



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL



**ALTERNATIVAS AL ANHÍDRIDO SULFUROSO EN
LA ELABORACIÓN DE VINOS: ANTIOXIDANTES DE
NATURALEZA FENÓLICA PROCEDENTES DE
SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA OLEÍCOLA Y
ENOLÓGICA**

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Rafaela Montemayor Raposo Ortega

Bajo la dirección de las doctoras:

Emma Cantos Villar

Maria José Ruiz Moreno

2017

TITULO: ALTERNATIVAS AL ANHÍDRIDO SULFUROSO EN LA
ELABORACION DE VINOS: ANTIOXIDANTES DE NATURALEZA
FENOLICA PROCEDENTES DE SUBPRODUCTOS DE LA
INDUSTRIA OLEICOLA Y ENOLOGICA

AUTOR: *Rafaela Montemayor Raposo Ortega*

© Edita: UCOPress. 2017
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: Alternativas al anhídrido sulfuroso en la elaboración de vinos: antioxidantes de naturaleza fenólica procedentes de subproductos de la industria oleícola y enológica

DOCTORANDA: Rafaela Raposo Ortega

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Rafaela Raposo Ortega se incorporó al IFAPA Rancho de la Merced dentro del Área de Tecnología, Postcosecha e Industria Agroalimentaria en noviembre de 2012. Durante el primer año su actividad se centró en revisión bibliográfica y puesta a punto de métodos analíticos necesarios para el desarrollo de la línea de investigación a la cual se incorporó.

La doctoranda se ha formado en numerosas técnicas analíticas. En el laboratorio ha ayudado a la puesta a punto de métodos y equipos implicados en la determinación de compuestos volátiles. De forma paralela ha desarrollado una parte importante de su trabajo en bodega (controles de maduración, elaboración de vinos), y una parte, aunque mínima, en campo (seguimiento de sus variedades).

También ha participado activamente en el entrenamiento y selección de un panel de cata. El análisis sensorial es actualmente una de las habilidades de la doctoranda.

Sus dos estancias de investigación han complementado su formación, y le han dado más capacidad de independencia en su capacidad investigadora.

La Tesis aborda aspectos muy distintos y complementarios. Se han obtenido resultados muy interesantes, que han quedado recogidos en 8 publicaciones de impacto (5 publicadas y 3 en revisión actualmente). Todas las revistas se encuentran en el primer cuartil y son de alto impacto, lo que asegura la calidad de los resultados de la presente Tesis.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 6 de marzo de 2017

Fdo.: Emma Cantos Villar

Fdo.: M^a José Ruiz Moreno



ISABEL LOPEZ INFANTE, profesora del Departamento de Bromatología y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Córdoba,

CERTIFICA

Que la Memoria titulada: "*Alternativas al anhídrido sulfuroso en la elaboración de vinos: antioxidantes de naturaleza fenólica procedentes de subproductos de la industria oleícola y enológica*", realizada por **Rafaela Raposo Ortega**, bajo la dirección de Emma Cantos Villar y M^a José Ruiz Moreno, reúne las condiciones exigidas para optar al título de Doctor por la Universidad de Córdoba.

Y para que así conste firma la siguiente certificación

Córdoba, _8_ de _Marzo_ de _2017_

Fdo.: _María Isabel López Infante

Código:64oxu899XYGEL0c3egKiWkG1110dNj Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/			
FIRMADO POR	MARIA ISABEL LOPEZ INFANTE	FECHA	08/03/2017
ID. FIRMA	64oxu899XYGEL0c3egKiWkG1110dNj	PÁGINA	1/1

La presente tesis Doctoral ha sido realizada en el Centro IFAPA Rancho de la Merced en Jerez de la Frontera (Cádiz) y Centro IFAPA Alameda del Obispo (Córdoba), perteneciente al Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) dependiente de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural bajo la dirección de la Dra Emma Cantos Villa y Maria José Ruiz Moreno.

No obstante parte del estudio experimental se ha llevado a cabo en otros centros de investigación de reconocido prestigio:



El estudio de la actividad antioxidante y microbiológica de los extractos procedentes de subproductos de la industria oleica y enológica ha sido realizado en el Dpto. de Ciencia y Tecnología de los Alimentos en la Universidad Católica San Antonio de Murcia (Murcia, España).



El estudio del contenido polifenólico y aminos biogénicas en los vinos obtenidos con el extracto procedente de subproductos de la industria enológica ha sido realizado en el Dept. of Agricultural and Food Sciences, Alma Mater Studiorum, University of Bologna. (Bologna, Italia).



La realización del presente trabajo se ha llevado a cabo en el marco del proyecto de investigación RTA-2001-00002 *“Alternativas al anhídrido sulfuroso en la elaboración de vinos: antioxidantes de naturaleza fenólica procedentes de subproductos de la industria oleícola y enológica”* del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y con la concesión a Rafaela Montemayor Raposo Ortega de un beca de formación de Investigadores de tipo Predoctoral del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) según la Resolución de convocatoria de 1 de octubre de 2012 (BOE 27 de octubre de 2012).

INFORME DEL FACTOR DE IMPACTO DE LAS PUBLICACIONES DE LA TESIS

Publicación	Factor de Impacto (2015)	Cuartil/Categoría
Efficacy of olive oil mill extract in replacing sulfur dioxide in wine model. LWT - Food Science and Technology , (2015) 61(1), 117–123	2.711	1° Food Science & Technology
Replacement of sulfur dioxide by hydroxytyrosol in white wine: influence on both quality parameters and sensory. LWT - Food Science and Technology , (2016) 65, 214–221		
Valorization of grape stems. Industrial Crops and Products , (2015) 63, 152–157	3.449	1° Agricultural Engineering - SCIE; Agronomy - SCIE;
Effect of hydroxytyrosol on quality of sulfur dioxide-free red wine. Food Chemistry , (2016) 192, 25–33	4.052	1° Food Science & Technology
Grapevine-shoot stilbene extract as a preservative in red wine. Food Chemistry , (2016) 197, 1102-1111		
Sulfur free red wines through the use of grapevine shoots. Part 1: impact on wine quality and safety. Food Chemistry , (2017) EN REVISIÓN		
Sulfur free red wines through the use of grapevine shoots. Part 2: volatile compounds and sensorial properties Food Chemistry , (2017) EN REVISION		
Grapevine-shoot stilbene extract as a preservative in white wine. Journal Food Science and Technology , (2016) EN REVISIÓN	1.241	3° Food Science & Technology

AGRADECIMIENTOS

Quiero mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido al desarrollo de este trabajo.

En primer lugar, expresar mi agradecimiento a mis dos directoras de tesis, Dra. Emma Cantos Villar y Dra. María José Ruiz Moreno, por su profesionalidad y calidad humana, por su dedicación y entrega, paciencia, el ánimo, el apoyo y por haber confiado en mí para este trabajo. Ambas han conseguido empujarme hasta donde hoy he conseguido llegar. “Mis Señoras Jefas” ¡GRACIAS INFINITAS!

A Belén Puertas, gracias por haber puesto ese grano en mi elección, por todo lo que me has enseñado, aconsejado y apoyado.

Al Dr. Fabbio Chinnici por haberme acogido, por todo lo que me ha enseñado, por el apoyo incondicional a esta extranjera y que sigue haciendo desde la distancia generosamente.

A Pilar Zafrilla y todo su equipo por lo enseñado y el trato que me dieron durante mi estancia en la Universidad de San Antonio de Murcia

Quiero agradecer al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Pesquera (INIA) la concesión de una beca de formación de Investigadores de tipo Predoctoral que ha posibilitado mi dedicación a este trabajo durante cuatro años. De igual modo al Instituto de Investigación y Formación, Agraria y Pesquera (IFAPA), Centro Rancho de la Merced (Jerez de la Frontera) donde he desarrollado mi esta Tesis. Así como al IFAPA Centro Alameda del Obispo (Córdoba).

A mis compañeros/as de fatiga:

Al Dr. Raúl Guerrero por lo enseñado, su ayuda en el laboratorio, su bendita paciencia y los buenos ratos.

A ellas, Dr. Zulema, María José y María Jesús, risas y cafés a raudales, y apoyo anímico todo el que quería y más. Gracias María José y María Jesús por ese gran apoyo en el laboratorio.

A Elías, Paco y Miguel por el apoyo en bodega y echarme una mano tan necesaria.

A Rocío y Carmen, gracias por los ánimos y las risas y esos benditos ratos de office.

A todo el quipo de viticultura, por su colaboración, asesoramiento en viña e interés por el estado de la tesis. Sin uva, no habría Tesis. Gracias equipo: José Luis, Ismail, Rubi, Juan Luis y José Antonio.

A esos vigilantes, Titín y Rai que tanto me han cuidado en esas tardes/noches infinitas

A la parte administrativa del IFAPA Rancho de la Merced, Ana, Piti, Carmen, sin ellas mis documentos seguirían en la bandeja de salida.

A los que me he encontrado y acompañado en este camino. Pepe, Rocío, Silvia, y compañía. A todos ellos gracias, mi estancia en Jerez no hubiera sido igual, le hubiera faltado música.

Y como no, a mis dos cuquis, Almudena y Maribel, que decir. No me he podido reír y llorar y las dos cosas a la vez más. Grandes donde las haya. Dos incondicionales para toda la vida. ¡¡GRACIAS!!

Y como no, en especial a mi familia, por todo su apoyo, a mi madre y hermanos, a mis incansables sobrinos. Y a él, que lo llevo en mi corazón, a mi padre.

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
ABREVIATURAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
CAPITULO I - INTRODUCCIÓN	1
I-1 Importancia del sector vitivinícola	3
I-2 El concepto de calidad en el vino	4
I-3 Parámetros que determinan la calidad en el vino	7
I-3.1 Propiedades enológicas	8
I-3.2 Control microbiológico	9
I-3.3 Polifenoles.....	13
I-3.4 Compuestos volátiles	17
I-3.5 Propiedades sensoriales	19
I-4 El sulfuroso en la elaboración del vino.....	23
I-4.1 Química y propiedades del SO ₂	23
I-4.1.1 Protección contra la oxidación.....	26
I-4.1.2 Inhibición y selección de levaduras y bacterias.....	28
I-4.1.3 Propiedades sensoriales sobre el vino.....	28
I-4.1.4 Capacidad de extracción	29
I-4.1.5 Efectos sobre la salud	29
I-4.2 Regulación en Europa del SO ₂ : concentraciones y etiquetado	30
I-5 Tratamientos alternativos al uso del SO ₂ en enología.....	32
I-5.1 Tratamientos físicos	34
I-5.1.1 Pulsos eléctricos	34
I-5.1.2 Ultrasonidos	35
I-5.1.3 Luz ultravioleta visible	36
I-5.1.4 Alta presión hidrostática	37
I-5.2 Tratamientos químicos y bioquímicos.....	37
I-5.2.1 Dicarbonato de dimetilo (DMDC) (E-242).....	37
I-5.2.2 Complejos de Plata	38

I-5.2.3 Lisozima	39
I-5.2.4 Bacteriocinas	41
I-5.2.5 Quitosano	42
I-5.2.6 Extractos vegetales ricos en polifenoles	44
I-6 Subproductos de la industria oleica y vitivinícola	47
I-6.1 Subproductos de la industria oleícola.....	47
I-6.2 Suproductos derivados de la industria vitivinícola.....	51
CAPITULO II – JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	57
CAPITULO III – MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
III-1 Caracterización de extractos polifenólicos.....	63
III-1.1 Extractos procedentes de subproductos de la industria agroalimentaria.....	63
III-1.2 Determinación del perfil polifenólico por HPLC de los extractos	64
III-1.2.1 Análisis de hidroxitirosol	64
III-1.2.2 Análisis de polifenoles.....	64
III-1.3 Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos	65
III-1.4 Evaluación de la capacidad antimicrobiana de los extractos	67
III-1.5 Determinación del perfil olfatométrico por CG-O de los extractos.....	68
III-2 Vinificación de vinos tintos y blancos	70
III-2.1 Productos con alto contenido en compuestos fenólicos	70
III-2.2 Material vegetal.....	70
III-2.2.1 Syrah	71
III-2.2.2 Sauvignon blanc	72
III-2.3 Control de maduración	73
III-2.3.1 Parámetros enológicos de la uva	73
III-2.3.2 Parámetros enológicos del mosto y vino	73
III-2.4 Métodos de elaboración.....	75
III-2.4.1 Método Tradicional de elaboración de vinos tintos.....	75
III-2.4.2 Método Ganimede® para la elaboración de vinos tintos.....	75
III-2.4.3 Método Tradicional de elaboración de vinos blancos.....	76
III-2.4.4 Método de elaboración en condiciones reductoras de vinos blancos	77

III-2.5 Vendimia 2013	77
III-2.6 Vendimia 2014	81
III-3 Análisis químicos de vinos	85
III-3.1 Parámetros enológicos	85
III-3.2 Determinaciones espectrofotométricas	87
III-3.3 Determinación de polifenoles por HPLC.....	89
III-3.3.1 Análisis de antocianicos.....	89
III-3.3.2 Compuesto fenólicos no antocianinas	89
III-3.3.3 Análisis de hidroxitirosol	90
III-3.3.4 Análisis de estilbenos	90
III-3.4 Análisis de aminas biógenas	91
III-3.5 Recuento de levaduras y bacterias	91
III-3.6 Determinación de compuestos volátiles por cromatografía de gases (CG)	92
III-3.7 Determinación del perfil olfatométrico por CG-O	93
III-3.8 Análisis sensorial.....	93
III-4 Análisis estadístico.....	96
CAPITULO IV – RESULTADOS	97
IV-1: Caracterización de extractos procedentes de subproductos de la industria enológica y oleica.....	101
PUBLICACIÓN 1. “Eficacia de un extracto rico en hidroxitirosol obtenido a partir de subproductos procedentes de la elaboración de aceite de oliva como sustituto del dióxido de azufre en vino modelo”	105
PUBLICACIÓN 2. “Revalorización de raspones de uva”.....	107
DISCUSIÓN IV-1	123
IV-2: Uso de productos ricos en hidroxitirosol procedentes de la industria oleica como alternativas al SO ₂ en la elaboración de vinos blancos y tintos.....	131
PUBLICACIÓN 3. “Efecto de extracto rico en hidroxitirosol sobre la calidad de vinos tintos sin SO ₂ ”	135
Discusión IV-2.1: Vinos Tintos de 2013.....	145
PUBLICACIÓN 4. “Sustitución del SO ₂ por hidroxitirosol en vino blanco: influencia tanto en los parámetros de calidad como en los sensoriales”	155

Discusión IV-2.2: Vinos Blancos de 2013	165
IV-3: Uso de un extracto de madera de poda como alternativa al SO ₂ en la elaboración de vinos blancos y tintos.....	175
PUBLICACIÓN 5. “Extracto de madera de poda rico en estilbenos como un conservante en vino tinto”	177
Discusión IV-3.1: Vinos Tintos de 2013	189
PUBLICACIÓN 6. “Extracto de madera de poda rico en estilbenos como un conservante en vino blanco”	195
Discusión IV-3.2: Vinos Blancos de 2013	231
IV-4: Optimización de la dosis e impacto en calidad y seguridad de vinos tintos	237
PUBLICACIÓN 7. “Vinos tintos libres de SO ₂ mediante el uso de madera de poda de la vid. Parte 1: impacto en la calidad y seguridad”.....	239
PUBLICACIÓN 8. “Vinos tintos libres de sulfitos mediante el uso de madera de poda de la vid. Parte 2: compuestos volátiles y propiedades sensoriales”	277
Discusión IV-4.1	319
PARTE 1.- Impacto del vineatrol en la calidad y seguridad del vino.....	319
PARTE 2.- Impacto del vineatrol en la composición volátil de los vinos	325
CAPITULO V - CONCLUSIONES.....	331
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	335

RESUMEN

RESUMEN

El anhídrido sulfuroso (SO₂) es el conservante más utilizado en la industria vitivinícola debido sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Sin embargo, dada su toxicidad y el creciente número de alergias asociadas a su ingesta existe gran interés en desarrollar alternativas que sean capaces de remplazar, o en su defecto, reducir la concentración de SO₂ en el vino.

Por otra parte, la industria agroalimentaria genera numerosas toneladas de subproductos al año, que suponen un importante problema desde un punto de vista medioambiental, especialmente procedentes de la producción de aceite de oliva, y de la industria enológica. Estos subproductos son muy ricos en compuestos antioxidantes, muchos de naturaleza polifenólica, entre los que se encuentra el hidroxitirosol (industria oleica) y los estilbenos (industria enológica).

En la presente Tesis Doctoral se estudió el efecto de productos, la mayoría de ellos elaborados a partir de subproductos, ricos en polifenoles sobre la calidad del vino blanco y tinto y su posible uso como alternativa al empleo de los sulfitos en vinificación. Inicialmente se evaluaron las propiedades antimicrobianas, antioxidantes y el perfil olfatométrico de dos extractos procedentes de la industria agroalimentaria. Seguidamente, se evaluó la aptitud tecnológica e impacto de productos ricos en polifenoles sobre la calidad del vino blanco y tinto, así como su evolución tras meses de envejecimiento en botella. Para finalizar se optimizó la dosis del producto rico en estilbenos que presentó mayor aptitud como posible sustituto del SO₂ en la elaboración de vinos, mediante un completo estudio de la calidad de los vinos incluyendo parámetros de calidad enológicos, parámetros relacionados con el color, composición volátil, compuestos fenólicos, perfil olfatométrico y propiedades sensoriales del vino.

En conjunto, los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis proponen a un extracto enriquecido en estilbenos procedente de madera de poda como alternativa natural y sostenible al empleo de SO₂ en enología.

Abstract

The most widely preservative used in the wine industry is sulfur dioxide (SO₂). Its antioxidant and antimicrobial properties make it essential nowadays. However, due to its toxicity and the increasing number of allergies associated with its intake, there is a great interest in finding alternatives other preservatives that can replace and/or reduce the SO₂ content in wines.

On the other hand, the agri-food industry generates many tons of by-products by year, which are an important environmental problem, especially those derived from the production of olive oil and the oenological industry. Above by-products are usually rich in antioxidant compounds, including hydroxytyrosol (oleic industry) and stilbenes (oenological industry).

In the current Thesis, the effect of products rich in polyphenols (most of the come from by-products) was evaluated on the quality of both white and red wines, looking for a natural alternative to sulfur dioxide in winemaking. Firstly, the antimicrobial and antioxidant properties as well as the olfatometric profile of extracts from the agri-food industry were evaluated. Subsequently, the impact of polyphenols-rich products on white and red wines properties was studied, at two stage of the process (bottling and aged in bottle). Finally, the selected polyphenol-rich product was tested at different dose. For this goal a wide study of wines including quality oenological parameters, parameters related to color, volatile composition, phenolic compounds, olfatometric profile and sensory wine properties was carried out

The results allow us to suggest an enriched-stilbene extract as a natural and suitable alternative to the use of SO₂ in oenology.

ABREVIATURAS

		A
A420	absorbancia a 420 nm	
A520	absorbancia a 520 nm	
A620	absorbancia a 620 nm	
AC	antocianinas compigmentadas	
AF	antocianinas libres	
ApH1	absorbancia a pH 1	
ApH3.2	absorbancia a pH 3.2	
AA	actividad antioxidante	
AAPH	2,2'-azobis(2-amidino-propano) diclorhidrato	
AcH	ácido acético	
AgNps	nanopartículas de plata	
ANOVA	análisis de varianza	
APH	alta presión hidrostática	
AUC	área bajo la curva de caída de FL	
AT	acidez total	
AV	acidez volátil	
		B
°Bé	grado Baumè	
BAL	bacterias ácido lácticas	
bl	blanco	
		C
°C	grado centígrado	
C	carbono	
CE	Comisión Europea	
CH ₃ CN	acetonitrilo	
CG-O	cromatografía de gases acoplado a olfatometría	
CG-SM	cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas	
cm	centímetro	
CO ₂	dióxido de carbono	
COI	Consejo oleícola internacional	
col.	colaboradores	
CPC	complejo de plata coloidal	
CT	control, vinos con adición de SO ₂	
Cu	cobre	
		D
DMDC	dicarbonato de dimetilo	
DMS	sulfuro de dimetilo	
DPPH	2-difenil-1-picrilhidrazil	
DEEMM	dietiletoximetilenmalonato	
		E
EEUU	Estados Unidos	
EFSA	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria	
etc.	etcétera	
EA	extractabilidad de antocianos	
		F
fi	fluorescencia a tiempo cero	

fo	fluorescencia a tiempo final	
FA	fermentación alcohólica	
FDA	American Food and Drug Administration	
Fe	hierro	
FL	fluoresceína	
FM	frecuencia modificada	
FML	fermentación maloláctica	
		G
g	gramo	
G-CT	vinos CT elaborados con el método Ganimede	
G-HTG	vinos HTG elaborados con el método Ganimede	
G-HTB	vinos HTB elaborados con el método Ganimede	
GRAS	generalmente reconocido como seguro	
GRP	grape reaction product	
G-VIN	vino VIN elaborado con el método Ganimede	
		H
h	hora	
ha	hectárea	
HCl	ácido clorhídrico	
hL	hectolitro	
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución	
hr	humedad relativa	
HSO ₃ ⁻	ión bisulfito	
HT	hidroxitirosol	
HTB	vinos elaborados con hidroxitirosol sintético (Biotech)	
HTB [®]	producto de HT producido por síntesis química. Suministrado por Seprox Biotech	
HTE	producto rico en HT procedente de subproductos de la oliva. Suministrado por Biomaslinic	
HTG	vinos elaborados con Hytolive	
HTG [®]	Hytolive, producto rico en HT procedente de subproductos de la oliva. Suministrado por Genosa	
hue	tonalidad	
HTE	extracto de oliva rico en HT. suministrado por Biomaslinic	
		I
I	Intensidad media	
I+D	investigación + desarrollo	
IC	intensidad colorante	
ICVV	Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino	
IPT	índice de polifenoles totales	
IFAPA	Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera	
IFC	Índice de Folin-Ciocalteu	
INE	Instituto Nacional de Estadística	
ISO	Organización Internacional para la Normalización	
		K
K	potasio	
kg	kilogramo	
K ₂ S ₂ O ₅	metabilsulfito de potasio	
kV	kilovoltio	
		L

L	litro	
LDL	lipoproteína de baja densidad	
LRI	índice de retención lineal	
LS	nivel de significación	
		M
m	metro	
MAPAMA	Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente de España	
MEA	agar de extracto de malta	
MeOH	metanol	
min	minuto	
mg	miligramo	
mL	mililitro	
mm	milímetro	
mM	milimolar	
mmol	milimolar	
mM	micromolar	
MPa	mega pascal	
MRS	Man, Rogosa y Sharpe Agar	
mtr	muestra	
		N
N	normalidad	
n.d.	no detectado	
n.i.	no identificado	
NaCl	cloruro sódico	
Na ₂ S ₂ O ₅	metabilsulfito de sodio	
NIST	National Institute of Standards and Technology	
nm	nanómetro	
nM	nanomolar	
n.s.	no significativa	
		O
OAV	valor de actividad odorante	
OIV	Organización Internacional de la Viña y el Vino	
ORAC	Oxygen Radical Scavenging Capacity (capacidad de absorción de radicales libres)	
		P
p/p	peso/peso	
P ₁₀₀	peso de 100 bayas	
PEF	campo eléctrico pulsado	
PIB	Producto Interior Bruto	
Pm	peso medio	
PP	pigmentos poliméricos	
PCA	análisis de componentes principales	
PLS	análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales	
POD	peroxidasa	
PPO	polifenoloxidasas	
		R
R-CT	vinos CT elaborados en condiciones reductoras	
R-HTG	vinos HTG elaborados en condiciones reductoras	
R-HTB	vinos HTB elaborados en condiciones reductoras	

R-VIN	vino VIN elaborado en condiciones reductoras	
r.p.m.	revoluciones por minuto	
ROS	especies reactivas del oxígeno	
RS	residuo medio	S
s	segundo	
Sb	Sauvignon blanc	
SO ₂	dióxido de azufre	
SO ₃ ²⁻	ión sulfito	
<i>spp</i>	especie	
STE	extracto rico en polifenoles procedentes de raspones de la uva	
Syr	Syrah	T
T	temperatura	
TH ₂	ácido tartárico	
Tn	tonaleda	U
UE	Unión Europea	
UFC	unidades formadoras de colonias	
UP	umbral de percepción	
US	Ultrasonidos	
UV	Ultravioleta	
UV-A	Ultravioleta A	
UV-B	Ultravioleta B	
UV-C	Ultravioleta C	
UV-vis	Ultravioleta visible	
UCAM	Universidad Católica San Antonio de Murcia	V
v	volumen	
v/v	volumen/volumen	
VIN®	extracto Vineatrol	
VIN	vino elaborado con Vineatrol	Z
ZO	Zona odorante	
		símbolo
3MH	3-mercapto-1-hexanol	
3MHA	3-mercaptohexil acetato	
4MMP	4-mercapto-4-metil-2-pentanona	
ΔE^*_{ab}	diferencia de color entre muestras	
ΔFM	diferencia en la frecuencia modificada entre los vinos	
ρ	densidad	
ρ_r	densidad relativa	
λ	fase de latencia	
λ_{ex}	longitud de onda de excitación	
λ_{em}	longitud de onda de emisión	
μL	microlitro	
μm	micrómetro	
μ_{max}	velocidad máxima de crecimiento específico	
μs	microsegundo	

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1. Distribución territorial de la superficie de viñedo de transformación por Comunidades Autónomas.....	3
Figura 1.2. Factores que determinan la composición y calidad del vino	5
Figura 1.3. Compuestos flavonoides y no flavonoides más comunes en el vino ...	14
Figura 1.4. Principales reacciones químicas de las antocianinas y su influencia en el color	17
Figura 1.5. Equilibrio químico y porcentaje de las distintas formas del anhídrido sulfuroso cuando es adicionado como metabisulfito potásico al vino	24
Figura 1.6. Reacción de Fenton: oxidación de etanol en vinos	27
Figura 1.7. H ₂ O ₂ formado por la oxidación de los catecoles apresado por SO ₂	27
Figura 1.8. Posible mecanismo de reacción del SO ₂ con el peróxido de hidrógeno	27
Figura 1.9. Posible reacción de iones bisulfito con quinonas	28
Figura 1.10. Hidroxitirosol derivado de la hidrólisis de la oleuropeina, naturalmente presente en las aceitunas y la hoja de la oliva.....	49
Figura 1.11. Contenido de los distintos polifenoles en los residuos obtenidos en la industria vitivinícola.....	52
Figura 1.12. Estructura química de monómeros y dímeros de estilbenos en madera de poda	55

CAPÍTULO 3

Figura 3.1. Uvas Syrah.....	71
Figura 3.2. Uvas Sauvignon blanc	72
Figura 3.3. Disoluciones concentradas (HTB 11 g/L; HTG 36 g/L, VIN 17.6 g/L) en matriz vínica de los productos comerciales utilizados en la vinificación tradicional de vinos tintos en la vendimia 2013.	81
Figura 3. 4. Tapones de corcho microaglomerado-Seleccork	81
Figura 3.5. Tapón sintético Excellent cork S.L.	82

Figura 3.6. Diagrama de vinificación de vino Syrah 2013	83
Figura 3.7. Diagrama de vinificación de vino Sauvignon blanc 2013	83
Figura 3.8. Diagrama de vinificación de vino Syrah 2014	84

CAPÍTULO 4

Figura 4.1. Cromatograma obtenido por HPLC-FI del extracto rico en hidroxitirosol (HTE).....	123
Figura 4.2. Cromatograma obtenido por HPLC-DAD del extracto rico en polifenoles (STE)	123
Figura 4.3. Cromatograma obtenido por HPLC-FI del producto rico en hidroxitirosol HTB (A) y HTG (B).....	132
Figura 4.4. Análisis sensorial de vinos Syrah elaborados mediante el método tradicional y método Ganimede. en el embotellado y a los seis meses	152
Figura 4.5. Análisis sensorial de vinos Sauvignon blanc elaborados mediante el método tradicional y condiciones reductoras, en el embotellado y a los seis meses de envejecimiento en botella.....	170
Figura 4.6. Cromatograma obtenido por HPLC-PDA del extracto rico en estilbenos (VIN) a 280 (gris) y 320 nm (negra) de absorbancia	175
Figura 4.7. Compuestos volátiles en los vinos de Syrah elaborados con SO ₂ y Vineatrol mediante el método tradicional (CT y VIN) y el sistema Ganimede (G-CT y G-VIN).....	190
Figura 4.8. Compuestos volátiles en los vinos de Syrah elaborados con SO ₂ y Vineatrol elaborados por el método tradicional (CT y VIN) y sistema Ganimede (G-CT y G-VIN).....	233
Figura 4.9. Perfil cromatográfico obtenido por HPLC-DAD de las antocianinas determinadas en el vino.....	322
Figura 4. 10. Análisis de componentes principales en vinos Syrah	324

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 1

Tabla 1.1. Principales alteraciones de los vinos producidas por levaduras y bacterias	11
Tabla 1.2. Compuestos aromáticos característicos del vino	18
Tabla 1.3. Factores importantes en la calidad del vino	20
Tabla 1.4. Grupos y nombre común de los descriptores más comunes utilizados en el análisis sensorial de los vinos	21
Tabla 1.5. Defectos en vinos	22
Tabla 1.6. Ventajas y desventajas del SO ₂	25
Tabla 1.7. Resumen de las concentraciones de sulfuroso permitidas en los vinos por países.....	31
Tabla 1.8. Alternativas químicas y físicas al sulfuroso: efectos y desventajas.	32
Tabla 1.9. Contenido de hidroxitirosol y tirosol en vinos	48
Tabla 1.10. Rango de concentraciones de estilbenos en vino	53

CAPÍTULO 3

Tabla 3.1. Resumen de los volúmenes adicionados de las disoluciones concentradas de los conservantes utilizados en las distintas fases de la vinificación de vino tinto por el método tradicional y método Ganimede durante la vendimia de 2013.	79
Tabla 3.2. Resumen de los volúmenes adicionados de las disoluciones concentradas de los conservantes utilizados en las distintas fases de vinificación de vino blanco por el método tradicional y método Ganimede durante la vendimia de 2013.	80
Tabla 3.3. Resumen de los gramos adicionados de los extractos/conservantes por depósito en las distintas fases de la vinificación de vino tinto por el método Ganimede durante la vendimia de 2014.....	82

CAPÍTULO 4

Tabla 4.1. valores DPPH y ORAC de los extractos HTE y STE.....	124
--	-----

Tabla 4.2. Fase de latencia (λ) y velocidad de crecimiento máximo (μ_{max}) de microorganismos (testigo), y de microorganismos expuestos a SO ₂ y a los extractos HTE y STE.....	125
Tabla 4.3. Zonas odorantes comunes para cada extracto (HTE y STE) en las distintas concentraciones (50 y 80 mg/L) con una FM(%) \geq 70	128
Tabla 4.4. Ensayos realizados en la vendimia 2013 en vinos Syrah	145
Tabla 4.5. Parámetros enológicos en vinos Syrah embotellados	146
Tabla 4.6. Parámetros relacionados con el color en vinos Syrah embotellados y tras 6 meses de envejecimiento en botella	148
Tabla 4.7. Compuestos volátiles en vinos Syrah (mg/L).....	149
Tabla 4.8. Zonas odorantes encontrados en vinos Syrah tras seis meses de envejecimiento en botella cuya frecuencia modificada (%) \geq 40	153
Tabla 4.9. Ensayos realizados en la vendimia 2013 en vinos Sauvignon blanc .	165
Tabla 4.10. Parámetros enológicos determinados en vinos Sauvignon blanc.....	166
Tabla 4.11. Parámetros relacionados con el color determinados en vinos Sauvignon blanc	167
Tabla 4.12. Compuestos volátiles en vinos Sauvignon blanc (mg/L)	168
Tabla 4.13. Zonas odorantes encontrados en vinos Sauvignon blanc con una Δ FM (%) \geq 40	172
Tabla 4.14. Ensayos realizados en la vendimia 2013 en vinos Syrah	189
Tabla 4.15. Principales zonas odoríferas diferentes encontradas en vinos de Syrah	192
Tabla 4.16. Principales zonas odoríferas diferentes encontradas en vinos de Sauvignon blanc.....	235
Tabla 4.17. Ensayos realizados en la vendimia 2014 en vinos Syrah elaborados mediante el método Ganimede	319

CAPITULO I
INTRODUCCIÓN

I-1 Importancia del sector vitivinícola

El sector vitivinícola tiene una gran importancia económica, social y medioambiental, tanto en España como en Europa. Según datos de la OIV, en 2012 la superficie vitícola ocupaba 7487000 ha, y una producción mundial de vino de 258 millones de hL, siendo España el país con mayor superficie vitícola (13.6% de la extensión vitícola mundial y 54.7% de la extensión vitícola europea) y el tercer país productor de vino del mundo (12.1% de la producción mundial y 18.8% de la producción de vino europeo) (OIV, 2015).

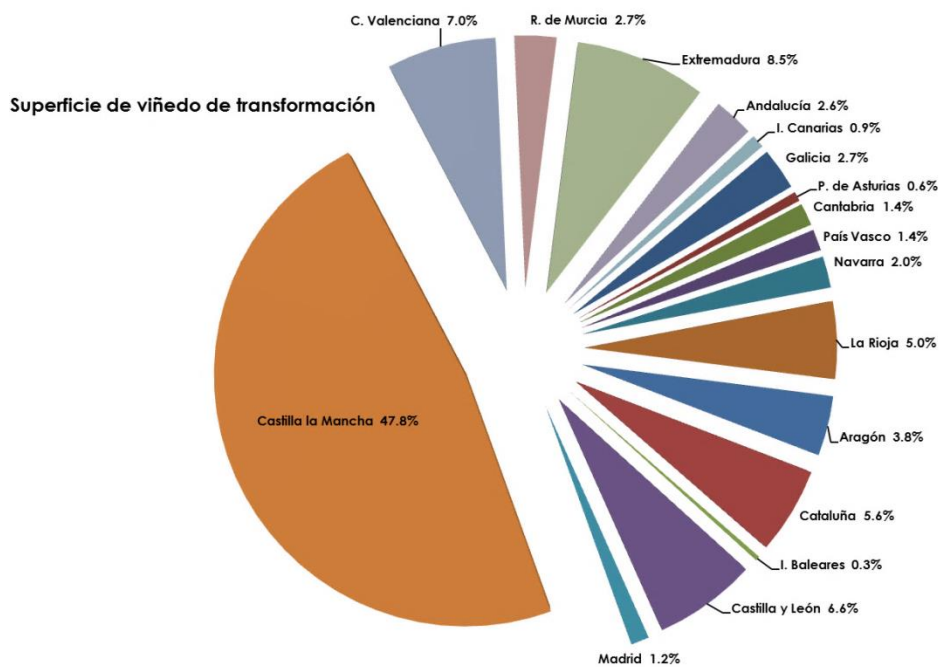


Figura 1.1. Distribución territorial de la superficie de viñedo de transformación por Comunidades Autónomas. Año 2012 (Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente)

Presente en todas las provincias de España (Figura 1.1), es el país del mundo con mayor superficie de vid cultivada (941154.86 ha) y una producción de uva de 5911600 toneladas (MAPAMA, 2015f). España es el tercer país productor de vino del mundo, con una producción total estimada de de 43767.1 miles de hL en 2016 (MAPAMA, 2015a). Formada por 4052 empresas, la industria vinícola conforma el 14.33% de toda la industria alimentaria española (MAPAMA, 2015e). Supone, con 5843.7 millones de €, el 6.26% del total de las ventas netas de producto de la Industria Alimentaria (el 0.54% del PIB español) y un 10.35% del total de las exportaciones de la Industria Alimentaria (2638 millones de €),

situándose dentro de los 10 sectores industriales más importantes de España (MAPAMA, 2015e).

La gran importancia económica, social y medioambiental del sector vitivinícola, y su despegue en las últimas décadas, han promovido la necesidad de practicar una vitivinicultura más competitiva, obteniendo uva de alta calidad a unos costes de producción sostenibles. En este sentido, en los últimos treinta años España ha pasado de destinar el 38.6% (1996) de la producción total de vino a un 88% (2015) a vino de calidad (MAPAMA, 2015c). Se observa así una reorientación del sector vitivinícola hacia producciones de vinos de calidad como resultado de un proceso de recualificación de la viticultura, la vinificación, los canales de distribución y el propio hecho del consumo final. Este proceso incorpora nuevos valores, atributos o cualidades a la definición de la calidad de los alimentos, como puede ser su procedencia geográfica, su sostenibilidad ambiental, su efecto protector, o al menos no nocivo, sobre la salud (Langreo & Castillo, 2014). Por tanto, en la estrategia competitiva global de la vitivinicultura es fundamental buscar nuevas tecnologías, técnicas de gestión innovadora y nuevas metodologías, más saludables y seguras, sin que se vea mermada la calidad del vino.

I-2 El concepto de calidad en el vino

La Organización Internacional de Normalización (ISO) define **calidad** como la capacidad de un producto o servicio de satisfacer las necesidades declaradas o implícitas del consumidor a través de sus propiedades o características. Desde este punto de vista, la calidad es una noción subjetiva (ligada al consumidor), la cual además está sometida a los mismos cambios que se suceden en la sociedad a lo largo del tiempo (Lucena Cobos, Cáceres Clavero, Cruz Gómez, & Méndez Rodríguez, 2004).

El concepto de **calidad**, aplicado al sector agroalimentario, puede incluir las siguientes categorías (Oyarzún & Tartanac, 2002):

- **Calidad nutricional.** La calidad referida a la aptitud de los alimentos para satisfacer las necesidades del organismo en términos de energía y nutrientes. Este factor ha adquirido gran relevancia para el consumidor informado que conoce el potencial preventivo de una dieta saludable y equilibrada.

- **Seguridad alimentaria.** La calidad como resguardo de inocuidad, esto es, que el alimento se encuentre libre de contaminaciones que supongan una amenaza para la salud.
- Calidad definida por los **atributos de valor.** Estos atributos son factores que están más allá de la calidad básica nutricional o de inocuidad de un alimento, y diferencian los productos de acuerdo a sus características organolépticas y a la satisfacción del acto de alimentarse ligada a factores socioculturales, tradicionales, medioambientales, éticos, etc.

La calidad en el vino viene definida por sus atributos sensoriales, los cuales están determinados por las propiedades físico-químicas del vino. El valor que toman estas variables físico-químicas es muy variable de un vino a otro, y depende de multitud de factores. Estos factores de calidad pueden agruparse en dos tipos (*Figura 1.2*):

1. no modificables o naturales: suelo, clima, material vegetal (portainjerto y variedad), etc.
2. modificables, es decir, con importante intervención del hombre: cultivo, técnicas de elaboración, procesos de crianza, etc.

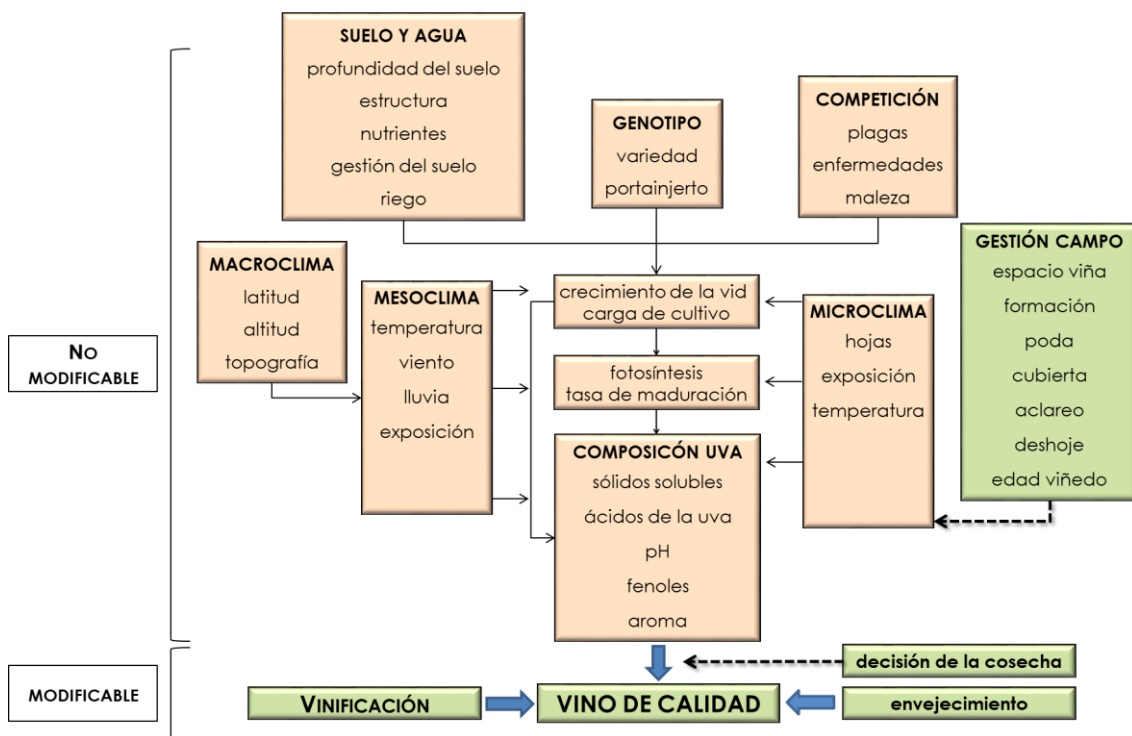


Figura 1.2. Factores que determinan la composición y calidad del vino (verde: factor modificable; naranja: factor no modificable) (extraído de Jackson & Lombard, 1993)

El análisis físico-químico de los vinos es una manera cuantitativa idónea y fiable para la evaluación de la calidad asociada a una evaluación sensorial cualitativo

(gusto, vista y olfato). Son muchos los componentes físicos y químicos y sus interacciones que en este sentido determinan la calidad final de un vino, entre los cuales se encuentran azúcares, alcoholes, proteínas, ácidos orgánicos, sales minerales, microbiología, compuestos fenólicos y compuestos aromáticos (Arrhenius, McCloskey, & Sylvan, 1996; Jackson & Lombard, 1993; Lambrechts & Pretorius, 2000). Los dos últimos son considerados como los parámetros más importantes con los que juzgar la calidad de uva, mosto fermentado y vino terminado (Guth, 1997; Harbertson & Spayd, 2006; Rapp & Mandery, 1986; Sáenz-Navajas et al., 2015).

Los polifenoles son constituyentes esenciales y responsables de importantes propiedades organolépticas, incluyendo las sensaciones bucales y el color de vinos tintos (Avizcuri, Sáenz-Navajas, Echávarri, Ferreira, & Fernández-Zurbano, 2016; Boulton, 2001; Gao et al., 2015; Heras-Roger, Alonso-Alonso, Gallo-Montesdeoca, Díaz-Romero, & Darias-Martín, 2016; Moreno-Arribas & Polo, 2009; Oliveira, Ferreira, De Freitas, & Silva, 2011; Santos-Buelga & Freitas, 2009; Sarni-Manchado, Fulcrand, Souquet, Cheynier, & Moutounet, 1996; Pascale Sarni-Manchado, Cheynier, & Moutounet, 1999; Soares, Brandão, Mateus, & De Freitas, 2017). De un lado, la fase visual cobra cada vez más importancia en la calidad de los productos alimenticios por su clara y directa incidencia sobre la aceptación y preferencia de los consumidores. El vino no es ajeno a esta situación y su aspecto se hace más importante, sobre todo a medida que el consumidor es más exigente y adquiere más conocimientos sobre el producto. Factores como la limpidez (brillo, transparencia, etc.) y color, en su sentido más amplio, son las características visuales más importantes de los vinos, y todas ellas están estrechamente ligadas a los polifenoles (Boido, Alcalde-Eon, Carrau, Dellacassa, & Rivas-Gonzalo, 2006; Harbertson & Spayd, 2006; Perez-Magarino & Gonzalez-San Jose, 2004). Los polifenoles también son responsables de la capacidad antioxidante (Canas, Casanova, & Pedro Belchior, 2008; Di Majo, La Guardia, Giammanco, La Neve, & Giammanco, 2008; Paixão, Perestrelo, Marques, & Câmara, 2007) y actúan como sustratos para reacciones de pardeamiento (Li, Guo, & Wang, 2008; Waterhouse & Laurie, 2006). Los vinos más ricos en sustratos ortofenólicos se oxidan antes, aumentando su tonalidad, y apareciendo más rápidamente los tonos pajizos, marrones o pardos en los vinos blancos, y los anaranjados y tejas en los vinos rosados y tintos, respectivamente. La contribución de los fenoles a la sensación de amargor, y su

capacidad astringente aumenta considerablemente la persistencia de la sensación bucal, y contribuye al «cuerpo» del vino confiriéndole estructura.

Por su parte, la fracción volátil juega un papel destacado en las características organolépticas del vino. El flavor es una característica distintiva importante del vino y, en un sentido amplio, se dice que es la impresión sensorial resultado de la combinación de todas las sensaciones percibidas en la calidad bucal y nasal incluyendo aroma, sabor y sensaciones táctiles (Lambrechts & Pretorius, 2000; Lawless & Heymann, 1999; Swiegers, Bartowsky, Henschke, & Pretorius, 2005). El aroma es el principal contribuyente a la percepción del flavor general y uno de los parámetros más importantes que influyen en la calidad y especificidad del vino y la aceptación del consumidor.

I-3 Parámetros que determinan la calidad en el vino

La evaluación de los factores que pueden influir en la calidad del vino se hace especialmente difícil por los problemas para determinar la calidad. El vino es una matriz compleja formada por un gran número de moléculas, las cuales sufren grandes cambios a lo largo de la vida del vino, de ahí su naturaleza dinámica. Una etapa crucial en la evolución del vino es la que transcurre una vez que el vino es embotellado. En esta etapa se producen un gran número de reacciones que dan lugar a cambios químicos y sensoriales. Estas modificaciones implican cambios en el aroma, el color, la astringencia o acidez. Es por ello que la etapa de envejecimiento en botella es crucial para la evolución del vino y es clave su control, ya que de ésta depende la percepción de la calidad del mismo (Alcalde-Eon, Escribano-Bailón, Santos-Buelga, & Rivas-Gonzalo, 2006; Antalick, Perello, & de Revel, 2014; Coetzee, Van Wyngaard, Šuklje, Silva Ferreira, & du Toit, 2016; Gambuti, Rinaldi, Ugliano, & Moio, 2013; Godden et al., 2001; Monagas, Bartolomé, & Gómez-Cordovés, 2005; Monagas, Gómez-Cordovés, & Bartolomé, 2005; Recamales, Sayago, González-Miret, & Hernanz, 2006)

El análisis detallado de la composición química y microbiológica del vino puede relevar la existencia de defectos en el amplio concepto de la calidad. El análisis químico de los vinos sería un método ideal de evaluación fiable siempre vinculada a la evaluación sensorial (Conde et al., 2007; Jackson & Lombard, 1993). En este sentido, las principales propiedades que se han relacionado con la calidad del vino y que son importantes controlar para la obtención de un vino

de calidad son: las propiedades enológicas, microbiológicas, antioxidantes y sensoriales (Guerrero & Cantos-Villar, 2015).

I-3.1 Propiedades enológicas

Los parámetros que determinan la idoneidad del mosto y vino, de acuerdo a los estándares de legalidad y la calidad del vino finalizado, son el azúcar, densidad, grado de alcohol, pH, acidez total, acidez volátil, SO₂, color y extracto seco, entre otros (Jackson & Lombard, 1993).

Azúcares y grado alcohólico. Durante la fermentación, la glucosa y la fructosa, principales azúcares presentes en la uva y el mosto de uva, son transformadas en etanol por la acción de las levaduras, generalmente *Saccharomyces cerevisiae*. Además del etanol, se producen pequeñas cantidades de otros compuestos, con alto impacto en la calidad del vino, como el glicerol (4-9 g/L en vinos) que contribuye al dulzor y el cuerpo de los vinos (Remize, Sablayrolles, & Dequin, 2000; Zuzuarregui, Carrasco, Palacios, Julien, & Olmo, 2005).

pH y acidez. El pH del vino es uno de los parámetros más importantes para la calidad. Éste refleja la cantidad y la fuerza de los ácidos presentes en el vino y que afectan a los parámetros sensoriales, tales como color, acidez y amargor. Por otra parte, el contenido en ácidos afecta también a la estabilidad microbiológica del vino. pH altos aumenta la actividad de microorganismos, tales como las bacterias, baja la intensidad del color en los vinos tintos y puede reducir la capacidad del vino para envejecer. Así, a pH 3-4 se evita el desarrollo de bacterias alterantes (Conde et al., 2007).

Altas cantidades de ácidos orgánicos y etanol, junto con pequeñas cantidades de azúcares, hacen que los vinos sean un ambiente inapropiado para muchos microorganismos, y, por tanto, los vinos serán muchos más estables microbiológicamente. Por otra parte, la acidez permite mantener la frescura de los vinos a la vez que modela los componentes relacionados con el flavor y el color (Coetzee & du Toit, 2015; Conde et al., 2007).

Color. El color es un parámetro de calidad indiscutible en la elaboración del vino. Por lo general, es la primera propiedad organoléptica de un vino que es percibida y, por lo tanto, responsable de la primera opinión que un consumidor da a un vino. El rechazo inicial de un vino por los consumidores puede ser debido no sólo a su mal color o la presencia de precipitados en la botella, sino también a unas tonalidades inesperadas en relación con su edad. Por otra parte,

el color puede condicionar la percepción de las propiedades de aroma, sabor, sensación en la boca o de un vino (Hernanz et al., 2009; Morrot, Brochet, & Dubourdieu, 2001; Österbauer et al., 2005).

El color y la estabilidad del color de los vinos están relacionados con el contenido de compuestos fenólicos, siendo las reacciones de oxidación, condensación, polimerización, etc., en las que los compuestos fenólicos son los responsables de la continua evolución de la cromaticidad del vino. En el caso de los vinos blancos son esencialmente las reacciones de pardeamiento, enzimático en los mostos y no enzimático en los vinos, las que condicionan el color, que varía desde el amarillo pálido de los vinos poco o nada «oxidados» hasta los tonos marrones o incluso negros de los vinos muy oxidados. La presencia de sustratos adecuados para ambas reacciones condiciona el potencial de pardeamiento; así durante la manipulación de las uvas y mostos la actuación de la polifenoloxidasas (PPO) se ha descrito como el factor más importante de pardeamiento (Véronique Cheynier, Souquet, Kontek, & Moutounet, 1994; Du Toit, Marais, Pretorius, & Du Toit, 2006; Macheix, Sapis, Fleuriet, & Lee, 1991; Singleton & Trousdale, 1983).

En el caso de vinos tintos y rosados, la cromaticidad se asocia más con la presencia de antocianos y de los pigmentos derivados de ellos y formados mediante reacciones de copigmentación, condensación y cicloadición. Estas reacciones modifican la intensidad, tonalidad y estabilidad del color del vino (*Figura 1.4*) (Asenstorfer, Markides, Iland, & Jones, 2003; Bimpilas, Panagopoulou, Tsimogiannis, & Oreopoulou, 2016; Boulton, 2001; Fulcrand, Dueñas, Salas, & Cheynier, 2006; González-Manzano, Dueñas, Rivas-Gonzalo, Escribano-Bailón, & Santos-Buelga, 2009; He et al., 2012; He et al., 2012; Heras-Roger et al., 2016; Hermosín-Gutiérrez, Lorenzo, & Espinosa, 2005; Rentzsch, Schwarz, Winterhalter, & Hermosín-Gutiérrez, 2007; Schwarz, Hofmann, & Winterhalter, 2004). Estas reacciones están influenciadas por factores tales como temperatura, pH, sulfitos y contenido de oxígeno en el vino (Morata, Gómez-Cordovés, Calderón, & Suárez, 2006; Sacchi, Bisson, & Adams, 2005; Somers, 1986).

I-3.2 Control microbiológico

El proceso de fermentación del mosto de uva es un proceso complejo que incluye la interacción de distintos microorganismos presentes en la uva o la bodega

(Fleet, 2003; Fugelsang & Edwards, 2007; Renouf, Claisse, & Lonvaud-Funel, 2005; Ribereau-Gayon, Dubourdieu, Doneche, & Lonvaud, 2006; Ugliano & Henschke, 2009). El proceso incluye dos etapas principales: la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica. La **fermentación alcohólica** (FA) es un proceso bioquímico llevado a cabo por las levaduras en el que se transforman los azúcares del mosto de la uva en etanol, CO₂ y otros compuestos químicos que contribuyen a la composición química y al flavor del vino resultante. Durante esta etapa, las condiciones del medio se modifican, como por ejemplo el aumento de concentración de etanol y la disminución de pH, produciéndose una selección natural a favor de aquellos microorganismos que mejor se adaptan a las nuevas condiciones. Como resultado de estos cambios en el medio la población de levaduras disminuye, mientras que la población de diversas especies de bacterias lácticas (BAL) aumenta, iniciándose la **fermentación maloláctica** (FML) (Lafon-Lafourcade, Lonvaud-Funel, & Carre, 1983; Ribereau-Gayon, Dubourdieu, et al., 2006) donde se produce una transformación del ácido málico en ácido láctico, causando una reducción de la acidez. Además, la FML contribuye a la estabilidad microbiológica y la calidad organoléptica de los vinos (Davis, Wibowo, Eschenbruch, Lee, & Fleet, 1985; Davis, Wibowo, Fleet, & Lee, 1988).

La ecología microbiana que llevan a cabo la FA y la FML y el grado en que estas especies individuales crecen, determinan los tipos y concentraciones de los muchos compuestos que pueden contribuir a las características del aroma y sabor del vino. Y, por tanto, están estrechamente relacionados con la calidad del vino (Fleet, 2003; Lambrechts & Pretorius, 2000; Romano, Fiore, Paraggio, Caruso, & Capece, 2003).

Las levaduras y las BAL, principalmente la especie *Saccharomyces cerevisiae* y *Oenococcus oeni*, respectivamente, desempeñan un papel importante en la elaboración del vino, contribuyendo de manera favorable en la calidad y las propiedades deseables del vino (Dicks, Dellaglio, & Collins, 1995; Lonvaud-Funel, 1999; Swiegers et al., 2005; Ugliano & Henschke, 2009). Sin embargo, en condiciones no controladas, las levaduras y las bacterias presentes en el vino, incluyendo las BAL, pueden dar lugar a un detrimento de la calidad del vino. Para evitar cualquier impacto negativo en la calidad organoléptica del producto final la participación de levaduras alterantes y el control de la FML debe ser controlada (Couto, Campos, Figueiredo, & Hogg, 2006; Loureiro &

Malfeito-Ferreira, 2003; Malfeito-Ferreira, 2011). A modo de resumen en la *Tabla 1.1* se recogen las principales alteraciones de los vinos producidos por levaduras y bacterias presentes en el vino (Du Toit & Pretorius, 2000).

Tabla 1.1. Principales alteraciones de los vinos producidas por levaduras y bacterias (adaptado de Du Toit & Pretorius, 2000)

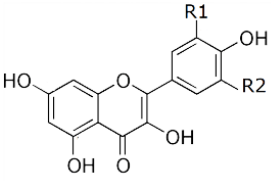
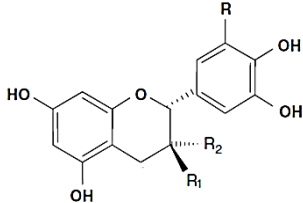
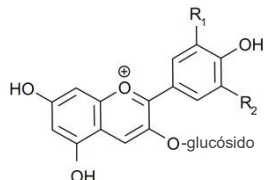
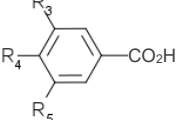
Levaduras alterantes	Alteración
<i>Brettanomyces bruxellensis</i> Anamorfo: <i>Dekkera bruxellensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> - producen fenoles volátiles y tetrahidropiridinas - incrementan los niveles de ácido acético
<i>Candida spp.</i> <i>C. vini</i> <i>C. stellata</i> <i>C. pulcherrima</i> <i>C. krusei</i>	<ul style="list-style-type: none"> - incrementan las concentraciones de acetaldehído, ácidos volátiles y ésteres
<i>Hanseniaspora uvarum</i> Anamorfo: <i>Kloeckera apiculata</i>	<ul style="list-style-type: none"> - producen altos niveles de ácido acético y sus ésteres
<i>Hansenula anómala</i> (<i>Pichia anómala</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - incrementa los niveles de acetato de etilo, acetato de isoamilo y acetato de metilbutilo
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<ul style="list-style-type: none"> - crecimiento en forma de película - incrementa los niveles de acetato de etilo y acetaldehído
<i>Pichia spp.</i> <i>P. anomala</i> <i>P. membranifaciens</i> <i>P. Vini</i>	<ul style="list-style-type: none"> - producen capas de aspecto calcáreo - produce altos niveles de acetaldehído
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<ul style="list-style-type: none"> - re-fermentación de vinos con azúcares residuales
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	<ul style="list-style-type: none"> - produce elevadas concentraciones de acetaldehído - aporta viscosidad
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<ul style="list-style-type: none"> - re-fermentación de vino embotellado - desacidifica el vino
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<ul style="list-style-type: none"> - provoca turbidez y la aparición de sedimentos - incrementa los niveles de ácido acético y reduce la cantidad de málico - fermentación secundaria de vinos con grandes cantidades de CO₂
Bacterias lácticas	
<i>Lactobacillus brevis</i>	<ul style="list-style-type: none"> - produce precursores de carbamato de etilo - consume ácido tartárico - provoca la acidificación de los vinos - producción de manitol
<i>Lactobacillus hilgardii</i> <i>Lactobacillus cellobiosus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - producen tetrahidropiridinas - provocan amargor como consecuencia del metabolismo del glicerol

<i>Lactobacillus kunkeei</i>	- produce altos niveles de ácido acético que está implicado en paradas de fermentación
<i>Lactobacillus plantarum</i>	- provoca degradación de tartrato - incrementa los niveles de diacetilo
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	- aporta viscosidad - provoca amargor como consecuencia del metabolismo del glicerol
<i>Oenococcus oeni</i>	- produce precursores de carbamato de etilo - produce histamina - implicada en paradas de fermentación - incrementa niveles de diacetilo
<i>Pediococcus damnosus</i>	- produce histamina - sintetiza polisacáridos
<i>Pediococcus parvulus</i>	- forma acroleína que contribuye al amargor
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	- sintetiza polisacáridos que incrementan la viscosidad
Bacterias acéticas	
<i>Acetobacter aceti</i> <i>Acetobacter pastorianus</i> <i>Gluconobacter oxydans</i>	- oxidación del etanol a acetaldehído y ácido acético - producción de acetato de etilo y acetoína a partir del ácido láctico - producción de dihidroxiacetona como consecuencia del metabolismo del glicerol - aportan viscosidad al vino
Otras bacterias	
<i>Bacillus spp.</i> <i>B. subtilis</i> , <i>B. circulans</i> <i>B. coagulans</i> <i>Clostridium spp.</i>	- incrementan la acidez del vino al producir ácido butírico - forman sedimentos

Estas alteraciones producen aromas indeseables debido principalmente a la formación de diacetilo, ácido acético y otros ácidos grasos volátiles o fenoles volátiles o, en menor medida, sustratos heterocíclicos aromáticos (Chatonnet, Dubourdiou, & Boidron, 1995; Costello & Henschke, 2002). Además, la producción de compuestos que pueden ser tóxicos debido a sus efectos fisiológicos indeseables en seres sensibles a ellos, como son las aminas biogénicas y el carbamato de etilo (Bartowsky, 2009; José M Landete, Ferrer, Polo, & Pardo, 2005; Marcobal, Martín-Álvarez, Polo, Muñoz, & Moreno-Arribas, 2006; Ugliano & Henschke, 2009).

I-3.3 Polifenoles

Los compuestos fenólicos son constituyentes naturales de la uva y transferidos al vino durante el proceso de elaboración. La composición y concentración de los compuestos fenólicos en el vino depende del tipo de uva y proceso de vinificación. Sus estructuras varían en gran medida durante la crianza y el envejecimiento del vino según las condiciones (Fulcrand et al., 2006; Yuan Gao et al., 2015; Weston, 2000). En la *Figura 1.3* se muestran las distintas familias y compuestos fenólicos más comunes en el vino. La concentración de polifenoles es mayor en vinos tintos (1 a 5 g/L) donde se encuentran todas las familias de compuestos fenólicos, mientras que los vinos blancos contienen niveles muy bajos de polifenoles (0.2 a 0.5 g/L), principalmente ácidos hidroxicinámicos (Betés-Saura, Andrés-Lacueva, & Lamuela-Raventós, 1996; Moreno-Arribas & Polo, 2009; Oliveira et al., 2011; Vinson & Hontz, 1995).

FLAVONOIDES	
<p>flavonoles</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - miricitina (R1=OH; R2=H) - quercitina (R1=OH; R2=H) - kaempferol (R1=R2=H) - quercitina-3-glucuródino (R1=OH; R2=ác. glucurónico) - quercitina-3-glucósido (R1=OH; R2=ác. glucósido) - kaempferol-3-glucósido (R1=H; R2=ác. glucósido) - kaempferol-3-glucurónido (R1=H; R2=ác. glucurónico)
<p>flavanoles</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - (+)-catequina (R1=OH; R2=R=H) - (-)-epicatequina (R2=OH; R1=R=H) - (+)-galocatequina (R2=H; R1=R=OH) - (-)-epigalocatequina (R1=H; R2=R=OH) - (-)-epicatequina-3-O-galato (R1=R=H; R2=ác. gálico)
<p>antocianos glucósidos</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - delphinidina-3-O-glucósido (R1= R2=OH) - cianidina-3-O-glucósido (R1=OH; R2=H) - petunidina-3-O-glucósido (R1=OH; R2= OCH3) - Peonidina-3-O-glucósido (R1=OCH3; R2=H) - malvidina-3-O-glucósido (R1= R2= OCH3)
NO FLAVONOIDES	
<p>derivados de ácidos benzoicos</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - ácido benzoico (R5=R4=R3=H) - ácido gálico (R5=R4=R3=OH) - ácido <i>p</i>-hidroxibenzoico (R5=R3=H; R4=OH) - ácido vanílico (R5=OCH3; R4=OH; R3=H) - ácido siringico (R5= R4= OCH3; R2=OH) - ácido protocatequico (R5=R4=OH; R3=H)

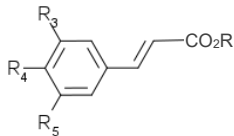
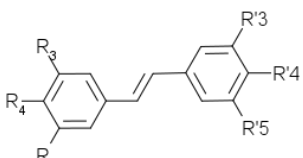
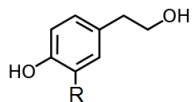
<p>derivados de ácidos cinámicos</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - ácido cinámico (R5=R4=R3= R=H) - ácido <i>p</i>-cumárico (R5=R3= R=H; R4=OH) - ácido cafeico (R5=R4=OH; R3=R=H) - ácido ferúlico (R5=OCH3; R4=OH; R3=H) - ácido <i>p</i>-cutárico (R5=R3=H; R4=OH; R=ác. tartárico) - ácido caftárico (R5=R4=OH; R3=H; R=ác. tartárico) - ácido fertárico (R5=OCH3; R4=OH; R3=H; R=ác. tartárico)
<p>estilbenos</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>trans</i>-resveratrol (R3=R5=R4'=OH; R4=R3'=R5'=H) - <i>trans</i>-piceido (R4= R3'=R5'=H; R5=R4'=OH; R3=glucosa) - astringina (R4= R5'=H; R5=R3'=R4'=OH; R3=glucosa) - piceatannol (R4=R5'=H; R3=R5=R3'= R4'=OH)
OTROS	
	<ul style="list-style-type: none"> - tirosol (R=H) - hidroxitirosol (R=OH)

Figura 1.3. Compuestos flavonoides y no flavonoides más comunes en el vino (adaptado de Oliveira et al., 2011)

Los polifenoles tienen un gran interés en enología ya que están directamente relacionados con varios parámetros de calidad. Influyen en muchas de las propiedades sensoriales de los vinos tales como la astringencia, el amargor y el color de vinos tintos (Alcalde-Eon, García-Estévez, Puente, Rivas-Gonzalo, & Escribano-Bailón, 2014; Avizcuri et al., 2016; Gambuti et al., 2013; Gawel, 1998; Hufnagel & Hofmann, 2008; McRae & Kennedy, 2011; Sáenz-Navajas, Ferreira, Dizy, & Fernández-Zurbano, 2010; Soares et al., 2015). La astringencia es un proceso complejo y, generalmente, es una sensación táctil causado por una pérdida de lubricación en la saliva bucal (Gawel, Oberholster, & Francis, 2000; McRae & Kennedy, 2011). Por lo general, se acepta que es causada por la capacidad de algunos compuestos fenólicos, como las procianidinas (elagitaninos y galotaninos) para precipitar con las proteínas salivares (de Freitas & Mateus, 2012; McRae & Kennedy, 2011; Santos-Buelga & Scalbert, 2000; Vidal et al., 2004), aunque más recientemente se ha propuesto otros mecanismos, como la influencia de partículas coloidales que permanecen en suspensión (Schwarz & Hofmann, 2008). Otros autores han descrito que ciertos ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, así como ciertos ésteres etílicos de éstos ácidos, tales como que los ácidos *cis*-aconítico, vanílico y siringico y el siringato de etilo son los compuestos más importantes en la sensación de astringencia (Hufnagel & Hofmann, 2008; Sáenz-Navajas et al., 2010). El sabor amargo en el vino, al igual que la astringencia, se asocia

principalmente con los flavonoides fenólicos, que incluyen monómeros, (+)-catequina y (-)-epicatequina, y sus oligómeros y polímeros (llamados procianidinas). Todos estos compuestos provocan ambas sensaciones de amargor y astringencia, y su prevalencia depende del tamaño molecular y la estructura del compuesto. Como regla general, la intensidad del amargor disminuye y la astringencia aumenta con el aumento del grado de polimerización (Rudnitskaya et al., 2010).

Con respecto a la influencia de los compuestos fenólicos sobre el color de los vinos tintos, las antocianinas glucósidos son las principales responsables. Durante el envejecimiento se produce un cambio de color de rojo-violáceo a tonalidades rojo-anaranjado. Este cambio se atribuye a la formación de nuevos pigmentos, resultado de la condensación directa o mediada, principalmente por acetaldehído, de los antocianos con otras moléculas como flavanoles o por reacciones de cicloadición entre antocianos y otras moléculas tales como acetaldehído, ácido pirúvico o vinilfenoles entre otros (Atanasova, Fulcrand, Cheynier, & Moutounet, 2002; Avizcuri et al., 2016; Es-Safi et al., 2008; Fulcrand et al., 2006; Hermosín-Gutiérrez et al., 2005; Schwarz et al., 2004; M. Schwarz, Jerz, & Winterhalter, 2003). En la *Figura 1.4* se resume estas reacciones y su influencia en el color (Zamora, 2013)

Sin embargo, está ampliamente descrito que los compuestos fenólicos son susceptibles a la oxidación durante el proceso de elaboración de los vinos y son considerados los principales sustratos para las reacciones de pardeamiento (Cheynier, Rigaud, Souquet, Barillere, & Moutounet, 1989; de Gaulejac, Vivas, Nonier, Absalon, & Bourgeois, 2001; Du Toit et al., 2006; Es-Safi et al., 2008; Li et al., 2008; Macheix et al., 1991; Oliveira et al., 2011; Sioumis, Kallithraka, Makris, & Kefalas, 2006; Waterhouse & Laurie, 2006). La oxidación de los compuestos fenólicos es muy compleja, dependiendo en gran medida de su estructura y concentración, siendo polifenoles que contienen un anillo aromático *o*-dihidroxibenceno (anillo catecol) o un grupo 1,2,3-trihidroxibenceno (pirogalol) los más fácilmente oxidables (Boulton, 2001; Du Toit et al., 2006; Oliveira et al., 2011; Sioumis, Kallithraka, Tsoutsouras, Makris, & Kefalas, 2005; Waterhouse & Laurie, 2006). Varios autores afirman que el oxígeno no reacciona directamente con los compuestos fenólicos, sino que el proceso está mediado por la acción catalítica de los iones de los metales: hierro ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) y cobre ($\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}$) mediante la reacción de Fenton

(Danilewicz, 2007, 2011; Waterhouse & Laurie, 2006). El pardeamiento es uno de los principales problemas producidos durante la vinificación, ya que por un lado afecta de manera negativa a las propiedades organolépticas del vino, tales como pérdida de color, incremento de la astringencia y malos olores, además de pérdida de aroma varietal (Cheynier et al., 1989; Cheynier, Rigaud, Souquet, Duprat, & Moutounet, 1990; Coetzee et al., 2016; Danilewicz, 2016; Danilewicz, Secombe, & Whelan, 2008; Escudero, Asensio, Cacho, & Ferreira, 2002; Ferreira, Escudero, Fernández, & Cacho, 1997; Macheix et al., 1991; Nikolantonaki & Waterhouse, 2012; Pati et al., 2014; Silva Ferreira, Guedes de Pinho, Rodrigues, & Hogg, 2002). Y, por otro lado, da lugar a la pérdida de valor nutricional del vino (Bonilla, Mayen, Merida, & Medina, 2001; Sioumis et al., 2005).

Por otra parte, además de la influencia en las características organolépticas, son muchos los estudios *in vitro* e *in vivo* que han demostrado que los compuestos fenólicos en el vino tienen interesantes actividades antioxidantes, tales como eliminación de radicales libres y de quelación de metales, eliminación de especies reactivas del oxígeno (ROS), relajación de los vasos sanguíneos, anti-inflamatorio, anticancerígeno y antiviral, entre otros (Canas et al., 2008; Fernández-Pachón, Villaño, García-Parrilla, & Troncoso, 2004; Frankel, German, Kinsella, Parks, & Kanner, 1993; Giugliano, 2000; Harbertson & Spayd, 2006; Lodovici et al., 2001; Makris, Kallithraka, & Kefalas, 2006).

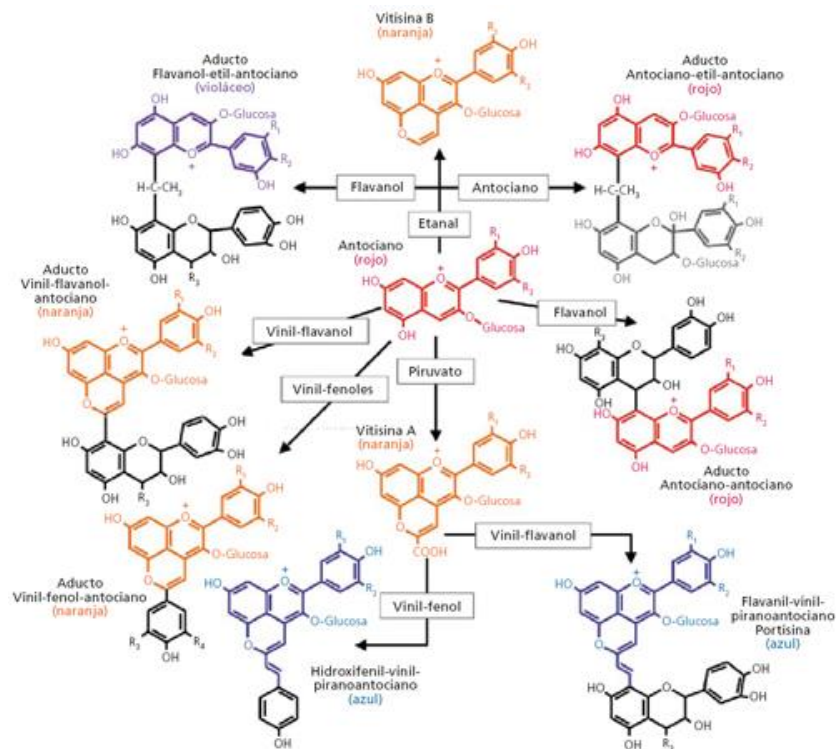


Figura 1.4. Principales reacciones químicas de las antocianinas y su influencia en el color (extraído de Zamora, 2013)

I-3.4 Compuestos volátiles

El aroma es un factor de calidad en todos los alimentos, pero en los vinos el aroma es probablemente uno de los aspectos más importantes que contribuyen a la calidad general. La composición aromática del vino es uno de los principales atributos evaluados por el consumidor de vino y es un componente integral de la experiencia general de degustación de vinos. (Antalick et al., 2015; Francis & Williamson, 2015; Lattey, Bramley, & Francis, 2010). El aroma se define como el conjunto de sustancias que contiene un producto y que son capaces de impactar en nuestro sentido olfativo, tanto vía orthonasal, como vía retronasal, durante la ingestión y paladeo del producto (Casal del Rey, 2001).

El aroma del vino es el resultado de una mezcla compleja de cientos de moléculas, volátiles y precursores no volátiles, pertenecientes a diferentes familias químicas y las interacciones con la matriz y entre ellas. La formación de los compuestos aromáticos es continua durante la elaboración y el envejecimiento del vino (Coetzee et al., 2016; Ferreira, Bueno, Franco-Luesma, Cullere, & Fernández-Zurbano, 2014; Guth, 1997). Los aromas del vino se pueden clasificar en tres grupos según el origen de los aromas: varietales, aromas de fermentación y aromas de envejecimiento (Moreno-Arribas & Polo, 2009; Styger, Prior, & Bauer, 2011). Por tanto, su complejidad y las dificultades de su estudio es el resultado de la diversidad de los mecanismos implicados en su origen. Entre éstos se encuentran: (i) el metabolismo de las uvas (influenciado por la variedad, suelo, clima y prácticas vitícolas); (ii) procesos bioquímicos prefermentativos (oxidación, hidrólisis); (iii) metabolismo de los microorganismos que realizan la fermentación alcohólica y maloláctica; (iv) las condiciones físicas de fermentación, en particular la temperatura y el potencial redox; (v) reacciones químicas y enzimáticas post-fermentativa, que se producen durante el almacenamiento de vino y durante su envejecimiento en barrica o botella. En la *Tabla 1.2* se enumeran los compuestos aromáticos más característicos del vino.

Tabla 1.2. Compuestos aromáticos característicos del vino (Datos adaptados de Cacho, 2006; Jackson, 1994 y Ferreira y col., 2002)

Familia de compuestos	Compuestos característicos
aldehídos y cetonas	acetaldehído, acetoina, diacetilo, furfural, fenilacetaldehído, metional, 5-metilfurfural, 5-hidroximetilfurfural, vainillina, acetovainillona, siringaldehído, β -damascenona, α -ionone, β -ionona
ácidos	acético, butírico, isovaleriánico, hexanoico, octanoico, decanoico, 2-metilbutírico, fenilacético.
ésteres	isobutirato de etilo, isovalerato de etilo, acetato de butilo, acetato de etilo, acetato de isobutilo, acetato de isoamilo, acetato de feniletilo, butirato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo, lactato de etilo, succinato de dietilo, furoato de etilo, dihidrocinamato de etilo, cinamato de etilo, vanillato de etilo, vanillato de metilo, 2-metilbutirato de etilo.
terpenoles	linalol, β -citronelol, α -terpineol, óxido de rosa cis
lactonas	δ -octalactona, γ -octalactona, γ -nonalactona, δ -decalactona, γ -decalactona, γ -undecalactona, c-dodecalactona, c-whiskylactona, t-whiskylactona, γ -butirolactona, sotolón, maltol, furaneol, homofuraneol.
fenoles	eugenol, guaiacol, isoeugenol, 4-etilfenol, 4-vinilfenol, 4-etilguaiacol, 4-vinilguaiacol, 4-propilguaiacol, 2,6-dimetoxifenol, 4-alil-2,6-dimetoxifenol, m-cresol, o-cresol.
alcoholes	1-hexanol, 2-etil-1-hexanol, cis-3-hexenol, 1-octen-3-ol, 1-propanol, furfural alcohol, metionol, isobutanol, alcohol isoamílico, β -feniletanol, alcohol bencílico.
metoxipirazinas	3-isobutil-2-metoxipirazina, 3-secbutil-2-metoxipirazina, 3-isopropil-2-metoxipirazina
mercaptanos	4-metil-4-mercapto-2-pentanona (4MMP), 3-mercapto-1-hexanol (3MH) y acetato de 3-mercaptohexilo (3MHA)

La calidad aromática del vino no sólo está representada por los aromas agradables, sino que además debe tener una ausencia de aromas defectuosos. Los principales aromas defectuosos pueden aparecer durante la FA y/o la FML si son llevadas a cabo por microorganismos de forma no controlada (Tabla 1.1), y durante el envejecimiento y/o conservación de los vinos por reacciones de

oxidación/reducción. Muy poca exposición al oxígeno se ha asociado con aromas reductivos y que pueden comprometer la calidad percibida del vino. El aroma a *reducción* es un término comúnmente utilizado en el análisis sensorial de vinos para identificar los aromas desagradables que recuerdan a *huevo podrido, col, ajo y putrefacción*. Como tales, deben ser considerados como un resultado negativo del envejecimiento en botella. Estos atributos de aroma se han asociado con la aparición de diferentes compuestos de azufre de peso molecular bajo, incluyendo sulfuro de hidrógeno, metil mercaptano, etil mercaptano y sulfuro de dimetilo (DMS) (Lopes et al., 2009; Ugliano et al., 2011, 2012). Por el contrario, la pérdida oxidativa de compuestos aromáticos y la evolución de compuestos de aroma indeseables se producen con la exposición excesiva de oxígeno. Los aromas que se generan debido a la formación de los nuevos compuestos químicos se han descrito como *miel, heno, tostado, frutos secos, caramelo, fruta muy madura, manzana, manzana oxidada, acetaldehído, cocido, aldehído y licor* (Coetzee & du Toit, 2015; Escudero et al., 2002; Silva Ferreira et al., 2002; Ugliano, 2013). Los compuestos asociados a estos aromas oxidados en vinos blancos incluyen el metional, fenilacetaldehído, 2,4,5-trimethyldioxolane, aldehídos alifáticos tales como trans-2-nonenal, y sotolona (Escudero et al., 2002; scudero, Cacho, & Ferreira, 2000; Silva Ferreira, Hogg, & Guedes de Pinho, 2003; Ugliano, 2013).

I-3.5 Propiedades sensoriales

La evaluación sensorial se ha definido como un método científico utilizado para medir, analizar e interpretar las respuestas a los productos según la percepción a través de la vista, el olfato, el tacto, el gusto y el oído (Stone, Bleibaum, & Thomas, 2012). La evaluación sensorial es una ciencia cuantitativa en la que se recogen los datos numéricos para establecer relaciones lícitas y específicas entre las características del producto y la percepción humana. La parte crítica del análisis sensorial es el análisis adecuado de los datos obtenidos dado que la calidad es difícil de precisar por su carácter cuasi-estético y su relación con el gusto personal (Charters & Pettigrew, 2005). En este sentido, con el fin de evaluar si las relaciones observadas entre las características del producto y las respuestas sensoriales son reales y no meramente el resultado de la variación en las respuestas no controlada, se utilizan los métodos de estadística para analizar los datos.

Entre los métodos de análisis sensorial se encuentra aquel que se basa en cuantificar las intensidades percibidas de las distintas características sensoriales a evaluar en un producto. Estos métodos se conocen como *análisis descriptivo* o frecuentemente conocido con el término 'cata'. La cata es el medio más razonable para evaluar la calidad de los vinos, y también el más efectivo para detectar los efectos de todas las manipulaciones. La cata es una combinación de (a) las cuatro sensaciones gustativas de sustancias no volátiles percibidas en la lengua (dulce, salado, ácido, amargo) y (b) el aroma (u olor) de sustancias volátiles percibidas por los órganos olfativos detrás de la nariz. El análisis sensorial puede ser descrito por diversos factores importantes para la calidad del vino (*Tabla 1.3*) (Zoecklein, Fugelsang, Gump, & Nury, 1995).

Tabla 1.3. Factores importantes en la calidad del vino

Órganos	Sentidos y sensaciones	Caracteres percibidos		
ojo	visión sensaciones visuales	color, limpidez, fluidez, efervescencia	Aspecto	
nariz	olfato (vía nasal directa) sensaciones olfativas	aroma, bouquet	olor	flavor
boca	olfato (vía retronasal)	aroma boca	gusto	
	gusto sensaciones gustativas	sabor o gusto propriadamente dicho		
	reacciones de las mucosas sensibilidad química	astringencia, causticidad, burbujeo	tacto	
	sensaciones táctiles	consistencia, liquidez, fluidez, untuosidad		
sensibilidad térmica	temperatura, alcohol			

La calidad y cantidad de color, así como la luminosidad del vino se evalúan en su totalidad por la vista, por lo general antes de la degustación. A continuación, el sentido del olfato y el gusto se utilizan para evaluar el flavor del vino (Clarke & Bakker, 2004). Siendo el flavor una característica distintiva principal del vino y podría decirse que, en sentido amplio, es la impresión sensorial que brindan compuestos que aportan tanto al aroma y al sabor, y puede también incorporar aspectos como acidez, dulzor, grado alcohólico, astringencia, etc. (Lambrechts & Pretorius, 2000).

El color, como se ha descrito anteriormente, es una parte de la importante de la impresión organoléptica percibida. En vinos jóvenes predomina el color rojo-

púrpura debido a la presencia de antocianinas libres. Conforme los vinos van envejeciendo se producen un cambio de color hacia rojo-anaranjado debido a reacciones de condensación de entre antocianinas y otros compuestos fenólicos presentes en el vino. El color informa sobre el cuerpo (concentración fenólica), la evolución y el estado del vino. En él se puede leer su edad y su carácter (Guerrero & Cantos-Villar, 2015).

La evaluación del aroma es uno de los aspectos más difíciles y discriminativas de la cata de vinos. En el vino, los aromas primarios, característicos de la cepa, presentan notas afrutadas o florales; los procedentes de la vinificación añaden otros aromas secundarios, mientras que la crianza aporta las notas de las especias, vainilla o fruta cocida que darán el *bouquet* al vino. En la *Tabla 1.4* se recogen algunos de los descriptores utilizados en la cata de vino.

Tabla 1.4. Grupos y nombre común de los descriptores más comunes utilizados en el análisis sensorial de los vinos

Grupo	Descriptor usado en vinos
floral	rosas, geranios, violetas, etc.
madera	madera, tostado
vegetal	fresco: herbáceo, patata, guisante, pimiento verde, eucalipto, etc hierba: se utiliza de manera equivalente a herbáceo como un aroma de defecto. cocinado/enlatado: patata, espárrago, etc. terroso seco: heno, tabaco, té, montura de cuero podrido (sulfuroso)
balsámico	el término resinoso se utiliza como sinónimo
fruta	cítrico: limón, lima, naranja, uva baya: grosellas, cerezas, etc. fruta de árbol: albaricoque, ciruela, etc. fruta tropical: kiwi, lichis, fruta de la pasión, banana fruta seca y otras: higos, ciruelas, pasas, etc.
animal	se cita como el animal, por ejemplo, aroma a cabra
empíreo	tostado, caramelo, ahumado.
químico	relacionado con la industria del petróleo, la creosota y fenoles
especial	clavo, pimienta, regaliz
etéreo	mantequilla, similar al caramelo, vainilla

El término aroma es más comúnmente utilizado para describir el olor del vino derivado de la uva. Mientras que el término *bouquet* hace referencia al aroma del vino formado durante el envejecimiento. Por otro lado, se denomina flavor a la combinación de las sensaciones percibidas a través del olfato y la boca.

En ausencia de una definición clara de la calidad aromática de un vino, no es sorprendente que se sepa más sobre la naturaleza química de los defectos del vino que los atributos positivos vinos. Existen una serie de sensaciones olfativas en los vinos considerados como indeseables (*Tabla 1.5*) y su identificación es clave en la calidad de los vinos. Un mal olor o defecto es un aroma atípico asociado a menudo con el deterioro (British Standard, 1992) y tienden a enmascarar el flavor del vino (Jackson, 2009).

Tabla 1.5. Defectos en vinos (extraído de (Clarke & Bakker, 2004)

Descriptor	Compuesto químico asociado	Posible causa
oxidado (áspero, químico, plano)	acetaldehído	exceso de formación durante la vinificación o el envejecimiento bajo condiciones oxidativas
olor (avinagrado) sabor (agrio)	ácido acético	exceso, por el deterioro del crecimiento aeróbico de bacterias del ácido acético, especialmente durante el proceso de envejecimiento en barricas.
	acetato de etilo	reacción de exceso de ácido acético con etanol
irritante olor a quemado	dióxido de azufre	exceso/inapropiada adicción
mantequilla	diacetilo	exceso por encima del umbral durante vinificación/envejecimiento
fenol	4-vinilfenol	procedimiento de la vinificación
	4-etilfenol	<i>Brettanomyces / Dekkera</i> actividad de levadura
como geranio	2-etoxi-3,5-hexadieno	compuesto formado a partir de ácido ascórbico, está presente, por las bacterias del ácido láctico
corcho	principalmente 2,4,6-tricloroanisol	de corchos que contienen moho, esterilización por compuestos clorados
olor de reducción - cebolla - patata cocida - espárrago	h ₂ s	condiciones de vinificación. formado por levaduras
	mercaptanos	
	(etil/metil)	
	metionol	
herbáceo	disulfuro de dimetilo	oxidación de los lípidos de la uva en prensa - por lo general en uvas inmaduras
	aldehídos	
almendra amarga	benzaldehído	exceso de formación
ratón	acetamida 2-acetil- tetrahidropiridina	Por <i>Brettanomyces</i> y <i>Lactobacillus</i>

Son varios los componentes del vino que influyen en las sensaciones percibidas en boca.

- El *alcohol vínico* (etanol) es uno de los componentes más importante del vino y se conoce por sus propiedades estimulantes y tóxicas. Su contenido en exceso que produce quemazón y ardor en boca.
- El contenido en *ácidos* (tartárico, málico, cítrico, láctico y succínico) determina la acidez del vino. La acidez es un parámetro importante en la cata de los vinos que contribuye en el frescor de los vinos. Una acidez insuficiente dará generalmente vinos planos, mientras que una acidez en exceso da lugar a vinos agrios. El ácido acético es muy importante, ya que es un potencial agente de deterioro (aroma a “vinagre”).
- Los residuos de los *azúcares*, glucosa y fructosa, en un vino terminado determinan principalmente su dulzor percibido y “sequedad”.
- El *amargo* está definido por una serie de compuestos con diferente composición química, tales como flavanoles y derivados, ácido caftarico, tirosol entre otros. El amargor es una característica de un exceso de extracción de polifenoles de la piel junto con un elemento herbáceo si las uvas no están suficientemente maduras.
- La *astringencia*, asociada a vinos tintos, es una sensación seca y áspera percibida en la boca. Se debe principalmente a compuestos fenólicos. Cuando la concentración de éstos es alta, el vino es considerado duro y demasiado astringente. Por el contrario, los vinos tintos que carecen de astringencia a menudo se consideran que son planos.

I-4 El sulfuroso en la elaboración del vino

I-4.1 Química y propiedades del SO₂

El anhídrido sulfuroso o dióxido de azufre (SO₂) ha sido utilizado como conservante desde finales del siglo XVIII, pero ha sido en las últimas décadas cuando se ha adquirido la mayor parte de los conocimientos científicos sobre su empleo en enología. La Organización Mundial de la Salud incluye al SO₂ entre los conservantes autorizados y hoy en día se utiliza en muchas industrias alimentarias, especialmente alimentos con pH bajos, tales como zumo de frutas y bebidas fermentadas (Ribereau-Gayon, Glories, Maujean, & Dubourdieu, 2006).

El SO₂ es probablemente uno de los aditivos más versátiles y eficientes utilizados en la elaboración del vino debido a sus propiedades antisépticas y antioxidantes. Además, el SO₂ minimiza la velocidad de polimerización de los

compuestos fenólicos y, en consecuencia, la pérdida de color durante el envejecimiento del vino tinto (Santos et al., 2016).

En el vino el SO₂ se disocia en tres especies moleculares que poseen diferentes propiedades en función de la composición del medio (Figura 1.5): SO₂ molecular (SO₂•H₂O), bisulfito (HSO₃⁻) y sulfito (SO₃²⁻). El equilibrio químico entre ellas depende del pH del vino (Divol, Toit, & Duckitt, 2012; Ribereau-Gayon, Glories, et al., 2006). En el rango de pH de los vinos (3-4), el sulfuroso se encuentra en un gran porcentaje como la forma bisulfito y en menor porcentaje como forma sulfito y SO₂ molecular. En el vino, las formas bisulfito y sulfito se combinan con otras moléculas tales como polifenoles, aldehídos y acetonas (Divol et al., 2012). La suma de las formas combinadas se denomina, “sulfuroso combinado”. Y la suma de SO₂ molecular, y de HSO₃⁻ y SO₃²⁻ sin combinar se denomina “sulfuroso libre” (Burroughs & Sparks, 1973). Siendo el SO₂ total en el vino la suma de las fracciones libre y combinada.

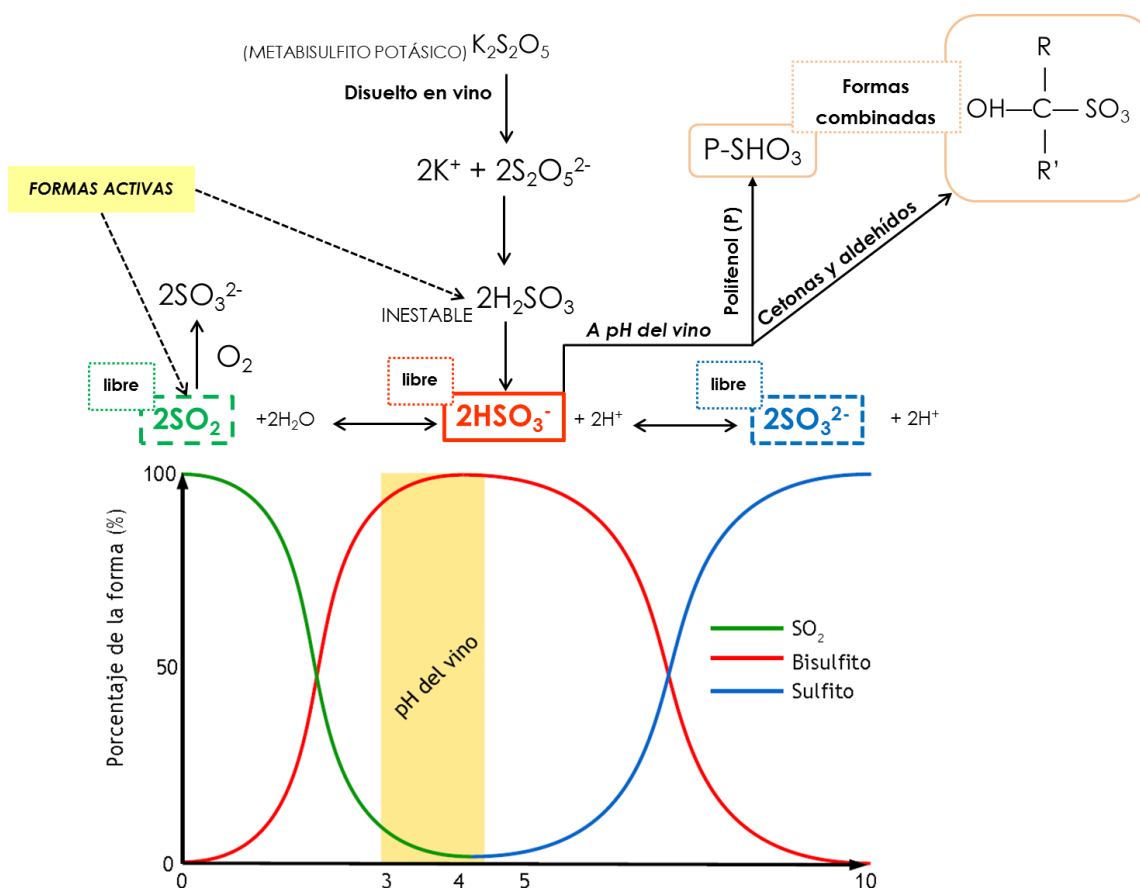


Figura 1.5. Equilibrio químico y porcentaje de las distintas formas del anhídrido sulfuroso cuando es adicionado como metabisulfito potásico al vino

La concentración de SO₂ libre presente en el vino es fundamental, ya que es la única fracción que posee las propiedades antimicrobianas y antioxidantes, siendo el SO₂ molecular 100 a 500 veces más activo que el ion bisulfito (Divol et al., 2012). Mientras que el SO₂ combinado tiene menor relevancia en relación a las propiedades antimicrobianas y antioxidantes.

Los derivados azufrados utilizados frecuentemente en enología son el SO₂ en forma de gas o líquido y el metabisulfito de sodio (Na₂S₂O₅) o potásico (K₂S₂O₅), entre otros. El SO₂ es utilizado fundamentalmente en tres etapas del proceso de vinificación: a) en una etapa pre-fermentativa, con el objetivo fundamental de prevenir la oxidación del mosto y rebajar la carga microbiana inicial, especialmente las bacterias lácticas, e inhibir el crecimiento microbiano que pueda alterar el vino; b) una vez finalizados los procesos de fermentación y previa a las etapas de crianza o conservación de los vinos, para así inhibir el crecimiento de microorganismos alterantes de los vinos; y c) justo antes del embotellado, con objeto de estabilizar los vinos e impedir cualquier alteración en las botellas.

Tabla 1.6. Ventajas y desventajas del SO₂ (adaptado de Guerrero & Cantos-Villar, 2015)

Propiedades	Ventajas	Inconvenientes	Bibliografía
antioxidante	<ul style="list-style-type: none"> - inactiva de enzimas (pardeamiento) - inhibe de reacciones de maillard - captador el oxígeno - reacciona con el H₂O₂ - reduce las formas quinonas 	<ul style="list-style-type: none"> - su efectividad depende del pH 	1, 2, 3
antimicrobianas	<ul style="list-style-type: none"> - previene fermentaciones secundarias de levaduras: “picado láctico” y “enfermedad del láctico” - previene la formación de aminas biogénicas, etilfenoles y otros olores desagradables 	<ul style="list-style-type: none"> - su efectividad depende del pH. - 30 a 50 mg / L de SO₂ libre puede ser ineficaz contra algunos microorganismos (bacterias acéticas) 	4-8
poder de extracción	<ul style="list-style-type: none"> - extracción de minerales, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos 	<ul style="list-style-type: none"> - SO₂ desaparece rápidamente en estrujado de las uvas - no mejora significativamente el color del vino final 	3

sensorial	- vinos con SO ₂ vinos tienen flavor más complejo, en particular en el caso de las uvas podridas o variedades mediocres - vinos con SO ₂ tienen un color más estable.	- el uso excesivo de SO ₂ puede enmascarar aromas varietales y de la fermentación - el SO ₂ conduce a la formación de H ₂ S y mercaptanos.	3, 9
salud		- reacciones alérgicas en personas sensibles: dermatitis, urticaria, angioedema, dolor abdominal, diarrea, broncoconstricción y	10-16

(1) Garde-Cerdán, Marsellés-Fontanet, et al., 2008; (2) Oliveira et al., 2011; (3) Ribereau-Gayon, Dubourdieu, et al., 2006; (4) Costello & Henschke, 2002 (5) Landete, Ferrer, & Pardo, 2007; (6) Puértolas, López, Condón, Raso, & Álvarez, 2009; (7) Santos, Nunes, Saraiva, & Coimbra, 2012; (8) Suárez, Suárez-Lepe, Morata, & Calderón, 2007; (9) Garde-Cerdán & Ancín-Azpilicueta, 2007; (10) Delfini et al., 2002; (11) Fredericks, du Toit, & Krügel, 2011 (12) Gao et al., 2002; (13) He et al., 2012; (14) Threlfall & Morris, 2002; (15) Vally, Misso, & Madan, 2009; 16) Vally & Thompson, 2001

I-4.1.1 Protección contra la oxidación

El SO₂ juega un papel muy importante en la prevención de la oxidación de compuestos presentes en el vino, incluyendo compuestos fenólicos, aldehídos, y compuestos volátiles.

La oxidación o pardeamiento del vino puede ser clasificado como enzimático y no enzimático o químico. La oxidación enzimática es un proceso característico y habitual de los procesos prefermentativos, mientras que la oxidación química, se manifiesta en los vinos embotellados o mal protegidos.

En el mosto de uva, los compuestos más susceptibles a la **oxidación enzimática** son los derivados de ácidos hidroxicinámicos, especialmente el ácido caftárico y cutárico, junto con los flavan-3-oles, como (+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-galoepicatequina y sus ésteres (Li et al., 2008; Pati et al., 2014).

El SO₂ juega un papel fundamental en la prevención de la oxidación enzimática de estos compuestos mediante la inactivación de las enzimas polifenoloxidasas (PPO), peroxidasa (POD), tirosinasa y proteasas, y también por la inhibición de las reacciones de Maillard (Garde-Cerdán, Marsellés-Fontanet, et al., 2008; Ribereau-Gayon, Dubourdieu, et al., 2006).

En el vino, la **oxidación química** puede ocurrir a través de varias vías en la que están involucrados los fenoles. La oxidación de fenoles catalizada por hierro y cobre, mediante la reacción de Fenton (*Figura 1.6*), que genera H_2O_2 , el cual oxida a los polifenoles. Seguidamente se produce la polimerización de los productos oxidados. Otras vías que implican reacciones de polimerización entre fenoles y otros compuestos presentes en el vino, incluyendo la condensación con acetaldehído o ácido glioxílico (derivado de la oxidación del ácido tartárico) (Danilewicz, 2007; Li et al., 2008; Saucier & Waterhouse, 1999; Waterhouse & Laurie, 2006).

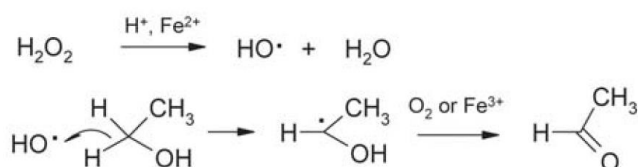


Figura 1.6. Reacción de Fenton: oxidación de etanol en vinos (Danilewicz, 2007)

El principal conservante utilizado en el vino para evitar el deterioro oxidativo es el dióxido de azufre. En la oxidación química el SO_2 puede actuar como antioxidante de tres formas (Li et al., 2008):

- a) por reacción con peróxido de hidrógeno. En este caso el efecto antioxidante del SO_2 depende de la capacidad del SO_2 para reducir el peróxido de hidrógeno, intermediario en los procesos de oxidación y potente oxidante, a agua (*Boulton, 1998*) (*Figura 1.7 y 1.8*).

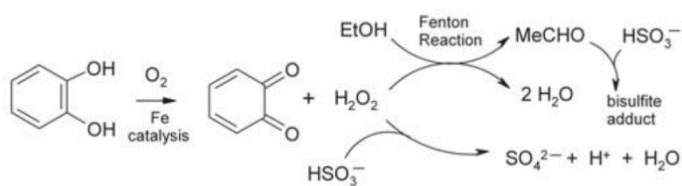


Figura 1.7. H_2O_2 formado por la oxidación de los catecoles y reacción con el SO_2

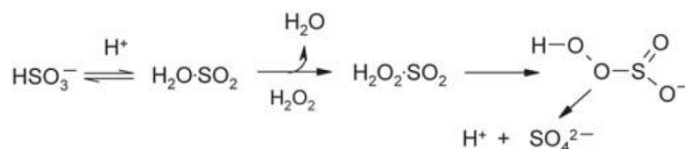


Figura 1.8. Posible mecanismo de reacción del SO_2 con el peróxido de hidrógeno (Danilewicz, 2007)

- b) por reacción con las quinonas y las semi-quinonas producidas por la oxidación de los orto-difenoles reduciéndolas de nuevo a su molécula original (Danilewicz, 2007; Karbowski et al., 2010; Oliveira et al., 2011)

(Figura 1.9). Estas reacciones de oxidación pueden ralentizar la producción de pigmentos pardos en los vinos causado por reacciones de polimerización que implican quinonas y semi-quinonas (Panero, Motta, Petrozziello, Guaita, & Bosso, 2015).

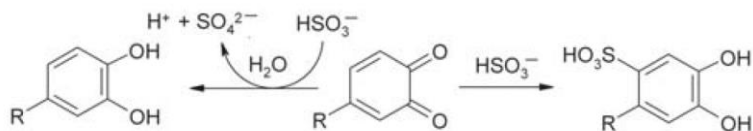


Figura 1.9. Posible reacción de iones bisulfito con quinonas (Danilewicz, 2007)

- c) aunque se ha considerado que puede actuar como antioxidante por reacción directa con el oxígeno (Ribereau-Gayon, Dubourdieu, et al., 2006), algunos autores han demostrado que el SO_2 no reacciona directamente con el oxígeno (Danilewicz, 2007, 2011; Danilewicz et al., 2008).

I-4.1.2 Inhibición y selección de levaduras y bacterias

El SO_2 utilizado desde el prensado/maceración hasta el embotellado controla el crecimiento de levaduras y bacterias. La microflora de una fermentación llevada a cabo por levaduras indígenas puede ser controlada con el uso de SO_2 , ya que es altamente tóxico para la mayoría de las levaduras *no-Saccharomyces*, mientras que las cepas de *Saccharomyces* son bastante resistentes al SO_2 (Divol et al., 2012; Romano & Suzzi, 1993). El SO_2 también es empleado para controlar el crecimiento de las bacterias lácticas (BAL) y el desarrollo de la fermentación maloláctica (FML) durante la elaboración del vino (Ough & Crowell, 1987).

Son varios los objetivos que se persiguen con la adición de SO_2 al mosto, (i) retrasar el inicio de la fermentación mediante la inhibición de todos los microorganismos presentes en el mosto, con el fin de llevar el mosto a las condiciones idóneas para el control de la fermentación alcohólica (FA); (ii) selección de levaduras, eliminando aquellos microorganismos que merman la calidad del vino obtenido; (iii) selección de BAL y control de FML.

I-4.1.3 Propiedades sensoriales sobre el vino

La adición de SO_2 , dada sus propiedades tecnológicas es un tratamiento esencial en la elaboración del vino. Sin embargo, el uso de este aditivo en dosis altas puede causar alteraciones organolépticas del producto final, aromas

indeseables a sulfuroso gaseoso, o de los productos de reducción, hidrosulfato y mercaptanos (Li et al., 2008).

Durante el proceso de envejecimiento del vino se producen transformaciones químicas que conducen a cambios en el color y sabor del vino. Los aldehídos y, principalmente, el acetaldehído, producto de la oxidación del etanol, son importantes intermediarios de estas transformaciones químicas. Una de las primeras reacciones descritas en los vinos tintos fue la reacción de polimerización entre antocianinas y flavonoles mediados por acetaldehído (Lee y col., 2004, Rivas-Gonzalo y col., 1995 y Timberlake & Brida, 1976). El acetaldehído también puede mediar en la autocondensación de antocianinas (Atanasova et al., 2002; Fulcrand et al., 2006), y reaccionar directamente con malvidina-3-glucósido para producir vitisina B (Fulcrand et al., 2006; Morata, Calderón, González, Gómez-Cordovés, & Suárez, 2007; Rentzsch et al., 2007). El SO₂ puede reaccionar con varios compuestos presentes en el vino, tales como, acetaldehído, ácido pirúvico, ácido 2-oxoglutarico, ácidos hidroxicinámicos, y azúcares reductores (Jackowitz & Mira de Orduña, 2013; Ribereau-Gayon, Dubourdieu, et al., 2006). La reacción con estos compuestos reduce, por tanto, la velocidad de polimerización fenólica y, en consecuencia, la evolución del color por lo general observada durante el envejecimiento del vino y, presumiblemente, su sabor través de la modulación de tanino.

I-4.1.4 Capacidad de extracción

Además de las propiedades antioxidante y antimicrobiana, la presencia del SO₂ libre en la elaboración del vino tinto favorece la extracción de compuestos tales como minerales, ácidos orgánicos y especialmente, compuestos fenólicos (antocianos y taninos). Esta actividad se debe a la capacidad de disgregación de las células de la piel de uva. Sin embargo, dado que el SO₂ libre desaparece rápidamente, el efecto extractante sólo se da durante un breve lapso de tiempo (Ribereau-Gayon, Dubourdieu, et al., 2006).

I-4.1.5 Efectos sobre la salud

Diversos estudios han asociado la utilización del SO₂ con algunos riesgos para la salud, tales como dolor de cabeza, dificultades respiratorias, diarrea, reacciones alérgicas, fatiga, irritación, hinchazón de cara, labio y/o garganta, entre otros en individuos sensibles al sulfito, observándose en los últimos años

un incremento en la intolerancia o sensibilidad al SO₂, especialmente en personas asmáticas y niños (Gao et al., 2002; Vally et al., 2009). Los individuos sensibles a los sulfitos reaccionan negativamente a su ingestión a partir de 10 mg de ingesta.

Los individuos sensibles al sulfito reaccionan negativamente a los sulfitos ingeridos en cantidades de 0.25–2 mg/L (Vally et al., 2009; Vally & Thompson, 2001). Los asmáticos que son esteroide-dependientes, o que tienen un alto grado de hiperreactividad de las vías respiratorias, tienen mayor riesgo de sufrir alguna reacción a los alimentos que contienen sulfito. En esta población, las reacciones de sensibilidad al sulfito podrían ser severas, ya que los derivados de SO₂ pueden causar la activación de proto-oncogenes, la inactivación de genes supresores de tumores, e incluso puede desempeñar un papel en la patogénesis del SO₂ asociado cáncer de pulmón (Qin & Meng, 2009). Por otra parte, más del 50% de la cantidad añadida (frecuentemente 30-50 mg/L de SO₂) acaba como forma combinada y, aunque no tiene actividad antiséptica y ni antimicrobiana, sigue siendo contraindicado para la salud. Además, el SO₂ se encuentra en muchos alimentos como aditivo alimentario, siendo su ingesta acumulativa en el organismo (Guerrero & Cantos-Villar, 2015; Vally et al., 2009).

I-4.2 Regulación en Europa del SO₂: concentraciones y etiquetado

Aunque diversos estudios han mostrado que los sulfitos tienen un efecto alergénico y otros efectos nocivos en la salud humana, hasta el momento debido a sus propiedades multifuncionales no hay ningún compuesto químico que pueda sustituir completamente este aditivo. Es por ello que las autoridades europeas han regulado el uso del SO₂ como conservante alimentario (Directivas 95/2/CE y 2006/52/CE). En el vino, el Reglamento (CE) N° 1493/1999 del Consejo de 17 de mayo de 1999, y el Reglamento (CE) N° 1622/2000 de 24 de julio de 2000 estableció una concentración limitada total de SO₂ de hasta 160 mg/L en los vinos tintos y 210 mg/L en los vinos blancos y rosados. A su vez, la dosis máxima recomendada por la OIV es de 150 a 400 mg/L de SO₂ total dependiendo del tipo de vino y de su contenido en materias reductoras (OIV, 2011). En el nuevo reglamento de la UE para “vinos ecológicos” se permite un máximo de hasta 100 mg/L en el vino tinto y 150 mg/L en blancos y rosados. En los vinos dulces se permite un extra de 30 mg/L (Diario Oficial de la Unión Europea, 2012b). Por otra parte, la legislación europea (Reglamento n° 1991/2004) obliga desde el 26 de noviembre de 2005 a los elaboradores, a

incluir en el etiquetado de los vinos “*contiene sulfitos*”, siempre y cuando su nivel exceda de los 10 mg/L. En la *Tabla 1.7* se resume las concentraciones de sulfuroso permitidas en vinos en distintos países.

Tabla 1.7. Resumen de las concentraciones de sulfuroso permitidas en los vinos por países

PAÍSES	INSTITUCIÓN	CONCENTRACIÓN
UE	Autoridades Europeas	<ul style="list-style-type: none"> - desde 1999: límite total de sulfuroso 160 mg/L en vinos tintos, y 210 mg/L en blancos y rosados. A partir de 2007: límite total máximo de 200 mg/L - límites entre 10 mg/kg o 10mg/L no se consideran presentes en el vino. Los vinos deben mostrar desde el 26 de noviembre de 2005 en las botellas próximo a las restricciones legales, la presencia total de sulfitos cuando excedan los 10 mg/L - en los vinos ecológicos se admite 100 mg/L para vino tinto y 150 mg/L para vinos blancos y rosados - en vinos ecológicos dulces se permite un extra de 30 mg/L para prevenir posibles fermentaciones
EEUU	Oficina Federal de Alcohol, Tabaco y Armas de Fuego	<ul style="list-style-type: none"> - se debe incluir una advertencia en las etiquetas de vinos que contengan más de 10 mg/L de sulfitos, medidos como SO₂ desde 1987 - ningún vino vendido entre estados debe contener más de 350 mg/L de sulfitos - los vinos etiquetados como “ecológicos” y “100% ecológicos” no deben contener sulfitos (<10 mg/L)
Canadá	Agencia Canadiense de Inspección Alimentaria	<ul style="list-style-type: none"> - la cantidad total de sulfuroso máxima es 350 mg/L en todos los vinos - permite hasta 100 mg/L en vinos ecológicos
otros países		<ul style="list-style-type: none"> - la cantidad total de sulfuroso máxima es 350 mg/L en todos los vinos
Mundial	Organización Internacional de la Viña y el Vino	<ul style="list-style-type: none"> - 150 mg/L para vinos tintos que contienen un máximo de 4 g/L de sustancias reductoras - 200 mg/L para vinos blancos y rosados que contienen un máximo de 4 g/L sustancias reductoras - 300 mg/L tintos, blancos y rosados que contienen más de 4 g/L de sustancias reductoras - 400 mg/L en casos excepcionales de vinos dulces
Mundial	Organización Mundial de la Salud	<ul style="list-style-type: none"> - Recomienda reducir su concentración debido a los efectos negativos en la salud de los consumidores con especial sensibilidad

I-5 Tratamientos alternativos al uso del SO₂ en enología

Por todo lo descrito anteriormente las investigaciones actuales se centran en la búsqueda de otros conservantes y tecnologías innovadoras, inofensivos para la salud, que pueden reemplazar o reducir sus niveles en el vino. Las nuevas alternativas deben garantizar su estabilidad microbiológica a la vez que proteger contra la oxidación, sin mermar las propiedades organolépticas del vino.

Las nuevas alternativas para sustituir y/o reducir el SO₂ se pueden dividir principalmente en dos grupos: i) alternativas químicas, que consisten en la adición al vino de compuestos tales como dicarbonato de dimetilo, complejos de plata, lisozimas, bacteriocinas, quitosano o extractos procedentes de plantas; ii) alternativas físicas tales como ultrasonidos, luz ultravioleta, pulsos eléctricos, o alta presión hidrostática. Los efectos en el vino, así como sus desventajas en la sustitución del sulfuroso se han resumido en la *Tabla 1.8*. Hasta la fecha, ninguna de estas alternativas ha demostrado ser tan eficaz como el sulfuroso. Se ha demostrado que un reemplazo parcial del sulfuroso es posible si se combinan tratamientos para reducir la actividad de enzimas y el crecimiento microbiano. Por otra parte, hay que considerar además de que para llevar a cabo los tratamientos físicos la infraestructura es compleja y costosa, ninguno de los tratamientos físicos hasta la fecha están autorizados.

Tabla 1.8. Alternativas químicas y físicas al sulfuroso: efectos y desventajas (Guerrero & Cantos-Villar, 2015; Santos et al., 2012)

Alternativas	Ventajas	Desventajas	Bibliografía
MÉTODOS FÍSICOS			
Pulsos eléctricos	<ul style="list-style-type: none"> - elimina microorganismos patógenos - aumenta la extracción de compuestos fenólicos - acelera el envejecimiento de los vinos 	<ul style="list-style-type: none"> - corrosión de los materiales de los electrodos de metal - infraestructura compleja y costosa 	1-6
Ultrasonidos	<ul style="list-style-type: none"> - aumenta la extracción de compuestos fenólicos 	<ul style="list-style-type: none"> - infraestructura compleja y costosa - las esporas de hongos son resistentes - faltan ensayos a gran escala 	1

Radiación ultravioleta	- elimina microorganismos patógenos	- menos efectiva en vinos tintos que en blancos - necesidad de un largo tiempo de exposición - modifica las características sensoriales de los vinos	7, 8
Alta presión hidrostática	- elimina microorganismos patógenos	- infraestructura compleja y costosa - disminuye la concentración de polifenoles - modifica las características sensoriales de los vinos - acelera reacciones de Maillard	9-12
ADITIVOS QUÍMICOS			
Dicarbonato de dimetilo	- inhibición del crecimiento de microorganismos	- menos efectivo en bacterias que en levaduras	13-16
Complejos de plata	- inhibe el crecimiento de microorganismos	- no inhibe procesos de oxidación, pudiendo afectar a color y aroma, especialmente en blancos	17-19
Bacteriocinas	- inhibición de bacterias - control de la fermentación maloláctica	- no afecta al crecimiento de levaduras - no posee propiedades antioxidantes	20
Lisozimas	- inhibe el crecimiento de bacterias - control de la fermentación maloláctica	- baja actividad contra bacterias gram-negativas y levaduras - se une a los compuestos polifenólicos de los vinos tintos - dan lugar a la formación de turbidez	21-30
Compuestos fenólicos	- Inhibición del crecimiento de microorganismos - Presentan alta capacidad antioxidante - Pueden dar lugar a mejoras en las características sensoriales	- Pueden dar lugar a cambios en el color y aroma	29-34

(1) García Martín & Sun, 2013; (2) Garde-Cerdán, Marsellés-Fontanet, et al., 2008; (3) Lustrato et al., 2010; (4) Marsellés-Fontanet et al., 2009; (5) Puértolas, López, et al., 2009; (6) Puértolas, Saldaña, Álvarez, et al., 2010; (7) Falguera et al., 2013; (8) Fredericks et al., 2011; (9) Morata

et al., 2012; (10) Santos et al., 2013; (11) Santos et al., 2015; (12) Santos et al., 2016; (13) Costa et al., 2008; (14) Divol et al., 2005; (15) Nieto-Rojo et al., 2015; (16) Threlfall & Morris, 2002; (17) García-Ruiz et al., 2015; (18) Garde-Cerdán et al., 2014; (19) Izquierdo-Cañas, García-Romero, Huertas-Nebreda, & Gómez-Alonso, 2012; (20) Rojo-Bezares, Sáenz, Zarazaga, Torres, & Ruiz-Larrea, 2007; (21) Azzolini, Tosi, Veneri, & Zapparoli, 2010; (22) Bartowsky, Costello, Villa, & Henschke, 2004a; (23) Cejudo-Bastante et al., 2010; (24) Chung & Hancock, 2000; (25) Enrique et al., 2010; (26) Gao et al., 2002; (27) Lasanta, Roldán, Caro, Pérez, & Palacios, 2010; (28) López et al., 2009; (29) Sonni, Cejudo Bastante, Chinnici, Natali, & Riponi, 2009; (30) Sonni, Chinnici, Natali, & Riponi, 2011; (31) Fracassetti, Gabrielli, Costa, Tomás-Barberán, & Tirelli, 2016; (32) García-Ruiz, Rodríguez-Bencomo, et al., 2013; (33) García-Ruiz, Moreno-Arribas, Martín-Álvarez, & Bartolomé, 2011; (34) González-Rompinelli et al., 2013.

I-5.1 Tratamientos físicos

I-5.1.1 Pulsos eléctricos

La técnica de campo eléctrico pulsado (PEF) es un tratamiento no térmico basado en la aplicación de pulsos eléctricos cortos (μs) de alto voltaje ($> 70 \text{ kV/cm}$) a productos localizados entre dos electrodos durante un período corto de tiempo, por lo general a escala de microsegundos (Buckow, Ng, & Toepfl, 2013; Puértolas, López, et al., 2009; Yang, Huang, Lyu, & Wang, 2016). Estudios realizados en mostos y vinos tratados con PEF han demostrado la inactivación de bacterias y levaduras, así como la inactivación de polifenoloxisada (Garde-Cerdán, Arias, Martín-Belloso, & Ancín-Azpilicueta, 2016; Lustrato et al., 2006, 2010; Lustrato, Alfano, De Leonardis, Macciola, & Ranalli, 2015; Puértolas, López, et al., 2009; Zhao et al., 2010). En general las levaduras son más sensibles a los PEF que las bacterias al PEF (Álvarez, Raso, Sala, & Condón, 2003). Sin embargo, la letalidad de los tratamientos PEF depende de la matriz de los alimentos, los microorganismos, y condiciones de tratamiento (Yang et al., 2016). El impacto de la aplicación PEF en distintos parámetros de calidad del vino y sobre las propiedades relacionadas con la salud también se ha estudiado en la última década. El tratamiento prefermentativo de PEF mejora la extracción de compuestos fenólicos en el vino de uva y puede aumentar el contenido de polifenoles y, por tanto, reducir el tiempo de maceración (Delsart et al., 2014, 2016; El Darra et al., 2016; Garde-Cerdán et al., 2016; Garde-Cerdán, Marsellés-Fontanet, Arias-Gil, Martín-Belloso, & Ancín-Azpilicueta, 2007; Noelia López, Puértolas, Hernández-Orte, Álvarez, & Raso, 2009; Puértolas, López, Condón, Álvarez, & Raso, 2010; Puértolas, Saldaña, Condón, Álvarez, & Raso, 2009). Si bien el aumento de polifenoles

depende de la intensidad de campo eléctrico, el tiempo de tratamiento, el tiempo de almacenamiento, y la variedad de uva (López-Giral et al., 2015; Yang et al., 2016). Estudios recientes han demostrado la mejora en la actividad de DPPH y la capacidad bioprotectora en los zumos de uva después del tratamiento con PEF (Leong, Burritt, & Oey, 2016). Diversos autores han verificado que la tecnología de PEF mejora las características cromáticas de los vinos (Jensen, Demiray, Egebo, & Meyer, 2008; Puértolas, López, et al., 2010; Puértolas, Saldaña, Condón, Álvarez, & Raso, 2010; Yang et al., 2016). Respecto a otras características físico-químicas, tales como pH, acidez total y volátil, parece que los efectos del tratamiento PEF pueden ser considerados como mínimos (El Darra, Grimi, Maroun, Louka, & Vorobiev, 2013; López, Puértolas, Condón, Álvarez, & Raso, 2008; Noelia López et al., 2009). En cuanto al análisis sensorial del vino tratado con PEF no hay ninguna conclusión unificada hasta el momento (Yang et al., 2016). Aunque autores han descrito que los vinos obtenidos con PEF y sin SO₂ presentaron un aroma menos complejo que los obtenidos con SO₂ (Garde-Cerdán et al., 2007).

La técnica PEF es capaz de controlar el crecimiento de microorganismos y mejorar la extracción de compuestos fenólicos. Además, es una técnica de bajo consumo de energía y requiere cortos tiempos de procesamiento sin causar ningún efecto perjudicial en el flavor, el color del mosto y vino. Todo ello hace que esta tecnología sea una buena alternativa para reducir SO₂ en la conservación de vino (Puértolas, López, et al., 2010).

I-5.1.2 Ultrasonidos

En los últimos años el tratamiento con ultrasonidos (US) se está utilizando como alternativa a los tratamientos de pasteurización y esterilización de productos alimenticios (O'Donnell, Tiwari, Bourke, & Cullen, 2010). La inactivación de microorganismos o enzimas, como la polifenoloxidasa es causada principalmente por procesos como cavitación, y/o químicos (formación de radicales libre). Algunos autores han propuesto el uso de US en distintas etapas de la vinificación: en mostos para reducir la carga de microorganismos alterantes antes de la inoculación de levaduras y/o inicio de la FML y aumentar los compuestos del color y el flavor en el vino (Butz & Tauscher, 2002; Jiranek, Grbin, Yap, Barnes, & Bates, 2008). Además, esta tecnología tiene un efecto mínimo en la degradación de parámetros clave de calidad como el color, el ácido

ascórbico, y el contenido de antocianinas de zumos de frutas (Tiwari, O'Donnell, & Cullen, 2009). Sin embargo, la efectividad del tratamiento US depende del tipo y número de bacterias (Tsukamoto et al., 2004), estando poco estudiado en vinos.

I-5.1.3 Luz ultravioleta visible

La luz ultravioleta es una radiación germicida no iónica que ocupa una banda ancha de longitudes de onda comprendida entre 200 nm (rayos X) y 400 nm (luz visible). El espectro UV se puede dividir en tres regiones: luz UV de longitud de onda corta (UV-C) con longitudes de onda en el intervalo de 200-280 nm, luz UV de longitud media (UV-B) con longitudes de onda comprendidas entre 280 y 320 nm, luz UV de longitud larga (UV-A) con longitudes de onda en el rango de 320-400 nm (Falguera, Pagán, Garza, Garvín, & Ibarz, 2011). La luz UV ha sido estudiada para la desinfección de fruta fresca y vegetales y preservar su calidad (Bintsis, Litopoulou-Tzanetaki, & Robinson, 2000; Yaun, Sumner, Eifert, & Marcy, 2004). Algunos estudios han mostrado que la UV-C puede ser utilizada para la reducción de SO₂ en la vinificación, siendo necesaria una cantidad de SO₂ para inhibir completamente la actividad de la polifenoloxidasas en vinos blancos. Además, la irradiación del mosto no afectó a los parámetros de calidad del vino (pH, ácido tartárico y alcohol), aunque sí se vieron afectados los parámetros del color (Falguera et al., 2013; Rizzotti, Levav, Fracchetti, Felis, & Torriani, 2015). Hasta el momento no existen datos del efecto de la UV-C sobre el perfil aromático de los vinos.

La capacidad de penetración y la eficacia de la irradiación con UV-vis depende de la apariencia y las características del producto, tales como color, absorbancia, densidad, materia en suspensión, y los sólidos solubles que pueden evitar que la luz UV-C llegue a los microorganismos en el medio líquido, siendo esta tecnología más efectiva en vinos blancos (Fredericks et al., 2011; Rizzotti et al., 2015). Así, estos resultados muestran que el uso de este tratamiento en vino a tintos es limitado, mientras que en vinos blancos debe ser utilizado al final de la vinificación, cuando el vino presenta una menor turbidez (Fredericks et al., 2011). Sin embargo, esta tecnología presenta dos grandes limitaciones para ser utilizada en la conservación del vino. Por una parte, la necesidad de un elevado tiempo de exposición y, por otra parte, el poco volumen que se puede tratar.

I-5.1.4 Alta presión hidrostática

Durante la última década, ha aumentado el uso de la alta presión hidrostática (APH) como una tecnología no térmica para la conservación de alimentos. Los alimentos son sometidos a una presión de 400-600 MPa. La aplicación de APH en vinificación ha demostrado la eficacia de APH en la inactivación de microorganismos (Buzrul, 2012; Delfini et al., 1995; González-Arenzana et al., 2016; Puig, Olmos, Quevedo, Guamis, & Mínguez, 2008; Santos et al., 2013; Tabilo-Munizaga et al., 2014). Sin embargo, la influencia de esta tecnología sobre los parámetros de calidad del vino, tales como la composición volátil aromática, el color, la astringencia, el amargo, el contenido en polifenoles, depende de la presión y el tiempo de aplicación (Buzrul, 2012; Santos et al., 2013, 2016; Tao et al., 2013). El tratamiento del vino con APH acelera las reacciones de Maillard, es decir, la oxidación de alcoholes y ácidos grasos obteniéndose vinos con una composición volátil similar a los vinos muy envejecidos y/o tratados térmicamente (Santos et al., 2015, 2016). Además, dependiendo de la presión y el tiempo de aplicación de la APH en mosto pueden activar algunas enzimas como la PPO, provocando una disminución de la capacidad antioxidante y el contenido de antocianinas (Del Pozo-Insfran, Del Follo-Martinez, Talcott, & Brenes, 2007; Talcott, Brenes, Pires, & Del Pozo-Insfran, 2003).

A pesar de que diversos estudios han demostrado el potencial de APH en mostos y vinos como antimicrobiano, la imposibilidad de poder utilizarse el tratamiento en continuo propone el uso de esta tecnología sólo es viable después del embotellado.

I-5.2 Tratamientos químicos y bioquímicos

I-5.2.1 Dicarbonato de dimetilo (DMDC) (E-242)

El dicarbonato de dimetilo (DMDC) (E-242) es un inhibidor químico de los microorganismos propuesto para sustituir el SO₂ en la elaboración del vino (Costa et al., 2008; Divol et al., 2005). La Unión Europea ha aprobado su uso en vinos a una concentración máxima de 200 mg/L en el embotellado de vinos con más de 5 g/L de azúcar residual (Reglamento (CE) n° 643/2006). El uso de DMDC también está autorizado en EEUU, Australia hasta un máximo de 200 mg/L (Costa et al., 2008).

Son varios los inconvenientes que presenta el uso del DMDC para el control microbiológico en la elaboración del vino. Por una parte, diversos estudios han demostrado que son más efectivos contra levaduras que contra bacterias, bajo los límites de concentración autorizados (Costa et al., 2008; Delfini et al., 2002; Divol et al., 2005). Además, su eficacia antimicrobiana en el vino depende de la temperatura, contenido de etanol, pH y, esencialmente, de la especie, cepa y concentración inicial de microorganismos (Costa et al., 2008). Por otra parte, las levaduras mueren tras la adición de este compuesto por lo que su uso no es aconsejable antes del fin de la fermentación (Divol et al., 2005; Renouf, Strehaiano, & Lonvaud-Funel, 2008). El DMDC se convierte rápidamente en metanol, a las 12-24 horas de su adición al vino, por lo que su efecto es efímero, no recomendándose su uso durante el almacenamiento (Costa et al., 2008; Divol et al., 2005).

Por tanto, la incapacidad de DMDC para proteger el vino de la oxidación e inhibir el crecimiento de varias bacterias utilizando la dosis máxima legal autorizada de DMDC, hace que su uso solo en la elaboración del vino no sea suficiente para sustituir al SO₂ (Nieto-Rojo et al., 2015; Santos et al., 2012; Threlfall & Morris, 2002).

I-5.2.2 Complejos de Plata

El amplio espectro de actividad antimicrobiana de la plata, especialmente sobre bacterias Gram-positiva y Gram-negativas, así como sobre hongos se conoce desde la antigüedad (Rathnayake, Ismail, Azahari, Darsanasiri, & Rajapakse, 2012; Silver, Phung, & Silver, 2006).

Diversos estudios han comprobado la alta capacidad antiséptica del complejo de plata coloidal (CPC) en vinos, capaz de controlar el desarrollo de bacterias lácticas y acéticas durante la elaboración de vino blanco y tinto, El empleo de CPC no afectó a los parámetros físico-químicos y las características sensoriales, aunque se vieron afectados los parámetros relacionados con el color en el caso de vinos blancos se vieron afectados por la oxidación (Izquierdo-Cañas et al., 2012). En contraste, Garde-Cerdán y col. (2014) no encontraron diferencias significativas en los parámetros relacionados con el color y las características sensoriales del vino (Garde-Cerdán et al., 2014).

La nanotecnología está teniendo un alto impacto en varias áreas de la industria alimentaria, incluyendo la elaboración del vino. Entre estos nanomateriales, el uso de nanopartículas de plata (AgNPs) parece ser muy eficiente en el control microbiano en vinos (García-Ruiz et al., 2015; Monge & Moreno-Arribas, 2016).

Sin embargo, varios obstáculos científicos, tecnológicos y legislativos deben ser superados para establecer aplicaciones in situ de esta tecnología en la industria del vino (Monge & Moreno-Arribas, 2016). En este sentido es necesario investigar sobre las implicaciones toxicológicas que conllevan su empleo. Algunos estudios ponen de manifiesto que las nanopartículas de plata pueden presentar citotoxicidad a través de la interacción de las nanopartículas con proteínas y enzimas a nivel intracelular (Avalos, Isabel, Mateo, & Morales, 2013; Chen & Schluesener, 2008; Choi et al., 2008).

I-5.2.3 Lisozima

Diversas investigaciones han centrado sus estudios en la búsqueda de “agentes microbianos naturales” como alternativa al SO₂ en la elaboración de vinos. Una de estas alternativas es la lisozima, proteína que se obtiene a partir de la albumina de huevo y la cual posee propiedades antimicrobianas contra ciertas bacterias Gram positivas, incluyendo BAL (Azzolini et al., 2010; Bartowsky, 2009; Delfini et al., 2004). Por este motivo se ha propuesto como alternativa al SO₂ para controlar la FML, así como el crecimiento espontáneo de bacterias lácticas en el vino tinto y blanco, que a menudo causan deterioro o parada de fermentación (Bartowsky et al., 2004a; Gao et al., 2002; Pilatte et al., 2000). La lisozima también se ha estudiado como un agente estabilizante en el envejecimiento biológico de tipos específicos de vinos como el jerez (Lasanta et al., 2010). Estos autores encontraron que el tratamiento con lisozima controlaba con éxito el desarrollo de BAL, evitando así la fermentación heteroláctica en estos vinos. Sin embargo, Roldán y col. (2012) encontraron que la lisozima puede afectar a las levaduras, inhibiendo su agregación y flotación e influyendo en el desarrollo del velo de flor (Roldán, Lasanta, Caro, & Palacios, 2012). La eficacia para inhibir BAL no deseadas difiere según la especie y las condiciones de vinificación; además posee un efecto limitado en bacterias acéticas y nulo frente a levaduras (Azzolini et al., 2010; Blättel et al., 2009; Delfini et al., 2004; Gao et al., 2002; López et al., 2009).

Así, aunque podría ser una alternativa válida del SO₂ para el control del BAL en la elaboración de vino blanco, diversos estudios han mostrado que la lisozima es menos eficaz en vinos tintos debido a que la actividad antimicrobiana de la lisozima frente a BAL podría verse limitada en el vino por las proantocianidinas de bajo peso molecular (Guzzo, Cappello, Azzolini, Tosi, & Zapparoli, 2011; Liang et al., 2013; Tirelli & De Noni, 2007). La combinación de lisozima con coloides de mosto y sólidos suspendidos puede conducir a una reducción significativa de la enzima libre (Azzolini et al., 2010; Delfini et al., 2004). Otros factores, como el pH y el etanol, parecen no afectar negativamente a la actividad de la lisozima (Amati, Chinnici, Piva, Arfelli, & Rinoni, 1996; Claudio Delfini et al., 2004; Gao et al., 2002). Otros autores han estudiado el efecto del uso de lisozima en la calidad sensorial de los vinos. Bartowsky y col. (2004) encontraron que el uso de la lisozima no merma la calidad sensorial de vinos blancos y tintos después de 6 meses de embotellado (Bartowsky, Costello, Villa, & Henschke, 2004b). Sonni y col. (2011) encontraron que los vinos blancos fermentados con lisozima mostraron una mayor cantidad de ésteres y menor cantidad de alcoholes superiores que los vinos fermentados con SO₂ (Sonni et al., 2011). Aunque parece que la lisozima no tiene efecto detectable sobre el aroma y el sabor del vino, se han observado efectos secundarios no deseados, tales como la pérdida de color en los vinos tintos y la formación de neblina en los blancos (Bartowsky et al., 2004b).

Estudios recientes han mostrado que, utilizando la lisozima combinada con otros compuestos, tales como nisina, taninos hidrolizados, además de mantener su actividad antimicrobiana contra las BAL, mejora la calidad sensorial de los vinos respecto al SO₂ (Cejudo-Bastante et al., 2010; Nieto-Rojo et al., 2015; Sonni et al., 2009).

El uso de la lisozima en la elaboración del vino fue aprobado por la OIV en 1997 (resolución OENO 10/97), con una dosis de aplicación elevada (20-50 g/hL) (Bartowsky, 2009; Weber et al., 2009). La lisozima parece ser una alternativa a la utilización de SO₂ para controlar la FML, así como el crecimiento espontáneo de bacterias lácticas en el vino tinto y blanco. Sin embargo, la lisozima no posee las propiedades antioxidantes del SO₂ (Desert & Hubert, 2002), ni su actividad antimicrobiana no específica hacia las bacterias Gram-negativas y levaduras (Liburdi, Benucci, & Esti, 2014). Por otra parte, durante la última década varios estudios han revelado reacciones alérgicas graves debido a la presencia de

lisozima en vinos (Pérez-Calderón, Gonzalo-Garijo, Lamilla-Yerga, Mangas-Santos, & Moreno-Gastón, 2007; Weber et al., 2009; Weber, Steinhart, & Paschke, 2007). Carstens y col., (2014) aplicaron diferentes filtraciones y otros procesos enológicos para evaluar su potencial de retirada de la lisozima de los vinos. Sólo la bentonita demostró ser capaz de reducir significativamente los residuos alergénicos. Según estos autores, la lisozima puede estar presente en el producto final a concentraciones que podrían representar una amenaza dependiendo de la técnica de producción empleada (Carstens et al., 2014). Por ello, los vinos tratados con lisozima están sujetos a un etiquetado específico de acuerdo con el reglamento de la Comisión Europea (EU) No. 1266/2010 del 22 diciembre 2010, que modifica la Directiva 2007/68/CE en cuanto a los requisitos de etiquetado de los vinos (Liburdi, Benucci, Palumbo, & Esti, 2016).

I-5.2.4 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos o proteínas producidas por diferentes grupos de bacterias que inhiben el crecimiento de otras especies bacterianas gram-positivas (Bartowsky, 2009; Gálvez, Abriouel, López, & Omar, 2007). Las bacteriocinas se caracterizan por ser muy específicas, no aportan color ni olor y carecen de efectos tóxicos sobre el ser humano (Abee, Krockel, & Hill, 1995). La nisina (producida por *Lactococcus lactis* de origen no enológico) es actualmente la única bacteriocina ampliamente utilizada como conservante de alimentos (Cleveland, Montville, Nes, & Chikindas, 2001). Rojo-Bezares y col. (2007) investigaron el uso de nisina sobre *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, bacterias de ácido acético y levadura. Las bacterias Gram-positivas, especialmente *O. oeni*, fueron más sensibles que las bacterias Gram-negativas, mientras que las levaduras fueron las más resistentes (Rojo-Bezares et al., 2007).

Otras bacteriocinas estudiadas son la pediocina y plantaricina. Diversos estudios han demostrado que son activas contra una serie de BAL, incluyendo cepas de *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus spp* (Bauer, Nel, & Dicks, 2003; Rojo-Bezares et al., 2007; Yurdugül & Bozoglu, 2002). Aunque ninguna de ellas afecta al crecimiento de levaduras (Bauer et al., 2003). García-Ruiz y col. (2013) estudiaron el uso de la lacticina 3147, una bacteriocina de amplio espectro producida por cepas de *Lactococcus lactis* aislada originalmente de productos lácteos, para controlar el crecimiento del vino BAL. Encontraron que

la actividad de la bacteriocina era dependiente de la cepa, siendo las cepas *O. oeni* las más sensibles y *Lactococcus casei* las más resistentes (García-Ruiz, Requena, et al., 2013).

Dada la especificidad de la nisina y el efecto sinérgico de ésta con el metabisulfito en la inhibición específica del crecimiento de las cepas de BAL del vino, se ha propuesto el uso combinado de éste con el metabisulfito como un nuevo método para la conservación del vino (Díez et al., 2012; García-Ruiz, Requena, et al., 2013; Rojo-Bezares et al., 2007). A pesar de los prometedores resultados frente a bacterias alterantes del vino, su uso aún no ha sido aprobado por la OIV. Además, no presentan capacidad antioxidante y su efecto sobre las propiedades organolépticas del vino aún son desconocidos (Santos et al., 2012).

I-5.2.5 Quitosano

El quitosano es un heteropolisacárido lineal de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa y 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa derivado de la quitina con actividad antimicrobiana reconocida y biocompatibilidad (Raafat & Sahl, 2009). Son varios los estudios que han demostrado la eficacia inhibidora del quitosano frente a levaduras y bacterias de deterioro, especialmente *Brettanomyces bruxellensis* (Bağder Elmacı et al., 2015; Ferreira et al., 2013; Gómez-Rivas et al., 2004; Nardi, Vagnoli, Minacci, Gautier, & Sieczkowski, 2014; Petrova, Cartwright, & Edwards, 2016; Taillandier et al., 2015). Gómez-Rivas y col. (2004) estudiaron la acción antimicrobiana del quitosano frente a *Saccharomyces cerevisiae* y *Brettanomyces intermedius* (*Brettanomyces bruxellensis*). Estos autores observaron que la adición de concentraciones muy altas de quitosano (3 a 6 mg/mL) inhibió el crecimiento de *B. bruxellensis* en un medio de cultivo, mientras que *S. cerevisiae* no se vio afectada (Gómez-Rivas et al., 2004). En contraste, Ferreira y col. (2013) han descrito que las levaduras se vieron afectadas a concentraciones más bajas (0.2 a 0.5 mg/mL), dependiendo del peso molecular de las moléculas de quitosano (cuanto menor es el peso molecular, menor será el valor mínimo de concentración inhibitoria) y las cepas ensayadas (Ferreira et al., 2013).

Sin embargo, el quitosano influyó en algunas características fisico-químicas del vino, particularmente la tonalidad y la intensidad del color. Resultados similares fueron obtenidos por Elmacı y col. (2015) para *Brettanomyces bruxellensis*. Esta

especie, junto con *Lactobacillus hilgardii* y *Oenococcus oeni*, fue uno de los microorganismos relacionados con el vino más susceptibles al quitosano, siendo completamente inactivado a 0.2 mg/mL (Elmacı et al., 2015). Recientemente Petrova y col. (2016) estudiaron la eficacia contra *Brettanomyces bruxellensis* del quitosano con diferentes procedencias (caparazón de cangrejo, hongos y lactato de quitosano). Encontraron que, dependiendo de la concentración, todas las preparaciones de quitosano que se adicionaron a los vinos tintos redujeron considerablemente las poblaciones de *Brettanomyces bruxellensis*. Sin embargo, los vinos no fueron completamente estables después del tratamiento ya que las poblaciones eventualmente aumentaron (Petrova et al., 2016). Chinnici y col., (2014) recientemente estudiaron el efecto antioxidante del quitosano en una matriz modelo. Concluyeron que el color era comparable a las muestras con sulfito dado que el quitosano absorbió aproximadamente el 80% de las especies fenólica oxidadas. Además, se redujo la oxidación de tioles sugiriendo que este aditivo podría contribuir a mantener el carácter varietal de los vinos procedentes de uvas aromáticas y vinificadas con cantidades reducidas de sulfito (Chinnici, Natali, & Riponi, 2014).

El quitosano se considera no tóxico, biodegradable, y se ha utilizado en las industrias alimentaria, farmacéutica, agrícola, textil, de tratamiento del agua y cosmética (Kong, Chen, Xing, & Park, 2010). La aplicación de quitosano como un agente antimicrobiano en la industria del vino es relativamente reciente y los datos científicos necesarios para apoyar el uso eficiente de quitosano es todavía escaso. Además, no existen estudios del impacto de la quitosano en las características fisico-químicas del vino. Por otra parte, el uso de quitosano como un sustituto potencial de los sulfitos debe tener en cuenta algunas de las limitaciones del quitosano, como que, sólo es soluble en condiciones ácidas obtenido mediante el uso de algunos ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético), posee una alta viscosidad y coagula las proteínas a altos valores de pH (Campos, Couto, & Hogg, 2016). Además, aunque el uso de quitosano de origen fúngico recientemente fue aprobado por la Organización Internacional de la Viña y del Vino (OIV) para clarificación del mosto y el vino (Chagas, Monteiro, & Ferreira, 2012), eliminar de metales pesados o la ocratoxina A (Bornet & Teissedre, 2008), su uso como alternativa aún no está autorizado.

I-5.2.6 Extractos vegetales ricos en polifenoles

Los compuestos fenólicos o polifenoles son constituyentes naturales de frutas, verduras, cereales, legumbres secas, chocolate y bebidas, como el té, café o vino. (Crozier, Jaganath, & Clifford, 2009).

Los polifenoles han demostrado actividad antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena, antiinflamatorio y vasodilatador, entre otros (Baroni, Di Paola Naranjo, García-Ferreira, Otaiza, & Wunderlin, 2012; King, Bomser, & Min, 2006; Xia, Deng, Guo, & Li, 2010). La actividad antioxidante de los polifenoles se debe principalmente a sus propiedades redox, que les permite captar radicales libres, donar átomos de hidrógeno o electrones o cationes metálicos (Amarowicz, Pegg, Rahimi-Moghaddam, Barl, & Weil, 2004; Dai & Mumper, 2010). Esta actividad depende de su estructura química y el número y posición de los grupos hidroxilos, así como de la naturaleza del anillo aromático de sustitución (anillo central) (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996; Robards, Prenzler, Tucker, Swatsitang, & Glover, 1999).

Otros estudios han demostrado que los compuestos fenólicos, tales como los ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, flavanoles, flavonoles y estilbenos, poseen actividad microbiana (Campos, Figueiredo, Hogg, & Couto, 2009; García-Ruiz, Bartolomé, Cueva, Martín-Álvarez, & Moreno-Arribas, 2009; Harris, Jiranek, Ford, & Grbin, 2010; Vaquero, Alberto, & de Nadra, 2007). Específicamente, algunos compuestos fenólicos como el resveratrol, hidroxitirosol y la quercetina, han mostrado efecto inhibitor sobre diversos microorganismos patógenos (Campos et al., 2016; Daglia, 2012). Esta actividad, al igual que la actividad antioxidante, depende de su estructura química y el número y posición de los grupos hidroxilos (Alañón, García-Ruiz, Díaz-Maroto, Pérez-Coello, & Moreno-Arribas, 2015; García-Ruiz et al., 2008).

En los últimos años, en el afán de encontrar agentes antimicrobianos naturales que permitan sustituir o disminuir el uso de sulfitos en los vinos, la utilización de compuestos fenólicos como alternativa al SO₂ en la elaboración de vinos está adquiriendo un gran interés científico. En esta línea, las especias los aceites esenciales y los extractos de origen vegetal, ricos en compuestos fenólicos, son interesantes candidatos como alternativa al SO₂, al poseer actividad antioxidante y antimicrobiana.

Los aceites esenciales han mostrado actividad microbiológica contra microorganismos presentes en la uva y el vino (Chavan & Tupe, 2014; Lang & Buchbauer, 2012). Recientemente, se investigó el potencial antimicótico y el modo de acción de dos aceites esenciales obtenidos principalmente de orégano, carvacrol y timol, contra la flora natural de levaduras de uvas y levaduras alterantes de vino. Los dos aceites esenciales mostraron actividad antifúngica comparable o mejor que la de metabisulfito de potasio. Sin embargo, su uso parece estar limitado debido, por una parte, a las restricciones reglamentarias y, por otra parte, debido a su impacto sobre las características sensoriales del vino (Chavan & Tupe, 2014). En la actualidad, los únicos vinos en los que se autoriza la adición de resina de pino son los vinos griegos (Retsina).

Salaha y col. (2008) evaluaron el efecto de un producto natural antioxidante alternativo extraído del rábano negro sobre determinados parámetros de calidad del vino tinto (color, contenido fenólico y actividad antioxidante) y pudieron producir vinos secos comercialmente aceptables con niveles reducidos de SO₂ (Salaha, Kallithraka, Marmaras, Koussissi, & Tzourou, 2008).

García-Ruiz y col. (2012) estudiaron la utilización de productos vegetales de diferentes procedencias (especias, flores, hojas, frutas, legumbres, semillas, pieles y subproductos agrícolas y otros productos naturales) como posible alternativa para reducir o eliminar el SO₂, particularmente sobre el control de la FML y el crecimiento de bacterias lácticas y acéticas en vinos (García-Ruiz et al., 2012). Entre los extractos naturales estudiados, extractos de piel de almendra y de hoja de eucalipto fueron estudiados como conservantes durante la crianza en barricas de vinos de Verdejo confirmando el efecto de estos extractos sobre la estabilidad microbiana de los vinos (García-Ruiz, Rodríguez-Bencomo, et al., 2013; González-Rompinelli et al., 2013). Aunque la composición fenólica y aromática se modificaron, no encontraron diferencias significativas en el análisis sensorial de los vinos (González-Rompinelli et al., 2013).

Recientemente, han sido estudiadas la actividad microbiana y antioxidante y el contenido de polifenoles totales de extractos de maderas enológicas de diferente origen y tostado (Alañón et al., 2015). Entre los microorganismos estudiados, las bacterias acéticas eran especialmente sensibles a los extractos de madera enológica. El extracto de madera de cerezo fue el que mostró un mayor amplio

espectro de acción. Sin embargo, no encontraron relación entre la actividad antimicrobiana con la actividad antioxidante o con el contenido total de polifenoles, lo que sugiere que la actividad antimicrobiana depende más de la estructura-función de los extractos fenólicos que de la cantidad total de fenoles (Alañón et al., 2015).

Diversos autores han estudiado el efecto de la adición de taninos como alternativa al SO₂ sobre diversos parámetros de calidad del vino (Bautista-Ortín, Martínez-Cutillas, Ros-García, López-Roca, & Gómez-Plaza, 2005; Cejudo-Bastante et al., 2010; Sonni et al., 2009). La adición de taninos enológicos no parece afectar al proceso de fermentación (Cejudo-Bastante et al., 2010). Sin embargo, el uso de taninos afectó a diversos parámetros de calidad de los vinos. Sonni y col. (2009) comprobaron que la utilización de taninos enológicos en la elaboración de vinos blancos modificaba la composición volátil de los vinos, proporcionando incluso una mejor percepción sensorial en comparación con el vino con SO₂ (Sonni et al., 2009). Sin embargo, Bautista-Ortín y col. (2005) describieron que el uso de dos diferentes taninos enológicos (galotaninos y procianidinas) en la elaboración de vinos tintos, no proporcionó ninguna mejora en las características cromáticas y sensoriales de los vinos tintos, ya que causaron un aumento del color amarillo acompañados de una mayor astringencia, sequedad y amargor (Bautista-Ortín et al., 2005).

A pesar de los escasos estudios publicados en la actualidad, los resultados obtenidos hasta ahora son alentadores y pueden indicar un futuro prometedor en cuanto al uso de productos naturales como alternativas para reducir y/o sustituir el uso de SO₂ en los vinos.

En resumen, muchas de las nuevas tecnologías estudiadas han descrito a fondo las propiedades antimicrobianas y antioxidantes, pero pocos han sido estudiados en vino y comparado al mismo tiempo con un vino tratado con SO₂. Hasta el momento, ninguna hasta ahora ha sido capaz de sustituir completamente al SO₂ en la elaboración de vinos. El reto para la comunidad científica y la industria del vino es, por tanto, encontrar alternativas que eliminen completamente el uso del SO₂ a fin de producir vinos más saludables y que cumplan con las exigencias de calidad de los consumidores. El uso de antioxidantes potentes parece ser la opción con más expectativas cuando se buscan alternativas al SO₂.

I-6 Subproductos de la industria oleica y vitivinícola

La industria agroalimentaria, tales como la vitivinícola y oleica, generan en el desarrollo de sus actividades una gran cantidad de residuos sólidos, hasta 20% p/p en la industria enológica y un 22% p/p del material utilizado en la industria oleícola (MAGRAMA, 2014). Estos residuos conllevan una serie de implicaciones relacionadas con aspecto de salubridad y medioambientales a los que es necesario dar una correcta gestión. La gestión de residuos en los últimos tiempos está tendiendo hacia aspectos relacionados con la prevención en la generación y unido a una gestión sostenible, entre los que se encuentra el reciclado, nuevo uso, recuperación y valorización de los residuos generados.

La valorización de los residuos vinícolas y oleicos radica actualmente en la elaboración de fertilizantes del suelo, así como un sustrato de fermentación para la producción de biomasa y alimentos para el ganado. Por otra parte, en la actualidad existe una amplia información sobre su contenido de sustancias bioactivas presentes en estos subproductos que promueven una actividad valiosa en la prevención de reacciones oxidativas, problemas cardiovasculares, procesos inflamatorios y estado patofisiológico degenerativo. Así, su valorización como fuente de fitoquímicos bioactivos de aplicación en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria podría constituir una alternativa eficiente, rentable y respetuosa con el medio ambiente para los residuos (Teixeira et al., 2014).

En la actualidad existe un creciente interés de los consumidores por productos más **productos seguros, sanos y de calidad**, alimentos que no supongan un riesgo para la salud, tomando cada vez más importancia los alimentos enriquecidos en compuestos bioactivos y nutracéuticos. Esto ha llevado a una creciente atención hacia la reutilización de residuos agroindustriales ricos en ingredientes vegetales saludables.

I-6.1 Subproductos de la industria oleícola

Hoy en día, uno de los cultivos más importantes a lo largo de toda la cuenca mediterránea es el olivo. Actualmente se dedican unos 8 millones de hectáreas en todo el mundo al cultivo del olivo, de las cuales 7.6 millones se encuentran en la cuenca mediterránea. En España concretamente, esta superficie abarca el

15% de las tierras cultivadas, alcanzando más de 2.6 millones de hectáreas (MAPAMA, 2015b), y una producción de aceite de oliva de 1.36 millones de Tn, convirtiendo a España en el primer productor mundial de aceite de oliva (46% de la producción mundial) (COI, 2016; MAPAMA, 2016). El aceite de oliva, fuente lipídica típica de la dieta mediterránea, se ha asociado con una baja incidencia de varias patologías (Gerber & Hoffman, 2015; Martínez-González et al., 2015) incluyendo enfermedades cardiovasculares (Ros et al., 2014) y trastornos neurológicos (Rodríguez-Morató et al., 2015). El **hidroxitirosol** (3,4-dihidroxifeniletanol, HT) es el principal responsable de las propiedades antioxidantes del aceite de oliva, debido a una eficiente actividad captadora/limpiadora (del Monaco et al., 2015), entre otras propiedades saludable del aceite de oliva (Cioffi et al., 2010; Cornwell & Ma, 2008; Vilaplana Pérez, Auñón Calles, García Flores, & Gil-Izquierdo, 2014). Las concentraciones de HT en el aceite de oliva varían entre 113.7–381.2 mg/kg, dependiendo de la variedad, origen, grado de madurez, método de procesamiento (Brenes, García, García, Rios, & Garrido, 1999; Esti, Cinquanta, & La Notte, 1998; Romero et al., 2004).

El HT se encuentra también de forma natural en el vino tinto con una concentración 1.98 y 3.89 mg/L (Boselli, Minardi, Giomo, & Frega, 2006; Di Tommaso, Calabrese, & Rotilio, 1998; Dudley et al., 2008; Proestos et al., 2005) (tabla 1.9). Incluso se han descrito pequeñas cantidades de HT en subproductos de la industria enológica (Lafka, Sinanoglou, & Lazos, 2007). Aunque las concentraciones encontradas en el vino tinto son más bajas que los encontrados en el aceite de oliva, estudios de biodisponibilidad revelan mayores cantidades de concentraciones HT en las recuperaciones urinarias después de la administración de vino tinto (De La Torre, Covas, Pujadas, Fitó, & Farré, 2006). Estos autores plantearon la hipótesis de la interacción entre etanol y dopamina después de la ingestión de vino tinto, lo que conduce a la formación de hidroxitirosol.

Tabla 1.9. Contenido de hidroxitirosol y tirosol en vinos (Fernandez-Mar y col., 2012)

	Vino blanco (mg/L)	Vino tinto (mg/L)	Vino tinto envejecido (mg/L)
Hidroxitirosol	1.85 ^A	3.89 ^A	25 ^E
	1.5 ^B	1.98 ^D	
	2.69 ^C		

^ADi Tommaso et al., 1998; ^BBoselli et al., 2006; ^CDudley et al., 2008; ^DMinuti, Pellegrino, & Tesei, 2006; ^EProestos et al., 2005

De las 8.766.897 Tn/año de aceituna de almazara que se cosechan en España, se estima que se producen unas 1.929.780 Tn/año de estos subproductos (MAGRAMA, 2014). Con el sistema de extracción actual para la elaboración del aceite de oliva se generan unos residuos líquidos llamados alpechines y una pasta sólida denominada orujo/alperujo. El orujo se utiliza principalmente como combustible, y en los últimos años, dado su alto contenido en microelementos y materia orgánica, también como fertilizante tras su compostaje. Estudios recientes han propuesto al alpeorujo para la producción de biosurfactantes, moléculas de origen biológico y excelente compatibilidad ambiental, con numerosas aplicaciones en campos tan variados como cosmética, medicamentos, alimentación, detergencia o medioambiente (Maass et al., 2016). Estos subproductos son muy ricos en compuestos antioxidantes, muchos de naturaleza polifenólica, entre los que se encuentra el HT. El HT es un polifenol que está presente ya sea fenol simple o esterificado con ácido elenólico para formar oleuropeína aglicona. El HT procede por la hidrólisis de la oleuropeína presente en las aceitunas durante la extracción de aceite de oliva (Boskou, 2008; Esti et al., 1998; Mateos et al., 2001). Dada su gran polaridad, el HT se encuentra en gran concentración en los subproductos procedentes de la elaboración del aceite de oliva (Figura 1.10).

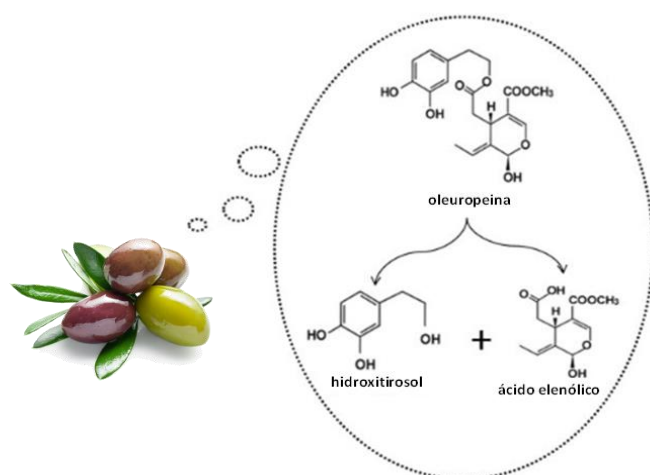


Figura 1.10. Hidroxitirosol derivado de la hidrólisis de la oleuropeína, naturalmente presente en las aceitunas y la hoja de la oliva

La alta capacidad antioxidante es la principal responsable de la gran diversidad de propiedades saludables, como ha recogido la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en su declaración relacionada con los polifenoles de aceituna y la protección de las partículas de LDL frente al estrés oxidativo (EFSA, 2011); y en el reglamento UE N° 432/2012 DE LA COMISIÓN de 16 de mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de

propiedades saludables de los alimentos, donde se recoge como declaración de los polifenoles del aceite de oliva (Diario Oficial de la Unión Europea, 2012a).

A través de diversos estudios sobre el HT se ha demostrado que es el componente responsable de la acción antioxidante de la aceituna y del aceite de oliva. El HT presenta actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* (Mateos, Domínguez, Espartero, & Cert, 2003) (Gonzalez-Santiago et al., 2006) y antiinflamatoria (Schaffer & Podstawa, 2007; Semidalas, Semidalas, Matsoukas, Nixarlidis, & Zoumpoulakis, 2016). El HT inhibe *in vitro* la oxidación de lipoproteínas de baja densidad y modula el equilibrio oxidativo/antioxidante en el plasma (Covas et al., 2006; Visioli, Bellomo, Montedoro, & Galli, 1995). Además, debido a su fuerte actividad antioxidante, el HT es capaz de modular los mecanismos claves implicados en el desarrollo de la aterosclerosis (Carluccio et al., 2003; Gonzalez-Santiago et al., 2006), y el cáncer (Bernini, Gilardini Montani, Merendino, Romani, & Velotti, 2015; Fabiani et al., 2008; Granados-Principal, Quiles, Ramirez-Tortosa, Sanchez-Rovira, & Ramirez-Tortosa, 2010). Otros efectos biológicos incluyen la neuroprotección (De La Cruz et al., 2015). En los últimos años, varios artículos han revelado datos que indican que este componente dietético es capaz de contrarrestar los efectos tóxicos relacionados con la exposición de metales pesados, incluyendo Hg (Mohan, Das, & Rao, 2015; Officioso, Alzoubi, Lang, & Manna, 2016; Tagliaferro, Officioso, Sorbo, Basile, & Manna, 2015).

Además de propiedades antioxidantes, el HT presenta una actividad bactericida importante (Bisignano et al., 1999; Brenes, Medina, Romero, & De Castro, 2007; Medina, Brenes, Romero, García, & Castro, 2007). Medina y col. (2007) evaluaron la actividad antimicrobiana de aceite de oliva, vinagre y diversas bebidas, como el vino, contra los patógenos transmitidos por los alimentos. El vinagre y extractos acuosos del aceite de oliva mostraron la mayor actividad bactericida contra todas las cepas analizadas, seguido de los vinos tintos y blancos. En el estudio realizado por Yangui y col. (2009) extractos obtenidos a partir de subproductos de aceituna, ricos en HT, presentaron capacidad desinfectante y antiséptica a concentraciones relativamente bajas (7-58 mg/L) (Yangui, Dhouib, Rhouma, & Sayadi, 2009). Otros autores han descrito que extractos de subproducto del aceite de oliva mostraron una alta actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Saccharomices cerevisise*, y *Bacillus cereus* (Serra et al., 2008).

No se han descrito efectos tóxicos de este compuesto incluso en dosis muy altas, por lo que presenta un excelente perfil de seguridad (Granados-Principal et al., 2010) y sugiere que los extractos naturales pueden tener aplicaciones importantes en el futuro como agentes antimicrobianos naturales para la industria alimentaria (Serra et al., 2008).

En España se dispone de la materia prima para la obtención de Hidroxitirosol y también del I+D necesarios. Algunas empresas de I+D dedicadas al Hidroxitirosol en el territorio nacional son: Biomaslinic S.L. en Granada (<http://www.biomaslinic.es>), Genosa en Málaga (<http://www.genosa.com>), Nutrafur en Murcia (<http://nutrafur.com>), Probeltegrupo en Murcia (<http://www.probeltegrupo.es>) y Seprox Biotech S.L. en Madrid(<http://www.seprox.es>)

I-6.2 Suproductos derivados de la industria vitivinícola.

La industria vitivinícola produce residuos procedentes del cultivo de la vid, tales como sarmientos y restos de poda, y otros residuos procedentes de la elaboración de mostos o vinos, representados por: desechos orgánicos (orujo de uva, semillas, pulpa y pieles, raspones y hojas), aguas residuales, emisión de gases de efecto invernadero (CO₂, compuestos orgánicos volátiles, etc.), y desechos inorgánicos (tierra de diatomeas, arcilla de bentonita y perlita) (Teixeira et al., 2014).

Del proceso de elaboración del vino tinto se obtienen diversos subproductos: raspones o escobajos (5-10%), orujos prensados (15%) y lías (3%) tras la clarificación. En el caso de la elaboración de vinos blancos se obtienen: raspones (5-10%), hollejos prensados (30%) y lías (3%). Existen también otros subproductos vitivinícolas menos estudiados pero que se consideran de gran interés debido a su volumen y/o composición, entre ellos la madera de poda. La producción de madera de poda oscila entre los 2-5 Tn/ha dependiendo de la zona de cultivo, variedad, prácticas agronómicas, etc. Actualmente se usa para compost y su valor añadido es muy bajo.

Se estima que en Europa se generan 4,5 millones de Tn de subproductos de uva, y en España se calcula que se generan 2.5 millones de Tn de subproductos de la industria vitivinícola anualmente (MAPAMA, 2014); esto supone millones de toneladas de residuos que hay que gestionar. Los tratamientos para reducir la contaminación de los residuos generan unos sobrecostes a las explotaciones

vitivinícolas, pero a la vez, y debido a la cantidad de compuestos beneficiosos que presentan, puede suponer una *oportunidad de negocio* rentable además de realizar un claro *beneficio medioambiental*. De forma general, las principales valorizaciones de los residuos vinícolas son: los raspones se usan para alimentación del ganado, para su incorporación al terreno de cultivo o combustible; los orujos se utilizan como abonos orgánicos o combustible, y también para obtención de alcohol vínico o colorantes; las pepitas para la obtención de aceites; los hollejos para obtención de alcohol vínico y de taninos enológicos; y las lías para recuperación de alcohol vínico y de tartratos (Hidalgo, 2003).

En el caso de los sarmientos y restos de poda son utilizados principalmente como alimento animal o enmiendas del suelo, aunque su valor comercial es bajo dado que generalmente se queman en el campo o se compostan (Çetin, Altinöz, Tarçan, & Göktürk Baydar, 2011).

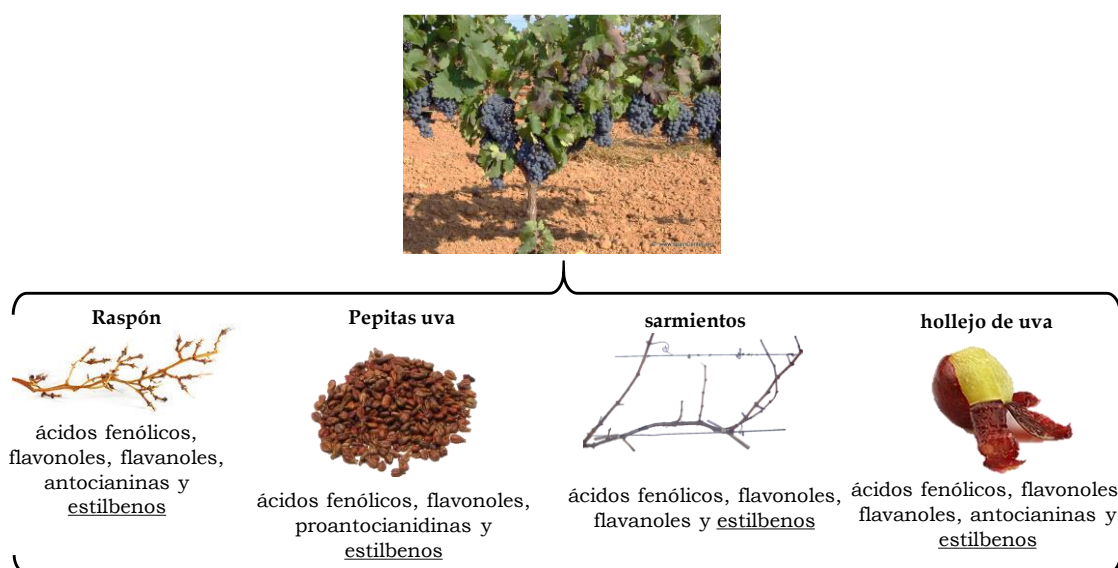


Figura 1.11. Contenido de los distintos polifenoles en los residuos obtenidos en la industria vitivinícola (Nassiri-Asl & Hosseinzadeh, 2016)

Por otra parte, la relación establecida entre la dieta y la salud ha llevado al estudio del contenido cualitativo y cuantitativo de los fitoquímicos bioactivos en alimentos vegetales y los subproductos generados, tales como los sarmientos de la vid, que indican que estos podrían ser una valiosa fuente de fibra dietética y de antioxidantes (González-Centeno et al., 2010; Karvela, Makris, Kalogeropoulos, & Karathanos, 2009). Los compuestos fenólicos obtenidos a partir de los residuos de la industria vinícola pertenecen a diferentes clases,

incluyendo los flavonoides (flavanoles, proantocianidinas, flavonas y flavonoles), los ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoico y hidroxicinámico) y los estilbenos. En el caso concreto de los estilbenos, estudios recientes muestran que, al igual que otros polifenoles, estos también poseen propiedades antioxidantes directas e incluso superiores que otros polifenoles (Moein, 2015). En la *Figura 1.12* se resume los estilbenos descritos en los sarmientos de *Vitis vinífera*: hopeaphenol, ampelopsin A, isohopeaphenol, piceatannol, trans-piceido, trans-resveratrol, ϵ -viniferina, miyabenol C, r-viniferina y r2-viniferina (Gorena et al., 2014; Houillé et al., 2015; Lambert et al., 2013; Pawlus, Waffo-Teguo, Shaver, & Merillon, 2012; Waffo-Teguo, Krisa, Richard, & Mérillon, 2008).

Los estilbenos son polifenoles no flavonoides químicamente constituidos por dos anillos aromáticos enlazados por puentes etilo. Los estilbenos poseen una gran capacidad antioxidante, pero su presencia en la dieta es escasa. Las principales fuentes de estilbenos en la dieta son las uvas y sus derivados, zumo y vino (Guerrero, Garcia-Parrilla, Puertas, & Cantos-Villar, 2009). El contenido de estilbenos en vino blanco y tinto se recoge en la *Tabla 1.10*.

Tabla 1.10. Rango de concentraciones de estilbenos en vino (adaptado de Pawlus et al., 2012)

compuesto	vino tinto	vino blanco	referencia
<i>E</i> -astringina	n.d. – 38.1	n.d. – 8.5	1
	n.d. – 25.7	-	2
	0.04 – 0.12	-	3
	n.d. – 1.8	-	4
	n.d. – 35.9	n.d. – 1.5	5
<i>Z</i> -astringina	n.d. – 1.6	n.d.	4
hopeafenol	trazas	-	6
	n.d. – 2.7	-	7
pallidol	0.5 – 4.8	-	1
	n.d. – 7	9.2	7
	0.06 – 0.4	-	3
	n.d. – 2.2	n.d.-0.3	8
<i>E</i> -piceatanol	trazas – 5.2	-	4
<i>Z</i> -piceido	2.4 – 8.9	-	6
	n.d. – 24.1	n.d. – 0.9	1
	n.d. – 5.2	n.d. – 1.89	9
	2.8 – 38.5	0.8 – 6.35	4
	n.d. – 17.9	n.d. – 0.4	5
	n.d. – 14.8	-	10
<i>E</i> -piceido	n.d. – 29,2	-	10
	n.d. – 14.27	-	6

	0.1 – 26.0	n.d. – 2.9	1
	n.d. – 19.5	-	2
	9.4 – 45.0	-	7
	n.d. – 6.5	n.d. – 1.9	9
	0.64 – 7.0	-	3
	0.5 – 9.3	trazas – 0.5	4
	n.d. – 50.8	n.d. – 7	5
<i>Z</i> -resveratrol	n.d. – 0.9	n.d. – 0.1	1
	1.7 – 23.2	-	2
	n.d. – trazas	n.d. – trazas	9
	0.37 – 3.7	-	3
	trazas – 4.9	trazas – 0.5	4
	trazas – 12.0	-	11
	n.d. – 0.23	n.d. – 0.2	12
<i>trans</i> -resveratrol	0.9 – 3.8	n.d. – 0.2	1
	0.53 – 5.08	-	6
	n.d. – 3.07	n.d. – 1.16	9
	n.d. – 3.45	-	7
	0.15 – 4.5	-	3
	0.35 – 1.3	0.01 – 0.57	13
	trazas – 3.4	trazas	4
	0.6 – 9.0	-	11
	0.06 – 36.1	0.65 – 8	12
ϵ -viniferina	0.19 – 4.3	-	2
	n.d. – 1.2	n.d.	7
	0.1 – 1.6	n.d.	8
<i>Z</i> - ϵ -viniferina	n.d. – 1.12	0.38	14
<i>E</i> - δ -viniferina	n.d. – 22.4	-	2

(1) Vitrac, Monti, Vercauteren, Deffieux, & Mérillon, 2002; (2) Vitrac et al., 2005; (3) Naugler, McCallum, Klassen, & Strommer, 2007; (4) Buiarelli, Coccioli, Jasionowska, Merolle, & Terracciano, 2007; (5) Ribeiro de Lima et al., 1999; (6) Boutegrabet et al., 2011; (7) Guebailia et al., 2006; (8) Landrault et al., 2002; (9) Lee & Rennaker, 2007; (10) Moreno-Labanda et al., 2004; (11) Stark, Wollmann, Lösch, & Hofmann, 2011; (12) Feijóo, Moreno, & Falqué, 2008; (13) Gerogiannaki-Christopoulou, Athanasopoulos, Kyriakidis, Gerogiannaki, & Spanos, 2006; (14) Amira-Guebailia et al., 2009

De la familia de los estilbenos el resveratrol es el más abundante, y por ello el más estudiado. El resveratrol se encuentra en la piel y pepitas de la uva, así como en las partes leñosas de las plantas (raspón y madera). Su concentración en uva y vino es muy variable, consecuencia de los numerosos factores que afectan a su síntesis: variedad, suelo, condiciones climáticas, condiciones de sanidad, fecha de vendimia de la uva y operaciones enológicas (Bavaresco, 2002). Se sintetiza como respuesta a diversas formas de estrés biótico y abiótico, tales como infección por hongos (*Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticola*, etc.), lesiones de tejidos vegetales, heladas, iones de metales pesados, etc

(Dixon, 2001). Al resveratrol se atribuye propiedades preventivas frente a enfermedades como el cáncer, cardiovasculares y daños isquémicos. Incluso aumenta la resistencia a estrés y prolonga la esperanza de vida de varios organismos, desde levaduras a vertebrados llegando a mamíferos (Artero, Artero, Tarín, & Cano, 2015). Gran parte de esta bioactividad es debido a su alta capacidad antioxidante (Baur et al., 2006; Fernández-Mar, Mateos, García-Parrilla, Puertas, & Cantos-Villar, 2012; Moein, 2015; Renaud et al., 2004; de Renaud & de Lorgeril, 1992; Romain et al., 2012; Smoliga, Baur, & Hausenblas, 2011).

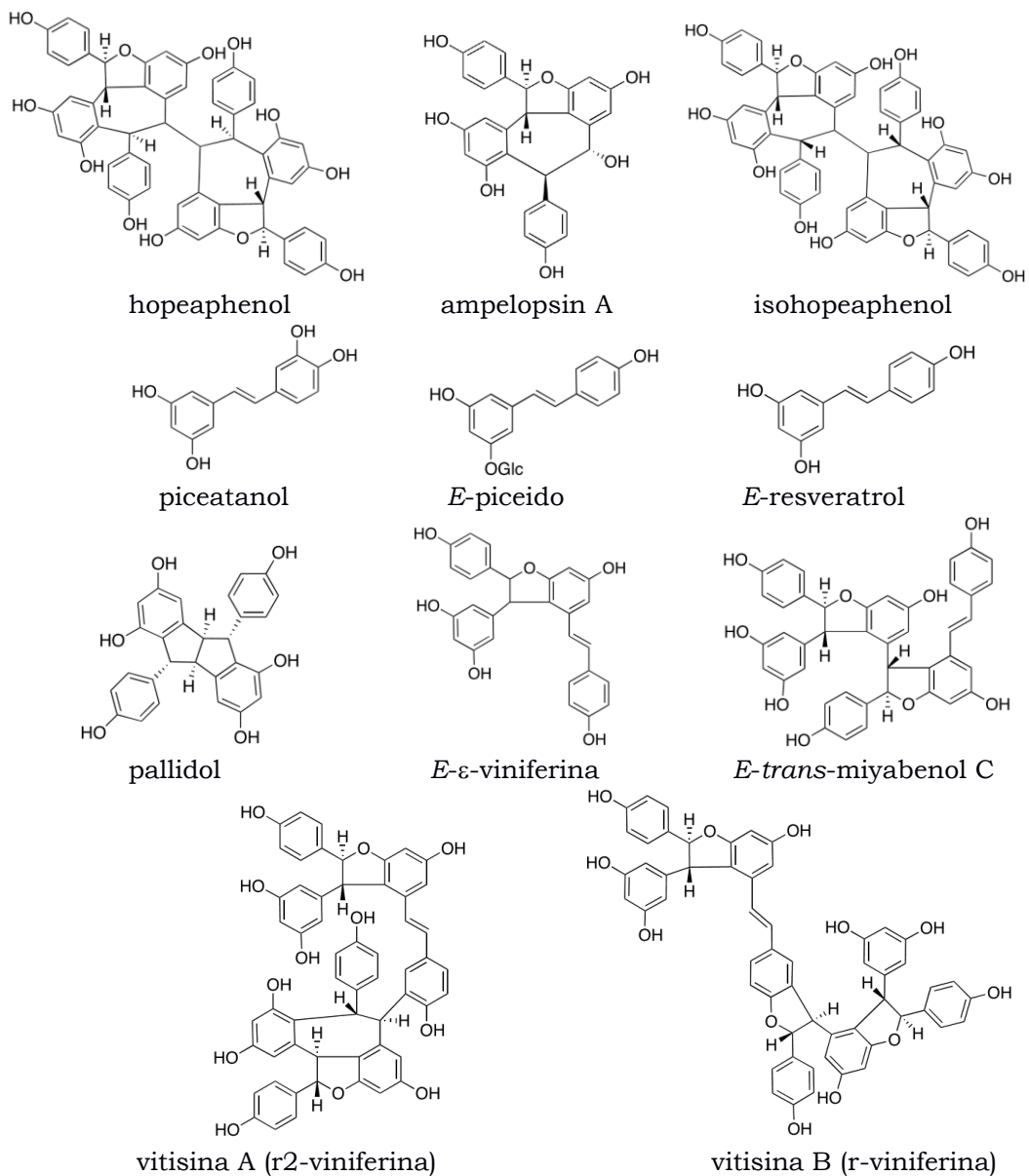


Figura 1.12. Estructura química de monómeros y dímeros de estilbenos en madera de *poda*

La ϵ -viniferina ha mostrado propiedades hepatoprotectoras y antioxidantes, así como anticancerígenas (Yáñez, Fraiz, Cano, & Orallo, 2006). Además de poseer propiedades bioactivas como nutraceutico y fármaco, tanto el resveratrol como la ϵ -viniferina, y debido a su naturaleza fitoalexinica, poseen un amplio espectro de actividades contra patógenos como son el mildiu (*Plasmopara viticola*), la podredumbre gris (*Botrytis cinerea*), *Poma medicaginis*, *Rhizopus stolonifer*, y un amplio espectro de microorganismos presentes durante el periodo de almacenamiento de frutas y vegetales cosechados (Jeandet et al., 2002; Rayne, Karacabey, & Mazza, 2008). La ϵ -viniferina ha mostrado poseer propiedades hepatoprotectoras y antioxidantes, así como anticancerígenas (Yáñez et al., 2006). Además de poseer propiedades bioactivas como nutraceutico y fármaco, tanto el resveratrol como la ϵ -viniferina, y debido a su naturaleza fitoalexinica, poseen un amplio espectro de actividades contra patógenos como son el mildiu (*Plasmopara viticola*), la pudrición gris (*Botrytis cinerea*), *Poma medicaginis*, *Rhizopus stolonifer*, y un amplio espectro de microorganismos presentes durante el periodo de almacenamiento de frutas y vegetales cosechados (Jeandet et al., 2002; Rayne et al., 2008).

El piceatanol procedente de la hidroxilación del *trans*-resveratrol, ha sido confirmado como agente anticancerígeno porque inhibe la proliferación, migración y la metástasis de diversos tumores (Heliawati, Kardinan, Mayanti, & Tjokronegoro, 2015; Larrosa, Tomás-Barberán, & Espín, 2004; Ovesná et al., 2006; Zhang, Jia, Wang, Hu, & Wang, 2014). Además, exhibe una alta capacidad antioxidante (Jeong et al., 2015; Livingston et al., 2015; Murias et al., 2005). Posee actividad inhibitoria en enfermedades degenerativas como el Alzheimer (Rivière et al., 2007).

Dado el contenido en estilbenos y las propiedades que poseen los estilbenos, los sarmientos tienen un valor económico potencial importante, como fuente significativa de estilbenos, debido al interés en sus propiedades promotoras de la salud (Rayne et al., 2008). La extracción efectiva de estilbenos y la aplicación comercial de estos compuestos podría contribuir a la sostenibilidad en la viticultura.

CAPITULO II

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La calidad del vino está definida por sus atributos sensoriales cualitativos, los cuales están determinados por una gran variedad de parámetros cuantitativos físicos y químicos y sus interacciones. Además, un vino de calidad, debe estar caracterizado por la ausencia de defectos en aspectos como el color y el aroma o la presencia de compuestos potencialmente tóxicos o alérgicos para individuos sensibles que afecten a la calidad organoléptica y seguridad del vino. Para ello es necesario el control de las condiciones de fermentación y crianza, así como de los microorganismos que llevan a cabo la fermentación. En este sentido, el dióxido de azufre (SO_2) es probablemente el más versátil y eficiente de los aditivos utilizados en la elaboración del vino, debido a sus múltiples propiedades: protege contra la oxidación, selecciona entre levaduras, selecciona entre levaduras y bacterias, tiene poder de extracción. A pesar de todas estas propiedades, son muchos los estudios que han demostrado que el SO_2 posee efectos negativos sobre las propiedades sensoriales y la salud, siendo necesario la regulación de su uso como conservante alimentario.

En la vitivinicultura actual, dada la preferencia de los consumidores hacia productos más seguros, sanos y de calidad, y con menor presencia de agentes químicos existe una tendencia a reducir los niveles máximos de SO_2 autorizados en vinificación, en la búsqueda de alimentos que no supongan un riesgo para la salud, tomando cada vez más importancia los alimentos sin aditivos y enriquecidos en compuestos bioactivos. Como resultado, se han propuesto nuevos conservantes y tecnologías innovadoras que son inofensivas para la salud, y que pueden reemplazar o reducir la concentración de SO_2 . Estas alternativas tienen un futuro prometedor que permite considerarlos como métodos alternativos a la adición de SO_2 en la elaboración del vino, dando lugar a vinos que reducen el riesgo de aparición de alergias, y son considerados por el consumidor más naturales, más saludables, más sostenibles y más genuinos. Sin embargo, pocos han sido estudiados en vinos y comparados a al mismo tiempo con un vino elaborado con SO_2 .

Por otra parte, la industria agroalimentaria, tales como la vitivinícola y oleica, generan un gran volumen de residuos sólidos, que conllevan una serie de implicaciones relacionadas con aspectos medioambientales y de sostenibilidad. La gestión de residuos en la actualidad está inclinándose hacia una gestión

sostenible, entre los que se encuentra el reciclado, nuevo uso, recuperación y valorización de los residuos generados. Los compuestos bioactivos obtenidos a partir de subproductos de la bodega y almazara han revelado interesantes actividades promotoras de la salud tanto *in vitro* como *in vivo*. Entre estos bioactivos, destacan los compuestos fenólicos, compuestos con propiedades antimicrobianas y antioxidantes.

En base a lo expuesto, la **hipótesis** del presente trabajo es que, dada sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, extractos con alto contenido en compuestos polifenólicos procedentes de subproductos derivados de la industria oleica y enológica podrían constituir una alternativa natural al uso del SO₂ en la elaboración de vinos.

El **objetivo** de la presente Tesis Doctoral ha sido la elaboración de vinos tintos y blancos de calidad, mediante la utilización de extractos ricos en polifenoles como sustitutos del SO₂.

Los **objetivos específicos** del presente trabajo han consistido en:

1. Caracterización de extractos procedentes de subproductos de la industria oleica y enológica. Evaluación de sus aptitudes como posibles alternativas al SO₂.
2. Evaluar los parámetros de calidad de vinos tintos elaborados con productos ricos en hidroxitirosol. Evaluar la aplicabilidad de estos productos bajo distintas condiciones de elaboración en tinto.
3. Evaluar los parámetros de calidad de vinos blancos elaborados con productos ricos en hidroxitirosol. Evaluar la aplicabilidad de estos productos bajo distintas condiciones de elaboración en blanco.
4. Evaluar los parámetros de calidad de los vinos tintos tratados con un extracto procedente de madera de poda (Vineatrol®). Evaluar la aplicabilidad de estos productos bajo distintas condiciones de elaboración en tinto.
5. Evaluar los parámetros de calidad de los vinos blancos tratados con un extracto procedente de madera de poda (Vineatrol®). Evaluar la aplicabilidad de estos productos bajo distintas condiciones de elaboración en blanco.
6. Optimizar la concentración/dosis de los extractos con alto contenido en polifenoles en la elaboración de vinos tintos de calidad.

CAPITULO III
MATERIALES Y MÉTODOS

III-1 Caracterización de extractos polifenólicos

III-1.1 Extractos procedentes de subproductos de la industria agroalimentaria

Se han estudiado y caracterizado en matriz vínica los siguientes productos como alternativa al SO₂ en la elaboración de vinos:

a) Procedente de la industria oleica: un extracto de oliva rico en hidroxitirosol (**HTE**) obtenido a partir de residuos de molino de aceituna mediante un proceso patentado (HT80®, patente WO2007093659A1). El extracto fue suministrado por Biomaslinic S.L. (Granada, España). Este extracto es líquido de apariencia jarabe viscoso, con olor dulzón y color marrón pálido.

Procedente de la industria enológica: se utilizaron raspones de la variedad Syrah cosechada en 2011 en el Centro IFAPA-Rancho de la Merced, en Jerez de la Frontera (España). El extracto de raspones (**STE**) se obtuvo mediante ultrasonido (model UP 200S, Dr. Hielscher GmbH, Teltow, German) siguiendo el método descrito por Piñeiro, Guerrero, Fernandez-Marin, Cantos-Villar, & Palma (2013). En resumen, los raspones de uva congelados y posteriormente liofilizados se extrajeron bajo las siguientes condiciones: alcohol destilado/agua (80:20, v/v) como disolvente de extracción, 75 °C como temperatura de extracción, 70% de amplitud, ciclo 0.7 s, 7 mm de punta de sonda y 250 mL como volumen de extracción (relación 1:30). El tiempo de extracción fue de 15 min. Posteriormente, se aplicó una etapa de aclarado a la muestra extraída con 25 mL de disolvente nuevo. Los extractos obtenidos se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga Digicen 20-R (Orto Alresa, España), se filtró por papel y a través de un filtro de 0.22 µm (PVDF Teknokroma, Barcelona, España).

Los extractos se prepararon en matriz vínica sintética, la cual consistió en 12% etanol absoluto y 4 gramos de ácido tartárico en agua destilada. Dicha disolución se ajustó a pH 3.4 con NaOH 2N. Como control se preparó una disolución de SO₂ también en matriz vínica sintética.

Los extractos se prepararon a dos concentraciones diferentes para cada uno de los compuestos activos (hidroxitirosol, polifenoles y SO₂) y teniendo en cuenta el porcentaje de riqueza de cada producto comercial utilizado: 50 mg/L y 80 mg/L de hidroxitirosol, polifenoles y SO₂.

III-1.2 Determinación del perfil polifenólico por HPLC de los extractos

III-1.2.1 Análisis de hidroxitirosol

La identificación y cuantificación de hidroxitirosol se realizó de acuerdo al método descrito por (Piñeiro, Cantos-Villar, Palma, & Puertas, 2011). El análisis cromatográfico se realizó en un JASCO-HPLC equipado con un detector de fotodiodo (MD-2010), un detector de fluorescencia fluorimétrico (FP-2020), una bomba de HPLC (PU-2089), un módulo de control de temperatura (CO-2060) y un módulo inyector (AS-2050). La separación se realizó en una columna de Mediterranea Sea 18 (Tecknokroma, Barcelona, España) (RP-18, 25 x 0,46 cm, tamaño de partícula de 5 µm) con una precolumna del mismo material, a 37 °C. Las fases móviles consistieron en una mezcla de agua:ácido fórmico de 99.9:0.1 para la fase A y metanol:ácido fórmico 99.9:0.1 para la fase B. La velocidad del flujo fue de 1 mL/min. Las condiciones de elución fueron las siguientes: el programa de elución comenzó con 100% de A para llegar a 90% de A a 5 min; 85% de A a 15 min; 65% de A a 35 min; 60% de A a los 55 min; 100% de B a los 60 min; 100% de A a los 65 min; para mantenerse posteriormente constante hasta el minuto 75. El software usado fue el Chrompass versión 1.8 suministrado por Jasco. Las condiciones de fluorescencia para detección y cuantificación fueron: para hidroxitirosol, longitud de onda de excitación (λ_{ex}) 279 nm y longitud de onda de emisión (λ_{em}) 631 nm; para tirosol, λ_{ex} a 278 nm y λ_{em} a 598 nm. Los picos fueron identificados mediante la comparación de su tiempo de retención y espectros UV-vis de los estándares. Las concentraciones se expresaron en mg/L.

III-1.2.2 Análisis de polifenoles

Los polifenoles se identificaron y cuantificaron siguiendo el método descrito por Guerrero, Puertas, Fernández, Palma, & Cantos-Villar (2010). Para ello se utilizó un equipo Waters HPLC (Milford, MA, EEUU) equipado con una bomba modelo 1525, módulo de control de temperatura y un detector de matriz de fotodiodos Waters 996. Las separaciones se realizaron en una columna Mediterranea Sea 18 (Tecknokroma, Barcelona, España) (RP-18, 25 x 0.46 cm, tamaño de partícula de 5 µm) con una precolumna del mismo material, a 30°C. Las fases móviles consistieron en una mezcla de agua:metanol:ácido acético de 88:10:2 para la fase A y 8:90:2 para la fase B. La velocidad del flujo fue de 1 mL/min.

El programa de elución comenzó con un 35% de B durante 3 min para llegar a 50% de B a 10 min, al 70% de B a 20 min y al 100% de B a los 23 min para mantenerse posteriormente constante hasta 28 min. El software usado fue Empower suministrado por Waters. Los picos fueron identificados mediante la comparación de su tiempo de retención y espectros UV-vis de los estándares. La cuantificación hidroxicinámicos, flavanoles y flavonoles se llevó a cabo utilizando la recta de calibrado de ácido cafeico, catequina y rutina respectivamente. Los estilbenos fueron cuantificados a 306 nm como *trans*-resveratrol

III-1.3 Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos

La capacidad antioxidante de los extractos se determinó por los métodos DPPH y ORAC.

- *Método DPPH*: este método evalúa la capacidad captadora de radicales libres de las moléculas oxidantes (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995). Y se basa en la disminución de la absorbancia a la longitud de onda de 515 nm de los radicales libres generados a partir de una solución metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) en presencia de una agente antioxidante. Con este método se determina la eficacia de un antioxidante como captador de un radical libre estable, DPPH•. Para ello, un volumen de 10 µL de muestra se añadió a 990 µL de 0.094 mM DPPH en MeOH. Para determinar la cinética de reacción, los ensayos se monitorizaron a 515 nm durante una hora a 25°C en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1063. La capacidad antioxidante se expresó como equivalentes de µM de Trolox/µL de muestra. Para ello se realizó una curva de calibrado con Trolox C. La concentración de la disolución stock de Trolox C utilizada para la elaboración de la recta patrón fue de 0.25 mM y se preparó en tampón fosfato sódico 75 mM pH 7.4.

Recta de calibrado:

$$x = \frac{(A_i - A_f)}{31.55} * \frac{1000}{10} * 10$$

donde A_i es la absorbancia inicial a tiempo cero y A_f la absorbancia 60 minutos después de la adición de DPPH.

- *Método ORAC (Oxygen Radical Scavenging Capacity)*: El ensayo se basa en la pérdida de fluorescencia de una sustancia de referencia (fluoresceína) tras la adición de un radical peroxilo, 2,2'-azobis(2-amidino-propano) diclorhidrato

(AAPH), que actúa como iniciador de la reacción oxidativa. En presencia de un antioxidante, ésta pérdida es menor cuanto más capacidad antioxidante tenga el compuesto a evaluar.

La capacidad de absorción de radicales se determinó con el método descrito por Dávalos, Gómez-Cordovés, & Bartolomé (2004). Las determinaciones se llevaron a cabo en un lector de microplacas Synergy HT (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA), utilizando microplacas de poliestireno de 96 pocillos con lados negros y fondo transparente, de Nalge Nunc Internacional (Roskilde, Denmark). La fluorescencia se leyó con una longitud de onda de excitación de 485/20 nm y un filtro de emisión de 528/20 nm. El lector de placas fue controlado por el software KC4, versión 3.4. La reacción se llevó a cabo en tampón de fosfato de sodio 75 mM (pH 7.4), y la mezcla de reacción final fue de 200 μ L fluoresceína (100 μ L; 3 nM, concentración final) y 20 μ L de muestra. La mezcla se preincubó durante 30 min a 37 °C, antes de añadir rápidamente la solución AAPH (30 μ L; 19 mM, de concentración final). La microplaca se agitó inmediatamente y se colocó en el lector, y la fluorescencia se registró cada 1.14 min durante 120 min. En cada ensayo, se realizó un blanco que contenía FL y AAPH con tampón fosfato sódico.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
B	H ₂ O	bl	bl	bl	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	H ₂ O
C	H ₂ O	mtr	mu	mu	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	H ₂ O
D	H ₂ O	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	H ₂ O
E	H ₂ O	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	H ₂ O
F	H ₂ O	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	H ₂ O
G	H ₂ O	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	mtr	H ₂ O
H	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O

Donde:

bl	BLANCO	100 μ L fluoresceína + 70 μ L tampón + 30 mL APPH
mtr	MUESTRA	100 μ L fluoresceína + volumen MUESTRA + (70 mL-volumen muestra) Tampón + 30 μ L APPH

La solución stock de FL (4 μ M) se realizó en tampón fosfato sódico 75 mM pH 7.4 y se conservó a 20 °C durante un máximo de 4 semanas. La solución de FL

se preparó diariamente en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7.4, mediante una dilución de la disolución stock, a una concentración final de 6 nM.

El radical AAPH se preparó diariamente a una concentración 127 mM en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7.4.

La capacidad de inhibición de la desaparición de FL, se cuantificó mediante la integración del área bajo la curva de caída de la FL (AUC). Todas las muestras fueron preparadas por triplicado. Con el fin de evitar el efecto de la temperatura, sólo se utilizaron los 60 pocillos centrales de la placa, dejando los exteriores con 200 µL de agua destilada. Los resultados fueron expresados como equivalentes de Trolox en µM/mg de extracto. Para ello se realizó una curva de calibrado de Trolox C. La concentración de la disolución stock de Trolox C utilizada para la elaboración de la recta patrón fue de 0.25 mM y se preparó en tampón fosfato sódico 75 mM pH 7.4. Se prepararon ocho disoluciones de calibración, de la disolución stock (6.25, 12.5, 15.0, 18.75, 21.25, 25, 27.5 y 31.25 µM)

La recta de calibrado fue:

$$y = 0.45 + 12.5 x$$

El área bajo la curva de caída de FL (AUC) fue calculada mediante la ecuación:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1.14}^{i=120} \frac{f_i}{f_0}$$

donde f_0 es la fluorescencia inicial leída a tiempo 0 y f_i es la lectura de fluorescencia a tiempo final. El AUC correspondiente a la muestra (Net AUC), se calculó restando el correspondiente AUC del blanco.

Estos análisis se realizaron en UCAM Universidad Católica San Antonio de Murcia (España).

III-1.4 Evaluación de la capacidad antimicrobiana de los extractos

El estudio del poder antimicrobiano *in vitro* de los extractos, así como del SO₂, se llevó a cabo sobre cepas de levadura, bacterias y hongos de importancia enológica y habituales en el proceso de fermentación. Los microorganismos estudiados fueron, levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* (CECT 1942), *Candida stellata* (CECT 11969), *Hanseniaspora uvarum* (CECT 1118), *Dekkera bruxellensis* (CECT 11045); bacterias: *Lactobacillus plantarum* (CECT 5956),

Acetobacter aceti (CECT-298T), *Pediococcus damnosus* (CECT 793), *Oenococcus oeni* (CECT 218); hongos: *Botryotinia fuckeliana* (CECT 20518). Estos microorganismos fueron obtenidos de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Para la determinación de la cinética de crecimiento microbiano se realizaron mediciones de impedancia indirecta, que se llevan a cabo mediante el sistema de medición BacTrac ("Bacteria Tracer", SY-LAB, Viena, Austria). Este instrumento consta de una incubadora que permite la incubación simultánea de 40 tubos de ensayo de 10 mL cada uno. Los cambios de impedancia fueron seguidos por una medida indirecta sobre la solución de KOH (2 mL). Estos cambios derivan del crecimiento microbiano en 3 mL de caldo compuesto por nutrientes, inóculos microbianos (100 μ L) y los diferentes extractos a evaluar (HTE, STE), así como la solución con SO₂ (todos a una concentración de 80 mg/L), y un control sin ningún aditivo (control positivo). Los caldos nutrientes fueron caldo de malta de levadura (Y3752 SIGMA-ALDRICH) para el crecimiento de levaduras, caldo MRS (69966 FLUKA) para el crecimiento de bacterias y caldo de dextrosa de patata (70139 FLUKA) para el crecimiento de hongos. Se obtienen dos medidas: (i) fase lag (λ , horas) y (ii) la velocidad máxima de crecimiento específico (μ_{\max} , horas⁻¹). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Estos análisis se realizaron en UCAM Universidad Católica San Antonio de Murcia (España).

III-1.5 Determinación del perfil olfatométrico por CG-O de los extractos

Preparación de la muestra: 100 mL de extracto preparado en matriz vínica se extrajo tres veces con diclorometano (10, 5, y 5 mL, respectivamente), en un matraz de 200 mL con agitación magnética durante 10, 5 y 5 min respectivamente, con el fin de extraer una amplia gama de compuestos orgánicos (alcoholes, tioles, ésteres, lactonas, aldehídos y ácidos carboxílicos) (Sarrazin, Dubourdieu, & Darriet, 2007). Las fases orgánicas combinadas se secaron después con sulfato de sodio anhidro y se concentró a un volumen final de 500 μ L bajo un flujo de nitrógeno (aproximadamente 100 mL/min) en un evaporador Turbo Vap LV (Biotage, Uppsala, Suecia).

Cromatografía de gases-Olfatometría (CG-O): Los análisis se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases Varian 3800 (Middelburg, Netherlands) equipado con un detector de ionización de llama y un olfatómetro OP275 (GL Science Inc., Tokyo, Japan). 1 µL de extracto se inyectó en modo splitless. Las columnas utilizadas fueron una DB-WAX y una DB-5 (J&W Scientific, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) 60 m x 0.25 mm con 0.25 µm de espesor de película. El programa de temperatura del horno fue el siguiente: 45 °C durante 1 min, aumentando hasta 220 °C a una velocidad de 3 °C/min y se mantuvo durante 30 min. El efluente de la columna se dividió 2:3 en un detector de ionización de llama y un orificio de inhalación calentado. La temperatura del inyector y detector fue 230 °C. El gas portador fue helio a una velocidad de flujo de 1 mL/min. El panel sensorial se compuso de tres panelistas entrenados, todos realizaron dos análisis olfatométrico por columna y cada muestra. Los panelistas evaluaron la intensidad del olor utilizando una escala de cuatro puntos (0 = no detectado, 1 = nota débil/difícil de reconocer, 2 = nota clara pero no intensa 3 = nota intensa). Los resultados se expresaron como "frecuencia modificada" MF (%) de acuerdo a la fórmula propuesta por Dravnieks (1985), con el fin de estimar/cuantificar la intensidad y su posible impacto odorante al aroma de las muestras.

$$FM(\%) = \sqrt{F(\%) \times I(\%)}$$

siendo FM(%) la frecuencia de detección del aroma expresado como porcentaje, e I(%) es la intensidad media expresada como el porcentaje con respecto a la intensidad máxima.

Cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-SM): se inyectó 1 µL de extracto de muestras en un cromatógrafo de gases Trace GC Ultra (Thermo Fisher Scientific S.p.A., Rodano, Milan, Italy) bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. El detector fue un espectrómetro de masas (ISQ single quadrupole MS, Thermo Fisher Scientific, Austin, Texas, USA) operando en modo EI (70 eV), conectado al CG con un transfer line calentado a 230 °C. Los espectros de masas se tomaron en el rango de 40-350 m/z. Para la adquisición de datos se utilizó el software Thermo Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, San Jose, California, USA).

Identificación de compuestos de aroma: los compuestos se identificaron mediante la comparación de sus índices de retención lineales (LRI) con los obtenidos en el análisis CG-SM del extracto y estándares, y una comparación

de los patrones de fragmentación del espectro de masas con los de los compuestos de referencia o con los espectros de masas de la biblioteca espectral de masa NIST 05 (versión 05). Así como con LRI's y cualidades de olor de las bases de datos en línea Flavornet (www.flavornet.org) y Pherobase (www.pherobase.com) y la literatura.

Los índices de retención lineal se calcularon en base a los tiempos de retención de los n-alcanos (C7-C40) bajo condiciones idénticas para cada instrumento.

III-2 Vinificación de vinos tintos y blancos

III-2.1 Productos con alto contenido en compuestos fenólicos

Se han estudiado como alternativa al SO₂ en la elaboración de vinos blancos y tintos, los siguientes extractos ricos en compuestos fenólicos:

a) alto contenido en hidroxitirosol:

- un producto de HT producido por síntesis química y enzimática con una riqueza mayor del 99% (**HTB**[®]) suministrada por Seprox Biotech (España). Y reconocido como ingrediente GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro) por la American Food and Drug Administration (FDA).
- un extracto natural elaborado a partir de subproductos de la oliva, con 26% de riqueza en hidroxitirosol (Hytolive[®], Genosa I+D, España), en lo sucesivo denominado **HTG**[®].

b) alto contenido en estilbenos:

- el extracto Vineatrol[®] (Actichem, Montauban, Francia), en lo sucesivo denominado **VIN**[®], un extracto comercial procedentes de sarmientos de la vid, particularmente rico en estilbenos, principalmente resveratrol y sus oligómeros. Las características del producto comercial son: > 5% de trans-resveratrol, > 5% ε-viniferina y , de forma general, > 20% ó 30% el total de monómeros y oligómeros de resveratrol.

III-2.2 Material vegetal

Las variedades elegidas fueron *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc y Syrah, cultivadas en la viña experimental situada en el IFAPA Centro Rancho de la Merced, en Jerez de la Frontera (Suroeste de España, 06:00:58S, 36:45:29N), a

35 metros del nivel del mar, caracterizado por ser un clima cálido. El terreno se caracteriza por ser terreno de albariza, característico de la zona, con un marco de plantación de 2.30 x 1.40 m. El sistema de conducción empleado es en espaldera vertical de tres alambres y 1.40 m de altura. El sistema de espaldera empleado es en cordón doble sobre espaldera vertical de tres alambres y 1.40 m de altura

III-2.2.1 Syrah

Variedad de origen incierto, unos autores indican que procede de la ciudad persa Shiraz (Irán), y otros indican que procede de Siracusa en Sicilia, mientras que otros indican que originaria de la zona francesa del Ródano, donde tiene una gran importancia en su viticultura. Sin embargo, es en el valle del Rodáno, donde se asienta definitivamente creando grandes vinos desde hace siglos, y desde donde se ha extendido por todo el mundo. Desde la década de los 70 hasta los años 90, aumentó su popularidad, expandiéndose las

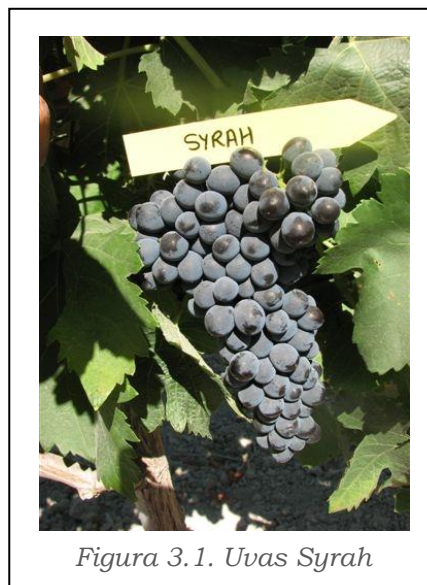


Figura 3.1. Uvas Syrah

plantaciones de Syrah significativamente. A comienzos de los años 2000, pasó a ser una de las diez variedades más plantadas del mundo, siendo cultivada con éxito en muchas áreas vitícolas de Francia (Ródano y zonas limítrofes), España, Grecia, Italia, Portugal y en las áreas más cálidas del Nuevo Mundo (Australia, California, Argentina, Sudáfrica). Actualmente es una de las variedades más de moda en el mundo vitivinícola, con muy buena adaptación a los climas mediterráneos. En el caso concreto de España, según los datos del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio ambiente (MAPAMA) en el 2015 había plantadas 20.155,11ha, en el 1990 solamente había 4 ha. Actualmente ocupa el 2.14% de la superficie de viñedo nacional, siendo la segunda variedad extranjera más cultivada y la once en el ranking de las 13 variedades más importantes en España (MAPAMA, 2015c).

Los vinos de esta variedad son suntuosos, vigorosos, potentes, con cuerpo, de textura sedosa, muy aromáticos, con aromas entre frutales y florales con recuerdos a violeta y florales, con una alta acidez, con gran cantidad de taninos y materia colorante, con un característico color rubí, con tendencia al color

púrpura. Permite elaborar vinos particularmente afrutados e interesantes para la mezcla con otros vinos menos aromáticos.

La elección de esta variedad ha sido motivada por las buenas características enológicas, las propiedades del color y tanicidad de los vinos elaborados con Syrah, así como por ser una variedad ampliamente extendida por todo el territorio vitícola mundial.

III-2.2.2 Sauvignon blanc

La *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc es una variedad originaria de Burdeos (Grave) y del Valle de Loira (Sancerre y Pouilly Fumé). Hoy en día es una variedad cultivada en muchas otras regiones vitivinícolas incluyendo Sudáfrica, Australia, Nueva Zelanda, Chile, Estados (Ron S Jackson & Jakoby, 1995). Según los datos del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio ambiente (MAPAMA) en 1990, en España, solamente había 56 ha frente 5.086,56 ha en el 2015 ocupando un 0.54% de la superficie total de viñedo

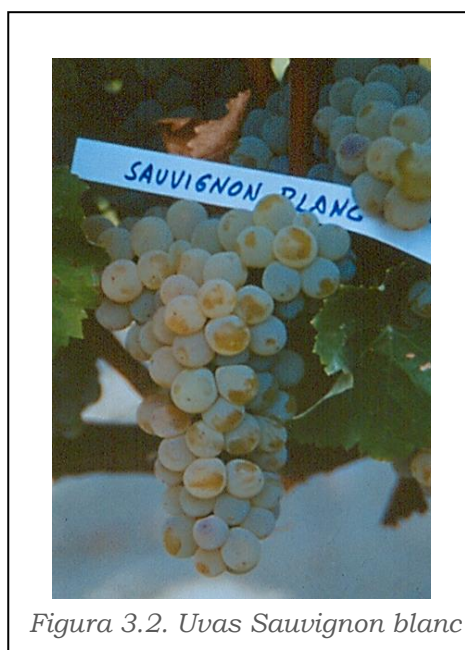


Figura 3.2. Uvas Sauvignon blanc

(MAPAMA, 2015c). Las uvas maduras de esta variedad poseen una acidez de moderada a alta, y producen vinos blancos frescos y secos con un aroma y flavor fuerte y punzante (Cooper, 2008). Debido a los distintos terruños y climas donde se cultiva, los estilos de vinos que se obtienen son muy diferentes. Así, los vinos de Sauvignon blanc producidos en regiones cálidas se caracterizan por poseer aromas frutales que recuerdan a la grosella, pomelo y fruta de la pasión; mientras que los vinos de Sauvignon blanc con marcado aroma vegetal, tales como pimienta verde, hierba fresca y espárrago, son producidos en climas más fríos (Benkwitz et al., 2012; Green, Parr, Breitmeyer, Valentin, & Sherlock, 2011; Hashizume & Samuta, 1999; Lund et al., 2009; Swiegers, Francis, Herderich, & Pretorius, 2006). El aroma de los vinos de Sauvignon blanc es conocido por el cambio drástico que experimentan después de un año de embotellado, motivo por el cual son vinos que deben ser consumidos en el año de producción (Herbst-Johnstone, Nicolau, & Kilmartin, 2011).

La elección de esta variedad es motivada por el hecho de que su oxidación se detecta fácilmente, ya que los tioles responsables de su aroma típico son muy susceptibles a la oxidación, así como por el hecho de ser una variedad ampliamente extendida a nivel mundial.

III-2.3 Control de maduración

Con el fin de determinar la fecha óptima de la vendimia, se realizó el seguimiento semanal de las variedades Syrah y Sauvignon blanc desde el envero hasta su vendimia. A continuación se describen los análisis realizados.

III-2.3.1 Parámetros enológicos de la uva

Para la realización de estos análisis se tomaron muestras de uva cortando “calitas” (pequeñas partes del racimo) de los distintos racimos (soleados y sombríos, altos y bajos, del extremo y de la base del sarmiento) de cada una de las cepas marcadas según la metodología recomendada por Ribéreau-Gayon (1975) y por Peynaud & Ribereau-Gayon (1971).

Peso medio de bayas (Pm): El peso medio de los granos de uva de cada variedad, se determinó pesando 100 bayas sin pedicelo:

$$Pm \text{ (peso medio)} = P_{100} \text{ (peso de 100 bayas)} / 100$$

Residuo seco uva (% RS): Su determinación se basa en la diferencia de peso de 50 bayas antes y después de ser sometidas a una temperatura de 100 °C hasta peso constante (aproximadamente 48 h). Los resultados se expresan en porcentaje respecto al inicial. Para ello se ha utilizado balanza analítica Mettler Toledo XS 105 DualRange con sensibilidad de ± 0.1 mg.

III-2.3.2 Parámetros enológicos del mosto y vino

Las muestras fueron prensadas en una prensa manual vertical de acero inoxidable recogiendo el mosto en un vaso de precipitado para sus análisis posteriores.

Grado Baumé (°Bé) y densidad relativa (ρ_r): La determinación del °Bé y de la densidad relativa se realizó mediante areometría con areómetros calibrados Dujardi-Salleron (Laboratoires Dujardin-Salleron, Francia). Para ello se utilizaron probetas de 250 mL del mosto obtenido a temperaturas de 20 °C.

pH: Se determinó mediante titrador Crison, modelo Compact (Barcelona, España), provisto de un electrodo combinado de hidrógeno cat. 52-21. Los resultados se expresan en unidades de pH.

Acidez Total (AT): Se ha determinado por valoración en titrador Crison Compact (Barcelona, España) con hidróxido sódico 0.1 N hasta pH = 7. Los resultados se expresan en gramos de ácido tartárico por litro de mosto o vino.

Ácido tartárico (TH₂): Se ha determinado la concentración de ácido tartárico de mostos y vinos según el método Rebelein (1969), basado en la formación de un complejo coloreado del ácido tartárico con vanadato amónico, cuya absorbancia a 530 nm es proporcional a la concentración de ácido tartárico.

Índice de Folin-Ciocalteu (IFC): En un matraz de 100 mL se vertieron sucesivamente 0.2 mL de vino tinto (o 1 mL de vino blanco), 5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (Panreac, España) y 10 mL de una disolución carbonato de sodio (Panreac, España) al 20%. Se enrasó con agua destilada, se esperaron 30 min para lograr la estabilización de la reacción y se efectuaron las medidas colorimétricas a 760 nm (Perkin Elmer, Lambda 25, EEUU) en cubeta de 1 cm de espesor.

Índice de maduración: Establecido como la relación entre la concentración de azúcares (medido como °Bé y su posterior conversión a g/L de azúcares), y la acidez total (g/L de ácido tartárico).

Madurez fenólica: El potencial polifenólico de la uva fue estimado empleando el conocido “método de Glories” (Saint-Cricq de Gaulejac, Vivas, & Glories, 1998). Se pesaron cuatro lotes de 50 gramos de muestra de uva. A dos de ellas se le adiciona 50 mL una disolución de pH 3.2 y a las otras dos, 50 mL de una disolución de pH 1 (a partir de HCl al 37%, calidad PRS, Panreac, Barcelona). Estas se trituran y se dejan en maceración durante 4 horas. Los macerados fueron filtrados y luego centrifugados durante 5 minutos a 3500 r.p.m. (Consul 21, Orto Alresa, España). Se analizaron la riqueza fenólica total (A280), el potencial total en antocianos (ApH1) y el potencial en antocianos extraíbles (ApH3.2). Los análisis se realizaron en un espectrofotómetro multiplaca. La extractibilidad de los antocianos se calculó con la ecuación:

$$EA (\%) = \frac{ApH1 - ApH3.2}{ApH1} \times 100$$

donde:

ApH1 (Antocianos potenciales) = Absorbancia (520 nm) de la disolución a pH 1

ApH3.2 (Antocianos extraíbles) = Absorbancia (520 nm) de la disolución a pH 3.2

III-2.4 Métodos de elaboración

III-2.4.1 Método Tradicional de elaboración de vinos tintos

En el sistema de fermentación tradicional de vinos tintos las uvas fueron despalilladas y estrujadas al llegar al lagar. El mosto junto con los hollejos se dividió en tantas fracciones como número de conservantes a estudiar por triplicado. Las distintas fracciones de mosto se encubaron en depósitos de acero inoxidable de 25 L. En estos depósitos se realizó la adición del conservante correspondiente, dióxido de azufre como control y los extractos en estudio. La fermentación alcohólica (FA) comenzó después de la inoculación de levadura seca activa (20 g/hL, ES488, Sepsa-Enartis, España), la cual se realizó a temperatura controlada de 23 ± 1 °C. Durante la fermentación se realizaron bazuqueos diarios. Una vez finalizada la FA, los hollejos fueron prensados y el vino llevado a depósitos de acero inoxidable de 10 L. Donde, tras la inoculación de bacterias malolácticas (1 g/hL, Challenge Easy ML, Sepsa-Enartis, España) y nutrientes (20 g/HL; Nutriferm ML, Sepsa-Enartis, España), el vino realizó la fermentación maloláctica (FML). Una vez finalizada la FML, se realizó la corrección del conservante correspondiente hasta la concentración inicial en cada ensayo. Para la estabilización del vino, dado el pequeño volumen del que se disponía, se mantuvo a 4 °C durante dos meses. Pasado este tiempo y comprobado que el vino era estable (Test de Boulton), se corrigió de nuevo el contenido de conservante hasta la concentración inicial. Seguidamente el vino fue trasegado y filtrado (Optical XL, Millipore, Francia) en atmósfera de nitrógeno, para su inmediato embotellado y conservación a una temperatura de 16 °C y humedad relativa 80%.

III-2.4.2 Método Ganimede® para la elaboración de vinos tintos

El método Ganimede® consiste en aprovechar el propio CO₂ generado durante la FA para una mayor extracción de compuesto desde la piel al mosto. El fermentador denominado Ganimede® posee dos elementos: un diafragma o embudo interior y dos *by-pass*. El embudo interior permite que el gas carbónico se acumule en el interior del depósito aumentando el ambiente reductor. La

apertura de los dos *by-pass* durante la FA facilita la liberación del gas acumulado directamente sobre los hollejos que serán inundados y mezclados íntimamente, obteniendo una disgregación eficaz del sombrero de manera suave, evitando acciones mecánicas tales como bombeos o remontados. Con ello se consigue una extracción más eficaz y selectiva de los aromas y polifenoles utilizando un método menos agresivo. Por otra parte, el hecho de realizarse la fermentación en un ambiente completamente anaerobio, protege a los vinos del contacto con el oxígeno y las posibles reacciones de oxidación.

En el método Ganimede® para la elaboración de vinos tintos, las uvas fueron despalilladas y estrujadas al llegar al lagar. El mosto junto con los hollejos se llevó a un depósito de acero inoxidable de 300 litros el cual previamente ha sido llenado con nitrógeno. La FA comenzó después de la inoculación de levadura seca activa (20 g/hL, ES488, Sepsa-Enartis, España). La FA se realizó a una temperatura controlada de 23 ± 1 °C. Una vez finalizada la FA, cuando la concentración de azúcar fue inferior a 3 g/L, los hollejos fueron prensados y el vino llevado a un depósito de acero inoxidable de 150 L. Donde, tras la inoculación de bacterias malolácticas (1 g/hL, Challenge Easy ML, Sepsa-Enartis, España) y nutrientes (20 g/HL; Nutriferm ML, Sepsa-Enartis, España), realizó la FML. Una vez finalizada la FML, el vino se dividió en tantas fracciones como conservantes a estudiar por triplicado. Las fracciones de vino se llevaron a depósitos de acero inoxidable de 10 L. Para la estabilización del vino, se mantuvo a 4 °C durante dos meses. A partir de este punto el proceso se desarrolló como se ha descrito en el método tradicional.

III-2.4.3 Método Tradicional de elaboración de vinos blancos

En el sistema de fermentación tradicional de vinos blancos las uvas fueron despalilladas y prensadas al llegar al lagar. Tras el prensado, el mosto se llevó a un depósito de acero inoxidable de 300 L. Se adicionó al mosto enzimas (2.5 mL/hL, Enartis ZYM Blanco L, Italia) y se mantuvo 24 horas a 4 °C para favorecer el desfangado. Tras este tiempo, el mosto desfangado se dividió en tantas fracciones como número de conservantes a estudiar por triplicado. Las fracciones de mosto se encubaron en depósitos de acero inoxidable de 25 L donde se realizó la adición del conservante correspondiente, dióxido de azufre como control y los extractos en estudio en su depósito correspondiente. La FA comenzó después de la inoculación de levadura seca activa (20 g/hL, Aroma

White, Sepsa-Enartis, España), la cual se realiza a temperatura controlada de 18 ± 1 °C. Una vez finalizada la FA, cuando la concentración de azúcar es inferior a 3 g/L, el vino se deslió y se llevó a otro depósito de acero inoxidable de 10 litros de capacidad, donde se realizó la corrección de los conservantes hasta la concentración inicial adicionada en cada ensayo. Para la estabilización del vino, se mantuvo en frío (4 °C) durante dos meses. Pasado este tiempo y comprobado que el vino era estable (Test de Boulton), fue corregido el contenido de conservante correspondiente de cada depósito hasta la concentración inicial. Seguidamente, el vino fue trasegado y filtrado en atmósfera de nitrógeno (Optical XL 10W, Millipore, Francia) para su inmediato embotellado y conservación a una temperatura y humedad relativa adecuada (16 °C y 80% de humedad relativa).

III-2.4.4 Método de elaboración en condiciones reductoras de vinos blancos

En el sistema de fermentación en condiciones reductoras de vinos blancos las uvas fueron despalilladas y prensadas al llegar al lagar. Tras el prensado, el mosto se llevó a un depósito de acero inoxidable de 300 L. Se adicionó al mosto enzimas (2.5 mL/hL, Enartis ZYM Blanco L, Italia) y se mantuvo 24 horas a 4 °C para favorecer el desfangado. Tras este tiempo, se procedió al desfangado del mosto a otro depósito de acero inoxidable de 300 L estanco, con salida para el CO₂, el cual previamente ha sido llenado con nitrógeno. La FA comenzó después de la inoculación de levadura seca activa (20 g/hL, Aroma White, Sepsa-Enartis, España). La FA se realizó a una temperatura controlada de 18 ± 1 °C. Diariamente fue adicionado CO₂ para asegurar las condiciones reductoras. Una vez finalizada la FA, cuando la concentración de azúcar fue inferior a 3 g/L, el vino desliado se dividió en tantas fracciones como conservantes a estudiar por triplicado. Las fracciones de vino se llevaron a depósitos de acero inoxidable de 10 L. En este punto se realiza la adición de SO₂ como control y los extractos en estudio en cada depósito correspondiente. Para la estabilización del vino se mantuvo en frío (4 °C) durante dos meses. A partir de este punto el proceso se desarrolló como se ha descrito en el método tradicional.

III-2.5 Vendimia 2013

En el año 2013 se realizaron las vinificaciones de la variedad tinta Syrah (Syr) y la variedad blanca Sauvignon blanc (Sb). Se ensayaron cuatro antioxidantes

distintos: un producto rico en hidroxitirosol procedente de subproductos, Hytolive® (**HTG**®); un producto rico en hidroxitirosol de naturaleza sintética, Biotech (**HTB**®); un extracto rico en estilbenos, Vineatrol® (**VIN**®); y, por último, como control, el dióxido de azufre (**CT**). Además, se ensayaron con dos sistemas de vinificación para la elaboración de vinos tintos y dos para la elaboración de vinos blancos, con el fin de comprobar si los resultados obtenidos dependían del método de elaboración estudiado; en el caso del vino tinto, se utilizó el método tradicional y el método Ganimede®; en el caso del vino blanco, se utilizó el método tradicional y la fermentación en condiciones reductoras.

Se realizaron las siguientes vinificaciones/ensayos:

1. Elaboración de vino tinto:

- a. Mediante sistema tradicional y los antioxidantes CT (50 mg/L SO₂), HTB (51 mg extracto/L para obtener una concentración de 50 mg/L de hidroxitirosol), HTG (192 mg extracto/L para obtener 50 mg/L de hidroxitirosol) y VIN (86 mg extracto/L para obtener 25 mg/L de estilbenos) (*Figura 3.6*).
- b. Mediante sistema Ganimede® y los antioxidantes G-CT (50 mg/L SO₂), G-HTB (51 mg extracto/L para obtener una concentración de 50 mg/L de hidroxitirosol), G-HTG (192 mg extracto/L para obtener 50 mg/L de hidroxitirosol) y G-VIN (86 mg extracto/L para obtener 25 mg/L de estilbenos) (*Figura 3.6*).

2. Elaboración de vino blanco:

- a. Mediante sistema tradicional y los antioxidantes CT (80 mg/L, SO₂), HTB (81 mg extracto/L para obtener una concentración de 80 mg/L de hidroxitirosol), HTG (308 mg extracto/L, para obtener 80 mg/L de hidroxitirosol) y VIN (175 mg extracto/L, para obtener 50 mg/L de estilbenos) (*Figura 3.7*).
- b. Mediante sistema Ganimede® y los antioxidantes R-CT (50 mg/L SO₂), R-HTB (81 mg extracto/L para obtener una concentración de 80 mg/L de hidroxitirosol), R-HTG (308 mg extracto/L, para obtener 80 mg/L de hidroxitirosol) y R-VIN (175 mg extracto/L, para obtener 50 mg/L de estilbenos) (*Figura 3.7*).

Los extractos se prepararon en una disolución 50:50 de alcohol vínico (96.7%) y matriz vínica (12%). La disolución se preparó concentrada, y de ella se tomó un volumen que se adicionó a cada depósito para obtener la concentración de

extracto deseada. En la *Tabla 3.1* y *Tabla 3.2* se resume el volumen de disolución de conservante adicionado en cada depósito durante las distintas fases de la vinificación de vinos tintos y blancos (*Figura 3.3* y *3.4*).

Tabla 3.1. Resumen de los volúmenes adicionados de las disoluciones concentradas de los conservantes utilizados en las distintas fases de la vinificación de vino tinto por el método tradicional y método Ganime de durante la vendimia de 2013

Volumen ADICIÓN conservante en mostos TINTOS en método TRADICIONAL (mL)					
conservante	ensayo	disolución (g/L)	Depósito 1	Depósito 2	Depósito 3
SO ₂	CT	150	8.33	8.33	8.33
HTB [®]	HTB	10.97	125	125	125
HTG [®]	HTG	36	125	125	125
VIN [®]	VIN	17.6	125	125	125
Volumen CORRECCIÓN 1 conservante en vinos TINTOS en método TRADICIONAL (mL)					
conservante	ensayo	disolución (g/L)	Depósito 1	Depósito 2	Depósito 3
SO ₂	CT	150	2.0	2.0	2.0
HTB [®]	HTB	7.5	38.9	38.9	38.9
HTG [®]	HTG	7.4	38.9	38.9	38.9
VIN [®]	VIN	10	60	60	60
Volumen CORRECCIÓN 2 conservante en vinos TINTOS en método TRADICIONAL (mL)- antes del embotellado					
conservante	ensayo	disolución (g/L)	Depósito 1	Depósito 2	Depósito 3
SO ₂	CT	150	4.0	4.5	4.1
HTB [®]	HTB	-	-	-	-
HTG [®]	HTG	-	-	-	-
VIN [®]	VIN	14.9	23.3	23.3	23.3
Volumen ADICIÓN conservante en vinos TINTOS en método GANIMEDE (mL)					
conservante	ensayo	disolución (g/L)	Depósito 1	Depósito 2	Depósito 3
SO ₂	G-CT	150	4.0	4.0	4.0
HTB [®]	G-HTB	7.5	81	81	81
HTG [®]	G-HTG	7.4	81	81	81
VIN [®]	G-VIN	10	60	60	60
Volumen CORRECCIÓN conservante en vinos TINTOS en método GANIMEDE (mL)- antes del embotellado					
conservante	ensayo	disolución (g/L)	Depósito 1	Depósito 2	Depósito 3
SO ₂	G-CT	150	4.5	4.5	4.5
HTB [®]	G-HTB	-	-	-	-
HTG [®]	G-HTG	-	-	-	-
VIN [®]	G-VIN	28.6	11.3	18.1	18.8

Tabla 3.2. Resumen de los volúmenes adicionados de las disoluciones concentradas de los conservantes utilizados en las distintas fases de vinificación de vino blanco por el método tradicional y método Ganime de durante la vendimia de 2013

Volumen ADICIÓN conservante mostos BLANCOS en método TRADICIONAL (mL)					
conservante	ensayo	disolución (g/L)	Depósito 1	Depósito 2	Depósito 3
SO ₂	CT	150	8.33	8.33	8.33
HTB®	HTB	16.26	125	125	125
HTG®	HTG	58.8	125	125	125
VIN®	VIN	28	125	125	125
Volumen CORRECCIÓN 1 conservante en vinos BLANCOS en método TRADICIONAL (mL)					
conservante	ensayo	disolución (g/L)	Depósito 1	Depósito 2	Depósito 3
SO ₂	CT	150	2.14	2.23	2.4
HTB®	HTB	8.53	54.5	55.7	57.8
HTG®	HTG	8.45	58.6	54.3	55.0
VIN®	VIN	28	56	56	56
Volumen CORRECCIÓN 2 conservante en vinos BLANCOS en método TRADICIONAL (mL)- antes del embotellado					
conservante	ensayo	disolución (g/L)	Depósito 1	Depósito 2	Depósito 3
SO ₂	CT	150	0.40	0.27	0.47
HTB®	HTB	-	-	-	-
HTG®	HTG	-	-	-	-
VIN®	VIN	9.8	33.0	33.0	33.0
Volumen ADICIÓN conservante VINOS BLANCOS en método GANIMEDE (mL)					
conservante	ensayo	disolución (g/L)	Depósito 1	Depósito 2	Depósito 3
SO ₂	R-CT	150	6.0	6.0	6.0
HTB®	R-HTB	16.2	56.0	56.0	56.0
HTG®	R-HTG	16.0	56.0	56.0	56.0
VIN®	R-VIN	16.0	56.0	56.0	56.0
Volumen CORRECCIÓN conservante VINOS BLANCOS en método GANIMEDE (mL) – antes del embotellado					
conservante	ensayo	disolución (g/L)	Depósito 1	Depósito 2	Depósito 3
SO ₂	R-CT	150	1.0	1.0	1.0
HTB®	R-HTB	-	-	-	-
HTG®	R-HTG	-	-	-	-
VIN®	R-VIN	28.6	50.0	25.0	50.0

El **HTB®** suministrado por Seprox Biotech (España) se presenta en estado sólido blanco y que, una vez disuelto, es un líquido transparente. El **HTG®** es un extracto líquido de apariencia viscosa y color marrón pálido. Y, por último, el **VIN®** es un extracto que se presenta en estado sólido marrón y en disolución concentrada tienen color marrón intenso (*Figura 3.3*). El SO₂ se adicionó directamente de una disolución preparada de 150 g/L (Sulfosol), suministrado por Sepsa-Enartis (España).



Figura 3.3. Disoluciones concentradas (HTB® 11 g/L; HTG® 36 g/L, VIN® 17.6 g/L) en matriz vínica de los productos comerciales utilizados en la vinificación tradicional de vinos tintos en la vendimia 2013.

En esta vendimia los tapones usados en el embotellado fueron tapones de corcho microaglomerado-Seleccork (44 mm de largo, 24 mm de diámetro; Tapones del Sur, Jerez de la Frontera, España).

Las muestras de vino fueron tomadas después de cada adición del conservante, en el embotellado, y después de 6 y 12 meses de almacenamiento en botella.



Figura 3.4. Tapones de corcho microaglomerado-Seleccork

III-2.6 Vendimia 2014

En el año 2014, se realizó la vinificación de la variedad Syrah utilizando el sistema Ganimed® y los ensayos fueron: con SO₂ (**CT**) y con Vineatrol (**VIN**) a dos concentraciones distintas.

La vinificación se realizó utilizando el sistema Ganimed® y los antioxidantes CT (50 mg/L de SO₂), VIN-50 (175 mg/L para obtener 50 mg/L de estilbenos) y VIN-100 (430 mg/L para obtener 100 mg/L de estilbenos) (Figura 3.8).

Con el fin de adicionar el mismo contenido de alcohol vínico a todos los ensayos, los gramos de extracto necesarios por depósito (de 11.25 L de volumen) se disolvieron en un volumen de 50 mL de alcohol vínico con 96.7% de etanol. Considerando que el Vineatrol tiene una riqueza del 29% de estilbenos y una solubilidad del 80-85%, y que el volumen de vino por depósito es de 11.25 litros,

en las *Tabla 3.3* se resume los gramos de extracto/conservante y volumen adicionado en cada depósito durante las distintas fases de la vinificación de vinos tintos (*Figura 3.8*).

El SO₂ se adicionó directamente de una disolución preparada de 150 g/L (Sulfosol), suministrado por Sepsa-Enartis (España).

Tabla 3.3. Resumen de los gramos adicionados de los extractos/conservantes por depósito en las distintas fases de la vinificación de vino tinto por el método Ganimede durante la vendimia de 2014

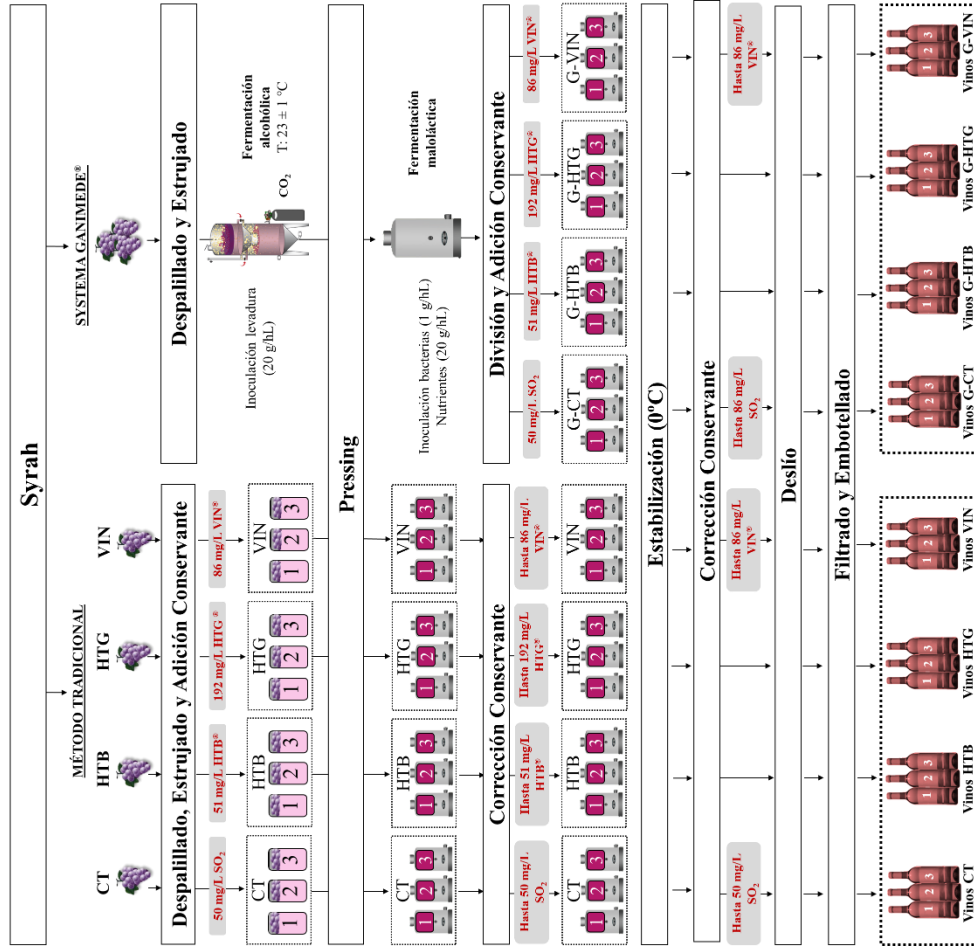
Gramos ADICIÓN conservante en vinos TINTOS (gramos/depósito)					
conservante	ensayo	volumen (mL)	Depósito 1	Depósito 2	Depósito 3
SO ₂	CT	-	1.0	1.0	1.0
VIN®	VIN-50	50.0	1.954	1.960	1.911
VIN®	VIN-100	50.0	4.833	4.845	4.838
Volumen CORRECCIÓN conservante en vinos TINTOS (mL) – antes embotellado					
conservante	ensayo	volumen (mL)	Depósito 1	Depósito 2	Depósito 3
SO ₂	CT	-	0.74	0.74	0.74
VIN®	VIN-50	-	-	-	-
VIN®	VIN-100	-	-	-	-

En esta vendimia los tapones usados en el embotellado consistieron en tapones sintéticos (Excellent cork SL, Valencia, España).



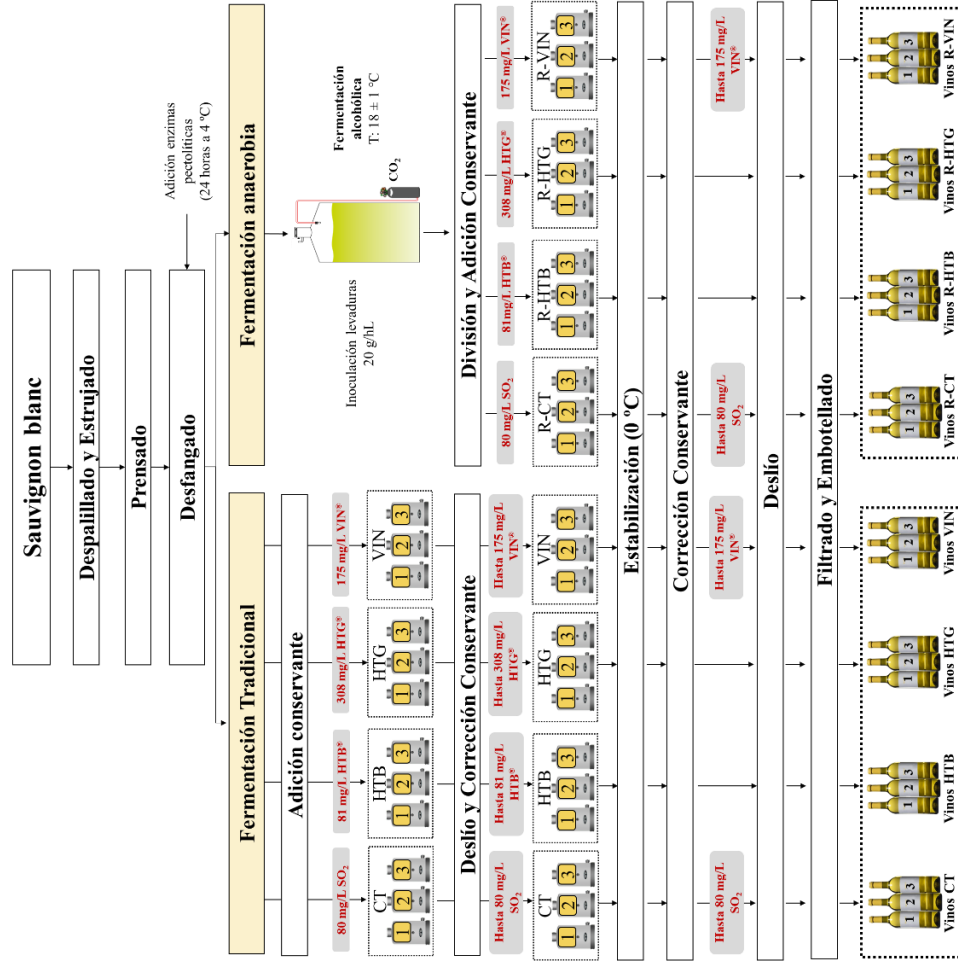
Figura 3.5. Tapón sintético Excellent cork S.L.

Las muestras de vino fueron tomadas después de la adición del conservante, en el embotellado, y después de 6 y 12 meses de almacenamiento en botella.



Almacenamiento en botella (12 meses a 16 °C y 80% HR)

Figura 3.7. Diagrama de vinificación de vino Syrah 2013



Almacenamiento en botella (12 meses a 16 °C y 80% HR)

Figura 3.6. Diagrama de vinificación de vino Sauvignon blanc 2013

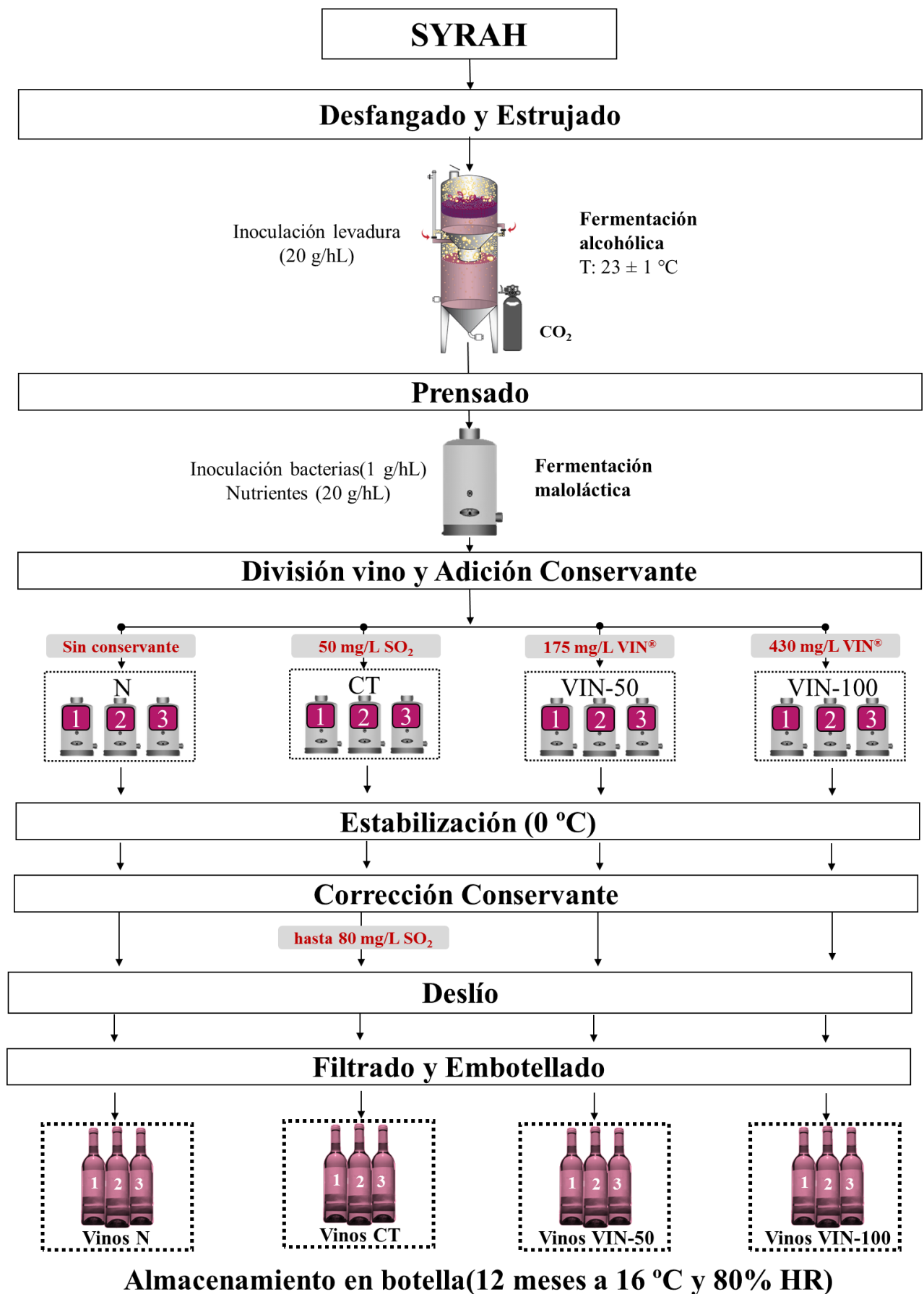


Figura 3.8. Diagrama de vinificación de vino Syrah 2014

III-3 Análisis químicos de vinos

III-3.1 Parámetros enológicos

Los análisis de los distintos parámetros enológicos que se realizaron a los vinos en distintas fases de la elaboración se realizaron por triplicado siguiendo los métodos analíticos oficiales establecidos por la organización Internacional de la viña y el vino (OIV, 2012). Parámetros enológicos que se determinaron en los vinos:

Grado alcohólico (% v/v) y densidad (ρ) se ha medido por inyección y lectura directa de los vinos en el Alcoholyser wine-Densímetro DMA4500 (Anton Paar, Austria).

Extracto seco: La muestra (20 mL de vino) fue calentada al baño maría a 100 °C durante 6 horas, a continuación, se secaron y enfriaron los crisoles para su posterior pesada. Los resultados se expresan en porcentaje respecto al inicial. Se ha utilizado balanza analítica METTLER TOLEDO XS 105 DualRange con sensibilidad de ± 0.1 mg.

Acidez total (AT): descrito en la sección III-2.3.2

Acidez volátil (AV): se ha determinado por destilación en un dispositivo por arrastre de vapor (DE 16-26, Selecta, España) y valoración con NaOH 0.1 N.

pH: descrito en la sección III-2.3.2

Azúcares reductores: se han determinado por el método descrito por Rebelein y Steinert, 1972, basado en las propiedades reductoras de la glucosa y de la fructosa sobre las sales cúpricas con una posterior valoración. Los resultados se expresaron en gramos de glucosa por litro de vino.

Metales: para la cuantificación de hierro, cobre, zinc, calcio, sodio y potasio los metales se ha utilizado espectrometría de absorción atómica. Para ello se utilizó un espectrómetro de absorción atómica. Inicialmente se realiza un ajuste del 100% de transmisión con agua destilada. A continuación, realizar la calibración con soluciones preparadas a distintas concentraciones del compuesto de referencia (25, 50, 75 y 100 mg/L) por aspiración directa en el “burner” del fotómetro. La cuantificación de metales en vinos se realiza por aspiración directa de una dilución 1:10 del vino en agua MilliQ. La concentración se expresa en mg/L.

Ácidos orgánicos: la cuantificación de los ácidos cítrico, tartárico, málico, láctico, succínico, glicerina y acético se realizó en un equipo Waters HPLC compuesto por una bomba binaria modelo 1525, módulo de control de temperatura, un detector de fotodiodo Waters 996 y un detector de índice de refracción (IR Waters 2414). La cuantificación se realizó con ambos detectores, excepto la glicerina que se cuantificó por el índice de refracción.

Compuestos volátiles mayoritarios: para la determinación de acetaldehído, acetato de etilo, metanol, 2- butanol, n-propanol, isobutanol, n-butanol, alcohol isoamílico y los alcoholes superiores (suma de los compuestos volátiles con punto de ebullición mayor que el metanol). 200 mL de vinos se destilan en un dispositivo por arrastre de vapor (DE 16-26, Selecta, España) hasta recoger aproximadamente tres cuartas partes del volumen inicial. El destilado se completa hasta 200 mL con agua destilada. A 10 mL del destilado se adiciona 1 mL de solución de patrón interno (4-metil-2-pentanol; Fluka, Sigma-Aldrich Corp., Buchs SG, Suiza) se adicionan al destilado. 1 µL de muestra se inyectan en un cromatógrafo de gases con un detector de ionización de llama (Perkin Elmer AutoSystem XL, USA) en modo splitless. La separación se llevó a cabo en una columna capilar ZB-WAX plus (60 m x 0,25 mm de diámetro interior y 0.5 µm espesor de película, Phenomenex, Torrance, EEUU). El programa de temperatura fue: 85 °C durante 5.5 min, luego subió a 120 °C a una velocidad de 5 °C/min y se mantuvo durante 5.5 min. El gas portador fue hidrógeno a una velocidad de flujo de 7 mL/min. La temperatura del inyector fue de 250 °C y del detector 250 °C. La identificación de los compuestos se llevó a cabo comparando sus tiempos de retención con los de los estándares de referencia puros. La cuantificación de compuestos volátiles se realizó usando un método de patrón interno y se basó en curvas de calibración de los estándares en etanol.

El cálculo de la concentración de cada compuesto volátil (C_i) se realizó siguiendo la siguiente ecuación: $C_i = \frac{C_p}{m} * \left(\frac{A_i}{A_p} - b \right)$

donde:

A_i – área del pico del compuesto

A_p –área del pico del estándar interno

C_p –concentración del estándar interno

m – pendiente de la curva de calibrado

b – corte en el eje Y de la curva de calibrado

Anhídrido sulfuroso libre y total: la determinación del contenido de SO₂ libre y total en los vinos se utilizó el método propuesto por Paul-Rankine. La determinación se basa en la liberación del SO₂ libre por acidificación con ácido fosfórico y se arrastra con una corriente de aire o nitrógeno que se hace borbotear en una solución diluida y neutra de peróxido de hidrógeno. Valoración del ácido sulfúrico formado con NaOH de 0.1 N. El arrastre en frío (10°C) garantiza la extracción únicamente del SO₂ libre. En caliente (100°C aproximado) se extrae el SO₂ total.

III-3.2 Determinaciones espectrofotométricas

❖ INTENSIDAD DE COLOR Y TONALIDAD: Para caracterizar el color de los vinos, se determinó el valor de la absorbancia a 420, 520 y 620 nm en cubeta de 1 cm mediante espectrofotometría UV-vis (Perkin Elmer Lambda 25, EEUU). Las muestras se filtraron por 0.45 µm de PVDF (Teknokroma Olimpeak, Barcelona, España). Con estas medidas se determinaron los parámetros intensidad colorante (IC), tonalidad (hue), %Rojo (%R), %Azul (%Az) y %Amarillo (%Am) (Glories, 1984):

$$IC = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

$$\text{hue} = (A_{420} / A_{520}) * 100$$

$$\%R = [A_{520} / (A_{420} + A_{520} + A_{620})] * 100$$

$$\%Az = [A_{620} / (A_{420} + A_{520} + A_{620})] * 100$$

$$\%Am = [A_{420} / (A_{420} + A_{520} + A_{620})] * 100$$

❖ PARÁMETROS CIELAB: Las mediciones colorimétricas se realizaron en un espectrofotómetro Konica-Minolta CM-3600d (Osaka, Japón). Los parámetros CIELab, L* (luminosidad), a* (rojo), b* (amarillez), se determinaron mediante el software SpectraMagic v.3.61G (Cyberchrome Inc., Minolta Co. Ltd), siguiendo las recomendaciones de la Comisión Internacional De L'Eclairage (CIE): el observador estándar (D10°) y el iluminante estándar (D65). Las diferencias de color (ΔE^*_{ab}) se calcularon como la distancia euclídea entre dos puntos del espacio 3D definido por L*, a* y b* (Martínez, Melgosa, Pérez, Hita, & Negueruela, 2001).

$$\Delta E^*_{ab} = [(L^*_1 - L^*_2)^2 + (a^*_1 - a^*_2)^2 + (b^*_1 - b^*_2)^2]^{1/2}$$

❖ ANTOCIANOS TOTALES (ANT); TANINOS TOTALES (TAN) E ÍNDICE DE POLIFENOLES TOTALES (IPT): La cuantificación se hizo de acuerdo con la metodología descrita por Puissant y León (1967). Para la determinación de antocianos totales se realizó una dilución 1:25 de la muestra en una solución de HCl al 1% (a partir de HCl al 37%, calidad PRS, Panreac, Barcelona). A continuación, se efectuó la medición de la absorbancia de a 520 nm. Para la determinación de taninos totales se realizó una dilución 1:50 de la muestra en agua milliQ. A continuación, se efectuó la medición de la absorbancia de a 280 nm. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro multiplaca.

❖ PARÁMETROS DE COPIGMENTACIÓN: La contribución de antocianos libres, antocianos copigmentados y pigmentos poliméricos al color se determinaron siguiendo el método propuesto por Boulton (1996). Los vinos se centrifugaron previamente y se ajustó el pH a 3.60. Se realizaron las siguientes medidas (espectrofotómetro Lambda 25, Perkin-Elmer, EEUU):

1) A_{acet} : A 2 mL de vino se añadieron 20 mL de acetaldehído (10%). Se agitaron y pasados 45 min. se midió la absorbancia a 520 nm en cubeta de 10 mm.

2) A^{20} : el vino se diluyó 1:20 en matriz vínica (24 mL de etanol puro se añadieron a 176 mL de agua destilada en el que se disolvieron 0.5 g de bitartrato potásico. Se ajustó el pH a 3.6 con HCl y NaOH) (Panreac, Barcelona). Pasados 5 min. se midió la absorbancia a 520 nm en cubeta de 1 mm. Se realizó la corrección de paso de luz multiplicando por 10.

3) A^{SO_2} : A 2 mL de vino se añadieron 160 μL de anhídrido sulfuroso (5%) (Sofosol M, Enartis, España) y en cubeta de 1 mm se midió absorbancia a 520 nm. Se realizó la corrección de paso de luz multiplicando por 10.

Se realizaron los siguientes cálculos:

- fracción de color debido a la copigmentación

$$\% \text{ antocianos copigmentados} = (A_{\text{acet}} - A^{20}) / A_{\text{acet}}$$

- fracción de color debida a los antocianos libres

$$\% \text{ antocianos libres} = (A^{20} - A^{\text{SO}_2}) / A_{\text{acet}}$$

- fracción perteneciente a los pigmentos poliméricos

$$\% \text{ pigmentos polimerizados} = A^{\text{SO}_2} / A_{\text{acet}}$$

Estos análisis se realizaron en el Departamento de Agricultura y Ciencias de la Alimentación de la Universidad de Bolonia (Italia)

III-3.3 Determinación de polifenoles por HPLC

III-3.3.1 Análisis de antocianicos

Las antocianinas se identificaron y cuantificaron siguiendo el método descrito por (Chinnici, Sonni, Natali, Galassi, & Riponi, 2009). El análisis se llevó a cabo en un Jasco RP-HPLC (Tokio, Japón) equipado con una válvula Rheodyne (Cotati, CA), un loop de 20 µL, una bomba PU-2089, un detector de fotodiodos (PU MD 910), un detector fluorométrico (FP 2020) y módulo de control de temperatura. La columna fue una Phenomenex (Torrance, USA) Synergy Hydro-RP 80A 25 cm x 3,0 mm ID a 30 °C. Los disolventes de elución para análisis de antocianinas fueron ácido fórmico al 10% en agua de grado HPLC (fase A) y ácido fórmico al 10%, CH₃CN al 45%, agua de grado HPLC al 45% (fase B) con un flujo de 0.47 mL/min. La cuantificación se realizó a 525 nm para antocianinas monómeras, 490 nm para vitisinas de tipo B, 505 nm para vitisinas de tipo A y vinilpiranoantocianinas y 545 nm para aductos directos y por puentes etilo. La concentración de cada compuesto se expresó como equivalente de malvidin-3-glucósido (mg/L).

Estos análisis se realizaron en el Departamento de Agricultura y Ciencias de la Alimentación de la Universidad de Bolonia (Italia)

III-3.3.2 Compuesto fenólicos no antocianinas

Se identificaron y cuantificaron siguiendo el método descrito por Chinnici, Natali, Bellachioma, Versari, & Riponi (2015) las siguientes familias de compuestos: (i) ácidos hidroxibenzoicos: gálico, siríngico, protocatéquico y vanílico; (ii) ácidos hidroxicinámicos: *trans-p*-coumarico, *trans-p*-coumarico, *trans*-cafeico, *trans*-caftarico, ferulico y ácido 2-S-glutationil-caftarico (GRP); (iii) flavanoles: (+)-catequina, (-)-epicatequina and procianidina B2; (iv) flavonoles: miricetina-3-O-glucosido, miricetina-3-O-glucuronido, quercitina-3-O-glucuronido, quercitina-3-O-glucosido, kaempferol-3-O-glucosido, isorhamnetin-3-O-glucosido.

El análisis se llevó a cabo en el HPLC descrito en la sección III-3.3.1 (análisis de antocianicos). Los disolventes de elución fueron ácido acético al 2% en agua de grado HPLC (disolvente A) y ácido acético al 2%, CH₃CN al 98% (disolvente B).

El gradiente de elución fue la siguiente: flujo inicial 95% A durante 15 min, 90% A a 25 min, 82% A a 32 min, 80% A a 37 min, 70% A a 42 min; 50% de A a 47 min; 0% A a 49 min durante 6 min. La temperatura de la columna fue de 30 °C con un flujo de 0,5 mL/min.

La detección UV se llevó a cabo como sigue: (i) ácidos hidroxibenzoicos: a 280 nm para los ácidos gálico y siríngico; 256 nm para los ácidos protocatéquico y vanílico; (ii) ácidos hidroxicinámicos: a 308 nm para los ácidos *trans-p*-cumárico y *trans-p*-cártarico; 324 nm para los ácidos *trans*-cafeico, *trans*-caftárico, ferúlico y el GRP (producto de la reacción de la uva); (iii) La detección de flavanoles se realizó mediante detección por fluorescencia (280 nm longitud de onda de excitación, λ_{em} ; 315 nm longitud de onda de emisión, λ_{em} ; y (iv) los flavonoles a 365 nm. Los derivados del ácido cafeico (GRP, isómeros del ácido del caftárico y cafeoato del etilo) y derivados del cumárico (isómeros del ácido coutárico y cumarato del etilo) fueron cuantificados como equivalentes de los ácidos cafeico y cumárico, respectivamente. Los resultados se expresados en mg/L.

Estos análisis se realizaron en el Departamento de Agricultura y Ciencias de la Alimentación de la Universidad de Bolonia (Italia)

III-3.3.3 Análisis de hidroxitirosol

La detección y cuantificación de hidroxitirosol en vinos se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección III-1.2.1. Las concentraciones se expresaron en mg/L.

III-3.3.4 Análisis de estilbenos

El procedimiento para la identificación y cuantificación de estilbenos se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección III-1.2.2.

La cuantificación de estilbenos se llevó a cabo a 280 nm para ampelopsina A, isohopheafenol, hopeafenol, pallidol utilizando la curva de calibrado de ampelopsina A; el *trans*-resveratrol se determinó a 306 nm con su estándar; piceatannol, r²-viniferina, ϵ -viniferina, r-viniferina y ω -viniferina se cuantificaron a 320 nm como ϵ -viniferina. Las concentraciones se expresaron en mg/L.

III-3.4 Análisis de aminas biógenas

Las aminas biógenas se identificaron y cuantificaron siguiendo un método descrito por (Cejudo-Bastante et al., 2010) con ligeras modificaciones. Las muestras se hicieron reaccionar con 1.75 mL de tampón de borato (1 mol/L, pH 9), 750 µL de metanol, 1 mL de muestra y 20 µL de DEEMM durante 30 minutos en un baño de ultrasonidos y se deja durante 24 h a 20 °C. La muestra derivatizada analizó en una Jasco HPLC descrito en la sección “análisis de antocianinas”. Las separaciones se realizaron en una columna de fase reversa Waters (Milford, MA, EE.UU.) Nova-Pak® C18 (3.9 x 300 mm, de 4 µm de tamaños de partícula) a 40 °C. Las composiciones de las fases móviles fueron las siguientes: fase A, tampón acetato 25 mmol/L pH 5.65; y fase B, acetonitrilo: metanol 80:20. El caudal fue de 1.1 mL/min. El gradiente de elución fue la siguiente: flujo inicial 100% A durante 7 min, 96% A a 18 min, 92% A a 23 min, y se mantiene hasta 25 min, 85% A a 28 min, 77% A a 50 min; 55% de A a 62 min; 40% A a 69 min; 20% A a 72 min, 100% A a 73 min durante 5 min. La detección se realizó a 280 nm y la cuantificación se realizó con sus estándares. Los resultados se expresaron en mg/L.

Estos análisis se realizaron en el Departamento de Agricultura y Ciencias de la Alimentación de la Universidad de Bolonia (Italia)

III-3.5 Recuento de levaduras y bacterias

El recuento de levaduras y bacterias lácticas y acéticas viables, fue realizado siguiendo los métodos analíticos oficiales establecidos por la organización Internacional de la viña y el vino (OIV, 2012). El volumen tomado fue como mínimo el 1% del volumen total de la muestra. Los resultados fueron expresados como UFC/mL (unidades formadoras de colonias/mL). La muestra tomada se centrifugó durante 10 min a 3500 r.p.m. en una centrífuga (Consul 21, Orto Aresa, España). El pele resultante se redisolvió en una disolución esterilizada de 0,3% de NaCl en agua milliQ. De esta disolución se realizaron sucesivas disoluciones del orden 10^{-1} . Las distintas disoluciones se sembraron mediante siembra en superficie en placas Petri aerobias para levaduras y bacterias acéticas y anaerobias para bacterias lácticas (Cultimed). Los medios de cultivo para levaduras fueron Agar de extracto de malta (MEA, Cultimed); Man, Rogosa y Sharpe Agar (MRS agar, Oxoid) para bacterias lácticas y Agar Wallerstein Differential para bacterias acéticas (WL differential, Sigma-Aldrich). Los medios

de cultivo y material fueron esterilizados en una autoclave a 121°C durante 15 min. Las placas Petri fueron incubados a 30 °C durante 2 a 5 días en una estufa para cultivos (JP Celecta, Barcelona).

III-3.6 Determinación de compuestos volátiles por cromatografía de gases (CG)

El análisis de los compuestos volátiles de los vinos se realizó mediante el método descrito por Ortega, López, Cacho, & Ferreira (2001) con modificaciones Garde-Cerdán et al. (2014). La extracción se llevó a cabo mezclando 3 mL de muestra, 9,5 mL de solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15 μL de solución patrón interna (2 butanol, 4-metil-2-pentanol, 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona, 2-octanol y ácido heptanoico; 40 mg de cada uno de ellos/100 mL de etanol) y 200 μL de diclorometano en tubos. Los tubos se agitaron durante 1 hora a 400 r.p.m. y posteriormente se centrifugaron a 2500 r.p.m. durante 10 min. Una vez separadas las fases, se recuperó la fase de diclorometano. Se inyectaron 2 μL de este extracto en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard (Palo Alto, CA) 6890 serie II equipado con un inyector automático y un detector FID Hewlett-Packard. La separación se llevó a cabo con una columna capilar DB-WAX (60 m x 0,32 mm de diámetro interior y 0.5 μm espesor de película, J&W Scientific, Folsom, CA, USA.). El programa de temperatura fue: 40 °C durante 5 min, luego subió a 220 °C a una velocidad de 3 °C/min. El gas portador fue nitrógeno a una velocidad de flujo de 3 mL/min. La temperatura del inyector fue de 220 °C y del detector 280 °C. La identificación de los compuestos se llevó a cabo comparando sus tiempos de retención con los de los estándares de referencia puros usando cromatógrafo de gases Hewlett-Packard (Palo Alto, CA) 6890 serie II equipado un detector de ionización de electrones con las mismas condiciones cromatográficas. La cuantificación de compuestos volátiles se realizó usando un método de patrón interno y se basó en curvas de calibración de los estándares respectivos en una solución de etanol al 12% (v/v) a pH 3.6. Estas soluciones estándar se sometieron al mismo proceso de extracción que las muestras de vino.

Estos análisis se realizaron en el Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino, ICSVV (Rioja, España).

III-3.7 Determinación del perfil olfatométrico por CG-O

El perfil olfatométrico de los vinos se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección III-1.5.

III-3.8 Análisis sensorial

Para estudiar la existencia de diferencias entre los ensayos, se empleó una prueba triangular (ISO Standard 4120: 1983) en el embotellado (ISO, 1983). El análisis descriptivo sensorial se realizó siguiendo el Método del Perfil Sensorial según la norma ISO 6564: 1985 (ISO, 1985). El panel sensorial estuvo compuesto por 11 jueces. Los descriptores se puntuaron en una escala de 1 a 10 (1: ausencia de un descriptor, 10: intensidad máxima). A continuación, se muestra las fichas de catas utilizadas para los vinos blancos y tintos.

FICHA DE CATA VINOS BLANCOS

ENSAYO:

Nombre:

Fecha:

		MUESTRA →	1	2	3
VISTA	amarillo grisáceo				
	amarillo verdoso				
	amarillo paja				
	dorado				
	oro viejo				
	ámbar				
	castaño				
	caoba				
	limpidez				
	AROMA	intensidad aroma			
cítricos (limón, pomelo, box tree)					
fruta de árbol (pera, manzana verde)					
fruta tropical (coco, plátano, piña, mango, litchi,)					
fruta de hueso (melocotón, albaricoque)					
fruta madura (uva pasa, compota, mermelada)					
fruto seco (almendra, avellana)					
floral (flor blanca, azahar, rosa, violeta, jazmín, lavanda)					
caramelo/dulce (mantecado, miel, mantequilla, pasta almendra)					
balsámica (pino, manzanilla, eucalipto, tomillo, té, menta, romero)					
vegetal (hierba, espárrago)					
especiado (curry, regaliz, anís, clavo, pimienta, canela)					
fenólica (hospital, medicina, farmacia, química)					
ahumado, tostado, madera (roble, resina, vainilla, tabaco, ahumado)					
DEFECTOS NARIZ	animal, cuero, sucio				
	tierra/ champiñón				
	levadura				
	químico (corcho, goma, plástico, cerilla)				
	acético				
	acetato de etilo (pegamento)				
	acetaldehído (oxidado)				
	reducido (azufre, huevo duro)				
GUSTO	intensidad sabor				
	acidez				
	amargo				
	salado				
	alcohol				
	astringente (tánico, seco)				
	viscoso (graso)				
	complejo				
	equilibrado				
	persistencia				
	calidad global				
	¿qué ensayo es?				
preferencia					

FICHA DE CATA VINOS TINTOS

ENSAYO:

Nombre:

Fecha:

		MUESTRA →	1	2	3
VISTA	rojo violáceo				
	rojo púrpura				
	rojo cereza				
	rojo rubí				
	rojo teja				
	limpidez				
AROMA	intensidad aroma				
	fruta roja (fresa, frambuesa, cereza)				
	fruta negra (grosella negra, mora)				
	fruta árbol (ciruela, melocotón, albaricoque, manzana)				
	fruta tropical (melón, plátano, piña, kiwi)				
	fruta madura (compota, mermelada, higo, uva pasa, ciruela pasa)				
	floral (violeta, rosa, geranio)				
	vegetal/pirazinas (pimiento verde, verde)				
	hierba fresca (verdor (hexanal), verdina, hierba cortada)				
	balsámica (eucalipto, pino, manzanilla, té, tomillo, menta)				
	caramelo/dulce (toffee, chocolate, mantecado, miel, melaza)				
	ahumada/ tostado/madera (ahumado, vainilla, café; roble, resina)				
	fruto seco (almendra, avellana)				
	especiado (curry, regaliz, anís, clavo, pimienta)				
láctea (mantequilla, yogurt)					
levadura (pan)					
mineral					
alcohol					
DEFECTOS NARIZ	animal, cuero, sucio				
	tierra, champiñón				
	vegetal cocido (coliflor, brócoli)				
	químico (corcho, goma, plástico, cerilla)				
	fenólica (hospital, medicina, farmacia)				
	acético				
	acetato de etilo (pegamento)				
	acetaldehído (oxidado)				
reducido (azufre, huevo duro)					
oxidado (metálico)					
GUSTO	intensidad sabor				
	acidez				
	amargo				
	salado				
	alcohol				
	astringente (tánico, seco)				
	viscoso (graso)				
	complejo				
	equilibrado				
	persistencia				
	calidad global				
¿qué ensayo es?					
preferencia					

III-4 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software Statistix versión 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, EUA) y Statgraphics Centurion XVI (STSC Inc., Rockville, MD, USA).

Los análisis estadísticos utilizados durante la tesis fueron:

- (i) Análisis de la varianza (ANOVA) de un factor y se analizaron las diferencias significativas según el criterio de Tuckey ($p < 0.05$).
- (ii) Análisis de la varianza de dos factores y se analizaron las diferencias significativas según el criterio de Tuckey ($p < 0.05$) y se utilizó la prueba LSD de Fischer ($p < 0,05$) como prueba de comparación cuando las muestras fueron significativamente diferentes después de ANOVA.
- (iii) Análisis de componente principales (PCA) con el fin de visualizar la estructura del conjunto de datos experimentales se aplicó un análisis multivariante.
- (iv) Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) utilizando utilizando PLS toolbox (v. 5.5.1, Eigenvector, USA) under MATLAB 2008R (v. 7.6.0, Mathworks, USA) workspace.

CAPITULO IV
RESULTADOS

En este capítulo se exponen los resultados obtenidos durante la presente Tesis Doctoral de acuerdo a los objetivos propuestos. Parte de estos resultados se han recogido en 8 publicaciones en revistas incluidas en el Science Citation Index (SCI).

IV-1: Caracterización de extractos procedentes de subproductos de la industria enológica y oleica

En España, la industria de productos de alimentación y bebidas es la primera rama industrial, según la última Encuesta Industrial de Empresas del Instituto Nacional de Estadística (INE), a 31 de diciembre de 2013, representando el 20.6% de las ventas netas de producto. Del total de ventas netas de producto de la Industria Alimentaria durante 2013, 9.4% fueron de grasas y aceites y 6.6% correspondieron al sector del Vino (MAPAMA, 2015d). Estos dos sectores producen toneladas de residuos que presentan un gran problema ambiental y económico (Devesa-Rey et al., 2011; Roig, Cayuela, & Sánchez-Monedero, 2006).

Los principales subproductos de la industria del aceite de oliva son el orujo y el orujillo. Éstos se utilizan como combustibles, y en los últimos años, dado su alto contenido en microelementos y materia orgánica, también como fertilizante tras su compostaje. Se estima que se producen unas 1929780 toneladas/año de estos subproductos (MAGRAMA, 2014). Los residuos oleicos, al igual que la aceituna y el aceite de oliva, son ricos en compuestos polifenólicos, entre ellos el hidroxitirosol (HT) (Amro, Aburjai, & Al-Khalil, 2002; De Marco, Savarese, Paduano, & Sacchi, 2007; El-Abbassi, Kiai, & Hafidi, 2012; Fernández-Bolaños et al., 2002; S. He & Yan, 2013; Lesage-Meessen et al., 2001; Mateos et al., 2001; Obied, Bedgood, Prenzler, & Robards, 2007; Visioli, Vinceri, & Galli, 1995). El HT ha generado un gran interés dado que se le han atribuido numerosas propiedades beneficiosas para la salud, tales como propiedades anticancerígenas, antimicrobianas, antidiabéticas y neuroprotectoras (Araújo, Pimentel, Alves, & Oliveira, 2015; Fernández-Mar et al., 2012; Obied et al., 2005, 2007; Vilaplana Pérez et al., 2014).

La alta capacidad antioxidante es la principal responsable de la gran diversidad de propiedades saludables del HT, como ha recogido la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en su declaración relacionada con los polifenoles de aceituna y la protección de las partículas de LDL frente al estrés oxidativo (EFSA, 2011); y en el reglamento (UE) nº 432/2012 de la comisión de 16 de mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos, donde se recoge como declaración de los polifenoles del aceite de oliva (Diario Oficial de la Unión Europea, 2012a). Se

ha descrito la incorporación del HT en zumo de tomate (Larrosa, Espín, & Tomás-Barberán, 2003) y productos de pescado (Pazos, Alonso, Sánchez, & Medina, 2008) como antioxidante natural añadido.

Diferentes estudios han mostrado que los residuos oleícolas tienen una toxicidad de amplio espectro (Niaounakis & Halvadakis, 2004) contra bacterias (Capasso et al., 1995; Ramos-Cormenzana, Juárez-Jiménez, & Garcia-Pareja, 1996), hongos (Fodale, Mule, & Briccoli Bati, 1999), algas (DellaGreca et al., 2001), plantas (Capasso, Cristinzio, Evidente, & Scognamiglio, 1992; Casa et al., 2003), insectos (Capasso et al., 1994), animales (Niaounakis & Halvadakis, 2004) y células humanas (Capasso et al., 1995). Diferentes estudios proponen así a estos subproductos como una fuente potencial para la recuperación de antioxidantes (Aldini et al., 2006; Araújo et al., 2015; Visioli et al., 1995).

Por su otra parte, la industria enológica genera una gran cantidad de residuos sólidos, entre ellos los orujos, sarmientos de vid y los raspones de los racimos de uva (Rayne et al., 2008; Teixeira et al., 2014). En cuanto a la composición fenólica los raspones, presentan un alto contenido en flavan-3-oles, flavonoles, ácidos hidroxicinámicos, y estilbenos (Alonso, Domínguez, Guillén, & Barroso, 2002; Souquet, Labarbe, Le Guernevé, Cheynier, & Moutounet, 2000; Teixeira et al., 2014). Los subproductos de la industria enológica han mostrado múltiples actividades biológicas, tales como actividades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, anticancerosas y de protección cardiovascular (Teixeira et al., 2014). Esto ha llevado a que, en los últimos años, haya aumentado el interés por estos subproductos, y su reutilización hacia la producción de polifenoles y/o sus extractos enriquecidos para su uso como complementos alimenticios y/o ingredientes activos por las industrias cosmética y farmacéutica. En este contexto, varios extractos de subproductos de la vinificación, como algunos obtenidos a partir de pepitas de uva y el orujo, han sido ampliamente investigados como fuentes de antioxidantes naturales (Makris, Boskou, & Andrikopoulos, 2007).

Menor atención se ha dirigido hacia los raspones de la uva, que sirven como fuente de catequinas y proantocianidinas (oligoméricas y poliméricas). Los raspones se retiran antes del proceso de vinificación, ya que su presencia durante la fermentación aumenta la astringencia, pudiendo afectar

negativamente las características organolépticas del vino. Existen algunos estudios que destacan el uso potencial de los raspones de la uva como una fuente rica de antioxidantes naturales (Karvela et al., 2009; Makris et al., 2007). Los raspones de la uva también han sido propuestos como una fuente rica de fibra dietética de buena calidad (González-Centeno et al., 2010). Estos hallazgos, combinados con una mayor presión para el reciclaje y la reutilización de residuos alimentarios, han llevado a las investigaciones a proponer los extractos de subproductos de uva como conservantes. Por ejemplo, se ha demostrado que los extractos fenólicos de uva y derivados de la uva son útiles conservantes en la carne de pollo, el jurel y los zumos de frutas (Manuel Pazos, Alonso, Fernández-Bolaños, Torres, & Medina, 2006; Selani et al., 2011).

En la actualidad, uno de los retos de la enología es la disminución del uso de SO_2 . A pesar de las propiedades que posee, principalmente antioxidantes y antimicrobianas, se ha demostrado que este compuesto está asociado con diversos riesgos para la salud (Guerrero & Cantos-Villar, 2015). Este hecho ha dirigido las investigaciones hacia la búsqueda de otros conservantes que puedan sustituir y/o reducir el SO_2 en los vinos. Algunos de los productos que han sido probados como alternativa al SO_2 son: complejo de plata coloidal, carbomato de dimetilo, ácido ascórbico, ácido hipofosforoso, ácido tioldipropiónico, Trolox C, cloruro de estañoso y Sporix, e incluso productos naturales (lisozima y bacteriocinas) (Santos et al., 2012). La aplicación de antioxidantes naturales como conservantes en la industria alimentaria es una práctica emergente que está cobrando importancia. Ya se han propuesto extractos fenólicos como conservantes en la industria alimentaria. Entre ellos, los taninos enológicos (Sonni et al., 2009), extractos vegetales (Salaha et al., 2008), extractos de piel de almendras o de eucalipto (González-Rompinelli et al., 2013) han resultado eficientes en la reducción de SO_2 en los vinos.

Es por ello que, en nuestra búsqueda de una alternativa al SO_2 en la elaboración de vinos blancos y tintos, se requirió dos particularidades, por un lado, que existiera de forma natural en el vino, y por otro, que fueran antioxidantes procedentes de subproductos de la industria agroalimentaria.

Estos antecedentes expuestos nos llevaron a la elección de extractos ricos en polifenoles procedentes de subproductos de la industria agroalimentaria:

- (i) Un extracto con alto contenido en hidroxitirosol que se obtuvo a partir de residuos del molino de aceituna a través de un proceso patentado (HT80[®], HTE, patente WO2007093659A1) (García-Granados López de Hierro & Sánchez Parra, 2007) suministrado por Biomasslinic S.L. (Granada, España).
- (ii) Un extracto con alto contenido en compuestos polifenólicos (STE) obtenido a partir de raspones de uva (Piñeiro et al., 2013). Este extracto se obtuvo en nuestras instalaciones en el IFAPA Centro Rancho de la Merced (Jerez de la Frontera, España).

Los dos extractos se disolvieron en una matriz vínica sintética y se caracterizaron de la siguiente manera:

1. Perfil polifenólico
2. Capacidad antioxidante
3. Capacidad antimicrobiana
4. Perfil olfatométrico

Estos resultados se comparan con un control en el que se utilizó el conservante más extendido en la industria enológica, el SO₂, disuelto igualmente en matriz vínica sintética.

Los resultados obtenidos del estudio de los extractos propuestos como alternativa al SO₂ se detallan en la **publicación 1**, para el extracto procedente de subproductos de la industria oleica, y en la **publicación 2**, para el extracto procedente de subproductos de la industria enológica.

A continuación, se presentan los resultados de este estudio en forma de dos publicaciones: Publicación 1 y Publicación 2

PUBLICACIÓN 1. “Eficacia de un extracto rico en hidroxitirosol obtenido a partir de subproductos procedentes de la elaboración de aceite de oliva como sustituto del dióxido de azufre en vino modelo”

María José Ruiz-Moreno, Rafaela Raposo, José Manuel Moreno-Rojas, Pilar Zafrilla, José Manuel Cayuela, Juana Mulero, Belén Puertas, Raúl F. Guerrero, Zulema Piñeiro, Francisco Girón, Emma Cantos-Villar (2015). *Efficacy of olive oil mill extract in replacing sulfur dioxide in wine model*. LWT - Food Science and Technology, 61(1), 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.024>



Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt

Efficacy of olive oil mill extract in replacing sulfur dioxide in wine model



Maria J. Ruiz-Moreno ^a, Rafaela Raposo ^b, Jose M. Moreno-Rojas ^a, Pilar Zafrilla ^c,
Jose M. Cayuela ^c, Juana Mulero ^c, Belen Puertas ^b, Raul F. Guerrero ^b, Zulema Piñeiro ^b,
Francisco Giron ^c, Emma Cantos-Villar ^{b,*}

^a Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro Alameda del Obispo, Avd. Menéndez Pidal, 14004, Córdoba, Spain

^b Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro Rancho de la Merced, Ctra Trebujena, km 2.1, 11471, Jerez de la Frontera, Spain

^c Universidad Católica San Antonio (UCAM), Campus de Los Jerónimos, s/n Guadalupe, 30107, Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 May 2014

Received in revised form

6 November 2014

Accepted 9 November 2014

Available online 15 November 2014

Keywords:

Antioxidant

Antimicrobial

Hydroxytyrosol

Olfactometry

ABSTRACT

Olive oil industry produces high amounts of olive mill solid waste. These have been described as natural source of hydroxytyrosol, which shows high antioxidant and antimicrobial properties joint to health-promoting effects. In the present work, an olive mill solid waste extract dissolved in model wine was evaluated to determine its potential capacity to replace and/or reduce sulfur dioxide in winemaking. Olive oil mill extract is a potent antioxidant of biological origin. The extract resulted in 4 and 40 mmol/L Trolox/mg extract by DPPH and ORAC respectively. Its antimicrobial activity was approaching to that of SO₂ for *Hanseniaspora uvarum*, *Candida stellata*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus damnosus* and *Acetobacter aceti*, higher for *Oenococcus oeni* and lower for *Dekkera bruxellensis* and *Botryotinia fuckeliana*.

Additionally, GC-olfactometry analysis showed that the most important odorants from the extract are naturally present in wines. However, some odorant zones might be significantly increased in wine after extract addition.

It can be concluded that olive mill solid waste extracts is a source of bioactive compounds of low cost, with high antioxidant activity and good antimicrobial properties.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The olive oil industry is important in the Mediterranean region. Spain is the country with the largest area in the world dedicated to olive oil trees and the olive oil producing country (>40% world production) (FAO, 2012). Two process are able for producing olive oil: three-phase mill which generates two waste (orujo and aqueous liquor), and two phase centrifugation technology which produces a semisolid waste called olive cake or alperujo. In Spain 90% of olive oil is produced by two-phase system, which means between 4 and 6.5 million tons of alperujo by year. Olive oil byproducts are frequently detoxified prior to disposal for cattle feeding or composting. The occurrence of phenolic compounds in these residues obstructs its biological treatment. Greater environmental and economic benefits could result from the conversion of

this byproduct to a product of higher added-value. Since olive mill solid wastes are a source of bioactive compounds, they may be used in nutraceutical, cosmetic, food and/or pharmaceutical industry (Fernández-Bolaños et al., 2004). However, it has not been effectively exploited yet.

Among the phenolic compounds present in olive, olive oil and olive byproducts, hydroxytyrosol (HT) is the major by quantity. Health-benefits such as anticancer, antimicrobial, antidiabetic and neuroprotective properties have been ascribed to HT (Fernández-Mar, Mateos, García-Parrilla, Puertas, & Cantos-Villar, 2012). The European Food Safety Authority (EFSA) has recently accepted the scientific evidence of health claims in relation to HT and protection from oxidative damage. In order to bear the claim, 5 mg of HT and its derivatives (e.g. oleuropein complex and tyrosol) in olive oil should be consumed daily (EFSA, 2011).

The application of natural antioxidants as preservatives in food industry is an emerging practice that is gaining importance lately. Phenolic extracts have already been proposed as preservatives in food industry. Hydroxytyrosol showed high efficiency in preventing

* Corresponding author. Tel.: +34 671560353; fax: +34 956434610.
E-mail address: emma.cantos@juntadeandalucia.es (E. Cantos-Villar).

foodstuff rich in lipids from lipid oxidation (Pazos, Alonso, Sánchez, & Medina, 2008).

The most widely preservative used in food industry is sulphur dioxide (SO₂). This fact is extensible to wine industry. In wine, SO₂ exhibits an important antioxidant function that helps to reduce the effects of dissolved oxygen as well as to inhibit polyphenoloxidase, tyrosinase and peroxidase enzymes, which are endogenous in grape and also come from fungal infections. In addition, SO₂ inhibits the development of microorganisms, such as yeasts, lactic acid bacteria and, to a lesser extent, acetic acid bacteria (Santos, Nunes, Saraiva, & Coimbra, 2012). However, several human health risks, including dermatitis, urticarial, angioedema, diarrhea, abdominal pain, bronchoconstriction and anaphylaxis, have been associated to SO₂ (Vally, Misso, & Madan, 2009). Consequently, the International Organization of Vine and Wine (OIV) has established limits for SO₂ content in wines (EC, 606/2009). Thus, there is great interest in research of other preservatives that can replace and/or reduce SO₂ content in wines.

Some chemicals have been tested as an alternative to SO₂: colloidal silver complex, dimethyl carbamate, ascorbic acid, hypophosphorous acid, thiodipropionic acid, Trolox C, stannous chloride, and Sporix, and even natural products (lysozyme and bacteriocins) (Santos et al., 2012). Among them, the use of phenolics has been proposed as a promising alternative. Enological tannins (Sonni, Cejudo Bastante, Chinnici, Natali, & Riponi, 2009), vegetal extract (Salaha, Kallithraka, Marmaras, Koussissi, & Tzourou, 2008), almond skin and eucalyptus leave extracts (González-Rompinelli et al., 2013) have resulted efficient in reducing SO₂ in wines.

This piece of work joins the two current food industry research interests mentioned above, increasing added-value in olive mill waste and developing other preservatives that can replace and/or reduce SO₂ content in wine. Concretely, it aims at the evaluation of the antioxidant activity, antimicrobial activity and olfactometry profile of the olive mill waste extract as a potential alternative to SO₂ in winemaking. It is a preliminary study to test this extract in winemaking.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Analytical grade methanol, acetic acid, diethyl ether, ethyl acetate and ethanol were supplied by Panreac (Barcelona, Spain). Chemical standards: 1-octen-3-one, Z-3-hexenol, Z-2-nonenal, terpinen-4-ol, 2-hydroxy-3-methyl-2-cyclopenten-1-one, guaiaicol, 2-phenylethanol, eugenol, maltol, 2-acetylpyrrole, 4-ethylguaiacol, pantolactone, furaneol, *E,E*-farnesol, *E*-isoeugenol, γ -decalactone 4-ethylphenol, sotolon, γ -dodecalactone δ -dodecalactone, phenylacetic acid, vanillin, n-alkanes (C7-C40), Trolox (6-hidroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), 2,20-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), fluorescein (FL), potassium hydroxide solution and dichloromethane (LiChrosolv quality) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Anhydrous sodium sulfate, tartaric acid and absolute ethanol (999 mL/L HPLC quality) were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Solfosol (water solution of SO₂) was supplied by Sepsa-Enartis (Penedès, Spain). Ultrapure water from a Milli-Q system (Millipore Corp., Bedford, MA) was used throughout this research.

2.2. Olive mill solid waste extract (HTE)

The olive hydroxytyrosol-enriched extract was obtained from olive mill waste through a patented process (HT80[®], patent

WO2007093659A1). Physico-chemical properties of the HT80[®] are shown in Table 1 (data supplied by Biomasslinic). HT80[®] was adjusted at 50 mg/L and 80 mg/L of hydroxytyrosol in model wine (120 mL/L ethanol, 4 g/L tartaric acid and adjusted to pH 3.4 with NaOH). These solutions are called hydroxytyrosol enriched extract (HTE) through the manuscript. The solutions without HT80[®] and with SO₂ at the same concentrations (50 mg/L and 80 mg/L) are called SO₂. Solutions without antioxidant are called control solutions (CT).

These concentrations were chosen as recommended for SO₂ in winemaking at warm climate (50 and 80 mg/L for red and 80 white wine respectively) (Puertas, Jiménez, Cantos-Villar, & Piñeiro, 2013).

2.3. HPLC analyses of phenolic compounds presented in the extract

Chromatographic analysis was carried out in a Jasco high-performance liquid chromatographic system equipped with a diode array detector (model MD-2010), a fluorescence detector (model FP-2020), an HPLC pump module (model PU-2089), a column oven module (model CO-2060) and an auto-sampler module (AS-2050), and controlled by Chrompass version 1.8 software. The method followed has been recently described in detail by Piñeiro, Cantos-Villar, Palma, and Puertas (2011). The fluorescence conditions were as follow: for hydroxytyrosol excitation 279 nm, emission at 631 nm. For tyrosol excitation 278 nm and emission at 598 nm.

2.4. Antioxidant activity

2.4.1. DPPH assay

Samples were analysed according to the technique reported by Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995). A volume of 10 μ L of different HTE concentrations was added to 990 μ L of 0.094 mmol/L DPPH in MeOH. To determine the reaction kinetics, the assays were continuously monitored at 515 nm over a 1 h period at 25 °C. Each sample was analysed in triplicate. The antioxidant activities were expressed as μ mol/L Trolox equivalents/mg extract. Those data were also used for estimating scavenging effect (%) according He et al. (2012).

2.4.2. ORAC assay

The oxygen radical absorbance capacity was determined as previously described (Lucas-Abellán et al., 2008). Reaction mixtures were prepared in triplicate and at least three independent assays were performed for each sample. The antioxidant activities were expressed as μ mol/L Trolox equivalents/mg extract.

2.5. Antimicrobial assay

Pure cultures were obtained from the CECT (Spanish Collection of Type Cultures, Valencia, Spain). Yeasts: *Saccharomyces cerevisiae*

Table 1
Physicochemical properties of the olive mill solid waste (HT80[®]).

Description	Characteristic	Method
Physical state	Liquid syrup	
Color	Pale-brownish	
Odor	Processed olives	
Humidity (g/kg)	170.3	Gravimetry
Ash (g/kg)	3.4	Gravimetry
Viscosity (20 °C, mPa.s)	6190	Rheology
Density (20 °C, g/mL)	1.20	Gravimetry
Refraction index	1.340	Refractometry
Solubility (water, g/L)	73	
Solubility (ethanol, g/L)	700	

(CECT 1942), *Candida stellata* (CECT 11969), *Hanseniaspora uvarum* (CECT 1118), *Dekkera bruxellensis* (CECT 11045). Bacteria: *Lactobacillus plantarum* (CECT 5956), *Acetobacter aceti* (CECT-298T), *Pediococcus damnosus* (CECT 793), *Oenococcus oeni* (CECT 218). Fungus: *Botryotinia fuckeliana* (CECT 20518). Microorganisms were grown in optimal conditions. Subsequently, either HTE or SO₂ were added to determine its antimicrobial properties. Yeasts were cultivated on 21 g/L malt broth (Sigma-Aldrich, Germany) with a final pH of 6.2. Bacteria were cultivated on 51 g/L MRS broth (Fluka, Spain) and fungus on 39 g/L potato dextrose broth (Fluka, Spain) with a final pH of 6.2 and 5.6 respectively.

For the determination of microbial growth kinetics, indirect impedance measurements were carried out by the BacTrac measuring system ("Bacteria Tracer", SY-LAB, Vienna, Austria). The impedance changes were followed by an indirect measure on KOH solution (2 ml). These changes derived from microbial growth on 3 mL broth composed by nutrient, microbial inoculum and either, SO₂ or HTE. Analyses were carried out in triplicate and included the following samples: i) control ii) HTE (80 mg/L of HT), and iii) SO₂ (80 mg/L) in model wine system.

2.6. Analysis of volatile compounds

2.6.1. Extraction of volatile compounds

HTE (100 mL) was extracted three times with dichloromethane (10, 5, and 5 mL, respectively) in a 200 mL flask with magnetic stirring for 10, 5 and 5 min, respectively. The combined organic phases were then dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated to a final volume of 500 μ L under a nitrogen stream (approximately 100 mL/min) in a Turbo-Vap LV evaporator (Biotech, Uppsala, Sweden) (Sarrazin, Dubourdieu, & Darriet, 2007).

2.6.2. GC-olfactometry

Analyses were carried out using a Varian 3800 GC (Middelburg, The Netherlands) equipped with an FID and an OP275 olfactometer (GL Science Inc., Tokyo, Japan). 1 μ L of extract was injected in splitless mode, 1 min being the splitless time. The columns used were DB-WAX and DB-5 from J&W Scientific, Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, California, USA), 60 m \times 0.25 mm with 0.25 μ m film thickness. The method followed has been described by Sarrazin et al., 2007. The sensory panel was composed of three trained tasters, who sniffed each sample twice. The panelists were asked to rate the intensity of the odor using a four point category scale (0 = non detected, 1 = weak/hardly recognizable note, 2 = clear but not intense note, 3 = intense note). Results were expressed as "modified frequency" MF (%).

2.6.3. GC-MS

1 μ L of sample was injected in a Trace GC Ultra gas chromatograph (Thermo Fisher Scientific S.p.A., Rodano, Milan, Italy) under the same conditions described above. The detector was a mass spectrometer (ISQ single quadrupole MS, Thermo Fisher Scientific, Austin, Texas, USA) operating in EI mode (70 eV), connected to the GC with a heated transfer line at 230 °C. Mass spectra were taken over the 40–350 *m/z* range. Thermo Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific, San Jose, California, USA) was used for data acquisition.

2.6.4. Identification of aroma compounds

The odorant compounds were identified on the basis of linear retention index and a comparison of MS fragmentation patterns with those of reference compounds or with mass spectra in the NIST 05 mass Spectral library (version 05).

2.7. Statistics

The analysis of the variance (ANOVA) and Least Significant Difference test (Tukey) were carried out with a significance level of $p \leq 0.05$. Statistix version 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA) was used.

3. Results and discussions

The potential capacity of the hydroxytyrosol extract (HTE) as an alternative to SO₂ in model wine system was evaluated for the first time. Its antioxidant and antimicrobial activities were determined. Additionally, the olfactometry profile of the extract was studied to foresee prospective sensory impact of its use in winemaking.

3.1. Physicochemical and phenolic characterization of the extract

HPLC-DAD-Fluorescence analysis was developed to characterize phenolic composition of HTE. The extract mainly contained hydroxytyrosol (HT, 58% total area) and of tyrosol (TYR, 35% total area) (Fig. 1). These compounds are naturally found in wines in variable amount. In white wines, values for HT ranged between 1.5 and 2.69 mg/L and for TYR between 1.75 and 45 mg/L. In red wines, values ranged from 1.98 to 3.89 mg/L for HT and from 4.25 to 31.62 mg/L for TYR (Fernández-Mar et al., 2012). Thus, the extract addition into the wine may not imply the qualitative modification of wine natural composition.

3.2. Antioxidant activity of HTE

Antioxidant activity (AA) data from HTE was determined. HTE extract at 50 mg/L of concentration reached 3.33 and 38.30 μ mol/L Trolox/mg extract by DPPH and ORAC respectively. Higher values were found for 80 g/L HTE concentration: 4.66 and 46.80 μ mol/L Trolox/mg extract by DPPH and ORAC respectively. AA of phenolic compounds has been widely described, including TYR and HT (Panzella et al., 2012; Villaño, Fernández-Pachón, Troncoso, & García-Parrilla, 2005). However, regarding olive mill solid waste, few data have been found in the literature. AA of alperujo polymeric phenolic fraction has been studied (Rubio-Senent, Rodríguez-Gutiérrez, Lama-Muñoz, & Fernández-Bolaños, 2013). Reducing power resulted in average of 2 μ mol Trolox/mL depending on the fraction, which was within the range of our data. Some data of AA from alperujo extract (with accelerated solvent extractor) have been described (Suárez, Romero, Ramo, Macià, & Motilva, 2009). DPPH data had been expressed as 1/EC₅₀, and thus they were not comparable with ours. ORAC data had ranged between 3.4 and 17.9 μ mol Trolox/mg, which were in agreement with our data.

Moreover, the scavenging effect (%) was calculated. It resulted 17% and 40% for HTE at 50 and 80 mg/L respectively. These data were in concordance with the 52% described for hydroxytyrosol by other authors (Panzella et al., 2012). However, AA was lower when compared with olive mill wastewater (90–100%). These results can be justified because the biophenols concentration in the wastewater is higher than in the pomace.

AA data of SO₂ are not available. When SO₂ solution was placed in methanol media for DPPH determination, an artifact was observed in solution. It may be the reason why these data were not found in the literature. However, some data have been found for ascorbic acid, a potent antioxidant used as preservative in food industry. AA for ascorbic acid resulted 2.84 μ mol TE/mg and 3.97 μ mol TE/mg by DPPH and ORAC respectively (Tabart, Kevers, Pincemail, Defraigne, & Dommes, 2009), which were significantly lower values in comparison with our data. Thus, HTE can be proposed as an energetic antioxidant of biological origin.

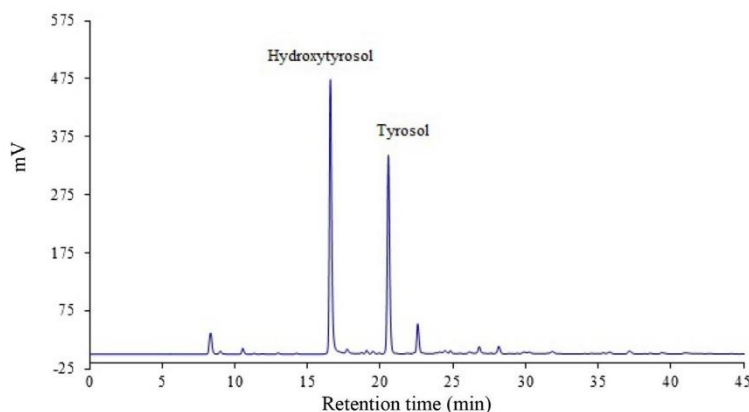


Fig. 1. Olive mill solid waste extract (HTE) fluorescence chromatogram. The fluorescence conditions were as follow: excitation 279 nm, emission at 631 nm until changing from minute 17 to excitation 278 nm and emission at 598 nm.

3.3. Antimicrobial activity of HTE

Microorganisms play an imperative role in winemaking by contributing to the quality and desirable properties of the wine. The effectiveness of HTE on microbial spoilage is a key factor for the feasibility of its use as a preservative in wine industry. Microbiological analyses were performed on microorganisms that naturally occur in wine during winemaking and also on microorganisms that produce alterations in wine (Bartowsky, 2009; Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003). Two parameters are obtained from BacTrac: lag phase (λ , hours) and maximum specific growth rate (μ_{max} , hours⁻¹). The longer λ and lower μ_{max} , the more inhibition is achieved. *S. cerevisiae*, the most widely used yeast in winemaking, delayed its growth with SO₂ but not with HTE (λ and μ_{max} , Table 2). In standard winemaking (without co-inoculation), growth delay of *S. cerevisiae* is not desirable since it might allow the growth of other microorganisms, and thus HTE may be considered more appropriate for the growth of *S. cerevisiae*. Strong inhibition of *S. cerevisiae* by alperujo extract has been described when the phenolic concentration in the extract was higher than that found in our extract (400 mg GAE/L) (Serra et al., 2008). *H. uvarum*, an early fermentation yeast which usually increases ethyl acetate in wines, was totally inhibited by SO₂, whereas HTE significantly delayed its growth in comparison with the control one (λ and μ_{max} , Table 2). *D. bruxellensis*, is responsible for serious economic losses in the wine industry due to its ability to spoil wines by the production of ethyl phenols. Lag phase (λ) was significantly affected only by SO₂ (λ , Table 2). *C. stellata* is frequently associated with overripe and botrytized grape. There was no difference when *C. stellata* was grown in the presence of either SO₂ or HTE (λ and μ_{max} , Table 2). *O. oeni* and *L. plantarum*, lactic acid bacteria, develop malolactic fermentation in wine. HTE affected in higher extension to *O. oeni* than SO₂ (λ and μ_{max} , Table 2). *L. plantarum* was affected by neither, SO₂ or HTE when compared to the control one. *P. damnosus*, spoilage acid lactic bacteria, synthesizes glucan which leads to an unacceptable viscosity of wine. *P. damnosus* was totally inhibited by SO₂ and highly inhibited by HTE (λ and μ_{max} , Table 2). Conversely, hydroxytyrosol and tyrosol have been assessed against lactic acid bacteria and did not show significant activity (Medina, Brenes, Romero, García, & de Castro, 2007). *A. aceti* causes the conversion of the ethanol in acetic acid, increasing volatile acidity in wines. It was not significantly affected by SO₂ or HTE (Table 2). In fact, gram negative bacteria have been described to be more resistant to

hydroxytyrosol than gram positive bacteria (Serra et al., 2008). The inhibition effects on bacterial growth of olive oil byproduct extracts have been described. However, these tested microorganisms were microorganisms related to human pathogens (Serra et al., 2008; Soni, Burdock, Christian, Bitler, & Cera, 2006) and plant damaging disease (Medina et al., 2011). *B. fuckeliana*, also known as its anamorphic form *Botrytis cinerea*, is the causal agent of gray mold disease. Its growth was just affected by SO₂ (Table 2). Low effectiveness has been described for olive oil byproducts against fungi. The only study found about the effectiveness of olive oil pomace extract against *B. cinerea* concluded that really high concentration of the extract is required for *B. cinerea* inhibition (Medina et al., 2011). In summary, at doses tested, HTE and SO₂ showed antimicrobial activity against *H. uvarum* and *P. damnosus*. Both resulted inefficient against *C. stellata*, *L. plantarum* and *A. aceti*. Moreover, SO₂ was also efficient against *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* and *B. fuckeliana*, meanwhile HTE was efficient against *O. oeni*. Thus, no general conclusion can be established regarding the antimicrobial activity of STE versus SO₂ since the effectiveness of HTE or SO₂ depends on the microorganisms. On the basis of these results, it is suggested further studies on different SO₂/HTE combinations to inhibit the maximum number of spoilage microorganism in winemaking.

3.4. Olfactometric profile of HTE

Overall, the panel detected more than 80 separate perceptions. In order to simplify, only odorants with MF(%) ≥ 40 were listed in Table 3. The higher the HTE dose used the more complex the odorant profile was. Whereas 48 odoriferous zones (OZs) were found for 80 g/L HTE, only 35 were found for 50 g/L HTE. In both doses, 15 odoriferous zones (1, 12, 13, 14, 15, 18, 22, 28, 31, 33, 34, 37, 41, 47, 48, Table 3) with MF % scores higher than 70 were detected (Table 3). Most of compounds responsible of those odorant zones (OZs) were tentatively identified. Specifically: 2-methyl-3-furanthiol + 1-octen-3-one (1, Table 3), cycloten (13, Table 3), guaiacol (14, Table 3), 2-phenylethanol (15, Table 3), maltol (18, Table 3), pantolactone + furaneol (22, Table 3), sotolon (31, Table 3), γ -undecalactone (33, Table 3), abhexon (34, Table 3), *E,E*-farnesol (37, Table 3), phenylacetic acid (47, Table 3) and vanillin (48, Table 3). The aforementioned compounds were associated with meaty/mushroom, caramel, phenolic, rose, caramel (twice), curry (twice), flowers, sweet and vanilla nuances. OZs 12, 28 and 41

Table 2Lag phase (λ) and maximum specific growth rate (μ_{\max}) of microorganism exposed to sulphur dioxide (SO₂) and olive mill solid waste extract (HTE) both at 80 mg/L.

Microorganism	λ (hours)			μ_{\max} (hours ⁻¹)		
	Control	SO ₂	HT	Control	SO ₂	HT
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4.50 ^b (0.01)	10.42 ^a (0.81)	4.72 ^b (0.09)	24.80 ^a (0.00)	13.54 ^b (4.70)	23.70 ^a (0.38)
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	3.73 ^b (0.01)	ND	13.32 ^a (0.05)	1.10 ^a (0.01)	ND	0.73 ^b (0.19)
<i>Dekkera bruxellensis</i>	25.13 ^b (0.01)	31.69 ^a (1.72)	25.49 ^b (1.76)	6.93 (0.00)	6.77 (0.31)	6.38 (0.72)
<i>Candida stellata</i>	2.62 (0.01)	2.82 (0.31)	2.98 (0.86)	18.34 (0.02)	18.55 (0.91)	18.37 (1.16)
<i>Oenococcus oeni</i>	17.25 ^c (0.78)	33.36 ^b (2.81)	49.28 ^a (2.06)	6.11 (0.43)	7.39 (2.92)	4.23 (0.50)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	5.44 ^{ab} (1.46)	7.38 ^a (0.77)	3.52 ^b (0.57)	7.035 ^{ab} (1.75)	8.39 ^a (0.23)	5.63 ^b (0.89)
<i>Pediococcus damnosus</i>	11.90 ^b (0.05)	ND	52.19 ^a (2.96)	38.23 ^a (0.01)	ND	0.41 ^b (0.06)
<i>Acetobacter aceti</i>	8.97 (0.01)	6.30 (1.27)	5.78 (1.19)	3.55 (0.59)	3.71 (0.03)	2.95 (0.52)
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	40.19 ^b (0.08)	59.77 ^a (4.38)	36.01 ^b (3.10)	10.46 ^a (0.02)	8.51 ^b (0.69)	9.80 ^a (0.20)

ND: no growth detected. Values with different superscript in the same row denote significant differences according to the Tukey method $p \leq 0.05$ ($n = 3$).**Table 3**

Odoriferous zones (OZs) found by GC-O in olive mill solid waste extract (HTE).

OZs	LRI	Descriptors	Compounds	MF (percentage) scores		
				HTE (mg/L)		
				80 mg/L	50 mg/L	
N ^a	DB-WAX	DB-5				
1	1306	868 + 976	meaty, mushroom	2-methyl 3-furanthiol ^a + 1-octen-3-one ^a	75	71
2	1376	848	green, leafy	Z-3-hexenol ^b	58	48
3	–	942	meaty	unknown	67	53
4	1514	1149	dusty, green	Z-2-nonenal ^a	67	67
5	1544		balsamic, flowers, green	unknown	67	62
6	1570	1098	sulfureous, solvent	ethyl methylthio-propionate ^b	53	–
7	1619	1178	fresh, pine, plastic	terpinen-4-ol ^a	43	–
8	1642	1188	paper, green, grass	crypton (4-isopropyl-2-cyclohexen-1-one) ^b	67	48
9	1755	1143	oily, resine, green	methyl nicotinate ^b	48	–
10	1796		minty, fresh	unknown	51	–
11	1819		sweet, creamy, spicy	unknown	78	–
12	1138	1834	alpehín	unknown	82	71
13	1846	1025	caramel, licorice, nutty	2-ciclopenten-1-one 3-methyl-2-hydroxy (cycloten) ^b	88	82
14	1862	1093	phenolic	guaiacol ^b	94	94
15	1917	1116	rose	2-phenylethanol ^b	85	75
16	1947		leather, dirty	unknown	43	–
17	1958	1356	chemical, medicine	unknown	67	–
18	1977	1111	caramel	maltol ^b	97	94
19	1992	1065	nutty, dirty	2-acetyl pyrrolle ^b	78	62
20	2010	1379	metallic	trans-4,5-epoxy-E-2-decenal ^a	65	67
21	2033	1278	spicy, flowers	4-ethylguaiacol ^b + furaneol ^a	82	62
22	2036	1051 + 1073	caramel	pantolactone ^b + furaneol ^a	88	82
23	2068	1134	caramel	homofuraneol ^a	67	48
24	2082		flowers, vainilla	unknown	71	61
25	2136		nutty	unknown	71	57
26	2158	1471	sweet, lactone like, peach	γ -decalactone ^a	65	68
27	2167		oily	unknown	58	–
28	2171		flowers	unknown	82	85
29	2180	1166	leather	4-ethylphenol ^b	61	48
30	2197	1333	eucalyptus	unknown	51	43
31	2198	1097	curry	sotolon ^a	100	100
32	2227	1326	green, medicine	unknown	43	–
33	2260	1922	peach, creamy, lactone-like	γ -undecalactone ^a	82	75
34	2271	1193	curry	abhexon ^a	85	75
35	2295		curry, nutty	unknown	43	–
36	2325		flowers, toasty	unknown	48	48
37	2350	1713	flowers	E, E-farnesol ^b	88	82
38	2372	1452	flowers	E-isoeugenol ^b	48	48
39	2395	1685	sweet, flower, wax	γ -dodecalactone ^a	53	48
40	2418	1733	sweet, fruity, nutty	δ -dodecalactone ^b	57	–
41	2446		barbecue	unknown	82	71
42	2452		black olive	unknown	78	62
43	2482		flowers, burnt	unknown	48	48
44	2503		flowers	unknown	43	–
45	2526		smoky	unknown	48	48
46	2541		flowers, vanille	unknown	53	–
47	2553	1242	sweet, cocoa, vinegar	phenylacetic acid ^b	82	75
48	2564	1407	vainilla	vanillin ^b	100	91

(n = 6). LRI. Linear retention index calculated on both DB-WAX and DB-5capillaries; MF (percentage), modified frequency.

^a Tentatively identified by LRI matching on two capillary columns (DB-WAX and DB5).^b Mass spectrum in agreement with spectra found in the NIST mass spectral library with the same retention times as those of pure substances or with mass spectra in the NIST library and previously reported linear retention indices on two columns (DB-WAX and DB-5). –: MF < 4.

(Table 3), with “alpechin”, flowers and barbecue descriptors, respectively, could not be identified. OZ 1 (Table 3) was tentatively identified as 2-methyl-3-furanthiol + 1-octen-3-one by their LRI on both columns. 2-Methyl-3-furanthiol has been identified as odorant in red wines from Bordeaux and Rioja Regions (Bouchilloux, Darriet, Henry, Lavigne-Cruège, & Dubourdiu, 1998). 1-Octen-3-one has been previously reported as natural contaminants, contributing to fresh mushroom type aroma of certain wines (Pons et al., 2011). OZs 13 and 18 (Table 3) confirmed by GC–MS as cycloten and maltol seem to contribute to the “toasty caramel” aroma of oak in toasted wood used in aging. Sugar thermal degradation in the presence of nitrogenous substances via Maillard reactions has been proposed as biosynthetic pathway (Culleré et al., 2013). OZs 15 and 47 (Table 3) identified as 2-phenylethanol and phenylacetic acid are well-known compounds from the shikimic acid-derivates group. Phenylacetic acid has been linked to wines made from sour rotten grapes (Barata et al., 2011). 2-Phenylethanol has been related with bouquet of Brazilian Cabernet Sauvignon wines (Falcão, de Revel, Rosier, & Bordignon-Luiz, 2008). OZ 22 (Table 3) was tentatively identified by GC–O as pantolactone + furaneol. The contribution of furaneol to the aroma profile of wines from Merlot, Cabernet Sauvignon, Semillon and Sauvignon Blanc varieties has been referred by authors (Sarrazin et al., 2007). This compound seems to be positively linked to the noble-rotten grapes and it has also been reported as a key aroma compound of Provence rosé wines (Masson & Schneider, 2009). Sotolon (31, Table 3) has been reported to be involved in the typical flavors of aged wines (Sarrazin et al., 2007). However, at high levels, this compound seems to be responsible for premature-aging flavor in young dry white wines (Pons, Lavigne, Landais, Darriet, & Dubourdiu, 2010). Abhexon (34, Table 3) (an ethyl analogue of sotolon) has recently been identified in aged Sauternes and Sherry wines (Collin, Nizet, Claeys Bouuaert, & Despatures, 2012). γ -Undecalactone (33, Table 3) has been referred as odorant in the Rhine Riesling wines from Croatia (Komes, Ulrich, & Lovric, 2006). OZ 37 (Table 3) was identified by GC–MS as *E*, *E*-Farnesol. This terpene has been mentioned as an odorant in Spanish aged red wines (Culleré, Escudero, Cacho, & Ferreira, 2004). Finally, OZs 48 and 14 (Table 3) were identified as vanillin and guaiacol respectively by GC–MS. They are mainly well-known oak-wood volatiles related to thermo-degradation of lignin and contributors to the organoleptic character of wood-aged wines. It has been demonstrated that vanillin also increases during malolactic fermentation in barrel (de Revel, Bloem, Augustin, Lonvaud-Funel, & Bertrand, 2005). Moreover, vanillin has been detected in Aragonez and Trincadeira clonal wines by GC–O. Guaiacol has been considered responsible of toasted character of premium red wines (Escudero, Campo, Fariña, Cacho, & Ferreira, 2007).

HTE odorant composition is similar to wine odorant composition, so a quantitative but not qualitative effect is expected after the addition of HTE to wine. Assays on wine should be performed to check first if the modification of the volatile composition of wine occurs, and secondly whether this is sensory perceptible. Odorant zone described on this paper will be useful in the study of the modification of the volatile composition of wine in further experiments.

4. Conclusions

The hydroxytyrosol-enriched extract obtained from olive mill solid waste is proposed as a suitable source of both antioxidants and antimicrobials, however HTE itself it is not sufficient effective to replace SO₂ in wines. Although good results have been obtained with HTE in model wine, further experiments on wines should be performed to confirm its usefulness. Moreover, the combination

SO₂ + HTE in real wines is suggested to: i) to enlarge the antimicrobial spectra and ii) to reduce the possible odor extract contribution.

The production of biologically active extracts from olive mill byproducts constitutes a viable alternative for adding value to those problematic wastes. The well-known health properties and bioavailability of hydroxytyrosol, which heart-health claims have been approved by EFSA, would increase the added-value of these wines with low SO₂ content.

Acknowledgments

Authors thank the INIA and FEDER for their financial support (Project RTA2011-00002). We are grateful to Biomasslinic SA for kindly supplied the olive mill waste extract. Ruiz-Moreno and Guerrero thanks to the European Social Fund (ESF) 2007–2013 “Andalucía se mueve con Europa” for the financial support of their contracts.

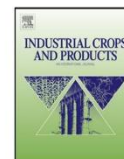
References

- Barata, A., Campo, E., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., Cacho, J., & Ferreira, V. (2011). Analytical and sensorial characterization of the aroma of wines produced with sour rotten grapes using GC–O and GC–MS: identification of key aroma compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2543–2553.
- Bartovsky, E. J. (2009). Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 149–156.
- Bouchilloux, P., Darriet, P., Henry, R., Lavigne-Cruège, V., & Dubourdiu, D. (1998). Identification of volatile and powerful odorous thiols in Bordeaux red wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3095–3099.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25–30.
- Collin, S., Nizet, S., Claeys Bouuaert, T., & Despatures, P.-M. (2012). Main odorants in jura flor-sherry wines. Relative contributions of sotolon, abhexon, and theaspirane-derived compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(1), 380–387.
- Culleré, L., Escudero, A., Cacho, J., & Ferreira, V. (2004). Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1653–1660.
- Culleré, L., Fernández de Simón, B., Cadahía, E., Ferreira, V., Hernández-Orte, P., & Cacho, J. (2013). Characterization by gas chromatography–olfactometry of the most odor-active compounds in extracts prepared from acacia, chestnut, cherry, ash and oak woods. *LWT – Food Science and Technology*, 53(1), 240–248.
- Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J., & Ferreira, V. (2007). Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4501–4510.
- European Commission. (2009). European Commission(EC) N° 606/2009 of 10 July 2009 laying down certain detailed rules for implementing Council Regulation (EC) No 479/2008 as regards the categories of grapevine products, oenological practices and the applicable restrictions. *Official Journal of the European Union*, L 193/59.
- European Food Safety Authority. (2011). *EFSA Journal*, 9(4), 2033 [25 pp]. Retrieved from <http://www.efsa.europa.eu/en/efasajournal/pub/2033.htm> Accessed 15.10.14.
- Falcão, I. D., de Revel, G., Rosier, J. P., & Bordignon-Luiz, M. T. (2008). Aroma impact components of Brazilian Cabernet Sauvignon wines using detection frequency analysis (GC–olfactometry). *Food Chemistry*, 107, 497–505.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. (2012). Retrieved from <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/QJ/QD/5>. Accessed 15.10.14.
- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Gómez, E., Guillén, R., Jiménez, A., Heredia, A., et al. (2004). Total recovery of the waste of two-phase olive oil processing: isolation of added-value compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5849–5855.
- Fernández-Mar, M. I., Mateos, R., García-Parrilla, M. C., Puertas, B., & Cantos-Villar, E. (2012). Bioactive compounds in wine: resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: a review. *Food Chemistry*, 130, 797–813.
- González-Rompinelli, E. M., Rodríguez-Bencomo, J. J., García-Ruiz, A., Sánchez-Patán, F., Martín-Álvarez, P. J., Bartolomé, B., et al. (2013). A winery-scale trial of the use of antimicrobial plant phenolic extracts as preservatives during wine ageing in barrels. *Food Control*, 33, 440–447.
- Komes, D., Ulrich, D., & Lovric, I. (2006). Characterization of odor-active compounds in Croatian Rhine Riesling wine, subregion Zagorje. *European Food Research and Technology*, 222(1–2), 1–7.
- Loureiro, V., & Malfeito-Ferreira, M. (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 23–50.

- Lucas-Abellán, C., Mercader-Ros, M., Zafrilla, M., Fortea, M., Gabaldón, J., & Núñez-Delgado, E. (2008). ORAC-fluorescein assay to determine the oxygen radical absorbance capacity of resveratrol complexed in cyclodextrins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2254–2259.
- Masson, G., & Schneider, R. (2009). Key compounds of provence rosé wine flavor. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60, 116–122.
- Medina, E., Brenes, M., Romero, C., García, A., & de Castro, A. (2007). Main antimicrobial compounds in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9817–9823.
- Medina, E., Romero, C., de los Santos, B., de Castro, A., García, A., Romero, F., et al. (2011). Antimicrobial activity of olive solutions from stored alperujo against plant pathogenic microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 6927–6932.
- Panzella, L., Verotta, L., Goya, L., Ramos, S., Martín, M. A., Bravo, L., et al. (2012). Synthesis and bioactivity profile of 5-s-lipoylhydroxytyrosol-based multi-defense antioxidants with a sizeable (poly)sulfide chain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 1710–1717.
- Pazos, M., Alonso, A., Sánchez, I., & Medina, I. (2008). Hydroxytyrosol prevents oxidative deterioration in foodstuffs rich in fish lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3334–3340.
- Piñero, Z., Cantos-Villar, E., Palma, M., & Puertas, B. (2011). Direct liquid chromatography method for the simultaneous quantification of hydroxytyrosol and tyrosol in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 11683–11689.
- Pons, M., Dauphin, B., La Guerche, S., Pons, A., Lavigne-Cruege, V., Shinkaruk, S., et al. (2011). Identification of impact odorants contributing to fresh mushroom off-flavor in wines: incidence of their reactivity with nitrogen compounds on the decrease of the olfactory defect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3264–3272.
- Pons, A., Lavigne, V., Landais, Y., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (2010). Identification of a sotolon pathway in dry white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 7273–7279.
- Puertas, B., Jiménez, M. J., Cantos-Villar, E., & Piñero, Z. (2013). Effect of the dry ice maceration and oak cask fermentation on colour parameters and sensorial evaluation of tempranillo wines. *International Journal of Food Science & Technology*, 48, 835–842.
- de Revel, G., Bloem, A., Augustin, M., Lonvaud-Funel, A., & Bertrand, A. (2005). Interaction of *Enococcus oeni* and oak wood compounds. *Food Microbiology*, 22, 569–575.
- Rubio-Senent, F., Rodríguez-Gutiérrez, G., Lama-Muñoz, A., & Fernández-Bolaños, J. (2013). Phenolic extract obtained from steam-treated olive oil waste: characterization and antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 54, 114–124.
- Salaha, M.-I., Kallithraka, S., Marmaras, I., Koussissi, E., & Tzourou, I. (2008). A natural alternative to sulphur dioxide for red wine production: influence on colour, antioxidant activity and anthocyanin content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 660–666.
- Santos, M., Nunes, C., Saraiva, J., & Coimbra, M. (2012). Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *European Food Research and Technology*, 234, 1–12.
- Sarrazin, E., Dubourdieu, D., & Darriet, P. (2007). Characterization of key-aroma compounds of botrytized wines, influence of grape botrytization. *Food Chemistry*, 103, 536–545.
- Serra, A. T., Matias, A. A., Nunes, A. V. M., Leitão, M. C., Brito, D., Bronze, R., et al. (2008). In vitro evaluation of olive- and grape-based natural extracts as potential preservatives for food. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 311–319.
- Soni, M. G., Burdock, G. A., Christian, M. S., Bitler, C. M., & Crea, R. (2006). Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food Chemistry Toxicology*, 44, 12.
- Sonni, F., Cejudo Bastante, M. J., Chinnici, F., Natali, N., & Riponi, C. (2009). Replacement of sulfur dioxide by lysozyme and oenological tannins during fermentation: influence on volatile composition of white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 688–696.
- Suárez, M., Romero, M.-P., Ramo, T., Macià, A., & Motilva, M.-J. (2009). Methods for preparing phenolic extracts from olive cake for potential application as food antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1463–1472.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., & Dommes, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113, 1226–1233.
- Vally, H., Misso, N. L. A., & Madan, V. (2009). Clinical effects of sulphite additives. *Clinical & Experimental Allergy*, 39, 1643–1651.
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2005). Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Analytica Chimica Acta*, 538, 391–398.

PUBLICACIÓN 2. “Revalorización de raspones de uva”

María José Ruiz-Moreno, Rafaela Raposo, José Manuel Cayuela, Pilar Zafrilla, Zulema Piñeiro, José Manuel Moreno-Rojas, Juana Mulero, Belén Puertas, Francisco Girón, Raúl F. Guerrero, Emma Cantos-Villar (2015). *Valorization of grape stems*. *Industrial Crops and Products*, 63, 152–157.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.016>



Valorization of grape stems



María J. Ruiz-Moreno^a, Rafaela Raposo^b, Jose M. Cayuela^c, Pilar Zafrilla^c, Zulema Piñeiro^b, José M. Moreno-Rojas^a, Juana Mulero^c, Belén Puertas^b, Francisco Giron^c, Raúl F. Guerrero^b, Emma Cantos-Villar^{b,*}

^a Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro Alameda del Obispo, Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural (Junta de Andalucía), Avd. Menéndez Pidal, 14004 Córdoba, Spain

^b Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro Rancho de la Merced, Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural (Junta de Andalucía), Ctra Trebujena, km 2.1, 11471 Jerez de la Frontera, Spain

^c Universidad Católica San Antonio (UCAM), Campus de Los Jerónimos, s/n Guadalupe, 30107 Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 June 2014

Received in revised form 4 September 2014

Accepted 12 October 2014

Available online 10 November 2014

Keywords:

Antioxidant
Antimicrobial
Grape byproducts
Olfactometry
Stilbenes

ABSTRACT

The wine industry produces large amounts of grape stem byproducts, which have been described as a natural source of polyphenols. In the present study, an extract from grape stems was evaluated for its antioxidant and antimicrobial activities in model wine to determine its potential capacity to replace and/or reduce SO₂ in winemaking. Additionally, its possible effects on aroma were studied.

Grape stem extract (STE) showed high antioxidant activity and it can be proposed as an energetic antioxidant. Its antimicrobial activity was compared to that of SO₂. STE showed a lower inhibitory effect than SO₂ for *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Dekkera bruxellensis* and *Pediococcus damnosus* whereas STE seems to be more efficient against *Candida stellata* and *Botryotinia fuckeliana*. GC-olfactometry analysis of STE showed that its most important odorants are naturally present in wines, and thus olfactometric profile modifications in wine, after STE addition, could appear quantitatively but not qualitatively.

It can be concluded that grape stems are compounds with a low sourcing cost, high antioxidant activity and good antimicrobial properties.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The world wine industry produces thousands of tons of residues which represent a waste management issue both ecologically and economically (FAO, 2012). Among wine by-products, pomace and grapevine canes have been widely studied (Çetin et al., 2011; Rayne et al., 2008). However, less attention has been focused on stems. Grape stems are removed before winemaking and represent around 5% of wine byproducts. They are frequently used for producing compost or for feeding ruminants (Anastasiadi et al., 2012). The possibility of increasing added value in stem residues generated by wineries around the world promotes studies on this byproduct.

Extracts from grape byproducts have been proposed as preservatives in the food industry due to their antioxidant and antimicrobial properties. For example, phenolic extracts from grape and grape derivatives have been shown to be useful preservatives

in chicken meat, horse mackerel and fruit juices (Pazos et al., 2006; Selani et al., 2011).

The most used preservative in the wine industry is sulphur dioxide (SO₂). In wine, SO₂ exhibits an important antioxidant function that helps to reduce the effects of dissolved oxygen and inhibit oxidase enzymes, which are endogenous to grapes and also come from fungal infections (Izquierdo-Cañas et al., 2012). Moreover, SO₂ inhibits the development of all types of microorganisms, such as yeasts, lactic acid bacteria and, to a lesser extent, acetic acid bacteria (Santos et al., 2012). However, several human health risks, including dermatitis, urticaria, angioedema, diarrhea, abdominal pain, bronchoconstriction and anaphylaxis, have been associated with SO₂ (Vally et al., 2009). Consequently, the International Organization of Vine and Wine (OIV) has established limits for SO₂ content in wines (OIV, 2012). Thus, there is great interest in the search for other preservatives that can replace and/or reduce SO₂ content in wines.

Another important reason that has increased the interest in searching for alternatives to SO₂ in wines is the fact that only molecular SO₂ (a percentage of free SO₂) possesses antioxidant and antimicrobial properties. The percentage of free SO₂ depends on

* Corresponding author. Tel.: +34 671560353; fax: +34 956434610.

E-mail address: emma.cantos@juntadeandalucia.es (E. Cantos-Villar).

the pH, a high pH decreasing its proportion, and therefore its effectiveness. In the last few years, wine pHs have increased due to the changing climate, and thus wines are becoming more vulnerable to spoilage (Sadras et al., 2013).

Some chemicals have been tested as an alternative to SO₂: colloidal silver complex (Garde-Cerdán et al., 2014; Izquierdo-Cañas et al., 2012), dimethyl dicarbonate (Costa et al., 2008), ascorbic acid, hypophosphorous acid, thiodipropionic acid, Trolox C, stannous chloride, and Sporix (Panagiotakopoulou and Morris, 1991), and even natural products (lysozyme and bacteriocins) (Bartowsky, 2009). Among these, the use of phenols is a promising alternative. Oenological tannins (Sonni et al., 2009), vegetal extract (Salaha et al., 2008), almond skin and eucalyptus leaf extracts (González-Rompinelli et al., 2013) have resulted efficient in reducing SO₂ in wines.

This study joins the two current oenological research interests mentioned above, increasing the added value of grape stem byproducts and developing other preservatives that can replace and/or reduce SO₂ content in wines. In particular, it aims to assess the antioxidant and antimicrobial activity and olfactometry profile of the grape stem extract as a potential alternative to SO₂ in winemaking. It is a preliminary study to test this extract in winemaking.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Analytical grade methanol, acetic acid, diethyl ether, ethyl acetate and ethanol were supplied by Panreac (Barcelona, Spain). Chemical standards: ethyl butyrate, hexanal, isoamyl acetate, 2-hydroxy-3-pentanone, hexyl acetate, 6-methyl-5-hepten-2-one, methyl octanoate, 1-octen-3-ol, Z-2-nonenal, 3-isobutyl-2-methoxypyrazine, phenylethanal, α -terpineol, E-2-undecenal, E,E-2,4-decadienal, guaiacol, eugenol, vanillin, n-alkanes (C7-C40), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), 2,20-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), fluorescein (FL), K(OH) solution and dichloromethane (LiChrosolv quality) were purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Anhydrous sodium sulfate, tartaric acid and absolute ethanol (99.9% HPLC quality) were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Solfosol (water solution of SO₂) was supplied by Sepsa-Enartis (Penedès, Spain). Ultrapure water from a Milli-Q system (Millipore Corp., Bedford, MA) was used throughout this research.

2.2. Grape stem extract (STE)

Stems from the Syrah grape variety harvested in 2011 at IFAPA-Rancho de la Merced Centre in Jerez de la Frontera (Spain) were used for this research. The Syrah variety was chosen for being widely spread worldwide (35,000 ha).

The grape stem extract was obtained by means of ultrasound (model UP 200S, from Dr. Hielscher GmbH, Teltow, Germany) as previously described (Piñeiro et al., 2013). This method has been developed in our laboratory. It is a simple, rapid, and reliable UAE method recently developed and validated for stilbenoid analysis in grape stem samples. Briefly, ground freeze-dried grape stems were extracted under the following conditions: distilled alcohol/water (80:20, v/v) as extraction solvent, 75 °C as extraction temperature, 70% amplitude, cycle 0.7 s, 7 mm probe tip and 250 ml as extraction volume (ratio 1:30). The extraction time was 15 min. Subsequently, a rinsing step was applied to the extracted sample with 25 ml of fresh solvent. The obtained extracts were centrifuged at 1469 × g for 5 min in a Digicen 20-R centrifuge (Orto Alresa, Spain), paper filtered, filtered through a 0.22 μm

filter (PVDF Teknokroma, Barcelona, Spain) and kept at –18 °C until analysis. This produced a stilbene-rich extract. Piñeiro et al. (2013) characterized this grape stem extract as follows: piceatannol (21.1 ± 0.1 mg/kg dw), trans-resveratrol (139.1 ± 0.8 mg/kg dw), *ε*-viniferin (65.1 ± 1.1 mg/kg dw) and vitisin B (13.0 ± 1.9 mg/kg dw).

Finally, the grape stem extract was adjusted to 50 ppm and 80 ppm in a model wine system (12%, v/v, ethanol, 4 g/l tartaric acid and adjusted to pH 3.4 with NaOH). These concentrations were chosen as they are recommended for SO₂ in winemaking in warm climates (50 ppm for red wine, and 80 ppm for white wine) (Puertas et al., 2013).

2.3. Antioxidant activity

2.3.1. DPPH assay

The samples were analyzed using the technique reported by Brand-Williams et al. (1995). The stock solution was prepared by dissolving 24 mg of DPPH in 100 ml of MeOH, and then stored at 20 °C in the dark until needed. The working solution was obtained by diluting 10 ml of the stock solution with 45 ml MeOH, to obtain an absorbance of 1.1 ± 0.1 units at 515 nm, using a Shimadzu UV-10673 spectrophotometer. A volume of 10 μl of different STE concentrations was added to 990 μl of 0.094 mM DPPH in MeOH, to reach 1 ml. To determine the reaction kinetics, the assays were continuously monitored at 515 nm over a 1 h period at 25 °C. Each sample was analyzed in triplicate. The antioxidant activities were expressed as μM Trolox equivalents/mg extract.

2.3.2. ORAC assay

The oxygen radical absorbance capacity was determined as previously described (Dávalos et al., 2004). The ORAC analyses were conducted on a Synergy HT multi-detection microplate reader, from Bio-Tek Instruments, Inc. (Winooski, VT, USA), using 96-well polystyrene microplates with black sides and a clear bottom, purchased from Nalge Nunc International. Fluorescence was read through the clear bottom, with an excitation wavelength of 485/20 nm and an emission filter of 528/20 nm. The plate reader was controlled by KC4 software, version 3.4. The reaction was performed in 75 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), and the final reaction mixture was 200 μl. FL (100 μl; 3 nM, final concentration) and 20 μl stem extracts, were placed in the wells of the microplate. The mixture was preincubated for 30 min at 37 °C, before rapidly adding the AAPH solution (30 μl; 19 mM, final concentration). Reaction mixtures were prepared in triplicate and at least three independent assays were performed for each sample. The antioxidant activities were expressed as μM Trolox equivalents/mg extract.

2.4. Antimicrobial assay

Pure cultures were obtained from the CECT (Spanish Collection of Type Cultures, Valencia, Spain). Yeasts: *Saccharomyces cerevisiae* (CECT 1942), *Candida stellata* (CECT 11969), *Hanseniaspora uvarum* (CECT 1118), *Dekkera bruxellensis* (CECT 11045). Bacteria: *Lactobacillus plantarum* (CECT 5956), *Acetobacter aceti* (CECT-298T), *Pediococcus damnosus* (CECT 793), *Oenococcus oeni* (CECT 218). Fungus: *Botryotinia fuckeliana* (CECT 20518). All the microorganisms were grown in optimal conditions. Subsequently, the extract and/or SO₂ were added to determinate its antimicrobial properties. Yeasts were cultivated on 21 g/l malt broth (Sigma–Aldrich, Germany) with a final pH of 6.2. Bacteria were cultivated on 51 g/l MRS broth (Fluka, Spain) and fungus on 39 g/l potato dextrose broth (Fluka, Spain) with a final pH of 6.2 and 5.6, respectively.

For the determination of microbial growth kinetics, indirect impedance measurements were carried out by the BacTrac measuring system (“Bacteria Tracer”, SY-LAB, Vienna, Austria). This

instrument consists of an incubator unit which allows for simultaneous incubation of 40 test tubes of 10 ml each. The CO₂ generated by the microorganisms dissolving potash changed its impedance. Data were processed by DMFit software. DMFit is an Excel add-in for fitting curves where a linear phase is preceded and followed by stationary phases. From this curve (i) lag phase (λ , hours) and (ii) maximum specific growth rate (μ_{\max} , hours⁻¹) are directly calculated. All analyses were carried out in triplicate and included: (i) control measurements for nutrient broth, KOH solution, and microbial inoculums (without additive), (ii) STE (80 ppm) in model wine, and (iii) SO₂ (80 ppm) in model wine.

2.5. Analysis of volatile compounds

2.5.1. Extraction of volatile compounds

Extraction was performed as described by Sarrazin et al. (2007) with slight modifications. Briefly, stem extract solution (100 ml) was extracted three times with dichloromethane (10, 5, and 5 ml, respectively) in a 200 ml flask with magnetic stirring for 10, 5 and 5 min, respectively. The combined organic phases were then dried over anhydrous sodium sulphate and concentrated to a final volume of 500 μ l under a nitrogen stream (approximately 100 ml/min) in a Turbo-Vap LV evaporator (Biotage, Uppsala, Sweden).

2.5.2. GC-olfactometry

Analyses were carried out using a Varian 3800 GC (Middelburg, The Netherlands) equipped with an FID and an OP275 olfactometer (GL Science Inc., Tokyo, Japan). 1 μ l of extract was injected in splitless mode, 1 min being the splitless time. The columns used were DB-WAX and DB-5 from J&W Scientific, Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, CA, USA), 60 m \times 0.25 mm with 0.25 μ m film thickness. The temperature program was as follows: 45 °C for 1 min, increasing to 220 °C at a rate of 3 °C/min and held for 30 min. The column effluent was split 2:3 into a flame ionization detector and a heated sniffing port. The injector and detector temperature was 230 °C. The carrier gas was helium at 1 ml/min (Sarrazin et al., 2007). The sensory panel was composed of three trained tasters, who sniffed each sample twice. The panelists were asked to rate the intensity of the odor using a four point category scale (0 = non detected, 1 = weak/hardly recognizable note, 2 = clear but not intense note, 3 = intense note). Results were expressed as "modified frequency" MF (%).

2.5.3. GC-MS

1 μ l of sample was injected into a Trace GC Ultra gas chromatograph (Thermo Fisher Scientific S.p.A., Rodano, Milan, Italy) under the conditions described above. The detector was a mass spectrometer (ISQ single quadrupole MS, Thermo Fisher Scientific, Austin, Texas, USA) operating in EI mode (70 eV), connected to the GC with a heated transfer line at 230 °C. Mass spectra were taken over the 40–350 m/z range. Thermo Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) was used for data acquisition.

2.5.4. Identification of aroma compounds

The odorant compounds were identified on the basis of a linear retention index and a comparison of MS fragmentation patterns with those of reference compounds or with mass spectra in the NIST library.

2.6. Statistics

The analysis of the variance (ANOVA) and Least Significant Difference test (Tukey) were carried out with a significance level of $p \leq 0.05$. Statistix version 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA) was used.

3. Results and discussion

3.1. Antioxidant activity of STE

The antioxidant activity (AA) of phenolic compounds has been widely described (Fernández-Pachón et al., 2006; Tabart et al., 2009; Villaño et al., 2005), including stilbenes (He and Yan, 2013). However, few data have been found in the literature regarding grape stem extract. AA data (DPPH and ORAC) from STE are shown in Fig. 1. STE at a concentration of 50 ppm reached 2.75 and 28.71 μ M Trolox/mg extract, measured by DPPH and ORAC respectively. Higher values were found for the higher STE concentration (80 ppm): 4.21 and 61.01 μ M Trolox/mg extract, measured by DPPH and ORAC, respectively. A review of the literature concerning the AA of winemaking byproducts reveals the difficulty of comparing the reported data, for several reasons: (i) different analytical methods, (ii) different standards or reference units, (iii) grape variety and climate conditions, (iv) extraction method. The AA data of STE by DPPH were in agreement with the one found in the literature for stem extract in 80% of ethanol (6.5 μ M Trolox/mg extract) (Llobera, 2012). Recently, AA from Syrah grape stem extract by ORAC has been described in the literature (González-Centeno et al., 2012). This extract was performed in more drastic conditions than ours (ASE system, eight extractions with acetone/water and three more with MeOH/water) and the authors reported values slightly higher than ours. Some more data have been found for the AA (by ORAC method) of other grape extracts in aqueous alcoholic mixtures. Those range between 4 and 21 μ M Trolox/mg (García-Ruiz et al., 2012), which are within the range of our data. Comparison with SO₂ for AA is not available. When SO₂ solution was placed in methanol media for DPPH determination an artifact was observed in the solution, which could explain why data regarding the AA of SO₂ were not found in the literature, even after an exhaustive review. However, some data have been found for ascorbic acid, a potent antioxidant used as preservative in the food industry. The AA for ascorbic acid was 2.84 μ mol TE/mg and 3.97 μ mol TE/mg by DPPH and ORAC respectively (Villaño et al., 2005), which were significantly lower values in comparison with our data. Thus, STE can be proposed as an energetic antioxidant of biological origin.

3.2. Antimicrobial activity of STE

Microorganisms play an imperative role in winemaking by contributing to the quality and desirable properties of the wine. The

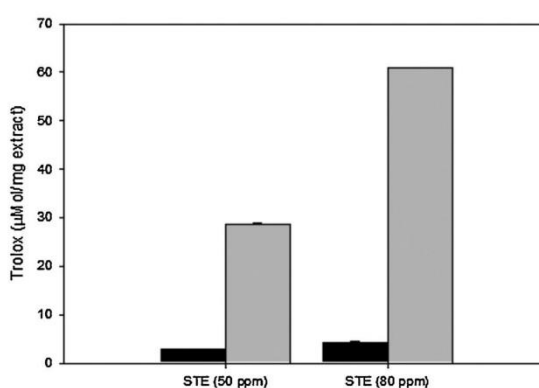


Fig. 1. Antioxidant activity of stem extract (STE) measurement by DPPH and ORAC at two concentrations (50 ppm, 80 ppm). ■, DPPH; □, ORAC.

Table 1
Lag phase (λ) and maximum specific growth rate (μ_{\max}) of microorganism exposed to nothing (control), sulphur dioxide (SO₂) and grape stem extract (STE) at 80 ppm.

Microorganism	λ (hours)			μ_{\max} (hours ⁻¹)		
	Control	SO ₂	STE	Control	SO ₂	STE
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4.50 ^a ± 0.01	10.4 ^b ± 0.81	5.66 ^a ± 0.46	24.79 ^b ± 0.00	13.54 ^a ± 4.70	16.50 ^a ± 0.61
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	3.73 ^a ± 0.01	nd	33.5 ^b ± 0.01	1.10 ± 0.01	nd	1.24 ± 0.32
<i>Dekkera bruxellensis</i>	25.13 ^a ± 0.01	31.7 ^b ± 1.78	28.3 ^a ± 0.21	6.93 ± 0.00	6.77 ± 0.31	5.52 ± 0.05
<i>Candida stellata</i>	2.62 ± 0.01	2.82 ± 0.31	3.68 ± 1.32	18.34 ^a ± 0.02	18.55 ^a ± 0.91	1.84 ^a ± 0.62
<i>Oenococcus oeni</i>	17.25 ^a ± 0.78	31.7 ^b ± 1.78	34.4 ^b ± 1.99	6.11 ± 0.43	8.74 ± 0.07	5.59 ± 1.00
<i>Lactobacillus plantarum</i>	5.44 ^a ± 1.46	7.38 ^{ab} ± 0.77	8.7 ^b ± 0.57	7.04 ± 1.75	8.39 ± 0.24	7.19 ± 0.54
<i>Pediococcus damnosus</i>	11.90 ^a ± 0.05	nd	0.13 ^b ± 0.49	38.24 ^a ± 0.02	nd	20.51 ^b ± 2.19
<i>Acetobacter aceti</i>	8.97 ± 0.01	6.3 ± 1.27	9.71 ± 0.31	3.55 ± 0.59	3.71 ± 0.03	3.70 ± 0.24
<i>Botrytinia fuckeliana</i>	40.19 ^a ± 0.08	59.8 ^b ± 4.38	57.2 ^b ± 3.90	10.46 ^a ± 0.02	8.506 ^a ± 0.69	2.60 ^b ± 0.61

Different letters mean significant differences between treatments (significant level $p \leq 0.05$). nd, not detected.

effectiveness of STE on microbial spoilage is a key factor for the feasibility of its uses as a preservative in the wine industry.

Microbiological analyses were performed on microorganisms that occur naturally in wine during winemaking, and also on microorganisms that produce alterations in wine (Loureiro and Malfeito-Ferreira, 2003).

When microorganisms grow in culture media, they metabolize substrates of low conductivity into products of a higher conductivity and thereby decrease impedance (Priego et al., 2011). Two parameters are obtained: lag phase (λ , hours) and maximum specific growth rate (μ_{\max} , hours⁻¹). At longer λ and lower μ_{\max} more inhibition is achieved. The growth of *S. cerevisiae*, the most widely used yeast in winemaking, was delayed with SO₂ but not with STE (λ , Table 1). μ_{\max} was decreased by both SO₂ and STE. In standard winemaking (without co-inoculation), growth delay of *S. cerevisiae* is not desirable since it might allow for the growth of other microorganisms, and thus STE may be considered more appropriate for the growth of *S. cerevisiae*. *H. uvarum*, an early fermentation yeast which usually increases ethyl acetate in wines, was totally inhibited by SO₂ (λ and μ_{\max} , Table 1), whereas STE significantly delayed its growth in comparison with the control (λ , Table 1). *Dekkera bruxellensis* is responsible for serious economic losses in the wine industry owing to its ability to spoil wines by the production of ethyl phenols. The lag phase (λ) was significantly affected only by SO₂ (λ , Table 1). *S. cerevisiae*, *H. uvarum* and *D. bruxellensis* have been described to be more susceptible to pterostilbene and resveratrol than to potassium metabisulphite (Pastorkova et al., 2013). These authors tested stilbene standards at high concentrations (512–4096 $\mu\text{g/ml}$), which may account for the difference with our data. *C. stellata* is frequently associated with overripe and botrytized grapes. There was no effect on lag phase when *C. stellata* was grown in the presence of either SO₂ or STE (λ , Table 1). However, STE significantly decreased its μ_{\max} at the doses tested, and thus it can be concluded that STE showed higher inhibition activity on *C. stellata* than SO₂.

O. oeni and *L. plantarum*, lactic acid bacteria, develop malolactic fermentation in wine. SO₂ and STE increased the lag phase in the bacterial growth of both. However, μ_{\max} was not affected by either (Table 1). *P. damnosus*, spoilage acid lactic bacteria, synthesizes glucan which leads to an unacceptable viscosity of wine. *P. damnosus* was strongly affected by SO₂ and, although in a lesser extent, also by STE (λ and μ_{\max} , Table 1). *A. aceti* causes the conversion of the ethanol in acetic acid, increasing volatile acidity in wines. It was not significantly affected by SO₂ or STE (Table 1). The inhibition effects on bacterial growth of wine phenolics, including stilbenes, have been described (García-Ruiz et al., 2009). These authors highlighted the efficacy of stilbenes to inhibit different lactic acid bacteria. In fact, phenolic extracts have been described as possible agents to control malolactic fermentation (García-Ruiz et al., 2012) even during white wine aging (Oliveira et al., 2013). Pomace extract, with a high polyphenolic concentration, has been described as showing antibacterial and antifungal activities (Oliveira et al., 2013). Finally

stem extracts have been proposed as inexpensive source of potent natural antifungal mixtures (Anastasiadi et al., 2008).

Botrytinia fuckeliana, also known as its anamorphic *Botrytis cinerea*, is the causal agent of gray mold disease. Its lag phase was affected by both SO₂ and STE. However, μ_{\max} was significantly delayed only by STE (Table 1). The use of grape pomace against *Botrytis* has recently been described (Mendoza et al., 2013).

In summary, at the doses tested, STE showed a lower inhibitory effect than SO₂ for *S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *D. bruxellensis* and *P. damnosus*, whereas STE was more efficient for *C. stellata* and *B. fuckeliana*. No differences were found for *O. oeni*, *L. plantarum* and *A. aceti*. Thus, no general conclusion can be established regarding the antimicrobial activity of STE versus SO₂ since the effectiveness of STE or SO₂ depends on the microorganisms.

3.3. Olfactometric profile of STE

An olfactometric study was performed on STE. A gas chromatography–olfactometry (GC–O) technique was used to characterize the odorant profile of STE. GC–O is an efficient tool for separating odor-active compounds from odorless volatiles of a complex mixture. Olfactometric analysis provides useful information about the identification of key aroma compounds, classifies odorants by their aromatic importance and determines those that might be responsible for aromatic differences. GC–O in combination with GC–MS analysis allows not only for the evaluation of the odor compounds, but also for identification with mass spectral information. STE was dissolved in model wine and submitted to liquid–liquid extraction with dichloromethane. The ability of this solvent to obtain representative extracts and extract a broad range of organic compounds (alcohols, thiols, esters, lactones, aldehydes, and carboxylic acids) is known (Sarrazin et al., 2007). The olfactometric strategy carried out in our study combining measurements of intensity and of frequency of detection has been widely described (Culleré et al., 2013). Overall, the panel detected more than 80 perceptions. For simplification, only odorants with MF (%) ≥ 40 were listed in Table 2. The higher the STE dose used the more complex the aroma profile was. While 40 odoriferous zones (OZs) were found for STE (80 ppm), only 24 OZs were found for STE (50 ppm). In both doses tested, 8 OZs (11, 19, 23, 24, 28, 29, 32 and 40, Table 2) were detected with MF (%) values higher or close to 70 (Table 2). The compounds responsible for these OZs were identified by GC–O in combination with GC–MS. Specifically: 3-isobutyl-2-methoxy-pyrazine (11, Table 2) γ -octalactone (19, Table 2), *trans*-4,5-epoxy-E-2-decenal (23, Table 2), furaneol [2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone] (24, Table 2), eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol) (28, Table 2) sotolon [3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5H)-one] (29, Table 2) and vanillin (40, Table 2) were identified. The aforementioned compounds were associated with green pepper (11, Table 2), sweet (19, Table 2), metallic (23, Table 2), caramel (24, Table 2), clove (28, Table 2), curry (29, Table 2),

Table 2
Odoriferous zones found by GC-olfactometry in grape stem extract (STE).

OZs	LRI ^c		Descriptors	Compounds	STE doses (ppm)		
	N ^b	DB-WAX			DB-5	MF (%)	80
1	1028		800	Fruity, apple	Ethyl butyrate ^b	61	58
2	1090		800	Green, grass	Hexanal ^b	48	48
3	1135		873	Fruity	Isoamyl acetate ^b	53	–
4	1170		822	Fresh, grass	2-Hydroxy-3-pentanone ^b	48	48
5	1270		1014	Fruity, fermented, herb	Hexyl acetate ^b	48	–
6	1294			Paper, toasty	Unknown	48	–
7	1319		917	Toasty, sweet	Unknown	43	–
8	1373		983 + 1126	Geranium, green	6-Methyl-5-hetpten-2-one ^b + methyl octanoate ^b	63	71
9	1438		972	Mushroom	1-Octen-3-ol ^b	51	71
10	1514		1149	Dusty, green	Z-2-nonenal ^b	67	62
11	1530		1184	Green pepper	3-Isobutyl-2-methoxypyrazine ^b	94	94
12	1620		1046	Honey	Phenylethanal ^b	43	48
13	1713		1194	Fresh, anise	α-Terpeneol ^b	58	–
14	1733		1367	Fatty, metallic, green	E-2-undecenal ^b	58	58
15	1790			Toasty, sweet, woody	Unknown	62	–
16	1822		1067	Sweet	Unknown	51	61
17	1845		1323	Plastic, burnt	(E,E)-2,4-decadienal ^b	58	–
18	1862		1089	Phenolic	Guaiacol ^b	82	–
19	1877		1276	Sweet, almond, coconut	γ-Octalactone ^a	78	71
20	1914			Sweet, fruity	Unknown	53	61
21	1977			Woody, almond	Unknown	48	43
22	1997			Green, coconut, creamy	Unknown	48	48
23	2011		1381	Metallic	Trans-4,5-epoxy-E-2-decenal ^a	78	78
24	2036		1073	Caramel	Furaneol ^a	75	67
25	2067		1138	Caramel	Homofuraneol ^a	43	–
26	2134			Fatty, rancid, green	Unknown	43	–
27	2161		1488	Sweet, lactone like, peach	γ-Decalactone ^a	85	–
28	2171		1365	Clove, spicy	Eugenol ^b	71	71
29	2198		1105	Curry	Sotolon ^a	82	67
30	2254			Coconut, creamy	Unknown	67	58
31	2268		1194	Spicy, nutty, sweet	Abhexone ^a	43	–
32	2302		1733	Incense, black pepper	Unknown	78	85
33	2321			Leather	Unknown	47	47
34	2350		1713	Flowers	E,E-farnesol ^a	71	–
35	2383			Toasty	Unknown	53	–
36	2423			Rancid	Unknown	43	–
37	2488			Toasty, sweet, honey	Unknown	53	53
38	2514			Liquor, rubber, barbecue	Unknown	43	–
39	2553		1244	Honey, pollen, sweet,	Phenylacetic acid ^a	67	43
40	2564		1407	Vanilla	Vanillin ^b	94	75

OZs, odorant zones; LRI, linear retention index; MF, modified frequency; –, MF (%) <40.

^a Tentatively identified by LRI matching on two capillary columns (DB-WAX and DB5).

^b Mass spectrum in agreement with spectra found in the NIST mass spectral library with the same retention times as those of pure substances or with mass spectra in the NIST library and previously reported linear retention indices on two columns (DB-WAX and DB-5).

^c Linear retention index calculated on both DB-WAX and DB-5capillaries.

and vanilla (40, Table 2) nuances. From those with high MF (%), only OZ (32, Table 2), with incense and black pepper descriptors, could not be identified. The majority of these compounds have been previously described in wine. 3-Isobutyl-2-methoxypyrazine (11, Table 2) confirmed by GC-MS, has been considered as one of the main 'varietal' volatiles reported in Cabernet sauvignon grapes and wine. Furaneol (24, Table 2) and sotolon (29, Table 2) are well-known products of carbohydrate degradation. Furaneol has been quantified in Merlot and in dry white Muscadet wines (Schneider et al., 2003). It has been strongly linked to the caramel or red fruit jam aroma in Cabernet Sauvignon wines (Falcão et al., 2008). In addition, it has also been identified as an odorant in both dry and botrytized wines from Semillon and Sauvignon blanc varieties (Sarrazin et al., 2007). Sotolon has been reported to make a positive contribution to specific nuances of Port wines, Sauternes wines and Jura flor-sherry wines (Sarrazin et al., 2007). It may have some role in the perception of the liquorice note in Spanish aged red wines from Priorato (Ferreira et al., 2001). However, the presence of this very intense aroma compound seems to be responsible for the premature-aging flavor in dry white wines (Pons et al., 2010). The last odoriferous zones (28 and 40, Table 2) corresponding to

eugenol and vanillin were confirmed by GC-MS. Both compounds are mainly oak-wood volatiles related to thermo-degradation of lignin in wines. Eugenol has been identified as one of the most active odorants in young red wines from Cabernet Sauvignon variety (López et al., 1999) and vanillin is considered an odorant of the aroma base of six wood extracts (Culleré et al., 2013). STE odorant composition is similar to wine odorant composition, so a quantitative but not qualitative effect is expected after the addition of STE to wine. In other studies where phenolic extracts came from other natural sources (not grape-related products), the addition of the extract into the wines modified their volatile profile (González-Rompinelli et al., 2013). The authors have recently described that instead of phenolic extracts modifying the volatile composition of wine when added, no significant differences were found in a triangle test. Other authors have described that the fortification of wines with stilbenes, which are the main components of the STE, does not seem to alter either their flavor or aroma (Gaudette and Pickering, 2011). Therefore, assays on wine should be performed to check first if the modification of the volatile composition of wine occurs, and secondly whether this is detected. This study could be very useful since the odorants zones that can be modified would be identified.

4. Conclusions

The results herein reveal that grape stems represent a rich source of high added-value compounds with high antioxidant activity and good antimicrobial properties. The odor profile of STE seems to be similar to that of wine, and thus a minor impact on the odorant composition of wine might be expected from its use.

On the whole, the data discussed above would suggest that STE is a promising economic alternative to SO₂ in winemaking. Furthermore, its biological origin provides a significant advance in environmental protection in wine producing zones. The added-value conversion of stem byproducts from winemaking helps in achieving sustainability in winemaking.

Although good results have been obtained with STE in model wine, further experiments on wines, which are more complex matrices, should be performed to confirm its usefulness.

Acknowledgments

Authors thank the INIA and FEDER for their financial support (Project RTA2011-00002) and to CTNC for microbiological support. Ruiz-Moreno and Guerrero thanks to the European Social Fund (ESF) 2007–2013 “Andalucía se mueve con Europa” for the financial support of their contracts.

References

- Anastasiadi, M., Choriantopoulos, N.G., Nychas, G.-J.E., Haroutounian, S.A., 2008. Antilisterial activities of polyphenol-rich extracts of grapes and vinification byproducts. *J. Agric. Food Chem.* 57, 457–463.
- Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A.L., Haroutounian, S.A., 2012. Grape stem extracts: polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties. *Food Sci. Technol.* 48, 316–322.
- Bartowsky, E.J., 2009. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 149–156.
- Çetin, E.S., Altınöz, D., Tarçan, E., Göktürk Baydar, N., 2011. Chemical composition of grape canes. *Ind. Crops Prod.* 34, 994–998.
- Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2008. Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiol.* 25, 422–427.
- Culleré, L., Fernández de Simón, B., Cadahía, E., Ferreira, V., Hernández-Orte, P., Cacho, J., 2013. Characterization by gas chromatography–olfactometry of the most odor-active compounds in extracts prepared from acacia, chestnut, cherry, ash and oak woods. *LWT – Food Sci. Technol.* 53, 240–248.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., 2004. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC–Fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.* 52, 48–54.
- Falcão, L.D., de Revel, G., Rosier, J.P., Bordignon-Luiz, M.T., 2008. Aroma impact components of Brazilian Cabernet Sauvignon wines using detection frequency analysis (GC–olfactometry). *Food Chem.* 107, 497–505.
- FAO, 2012. El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2012. *Fao Inter-Departmental Working Group*, Roma.
- Fernández-Pachón, M.S., Villano, D., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C., 2006. Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. *Anal. Chim. Acta* 563, 101–108.
- Ferreira, V., Aznar, M., López, R., Cacho, J., 2001. Quantitative gas chromatography–olfactometry carried out at different dilutions of an extract. Key differences in the odor profiles of four high-quality spanish aged red wines. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4818–4824.
- García-Ruiz, A., Cueva, C., González-Rompinelli, E.M., Yuste, M., Torres, M., Martín-Álvarez, P.J., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M.V., 2012. Antimicrobial phenolic extracts able to inhibit lactic acid bacteria growth and wine malolactic fermentation. *Food Control* 28, 212–219.
- García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Cueva, C., Martín-Álvarez, P.J., Moreno-Arribas, M.V., 2009. Inactivation of oenological lactic acid bacteria (*Lactobacillus hilgardii* and *Pediococcus pentosaceus*) by wine phenolic compounds. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1042–1053.
- Garde-Cerdán, T., López, R., Garijo, P., González-Arenzana, L., Gutiérrez, A.R., López-Alfaro, I., Santamaría, P., 2014. Application of colloidal silver versus sulfur dioxide during vinification and storage of Tempranillo red wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* 20, 51–61.
- Gaudette, N.J., Pickering, G.J., 2011. Sensory and chemical characteristics of trans-resveratrol-fortified wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 17, 249–257.
- González-Centeno, M.R., Jourdes, M., Femenia, A., Simal, S., Rosselló, C., Teissedre, P.-L., 2012. Proanthocyanidin composition and antioxidant potential of the stem winemaking byproducts from 10 different grape varieties (*Vitis vinifera* L.). *J. Agric. Food Chem.* 60, 11850–11858.
- González-Rompinelli, E.M., Rodríguez-Bencomo, J.J., García-Ruiz, A., Sánchez-Patán, F., Martín-Álvarez, P.J., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M.V., 2013. A winery-scale trial of the use of antimicrobial plant phenolic extracts as preservatives during wine ageing in barrels. *Food Control* 33, 440–447.
- He, S., Yan, X., 2013. From resveratrol to its derivatives: new sources of natural antioxidant. *Curr. Med. Chem.* 20, 1005–1017.
- Izquierdo-Cañas, P.M., García-Romero, E., Huertas-Nebreda, B., Gómez-Alonso, S., 2012. Colloidal silver complex as an alternative to sulphur dioxide in winemaking. *Food Control* 23, 73–81.
- Llobera, A., 2012. Study on the antioxidant activity of grape stems (*Vitis vinifera*). A preliminary assessment of crude extracts. *Food Nutr. Sci.* 3, 500–504.
- López, R., Ferreira, V., Hernández, P., Cacho, J.F., 1999. Identification of impact odorants of young red wines made with Merlot, Cabernet Sauvignon and Grenache grape varieties: a comparative study. *J. Sci. Food Agric.* 79, 1461–1467.
- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 23–50.
- Mendoza, L., Yañez, K., Vivanco, M., Melo, R., Cotoras, M., 2013. Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Ind. Crops Prod.* 43, 360–364.
- OIV, 2012. Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins. *Office International de la Vigne et du Vin*, Paris.
- Oliveira, D.A., Salvador, A.A., Smânia Jr., A., Smânia, E.F.A., Maraschin, M., Ferreira, S.R.S., 2013. Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. *J. Biotechnol.* 164, 423–432.
- Panagiotakopoulou, V., Morris, J.R., 1991. Chemical additives to reduce browning in white wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 255–260.
- Pastorkova, E., Zakova, T., Landa, P., Novakova, J., Vadlejch, J., Kokoska, L., 2013. Growth inhibitory effect of grape phenolics against wine spoilage yeasts and acetic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 161, 209–213.
- Pazos, M., Alonso, A., Fernández-Bolaños, J., Torres, J.L., Medina, I., 2006. Physico-chemical properties of natural phenolics from grapes and olive oil byproducts and their antioxidant activity in frozen horse mackerel filets. *J. Agric. Food Chem.* 54, 366–373.
- Piñeiro, Z., Guerrero, R.F., Fernández-Marin, M.I., Cantos-Villar, E., Palma, M., 2013. Ultrasound-assisted extraction of stilbenoids from grape stems. *J. Agric. Food Chem.* 61, 12549–12556.
- Pons, A., Lavigne, V.R., Landais, Y., Darriet, P., Dubourdieu, D., 2010. Identification of a sotolon pathway in dry white wines. *J. Agric. Food Chem.* 58, 7273–7279.
- Priego, R., Medina, L.M., Jordano, R., 2011. Bactometer system versus traditional methods for monitoring bacteria populations in salchichon during its ripening process. *J. Food Prot.* 74, 145–148.
- Puertas, B., Jiménez, M.J., Cantos-Villar, E., Piñeiro, Z., 2013. Effect of the dry ice maceration and oak cask fermentation on colour parameters and sensorial evaluation of Tempranillo wines. *Int. J. Food Sci. Technol.* 48, 835–842.
- Rayne, S., Karacabey, E., Mazza, G., 2008. Grape cane waste as a source of trans-resveratrol and trans-viniferin: high-value phytochemicals with medicinal and anti-phytopathogenic applications. *Ind. Crops Prod.* 27, 335–340.
- Sadras, V.O., Petrie, P.R., Moran, M.A., 2013. Effects of elevated temperature in grapevine. II: Juice pH, titratable acidity and wine sensory attributes. *Aust. J. Grape Wine Res.* 19, 107–115.
- Salaha, M.-I., Kallithraka, S., Marmaras, I., Koussissi, E., Tzourou, I., 2008. A natural alternative to sulphur dioxide for red wine production: influence on colour, antioxidant activity and anthocyanin content. *J. Food Comp. Anal.* 21, 660–666.
- Santos, M., Nunes, C., Saraiva, J., Coimbra, M., 2012. Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *Eur. Food Res. Technol.* 234, 1–12.
- Sarrazin, E., Dubourdieu, D., Darriet, P., 2007. Characterization of key-aroma compounds of botrytized wines, influence of grape botrytization. *Food Chem.* 103, 536–545.
- Schneider, R., Kotseridis, Y., Majcenovic, A.B., Augier, C., Razungles, A., Le Quéré, J., Étévant, P., 2003. Quantification of furaneol and homofuraneol in *Vitis vinifera* wines by stable isotope dilution assay using GC–MS/MS. In: *In: Flavour Research at the Dawn of the Twenty-First Century-Proceedings of the 10th Weurman Flavour Research Symposium*, Beaune, France, 25–28 June, 2002, pp. 710–714 (Editions Tec & Doc).
- Selami, M., Contreras-Castillo, C., Shirahigue, L., Gallo, C., Plata-Oviedo, M., Montes-Villanueva, N., 2011. Wine industry residues extracts as natural antioxidants in raw and cooked chicken meat during frozen storage. *Meat Sci.* 88, 397–403.
- Sonni, F., Cejudo Bastante, M.J., Chinnici, F., Natali, N., Riponi, C., 2009. Replacement of sulfur dioxide by lysozyme and oenological tannins during fermentation: influence on volatile composition of white wines. *J. Sci. Food Agric.* 89, 688–696.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., Dommès, J., 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.* 113, 1226–1233.
- Vally, H., Misso, N.L.A., Madan, V., 2009. Clinical effects of sulphite additives. *Clin. Exp. Allergy* 39, 1643–1651.
- Villano, D., Fernández-Pachón, M.S., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C., 2005. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Anal. Chim. Acta* 538, 391–398.

DISCUSIÓN IV-1

Con el fin de evaluar el potencial de un extracto rico en hidroxitirosol (HTE) y un extracto rico en polifenoles (STE) se disolvieron a dos concentraciones (50 mg/L y 80 mg/L) en una matriz vínica sintética (12% etanol absoluto, 4 g/L ácido tartárico y un pH de 3.4). Lo mismo se hizo con el SO₂, que empleó como control.

1. Perfil Polifenólico

El extracto rico en hidroxitirosol (HTE) contenía un 58% del área total de hidroxitirosol y 35% del área total de tirosol.

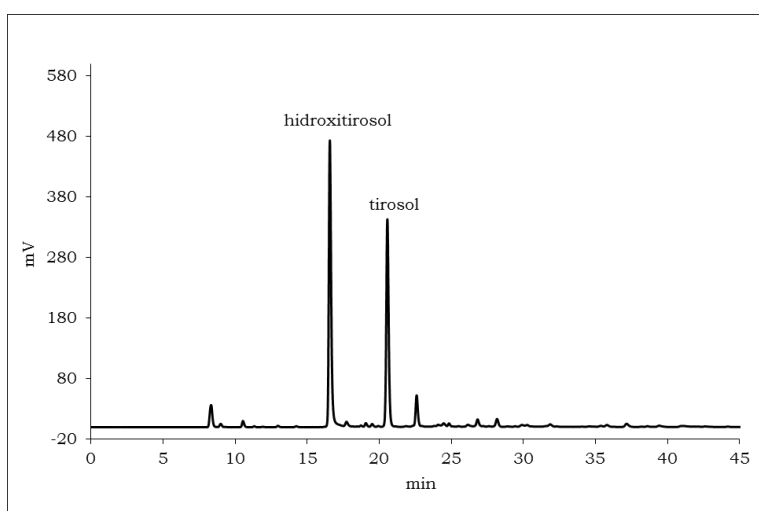


Figura 4.1. Cromatograma obtenido por HPLC-Fl del extracto rico en hidroxitirosol (HTE). Las condiciones fueron: 279 nm de excitación, 631 nm de emisión hasta el minuto 17 donde cambió a 278 nm de excitación y 598 nm de emisión

El extracto rico en polifenoles estaba compuesto por un 89% correspondiente a flavonoles, procianidinas y ácido caftárico y un 11% correspondiente a estilbenos. Concretamente, la concentración de los principales estilbenos fue: piceatanol (21.1 ± 0.1 mg/kg), *trans*-resveratrol (131.1 ± 0.8 mg/kg), ϵ -viniferin (65.1 ± 1.1 mg/kg) and *r*-viniferina (13.0 ± 1.9 mg/kg).

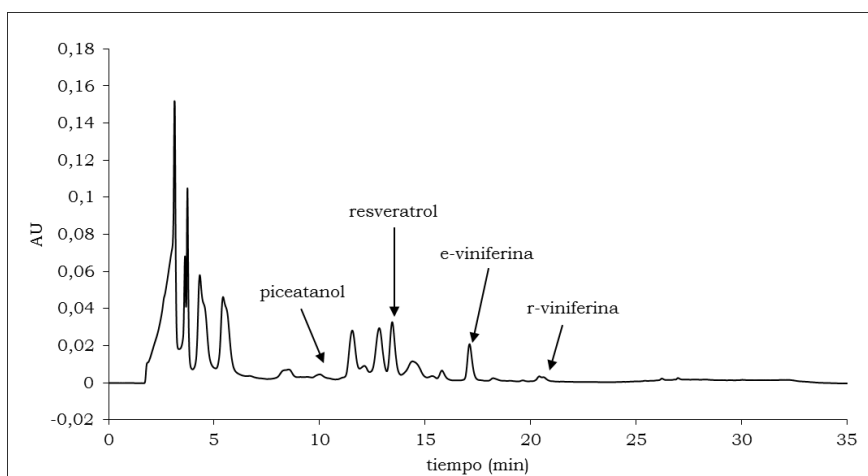


Figura 4.2. Cromatograma obtenido por HPLC-DAD del extracto rico en polifenoles (STE)

2. Actividad Antioxidante (AA)

En la *Tabla 4.1* se recogen los resultados correspondientes a la actividad antioxidante (AA) de los dos extractos, a modo de resumen de las dos publicaciones.

Tabla 4.1. valores DPPH y ORAC de los extractos HTE y STE

Concentración (mg/L)	Extracto	DPPH	ORAC
50	HTE	3.33	38.30
	STE	2.75	28.71
80	HTE	4.66	46.80
	STE	4.21	61.01
176	ácido ascórbico ¹	2.84	3.9

¹Tabart, Kevers, Pincemail, Defraigne, & Dommes (2009). Resultados expresados en μmol Trolox equivalente/mg de extracto

La AA encontrada fue distinta dependiendo de la concentración, así como del extracto. En ambos extractos la máxima AA se obtuvo a la mayor concentración, aunque el aumento no fue lineal en ningún caso. Estos datos no pudieron ser comparados con el testigo (disolución de 50 y 80 mg/L de SO_2) dado que al poner el SO_2 en medio de metanol para la determinación de su AA por el método DPPH se observó una turbidez que impidió la medida. Por otra parte, estudios previos han demostrado que SO_2 es un captador muy débil de radical anión superóxido. Estos hechos que explicarían la ausencia de estos datos en la literatura. Aunque, sí existen datos de otro potente conservante utilizado en la industria agroalimentaria, el ácido ascórbico. Éste posee una AA significativamente más baja que la mostrada por los extractos (*Tabla 4.1*).

Así, los extractos estudiados, HTE y STE pueden ser propuestos como potentes antioxidantes energéticos de origen vegetal.

3. Actividad Antimicrobiana

Para evaluar la capacidad antimicrobiana de los extractos se seleccionaron microorganismos que se encuentran naturalmente en el mosto/vino durante el proceso de elaboración, además de otros microorganismos que producen alteraciones en el vino (Bartowsky, 2009; Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003). Para la determinación de la cinética de crecimiento microbiano, se utilizó el sistema Bactrac ("Bacteria Tracer", SY-LAB, Viena, Austria), donde se realizan medidas indirectas de impedancia. Esta cinética de crecimiento del cultivo puede variar dependiendo del extracto que se adicionó al medio (HTE o STE) o

de la disolución control con SO₂, respecto a su cinética cuando no se le adiciona nada (Testigo). Así, se obtienen dos parámetros que caracterizan dicho crecimiento: (i) fase de latencia (λ , horas) y (ii) la velocidad máxima de crecimiento específico máximo (μ_{\max} , horas⁻¹). Así cuanto mayor sea λ y menor μ_{\max} mayor poder inhibitorio posee. En la *Tabla 4.2* se recogen los resultados correspondientes a la fase de latencia (λ) y tasa de crecimiento específico máximo (μ_{\max}) de microorganismos extractos HTE y STE.

Tabla 4.2. Fase de latencia (λ) y velocidad de crecimiento máximo (μ_{\max}) de microorganismos (testigo), y de microorganismos expuestos a SO₂ y a los extractos HTE y STE

Microorganismo	λ (horas)			
	Testigo	SO ₂	HTE	STE
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4.50 ± 0.01	10.4 ± 0.81	4.72 ± 0.09	5.66 ± 0.46
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	3.73 ± 0.01	n.d.	13.32 ± 0.05	33.5 ± 0.01
<i>Dekkera bruxellensis</i>	25.13 ± 0.01	31.7 ± 1.78	25.49 ± 1.76	28.3 ± 0.21
<i>Candida stellata</i>	2.62 ± 0.01	2.82 ± 0.31	2.98 ± 0.86	3.68 ± 1.32
<i>Oenococcus oeni</i>	17.25 ± 0.78	31.7 ± 1.78	49.28 ± 2.06	34.4 ± 1.99
<i>Lactobacillus plantarum</i>	5.44 ± 1.46	7.38 ± 0.77	3.52 ± 0.57	8.70 ± 0.57
<i>Pediococcus damnosus</i>	11.90 ± 0.05	n.d.	52.19 ± 2.96	0.13 ± 0.49
<i>Acetobacter aceti</i>	8.97 ± 0.01	6.3 ± 1.27	5.78 ± 1.19	9.71 ± 0.31
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	40.19 ± 0.08	59.8 ± 4.38	36.01 ± 3.10	57.2 ± 3.90
Microorganismo	μ_{\max} (horas ⁻¹)			
	Testigo	SO ₂	HTE	STE
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24.79 ± 0.00	13.54 ± 4.70	23.70 ± 0.38	16.50 ± 0.61
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	1.10 ± 0.01	n.d.	0.73 ± 0.19	1.24 ± 0.32
<i>Dekkera bruxellensis</i>	6.93 ± 0.00	6.77 ± 0.31	6.38 ± 0.72	5.52 ± 0.05
<i>Candida stellata</i>	18.34 ± 0.02	18.55 ± 0.91	18.37 ± 1.16	1.84 ± 0.62
<i>Oenococcus oeni</i>	6.11 ± 0.43	8.74 ± 0.07	4.23 ± 0.5	5.59 ± 1.00
<i>Lactobacillus plantarum</i>	7.04 ± 1.75	8.39 ± 0.24	5.63 ± 0.89	7.19 ± 0.54
<i>Pediococcus damnosus</i>	38.24 ± 0.02	n.d.	0.41 ± 0.06	20.51 ± 2.19
<i>Acetobacter aceti</i>	3.55 ± 0.59	3.71 ± 0.03	2.95 ± 0.52	3.70 ± 0.24
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	10.46 ± 0.02	8.51 ± 0.69	9.80 ± 0.2	2.60 ± 0.61

SO₂, dióxido de azufre; HTE, extracto rico en HT procedente de residuos del molino de aceituna; STE, extracto rico en polifenoles procedentes de raspones de la uva. n.d., no detectado.

Comparando los datos obtenidos para SO₂ y para los extractos (HTE, STE), el SO₂ mostró mayor actividad antimicrobiana frente a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (principal responsable de la fermentación alcohólica en vinos) que

cualquiera de los extractos. El retardo de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* no es deseable, ya que podría permitir el crecimiento de otros microorganismos y, por tanto, los extractos HTE y STE pueden considerarse más apropiados para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. Tanto los extractos como el SO₂ mostraron actividad frente a *Hanseniaspora uvarum*, aunque el SO₂ mostró mayor actividad inhibiendo su crecimiento totalmente. *Hanseniaspora uvarum* es una levadura de fermentación temprana que normalmente aumenta el acetato de etilo en los vinos. Respecto a *Dekkera bruxellensis*, responsable de graves pérdidas económicas en la industria vitivinícola debido a su capacidad de deteriorar los vinos mediante la producción de fenoles de etilo, solo el SO₂ aumentó significativamente la fase de latencia. Se observó también que HTE y STE, al igual que el SO₂, no mostraron actividad frente a *Candida stellata*, levadura asociada frecuentemente con las uvas sobremaduradas o botritizadas, aunque el STE disminuyó en 10 veces la μ_{max} .

Las bacterias *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus plantarum*, son bacterias ácido lácticas, principales responsable de la fermentación maloláctica en los vinos. Los tres conservantes modificaron los parámetros cinéticos de *Oenococcus oeni*, mostrando más efectividad estadísticamente significativa el HTE, después el STE y, por último, el SO₂ fue el que menos disminuyó λ . Sin embargo, frente a la otra bacteria láctica, *Lactobacillus plantarum*, el SO₂ y el STE aumentaron ligeramente la fase de latencia, mientras que HTE no la modificó. Respecto a las bacterias relacionadas con el deterioro del vino estudiadas, la *Pediococcus damnosus* es una bacteria de descomposición que sintetiza el compuesto glucano que conduce a una viscosidad inaceptable en el vino. Ésta bacteria fue completamente inhibida por el SO₂, el HTE mostró una gran efectividad, mientras que, aunque STE no influyó en la fase de latencia sí disminuyó la velocidad máxima de crecimiento. La adición de los extractos y SO₂ no influyó en el crecimiento de *Acetobacter aceti*, bacteria que provoca la conversión del etanol en ácido acético, aumentando la acidez volátil en los vinos.

Además de estas levaduras y bacterias se analizó la capacidad inhibitoria sobre *Botryotinia fuckeliana* o *Botrytis cinerea*, un hongo causante de la enfermedad de la podredumbre gris. El HTE no inhibió su crecimiento. El único estudio encontrado sobre la efectividad del extracto de orujo de aceite de oliva contra *Botrytis cinerea* concluyó que se requiere una concentración realmente alta del extracto para la inhibición de *Botrytis cinerea* (Medina et al., 2011). Mientras

que su fase de latencia se vio afectada tanto por SO₂ como por STE. Aunque, la velocidad máxima de crecimiento disminuyó significativamente sólo por la presencia del STE.

En resumen, el SO₂ resultó más eficiente contra la mayoría de microorganismos estudiados, y en las dosis ensayadas. HTE destacó por inhibir en mayor grado el crecimiento de *Oenococcus oeni*, mientras que el STE lo hizo por inhibir en mayor grado a *Candida stellata* y *Botryotinia fuckeliana*.

4. Perfil Olfatométrico

Con el fin de evaluar el impacto sensorial de los extractos sobre el vino se estudió el perfil olfatométrico de los extractos. El panel detectó más de 80 zonas odorantes. Para simplificar, sólo se han considerado los odorantes con FM(%) \geq 30, ya que a una FM menor pueden ser consideradas como ruido (Culleré et al., 2013). En los dos extractos, la máxima dosis mostró un perfil aromático más complejo. Para 80 mg/L, se encontraron 48 zonas odorantes (ZO's) en HTE y 40 ZO's en STE; mientras que para 50 mg/L, se encontraron 35 en HTE y 24 ZO en STE.

A modo de resumen se recogen en la *Tabla 4.3* las zonas odorantes comunes en las dos concentraciones estudiadas (50 y 80 mg/L) con una FM(%) \geq 70, para cada uno de los extractos (HTE y STE).

En el perfil olfatométrico de la disolución de HTE se encontraron 15 zonas odorantes con una FM(%) \geq 70 comunes a las dos dosis (1, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 48, *Tabla 4.3*). Mientras que en la disolución de STE se detectaron 8 ZO que aparecieron en ambas dosis ensayadas (2, 6, 9, 10, 13, 14, 17 y 21, *Tabla 4.3*).

Se ha encontrado que, de estas zonas encontradas en HTE y STE con un FM(%) \geq 70 en ambas concentraciones, tres fueron comunes en ambos extractos, independientemente de la dosis (ZO 10, 14 y 21). Estas zonas corresponden a **ZO-10** (caramelo), identificado tentativamente como furaneol; **ZO-14** (curry), identificado tentativamente como sotolon; y **ZO-21** (vainilla), identificado como vainillina. Todos estos compuestos han sido identificados en vinos. El furaneol (ZO-10, caramelo) se ha vinculado al perfil aromáticos de las variedades Merlot, Cabernet Sauvignon, Semillon y Sauvignon Blanc (Sarrazin et al., 2007), de los vinos rosados de Provenza (Masson & Schneider, 2009) y, además, parece estar

vinculado positivamente a las uvas podridas. El sotolon (ZO-14, curry) contribuye positivamente a los matices específicos de los vinos de Oporto, de Sauternes y los vinos de jerez de flor de Jura (Sarrazin et al., 2007). Parece que puede tener un cierto papel en la percepción de la nota a regaliz en vinos tintos españoles del Priorato (Ferreira, Aznar, López, & Cacho, 2001). Sin embargo, altos niveles de este compuesto parece ser el responsable del aroma a envejecimiento prematuro en los vinos blancos jóvenes secos (Pons, Lavigne, Landais, Darriet, & Dubourdiou, 2010). La vainilla (ZO-21, vainilla) está relacionada con la termodegradación de la lignina y contribuye al carácter organoléptico de los vinos envejecidos en madera.

Tabla 4.3. Zonas odorantes comunes para cada extracto (HTE y STE) en las distintas concentraciones (50 y 80 mg/L) con una FM(%) \geq 70

ZO	LRI ₁		Descripciones	compuestos	FM(%)			
	DB-WAX	DB-5			HTE (mg/L)		STE (mg/L)	
					80	50	80	50
1	1306	868+976	carne, metálico, seta	2-metil 3-furantiol ^a + 1-octen-3-ona ^a	75	68	*	*
2	1530	1184	pimiento verde	3-isobutil-2-metoxipirazina ^b	*	*	94	94
3	1138	1834	alpechín	desconocido	82	71	*	*
4	1846	1025	caramelo, licoroso, nuez	2-ciclopenten-1-ona-3-metil-2-hidroxi (cicloteno) ^b	88	82	*	*
5	1862	1089	fenólico	guaiacol ^b	94	94	82	*
6	1877	1276	dulce, almendra, coco	γ -octalactona ^a	*	*	78	71
7	1917	1116	rosa	2-feniletanol ^b	85	75	*	*
8	1977	1111	caramelo	maltol ^b	97	94	*	*
9	2011	1381	metálico	trans-4,5-epoxy-E-2-decenal ^a	*	*	78	78
10	2036	1073	caramelo	furaneol ^a	88	82	75	67
11	2161	1488	melocotón	γ -decalactona ^a	*	*	85	*
12	2171	-	flores	desconocido	85	85	*	*
13	2171	1365	clavo, especias	eugenol ^b	*	*	71	71
14	2198	1105	curry	sotolon ^a	100	100	82	67
15	2260	1922	melocotón, cremoso	γ -undecalatona ^a	82	75	*	*
16	2271	1193	curry	abhexon ^a	85	75	*	*
17	2302	1733	incienso, pimienta negra	n.i.	*	*	78	85
18	2350	1713	dulce	E,E-farnesol ^a	88	82	71	*
19	2446	-	barbacoa	desconocido	82	71	*	*
20	2553	1242	dulce, coco, vinagre	ácido fenilacético ^a	82	75	*	*
21	2564	1407	vainilla	vanilina ^b	100	91	94	75

¹ índice de retención lineal calculado en ambas columnas capilares DB-WAX y DB-5. ^a identificado tentativamente por el LRI en las dos columnas capilares (DB-WAX and DB5). n.i., no identificado. ^b espectro de masas de acuerdo al espectro de masas encontrado en la librería de espectro de masas NIST con el mismo tiempo de retención, como los de la sustancia pura o, el espectro de masas en la librería NIST y el LRI previamente descrito en las dos columnas (DB-WAX y DB-5)

Específicamente en el HTE se encontraron otras 9 zonas odorantes que también han sido identificados en vinos. **ZO-1** (carne/metálico), tentativamente identificado como la suma de dos compuestos, el 2-metil-3-furanthiol y 1-octen-3-ona. El 2-metil-3-furanthiol ha sido identificado como odorante en los vinos tintos de las regiones de Burdeos y Rioja (Bouchilloux, Darriet, Henry, Lavigne-Cruège, & Dubourdieu, 1998). El 1-octen-3-ona contribuye al aroma de champiñón fresco de ciertos vinos (Pons et al., 2011). **ZO-4** (caramelo/licoroso/nuez), identificado como cicloteno y la ZO-9 (caramelo), identificado como maltol. El cicloteno y maltol parecen contribuir al aroma "caramelo tostado" de roble en madera tostada utilizada en el envejecimiento (Culleré et al., 2013). **ZO-5** (fenólico), identificado como guaiacol. El guaiacol al igual que la vainilla, está relacionada con la termodegradación de la lignina y ha sido considerado responsable del carácter tostado de los vinos tintos Premium (Ana Escudero, Campo, Fariña, Cacho, & Ferreira, 2007). **ZO-7** (rosas), que ha sido identificado como 2-feniletanol, compuesto relacionado con el aroma de vinos Cabernet Sauvignon brasileños (Falcão, de Revel, Rosier, & Bordignon-Luiz, 2008). **ZO-15** (melocotón/lactona), tentativamente identificada como γ -undecalactona. Este compuesto se ha señalado como odorante en los vinos Riesling del Rin de Croacia (Komes, Ulrich, & Lovric, 2006). **ZO-16** (curry), tentativamente identificado como abhexon. El abhexon ha sido identificado en vinos envejecidos de Sauternes y Jerez (Collin, Nizet, Claeys Bouuaert, & Despatures, 2012). **ZO-18** (flores), identificado tentativamente como *E,E*-farnesol; terpeno considerado como un aroma de los vinos tintos españoles (Culleré, Escudero, Cacho, & Ferreira, 2004). **ZO-20** (dulce/cacao/vinagre) identificado como ácido fenilacético, el cual se ha asociado a vinos de uva podrida (Barata et al., 2011).

Específicamente en el STE se encontraron, además de las ZO's comunes con el HTE, otras 5 ZO's: **ZO-2** (pimienta verde) correspondiente a la 3-isobutil-2-metoxipirazina, considerada como uno de los principales volátiles varietales obtenidos en uvas y vino Cabernet Sauvignon. **ZO-6** (dulce/almendra/coco), tentativamente identificado como γ -octalactona. Este compuesto se ha identificado en vinos jóvenes de Tinta negra moles de Maderia (Perestrello, Fernandes, Albuquerque, Marques, & Câmara, 2006). **ZO-9** (metálico), tentativamente identificado como *trans*-4,5-epoxi-E-2-decenal. **ZO-13** (clavo/especiado) identificado como eugenol. El eugenol ha sido identificado

como uno de los olores más activos en los vinos tintos jóvenes de la variedad Cabernet Sauvignon (Noelia López et al., 2009). Y, por último, una **ZO-17** (incienso, pimienta negra) que no se ha podido identificar.

De acuerdo al número de zonas odorantes que aparecen en el extracto rico en polifenoles, STE, parece que éste es más similar al perfil odorante de vinos. aunque, se deben realizar ensayos en vinos para comprobar, primero, si se produce la modificación de la composición volátil del vino, y en segundo lugar, si estas modificaciones son detectables sensorialmente.

En resumen, el extracto rico en hidroxitirosol (HTE) y rico en polifenoles (STE) mostraron un alto poder antioxidante, por lo que pueden ser propuestos como potentes antioxidantes. Respecto a la actividad antimicrobiana no se puede establecer una conclusión general con respecto a la actividad antimicrobiana de los extractos frente al SO₂ ya que la eficacia depende de los microorganismos, aunque el SO₂ resultó más eficiente en la inhibición de la mayoría de microorganismos. El análisis GC-olfatometría mostró que los aromas más importantes de los extractos están presentes en los vinos de forma natural. Sin embargo, algunas zonas podrían aumentar significativamente afectando al aroma del vino.

Por lo tanto, se concluye (i) que es necesaria la selección de otros extractos, y (ii) que es necesario realizar ensayos en vinos reales (y no matriz vínica) para comprobar la verdadera efectividad de los extractos en una matriz mucho más compleja, especialmente en el caso de la olfatometría, ya que el impacto sensorial es determinante para evaluar la calidad de los vinos.

IV-2: Uso de productos ricos en hidroxitirosol procedentes de la industria oleica como alternativas al SO₂ en la elaboración de vinos blancos y tintos

Dados que los resultados de caracterización del extracto de HTE nos indicaba que este extracto no era el más adecuado para remplazar al SO₂ en vinos, se prosiguió con la búsqueda de otros productos ricos en HT. De acuerdo a sus características físicas y químicas se seleccionaron dos productos ricos en HT (HTB® y HTG®).

Los productos seleccionados fueron:

- (i) **HTB®**: un producto de HT con una riqueza mayor del **97%** producido por síntesis química y enzimática que fue suministrado por Seprox, Biotech (Murcia, España). HTB® ha sido reconocido como ingrediente GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro) por la American Food and Drug Administration (FDA). La elección de este producto, a pesar de no proceder de un subproducto, fue debido a su alta riqueza en HT, ser incoloro, no poseer aroma y ser fácilmente soluble.
- (ii) **HTG®**: un producto natural de residuos de oliva (orujo), con una riqueza del **27.2%** en HT, 5-10% de otros fenólicos (5% tirosol), 0.1-1.0% de flavonoides (Hytolive®, Genosa I+D, Malaga, España). El producto era un líquido meloso de color pardo oscuro. La elección de este producto fue debido a que presentaba buenas propiedades, entre ellas menor aroma y densidad y gran solubilidad en mezclas hidroalcohólicas.

En la *Figura 4.3* se muestra el perfil cromatográfico de ambos productos

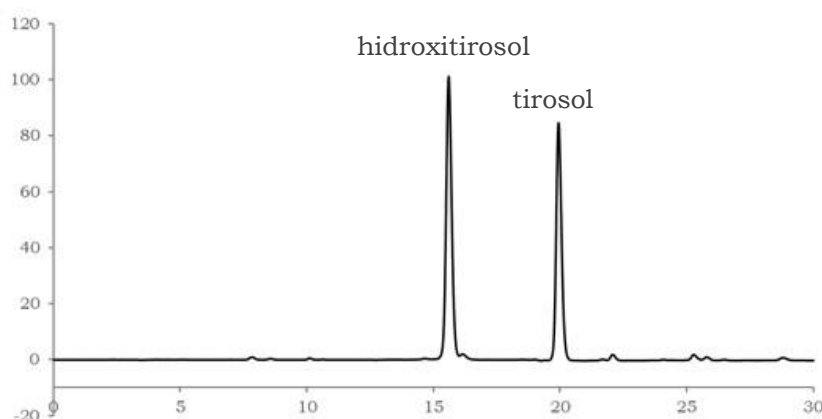
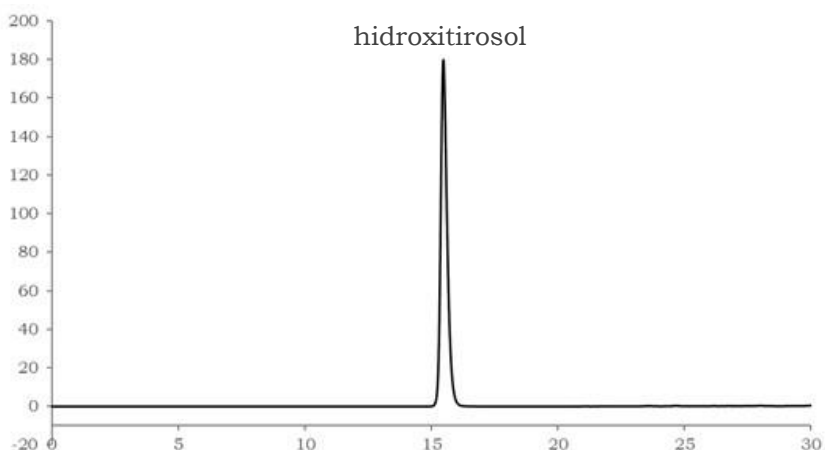


Figura 4.3. Cromatograma obtenido por HPLC-Fl del producto rico en hidroxitirosol HTB (A) y HTG (B). Las condiciones fueron: 279 nm de excitación, 631 nm de emisión hasta el minuto 17 donde cambió a 278 nm de excitación y 598 nm de emisión

Además, con el fin de generalizar los resultados se utilizaron distintos métodos de vinificación. En concreto, los vinos tintos se elaboraron mediante el método tradicional y método Ganimede (**Publicación 3**), y los vinos blancos se elaboraron mediante el método tradicional y en condiciones reductoras (**Publicación 4**).

La calidad de los vinos obtenidos fue evaluada en diferentes fases de la vinificación, tras la adición del conservante, en el embotellado y a los 6 meses de embotellado. Los parámetros relacionados con la calidad de vinos que se evaluaron fueron:

1. Parámetros enológicos
2. Parámetros relacionados con el color
3. Compuestos volátiles: ésteres, alcoholes y ácidos grasos.
4. Perfil olfatométrico
5. Análisis sensorial

Estos resultados, a su vez, se comparan con un control en el que se utilizó el SO₂.

A continuación, se presentan los resultados de este estudio y la comparación entre los productos y los métodos de elaboración. Parte de los resultados obtenidos, se presentan en forma de dos publicaciones: Publicación 3 y Publicación 4

PUBLICACIÓN 3. “Efecto de extracto rico en hidroxitirosol sobre la calidad de vinos tintos sin SO₂”

Rafaela Raposo, María José Ruiz-Moreno, Teresa Gardé-Cerdán, Belén Puertas, José Manuel Moreno-Rojas, Ana Gonzalo-Diago, Raúl F. Guerrero, Víctor Ortiz, Emma Cantos-Villar (2016). *Effect of hydroxytyrosol on quality of sulfur dioxide-free red wine*. Food Chemistry 192, 25–33.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.085>



Effect of hydroxytyrosol on quality of sulfur dioxide-free red wine



R. Raposo^a, M.J. Ruiz-Moreno^b, T. Garde-Cerdán^c, B. Puertas^a, J.M. Moreno-Rojas^b, A. Gonzalo-Diago^c, R.F. Guerrero^a, V. Ortiz^b, E. Cantos-Villar^{a,*}

^aInstituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro Rancho de la Merced, Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural (CAPDR), Junta de Andalucía, Cra Trebujena, km 2.1, 11471 Jerez de la Frontera, Spain

^bInstituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro Alameda del Obispo, Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural (CAPDR), Junta de Andalucía, Avd Menéndez Pidal, 14004 Córdoba, Spain

^cInstituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV), Gobierno de La Rioja-CSIC-Universidad de La Rioja, Ctra. Burgos, Km. 6. Finca La Grajera, 26007 Logroño, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 March 2015

Received in revised form 18 June 2015

Accepted 23 June 2015

Available online 27 June 2015

Keywords:

Hydroxytyrosol

Quality wine

Color

Aroma

Sensorial

Olfactometry

ABSTRACT

In this work, the feasibility of two commercial products enriched in hydroxytyrosol (HT) as alternative to sulfur dioxide in Syrah red wines was evaluated. The HT enriched products came from synthesis and from olive waste. Wines treated with HT were compared with wines treated with sulfur dioxide at two wine-making stages: bottling and after 6 months of storage in bottle. Minor differences were found in enological parameters and volatile composition (esters, alcohols and acids). Significant differences were observed in color related parameters and sensory analysis. HT wines improved color parameters as well as scents and tasting at bottling. However, after 6 months of storage in bottle HT wines were more oxidized than SO₂ wines. The olfactometry profile of HT wines supported sensory analysis. HT wines showed new odorant zones from both the added product and oxidation.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The most widely preservative used in the wine industry is sulfur dioxide (SO₂). Its antioxidant and antimicrobial properties make it essential nowadays. SO₂ has been used to inhibit polyphenol oxidase activity during winemaking, as well as to control the onset of undesirable fermentations such as acetic or malolactic fermentation (Guerrero & Cantos-Villar, 2015). However, the use of SO₂ has also drawbacks. Several human health risks, including dermatitis, urticarial, angioedema, diarrhea, abdominal pain, bronchoconstriction and anaphylaxis, have been associated with SO₂. Furthermore, it is also important to reduce the amount of SO₂ in wine since this compound is found in many food products as a food preservative and the amount consumed is accumulative in the organism (Vally, Misso, & Madan, 2009). In sulfite-sensitive individuals, allergic reactions could be severe, since SO₂ derivatives can cause the activation of proto-oncogenes, inactivation of tumor suppressor genes, and even can play a role in the pathogenesis of SO₂ associated lung cancer. Thus, increasingly, consumers have been clamoring for natural, organic alternatives as opposed to the chemical preservatives present in wine. In fact, there are

negative perceptions of sulfites and willingness to pay for non-sulfited wines (Costanigro, Appleby, & Menke, 2014).

From an enological point of view, SO₂ can produce organoleptic alterations in the final product, neutralize the aroma and even produce characteristic aroma defects (Ribereau-Gayon, Dubourdieu, Doneche, & Lonvaud, 2006). Additionally, only molecular SO₂ (a fraction of the free sulfite present) possesses antioxidant and antimicrobial properties and its percentage depends on the wine pH. High pH decreases its proportion, and therefore its effectiveness.

Some emerging technologies, also called green technologies, have been proposed as possible alternatives to SO₂. Pulsed electric field, ultrasounds, high pressure and ultraviolet light have been tested in wines. However, it is still necessary to validate the applicability of these technologies in wineries. Some chemical compounds have been also investigated: colloidal silver complex, dimethyl dicarbonate, ascorbic acid, hypophosphorous acid, thioldipropionic acid, Trolox C, stannous chloride, and Sporix, sodium hypochlorite and even natural products such as lysozyme and bacteriocins (Santos, Nunes, Saraiva, & Coimbra, 2012). However, there is not currently any substance or treatment that substitutes entirely the use of SO₂.

Hydroxytyrosol (HT) is a phenyl ethyl alcohol which shows high antioxidant and antimicrobial capacity. HT is naturally found in red

* Corresponding author.

E-mail address: emma.cantos@juntadeandalucia.es (E. Cantos-Villar).

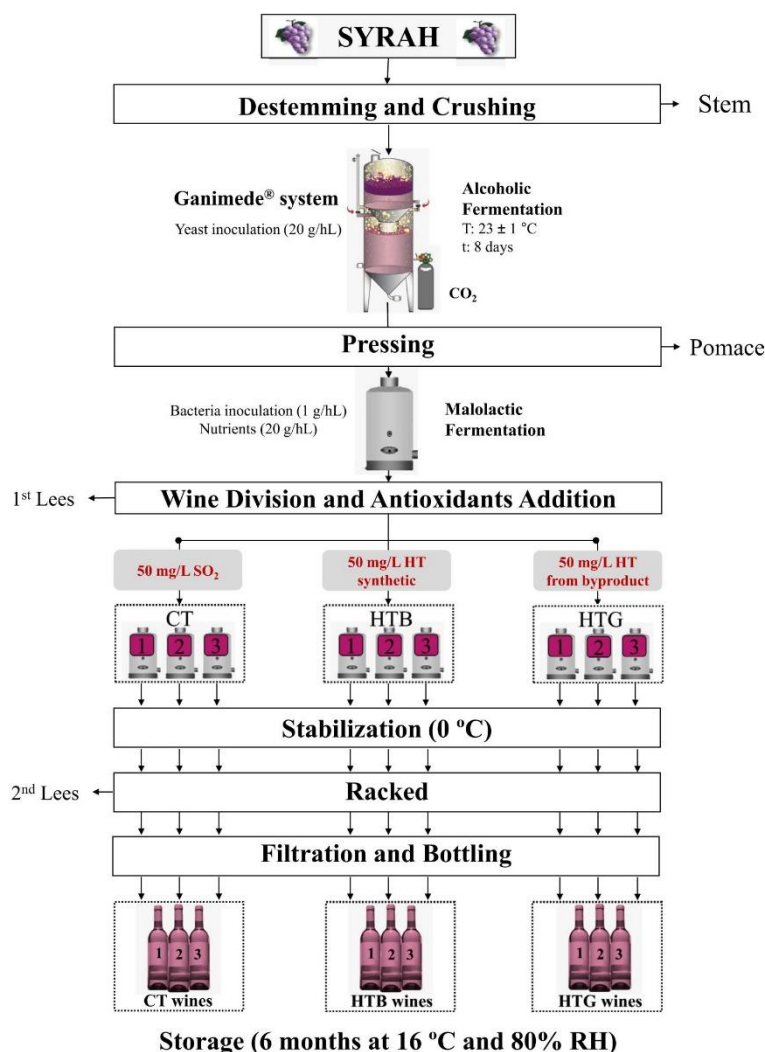


Fig. 1. Diagram of the winemaking process Syrah wines.

temperature program was as follows: 40 °C for 5 min, then raised up to 220 °C at a rate of 3 °C/min. The carrier gas was nitrogen at a flow rate of 3 mL/min. Injector temperature was 220 °C and detector temperature was 280 °C. Identification of compounds was carried out by comparison of their retention times with those of pure reference standards using a Hewlett-Packard GCD Series II Gas Chromatograph Electron Ionization Detector with the same chromatographic conditions. Quantification of volatile compounds was performed using an internal standard method and was based on calibration curves of respective standards in a 12% ethanol (v/v) solution at pH 3.6. These standard solutions underwent the same process of extraction as the wine samples.

2.8. Sensory analysis

In order to study the existence of differences, a triangular test (ISO Standard 4120:1983) was employed (ISO, 1983). Moreover,

descriptive sensory analysis was performed following the Sensory Profile Method according to standard ISO 6564:1985 (ISO, 1985) by 11 judges. The descriptors were scored on a scale of 1–10 (1: absence of a descriptor, 10: maximum intensity). The descriptors were the most likely to be affected by the winemaking process: aroma intensity, fruity aromas (red, black, mature fruits), spicy, savor intensity, acidity, bitter, heat, astringent, balanced and persistence.

2.9. Gas chromatography–olfactometry analyses (GC–O)

GC–O analyses were carried out in wines storage for 6 months in bottle using a Varian 3800 GC (Middelburg, The Netherlands) equipped with an FID and an OP275 olfactometer (GL Science Inc., Tokyo, Japan). The sample extraction and method followed has been described by authors (Sarrazin, Dubourdieu, & Darriet, 2007). 1 µL of extract was injected in splitless mode, using a split

time of 1 min. The columns used were DB-WAX and DB-5 from J&W Scientific, Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, California, USA), 60 m × 0.25 mm with 0.25 µm film thickness. The sensory panel was composed of three trained tasters, who sniffed each sample three times. Results were expressed as “modified frequency” MF (%) with the formula proposed by Dravnieks (1985).

For GC–MS analysis 1 µL of extract was injected in a Trace GC Ultra gas chromatograph (Thermo Fisher Scientific S.p.A., Rodano, Milan, Italy) under the same conditions described above. The detector was a mass spectrometer (ISQ single quadrupole MS, Thermo Fisher Scientific, Austin, Texas, USA) operating in EI mode (70 eV), connected to the GC with a heated transfer line at 230 °C. Mass spectra were taken over the 40–350 *m/z* range. Thermo Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific, San Jose, California, USA) was used for data acquisition. The odorant compounds were identified on the basis of linear retention index and a comparison of MS fragmentation patterns with those of reference compounds or with mass spectra in the NIST 05 mass Spectral library (version 05).

2.10. Statistics

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) on the average values. ANOVA and Least Significant Difference test (Tukey) were carried out with a significance level of $p \leq 0.05$. Statistic version 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA) was used.

3. Results and discussion

3.1. Enological parameters

Enological parameters of wines at bottling are shown in Table 1. No significant differences were found for relative density, ethanol,

Table 1
Enological parameters in Syrah wines at bottling.

	CT	HTB	HTG	LS
Relative density	0.9912 (0.0000)	0.9913 (0.0000)	0.9912 (0.0000)	–
Ethanol (%vol.)	13.78 (0.03)	13.84 (0.04)	13.88 (0.03)	–
Glycerin (g/L)	8.99 (0.05)	8.89 (0.25)	8.96 (0.11)	–
Dry extract (g/L)	21.58 (0.63)	22.05 (0.69)	21.62 (0.34)	–
Total acidity (g/L TH ₂)	4.32 (0.03)	4.33 (0.18)	6.20 (0.01)	–
pH	3.69 (0.02)	3.72 (0.01)	3.71 (0.01)	–
Volatiles acidity (g/L AcH)	0.33 (0.01) ^b	0.37 (0.01) ^b	0.48 (0.05) ^a	**
Acetic acid (g/L)	0.36 (0.01)	0.36 (0.01)	0.37 (0.02)	–
Citric acid (g/L)	0.45 (0.01)	0.46 (0.02)	0.47 (0.00)	–
Tartaric acid (g/L)	1.74 (0.01) ^b	2.07 (0.12) ^a	2.02 (0.09) ^a	**
Malic acid (g/L)	0.14 (0.01)	0.16 (0.01)	0.15 (0.01)	–
Lactic acid (g/L)	2.17 (0.04)	2.27 (0.16)	2.22 (0.09)	–
Succinic acid (g/L)	0.73 (0.02)	0.72 (0.06)	0.71 (0.01)	–
HT (mg/L)	3.92 (0.33) ^b	42.65 (2.05) ^a	42.45 (0.21) ^a	***
Total SO ₂ (mg/L)	42 (1) ^a	3 (1) ^b	3 (1)	***
Free SO ₂ (mg/L)	24 (0)	–	–	***
Anthocyanins (mg/L)	571 (19) ^a	431 (31) ^b	434 (5) ^b	***
Tannins (g/L)	3.74 (0.13) ^a	3.34 (0.17) ^b	3.58 (0.12) ^{a,b}	*
TPI	38.2 (1.2) ^a	34.7 (1.5) ^b	36.9 (1.1) ^{a,b}	*
Na (mg/L)	<10	<	<	–
Ca (mg/L)	<50	<	<	–
K (mg/L)	998 (17) ^a	935 (5) ^b	953 (8) ^b	**
Fe (mg/L)	<1	<	<	–
Cu (mg/L)	<0.5	<	<	–
Zn (mg/L)	<0.5	<	<	–

CT, SO₂ addition wine; HTB, synthetic hydroxytyrosol addition wine; HTG, htylative addition wine; HT, hydroxytyrosol; TH₂, tartaric acid; AcH, acetic acid; TPI, total polyphenol index. Standard deviation between brackets. Different superscript letters (a or b) for the same parameter denote significant differences ($p < 0.05$). Analyses of variance, level of significance (LS): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

glycerin, dry extract, total acidity, pH, acetic acid, citric acid, malic acid, lactic acid and succinic acid. Neither differences in metals (sodium, calcium, iron, copper and zinc) were found. Volatile acidity was higher in HTG wines than in CT and HTB wines. The difference in volatile acidity may be due to the intrinsic variability of the winemaking, as all values were under the legal limit for red wine (OJEU, 479/2008). CT wines showed significant lower tartaric acid and higher potassium than HTB and HTG wines. Regarding antioxidants, only CT wines contained significant concentration of sulfur dioxide, meanwhile HT was present in low amount in CT wines (3.92 mg/L) and around 42 mg/L in wines treated with HT. Therefore, 9% of HT was lost during racking and filtration (50 mg/L added at racking, Fig. 1). Additionally, the concentration of anthocyanins was lower in HT wines, around 25% less than in CT wines. In the case of tannins, its concentration was lower in HTB wines, around 11% less than in CT wines, without significant differences between CT and HTG wines. These results are in agreement with other authors (Izquierdo-Cañas, García-Romero, Huertas-Nebreda, & Gómez-Alonso, 2012; Salaha, Kallithraka, Marmaras, Koussissi, & Tzourou, 2008) who attributed this fact to the extraction capacity of SO₂ during maceration. However, in the present study, SO₂ was not added until the end of malolactic fermentation (Fig. 1) when the solids were separated from the liquid. Thus, it may be due to the inhibition of the oxidation processes by SO₂ rather than its extraction capacity. In concordance with tannins, TPI was also higher for CT wines than for HTB wines, without significant differences between CT wines and HTG wines and neither between both treatments.

3.2. Evolution of color related parameters

The color of red wine is one of the most important quality parameters, and determines sensory evaluation to a significant extent. Generally, it is the first characteristic perceived, and therefore plays a key role in the decision-making process of the consumer. Color related parameters were determined at bottling and after 6 months of storage (Table 2). At bottling, both HTB and HTG wines were significantly different from CT ones. HT wines showed higher color intensity, *a** (redness) and *b** (yellowness), lower *L** (lightness) and hue than CT ones. Thus, at this step of the process, HT wines showed better red wine chromatic parameters than CT ones. The addition of polyphenols to red wine has been widely reported to increase polymerization reaction and thus improve color properties (Alcalde-Eon, García-Estévez, Puente, Rivas-Gonzalo, & Escribano-Bailón, 2014).

However, after 6 months of storage HT wines showed lower color intensity and *a**, and higher hue, *L** and *b** than CT ones. Therefore, at this stage, HT wines were less red, more yellow and oxidized than CT ones. HT might not be able to preserve polyphenols as much as SO₂, and thus, color evolved quicker in HT wines.

Table 2
Color related parameters in Syrah wines.

	Bottling				6 months of storage in bottle			
	CT	HTB	HTG	LS	CT	HTB	HTG	LS
CI	6.56 ^b	9.45 ^a	9.64 ^a	***	9.13 ^a	8.26 ^b	8.26 ^b	***
Hue	0.67 ^a	0.64 ^b	0.62 ^b	***	0.70 ^b	0.83 ^a	0.83 ^a	***
<i>L</i> *	63.34 ^a	54.73 ^b	54.31 ^b	***	53.31 ^b	57.50 ^a	58.36 ^a	***
<i>a</i> *	38.97 ^b	48.13 ^a	48.82 ^a	***	45.16 ^a	39.14 ^b	38.50 ^b	***
<i>b</i> *	2.34 ^b	4.77 ^a	5.04 ^a	***	12.24 ^b	17.25 ^a	15.08 ^a	***
ΔE^*		12.81	13.64			8.88	8.83	

CT, SO₂ addition wine; HTB, synthetic hydroxytyrosol addition wine; HTG, htylative addition wine. CI, color intensity. ΔE^*_{ab} , color differences. Different superscript letters (a or b) for the same parameter denote significant differences ($p < 0.05$). Analyses of variance, levels of significance (LS): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

In fact, it has been reported that sulfur dioxide reduces the rate of anthocyanin loss and slightly reduces polymerization (Picinelli, Bakker, & Bridle, 1994).

In order to establish whether the observed changes in the chromatic parameters were visually relevant, the color differences (ΔE^*) between HT and CT wines were calculated. ΔE^* values ≥ 3 CIELab units have been related to human-eye perceptible differences in color (Martínez et al., 2001). Differences between CT and HT wines at bottling were around 13 CIELab units, meanwhile after 6 months of storage in bottle the differences were around 8 CIELab units, and thus differences were perceptible at both wine-making stages.

Other authors have described an improvement of color parameters when testing alternatives to SO_2 (Garde-Cerdán et al., 2014; Izquierdo-Cañas et al., 2012). Since SO_2 binds to anthocyanins discoloring them, the use of no SO_2 improved color parameters at bottling. However, the key point was to preserve these differences during storage. This is in agreement with Santos et al., 2013, who described how color differences between SO_2 and high pressure treated wines increased with storage.

3.3. Volatile compounds

The volatile compounds determined in Syrah wines were in agreement with those previously described for the Syrah variety (Moreno-Pérez, Vila-López, Fernández-Fernández, Martínez-Cutillas, & Gil-Muñoz, 2013). They were grouped into three categories: esters ($n = 11$, Fig. 2A), alcohols ($n = 9$, Fig. 2B), and fatty acids ($n = 5$, Fig. 2C). The esters composition was not affected by the added antioxidant, with no significant differences between treatments and

control. It is important to highlight this fact because esters are the key compounds for wine aroma, exhibiting floral and fruity odors. Within volatile esters (Fig. 2A), ethyl lactate followed by ethyl acetate were the most abundant compounds, with values above 60 and 48 mg/L, respectively. The concentration of ethyl acetate in the wines was around 50 mg/L, so this ester would contribute positively to wine aroma (Gil, Cabellos, Arroyo, & Prodanov, 2006). Ethyl lactate gives milky notes to wines when its concentration is above 155 mg/L (Gómez-Míguez, Cacho, Ferreira, Vicario, & Heredia, 2007). All wines showed a concentration of this compound below its sensory threshold. Isoamyl and 2-phenylethyl acetates showed a concentration around their sensory thresholds (1 mg/L and 0.25 mg/L respectively), so these compounds could contribute to global wine aroma (Campo, Ferreira, Escudero, & Cacho, 2005). Regarding ethyl esters of fatty acids, the concentration of ethyl hexanoate and ethyl octanoate were above its perception threshold, 0.014 mg/L and 0.005 mg/L, respectively (Ferreira, López, & Cacho, 2000). Ethyl fatty acid esters are known to provide sweet and/or soap odor to the wines.

The total concentration of higher alcohols (Fig. 2B) was the most abundant volatile in all wines. Its total concentration was below 400 mg/L, and thus it can be considered that these compounds have positive contribution to the global aroma (Gil et al., 2006). Significant differences were only found in methionol. Control wines showed higher concentration of methionol than HTB and HTG wines, which did not show significant differences between them. Methionol is synthesized by yeast during fermentation and it is known to be very sensitive to oxidation (Dombre, Rigou, Wirth, & Chalier, 2015). Thus, methionol was more oxidized in absence of SO_2 . Methionol exhibits boiled potato notes and its

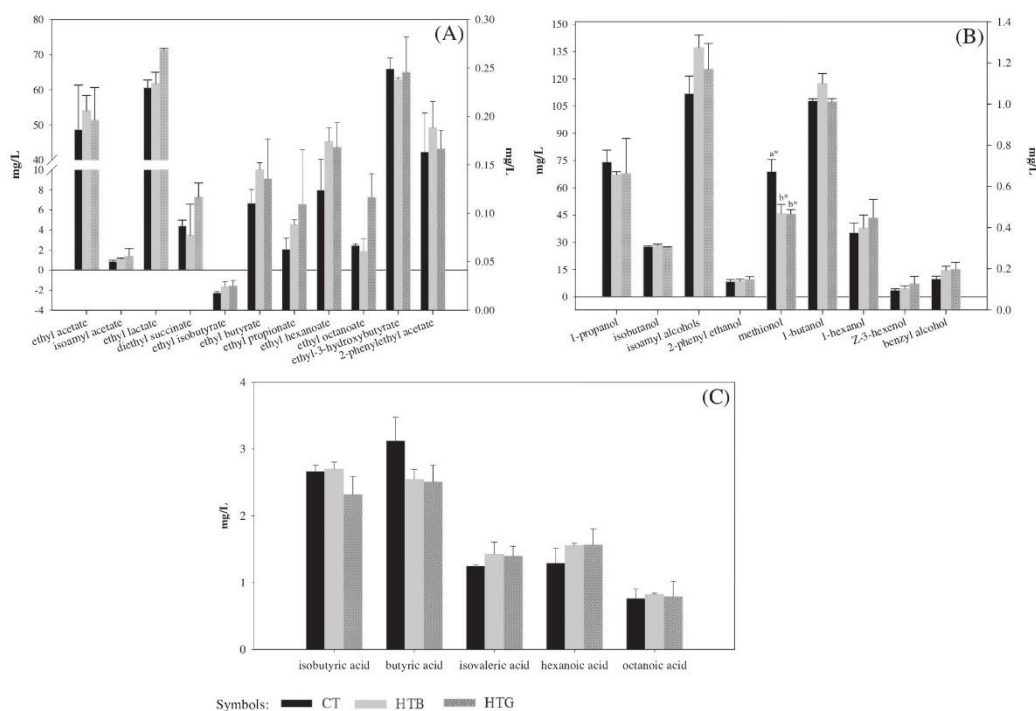


Fig. 2. Volatile compounds determined in Syrah wines, grouped according to similarity in structure: (A) esters, (B) alcohols, (C) acids. CT, SO_2 addition wine; HTB, synthetic hydroxytyrosol addition wine; HTG, hytolive addition wine.

concentration was under the odor threshold in all wines (1 mg/L) (Ferreira, Ortín, Escudero, López, & Cacho, 2002).

The fatty acids did not show significant differences among the wines (Fig. 2C). The most abundant were isobutyric and butyric acids. These compounds contribute to the wine fresh flavor, but they contribute an unpleasant flavor if they are in excess (>20 mg/L). In the present work, wines total fatty acid concentration was below this concentration, and thus that they might have improved wine aroma (Pozo-Bayón et al., 2005).

In agreement with these results, minor differences in wine volatile composition have also been observed by authors who tested other alternatives to SO₂ such as pulsed electric fields (Puértolas, Lopez, Condón, Álvarez, & Raso, 2010), high hydrostatic pressure (Morata et al., 2012) or colloidal silver (Garde-Cerdán et al., 2014). Moreover, some compounds, such as glutathione, caffeic and gallic acids, can inhibit the decrease of some volatile compounds in wines during their storage, and the protective effect of these compounds increased in the presence of 40 mg/L of free SO₂ (Roussis & Sergianitis, 2008). It has been also observed that the mixtures of these compounds can protect several aromatic volatiles of white wines with reduced SO₂ (Roussis, Lambropoulos, & Tzimas, 2007). The results showed that the use of HT as alternative to SO₂ did not modify the global aromatic profile of wines, regardless of their origin. Moreover, HT was able to preserve volatile compounds, but methionol, to the same extent as SO₂.

3.4. Sensory analysis

Wines at bottling showed sensory significant differences as shown in Fig. 3A. HT wines showed higher aroma intensity and more scents of fruit (black fruit and mature fruit) than CT ones, especially in HTB wines. This is in agreement with authors who described greater intensity of the olfactory descriptor in red wines elaborated with colloidal silver complex instead of SO₂ (Izquierdo-Cañas et al., 2012). In fact, it has been described that SO₂ may neutralize aromas (Li, Guo, & Wang, 2008). In contrast, CT wines resulted in higher score in spicy aroma. No wine showed any aromatic defects (dirty, reduced, oxidized, yeast, chemical, rancid, acetic, acetaldehyde or ethyl acetate, data not shown). In taste, CT wines were more balanced and less heat.

After 6 months of storage in bottle, differences among wines changed (Fig. 3B). CT wines achieved higher score in aroma

intensity (black fruit and spicy) than HT ones. Thus, it can be established that HT wine sensory characters, evolved quicker than CT ones independently of the origin. In taste, differences among wines were minimized. Low significant differences were found just for the balanced character, and CT wines more balanced than HT wines. These results were in agreement with Santos et al. (2013), who established that high pressure treatments as an alternative to SO₂ of red wines altered significantly the descriptive sensory analysis of the wines in both aroma and taste (Santos et al., 2013). However, minor differences have been found between wines elaborated with colloidal silver versus sulfur dioxide after 5 month of storage in bottle (Garde-Cerdán et al., 2014).

Moreover, a triangular test to evaluate the differences among CT, HTB and HTG bottled wines was conducted in dark wine glasses to avoid judgments being influenced by wine color. The results showed that differences between three assays could be observed (95% significance level) in olfactometry properties. To examine these aroma differences further, an olfactometric assay was conducted.

3.5. Olfactometric profile

Olfactometric characterization obtained for each wine (CT, HTB and HTG) after 6 months in bottle was listed in Table 3. Overall, more than 80 odoriferous perceptions were detected. To simplify, odorants not reaching a maximum GC–O scores (MF) of 30% were eliminated and considered as noise (Culleré et al., 2013), which reduced the odorant zones to 62.9 of these 62 odorant zones were not identified: LRI_{DB-Wax} 1017, LRI_{DB-Wax} 1402, LRI_{DB-Wax} 1451, LRI_{DB-Wax} 1488, LRI_{DB-Wax} 1611, LRI_{DB-Wax} 1964, LRI_{DB-Wax} 1984, LRI_{DB-Wax} 2300 and LRI_{DB-Wax} 2484–2499. The analysis of variance (ANOVA) performed on olfactometric data allowed to determinate 7 different odoriferous zones (OZs) corresponding to 2,3-butanodione (buttery), ethyl butyrate (fruity), LRI_{DB-Wax} 1351 (popcorn) tentative identified as 2-acetyl-1-pyrroline, LRI_{DB-Wax} 1432 tentative identified as ethyl cyclohexanoate (fruity), LRI_{DB-Wax} 1611 (toasty, burnt), LRI_{DB-Wax} 1667 tentative identified as phenylacetaldehyde (honey) and LRI_{DB-Wax} 1964 (chamomile). It has been recently described that odorants presenting large differences of MF (%) values ($\Delta MF > 40\%$) have acuter role in the perception of aromatic differences among samples (Álvarez-Pérez et al., 2012). Odorants that showed maximum differences on olfactometric scores ($\geq 40\%$ MF) in comparison with the CT ones, were

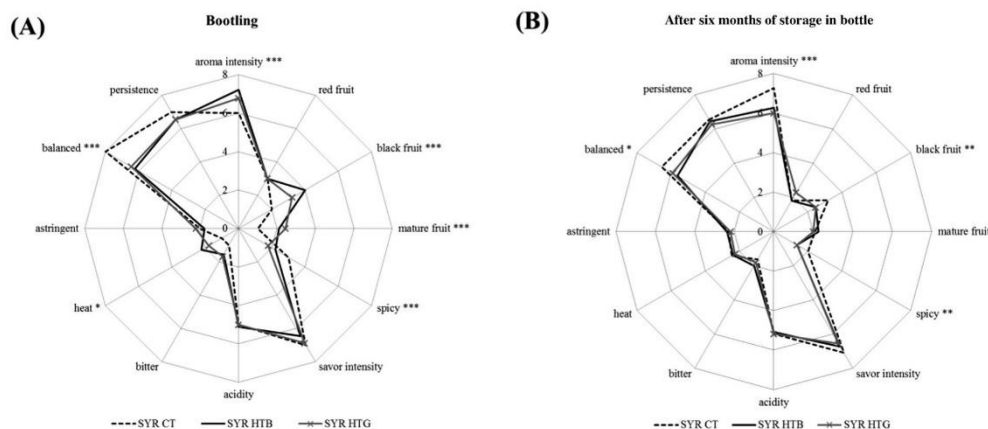


Fig. 3. Cobweb diagram of the sensory score for Syrah wines at bottling (A) and after 6 months of storage (B). CT, SO₂ addition wine; HTB, synthetic hydroxytyrosol addition wine; HTG, htyolive addition wine. Descriptors with * denote significant differences ($p < 0.05$). Analyses of variance, levels of significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Table 3

Odoriferous zones found in Syrah wines after 6 months of storage in bottle. Gas chromatography retention data, identity, odorant description, modified frequency (%) and differences in modified frequency (%) between HT and CT wines.

LRI ¹		Identity	Odorant description	MF (%)			ΔMF (%)		LS
DB-WAX	DB-5			CT	HTB	HTG	HTB-CT	HTG-CT	
<1000	<700	2,3-Butanedione ^b	Butter, lactic	81	67	65	-13	-15	*
1012	754	Isobutyl acetate ^b	Sweet	69	64	60	-4	-9	
1017	-	n.i	Toasty	67	62	55	-5	-11	
1036	793	Ethyl butyrate ^a	Fruity	70	55	65	-15	-5	**
1067, 1082	843, 850	Ethyl 2-methylbutyrate + ethyl 3-methylbutyrate ^b	Fruity	66	60	65	-6	-2	
1095	<700	Isobutanol ^a	Fusel, bitter, green	60	50	62	-10	2	
1107	818	Butyl acetate ^b	Solvent, fruity	44	37	53	-7	9	
1122	873	Isoamyl acetate ^a	Banana	78	67	73	-12	-5	
1144	793	Z-3-hexenal ^b	Grass	47	33	47	-14	0	
1213	730	Isoamyl alcohol ^a	Fusel	90	86	91	-3	2	
1242	996	Ethyl hexanoate ^a	Fruity	82	70	74	-11	-7	
1307	865	2-Methyl-3-furanthiol ^b	Meaty	88	88	87	0	-2	
1351	924	2-Acetyl-1-pyrroline^b	Popcorn	7	73	64	66	57	**
1363	940	4-Mercapto-4-methyl-2-pentanone ^b	Box tree	41	53	45	13	4	
1391	850	Z-3-hexenal ^a	Grass	52	65	62	12	10	
1402	-	n.i	Yeast, rubber, látex	58	56	69	-2	11	
1432	1137	Ethyl ciclohexanoate^b	Fruity	0	0	67	0	67	***
1433	1195	Ethyl octanoate ^a	Fruity	69	71	62	2	-6	
1438	910	2-Furfurylthiol ^b	Coffee	46	52	54	6	8	
1444	<700	Acetic acid ^a	Vinegar	75	76	78	2	4	
1451	-	n.i	Fruity, strawberry	62	50	58	-12	-5	
1465	903	Methional ^b	Baked potatoes	84	79	83	-5	-1	
1488	-	n.i	Latex, sweat	52	50	44	-2	-8	
1515	1147	Z-2-nonenal ^a	Chlorine	74	69	76	-5	2	
1548	1161	3,5-Diethyl-2-methylpyrazine ^b	Baked, sweet	58	52	62	-6	4	
1551	1100	Linalool ^a	Floral, muscat	45	44	40	-2	-5	
1596	1156	(E,Z)-nona-2,6-dienal ^b	Cucumber	60	60	67	0	7	
1611	-	n.i	Toasty, burnt	0	60	0	60	0	***
1627	836	Butyric acid ^a	Cheese	90	93	94	3	4	
1635	1025	2-Acetylpyrazine ^b	Toasty, burnt	73	71	73	-2	0	
1667	1047	Phenylacetaldehyde ^b	Honey	33	53	54	20	21	**
1669	802	3-Methylbutanoic acid ^a	Cheese	91	90	91	-2	0	
1728	979	Methional ^a	Potato	88	91	90	4	2	
1731	1252	3-Mercaptohexyl acetate ^b	Box tree	45	47	55	2	10	
1823	-	2,4,6-Trichloroanisole ^b	Ahumado	30	49	58	19	27	
1827	1261	Phenethylacetate ^b	Roses	58	47	52	-11	-5	
1837	1395	β-Damascenone ^b	Sweet, apple	87	80	90	-7	3	
1847	1002	Hexanoic acid ^a	Pungent	87	93	93	6	6	
1853	1131	3-Mercaptohexanol ^b	Grapefruit	87	83	93	-3	6	
1863	1093	Guaiacol ^b	Phenolic, smoky	69	81	83	13	14	
1894	1355	Ethyl dihydrocinnamate ^b	Sweet, pleasant	74	67	74	-8	0	
1921	1118	2-Phenylethanol ^a	Roses	86	88	91	2	5	
1964	-	n.i	Chamomile	0	0	41	0	41	***
1984	1491	n.i	Fish	41	40	50	-1	9	
2044	1084	Furaneol ^b	Caramel	91	91	91	0	0	
2055	1293	4-Ethylguaiacol ^b	Clove	58	59	65	2	8	
2073	1141	Homofuraneol ^b	Caramel	60	60	71	0	11	
2083	1073–1088	p-Cresol (m-cresol) ^b	Leather, animal	69	68	76	-1	8	
2100	1073	Norfuraneol ^b	Caramel	62	52	60	-11	-2	
2144	1455	Ethylcinnamate ^b	Flowery	71	73	76	2	5	
2171	1474	γ-Decalactone ^b	Peach	69	73	69	4	0	
2174	1371	Eugenol ^b	Clove	62	53	61	-9	-1	
2186	1168	4-Ethylphenol ^b	Leather	51	53	65	2	15	
2203	1320	4-Vinylguaiacol ^b	Phenolic	73	67	76	-6	4	
2205	1124	Sotolon ^b	Curry	91	91	90	0	-2	
2227	-	δ-Decalactone ^b	Coconut	55	47	44	-8	-11	
2234	-	o-Aminoacetophenone ^b	Sweet, smoky	72	56	71	-16	-1	
2261	1199	Abhexone ^b	Curry	46	52	45	6	-1	
2300	1732	n.i	Blackpepper	67	69	71	2	4	
2484–2499	-	n.i	Smoky	58	65	69	7	11	
2553	1258	Phenylacetic acid ^a	Urine, sweet, floral	85	82	88	-3	3	
2569	1411	Vanillin ^b	Vanille	87	86	91	0	5	

CT, SO₂ addition wine; HTB, synthetic hydroxytyrosol addition wine; HTG, tyrosol addition wine. Analyses of variance, levels of significance (LS): **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

In bold odorants with maximum differences on olfactometric scores.

^a Identification based on coincidence of gas chromatography retention on capillary columns and mass spectrometric data with those of pure compounds available in the laboratory or with NIST mass spectrometric library data.

^b Identification based on coincidence of chromatographic retention data on DB-WAX and DB-5 capillary columns and on the similarity of odor previously reported. n.i, not identified compound; MF, modified frequency; ΔMF (%), differences in modified frequency between HT and CT wines.

¹ Linear retention index calculated on DB-WAX and DB-5 capillary columns.

highlighted in bold (Table 3). 2-Acetyl-1-pyrroline (popcorn) was increased in both HT wines with respect to CT wines. 2-Acetyl-1-pyrroline increased its modified frequency in wines prepared in the absence of SO₂, independently of the extract used instead of SO₂. Despite this compound showing a very low threshold (0.1 mg/L), the mousy off-flavor was not detected in the wine (Costello & Henschke, 2002).

HTG wines were characterized by the presence of ethyl cyclohexanoate and an unknown compound (LRI_{DB-Wax} 1964) with fruity and chamomile odorant descriptors respectively. Meanwhile HTB wines were characterized by an unknown compound (LRI_{DB-Wax} 1611) with toasty and burnt odorant descriptors.

Ethyl cyclohexanoate has been considered one of the most important contributors to the sweet-fruity odorants of many aged wines and distillates. It has been suggested that it is formed during oxidation processes (Campo, Cacho, & Ferreira, 2006).

Significant differences were also found in phenylacetaldehyde (honey) between CT and HT wines. Although ΔMF < 40%, this is important considering the nature of the compound. In terms of sensory, fruitiness perception seems to be modulated by phenylacetaldehyde wine content, when it is found in high concentration red wines become less fruity (San Juan, Ferreira, Cacho, & Escudero, 2011). Thus, HT wines might be less fruity, in agreement with sensory analysis after 6 months of storage in bottle (Fig. 3B). A decrease in phenylacetaldehyde levels when sulfur dioxide was added has been described by the authors (Sarrazin et al., 2007).

Finally, it worth to mention that differences in methionol observed by volatile analysis (Fig. 2B) were not supported by olfactometric data (Table 3). It could be due to the high MF found for this compound, which did not allow us to discriminate small changes in odor intensity. In summary, the addition of hydroxytyrosol products modified the olfactometric profile of Syrah wines, introducing: (i) odorants from the added-products, (ii) odorants relates with oxidation.

4. Conclusions

The results indicated that the use of hydroxytyrosol for red wine production without sulfur dioxide hardly modified the enological parameters. Minimal differences were observed among wines regarding to the volatile composition, only methionol was significantly lower in HT wines. However, color-related parameters, sensory analysis and olfactometry analysis were importantly modified. HT wines showed worse chromatic parameters than CT ones after 6 months of storage in bottle. It was supported by sensory analysis. Sensorial differences after 6 months in bottle were supported by olfactometric data. New odorant zones (popcorn, fruitiness, toasty and chamomile scents) appeared in HTB and HTG wines. Moreover phenylacetaldehyde and ethyl cyclohexanoate, which are oxidation related compounds, were significantly increased in HT wines.

The study was initially designed to follow the wine evolution during 1 year of storage in bottle. However, analysis revealed that HT wines were oxidized after 6 months of storage in bottle. This was supported by color related parameters, sensory analysis and olfactometric profile of HT wines. For this reason, the study was stopped at this point.

The key point of the process seemed to be the evolution during the storage in bottle. The combination of those commercial products enriched in hydroxytyrosol during winemaking with some other antioxidant additive (ascorbic acid, low SO₂ concentration, glutathione, tannins, etc.) at bottling should be investigated.

There is a growing community of consumers with a real interest in wines either with a minimum of added sulfites or no sulfites

addition. Producing wines with lower sulfur dioxide using a compound naturally found in wine such as hydroxytyrosol, may provide a healthier wine with added-value since: (i) the amount of SO₂ would be reduced (ii) the concentration of HT, which has recently accepted as protective compound against oxidative damage in humans, would be increased.

Acknowledgments

Authors thank the INIA and FEDER for their financial support (Project RTA2011-00002). Ruiz-Moreno and Guerrero thanks to the European Social Fund (ESF) 2007–2013 “Andalucía se mueve con Europa” for the financial support of their contracts.

References

- Alcalde-Eon, C., García-Estévez, I., Puente, V., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, M. T. (2014). Color stabilization of red wines. A chemical and colloidal approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(29), 6984–6994.
- Álvarez-Pérez, J. M., Campo, E., San-Juan, F., Coque, J. J. R., Ferreira, V., & Hernández-Orte, P. (2012). Sensory and chemical characterisation of the aroma of Prieto Picudo rosé wines: the differential role of autochthonous yeast strains on aroma profiles. *Food Chemistry*, 133(2), 284–292.
- Campo, E., Cacho, J., & Ferreira, V. (2006). Multidimensional chromatographic approach applied to the identification of novel aroma compounds in wine. Identification of ethyl cyclohexanoate, ethyl 2-hydroxy-3-methylbutyrate and ethyl 2-hydroxy-4-methylpentanoate. *Journal of Chromatography A*, 1137, 223–230.
- Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., & Cacho, J. (2005). Prediction of the wine sensory properties related to grape variety from dynamic-headspace gas chromatography–olfactometry data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5682–5690.
- Costanigro, M., Appleby, C., & Menke, S. D. (2014). The wine headache: consumer perceptions of sulfites and willingness to pay for non-sulfited wines. *Food Quality and Preference*, 31, 81–89.
- Costello, P. J., & Henschke, P. A. (2002). Mousy off-flavor of wine: precursors and biosynthesis of the causative N-heterocycles 2-ethyltetrahydropyridine, 2-acetyltetrahydropyridine, and 2-acetyl-1-pyrroline by *Lactobacillus hilgardii* DSM 20176. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7079–7087.
- Culleré, L., Fernández de Simón, B., Cadahía, E., Ferreira, V., Hernández-Orte, P., & Cacho, J. (2013). Characterization by gas chromatography–olfactometry of the most odor-active compounds in extracts prepared from acacia, chestnut, cherry, ash and oak woods. *LWT – Food Science and Technology*, 53(1), 240–248.
- Dombre, C., Rigou, P., Wirth, J., & Chalié, P. (2015). Aromatic evolution of wine packed in virgin and recycled PET bottles. *Food Chemistry*, 176, 376–387.
- Dravnieks, A. (1985). *Atlas of odor character profiles*. Philadelphia, PA: Astm Intl.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. (2011). Scientific opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage. Pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No. 1924/2006. *EFSA Journal*, 9(4), 2033. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2033> [25 pp. <<http://www.efsa.europa.eu/efsajournal>>].
- Fernández-Mar, M. I., Mateos, R., García-Parrilla, M. C., Puertas, B., & Cantos-Villar, E. (2012). Bioactive compounds in wine: resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chemistry*, 130(4), 797–813.
- Ferreira, V., López, R., & Cacho, J. F. (2000). Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(11), 1659–1667.
- Ferreira, V., Ortín, N., Escudero, A., López, R., & Cacho, J. (2002). Chemical characterization of the aroma of Grenache rosé wines: Aroma extract dilution analysis, quantitative determination, and sensory reconstitution studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), 4048–4054.
- Garde-Cerdán, T., López, R., Garijo, P., González-Arenzana, L., Gutiérrez, A. R., López-Alfaro, I., et al. (2014). Application of colloidal silver versus sulfur dioxide during vinification and storage of Tempranillo red wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20(1), 51–61.
- Gil, M., Cabellos, J. M., Arroyo, T., & Prodanov, M. (2006). Characterization of the volatile fraction of young wines from the denomination of origin “Vinos de Madrid” (Spain). *Analytica Chimica Acta*, 563(1–2), 145–153.
- Gómez-Míguez, M. J., Cacho, J. F., Ferreira, V., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2007). Volatile components of Zalema white wines. *Food Chemistry*, 100(4), 1464–1473.
- Guerrero, R. F., & Cantos-Villar, E. (2015). Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. *Trends in Food Science & Technology*, 42(1), 27–43.
- ISO 4120. (1983). *Sensory analysis. Methodology. Triangular test*. Genève, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO 6564. (1985). *Sensory analysis. Methodology. Flavour profile methods*. Genève, Switzerland: International Organization for Standardization.
- Izquierdo-Cañas, P. M., García-Romero, E., Huertas-Nebreda, B., & Gómez-Alonso, S. (2012). Colloidal silver complex as an alternative to sulphur dioxide in winemaking. *Food Control*, 23(1), 73–81.

- Li, H., Guo, A., & Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*, 108(1), 1–13.
- Martínez, J., Melgosa, M., Pérez, M., Hita, E., & Negueruela, A. (2001). Note. Visual and instrumental color evaluation in red wines. *Food Science and Technology International*, 7(5), 439–444.
- Morata, A., Benito, S., González, M., Palomero, F., Tesfaye, W., & Suárez-Lepe, J. (2012). Cold pasteurisation of red wines with high hydrostatic pressure to control *Dekkera/Brettanomyces*: Effect on both aromatic and chromatic quality of wine. *European Food Research and Technology*, 235(1), 147–154.
- Moreno-Pérez, A., Vila-López, R., Fernández-Fernández, J. I., Martínez-Cutillas, A., & Gil-Muñoz, R. (2013). Influence of cold pre-fermentation treatments on the major volatile compounds of three wine varieties. *Food Chemistry*, 139, 770–776.
- OIV (2012). *Recueil des Méthodes Internationales d'Analyse des vins*. Paris: Office International de la Vigne et du Vin.
- OJEU, Council regulation (EC) N° 479/2008 of 29 April 2008.
- Ortega, C., López, R., Cacho, J., & Ferreira, V. (2001). Fast analysis of important wine volatile compounds: Development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts. *Journal of Chromatography A*, 923(1), 205–214.
- Picinelli, A., Bakker, J., & Bridle, P. (1994). Model wine solutions: Effect of sulphur dioxide on colour and composition during ageing. *Vitis*, 33(1), 31–35.
- Piñero, Z., Cantos-Villar, E., Palma, M., & Puertas, B. (2011). Direct liquid chromatography method for the simultaneous quantification of hydroxytyrosol and tyrosol in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11683–11689.
- Pozo-Bayón, M., G-Alegría, E., Polo, M., Tenorio, C., Martín-Álvarez, P., Calvo De La Banda, M., et al. (2005). Wine volatile and amino acid composition after malolactic fermentation: effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8729–8735.
- Puértolas, E., Lopez, N., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2010). Potential applications of PEF to improve red wine quality. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 247–255.
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook of enology: The microbiology of wine and vinifications* (2nd ed.). Chichester: Wiley [Vol. 1].
- Roussis, I. G., Lambropoulos, I., & Tzimas, P. (2007). Protection of volatiles in a wine with low sulfur dioxide by caffeic acid or glutathione. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 274–278.
- Roussis, I. G., & Sergianitis, S. (2008). Protection of some aroma volatiles in a model wine medium by sulphur dioxide and mixtures of glutathione with caffeic acid or gallic acid. *Flavour and Fragrance Journal*, 23, 35–39.
- Ruiz-Moreno, M. J., Raposo, R., Moreno-Rojas, J. M., Zafrilla, P., Cayuela, J. M., Mulero, J., et al. (2015). Efficacy of olive oil mill extract in replacing sulfur dioxide in wine model. *LWT – Food Science and Technology*, 61, 117–123.
- Salaha, M.-I., Kallithraka, S., Marmaras, I., Koussissi, E., & Tzourou, I. (2008). A natural alternative to sulphur dioxide for red wine production: Influence on colour, antioxidant activity and anthocyanin content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8), 660–666.
- San Juan, F., Ferreira, V., Cacho, J., & Escudero, A. (2011). Quality and aromatic sensory descriptors (mainly fresh and dry fruit character) of Spanish red wines can be predicted from their aroma-active chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7916–7924.
- Santos, M. C., Nunes, C., Cappelle, J., Gonçalves, F. J., Rodrigues, A., Saraiva, J. A., et al. (2013). Effect of high pressure treatments on the physicochemical properties of a sulphur dioxide-free red wine. *Food Chemistry*, 141(3), 2558–2566.
- Santos, M., Nunes, C., Saraiva, J., & Coimbra, M. (2012). Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: Review of their potentialities and limitations. *European Food Research and Technology*, 234(1), 1–12.
- Sarrazin, E., Dubourdieu, D., & Darriet, P. (2007). Characterization of key-aroma compounds of botrytized wines, influence of grape botrytization. *Food Chemistry*, 103(2), 536–545.
- Vally, H., Misso, N. L., & Madan, V. (2009). Clinical effects of sulphite additives. *Clinical and Experimental Allergy*, 39(11), 1643–1651.

Discusión IV-2.1: Vinos Tintos de 2013

Con el fin de evaluar la aptitud de dos productos ricos en hidroxitirosol (HTB® y HTG®) en la elaboración de vinos se estudiaron los efectos de su utilización en la elaboración de vinos tintos. Además, se utilizaron dos métodos de vinificación, tradicional y Ganimede®, para comprobar la influencia del método de elaboración y el uso de los productos. Los ensayos realizados se resumen en la *Tabla 4.4*

Tabla 4.4. Ensayos realizados en la vendimia 2013 en vinos Syrah

Antioxidante	mg/L	Método tradicional		Método Ganimedes	
		nomenclatura	réplicas	nomenclatura	replicas
Anhídrido sulfuroso	50	CT	3	G-CT	3
HT sintético (Biotech)	52*	HTB	3	G-HTB	3
Extracto HT (Hytolive)	184*	HTG	3	G-HTG	3

* corresponden a 50 mg/L de hidroxitirosol, teniendo en cuenta 97% de riqueza en HTB® y 27.2 en HTG®.

1. Parámetros enológicos

En la *Tabla 4.5* se recogen los resultados correspondientes a los parámetros enológicos determinados en el embotellado y a los 6 meses del embotellado en los vinos Syrah.

Los productos ricos en HT afectaron significativamente a varios parámetros enológicos, independientemente del método de elaboración: acidez volátil (AV), antocianos, taninos, índice de polifenoles totales (IPT). Respecto a la AV, en el método tradicional, los vinos elaborados con HT mostraron mayores valores de AV, mientras que en el método Ganimede, el vino G-HTG presentó una AV significativamente mayor, aunque en todos los casos estaban por debajo de los límites legales para vino tinto (OJEU,479/2008). El contenido de IPT y antocianos fue menor en los vinos elaborados con HT, siendo aproximadamente un 27% menor por el método tradicional y un 24% menor por el método Ganimede, con respecto a sus controles. Esto puede ser debido a que la presencia del SO₂ mejora la extracción de estos compuestos a la vez que impide la degradación, oxidación y precipitación de antocianinas (He et al., 2012).

Otros parámetros fueron estadísticamente diferentes dependiendo del método de elaboración. Así, los vinos elaborados por el método tradicional y con productos ricos en HT mostraron menores valores de extracto seco, ácido cítrico

y acetaldehído y mayores valores de ácido acético, en concordancia con el valor de AV. El metabolismo del ácido cítrico es usualmente secuencial al ácido málico en el vino durante la FML por *Oenococcus oeni* (Bartowsky & Henschke, 2004). La adición de SO₂ después de la FML ha inhibido el consumo de ácido cítrico en los vinos CT. Respecto al mayor contenido de acetaldehído en vinos CT, se debe a que la presencia de SO₂ provoca una mayor formación de acetaldehído por las levaduras como efecto desintoxicante del SO₂ (Jackowetz, Dierschke, & Mira de Orduña, 2011). Estos parámetros no fueron estadísticamente diferentes en los vinos elaborados por el método Ganimede ya que en este caso la FA fue común para todos los vinos. Sin embargo, los vinos G-HTB y G-HTG mostraron mayores valores de ácido tartárico y menores valores de K, aunque todos estaban dentro de los valores normales para vinos tintos.

Tabla 4.5. Parámetros enológicos en vinos Syrah embotellados

	CT	HTB	HTG	LS	G-CT	G-HTB	G-HTG	LS
grado alcohólico (% vol)	13.83	13.17	13.50	ns	13.78	13.84	13.88	ns
extracto seco (g/L)	23.99 ^a	21.56 ^b	21.98 ^b	**	21.58	22.05	21.62	ns
glicerina (g/L)	8.91	8.72	8.82	ns	9.01	8.89	8.96	ns
acidez total (g/L TH ₂)	4.44	4.56	4.63	ns	4.32	4.33	4.20	ns
pH	3.68	3.69	3.68	ns	3.69 ^c	3.72 ^a	3.71 ^b	***
acidez volátil (g/L AcH)	0.33 ^b	0.54 ^a	0.52 ^a	*	0.33 ^b	0.37 ^b	0.48 ^a	**
ácido acético (g/L)	0.34 ^a	0.48 ^b	0.50 ^b	***	0.36	0.36	0.37	ns
ácido cítrico (g/L)	0.21	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.	n.d.	
ácido málico (g/L)	0.16	0.17	0.16	ns	0.14	0.16	0.15	ns
ácido tartárico (g/L)	2.03	2.16	2.20	ns	1.74 ^b	2.07 ^a	2.02 ^a	**
ácido láctico (g/L)	1.85	2.34	2.22	ns	2.16	2.27	2.22	ns
ácido succínico (g/L)	0.88	0.82	0.87	ns	0.73	0.72	0.71	ns
hidroxitirosol (mg/L)	1.93 ^b	45.00 ^a	43.33 ^a	***	1.93 ^b	47.13 ^a	42.53 ^a	***
SO ₂ libre (mg/L)	21.0	0.0	0.0		24.0	0.0	0.0	
SO ₂ total (mg/L)	45.0	0.0	0.0		42.0	0.0	0.0	
antocianos (mg/L)	592 ^a	420 ^b	441 ^b	**	571 ^a	431 ^b	434 ^b	***
taninos (g/L)	3.96 ^a	3.15 ^b	3.28 ^b	*	3.74 ^a	3.34 ^b	3.58 ^{ab}	*
IPT	40.3 ^a	32.9 ^b	33.4 ^b	*	38.2 ^a	34.7 ^b	36.9 ^{ab}	*
K (mg/L)	1003	970	949	ns	989 ^a	935 ^b	953 ^b	ns
acetaldehído (mg/L)	12 ^a	6 ^b	6 ^b	**	7	7	6	ns

CT, vinos con adición de SO₂; HTB, vinos con adición de hidroxitirosol sintético; HTG, vinos con adición de Hytolive. G-CT, vinos con adición de SO₂ elaborados con el método Ganimede; G-HTB, vinos con adición de hidroxitirosol sintético elaborados con el método Ganimede; G-HTG, vinos con adición de Hytolive elaborados con el método Ganimede. IPT, índice de polifenoles totales. K, potasio. n.d., no detectado. Diferentes letras superíndices (a, b o c) para los mismos parámetros denotan diferencias significativas de acuerdo con el test de Fischer (p < 0.05). Nivel de significación (LS): * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001); ns, no significancia.

2. Parámetros relacionados con el color

Los parámetros de color determinados en el embotellado y después de seis meses de almacenamiento en botella se muestran en la *Tabla 4.6*

En el embotellado, el efecto de los productos de HT sobre el color dependió del método de elaboración. En el método tradicional, la adición de HTG modificó significativamente todos los parámetros relacionados con el color, y HTB sólo afectó a la intensidad colorante (IC). Mientras que en el método Ganimede, ambos afectaron por igual a los parámetros del color. Como consecuencia, los vinos HTG, G-HTB y G-HTG presentaron valores significativos más altos de intensidad colorante, a^* (rojos), b^* (amarillos), y más bajos de luminosidad (L^*) que sus respectivos controles (CT y G-CT). En los vinos CT y G-CT, el SO_2 pueden tener un efecto blanqueador sobre los antocianos libres por la adición nucleófila a la posición C4 del anillo C de los antocianos en el catión flavilium, decreciendo su intensidad colorante (He et al., 2012). Por otra parte, se ha descrito que la adición de productos ricos en polifenoles incrementan las reacciones de polimerización y, por tanto, mejora las propiedades del color (Alcalde-Eon, García-Estévez, Ferreras-Charro, et al., 2014; Gordillo et al., 2014). Por tanto, en el embotellado, el vino HTG, G-HTB y G-HTG mostraron mejores parámetros cromáticos para vinos tintos que los vinos, CT y G-CT. Estos resultados están de acuerdo con otros autores que han descrito la mejora de los parámetros del color en vinos sin SO_2 (Garde-Cerdán et al., 2014; Izquierdo-Cañas et al., 2012).

Después de 6 meses de embotellado, independientemente del método de elaboración, los vinos HT fueron estadísticamente diferentes de su control. Así los vinos HTB y HTG y los vinos G-HTB y G-HTG disminuyeron su IC, la absorbancia a 520 y el valor de a^* (rojos), además mostraron una mayor tonalidad y L^* . Es decir, los vinos HT presentaron peores características cromáticas para un vino tinto.

Las diferencias observadas en los vinos con HT y CT en el embotellado y a los 6 meses fueron perceptibles al ojo humano, de acuerdo a los valores de ΔE^*_{ab} (Martínez et al., 2001).

Tabla 4.6. Parámetros relacionados con el color en vinos Syrah embotellados y tras 6 meses de envejecimiento en botella

embotellado	CT	HTB	HTG	LS	G-CT	G-HTB	G-HTG	LS
A420	0.265 ^b	0.301 ^{ab}	0.348 ^a	*	0.233 ^b	0.326 ^a	0.329 ^a	***
A520	0.467 ^b	0.475 ^{ab}	0.566 ^a	*	0.349 ^b	0.511 ^a	0.529 ^a	***
A620	0.088 ^b	0.094 ^{ab}	0.112 ^a	*	0.074 ^b	0.109 ^a	0.105 ^a	*
IC	7.74 ^b	8.70 ^{ab}	10.27 ^a	*	6.56 ^b	9.45 ^a	9.64 ^a	***
tonalidad	0.62	0.63	0.62	n.s.	0.67 ^a	0.64 ^b	0.62 ^b	***
L*	56.62 ^a	56.57 ^a	50.48 ^b	***	63.34 ^a	54.73 ^b	54.31 ^b	**
a*	46.92 ^b	46.81 ^b	51.83 ^a	**	38.97 ^b	48.13 ^a	48.82 ^a	**
b*	3.57 ^b	4.98 ^b	6.41 ^a	*	2.34 ^b	4.77 ^a	5.04 ^a	*
ΔE*		4.62 ^b	12.49 ^a	**		6.80	7.53	n.s.
6 meses	CT	HTB	HTG	LS	G-CT	G-HTB	G-HTG	LS
A420	0.374	0.304	0.342	n.s.	0.332	0.332	0.331	n.s.
A520	0.564 ^a	0.385 ^b	0.433 ^b	*	0.475 ^a	0.400 ^b	0.398 ^b	***
A620	0.121	0.095	0.106	n.s.	0.107 ^a	0.095 ^b	0.098 ^b	*
IC	10.57 ^a	7.83 ^b	8.81 ^{ab}	*	9.13 ^a	8.26 ^b	8.26 ^b	*
tonalidad	0.67 ^b	0.79 ^a	0.80 ^a	*	0.70 ^b	0.83 ^a	0.83 ^a	**
L*	47.94 ^b	58.61 ^a	55.87 ^a	*	53.31 ^b	57.50 ^a	58.36 ^a	**
a*	50.46 ^a	38.60 ^b	41.58 ^b	**	45.16 ^a	39.14 ^b	38.50 ^b	***
b*	14.01	11.12	14.61	n.s.	12.24	17.25	15.08	n.s.
ΔE*		13.20	12.50	n.s.		12.76	12.99	n.s.

CT, vinos con adición de SO₂; HTB, vinos con adición de hidroxitirosol sintético; HTG, vinos con adición de Hytolive. G-CT, vinos con adición de SO₂ elaborados con el método Ganimede; G-HTB, vinos con adición de hidroxitirosol sintético elaborados con el método Ganimede; G-HTG, vinos con adición de Hytolive elaborados con el método Ganimede. IC, intensidad colorante; ΔE*, diferencias en el color con respecto a la correspondiente muestra control. n.d., no detectado. Diferentes letras superíndices (a o b) para los mismos parámetros denotan diferencias significativas de acuerdo con el test de Fischer (p < 0.05). Niveles de significación (LS): * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001); ns, no significancia

3. Compuestos volátiles: ésteres, alcoholes y ácidos grasos

Los compuestos volátiles determinados en vinos Syrah fueron agrupados en tres categorías: ésteres (acetato de etilo, acetato de etilo, acetato de isoamilo, lactato de etilo, succinato de dietilo, etil-3-hidroxibutirato, 2-feniletil acetato, hexanoato de etilo, butirato de etilo, propionato de etilo, octanoato de etilo), alcoholes (1-propanol, isobutanol, 1-butanol, alcohol amílico, 1-hexanol, Z-3-hexenol, metionol, alcohol bencilo y 2-feniletanol) y ácidos grasos (ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico, ácido hexanoico, ácido octanoico). Por cuestiones de logística, estos compuestos se analizaron a los 4 meses del embotellado.

En la *Tabla 4.7* se recoge la suma total de cada una de las categorías, así como los compuestos que mostraron diferencia significativa en los vinos elaborados

por el método tradicional y por el método Ganimede. Las diferencias encontradas dependieron más del método de elaboración que del conservante utilizado.

Tabla 4.7. Compuestos volátiles en vinos Syrah (mg/L)

	UP (mg/L)	CT	HTB	HTG	LS	G-CT	G-HTB	G-HTG	LS
acetato de etilo	7.50 ¹	57.50	48.33	47.00	n.s.	45.67	45.67	49.33	n.s.
acetato de isoamilo	0.03 ¹	2.76 ^a	1.29 ^b	1.03 ^b	**	0.85	1.38	1.14	n.s.
lactato de etilo	155 ⁴	64.15	68.57	61.52	n.s.	60.60 ^b	71.28 ^a	61.79 ^b	*
2-feniletil acetato	0.25 ¹	0.45 ^a	0.25 ^b	0.20 ^b	*	0.16	0.17	0.19	n.s.
hexanoato de etilo	0.062 ⁶	0.36 ^a	0.23 ^b	0.12 ^c	***	0.12	0.17	0.17	n.s.
butirato de etilo	0.125 ⁶	0.25 ^a	0.16 ^b	0.13 ^b	**	0.11	0.14	0.15	n.s.
octanoato de etilo	0.005 ³	0.13 ^a	0.10 ^{ab}	0.06 ^b	*	0.07	0.12	0.06	n.s.
Σ ESTERES†		133.5 ^a	123.2 ^b	111.3 ^c	**	114.9	124.4	120.1	n.s.
1-propanol	306 ²	53.75 ^b	75.90 ^a	77.35 ^a	*	74.22	67.88	67.28	n.s.
alcohol isoamilo	30.0 ¹	213.1 ^a	163.5 ^b	145.3 ^c	**	111.9	125.5	137.1	n.s.
1-hexanol	8.0 ¹	2.19 ^a	1.34 ^b	1.22 ^b	**	0.38	0.45	0.40	n.s.
Z-3-hexenol	0.40 ¹	0.44 ^a	0.30 ^b	0.25 ^b	*	0.10	0.13	0.10	n.s.
metionol	1.0 ³	0.98	0.78	0.71	n.s.	0.67 ^a	0.47 ^b	0.47 ^b	*
2-feniletanol	14.0 ³	18.74 ^a	13.76 ^b	12.04 ^b	*	8.36	9.63	8.71	n.s.
Σ ALCOHOLES•		299.3	284.9	264.0	n.s.	235.6	245.2	239.0	n.s.
ácido butírico	0.173 ³	1.82 ^b	2.28 ^a	2.22 ^a	*	3.12	2.51	2.46	n.s.
ácido isovalérico	0.334 ³	1.96 ^a	1.60 ^b	1.53 ^b	**	1.25	1.41	1.52	n.s.
ácido hexanoico	0.42 ³	2.94 ^a	2.19 ^b	1.86 ^b	*	1.29	1.56	1.56	n.s.
ácido octanoico	0.50 ³	1.52 ^a	1.07 ^b	0.82 ^b	*	0.76	0.79	0.83	n.s.
Σ ÁCIDOS GRASOS‡		10.25 ^a	9.28 ^b	8.68 ^b	**	8.89	8.93	8.56	n.s.

CT, vinos con adición de SO₂; HTB, vinos con adición de hidroxitirosol sintético; HTG, vinos con adición de Hytolive. G-CT, vinos con adición de SO₂ elaborados con el método Ganimede; G-HTB, vinos con adición de hidroxitirosol sintético elaborados con el método Ganimede; G-HTG, vinos con adición de Hytolive elaborados con el método Ganimede. UP, umbral de percepción olfatométrico. † suma de todos ésteres cuantificados; • suma de todos los alcoholes cuantificados; ‡ suma de todos los ácidos grasos cuantificados. ¹ Guth, 1997, determinado en 12% v/v etanol/agua; ² Peinado, Moreno, Bueno, Moreno, & Mauricio, 2004, determinado en 10% (v/v) etanol/agua, ajustada a pH 3.5 con ácido tartárico; ³ Ferreira, López, & Cacho, 2000, determinado en 11% v/v etanol/agua, 7 g/L glicerina, 5 g/L ácido tartárico a un pH 3.4; ⁴ Etievant, 1991, determinado en 12% v/v etanol/agua; ⁵ Gómez-Míguez, Cacho, Ferreira, Vicario, & Heredia, 2007, calculado en una mezcla de 10% agua/etano, 5g/L de ácido tartárico a pH 3.2; ⁶ Ferreira & San Juan, 2011; ⁷ Pineau, Barbe, Van Leeuwen, & Dubourdiou, 2009, determinado en vinos tintos desaromatizados. Diferentes letras superíndices (a o b) para los mismos parámetros denotan diferencias significativas de acuerdo con el test de Fischer (p < 0.05). Niveles de significación (LS): * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001); ns, no significancia.

En el método Ganimede, los productos ricos en HT no afectaron a los ésteres totales e individuales con una concentración por encima del umbral de percepción. Esto es lógico ya que los ésteres son producidos durante la FA y

este proceso es común en estos vinos (G-CT, G-HTB y G-HTG). Sin embargo, en el método tradicional, la adición de HTB y HTG (antes de la FA) afectó a la composición de los ésteres de los vinos. El vino CT presentó mayor concentración de ésteres totales, seguido del vino HTB y el vino HTG, que presentó menor concentración. Los vinos CT mostraron concentración significativamente mayor y por encima de su umbral de percepción de: acetato de isoamilo, octanoato de etilo, hexanoato de etilo, butirato de etilo, 2-feniletil acetato. Los acetatos de alcoholes superiores y los etil éster de ácidos grasos son importantes en el aroma global y son compuestos claves en el aroma a fruta y dulce en los vinos (Ebeler, 2001; Garde-Cerdán, Jarauta, Salinas, & Ancín-Azpilicueta, 2008). No se encontraron diferencias en los dos esteres mayoritarios, el lactato de etilo y acetato de etilo. El lactato de etilo se encontró por debajo de su umbral de percepción (155 mg/L, (Etievant, 1991) a partir del cual contribuye con notas a leche. En todos los vinos el contenido de acetato de etilo fue inferior a 150 mg/L. Concentraciones superiores confiere olor a vinagre en el vino (Amerine & Roessler, 1983).

Respecto a los alcoholes, la concentración total fue inferior a 300 mg/L en todos los vinos, por lo que contribuyen de manera positiva a la complejidad aromática del vino (Coetzee & du Toit, 2015; Gil, Cabellos, Arroyo, & Prodanov, 2006). Independientemente del método de elaboración, no se encontraron diferencias en el contenido total de alcoholes entre los vinos, aunque si se encontraron diferencias en los alcoholes individuales. En los vinos elaborados por el método Ganimede, sólo se observó diferencia significativa en el metionol. El vino G-CT presentó mayor concentración de metionol respecto a G-HTB y G-HTB. Este compuesto es sensible a la oxidación (Dombre, Rigou, Wirth, & Chalier, 2015), por lo que se puede sugerir que en ausencia de SO₂ pudo haberse oxidado. En el método tradicional, al igual que ocurría con los esteres, la concentración de la mayoría de los alcoholes aumentó cuando había SO₂ durante la FA. Los vinos CT presentaron mayor concentración de alcohol isoamílico, 1-hexanol, Z-3-hexenol y 2-feniletanol y, compuestos que contribuyen al aroma a fruta, floral y hierba (Gómez-Míguez, González-Miret, & Heredia, 2007). En el caso del Z-3-hexenol, se ha descrito que los vinos oxidados presentan menores valores de éste compuesto (Balboa-Lagunero, Arroyo, Cabellos, & Aznar, 2011), esto lleva a sugerir que los vinos HTB y HTG estaban más oxidados. Por otro lado, el contenido de 1-propanol fue mayor en los vinos HTB y HTG. Aunque este

compuesto se ha relacionado con vinos con notas a oxidado (Balboa-Lagunero, Arroyo, Cabellos, & Aznar, 2013), en los vinos se encontró por debajo de su umbral de percepción (306 mg/L, Peinado et al., 2004).

Respecto a los ácidos grasos, los vinos obtenidos mediante el método Ganimede no mostraron diferencias significativas ni en la suma del total de ácidos grasos ni en cada uno de los ácidos grasos cuantificados. En los vinos elaborados por el método tradicional si se observaron diferencias. Los vinos CT mostraron mayor contenido total de ácidos grasos, de ácido hexanoico, ácido isovalérico y ácido octanoico (Garde-Cerdán, Jarauta, et al., 2008). Mientras que la concentración de ácido butírico fue mayor en los vinos HTB y HTG. Todos los ácidos grasos cuantificados presentaron una concentración superior a su umbral de percepción (*Tabla 4.7*). El contenido de ácidos totales en todos los vinos fue inferior a 20 mg/L, y por tanto no modificaron negativamente el aroma del vino y contribuyendo al aroma a fresco en los vinos (Garde-Cerdán, Jarauta, et al., 2008; Pozo-Bayón et al., 2005).

4. Análisis sensorial

El análisis sensorial descriptivo de los vinos se realizó en el embotellado y a los 6 meses de conservación en botella (*Figura 4.4*).

En el embotellado los vinos elaborados con los productos ricos en HT fueron sensorialmente distintos de sus respectivos controles. En el método tradicional los vinos HT se caracterizaron por presentar una mayor puntuación en el atributo fruta pasa, especialmente los vinos HTB, y sensación astringente en boca, especialmente en vinos HTG. En contraste los vinos CT presentaron mayor intensidad aromática, caracterizada por notas a fruta negra, sensaciones amargas y mayor calidez en boca.

Los vinos elaborados con productos de HT mediante el sistema Ganimede (vinos G-HT) se caracterizaron por una mayor intensidad aromática, con notas a fruta negra y madura, notas a especias, y por presentar sensación de calidez en boca, siendo menos equilibrados.

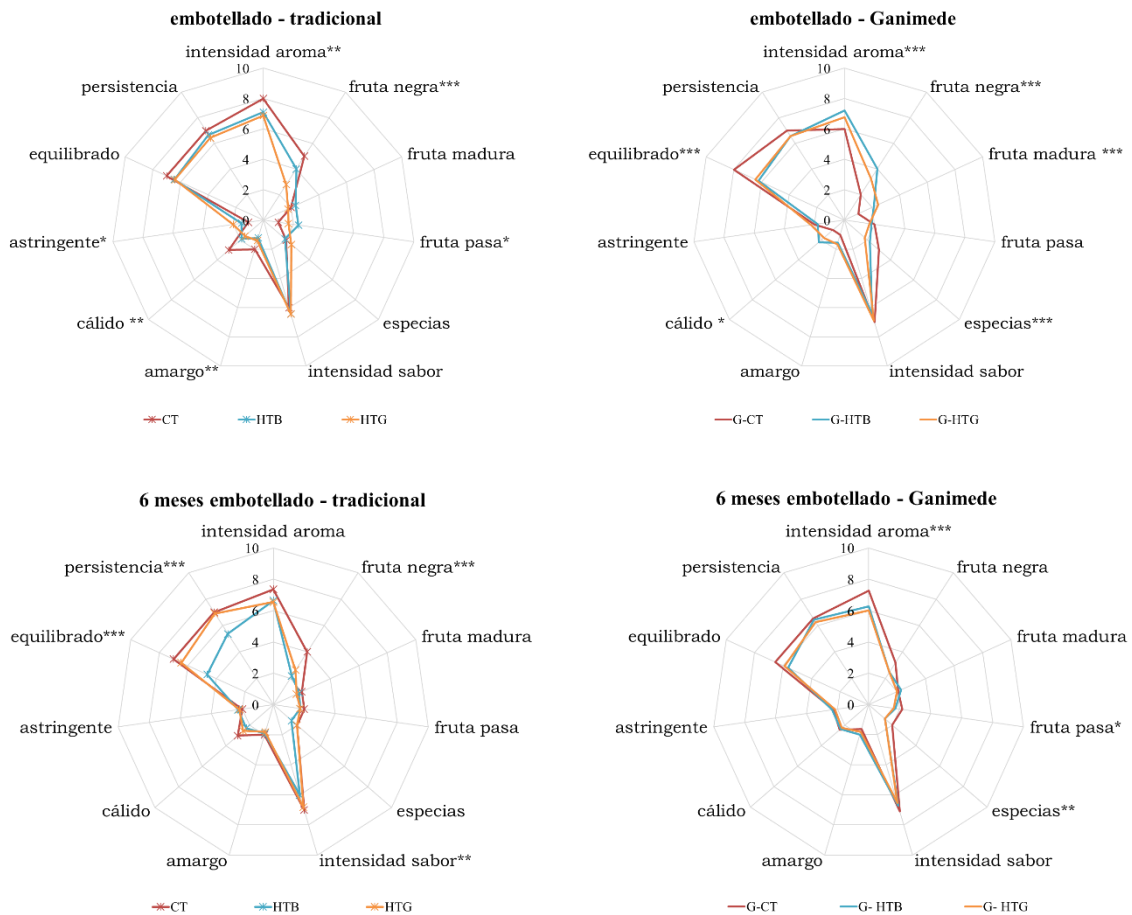


Figura 4.4. Análisis sensorial de vinos Syrah elaborados mediante el método tradicional y método Ganimede, en el embotellado y a los seis meses. Análisis de la varianza de un factor y LSD ($p < 0.05$), niveles de significación (LS): * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$); ns, no significancia

La evolución con el tiempo de envejecimiento en botella (6 meses) fue diferente dependiendo del método de elaboración. En la vinificación tradicional, los vinos HTB presentaron peores puntuaciones en intensidad de sabor, equilibrado y persistencia, respecto a los vinos CT y HTG. Además, los HTB, mostraron defectos en el aroma, tales como sucio y terroso/mohoso (datos no mostrados). Los vinos CT se caracterizaron por importantes notas a fruta negra. En el método Ganimede, los vinos G-HT perdieron intensidad en todos los atributos y presentaron el defecto de aroma a sucio. Mientras que los vinos G-CT se caracterizaron por altas puntuaciones en fruta pasificada, especias. Respecto a las sensaciones en boca, no se encontraron diferencias.

5. Perfil olfatométrico

Se realizó un perfil olfatométrico a los 6 meses de cada uno de los vinos obtenidos por el método Ganimede. Se seleccionaron estos vinos porque en el

análisis sensorial a los 6 meses se describieron muy diferentes de su control (G-CT) sin que el panel asociara esta diferencia a los descriptores utilizados. El panel detectó más de 80 zonas odorantes (ZO's). Para simplificar, sólo se han considerado los odorantes con una frecuencia modificada $FM(\%) \geq 30$, ya que a una FM menor puede ser considerada como ruido (Culleré et al., 2013) (*Tabla 3 de la publicación 3*). Además, se ha descrito que las ZO's que presentan grandes diferencias de frecuencia modificada ($\Delta FM \geq 40\%$) tienen un papel importante en la percepción de las diferencias aromáticas entre muestras (Álvarez-Pérez et al., 2012). En la *Tabla 4.8* se resume las ZO's que muestran las máximas diferencias en frecuencia modificada entre los vinos elaborados con HT y sus respectivos CT.

Tabla 4.8. Zonas odorantes encontrados en vinos Syrah tras seis meses de envejecimiento en botella cuya frecuencia modificada (%) ≥ 40

ZO	LRI ¹		compuesto	Descripción odorante	FM (%)			ΔFM (%)		LS
	DB-WAX	DB-5			G-CT	G-HTB	G-HTG	(G-HTB) - (G-CT)	(G-HTG) - (G-CT)	
1	1351	924	2-acetil-1-pirrolina ^b	palomitas de maíz	7	73	64	66	57	**
2	1432	1137	ciclohexanoato de etilo ^a	fruta	0	0	67	0	67	***
3	1611	-	n.i.	tostado, quemado	0	60	0	60	0	***
4	1964	-	n.i.	manzanilla	0	0	41	0	41	***

G-CT, vinos con adición de SO₂ elaborados con el método Ganimede; G-HTB, vinos con adición de hidroxitirosol sintético elaborados con el método Ganimede; G-HTG, vinos con adición de Hytolive elaborados con el método Ganimede. ¹ Índice de retención lineal calculado en las columnas capilar DB-WAX y DB-5. ^a Identificación basada en la coincidencia de la retención de cromatografía de gases en ambas columnas y datos de espectrometría de masas con los de compuestos puros disponibles en el laboratorio o con datos de la biblioteca de espectrometría de masas NIST. ^b Identificación basada en la coincidencia de los datos de retención cromatográfica en la columna capilar DB-WAX y en la similitud del aroma previamente descrito. n.i., compuesto no identificado. FM, frecuencia modificada; ΔFM (%), diferencia en la frecuencia modificada entre los vinos HT y CT. Análisis de la varianza, niveles de significación: * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001).

Sólo 4 ZO's presentaron una $\Delta FM(\%) \geq 40$, y que fueron consecuencia directa del uso de los productos ricos en HT. En ambos vinos (G-HTG y G-HTB) la **ZO-1** identificada como 2-acetil-1-pirrolina (palomitas de maíz) incrementó notablemente con respecto al vino G-CT. A pesar del bajo umbral de percepción que presenta este compuesto (0,1 µg/L; Costello & Henschke, 2002). No se detectó este aroma desagradable en el análisis sensorial de los vinos

Los vinos G-HTB se caracterizaron por aparición de una **ZO-3**, que no pudo ser identificada con aroma a tostado/quemado. Mientras que, el vino G-HTG se caracterizó por dos nuevas zonas, la **ZO-2** identificada como ciclohexanoato de etilo (fruta), y la **ZO-4** que no pudo ser identificada descrita como manzanilla. El ciclohexanoato de etilo se ha considerado uno de los contribuyentes más

importantes a los aromas olorosos dulces-frutales de muchos vinos envejecidos y destilados. Algunos autores han sugerido que el ciclohexanoato de etilo se forma durante los procesos de oxidación (Campo, Cacho, & Ferreira, 2006).

En resumen, los productos ricos en hidroxitirosol, HTB[®] y HTG[®], utilizados en la elaboración de vinos tintos obtenidos mediante el método tradicional y el método Ganimede: (i) modifica los parámetros enológicos, especialmente la acidez volátil y el contenido de antocianos e IPT; (ii) modifica notablemente el color de los vinos, obteniéndose vinos menos rojos y más amarillos, propios de vinos oxidados después de 6 meses de embotellado (iii) la composición volátil se modificó de forma importante en los vinos elaborados con productos de HT y mediante el método tradicional. Disminuyó el contenido de ésteres y 2-feniletanol y aumentó la concentración de 1-propanol, compuestos relacionados con procesos de oxidación; (iv) modifica el análisis sensorial descriptivo de los vinos, especialmente a los 6 meses de embotellado, apareciendo defectos en el aroma (v) el análisis GC-olfatometría de los vinos elaborados mediante el sistema ganimede, mostró que aunque la mayoría de las zonas odorantes eran comunes con el CT, la utilización de productos con alto contenido de hidroxitirosol modificó el perfil olfatométrico de los vinos Syrah introduciendo nuevas zonas odorantes, algunas de ellas relacionadas con la oxidación.

Este experimento fue planteado para un año en botella, sin embargo, se paró a los 6 meses, dado que los análisis a los 6 meses mostraban una peor calidad de los vinos elaborados con Hidroxitirosol comparado con SO₂, presentado algunos parámetros relacionados con la oxidación.

Se concluye que, a pesar de que los productos ricos en HT seleccionados para este estudio, presentaban a priori buenas propiedades físico-químicas, no son una alternativa real al SO₂.

PUBLICACIÓN 4. “Sustitución del SO₂ por hidroxitirosol en vino blanco: influencia tanto en los parámetros de calidad como en los sensoriales”

Rafaela Raposo, María José Ruiz-Moreno, Teresa Gardé-Cerdán, Belén Puertas, José Manuel Moreno-Rojas, Pilar Zafrilla, Ana Gonzalo-Diago, Raúl F. Guerrero, Emma Cantos-Villar (2016). *Replacement of sulfur dioxide by hydroxytyrosol in white wine: influence on both quality parameters and sensory*. LWT - Food Science and Technology, 65, 214–221.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.005>



Replacement of sulfur dioxide by hydroxytyrosol in white wine: Influence on both quality parameters and sensory



Rafaela Raposo^a, María J. Ruiz-Moreno^b, Teresa Garde-Cerdán^c, Belén Puertas^a, José M. Moreno-Rojas^b, Pilar Zafrilla^d, Ana Gonzalo-Diago^c, Raul F. Guerrero^b, Emma Cantos-Villar^{b,*}

^a Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Rancho de la Merced, Ctra. Trebujena, km 2.1, 11471 Jerez de la Frontera, Spain

^b Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Alameda del Obispo, Avd Menéndez Pidal, 14004 Córdoba, Spain

^c Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino, Gobierno de La Rioja-CSIC-Universidad de La Rioja, Carretera de Burgos Km. 6, Finca La Grajera, 26007 Logroño, Spain

^d Universidad Católica San Antonio, Campus de Los Jerónimos, s/n Guadalupe, 30107 Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 May 2015

Received in revised form

21 July 2015

Accepted 2 August 2015

Available online 5 August 2015

Keywords:

Aroma

Color

Hydroxytyrosol

Olfactometry

Wine quality

ABSTRACT

The feasibility of two hydroxytyrosol commercial products as an alternative to sulfur dioxide (SO₂) in Sauvignon wines was evaluated. The hydroxytyrosol enriched products came from synthesis and olive waste. For this purpose wines elaborated with those products were compared with control ones elaborated with SO₂. Enological parameters, color related parameters, antioxidant activity, volatile compounds, sensory analysis and olfactometric profile were determined in wines. Moreover, the evolution of wines after bottling was evaluated over six months. No significant differences were found in enological parameters and volatile composition (esters, alcohols and acids). However, significant differences were observed in color related parameters, antioxidant capacity, sensory analysis and olfactometric profile. Hydroxytyrosol-enriched wines resulted more colored and with higher antioxidant activity. Their main sensorial attributes did not correspond with the typical for Sauvignon blanc wines, which was related with a decrease in the odor intensity of the volatile thiol 3-mercaptohexyl acetate.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The most widely preservative used in wine industry is sulfur dioxide (SO₂). Its antioxidant and antimicrobial properties make it essential nowadays. SO₂ has been used to inhibit polyphenol oxidase activity during winemaking, as well as to control the onset of undesirable fermentations such as acetic or malolactic fermentation (Guerrero & Cantos-Villar, 2015). However, the use of SO₂ has also drawbacks. Several human health risks, including dermatitis, urticarial, angioedema, diarrhea, abdominal pain, bronchoconstriction and anaphylaxis, have been associated to SO₂. It is important to reduce the amount of SO₂ in wine since this compound is found in many food products as a food preservative and the amount consumed is accumulated in the organism (Vally, Misso, & Madan, 2009). Consequently, the International Organization of Vine and Wine (OIV) has been progressively reducing the

maximum SO₂ recommended concentration authorized in wines, which is nowadays 210 mg/L for white and rosé wines and 160 mg/L for red wines (OIV, 2012). Moreover, SO₂ addition in wine can produce organoleptic alterations in the final product, neutralize the aroma and even produce characteristic aroma defects.

For above reasons the research on alternatives to SO₂ has been enhanced. Some emerging technologies, also called green technologies, have been proposed as possible alternatives to SO₂. Pulsed electric field, ultrasounds, high pressure and ultraviolet light have been tested in wines. However, further research is necessary to know in more detail the effect of those treatments on the sensorial properties of wines, and to validate the applicability of these technologies in wineries. Some chemical compounds have been also investigated: colloidal silver complex, dimethyl dicarbonate, ascorbic acid, hypophosphorous acid, thiodipropionic acid, Trolox C, stannous chloride, Sporix, sodium hypochlorite and even natural products such as lysozyme and bacteriocins (Santos, Nunes, Saraiva, & Coimbra, 2012). Among them, the use of phenolic compounds has been proposed as a promising alternative. For example, enological

* Corresponding author.

E-mail address: emma.cantos@juntadeandalucia.es (E. Cantos-Villar).

tannins combined with lysozyme were added in alcoholic fermentation (Sonni, Cejudo Bastante, Chinnici, Natali, & Riponi, 2009), and rich extracts in polyphenols from almond skin and eucalyptus leave have been proved in Verdejo wines during aging in barrels (González-Rompinelli et al., 2013). However an alternative which completely substitute SO₂ in winemaking has not been found yet.

Hydroxytyrosol (HT) is a phenylethyl alcohol which shows high antioxidant and antimicrobial capacity. HT is naturally found in wine in a wide concentration range. In white wines, values ranged from 1.75 to 45 mg/L (Fernández-Mar, Mateos, García-Parrilla, Puertas, & Cantos-Villar, 2012). HT, among other olive oil polyphenols, has been recently accepted as protective compound against oxidative damage (EFSA, 2011). In a previous study the antioxidant activity, antimicrobial activity and olfactometric profile of an olive mill waste extract with high HT concentration was evaluated (Ruiz-Moreno et al., 2015). It was concluded that the extract was a suitable source of both antioxidants and antimicrobials, although its odorants may contribute negatively to wine. Based on these results, in the current work two different HT extracts, were tested as a possible alternative to SO₂ in white wine.

The aim of this study was to evaluate the feasibility of hydroxytyrosol as an alternative to SO₂ in white wines. Enological quality parameters, color related parameters, antioxidant capacity, volatile composition, olfactometric profile and sensory wine properties were evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Analytical grade methanol and formic acid were supplied by Panreac (Barcelona, Spain). Chemical standards: hydroxytyrosol, Trolox (6-hidroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), 2,20-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), K(OH) solution, dichloromethane (LiChrosolv quality), aroma standards and alkane solution (C7–C40) used for identification were purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Anhydrous sodium sulfate was obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Ultrapure water from a Milli-Q system (Millipore Corp., Bedford, MA) was used throughout this research.

2.2. Hydroxytyrosol commercial products

Two products based on HT were used in the present study. The first, HT product was produced by chemical and enzymatic synthesis with analytical purity (>99%) (Seprox Biotech, Spain), hereinafter called as HTB. It is generally recognized as safe (GRAS). The second one, was a natural extract from olive byproducts, with a richness of 26% HT (Hytolive[®], Genosa I + D, Spain), hereinafter referred as HTG.

2.3. Winemaking

A 600 kg of Sauvignon blanc grapes were harvested, destemmed, crushed and pressed. After pressing, enzymes were added into the must (2.5 mL/hL, Enartis ZYM Blanco L, Italy), dejuiced (24 h at 4 °C) and placed in a 300 L steel vessel, which had been previously filled up with nitrogen. Alcoholic fermentation (AF) was then started after yeasting (Aroma White, Italy). AF was developed during 13 days under control temperature (18 °C). CO₂ was added daily to assure reductive conditions. Afterward, wine was kept cold (15 °C) under nitrogen atmosphere for another 13 days until sugar concentration was under 3 g/L. Then, the wine was divided in three

batches, each one in triplicate. 80 mg/L of SO₂ (Solfosol, Sepsa-Enartis, Spain) were added to CT wines, 80 mg/L of HT synthetic to HTB wines, and 308 mg/L of Hytolive (for 80 mg/L of HT) to HTG wines. This concentration was selected in agreement with antioxidant activity of hydroxytyrosol (Ruiz-Moreno et al., 2015) and previous sensory studies (data not shown).

Wines were stabilized in a cold chamber during two months. Subsequently, the wines of each batch were racked, filtered (Optical XL 10W, Millipore, France) and bottled. Bottled wines were stored under control conditions (16 °C, 80% RH) during 6 months. Sampling was conducted after addition of antioxidants (end of AF), at bottling and after six months of storage in bottle.

2.4. Enological parameters

Density, ethanol, glycerine, dry extract, total and volatile acidity, pH, SO₂, organic acids (acetic, citric, tartaric, malic, lactic and succinic acids) and metals (Na, K, Ca, Cu, Fe and Zn) were determined at bottling following the official analytical methods established by the International Organization of Vine and Wine (OIV, 2012).

2.5. Color related parameters

Color intensity (D.O. 420 nm + D.O. 520 nm) and hue (D.O. 420 nm/D.O. 520 nm) were determined by spectrophotometric measures (Lambda 25, Perkin–Elmer, USA). Colorimetric measurements were registered with a Konica–Minolta CM-3600d spectrophotometer (Osaka, Japan), using 20 mm path length glass cells and distilled water as reference. The CIE Lab parameters (*L*^{*}, *a*^{*}, *b*^{*}) were determined by using the software SpectraMagic v.3.61G (Cyberchrome Inc, Minolta Co. Ltd), following the recommendations of the Commission Internationale de L'Eclairage (CIE): the standard observer (D10°) and the standard illuminant (D65). Color differences (ΔE^*_{ab}) were calculated as the Euclidean distance between two points in the 3D space defined by *L*^{*}, *a*^{*}, and *b*^{*} (Martínez, Melgosa, Pérez, Hita, & Negueruela, 2001).

2.6. HPLC determination of hydroxytyrosol

Hydroxytyrosol was quantified as described by authors (Piñeiro, Cantos-Villar, Palma, & Puertas, 2011). Briefly, 20 µL of must or wine were analyzed by a Jasco high-performance liquid chromatographic system equipped with a diode array detector (model MD-2010), a fluorescence detector (model FP-2020), an HPLC pump module (model PU-2089), a column oven module (model CO-2060) and an auto-sampler module (AS-2050), controlled by Chrompass version 1.8 software.

2.7. Analysis of volatile compounds by gas chromatography

The analysis of wines fermentative volatile compounds was performed by the method described by Ortega, López, Cacho, and Ferreira (2001) with modifications (Garde-Cerdán et al., 2014) after 3 months of bottling. The extracts were injected onto a Hewlett–Packard (Palo Alto, CA) 6890 gas chromatograph equipped with an automatic injector and a Hewlett–Packard FID detector. Separation was carried out with a DB-Wax capillary column (60 m × 0.32 mm I.D. × 0.5 µm film thickness; J&W Scientific, Folsom, CA). The temperature program was: 40 °C for 5 min then raised up to 220 °C at a rate of 3 °C/min. The carrier gas was nitrogen at a flow rate of 3 mL/min. Injector temperature was 220 °C and detector temperature was 280 °C. Identification of compounds was carried out by comparison of their retention times with those of pure reference standards.

2.8. Sensory analysis

Descriptive sensory analysis was performed following the Sensory Profile method according to standard ISO 6564:1985 (ISO, 1985) by 11 judges. The descriptors were scored on a scale of 1–10 (1: absence of a descriptor, 10: maximum intensity). The descriptors most likely to be affected by the winemaking process were: color intensity, tonality, aroma intensity, fruity (citrus, white, tropical, stone and mature fruit), aroma defects (dirty, reduced, oxidized, yeast, chemical, rancid, acetic, acetaldehyde and ethyl acetate), savor intensity, acidity, bitter, heat, astringent, balanced and persistence. Moreover, in order to study the existence of differences among CT, HTB and HTG wines, a triangular test (ISO Standard 4120:1983) was employed (ISO, 1983).

2.9. Gas chromatography-olfactometry analyses

GC analyses were carried out in wines stored 6 months in bottle using a Varian 3800 GC (Middelburg, The Netherlands) equipped with a FID and an OP275 olfactometer (GL Science Inc., Tokyo, Japan). 1 μ L of extract was injected in splitless mode, being 1 min the splitless time. The columns used were DB-WAX and DB-5 from J&W Scientific, Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, California, USA), 60 m \times 0.25 mm with 0.25 μ m film thickness. The sample extraction and method followed has been described by authors (Sarrazin, Dubourdiou, & Darriet, 2007). The sensory panel was composed of three trained tasters, who sniffed each sample three times. Results were expressed as “modified frequency” MF (%) with the formula proposed by Dravnieks (1985).

For GC–MS analysis 1 μ L of extract was injected in a Trace GC Ultra gas chromatograph (Thermo Fisher Scientific S.p.A., Milan, Italy) under the same conditions described above. The detector was a mass spectrometer (ISQ single quadrupole MS, Thermo Fisher Scientific, Austin, Texas, USA) operating in EI mode (70 eV), connected to the GC with a heated transfer line at 230 °C. Mass spectra were taken over the 40–350 m/z range. Thermo Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific, San Jose, California, USA) was used for data acquisition. The odorant compounds were identified on the basis of linear retention index and a comparison of MS

fragmentation patterns with those of reference compounds or with mass spectra in the NIST 05 mass Spectral library.

2.10. Statistics

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) on the average values. ANOVA and Least Significant Difference test (Tukey) were carried out with a significance level of $p \leq 0.05$. Statistic version 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA) was used.

3. Results and discussion

3.1. Enological parameters

In Table 1 enological parameters of wines at bottling are shown. No significant differences were found for density, ethanol, glycerine, pH, total and volatile acidity, acetic acid, citric acid, malic acid, lactic acid and succinic acids. No differences in metals (sodium, calcium, iron, copper and zinc) were found. Wines elaborated with HT (HTB and HTG) showed higher dry extract than CT wines, probably due to tartaric acid. CT wines showed small but significant lower tartaric acid and potassium than HTB and HTG wines. Regarding antioxidants, only CT wines contained free sulfur dioxide. HT was present in low amount in CT wines and around 80 mg/L in wines elaborated with HT (HTB and HTG), which meant that HT was not lost during racking and filtration. Thus, it can be concluded that minimal differences were observed among wines with regards to enological quality parameters. This is in agreement with authors (Izquierdo-Cañas, García-Romero, Huertas-Nebreda, & Gómez-Alonso, 2012), who studied the use of colloidal silver complex instead of SO₂ in the elaboration of Merseguera white wines. The authors found small but significant differences in alcohol, total and volatile acidity, as well as in malic and citric acids. In contrast, higher differences respect to the control were found in pH and total acidity of Parellada white wines when pulsed electric fields were used to stabilize them (Garde-Cerdán, Marsellés-Fontanet, Arias-Gil, Ancín-Azpilicueta, & Martín-Belloso, 2008).

Enological parameters permit to confirm that wine comply with

Table 1
Enological parameters of Sauvignon blanc wines at bottling.

	CT	HTB	HTG	LS
Density relative	0.9907 (0.0001)	0.9908 (0.0000)	0.9908 (0.0000)	–
Ethanol (%vol)	12.87 (0.03)	12.88 (0.03)	12.85 (0.01)	–
Glycerine (g/L)	4.95 (0.04)	5.02 (0.03)	4.99 (0.05)	–
Dry extract (g/L)	15.18 (0.06) ^b	15.63 (0.09) ^a	15.69 (0.12) ^a	**
Total acidity (g/L TH ₂)	6.44 (0.01)	6.69 (0.08)	6.65 (0.16)	–
pH	2.98 (0.03)	2.95 (0.00)	2.96 (0.01)	–
Volatile acidity (g/L ACh)	0.30 (0.01)	0.29 (0.01)	0.28 (0.02)	–
Acetic acid (g/L)	0.24 (0.01)	0.23 (0.01)	0.24 (0.01)	–
Citric acid (g/L)	0.45 (0.01)	0.46 (0.02)	0.47 (0.00)	–
Tartaric acid (g/L)	3.13 (0.06) ^b	3.42 (0.03) ^a	3.43 (0.01) ^a	***
Malic acid (g/L)	2.32 (0.08)	2.47 (0.06)	2.44 (0.07)	–
Lactic acid (g/L)	0.07 (0.02)	0.11 (0.01)	0.09 (0.01)	–
Succinic acid (g/L)	0.45 (0.01)	0.44 (0.01)	0.44 (0.00)	–
HT (ppm)	3.92 (0.33) ^b	82.35 (0.94) ^a	74.16 (1.48) ^a	***
Total SO ₂ (mg/L)	65 (1)	6 (1)	6 (1)	***
Free SO ₂ (mg/L)	13 (0)	–	–	***
Na (mg/L)	<10	<10	<10	–
Ca (mg/L)	<50	<50	<50	–
K (mg/L)	418 (5) ^c	436 (6) ^b	450 (4) ^a	***
Fe (mg/L)	<1	<1	<1	–
Cu (mg/L)	<0.2	<0.2	<0.2	–
Zn (mg/L)	<0.5	<0.5	<0.5	–

CT, SO₂ addition wine; HTB, synthetic hydroxytyrosol addition wine; HTG, hydroxytyrosol addition wine; HT, hydroxytyrosol; TH₂, tartaric acid; ACh, acetic acid. Standard deviation between brackets. Different superscript letters (a, b or c) for the same parameter denote significant differences ($p < 0.05$). Analyses of variance, level of significance (LS): * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

legality and quality standards. Twenty one enological parameters were analyzed. Only dry extract, tartaric acid and potassium were significantly different. However, they were within legal, quality and usual range in white wines.

3.2. Evolution of color related parameters

Significant differences were observed in wine color (Table 2, end AF). HTB and HTG wines showed higher color intensity (CI), a^* and b^* than CT wines. Meanwhile hue resulted lower in HTB and HTG wines than in CT wines. Higher a^* and b^* values in HT wines implied wines less green and more yellow in relation to CT wines. Differences were similar to those found at “end AF” for all parameters except for L^* at bottling. HT wines resulted darker (lower L^*) than CT wines. Wine color parameters, especially color intensity, evolved during the storage in bottle (6 months) in all assays. a^* Decreased and b^* increased during the aging according with other authors (Boido, Alcalde-Eon, Carrau, Dellacassa, & Rivas-Gonzalo, 2006). In HT wines b^* increased importantly whereas differences in a^* among wines disappeared with storage.

In order to establish whether the observed changes in the chromatic parameters were visually relevant, the color differences (ΔE^*) between HT and CT wines were calculated. ΔE^* values ≥ 3 CIELab units have been related to human-eye perceptible differences in color (Gómez-Míguez et al., 2007). Differences at the end of AF were lower than 3; at bottling differences were lower than 3 only for HTB wines; after 6 months of storage in bottle, the differences were higher than 3 in both HTB and HTG wines ($\Delta E^*_{ab} = 4.38$ and 5.60 CIELab units, respectively). Other authors have described important differences in wine color when alternatives to SO_2 were tested (Falguera, Forms, & Ibarz, 2013; Izquierdo-Cañas et al., 2012). Izquierdo-Cañas et al. (2012) determined color parameters in bottled wines. White wines treated with colloidal silver complex changed importantly the coordinates CIELab. Falguera et al. (2013) also described high differences when compared color parameters of irradiated wines with control ones. As far of our knowledge, it is the first time when studying alternatives to SO_2 that the evolution of white wine color with storage in bottle has been described.

3.3. Volatile compounds

The volatile compounds were grouped into 3 categories (Fig. 1): esters ($n = 12$), alcohols ($n = 9$) and fatty acids ($n = 6$). Within esters (Fig. 1A), ethyl acetate followed by ethyl lactate were the most abundant, which values above 15 and 5 mg/L, respectively. Only ethyl lactate showed significant differences due to the added antioxidant. This ester provides milky notes to wines and is responsible for the volume sensation of wines. Nevertheless, ethyl lactate concentration in white wines is low and it was present below of its perception threshold (Campo, Ferreira, Escudero, &

Cacho, 2005). Acetate ester of higher alcohols, mainly isoamyl acetate and 2-phenylethyl acetate, and ethyl esters of fatty acids, mainly ethyl hexanoate and ethyl octanoate were not affected by the type of antioxidant used during the storage in bottle. These compounds are considered important contributors to young wine aroma and exhibit floral and fruity odors. Isoamyl acetate was found in the wine at concentrations close to its perception threshold (1 mg/L) and 2-phenylethyl acetate at concentrations above its threshold level (0.25 mg/L). Regarding ethyl esters of fatty acids, the concentration of ethyl hexanoate was above its perception threshold (0.08 mg/L) while the concentration of ethyl octanoate was below of its perception threshold (0.58 mg/L) (Peinado, Moreno, Bueno, Moreno, & Mauricio, 2004).

The alcohols (Fig. 1B) showed significant differences due to the antioxidant only in methionol, isoamyl alcohols, and 2-phenylethanol. Control wines showed lower concentration of methionol than HTB and HTG wines, which did not show significant differences between them. Methionol is synthesized by yeast during fermentation and it is known to be very sensitive to oxidation (Dombre, Rigou, Wirth, & Chaliier, 2015). Thus, methionol was more oxidized in absence of SO_2 . Methionol exhibits boiled potato notes and its concentration was under the odor threshold in all wines (1 mg/L) (Ferreira, Ortín, Escudero, López, & Cacho, 2002). In the case of isoamyl alcohols, control wines had higher concentration of these compounds than HT wines, once again, with no differences between them. The concentration of 2-phenylethanol was higher in control than in HTG wines, without showing significant differences with HTB wines. Total alcohol content was significant lower in wines without SO_2 . This result agrees with Garde-Cerdán and Ancín-Azpilicueta (2007) and Sonni et al. (2009) who found that the suppression of SO_2 caused a decrease on the total alcohol content in wines. Alcohols have intense odors that play a role in wine aromas. At low concentrations (less than 300 mg/L), they contribute to the wine aromatic complexity. At high levels, their penetrating odors mask the wine aromatic finesse. The concentration of total alcohols in wines was below to 300 mg/L, so these compounds probably enhanced the wine aroma.

Few differences were found for fatty acids (Fig. 1C). Only butyric acid was affected by the added antioxidant. Its concentration was lower in HTG wines than in CT and HTB wines. Other authors did not find differences in the concentration of fatty acids after 3 months of white wines aging in bottle with and without SO_2 (Garde-Cerdán & Ancín-Azpilicueta, 2007). Fatty acids contribute to the fresh flavor of wine, but, in excess, (>20 mg/L), became an unpleasant flavor, impairing wine aroma (Pozo-Bayón et al., 2005). They also help to modify the perception of other taste sensations.

Minor differences in wine volatile composition have been also described by authors who tested other alternatives to SO_2 such as pulsed electric fields (Garde-Cerdán et al., 2008), plant phenolic extract (González-Rompinelli et al., 2013) and colloidal silver

Table 2
Color related parameters in Sauvignon blanc wines.

	End AF				Bottling				6 Months of storage			
	CT	HTB	HTG	LS	CT	HTB	HTG	LS	CT	HTB	HTG	LS
CI	0.044 ^a	0.059 ^b	0.063 ^a	***	0.032 ^c	0.067 ^b	0.072 ^a	***	0.060 ^b	0.099 ^a	0.110 ^a	***
Hue	6.299 ^a	3.811 ^b	3.833 ^b	***	5.344 ^a	4.803 ^b	4.593 ^b	***	5.17 ^a	4.329 ^b	4.309 ^b	**
L^*	98.06	97.42	97.22	—	99.11 ^a	98.38 ^b	98.03 ^b	***	98.53 ^a	97.14 ^b	96.56 ^b	***
a^*	-1.35 ^b	-0.79 ^a	-0.80 ^a	***	-1.30 ^b	-1.09 ^a	-1.06 ^a	***	-1.26	-1.29	-1.26	—
b^*	6.26 ^b	8.52 ^a	9.00 ^a	***	5.25 ^c	7.53 ^b	8.08 ^a	***	7.10 ^b	11.25 ^a	12.34 ^a	***
ΔE^*		2.28	2.81			2.38	3.02	—		4.38	5.6	—

CT, SO_2 addition wine; HTB, synthetic hydroxytyrosol addition wine; HTG, hytolive addition wine. AF, alcoholic fermentation. CI, color intensity. ΔE^*_{ab} , color differences. Different superscript letters (a, b or c) for the same parameter denote significant differences ($p < 0.05$). Analyses of variance, levels of significance (LS): * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

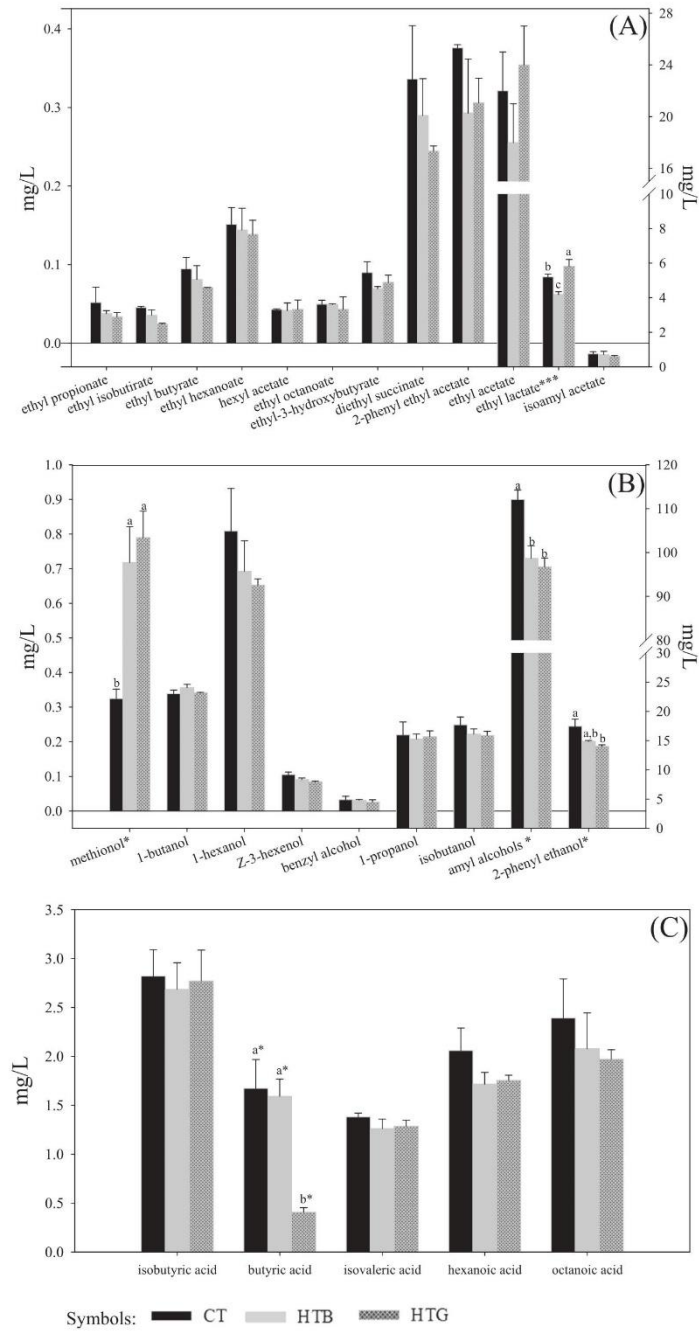


Fig. 1. Volatile compounds determined in Sauvignon blanc wines, grouped according to similarity in structure: A) esters, B) alcohols, C) acids. CT, **■** SO₂ addition wine; HTB, **▒** synthetic hydroxytyrosol addition wine; HTG, **▓** hytolive addition wine.

(Garde-Cerdán et al., 2014). In contrast, volatile composition of Sauvignon blanc wine (at the end of AF and after 1 year of storage) was significantly modified when SO₂ was replaced by lysozyme and enological tannins (Sonni, Chinnici, Natali, & Riponi, 2011).

In the present study, although AF was common for all wines, their volatile composition could have been evolved differently since the different preservatives were added at the end of AF. The results showed that the use of HT, regardless of their origin, as alternative to SO₂ did not modify the wine aroma profile, and preserved volatile compounds to the same extents as SO₂.

3.4. Sensory analysis

Sensory analysis was conducted at bottling and after 6 months of storage. Wines at bottling (Fig. 2A) showed sensory significant differences. The highest differences were found in visual appearance parameters. Wines without SO₂ (HTB and HTG wines) were described as wines with greater color intensity and hue, whereas CT wines showed a paler color. Indeed, color evolution is one of most difficult parameters to control when alternatives to SO₂ in white wines are used (Guerrero & Cantos-Villar, 2015; Izquierdo-Cañas et al., 2012). It is worth to mention that instead ΔE^* between CT and HTB wines at bottling resulted lower than 3 CIELab units, and thus not easily detected by human eye, tasters were able to detect color differences.

HT wines, especially HTB wines, presented more scents of fruit (white, tropical and stone fruits). It has been described that SO₂ may neutralize aromas (Guerrero & Cantos-Villar, 2015). In the present work, wines did not present any sensorial aromatic defects (dirty, reduced, oxidized, yeast, chemical, rancid, acetic, acetaldehyde or ethyl acetate). CT wines had higher savor intensity and were less balanced due to the bitter character (Fig. 2A). Sensory results of SO₂ alternative application in wine have been described at bottling on the bibliography. Lysozyme-treated Riesling wine showed a greater fruity aroma intensity than the untreated control wine (Bartowsky, Costello, Villa, & Henschke, 2004), whereas wines treated with colloidal silver complex showed a loss of varietal aromas (Izquierdo-Cañas et al., 2012).

After 6 months of bottling (Fig. 2B), differences among wines were found in visual appearance. HT wines showed higher color intensity, as described in bottling. Aromas were more evolved in HTG wines, which showed lower citrus, white and tropical fruits, and higher mature notes, in comparison with both HTB and CT wines. CT wines were scored with the highest aroma intensity. HT

wines became more astringent, without significant differences among both HT assays. Additionally, HTG wines were more bitter and less balanced.

In summary, HT wines at bottling (especially HTB ones) showed higher scores than CT wines, but for visual appearance. After 6 months of bottling HT wines were scored lower, especially HTG. No references have been found on the sensorial effect of alternatives to SO₂ on white winemaking with bottle aging. It has been recently described that wines with medium content of SO₂ showed better sensory profile that these with low content of SO₂ after six months of bottle storage (Panero, Motta, Petrozziello, Guaita, & Bosso, 2015).

A triangular test to evaluate the differences among CT, HTB and HTG bottled wines was conducted in dark wine glasses to avoid judgments being influenced by wine color. The results showed that differences between three assays could be observed (95% significance level) in olfactory phase. An olfactometric assay was carried out to advance in the knowledge of the aromas responsible of these differences, which could not be detected by the volatile compounds analysis described above.

3.5. Olfactometric profile

Olfactometric characterization obtained for each wine (CT, HTB and HTG) was listed in supplementary data (Table S1). Overall, more than 60 odoriferous perceptions were detected. To simplify, odorants not reaching a maximum GC–O scores (MF) of 30% were eliminated and considered as noise (Culleré et al., 2013). Odorants showing maximum differences on olfactometric scores (minimum 40% MF) respect to the CT were highlighted in bold (Table S1). The analyses of variance (ANOVA) performed on olfactometric data allowed to determinate thirteen different odoriferous zones (OZs) that showed significant differences among the wine samples. Discriminant odorants were classified into three groups according to their average MF(%) values (Table 3). In the first group (MF scores > 70%), only 2-furfurylthiol (coffee) was detected, being its MF higher in CT wines than in HT ones. The second group (70 > MF(%) > 50) was composed for 8 compounds, 6 of them were identified. 4-Mercapto-4-methyl-2-pentanone and 3-mercaptohexyl acetate (considered as markers of Sauvignon blanc wines) were significant lower in both HTB and HTG wines in comparison with CT ones. Linalool (floral, Muscat) and (E,Z)-nona-2,6-dienal (cucumber) were also decreased in HT wines. By contrast, abhexone (curry) and an unknown compound with LRI

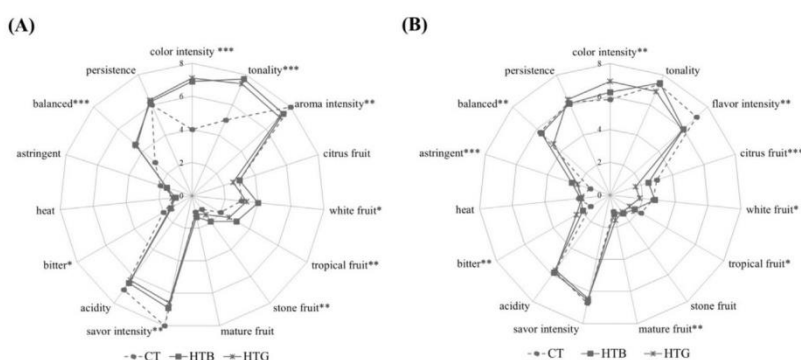


Fig. 2. Cobweb diagram of the sensory score for Sauvignon blanc wines at bottling (A) and after 6 months of storage (B). CT, SO₂ addition wine; HTB, synthetic hydroxytyrosol addition wine; HTG, hytolive addition wine. Descriptors with * denote significant differences ($p < 0.05$). Analyses of variance, levels of significance: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

Table 3

Odoriferous zones found in Sauvignon blanc wines after 6 months of storage in bottle. Gas chromatography retention data, identity, odorant description, modified frequency (%) and differences in modified frequency (%) between HT and CT wines.

LRI ^a		Identity	Odorant description	MF(%)			ΔMF(%)		LS
DB-WAX	DB-5			CT	HTB	HTG	HTB-CT	HTG-CT	
MF(%) > 70									
1438	910	2-furfurylthiol ^b	Coffee	71	41	55	–30	–16	**
70 > MF(%) > 50									
1363	940	4-mercapto-4-Methyl-2-pentanone ^b	box tree	68	50	55	–18	–13	***
1432	1137	ethyl ciclohexanoate^b	Fruity	0	0	60	0	60	***
1551	1100	Linalool ^b	Floral, muscat	57	36	43	–21	–14	**
1596	1156	(E,Z)-nona-2,6-dienal^b	Cucumber	58	7	47	–51	–11	*
1731	1252	3-mercaptohexyl acetate^b	box tree	62	37	0	–25	–62	*
1964	-	n.i	Chamomile, sweet	14	34	58	20	44	*
2261	1199	Abhexone ^b	Curry	34	50	38	16	4	*
2533	1401	n.i	Leather	0	0	51	0	51	*
50 > MF(%) > 30									
1611	-	n.i	Toasty, burnt	0	41	14	41	14	*
1667	1047	Phenylacetaldehyde ^b	Honey	20	38	37	18	17	*
1984	1491	n.i	Fish	7	0	38	–7	31	*
2300	1732	n.i	Black pepper	14	0	34	–14	20	*

CT, SO₂ addition wine; HTB, synthetic hydroxytyrosol addition wine; HTG, hytolive addition wine. In bold odorants with maximum differences on olfactometric scores n.i, not identified compound; MF, modified frequency; ΔMF, difference in modified frequency between HT and CT wines. Analyses of variance, levels of significance: * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001).

^a Linear retention index calculated on both DB-WAX and DB-5 capillary columns.

^b Identification based on coincidence of chromatographic retention data on capillary columns (DB-WAX and DB5) and on the similarity of odor previously reported.

1964 (chamomile, sweet) increased their intensity in HT wines. Ethyl ciclohexanoate, and an unknown compound with LRI_{DB-WAX} 2533 (leather), were only detected in HTG wines, which made them markers for wines elaborated with hytolive.

Finally, in the last odorant group (50 > MF(%) > 30), phenylacetaldehyde and an odorant zone with LRI_{DB-WAX} 1611 (toasty) increased in HT wines. Two odorant zones with LRI_{DB-WAX} 1984 (fish) and LRI_{DB-WAX} 2300 (black pepper) resulted characteristic of HTG wines. According to Álvarez-Pérez et al. (2012), odorants presenting large differences of MF(%) values (ΔMF > 40%) are those that have a more acute role in the perception of aromatic differences among samples.

In agreement with triangular test, the olfactometric profile resulted different for CT, HTB and HTG wines. The addition of HT to wines modified its olfactometric profile, especially in HTG wines. Olfactometric profile of CT wines was characterized by the presence of the volatile thiol 3-mercaptohexyl acetate, which is responsible for the box tree aroma found in Sauvignon blanc wines (Coetzee & du Toit, 2012). HTB wines were marked by a lower intensity of (E,Z)-nona-2,6-dienal and higher of LRI_{DB-WAX} 1611 (toasty), meanwhile HTG wines were characterized by a higher intensity of LRI_{DB-WAX} 1964 (chamomile, sweet) and the presence of ethyl ciclohexanoate (fruity) and LRI_{DB-WAX} 2533 (leather). Thus, it seems clear that, the addition of hydroxytyrosol products decreased the varietal character of Sauvignon blanc wines, introducing odorants which might contribute to the differences found in the sensory analysis.

4. Conclusions

The results indicate that the use of hydroxytyrosol in white wine elaboration without SO₂ hardly modified the enological parameters and the volatile composition of wines. However color-related parameters, sensory analysis and olfactometry analysis were modified. HT wines had higher intensity color as well as higher total score at bottling (especially HTB) but lower score after 6 months of storage in bottle (especially HTG), together with different olfactometric profile. The addition of HT commercial products decreased the varietal character of Sauvignon blanc wines. The key point of the process seems to be the evolution during the storage in bottle. The combination of those commercial products enriched in

hydroxytyrosol during winemaking with some other antioxidant additive (ascorbic acid, low SO₂ concentration, glutation, tannins, etc.) at bottling should be investigated. Either suppressing or reducing the amount of SO₂ is a challenge for wine industry. If it could be done by a compound naturally found in wine as hydroxytyrosol, which has recently accepted as protective compound against oxidative damage, it would achieve a healthier wine with added-value.

Acknowledgments

Authors thank the INIA and FEDER for their financial support (Project RTA2011-00002). Ruiz-Moreno and Guerrero thank to the European Social Fund 2007–2013 “Andalucía se mueve con Europa” for the financial support of their contracts.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.005>.

References

- Álvarez-Pérez, J. M., Campo, E., San-Juan, F., Coque, J. J. R., Ferreira, V., & Hernández-Orte, P. (2012). Sensory and chemical characterisation of the aroma of Prieto Picudo rosé wines: the differential role of autochthonous yeast strains on aroma profiles. *Food Chemistry*, 133(2), 284–292.
- Bartowsky, E. J., Costello, P. J., Villa, A., & Henschke, P. A. (2004). The chemical and sensorial effects of lysozyme addition to red and white wines over six months' cellar storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10(2), 143–150.
- Boido, E., Alcalde-Eon, C., Carrau, F., Dellacassa, E., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2006). Aging effect on the pigment composition and color of *Vitis vinifera* L. cv. Tannat wines. Contribution of the main pigment families to wine color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18), 6692–6704.
- Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., & Cacho, J. (2005). Prediction of the wine sensory properties related to grape variety from dynamic-headspace gas chromatography–olfactometry data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5682–5690.
- 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(1), 287–298.
- Culleré, L., Fernández de Simón, B., Cadahía, E., Ferreira, V., Hernández-Orte, P., & Cacho, J. (2013). Characterization by gas chromatography–olfactometry of the most odor-active compounds in extracts prepared from acacia, chestnut, cherry, ash and oak woods. *LWT – Food Science and Technology*, 53(1), 240–248.

- Dombre, C., Rigou, P., Wirth, J., & Chalier, P. (2015). Aromatic evolution of wine packed in virgin and recycled PET bottles. *Food Chemistry*, 176(0), 376–387.
- Dravnieks, A. (1985). *Atlas of odor character profiles*. Philadelphia, PA: Astm Intl.
- EFSA, Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies. (2011). Scientific opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage. Pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 9(4), 2033–2078.
- Falguera, V., Forns, M., & Ibarz, A. (2013). UV–vis irradiation: an alternative to reduce SO₂ in white wines? *LWT – Food Science and Technology*, 51(1), 59–64.
- Fernández-Mar, M. I., Mateos, R., García-Parrilla, M. C., Puertas, B., & Cantos-Villar, E. (2012). Bioactive compounds in wine: resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: a review. *Food Chemistry*, 130(4), 797–813.
- Ferreira, V., Ortín, N., Escudero, A., López, R., & Cacho, J. (2002). Chemical characterization of the aroma of Grenache rosé wines: aroma extract dilution analysis, quantitative determination, and sensory reconstitution studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), 4048–4054.
- Garde-Cerdán, T., & Ancín-Azpilicueta, C. (2007). Effect of SO₂ on the formation and evolution of volatile compounds in wines. *Food Control*, 18(12), 1501–1506.
- Garde-Cerdán, T., López, R., Garijo, P., González-Arenzana, L., Gutiérrez, A. R., López-Alfaro, I., et al. (2014). Application of colloidal silver versus sulfur dioxide during vinification and storage of Tempranillo red wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20(1), 51–61.
- Garde-Cerdán, T., Marsellés-Fontanet, A. R., Arias-Gil, M., Ancín-Azpilicueta, C., & Martín-Belloso, O. (2008). Effect of storage conditions on the volatile composition of wines obtained from must stabilized by PEF during ageing without SO₂. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4), 469–476.
- Gómez-Míguez, M. J., González-Miret, M. L., Hernanz, D., Fernández, M. Á., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2007). Effects of pre-fermentative skin contact conditions on colour and phenolic content of white wines. *Journal of Food Engineering*, 78(1), 238–245.
- González-Rompinelli, E. M., Rodríguez-Bencomo, J. J., García-Ruiz, A., Sánchez-Patán, F., Martín-Álvarez, P. J., Bartolomé, B., et al. (2013). A winery-scale trial of the use of antimicrobial plant phenolic extracts as preservatives during wine ageing in barrels. *Food Control*, 33(2), 440–447.
- Guerrero, R. F., & Cantos-Villar, E. (2015). Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: a parameter review. *Trends in Food Science & Technology*, 42(1), 27–43.
- ISO 4120. (1983). *Sensory analysis. Methodology. Triangular test*. Genève, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO 6564. (1985). *Sensory analysis. Methodology. Flavour profile methods*. Genève, Switzerland.
- Izquierdo-Cañas, P. M., García-Romero, E., Huertas-Nebreda, B., & Gómez-Alonso, S. (2012). Colloidal silver complex as an alternative to sulphur dioxide in wine-making. *Food Control*, 23(1), 73–81.
- Martínez, J. A., Melgosa, M., Pérez, M. M., Hita, E., & Negueruela, A. I. (2001). Note: Visual and instrumental color evaluation in red wines. *Food Science and Technology International*, 7(5), 439–444.
- OIV. (2012). *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins*. Paris: Organisation Internationale de la Vigne et du Vin.
- Ortega, C., López, R., Cacho, J., & Ferreira, V. (2001). Fast analysis of important wine volatile compounds: development and validation of a new method based on gas chromatographic–flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts. *Journal of Chromatography A*, 923(1), 205–214.
- Panero, L., Motta, S., Petrozziello, M., Guaita, M., & Bosso, A. (2015). Effect of SO₂ reduced glutathione and ellagitannins on the shelf life of bottled white wines. *European Food Research and Technology*, 240(2), 345–356.
- Peinado, R. A., Moreno, J., Bueno, J. E., Moreno, J. A., & Mauricio, J. C. (2004). Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chemistry*, 84(4), 585–590.
- Piñero, Z., Cantos-Villar, E., Palma, M., & Puertas, B. (2011). Direct liquid chromatography method for the simultaneous quantification of hydroxytyrosol and tyrosol in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11683–11689.
- Pozo-Bayón, M. A., G-Alegría, E., Polo, M. C., Tenorio, C., Martín-Álvarez, P. J., Calvo de la Banda, M. T., et al. (2005). Wine volatile and amino acid composition after malolactic fermentation: effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8729–8735.
- Ruiz-Moreno, M. J., Raposo, R., Moreno-Rojas, J. M., Zafrilla, P., Cayuela, J. M., Mulero, J., et al. (2015). Efficacy of olive oil mill extract in replacing sulfur dioxide in wine model. *LWT – Food Science and Technology*, 61(1), 117–123.
- Santos, M. C., Nunes, C., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2012). Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *European Food Research and Technology*, 234(1), 1–12.
- Sarrazin, E., Dubourdieu, D., & Darriet, P. (2007). Characterization of key-aroma compounds of botrytized wines, influence of grape botrytization. *Food Chemistry*, 103(2), 536–545.
- Sonni, F., Cejudo Bastante, M. J., Chinnici, F., Natali, N., & Riponi, C. (2009). Replacement of sulfur dioxide by lysozyme and oenological tannins during fermentation: influence on volatile composition of white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(4), 688–696.
- Sonni, F., Chinnici, F., Natali, N., & Riponi, C. (2011). Pre-fermentative replacement of sulphur dioxide by lysozyme and oenological tannins: effect on the formation and evolution of volatile compounds during the bottle storage of white wines. *Food Chemistry*, 129(3), 1193–1200. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.104>.
- Vally, H., Misso, N. L. A., & Madan, V. (2009). Clinical effects of sulphite additives. *Clinical & Experimental Allergy*, 39(11), 1643–1651.

Discusión IV-2.2: Vinos Blancos de 2013

Con el fin de evaluar la aptitud de los productos ricos en hidroxitirosol HTB y HTG en la elaboración de vinos se estudiaron los efectos de su utilización en la elaboración de vinos blancos (*Figura 3.2, capítulo materiales y métodos*). Además, los vinos se elaboraron mediante dos formas distintas, el método de vinificación tradicional y bajo condiciones reductoras. Al igual que en el estudio de vinos tintos se elaboró de forma paralela y bajo las mismas condiciones un control con SO₂. Los ensayos realizados se resumen en la *Tabla 4.9*

Tabla 4.9. Ensayos realizados en la vendimia 2013 en vinos Sauvignon blanc

Vinos blancos		método tradicional		condiciones reductoras	
Antioxidante	mg/L	nomenclatura	réplicas	nomenclatura	replicas
Anhidrido sulfuroso	80	CT	3	R-CT	3
HT sintético (Biotech)	83*	HTB	3	R-HTB	3
Extracto HT (Hytolive)	294*	HTG	3	R-HTG	3

*Corresponden a 80 mg/L de hidroxitirosol, teniendo en cuenta 97% de riqueza en HTB® y 27.2 en HTG®

1. Parámetros enológicos

En la *Tabla 4.10* se recogen los resultados correspondientes a los parámetros enológicos determinados en el embotellado en los vinos Sauvignon blanc. Los vinos HT (HTB y HTG) y los R-HT (R-HTB y R-HTG) presentaron mayor concentración de ácido tartárico e IPT que sus respectivos controles (CT y R-CT).

En la elaboración mediante el método tradicional se encontraron además diferencias en extracto seco, acidez total, pH, K y acetaldehído. Mientras que bajo condiciones reductoras solo se observaron diferencias en el extracto seco, ya que en este caso la adición de productos (HTB, HTG o SO₂) se hizo tras la FML.

En cualquier caso, todos los vinos cumplen con los estándares de legalidad y calidad y dentro de los rangos usuales de los vinos blancos.

Tabla 4.10. Parámetros enológicos determinados en vinos Sauvignon blanc

	CT	HTB	HTG	LS	R-CT	R-HTB	R-HTG	LS
grado alcohólico (% vol)	12.73	12.72	12.73	n.s.	12.87	12.88	12.85	n.s.
glicerina (g/L)	6.15	5.79	5.89	n.s.	4.95	5.02	4.99	n.s.
extracto seco (g/L)	15.69 ^a	15.14 ^b	14.83 ^b	***	15.18 ^b	15.63 ^a	15.69 ^a	**
acidez total (g/L TH ₂)	7.35 ^b	7.56 ^a	7.17 ^c	**	6.45	6.69	6.65	n.s.
pH	2.95 ^a	2.88 ^b	2.89 ^b	***	3.00	2.95	2.96	n.s.
acidez volátil (g/L AcH)	0.35	0.40	0.40	n.s.	0.30	0.29	0.28	n.s.
ácido acético (g/L)	0.23	0.26	0.30	n.s.	0.24	0.23	0.24	n.s.
ácido cítrico (g/L)	0.50	0.46	0.46	n.s.	0.45	0.46	0.47	n.s.
ácido tartárico (g/L)	3.36 ^b	3.50 ^a	3.50 ^a	*	3.13 ^b	3.42 ^a	3.43 ^a	***
ácido málico (g/L)	2.76	2.67	2.64	n.s.	2.32	2.47	2.44	n.s.
ácido láctico (g/L)	0.06	0.09	0.12	n.s.	0.07	0.11	0.09	n.s.
ácido succínico (g/L)	0.67	0.56	0.49	n.s.	0.45	0.44	0.44	n.s.
hidroxitirosol (mg/L)	0.00	91.77	94.40	n.s.	0.00 ^c	82.35 ^a	74.16 ^b	***
SO ₂ libre (mg/L)	12.5	n.d.	n.d.		13.0	n.d.	n.d.	
SO ₂ total (mg/L)	74.3	n.d.	n.d.		65.0 ^a	6.2 ^b	6.0 ^b	***
k (mg/L)	451 ^a	434 ^b	421 ^b	*	418 ^c	436 ^b	450 ^a	***
IPT	4.58 ^c	5.97 ^b	6.98 ^a	***	4.18 ^c	5.18 ^b	6.11 ^a	***
acetaldehído (mg/L)	48.5 ^a	16.0 ^b	17.0 ^b	***	25.0	29.0	30.0	n.s.

CT, vinos con adición de SO₂; HTB, vinos con adición de hidroxitirosol sintético; HTG, vinos con adición de Hytolive. R-CT, vinos con adición de SO₂ elaborados en condiciones reductoras; R-HTB, vinos con adición de hidroxitirosol sintético elaborados en condiciones reductoras; R-HTG, vinos con adición de Hytolive elaborados en condiciones reductoras. IPT, índice de polifenoles totales. K, potasio. n.d., no detectado. Diferentes letras superíndices (a, b o c) para los mismos parámetros denotan diferencias significativas de acuerdo con el test de Fischer ($p < 0.05$). Niveles de significación (LS): * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$); ns, no significancia

2. Parámetros relacionados con el color

En la *Tabla 4.11* se muestran los parámetros relacionados con el color determinados en el embotellado y después de seis meses de almacenamiento en botella.

En el embotellado, e independientemente del método de elaboración, la adición de los productos ricos en HT modificó el color de los vinos. Se observaron diferencias en todos los parámetros relacionados con el color. El vino HTG y R-HTG presentaron los valores más altos en A420, A470 y b* y valores más bajos de luminosidad (L*), seguido de HTB. Las diferencias encontradas en a* fueron distintas dependiendo del método de elaboración. Los vinos HTB y HTG presentaron valores más bajos a* que el vino CT y, por tanto, con notas más verdes, mientras que los vinos R-HTB y R-HTG presentaron valores más altos

que el R-CT. Por tanto, se concluye que los vinos elaborados con productos ricos en HT presentan peores parámetros de color que sus respectivos CT.

Después de 6 meses de almacenamiento en botella, todos los parámetros relacionados con el color evolucionaron en todos los ensayos, independientemente del método de elaboración: aumentaron A420, A470 y disminuyeron L* de acuerdo con otros autores (Recamales et al., 2006). Desaparecieron las diferencias en estos parámetros entre los vinos HTB y HTG y los vinos R-HTB y R-HTG, diferenciándose estadísticamente de sus respectivos controles.

Las diferencias encontradas entre los vinos elaborados con los productos ricos en HT y los vinos elaborados con el SO₂ podrían estar relacionados con (i) la capacidad del SO₂ para reducir las orto-quinonas y semi-quinonas de los flavanoles (Panero et al., 2015) y que, por tanto, parece poseer en menor medida los productos ricos en HT; (ii) el marcado color marrón oscuro que presenta la disolución de alta concentración de Hytolive (HTG) que se adiciona a los vinos; (iii) tal y como se muestra en la *Tabla 3.2* (sección III-2.5).

Tabla 4.11. Parámetros relacionados con el color determinados en vinos Sauvignon blanc

embotellado	CT	HTB	HTG	LS	R-CT	R-HTB	R-HTG	LS
A420	0.037 ^c	0.140 ^b	0.157 ^a	***	0.031 ^c	0.055 ^b	0.059 ^a	***
A470	0.012 ^c	0.065 ^b	0.074 ^a	***	0.009 ^c	0.026 ^b	0.028 ^a	***
L*	98.80 ^a	96.23 ^b	95.94 ^c	***	99.10 ^a	98.38 ^b	98.03 ^c	***
a*	-1.10 ^a	-2.91 ^b	-3.01 ^b	***	-1.30 ^b	-1.09 ^a	-1.07 ^a	***
b*	6.24 ^c	20.36 ^b	21.72 ^a	***	5.25 ^c	7.53 ^b	8.08 ^a	***
ΔE* _{ab}		14.60 ^b	15.99 ^a	*		2.40 ^b	3.03 ^a	***
6 meses embotellado	CT	HTB	HTG	LS	R-CT	R-HTB	R-HTG	LS
A420	0.057 ^c	0,162 ^a	0,167 ^a	***	0.050 ^b	0.081 ^a	0.089 ^a	***
A470	0.025 ^c	0,072 ^a	0,077 ^a	***	0.022 ^b	0.038 ^a	0.043 ^a	***
L*	97.99 ^a	95.14 ^b	94.76 ^b	***	98.53 ^a	97.14 ^b	96.56 ^b	***
a*	-1.20 ^a	-2.98 ^b	-3.03 ^b	***	-1.26	-1.29	-1.27	
b*	8.25 ^b	22.26 ^a	22.34 ^a	***	7.10 ^b	11.25 ^a	12.34 ^a	***
ΔE*		14.4	14.6	n.s.		4.4	5.6	n.s.

CT, vinos con adición de SO₂; HTB, vinos con adición de hidroxitirosol sintético; HTG, vinos con adición de Hytolive. R-CT, vinos con adición de SO₂ elaborados en condiciones reductoras; R-HTB, vinos con adición de hidroxitirosol sintético elaborados en condiciones reductoras; R-HTG, vinos con adición de Hytolive elaborados en condiciones reductoras. IC, intensidad colorante; ΔE*, diferencias en el color con respecto a la correspondiente muestra control. n.d., no detectado. Diferentes letras superíndices (a o b) para los mismos parámetros denotan diferencias significativas de acuerdo con el test de Fischer (p < 0.05). Niveles de significación (LS): * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001); ns, no significancia.

Los valores de ΔE^*_{ab} muestran que las diferencias en el color fueron perceptibles entre los vinos HT y CT ($\Delta E^*_{ab} > 3$; Martínez et al., 2001). Mientras que en el embotellado prácticamente no eran perceptibles entre los vinos R-HT y R-CT ($\Delta E^*_{ab} < 3$). Tras 6 meses de embotellado se observó un aumento de esta diferencia, especialmente en el método bajo condiciones reductoras.

3. Compuestos volátiles: ésteres, alcoholes y ácidos grasos

La *Tabla 4.12* recoge los compuestos volátiles determinados en vinos Sauvignon blanc que mostraron diferencias significativas y/o superaron la concentración del umbral de percepción (UP) y, por tanto, importantes en la percepción del aroma global del vino. Por cuestiones de logística, estos compuestos se analizaron a los 4 meses del embotellado.

Tabla 4.12. Compuestos volátiles en vinos Sauvignon blanc (mg/L)

	UP (mg/L)	CT	HTB	HTG	LS	R-CT	R-HTB	R-HTG	LS
acetato de etilo	7.50 ¹	29.50	31.50	30.50	n.s.	22.33	20.00	24.00	n.s.
acetato de isoamilo	0.03 ¹	0.33	0.44	0.51	n.s.	0.75	0.70	0.62	n.s.
hexanoato etilo	0.062 ⁶	0.06	0.10	0.11	n.s.	0.15	0.14	0.14	n.s.
lactato de etilo	155 ⁴	5.02 ^b	3.92 ^c	6.50 ^a	***	5.12 ^b	4.19 ^c	5.81 ^a	***
octanoato de etilo	0.005 ³	0.02	0.04	0.06	n.s.	0.05	0.05	0.04	n.s.
2-feniletil acetato	0.25 ¹	0.32	0.28	0.20	n.s.	0.38	0.29	0.31	n.s.
Σ ESTERES†		36.81	37.00	38.36	n.s.	29.90	26.37	31.32	n.s.
alcohol isoamilo	30.0 ¹	134.0	137.2	137.7	n.s.	112.1 ^a	98.7 ^b	96.7 ^b	*
metionol	1.0 ³	1.22 ^b	1.22 ^b	1.41 ^a	*	0.32 ^b	0.72 ^a	0.79 ^a	*
alcohol bencílico	200 ⁵	0.04	0.03	0.03	n.s.	0.03	0.03	0.03	n.s.
2-feniletanol	14.0 ³	22.79	23.62	22.76	n.s.	17.44 ^a	16.10 ^{ab}	14.02 ^b	*
Σ ALCOHOLES•		194.2	200.3	198.4	n.s.	164.8 ^a	148.8 ^b	145.2 ^b	**
ácido isobutírico	2.30 ³	2.76	2.31	2.97	n.s.	2.82	2.69	2.77	n.s.
ácido butírico	0.173 ³	0.37	0.49	0.46	n.s.	1.67 ^a	1.59 ^a	0.41 ^b	*
ácido isovalérico	0.334 ³	1.60	1.69	1.63	n.s.	1.38	1.26	1.29	n.s.
ácido hexanoico	0.42 ³	0.83	1.10	1.14	n.s.	2.06	1.72	1.75	n.s.
ácido octanoico	0.50 ³	1.10	1.66	1.50	n.s.	2.39	2.08	1.97	n.s.
Σ ÁCIDOS GRASOS‡		7.04	7.25	7.74	n.s.	10.32	9.65	8.80	n.s.

CT, vinos con adición de SO₂; HTB, vinos con adición de hidroxitirosol sintético; HTG, vinos con adición de Hytolive. R-CT, vinos con adición de SO₂ elaborados en condiciones reductoras; R-HTB, vinos con adición de hidroxitirosol sintético elaborados en condiciones reductoras; R-HTG, vinos con adición de Hytolive elaborados en condiciones reductoras. UP, umbral de percepción olfatométrico. † suma de todos ésteres cuantificados; • suma de todos los alcoholes cuantificados; ‡ suma de todos los ácidos grasos cuantificados. ¹ (Guth, 1997), determinado en 12% v/v etanol/agua; ² (Peinado et al., 2004) determinado en 10% (v/v) etanol/agua, ajustada a pH 3.5 con ácido tartárico; ³ (V. Ferreira et al., 2000), determinado en 11% v/v etanol/agua, 7 g/L glicerina, 5 g/L ácido tartárico a un pH 3.4; ⁴ (Etievant, 1991), determinado en 12% v/v etanol/agua; ⁵ (Gómez-Míguez et al., 2007) calculado en

una mezcla de 10% agua/etano, 5g/L de ácido tartárico a pH 3.2; ⁶ (Ferreira y San Juan, 2014. Chap 14 Food Flavors: Chemical, Sensory, and Technological Properties). Diferentes letras superíndices (a, b o c) para los mismos parámetros denotan diferencias significativas de acuerdo con el test de Fischer ($p < 0.05$). Niveles de significación (LS): * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$); ns, no significancia.

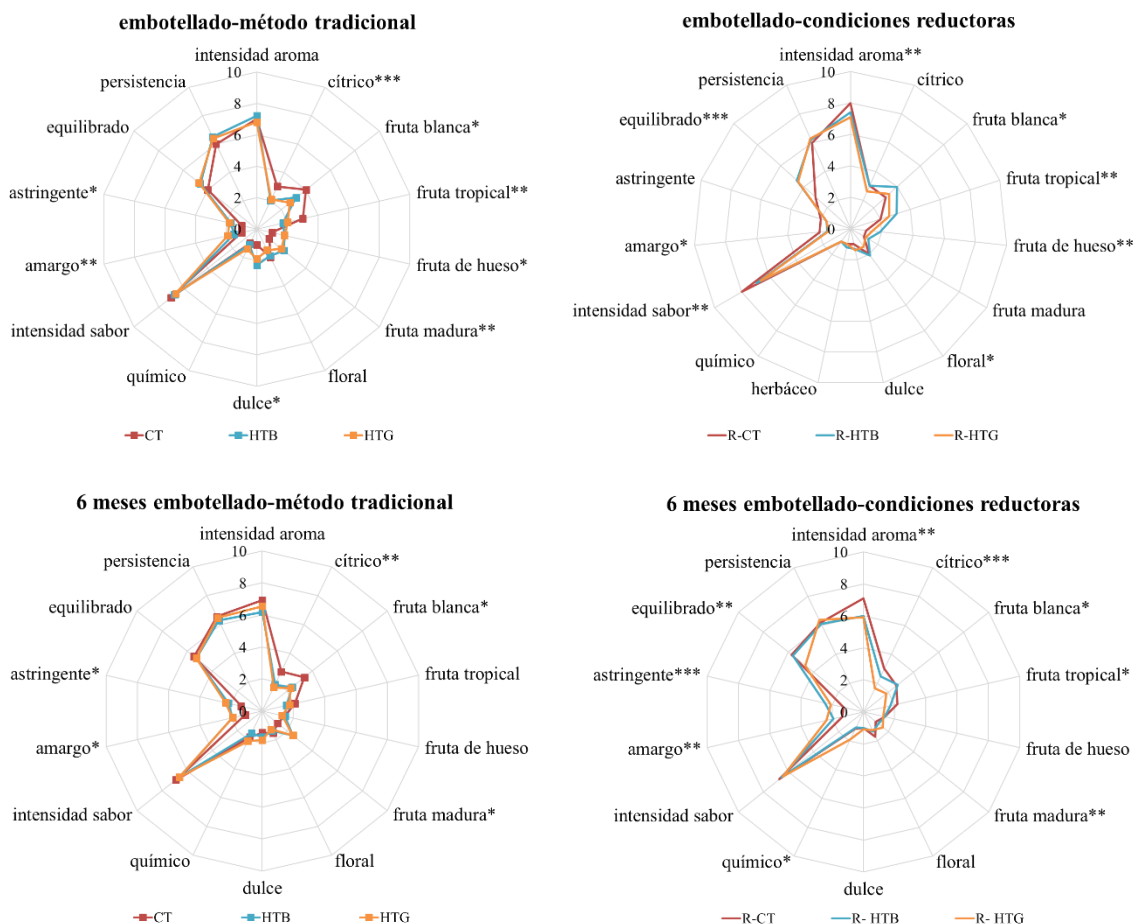
La presencia de HT apenas afectó al contenido de compuestos volátiles, con respecto a su testigo, independientemente del método de elaboración. Estos resultados coinciden con los escritos en la literatura. Garde-Cerdán y Ancín-Azpilicueta (2007) encontraron que la presencia o ausencia de SO₂ no influyó en el contenido de ésteres totales en vinos de Parellada (Garde-Cerdán & Ancín-Azpilicueta, 2007). El contenido de ésteres, debido principalmente al acetato de etilo, fue mayor en el método tradicional comparado con los valores obtenidos bajo condiciones reductoras, de acuerdo con otros autores. Garde-Cerdán y col. han descrito que el contenido de ésteres totales fue superior en los vinos obtenidos por el método tradicional que por el sistema bajo condiciones reductoras (Garde-Cerdán, Jarauta, et al., 2008).

Respecto a los alcoholes, en el método tradicional, la presencia de HT no afectó ni al contenido total, ni a la mayoría de alcoholes individuales. Sin embargo, bajo condiciones reductoras, la presencia de HT disminuyó el contenido total de alcoholes. Cabe destacar, la disminución del 2-feniletanol en los vinos elaborados con HTG® en condiciones reductoras (R-HTG). Una disminución en la concentración de este compuesto puede ser causado por su oxidación a 2-fenilacetaldehído, compuesto asociado al aroma oxidado de vinos blancos (Grant-Preece, Fang, Schmidtke, & Clark, 2013; Silva Ferreira et al., 2003).

Respecto al contenido de ácidos grasos, la presencia de HT no influyó en el contenido total de ácidos grasos. Solo el ac. butírico disminuyó su concentración en vinos G-HTG. El contenido de los ácidos grasos fue mayor en condiciones reductoras en comparación con el método tradicional. Se ha descrito que la ausencia de oxígeno y presencia de CO₂ estimula la síntesis de ácidos grasos durante la fermentación alcohólica (Day, Schmidt, Smith, & Wilkes, 2015). En todos los vinos el contenido de ácidos totales fue inferior a 20 mg/L y, por tanto, no modifica negativamente el aroma del vino (Lambrechts & Pretorius, 2000; Pozo-Bayón et al., 2005; Schreier & Jennings, 1979).

4. Análisis sensorial

Se realizó un análisis sensorial descriptivo inmediatamente en el embotellado y a los 6 meses de conservación en botella (*Figura 4.5*).



*Figura 4.5. Análisis sensorial de vinos Sauvignon blanc elaborados mediante el método tradicional y condiciones reductoras, en el embotellado y a los seis meses de envejecimiento en botella. Análisis de la varianza de un factor y LSD ($p < 0.05$), niveles de significación (LS): * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$)*

En el embotellado los vinos elaborados con productos ricos en HT fueron sensorialmente distintos de sus respectivos controles. En el método tradicional los vinos HTB y HTG se caracterizaron por presentar una mayor puntuación en los atributos a fruta de hueso y madura, sensación astringente y amargor en boca. En contraste, el vino CT presentó una alta intensidad aromática caracterizada por notas a cítricos, fruta blanca y tropical, caracteres más típicos de los vinos de Sauvignon blanc. Los vinos elaborados con productos ricos en HT bajo condiciones reductoras (R-HTB y R-HTG), especialmente el vino R-HTB, se caracterizaron por poseer notas a fruta (blanca, tropical y de hueso) y

equilibrados en boca. En contraste, los vinos R-CT presentaron mayor intensidad aromática caracterizada por notas florales, con alta intensidad de sabor y menor equilibrio en boca.

Después de 6 meses en botella, las diferencias entre los vinos elaborados por el método tradicional se minimizaron. Los vinos CT se caracterizaron por notas a cítricos y fruta blanca, mientras que los vinos HTB y HTG se caracterizaron por notas a fruta madura. Sin embargo, bajo condiciones reductoras los vinos R-HTG acusaron una mayor evolución en el aroma, presentando la menor puntuación en intensidad aromática y todos los atributos aromáticos, excepto fruta madura, respecto a HTB y CT. Independientemente del método, los vinos elaborados con HTG® (HTG y R-HTG) presentaron defectos a químico. Además, los vinos elaborados con productos ricos en HT fueron amargos y astringentes. Las diferencias encontradas en el amargor, independientemente de elaboración, podrían ser debidas a las propiedades de amargor de los derivados secoiridoides de hidroxitirosol y tirosol, que producen el amargor en el aceite de oliva (Mateos, Cert, Pérez-Camino, & García, 2004).

5. Perfil olfatométrico

Se realizó un perfil olfatométrico a los 6 meses de embotellado de cada uno de los vinos obtenidos bajo condiciones reductoras. Al igual que en los vinos tintos, se seleccionaron los vinos elaborados bajo condiciones reductoras por su mayor complejidad. Siguiendo los criterios descritos para los vinos tintos elaborados con productos ricos en HT, se resume en la *Tabla 4.13* las ZO's que muestran las máximas diferencias en frecuencia modificada ($\Delta FM (\%) \geq 40$), además de otras consideradas interesantes por su posible repercusión en el aroma.

De las 60 ZO's detectadas, solo 6 ZO's presentaron una $\Delta FM (\%) \geq 40$, 2 ZO's en el vino R-HTB y 4 ZO's en el vino R-HTG. En los vinos R-HT disminuyeron respecto a R-CT las zonas: **ZO-2** identificada como *E,Z*-nona-2,6-dienal (pepino), principalmente en el vino R-HTB; y la **ZO-3** identificada como 3-mercaptohexil acetato (3MHA) (boj) y considerado como marcador de la variedad Sauvignon blanc (Coetzee & du Toit, 2012), que disminuyó en ambos vinos pero principalmente en los vinos R-HTG. Coetzee (2014) ha descrito que el 3MHA decrece principalmente en vinos Sauvignon blanc que estaban expuestos a una oxidación repetitiva (Coetzee, 2014).

Tabla 4.13. Zonas odorantes encontrados en vinos Sauvignon blanc con una ΔFM (%) ≥ 40

ZO	LRI ¹		compuesto	Descripción odorante	FM (%)			ΔFM (%)		LS
	DB-WAX	DB-5			R-CT	R-HTB	R-HTG	(R-HTB) - (R-CT)	(R-HTG) - (R-CT)	
1	1432	1137	ciclohexanoato de etilo ^a	fruta	0	0	60	0	60	***
2	1596	1156	(<i>E,Z</i>)- nona-2,6-dienal ^a	pepino	58	7	47	-51	-11	*
3	1731	1252	3-mercaptohexil acetato ^a	box tree	62	37	0	-25	-62	*
4	1964	-	n.i.	manzanilla, dulce	14	34	58	20	44	*
5	2533	1401	n.i.	piel, cuero	0	0	51	0	51	*
6	1611	-	n.i.	tostado, quemado	0	41	14	41	14	*
7	1636	940	4-mercapto-4-metil-2-pentanona	boj	68	50	55	-18	-13	**
8	1667	1047	fenilacetaldéhid ^b	miel	20	38	37	18	17	*

R-CT, vinos con adición de SO₂ elaborados en condiciones reductoras; R-HTB, vinos con adición de hidroxitirosol sintético elaborados en condiciones reductoras; R-HTG, vinos con adición de Hylolive elaborados en condiciones reductoras. ¹ Índice de retención lineal calculado en las columnas capilar DB-WAX y DB-5. ^a Identificación basada en la coincidencia de la retención de cromatografía de gases en ambas columnas y datos de espectrometría de masas con los de compuestos puros disponibles en el laboratorio o con datos de la biblioteca de espectrometría de masas NIST. ^b Identificación basada en la coincidencia de los datos de retención cromatográfica en la columna capilar DB-WAX y en la similitud del aroma previamente descrito. n.i., compuesto no identificado. FM, frecuencia modificada; ΔFM (%), diferencia en la frecuencia modificada entre los vinos elaborados con productos ricos en HT y su respectivo SO₂ en método tradicional y bajo condiciones reductoras. Análisis de la varianza, niveles de significación: * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001).

Por otra parte, el uso de los productos provocó la aparición de nuevas zonas. Los vinos R-HTB se caracterizaron por la aparición de la **ZO-6**, que no pudo ser identificada, con aroma a tostado/quemado. Los vinos R-HTG se caracterizaron por la **ZO-1** identificada como ciclohexanoato de etilo (fruta), y la **ZO-4** descrita como manzanilla (ambas descritas en los vinos de Syrah tratados con productos HT) y la **ZO-5** descrita como piel/cuero. Los compuestos responsables de la ZO 4 y 5 tampoco pudieron ser identificados. El ciclohexanoato de etilo se ha considerado uno de los contribuyentes más importantes a los aromas olorosos dulces-frutales de muchos vinos envejecidos y destilados. Campo y col. (2006) han sugerido que el ciclohexanoato de etilo se forma durante los procesos de oxidación (Campo et al., 2006). Considerando los resultados de la olfatometría de los vinos Syrah (*apartado E de la discusión IV-2.1*), la ZO-6 se puede considerar que es característica del extracto HTB® y las ZO's 1 y 4 características del extracto HTG®.

Existen otras zonas odorantes que, aunque el ΔFM (%) < 40, son importantes considerar. La **ZO-7** identificada como 4-mercapto-4-metil-2-pentanona (boj), que disminuye en los vinos R-HT. Este compuesto es considerado como marcador de los vinos Sauvignon blanc (Coetzee & du Toit, 2012), y de ahí su

importancia. La **ZO-8** identificada como fenilacetaldehído (miel), aumenta en los vinos R-HTB y R-HTG. Este compuesto resulta de la oxidación del 2-feniletanol y por tanto relacionado con vinos oxidados (Balboa-Lagunero et al., 2011). Datos que coincide con la disminución de 2-feniletanol observada en los vinos R-HTG y R-HTB (Tabla 4.12).

En resumen, los productos ricos en hidroxitirosol, HTB® y HTG®, utilizados en la elaboración de vinos blancos obtenidos mediante el método tradicional y bajo condiciones reductoras apenas modificaron los parámetros enológicos y preservaron la composición volátil tanto como el SO₂, excepto la concentración de 2-feniletanol. Modificaron notablemente otros parámetros: (i) se obtuvieron vinos más amarillos-pardos y oscuros, propios de vinos oxidados, especialmente los vinos elaborados mediante el método tradicional en el embotellado; (ii) modificaron el análisis sensorial descriptivo de los vinos, apareciendo notas relacionadas con la oxidación en el método tradicional, si bien al cabo de los 6 meses estas diferencias disminuyeron, mientras que los vinos elaborados bajo condiciones reductoras y con el extracto Hytolive evolucionaron más que el control; (iii) disminuyeron el carácter varietal de los vinos Sauvignon blanc, introduciendo nuevas zonas odorantes relacionadas con aromas a oxidación que pudieron contribuir a las diferencias encontradas en el análisis sensorial.

Al igual que los vinos tintos, este experimento fue planteado para un año en botella, sin embargo, se paró a los 6 meses, dado que los análisis,

Al igual que en vinos tintos, se concluye que, a pesar de que los productos ricos en HT seleccionados para este estudio, presentaban a priori buenas propiedades físico-químicas, no son una alternativa real al SO₂.

IV-3: Uso de un extracto de madera de poda como alternativa al SO₂ en la elaboración de vinos blancos y tintos

Con el fin de confirmar el potencial uso de un extracto rico en estilbenos como alternativa al SO₂ en vinos, se realizaron vinificaciones de vino tinto y blanco. Además, en la búsqueda de generalizar los resultados lo máximo posible se utilizaron distintos métodos de vinificación. En concreto, los vinos tintos se elaboraron mediante el método tradicional y método Ganimede (**Publicación 5**), y los vinos blancos se elaboraron mediante el método tradicional y en condiciones reductoras (**Publicación 6**). En este caso, y a diferencia de los capítulos anteriores, los resultados publicados corresponden exactamente con los resultados contenidos en el capítulo. Así, con el fin de no ser reiterativos, las tablas y figuras son referidas a las encontradas en las publicaciones.

Para este estudio se utilizó un extracto comercial de madera de poda llamado Vineatrol®, en lo sucesivo denominado VIN®, comercializado por la empresa francesa Actichem (Montauban, Francia). Se ha descrito el potencial antioxidante que presenta este extracto (Müller y col, 2009). Este extracto es particularmente rico en estilbenos, principalmente resveratrol y sus oligómeros. Las características técnicas del producto, suministradas por la empresa son: > 5% de *trans*-resveratrol, > 5% ε-viniferina y de forma general > 20% ó 30% el total de monómeros y oligómeros de resveratrol.

En la *Figura 4.6* se muestra el perfil cromatográfico del Vineatrol® obtenido en nuestro laboratorio siguiendo el procedimiento descrito en la sección III-3.3.4

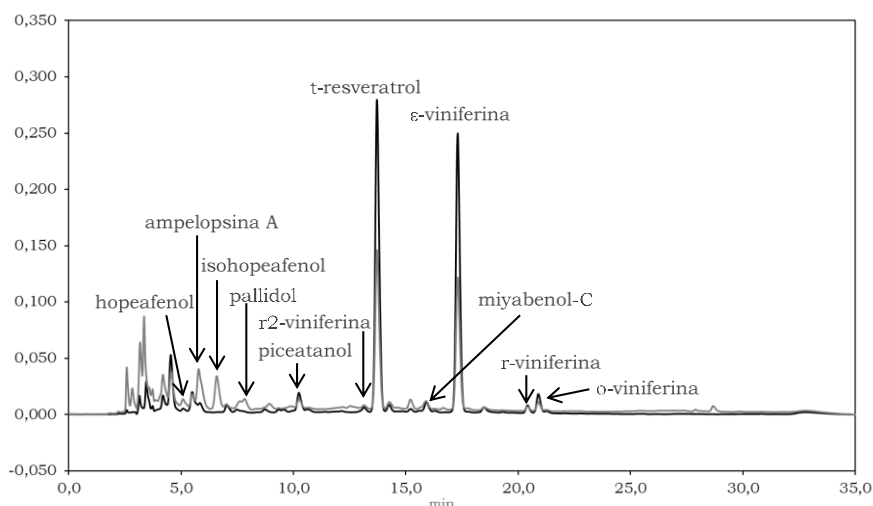


Figura 4.6.
Cromatograma
obtenido por
HPLC-PDA del
extracto rico en
estilbenos (VIN®)
a 280 (gris) y
320 nm (negra)
de absorbancia

La calidad de los vinos obtenidos fue evaluada en diferentes fases de la vinificación: tras la adición del extracto se evaluaron los siguientes parámetros relacionados con la calidad de los vinos:

1. Parámetros enológicos
2. Parámetros relacionados con el color
3. Compuestos volátiles: ésteres, alcoholes y ácidos grasos.
4. Perfil olfatométrico
5. Análisis sensorial

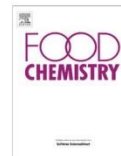
Estos resultados, a su vez, se comparan con un control en el que se utilizó el SO₂.

A continuación, se presentan los resultados de este estudio en forma de dos publicaciones: Publicación 5 y Publicación 6.

PUBLICACIÓN 5. “Extracto de madera de poda rico en estilbenos como un conservante en vino tinto”

Rafaela Raposo, María José Ruiz-Moreno, Teresa Gardé-Cerdán, Belén Puertas, José Manuel Moreno-Rojas, Ana Gonzalo-Diago, Raúl F. Guerrero, Víctor Ortiz, Emma Cantos-Villar (2016). Grapevine-shoot stilbene extract as a preservative in red wine. Food Chemistry 197, 1102-1111.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.102>



Grapevine-shoot stilbene extract as a preservative in red wine



Rafaela Raposo^a, María José Ruiz-Moreno^b, Teresa Garde-Cerdán^c, Belén Puertas^a, José Manuel Moreno-Rojas^b, Ana Gonzalo-Diago^c, Raúl Guerrero^a, Víctor Ortíz^b, Emma Cantos-Villar^{a,*}

^aInstituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro Rancho de la Merced, Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural (CAPDR), Junta de Andalucía, Ctra. Trebujena, km 2.1, 11471 Jerez de la Frontera, Spain

^bInstituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro Alameda del Obispo, Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural (CAPDR), Junta de Andalucía, Avd. Menéndez Pidal, 14004 Córdoba, Spain

^cInstituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV), Gobierno de La Rioja-CSIC-Universidad de La Rioja, Ctra. Burgos, km. 6. Finca La Grajera, 26007 Logroño, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 September 2015

Received in revised form 18 November 2015

Accepted 19 November 2015

Available online 26 November 2015

Keywords:

Stilbene

Sulfur dioxide

Color

Volatile compounds

Sensorial

Olfactometry

ABSTRACT

This paper reports the use of a grapevine-shoot stilbene extract (Vineatrol[®]) as a preservative in red wine. Its effectiveness to preserve red wine quality under two different winemaking systems (traditional and Ganimede) was studied at bottling and after twelve months of storage in bottle. Enological parameters, color related parameters, volatile composition, sensory analysis and olfactometric profile were evaluated. At bottling wines treated with Vineatrol showed higher color related parameters and higher score in sensory analysis than those treated with SO₂. The use of SO₂ increased ester and alcohol volatile compounds in relation to the use of Vineatrol. Wine olfactometric profile was modified by Vineatrol addition. Two new odorant zones with high modified frequency appeared in wines treated with Vineatrol. After 12 months of storage in bottle, wines treated with Vineatrol showed parameters related to oxidation. The weak point of the process seemed to be the evolution during the storage in bottle.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The most widely preservative used in food industry is sulfur dioxide (SO₂). This fact is extensible to wine industry. SO₂ is probably one of the most versatile and efficient additives used in winemaking due to its antiseptic and antioxidant properties. It exhibits an important antioxidant function that helps to reduce the effects of dissolved oxygen as well as to inhibit oxidase enzymes, which are endogenous in grape and also come from fungal infections. Moreover, SO₂ inhibits the development of all types of microorganisms, such as yeasts, lactic bacteria and, to a lesser extent, acetic bacteria. However, several human health risks, including dermatitis, urticaria, angioedema, diarrhea, abdominal pain, bronchoconstriction and anaphylaxis, have been associated to SO₂ (reviewed in Guerrero & Cantos-Villar, 2015). Since SO₂ is widely used as preservative in many food products, and is accumulative in the organisms, its reduction in wine is a consumer's demand. Increasingly, consumers have been clamoring for natural, organic alternatives as opposed to the chemical preservatives present in wine (Comuzzo, Rauhut, Werner, Lagazio, & Zironi, 2013). In fact, there

are negative perceptions of sulfites and willingness to pay for non-sulfited wines (Costanigro, Appleby, & Menke, 2014).

Consequently, there is a great interest in finding alternative technologies as well as other preservatives that can replace and/or reduce SO₂ content in wines. Physical methods, also called green technologies, include pulsed electric field, ultrasounds, ultraviolet light and high hydrostatic pressure (Santos, Nunes, Saraiva, & Coimbra, 2012). In spite of promising results, these technologies require complex and expensive equipments. Some chemicals have been also tested as an alternative to SO₂: colloidal silver complex (García-Ruiz et al., 2015; Izquierdo-Cañas, García-Romero, Huertas-Nebreda, & Gómez-Alonso, 2012), dimethyl carbamate (Costa, Barata, Malfeito-Ferreira, & Loureiro, 2008), and even natural products (lysozyme and bacteriocins) (Lasanta, Roldán, Caro, Pérez, & Palacios, 2010; Liburdi, Benucci, & Esti, 2014). Among them, the use of phenolics has been proposed as an alternative. Sonni et al. studied the effects on volatile composition of white wines by the substitution of SO₂ during fermentation with lysozyme and tannin (Sonni, Cejudo Bastante, Chinnici, Natali, & Riponi, 2009). They concluded that both volatile composition and sensory impact were importantly modified. Salaha, Kallithraka, Marmaras, Koussissi, and Tzourou (2008) tested a black radish extract and ascorbic acid as alternative to SO₂ in red winemaking. Enological parameters and anthocyanin content were strongly

* Corresponding author.

E-mail address: emma.cantos@juntadeandalucia.es (E. Cantos-Villar).

affected, showing wines commercially acceptable. González-Rompinelli et al. (2013) assayed almond skin and eucalyptus leave extracts as preservatives during Verdejo wines aging in barrels. Aromatic composition and phenolic compounds were also modified, but no significant differences were found in the global sensory score of the wines. We have recently tested the effectiveness of hydroxytyrosol as a preservative in red wine (Raposo et al., 2016). However, hydroxytyrosol was not able to avoid oxidation during the storage in bottle.

Vineatrol® is an extract from grapevine-shoot that is particularly rich in stilbenes, mainly resveratrol and its oligomers. It has been described as natural source of bioactive stilbenes and a potent antioxidant (Müller et al., 2009; Romain et al., 2012).

The preservative capacity of stilbene extracts has been recently evaluated (Ruiz-Moreno et al., 2015). The antioxidant activity, antimicrobial activity and olfactometric profile of a stilbene stem extract in a model wine were evaluated. It was concluded that the stilbene extract showed good properties to replace SO₂ but it should be tested in real wine.

In the current work, the potential use of Vineatrol, a shoot stilbene extract, to replace the SO₂ in red wine was investigated. Vineatrol was tested under two different winemaking systems: traditional and Ganimede. Enological quality parameters, color related parameters, volatile composition, olfactometric profile and sensory wine properties were evaluated, at bottling and after storage in bottle.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Analytical grade methanol and formic acid were supplied by Panreac (Barcelona, Spain). Chemical standards: resveratrol, piceatannol, dichloromethane (LiChrosolv quality), aroma standards and alkane solution (C7–C40) used for identification were purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Anhydrous sodium sulfate was obtained from Panreac (Barcelona, Spain). ϵ -Viniferin, ampelopsin A, *r*-viniferin, *r2*-viniferin, hopeaphenol, isohopeaphenol, pallidol, miyabenol C and ω -viniferin were kindly provided by the GESVAB (Groupe D'Étude des Substances Végétales à Activité Biologique) from University of Bordeaux II. Ultrapure water from a Milli-Q system (Millipore Corp., Bedford, MA) was used throughout this research.

2.2. Grapevine-shoot extract

Vineatrol® is a grapevine-shoot extract. Due to Vineatrol has low solubility in aqueous media, the extract was dissolved in a mix composed by: wine matrix (12% ethanol, pH = 3.6) and wine alcohol (96%), at 50:50 proportions. Samples (20 μ L) of the above solution were analyzed by using a Waters HPLC system with a model 1525 pump and a Waters 996 Photodiode Array Detector. Separations were performed on a Mediterranean Sea18 column (Tecknokroma, Barcelona, Spain) (RP-18, 25 \times 0.46 cm; 5 μ m particle size) and a guard column of the same material, at 30 °C. The mobile phases consisted of a water:methanol:acetic acid mixture, solvent A 88:10:2 and solvent B 8:90:2 at a flow rate of 1 mL min⁻¹. Vineatrol contained: 5.66% trans-resveratrol, 13.25% ϵ -viniferin, 3.76% ampelopsin A, 1.44% *r*-viniferin, 1.22% hopeaphenol, 1.04% pallidol, 1.07% ω -viniferin, 0.97% piceatannol, 0.78% isohopeaphenol and 0.30% *r2*-viniferin. The total stilbene Vineatrol richness was 29%.

Vineatrol was kindly supplied by Actichem (Montauban, France).

2.3. Winemaking

The study was designed to evaluate the capacity of Vineatrol as alternative to SO₂ under different winemaking conditions (traditional and Ganimede). A complete diagram of the processes is shown in Fig. 1. Syrah grapes (560 kg) were harvested, destemmed, crushed and divided in two batches. The first batch (150 kg) was divided again in two batches (25 kg each, in triplicate): one batch was treated with SO₂ (CT), and the other batch was treated with Vineatrol dissolved as previously commented in Section 2.2 (VIN). These batches followed traditional winemaking (Fig. 1). In parallel, another winemaking system was conducted. 360 kg of crushed grapes were placed into a Ganimede fermenter (Ganimede®). The design of this type of fermenter permits the CO₂ to accumulate. Ganimede system was selected because it generates a reductive environment inside the tank, which preserves the must from oxidation. In this winemaking system, press was conducted after alcoholic fermentation, liquid wine was replaced in the container and divided in batches when malolactic fermentation was finished, in the first batch SO₂ was added (G-CT), and in the second one Vineatrol was added (G-VIN), each one in triplicate.

The concentrations of the preservatives in both winemaking systems were: 50 mg/L of SO₂ (Sulfosol, Sepsa-Enartis) and 86 mg/L of VIN (Vineatrol®), which meant 25 mg/L of total stilbenes (29% of richness of stilbenes in Vineatrol). Alcoholic fermentations (AF) were started after yeast addition (20 g/hL, ES488, Sepsa-Enartis, Spain). Malolactic fermentation was induced with *Oenococcus oeni* (1 g/hL, Challenge Easy ML, Sepsa-Enartis, Spain) and nutrients (20 g/hL Nutriferm ML, Sepsa-Enartis, Spain). Stabilization was performed during two months at 0 °C. Finally wines were racked, filtered (Optical XL, Millipore, France), antioxidants adjusted to the initial concentration (50 mg/L de SO₂ and 86 mg/L of VIN), and bottled. Stilbene concentration was follow in wines as previously described in the Section 2.2. Bottled wines were stored under control conditions (16 °C and 80% RH) during 12 months. Wine sampling was carried out at bottling and after 12 months of storage in bottle.

Since these two winemaking systems have already been studied (Garde-Cerdán, Jarauta, Salinas, & Ancín-Azpilicuenta, 2008), the aim of the present study was to evaluate the capacity of Vineatrol as alternative to SO₂ under two different winemaking conditions rather than the evaluation of these two winemaking themselves.

2.4. Enological parameters

Relative density, ethanol, glycerin, dry extract, total and volatile acidity, pH, organic acids (acetic, citric, tartaric, malic, lactic, and succinic acids), total and free SO₂, acetaldehyde, ethyl acetate and methanol were determined at bottling following the official analytical methods established by the International Organization of Vine and Wine (OIV, 2014).

Anthocyanin, tannin, total polyphenols index (TPI), were measured following the method described by Saint-Cricq de Gaulejac, Vivas, and Glories (1998). Stilbenes were measured as previously described in the Section 2.2.

2.5. Color related parameters

Color intensity (D.O. 420 nm + D.O. 520 nm + D.O. 620 nm) and hue (D.O. 420 nm/D.O 520 nm) were determined by spectrophotometric measurements (Lambda 25, Perkin-Elmer, Massachusetts). Colorimetric measurements were registered with a Konica-Minolta CM-3600d spectrophotometer (Osaka, Japan), using 2 mm path-length glass-cells and distilled water as reference. The CIELab parameters (L*, a*, b*, C*_{ab}, h*_{ab}) were determined by using

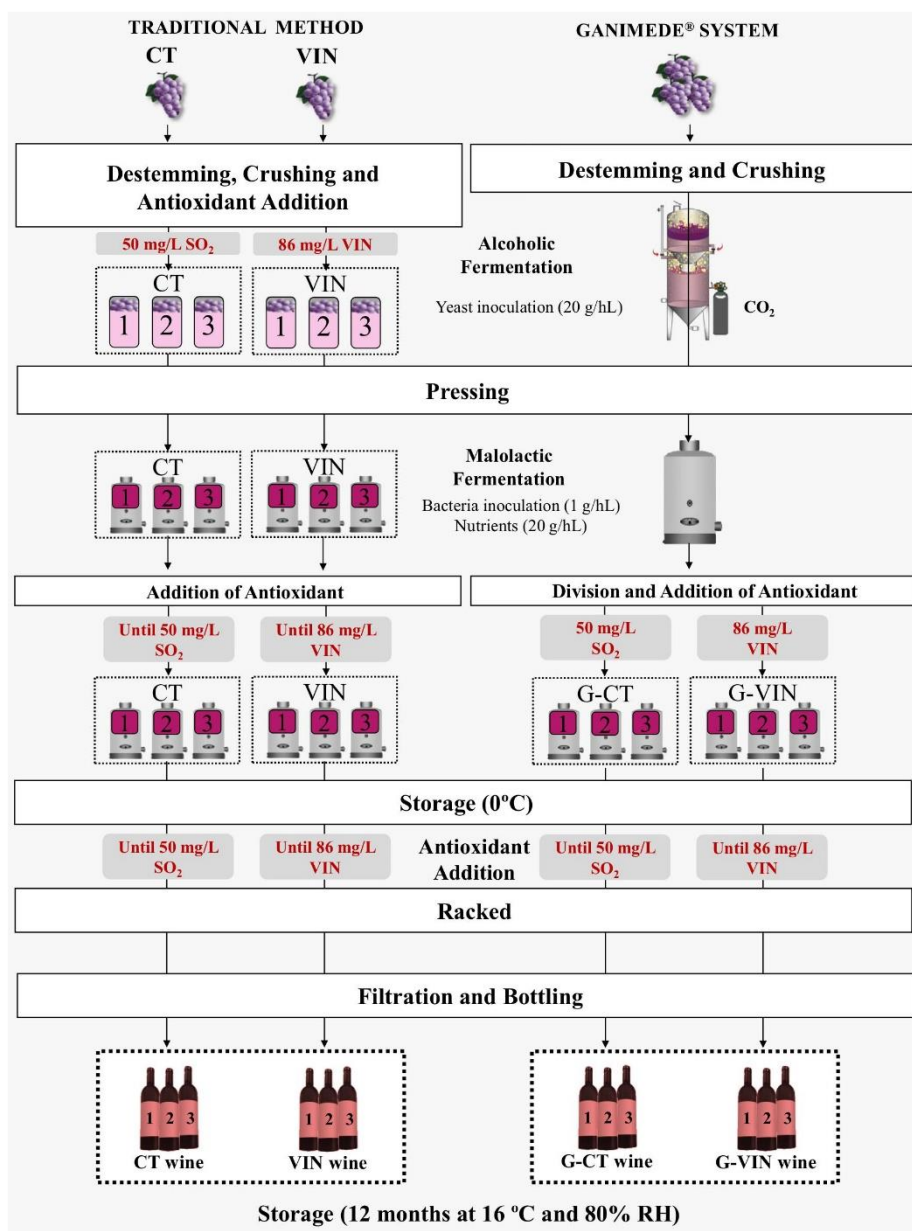


Fig. 1. Diagram of the winemaking processes: traditional winemaking and Ganimele system.

the software SpectraMagic v.3.61G (Cyberchrome Inc, Minolta Co. Ltd), following the recommendations of the Commission Internationale de L'Eclairage (CIE): the standard observer (D10°) and the standard illuminant (D65). Color differences (ΔE_{3b}^*) were calculated as the Euclidean distance between two points in the 3D space defined by L*, a*, and b* (Martínez, Melgosa, Pérez, Hita, & Negueruela, 2001).

2.6. Analysis of volatile compounds by gas chromatography

The analysis of wines fermentative volatile compounds was performed after 4 months of storage in bottle by the method described by Garde-Cerdán et al. (2014). The extraction was carried out by mixing 3 mL of sample, 9.5 mL of (NH₄)₂SO₄ saturated solution, 15 µL of internal standard solution (2-butanol, 4-methyl-2-

pentanol, 4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone, 2-octanol, and heptanoic acid, 40 mg of each of them/100 mL of ethanol) and 200 μ L of dichloromethane in tubes. The tubes were shaken for 1 h at 400 rpm and then centrifuged at 2500 rpm for 10 min. Once the phases were separated, the dichloromethane phase was recovered. 2 μ L of this extract were injected onto a Hewlett–Packard (Palo Alto, CA) 6890 series II gas chromatograph equipped with an automatic injector and a Hewlett–Packard FID detector. Separation was carried out with a DB-Wax capillary column (60 m \times 0.32 mm I.D., \times 0.5 μ m film thickness; J&W Scientific, Folsom, CA, USA). The temperature program was as follows: 40 °C for 5 min, then raised up to 220 °C at a rate of 3 °C/min. The carrier gas was nitrogen at a flow rate of 3 mL/min. Injector temperature was 220 °C and detector temperature was 280 °C. Identification of compounds was carried out by comparison of their retention times with those of pure reference standards using a Hewlett–Packard GCD Series II Gas Chromatograph Electron Ionization Detector with the same chromatographic conditions. Quantification of volatile compounds was performed using an internal standard method and was based on calibration curves of respective standards in a 12% ethanol (v/v) solution at pH 3.6. These standard solutions underwent the same process of extraction that the wine samples.

2.7. Sensory analysis

In order to study the existence of differences, a triangular test (ISO Standard 4120:1983) was employed (ISO 4120, 1983) at bottling and after 12 months of storage in bottle. Moreover, descriptive sensory analysis was performed following the Sensory Profile Method according to standard ISO 6564:1985 (ISO 6564, 1985) by 11 judges. The descriptors were scored on a scale of 1–10 (1: absence of a descriptor, 10: maximum intensity). The descriptors selected were the most likely to be affected by the winemaking process: aroma intensity, fruity aromas (red, black, mature fruits), spicy, savor intensity, bitterness, astringency, balanced and persistence. Aroma defects (dirty, reduced, oxidized, yeast, chemical, phenolic, acetic, acetaldehyde and ethyl acetate) were also evaluated.

2.8. Gas chromatography–olfactometry (GC–O) and chromatography–mass (GC–MS) analyses

GC–O analysis were carried out in wines after 6 months of storage in bottle using a Varian 3800 GC (Middelburg, The Netherlands) equipped with an FID and an OP275 olfactometer (GL Science Inc., Tokyo, Japan). The sample extraction and method followed has been described by authors (Sarrazin, Dubourdieu, & Darriet, 2007). 1 μ L of extract was injected in splitless mode, using a split time of 1 min. The columns used were DB-WAX and DB-5 from J&W Scientific, Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, California, USA), 60 m \times 0.25 mm with 0.25 μ m film thickness. The sensory panel was composed of three trained tasters, who sniffed each sample three times. Results were expressed as “modified frequency” MF (%) with the formula proposed by Dravnieks (1985).

For GC–MS analysis 1 μ L of extract was injected in a Trace GC Ultra gas chromatograph (Thermo Fisher Scientific S.p.A., Rodano, Milan, Italy) under the same conditions described above. The detector was a mass spectrometer (ISQ single quadrupole MS, Thermo Fisher Scientific, Austin, Texas, USA) operating in EI mode (70 eV), connected to the GC with a heated transfer line at 230 °C. Mass spectra were taken over the 40–350 m/z range. Thermo Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific, San Jose, California, USA) was used for data acquisition. The odorant compounds were identified on the basis of linear retention index and a comparison of MS fragmentation patterns with those of reference compounds or with mass spectra in the NIST 05 mass Spectral library (version 05).

2.9. Statistics

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) on average values. ANOVA and all pairwise comparison test (Tukey) were conducted with a significance level $p \leq 0.05$. Statistix version 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA) was used.

3. Results and discussion

3.1. Enological parameters

Enological parameters of wines at bottling are shown in Table 1. No significant differences were found in relative density, ethanol, glycerin, total and volatile acidity, pH, acetic acid, malic acid, succinic acid, acetaldehyde, ethyl acetate and methanol. Dry extract was significantly higher in wines elaborated by traditional method (CT and VIN) than in those elaborated by Ganimede (G-CT and G-VIN), which means that traditional winemaking was a more extractive process than Ganimede. It was probably due to the softer punching down of the cap in Ganimede system. Citric acid was under detection limit (0.1 mg/L) in Ganimede. Tartaric acid ranged between 1.74 and 2.21, lower values corresponded to Ganimede. CT wines showed lower concentration of lactic acid, which was in agreement with the lower malic concentration in grape (data not shown). Regarding preservative content, only CT wines contained significant concentration of SO₂, while stilbenes were mainly found in wines treated with Vineatrol. Anthocyanin concentration was significantly lower (15%) in wines treated with Vineatrol that in those treated with SO₂ in both winemaking systems. We hypothesize that it may be due to the interaction between the non-phenolic fraction of Vineatrol and anthocyanins. Cellulose and lignin (main components from grapevine shoot) might precipitate anthocyanins as cell wall material does (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe, & Serna-Saldívar, 2014). No differences in tannins and total polyphenols index were found between winemaking systems neither between preservatives, in

Table 1
Enological parameters in Syrah wines at bottling.

	CT	VIN	G-CT	G-VIN	LS
Relative density	0.9922	0.9922	0.9923	0.9922	–
Ethanol (%vol.)	13.84	13.76	13.92	13.95	–
Glycerin (g/L)	9.04	8.49	8.99	8.95	–
Dry extract (g/L)	23.99 ^a	23.56 ^a	21.58 ^b	21.92 ^b	***
Total acidity (g/L TH ₂)	4.44	4.55	4.32	4.42	–
pH	3.68	3.70	3.69	3.72	–
Volatile acidity (g/L AcH)	0.33	0.28	0.33	0.31	–
Acetic acid (g/L)	0.32	0.31	0.36	0.36	–
Citric acid (g/L)	0.27 ^a	0.16 ^b	<LoD	<LoD	***
Tartaric acid (g/L)	2.10 ^{ab}	2.21 ^a	1.74	2.02 ^b	***
Malic acid (g/L)	0.17	0.19	0.14	0.16	–
Lactic acid (g/L)	1.85 ^b	2.21 ^a	2.17 ^a	2.18 ^a	*
Succinic acid (g/L)	0.89	0.83	0.73	0.75	–
Total SO ₂ (mg/L)	45.0 ^a	0.0 ^b	42.0 ^a	0.0 ^b	***
Free SO ₂ (mg/L)	21.0 ^a	0.0 ^b	24.0 ^a	0.0 ^b	***
Total stilbenes (mg/L)	1.01 ^b	23.30 ^a	1.02 ^b	23.52 ^a	***
Total anthocyanins (mg/L)	592 ^a	507 ^b	571 ^a	484 ^b	**
Tannins (g/L)	3.96	4.11	3.74	3.82	–
TPI	40.3	41.6	38.2	39.0	–
Acetaldehyde (mg/L)	13	16	9	9	–
Ethyl acetate (mg/L)	76	65	55	61	–
Methanol (mg/L)	119	120	132	131	–

CT, SO₂ addition wine; VIN, Vineatrol addition wine; G-CT, SO₂ addition wine elaborated in fermenter Ganimede; G-VIN, Vineatrol addition wine elaborated in fermenter Ganimede. TPI, Total Polyphenols Index; <LoD, under detection limit. Different superscript letters (a, b or c) for the same parameter denote significant differences ($p < 0.05$). Analyses of variance, level of significance (LS): * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

contrast with described by other authors (Bai et al., 2013; Garde-Cerdán et al., 2008).

3.2. Evolution of color related parameters

Color related parameters were determined at bottling and after 12 months of storage in bottle (Table 2). The addition of Vineatrol significantly modified color related parameters in wines. At bottling, both VIN and G-VIN wines showed higher color intensity, a^* (redness), b^* (yellowness), C_{ab}^* (chroma) and lower L^* (lightness) than their respective CT ones. Thus, at this step of the process, wines treated with Vineatrol showed higher and more pure color than CT ones, especially in Ganimede system. H_{ab} only showed significant difference in wines elaborated under traditional winemaking. In control wines, SO_2 can strongly bleach the free anthocyanins by the nucleophilic addition at the C4 position in the C ring of the anthocyanin in the flavylium cation in red wines, decreasing color (He et al., 2012). On the other hand, the addition of extracts rich in polyphenols to red wine has been described to increase polymerization reaction and thus improve wine color properties (Gordillo et al., 2014). After 12 months of storage in bottle, wines treated with Vineatrol showed lower color intensity a^* (redness), C_{ab}^* (chroma), and higher L^* (lightness) hue and h_{ab} than their respective CT ones, while no significant differences were found for b^* (yellowness). At this step, these differences were more marked in traditional than in Ganimede. Vineatrol treated wines showed less color and low purity color. Color related parameters of Vineatrol wines (VIN and G-VIN) were less stable than those of SO_2 treated wines during storage in bottle. Thus, although Vineatrol achieved color parameters at bottling, it was not able to preserve these differences after the storage period (12 months).

In order to establish whether the observed changes in the chromatic parameters were visually relevant, the color differences (ΔE^*) between Vineatrol wines and their respective controls (VIN vs CT, and G-VIN vs G-CT) were calculated. ΔE^* values ≥ 3 CIELab units have been related to human-eye perceptible differences in color (Martínez et al., 2001). Differences were perceptible both at bottling (especially in Ganimede system) and after 12 months of storage in bottle (especially in traditional winemaking).

3.3. Volatile compounds

The volatile compounds determined in Syrah wines were grouped into three categories: esters ($n = 11$, Fig. 2A), alcohols ($n = 9$, Fig. 2B) and fatty acids ($n = 5$, Fig. 2C). Wine volatile esters composition was hardly affected by the added preservative (SO_2 or Vineatrol) in Ganimede system. Since esters are produced during alcoholic fermentation (AF), and this process was common to G-CT and G-VIN (Fig. 1), no differences were expected in these volatile compounds. However, as different AF was developed in

traditional winemaking (CT and VIN, Fig. 1), major differences were found. The use of SO_2 increased wine esters concentration in relation to the use of Vineatrol. CT wines presented higher concentration of isoamyl acetate, ethyl propionate, ethyl butyrate, ethyl hexanoate, hexyl acetate, ethyl octanoate, ethyl 3-hydroxybutyrate and 2-phenylethyl acetate than VIN wines (Fig. 2A). These compounds were found in the wines at a concentration above their odor thresholds (Gómez-Míguez, Cacho, Ferreira, Vicario, & Heredia, 2007). Esters are relevant compounds for the wine aroma and thus for wine quality, since many of them are responsible for aromas such as floral, fruity, solvent-like, sweaty or soapy, depending on the structure and carbon chain length of the esters (Ebeler, Sun, Datta, Stremple, & Vickers, 2001). The most abundant volatile esters, ethyl lactate did not show significant differences between the winemaking system or the used preservative, either. The major difference between traditional and Ganimede was the higher concentration in diethyl succinate in Ganimede wines. However, the concentration of this compound was below its sensory threshold (200 mg/L) in the wines (Gómez-Míguez et al., 2007). Garde-Cerdán et al. (2008) also observed higher concentration of total esters in Syrah wines obtained from the traditional winemaking than from the Ganimede.

The content of higher alcohols (Fig. 2B) presented a similar behavior as esters.

The total alcohols content was below 300 mg/L in the wines, thereby contributing to wine aromatic complexity. In relation to both methodologies (traditional and Ganimede), generally, traditional winemaking reached higher alcohol concentration than Ganimede. It could be due to the content of oxygen in the traditional winemaking that is higher than in Ganimede one. It has been described that the oxygen favors the synthesis of higher alcohols during the fermentation (Valero, Moyano, Millan, Medina, & Ortega, 2002), which was in agreement with our data.

In Ganimede system, the use of different preservatives did not show differences in the higher alcohols analyzed, but for methionol. Higher concentration of methionol was detected in control wines than in Vineatrol ones. Methionol is synthesized by yeast during alcoholic fermentation, and it is known to be very sensitive to oxidation (Dombre, Rigou, Wirth, & Chalié, 2015). Thus, methionol was more oxidized in absence of SO_2 . Methionol exhibits boiled potato notes. Its concentration was under the odor threshold (1 mg/L) in wines (Gómez-Míguez et al., 2007).

Regarding traditional winemaking, the majority of alcohols increased when SO_2 was used during the AF (G-CT): isoamyl alcohols, 2-phenylethanol, 1-hexanol, Z-3-hexenol and benzyl alcohol. These compounds contributed to the fruity, floral and grass aromas (Gómez-Míguez et al., 2007). Sonni et al. (2009) observed that SO_2 has a significant influence on alcohol production. The authors found that the amount of total alcohols in wines treated with

Table 2
Color related parameters in Syrah wines.

	Bottling					12 months of storage in bottle				
	CT	VIN	G-CT	G-VIN	LS	CT	VIN	G-CT	G-VIN	LS
CI	7.74 ^b	10.34 ^a	6.56 ^c	9.69 ^a	***	9.73 ^a	8.37 ^b	8.32 ^b	7.61 ^b	*
hue	0.62 ^b	0.61 ^b	0.67 ^a	0.60 ^b	***	0.70 ^c	0.78 ^b	0.75 ^{b,c}	0.86 ^a	**
L^*	56.62 ^a	52.78 ^b	63.34 ^a	52.74 ^b	**	49.00 ^b	57.43 ^a	55.70 ^a	59.55 ^a	*
a^*	46.92 ^b	49.79 ^a	38.97 ^c	50.29 ^a	**	48.22 ^a	39.45 ^{b,c}	41.68 ^b	37.02 ^c	**
b^*	3.57 ^b	5.61 ^a	2.34 ^b	3.28 ^a	**	13.18	13.80	13.31	16.62	-
C_{ab}^*	43.99 ^{a,b}	50.11 ^a	38.47 ^b	50.38 ^a	**	47.83 ^a	41.8 ^b	43.78 ^{a,b}	40.73 ^b	*
h_{ab}	4.24 ^b	6.41 ^a	3.68 ^b	3.73 ^b	**	14.75 ^b	19.4 ^{a,b}	17.59 ^{a,b}	24.38 ^a	*
ΔE^*		5.21 ¹		15.54 ²			12.18 ¹			6.89 ²

CT, SO_2 addition wine; VIN, Vineatrol addition wine; G-CT, SO_2 addition wine elaborated in fermenter Ganimede; G-VIN, Vineatrol addition wine elaborated in fermenter Ganimede. CI, color intensity. ΔE^* , color differences (¹VIN vs CT; ²G-VIN vs G-CT). Different superscript letters (a, b or c) for the same parameter denote significant differences ($p < 0.05$). Analyses of variance, levels of significance (LS): * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

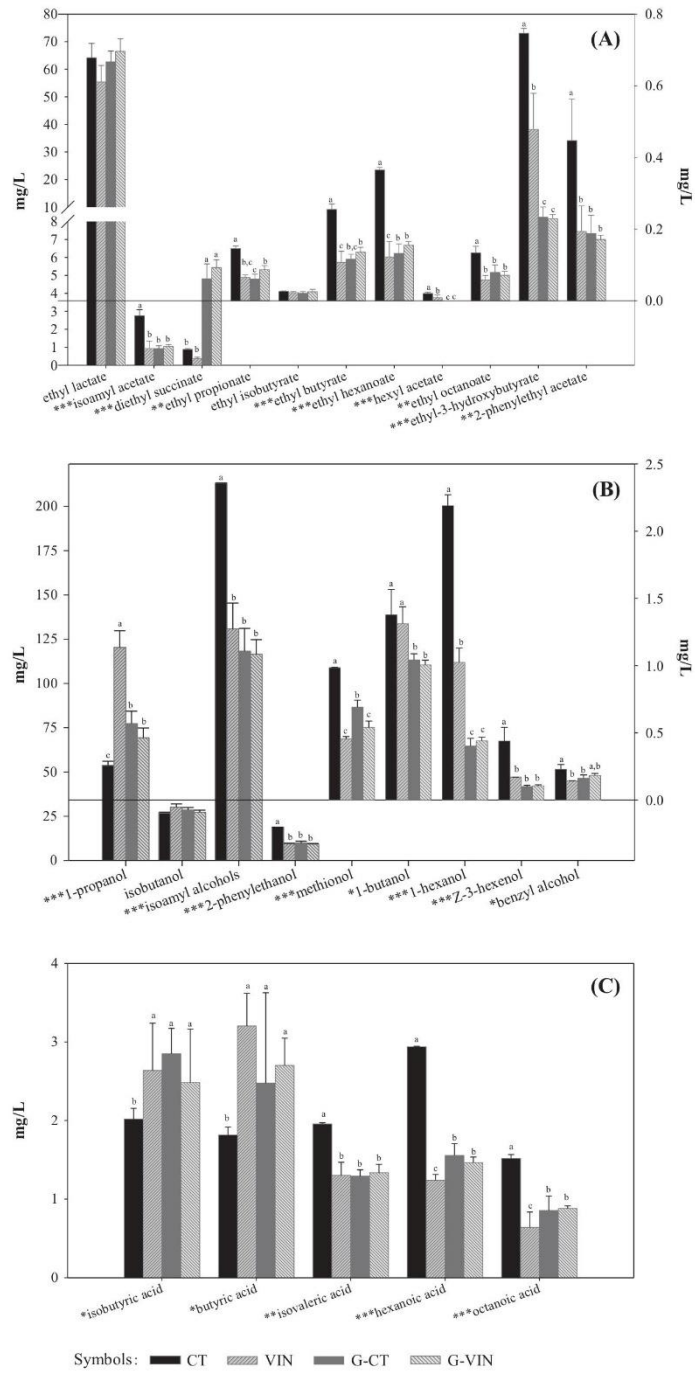


Fig. 2. Volatile compounds determined in Syrah wines: (A) esters, (B) alcohols, (C) acids. CT, ■ SO₂ addition wine; VIN, ▨ Vineatrol addition wine; G-CT, ▩ SO₂ addition wine elaborated in fermenter Ganimed®; G-VIN, ▪ Vineatrol addition wine elaborated in fermenter Ganimed®. Different superscript letters (a, b or c) for the same parameter denote significant differences ($p < 0.05$). Analyses of variance, levels of significance: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

SO₂ was higher than in wines treated with lysozyme. In the current study, the only compound that increased its concentration with the addition of Vineatrol was 1-propanol. Other authors have described that wines with oxidation notes, were related to higher values in propanol, among other compounds (Balboa-Lagunero, Arroyo, Cabellos, & Aznar, 2013). However 1-propanol concentration was under the odor threshold (306 mg/L) in the wines (Peinado, Moreno, Bueno, Moreno, & Mauricio, 2004).

No significant differences were observed in the content of fatty acids in Ganimede system (Fig. 2C). In traditional winemaking, CT wines showed higher concentrations of isovaleric, hexanoic and octanoic acids than wines treated with Vineatrol. In contrast, Vineatrol wines (VIN and G-VIN) presented higher concentration of isobutyric and butyric acids than their respective control ones. Fatty acids showed values above its perception, and thus they contributed to the fresh flavor of wine (Poza-Bayón et al., 2005). Finally, it can be observed that VIN wines were more similar to Ganimede wines (G-CT and G-VIN) than to its respective CT.

3.4. Sensory analysis

A triangular test to evaluate the differences among bottled wines was conducted in dark wine glasses to avoid judgments being influenced by wine color. The results showed that differences between wines treated with SO₂ and those treated with Vineatrol could be detected (95% significance level) in olfactory phase for both winemaking systems, at bottling and after 12 months of storage in bottle (data not shown).

In descriptive analysis, differences in aroma between treatments were more marked in Ganimede system at bottling (Fig. 3A). In Ganimede system aroma intensity was significantly higher in G-VIN wines than in G-CT ones, which could not be justified by volatile wine composition (Fig. 2). It is important to notice that volatile composition was analyzed after 4 months of bottling. This difference was supported for more scents of fruit (black and mature fruit). In traditional winemaking only red fruit scent was higher in CT wines than in VIN ones. CT wines showed less spicy aroma than the others (VIN, G-CT and G-VIN). None of the wines showed any aromatic defects. In taste, both winemaking systems followed the same tendency, although differences were more marked in Ganimede system. Wines treated with Vineatrol (VIN and G-VIN) showed higher savor intensity, bitterness, astringency and persistence than those treated with SO₂ (CT and G-CT), and thus VIN wines resulted less balanced.

After 12 months of storage in bottle (Fig. 3B), wines treated with Vineatrol were rated with less points than their respective controls. Vineatrol wines showed less red fruit scent. G-VIN wines even showed some defects such as chemical and phenolic notes.

These results were in agreement with Santos et al. (2013), who established that red wines elaborated without SO₂ altered significantly aroma and taste after 9 months of storage in bottle. In contrast, minor differences have been found between red wines treated with colloidal silver after five months of storage in bottle (Garde-Cerdán et al., 2014).

3.5. Olfactometric profile

Olfactometric characterization was developed on each wine (Table 3). Overall, more than 80 odoriferous perceptions were detected. To simplify, odorants not reaching a maximum GC–O scores (MF) of 30% were eliminated and considered as noise (Culleré et al., 2013). Then, the number of odorant zones was reduced to 59. From these, 8 odorant zones were not identified: LRI_{DB-Wax} 1841 (pungent scent), LRI_{DB-5} 1271 (chamomile, sweet scents), LRI_{DB-Wax} 2057 (wet scent), LRI_{DB-Wax} 2115 (phenolic scent), LRI_{DB-Wax} 2296 (black pepper scent), LRI_{DB-Wax} 2462 (pine, fresh scents), LRI_{DB-Wax} 2485 (smoky scent) and LRI_{DB-5}1688 (citrus, almond scents).

The analysis of variance (ANOVA) revealed odorant differences derived from both winemaking systems and the used preservative. Regarding winemaking system, 2,3-butanodione (butter, lactic scents), ethyl-2-methyl butyrate + ethyl-3-methylbutyrate (fruity scent) and methional (boiled potatoes scent) showed higher modified frequency in wines elaborated with Ganimede than in those elaborated with traditional winemaking, independently of the preservative used. While Z-3-hexenal (grass scent), linalool (floral, Muscat scents) and 2-phenylethyl acetate (rose scent) compounds showed higher modified frequency in wines elaborated with traditional winemaking than in those elaborated with Ganimede. 1-Hexanol and Z-3-hexenol, both with grass scent, and isoamyl acetate, with banana scent, resulted significantly higher in wines treated with SO₂ under traditional conditions (CT), which was in agreement with volatile composition data (Fig. 2).

Ethyl butyrate, isoamyl alcohol, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, isobutyric acid, butyric acid, methional and 2-phenylethanol did not show differences among wines by olfactometric analysis, which was not in agreement with volatile composition data (Fig. 2). In general terms, high modified frequency is related with

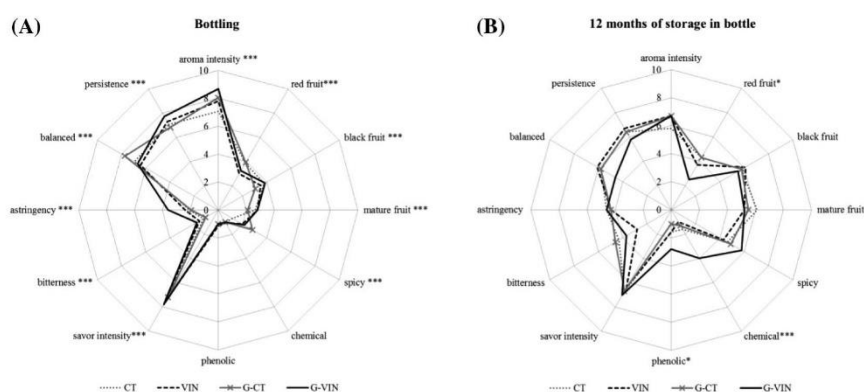


Fig. 3. Cobweb diagram of the sensory score for Syrah wines (A) at bottling and (B) after 12 months of storage in bottle. CT, SO₂ addition wine in traditional winemaking; VIN, Vineatrol addition wine in traditional winemaking; G-CT, SO₂ addition wine in Ganimede system; G-VIN, Vineatrol addition wine in Ganimede system; Descriptors with * denote significant differences ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

Table 3

Odoriferous zones found in Syrah wines. Gas chromatography retention data, identity, odorant description, modified frequency (%) and differences in modified frequency (%) between CT and VIN wines, and G-CT and G-VIN wines.

OZs	LRI		Compound	Descriptor	MF (%)				ΔMF (%)		
	DB-WAX	DB-5			CT	VIN	G-CT	G-VIN	VIN-CT	(G-VIN)-(G-CT)	LS
1	<1100	<700	2,3-butanodione ¹	Butter, lactic	67 ^b	67 ^b	81 ^a	82 ^a	0	2	**
2	<1100	752	Isobutyl acetate ²	Sweet	62	61	70	67	-1	-2	
3	<1100	793	Ethyl butyrate ¹	Fruity	64	64	70	73	0	3	
4	<1100	846, 850	Ethyl 2-methylbutyrate ² + ethyl 3-methylbutyrate ²	Fruity	40 ^b	48 ^{ab}	67 ^a	66 ^a	8	-1	*
5	<1100	<700	Isobutanol ¹	Fusel, bitter, green	65	59	60	58	-6	-3	
6	<1100	820	Butylacetate ²	Solvent, fruity	55	52	41	55	-3	14	
7	1119	876	Isoamyl acetate ¹	Banana	82 ^a	73 ^b	74 ^b	76 ^b	-10	2	*
8	1140 ¹	797	Z-3-hexenal ²	Grass	62 ^a	65 ^a	47 ^{ab}	41 ^b	2	-6	*
9	1209	728	Isoamyl alcohol ¹	Fusel	87	87	87	89	0	2	
10	1239	998	Ethyl hexanoate ¹	Fruity	71	77	80	73	7	7	
11	1303	865	2-methyl-3-furanthiol ²	Meaty	84	81	88	89	-3	1	
12	1348	924	2-acetyl-1-pyrroline ²	Popcorn, yeast, bread	53	49	45	56	-4	11	
13	1354	940	4-mercapto-4-methyl-2-pentanone ²	Box tree	46	51	41	45	5	5	
14	1361	895 ¹	1-hexanol ²	Grass	65 ^a	49 ^{ab}	41 ^b	43 ^b	-16	2	**
15	1386 ¹	855	Z-3-hexenal ¹	Grass	69 ^a	57 ^b	47 ^c	50 ^{bc}	-2	13	**
16	1432 ¹	912	2-furfurylthiol ²	Coffee	37	47	50	44	10	-6	
17	1436	1196	Ethyl octanoate ¹	Fruity	68	66	70	71	-3	1	
18	1440 ¹	<700	Acetic acid ¹	Vinegar	80	82	73	83	2	11	
19	1468	906	Methional ²	Boiled potato	71 ^b	78 ^{ab}	84 ^a	85 ^a	7	1	**
20	1522	1153	Z-2-nonenal ²	Chlorine, green	76	73	70	78	-3	8	
21	1542	1164	3,5-diethyl-2-methylpyrazine ²	Baked, sweet	70	69	66	68	-1	11	
22	1548	1098 ¹	Linalool ¹	Floral, Muscat	71 ^a	73 ^a	47 ^b	47 ^b	2	0	**
23	1573 ¹	-	Isobutyric acid ²	Cheese	53	47	59	52	-6	-6	
24	1592	1156	(E,Z)-nona-2,6-dienal ²	Cucumber	64	69	59	69	4	9	
25	1624 ¹	-	Butyric acid ¹	Cheese	97	93	90	91	-4	2	
26	1630 ¹	1013	2-acetylpyrazine ²	Toasty, burnt	69	76	76	76	8	0	
27	1659	1047	Phenylacetaldehyde ¹	Honey	52	44	24	50	-8	26	
28	1665	803 ²	3-methylbutanoic acid ¹	Cheese	84	77	86	87	-7	1	
29	1722	979	Methional ¹	Boiled potato	90	87	82	81	-2	-1	
30	1726	1252	3-mercaptohexyl acetate ²	Box tree	60	65	45	45	5	0	
31	1821 ¹	1263	2-phenethyl acetate ¹	Roses	75 ^a	71 ^{ab}	60 ^b	62 ^{ab}	-4	2	*
32	1831	1396	β-damascenone ¹	Sweet, apple	79	83	87	87	4	1	
33	1841 ¹	-	n.i.	Pungent	88	88	88	88	0	0	
34	1847	1133	3-mercaptohexanol ²	Grapefruit	78	82	82	86	4	3	
35	1859	1095	Guaiacol ²	Phenolic, smoky	76	76	73	74	0	0	
36	1891	1355	Ethyl dihydrocinnamate ²	Sweet, pleasant	72	68	74	73	-5	-1	
37	1917	1118	2-phenylethanol ¹	Roses	89	92	85	87	3	3	
38	-	1271 ¹	n.i.	Chamomile, sweet	0 ^b	71 ^a	0 ^b	67 ^a	71	67	***
39	2042	1088	Furaneol ²	Caramel	69	77	83	81	8	-2	
40	2055	1293	4-ethylguaiacol ²	Clove	64	52	58	60	-12	3	
41	2057	1380	n.i.	Wet, unpleasant	76	74	73	62	-1	-11	
42	2068	1145	Homofuraneol ²	Caramel	49	56	39	49	7	10	
43	2076 ¹	1076–1088	p-Cresol (m-cresol) ²	Leather, animal	55	60	67	73	5	6	
44	2088	1073	Norfuraneol ²	Caramel	54	59	60	52	5	-8	
45	2115 ¹	-	n.i.	Phenolic	58 ^{ab}	69 ^a	55 ^b	67 ^a	11	12	*
46	2130	1455	Ethyl cinnamate ²	Flowery	64	71	70	69	6	-1	
47	2166 ¹	1369	γ-decalactone ² + eugenol ¹	Peach + clove	67	60	67	70	-7	4	
48	2179 ¹	1179	4-ethylphenol ²	Leather	48	50	67	69	2	2	
49	2195 ¹	1320	4-vinylguaiacol ²	Phenolic	43	50	71	70	1	10	
50	2196	1129	Sotolon ²	Curry	92	93	91	91	1	1	
51	2219	1490	δ-decalactone ²	Coconut	51	61	49	58	10	8	
52	2226 ¹	1317	o-aminoacetophenone	Sweet, smoky.	71	78	73	69	8	-4	
53	2252	1201 ¹	Abhexone ²	Curry	52	45	47	53	-7	6	
54	2296	1733	n.i.	Black pepper	66	70	66	76	4	10	
55	2462	1558	n.i.	Pine, fresh	42 ^b	69 ^a	20 ^b	70 ^a	27	49	***
56	2485 ¹	-	n.i.	Smoky	62	60	60	55	-2	-5	
57	2546	1258	Phenylacetic acid ¹	Urine, sweet, floral	84	91	83	81	7	-2	
58	2564	1411	Vanillin ²	Vanilla	72 ^b	77 ^{ab}	81 ^{ab}	83 ^a	6	3	
59	-	1688 ¹	n.i.	Citrus, almond	0 ^b	62 ^a	0 ^b	48 ^a	62	48	**

CT, SO₂ addition wine; VIN, Vineatrol addition wine; G-CT, SO₂ addition wine elaborated in fermenter Ganimede; G-VIN, Vineatrol addition wine elaborated in fermenter Ganimede; LRI, Linear retention index; ¹Identification based on coincidence of gas chromatography retention on both columns and mass spectrometric data with those of pure compounds available in the laboratory or with NIST mass spectrometric library data. ²Identification based on coincidence of chromatographic retention data on DB-WAX or DB5 capillary column and on the similarity of odor previously reported. ³MF (%) calculated on that capillary columns. n.i., not identified compound; MF, modified frequency; ΔMF (%), difference in modified frequency between VIN and CT wines, G-VIN and G-CT wines. Different superscript letters (a, b or c) for the same parameter denote significant differences ($p < 0.05$). Analyses of variance, levels of significance: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

high sensory impact. However, small differences among samples in compounds that showed high modified frequency values may be difficult to detect by olfactometry. The influence of ethanol, or in

general of the food matrix, has been reported to modify the detection of certain compounds by olfactometry analysis (Campo, Ferreira, Escudero, & Cacho, 2005).

Regarding the used preservative, two unknown compounds: LRI_{DB-5} 1271 with chamomile/sweet scents, and LRI_{DB-5} 1688 with citric/almond scents, were only detected in wines treated with Vineatrol. Another two unidentified compounds increased their MF in Vineatrol wines: LRI_{DB-Wax} 2115 and LRI_{DB-Wax} 2462. Since these two compounds were also detected in control wines (CT, G-CT) with lower MF, they did not come from Vineatrol addition. Large differences of MF (%) values ($\Delta MF > 40\%$) have an acuter role in the perception of aromatic differences among samples (Álvarez-Pérez et al., 2012), and thus the most important markers of Vineatrol wines were as follow: LRI_{DB-5} 1271 (chamomile/sweet scents) > LRI_{DB-5} 1688 (citric/almond scents) > LRI_{DB-Wax} 2462 (pine, fresh scents) > LRI_{DB-Wax} 2115 (phenolic scent).

4. Conclusions

In the present work it has been demonstrated that a grapevine-shoot extract with 29% of stilbenes (Vineatrol) did not negatively affect the red wine chemical composition. At bottling, wines treated with Vineatrol showed (i) good quality enological parameters (ii) higher color intensity and purity than wines treated with SO₂ and (iii) good score at sensory analysis, independently of the wine-making system used (traditional or Ganimede). However, Vineatrol was not able to preserve these differences after 12 months of storage in bottle. After 12 months of storage in bottle, wines treated with Vineatrol showed oxidation characters in color parameters and sensory analysis.

Regarding volatile composition, in traditional winemaking the presence of SO₂ during AF increased the concentration of esters, alcohols and several fatty acids in comparison with the use of Vineatrol, which improved the global aroma of wines. Moreover, wines treated with Vineatrol showed lower concentration of methionol and higher of 1-propanol, which are related to oxidation, although the odor thresholds of these two compounds were not reached. In wines elaborated by Ganimede system, Vineatrol preserved the volatile compounds as much as SO₂ (G-CT), but for methionol.

Olfactometry analysis evidenced that Vineatrol modified the olfactometric profile of Syrah wines introducing two new odorant zones which were not identified.

Further research should be focused on optimizing the Vineatrol doses in combination with or without other preservatives to avoid oxidation processes during the storage in bottle.

A wine treated with Vineatrol is a free SO₂ wine which is considered a wine more natural, healthier, more sustainable and genuine. The replacement of SO₂ by a natural extract such as Vineatrol, with described health promoting properties, may implement this consideration.

Acknowledgments

Authors thank the INIA and FEDER for their financial support (Project RTA2011-00002). Authors are grateful to Jean-Claude Izard (Actichem) for kindly supplied Vineatrol® and to GESVAB for kindly supplied stilbene standards, Ruiz-Moreno and Guerrero thanks to the European Social Fund (ESF) 2007-2013 “Andalucía se mueve con Europa” for the financial support of their contracts.

References

Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46–55.
 Álvarez-Pérez, J. M., Campo, E., San-Juan, F., Coque, J. J. R., Ferreira, V., & Hernández-Orte, P. (2012). Sensory and chemical characterisation of the aroma of Prieto Picudo rosé wines: The differential role of autochthonous yeast strains on aroma profiles. *Food Chemistry*, 133(2), 284–292.

Bai, B., He, F., Yang, L., Chen, F., Reeves, M. J., & Li, J. (2013). Comparative study of phenolic compounds in Cabernet Sauvignon wines made in traditional and Ganimede fermenters. *Food Chemistry*, 141(4), 3984–3992.
 Balboa-Lagunero, T., Arroyo, T., Cabellos, J. M., & Aznar, M. (2013). Yeast selection as a tool for reducing key oxidation notes in organic wines. *Food Research International*, 53(1), 252–259.
 Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., & Cacho, J. (2005). Prediction of the wine sensory properties related to grape variety from dynamic-headspace gas chromatography–Olfactometry data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5682–5690.
 Comuzzo, P., Rauhut, D., Werner, M., Lagazio, C., & Zironi, R. (2013). A survey on wines from organic viticulture from different European countries. *Food Control*, 34, 274–282.
 Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2008). Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiology*, 25(2), 422–427.
 Costanigro, M., Appleby, C., & Menke, S. D. (2014). The wine headache: Consumer perceptions of sulfites and willingness to pay for non-sulfited wines. *Food Quality and Preference*, 31, 81–89.
 Culleré, L., Fernández de Simón, B., Cadahía, E., Ferreira, V., Hernández-Orte, P., & Cacho, J. (2013). Characterization by gas chromatography–Olfactometry of the most odor-active compounds in extracts prepared from acacia, chestnut, cherry, ash and oak woods. *LWT – Food Science and Technology*, 53(1), 240–248.
 Dombre, C., Rigou, P., Wirth, J., & Chalier, P. (2015). Aromatic evolution of wine packed in virgin and recycled PET bottles. *Food Chemistry*, 176, 376–387.
 Dravnieks, A. (1985). *Atlas of odor character profiles*. Philadelphia, PA: Astm Intl.
 Ebeler, S. E., Sun, G. M., Datta, M., Stremple, P., & Vickers, A. K. (2001). Solid-phase microextraction for the enantiomeric analysis of flavors in beverages. *Journal of AOAC International*, 84(2), 479–485.
 García-Ruiz, A., Crespo, J., López-de-Luzuriaga, J. M., Olmos, M. E., Monge, M., Rodríguez-Álfaro, M. P., ... Moreno-Arribas, M. V. (2015). Novel biocompatible silver nanoparticles for controlling the growth of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in wines. *Food Control*, 50, 613–619.
 Garde-Cerdán, T., Jarauta, I., Salinas, M. R., & Ancín-Azpilicueta, C. (2008). Comparative study of the volatile composition in wines obtained from traditional vinification and from the Ganimede method. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(10), 1777–1785.
 Garde-Cerdán, T., López, R., Garijo, P., González-Arenzana, L., Gutiérrez, A. R., López-Álfaro, I., & Santamaría, P. (2014). Application of colloidal silver versus sulfur dioxide during vinification and storage of Tempranillo red wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20(1), 51–61.
 Gómez-Míguez, M. J., Cacho, J. F., Ferreira, V., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2007). Volatile components of Zalema white wines. *Food Chemistry*, 100(4), 1464–1473.
 González-Rompinelli, E. M., Rodríguez-Bencomo, J. J., García-Ruiz, A., Sánchez-Patán, F., Martín-Álvarez, P. J., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2013). A winery-scale trial of the use of antimicrobial plant phenolic extracts as preservatives during wine ageing in barrels. *Food Control*, 33(2), 440–447.
 Gordillo, B., Cejudo-Bastante, M. J., Rodríguez-Pulido, F. J., Jara-Palacios, M. J., Ramírez-Pérez, P., González-Miret, M. L., & Heredia, F. J. (2014). Impact of adding white pomace to red grapes on the phenolic composition and color stability of Syrah wines from a warm climate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(12), 2663–2671.
 Guerrero, R. F., & Cantos-Villar, E. (2015). Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. *Trends in Food Science & Technology*, 42(1), 27–43.
 He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C.-Q. (2012). Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules*, 17(2), 1571–1601.
 ISO 4120 (1983). *Sensory analysis. Methodology. Triangular test*. Genève, Switzerland: International Organization for Standardization.
 ISO 6564 (1985). *Sensory analysis. Methodology. Flavour profile methods*. Genève, Switzerland: International Organization for Standardization.
 Izquierdo-Cañas, P. M., García-Romero, E., Huertas-Nebreda, B., & Gómez-Alonso, S. (2012). Colloidal silver complex as an alternative to sulphur dioxide in winemaking. *Food Control*, 23(1), 73–81.
 Lasanta, C., Roldán, A., Caro, I., Pérez, L., & Palacios, V. (2010). Use of lysozyme for the prevention and treatment of heterolactic fermentation in the biological aging of sherry wines. *Food Control*, 21(11), 1442–1447.
 Liburdí, K., Benucci, I., & Esti, M. (2014). Lysozyme in wine: an overview of current and future applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 1062–1073.
 Martínez, J. A., Melgosa, M., Pérez, M. M., Hita, E., & Negueruela, A. I. (2001). Note. Visual and instrumental color evaluation in red wines. *Food Science and Technology International*, 7(5), 439–444.
 Müller, C., Ullmann, K., Wilkens, A., Winterhalter, P., Toyokuni, S., & Steinberg, P. (2009). Potent antioxidative activity of Vineatrol® 30 grapevine-shoot extract. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(8), 1831–1836.
 OIV (2014). *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins*. Paris: Office International de la Vigne et du Vin.
 Peinado, R. A., Moreno, J., Bueno, J. E., Moreno, J. A., & Mauricio, J. C. (2004). Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chemistry*, 84(4), 585–590.
 Pozo-Bayón, M. A., G-Alegria, E., Polo, M. C., Tenorio, C., Martín-Álvarez, P. J., Calvo de la Banda, M. T., ... Moreno-Arribas, M. V. (2005). Wine volatile and amino acid composition after malolactic fermentation: Effect of *Oenococcus oeni* and

- Lactobacillus plantarum starter cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8729–8735.
- Raposo, R., Ruiz-Moreno, M. J., Garde-Cerdán, T., Puertas, B., Moreno-Rojas, J. M., Gonzalo-Diago, A., ... Cantos-Villar, E. (2016). Effect of hydroxytyrosol on quality of sulfur dioxide-free red wine. *Food Chemistry*, 192, 25–33.
- Romain, C., Gaillet, S., Carillon, J., Vidé, J., Ramos, J., Izard, J.-C., ... Rouanet, J.-M. (2012). Vineatrol and cardiovascular disease: Beneficial effects of a vine-shoot phenolic extract in a hamster atherosclerosis model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(44), 11029–11036.
- Ruiz-Moreno, M. J., Raposo, R., Cayuela, J. M., Zafrilla, P., Piñeiro, Z., Moreno-Rojas, J. M., Mulero, J., Puertas, B., Giron, F., Guerrero, R. F., & Cantos-Villar, E. (2015). Valorization of grape stems. *Industrial Crops and Products*, 63, 152–157.
- Saint-Cricq de Gaulejac, N., Vivas, N., & Glories, Y. (1998). Maturité phénolique: définition et contrôle. *Revue Française d'Œnologie*, 173, 22–25.
- Salaha, M.-I., Kallithraka, S., Marmaras, I., Koussissi, E., & Tzourou, I. (2008). A natural alternative to sulphur dioxide for red wine production: Influence on colour, antioxidant activity and anthocyanin content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8), 660–666.
- Santos, M. C., Nunes, C., Cappelle, J., Gonçalves, F. J., Rodrigues, A., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2013). Effect of high pressure treatments on the physicochemical properties of a sulphur dioxide-free red wine. *Food Chemistry*, 141(3), 2558–2566.
- Santos, M. C., Nunes, C., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2012). Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: Review of their potentialities and limitations. *European Food Research and Technology*, 234(1), 1–12.
- Sarrazin, E., Dubourdiou, D., & Darriet, P. (2007). Characterization of key-aroma compounds of botrytized wines, influence of grape botrytization. *Food Chemistry*, 103(2), 536–545.
- Sonni, F., Cejudo Bastante, M. J., Chinnici, F., Natali, N., & Riponi, C. (2009). Replacement of sulfur dioxide by lysozyme and oenological tannins during fermentation: Influence on volatile composition of white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(4), 688–696.
- Valero, E., Moyano, L., Millan, M. C., Medina, M., & Ortega, J. M. (2002). Higher alcohols and esters production by *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of the initial oxygenation of the grape must. *Food Chemistry*, 78(1), 57–61.

Discusión IV-3.1: Vinos Tintos de 2013

Siguiendo el esquema de vinificación descrito en la *Figura 3.1 (sección III-2.5)*, se evaluó la aptitud del extracto enriquecido en estilbenos como alternativa al SO₂ en la elaboración de vinos tintos. Se realizaron dos tratamientos: un testigo con SO₂ (CT) y un tratamiento único con Vineatrol (VIN). Con el fin de comprobar la influencia del método de elaboración y el uso del extracto, ambos tratamientos se estudiaron bajo dos métodos de vinificación, tradicional y Ganimede®, Los ensayos se resumen en la *Tabla 4.14*

Tabla 4.14. Ensayos realizados en la vendimia 2013 en vinos Syrah

Antioxidante	mg/L	Método tradicional		Método Ganimede	
		nomenclatura	réplicas	nomenclatura	replicas
Anhidrido sulfuroso	50	CT	3	G-CT	3
Vineatrol	86*	VIN	3	G-VIN	3

*corresponden a 25 mg/L del total de todos estilbenos presentes en Vineatrol

❖ Las diferencias encontradas en los **parámetros enológicos y del color** principalmente fueron consecuencia del uso del extracto más que del método de elaboración (*Publicación 6, tablas 1 y 2*). La adición de Vineatrol modificó significativamente el contenido de antocianinas y el color de los vinos. Los vinos VIN y G-VIN mostraron un 15% menos de antocianinas que sus correspondientes controles. Esas diferencias encontradas en ambos métodos pueden ser debido a que la presencia del SO₂ mejora la extracción de antocianinas a la vez que impide su degradación, oxidación y precipitación (He et al., 2012a). Está descrito que el color de los vinos tintos está relacionado con el contenido de antocianinas (Alcalde-Eon, García-Estévez, Puente, et al., 2014; He et al., 2012a; Heras-Roger et al., 2016). Así, los vinos elaborados con Vineatrol (VIN y G-VIN) mostraron valores más altos de IC, a* (rojos), b* (amarillos) y menos luminosos (menores valores de L*) que sus respectivos controles (CT y G-CT). Estas diferencias pueden ser debidas a que el SO₂ en los vinos CT y G-CT, ejerce un efecto blanqueador de los antocianos libres por la adición nucleófila a la posición C4 del anillo-C de los antocianos en el catión flavilium, decreciendo su intensidad colorante (He et al., 2012a). Por otra parte, se ha descrito que la adición de extractos ricos en polifenoles incrementan las reacciones de polimerización y, por tanto, mejora la estabilidad del color (Alcalde-Eon, García-Estévez, Ferreras-Charro, et al., 2014; Gordillo et al., 2014).

Después de doce meses de embotellado, los vinos elaborados con Vineatrol evolucionaron significativamente de forma distinta a los vinos elaborados con SO₂. Los vinos VIN y G-VIN presentaron una menor IC y a* y una mayor tonalidad que sus respectivos controles. Estas diferencias pueden ser debidas principalmente al consumo de SO₂ durante el almacenamiento en botella, que conlleva la liberación de los antocianos del SO₂ expresando el color rojo de su forma catión flavilium (He et al., 2012a), con el consecuente aumento de la IC y a*. Estas diferencias fueron más evidentes en el método tradicional.

❖ Respecto a los 25 **compuestos volátiles** determinados en vinos Syrah, se agruparon en tres familias: ésteres, alcoholes y ácidos grasos, según lo descrito en *Discusión IV-2.1*. Por cuestiones de logística, estos compuestos se analizaron a los 4 meses del embotellado.

En la *Figura 4.7* se muestra la concentración de totales por familias (ésteres, alcoholes y ácidos grasos). La tabla completa de compuestos individuales se puede ver en la *Publicación 6, Figura 2*.

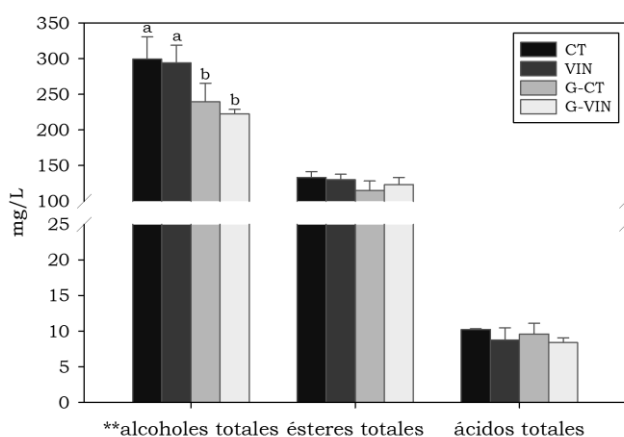


Figura 4.7. Compuestos volátiles en los vinos de Syrah elaborados con SO₂ y Vineatrol mediante el método tradicional (CT y VIN) y el sistema Ganimede (G-CT y G-VIN)

No se encontraron diferencias significativas en ésteres totales, ni en los ésteres mayoritarios, lactato de etilo y acetato de etilo. Comparando ambos métodos, los ésteres individuales con concentraciones por encima de su umbral de percepción presentaron menor concentración en los vinos elaborados por el método Ganimede que por el tradicional. Estos resultados están de acuerdo con otros autores, que observaron que el contenido de ésteres totales fue superior en los vinos obtenidos por el método tradicional que por el sistema Ganimede (Garde-Cerdán, Jarauta, et al., 2008). Además, en el método tradicional, el SO₂ aumentó la concentración de algunos ésteres individuales respecto a los vinos elaborados con Vineatrol. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores. Sonni y col (2011) observaron que los vinos elaborados con

SO₂ presentaron mayores concentraciones de compuestos volátiles que los elaborados con lisozima (Sonni et al., 2011). Respecto a los ácidos grasos, tampoco se observaron diferencias significativas en su contenido total entre los vinos. La concentración total fue inferior a 20 mg/L en todos los vinos y, por tanto, estos compuestos no afectaron negativamente al aroma del vino (Pozo-Bayón et al., 2005). Aunque sí se observaron algunas diferencias en los ácidos grasos individuales (*Publicación 6, Figura 2C*); en el método tradicional, los vinos CT mostraron mayor concentración de los ácidos isovalérico, hexanoico y octanoico y menor concentración de isobutírico y butírico.

La suma de los alcoholes totales fue estadísticamente distinta entre los métodos de elaboración, sin encontrarse diferencias entre tratamientos (SO₂ vs VIN®). Los alcoholes totales fueron superiores en el método tradicional respecto al método Ganimede. Se ha descrito que el oxígeno favorece la síntesis de alcoholes durante la fermentación alcohólica (Valero, Moyano, Millan, Medina, & Ortega, 2002). Todos los vinos mostraron una concentración total de alcoholes superiores inferior a 300 mg/L, por lo que añaden un nivel deseable de complejidad al vino (Dubois, 1994; Rapp & Versini, 1995).

De los 25 compuestos volátiles cuantificados, varios relacionados con procesos de oxidación requieren una especial atención. El CT presentó concentraciones estadísticamente mayores del 2-feniletanol, Z-3-hexenol, ácido hexanoico y ácido octanoico, sin encontrarse diferencias entre VIN, G-CT y G-VIN. Menores concentraciones de estos compuestos se relacionan con vinos más evolucionados, lo que sugiere que el SO₂ protege a estos compuestos frente a la oxidación en mayor medida que el Vineatrol cuando se vinificó por el método tradicional (Balboa-Lagunero et al., 2011; Grant-Preece et al., 2013; Silva Ferreira et al., 2003). Además, los vinos CT presentaron menor concentración de 1-propanol que los vinos VIN. La presencia de este compuesto se ha relacionado con vinos con notas a oxidado (Balboa-Lagunero et al., 2013), aunque cabe destacar que en los vinos se encontraron por debajo de su umbral de percepción (306 mg/L, (Peinado et al., 2004). Especial atención requiere el metionol. Fue el único de los compuestos volátiles que se vio afectado por el Vineatrol, independientemente del método de elaboración. Su concentración fue mayor en los vinos elaborados con SO₂, lo que sugiere de nuevo que el Vineatrol protegió en menor medida a este compuesto fácilmente oxidable (Dombre et al., 2015).

❖ El **análisis sensorial** se realizó en dos momentos: en el embotellado y a los doce meses de embotellado (*Publicación 6, Figura 3*). Los vinos elaborados con Vineatrol presentaron mayor intensidad del aroma y atributo especiado y menor puntuación en el atributo a fruta roja que los vinos CT. En el método Ganimede, sin embargo, la adición de SO₂ (vinos G-CT) disminuyó los atributos a fruta negra y madura, respecto a los vinos tratados con Vineatrol (G-VIN). Respecto a la fase gustativa, los vinos VIN y G-VIN se caracterizaron por presentar mayor intensidad del sabor, sensación de amargor en boca y persistencia que sus respectivos controles (CT y G-CT). Los vinos G-CT destacaron por ser más equilibrados en boca. Después de 12 meses en botella, la mayoría de diferencias encontradas en el embotellado desaparecieron. Los vinos con Vineatrol (VIN y G-VIN) presentaron menor puntuación del atributo fruta roja. Sin embargo, el vino G-VIN mostró notas a químico y fenólico, considerados defectos en vinos.

Respecto al **análisis olfatométrico**, la adición de Vineatrol modificó el perfil olfatométrico de los vinos (*Publicación 6, Tabla 3*). Del total de las 80 ZO's encontradas en los vinos, sólo 3 zonas odorantes no identificadas presentaron una $\Delta FM (\%) \geq 40$ (*Tabla 4.15*). Aumentó la **ZO-1** (pino, fresco), principalmente en los vinos elaborados mediante el sistema Ganimede. Además, se presentaron dos nuevas ZO's que no fueron detectadas en los vinos elaborados con SO₂. La **ZO-2**, con el descriptor manzanilla y la **ZO-3** descrita como cítrico, almendra.

Tabla 4.15. Principales zonas odoríferas diferentes encontradas en vinos de Syrah

ZO	LRI ¹		compuesto	Descripción	FM (%)				ΔFM (%)		LS
	DB-WAX	DB-5			CT	VIN	G-CT	G-VIN	VIN-CT	(G-VIN)-(G-CT)	
1	2462	1558	n.i.	manzanilla	42	69	20	70	27	50	***
2	-	1271	n.i.	cítrico, almendra	0	71	0	67	71	67	***
3	-	1688	n.i.	pino, fresco	0	62	0	48	60	48	**

CT, vinos con SO₂ sistema tradicional; VIN; vinos con Vineatrol sistema tradicional; G-CT, vinos con SO₂ sistema Ganimede; G-VIN, vinos con Vineatrol sistema Ganimede; ZO's, zonas odorantes; LRI, índice de retención lineal, calculado en las columnas capilar DB-WAX y DB-5. FM, frecuencia modificada. n.i., compuesto no identificado.

En resumen, el extracto de madera de poda rico en estilbenos (Vineatrol) utilizado en la elaboración de vinos tintos dio lugar a vinos con parámetros enológicos de calidad buenos, con una buena intensidad y pureza del color y buenas puntuaciones en el análisis sensorial en el embotellado. Sin embargo, después de 12 meses de embotellado, los vinos con Vineatrol mostraron valores en el color y análisis sensorial relacionados con procesos de oxidación. El Vineatrol no modificó el contenido total de alcoholes, ésteres y ácidos entre el Vineatrol y el SO₂, independientemente del método de elaboración. Sin embargo, en el método tradicional, modificó algunos compuestos volátiles. El uso de Vineatrol aumentó la concentración de 1-propanol y disminuyó la concentración de 2-feniletanol, Z-3-hexenol y metionol, compuestos relacionados con procesos de oxidación, mientras que en los vinos elaborados mediante el método Ganimede, el Vineatrol preservó la composición volátil tal y como el SO₂, excepto para el metionol. El análisis GC-olfatometría mostró que la utilización de Vineatrol modificó el perfil olfatométrico de los vinos Syrah introduciendo tres nuevas zonas odorantes que no pudieron ser identificadas.

En conclusión, aunque en el embotellado los resultados eran prometedores, la dosis utilizada de VIN no fue capaz de evitar los procesos de oxidación durante el envejecimiento en botella, lo que parece ser el punto crítico del proceso.

PUBLICACIÓN 6. “Extracto de madera de poda rico en estilbenos como un conservante en vino blanco”

Rafaela Raposo, María José Ruiz-Moreno, Teresa Garde-Cerdán, Belén Puertas, José Manuel Moreno-Rojas, Ana Gonzalo-Diago, Raúl F. Guerrero, Víctor Ortiz, Emma Cantos-Villar (2016). *Grapevine-shoot stilbene extract as a preservative in white wine. En revisión Journal Food Science and Technology* (desde 25 Mayo 2016)

**Manuscrito enviado a la revista Journal Food Science and
Technology**

Grapevine-shoot stilbene extract as a preservative in white wine

Rafaela Raposo^a, María J. Ruiz-Moreno^b, Teresa Garde-Cerdán^c, Belén Puertas ^a, José M. Moreno-Rojas^b, Ana Gonzalo-Diago^c, Raul F. Guerrero^b, Victor Ortíz-Somovilla^b, Emma Cantos-Villar^{a*}

^a Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Rancho de la Merced. Ctra Trebujena, km 2.1, 11471, Jerez de la Frontera, Spain.

^b Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Alameda del Obispo. Avd Menéndez Pidal, 14004 Córdoba, Spain.

^c Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino, Gobierno de La Rioja-CSIC-Universidad de La Rioja, Carretera de Burgos Km. 6, Finca La Grajera, 26007 Logroño, Spain.

*Corresponding author: Emma Cantos Villar

E-mail: emma.cantos@juntadeandalucia.es

Journal of Food Science and Technology
Grapevine-shoot stilbene extract as a preservative in white wine
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Grapevine-shoot stilbene extract as a preservative in white wine
Article Type:	Original Article
Corresponding Author:	Emma Cantos-Villar SPAIN
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Rafaela Raposo
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Rafaela Raposo Maria Jose Ruiz-Moreno Teresa Garde-Cerdan Belen Puertas Jose Manuel Moreno-Rojas Ana Gonzalo-Diago Raul Federico Guerrero Victor Ortiz-Somovilla Emma Cantos-Villar
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	The feasibility of a grapevine-shoot stilbene extract (Vineatrol®) as an alternative to sulfur dioxide (SO ₂) in Sauvignon blanc wines was evaluated. Its effectiveness to preserve Sauvignon blanc wine quality was studied under traditional and reductive winemaking conditions, at bottling and after storage in bottle. Enological parameters, color related parameters, volatile composition, sensory analysis and olfactometric profile were evaluated. Acetaldehyde was higher when SO ₂ was presented during alcoholic fermentation. Color was affected by Vineatrol addition. Vineatrol treated wines turned out to be darker, greener and browner than control ones treated with SO ₂ . Regarding volatile compounds, Vineatrol addition decreased ethyl acetate and preserved methionol concentration in wines. Vineatrol treated wines elaborated under traditional conditions showed better scores due to fruity notes, although they were less balanced, at bottling. Olfactometric analysis showed five potential characteristic odorant zones in Vineatrol wines which could play a role in sensory perception of treated white wines.
Suggested Reviewers:	Juan Cacho Universidad de Zaragoza jcacho@unizar.es He is an expert in wine, aroma, sensory and olfactometry. We cited him several times through the manuscript. Fabio Chinnici University of Bologna

	fabio.chinnici@unibo.it He works on alternatives to SO2
	Paulo Lops Amorin pdlet@net.sapo.pt His previous works on Sauvignon blanc wines have been very useful

Grapevine-shoot stilbene extract as a preservative in white wine

Rafaela Raposo^a, María J. Ruiz-Moreno^b, Teresa Garde-Cerdán^c, Belén Puertas^a, José M. Moreno-Rojas^b, Ana Gonzalo-Diago^c, Raul F. Guerrero^b, Víctor Ortiz-Somovilla^b, Emma Cantos-Villar^{a*}

^a Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Rancho de la Merced. Ctra Trebujena, km 2.1, 11471, Jerez de la Frontera, Spain.

^b Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Alameda del Obispo. Avd Menéndez Pidal, 14004 Córdoba, Spain.

^c Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino, Gobierno de La Rioja-CSIC-Universidad de La Rioja, Carretera de Burgos Km. 6, Finca La Grajera, 26007 Logroño, Spain.

*emma.cantos@juntadeandalucia.es. Tlf: 0034671560353; Fax: 0034956034610

1 **Grapevine-shoot stilbene extract as a preservative in white wine**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

2

3

4

5

6

7

8

9

10 Keywords: Stilbene, sulfur dioxide, quality, Sauvignon blanc, added-value wines

11 **Abstract**

12 The feasibility of a grapevine-shoot stilbene extract (Vineatrol®) as an alternative to sulfur
13 dioxide (SO₂) in Sauvignon blanc wines was evaluated. Its effectiveness to preserve
14 Sauvignon blanc wine quality was studied under traditional and reductive winemaking
15 conditions, at bottling and after storage in bottle. Enological parameters, color related
16 parameters, volatile composition, sensory analysis and olfactometric profile were evaluated.
17 Acetaldehyde was higher when SO₂ was presented during alcoholic fermentation. Color was
18 affected by Vineatrol addition. Vineatrol treated wines turned out to be darker, greener and
19 browner than control ones treated with SO₂. Regarding volatile compounds, Vineatrol
20 addition decreased ethyl acetate and preserved methionol concentration in wines. Vineatrol
21 treated wines elaborated under traditional conditions showed better scores due to fruity notes,
22 although they were less balanced, at bottling. Olfactometric analysis showed five potential
23 characteristic odorant zones in Vineatrol wines which could play a role in sensory perception
24 of treated white wines.

25 **1. Introduction**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

26 The most widely preservative used in wine industry is sulfur dioxide (SO₂). Its antioxidant
27 and antimicrobial properties make it essential nowadays. SO₂ has been used to inhibit
28 polyphenol oxidase activity during winemaking, as well as to control the onset of undesirable
29 fermentations such as acetic or malolactic fermentation (Guerrero and Cantos-Villar 2015).
30 However, the use of SO₂ has also drawbacks. Several human health risks, including
31 dermatitis, urticarial, angioedema, diarrhea, abdominal pain, bronchoconstriction and
32 anaphylaxis, have been associated to SO₂ consumption. It is important to reduce the amount
33 of SO₂ in wine since this compound is found in many food products as a food preservative
34 and the amount ingested is accumulated in the organism (Vally et al. 2009). Consequently,
35 the International Organization of Vine and Wine (OIV) has been progressively reducing the
36 maximum SO₂ recommended concentration authorized in wines, which is nowadays 210
37 mg/L for white and rosé wines and 160 mg/L for red wines (OIV 2014).
38 In recent years, the research on alternatives to SO₂ has risen. Some chemical compounds have
39 been investigated: colloidal silver complex, dimethyl dicarbonate, ascorbic acid,
40 hypophosphorous acid, thiodipropionic acid, Trolox C, stannous chloride, Sporix, sodium
41 hypochlorite and even natural products such as lysozyme and bacteriocins (Santos et al.
42 2012). Among them, the use of phenolic compounds has been proposed as a promising
43 alternative. Enological tannins combined with lysozyme were added during alcoholic
44 fermentation of white wines, modifying wine volatile composition (Sonni et al. 2009). Other
45 authors tested extracts rich in polyphenols, from almond skin and eucalyptus leave, on
46 Verdejo wines during ageing in barrels. The extracts modified the volatile composition of
47 wines, but no significant differences were found in the global sensory analysis between
48 control and treated wines (González-Rompinelli et al. 2013). Hydroxytyrosol extracts have
49 been also suggested as alternatives to SO₂. These extracts affected to the varietal character of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Sauvignon blanc wines (Raposo et al. 2016b). The replacement of SO₂ in winemaking is still a challenge, especially in white wine. White wine oxidation is an ongoing problem for winemakers worldwide. Oxidation drastically affects wine quality. It produces a loss of pleasant aroma together with an increase in unwanted aroma nuances. Furthermore, Sauvignon blanc is a well-documented example of an oxygen-sensitive wine (Coetzee and du Toit 2012). Vineatrol[®] is an extract from grapevine-shoot that is particularly rich in stilbenes, mainly resveratrol and its oligomers. It has been described as a natural source of bioactive stilbenes and as a potent antioxidant (Müller et al. 2009; Romain et al. 2012). Studies developed in our lab have recently described Vineatrol as a good preservative in red wine (Raposo et al. 2016a). In the current work, the potential use of Vineatrol to replace the SO₂ in Sauvignon blanc wine was investigated. Vineatrol was tested under traditional and reductive winemaking conditions. Enological quality parameters, color related parameters, volatile composition, sensory and olfactometric profile were evaluated, at bottling and after storage in bottle.

65 **2. Materials and methods**

66 **2.1. Chemicals**

67 Analytical grade methanol and formic acid were supplied by Panreac (Barcelona, Spain).
68 Chemical standards: *trans*-resveratrol, piceatannol, dichloromethane (LiChrosolv quality),
69 aroma standards and alkane solution (C7-C40) used for identification were purchased from
70 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Anhydrous sodium sulfate was obtained from Panreac
71 (Barcelona, Spain). ε-Viniferin, ampelopsin A, r-viniferin, r²-viniferin, hopeaphenol,
72 isohopeaphenol, pallidol, miyabenol C and ω-viniferin were kindly provided by the
73 GESVAB (Groupe D'Étude des Substances Végétales à Activité Biologique) from

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

74 University of Bordeaux II. Ultrapure water from a Milli-Q system (Millipore Corp., Bedford,
75 MA) was used throughout this research.

76 **2.2. Grapevine-shoot extract**

77 Vineatrol® is a grapevine-shoot extract (VIN). The extract was dissolved in wine matrix
78 (12% ethanol, pH = 3.6) and wine alcohol (96%), at 50:50 (v/v) proportions, due to Vineatrol
79 has low solubility in aqueous media. 20 µL of this solution were analyzed as described in
80 section 2.5. The analysis showed that Vineatrol contained: 5.66% *trans*-resveratrol, 13.25%
81 ε-viniferin, 3.76% ampelopsin A, 1.44% r-viniferin, 1.22% hopeaphenol, 1.04% pallidol,
82 1.07% ω-viniferin, 0.97% piceatannol, 0.78% isohopeaphenol and 0.30% r2-viniferin. The
83 total stilbene Vineatrol richness was 29%. Vineatrol was kindly supplied by Actichem
84 (Montauban, France).

85 **2.2. Winemaking**

86 The study was designed to evaluate the capacity of Vineatrol as alternative to SO₂ under
87 traditional and reductive winemaking conditions. A diagram of the processes is shown in
88 Figure 1. Sauvignon blanc grapes (1000 Kg) were harvested, destemmed, crushed and
89 pressed. Then pectolitic enzymes were added into the must (2.5 mL/hL, Enartis ZYM Blanco
90 L, Italy), dejuiced (24 hours at 4 °C) and placed in a 300 L steel vessel saturated with
91 nitrogen. This tank was divided in two batches: traditional and reductive batches. The first
92 batch (150 L) was divided into two new batches: one batch was treated with SO₂ (CT), and
93 the other batch was treated with Vineatrol (VIN), both in triplicate (Fig. 1 Left side). In the
94 reductive batch (150 L, Fig. 1 Right side), a single winemaking was conducted under
95 nitrogen gas atmosphere (nitrogen gas was added before and after alcoholic fermentation to
96 remove oxygen).

97 Alcoholic fermentation (AF) was induced in vessels (traditional and reductive batches) by
98 yeasting (Aroma White, Italy). In traditional batch, AF was developed individually in each

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

99 triplicate, while AF was in a single vessel in reductive batch. The last one was split into two
100 new batches when sugar concentration was under 5 g/L. SO₂ was added to the first batch (R-
101 CT) and Vineatrol to the second one (R-VIN), each one in triplicate. Stabilization was
102 performed during two months at 0 °C. Finally, wines were racked, filtered (Optical XL,
103 Millipore, France), preservatives adjusted to the initial concentration (80 mg/L SO₂ and 138
104 mg/L of VIN) and bottled. Bottled wines were stored under control conditions (16 °C and
105 80% RH) during 12 months. Wine sampling was carried out at bottling, and after 6 and 12
106 months of storage in bottle.

107 The concentrations of the preservatives in both winemaking systems were: 80 mg/L of SO₂
108 (Sulfosol, Sepsa-Enartis) and 138 mg/L of VIN (Vineatrol®), which meant 40 mg/L of total
109 stilbenes (29% of richness of stilbenes in Vineatrol).

110 **2.3. Enological parameters**

111 Relative density, ethanol, glycerin, dry extract, total and volatile acidity, pH, organic acids
112 (acetic, citric, tartaric, malic, lactic, and succinic acids), total and free SO₂, metals (Na, Ca,
113 K, Fe, Cu and Zn) and acetaldehyde, were determined at bottling following the official
114 analytical methods established by the International Organization of Vine and Wine (OIV,
115 2014).

116 **2.4. Analysis of Stilbenes by HPLC**

117 Stilbenes were measure in wines during winemaking to adjust stilbene concentration in wine
118 to 40 mg/L of stilbenes (138 mg/L VIN) in wines (Fig. 1, Table 1). The HPLC method was
119 described by Guerrero et al. (2010). Samples (20 µL) were analyzed by using a Waters HPLC
120 system with a model 1525 pump and a Waters 996 Photodiode Array Detector. Separations
121 were performed on a Mediterranea Sea18 column (Tecknokroma, Barcelona, Spain) (RP-18,
122 25×0.46 cm; 5 µm particle size) and a guard column of the same material, at 30 °C. The

123 mobile phases consisted of a water:methanol:acetic acid mixture, solvent A 88:10:2 (v/v/v)
1
2
3 124 and solvent B 8:90:2 (v/v/v) at a flow rate of 1 mL/min.

4 5 125 **2.5. Color related parameters**

6
7 126 Absorbance at 420 nm was determined by spectrophotometric measures (Lambda 25, Perkin-
8
9
10 127 Elmer, Massachusetts). Colorimetric measurements were registered with a Konica-Minolta
11
12 128 CM-3600d spectrophotometer (Osaka, Japan), using 20 mm path-length glass-cells and
13
14 129 distilled water as reference. The CIELab parameters (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} and h^*_{ab}) were
15
16
17 130 determined by using the software SpectraMagic v.3.61G (Cyberchrome Inc, Minolta Co.
18
19 131 Ltd), following the recommendations of the Commission Internationale de L'Eclairage (CIE).
20
21 132 Color differences (ΔE^*_{ab}) were calculated between Vineatrol treated wines and their
22
23
24 133 respective controls, as the Euclidean distance between two points in the 3D space defined by
25
26
27 134 L^* , a^* , and b^* (Martínez et al. 2001).

28 29 135 **2.6. Analysis of volatile compounds by gas chromatography**

30
31 136 The analysis of wines fermentative volatile compounds was performed after 4 months of
32
33
34 137 storage in bottle by the method described by Garde-Cerdán et al. (2014). The extract were
35
36 138 injected onto a Hewlett-Packard (Palo Alto, CA) 6890 series II gas chromatograph equipped
37
38
39 139 with an automatic injector and a Hewlett-Packard FID detector. Separation was carried out
40
41 140 with a DB-Wax capillary column (60 m x 0.32 mm I.D., x 0.5 μ m film thickness; J&W
42
43
44 141 Scientific, Folsom, CA, USA). The temperature program was: 40 °C for 5 min then raised up
45
46 142 to 220 °C at a rate of 3 °C/min. The carrier gas was nitrogen at a flow rate of 3 mL/min.
47
48
49 143 Injector temperature was 220 °C and detector temperature was 280 °C. Identification of
50
51 144 compounds was carried out by comparison of their retention times with those of pure
52
53
54 145 reference standards.

55 56 146 **2.7. Sensory analysis**

57
58
59
60
61
62
63
64
65

147 Descriptive sensory analysis were performed at bottling and after 6 months of storage in
1
2
3 148 bottle, following the Sensory Profile Method according to standard ISO 6564:1985 (ISO
4
5 149 1985) by a panel of 11 judges. Panelists had extensive experience in wine tasting and regular
6
7 150 participations in sensory panels. The sensory attributes scored in the olfactory phase were
8
9 151 aroma intensity, citrus fruit, white fruit, tropical fruit, and mature fruit, and in the taste phase
10
11 152 were savor intensity, acidity, bitterness, astringency, balanced and persistence. Wine defects
12
13 153 were also rated (dirty, reduction, oxidation, yeast, chemical, phenolic, acetic, acetaldehyde
14
15 154 and ethyl acetate). Panelists were instructed to assess first the aroma and then palate of wines,
16
17 155 scoring each attribute on a scale of 1 to 10 (1: absence of a descriptor, 10: maximum
18
19 156 intensity).

24 157 **2.8. Gas chromatography-olfactometry (GC-O) and chromatography-mass (GC-MS)** 25 26 158 **analyses** 27 28

29 159 GC-O analysis were carried out in wines after 6 months of storage in bottle using a Varian
30
31 160 3800 GC (Middelburg, The Netherlands) equipped with an FID and an OP275 olfactometer
32
33 161 (GL Science Inc., Tokyo, Japan). The sample extraction and method followed has been
34
35 162 described by authors (Sarrazin et al. 2007). 1 μ L of extract was injected in splitless mode,
36
37 163 using a split time of 1 min. The columns used were DB-WAX and DB-5 from J&W
38
39 164 Scientific, Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, California, USA), 60 m \times 0.25 mm with
40
41 165 0.25 μ m film thickness. The sensory panel was composed of three trained tasters, who sniffed
42
43 166 each sample three times. Results were expressed as “modified frequency” MF(%) with the
44
45 167 formula proposed by Dravnieks (1985).

50
51 168 For GC-MS analysis 1 μ L of extract was injected in a Trace GC Ultra gas chromatograph
52
53 169 (Thermo Fisher Scientific S.p.A., Rodano, Milan, Italy) under the same conditions described
54
55 170 above. The detector was a mass spectrometer (ISQ single quadrupole MS, Thermo Fisher
56
57 171 Scientific, Austin, Texas, USA) operating in EI mode (70 eV), connected to the GC with a
58
59
60
61
62
63
64
65

172 heated transfer line at 230 °C. Thermo Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific, San Jose,
1
2
3 173 California, USA) was used for data acquisition. The odorant compounds were identified on
4
5 174 the basis of linear retention index and a comparison of MS fragmentation patterns with those
6
7 175 of reference compounds or with mass spectra in the NIST 05 mass Spectral library (version
8
9 176 05).

12 177 **2.9. Statistics**

14 178 Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) on average values. Tukey's
15
16 179 test was used as comparison test when significant differences were observed by ANOVA ($p \leq$
17
18 180 0.05). Statistix version 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA) was used.

22 181 **3. Results and discussion**

24 182 **3.1. Enological parameters**

26 183 The wine composition at bottling is shown in Table 1. No significant differences were found
27
28 184 for dry extract, volatile acidity, acetic acid, citric acid and lactic acid. No significant
29
30 185 differences were found in metals among wines. Only potassium resulted different in each
31
32 186 assay, which could be due to differences in grape and/or in bitartrate formation. All metals,
33
34 187 included potassium, were found in low concentrations which assure the stability of the wines.
35
36 188 Ethanol was significant higher in Vineatrol treated wines, especially under traditional
37
38 189 winemaking (VIN), which can be justified for the multiple addition of Vineatrol into the wine
39
40 190 during traditional winemaking (Fig. 1). As previously commented, due to the low solubility
41
42 191 of Vineatrol, it was necessary to dissolve it in an alcoholic matrix (50% of wine alcohol).

44 192 The wines produced under reductive conditions showed the lower relative density, total
45
46 193 acidity and tartaric acid, as a consequence of the higher pH, than those elaborated under
47
48 194 traditional winemaking. Organic acids make an important contribution to the composition,
49
50 195 stability and organoleptic qualities of wines, especially white wines. Differences in malic acid
51
52 196 content are due to the initial concentration in grapes (data not shown). Acetic acid content
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

197 was low in all the wines, and lower than the maximum fixed by ECC Regulation 2676/90 (1
1
2
3 198 g/L). Nor malolactic fermentation, neither acetic fermentation was developed, as desirable in
4
5 199 white wines.
6
7 200 Succinic acid concentration, which derives from the fermentative metabolism of yeast,
8
9 201 presented the highest values in control wines from traditional winemaking (CT). High SO₂
10
11
12 202 concentration (100 mg/L) in must has been described to increase succinic acid (Caridi 2003;
13
14 203 Sonni et al. 2011).
15
16 204 Regarding preservatives, only control wines (CT and R-CT) contained total and free SO₂,
17
18 205 around 70 and 13 mg/L respectively. Stilbenes were present in low amount (1 mg/L) in
19
20
21 206 control wines and around 35 mg/L in Vineatrol treated wines (VIN and R-VIN).
22
23
24 207 The highest concentration of acetaldehyde was reached in CT wines. SO₂ induces
25
26 208 acetaldehyde formation by yeasts, and wines fermented with SO₂ have considerably higher
27
28
29 209 acetaldehyde levels than wines made without SO₂ (Jackowetz et al. 2011).
30
31
32 210 Although some differences were found among wines, it can be concluded that all wines
33
34 211 complied with quality standards parameters for white wines. These parameters are in
35
36 212 agreement with the data range previously described for Sauvignon blanc wines (Baiano et al.
37
38
39 213 2012; Sonni et al. 2011).
40
41 214 **3.2. Evolution of color related parameters**
42
43 215 Color is an undisputed quality parameter in winemaking. It is strongly advised to monitor
44
45
46 216 color when a SO₂ alternative is studied since it encloses useful information about oxidation
47
48 217 (Guerrero and Cantos-Villar 2015). Wine color parameters were determined at bottling and
49
50
51 218 after 12 months of storage in bottle (Table 2). At bottling, all color related parameters were
52
53 219 significantly different between Vineatrol treated wines and their respective control wines.
54
55 220 Vineatrol treated wines showed a deeper yellow/brown color (Table 2, A₄₂₀) as a direct
56
57
58 221 consequence of the addition of Vineatrol, which showed brown color when prepared at high
59
60
61
62
63
64
65

1 222 concentration (5 mL of Vineatrol solution was added per liter of wine). Moreover, Vineatrol
2 223 treated wines showed lower lightness (L^*), redness a^* and hue (h^*_{ab}), while higher
3
4 224 yellowness (b^*) and Chroma (C^*_{ab}) than their respective control wines. Thus, Vineatrol
5
6 225 treated wines showed a darker, greener and yellower/browner color.
7
8
9 226 The same tendencies were observed after 12 months of storage in bottle (lower L^* and h^* ,
10
11 while higher A_{420} , b^* and C^* in Vineatrol wines) but for a^* , in which differences were not
12 227 found (Table 2). Differences were more marked at this stage than at bottling. So the
13
14 228 differences between Vineatrol treated wines and their respective control increased with
15
16 229 differences between Vineatrol treated wines and their respective control increased with
17
18 230 storage. This was corroborated by the calculation of ΔE^* between VIN and CT wines: from
19
20 231 8.15 (bottling) to 11.12 (12 months of storage) in traditional winemaking, and from 10.32
21
22 232 (bottling) to 13.30 (12 months of storage) in reductive winemaking, respectively. Differences
23
24 233 in color between Vineatrol treated wines and their respective controls were human-eye
25
26 234 perceptible in both types of winemaking and in all stage of the process ($\Delta E^* \geq 3$ CIELab
27
28 235 units) (Martínez et al. 2001). Thus, Vineatrol strongly affected to wine color. These
29
30 236 differences increased with storage after bottling.
31
32 237 Authors have described important differences in wine color when other alternatives to SO_2
33
34 238 were studied in white wines. Izquierdo-Cañas et al. (2012) determined color parameters in
35
36 239 bottled wines. Merseguera wines treated with colloidal silver complex changed importantly
37
38 240 the coordinates CIELab respect to wines treated with SO_2 . Falguera et al. (2013) also
39
40 241 described high differences in color parameters when compared irradiated wines with control
41
42 242 ones. Sauvignon blanc wines treated with hydroxytyrosol changed their color parameters
43
44 243 independently of the nature of hydroxytyrosol (from synthesis or from natural extract)
45
46 244 (Raposo et al. 2016b).
47
48
49
50
51
52
53
54
55

56 245 **3.3. Volatile compounds**

57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 246 The volatile compounds were grouped into 3 categories: esters (n =12, Fig. 2a), alcohols (n =
2 247 9, Fig. 2b) and fatty acids (n = 6, Fig. 2c).
3
4 248 Esters (Fig. 2a) are considered important contributors to young wine aroma and exhibit floral
5
6 249 and fruity odors. Their concentrations agreed with previously described in Sauvignon blanc
7
8 250 wines (Sonni et al. 2011). The majority of the esters did not show significant differences
9
10 251 between treated (VIN, R-VIN) and control wines (CT, R-CT) regardless winemaking process.
11
12 252 Ethyl lactate, diethyl succinate, ethyl isobutyrate, hexyl acetate and ethyl-3-hydroxybutyrate
13
14 253 were not affected by the added preservative (SO₂ or Vineatrol), neither by the winemaking
15
16 254 conditions (traditional or reductive). Ethyl acetate followed by ethyl lactate showed the
17
18 255 highest concentrations, with values above 25 and 5 mg/L, respectively. Ethyl acetate showed
19
20 256 the highest significant differences among treatments, being its concentration lower in
21
22 257 Vineatrol treated wines especially in reductive conditions (R-VIN). This ester provides fruity
23
24 258 and solvent notes. Ethyl acetate concentration in wines was present over its perception
25
26 259 threshold (12.3 mg/L; Ferreira et al. 2002).
27
28 260 Wines elaborated under reductive conditions and with SO₂ (R-CT) showed different
29
30 261 concentration of isoamyl acetate, 2-phenylethylacetate, ethyl propionate, ethyl butyrate and
31
32 262 ethyl hexanoate, in comparison to the other wines. In wines, these esters showed
33
34 263 concentrations above their threshold: 0.03 mg/L, 0.25 mg/L, 1.8 mg/L, 0.02 mg/L and 0.014
35
36 264 mg/L respectively (Ferreira et al. 2002; Peinado et al. 2004).
37
38 265 In traditional winemaking, ethyl octanoate showed lower concentrations when SO₂ (CT) was
39
40 266 used instead of Vineatrol (VIN). This compound confers sweet fruity aromas to the wine. Its
41
42 267 odor threshold was under the concentration found in wines (0.005 mg/L; Ferreira et al. 2002).
43
44 268 Regarding alcohols (Fig. 2b), methionol was the only compound that showed significant
45
46 269 differences due to the added preservative. Control wines (CT, R-CT) showed lower
47
48 270 concentration of methionol than Vineatrol treated wines (VIN, R-VIN), especially in
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 271 reductive conditions (R-CT). Methionol is synthesized by yeast during alcoholic fermentation
2 272 and it is known to be very sensitive to oxidation, producing methional (Dombre et al. 2015;
3
4 273 Escudero et al. 2000). Thus, methionol was less oxidized in the presence of Vineatrol, in
5
6 274 agreement with previous results described for hydroxytyrosol extracts to preserve Sauvignon
7
8
9 275 white wines (Raposo et al. 2016b). Methionol exhibits boiled potato notes. Its concentration
10
11 276 was below its odor threshold (1 mg/L; Ferreira et al. 2002) under reductive conditions in
12
13 277 contrast with traditional winemaking.
14
15
16 278 Regarding winemaking conditions, 2-phenylethanol concentration was slightly lower in
17
18 279 reductive conditions, regardless of the preservative used. Varela et al. (2012) described that
19
20 280 O₂ increased the synthesis of 2-phenylethanol during the alcoholic fermentation in
21
22 281 Chardonnay wines. This compound confers rose odor, being its threshold under the
23
24 282 concentration found in the wines (14 mg/L; Gil et al. 2006). Total alcohol content was not
25
26 283 significant different among wines (175 mg/L). Alcohols contribute to the wine aromatic
27
28 284 complexity when they are not at high concentrations (above 300 mg/L), as occurred in the
29
30 285 studied wines.
31
32
33 286 Fatty acids provide fresh flavor to wine, but, in excess (> 20 mg/L), became an unpleasant
34
35 287 flavor, impairing wine aroma (Pozo-Bayón et al. 2005). The wines elaborated in the present
36
37 288 work showed values of total fatty acids lower than 20 mg/L. Some differences were found in
38
39 289 fatty acids between treatments (Fig. 2c). Only butyric acid was affected by the added
40
41 290 preservative. Vineatrol addition increased its concentration in traditional winemaking, and
42
43 291 decreased its content in reductive conditions. Butyric acid, with cheese odor descriptor, has a
44
45 292 threshold of 0.17 mg/L (Ferreira et al. 2002), being its concentration in wines above this
46
47 293 value.
48
49
50 294 Regarding winemaking system, hexanoic and octanoic acid concentrations were higher in
51
52 295 wines elaborated under reductive conditions respect to traditional winemaking. The presence
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 296 of CO₂ and the absence of O₂ are two of the factors that can stimulate their synthesis during
2 297 alcoholic fermentation (Day et al. 2015). These acids show cheese and rancid odors, being
3
4 298 their threshold under the values found in our wines.

6 299 Other suggested alternatives to SO₂ have been also described to modify volatile composition.
7
8
9 300 Sonni et al. (2009) reported that volatile composition of Sauvignon blanc wine (at the end of
10
11
12 301 AF and after 1 year of storage) was significantly modified when SO₂ was replaced by
13
14 302 lysozyme and enological tannins. More recently, it has been described that high pressure
15
16 303 treatments strongly affect the volatile composition in white wine, leading to a similar volatile
17
18 304 profile than in aged wines (Santos et al. 2015).

21 305 **3.4. Sensory analysis**

22 306 Sensory analysis was conducted at bottling and after 6 months of storage in bottle (Fig. 3).
23
24 307 Data regarding 12 months of storage in bottle are not shown herein because all wines showed
25
26 308 several defects (oxidation, chemical, unbalanced) that masked the sensory attributes. Sensory
27
28 309 attributes were grouped according to both aroma descriptors (Fig. 3a and 3c) and taste
29
30 310 descriptors (Fig. 3b and 3d).

31 311 At bottling, in general, Vineatrol treated wines elaborated under traditional winemaking
32
33 312 (VIN) showed the highest scores. In the aroma, VIN wines showed higher white and mature
34
35 313 fruit scents and higher aroma intensity but lower citrus scent than the rest of the wines
36
37 314 evaluated (Fig. 3a). In the taste (Fig. 3b), VIN wines presented higher acidity and persistence,
38
39 315 while R-VIN showed higher astringency and bitterness. Wines elaborated under traditional
40
41 316 winemaking were more balanced than those elaborated under reductive conditions (Fig. 3b).
42
43 317 At bottling any aromatic defect (dirty, reduction, oxidization, yeast, chemical, rancid, acetic,
44
45 318 acetaldehyde or ethyl acetate) was detected.

46 319 After six months of storage in bottle, the wines had lost aroma intensity, respect to the
47
48 320 bottling stage (Fig. 3c). Chemical notes were detected in all wines but in control wines
49
50
51
52
53
54
55

1 321 elaborated under reductive conditions (R-CT). Citrus fruit scent showed higher score in
2
3 322 control wines (CT and R-CT), independently of the winemaking conditions (Fig. 3c).
4
5 323 Regarding taste, R-VIN wines were evaluated more astringent than the rest of the wines, as at
6
7 324 bottling (Fig. 3d). In general, it seems that differences among wines decreased over storage
8
9 325 period.

10
11
12 326 In the present study synthetic microagglomerate corks were used (44 mm length and 24 mm
13
14 327 diameter; Tapones del Sur, Jerez de la Frontera, Spain). They have been described to allow
15
16
17 328 oxygen enter into the bottle at relative high rate (Lopes et al. 2009), which may explain
18
19 329 oxidation observed at 12 months of storage in bottle. This fact should be taken into account in
20
21
22 330 future research in this line, especially in a high sensible oxidation variety such as Sauvignon
23
24 331 blanc.

25 26 27 332 **3.5. Olfactometric profile**

28
29 333 Olfactometric characterization was carried out on each wine (Table 3). Overall, more than 80
30
31
32 334 odoriferous perceptions were detected. To simplify, odorants not reaching a maximum GC-O
33
34 335 scores (MF) of 30% were considered as noise (Culleré et al. 2013). Then, the number of
35
36 336 odorant zones was reduced to 52. The ANOVA performed on olfactometric data allowed to
37
38
39 337 determine different odoriferous zones (OZs) that showed significant differences among
40
41 338 Vineatrol treated wines and their respective controls (VIN-CT and R-VIN- R-CT).

42
43
44 339 4-Mercapto-4-methyl-2-pentanone (OZ 10) and 3-mercaptohexyl acetate (OZ 27)
45
46 340 compounds, are varietal thiols of particular interest for their contribution to the tropical and
47
48
49 341 passion fruit descriptors of Sauvignon blanc wines (Makhotkina et al. 2013; Tominaga et al.
50
51 342 2006). Their MF was not affected by Vineatrol addition in wines. Moreover, oxidation related
52
53 343 compounds such as methional (OZ 16) and sotolon (OZ 44) showed no significant
54
55
56 344 differences in MF between Vineatrol treated and control wines.

57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 345 Vineatrol addition increased the MF in the following compounds: 3,5-diethyl-2-
2
3 346 methylpyrazine (OZ 18, baked/sweet scents) and vanillin (OZ 50, vanilla scent).
4
5 347 Phenylacetaldehyde (OZ 24, honey scent) and guaiacol (OZ 32, phenolic/smoky scents) were
6
7 348 also increased in Vineatrol treated wine under reductive conditions. By contrast, Vineatrol
8
9 349 treated wines showed lower values of MF for the following compounds: 1-hexanol (OZ 11,
10
11 grass scent) and o-aminoacetophenone (OZ 46, sweet/smoky scents). Despite these
12 350
13 significant differences in MF between Vineatrol treated wines and their respective control
14 351
15 ones, they were lower than 40%, and thus, they seem not having an acute role in the
16 352
17 perception (Álvarez-Pérez et al. 2012).
18 353
19

20
21
22 354 The most important differences between Vineatrol treated and control wines were due to five
23
24 355 unknown compounds: LRI_{DB-5} 1271 (OZ 35) with chamomile/sweet scents, LRI_{DB-Wax} 2296
25
26 356 (OZ 47) with black pepper scent, LRI_{DB-Wax} 2462 (OZ 48) with pine/fresh scents and LRI_{DB-5}
27
28 357 1691 (OZ 52) with citrus/almond scents. All of them showed differences in MF higher than
29
30 358 40%, and thus they may have impact on the perception, contributing to sensory differences
31
32 found among Vineatrol and control wines. These compounds may be the markers in Vineatrol
33 359
34 treated wines. They also appeared when Vineatrol was added into red wine (Raposo et al.
35 360
36 2016a).
37 361
38

39 362 **4. Conclusions**

40
41
42
43 363 This work outlines the difficulty of replacement SO₂ in white winemaking. The use of
44
45 grapevine-shoot extract with high concentration on stilbenes (29%) is a promising alternative
46 364
47 to reduce SO₂ in white wines at bottling. However, further research is still needed to optimize
48 365
49 Vineatrol doses, probably in combination with low amount of SO₂. Sauvignon blanc wines
50 366
51 were affected on their odorant profile. The odorant differences between Vineatrol treated and
52 367
53 control wines were due to five unknown compounds, with no unpleasant aroma scents. The
54 368
55 alterations in color properties are suggested come from the extract, at least in part, and thus i)
56 369
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 370 doses should be optimize and/or ii) the extract should be cleaned from color compounds.
2
3 371 Winemaking conditions seems not affect importantly to the use or not of Vineatrol in wines.
4
5 372 The results are important for both the science community and for wineries, which are
6
7 373 currently making effort to replace and/or reduce SO₂ in winemaking.
8

9
10 374 **Acknowledgments**

11
12 375 Authors thank the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
13
14 376 (INIA) and Fondo Europeo de Desarrollo Rural (FEDER) for their financial support (Project
15
16 377 RTA2015-00005-C02-00). Authors are grateful to Jean-Claude Izard (Actichem) for kindly
17
18 378 supplied Vineatrol® and to GESVAB for kindly supplied stilbene standards. Ruiz-Moreno
19
20 379 and Guerrero thank to the European Social Fund 2007-2013 “*Andalucía se mueve con*
21
22 380 *Europa*” for the financial support of their contracts.
23
24
25

26
27 381 **References**

28
29 382 Álvarez-Pérez JM, Campo E, San-Juan F, Coque JJR, Ferreira V, Hernández-Orte P (2012)
30
31 383 Sensory and chemical characterisation of the aroma of Prieto Picudo rosé wines: the
32
33 384 differential role of autochthonous yeast strains on aroma profiles Food Chem
34
35 385 133:284-292 doi:[10.1016/j.foodchem.2012.01.024](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.024)
36
37
38 386 Baiano A, Terracone C, Longobardi F, Ventrella A, Agostiano A, Del Nobile MA (2012)
39
40 387 Effects of different vinification technologies on physical and chemical characteristics
41
42 388 of Sauvignon blanc wines Food Chem 135:2694-2701
43
44 389 doi:[10.1016/j.foodchem.2012.07.075](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.075)
45
46
47 390 Caridi A (2003) Effect of protectants on the fermentation performance of wine yeasts
48
49 391 subjected to osmotic stress Food Technol Biotech 41:145-148
50
51
52 392 Coetzee C, du Toit WJ (2012) A comprehensive review on Sauvignon blanc aroma with a
53
54 393 focus on certain positive volatile thiols Food Res Int 45:287-298
55
56 394 doi:[10.1016/j.foodres.2011.09.017](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.017)
57
58
59
60
61
62
63
64
65

395 Culleré L, Fernández de Simón B, Cadahía E, Ferreira V, Hernández-Orte P, Cacho J (2013)
1
2 396 Characterization by gas chromatography–olfactometry of the most odor-active
3
4
5 397 compounds in extracts prepared from acacia, chestnut, cherry, ash and oak woods
6
7 398 LWT - Food Sci Technol 53:240-248 doi:[10.1016/j.lwt.2013.02.010](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.02.010)
8
9
10 399 Day MP, Schmidt SA, Smith PA, Wilkes EN (2015) Use and impact of oxygen during
11
12 400 winemaking Aust J Grape Wine R 21:693-704 doi:[10.1111/ajgw.12199](https://doi.org/10.1111/ajgw.12199)
13
14 401 Dombre C, Rigou P, Wirth J, Chalier P (2015) Aromatic evolution of wine packed in virgin
15
16 402 and recycled PET bottles Food Chem 176:376-387
17
18 403 doi:[10.1016/j.foodchem.2014.12.074](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.074)
19
20
21 404 Dravnieks A (1985) Atlas of odor character profiles. Astm Intl, Philadelphia, PA
22
23
24 405 Escudero A, Cacho J, Ferreira V (2000) Isolation and identification of odorants generated in
25
26 406 wine during its oxidation: a gas chromatography–olfactometric study Eur Food Res
27
28 407 Technol 211:105-110 doi:[10.1007/s002179900128](https://doi.org/10.1007/s002179900128)
29
30
31 408 Falguera V, Forns M, Ibarz A (2013) UV–vis irradiation: an alternative to reduce SO₂ in
32
33 409 white wines? LWT - Food Sci Technol 51:59-64 doi:[10.1016/j.lwt.2012.11.006](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.11.006)
34
35
36 410 Ferreira V, Ortín N, Escudero A, López R, Cacho J (2002) Chemical characterization of the
37
38 411 aroma of Grenache rosé wines: aroma extract dilution analysis, quantitative
39
40 412 determination, and sensory reconstitution studies J Agr Food Chem 50:4048-4054
41
42 413 doi: [10.1021/jf0115645](https://doi.org/10.1021/jf0115645)
43
44
45 414 Garde-Cerdán T, López R, Garijo P, González-Arenzana L, Gutiérrez AR, López-Alfaro I,
46
47 415 Santamaría P (2014) Application of colloidal silver versus sulfur dioxide during
48
49 416 vinification and storage of Tempranillo red wines Aust J Grape Wine R 20:51-61
50
51 417 doi:[10.1111/ajgw.12050](https://doi.org/10.1111/ajgw.12050)
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 418 Gil M, Cabellos JM, Arroyo T, Prodanov M (2006) Characterization of the volatile fraction
419 of young wines from the Denomination of Origin “Vinos de Madrid” (Spain) Anal
420 Chim Acta 563:145-153 doi:[10.1016/j.aca.2005.11.060](https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.060)
421 González-Rompinelli EM, Rodríguez-Bencomo JJ, García-Ruiz A, Sánchez-Patán F, Martín-
422 Álvarez PJ, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV (2013) A winery-scale trial of the use
423 of antimicrobial plant phenolic extracts as preservatives during wine ageing in barrels
424 Food Control 33:440-447 doi:[10.1016/j.foodcont.2013.03.026](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.03.026)
425 Guerrero RF, Cantos-Villar E (2015) Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide
426 replacements in wine: a parameter review Trends Food Sci Tech 42:27-43
427 doi:[10.1016/j.tifs.2014.11.004](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.11.004)
428 ISO (1985) Sensory analysis. Methodology. Flavour profile methods. Genève, Switzerland.
429 Izquierdo-Cañas PM, García-Romero E, Huertas-Nebreda B, Gómez-Alonso S (2012)
430 Colloidal silver complex as an alternative to sulphur dioxide in winemaking Food
431 Control 23:73-81 doi:[10.1016/j.foodcont.2011.06.014](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.014)
432 Jackowetz JN, Dierschke S, Mira de Orduña R (2011) Multifactorial analysis of acetaldehyde
433 kinetics during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* Food Res Int
434 44:310-316 doi:[10.1016/j.foodres.2010.10.014](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.014)
435 Lopes P et al. (2009) Impact of oxygen dissolved at bottling and transmitted through closures
436 on the composition and sensory properties of a Sauvignon blanc wine during bottle
437 storage J Agr Food Chem 57:10261-10270 doi:[10.1111/ajgw.12199](https://doi.org/10.1111/ajgw.12199)
438 Makhotkina O, Herbst-Johnstone M, Logan G, du Toit W, Kilmartin PA (2013) Influence of
439 sulfur dioxide additions at harvest on polyphenols, C6-compounds, and varietal thiols
440 in Sauvignon blanc Am J Enol and Viticult 64:203-213 doi:[10.5344/ajev.2012.12094](https://doi.org/10.5344/ajev.2012.12094)

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 441 Martínez JA, Melgosa M, Pérez MM, Hita E, Negueruela AI (2001) Note. Visual and
442 instrumental color evaluation in red wines Food Sci Technol Int 7:439-444
443 doi:[10.1106/VFAT-5REN-1WK2-5JGQ](https://doi.org/10.1106/VFAT-5REN-1WK2-5JGQ)
444 Müller C, Ullmann K, Wilkens A, Winterhalter P, Toyokuni S, Steinberg P (2009) Potent
445 antioxidative activity of Vineatrol®30 grapevine-shoot extract Biosci Biotech Bioch
446 73:1831-1836 doi:[10.1271/bbb.90213](https://doi.org/10.1271/bbb.90213)
447 OIV (2014) Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins. Organisation
448 International de la Vigne et du Vin, Paris
449 Peinado RA, Moreno J, Bueno JE, Moreno JA, Mauricio JC (2004) Comparative study of
450 aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative
451 cryomaceration Food Chem 84:585-590 doi:[10.1016/S0308-8146\(03\)00282-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00282-6)
452 Pozo-Bayón MA et al. (2005) Wine volatile and amino acid composition after malolactic
453 fermentation: effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures J
454 Agr Food Chem 53:8729-8735 doi:[10.1021/jf050739y](https://doi.org/10.1021/jf050739y)
455 Raposo R et al. (2016a) Grapevine-shoot stilbene extract as a preservative in red wine Food
456 Chem 197, Part B:1102-1111 doi:[10.1016/j.foodchem.2015.11.102](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.102)
457 Raposo R et al. (2016b) Replacement of sulfur dioxide by hydroxytyrosol in white wine:
458 Influence on both quality parameters and sensory LWT - Food Sci Technol 65:214-
459 221 doi:[10.1016/j.lwt.2015.08.005](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.005)
460 Romain C et al. (2012) Vineatrol and cardiovascular disease: beneficial effects of a vine-
461 shoot phenolic extract in a hamster atherosclerosis model J Agr Food Chem
462 60:11029-11036 doi:[10.1021/jf303549t](https://doi.org/10.1021/jf303549t)
463 Santos MC, Nunes C, Rocha MAM, Rodrigues A, Rocha SM, Saraiva JA, Coimbra MA
464 (2015) High pressure treatments accelerate changes in volatile composition of sulphur

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

465 dioxide-free wine during bottle storage Food Chem 188:406-414
466 doi:[10.1016/j.foodchem.2015.05.002](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.002)
467 Santos MC, Nunes C, Saraiva JA, Coimbra MA (2012) Chemical and physical methodologies
468 for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of
469 their potentialities and limitations Eur Food Res Technol 234:1-12
470 doi:[10.1007/s00217-011-1614-6](https://doi.org/10.1007/s00217-011-1614-6)
471 Sarrazin E, Dubourdieu D, Darriet P (2007) Characterization of key-aroma compounds of
472 botrytized wines, influence of grape botrytization Food Chem 103:536-545
473 doi:[10.1016/j.foodchem.2006.08.026](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.026)
474 Sonni F, Cejudo Bastante MJ, Chinnici F, Natali N, Riponi C (2009) Replacement of sulfur
475 dioxide by lysozyme and oenological tannins during fermentation: influence on
476 volatile composition of white wines J Sci Food Agr 89:688-696
477 doi:<http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.3503>
478 Sonni F, Chinnici F, Natali N, Riponi C (2011) Pre-fermentative replacement of sulphur
479 dioxide by lysozyme and oenological tannins: effect on the formation and evolution of
480 volatile compounds during the bottle storage of white wines Food Chem 129:1193-
481 1200 doi: [10.1016/j.foodchem.2011.05.104](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.104)
482 Tominaga T, Niclass Y, Frérot E, Dubourdieu D (2006) Stereoisomeric distribution of 3-
483 mercaptohexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate in dry and sweet white wines made
484 from *Vitis vinifera* (var. Sauvignon blanc and Semillon) J Agr Food Chem 54:7251-
485 7255 doi:[10.1021/jf061566v](https://doi.org/10.1021/jf061566v)
486 Vally H, Misso NLA, Madan V (2009) Clinical effects of sulphite additives Clin Exp Allergy
487 39:1643-1651 doi:[10.1111/j.1365-2222.2009.03362.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03362.x)
488 Varela C, Torrea D, Schmidt SA, Ancin-Azpilicueta C, Henschke PA (2012) Effect of
489 oxygen and lipid supplementation on the volatile composition of chemically defined

490 medium and Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* Food Chem

491 135:2863-2871 doi:[10.1016/j.foodchem.2012.06.127](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.127)

492 **Figure captions**

493 **Fig. 1** Diagram of the winemaking processes.

494 **Fig. 2** Volatile compounds determined in Sauvignon blanc wines: a) esters, b) alcohols, c)
495 acids. ■ SO₂ addition wine under traditional conditions; VIN, ▨ Vineatrol addition
496 wine under traditional conditions; R-CT, ■ SO₂ addition wine under reductive
497 conditions; R-VIN, ▨ Vineatrol addition wine under reductive conditions. Different
498 letters indicate significant differences according to a Tukey's test ($p \leq 0.05$). Analyses of
499 variance, levels of significance: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

500 **Fig. 3** Cobweb diagram of the sensory scores for Sauvignon blanc wines at bottling aroma
501 perception (a) and in-mouth perception (b), and after 6 months of storage aroma perception
502 (c) and in-mouth perception (d). CT, SO₂ addition wine under traditional conditions; VIN,
503 Vineatrol addition wine under traditional conditions; R-CT, SO₂ addition wine under
504 reductive conditions. R-VIN, Vineatrol addition wine under reductive conditions. Descriptors
505 with * denote significant differences. Analyses of variance, levels of significance: * ($p <$
506 0.05), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

507 **TABLES**

508 **Table 1** Enological parameters in Sauvignon blanc wines at bottling

509 **Table 2** Color related parameters in Sauvignon blanc wines

510 **Table 3** Odoriferous zones found in Sauvignon Blanc wines after six months of storage in
511 bottle. Gas chromatography retention data, identity, odorant description, modified frequency
512 (%) and differences in modified frequency (%) between CT and VIN wines, and R-CT and R-
513 VIN wines respectively.

Table

Table 1. Enological parameters of Sauvignon blanc wines at bottling

	CT	VIN	R-CT	R-VIN	LS
Relative density	0.9989 (0.0001) ^a	0.9984 (0.0006) ^a	0.9907 (0.0001) ^b	0.9906 (0.0002) ^b	***
Ethanol (%vol)	12.72 (0.07) ^c	13.21 (0.04) ^a	12.78 (0.02) ^c	12.95 (0.08) ^b	***
Glycerol (g/L)	6.18 (0.20) ^a	5.51 (0.19) ^b	4.95 (0.04) ^c	4.99 (0.01) ^c	***
Dry extract (g/L)	15.75 (0.12)	15.21 (0.27)	15.17 (0.08)	15.53 (0.04)	
Total acidity (g/L TH ₂)	7.36 (0.00) ^a	7.05 (0.08) ^a	6.45 (0.01) ^b	6.59 (0.05) ^b	***
pH	2.90 (0.00) ^b	2.88 (0.00) ^b	3.00 (0.00) ^a	2.96 (0.00) ^a	*
Volatile acidity (g/L AcH)	0.35 (0.01)	0.36 (0.08)	0.30 (0.00)	0.34 (0.06)	
Acetic acid (g/L)	0.23 (0.01)	0.26 (0.01)	0.24 (0.01)	0.24 (0.01)	
Citric acid (g/L)	0.50 (0.01)	0.49 (0.00)	0.45 (0.01)	0.47 (0.01)	
Tartaric acid (g/L)	3.36 (0.07) ^a	3.45 (0.03) ^a	3.13 (0.06) ^b	3.21 (0.01) ^b	**
Malic acid (g/L)	2.76 (0.04) ^a	2.60 (0.05) ^a	2.32 (0.02) ^b	2.43 (0.02) ^b	***
Lactic acid (g/L)	0.06 (0.02)	0.04 (0.01)	0.07 (0.01)	0.09 (0.01)	
Succinic acid (g/L)	0.67 (0.04) ^a	0.50 (0.03) ^b	0.45 (0.01) ^b	0.44 (0.01) ^b	***
Total stilbenes (mg/L)	0.92 (0.07) ^b	36.40 (4.10) ^a	0.95 (0.05) ^b	33.30 (2.30) ^a	***
Total SO ₂ (mg/L)	73.5 (0.7) ^a	0.0 (0.0) ^b	65.0 (1.0) ^a	0.0 (0.0) ^b	***
Free SO ₂ (mg/L)	12.5 (0.7) ^a	0.0 (0.0) ^c	13.0 (0.0) ^b	0.0 (0.0) ^c	***
Na (mg/L)	< 10	< 10	< 10	< 10	
Ca (mg/L)	< 50	< 50	< 50	< 50	
K (mg/L)	456 (8) ^a	394 (3) ^d	418 (5) ^c	436 (6) ^b	***
Fe (mg/L)	< 10	< 10	< 10	< 10	
Cu (mg/L)	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2	
Zn (mg/L)	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	
Acetaldehyde (mg/L)	45.50 (2.12) ^a	17.00 (0.00) ^d	21.67 (0.58) ^c	27.33 (0.58) ^b	***

CT SO₂ addition wine, VIN Vineatrol addition wine, R-CT SO₂ addition wine elaborated in reductive conditions, R-VIN Vineatrol addition wine in reductive conditions, LS level signification

TH₂ tartaric acid; AcH, acetic acid

Standard deviation in brackets

Different superscript letters (a, b or c) for the same parameter denote significant differences according to Tukey's test (p < 0.05)

Analyses of variance, level of significance (LS): * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001)

Table

Table 2 Color related parameters (A_{420} , L^* , a^* , b^* , Hue, Chroma and ΔE_{ab}) in Sauvignon blanc wines

	Bottling					12 months of storage in bottle				
	CT	VIN	R-CT	R-VIN	LS	CT	VIN	R-CT	R-VIN	LS
A_{420}	0.037 ^b (0.001)	0.103 ^a (0.008)	0.031 ^b (0.001)	0.116 ^a (0.010)	***	0.049 ^b (0.005)	0.122 ^a (0.010)	0.050 ^b (0.004)	0.129 ^a (0.016)	***
L^*	98.80 ^a (0.03)	97.38 ^b (0.08)	99.10 ^a (0.03)	96.78 ^c (0.28)	***	97.85 ^a (0.30)	94.94 ^b (0.70)	98.53 ^a (0.23)	93.78 ^c (0.21)	***
a^*	-1.10 ^a (0.01)	-2.06 ^b (0.03)	-1.30 ^a (0.02)	-2.04 ^b (0.13)	***	-1.20 (0.00)	-1.50 (0.19)	-1.26 (0.04)	-1.03 (0.03)	
b^*	6.24 ^b (0.10)	14.2 ^a (0.35)	5.25 ^b (0.05)	15.28 ^a (1.38)	***	8.32 ^b (0.29)	19.05 ^a (1.50)	7.10 ^b (0.44)	19.52 ^a (1.94)	***
C^*_{ab}	6.33 ^b (0.10)	14.35 ^a (0.35)	5.41 ^b (0.05)	15.41 ^a (1.38)	***	8.41 ^b (0.29)	19.05 ^a (1.48)	7.21 ^b (0.44)	19.54 ^a (1.94)	***
h^*_{ab}	100.0 ^b (0.2)	98.3 ^c (0.1)	103.9 ^a (0.1)	97.4 ^d (0.3)	***	98.2 ^b (0.3)	94.5 ^c (0.9)	100.0 ^a (0.3)	93.0 ^d (0.3)	***
ΔE_{ab}^*		8.15		10.32			11.12		13.30	

CT SO_2 addition wine, VIN Vineatrol addition wine, R-CT SO_2 addition wine under reductive conditions, R-VIN vineatrol addition wine under reductive conditions, LS level signification

A_{420} absorbance at 420 nm, L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} , h^*_{ab} are CIELab color coordinates, ΔE_{ab}^* color differences

Standard deviation in brackets

Different superscript letters for the same parameter denote significant differences according to Tukey's test ($p < 0.05$)

Analyses of variance, levels of significance (LS): * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$)

Table

Table 3 Odoriferous zones found in Sauvignon Blanc wines after six months of storage in bottle. Gas chromatography retention data, identity, odorant description, modified frequency (%) and differences in modified frequency (%) between CT and VIN wines, and R-CT and R-VIN wines

OZs	LRI		Compound	Descriptor	MF(%)				ΔMF(%)		LS
	DB-WAX	DB-5			CT	VIN	R-CT	R-VIN	VIN-CT	(R-VIN)-(R-CT)	
1	<1100	752	isobutyl acetate ²	sweet	61	61	60	70	0	10	
2	<1100	793	ethyl butyrate ¹	fruity	56	57	62	59	1	-3	
3	<1100	846, 850	ethyl 2-methylbutyrate ² + ethyl 3-methylbutyrate ²	fruity	60 ^{ab}	44 ^b	77 ^a	74 ^a	-16	-3	**
4	<1100 †	<700	isobutanol ¹	fusel, bitter, green	58 ^a	60 ^a	44 ^b	47 ^b	2	3	*
5	1110	820	butyl acetate ²	solvent, fruity	64	72	65	56	8	-9	
6	1119	876	isoamyl acetate ¹	banana	73	72	72	64	-1	-8	
7	1209	728	isoamyl alcohol ¹	fusel	87	85	86	91	-2	5	
8	1239	998	ethyl hexanoate ¹	fruity	70 ^b	70 ^b	87 ^a	82 ^{ab}	0	-5	**
9	1303	865	2-methyl-3-furanthiol ²	meaty	84	85	91	86	1	-5	
10	1354	940	4-mercapto-4-methyl-2-pentanone ²	box tree	56	66	68	58	10	-10	
11	1361	895 †	1-hexanol ¹	grass	50 ^a	27 ^b	44 ^a	25 ^b	-23	-19	*
12	1386 †	855	Z-3-hexenol ¹	grass	66	67	60	60	1	0	
13	1432	912	2-furfurylthiol ²	coffee	69	60	69	60	-9	-9	
14	1436	1196	ethyl octanoate ¹	fruity	69	69	73	73	0	0	
15	1440 †	<700	acetic acid ¹	vinegar	81	83	71	74	2	3	
16	1468	906	methional ²	baked potatoes	74	78	83	80	4	-3	
17	1522	1153	Z-2-nonenal ² + E-2-nonenal ²	chlorine, green	72	83	82	83	11	2	
18	1542 †	1164	3,5-diethyl-2-methylpyrazine ²	baked, sweet	50 ^b	69 ^a	47 ^b	67 ^a	19	20	**
19	1551	1098 †	linalool ²	floral, muscat	58	62	58	60	4	2	
20	1573 †	-	isobutyric acid ²	cheese	69 ^a	36 ^b	43 ^b	47 ^{ab}	-33	4	*
21	1592 †	1156	(E,Z)-nona-2,6-dienal ²	cucumber	58	65	58	64	7	6	
22	1624	-	butyric acid ¹	cheese	90	82	91	93	-8	2	
23	1630 †	1013	2-acetylpyrazine ²	toasty, burnt	73	76	71	69	3	-2	
24	1659	1047 †	phenylacetaldehyde ²	honey	52 ^{ab}	58 ^a	27 ^c	47 ^b	6	20	***
25	1665	-	3-methylbutanoic acid ¹	cheese	93	97	90	86	4	-4	
26	1722	979	methionol ¹	potato	97 ^a	93 ^{ab}	81 ^b	87 ^{ab}	-4	6	*
27	1726	1252	3-mercaptohexyl acetate ²	box tree	67	76	59	62	9	3	
28	1821	1263	phenethyl acetate ²	roses	77	69	75	71	-8	-4	
29	1841	1396	β-damascenone ²	sweet, apple	85	83	89	87	-2	-2	
30	1841 †	-	n.i.	pungent	83	82	88	91	-1	3	
31	1847	1133	3-mercaptohexanol ²	grapefruit	82	83	87	88	1	1	

32	1859	1095	guaiacol ²	phenolic, smoky	51 ^{ab}	55 ^{ab}	42 ^b	70 ^a	4	28	*
33	1891	1355	ethyl dihydrocinnamate ²	sweet, pleasant	60	60	60	61	0	1	
34	1917	1118	2-phenylethanol ¹	roses	93	94	93	93	1	0	
35	-	1271 †	<i>n.i.</i>	<i>chamomile, sweet</i>	7 ^b	69 ^a	34 ^a	80 ^a	62	46	**
36	2042	1088	furaneol ²	caramel	72	73	82	81	1	-1	
37	2057	1380	<i>n.i.</i>	wet, unpleasant	70	78	87	84	8	-3	
38	2068	1145	homofuraneol ²	caramel	60	71	72	73	9	1	
39	2076 †	1076-1088	p-cresol (m-cresol) ²	leather, animal	64	55	58	64	-9	6	
40	2130	1455	ethyl cinnamate ²	flowery	58	61	64	68	2	4	
41	2166	1474	γ-decalactone ²	peach	59	57	61	61	-2	0	
42	2179	1371	eugenol ²	clove	53	49	57	52	-4	-5	
43	2195	1320	4-vinylguaiacol ²	phenolic	66	69	78	80	3	2	
44	2196	1124	sotolon ²	curry	88	86	91	88	-2	-3	
45	2219	1490	δ-decalactone ²	coconut	66	61	57	62	-6	5	
46	2226 †	1317	o-aminoacetophenone ²	sweet, smoky	75 ^a	41 ^b	65 ^a	44 ^b	-34	-21	**
47	2296	1733	<i>n.i.</i>	<i>black pepper</i>	10 ^b	72 ^a	13 ^b	79 ^a	62	66	***
48	2462	1553	<i>n.i.</i>	<i>pine, fresh</i>	24 ^b	74 ^a	12 ^b	67 ^a	50	55	***
49	2546	1258	phenylacetic acid ¹	urine, sweet, floral	82	76	86	84	-6	-2	
50	2564	1411	vanillin ²	vanille	56 ^b	72 ^a	73 ^b	81 ^a	16	8	***
51	2427	1668	δ-dodecalactone ¹	fatty	28 ^b	66 ^a	45 ^{ab}	62 ^a	38	17	*
52	-	1691 †	<i>n.i.</i>	<i>citrus, almond</i>	30 ^{ab}	65 ^a	7 ^b	58 ^{ab}	35	51	*

CTSO₂ addition wine, VIN Vineatrol addition wine, R-CT SO₂ addition wine elaborated in reductive conditions, R-VIN Vineatrol addition wine in reductive conditions

LRI Linear retention index, MF(%) modified frequency, ΔMF(%) difference in modified frequency between VIN and CT wines, R-VIN and R-CT wines, LS level signification

¹ Identification based on coincidence of gas chromatography retention on both columns and mass spectrometric data with those of pure compounds available in the laboratory or with NIST mass spectrometric library data

² Identification based on coincidence of chromatographic retention data on DB-WAX or DB-5 capillary column and on the similarity of odor previously reported

† MF(%) calculated on that capillary columns

n.i., not identified compound

Different superscript letters (a, b or c) for the same parameter denote significant differences according to Tukey's test (p < 0.05)

Analyses of variance, levels of significance (LS): *(p < 0.05), **(p < 0.01), ***(p < 0.001).

Figure

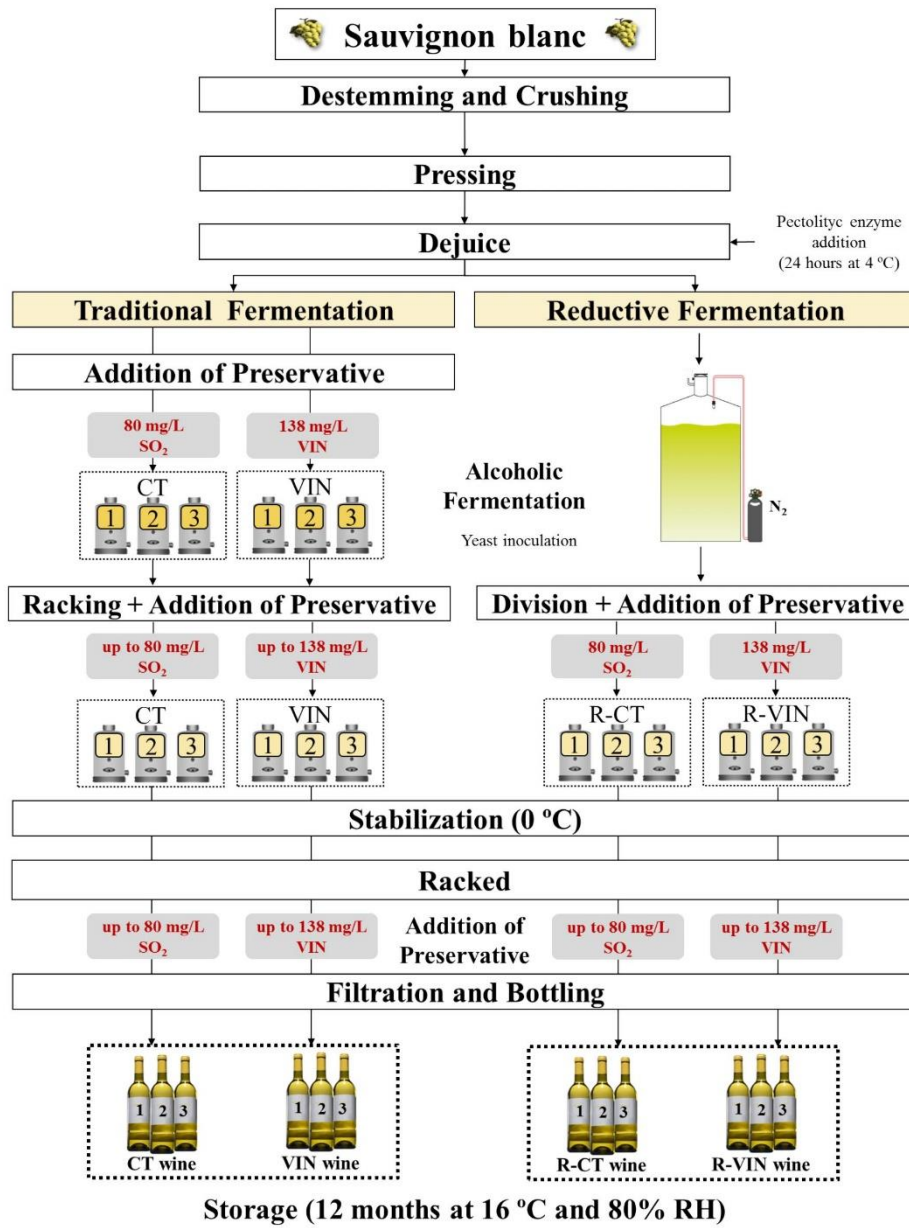
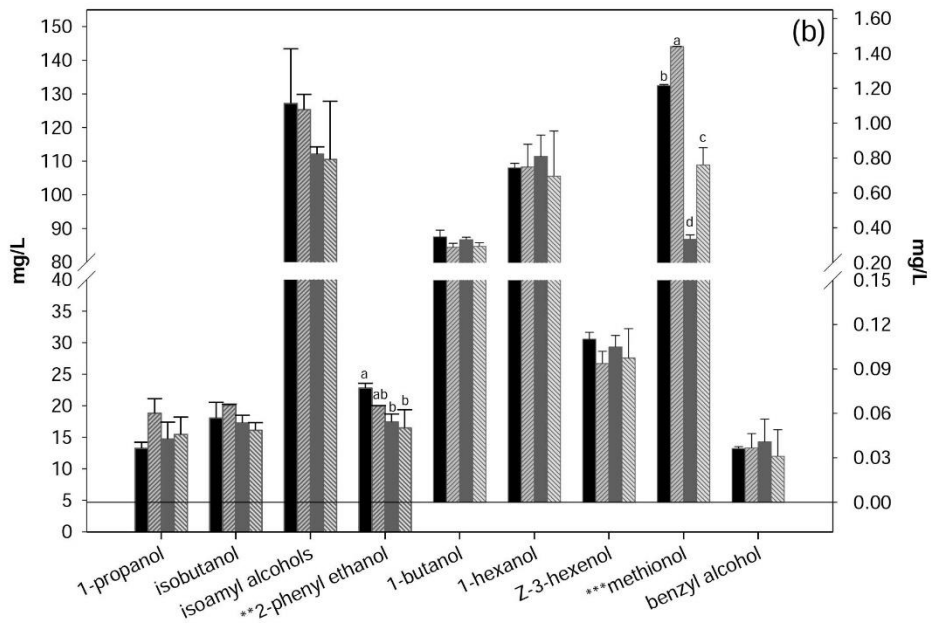
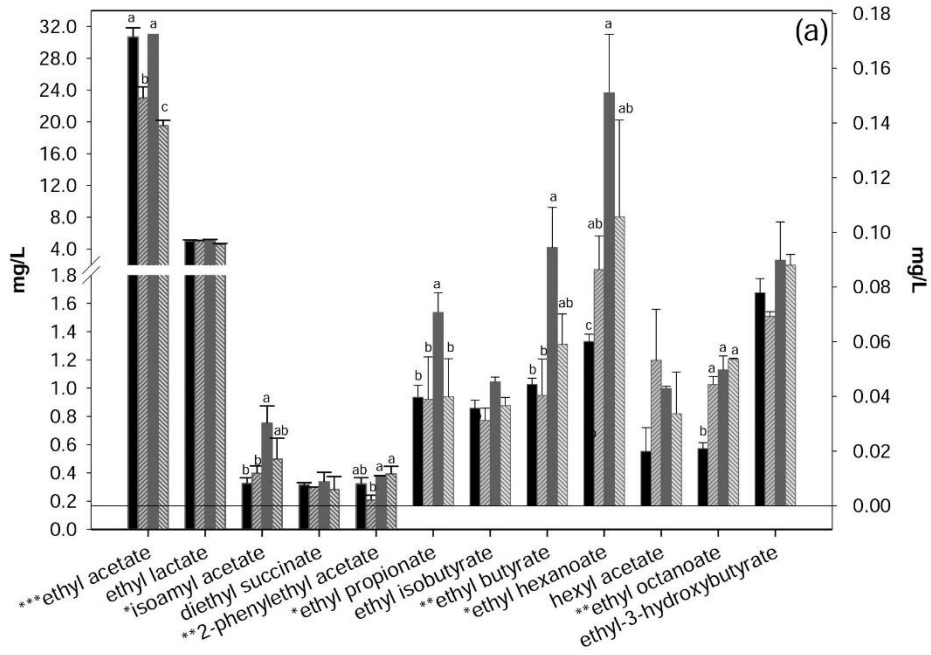


Fig. 1

Figure



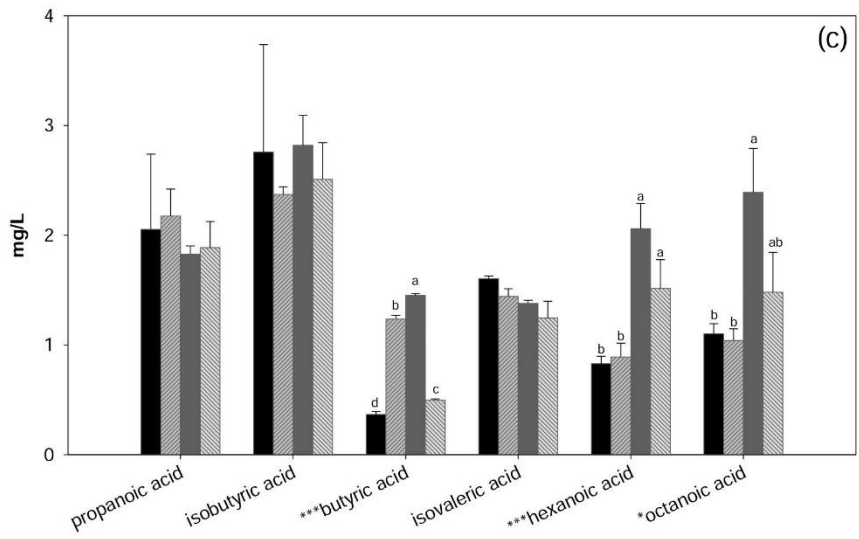


Fig. 2 Symbols CT VIN R-CT R-VIN

Figure

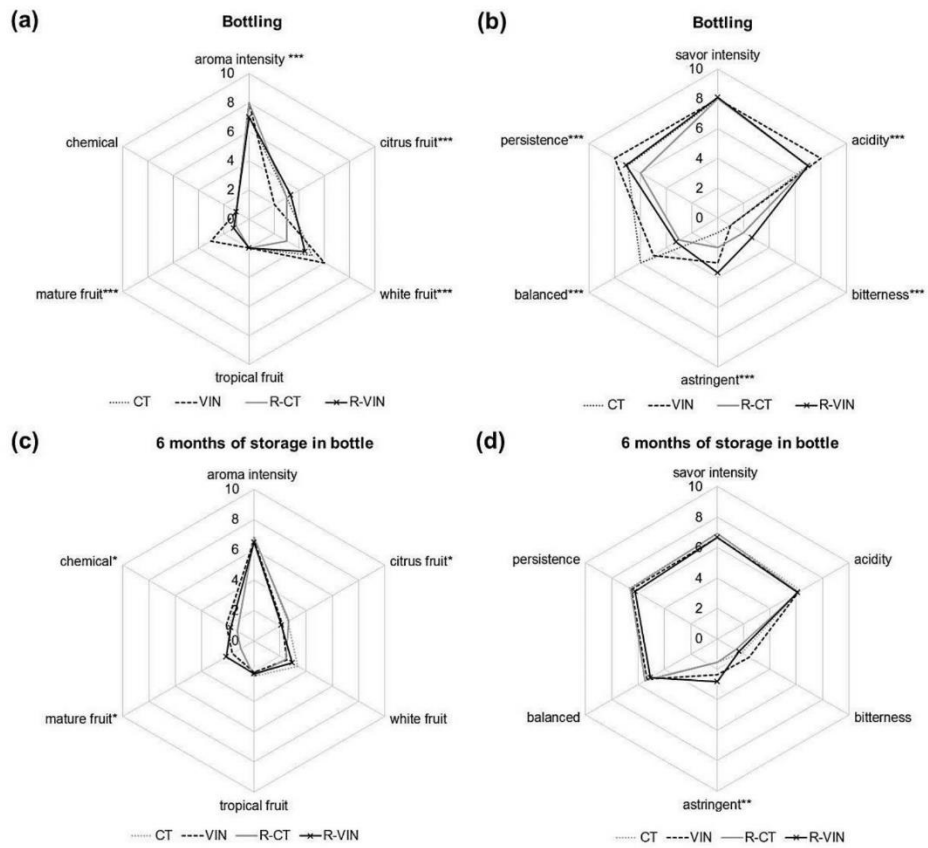


Fig. 3

Discusión IV-3.2: Vinos Blancos de 2013

Siguiendo el esquema de vinificación descrito en la *Figura 3.2* (sección III-2.5) se evaluó la aptitud del extracto enriquecido en estilbenos como alternativa al SO₂ en la elaboración de vinos blancos. Se realizaron dos tratamientos: un testigo con SO₂ (CT) y un tratamiento único con Vineatrol (VIN). Con el fin de comprobar la influencia del método de elaboración y el uso del extracto, ambos tratamientos se estudiaron bajo dos métodos de vinificación, tradicional y Ganimede®, Los ensayos se resumen en la *Tabla 4.15*.

Tabla 4.15.- ensayos realizados en la vendimia 2013 en vinos Sauvignon blanc

antioxidante	mg/L	método tradicional		condiciones reductoras	
		nomenclatura	réplicas	nomenclatura	replicas
Anhidrido sulfuroso	80	CT	3	R-CT	3
Vineatrol	172*	VIN	3	R-VIN	3

*corresponden a 80 mg/L del total de estilbenos presentes en Vineatrol

❖ Las diferencias encontradas en los **parámetros enológicos** fueron principalmente consecuencia del método de elaboración y no del conservante utilizado (*Publicación 7, Tabla 1*). Los vinos elaborados por el método tradicional presentaron mayor densidad relativa, acidez total, ácido tartárico y málico y un menor pH comparado con los vinos elaborados bajo condiciones reductoras. El contenido en potasio fue significativamente distinto para cada vino. Estas diferencias no tuvieron repercusión sobre la calidad de los vinos, ya que todos los parámetros estaban dentro del rango de valores normales para vinos blancos.

Los parámetros que se vieron afectados por el uso de Vineatrol fueron el grado alcohólico y acetaldehído. El grado alcohólico fue significativamente más alto en los vinos elaborados con Vineatrol (VIN y R-VIN), especialmente en el método tradicional (VIN), comparado con sus respectivos controles (CT y R-CT). Dada la baja solubilidad del Vineatrol, fue necesario su disolución en matriz vínica:alcohol vínico (50:50). Además, en el método tradicional fue necesaria la adición de extracto una vez más que en el método Ganimede (*Tabla 3.1, sección III materiales y métodos*). Respecto al acetaldehído, los vinos controles (CT y R-CT) presentaron concentraciones significativamente más altas que sus respectivos vinos con Vineatrol. Está descrito que el SO₂ induce la formación de acetaldehído por las levaduras (Jackowitz et al., 2011).

❖ Mayor impacto tuvo la adición de Vineatrol sobre el **color** de los vinos blancos, independientemente del método de elaboración (*Publicación 7, Tabla 2*). En el embotellado, los vinos elaborados con Vineatrol (VIN y R-VIN) presentaron una mayor A420, b* y C*_{ab} y una menor luminosidad (L*), a* y h_{ab} que sus respectivos controles (CT y R-CT). Es decir, vinos más oscuros, de color verdoso y con un marcado color amarillo/marrón. El color amarillo/marrón, fue una consecuencia directa de la adición del Vineatrol, el cual muestra un color marrón cuando es preparado a altas concentraciones (*Figura 3.5, sección III, materiales y métodos*). Además, las diferencias encontradas en el embotellado entre los vinos con Vineatrol y sus controles (CT) aumentaron a los 12 meses de embotellado, lo cual se corrobora con el valor de ΔE_{ab}^* .

Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores que han descrito importantes diferencias en el color de los vinos blancos cuando son tratados con otras alternativas al SO₂, tales como complejo de plata coloidal (Izquierdo-Cañas et al., 2012), lisozima (Sonni et al., 2009), irradiación de los mostos con UV-visible (Falguera et al., 2013), ácido ascórbico y glutatión (Comuzzo et al., 2015). Izquierdo-Cañas y col. (2012) obtuvieron vinos blancos con un complejo de plata coloidal menos luminosidad y más color amarillo. Sonni y col (2009), observaron que los vinos tratados con lisozima presentaron una mayor intensidad óptica a 420nm. Falguera y col. (2013) describieron que la radiación de UV-vis sobre mostos dieron lugar a vinos con importantes cambios en las coordenadas CIELab. Comuzzo y col. (2015) estudió el efecto de diferentes productos (ácido ascórbico y glutatión) sobre el pardeamiento de vinos blancos. En ambos casos se obtuvieron vinos con una A420 mayor que el vino elaborado con SO₂.

❖ La mayoría de compuestos volátiles no mostraron diferencias entre los tratamientos (Vineatrol y SO₂), independientemente del método de elaboración (*Publicación 7, Figura 2*). No se encontraron diferencias significativas en el contenido total de alcoholes (*Figura 4.8*). Además, su concentración fue inferior a 300 mg/L, confiriendo complejidad al aroma del vino (Rapp & Mandery, 1986). Sin embargo, la adición de Vineatrol disminuyó significativamente al contenido total de ésteres, independientemente del método de elaboración (*Figura 4.8*).

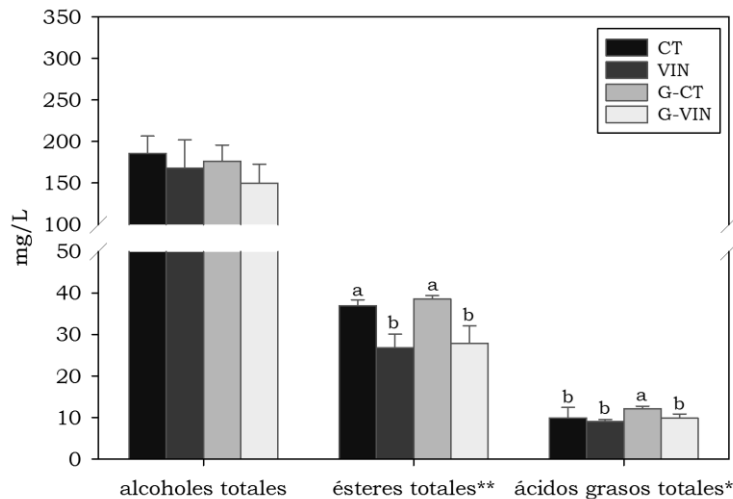


Figura 4.8. Compuestos volátiles en los vinos de Syrah elaborados con SO₂ y Vineatrol elaborados por el método tradicional (CT y VIN) y sistema Ganimede (G-CT y G-VIN)

Estas diferencias en los totales (Figura 4.8) son debidas principalmente a el acetato de etilo (Publicación 7, Figura 2A). El acetato de etilo, éster mayoritario en todos los vinos, fue significativamente menor en los vinos con Vineatrol, especialmente en el R-VIN. En todos los vinos su concentración fue superior a su umbral de percepción (12.27 mg/L; (Etievant, 1991) e inferior a 150 mg/L, concentración a partir de la cual puede conferir aroma desagradable a vinagre (Clarke & Bakker, 2004). El acetato de etilo confiere notas a fruta y disolvente. Se ha descrito que la disminución de ésteres acetatos puede contribuir a una pérdida de frescor y afrutado en los vinos blancos (Coetzee & du Toit, 2015). Respecto al contenido en alcoholes no se encontraron diferencias significativas en el contenido total de alcoholes.

Respecto al contenido de ácidos grasos, no se encontraron diferencias entre los vinos CT y VIN (método tradicional). Sin embargo, bajo condiciones reductoras, el Vineatrol disminuyó el contenido de ácidos grasos totales respecto a su control, R-CT. Respecto al ácido butírico, en vinos elaborados con Vineatrol bajo el método tradicional aumentó su concentración. Mientras que, en condiciones reductoras, su concentración disminuyó en los vinos tratados con Vineatrol (R-VIN).

Se ha descrito que otras alternativas al SO₂ han modificado la composición volátil. Sonni y col (2009) han descrito que el uso de lisozima y taninos enológicos como alternativa al SO₂ han modificado la composición volátil de vinos de Sauvignon blanc (Sonni et al., 2009). Más recientemente, se ha descrito que los tratamientos de alta presión afectan fuertemente a la composición volátil

en el vino blanco, dando lugar a un perfil volátil similar al de los vinos envejecidos (Santos et al., 2015).

❖ En el **análisis sensorial** se realizó en copas negras para evitar la influencia del color. En el embotellado influyeron tanto el tratamiento como el método de elaboración. En el método tradicional, los vinos elaborados con Vineatrol se caracterizaron por una alta intensidad aromática, fruta blanca, fruta madura, con una alta acidez, astringencia y persistencia en boca; mientras que su respectivo CT presentó aromas a cítricos y mayor equilibrio en boca. En los vinos elaborados bajo condiciones reductoras, R-VIN y R-CT se caracterizaron por aromas a cítricos. Sin embargo, en boca los vinos R-VIN presentaron mayor amargor y astringencia.

Después de 6 meses de embotellado, el perfil sensorial de los vinos cambió. Todos los vinos bajaron su intensidad aromática y se minimizaron las diferencias. Sin embargo, los vinos CT siguieron destacando en el atributo cítrico. Mientras que los vinos elaborados con Vineatrol se caracterizaron por presentaron ligeras notas a químico y altas puntuaciones en el atributo fruta madura, mientras en boca destacaron por una elevada astringencia

Estos resultados en el análisis olfativo concuerdan con los obtenidos en la composición volátil (realizados a los 4 meses de embotellado), en el que los vinos controles (CT) presentaban mayor concentración de ésteres totales, principalmente acetato de etilo, responsables de los aromas afrutados/florales asociados con el vino (*Lilly y col, 2000*), y en condiciones reductoras, además, mayor concentración de ácidos grasos, compuestos que realzan el frescor de los vinos (Coetzee & du Toit, 2015).

❖ La adición de Vineatrol modificó el **perfil olfatométrico** de los vinos (*Publicación 7, Tabla 3*). Del total de las 80 ZO's encontradas en los vinos sólo 4 zonas odorantes, no identificadas, presentaron una $\Delta FM (\%) \geq 40$ (*Tabla 4.16*). La **ZO-1**, con el descriptor pimienta negra, la **ZO-2** descrita como pino, fresco, **ZO-3** (manzanilla, dulce) y la **ZO-4**, con descriptor cítrico, almendra. Estas zonas odorantes (2, 3 y 4) también se encontraron en los vinos Syrah elaborados con Vineatrol en ambos sistemas de elaboración, a las dosis estudiadas.

Tabla 4.16. Principales zonas odoríferas diferentes encontradas en vinos de Sauvignon blanc

ZO	LRI ¹			Descripción	FM (%)				ΔFM (%)		LS
	DB-WAX	DB-5	compuesto		CT	VIN	R-CT	R-VIN	VIN -CT	(R-VIN) - (R-CT)	
1	2296	1733	n.i.	pimiento negra	10	72	13	79	62	66	***
2	2462	1553	n.i.	pino, frescor	24	74	12	67	50	55	***
3	-	1271†	n.i.	manzanilla, dulce	7	69	34	80	62	46	**
4	-	1691†	n.i.	cítrico, almendra	30	65	7	58	35	51	*

CT, vinos con SO₂ sistema tradicional; VIN; vinos con Vineatrol sistema tradicional; G-CT, vinos con SO₂ bajo condiciones reductoras; G-VIN, vinos con Vineatrol bajo condiciones reductoras; ZO's, zonas odorantes; LRI, índice de retención lineal, calculado en las columnas capilar DB-WAX y DB-5. FM, frecuencia modificada. n.i., compuesto no identificado.

En resumen, los vinos obtenidos con el extracto de madera de poda rico en estilbenos (Vineatrol) presentaron parámetros enológicos dentro de los rangos usuales en vinos blancos. Si bien el uso de Vineatrol afectó a varios parámetros de calidad, (i) modificó el color de los vinos, obteniéndose vinos más amarillos/pardos y menos luminosos; (ii) independientemente del método de elaboración, disminuyó el contenido de ésteres totales, especialmente el acetato de etilo. (iii) los vinos a los 6 meses de embotellado, los vinos elaborados con Vineatrol presentaban notas a químico y fenólico, especialmente los elaborados con el sistema tradicional; (iv) el análisis GC-olfatometría mostró que la utilización de Vineatrol modificó el perfil olfatométrico de los vinos Sauvignon blanc introduciendo nuevas zonas odorantes no identificadas, independientemente del método de elaboración.

Esto hace pensar que existen dos puntos claves a tener en cuenta para futuras investigaciones que sigan esta línea; por un lado, el extracto, el cual debería ser incoloro; por otro lado, el almacenamiento en botella, principalmente como consecuencia del tapón utilizado. Por tanto, sería necesario otras investigaciones que, por un lado, se optimice la concentración del extracto Vineatrol o la optimización de la concentración del Vineatrol y/o con otros antioxidantes (ácido ascórbico, glutatión, taninos, ...) o con el conservante SO₂ en menor concentración en el embotellado y, por otro lado, el tapón utilizado en el embotellado, especialmente en variedades altamente sensibles a la oxidación. En todo caso, aconsejándose la utilización del método Ganimede para la elaboración de los vinos.

De forma paralela a lo concluido con en la elaboración en tintos, el Vineatrol, a la dosis empleada, no parece ser eficiente en la conservación del vino durante el envejecimiento en botella. Además, a diferencia de lo observado en vinos tintos, el Vineatrol afecta de manera negativa al color del vino.

IV-4: Optimización de la dosis e impacto en calidad y seguridad de vinos tintos

Los resultados obtenidos en la vendimia 2013, respecto al uso de Vineatrol en vinificación en tinto fueron prometedores, y por tanto se decidió ahondar en esta línea, teniendo en cuenta varios aspectos: primero, la dosis óptima de extractos que actuando como conservante, no implicara un detrimento de la calidad del vino, especialmente durante el almacenamiento en botella; segundo, abordar aspectos importantes relacionados con la seguridad del vino (recuento de microorganismos y aminos biógenas); tercero, ahondar en el perfil polifenólico.

Con el fin de optimizar la concentración del extracto rico en estilbenos (Vineatrol) como alternativa al SO₂ en la elaboración de vinos, se realizaron vinificaciones de vino tinto mediante el método Ganimede y con dos dosis de Vineatrol. Además, en el embotellado se eliminó el espacio de cabeza con N₂ y se utilizaron tampones sintéticos. La calidad de los vinos fue evaluada en diferentes fases de la vinificación, tras la adición del conservante, en el embotellado, a los 6 meses y a los doce meses de embotellado. Además, la calidad y seguridad de los vinos fue estudiada en el embotellado y a los doce meses de embotellado, con especial atención en aquellos parámetros que se vieron más afectados en los estudios preliminares. Los vinos fueron sometidos a un amplio estudio, así, además de parámetros enológicos, medidas cromáticas, se puso especial atención en los compuestos polifenólicos, aminos biogénicas, recuento de algunos microorganismos enológicos, todos ellos recogidos en la **Publicación 7**, y ésteres y otros compuestos volátiles, zonas odorantes y análisis sensorial (recogidos en la **Publicación 8**) para garantizar la calidad del vino. Estos resultados, a su vez, se comparan con un control en el que se utilizó el SO₂.

A continuación, se presentan los resultados de este estudio en forma de dos publicaciones: Publicación 7 y Publicación 8

PUBLICACIÓN 7. “Vinos tintos libres de SO₂ mediante el uso de madera de poda de la vid. Parte 1: impacto en la calidad y seguridad”

Rafaela Raposo, Fabio Chinnici, María José Ruiz-Moreno, Belén Puertas, María Carbú, Raúl F. Guerrero, Víctor Ortiz-Somovilla, José Manuel Moreno-Rojas, Emma Cantos-Villar (2017). Sulfur free red wines through the use of grapevine shoots. Part 1: impact on wine quality and safety. *En revision* Food Chemistry

**Sulfur free red wines through the use of grapevine shoots. Part 1:
impact on wine quality and safety**

Rafaela Raposo^a, Fabio Chinnici^b, María José Ruiz-Moreno^c, Belén Puertas^a, María Carbú^d, Raúl F. Guerrero^a, Víctor Ortiz-Somovilla^b, José Manuel Moreno-Rojas^b, Emma Cantos-Villar^{a*}

Rafaela Raposo^a, María J. Ruiz-Moreno^b, Teresa Garde-Cerdán^c, Belén Puertas^a, José M. Moreno-Rojas^b, Ana Gonzalo-Diago^c, Raul F. Guerrero^b, Victor Ortiz-Somovilla^b, Emma Cantos-Villar^{a*}

^a Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro Rancho de la Merced. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural (CAPDR). Junta de Andalucía. Ctra. Trebujena, km 2.1, 11471, Jerez de la Frontera, Spain

^b Department of Agricultural and Food Sciences, Alma Mater Studiorum, University of Bologna, Piazza Goidanich, 60, 47521 Cesena, FC, Italy.

^c Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro Alameda del Obispo. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural (CAPDR). Junta de Andalucía. Avd. Menéndez Pidal, 14004, Córdoba, Spain

^d Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública. Facultad de Ciencias. Universidad de Cádiz. Polígono Río San Pedro s/n11510, Cádiz, Spain

*Corresponding author: Emma Cantos Villar

E-mail: emma.cantos@juntadeandalucia.es

Manuscript Number:

Title: Sulfur free red wines through the use of grapevine shoots. Part 1: impact on wine quality and safety

Article Type: Research Article (max 7,500 words)

Keywords: stilbene; SO₂; quality wine; polyphenols; color; anthocyanins

Corresponding Author: Dr. Cantos-Villar Emma,

Corresponding Author's Institution: IFAPA - Rancho de La Merced. Junta de Andalucía

First Author: Rafaela Raposo

Order of Authors: Rafaela Raposo; Fabio Chinnici; Maria J Ruiz-Moreno; Belen Puertas; Maria Carbu; Raul F Guerrero; Victor Ortiz; Jose M Moreno-Rojas; Cantos-Villar Emma

Abstract: Following a preliminary study to determine the possibility of using a grapevine shoot extract (VIN) as a sustainable alternative to sulfur dioxide (SO₂), in this study, the chromatic features, phenolic composition, biogenic amines and some microorganism of wines treated with VIN at two concentrations were studied during storage in bottle for the first time. The highest differences were found in phenolic compounds after 12 months of storage in bottle. After storage, the VIN wines had a low content of free anthocyanins and were high in vinyl-pyranoanthocyanins, and direct and ethyl-bridged adducts. Consequently, they showed a bluer tone, less hue and higher color intensity. Thus, the VIN promoted color stabilization reactions and, especially at high dose, preserved non-anthocyanin phenolic compounds better than SO₂. Finally, the VIN guaranteed the stability and safety of the wines, as assessed by determining the content of biogenic amines and enological microorganisms.

1 **Sulfur free red wines through the use of grapevine shoots. Part 1: impact on wine**
2 **quality and safety**

3 Rafaela Raposo^a, Fabio Chinnici^b, María José Ruiz-Moreno^c, Belén Puertas^a, María Carbú^d,
4 Raúl F. Guerrero^a, Víctor Ortiz-Somovilla^c, José Manuel Moreno-Rojas^c, Emma Cantos-
5 Villar^{a*}

6 ^a Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro Rancho de la
7 Merced. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural (CAPDR). Junta de Andalucía.
8 Ctra. Trebujena, km 2.1, 11471, Jerez de la Frontera, Spain

9 ^b Department of Agricultural and Food Sciences, Alma Mater Studiorum, University of
10 Bologna, Piazza Goidanich, 60, 47521 Cesena, FC, Italy.

11 ^c Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro Alameda del
12 Obispo. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural (CAPDR). Junta de Andalucía.
13 Avd. Menéndez Pidal, 14004, Córdoba, Spain

14 ^d Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública. Facultad de Ciencias.
15 Universidad de Cádiz. Polígono Río San Pedro s/n11510, Cádiz, Spain

16 *E-mail address: emma.cantos@juntadeandalucia.es

17
18 **Abstract**

19 Following a preliminary study to determine the possibility of using a grapevine shoot extract
20 (VIN) as a sustainable alternative to sulfur dioxide (SO₂), in this study, the chromatic
21 features, phenolic composition, biogenic amines and some microorganism of wines treated
22 with VIN at two concentrations were studied during storage in bottle for the first time. The
23 highest differences were found in phenolic compounds after 12 months of storage in bottle.
24 After storage, the VIN wines had a low content of free anthocyanins and were high in vinyl-
25 pyranoanthocyanins, and direct and ethyl-bridged adducts. Consequently, they showed a
26 bluer tone, less hue and higher color intensity. Thus, the VIN promoted color stabilization
27 reactions and, especially at high dose, preserved non-anthocyanin phenolic compounds better
28 than SO₂. Finally, the VIN guaranteed the stability and safety of the wines, as assessed by
29 determining the content of biogenic amines and enological microorganisms.

30

31 **Keywords:** stilbene, SO₂, quality wine, polyphenols, color, anthocyanins.

32 **1. Introduction**

33 Wine quality is defined by their sensory attributes, which are determined by the physical and
34 chemical characteristics of the wine. Since phenolic compounds are essential constituents of
35 wine and are responsible for important organoleptic characteristics such as color, astringency
36 and bitterness, they constitute an important quality parameter of red wine. In wine, they are
37 mainly composed of anthocyanins, including monomeric anthocyanins and their derivatives,
38 and non-anthocyanin phenolic compounds which include hydroxybenzoic and
39 hydroxycinnamic acids (and their derivatives), flavanols and flavonols. The color of young
40 red wine is mainly a result of the quantity and quality of monomeric anthocyanins, while
41 astringency and bitterness is related to flavanols and phenolic acids (He et al., 2012a, 2012b).
42 During maturation and wine aging, there is a progressive loss of phenolic compounds due to
43 their participation in a number of chemical reactions, such as degradation, oxidation,
44 precipitation with polysaccharides, condensation with tannins and the formation of other
45 stable anthocyanin-derived pigments. All these reactions can result in significant changes in
46 the color, mouth-feel and flavor properties of red wines (Fulcrand, Dueñas, Salas, &
47 Cheynier, 2006). Anthocyanins are transformed into oligomeric and polymeric pigments
48 through condensation reactions with flavanols, either directly or mediated by aldehydes.
49 Monomeric anthocyanins are also involved in other condensation reactions with pyruvic acid,
50 4-vinylphenols, hydroxycinnamic acids and acetaldehyde, among others, leading to the so-
51 called pyranoanthocyanins. They can help to preserve the color of red wine due to their
52 stability and resistance to oxidation (Fulcrand et al., 2006; Rentzsch, Schwarz, Winterhalter,
53 & Hermosín-Gutiérrez, 2007; Schwarz, Hofmann, & Winterhalter, 2004). In turn, polymeric
54 pigments, which play an important role in the overall color intensity of aged wines, have been
55 shown to be barely prone to discoloration, in this case produced by SO₂.

56 Although wine is considered to be a safe food product, there are a number of hazards
57 associated with the use of certain additives and with some microbial metabolites produced
58 during the winemaking process that must be kept rigorously under control. When present at
59 high concentrations, these compounds could have toxicological effects, causing health
60 problems in consumers, especially to sensitive persons. Therefore, the amount of microbial
61 metabolites in foods must be controlled for health reasons and to prevent any consequent
62 economic impact (Ordóñez, Troncoso, García-Parrilla, & Callejón, 2016). Biogenic amines
63 (BAs) and microorganisms play an important role in both the quality and safety of wine. High
64 BA intake may lead to a variety of human symptoms such as headache, blushing, itching,
65 skin irritation, impaired breathing, tachycardia, hypertension, hypotension and vomiting
66 (Guo, Yang, Peng, & Han, 2015). BA formation occurs mainly during malolactic
67 fermentation and can be affected by many factors including the degree of maturity,
68 maceration, alcohol content, microbial growth and populations, and the fermentation
69 conditions, including SO₂ (Guo et al., 2015).

70 SO₂ is the most important and widely used preservative in winemaking due to its known
71 antioxidant and antimicrobial properties. However, several human health risks, including
72 dermatitis, urticaria, angioedema, diarrhea, abdominal pain, bronchoconstriction and
73 anaphylaxis, have been associated with its presence in wines (reviewed by Guerrero &
74 Cantos-Villar, 2015). Consequently, there is a great deal of interest in finding alternatives to
75 SO₂ in winemaking. The use of phenolic compounds, for instance, has been proposed as a
76 promising alternative to SO₂. García-Ruiz and co-workers (García-Ruiz, Moreno-Arribas,
77 Martín-Álvarez, & Bartolomé, 2011) evaluated the antioxidant and antibacterial activity of 18
78 phenolic compounds mainly present in *Vitis vinifera L.* on different lactic acid bacteria
79 (LAB). They confirmed the potential use of phenolic compounds as preservatives in wine.

80 Furthermore, other authors have reported the use of phenolic extracts of different origins as
81 preservatives in red wines (Salaha, Kallithraka, Marmaras, Koussissi, & Tzourou, 2008).

82 Today's consumers demand high quality foods that are free from additives, fresh tasting,
83 microbiologically safe and with an extended shelf-life. With this in mind, researchers and the
84 wine industry are looking for natural alternatives to replace SO₂ without significantly
85 changing the quality and safety attributes of wine. In previous research, Vineatrol[®], an extract
86 from grapevine-shoot that is particularly rich in stilbenes, was tested as a preservative in red
87 wine (Raposo et al., 2016). Although promising results were achieved, several issues needed
88 further research: first, the optimal dose to avoid a loss of wine quality, while optimizing the
89 preservation of antioxidant properties mainly during storage in bottle; second, important
90 aspects in wine safety and quality; and finally, the differences observed in phenolic
91 compounds, mainly in anthocyanins.

92 The quality and safety of SO₂ free red wines elaborated with Vineatrol were studied at
93 bottling and after 12 months of storage in bottle. In the current study (Part I), besides
94 enological parameters such as quality parameters and chromatic measurements, special
95 attention has been given to polyphenolic compounds and biogenic amines.

96 **2. Material and methods**

97 **2.1. Chemicals**

98 Analytical grade methanol and acetic acid were supplied by Panreac (Barcelona, Spain).
99 HPLC-grade acetonitrile, NaOH and acetic acid were supplied by Merck (Darmstadt,
100 Germany). Diethylethoxymethylenmalonate (DEEMM), boric acid and acetaldehyde were
101 supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). The following chemical standards were
102 purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany): gallic, syringic, protocatechuic,
103 vanillic, *trans*-caffeic, ferulic acid, (+)-catechin, (-)-epicatechin, procyanidin B2, myricetin-
104 3-glucoside, myricetin-3-glucuronide, quercetin-3-*O*-glucuronide, quercetin-3-*O*-glucoside,

105 kaempferol-3-*O*-glucosyde, isorhamnetin-3-*O*-glucoside, quercetin, *trans*-resveratrol,
106 piceatannol, putrescine, histamine, tyramine, cadaverine, and phenylethylamine. ϵ -Viniferin,
107 ampelopsin A, r-viniferin, r2-viniferin, hopeaphenol, isohopeaphenol, pallidol and ω -
108 viniferin were kindly provided by the GESVAB (Groupe D'Étude des Substances Végétales à
109 Activité Biologique, University of Bordeaux II). Malvidin-3-*O*-glucoside was purchased
110 from Extrasynthese (Genay, France). Ultrapure water from a Milli-Q system (Millipore
111 Corp., Bedford, MA) was used throughout this research.

112 **2.2. Grapevine-shoot extract**

113 Vineatrol[®] was kindly provided by Actichem S.A. (Montauban, France), the developer and
114 producer this grapevine shoot extract. This extract contains considerable amounts of
115 stilbenoids: 5.66% *trans*-resveratrol, 13.25% ϵ -viniferin, 3.76% ampelopsin A, 1.44% r-
116 viniferin, 1.22% hopheaphenol, 1.07% ω -viniferin, 1.04% pallidol, 0.97% piceatannol, 0.78%
117 isohopeaphenol and 0.30% r2-viniferin. The total stilbene richness of Vineatrol was 29.5%.
118 Since Vineatrol has low solubility in aqueous media, it was dissolved in wine alcohol (96%)
119 before adding it to the wine.

120 **2.3. Winemaking**

121 Syrah grapes (482 kg) were harvested, destemmed and crushed, and then placed into a
122 Ganimede fermenter (Ganimede[®]). Previous results described few differences when
123 Vineatrol was used in the Ganimede system compared with the traditional one (Raposo et al.
124 2016). In the sulfite free must, alcoholic fermentation (AF) was started after adding yeast (20
125 g/hL, ES488, Sepsa-Enartis, Spain). After AF, malolactic fermentation was induced with
126 *Oenococcus oeni* (1 g/hL, Challenge Easy ML, Sepsa-Enartis, Spain) and nutrients (20 g/hL
127 Nutriferm ML, Sepsa-Enartis, Spain). Once the malolactic fermentation had finished, the
128 wine was divided into three batches, each one in triplicate, as follows: in the first batch, SO₂
129 (Sulfosol, Sepsa-Enartis) was added at 50 mg/L (CT), and in the other two, different amounts

130 of Vineatrol were added: VIN-50 when 50 mg/L of the total stilbene content was added,
131 which meant 175 mg/L of Vineatrol (29% richness in stilbenes and 99% solubility), and VIN-
132 100 when 100 mg/L of the total stilbene content was added, which meant 430 mg/L Vineatrol
133 (29% richness in stilbenes and 80% solubility). The wines were stabilized for 8 weeks at 0
134 °C, and then racked, filtered (Optical XL, Millipore, France) and bottled. A synthetic closer
135 made of a polymer material was chosen (Excellent cork SL, Valencia, Spain). Finally, the
136 bottled wines were stored under controlled conditions (16 °C and 80% RH) for 12 months. A
137 randomly-chosen wine bottle sample was analyzed at bottling and another after 12 months of
138 storage in bottle.

139 **2.4. Enological parameters**

140 Ethanol, glycerin, dry extract, total and volatile acidity, pH, organic acids (acetic, citric,
141 tartaric, malic, lactic, and succinic), potassium, total and free SO₂, acetaldehyde and methanol
142 were determined following the official analytical methods established by the International
143 Organization of Vine and Wine (OIV, 2014). The total anthocyanins, tannins and total
144 polyphenols index (TPI) were measured following the method described by (Saint-Cricq de
145 Gaulejac, Vivas, & Glories, 1998). All the above parameters were measured at bottling, and
146 only those which might evolve during ageing in bottle were measured again after 12 months
147 of storage in bottle (total and free SO₂, total stilbenes, acetaldehyde, total anthocyanins and
148 tannins).

149 **2.5. Chromatic measurements and free, co-pigmented and polymerized anthocyanins**

150 Color intensity (CI = D.O. 420 nm + D.O. 520 nm + D.O. 620 nm) and hue (D.O. 420
151 nm/D.O 520 nm) were determined by spectrophotometric measurements (Lambda 25, Perkin-
152 Elmer, Massachusetts). The colorimetric measurements were registered with a Konica-
153 Minolta CM-3600d spectrophotometer (Osaka, Japan), using 2 mm path length glass cells
154 and distilled water as a reference. The CIELab parameters L* (lightness), a* (redness), b*

155 (yellowness) were determined using the SpectraMagic v.3.61G software (Cyberchrome Inc,
156 Minolta Co. Ltd), following the recommendations of the Commission Internationale de
157 L'Eclairage (CIE). The standard observer (D10°) and the standard illuminant (D65) were
158 used. Color differences (ΔE^*_{ab}) were calculated as the Euclidean distance between two points
159 in the 3D space defined by L^* , a^* , and b^* (Martínez, Melgosa, Pérez, Hita, & Negueruela,
160 2001).

161 Free anthocyanins (FA), co-pigmented anthocyanins (CA), and polymeric pigments (PP)
162 color fractions were determined following the method proposed by Boulton (1996). The
163 wines were previously centrifuged and the pH adjusted to 3.60. Data from UV–Vis analysis
164 were expressed as absorbance units (AU) with 10 mm path length and corrected by dilution,
165 according to Bolton's protocol.

166 **2.6. Analysis of phenolic compounds by HPLC**

167 The analysis of the phenolic compounds was carried out by RP–HPLC/DAD. The wine was
168 filtered at 0.22 μm and directly injected (20 μL) into a Jasco apparatus (Tokyo, Japan)
169 equipped with a binary gradient pump (PU 1580), a Rheodyne valve (Cotati, CA), a
170 photodiode detector (PU MD 910), a fluorescence detector (PU FP 2020 Plus) and an oven
171 (model 7981, Jones Chromatography, Hengoed Mid Glamorgan, UK). The column was a
172 Phenomenex (Torrance, USA) Synergy Hydro-RP 80A 25 cm x 3.0 mm ID.

173 The anthocyanin phenolic compounds were measured in the wines following the method
174 described by Chinnici, Sonni, Natali, Galassi, & Riponi (2009). The elution solvents for
175 anthocyanin analysis were 10% formic acid in HPLC grade water (solvent A) and 10%
176 formic acid, 45% CH_3CN , 45% HPLC grade water (solvent B) with a flow of 0.47 mL/min.
177 Quantification was performed at 525 nm for monomeric anthocyanins, 490 nm for B-type
178 vitisins, 505 for A-type vitisins and vinyl-pyranoanthocyanins and 545 nm for direct and

179 ethyl-bridged adducts. The concentration of each compound was expressed as malvidin-3-
180 glucoside equivalents (mg/L).

181 The non-anthocyanin phenolic compounds were measured in the wines following the method
182 described by Chinnici, Natali, Bellachioma, Versari, & Riponi (2015). The elution solvents
183 were 2% acetic acid in HPLC grade water (solvent A) and 2% acetic acid, 98% CH₃CN,
184 (solvent B). The gradient elution was as follows: initial flow 95% A for 15 min, 90% A for
185 25 min, 82% A for 32 min, 80% A for 37 min, 70% A for 42 min; 50% A for 47 min; 0% A
186 for 49 min. The column temperature was 30 °C with a flow of 0.5 mL/min. Detection and
187 quantification were carried out as follows: at 280 nm for gallic acid and syringic acid, at 256
188 nm for protocatechuic acid and vanillic acid, at 308 nm for *trans-p*-coumaric acid and *trans-*
189 *p*-couteric acid, at 324 nm for *trans*-caffeic acid, *trans*-caftaric acid, ferulic acid GRP, at 365
190 nm for flavonols. Caffeic acid and coumaric derivatives were quantified as caffeic and
191 coumaric acid equivalents respectively. The other compounds were quantified with their
192 respective standards. Flavanols were quantified by fluorescence at an excitation wavelength
193 of 280 nm and an emission wavelength of 315 nm.

194 **2.7. Analysis of stilbenes by HPLC**

195 The stilbenes were measured in the wines by HPLC following the method described by
196 Guerrero, Puertas, Jiménez, Cacho, & Cantos-Villar (2010). The samples (20 µL) (wine and
197 Vineatrol) were analyzed by using a Waters HPLC system with a model 1525 pump and a
198 Waters 996 Photodiode Array Detector. Separations were performed on a Mediterranea
199 Sea18 column (Tecknokroma, Barcelona, Spain) (RP-C18, 25×0.46 cm; 5 µm particle size)
200 and a guard column of the same material, at 30 °C. The mobile phases consisted of a
201 water:methanol:acetic acid mixture, solvent A 88:10:2 and solvent B 8:90:2 at a flow rate of 1
202 mL/min. Peaks were identified by comparing their retention time and UV-Vis spectra with
203 standard compounds. Quantification was carried out at 280 nm for ampelopsin A,

204 isohopheaphenol, hopeaphenol, pallidol as ampelopsin A; *trans*-resveratrol was determined at
205 306 nm with its standard; piceatannol, r2-viniferin, ϵ -viniferin, r-viniferin and ω -viniferin
206 were quantified at 320 nm as ϵ -viniferin. Concentrations were expressed as mg/L.

207 **2.8. Analysis of biogenic amines**

208 Biogenic amines were determined following a method described by Cejudo-Bastante et al.,
209 (2010) with minor modifications. A 1.75 mL of borate buffer (1 mol/L, pH=9), 750 μ L of
210 methanol and 1 mL of sample were mixed. Next, 20 μ L of DEEMM were added. The
211 reaction was conducted for 30 min in an ultrasound bath and left overnight at 20 °C. Then,
212 samples were filtered with cellulose filters and injected (20 μ L) into the HPLC apparatus
213 already described at section 2.6. Separations were performed on a Waters (Milford, MA,
214 USA) reversed-phase column Nova-Pak® C18 (3.9 \times 300 mm; 4 μ m particle) at 40 °C. The
215 compositions of the mobile phases were as follows: phase A, 25 mmol/L acetate buffer
216 pH=5.65, and phase B, 80:20 acetonitrile:methanol. The flow rate was 1.1 mL/min.
217 Quantification was performed at 280 nm by means of calibration curves carried out for each
218 standard.

219 **2.9. Enumeration of yeast and bacteria**

220 The enumeration of viable yeasts and acetic bacteria were determined in the musts, the wines
221 during their production and after bottling by counting colony growth on a solid medium after
222 suitable incubation (OIV, 2014). The culture medium for yeasts was Malt Extract Agar
223 (MEA, Cultimed) and Wallerstein Differential Agar for acetic acid bacteria (WL differential,
224 Sigma-Aldrich). The plates were incubated at 30 °C for 2-5 days. The results were expressed
225 as CFU/mL (colony-forming unit/mL).

226 **2.10. Statistics**

227 Ethanol, glycerin, dry extract, total and volatile acidity, pH, organic acids, potassium, total
228 and free SO₂, total stilbenes, acetaldehyde and methanol were analyzed by means of a one-

229 way analysis of variance (ANOVA, $p < 0.05$). Color related parameters, co-pigmentation,
230 phenolic compounds and biogenic amines were analyzed by a two-way ANOVA ($p < 0.05$),
231 but in the case not detected compounds, in which one-way analysis of variance was applied.
232 Fischer's LSD tests ($p < 0.05$) were used as comparison tests when samples were
233 significantly different after the ANOVA. Principal components analysis (PCA) was used for
234 the data analysis. Statistix version 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA) and
235 Statgraphics Centurion XVI (STSC Inc., Rockville, MD, USA) were used.

236 **3. Results and discussion**

237 **3.1. Enological parameters**

238 The enological parameters of the wines are shown in Table 1. At bottling, no significant
239 differences were found in glycerin, pH, volatile acidity, acetic acid, citric acid, tartaric acid,
240 malic acid, lactic acid, succinic acid, potassium, acetaldehyde and methanol. Ethanol was
241 significantly higher in the VIN-treated wines due to the low solubility of VIN. It was
242 necessary to dissolve it in wine alcohol before adding it to the wine. The VIN wines at high
243 doses (VIN-100) had the highest dry extract, which could be due to the addition of VIN (solid
244 powder). The total acidity was slightly lower in the CT wines. As expected, only the CT
245 wines contained significant concentrations of total and free sulfur dioxide, while stilbenes
246 were mainly detected in the VIN wines. The VIN wines showed lower total anthocyanins and
247 higher tannin contents. This is in agreement with previous results obtained in our laboratory,
248 where a low dose of VIN also decreased anthocyanin content (Raposo et al., 2016). Due to
249 the importance of anthocyanins and tannins in the quality of wine, further studies on
250 individual phenolic compounds and anthocyanin forms have been developed in the current
251 work. They are shown below.

252 After 12 months of storage in bottle, and apart from preservatives (SO_2 or total stilbenes),
253 only differences in total anthocyanins and tannins were observed among wines (Table 1, 12

254 months). Total anthocyanins, tannins and acetaldehyde considerably decreased with regard to at
255 bottling, which could be partly due to pyranoanthocyanin formation and direct condensation
256 products (Boido, Alcalde-Eon, Carrau, Dellacassa, & Rivas-Gonzalo, 2006; Fulcrand et al.,
257 2006). The decrease was proportional in all wines, independent of the preservative used,
258 maintaining the differences found at bottling, except for tannins. The decrease in tannins was
259 slightly higher in the VIN-50 wines. Regarding preservatives, the concentration of SO₂ in the
260 CT wines decreased by about 62% on average, in agreement with Waterhouse et al., (2016)
261 and Ugliano et al., (2012), while VIN treated wines showed a limited loss of preservative
262 (19% lost on average).

263 Due to the importance of anthocyanins and tannins in the quality of wine, further studies on
264 individual phenolic compounds and anthocyanin forms were developed in the current work.

265 **3.2. Chromatic measurements and free, co-pigmented and polymerized anthocyanins**

266 Sample chromatic parameters (CT, VIN-50 and VIN-100) were analyzed at bottling and after
267 12 months of storage in bottle. The data were subjected to a two-way ANOVA statistical
268 treatment (Table 2) in order to highlight the separate effects of treatments and storage,
269 together with their possible interactions.

270 Regarding the *treatment* variable, the CT wines showed a lower color intensity (CI) and b*,
271 while showing a higher hue, yellow (%Y) and luminosity (L*) than the VIN wines.
272 Interestingly, no differences were found between the VIN treated wines (VIN-50, VIN-100).

273 To deepen on the mechanisms involved in these observations, the contribution of free
274 anthocyanins (FA), co-pigmented anthocyanins (CA) and polymeric pigments (PP) to the
275 total wine color were determined (Table 2). The CT and VIN wines showed a higher
276 proportion of CA and PP, respectively. In the CT wines, SO₂ may have reacted with several
277 wine constituents such as acetaldehyde, pyruvic acid, anthocyanins or cinnamic compounds.
278 Hence, those reactions may have reduced the rate of polymerization reactions (He et al.,

279 2012b; Jackowetz & Mira de Orduña, 2013; Morata, Gómez-Cordovés, Calderón, & Suárez,
280 2006).

281 Regarding the *storage* variable, a stronger influence on color parameters than *treatment* was
282 observed. After 12 months of storage in bottle, CI, %R, L*, a*, FA and CA decreased, while
283 hue, %Y, %B, b* and PP increased, in agreement with results found in wine ageing by
284 several authors (Boido et al., 2006; García-Puente Rivas, Alcalde-Eon, Santos-Buelga, Rivas-
285 Gonzalo, & Escribano-Bailón, 2006; Hermosín-Gutiérrez, Lorenzo, & Espinosa, 2005).

286 The interaction *treatment x storage* (TxS) was significant in all parameters except %B and
287 CA (Table 2). It means that the evolution during storage in bottle was different depending on
288 the treatment in all the parameters with significant differences. The most remarkable
289 differences during this evolution between the CT and VIN wines were found in the CI, L* and
290 b* parameters (Supplementary Table). CI increased in the CT wines but decreased in the VIN
291 wines during storage time; The CT wines showed a decrease in L* whereas no changes were
292 seen in the VIN wines; and, increases in b* were observed in both the CT and VIN wines,
293 this increase being much greater in the former. The VIN wines showed the largest increase in
294 PP (approximately, 28% higher) and decrease in FA (approximately 17% lower) with regard
295 to at bottling, in contrast with the CT wines, in which the PP increased by 18% and FA
296 remained constant with regard to its initial values at bottling.

297 The colorimetric differences (ΔE^*) calculated for every pair of wines (VIN wines vs CT),
298 ranged from 7 to 10 CIELAB units (Table 2). These colorimetric differences can be
299 considered to be visually detectable because these values are higher than the estimation of 3.0
300 CIELAB units (Martinez et al., 2001).

301 It can be concluded that VIN was able to stabilize wine color. VIN contributed to maintaining
302 higher color intensities and darker hue throughout bottling storage, apparently promoting a
303 faster and more pronounced polymerization between free anthocyanins (which promptly

304 decreased) and other wine constituents. The nature of some of those condensed pigments is
305 discussed below in the current manuscript.

306 **3.3. Phenolic compounds**

307 *3.3.1. Anthocyanins and anthocyanins-derived pigments*

308 Following the method developed by Chinnici et al., (2009), twenty eight anthocyanin
309 derivatives were identified in wines as follows (Table 3): delphinidin-3-*O*-glucoside,
310 cyanidin-3-*O*-glucoside, petunidin-3-*O*-glucoside, peonidin-3-*O*-glucoside, malvidin-3-*O*-
311 glucoside, delphinidin-3-*O*-acetylglucoside, cyanidin-3-*O*-acetylglucoside, petunidin-3-*O*-
312 acetylglucoside, peonidin-3-*O*-acetylglucoside, malvidin-3-*O*-acetylglucoside, delphinidin-3-
313 *O*-coumaroylglucoside, cyanidin-3-*O*-coumaroylglucoside, malvidin-3-*O*-caffeoylglucoside,
314 petunidin-3-*O*-coumaroylglucoside, peonidin-3-*O*-coumaroylglucoside, malvidin-3-*O*-
315 coumaroylglucoside, malvidin-3-*O*-glucoside-pyruvic acid, malvidin-3-*O*-acetylglucoside-
316 pyruvic acid, malvidin-3-*O*-coumaroylglucoside-pyruvic acid, petunidin-3-*O*-glucoside-
317 pyruvic acid, malvidin-3-*O*-glucoside-acetaldehyde, malvidin-3-*O*-acetylglucoside-
318 acetaldehyde, malvidin-3-*O*-glucoside-4-vinylcatechol, malvidin-3-*O*-glucoside-4-
319 vinylphenol, malvidin-3-*O*-glucoside-4-vinyl(epi)catechin, malvidin-3-*O*-glucoside-
320 (epi)catechin, malvidin-3-*O*-glucoside-ethyl-(epi)catechin (2 isomers). All the above
321 compounds were grouped into three categories (Table 3, bottom side): (i) monomeric
322 anthocyanins, including glucosides, acetylglucosides, coumaroylglucosides and
323 caffeoylglucosides; (ii) pyranoanthocyanins, which included A-type vitisins, B-type vitisins
324 and vinyl-pyranoanthocyanins; (iii) direct and ethyl bridge adducts.

325 Regarding the *treatment* variable, the CT wines showed the highest total anthocyanin
326 concentration, mainly due to the higher differences in the concentration of monomeric
327 anthocyanins. Anthocyanin glucosides, acetylglucosides and cinnamoylglucosides were 1.5-
328 fold higher in the CT wines. Free anthocyanins have been described to bind with SO₂, which

329 inhibits further polymerization (Picinelli, Bakker, & Bridle, 1994). In contrast, the
330 pyranoanthocyanins category was found in lower percentages in the CT wines, in particular
331 B-type vitisins and vinyl-pyranoanthocyanins. This may be explained by the lower amount of
332 acetaldehyde likely to be available in the CT wines, since SO₂ is known to bind with
333 acetaldehyde (Jackowetz & Mira de Orduña, 2013). In contrast, A-type vitisins were lower in
334 the VIN wines. The pyruvic acid reaction with malvidin-3-*O*-glucoside is less favorable than
335 these with acetaldehyde (Morata et al., 2006), affecting SO₂ to a lesser extent.

336 It has been reported that the chemical pathway for the formation of pyranoanthocyanins is
337 likely to start with cycloaddition of either yeast metabolites such as pyruvic acid or
338 acetaldehyde, or yeast components such as 8-vinylflavanols, 4-vinylphenols and caffeic acid
339 to the C-4 and 5-OH positions of anthocyanins (De Freitas & Mateus, 2011; Fulcrand et al.,
340 2006; Schwarz et al., 2004). The SO₂ blocks the C4 position in the C ring of the anthocyanins
341 in the flavilium cation, preventing their formation (He et al., 2012a). The reduced amount of
342 malvidin-3-*O*-glucoside-4-vinylcatechol, also called Pinotin A, in the CT wines may be
343 justified by a lower caffeic acid/malvidin-3-*O*-glucoside ratio (lower caffeic acid, Table 4)
344 and higher malvidin-3-*O*-glucoside (Rentsch et al., 2007; Schwarz et al., 2004). The higher
345 stability of the pyranoanthocyanins compared to the anthocyanins monoglucosides is well
346 known (García-Puente Rivas et al., 2006; He et al., 2012b). The fact that the VIN wines
347 showed a higher concentration of these compounds supported the color stability found in VIN
348 wines, in agreement with the observations described in Section 3.2.

349 Regarding the *storage* variable, after 12 months of storage in bottle, the wines showed a
350 decrease in their total anthocyanin content, mainly due to anthocyanin-3-*O*-glucosides,
351 anthocyanin-3-*O*-acetylglucosides and anthocyanin-3-*O*-cinnamoylglucosides (Alcalde-Eon,
352 Escribano-Bailón, Santos-Buelga, & Rivas-Gonzalo, 2006; Boido et al., 2006; Monagas,
353 Gómez-Cordovés, & Bartolomé, 2005). The concentrations of A-type vitisins remained

354 constant while the vinyl-pyranoanthocyanins and direct and ethyl-bridged adducts contents
355 increased, in agreement with other authors (Alcalde-Eon et al., 2006; Asenstorfer, Markides,
356 Iland, & Jones, 2003; Monagas et al., 2005b; Rentzsch et al., 2007).

357 During wine aging in bottle, monomeric anthocyanins are gradually incorporated into derived
358 pigments such as pyranoanthocyanins (A-type vitisins, B-type vitisins and vinyl-
359 pyranoanthocyanins), which are highly stable, more resilient to pH change, resistant to SO₂
360 bleaching and oxidative degradation, thus making an important contribution to the color
361 stability of red wines (Håkansson, Pardon, Hayasaka, de Sa, & Herderich, 2003; He et al.,
362 2012b).

363 Regarding direct and ethyl-bridged adducts, although a slight increase was observed during
364 storage, their contribution to the total anthocyanin concentration remained low. The
365 contribution to the aged red wine color of this class of compounds is still unclear. In fact,
366 while some researchers indicate negligible effects (Alcalde-Eon et al., 2006; Boido et al.,
367 2006; Santos-Buelga & Freitas, 2009) others report a strong correlation between the
368 accumulation of ethyl-bridged adducts and color intensity in aged wines (Chinnici et al.,
369 2009; He et al., 2012b), supposedly related to their high molar extinction coefficients at pH>
370 3.5.

371 The interaction *treatment x storage* (TxS) was significant for the following compounds
372 (Supplementary Table): petunidin-3-*O*-acetylglucoside, malvidin-3-*O*-acetylglucoside,
373 peonidin-3-*O*-coumaroylglucoside, malvidin-3-*O*-glucoside-pyruvic acid, petunidin-3-*O*-
374 glucoside-pyruvic acid, malvidin-3-*O*-glucoside-4-vinylcatechol, malvidin-3-*O*-glucoside-4-
375 vinyl(epi)catechin and malvidin-3-*O*-glucoside(epi)catechin. Significant interactions were
376 also found for monomeric anthocyanins (%), pyranoanthocyanins (%) and direct and ethyl
377 bridged adducts (%). These data suggest that the evolution of all the above compounds during
378 *storage* was different depending on the *treatment*.

379 *3.3.2. Non-anthocyanin phenolic compounds*

380 Nineteen compounds, belonging to four families, were quantified in wines according to
381 Chinnici et al., (2009) as follows (Table 4): (i) hydroxybenzoic acids: gallic acid, syringic
382 acid, protocatechuic acid and vanillic acid; (ii) hydroxycinnamic acids: *trans-p*-coumaric
383 acid, *trans-p*-coumaric acid, *trans*-caffeic acid, *trans*-caftaric acid, ferulic acid and 2-*S*-
384 glutathionyl-caftaric acid (GRP); (iii) flavanols: (+)-catechin, (-)-epicatechin and procyanidin
385 B2; (iv) flavonols: myricetin-3-*O*-glucoside, myricetin-3-*O*-glucuronide, quercetin-3-*O*-
386 glucuronide, quercetin-3-*O*-glucoside, kaempferol-3-*O*-glucose, isorhamnetin-3-*O*-glucoside.

387 Regarding the *treatment* variable, hydroxybenzoic acids differentiated each treatment. The
388 content of hydroxybenzoic acids in the wines was as follows in decreasing order: VIN-100 >
389 VIN-50 > CT. In contrast, hydroxycinnamic acids and flavanols differentiated the treatments
390 into two groups: one group was CT and VIN-50, and the second group, VIN-100. We
391 hypothesized that VIN, especially at high doses, could protect the oxidation of these phenolic
392 compounds. No significant differences were found in flavonols among treatments.

393 Regarding the *storage* variable, after 12 months of storage in bottle, the total
394 hydroxycinnamic acids, total flavanols and flavonols contents in the wines decreased. These
395 decreases may be due to their involvement in oxidation and polymerization reactions
396 (Fulcrand et al., 2006; Hermosín-Gutiérrez et al., 2005; Monagas, Bartolomé, & Gómez-
397 Cordovés, 2005a). Increases in four compounds were observed with ageing. The gallic acid
398 content increased because it can be released from its galloylated precursor (Hermosín-
399 Gutiérrez et al., 2005). Hydroxycinnamic acids increased and their corresponding esters
400 decreased in agreement with findings described by other authors (Monagas et al., 2005a;
401 Zafrilla et al., 2003).

402 The interaction *treatment x storage* (TxS) was significant for all non-anthocyanin phenolic
403 compounds except (+)-catechin, myricetin-3-*O*-glucoside+myricetin-3-*O*-glucuronide and

404 kaempferol-3-*O*-glucoside (Supplementary Table). In fact, decreases in the total non-
405 anthocyanin phenolic content during the storage in bottle was observed to differ depending
406 on the wine: 24% in CT wines, 1% in VIN-50 wines, while in VIN-100 wines the initial
407 levels were preserved, which supports the hypothesis of the preservative properties of VIN.

408 **3.4. Biogenic amines and microbiological stability**

409 The main biogenic amines (BAs) associated with wine were determined: putrescine,
410 histamine, tyramine, cadaverine and phenylethylamine (Table 5).

411 Regarding *treatment* variable, no differences in total BAs content were found among wines
412 treated with different preservatives. Malolactic fermentation was common for all wines, and
413 no spoilage signs were observed, so the main factors concerning the concentration of BAs
414 were under control (Guo et al., 2015; Marcobal, Martín-Álvarez, Polo, Muñoz, & Moreno-
415 Arribas, 2006). The BA data were in the range of those described for red wines (Smit, Du
416 Toit, & Du Toit, 2008). Cadaverine and phenylethylamine concentrations were lower than
417 those described for wines elaborated in different Spanish regions (Landete, Ferrer, Polo, &
418 Pardo, 2005; Marcobal et al., 2006).

419 Regarding *storage* variable, an increase in concentrations of histamine and tyramine were
420 observed in the wines after 12 months of storage in bottle, which is in accordance with
421 González Marco & Ancín-Azpilicueta, (2006). Putrescine, cadaverine and phenylethylamine
422 remained constant during storage in bottle (Landete et al., 2005). No significant interaction
423 treatment x storage (TxS) was observed for any BAs.

424 In order to investigate the microbiological stability of the wines, yeast and acetic acid
425 bacteria counts were performed after the addition of the preservative and at bottling.
426 Differences were found only after the addition of the preservative (data not shown). At this
427 stage, the CT wines showed 3.8×10^3 CFU/mL of yeast, 60 times higher in the VIN-50 wines
428 and 40 times higher in the VIN-100 wines. This contrasted with acetic acid bacteria which

429 presented lower amounts in the VIN-100 than in the CT and VIN-50 wines. In fact, stilbenes
430 have been described to inhibit several lactic and acid bacteria (García-Ruiz, Bartolomé,
431 Cueva, Martín-Álvarez, & Moreno-Arribas, 2009). The above differences disappeared after
432 filtration before bottling. At that stage any yeast and/or acetic acid bacteria was detected.

433 We can conclude that the wines can be considered microbiologically stable and safe,
434 regardless of the preservative used.

435 **3.5. Multivariate statistical analysis**

436 The Principal Component Analysis (PCA) explained differences in the whole dataset. Two
437 principal components (PCs) were selected according to the percentage of total variance
438 explained. The two first components explained 83.9% of the total variance (Figure 1). The
439 first PC (PC1, which explains 62.1% of the total variance) was mainly positively correlated
440 with a*, %R, monomeric anthocyanins (anthocyanins-3-*O*-glucoside, anthocyanins-3-*O*-
441 acetylglucoside, anthocyanins-3-*O*-cinnamoylglucoside), malvidin-3-*O*-coumaroylglucoside-
442 pyruvic acid, malvidin-3-*O*-glucoside-ethyl-(epi)catechin isomer2, total anthocyanins, (-)-
443 epicatechin and total flavanols (data not shown). It was negatively correlated with %PP,
444 malvidin-3-*O*-glucoside(epi)catechin, malvidin-3-*O*-glucoside-ethyl-(epi)catechin
445 isomer1, vinyl-pyranoanthocyanins, *trans-p*-coumaric acid, histamine and tyramine. The
446 second PC (PC2, which explains 21.8% of the total variance) was positively correlated with
447 L*, cyanidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-coumaroylglucoside, A-type vitisins and direct
448 and ethyl-bridged adducts; It was negatively correlated with b*, CI, total B-type vitisins,
449 gallic acid, syringic acid, protocatechuic acid, total hydroxybenzoic acids, ferulic acid, total
450 hydroxycinnamic acids and procyanidin B2 (data not shown).

451 The score plot generated for the PCA model of the entire data set shows that wines can be
452 grouped according to both the treatment and the stage of the process (Figure 1). PC1
453 discriminated between two different storage stages: bottling and 12 months of storage;

454 therefore, positive values of PC1 correspond to the wines after bottling while the samples
455 stored for 12 months in bottle showed negative values for the first component. For the same
456 storage time, PC2 explains the difference within the treatments: positive values of PC2
457 correspond to CT wines while negative values mark all the VIN treated wines. Of note is that
458 the separation between VIN50 and VIN 100 appeared after 12 months of storage.

459 **4. Conclusions**

460 The VIN treated wines showed similar quality parameters to the SO₂ treated wines, but
461 higher color intensity and polymeric pigments were observed. Differences were also found in
462 their phenolic composition, especially in their anthocyanin profile. The VIN wines showed
463 lower monomeric anthocyanin concentrations but higher B-type vitisins and vinyl-
464 pyranoanthocyanins. The latter two are highly stable color compounds resistant to oxidation.
465 Moreover, a higher hydroxybenzoic concentration was also observed in the VIN wines. The
466 VIN-100 wines were the richest in hydroxycinnamic acids and flavanols. No differences were
467 found among the wines in the safety parameters studied (biogenic amines, yeast and acetic
468 acid bacteria) or the flavonol compounds.

469 After 12 months of storage in bottle, color features, pigments and phenolic compounds
470 evolved as would be expected in red wines. However, the extent of this evolution varied
471 between samples depending on both the preservative used (VIN or SO₂) and the dose (VIN-
472 50 or VIN-100). Anthocyanin compounds evolved to a major extent in the VIN wines, which
473 were low in free anthocyanins and high in vinyl-pyranoanthocyanins, and direct and ethyl-
474 bridged adducts. As a consequence, the VIN wines showed a bluer, less red color and higher
475 color intensity. Therefore, it seems that Vineatrol promotes color stabilization reactions and
476 non-anthocyanin phenolic compound preservation.

477 In conclusion, the present study demonstrates that the use of a grapevine-shoot extract with
478 30% stilbenes (Vineatrol[®]) as a preservative is able to guarantee safety and stability in red

479 wines with good chromatic parameters and phenolic profile. Although no significant
480 differences were observed between the wines treated with Vineatrol at different doses at
481 bottling, after 12 months storage the presence of 100 mg/L of stilbenes contributed to
482 preserving better the phenolic acids and flavanols of red wines. This could be also due to the
483 low loss of VIN during storage in bottle (19%), in contrast with that observed for SO₂ (62%).
484 Further research focusing on sensory aspects has been also performed. The effect of Vineatrol
485 on the aroma and sensory analysis of red wine is described in Part II of the current study.

486

487 **Acknowledgements**

488 The authors thank INIA and FEDER for their financial support (Projects RTA2011-00002
489 and AVA.AVA201601.3). The authors are grateful to Jean-Claude Izard (Actichem) for
490 kindly supplying Vineatrol[®] and to GESVAB for kindly supplying stilbene standards. Ruiz-
491 Moreno and Guerrero thank the European Social Fund (ESF) 2007-2013 “*Andalucía se
492 mueve con Europa*” for the financial support of their contracts.

493

494 **References**

- 495 Alcalde-Eon, C., Escribano-Bailón, M. T., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2006).
496 Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing: a
497 comprehensive study. *Analytica Chimica Acta*, *563*(1), 238–254.
- 498 Asenstorfer, R. E., Markides, A. J., Iland, P. G., & Jones, G. P. (2003). Formation of vitisin A
499 during red wine fermentation and maturation. *Australian Journal of Grape and Wine
500 Research*, *9*(1), 40–46.
- 501 Boido, E., Alcalde-Eon, C., Carrau, F., Dellacassa, E., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2006). Aging
502 effect on the pigment composition and color of *Vitis vinifera* L. cv. Tannat wines.
503 Contribution of the main pigment families to wine color. *Journal of Agricultural and*

504 *Food Chemistry*, 54(18), 6692–6704.

505 Boulton, R. B. (1996). A method for the assessment of copigmentation in red wines. In *47th*
506 *annual meeting of the American Society for Enology and Viticulture, Reno, NV*.

507 Cejudo-Bastante, M. J., Sonni, F., Chinnici, F., Versari, A., Perez-Coello, M. S., & Riponi, C.
508 (2010). Fermentation of sulphite-free white musts with added lysozyme and oenological
509 tannins: Nitrogen consumption and biogenic amines composition of final wines. *LWT -*
510 *Food Science and Technology*, 43(10), 1501–1507.

511 Chinnici, F., Natali, N., Bellachioma, A., Versari, A., & Riponi, C. (2015). Changes in
512 phenolic composition of red wines aged in cherry wood. *LWT - Food Science and*
513 *Technology*, 60(2, Part 1), 977–984.

514 Chinnici, F., Sonni, F., Natali, N., Galassi, S., & Riponi, C. (2009). Colour features and
515 pigment composition of Italian carbonic macerated red wines. *Food Chemistry*, 113(2),
516 651–657.

517 De Freitas, V., & Mateus, N. (2011). Formation of pyranoanthocyanins in red wines: a new
518 and diverse class of anthocyanin derivatives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*,
519 401(5), 1463–1473.

520 Fulcrand, H., Dueñas, M., Salas, E., & Cheynier, V. (2006). Phenolic reactions during
521 winemaking and aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 289–297.

522 García-Puente Rivas, E., Alcalde-Eon, C., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C., &
523 Escribano-Bailón, M. T. (2006). Behaviour and characterisation of the colour during red
524 wine making and maturation. In *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2), 215-222.

525 García-Ruiz, A., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., & Bartolomé, B. (2011).
526 Comparative study of the inhibitory effects of wine polyphenols on the growth of
527 enological lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 145(2–3),
528 426–431.

529 García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Cueva, C., Martín-Álvarez, P. J., & Moreno-Arribas, M. V.
530 (2009). Inactivation of oenological lactic acid bacteria (*Lactobacillus hilgardii* and
531 *Pediococcus pentosaceus*) by wine phenolic compounds. *Journal of Applied*
532 *Microbiology*, *107*(3), 1042–1053.

533 González-Marco, A., & Ancín-Azpilicueta, C. (2006). Amine concentrations in wine stored
534 in bottles at different temperatures. *Food Chemistry*, *99*(4), 680–685.

535 Guerrero, R. F., & Cantos-Villar, E. (2015). Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide
536 replacements in wine: a parameter review. *Trends in Food Science & Technology*, *42*(1),
537 27–43.

538 Guerrero, R. F., Puertas, B., Jiménez, M. J., Cacho, J., & Cantos-Villar, E. (2010).
539 Monitoring the process to obtain red wine enriched in resveratrol and piceatannol
540 without quality loss. *Food Chemistry*, *122*(1), 195–202.

541 Guo, Y. Y., Yang, Y. P., Peng, Q., & Han, Y. (2015). Biogenic amines in wine: a review.
542 *International Journal of Food Science and Technology*, *50*(7), 1523–1532.

543 Håkansson, A. E., Pardon, K., Hayasaka, Y., de Sa, M., & Herderich, M. (2003). Structures
544 and colour properties of new red wine pigments. *Tetrahedron Letters*, *44*(26), 4887-
545 4891.

546 He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C.-Q. (2012a).
547 Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color
548 expression. *Molecules*, *17*(2), 1571–1601.

549 He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C.-Q. (2012b).
550 Anthocyanins and their variation in red wines II. Anthocyanin derived pigments and
551 their color evolution. *Molecules*, *17*(2), 1483–1519.

552 Hermosín-Gutiérrez, I., Lorenzo, E. S.-P., & Espinosa, A. V. (2005). Phenolic composition
553 and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the

554 cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chemistry*, 92(2), 269–283.

555 Jackowetz, J. N., & Mira de Orduña, R. (2013). Survey of SO₂ binding carbonyls in 237 red
556 and white table wines. *Food Control*, 32(2), 687–692.

557 Landete, J. M., Ferrer, S., Polo, L., & Pardo, I. (2005). Biogenic amines in wines from three
558 spanish regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 1119–1124.

559 Marcobal, A., Martín-Álvarez, P. J., Polo, M. C., Muñoz, R., & Moreno-Arribas, M. V.
560 (2006). Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red
561 wine. *Journal of Food Protection*, 69(2), 397–404.

562 Martínez, J. A., Melgosa, M., Pérez, M. M., Hita, E., & Negueruela, A. I. (2001). Note.
563 Visual and instrumental color evaluation in red wines. *Food Science and Technology*
564 *International*, 7(5), 439–444.

565 Monagas, M., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2005a). Evolution of polyphenols in
566 red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle: II. Non-anthocyanins
567 phenolic compounds. *European Food Research and Technology*, 220(3), 331–340.

568 Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2005b). Evolution of polyphenols in
569 red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle: I. Anthocyanins and
570 pyranoanthocyanins. *European Food Research and Technology*, 220(5–6), 607–614.

571 Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Calderón, F., & Suárez, J. A. (2006). Effects of pH,
572 temperature and SO₂ on the formation of pyranoanthocyanins during red wine
573 fermentation with two species of *Saccharomyces*. *International Journal of Food*
574 *Microbiology*, 106(2), 123–129.

575 OIV (2014) Compendium of international methods of wine and must analysis. International
576 Organisation of wine and wine , Paris

577 Ordóñez, J. L., Troncoso, A. M., García-Parrilla, M. D. C., & Callejón, R. M. (2016). Recent
578 trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages – A review.

579 *Analytica Chimica Acta*. 939, 10-26

580 Picinelli, A., Bakker, J., & Bridle, P. (1994). Model wine solutions: effect of sulphur dioxide
581 on colour and composition during ageing. *Vitis*, 33(1), 31–35.

582 Raposo, R., Ruiz-Moreno, M. J., Garde-Cerdán, T., Puertas, B., Moreno-Rojas, J. M.,
583 Gonzalo-Diago, A., Guerrero, R.F., Ortiz, V., & Cantos-Villar, E. (2016). Grapevine-
584 shoot stilbene extract as a preservative in red wine. *Food Chemistry*, 197, Part, 1102–
585 1111.

586 Rentzsch, M., Schwarz, M., Winterhalter, P., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). Formation of
587 hydroxyphenyl-pyranoanthocyanins in Grenache wines: Precursor levels and evolution
588 during aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4883–4888.

589 Saint-Cricq de Gaulejac, N., Vivas, N., & Glories, Y. (1998). Maturité phénolique: définition
590 et contrôle. *Revue Française d’Oenologie*, (173), 22–25.

591 Salaha, M.-I., Kallithraka, S., Marmaras, I., Koussissi, E., & Tzourou, I. (2008). A natural
592 alternative to sulphur dioxide for red wine production: influence on colour, antioxidant
593 activity and anthocyanin content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8),
594 660–666.

595 Santos-Buelga, C., & Freitas, V. de. (2009). Influence of phenolics on wine organoleptic
596 properties. In M. V. Moreno-Arribas & M. C. Polo (Eds.), *Wine Chemistry and*
597 *Biochemistry* (pp. 529–570). inbook, New York, NY: Springer New York.

598 Schwarz, M., Hofmann, G., & Winterhalter, P. (2004). Investigations on anthocyanins in
599 wines from *Vitis vinifera* cv. Pinotage: factors influencing the formation of Pinotin A
600 and its correlation with wine age. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3),
601 498–504.

602 Smit, A. Y., Du Toit, W. J., & Du Toit, M. (2008). Biogenic amines in wine: understanding
603 the headache. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 29(2).

604 Ugliano, M., Dieval, J. B., Siebert, T. E., Kwiatkowski, M., Aagaard, O., Vidal, S., & Waters,
605 E. J. (2012). Oxygen consumption and development of volatile sulfur compounds during
606 bottle aging of two Shiraz wines. Influence of pre- and postbottling controlled oxygen
607 exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(35), 8561–8570.

608 Waterhouse, A. L., Frost, S., Ugliano, M., Cantu, A. R., Currie, B. L., Anderson, M., Chassy,
609 Alexander, W., Vidal, S., Diéval, J.-B., Aagaard, O., & Heymann, H. (2016). Sulfur
610 dioxide – oxygen consumption ratio reveals differences in bottled wine oxidation.
611 *American Journal of Enology and Viticulture*. *67*(4): 449-459.

612 Zafrilla, P., Morillas, J., Mulero, J., Cayuela, J. M., Martínez-Cachó, A., Pardo, F., & López
613 Nicolás, J. M. (2003). Changes during storage in conventional and ecological wine:
614 Phenolic content and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,
615 *51*(16), 4694–4700.

616 **FIGURE CAPTIONS**

617 **Figure 1.** Principal component analysis (PCA) for data set of Syrah wines. Symbols:

618 ● CT ☒ VIN-50 ◆ VIN-100. * indicates samples after 12 months of storage in bottle

619 **TABLES**

620 **Table 1.** Enological parameters in Syrah wines as affected by treatments (CT, VIN-50 and
621 VIN-100) and storage in bottle (bottling and 12 months).

622 **Table 2.** Chromatic features in Syrah wines as affected by treatments (CT, VIN-50 and VIN-
623 100) and storage in bottle (bottling and 12 months).

624 **Table 3.** Anthocyanin content (mg/L) in Syrah wines as affected by treatments (CT, VIN-50
625 and VIN-100) and storage in bottle (bottling and 12 months).

626 **Table 4.** Non-anthocyanin phenolic compounds (mg/L) in Syrah wines as affected by
627 treatments (CT, VIN-50 and VIN-100) and storage in bottle (bottling and 12 months).

628 **Table 5.** Biogenic amines (mg/L) in Syrah wines as affected by treatments (CT, VIN-50 and
629 VIN-100) and storage in bottle (bottling and 12 months).

630 **Supplementary Table.** Significant differences in chromatic measurements, co-pigmentation,
631 anthocyanins and derivative pigments, non-anthocyanin phenolic compounds and biogenic
632 amines in Syrah wines as affected by treatments (CT, VIN-50 and VIN-100) and storage in
633 bottle (bottling and 12 months).

634

Table(s)

Table 1.

Bottling	CT	VIN-50	VIN-100	LS
Ethanol (% v/v)	15.3 ^b	15.6 ^a	15.5 ^a	***
Glycerin (g/L)	12.13	12.07	12.04	ns
Dry extract (g/L)	27.1 ^b	27.3 ^b	28.0 ^a	**
Total acidity (g/L TH ₂)	5.57 ^b	5.69 ^a	5.77 ^a	**
pH	3.63	3.61	3.61	ns
Volatile acidity (g/L AcH)	0.52	0.47	0.45	ns
Acetic acid (g/L)	0.47	0.47	0.47	ns
Citric acid (g/L)	0.15	0.12	0.12	ns
Tartaric acid (g/L)	1.97	2.08	2.07	ns
Malic acid (g/L)	0.13	0.14	0.14	ns
Lactic acid (g/L)	1.20	1.21	1.19	ns
Succinic acid (g/L)	1.18	1.16	1.17	ns
Total SO ₂ (mg/L)	43	nd	nd	
Free SO ₂ (mg/L)	25	nd	nd	
Total stilbenes ¹ (mg/L)	2.21 ^c	45.66 ^b	104.92 ^a	***
Total anthocyanins (mg/L)	667 ^a	645 ^b	648 ^b	*
Tannins (g/L catechin)	4.79 ^b	5.52 ^a	5.55 ^a	***
Potassium (mg/L)	1080	1060	1061	ns
Acetaldehyde (mg/L)	9.7	9.7	10.5	ns
Methanol (mg/L)	210.5	200.4	196.5	ns
12 months	CT	VIN-50	VIN-100	LS
Total SO ₂ (mg/L)	17	nd	nd	
Free SO ₂ (mg/L)	9	nd	nd	
Total stilbenes ¹ (mg/L)	2.77 ^c	35.27 ^b	88.04 ^a	***
Total anthocyanins (mg/L)	420 ^a	369 ^b	368 ^b	***
Tannins (g/L catechin)	4.23 ^c	4.55 ^b	4.88 ^a	**
Acetaldehyde (mg/L)	5.4	5.9	5.5	ns

CT, wine with sulfur dioxide added at 50 mg/L; VIN-50 and VIN-100, wine with Vineatrol added at 50 and 100 mg/L of stilbenes respectively. TH₂, tartaric acid; AcH, acetic acid. ¹, total stilbenes as the sum of ampelopsin A, pallidol, *trans*-resveratrol, piceatannol, ϵ -viniferin, *r*-vitisin, ω -viniferin. nd, not detected. Different superscript letters (a, b or c) for the same parameter denote significant differences according to Fischer's LSD test ($p < 0.05$). Analyses of variance, level of significance (LS): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Table(s)

Table 2.

	Treatment				Storage			Interaction TxS
	CT	VIN-50	VIN-100	<i>p</i> -value	Bottling	12 months	<i>p</i> -value	<i>p</i> -value
CI	15.21 ^b	19.87 ^a	20.12 ^a	***	18.61 ^a	18.19 ^b	*	***
hue	0.602 ^a	0.577 ^b	0.581 ^b	***	0.533 ^b	0.640 ^a	***	***
%Y	33.4 ^a	31.9 ^b	32.0 ^b	***	31.1 ^b	33.8 ^a	***	***
%R	55.5	55.7	55.5	ns	58.3 ^a	52.8 ^b	***	*
%B	11.2	12.4	12.4	ns	10.64 ^b	13.32 ^a	***	ns
L*	38.18 ^a	31.60 ^b	31.34 ^b	***	33.99 ^a	33.43 ^b	***	**
a*	56.90	56.70	56.78	ns	59.52 ^a	54.07 ^b	***	***
b*	9.05 ^b	14.65 ^a	14.78 ^a	***	11.28 ^b	14.37 ^a	***	***
ΔE_{ab}^*		8.735	9.005		10.08	7.32		
FA (%)	46.54	47.48	45.84	ns	52.42 ^a	40.83 ^b	***	***
CA (%)	24.56 ^a	15.12 ^b	16.54 ^b	***	24.97 ^a	12.52 ^b	***	ns
PP (%)	29.26 ^b	37.39 ^a	37.62 ^a	***	22.62 ^b	46.90 ^a	***	***

CT, wine with sulfur dioxide added at 50 mg/L; VIN-50 and VIN-100, wine with Vineatrol added 50 and 100 mg/L of stilbenes respectively. CI, color intensity; %Y, percentage of yellow; %R, percentage of red; %B percentage of blue in the total wine color. ΔE_{ab}^* , color differences with regard to CT sample. FA, fraction color due free anthocyanins; CA, fraction color due to copigmented anthocyanins; PP, fraction color due to polymeric pigments. Different superscript letters for the same parameter denote significant differences according to Fischer's LSD test ($p < 0.05$). Different significance groups considered * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: not significant.

Table(s)

Table 3.

	Treatment				Storage			Interaction
	CT	VIN-50	VIN-100	<i>p</i> -value	Bottling	12 months	<i>p</i> -value	TxS <i>p</i> -value
Delphinidin-3- <i>O</i> -glucoside	9.01 ^a	5.59 ^b	5.68 ^b	***	9.65 ^a	3.87 ^b	***	ns
Cyanidin-3- <i>O</i> -glucoside	0.41 ^a	0.29 ^b	0.20 ^c	***	0.38 ^a	0.21 ^b	***	ns
Petunidin-3- <i>O</i> -glucoside	21.37 ^a	13.82 ^b	13.82 ^b	***	23.99 ^a	8.68 ^b	***	ns
Peonidin-3- <i>O</i> -glucoside	9.93 ^a	6.61 ^b	6.67 ^b	***	11.33 ^a	4.14 ^b	***	ns
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside	212.8 ^a	147.1 ^b	148.2 ^b	***	249.2 ^a	89.5 ^b	***	ns
Σ Anthocyanin-3-<i>O</i>-glucosides	253.5^a	173.4^b	174.6^b	***	294.6^a	106.4^b	***	ns
Delphinidin-3- <i>O</i> -acetylglucoside	3.42 ^a	2.22 ^b	2.25 ^b	***	3.92 ^a	1.33 ^b	***	ns
Cyanidin-3- <i>O</i> -acetylglucoside	0.49	0.41	0.41	ns	0.85 ^a	0.02 ^b	***	ns
Petunidin-3- <i>O</i> -acetylglucoside	7.41 ^a	5.30 ^b	5.27 ^b	***	8.80 ^a	3.18 ^b	***	**
Peonidin-3- <i>O</i> -acetylglucoside	10.66 ^a	7.01 ^b	7.02 ^b	***	13.69 ^a	2.77 ^b	***	ns
Malvidin-3- <i>O</i> -acetylglucoside	94.34 ^a	64.93 ^b	65.63 ^b	***	116.55 ^a	33.38 ^b	***	*
Σ Anthocyanin-3-<i>O</i>-acetylglucosides	116.3^a	79.9^b	80.6^b	***	143.8^a	40.7^b	***	ns
Delphinidin-3- <i>O</i> -coumaroylglucoside†	1.52 ^a	0.99 ^c	1.08 ^b	***	1.20	nd		
Cyanidin-3- <i>O</i> -coumaroylglucoside	1.17 ^a	0.83 ^b	0.80 ^b	***	0.94	0.93	ns	ns
Malvidin-3- <i>O</i> -caffeoylglucoside	1.00 ^a	0.76 ^b	0.76 ^b	***	1.29 ^a	0.40 ^b	***	ns
Petunidin-3- <i>O</i> -coumaroylglucoside	3.64 ^a	2.31 ^b	2.32 ^b	***	4.17 ^a	1.35 ^b	***	ns
Peonidin-3- <i>O</i> -coumaroylglucoside	6.20 ^a	3.57 ^b	3.62 ^b	***	6.86 ^a	2.07 ^b	***	*
Malvidin-3- <i>O</i> -coumaroylglucoside	27.12 ^a	16.77 ^b	17.08 ^b	***	31.12 ^a	9.52 ^b	***	ns
Σ Anthocyanin-3-<i>O</i>-cinnamoylglucosides	39.90^a	24.73^b	25.12^b	***	45.57^a	14.26^b	***	ns
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside-pyruvic acid	3.24 ^a	2.27 ^b	2.29 ^b	***	2.09 ^b	3.11 ^a	***	***
Malvidin-3- <i>O</i> -acetylglucoside-pyruvic acid	2.10 ^a	1.88 ^b	1.87 ^b	***	1.60 ^b	2.29 ^a	***	ns
Malvidin-3- <i>O</i> -coumaroylglucoside-pyruvic acid	1.04 ^a	0.91 ^b	0.89 ^b	***	1.38 ^a	0.52 ^b	***	ns
Petunidin-3- <i>O</i> -glucoside-pyruvic acid	1.88 ^a	1.35 ^b	1.36 ^b	***	1.84 ^a	1.22 ^b	***	**
Σ A-type vitisins	8.25^a	6.41^b	6.41^b	***	6.91	7.14	ns	***
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside-acetaldehyde	1.70 ^b	2.28 ^a	2.28 ^a	***	2.91 ^a	1.26 ^b	***	ns
Malvidin-3- <i>O</i> -acetylglucoside-acetaldehyde	0.60 ^b	1.17 ^a	1.21 ^a	***	1.06 ^a	0.93 ^b	**	ns
Σ B-type vitisins	2.30^b	3.45^a	3.49^a	***	3.97^a	2.19^b	***	ns
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside-4-vinylcatechol	0.11 ^b	0.25 ^a	0.26 ^a	***	0.08 ^b	0.33 ^a	***	***
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside-4-vinylphenol	0.32 ^a	0.26 ^b	0.27 ^b	***	0.23 ^b	0.34 ^a	***	ns
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside-4-vinyl(epi)catechin	0.09 ^b	0.16 ^a	0.17 ^a	***	0.03 ^b	0.25 ^a	***	***
Σ Vinyl-pyranoanthocyanins	0.52^b	0.67^a	0.70^a	***	0.34^b	0.92^a	***	***
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside(epi)catechin	1.39 ^a	1.02 ^b	0.99 ^b	***	0.69 ^b	1.58 ^a	***	***
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside-ethyl-(epi)catechin isomer1†	0.72 ^a	0.65 ^b	0.63 ^b	**	nd	0.67		
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside-ethyl-(epi)catechin isomer2	1.31 ^a	1.10 ^b	1.07 ^b	***	1.55 ^a	0.77 ^b	***	ns
Σ Direct and ethyl-bridged adducts	3.07^a	2.43^b	2.39^b	***	2.24^b	3.02^a	***	***
Σ Total anthocyanins	423.8^a	290.9^b	293.2^b	***	497.4^a	174.6^b	***	ns
% monomeric anthocyanins	96.0 ^a	93.8 ^b	93.8 ^b	***	97.3 ^a	91.8 ^b	***	***
% pyranoanthocyanins	3.1 ^b	4.9 ^a	4.9 ^a	***	2.3 ^b	6.4 ^a	***	***
% direct and ethyl bridge adducts	0.9 ^b	1.3 ^a	1.3 ^a	***	0.6 ^b	1.8 ^a	***	***

CT, wine with sulfur dioxide added at 50 mg/L; VIN-50 and VIN-100, wine with Vineatrol added at 50 and 100 mg/L of stilbenes respectively. †Compounds submitted to a one-way ANOVA. Different significance groups considered. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: not significant; nd, not detected.

Table(s)

Table 4.

	Treatment				Storage			Interaction (TxS)
	CT	VIN-50	VIN-100	<i>p</i> -value	Bottling	12 months	<i>p</i> -value	<i>p</i> -value
Gallic acid	9.01 ^b	10.00 ^a	10.64 ^a	**	9.51 ^b	10.25 ^a	*	*
Syringic acid	4.71 ^c	7.20 ^b	7.89 ^a	***	6.60	6.60	ns	***
Protocatechuic acid	0.90 ^c	1.03 ^b	1.14 ^a	***	1.03	1.01	ns	***
Vanillic acid	0.18 ^c	0.24 ^b	0.26 ^a	***	0.30 ^a	0.15 ^b	***	***
∑ Hydroxybenzoic acids	14.79^c	18.47^b	19.93^a	***	17.44	18.02	ns	***
<i>trans-p</i> -Coumaric acid†	0.47 ^b	0.58 ^a	0.60 ^a	*	nd	0.55		
<i>trans-p</i> -Coutaric acid	7.75	7.85	8.23	ns	8.35 ^a	7.54 ^b	**	*
<i>trans</i> -Caffeic acid	0.32 ^c	0.38 ^b	0.41 ^a	***	0.28 ^b	0.46 ^a	***	***
<i>trans</i> -Caftaric acid	25.37	25.13	26.49	ns	27.24 ^a	24.08 ^b	***	**
ferulic acid	7.56 ^b	8.11 ^b	9.41 ^a	***	9.03 ^a	7.68 ^b	***	*
GRP	5.89	5.34	5.56	ns	5.31 ^b	5.88 ^a	*	**
∑ Hydroxycinnamic acids	47.12^b	47.09^b	50.40^a	ns	50.22^a	46.19^b	**	**
(+)-Catechin	9.07 ^b	9.34 ^b	10.76 ^a	***	11.32 ^a	8.12 ^b	***	ns
(-)-Epicatechin	10.16 ^a	9.62 ^b	10.38 ^a	**	13.47 ^a	6.63 ^b	***	*
Procyanidin B2	0.85 ^c	1.07 ^b	1.17 ^a	***	1.04	1.02	ns	***
∑ Flavanols	20.08^b	20.02^b	22.31^a	***	25.84^a	15.77^b	***	*
Myricetin-3- <i>O</i> -glucoside + Myricetin-3- <i>O</i> -glucuronide	1.60	1.57	1.66	ns	1.73 ^a	1.49 ^b	*	ns
Quercetin-3- <i>O</i> -glucuronide	5.33	5.06	5.48	ns	5.47	5.11	ns	*
Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside	15.65	15.63	16.80	ns	17.14 ^a	14.90 ^b	***	*
Kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside	0.18	0.18	0.19	ns	0.21 ^a	0.16 ^b	***	ns
Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucoside	7.31	7.26	7.74	ns	7.90 ^a	6.97 ^b	***	*
∑ Flavanols	30.06	29.69	31.86	ns	32.44^a	28.63^b	***	*
∑ Total non-anthocyanins	112.0^b	115.3^b	124.5^a	**	125.9^a	108.6^b	***	**

CT, wine with sulfur dioxide added at 50 mg/L; VIN-50 and VIN-100, wine with Vineatrol added at 50 and 100 mg/L of stilbenes respectively. GRP, grape reaction product (2-S-glutathionyl-caftaric acid). Different superscript letters for the same parameter denote significant differences according to Fischer's LSD test ($p < 0.05$). †Compounds submitted to a one-way ANOVA. Different significance groups considered * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: not significant; nd: not detected.

Table(s)

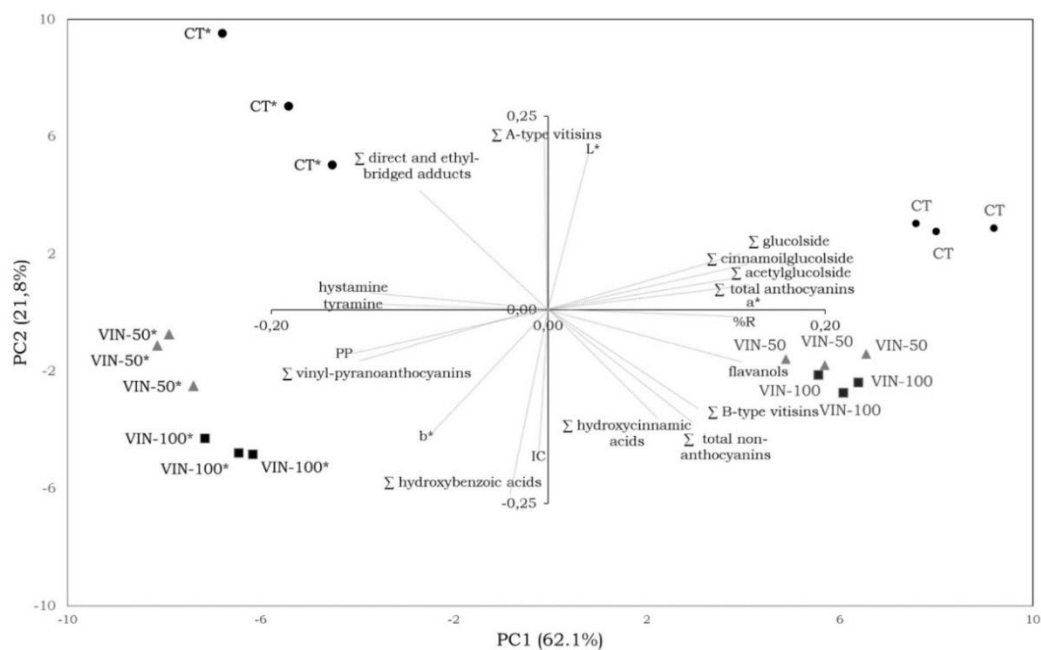
Table 5.

	Treatment				Storage			Interaction (TxS)
	CT	VIN-50	VIN-100	p-value	Bottling	12 months	p-value	p-value
Putrescine	7.94	7.34	7.56	ns	7.93	7.29	ns	ns
Histamine	1.68	1.75	1.64	ns	1.26 ^b	2.12 ^a	***	ns
Tyramine	0.21	0.20	0.21	ns	0.11 ^b	0.31 ^a	***	ns
Cadaverine	0.07	0.07	0.06	ns	0.06	0.07	ns	ns
Phenylethylamine	0.03	0.04	0.03	ns	0.03	0.04	ns	ns
Σ Total biogenic amines	9.93	9.39	9.51	ns	9.39	9.83	ns	ns

CT, wine with sulfur dioxide added 50 mg/l; VIN-50 and VIN-100, wine with Vineatrol added at 50 and 100 mg/L of stilbenes respectively. Different superscript letters for the same parameter denote significant differences according to Fischer's LSD test ($p < 0.05$). Different significance groups considered * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: not significant.

Figure(s)

[Click here to download Figure\(s\): Figure 1-Def.docx](#)



Supplementary table. Significant differences in chromatic measurements, co-pigmentation, anthocyanins and derivatives pigments, non-anthocyanin phenolic compounds and biogenic amines in Syrah wines as affected by treatments (CT, VIN-50 and VIN-100) and with storage in bottle (bottling and 12 months)

<i>Chromatic measurements</i>	Bottling			12 Months of storage			Interaction (<i>TxS</i>)
	CT	VIN-50	VIN-100	CT	VIN-50	VIN-100	<i>p</i> -value
CI	14.56 ^d	20.43 ^a	20.85 ^a	15.86 ^c	19.31 ^b	19.39 ^b	***
hue	0.57 ^d	0.51 ^e	0.51 ^e	0.63 ^c	0.64 ^b	0.65 ^a	***
%Y	32.8 ^b	30.18 ^c	30.13 ^c	33.9 ^a	33.7 ^a	33.9 ^a	***
%R	57.5 ^b	58.7 ^{ab}	58.8 ^a	53.5 ^c	52.7 ^c	52.3 ^c	*
%B	11.8	11.1	11.1	12.6	13.6	13.8	ns
L*	38.8 ^a	31.78 ^c	31.39 ^{cd}	37.6 ^b	31.42 ^{cd}	31.30 ^d	**
a*	58.90 ^b	59.76 ^a	59.88 ^a	54.90 ^c	53.64 ^d	53.69 ^d	***
b*	6.78 ^c	13.38 ^c	13.67 ^b	11.30 ^d	15.91 ^a	15.88 ^a	***
ΔE_{ab}^*		9.68	10.17		7.79	7.84	
<i>Copigmentation</i>	CT	VIN-50	VIN-100	CT	VIN-50	VIN-100	<i>p</i>-value
FA (%)	47.5 ^b	55.9 ^a	53.8 ^a	45.6 ^b	39.0 ^c	37.9 ^c	***
CA (%)	32.0	20.4	22.5	17.2	9.8	10.6	ns
PP (%)	20.5 ^d	23.6 ^c	23.7 ^c	38.0 ^b	51.2 ^a	51.5 ^a	***
<i>Anthocyanins and derivatives</i>	CT	VIN-50	VIN-100	CT	VIN-50	VIN-100	<i>p</i>-value
Delphinidin-3- <i>O</i> -glucoside	11.91	8.46	8.57	6.11	2.72	2.79	ns
Cyanidin-3- <i>O</i> -glucoside	0.49	0.38	0.28	0.33	0.19	0.11	ns
Petunidin-3- <i>O</i> -glucoside	29.53	21.29	21.15	13.20	6.35	6.49	ns
Peonidin-3- <i>O</i> -glucoside	13.53	10.20	10.26	6.32	3.02	3.07	ns
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside	294.1	226.2	227.3	131.4	67.9	69.2	ns
∑ Anthocyanin-3-<i>O</i>-glucosides	349.6	266.6	267.5	157.4	80.2	81.6	ns
Delphinidin-3- <i>O</i> -acetylglucoside	4.74	3.49	3.54	2.10	0.94	0.95	ns
Cyanidin-3- <i>O</i> -acetylglucoside	0.94	0.80	0.82	0.04	0.01	0.01	ns
Petunidin-3- <i>O</i> -acetylglucoside	9.79 ^a	8.29 ^b	8.33 ^b	5.03 ^c	2.31 ^d	2.21 ^d	**
Peonidin-3- <i>O</i> -acetylglucoside	16.39	12.36	12.31	4.93	1.65	1.74	ns
Malvidin-3- <i>O</i> -acetylglucoside	138.2 ^a	105.4 ^b	106.2 ^b	50.52 ^c	24.51 ^d	25.11 ^d	*
∑ Anthocyanin-3-<i>O</i>-acetylglucosides	170.0	130.3	131.1	62.62	29.42	30.02	ns
Delphinidin-3- <i>O</i> -coumaroylglucoside	1.52	0.99	1.08	nd	nd	nd	
Cyanidin-3- <i>O</i> -coumaroylglucoside	1.14	0.85	0.83	1.21	0.81	0.77	ns
Malvidin-3- <i>O</i> -caffeoylglucoside	1.49	1.17	1.2	0.52	0.35	0.32	ns
Petunidin-3- <i>O</i> -coumaroylglucoside	5.11	3.71	3.68	2.17	0.90	0.95	ns
Peonidin-3- <i>O</i> -coumaroylglucoside	8.94 ^a	5.78 ^b	5.87 ^b	3.47 ^c	1.36 ^d	1.37 ^d	*
Malvidin-3- <i>O</i> -coumaroylglucoside	38.77	27.08	27.52	15.47	6.46	6.64	ns
∑ Anthocyanin-3-<i>O</i>-cinnamoylglucosides	56.97	39.57	40.17	22.83	9.89	10.06	ns
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside-pyruvic acid	2.32 ^c	1.97 ^d	1.97 ^d	4.15 ^a	2.57 ^b	2.61 ^b	***
Malvidin-3- <i>O</i> -acetylglucoside-pyruvic acid	1.70	1.55	1.56	2.50	2.21	2.18	ns
Malvidin-3- <i>O</i> -coumaroylglucoside-pyruvic acid	1.37	1.40	1.37	0.72	0.42	0.42	ns
Petunidin-3- <i>O</i> -glucoside-pyruvic acid (A type vit?)	2.11 ^a	1.71 ^b	1.71 ^b	1.65 ^b	1.00 ^c	1.02 ^c	**
∑ A-type vitisins	7.49^b	6.63^c	6.60^c	9.01^a	6.20^c	6.23^c	***
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside-acetaldehyde	2.53	3.10	3.11	0.86	1.46	1.45	ns
Malvidin-3- <i>O</i> -acetylglucoside-acetaldehyde	0.65	1.27	1.25	0.55	1.07	1.17	ns
∑ B-type vitisins	3.18	4.37	4.35	1.41	2.53	2.62	ns
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside-4-vinylcatechol	0.07 ^d	0.09 ^d	0.09 ^d	0.16 ^c	0.41 ^b	0.44 ^a	***
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside-4-vinylphenol	0.25	0.22	0.22	0.38	0.31	0.32	ns
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside-4-vinyl(epi)catechin	0.03 ^c	0.03 ^c	0.03 ^c	0.14 ^b	0.30 ^a	0.31 ^a	***
∑ Vinyl-pyranoanthocyanins	0.35^c	0.33^c	0.34^c	0.68^b	1.02^a	1.06^a	***
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside(epi)catechin	0.82 ^c	0.64 ^d	0.60 ^d	1.97 ^a	1.39 ^b	1.38 ^b	***
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside-ethyl-(epi)catechin isomer1	nd	nd	nd	0.72	0.63	0.65	
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside-ethyl-(epi)catechin isomer2	1.73	1.49	1.45	0.90	0.71	0.70	ns
∑ Direct and ethyl-bridged adducts	2.55^c	2.12^d	2.05^d	3.58^a	2.74^b	2.73^b	***
∑ Total anthocyanins	590	450	452	257	132	134	ns
% ∑ monomeric anthocyanins	97.7 ^a	97.0 ^b	97.1 ^b	94.3 ^c	90.5 ^d	90.6 ^d	***

PUBLICACIÓN 8. “Vinos tintos libres de sulfitos mediante el uso de madera de poda de la vid. Parte 2: compuestos volátiles y propiedades sensoriales”

María José Ruiz-Moreno, Rafaela Raposo, Belén Puertas, Francisco Julián Cuevas, Fabbio Chinicci, José Manuel Moreno-Rojas, Emma Cantos-Villar (2017). Sulfur free red wines through the use of grapevine shoots. Part 2: volatile compounds and sensorial properties. *En revisión* Food Chemistry

**Sulfur free red wines through the use of grapevine shoots. Part 2:
volatile compounds and sensorial properties**

María José Ruiz-Moreno^a, Rafaela Raposo^b, Belén Puertas^b, Francisco Julián Cuevas^a, Fabio Chinicci^c, José Manuel Moreno-Rojas^a, Emma Cantos-Villar^{b*}

^a Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro Alameda del Obispo. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural (CAPDR). Junta de Andalucía. Avd. Menéndez Pidal, 14004, Córdoba, Spain

^b Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro Rancho de la Merced. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural (CAPDR). Junta de Andalucía. Ctra. Trebujena, km 2.1, 11471, Jerez de la Frontera, Spain

^c Department of Agricultural and Food Sciences, Alma Mater Studiorum, University of Bologna, Piazza Goidanich, 60, 47521 Cesena, FC, Italy.

*Corresponding author: Emma Cantos Villar

E-mail: emma.cantos@juntadeandalucia.es

Manuscript Number:

Title: Sulfur free red wines through the use of grapevine shoots. Part 2: volatile compounds and sensorial properties

Article Type: Research Article (max 7,500 words)

Keywords: stilbene; sulfur dioxide; esters; oxidation; sensory analysis; olfactometry

Corresponding Author: Dr. Cantos-Villar Emma,

Corresponding Author's Institution: IFAPA - Rancho de La Merced. Junta de Andalucía

First Author: Maria J Ruiz-Moreno

Order of Authors: Maria J Ruiz-Moreno; Rafaela Raposo; Belen Puertas; Francisco J Cuevas; Fabio Chinnici; Jose M Moreno-Rojas; Cantos-Villar Emma

Abstract: Following a preliminary study to determine the possibility of using a grapevine shoot extract (VIN) as a sustainable alternative to sulfur dioxide (SO₂), this second phase studied for the first time selected aroma compounds (esters, oxidation and vine shoot related compounds), sensory analysis, and the olfactometric profiles of wines treated with VIN at two concentrations during storage in bottle. Treatment with VIN hardly modified the content of ester and oxidation-related compounds in the wines. However, the high α -damascenone and isoeugenol content and increase in astringency attribute at tasting was noteworthy, as were some odorant zones, all of which were established as VIN markers after the chemometric data analysis. The lowest dose tested may be recommended as a suitable alternative to SO₂. Although some characteristics of these wines may change, these changes are not considered to decrease the quality of the wines, at least after one year of storage in bottle.

1 **Sulfur free red wines through the use of grapevine shoots. Part 2: volatile**
2 **compounds and sensorial properties**

3 María José Ruiz-Moreno^a, Rafaela Raposo^b, Belén Puertas^b, Francisco Julián Cuevas^a,
4 Fabio Chinnici^c, José Manuel Moreno-Rojas^a, Emma Cantos-Villar^{b*}

5 ^a Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro Alameda
6 del Obispo. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural (CAPDER). Junta de
7 Andalucía). Avd. Menéndez Pidal, 14004, Córdoba, Spain.

8 ^b Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro Rancho
9 de la Merced. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural (CAPDER). Junta de
10 Andalucía). Ctra. Trebujena, km 2.1, 11471, Jerez de la Frontera, Spain.

11 ^c Department of Agricultural and Food Sciences, Alma Mater Studiorum, University of
12 Bologna, Piazza Goidanich, 60, 47521 Cesena, FC, Italy.

13

14 *E-mail address: emma.cantos@juntadeandalucia.es

15 **Abstract**

16 Following a preliminary study to determine the possibility of using a grapevine shoot
17 extract (VIN) as a sustainable alternative to sulfur dioxide (SO₂), this second phase
18 studied for the first time selected aroma compounds (esters, oxidation and vine shoot
19 related compounds), sensory analysis, and the olfactometric profiles of wines treated
20 with VIN at two concentrations during storage in bottle. Treatment with VIN hardly
21 modified the content of ester and oxidation-related compounds in the wines. However,
22 the high β-damascenone and isoeugenol content and increase in astringency attribute at
23 tasting was noteworthy, as were some odorant zones, all of which were established as
24 VIN markers after the chemometric data analysis.

25 The lowest dose tested may be recommended as a suitable alternative to SO₂. Although
26 some characteristics of these wines may change, these changes are not considered to
27 decrease the quality of the wines, at least after one year of storage in bottle.

28 Keywords: *stilbene, sulfur dioxide, esters, oxidation, sensory analysis, olfactometry.*

29 **1. Introduction**

30 Wine aroma is one of the main attributes determining consumer preference. In the case
31 of red wines, perceived aroma quality depends on complex interactions among a
32 relatively large number of aroma compounds that are predominantly derived from
33 grapes, yeast and bacterial metabolism, but also from post-fermentation technological
34 operations, when applied (Ugliano, Travis, Francis, & Henschke, 2010).

35 Esters have often been proposed as the group of compounds most directly responsible
36 for the fruity aroma of wine (Escudero, Campo, Fariña, Cacho, & Ferreira, 2007). The
37 contribution of esters to wine fruitiness can be modulated by other aroma compounds
38 simultaneously present in the wine, including among others C-13 norisoprenoids (β -
39 damascenone and β -ionone), which have clearly been established as key odorants in red
40 wines (Pineau, Barbe, Van Leeuwen, & Dubourdieu, 2007). In fact, C13-norisoprenoids
41 have been associated with high quality wine characteristics due to their low odor
42 threshold ($\mu\text{g/L}$) and pleasant odor descriptors related to tea, violet, exotic flowers,
43 stewed apple, eucalyptus and camphor (Genovese, Gambuti, Piombino, & Moio, 2007;
44 Panighel & Flamini, 2014).

45 Due to this complex picture, in recent years olfactometry studies have been integrated
46 into sensory studies (Plutowska & Wardencki, 2008). In fact, gas chromatography–
47 olfactometry (GC–O) has been suggested as a useful tool to monitor wine oxidation
48 (Ferreira, Jarauta, López, & Cacho, 2003). The authors signaled phenyl acetaldehyde
49 and sotolon, among others, as descriptors related to oxidation.

50 During bottle maturation, wine is exposed to relatively low quantities of oxygen.
51 Oxygen modulates the extent of different reactions involving volatile and non-volatile

52 components, resulting in the formation/degradation of a number of powerful aroma
53 compounds, with major consequences for the process of aroma evolution during bottle
54 ageing (Ugliano, 2013).

55 The preservative most widely used in winemaking to prevent oxidation processes is
56 sulfur dioxide (SO₂). SO₂ not only helps to reduce the effects of dissolved oxygen, but
57 also inhibits the development of all types of microorganisms, such as yeasts, lactic
58 bacteria and, to a lesser extent, acetic bacteria. However, several human health risks,
59 including dermatitis, urticaria, angioedema, diarrhea, abdominal pain,
60 bronchoconstriction and anaphylaxis, have been associated with SO₂ (Guerrero &
61 Cantos-Villar, 2015).

62 Today consumers demand high quality foods that are free from additives, fresh tasting,
63 microbiologically safe and with an extended shelf-life. In the face of these demands,
64 researchers and the wine industry are looking for natural alternatives to replace SO₂
65 without significantly changing the quality and safety attributes of wine. In previous
66 research, Vineatrol[®], an extract from grapevine-shoot that is particularly rich in
67 stilbenes, was tested as a preservative in red wine (Raposo et al., 2016). Although
68 promising results were achieved, several issues needed further research: first, the
69 optimal dose to prevent a loss of wine quality, while optimizing the preservation of
70 antioxidant properties mainly during storage in bottle; second, the study of important
71 aspects regarding volatile profile related to varietal, fermentation and oxidation aromas.
72 Finally, the impact of the relationship between treatment and doses, on both GC-O data
73 and sensory analysis.

74 In the current study, the aroma compounds and sensory properties of red wines
75 elaborated with Vineatrol at two doses were studied at bottling and after 12 months of
76 storage in bottle. Special attention was paid to ester compounds, as well as to other

77 volatile compounds, odorant zones and sensory analysis to guarantee quality wine. The
78 effect of Vineatrol on enological parameters, phenolic compounds and biogenic amines
79 were discussed in the first part of the present study. Both parts of the research form a
80 complete, original study.

81 **2. Materials and methods**

82 **2.1. Chemicals**

83 Dichloromethane (LiChrosolv quality), aroma standards and alkane solution (C7-C40)
84 used for identification were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).
85 Anhydrous sodium sulfate and ammonium sulfate were obtained from Panreac
86 (Barcelona, Spain) and from Scharlau (Barcelona, Spain), respectively. Sodium
87 chloride, ACS reagent grade (purity $\geq 99.8\%$) and standards compounds, ethyl butyrate,
88 ethyl hexanoate, ethyl octanoate, ethyl decanoate, propyl acetate, isobutyl acetate,
89 isoamyl acetate, hexyl acetate, octyl acetate, 2-phenylethylacetate, ethyl isobutyrate,
90 ethyl 2-methylbutyrate, ethyl isovalerate, ethyl leucate, ethyl phenylacetate, ethyl
91 dihydrocinnamate, ethyl cinnamate, methyl hexanoate, methyl octanoate, methyl
92 decanoate, isoamyl butyrate, isoamyl hexanoate, isoamyl octanoate, isoamyl butyrate,
93 isoamyl hexanoate, isoamyl octanoate, ethyl valerate, ethyl heptanoate, ethyl nononate,
94 ethyl propanoate, isobutyl hexanoate, 3-methyl-1-pentanol, γ -hexalactone, β -ionone, 4-
95 methylguaiacol, eugenol, furfural, isoeugenol, guaiacol, 5-methylfurfural, *trans*-
96 whiskey lactone, *cis*-whiskey lactone, vanillin, 3-octanol sotolon, and phenyl
97 acetaldehyde were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). β -damascenone,
98 was purchased from Firmenich (Barcelona, Spain).
99 Isotopically labelled esters: [$^2\text{H}_3$]-ethyl butyrate, [$^2\text{H}_{11}$]-ethyl hexanoate, [$^2\text{H}_{15}$]-
100 ethyloctanoate, and [$^2\text{H}_5$]-ethyl cinnamate, were supplied by CDN isotopes (Pointe-

101 Claire, Canada). Ultrapure water from a Milli-Q system (Millipore Corp., Bedford, MA)
102 was used throughout this research.

103 **2.2. Grapevine-shoot extract**

104 Vineatrol[®] was kindly provided by Actichem S.A. (Montauban, France), the developer
105 and producer of this grapevine shoot extract. This extract contains considerable amounts
106 of stilbenoids: 5.66% *trans*-resveratrol, 13.25% ϵ -viniferin, 3.76% ampelopsin A,
107 1.44% *r*-viniferin, 1.22% hopheaphenol, 1.04% pallidol, 1.07% ω -viniferin, 0.97%
108 piceatannol, 0.78% isohopeaphenol and 0.30% *r*²-viniferin. The total stilbene richness
109 of Vineatrol was 29.45%. Since Vineatrol has low solubility in aqueous media, it was
110 dissolved in wine alcohol (96%) before adding it to the wine.

111 **2.3. Winemaking**

112 Syrah grapes (482 kg) were harvested, destemmed and crushed, and then placed into a
113 Ganimede fermenter (Ganimede[®]). Previous results described few differences when
114 Vineatrol was used in the Ganimede system compared with the traditional one (Raposo
115 et al., 2016). In the sulfite free must, alcoholic fermentation (AF) was started after
116 adding yeast (20 g/hL, ES488, Sepsa-Enartis, Spain). After AF, malolactic fermentation
117 was induced with *Oenococcus oeni* (1 g/hL, Challenge Easy ML, Sepsa-Enartis, Spain)
118 and nutrients (20 g/hL Nutriferm ML, Sepsa-Enartis, Spain). Once the malolactic
119 fermentation had finished, the wine was divided into three batches, each one in
120 triplicate, as follows: in the first batch, SO₂ (Sulfosol, Sepsa-Enartis) was added at 50
121 mg/L (CT), and in the other two, different amounts of Vineatrol were added: VIN-50
122 when 50 mg/L of the total stilbene content was added, which meant 175 mg/L of
123 Vineatrol (29% richness in stilbenes and 99% solubility), and VIN-100 when 100 mg/L
124 of the total stilbene content was added, which meant 430 mg/L Vineatrol (29% richness
125 in stilbenes and 80% solubility). The wines were stabilized for 8 weeks at 0 °C, and then

126 racked, filtered (Optical XL, Millipore, France) and bottled. A synthetic closer made of
127 a polymer material was chosen (Excellent cork SL, Valencia, Spain). Finally, the
128 bottled wines were stored under controlled conditions (16 °C and 80% RH) for 12
129 months. A randomly-chosen wine bottle sample was analyzed at bottling and another
130 after 12 months of storage in bottle.

131 **2.4. Determination of ester compounds by automated HS-SPME-GC-MS**

132 The concentration of esters was determined using a headspace solid-phase micro-
133 extraction (HS-SPME) followed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS)
134 as described by Antalick, Perello, and de Revel (2010) with modifications. Briefly: 25
135 mL of wine was spiked with 20 µL of internal standard mix solution at 200 mg/L of
136 deuterated esters. Then, 10 mL of the spiked samples diluted 1:16 with Mili-Q water
137 were placed into a 20 mL SPME vial filled with 3.5 g of NaCl. The vials were
138 homogenized for 30 seconds in a vortex shaker and placed in a Combipal autosampler
139 tray (CTC Analytics). Next, they were stirred at 500 rpm for 2 min at 40°C. Extraction
140 was set at 40°C for 38 min and desorption was performed at 250°C for 15 min. A PDMS
141 fiber of 100 µm (Supelco, Bellefont, PA, USA) was desorbed into a Trace GC ultra-gas
142 chromatograph (ThermoFisher Scientific S.p.A., Rodano, Milan, Italy) coupled to an
143 ISQ Single Quadrupole MS spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Austin, Texas,
144 USA). The GC-MS conditions were those described by (Antalick et al., 2010).
145 Identification and quantification procedures were also developed according to these
146 authors.

147 **2.5. Measurement of other volatile compounds by SBSE-GC/MS analysis**

148 Volatile compounds (β -damascenone, β -ionone, furfural, 5-methylfurfural, guaiacol, 4-
149 methylguaiacol, *Z*-whiskey lactone, *E*-whiskey lactone, eugenol, isoeugenol, vainillin)
150 were extracted by stir-bar sorptive extraction (SBSE) as described by Marín, Zalacain,

151 De Miguel, Alonso, and Salinas (2005) and Pardo-García, De La Hoz, Zalacain,
152 Alonso, and Salinas (2014) with few modifications. Briefly, 25 mL of red wine sample
153 was stirred at 700 rpm at room temperature for 90 min with a 10-mm stir bar coated
154 with polydimethylsiloxane of 0.5 mm film thickness (Gerstel, Mülheim and der Ruhr,
155 Germany). The stir bar was desorbed in an automated thermal desorption unit (TDU,
156 Gerstel, Mülheiman der Ruhr, Germany) mounted on an Agilent 7890 gas
157 chromatograph system (GC) coupled to an Agilent 5975 quadrupole mass spectrometer
158 detector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with a fused silica
159 capillary column BP21 (30-m length, 0.25 mm I.D. and 0.25 μm film thickness) (SGE,
160 Ringwood, Australia), with helium as carrier gas. Analysis conditions and
161 quantification were carried out as described by authors (Pardo-García et al., 2014).
162 Sotolon and phenyl acetaldehyde were determined by liquid-liquid extraction and GC-
163 MS analysis following the method described by authors (Lavigne, Pons, Darriet, &
164 Dubourdiou, 2008). Briefly, 100 mL of wine, spiked with 100 μl of 3-octanol (at 100
165 mg/L) and 15 g of ammonium sulfate was extracted with 10, 5 and 5 mL of
166 dichloromethane. The extracts were blended, dried over anhydrous sodium sulfate and
167 concentrated up to 0.5 mL under a nitrogen stream. Two microliters of the extract were
168 injected into the GC-MS. The instrument was a Trace GC ultra-gas chromatograph
169 (ThermoFisher Scientific S.p.A., Rodano, Milan, Italy) coupled to an ISQ Single
170 Quadrupole MS spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Austin, Texas, USA) equipped
171 with a fused silica column coated with a BP20 (50 m x 0,25 mm x 0,22 μm), (SGE,
172 Ringwood, Australia) and helium as the carrier gas at 1 mL/min. The injection
173 temperature was therefore programmed at 180°C in splitless mode.

174 **2.6. Gas chromatography-olfactometry (GC-O) and chromatography-mass**
175 **spectrometry (GC-MS) analyses**

176 GC–O analysis were carried out on the wines at bottling and after 12 months of storage
177 in bottle using a Varian 3800 GC (Middelburg, The Netherlands) equipped with an FID
178 and an OP275 olfactometer (GL Science Inc., Tokyo, Japan). The sample extraction and
179 method followed has been described by authors (Sarrazin, Dubourdieu, & Darriet,
180 2007). 1 μ L of extract was injected in splitless mode, using a split time of 1 min. The
181 columns used were DB-WAX and DB-5 from J&W Scientific, Agilent Technologies
182 Inc. (Santa Clara, California, USA), 60 m \times 0.25 mm with 0.25 μ m film thickness. The
183 sensory panel was composed of three trained tasters, who sniffed each sample three
184 times. The results were expressed as “modified frequency” MF(%) with the formula
185 proposed by Dravnieks, (1985).

186 For the GC-MS analysis, 1 μ L of extract was injected in a Trace GC Ultra gas
187 chromatograph (Thermo Fisher Scientific S.p.A., Rodano, Milan, Italy) under the same
188 conditions described above. The detector was a mass spectrometer (ISQ single
189 quadrupole MS, Thermo Fisher Scientific, Austin, Texas, USA) operating in EI mode
190 (70 eV), connected to the GC with a heated transfer line at 230 °C. Mass spectra were
191 taken over the 40-350 m/z range. Thermo Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific,
192 San Jose, California, USA) was used for data acquisition. The odorant compounds were
193 identified on the basis of linear retention indexes and a comparison of MS
194 fragmentation patterns with those of reference compounds or with mass spectra in the
195 NIST 05 mass Spectral library (version 05).

196 **2.7. Sensory analysis**

197 The wines (30 mL) were presented in transparent glasses distributed in a randomized
198 order. They were evaluated in terms of 13 descriptors: odor intensity, red fruit, black
199 fruit, jammy fruit, candy/sweet, woody/smoky, flavor intensity, bitterness, alcohol,
200 astringency, balanced, persistence and global quality. The descriptors were scored on a

201 scale from 0 to 10 (0: absence of a descriptor, 10: maximum intensity). The wine
202 sensory analysis was performed by twelve trained panelists from IFAPA.

203 **2.8. Statistics**

204 The data were subjected to analysis of variance using Shapiro Wilk's and Lenève's tests
205 for normality and heterosticity requirements. Differences at $p < 0.05$ were considered to
206 be statistically significant. A comparison of means based on least significant differences
207 (LSD, Fisher's test) was performed. A univariate analysis (ANOVA) was performed
208 using Statistix (v 9.0, Analytical Software, FL, USA). A multivariate analysis (PLS-DA,
209 partial least squares discriminant analysis) was performed using PLS toolbox (v. 5.5.1,
210 Eigenvector, USA) under MATLAB 2008R (v. 7.6.0, Mathworks, USA) workspace.

211 **3. Results and discussion**

212 The current study presents results concerning the sensory aspects of wines in which
213 VIN was used as a preservative at different doses. In the first part of the current study,
214 we demonstrated the safety and stability of the red wines obtained using a grapevine-
215 shoot extract (VIN) as a preservative, these wines also presenting good chromatic
216 parameters and phenolic profile. To gain a more in-depth understanding of the
217 feasibility of VIN as a preservative, the VIN wines were thoroughly characterized
218 regarding aroma and sensory related compounds. For the current study, ester
219 compounds were selected since they are key aroma compounds. Additionally, other
220 volatile compounds were studied that are related to varietal aspects and oxidation
221 processes, as well as compounds described in vine shoot extracts. The relationship
222 between volatile compounds, olfactometry data and sensory analysis were investigated
223 using a multivariate analysis.

224 **3.1. Volatile compounds**

225 **3.1.1. Ester Compounds**

226 Several authors have demonstrated that esters play an important role in the modulation
227 of the fruity expression of red wines. Concretely, esters seem to be strongly involved in
228 the aromatic perception of specific “red” and “black berry” fruit nuances of red wines
229 (Antalick et al., 2015; Lytra, Tempere, Revel, & Barbe, 2012). Although at the pH of
230 wine a significant proportion of esters are hydrolyzed during ageing, most of them are
231 still present in concentrations over their odor thresholds in 1-2 year old wines (Escudero
232 et al., 2007).

233 Twenty one ester compounds belonging to seven chemical families were determined in
234 the wines and the influence of treatment (SO₂ or VIN) and storage (bottling or 12
235 months in bottle) on their contents was evaluated by means of two-way ANOVA (Table
236 1): (i) *ethyl esters of straight-chain fatty acids (EEFAs)*: ethyl butyrate, ethyl hexanoate
237 and ethyl octanoate; (ii) *higher alcohol acetates (HAAs)*: propyl acetate, isoamyl
238 acetate, hexyl acetate, octyl acetate and phenylethyl acetate; (iii) *ethyl esters of*
239 *branched acids (EEBAs)*: ethyl isobutyrate, ethyl 2-methylbutyrate, ethyl isovalerate,
240 ethyl leucate; (iv) *cinnamates*: ethyl dihydrocinnamate and ethyl cinnamate; (v) *methyl*
241 *esters of fatty acid (MEFAs)*: methyl hexanoate and methyl decanoate; (vi) *isoamyl*
242 *esters of fatty acids (IEFAs)*: isoamyl butyrate, isoamyl hexanoate and isoamyl
243 octanoate; (vi) *miscellaneous esters (MEs)*: ethyl propanoate and isobutyl hexanoate.

244 Regarding *treatment*, no difference in total esters was observed. In fact, few esters were
245 affected by the addition of VIN. The VIN wines contained lower concentrations of
246 hexyl acetate, octyl acetate, methyl hexanoate, isoamyl butyrate, isoamyl hexanoate and
247 isobutyl hexanoate, but a higher amount of ethyl propanoate with regard to the control
248 wines, independently of the VIN dose added into the wine (VIN-50 or VIN-100). The
249 increase in ethyl propanoate in the VIN wines was marked after 12 months of storage in

250 bottle (Supplementary Table 1). Although statistically significant, these differences are
251 not expected to directly impact on wine aroma since they are far from the odor
252 threshold (2100 µg/L; Antalick et al., 2010).

253 Regarding *storage*, total esters decreased after 12 months of storage in bottle. The main
254 contribution to this fact was the decrease in the content of the following groups: HAAs,
255 cinnamates, MEFAs, IEFAs and isobutyl hexanoate from the ME group. This fact is
256 explained by hydrolysis processes (Antalick, Perello, & de Revel, 2014). On the other
257 hand, the EBBA group and ethyl propanoate increased after 12 months of storage in
258 bottle, which is in agreement with previous reports (Liu, Xing, Li, Yang, & Pan, 2016;
259 Santos et al., 2015). While the synthesis of EEBAAs by esterification from the
260 corresponding branched acids is known to take place, the origin and evolution of ethyl
261 propanoate still remains unclear (Antalick et al., 2014). Moreover, ethyl 2-
262 methylbutyrate reached levels over its threshold (18 µg/L; Ferreira, López, & Cacho,
263 2000) in all the wines after storage (Supplementary Table 1). Higher levels of ethyl
264 propanoate and EEBAAs (ethyl isobutyrate, ethyl 2-methylbutyrate) have been related
265 with 'black-berry' and 'jammy' nuances of red wines (Pineau, Barbe, Van Leeuwen, &
266 Dubourdieu, 2009).

267 The interaction between the factors *treatment x storage* (TxS) was significant for hexyl
268 acetate, octyl acetate, methyl hexanoate, methyl decanoate, isoamyl butyrate, isoamyl
269 hexanoate and isobutyl hexanoate. This meant, that different evolution with storage was
270 observed depending on the treatment. It is worth noting that, although alcoholic
271 fermentation was common to all the wines, the VIN wines showed a lower
272 concentration of esters than the CT ones at bottling. However, this difference was not
273 found after 12 months, the VIN wines having maintained a higher concentration of
274 esters after storage in bottle (Supplementary Table 1).

275 **3.1.2. Other Volatile Compounds**

276 Apart from esters, other volatile compounds could also contribute to the modulation of
277 aroma perception. Thirteen non-ester aroma compounds were analyzed in the wines
278 under study, as follows: β -damascenone, β -ionone, phenyl acetaldehyde, sotolon,
279 furfural, 5-methylfurfural, guaiacol, 4-methylguaiacol, *Z*-whisky lactone, *E*-whisky
280 lactone, eugenol, isoeugenol and vanillin (Table 1). They were selected since they are
281 related to varietal aromas, oxidation processes and vine shoot extract aromas (Ferreira,
282 Bueno, Franco-Luesma, Culleré, & Fernández-Zurbano, 2014; Sáenz-Navajas et al.,
283 2015; Sánchez-Gómez, Zalacain, Alonso, & Salinas, 2014; Ugliano, 2013).

284 Regarding *treatments*, the VIN wines showed a higher concentration of β -damascenone,
285 guaiacol, *E*-whiskey lactone and isoeugenol compared to the CT wines (Table 1). The
286 β -damascenone concentration was twice as high in the VIN wines, independently of the
287 VIN dose added to the wine. This could be explained by the reaction of β -damascenone
288 with the free SO₂ to give an odorless sulfonic acid derivative (Daniel, Elsey, Capone,
289 Perkins, & Sefton, 2004). β -Damascenone has been established as a key odorant in red
290 wines due to its low odor threshold (7.0 μ g/L, Pineau et al., 2007). It has been
291 associated with descriptors such as fruity-flowery, woody, honey, and especially baked
292 apple. Moreover, it has been described as an aroma enhancer of fruity aromas (Pineau
293 et al., 2007). Wine experts recently demonstrated a positive correlation between the
294 concentration of C13-norisoprenoids (β -damascenone and β -ionone) and high quality
295 ratings (Sáenz-Navajas et al., 2015). C13-norisoprenoids have a positive influence on
296 dried fruits, black fruits and caramel/roasted notes, and exert a suppressing effect on red
297 fruit notes (Ferreira et al., 2016). Thus the increase in β -damascenone is expected to
298 impact as an enhancer of fruity notes in the VIN wines.

299 Similar results were observed in red wines after the application of high hydrostatic
300 pressure and storage in bottle. A higher content of norisoprenoids was found for the
301 sulfur dioxide-free red wines compared to the SO₂ wines (Santos et al., 2015).
302 Guaiacol (smoky, phenolic, aromatic, burnt, burnt bacon) was slightly higher in the
303 VIN wines. However, its content was under its odor threshold in all the wines (75 µg/L;
304 Pollnitz, Pardon, Sykes, & Sefton, 2004). Guaiacol is formed during the fermentation
305 process (Baumes, Bayonove, Barillère, Escudier, & Cordonnier, 1988), which was
306 common to all the wines. Moreover, it can be obtained by the decarboxylation of
307 vanillic acid, which was higher in the VIN wines (Part I of the current work), in
308 agreement with authors (Luque-Rodríguez, Pérez-Juan, & Luque de Castro, 2006).
309 Higher concentrations of *E*-whiskey lactone and isoeugenol were found in the VIN
310 wines, especially in the VIN-100 wines. These compounds are usually found in wines
311 aged in wood (Ferreira et al., 2016) but they have also been described in vine shoot
312 extracts (Sánchez-Gómez et al., 2014; Sánchez-Gómez, Zalacain, Alonso, & Salinas,
313 2016). However, both compounds were found in the wines under their odor threshold
314 (*E*-whiskey lactone 320 µg/L, Marín et al., 2005; isoeugenol 6.0 µg/L, Sánchez-
315 Palomo, Gómez García-Carpintero, Alonso-Villegas, & González-Viñas, 2010), and
316 thus were not expected to have an important contribution to the overall flavor of the
317 wines.
318 It is of note that sotolon and phenyl acetaldehyde, which are well known oxidation
319 related compounds (Ugliano, 2013), were similar in the CT and VIN wines. Other
320 alternatives to SO₂, such as high hydrostatic pressure treatment, accelerated the
321 Maillard reaction and resulted in an increase in phenyl acetaldehyde (Santos et al.,
322 2015).

323 Regarding *storage*, an increase in phenyl acetaldehyde, 4-methylguaiacol, and whiskey
324 lactones was observed after 12 months of storage in bottle. The increase of phenyl
325 acetaldehyde (honey-like scent) in bottled wines has been previously described. As
326 mentioned above, it has been related with the Maillard reaction, specifically with
327 Strecker degradation, through phenylalanine degradation (Pereira, Cacho, & Marques,
328 2014). Its concentration was over the odor threshold for both storage times (1 µg/L;
329 Sarrazin et al., 2007). 4-Methylguaiacol (smoky scent) was under its odor threshold (65
330 µg/L; Pollnitz et al., 2004) in both the just bottled and stored wines. *Z*-Whiskey lactone
331 and *E*-whiskey lactone, whose aroma descriptors are fresh oak and coconut depending
332 on their concentrations, were found in very low concentrations, which were under their
333 odor thresholds. The evolution of whiskey lactones during storage, without ageing in
334 wood, has not been described.

335 The interaction between *treatment x storage (TxS)* was not significant for any
336 compound, and thus all the above compounds evolved similarly in the wine,
337 independently of the preservative and dose tested (Supplementary Table 1).

338 **3.2. Odorant zones**

339 Gas chromatography–olfactometry studies of wines try to connect or to identify the
340 relationships between odorant profile and organoleptic properties (Plutowska &
341 Wardencki, 2008).

342 In the current study, GC-O was carried out on the wines both at bottling and after 12
343 months of storage in bottle. Fifty five odorant zones were detected in the wines
344 (Supplementary Table 2). Odorants not reaching a maximum GC–O score (MF) of 30%
345 were not considered (Culleré et al., 2013). As the main goal of the current study was to
346 search for differences between SO₂ treated wines (CT) and VIN treated wines (VIN-50
347 and VIN-100), only differences (Δ MF) higher than 40% between CT and VIN wines

348 are shown in Table 2 (VIN-50 – CT and VIN-100 – CT). At bottling, four and seven
349 odorant zones (OZs) were increased in the VIN-50 and VIN-100 wines respectively
350 (Table 2). Among them, OZ10 was identified as 2-acetyl-1-pyrroline (popcorn, toasty
351 bread notes), and OZ31 as *trans*-1,10-dimethyl-*trans*-9-decalol (geosmine, earthy
352 notes). Those compounds showed $\Delta\text{FM}(\%) \geq 40$ only for VIN-100 wines at bottling.
353 Both of them are off-flavors in wines with a low threshold, and are thus undesirable
354 compounds (Costello & Henschke, 2002; Lisanti, Gambuti, Genovese, Piombino, &
355 Moio, 2014).

356 The other five OZs, which could not be identified, were as follow: OZ36 (tobacco
357 notes), OZ37 (sweet, chamomile tea notes), OZ42 (phenolic, fresh, blackcurrant notes),
358 OZ51 (pine, fresh notes), OZ55 (citrus, almond notes). OZ36 showed a MF higher than
359 40% only in the VIN-100, while OZ37, OZ42, OZ51, OZ55 had a MF higher than 40%
360 in both VIN wines (VIN-50 and VIN-100).

361 After 12 months of storage in bottle, the MF decreased for the OZs previously
362 mentioned, especially for the off-flavors (OZ10, OZ31). Geosmin has been described to
363 decrease during storage in bottle (La Guerche, Dauphin, Pons, Blancard, & Darriet,
364 2006). Thus, the negative contribution of VIN extract to the VIN100 wines decreased
365 with the storage in bottle.

366 **3.3. Sensory analysis**

367 At bottling, wines showed sensory differences as shown in Figure 1a. The VIN wines
368 showed higher scores for ‘black fruit’, ‘jammy fruit’, ‘candy/sweet’ and ‘woody/smoky’
369 attributes. However, the only significant differences were the ‘candy/sweet’ and
370 ‘woody/smoky’ attributes for the VIN-100 wines. In tasting, of note was that the VIN
371 wines showed the highest scores for astringency and bitterness, which could be related
372 with their higher flavanol content (Part I, Table 4). Moreover, the VIN-100 wines got

373 the lowest scores for balanced and global quality. It is worth mentioning that the off-
374 flavors detected by olfactometry were not detected in the sensory analysis.

375 After 12 months of storage in bottle, the VIN-100 wines presented the highest scores for
376 'black fruit', 'jammy fruit', 'candy/sweet' and 'woody/smoky', and the lowest for 'red
377 fruit' (Figure 1b), but only the 'red fruit' and 'jammy fruit' attributes were significantly
378 different. The differences in taste between the wines with storage were minimized, only
379 the astringency attribute scoring significantly lower for the CT wines.

380 **3.4. Multivariate analysis: potential markers of Vineatrol wines**

381 For the multivariate analysis, the natural group pattern of the data was previously
382 determined by a hierarchical cluster analysis (Supplementary Figure 1). The main
383 source of the variability corresponded to the time factor, not to the treatment. Thus, two
384 PLS-DA models were performed, at bottling and after 12 months of storage, to
385 determinate the impact of the treatment (SO₂ and VIN) on the wines.

386 The volatile compounds, odorant zones and sensory data matrices were subjected to the
387 supervised multivariate technique (PLS-DA). The matrices consisted of 9 rows (as
388 samples) and 101 columns (as variables). The CT and VIN wines were labelled as class
389 1 and class 2, respectively. Several pre-processing transformations were evaluated and
390 selected according to the lowest Root Mean Squares Error in Cross Validation
391 (RMSECV). 'Auto-scaling' was selected because of its more accurate prediction results
392 compared with 'Pareto scaling', 'Mean center' and 'Log' transformation. In fact, in the
393 literature it is the recommended pre-processing technique (Seisonen, Vene, & Koppel,
394 2016). The validation of the models was performed using leave-one-out cross validation
395 *At bottling*, the model obtained values of 100 % for sensitivity and 100 % for specificity
396 (Supplementary Table 3), and thus the model predicted 100% of the samples. The first
397 latent variable explained 52% of the data variability and differentiated the CT from the

398 VIN wines (Figure 2A). The ester compounds and “red fruit” attribute were mainly
399 linked to the differences in CT wines, while mainly odorant zones, β -damascenone,
400 isoeugenol, ethyl dihydrocinnamate ‘candy/sweet’, ‘black fruit’, ‘woody/smoky’,
401 ‘bitterness’ and ‘astringency’ attributes were linked to the differences in VIN wines
402 (Figure 2B). Despite the second latent variable (7%) not being responsible for the
403 discrimination between the supervised classes, it showed a clear trend between the VIN-
404 50 and VIN-100 wines. The OZ31 (geosmine, earthy notes), ‘odour intensity’
405 ‘woody/smoky’ and ‘jammy fruit’ attributes were linked to VIN-100 wines; while ethyl
406 leucate, ‘balanced’ and ‘global quality’ attributes were linked to the VIN-50 ones
407 (Figure 2B).

408 *After 12 months of storage in bottle*, the second model obtained values of 100 % for
409 sensitivity and 100 % for specificity (Supplementary Table 3). The first latent variable
410 explained 30% of data variability differentiating the CT from the VIN wines (Figure
411 2C). Ethyl leucate, OZ29, OZ16, OZ20, OZ44, ‘bitterness’, ‘red fruit’, ‘flavour
412 intensity’ and ‘global quality’ attributes were mainly linked to the CT wines; while
413 OZ37, OZ42, OZ55, OZ49, OZ51, β -damascenone, isoeugenol, ethyl propanoate,
414 ‘astringency’, ‘jammy fruit’ and ‘alcohol’ were linked to the VIN wines (Figure 2D).
415 The second latent variable (17%) did not differentiate the wines at this stage (Figure
416 2C).

417 The Variable Importance in Projection values (VIP) were used to determine the main
418 contributors of the classes in the PLS regression studies. The candidates as potential
419 markers were determined, first taking into account VIP values > 1.5 extracted from the
420 PLS-DA model, as previously described (Cuevas, Moreno-Rojas, Arroyo, Daza, &
421 Ruiz-Moreno, 2016), and secondly, the differences between the VIN and CT wines.
422 According to these two requirements, at bottling, isobutyl hexanoate, hexyl acetate,

423 octyl acetate, isoamyl hexanoate and isoamyl butyrate were identified as potential
424 markers for the CT wines (Figure 2E); while β -damascenone, isoeugenol, and the
425 odorant zones OZ10, OZ37, OZ42, OZ51 and OZ55 were identified as potential
426 characteristic markers of the VIN wines at bottling. From all the attributes studied, only
427 'astringency' was considered as a potential sensory marker of the VIN wines (Figure
428 2E). In contrast, after 12 months of storage, no markers could be assigned for the CT
429 wines, while in the VIN wines, ethyl propanoate, β -damascenone, isoeugenol, guaiacol,
430 OZ37, OZ42, OZ51, OZ55 and astringency were identified as potential characteristic
431 markers (Figure 2F).

432 Some of the above mentioned markers could be related with the sensory differences
433 found in wines (Figure 1). *At bottling*, the higher scores in 'candy/sweet' and 'black
434 fruit' notes of the VIN wines might be related with the contribution of the odorant
435 markers OZ37 (sweet, chamomile tea) and OZ42 (phenolic, fresh, blackcurrant)
436 respectively. Meanwhile, the 'woody/smoky' notes of the VIN-100 wines might be
437 related with the greater contribution from OZ10 (popcorn, toasty bread). Moreover, β -
438 damascenone (VIN marker), known to be a key aroma modulator, may also have a
439 significant positive effect on the higher scores for 'black fruit' and 'jammy fruit.' It also
440 impacts strongly on the 'candy/sweet' notes and woody compounds of the VIN wines,
441 in concordance with previous literature (Ferreira et al., 2016). The other odorant
442 markers, OZ51 and OZ55, could not be assigned to a specific sensory note found in
443 wines; however, their contribution to sensory differences via interactions could not be
444 discarded.

445 After 12 months of storage, although the sensory differences were minimized, the above
446 odorant markers (OZ37: sweet, chamomile tea; and OZ42: phenolic, fresh and
447 blackcurrant) continued being relevant, and could be related to the higher scores for

448 'candy/sweet' and 'black fruit', mainly in VIN-100. Meanwhile, differences in 'jammy
449 fruit' and 'red fruit' attributes may be related to the enhancer role of ethyl propanoate
450 and β -damascenone (VIN markers) via perceptive interactions, as described in the
451 literature (Lytra, Tempere, Le Floch, De Revel, & Barbe, 2013).

452 The interpretation of sensory data is much more complex, requiring the study of
453 interactions among components, currently a challenge for the scientific community. In
454 this sense, the holistic design of multivariate analysis could be a better approach for
455 relating the sensory and the analytical data. In the current study, the data fusion
456 approach (merging the different responses from different analytical sources) allowed to
457 evaluate the contribution of the sensorial and analytical data in the discrimination of the
458 samples. Thus, chemometric approach based on the *data fusion* enhanced our
459 understanding of the interpretation of sensory and aroma data in the discrimination of
460 the samples, elucidating new potential volatile markers and interaction effects.

461 **4. Conclusions**

462 VIN affected the sensorial properties of Syrah wines both at bottling and after 12
463 months of storage in bottle. However, after a multivariate analysis, the main source of
464 variability was seen to correspond to the storage factor and not to the treatment.

465 The ester compounds were slightly affected by the treatment with VIN after alcoholic
466 fermentation. Oxidation related compounds evolved similarly in the CT and VIN wines.
467 In contrast, increases were found in β -damascenone and isoeugenol in VIN wines.
468 Despite this, the CT and VIN-50 wines obtained a very similar taste score, while VIN-
469 100 got a lower score. The highest VIN dose (VIN-100) used seems to significantly
470 alter the aroma and taste of wines, especially at bottling.

471 Finally, the present study demonstrates that a grapevine-shoot extract with 29% of
472 stilbenes (Vineatrol) is able to replace SO₂ after alcoholic fermentation with no loss of

473 quality at the lowest dose used in the study, although some aroma compounds (β -
474 damascenone, isoeugenol), odorant zones (OZ37, OZ42, OZ51, OZ55) and astringency
475 increased in these wines. These changes implied differences at a sensory level, but not
476 necessarily a decrease in the overall quality of the wines. Future research into the long-
477 term evolution of those wines is required to confirm the suitability of the Vineatrol.
478 Additionally, an evaluation of the use of VIN when medium quality grapes are the raw
479 material is also needed.

480

481 **Acknowledgements**

482 The authors thank the INIA and FEDER for their financial support (RTA2015-00005-
483 C02 and AVA.AVA201601.03). The authors are grateful to Jean-Claude Izard
484 (Actichem) for kindly supplying Vineatrol[®] and to GESVAB for kindly supplying the
485 stilbene standards. Ruiz-Moreno thanks IFAPA and the European Social Funds (ESF)
486 2007-2013 “*Andalucía se mueve con Europa*” for the financial support towards her
487 contract.

488 **References**

- 489 Antalick, G., Perello, M.-C., & de Revel, G. (2014). Esters in wines: new insight
490 through the establishment of a database of French wines. *American Journal of*
491 *Enology and Viticulture*.
- 492 Antalick, G., Perello, M.-C., & de Revel, G. (2010). Development, validation and
493 application of a specific method for the quantitative determination of wine esters
494 by headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry.
495 *Food Chemistry*, 121(4), 1236-1245.

- 496 Antalick, G., Šuklje, K., Blackman, J. W., Meeks, C., Deloire, A., & Schmidtke, L. M.
497 (2015). Influence of grape composition on red wine ester profile: comparison
498 between Cabernet Sauvignon and Shiraz cultivars from Australian warm climate.
499 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(18), 4664-4672.
- 500 Baumes, R. L., Bayonove, C. L., Barillère, J.-M., Escudier, J. L., & Cordonnier, R.
501 (1988). La macération pelliculaire dans la vinification en blanc. Incidence sur la
502 composante volatile des moûts. *OENO One*, 22(3), 209-223.
- 503 Costello, P. J., & Henschke, P. A. (2002). Mousy off-flavor of wine: precursors and
504 biosynthesis of the causative N-heterocycles 2-ethyltetrahydropyridine, 2-
505 acetyltetrahydropyridine, and 2-acetyl-1-pyrroline by *Lactobacillus hilgardii* DSM
506 20176. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(24), 7079-7087.
- 507 Cuevas, F. J., Moreno-Rojas, J. M., Arroyo, F., Daza, A., & Ruiz-Moreno, M. J. (2016).
508 Effect of management (organic vs conventional) on volatile profiles of six plum
509 cultivars (*Prunus salicina* Lindl.). A chemometric approach for varietal
510 classification and determination of potential markers. *Food Chemistry*, 199, 479-
511 484.
- 512 Culleré, L., Fernández de Simón, B., Cadahía, E., Ferreira, V., Hernández-Orte, P., &
513 Cacho, J. (2013). Characterization by gas chromatography–olfactometry of the
514 most odor-active compounds in extracts prepared from acacia, chestnut, cherry, ash
515 and oak woods. *LWT - Food Science and Technology*, 53(1), 240-248.
- 516 Daniel, M. A., Elsey, G. M., Capone, D. L., Perkins, M. V., & Sefton, M. A. (2004).
517 Fate of damascenone in wine: the role of SO₂. *Journal of Agricultural and Food*
518 *Chemistry*, 52(26), 8127-8131.

- 519 Dravnieks, A. (1985). *Atlas of odor character profiles*. Philadelphia, PA: Astm Intl.
- 520 Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J., & Ferreira, V. (2007). Analytical
521 characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of
522 odor families and the concept of fruitiness of wines. *Journal of Agricultural and*
523 *Food Chemistry*, 55(11), 4501-4510.
- 524 Ferreira, V., Bueno, M., Franco-Luesma, E., Culleré, L., & Fernández-Zurbano, P.
525 (2014). Key changes in wine aroma active compounds during bottle storage of
526 Spanish red wines under different oxygen levels. *Journal of Agricultural and Food*
527 *Chemistry*, 62(41), 10015-10027.
- 528 Ferreira, V., Jarauta, I., López, R., & Cacho, J. (2003). Quantitative determination of
529 sotolon, maltol and free furaneol in wine by solid-phase extraction and gas
530 chromatography-ion-trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*,
531 1010(1), 95-103.
- 532 Ferreira, V., López, R., & Cacho, J. F. (2000). Quantitative determination of the
533 odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science*
534 *of Food and Agriculture*, 80(11), 1659-1667.
- 535 Ferreira, V., Sáenz-Navajas, M.-P., Campo, E., Herrero, P., de la Fuente, A., &
536 Fernández-Zurbano, P. (2016). Sensory interactions between six common aroma
537 vectors explain four main red wine aroma nuances. *Food Chemistry*, 199, 447-456.
- 538 Genovese, A., Gambuti, A., Piombino, P., & Moio, L. (2007). Sensory properties and
539 aroma compounds of sweet Fiano wine. *Food Chemistry*, 103(4), 1228-1236.
- 540 Guerrero, R. F., & Cantos-Villar, E. (2015). Demonstrating the efficiency of sulphur
541 dioxide replacements in wine: a parameter review. *Trends in Food Science &*

- 542 *Technology*, 42(1), 27-43.
- 543 La Guerche, S., Dauphin, B., Pons, M., Blancard, D., & Darriet, P. (2006).
544 Characterization of some mushroom and earthy off-odors microbially induced by
545 the development of rot on grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,
546 54(24), 9193-9200.
- 547 Lavigne, V., Pons, A., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (2008). Changes in the sotolon
548 content of dry white wines during barrel and bottle aging. *Journal of Agricultural
549 and Food Chemistry*, 56(8), 2688-2693.
- 550 Lisanti, M. T., Gambuti, A., Genovese, A., Piombino, P., & Moio, L. (2014). Earthy
551 off-flavour in wine: evaluation of remedial treatments for geosmin contamination.
552 *Food Chemistry*, 154, 171-178.
- 553 Liu, D., Xing, R. R., Li, Z., Yang, D. M., & Pan, Q. H. (2016). Evolution of volatile
554 compounds, aroma attributes, and sensory perception in bottle-aged red wines and
555 their correlation. *European Food Research and Technology*, 242(11), 1937-1948.
- 556 Luque-Rodríguez, J. M., Pérez-Juan, P., & Luque de Castro, M. D. (2006). Extraction
557 of polyphenols from vine shoots of *Vitis vinifera* by superheated ethanol–water
558 mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8775-8781.
- 559 Lytra, G., Tempere, S., Le Floch, A., De Revel, G., & Barbe, J. C. (2013). Study of
560 sensory interactions among red wine fruity esters in a model solution. *Journal of
561 Agricultural and Food Chemistry*, 61(36), 8504-8513.
- 562 Lytra, G., Tempere, S., Revel, G. De, & Barbe, J. C. (2012). Impact of perceptive
563 interactions on red wine fruity aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,
564 60(50), 12260-12269.

- 565 Marín, J., Zalacain, A., De Miguel, C., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2005). Stir bar
566 sorptive extraction for the determination of volatile compounds in oak-aged wines.
567 *Journal of Chromatography A*, *1098*(1-2), 1-6.
- 568 Panighel, A., & Flamini, R. (2014). Applications of solid-phase microextraction and gas
569 chromatography/mass spectrometry (SPME-GC/MS) in the study of grape and
570 wine volatile compounds. *Molecules*, *19*(12), 21291-21309.
- 571 Pardo-García, A. I., De La Hoz, K. S., Zalacain, A., Alonso, G. L., & Salinas, M. R.
572 (2014). Effect of vine foliar treatments on the varietal aroma of Monastrell wines.
573 *Food Chemistry*, *163*, 258-266.
- 574 Pereira, V., Cacho, J., & Marques, J. C. (2014). Volatile profile of Madeira wines
575 submitted to traditional accelerated ageing. *Food Chemistry*, *162*, 122-134.
- 576 Pineau, B., Barbe, J.-C., Van Leeuwen, C., & Dubourdieu, D. (2007). Which impact for
577 β -damascenone on red wines aroma? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,
578 *55*(10), 4103-4108.
- 579 Pineau, B., Barbe, J.-C., Van Leeuwen, C., & Dubourdieu, D. (2009). Examples of
580 perceptive interactions involved in specific “red-” and “black-berry” aromas in red
581 wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(9), 3702-3708.
- 582 Plutowska, B., & Wardencki, W. (2008). Application of gas chromatography-
583 olfactometry (GC-O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages - A
584 review. *Food Chemistry*, *107*(1), 449-463.
- 585 Pollnitz, A. P., Pardon, K. H., Sykes, M., & Sefton, M. A. (2004). The effects of sample
586 preparation and gas chromatograph injection techniques on the accuracy of
587 measuring guaiacol, 4-methylguaiacol and other volatile oak compounds in oak

588 extracts by stable isotope dilution analyses. *Journal of Agricultural and Food*
589 *Chemistry*, 52(11), 3244-3252.

590 Raposo, R., Ruiz-Moreno, M. J., Garde-Cerdán, T., Puertas, B., Moreno-Rojas, J. M.,
591 Gonzalo-Diago, A., Guerrero, R. F., Ortíz, V., Cantos-Villar, E. (2016).
592 Grapevine-shoot stilbene extract as a preservative in red wine. *Food Chemistry*,
593 *197, Part B*, 1102-1111.

594 Sáenz-Navajas, M.-P., Avizcuri, J.-M., Ballester, J., Fernández-Zurbano, P., Ferreira,
595 V., Peyron, D., & Valentin, D. (2015). Sensory-active compounds influencing
596 wine experts' and consumers' perception of red wine intrinsic quality. *LWT - Food*
597 *Science and Technology*, 60(1), 400-411.

598 Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2014). Vine-shoot
599 waste aqueous extracts for re-use in agriculture obtained by different extraction
600 techniques: phenolic, volatile, and mineral compounds. *Journal of Agricultural*
601 *and Food Chemistry*, 62(45), 10861-10872.

602 Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2016). Effect of
603 toasting on non-volatile and volatile vine-shoots low molecular weight phenolic
604 compounds. *Food Chemistry*, 204, 499-505.

605 Sánchez-Palomo, E., Gómez García-Carpintero, E., Alonso-Villegas, R., & González-
606 Viñas, M. A. (2010). Characterization of aroma compounds of Verdejo white
607 wines from the La Mancha region by odour activity values. *Flavour and*
608 *Fragrance Journal*, 25(6), 456-462.

609 Santos, M. C., Nunes, C., Rocha, M. A. M., Rodrigues, A., Rocha, S. M., Saraiva, J. A.,
610 & Coimbra, M. A. (2015). High pressure treatments accelerate changes in volatile

611 composition of sulphur dioxide-free wine during bottle storage. *Food Chemistry*,
612 188, 406-414.

613 Sarrazin, E., Dubourdieu, D., & Darriet, P. (2007). Characterization of key-aroma
614 compounds of botrytized wines, influence of grape botrytization. *Food Chemistry*,
615 103(2), 536-545.

616 Seisonen, S., Vene, K., & Koppel, K. (2016). The current practice in the application of
617 chemometrics for correlation of sensory and gas chromatographic data. *Food*
618 *Chemistry*, 210, 530-540.

619 Ugliano, M. (2013). Oxygen contribution to wine aroma evolution during bottle aging.
620 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(26), 6125-6136.

621 Ugliano, M., Travis, B., Francis, I. L., & Henschke, P. A. (2010). Volatile composition
622 and sensory properties of Shiraz wines as affected by nitrogen supplementation and
623 yeast species: rationalizing nitrogen modulation of wine aroma. *Journal of*
624 *Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12417-12425.

625

626 **FIGURE CAPTIONS**

627 **Figure 1.** Cobweb diagram of the sensory scores for Syrah wines as affected by
628 treatments (CT, VIN-50 and VIN-100) and storage in bottle (bottling and 12 months).

629 **Figure 2.** Scores plot, loadings plots and Variable importance in Projection values for
630 the partial least squares - discriminant analysis (PLS-DA) of the control (CT) and
631 Vineatrol (VIN) wines. A) Scores plot at bottling. Inverse red triangle for control wines
632 (CT) and green squares for Vineatrol wines (VIN). B) Loadings plot at bottling. C)

633 Scores plot for 12 months of storage in bottle. Inverse red triangle for control wines
634 (CT) and green squares for Vineatrol wines (VIN). D) Loadings plot at 12 months of
635 storage in bottle. E) VIP values for the bottling model. F) VIP values for the 12 months
636 of storage in bottle model.

637 *Foot notes:* Descriptors abbreviation; ALCO=Alcohol, ASTR=Astringency,
638 BALA=balanced, BITTE=Bitterness, BLACK=Black fruit, FLAV=Flavor intensity, O.
639 INTENS=Odour intensity, PERSIS=Persistence, QUAL=Global quality, RED=Red
640 fruit, JAMMY=jammy fruit.

641 **TABLES**

642 **Table 1.** Volatile compound content ($\mu\text{g/L}$) in Syrah wines as affected by treatments
643 (CT, VIN-50 and VIN-100) and storage in bottle (bottling and 12 months)

644 **Table 2.** Odorant zones found in Syrah wines as affected by treatments (CT, VIN-50
645 and VIN-100) and storage in bottle (bottling and after 12 months).

646 **SUPPLEMENTARY DATA**

647 **Supplementary Figure 1-** Hierarchical cluster analysis based on Ward's method of the
648 control (CT) and Vineatrol (VIN) wines.

649 **Supplementary Table 1.** Significant differences in esters, C13 norisoprenoids,
650 oxidation related compounds and vine shoot related compounds ($\mu\text{g/L}$) in Syrah wines
651 under treatments (CT, VIN-50 and VIN-100) and with storage in bottle (bottling and 12
652 months).

653 **Supplementary Table 2.** Gas chromatography retention data, identity, odorant
654 description, modified frequency (%) and significant differences in modified frequency
655 (%) in Syrah wines under treatments (CT, VIN-50 and VIN-100) and storage in bottle
656 (bottling and 12 months).

657 **Supplementary Table 3.** PLS-DA model statistics for Control (CT) and Vineatrol (VIN)
658 wines at bottling and after 12 months of storage in bottle.
659 **Supplementary Figure 1.** Hierarchical cluster data analysis.
660

Table(s)

Table 1.

Compound	Treatment				Storage			Interaction (TxS)
	CT	VIN-50	VIN-100	<i>p</i> -value	Bottling	12 months	<i>p</i> -value	<i>p</i> -value
Esters								
Ethyl butyrate	330	321	331	ns	318	336	ns	ns
Ethyl hexanoate	506	476	488	ns	509	472	ns	ns
Ethyl octanoate	400	381	352	ns	377	379	ns	ns
<i>ΣEEFAs</i>	1236	1167	1167	ns	1189	1191	ns	ns
Propyl acetate	34	32	32	ns	32	34	ns	ns
Isoamyl acetate	1761	1712	1654	ns	2041a	1377b	***	ns
Hexyl acetate	22a	20b	19b	**	32a	8.30b	***	**
Octyl acetate	0.06a	0.05b	0.04b	**	0.08a	0.02b	***	**
Phenylethyl acetate	71	66	64	ns	88a	46b	***	ns
<i>ΣHAAs</i>	1889	1830	1770	ns	2193a	1465b	***	ns
Ethyl isobutyrate	90	94	97	ns	49b	138a	***	ns
Ethyl 2-methylbutyrate	17	17	17	ns	13b	21a	***	ns
Ethyl isovalerate	31	30	30	ns	24b	36a	***	ns
Ethyl leucate	64	68	61	ns	54b	75a	**	ns
<i>ΣEEBAs</i>	201	210	206	ns	140b	271a	***	ns
Ethyl dihydrocinnamate	0.15	0.20	0.18	ns	0.20a	0.16b	*	ns
Ethyl cinnamate	0.19	0.19	0.20	ns	0.22a	0.17b	*	ns
<i>Σcinnamates</i>	0.34	0.40	0.38	ns	0.42a	0.32b	**	ns
Methyl hexanoate	1.7a	1.6b	1.5b	*	2.0a	1.18b	***	*
Methyl decanoate	0.19	0.18	0.16	ns	0.23a	0.12b	***	*
<i>ΣMEFAs</i>	1.9a	1.7b	1.7b	*	2.2a	1.3b	***	**
Isoamyl butyrate	0.36a	0.32b	0.31b	**	0.45a	0.20b	***	**
Isoamyl hexanoate	0.88a	0.67b	0.55b	**	1.10a	0.33b	***	**
Isoamyl octanoate	0.41	0.38	0.30	ns	0.50a	0.24b	***	ns
<i>ΣIEFAs</i>	1.65a	1.37b	1.16b	***	2.00a	0.78b	***	**
Ethyl propanoate	238b	270a	278a	*	182b	342a	***	ns
Isobutyl hexanoate	0.20a	0.17b	0.16b	**	0.26a	0.09b	***	**
<i>ΣMEs</i>	238b	270a	278a	*	182b	342a	***	ns
<i>ΣTotal Esters</i>	3568	3471	3432	ns	3709a	3271b	***	*
Non-Esters								
<i>C13 Norisoprenoids</i>								
β-Damascenone	1.12b	2.23a	2.22a	***	1.65	1.67	ns	ns
β-Ionone	0.12	0.11	0.09	ns	0.10	0.11	ns	ns
<i>Oxidation related compounds</i>								
Phenylacetaldehyde	4.5	5.0	4.5	ns	1.9b	7.3a	***	ns
Sotolon	nq	nq	nq		nd	nq		
<i>Vine shoot related compounds</i>								
Furfural	245	299	300	ns	293	270	ns	ns
5-Methylfurfural	20	24	25	ns	21	25	ns	ns
Guaiacol	22b	29a	31a	*	26	28	ns	ns
4-Methylguaiacol	1.2	1.3	1.4	ns	1.1b	1.5a	**	ns
<i>Z</i> -Whisky lactone	0.45	0.50	0.45	ns	0.40b	0.53a	**	ns
<i>E</i> -Whisky lactone	0.90b	1.10ab	1.25a	*	0.90b	1.27a	**	ns
Eugenol	1.50	1.70	1.60	ns	1.53	1.60	ns	ns
Isoeugenol	0.55c	1.20b	1.50a	***	1.03	1.10	ns	ns
Vanillin	56	58	59	ns	61	54	ns	ns

CT, SO₂ addition wine (50 mg/L); VIN-50, Vineatrol addition wine (50 mg/L of stilbenes); VIN-100 Vineatrol addition wine (100 mg/L of stilbenes). *ΣEEFAs*= ethyl esters of straight chain fatty acids; *ΣHAAs*= higher alcohol acetates; *ΣEEBAs*=ethyl esters of branched acids; *Σcinnamates* = cinnamates; *ΣMEFAs*= methyl esters of fatty acids; *ΣIEFAs*=isoamyl esters of fatty acids; *ΣMEs*= miscellaneous esters; *ΣTotal esters*= sum of total esters studied. nd, not detected (value<LOD=0.7 µg/L); nq, not quantified (value<LOQ=2.0 µg/L). Mean concentrations of volatile compounds are expressed in µg/L followed by different letters at *p*≤ 0.05 (fischer's LSD). Different significance groups considered. **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001; ns: no significant.

Table(s)

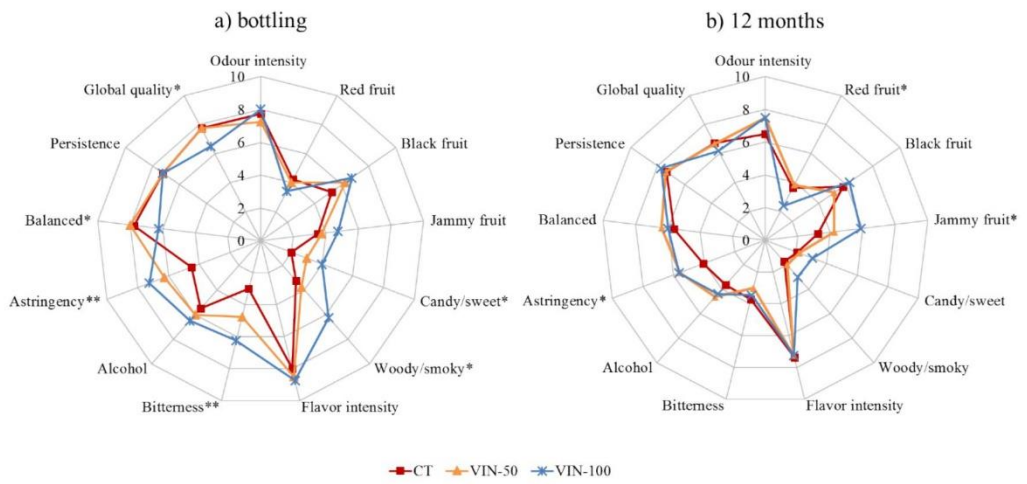
Table 2.

OZs	LRI		Compound	Descriptor	MF (%)						ΔMF (%)			
	DB-Wax	DB-5			Bottling		12 months		Bottling		12 months			
					CT	VIN-50	VIN-100	CT	VIN-50	VIN-100	VIN-50-CT	VIN-100-CT	VIN-50-CT	VIN-100-CT
10	1351	924	2-acetyl-1-pyrroline ²	popcorn, toasty bread	25	47	66	68	72	70	22	41	4	2
31	1850	1425	<i>trans</i> -1,10-dimethyl- <i>trans</i> -9-decalol (geosmin)	earthy	0	0	55	3	6	29	0	55	3	26
36	1991†	-	n.i	tobacco	0	10	42	14	30	46	10	42	16	32
37	2030	1271	n.i	sweet, chamomile tea	14	70	76	20	69	72	56	62	49	52
42	2122	1373	n.i	phenolic, fresh, blackcurrant	14	57	75	19	53	61	43	61	34	42
51	2462	1558	n.i	pine, fresh	7	56	60	10	56	69	49	53	46	59
55	-	1691†	n.i	citrus, almond	0	44	69	0	50	60	44	69	50	60

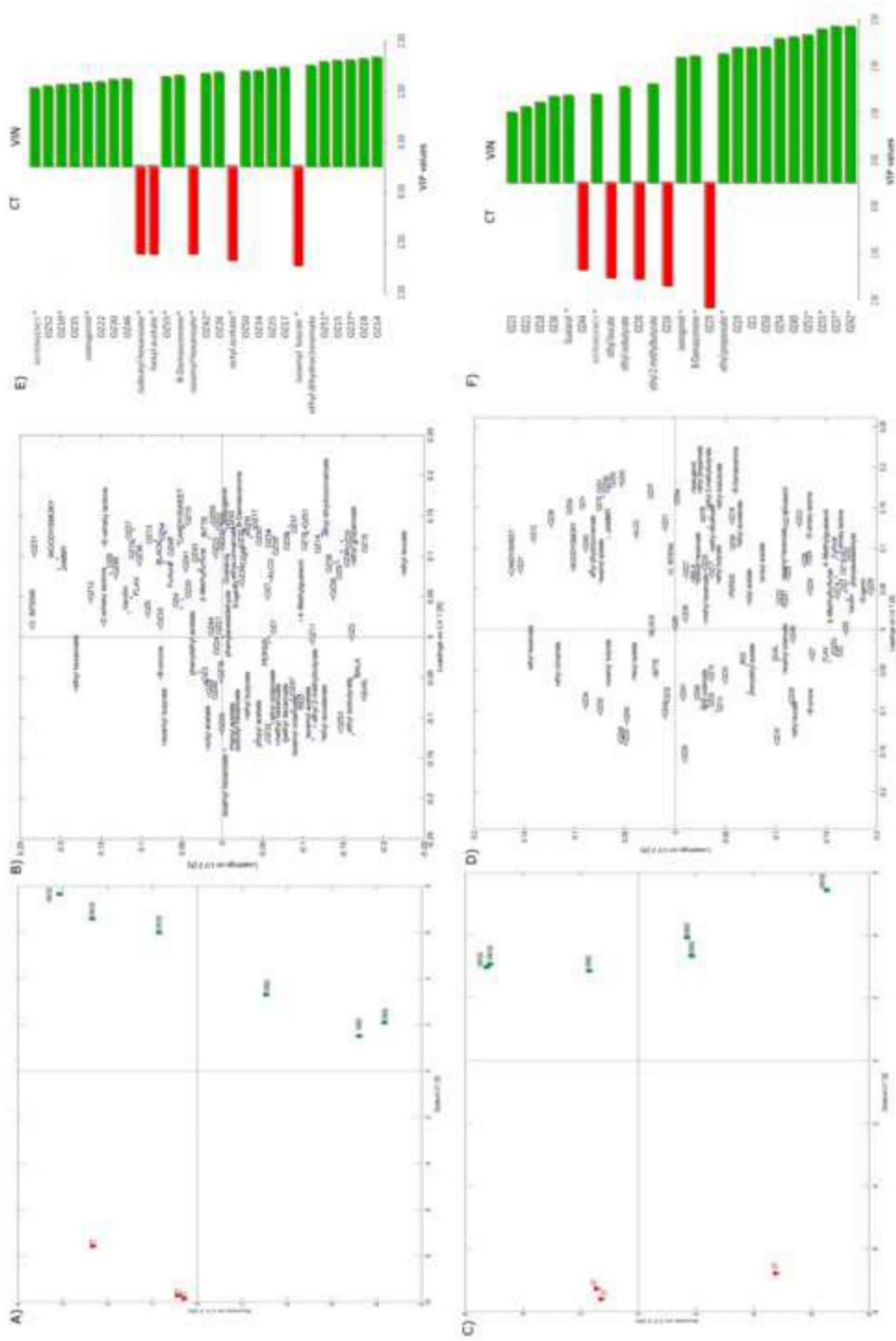
CT, SO₂ addition wine (50 mg/L); VIN-50, Vineatrol addition wine (50 mg/L of stilbenes); VIN-100 Vineatrol addition wine (100 mg/L of stilbenes). LRI, linear retention index; OZs, odorant zones; MF: modified frequency; ΔMF (%), difference in modified frequency between VIN50 and CT wines, at bottling and 12 months respectively.² Identification based on coincidence of chromatographic retention data on DB-WAX or DB-5 capillary column and on the similarity of odor previously reported. † MF (%) calculated on those capillary columns. n.i., compound not identified. Only the differences higher than 40% are highlighted in the text (bold numbers).

Figure(s)
[Click here to download Figure\(s\): Figure1_27Febrero.docx](#)

Figure 1.



Figure(s)
[Click here to download high resolution image](#)



Supplementary Table 1. Significant differences in esters, C13 norisoprenoids, oxidation related compounds and vine shoot related compounds ($\mu\text{g/L}$) in Syrah wines under treatments (CT, VIN-50 and VIN-100) and with storage in bottle (bottling and 12 months)

Compounds	Bottling			12 months			Interaction (TxS) <i>p</i> -value
	CT	VIN-50	VIN-100	CT	VIN-50	VIN-100	
Esters							
Ethyl butyrate	327	316	311	331	325	351	ns
Ethyl hexanoate	536	490	500	477	462	477	ns
Ethyl octanoate	400	379	352	401	385	353	ns
<i>ΣEEFAs</i>	1263	1161	1142	1209	1172	1191	ns
Propyl acetate	34	31	30	34	34	34	ns
Isoamyl acetate	2158	2047	1918	1365	1379	1389	ns
Hexyl acetate	36a	31b	29b	8.4c	8.0c	8.5c	**
Octyl acetate	0.11a	0.07b	0.06b	0.02c	0.02c	0.02c	**
Phenylethyl acetate	92	85	87	50	47	40	ns
<i>ΣHAAs</i>	2320	2194	2067	1457	1466	1472	ns
Ethyl isobutyrate	52	50	47	128	139	148	ns
ethyl 2-methylbutyrate	13.8	13.4	12.8	20.4	21.5	22.1	ns
Ethyl isovalerate	26	24	23	36	36	38	ns
Ethyl leucate	47	62	53	81	74	70	ns
<i>ΣEEBAs</i>	137	150	134	264	270	277	ns
Ethyl dihydrocinnamate	0.17	0.22	0.21	0.14	0.18	0.15	ns
Ethyl cinnamate	0.20	0.23	0.24	0.18	0.16	0.17	ns
<i>Σcinnamates</i>	0.37	0.45	0.45	0.32	0.34	0.32	ns
Methyl hexanoate	2.22a	1.98b	1.82b	1.18c	1.15c	1.22c	*
Methyl decanoate	0.28a	0.23b	0.19b	0.10c	0.12c	0.14c	*
<i>ΣMEFAs</i>	2.50a	2.20b	2.00b	1.29c	1.27c	1.36c	**
Isoamyl butyrate	0.51a	0.43b	0.41b	0.21c	0.21c	0.20c	**
Isoamyl hexanoate	1.44a	0.97b	0.79b	0.33c	0.37c	0.32c	**
Isoamyl octanoate	0.57	0.52	0.41	0.25	0.25	0.20	ns
<i>ΣIEFAs</i>	2.52a	1.91b	1.60b	0.79c	0.83c	0.72c	**
Ethyl propanoate	174	189	183	301	352	373	ns
Isobutyl hexanoate	0.30a	0.25b	0.23b	0.09c	0.09c	0.09c	**
<i>ΣMEs</i>	174	189	183	301	352	373	ns
<i>ΣTotalEsters</i>	3901a	3678b	3548b	3235c	3264c	3316c	*
C13-Norisoprenoids							
β -Damascenone	1.02	2.23	2.38	1.22	2.23	2.07	ns
β -Ionone	0.11	0.10	0.09	0.13	0.11	0.10	ns
Oxidation related compounds							
Phenyl acetaldehyde	1.9	1.9	1.9	7.0	8.0	7.0	ns
Sotolon	nd	nd	nd	nq	nq	nq	ns
Vine shoot related compounds							
Furfural	246	313	319	245	284	282	ns
5-Methylfurfural	17	23	22	23	24	27	ns
Guaiacol	21	29	27	22	32	30	ns
4-methylguaiacol	1.0	1.2	1.0	1.4	1.5	1.7	ns
Z-whisky lactone	0.40	0.40	0.40	0.50	0.60	0.60	ns
E-whisky lactone	0.70	0.90	1.10	1.10	1.30	1.40	ns
Eugenol	1.40	1.80	1.60	1.50	1.60	1.50	ns
Isoeugenol	0.60	1.20	1.30	0.50	1.20	1.60	ns
Vanillin	59	62	61	53	53	57	ns

CT, SO₂ addition wine (50 mg/L); VIN-50, Vineatrol addition wine (50 mg/L of stilbenes); VIN-100 Vineatrol addition wine (100 mg/L of stilbenes). Σ EEFAs= ethyl esters of fatty acids; Σ HAAs= higher alcohols acetates; Σ EEBAs= ethyl esters of branched acids; Σ cinnamates= cinnamates; Σ MEFAs= methyl esters of fatty acids; Σ IEFAs=isoamyl esters of fatty acids; Σ MEs= miscellaneous esters; Σ Total esters= sum of total ester studied. nd, not detected (value<LOD=0.7 $\mu\text{g/L}$); nq, not quantified

Supplementary Table 2. Gas chromatography retention data, identity, odorant description, modified frequency (%) and significant differences in modified frequency (%) in Syrah wines under treatments (CT, VIN-50 and VIN-100) and with storage in bottle (bottling and 12 months).

OZs	LRI		Compound	Descriptor	MF (%)						ΔMF (%) ≥ 40 (T-CT)			
	DB-WAX	DB-5			Bottling			12 months			Bottling		12 months	
					CT	VIN-50	VIN-100	CT	VIN-50	VIN-100	VIN-50-CT	VIN-100-CT	VIN-50-CT	VIN-100-CT
1	979	<700	2,3-butanodione ²	butter, caramel	78	79	77	67	72	73	1	-1	5	6
2	1035	752	isobutyl acetate ²	sweet	64	57	61	61	61	60	-7	-3	0	-1
3	1055	793	ethyl butyrate ¹	fruity	69	65	66	65	68	64	-4	-3	3	-1
4	1068	846, 850	ethyl 2-methylbutyrate ² + ethyl 3-methylbutyrate ²	fruity	67	66	69	68	70	69	-1	2	2	1
5	1096†	<700	isobutanol ¹	fusel, bitter, green	52	52	52	41	43	31	0	0	2	-10
6	1125	876	isoamyl acetate ¹	banana	54	55	62	44	41	39	1	8	-3	-5
7	1213	728	isoamyl alcohol ¹	fusel	84	86	85	82	81	81	2	1	-1	-1
8	1239	998	ethyl hexanoate ¹	fruity, strawberry, anise	79	77	78	67	69	68	-2	-1	2	1
9	1305	865	2-methyl-3-furanthiol ²	meaty	85	87	87	84	86	85	2	2	2	1
10	1351	924	2-acetyl-1-pyrroline²	popcorn, toasty bread	25	47	66	68	72	70	22	41	4	2
11	1357	897†	1-hexanol ¹	green, grass	55	44	53	60	69	58	-11	-2	9	-2
12	1361	940†	4-mercapto-4-methyl-2-pentanone ²	box tree	47	47	55	41	44	50	0	8	3	9
13	1389	855	Z-3-hexenol ¹	grass	53	56	61	51	46	49	3	8	-5	-2
14	1438	912	2-furfurylthiol ²	coffee	46	44	48	56	61	53	-2	2	5	-3
15	1435	1196	ethyl octanoate ¹	fruity	66	73	72	65	60	64	7	6	-5	-1
16	1446	<700	acetic acid ¹	vinegar	71	70	70	59	54	52	-1	-1	-5	-7
17	1464	906	methional ²	baked potatoes	68	73	72	68	69	70	5	4	1	2
18	1515	1153	Z-2-nonenal ² +E-2-nonenal ²	chlorine, green	76	82	80	72	77	76	6	4	5	4
19	1545	1164	3,5-diethyl-2-methylpyrazine ²	baked, sweet	59	62	68	66	73	76	3	9	7	10
20	1551	1098†	linalool ²	floral, muscat	55	55	58	47	34	41	0	3	-13	-6
21	1596	1156	(E,Z)-nona-2,6-dienal ²	cucumber	71	68	71	65	68	69	-3	0	3	4
22	1627	838?†	butyric acid ¹	cheese	83	88	90	82	85	85	5	7	3	3
23	1635	1013	2-acetylpyrazine ²	toasty, burnt	64	73	73	56	66	59	9	9	10	3
24	1653	1047	Phenylacetaldehyde ¹	honey	30	20	34	45	50	44	-10	4	5	-1
25	1669	803?	3-methylbutanoic acid ¹	cheese	85	86	86	83	86	87	1	1	3	4
26	1698	1416†	dodecanal ²	green, aldehyde-like	52	67	67	69	71	67	15	15	2	-2
27	1728	979	methionol ²	boiled potato	69	74	81	66	69	62	5	12	3	-4
28	1731	1252	3-mercaptopentyl acetate ²	box tree	60	67	62	57	52	50	7	2	-5	-7
29	1825	1263	phenethylacetate ²	roses	53	40	37	31	21	25	-13	-16	-10	-6
30	1831	1396	β-damascenone ²	sweet, apple	82	88	91	79	76	79	6	9	-3	0
31	1850	1425	trans-1,10-dimethyl-trans-9-decalol (geosmin)	earthy	0	0	55	3	6	29	0	55	3	26
32	1853	1133	3-mercaptopentanol ²	grapefruit	89	87	84	81	74	79	-2	-5	-7	-2
33	1864	1095	guaiaicol ²	phenolic, smoky	74	80	78	73	69	72	6	4	-4	-1
34	1894	1355	ethyl dihydrocinnamate ²	sweet, pleasant	67	71	72	59	54	59	4	5	-5	0
35	1923	1118	2-phenylethanol ¹	roses	86	86	83	76	69	77	0	-3	-7	1
36	1991†	-	n.i	tobacco	0	10	42	14	30	46	10	42	16	32
37	2030	1271	ni	sweet, chamomile tea	14	70	76	20	69	72	56	62	49	52
38	2043	1088	furaneol ²	caramel	79	82	81	74	74	77	3	2	0	3
39	2055	1293	4-ethylguaiaicol ²	clove	47	51	52	43	53	43	4	5	10	0
40	2057	1380	n.i	wet, unpleasant	79	77	80	75	66	73	-2	1	-9	-2
41	2083	1076-1088	p-cresol (m-cresol) ²	leather, animal	83	82	80	68	56	66	-1	-3	-12	-2
42	2122	1373	n.i	Phenolic, fresh, blackcurrant	14	57	75	19	53	61	43	61	34	42
43	2141	1455	ethyl cinnamate ²	flowery	67	70	71	67	65	67	3	4	-2	0
44	2171	1477	γ-decalactone ²	peach	71	71	71	62	56	66	0	0	-6	4
45	2203	1320	4-vinylguaiaicol ²	phenolic	72	75	78	72	73	75	3	6	1	3
46	2205	1129	sotolon ²	curry	87	91	91	85	85	85	4	4	0	0
47	2227	1490	δ-decalactone ²	coconut	47	47	44	42	45	39	0	-3	3	-3
48	2234†	1317	o-aminoacetophenone ²	sweet, smoky, flower, foxy	66	71	71	68	62	66	5	5	-6	-2
49	2300	1733	n.i	black pepper	60	62	75	48	65	67	2	15	17	19
50	2427	1669	δ-dodecalactone ²	fatty	24	42	48	22	45	60	18	24	23	38
51	2462	1558	n.i	pine, fresh	7	56	60	10	56	69	49	53	46	59
52	2488	1397	n.i	smoky	65	66	70	73	76	73	1	5	3	0

53	2553	1258	phenylacetic acid ¹	urine, sweet, floral	75	72	62	77	77	75	-3	-13	0	-2
54	2569	1411	vanillin ²	vanilla	64	71	79	52	69	68	7	15	17	16
55	-	1691	n.i	citrus, almond	0	44	69	0	50	60	44	69	50	60

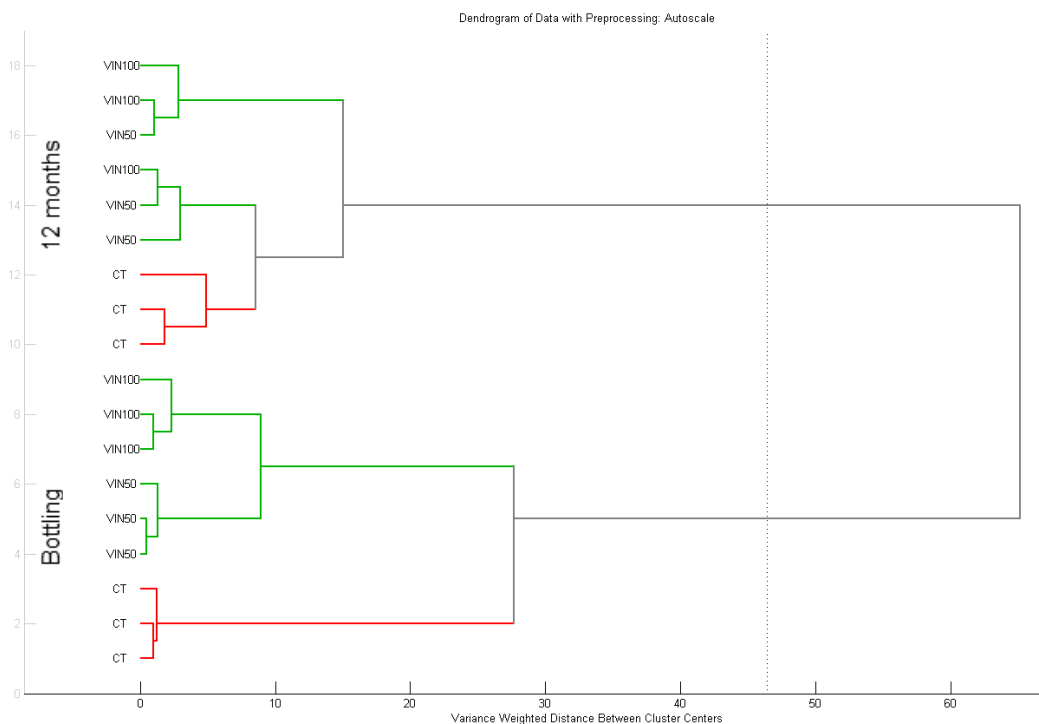
CT, SO₂ addition wine (50 mg/L); VIN-50, Vineatrol addition wine (50 mg/L stilbenes); VIN-100 Vineatrol addition wine (100 mg/L stilbenes). LRI, Linear retention index. OZs: odorant zones, MF: modified frequency; ΔMF (%), difference in modified frequency between VIN-50, VIN-100 and CT wines at bottling and 12 months. ¹ Identification based on coincidence of gas chromatography retention on both columns and mass spectrometric data with those of pure compounds available in the laboratory or with NIST mass spectrometric library data. ² Identification based on coincidence of chromatographic retention data on DB-WAX or DB-5 capillary columns and on the similarity of odor previously reported. † MF (%) calculated on that capillary columns. ni, not identified compound.

Supplementary Table 3. PLS-DA model statistics for Control (CT) and Vineatrol (VIN) wines at bottling and after 12 months of storage in bottle.

		Bottling		12 months	
		CT	VIN	CT	VIN
Model calibration	Sensitivity (%)	100	100	100	100
	Specificity (%)	100	100	100	100
	R ²	0.99	0.99	0.99	0.99
	RMSEC	0.02	0.02	0.04	0.04
Modelcross-validation	Sensitivity (%)	100	100	100	100
	Specificity (%)	100	100	100	100
	R ²	0.82	0.82	0.93	0.93
	RMSECV	0.20	0.20	0.14	0.14

RMSEC: Root mean squares error at calibration step; RMSECV: Root mean squares error at cross validation step.

Supplementary Figure 1



Discusión IV-4.1

Siguiendo el esquema de vinificación descrito en la *Figura 3.3* (sección III-2.6), se evaluó la optimización del extracto enriquecido en estilbenos como alternativa al SO₂ en la elaboración de vinos tintos mediante el método Ganimede. Se realizaron tres tratamientos: un testigo con SO₂ (CT) y dos tratamientos con Vineatrol (VIN-50 y VIN-100). Los ensayos se resumen en la *Tabla 4.17*

Tabla 4.17. Ensayos realizados en la vendimia 2014 en vinos Syrah elaborados mediante el método Ganimede

antioxidante	mg/L	nomenclatura	réplicas
Anhídrido sulfuroso	50	CT	3
Vineatrol	175*	VIN-50	3
Vineatrol	430**	VIN-100	3

* corresponden a 50 mg/L del total de estilbenos presentes en Vineatrol y una solubilidad del 99%

** corresponden a 100 mg/L del total de estilbenos presentes en Vineatrol y una solubilidad del 80%

PARTE 1.- Impacto del vineatrol en la calidad y seguridad del vino

El Vineatrol afectó a varios de los parámetros enológicos, color y compuestos fenólicos. Además, afectó a la evolución de éstos durante el almacenamiento en botella. A continuación, se detallan los cambios producidos.

❖ Las diferencias encontradas en los **parámetros enológicos**, fueron: etanol, extracto seco, concentración total de antocianos y taninos (*Publicación 7, Tabla 1*). Los vinos tratados con Vineatrol (VIN-50 y VIN-100) presentaron mayor contenido de etanol, mientras que el extracto seco fue significativamente mayor solo en vinos VIN-100. Como se ha comentado anteriormente, dada la baja solubilidad del extracto fue necesaria la disolución de este en alcohol vínico. Los vinos con Vineatrol mostraron menor contenido de antocianos totales (3% menos) y mayor contenido de taninos (13% más) que los vinos CT.

Después de 12 meses de embotellado, las diferencias en el contenido de antocianos y taninos se habían incrementado. La evolución de estos parámetros fue independiente del tratamiento.

Cabe destacar que, tras 12 meses de conservación en botella, la concentración de conservante disminuyó, especialmente en el caso del SO₂. La concentración de SO₂ disminuyó en un 62%, de acuerdo con otros autores (Ugliano et al.,

2012; Waterhouse et al., 2016). Mientras que la pérdida de estilbenos en los vinos elaborados con Vineatrol fue aproximadamente del 19%.

El Vineatrol afectó al **color** de los vinos, independientemente de la concentración utilizada (*Publicación 7, Tabla 2*). Los vinos elaborados con Vineatrol mostraron una mayor intensidad colorante (IC) y b^* , menor tonalidad, luminosidad (L^*) y porcentaje de amarillo (%Y) que los vinos CT. Además, los vinos elaborados con Vineatrol mostraron una alta proporción de pigmentos poliméricos (PP), mientras que los vinos CT mostraron una alta proporción de antocianinas copigmentadas (AC). Estos resultados pueden ser debidos a que el SO_2 reacciona con distintos compuestos tales como acetaldehído, ácido pirúvico, antocianinas y compuestos cinámicos, y por lo tanto, podría reducir la proporción de reacciones de polimerización (He et al., 2012b; Jackowetz & Mira de Orduña, 2013; Morata et al., 2006). De acuerdo con lo descrito en la literatura, después de doce meses de envejecimiento en botella, disminuyó la IC, porcentaje de rojo (%R), L^* , a^* , antocianinas libres (AF) y antocianinas copigmentadas (AC), mientras que aumentó la tonalidad, %Y, porcentaje de azul (%B) y pigmentos poliméricos (PP) (Atanasova et al., 2002; Bimpilas et al., 2016; Boido et al., 2006; Dobrei, Poiana, Sala, Ghita, & Gergen, 2010; García-Puente Rivas, Alcalde-Eon, Santos-Buelga, Rivas-Gonzalo, & Escribano-Bailón, 2006; Heras-Roger, Pomposo-Medina, Díaz-Romero, & Darías-Martín, 2014; Hermosín-Gutiérrez et al., 2005). Si bien, los vinos con Vineatrol mostraron una evolución de la mayoría de estos parámetros del color distinta a CT (*Publicación 7, Tabla 2, interacción TxS*). Los vinos CT mostraron una mayor disminución de L^* y aumento de b^* . Además, mientras que en los vinos con Vineatrol disminuyó la IC, en los vinos CT aumentó, posiblemente debido al consumo de SO_2 durante el almacenamiento en botella, que conlleva la liberación de las antocianinas del SO_2 expresando el color rojo de su forma catión flavilium (He et al., 2012a). Todos los vinos mostraron un aumento de PP, aunque éste fue más marcado en los vinos VIN que en los CT (28% vs 18%). Respecto a AF, su concentración se mantuvo constante en los vinos CT, mientras que disminuyó en los vinos con Vineatrol (17% más bajo) respecto al embotellado.

❖ El análisis cromatográfico permitió la identificación de 28 antocianinas (*Figura 4.9*). Los vinos elaborados con Vineatrol mostraban diferencias en el contenido de antocianinas libres, piranoantocianinas (vitisinas tipo A y tipo B y las vinil-piranoantocianinas) y dímeros de enlace directo o a través de puentes

etilo, independientemente de la concentración utilizada (*Publicación 7, Tabla 3*). Así, se observó que las concentraciones de antocianinas en sus formas glucósido, acetilglucósido, cumaroilglucósido y cafeoilglucósido y de vitisinas tipo A fueron inferiores en los vinos con Vineatrol respecto a los vinos CT. Sin embargo, la presencia de Vineatrol favoreció la formación de las vitisinas tipo B, en especial pinotina A, y las vinil-piranoantocianinas. Estas diferencias pueden ser debidas a que, (i) la presencia de SO₂ en vinos CT bloquee la posición C4 en el anillo-C de las antocianinas en el catión flavilium dificultando la polimerización de las antocianinas libres y la formación de vinil-piranoantocianinas (de Freitas & Mateus, 2011; Fulcrand et al., 2006; He et al., 2012b; Picinelli, Bakker, & Bridle, 1994; M. Schwarz et al., 2004); (ii) el SO₂ se une a otros compuestos presentes en el vino, principalmente al acetaldehído, y en menor medida ácido pirúvico, compuestos claves en la formación de vitisinas tipo B y tipo A, respectivamente (Jackowetz & Mira de Orduña, 2013); (iii) la reacción de malvidina-3-glucósido con ácido pirúvico es menos favorecida que ésta con el acetaldehído, por lo tanto, el SO₂ afecta menos a la formación de las vitisinas tipo A (Morata et al., 2007); (iv) en el caso concreto de Pinotin A, la formación de ésta se ve favorecida cuando la relación cafeico/malvidina-3-glucósido es mayor, hecho que sucede en los vinos tratados con Vineatrol, donde la concentración de cafeico es mayor y de malvidina-3-glucósido es menor que en vinos CT (*Publicación 7, Tablas 3 y 4*).

De acuerdo con otros autores, con el envejecimiento se produjo una disminución de las antocianinas monoglucósidos y un aumento de las piranoantocianinas y dímeros por condensación directa o a través de puentes etilo (Alcalde-Eon et al., 2006; Asenstorfer et al., 2003; Boido et al., 2006; Monagas, Gómez-Cordovés, et al., 2005; Rentzsch et al., 2007). Una de las causas de esta disminución es la incorporación de las antocianinas a nuevos derivados, como las piranoantocianinas. Compuestos que son más resistentes a los cambios de pH, al blanqueamiento por el SO₂ y a la degradación oxidativa. Así, estos compuestos tienen una importante contribución a la estabilidad del color de los vinos tintos (García-Puente Rivas et al., 2006; Håkansson, Pardon, Hayasaka, de Sa, & Herderich, 2003). Sin embargo, la evolución de estos compuestos fue distinta dependiendo del tratamiento. Los vinos con Vineatrol mostraron un mayor descenso del % de antocianinas monoméricas (6.5% menos vs 3.4% menos en vinos CT), mayor aumento de piranoantocianinas (4.9% vs

2.4%) y de dímeros de enlace directo y/o mediante puentes etilo (1.7% vs 1.0% *Tabla 3 Publicación 7*). El hecho de que los vinos elaborados con Vineatrol muestren una mayor concentración de los piranoantocianinas tanto en el embotellado como a los doce meses justifica la estabilidad del color encontrada en los parámetros de color descritos en los vinos tratados con Vineatrol.

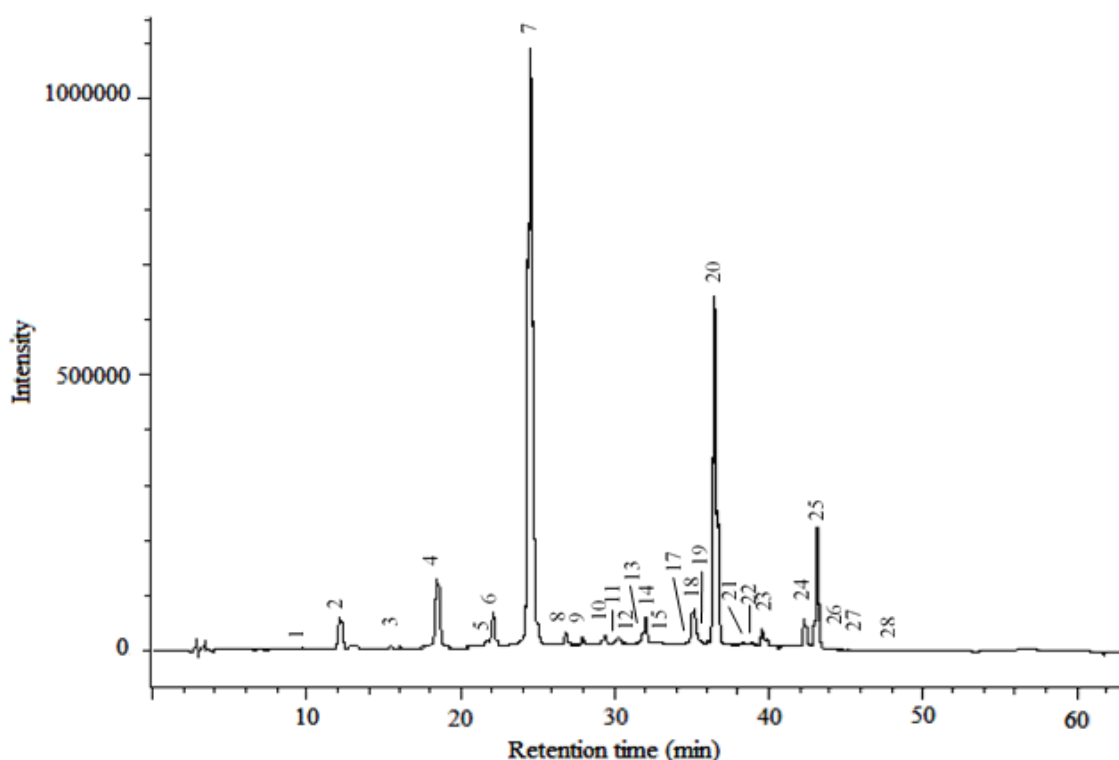


Figura 4.9. Perfil cromatográfico obtenido por HPLC-DAD de las antocianinas determinadas en el vino.

Simbología: 1) malvidina-3-O-glucosido(epi)catequina, 2) delphinidina-3-O-glucosido, 3) cianidina-3-O-glucosido, 4) petunidina-3-O-glucosido, 5) petunidina-3-O-glucosido-ácido pirúvico, 6) peonidina-3-O-glucosido, 7) malvidina-3-glucosido, 8) delphinidina-3-O-acetilglucosido, 9) malvidina-3-O-glucosido-ácido pirúvico, 10) malvidina-3-O-glucosido-acetaldehído, 11) cianidina-3-O-acetilglucosido, 12) malvidina-3-O-acetilglucosido-ácido pirúvico, 13) malvidina-3-O-glucosido-etil(epi)catequina isomero1, 14) petunidina-3-O-acetilglucosido, 15) malvidina-3-O-acetilglucosido-acetaldehído, 16) malvidina-3-O-glucosido-etil(epi)catequina isomero2, 17) delphinidina-3-O-coumaroilglucosido 18) peonidina-3-O-acetilglucosido, 19) malvidina-3-O-coumaroilglucosido-ácido pirúvico, 20) malvidina-3-O-acetilglucosido, 21) cianidina-3-O-coumaroilglucosido, 22) malvidina-3-O-cafeoilglucosido, 23) petunidina-3-O-coumaroilglucosido, 24) peonidina-3-O-coumaroilglucosido, 25) malvidina-3-O-coumaroilglucosido, 26) malvidina-3-O-glucosido-4-vinilcatecol, 27) malvidina-3-O-glucosido-4-vinil(epi)catequina, 28) malvidina-3-O-glucosido-4-vinilfenol

❖ El uso de Vineatrol también afectó al contenido de compuestos fenólicos no antocianínicos estudiados: ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos y flavanoles (*Publicación 7, Tabla 4*). La concentración del total de ácidos hidroxibenzoicos siguió el orden VIN-100 > VIN-50 > CT. Mientras que la

concentración total de ácidos hidroxicinámicos y flavanoles fue significativamente mayor en los vinos VIN-100, sin encontrarse diferencias entre CT y VIN-50. No se encontraron diferencias en la concentración de flavonoles.

La evolución de estos compuestos fenólicos fue distinta dependiendo del tratamiento (*Publicación 7, Tabla suplementaria*). El contenido total de polifenoles no antociánicos decreció un 24% en vinos CT, 1% en VIN-50, mientras que en los vinos VIN-100 se mantuvo constante con el tiempo. Estos resultados sugieren que el Vineatrol a altas dosis protege a estos compuestos de la oxidación.

❖ En relación a la seguridad de los vinos se determinaron: aminas biogénicas y estabilidad microbiológica. No se encontraron diferencias en el contenido de aminas biogénicas entre los vinos y, además, las concentraciones se encontraron dentro del rango de los vinos tintos (Smit, Du Toit, & Du Toit, 2008). Con respecto a la estabilidad microbiológica, no se observaron diferencias tras el filtrado de los vinos en el recuento de levaduras y bacterias lácticas y acéticas. Por lo tanto, los vinos elaborados con Vineatrol pueden ser considerados microbiológicamente estables y seguros.

❖ La relación entre todos los parámetros del color, compuestos polifenólicos y aminas biogénicas, así como la evolución de éstos, fue estudiada a través de un análisis multivariante. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de componentes principales (PCA). Detalles del análisis se resume en la *Figura 4.10* donde se representan cada uno de los vinos de acuerdo al PCA generado, así como las variables con más peso en cada componente principal (PC) obtenida. El modelo de PCA generado permitió agrupar los vinos de acuerdo al tratamiento y etapa del proceso. La PC1 (que explica el 62.1% de la variabilidad) discriminó entre embotellado (valores positivos) y 12 meses (valores negativos). Mientras que el PC2 (que explica el 21.8% de la variabilidad) diferenció entre VIN-50 y VIN-100 (valores negativos) y CT (valores positivos).

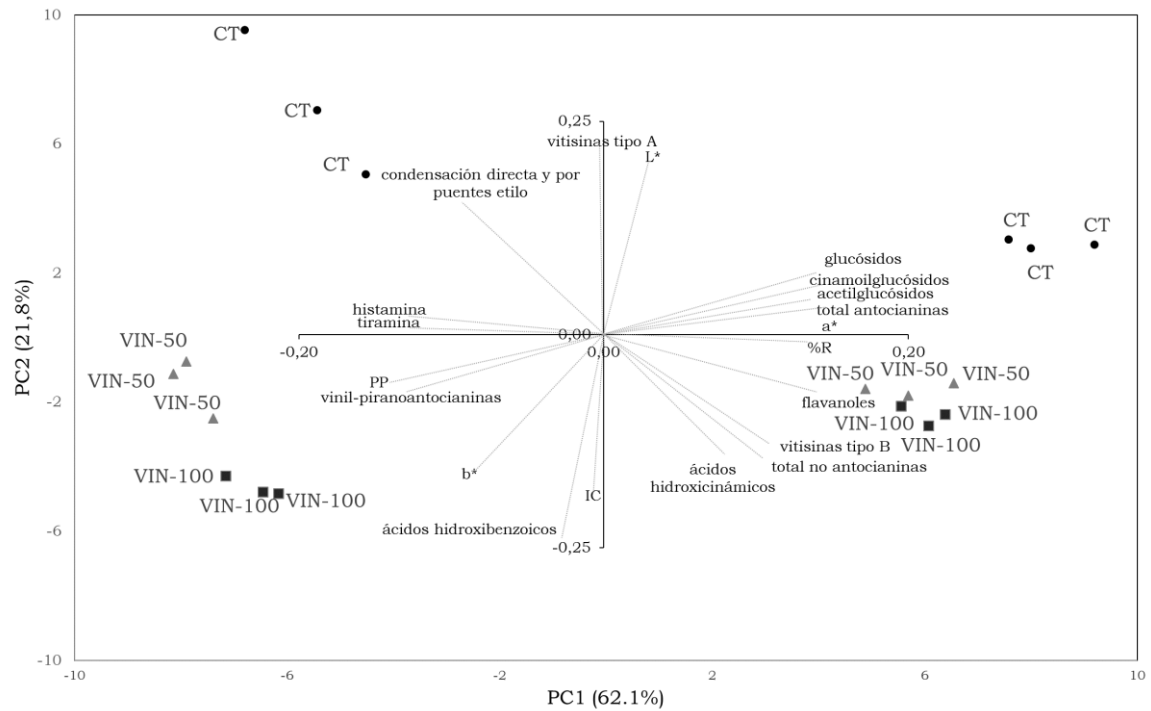


Figura 4. 10. Análisis de componentes principales en vinos Syrah

En resumen, el extracto de madera de poda rico en estilbenos (Vinatrol) utilizado en la elaboración de vinos tintos mejora las propiedades cromáticas y el perfil polifénolico con respecto a los vinos tratados con SO_2 . El Vinatrol, independientemente de la dosis, disminuyó el contenido de antocianinas monoméricas, y aumentó el contenido de compuestos que estabilizan el color de los vinos, tales como vitisinas tipo B y vinyl-piranoantocianinas. Esto se reflejó en una mejora en el color de los vinos elaborados con Vinatrol. Por otra parte, la evolución de los vinos fue diferente dependiendo del tratamiento. Los vinos elaborados con Vinatrol parecen promover la estabilización del color (mayor grado de formación de vinyl-piranoantocianinas) y la conservación de compuestos fenólicos no antociánicos, especialmente los vinos VIN-100. Esto también podría ser debido a la baja pérdida de Vinatrol (estilbenos) durante el almacenamiento en botella, en contraste con lo observado para el SO_2 .

En conclusión, el presente estudio demuestra que el uso de un extracto de madera de poda con 30% de estilbenos (Vinatrol®) como conservante es capaz de garantizar la seguridad y estabilidad en vinos tintos con buenos parámetros cromáticos y perfil fenólico, a partir de dosis moderadas (50 ppm de estilbenos).

PARTE 2.- Impacto del vineatrol en la composición volátil de los vinos

Con objeto de profundizar en el estudio del Vineatrol como una alternativa real al SO₂ en la elaboración de vinos tintos, se procedió a la caracterización de los componentes relacionados con el aroma y el análisis sensorial de los vinos elaborados con Vineatrol. Se realizó un amplio estudio de los ésteres y otros compuestos importantes en el aroma del vino (compuestos relacionados con aromas varietales, con procesos de oxidación y con extractos de madera de poda de la vid) y su relación con el análisis olfatométrico y sensorial de los vinos.

❖ Con respecto a los ésteres, la adición de Vineatrol e independientemente de la dosis utilizada, no modificó el contenido total de ésteres, aunque sí afectó al contenido de varios ésteres. De los 21 ésteres cuantificados, 6 de ellos presentaron menor concentración en los vinos con Vineatrol que en los vinos CT (acetato de hexilo, acetato de octilo, hexanoato y decanoato de metilo, butirato y hexanoato de isoamilo y hexanoato de isobutilo). Sólo el propanoato de etilo (fresa madura) fue significativamente mayor en los vinos elaborados con Vineatrol (*Publicación 8, Tabla 1*).

Con el envejecimiento se produjo un aumento de los ésteres etílicos de ácidos grasos ramificados (EEBAs), probablemente debido a procesos de esterificación (Liu, Xing, Li, Yang, & Pan, 2016; Santos et al., 2015). La evolución de los ésteres con el envejecimiento en botella en todos los vinos estaba en concordancia con lo descrito en la literatura (Antalick et al., 2014; Liu et al., 2016). Varios autores han descrito que altas cantidades de propanoato, isobutanoato y 2-metilbutanoato de etilo, se relacionan con notas a fruta negra y fruta madura (Pineau et al., 2009). Respecto a otros compuestos volátiles analizados, la adición de Vineatrol aumentó la concentración de la β-damascenona (manzana asada), guaiacol (fenólico, ahumado, tostado), E-whiskylactona (coco) e isoeugenol (madera, dulce), los dos últimos compuestos aumentaron especialmente en los vinos VIN-100. La menor concentración de β-damascenona en CT puede ser debido a que el SO₂ se une a ésta, dando lugar a un derivado de ácido sulfónico inodoro (Daniel, Elsey, Capone, Perkins, & Sefton, 2004). Recientemente se ha descrito que los C-13 norisoprenoides (β-damascenona y β-ionona) tienen una influencia positiva con notas a frutas pasa y negra y caramelo/tostado y ejercen un efecto supresor sobre las notas a frutas rojas (Ferreira et al., 2016). Por otra parte, dado que la fermentación fue común

a todos los vinos y que no estuvieron en contacto con madera, la mayor presencia de guaiacol, *E*-whiskylactona e isoeugenol en los vinos elaborados con Vineatrol puede ser una consecuencia directa del uso del Vineatrol. Se ha descrito que los extractos procedentes de madera de poda pueden contener ácido vanílico, a partir del cual y por descarboxilación dar lugar a guaiacol (Luque-Rodríguez, Pérez-Juan, & Luque de Castro, 2006). Recientemente, otros autores han descrito que los extractos de madera de poda contienen *E*-whiskylactona e isoeugenol (Sánchez-Gómez, Zalacain, Alonso, & Salinas, 2014, 2016). Sin embargo, todos estos compuestos estaban por debajo de su umbral de percepción, por lo que se puede suponer que no tendrán impacto en el análisis sensorial de los vinos.

Un hecho a destacar es que no se encontraron diferencias en los compuestos relacionados con la oxidación, 2-fenilacetaldehído y sotolon (Ugliano, 2013) entre vinos tratados con Vineatrol (VIN-50 y VIN-100) y con SO₂ (CT).

Con el tiempo de envejecimiento y de acuerdo a lo descrito en la literatura, varios compuestos aumentaron su concentración: 2-fenilacetaldehído (notas a miel), sotolon (curry), 4-metilguaiacol (especiado, fenólico) y las *Z*- y *E*-whiskylactonas (madera, coco) (V. Ferreira et al., 2001; Moreira, Lopes, Ferreira, Cabral, & de Pinho, 2016; Pereira, Cacho, & Marques, 2014; Soares da Costa et al., 2004). A excepción del 2-fenilacetaldehído (1 µg/L, Sarrazin et al., 2007), estos compuestos se encontraron por debajo de su umbral de percepción (sotolon 5 µg/L, (Guth, 1997); 4-metilguaiacol 31 µg/L, (Mayr, Geue, Holt, Pearson, & Francis, 2014); *Z*- y *E*-whisky lactonas 24 µg/L y 172 µg/L respectivamente, (Brown, Sefton, Taylor, & Elsey, 2006). Todos los compuestos evolucionaron de igual modo durante el envejecimiento en botella, independientemente del tratamiento (*Publicación 8, Tabla suplementaria 1*).

❖ Respecto al **análisis olfatométrico**, la adición de Vineatrol modificó el perfil olfatométrico de los vinos (*Publicación 8, Tabla 2*). En el embotellado, los vinos Vineatrol se detectaron 7 zonas odorantes con una ΔFM (%) ≥ 40, dependiendo de la dosis usada. Cuatro zonas, las cuales no pudieron ser identificadas, aumentaron independientemente de la dosis de Vineatrol: la **ZO-37** (dulce, manzanilla), **ZO-42** (fenólico, fresco, grosella), **ZO-51** (pino, fresco) y la **ZO-55** (cítrico, almendra). Tres zonas aumentaron más de un 40% respecto a CT exclusivamente en VIN-100: la **ZO-10** fue tentativamente identificada como

2-acetil-1-pirrolina (palomitas); la **ZO-31** tentativamente identificada como geosmin (terroso); y la **ZO-36** con el descriptor a tabaco y cuyo compuesto responsable no pudo ser identificado. Las zonas 31 y 36 aparecieron únicamente a alta dosis de Vineatrol (VIN-100), mientras que en CT y VIN-50 no aparecieron. Los compuestos relacionados con la zona 10 y la 31 son considerados no deseables en vinos (Costello & Henschke, 2002; Lisanti, Gambuti, Genovese, Piombino, & Moio, 2014).

Después de doce meses de embotellado, las diferencias entre los vinos con Vineatrol y CT disminuyeron, especialmente aquellas zonas considerables no deseables.

❖ La adición de Vineatrol modificó al **perfil sensorial** de los vinos, en especial a altas concentraciones (VIN-100) (*Publicación 8, Figura 1*). En el embotellado, los vinos VIN-100 destacaron significativamente por presentar altas puntuaciones en los atributos caramelo/dulce y madera/ahumado. Además, los vinos VIN-100 también destacaron por presentar altas puntuaciones en los atributos fruta negra y mermelada, aunque las diferencias no fueron significativas para estos atributos. Sin embargo, los vinos tratados con Vineatrol, a ambas concentraciones estudiadas, destacaron por una alta astringencia y amargor en boca, especialmente los vinos VIN-100. Estas diferencias en boca y nariz dieron lugar a que los vinos VIN-100 obtuvieran las peores puntuaciones en equilibrio y calidad global. No se encontraron diferencias significativas en nariz, equilibrio y calidad global entre VIN-50 y CT.

Después de doce meses de envejecimiento en botella, los vinos VIN-100 destacaron significativamente por presentar mayores puntuaciones en mermelada y peores puntuaciones en fruta roja. Además, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los vinos, los VIN-100 también destacaron por presentar altas puntuaciones en los atributos fruta negra, caramelo/dulce y madera/ahumado. Los vinos elaborados con Vineatrol destacaron de nuevo por presentar una alta astringencia en boca. Aunque no se encontraron diferencias en equilibrio, persistencia y calidad global.

El análisis sensorial corrobora los datos obtenidos en el estudio de la composición volátil, observándose además el posible efecto aditivo que tiene lugar entre compuestos que comparten características químicas, aromáticas y, muy a menudo, también rutas de biosíntesis, tales como los ésteres etílicos de

ácidos grasos (etil propanoato, isobutirato de etilo y el 2-metilbutanoato de etilo) (Jarauta, Ferreira, & Cacho, 2006), potenciando el atributo fruta negra en los vinos VIN-100 a los doce meses de embotellado y la supresión del atributo fruta roja por parte de la β -damascenona.

❖ La relación entre la composición volátil, perfil olfatométrico y análisis sensorial, en el embotellado y a los doce meses de almacenamiento, fue estudiada a través de un análisis multivariante (PLS-DA). Este análisis pudo diferenciar entre los distintos tratamientos (Vineatrol y SO₂), tanto en el embotellado como a los doce meses de almacenamiento. Se obtuvieron dos factores latentes (FL) para cada fase de envejecimiento. En el embotellado, la FL1 (explicó el 54% de la variabilidad) consiguió diferenciar los vinos con SO₂ (CT) y con Vineatrol, mientras que la FL2 distinguió entre los VIN-50 y VIN-100.

Los datos obtenidos del análisis PLS-DA, junto con los principales contribuyentes/marcadores para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento obtenidos a través de la utilización de la Importancia de la Variable para la proyección (VIP, considerando un valor mayor de VIP > 1.5) y en conjunción con los análisis realizados permiten concluir que los vinos elaborados con Vineatrol se caracterizaron, independientemente del tiempo en botella, (i) por la sensación astringente en boca, (ii) por la presencia de dos compuestos volátiles de la β -damascenona, isoeugenol y (iii) las zonas odorantes la ZO-37 (dulce, manzanilla) y ZO-42 (fenólico, grosella), OZ51 (pino, fresco), OZ 35 (cítrico, almendra).

Por su parte los vinos CT en el embotellado se caracterizaron principalmente por hexanoato de isobutilo, acetato de hexilo, acetato de octilo, hexanoato y butirato de isoamilos. Mientras que a los 12 meses no mostraron ningún marcador.

En resumen, el extracto de madera de poda rico en estilbenos (Vineatrol) utilizado en la elaboración de vinos tintos afectó a algunos compuestos volátiles, olfatometría y análisis sensorial. El Vineatrol, aunque no afectó a la mayoría de los compuestos volátiles, afectó principalmente a la concentración de β -damascenona e isoeugenol, y la aparición y/o aumento de zonas odorantes, que en sinergia modularon el aroma y la complejidad aromática de los vinos elaborados con Vineatrol, caracterizando a los vinos con atributos a fruta negra, mermelada, madera/ahumado y caramelo/dulce y la disminución de las notas a frutos rojos. Además, la utilización de Vineatrol produjo un aumento de la astringencia en boca. Si bien, estas diferencias se fueron mitigando con el tiempo de embotellado, especialmente en VIN-50. Todo en conjunción, permite concluir que los vinos CT y VIN-50 fueron parecidos, diferenciándose negativamente el VIN-100. Por tanto, la dosis VIN-100 parece ser excesiva y afectar a la calidad del vino, mientras que la dosis VIN-50 puede considerarse adecuada.

En conclusión, el presente estudio demuestra que el uso de extracto de madera de poda con 30% de estilbenos (Vineatrol®) como conservante y a una dosis moderada es capaz de garantizar la calidad y aumentar la complejidad aromática de los vinos y preservarlos durante los doce meses de almacenamiento en botella.

CAPITULO V
CONCLUSIONES

A continuación, se enumeran las principales conclusiones obtenidas en la tesis doctoral, de acuerdo a los objetivos inicialmente establecidos.

Primera:

La caracterización de un extracto rico en hidroxitirosol (HT) y otro rico en polifenoles, procedentes de subproductos de la industria oleícola y vitícola respectivamente, permitió concluir su no idoneidad para uso en vinificación como alternativas al SO₂. A pesar de sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, el perfil olfatómico de los mismos denotó que ambos podrían modificar el análisis sensorial en vinos

Segundo:

La utilización de los productos ricos en hidroxitirosol en la elaboración de vinos tintos, dio lugar a vinos con parámetros dentro de los límites legales y buenos parámetros del color. Sin embargo, con el envejecimiento en botella estos vinos presentaron parámetros relacionados con oxidación (color, composición volátil, perfil olfatómico y el análisis descriptivo). Estos parámetros se vieron más afectados en la elaboración mediante el tradicional que en cuando se utilizó el sistema Ganimede. Por tanto, se concluye que los productos ricos en HT probados en este estudio no son una alternativa real al SO₂ en la elaboración de vinos tintos.

Tercero:

La utilización de los productos ricos en hidroxitirosol en la elaboración de vinos blancos afecta de forma importante al color de los vinos y análisis sensorial desde el momento de la adición de los extractos. Además, con el envejecimiento, e independientemente del método de elaboración, los vinos tratados con productos de HT evolucionaron más rápidamente. Además, los productos ricos en hidroxitirosol disminuyeron el carácter varietal de Sauvignon blanc. Por tanto, al igual que en los vinos tintos, se concluye que, los productos ricos en HT probados en este estudio, no son una alternativa real al SO₂.

Cuarto:

La utilización de un extracto procedente de madera de poda (Vineatrol®) en la elaboración de vinos tintos a una dosis baja produjo vinos con buenos parámetros de calidad (color, volátiles y análisis sensorial) en el embotellado.

Sin embargo, el extracto no consiguió evitar los procesos de oxidación durante en el envejecimiento en botella, especialmente cuando los vinos fueron elaborados por el método tradicional. Se concluye la necesidad de optimizar la dosis de Vineatrol para evitar dicha evolución en botella.

Quinto:

La utilización de un extracto procedente de madera de poda (Vineatrol®) en la elaboración de vinos blancos a una dosis baja afectó de forma negativa al color de los vinos y disminuyó el contenido de ésteres. Además, introdujo nuevas zonas odorantes y modificó el análisis sensorial de los vinos. Tras el envejecimiento en botella, aparecieron notas a oxidado, especialmente en los vinos elaborados por el método tradicional. El Vineatrol, a la dosis empleada, no parece ser eficiente como alternativa al SO₂ en vino blanco.

Sexto:

La adición de Vineatrol en vinos tintos tras la FA a dosis mayores a la utilizada en experimentos anteriores mejoró las características cromáticas y perfil polifenólico de los vinos embotellados. Además, durante doce meses de envejecimiento en botella los vinos tratados con Vineatrol poseían mayor estabilidad del color (debido a la mayor proporción de proantocianidinas) y mayor concentración de compuestos polifenólicos no antociánicos. Estos vinos también mostraron una mayor concentración de β-damascenona, guaiacol, isoeugenol, así como de algunas zonas odorantes. Lo que se pudo relacionar con los atributos dulce, madera y mermelada encontrados en cata, gracias a un análisis multivariante. La dosis más alta se descartó por presentar algunos *off-flavor* y obtener menor puntuación global en cata. Mientras que la dosis más baja de este estudio puede ser recomendada como óptima. Si bien fue diferente de los vinos elaborados con SO₂ (CT) su calidad global fue la misma. Además, en este estudio se determinaron los marcadores del Vineatrol.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Abee, T., Krockel, L., & Hill, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology*, 28(2), 169-185.
- Alañón, M. E., García-Ruiz, A., Díaz-Maroto, M. C., Pérez-Coello, M. S., & Moreno-Arribas, M. V. (2015). Antimicrobial and antioxidant activity of pressurized liquid extracts from oenological woods. *Food Control*, 50, 581-588.
- Alcalde-Eon, C., Escribano-Bailón, M. T., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2006). Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing: a comprehensive study. *Analytica Chimica Acta*, 563(1), 238-254.
- Alcalde-Eon, C., García-Estévez, I., Ferreras-Charro, R., Rivas-Gonzalo, J. C., Ferrer-Gallego, R., & Escribano-Bailón, M. T. (2014). Adding oenological tannin vs. overripe grapes: Effect on the phenolic composition of red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 34(1), 99-113.
- Alcalde-Eon, C., García-Estévez, I., Puente, V., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, M. T. (2014). Color stabilization of red wines. A chemical and colloidal approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(29), 6984-6994.
- Aldini, G., Piccoli, A., Beretta, G., Morazzoni, P., Riva, A., Marinello, C., & Maffei Facino, R. (2006). Antioxidant activity of polyphenols from solid olive residues of c.v. Coratina. *Fitoterapia*, 77(2), 121-128.
- Alonso, A. M., Domínguez, C., Guillén, D. A., & Barroso, C. G. (2002). Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3112-3115.
- Álvarez-Pérez, J. M., Campo, E., San-Juan, F., Coque, J. J. R., Ferreira, V., & Hernández-Orte, P. (2012). Sensory and chemical characterisation of the aroma of Prieto Picudo rosé wines: the differential role of autochthonous yeast strains on aroma profiles. *Food Chemistry*, 133(2), 284-292.
- Álvarez, I., Raso, J., Sala, F. J., & Condón, S. (2003). Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by pulsed electric fields. *Food Microbiology*, 20(6), 691-700.

- Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J. A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84(4), 551-562.
- Amati, A., Chinnici, F., Piva, A., Arfelli, G., & Rinoni, C. (1996). Influence of enological operations on lysozyme activity in winemaking. *Wein-Wissenschaft*, 51(2), 59-62.
- Amerine, M. A., & Roessler, E. B. (1983). *Wines. Their sensory evaluation*. Freeman San Francisco.
- Amira-Guebailia, H., Valls, J., Richard, T., Vitrac, X., Monti, J.-P., Delaunay, J.-C., & Mérillon, J.-M. (2009). Centrifugal partition chromatography followed by HPLC for the isolation of cis- ϵ -viniferin, a resveratrol dimer newly extracted from a red Algerian wine. *Food Chemistry*, 113(1), 320-324.
- Amro, B., Aburjai, T., & Al-Khalil, S. (2002). Antioxidative and radical scavenging effects of olive cake extract. *Fitoterapia*, 73(6), 456-461.
- Antalick, G., Perello, M.-C., & de Revel, G. (2014). Esters in wines: new insight through the establishment of a database of French wines. *American Journal of Enology and Viticulture*.
- Antalick, G., Šuklje, K., Blackman, J. W., Meeks, C., Deloire, A., & Schmidtke, L. M. (2015). Influence of grape composition on red wine ester profile: comparison between Cabernet Sauvignon and Shiraz cultivars from Australian warm climate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(18), 4664-4672.
- Araújo, M., Pimentel, F. B., Alves, R. C., & Oliveira, M. B. P. P. (2015). Phenolic compounds from olive mill wastes: health effects, analytical approach and application as food antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 200-211.
- Arrhenius, S. P., McCloskey, L. P., & Sylvan, M. (1996). Chemical markers for aroma of *Vitis vinifera* var. Chardonnay regional wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(4), 1085-1090.
- Artero, A., Artero, A., Tarín, J. J., & Cano, A. (2015). The impact of moderate wine consumption on health. *Maturitas*, 80(1), 3-13.

- Asenstorfer, R. E., Markides, A. J., Iland, P. G., & Jones, G. P. (2003). Formation of vitisin A during red wine fermentation and maturation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9(1), 40-46.
- Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2002). Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 15-27.
- Avalos, A., Isabel, A., Mateo, D., & Morales, P. (2013). Cytotoxicity and ROS production of manufactured silver nanoparticles of different sizes in hepatoma and leukemia cells. *Journal of Applied Toxicology*, 34(4), 413-423.
- Avizcuri, J.-M., Sáenz-Navajas, M.-P., Echávarri, J.-F., Ferreira, V., & Fernández-Zurbano, P. (2016). Evaluation of the impact of initial red wine composition on changes in color and anthocyanin content during bottle storage. *Food Chemistry*, 213, 123-134.
- Azzolini, M., Tosi, E., Veneri, G., & Zapparoli, G. (2010). Evaluating the efficacy of lysozyme against lactic acid bacteria under different winemaking scenarios. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 31(2), 99-105.
- Balboa-Lagunero, T., Arroyo, T., Cabellos, J. M., & Aznar, M. (2011). Sensory and olfactometric profiles of red wines after natural and forced oxidation processes. *American journal of enology and viticulture*, 62(4), 527-535.
- Balboa-Lagunero, T., Arroyo, T., Cabellos, J. M., & Aznar, M. (2013). Yeast selection as a tool for reducing key oxidation notes in organic wines. *Food Research International*, 53(1), 252-259.
- Barata, A., Campo, E., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., Cacho, J., & Ferreira, V. (2011). Analytical and sensorial characterization of the aroma of wines produced with sour rotten grapes using GC-O and GC-MS: identification of key aroma compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2543-2553.
- Baroni, M. V., Di Paola Naranjo, R. D., García-Ferreira, C., Otaiza, S., & Wunderlin, D. A. (2012). How good antioxidant is the red wine? Comparison of some in vitro and in vivo methods to assess the antioxidant capacity of Argentinean red wines. *LWT - Food Science and Technology*, 47(1), 1-7.

- Bartowsky, E. J. (2009). Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in Applied Microbiology*, 48(2), 149-156.
- Bartowsky, E. J., Costello, P. J., Villa, A., & Henschke, P. a. (2004a). The chemical and sensorial effects of lysozyme addition to red and white wines over six months' cellar storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10(2), 143-150.
- Bartowsky, E. J., Costello, P. J., Villa, A., & Henschke, P. A. (2004b). The chemical and sensorial effects of lysozyme addition to red and white wines over six months' cellar storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10(2), 143-150.
- Bartowsky, E. J., & Henschke, P. A. (2004). The 'buttery' attribute of wine—diacetyl—desirability, spoilage and beyond. *International journal of food microbiology*, 96(3), 235-252.
- Bauer, R., Nel, H. A., & Dicks, L. M. T. (2003). Pediocin PD-1 as a method to control growth of *Oenococcus oeni* in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(2), 86-91.
- Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V. V., Allard, J. S., Lopez-Lluch, G., & Lewis, K. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444(7117), 337-342.
- Bautista-Ortín, A. B., Martínez-Cutillas, A., Ros-García, J. M., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2005). Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. *International Journal of Food Science & Technology*, 40(8), 867-878.
- Bavaresco, L. (2002). Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 29(5-6), 181-187.
- Benkwitz, F., Nicolau, L., Lund, C., Beresford, M., Wohlers, M., & Kilmartin, P. A. (2012). Evaluation of key odorants in Sauvignon blanc wines using three different methodologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(25), 6293-6302.

- Bernini, R., Gilardini Montani, M. S., Merendino, N., Romani, A., & Velotti, F. (2015). Hydroxytyrosol-derived compounds: a basis for the creation of new pharmacological agents for cancer prevention and therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, *58*(23), 9089-9107.
- Betés-Saura, C., Andrés-Lacueva, C., & Lamuela-Raventós, R. M. (1996). Phenolics in white free run juices and wines from Penedès by high-performance liquid chromatography: changes during vinification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*(10), 3040-3046.
- Bimpilas, A., Panagopoulou, M., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2016). Anthocyanin copigmentation and color of wine: The effect of naturally obtained hydroxycinnamic acids as cofactors. *Food Chemistry*, *197*, Part, 39-46.
- Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Robinson, R. K. (2000). Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry—a critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(6), 637-645.
- Bisignano, G., Tomaino, A., Cascio, R. Lo, Crisafi, G., Uccella, N., & Saija, A. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *51*(8), 971-974.
- Blättel, V., Wirth, K., Claus, H., Schlott, B., Pfeiffer, P., & König, H. (2009). A lytic enzyme cocktail from *Streptomyces* sp. B578 for the control of lactic and acetic acid bacteria in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *83*(5), 839-848.
- Boido, E., Alcalde-Eon, C., Carrau, F., Dellacassa, E., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2006). Aging effect on the pigment composition and color of *Vitis vinifera* L. cv. Tannat wines. Contribution of the main pigment families to wine color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(18), 6692-6704.
- Bonilla, F., Mayen, M., Merida, J., & Medina, M. (2001). Yeasts used as fining treatment to correct browning in white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(4), 1928-1933.
- Bornet, A., & Teissedre, P. L. (2008). Chitosan, chitin-glucan and chitin effects on minerals (iron, lead, cadmium) and organic (ochratoxin A) contaminants in wines. *European Food Research and Technology*, *226*(4), 681-689.

- Boselli, E., Minardi, M., Giomo, A., & Frega, N. G. (2006). Phenolic composition and quality of white doc wines from Marche (Italy). *Analytica Chimica Acta*, 563(1), 93-100.
- Boskou, D. (2008). *Olive oil: minor constituents and health*. CRC Press.
- Bouchilloux, P., Darriet, P., Henry, R., Lavigne-Cruège, V., & Dubourdieu, D. (1998). Identification of volatile and powerful odorous thiols in Bordeaux red wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(8), 3095-3099.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and Its role in the color of red wine: a critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2), 67-87.
- Boutegrabet, L., Fekete, A., Hertkorn, N., Papastamoulis, Y., Waffo-Téguo, P., Mérillon, J. M., Jaendet, P; Gougeon, R. D, & Schmitt-Kopplin, P. (2011). Determination of stilbene derivatives in Burgundy red wines by ultra-high-pressure liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(5), 1513.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Brenes, M., García, A., García, P., Rios, J. J., & Garrido, A. (1999). Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), 3535-3540.
- Brenes, M., Medina, E., Romero, Concepci., & De Castro, A. (2007). Antimicrobial activity of olive oil. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 18(4), 6.
- Brown, R. C., Sefton, M. A., Taylor, D. K., & Elsey, G. M. (2006). An odour detection threshold determination of all four possible stereoisomers of oak lactone in a white and a red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(2), 115-118.
- Buckow, R., Ng, S., & Toepfl, S. (2013). Pulsed electric field processing of orange juice: a review on microbial, enzymatic, nutritional, and sensory quality and stability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(5),

455-467.

- Buiarelli, F., Coccioli, F., Jasionowska, R., Merolle, M., & Terracciano, A. (2007). Analysis of some stilbenes in Italian wines by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(18), 2955-2964.
- Burroughs, L. F., & Sparks, A. H. (1973). Sulphite-binding power of wines and ciders. I. Equilibrium constants for the dissociation of carbonyl bisulphite compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24(2), 187-198.
- Butz, P., & Tauscher, B. (2002). Emerging technologies: chemical aspects. *Food Research International*, 35(2-3), 279-284.
- Buzrul, S. (2012). High hydrostatic pressure treatment of beer and wine: a review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13, 1-12.
- Campo, E., Cacho, J., & Ferreira, V. (2006). Multidimensional chromatographic approach applied to the identification of novel aroma compounds in wine— Identification of ethyl cyclohexanoate, ethyl 2-hydroxy-3-methylbutyrate and ethyl 2-hydroxy-4-methylpentanoate. *Journal of Chromatography A*, 1137(2), 223-230.
- Campos, F. M., Couto, J. A., & Hogg, T. (2016). Utilisation of natural and by-products to improve wine safety. En V. M. Moreno-Arribas & B. Bartolomé Suáldea (Eds.), *Wine Safety, Consumer Preference, and Human Health* (pp. 27-49). Cham: Springer International Publishing.
- Campos, F. M., Figueiredo, A. R., Hogg, T. A., & Couto, J. A. (2009). Effect of phenolic acids on glucose and organic acid metabolism by lactic acid bacteria from wine. *Food Microbiology*, 26(4), 409-414.
- Canas, S., Casanova, V., & Pedro Belchior, A. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of Portuguese wine aged brandies. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8), 626-633.
- Capasso, R., Cristinzio, G., Evidente, A., & Scognamiglio, F. (1992). Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste waters. *Phytochemistry*, 31(12), 4125-4128.
- Capasso, R., Evidente, A., Schivo, L., Orru, G., Marcialis, M. A., & Cristinzio, G.

- (1995). Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *Journal of Applied Bacteriology*, 79(4), 393-398.
- Capasso, R., Evidente, A., Tremblay, E., Sala, A., Santoro, C., Cristinzio, G., & Scognamiglio, F. (1994). Direct and mediated effects on *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera; Tephritidae) of natural polyphenols and some of related synthetic compounds: Structure-activity relationships. *Journal of Chemical Ecology*, 20(5), 1189-1199.
- Carluccio, M. A., Siculella, L., Ancora, M. A., Massaro, M., Scoditti, E., Storelli, C., Visioli, F., Distanti, A., & De Caterina, R. (2003). Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(4), 622-629.
- Carstens, C., Deckwart, M., Webber-Witt, M., Schäfer, V., Eichhorn, L., Brockow, K., Fischer, M., Christmann, M., & Paschke-Kratzin, A. (2014). Evaluation of the efficiency of enological procedures on lysozyme depletion in wine by an indirect ELISA method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(26), 6247-6253.
- Casa, R., D'Annibale, A., Pieruccetti, F., Stazi, S. R., Sermanni, G. G., & Cascio, B. Lo. (2003). Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere*, 50(8), 959-966.
- Casal del Rey, J. (2001). *Análisis sensorial y Cata de los Vinos de España*. (Agricultura Española, Ed.), Editorial Agrícola Española (Unión espa). Madrid.
- Cejudo-Bastante, M. J., Sonni, F., Chinnici, F., Versari, A., Perez-Coello, M. S., & Riponi, C. (2010). Fermentation of sulphite-free white musts with added lysozyme and oenological tannins: nitrogen consumption and biogenic amines composition of final wines. *LWT - Food Science and Technology*, 43(10), 1501-1507.
- Çetin, E. S., Altinöz, D., Tarçan, E., & Göktürk Baydar, N. (2011). Chemical composition of grape canes. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 994-998.
- Chagas, R., Monteiro, S., & Ferreira, R. B. (2012). Assessment of potential effects of common fining agents used for white wine protein stabilization. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63(4), 574-578.

- Charters, S., & Pettigrew, S. (2005). Is wine consumption an aesthetic experience? *Journal of Wine Research*, 16(2), 121-136.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., & Boidron, J. N. (1995). The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(4), 463-468.
- Chavan, P. S., & Tupe, S. G. (2014). Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. *Food Control*, 46, 115-120.
- Chen, X., & Schluesener, H. J. (2008). Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters*, 176(1), 1-12.
- Cheyrier, V., Rigaud, J., Souquet, J.-M., Duprat, F., & Moutounet, M. (1990). Must browning in relation to the behavior of phenolic compounds during oxidation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(4), 346-349.
- Cheyrier, V., Rigaud, J., Souquet, J. M., Barillere, J. M., & Moutounet, M. (1989). Effect of pomace contact and hyperoxidation on the phenolic composition and quality of Grenache and Chardonnay wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40(1), 36-42.
- Cheyrier, V., Souquet, J., Kontek, A., & Moutounet, M. (1994). Anthocyanin degradation in oxidising grape musts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66(1994), 283-288.
- Chinnici, F., Natali, N., Bellachioma, A., Versari, A., & Riponi, C. (2015). Changes in phenolic composition of red wines aged in cherry wood. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2, Part 1), 977-984.
- Chinnici, F., Natali, N., & Riponi, C. (2014). Efficacy of Chitosan in inhibiting the oxidation of (+)-catechin in white wine model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(40), 9868-9875.
- Chinnici, F., Sonni, F., Natali, N., Galassi, S., & Riponi, C. (2009). Colour features and pigment composition of Italian carbonic macerated red wines. *Food Chemistry*, 113(2), 651-657.
- Choi, O., Deng, K. K., Kim, N.-J., Ross, L., Surampalli, R. Y., & Hu, Z. (2008).

- The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research*, 42(12), 3066-3074.
- Chung, W., & Hancock, R. E. W. (2000). Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 60(1), 25-32.
- Cioffi, G., Pesca, M. S., De Caprariis, P., Braca, A., Severino, L., & De Tommasi, N. (2010). Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 121(1), 105-111.
- Clarke, R. J., & Bakker, J. (2004). *Wine flavour chemistry*. Wiley Online Library.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71(1), 1-20.
- Coetzee, C. (2014). *Oxidation treatments affecting Sauvignon blanc wine sensory and chemical composition*. Stellenbosch: Stellenbosch University.
- 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(1), 287-298.
- Coetzee, C., & du Toit, W. J. (2015). Sauvignon blanc wine: Contribution of ageing and oxygen on aromatic and non-aromatic compounds and sensory composition - A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 36(3), 347-365.
- Coetzee, C., Van Wyngaard, E., Šuklje, K., Silva Ferreira, A. C., & du Toit, W. J. (2016). Chemical and sensory study on the evolution of aromatic and nonaromatic compounds during the progressive oxidative storage of a Sauvignon blanc wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(42), 7979-7993.
- COI. (2016). Huiles D'Olive - Olive Oils. Recuperado a partir de http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures?lang=es_ES
- Collin, S., Nizet, S., Claeys Bouuaert, T., & Despatures, P.-M. (2012). Main

- odorants in jura flor-sherry wines. Relative contributions of sotolon, abhexon, and theaspirane-derived compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(1), 380-387.
- Comuzzo, P., Battistutta, F., Vendrame, M., Páez, M. S., Luisi, G., & Zironi, R. (2015). Antioxidant properties of different products and additives in white wine. *Food Chemistry*, 168, 107-114.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A. C. P., Tavares, R. M., Sousa, M. J., Agasse, Alice., Delrot, S., & Gerós, H. (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food*, 1(1), 1-22.
- Cooper, M. (2008). *Wine atlas of New Zealand*. Auckland, New Zealand: Hodder Moa.
- Cornwell, D. G., & Ma, J. (2008). Nutritional benefit of olive oil: the biological effects of hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 8774-8786.
- Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2008). Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiology*, 25(2), 422-427.
- Costello, P. J., & Henschke, P. A. (2002). Mousy off-flavor of wine: precursors and biosynthesis of the causative N-heterocycles 2-ethyltetrahydropyridine, 2-acetyltetrahydropyridine, and 2-acetyl-1-pyrroline by *Lactobacillus hilgardii* DSM 20176. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(24), 7079-7087.
- Couto, J. A., Campos, F. M., Figueiredo, A. R., & Hogg, T. A. (2006). Ability of lactic acid bacteria to produce volatile phenols. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(2), 166-171.
- Covas, M.-I., de la Torre, K., Farré-Albaladejo, M., Kaikkonen, J., Fitó, M., López-Sabater, C., Pujadas-Bastardes, M. A., Joglar, J., Weinbrenner, T., & Lamuela-Raventós, R. M. (2006). Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(4), 608-616.

- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001-1043.
- Culleré, L., Escudero, A., Cacho, J., & Ferreira, V. (2004). Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality spanish aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1653-1660.
- Culleré, L., Fernández de Simón, B., Cadahía, E., Ferreira, V., Hernández-Orte, P., & Cacho, J. (2013). Characterization by gas chromatography-olfactometry of the most odor-active compounds in extracts prepared from acacia, chestnut, cherry, ash and oak woods. *LWT - Food Science and Technology*, 53(1), 240-248.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174-181.
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15(10), 7313.
- Daniel, M. A., Elsey, G. M., Capone, D. L., Perkins, M. V, & Sefton, M. A. (2004). Fate of damascenone in wine: the role of SO₂. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8127-8131.
- Danilewicz, J. C. (2007). Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: central role of iron and copper. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58(1), 53-60.
- Danilewicz, J. C. (2011). Mechanism of autoxidation of polyphenols and participation of sulfite in wine: key role of iron. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62(3), 319-328. <https://doi.org/10.5344/ajev.2011.10105>
- Danilewicz, J. C. (2016). Reaction of oxygen and sulfite in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 67(1), 13-17.
- Danilewicz, J. C., Secombe, J. T., & Whelan, J. (2008). Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59(2), 128-136.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2004). Extending

- applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC–Fluorescein) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 48-54.
- Davis, C. R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T. H., & Fleet, G. H. (1985). Practical implications of malolactic fermentation: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36(4), 290-301.
- Davis, C. R., Wibowo, D., Fleet, G. H., & Lee, T. H. (1988). Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39(2), 137-142.
- Day, M. P., Schmidt, S. A., Smith, P. A., & Wilkes, E. N. (2015). Use and impact of oxygen during winemaking. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21, 693-704.
- de Freitas, V., & Mateus, N. (2011). Formation of pyranoanthocyanins in red wines: a new and diverse class of anthocyanin derivatives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(5), 1463-1473.
- de Freitas, V., & Mateus, N. (2012). Protein/Polyphenol Interactions: Past and Present Contributions. Mechanisms of Astringency Perception. *Current Organic Chemistry*, 16(351), 724-746.
- de Gaulejac, N. V., Vivas, N., Nonier, M., Absalon, C., & Bourgeois, G. (2001). Study and quantification of monomeric flavan-3-ol and dimeric procyanidin quinonic forms by HPLC/ESI-MS. Application to red wine oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(12), 1172-1179.
- De La Cruz, J. P., Ruiz-Moreno, M. I., Guerrero, A., Reyes, J. J., Benitez-Guerrero, A., Espartero, J. L., & González-Correa, J. A. (2015). Differences in the neuroprotective effect of orally administered virgin olive oil (*Olea europaea*) polyphenols tyrosol and hydroxytyrosol in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(25), 5957-5963.
- De La Torre, R., Covas, M. I., Pujadas, M. A., Fitó, M., & Farré, M. (2006). Is dopamine behind the health benefits of red wine? *European Journal of Nutrition*, 45(5), 307-310.
- De Marco, E., Savarese, M., Paduano, A., & Sacchi, R. (2007). Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill

- wastewaters. *Food Chemistry*, 104(2), 858-867.
- del Monaco, G., Officioso, A., D'Angelo, S., La Cara, F., Ionata, E., Marcolongo, L., ... Morana, A. (2015). Characterization of extra virgin olive oils produced with typical Italian varieties by their phenolic profile. *Food chemistry*, 184, 220-228.
- Del Pozo-Insfran, D., Del Follo-Martinez, A., Talcott, S. T., & Brenes, C. H. (2007). Stability of copigmented anthocyanins and ascorbic acid in muscadine grape juice processed by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science*, 72(4).
- Delfini, C., Cersosimo, M., Del Prete, V., Strano, M., Gaetano, G., Pagliara, A., & Ambrò, S. (2004). Resistance screening essay of wine lactic acid bacteria on lysozyme: efficacy of lysozyme in unclarified grape musts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 1861-1866.
- Delfini, C., Conterno, L., Carpi, G., Rovere, P., Tabusso, A., Cocito, C., & Amati, A. (1995). Microbiological stabilisation of grape musts and wines by high hydrostatic pressures. *Journal of Wine Research*, 6(2), 143-151.
- Delfini, C., Gaia, P., Schellino, R., Strano, M., Pagliara, A., & Ambrò, S. (2002). Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl dicarbonate (DMDC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(20), 5605-5611.
- DellaGreca, M., Monaco, P., Pinto, G., Pollio, A., Previtera, L., & Temussi, F. (2001). Phytotoxicity of low-molecular-weight phenols from olive mill waste waters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 67(3), 352-359.
- Delsart, C., Cholet, C., Ghidossi, R., Grimi, N., Gontier, E., Gény, L., ... Mietton-Peuchot, M. (2014). Effects of pulsed electric fields on cabernet sauvignon grape berries and on the characteristics of wines. *Food and Bioprocess Technology*, 7(2), 424-436.
- Delsart, C., Grimi, N., Boussetta, N., Miot Sertier, C., Ghidossi, R., Vorobiev, E., & Mietton Peuchot, M. (2016). Impact of pulsed-electric field and high-voltage electrical discharges on red wine microbial stabilization and quality characteristics. *Journal of Applied Microbiology*, 120(1), 152-164.

- Desert, S., & Hubert, L. (2002). Le dioxyde de soufre est-il irremplaçable. *Rev. Oenologues*, 102, 35-36.
- Devesa-Rey, R., Vecino, X., Varela-Alende, J. L., Barral, M. T., Cruz, J. M., & Moldes, A. B. (2011). Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. *Waste Management*, 31(11), 2327-2335.
- Di Majo, D., La Guardia, M., Giammanco, S., La Neve, L., & Giammanco, M. (2008). The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chemistry*, 111(1), 45-49.
- Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento (UE) n° 432/2012 de la Comisión de 16 de mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y, Pub. L. No. 432/2012 (2012). Unión Europea. Recuperado a partir de <https://www.boe.es/doue/2012/136/L00001-00040.pdf>
- Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento de Ejecución (UE) número 203/2012 DE LA COMISIÓN, de 8 de marzo de 2012, que modifica el Reglamento (CE) número 889/2008, por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) n o 834/2007 del Consejo, en lo que respecta a la (2012). Recuperado a partir de http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/la-agricultura-ecologica/RE203-2012_tcm7-198568.pdf
- Di Tommaso, D., Calabrese, R., & Rotilio, D. (1998). Identification and quantitation of hydroxytyrosol in Italian wines. *Journal of Separation Science*, 21(10), 549-553.
- Dicks, L. M. T., Dellaglio, F., & Collins, M. D. (1995). Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(2), 395-397.
- Diez, L., Rojo-Bezares, B., Zarazaga, M., Rodríguez, J. M., Torres, C., & Ruiz-Larrea, F. (2012). Antimicrobial activity of pediocin PA-1 against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *Food Microbiology*, 31(2), 167-172.

- Divol, B., Strehaiano, P., & Lonvaud-Funel, A. (2005). Effectiveness of dimethyldicarbonate to stop alcoholic fermentation in wine. *Food Microbiology*, 22(2-3), 169-178.
- Divol, B., Toit, M., & Duckitt, E. (2012). Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(3), 601-613.
- Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411(6839), 843-847.
- Dobrei, A., Poiana, M.-A., Sala, F., Ghita, A., & Gergen, I. (2010). Changes in the chromatic properties of red wines from *Vitis vinifera* L. cv. Merlot and Pinot Noir during the course of aging in bottle. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 8(2), 20-24.
- Dombre, C., Rigou, P., Wirth, J., & Chalier, P. (2015). Aromatic evolution of wine packed in virgin and recycled PET bottles. *Food Chemistry*, 176(0), 376-387.
- Du Toit, M., & Pretorius, I. S. (2000). Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal—a review. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 21(Special Issue), 74-96.
- Du Toit, W. J., Marais, J., Pretorius, I. S., & Du Toit, M. (2006). Oxygen in must and wine: a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27(1), 76-94.
- Dubois, P. (1994). Les arômes des vins et leurs défauts. *Revue Française d'Oenologie*, 34(145), 27-41.
- Dudley, J. I., Lekli, I., Mukherjee, S., Das, M., Bertelli, A. A. A., & Das, D. K. (2008). Does white wine qualify for French paradox? Comparison of the cardioprotective effects of red and white wines and their constituents: resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(20), 9362-9373.
- Ebeler, S. E. (2001). Analytical chemistry: Unlocking the secrets of wine flavor. *Food reviews international*, 17(1), 45-64.
- EFSA. (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative

- damage. Pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA journal*, 9(4), 2033-2078. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2033>
- El-Abbassi, A., Kiai, H., & Hafidi, A. (2012). Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater. *Food chemistry*, 132(1), 406-412.
- El Darra, N., Grimi, N., Maroun, R. G., Louka, N., & Vorobiev, E. (2013). Pulsed electric field, ultrasound, and thermal pretreatments for better phenolic extraction during red fermentation. *European Food Research and Technology*, 236(1),
- El Darra, N., Rajha, H. N., Ducasse, M.-A., Turk, M. F., Grimi, N., Maroun, R. G., Louka, N., & Vorobiev, E. (2016). Effect of pulsed electric field treatment during cold maceration and alcoholic fermentation on major red wine qualitative and quantitative parameters. *Food Chemistry*, 213, 352-360.
- Elmacı, B. S., Gülgör, G., Tokatlı, M., Erten, H., İşci, A., & Özçelik, F. (2015). Effectiveness of chitosan against wine-related microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 107(3), 675-686.
- Enrique, M., Ibáñez, A., Marcos, J. F., Yuste, M., Martinez, M., Vallés, S., & Manzanares, P. (2010). β -Glucanases as a tool for the control of wine Spoilage Yeasts. *Journal of food science*, 75(1), M41-M45.
- Es-Safi, N.-E., Meudec, E., Bouchut, C., Fulcrand, H., Ducrot, P.-H., Herbette, G., & Cheynier, V. (2008). New compounds obtained by evolution and oxidation of malvidin-3-O-glucoside in ethanolic medium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4584-4591.
- Escudero, A., Asensio, E., Cacho, J., & Ferreira, V. (2002). Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food chemistry*, 77(3), 325-331.
- Escudero, A., Cacho, J., & Ferreira, V. (2000). Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: a gas chromatography-olfactometric study. *European Food Research and Technology*, 211(2), 105-110.

- Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J., & Ferreira, V. (2007). Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4501-4510.
- Esti, M., Cinquanta, L., & La Notte, E. (1998). Phenolic compounds in different olive varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 32-35.
- Etievant, P. X. (1991). Wine. *Volatile compounds in foods and beverages*, 434, 483-546.
- Fabiani, R., Rosignoli, P., De Bartolomeo, A., Fuccelli, R., Servili, M., Montedoro, G. F., & Morozzi, G. (2008). Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *The Journal of Nutrition*, 138(8), 1411-1416.
- Falcão, L. D., de Revel, G., Rosier, J. P., & Bordignon-Luiz, M. T. (2008). Aroma impact components of Brazilian Cabernet sauvignon wines using detection frequency analysis (GC-Olfactometry). *Food Chemistry*, 107(1), 497-505.
- Falguera, V., Forns, M., & Ibarz, A. (2013). UV-vis irradiation: an alternative to reduce SO₂ in white wines? *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 59-64.
- Falguera, V., Pagán, J., Garza, S., Garvín, A., & Ibarz, A. (2011). Ultraviolet processing of liquid food: A review. Part 1: Fundamental engineering aspects. *Food Research International*, 44(6), 1571-1579.
- Feijóo, O., Moreno, A., & Falqué, E. (2008). Content of trans-and cis-resveratrol in Galician white and red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8), 608-613.
- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Heredia, A., Guillén, R., & Jiménez, A. (2002). Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or «alperujo». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6804-6811.
- Fernández-Mar, M. I., Mateos, R., García-Parrilla, M. C., Puertas, B., & Cantos-Villar, E. (2012). Bioactive compounds in wine: resveratrol, hydroxytyrosol

- and melatonin: a review. *Food Chemistry*, 130(4), 797-813.
- Fernández-Pachón, M. S., Villaño, D., García-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2004). Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 113-118.
- Ferreira, D., Moreira, D., Costa, E. M., Silva, S., Pintado, M. M., & Couto, J. A. (2013). The Antimicrobial action of chitosan against the wine spoilage yeast *Brettanomyces / Dekkera*, 1(3), 1-6.
- Ferreira, V., Aznar, M., López, R., & Cacho, J. (2001). Quantitative gas chromatography-olfactometry carried out at different dilutions of an extract. Key differences in the odor profiles of four high-quality Spanish aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4818-4824.
- Ferreira, V., Bueno, M., Franco-Luesma, E., Cullere, L., & Fernández-Zurbano, P. (2014). Key changes in wine aroma active compounds during bottle storage of Spanish red wines under different oxygen levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(41), 10015-10027.
- Ferreira, V., Escudero, A., Fernández, P., & Cacho, J. F. (1997). Changes in the profile of volatile compounds in wines stored under oxygen and their relationship with the browning process. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 205(5), 392-396.
- Ferreira, V., López, R., & Cacho, J. F. (2000). Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(11), 1659-1667.
- Ferreira, V., Sáenz-Navajas, M.-P., Campo, E., Herrero, P., de la Fuente, A., & Fernández-Zurbano, P. (2016). Sensory interactions between six common aroma vectors explain four main red wine aroma nuances. *Food Chemistry*, 199, 447-456.
- Ferreira, V., & San Juan, F. (2011). Flavor of wine. En H. Jelen (Ed.), *Food flavors: chemical, sensory and technological properties* (pp. 269-300). New York: CRC Press.
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of*

Food Microbiology, 86(1), 11-22.

- Fodale, A. S., Mule, R., & Briccoli Bati, C. (1999). The antifungal activity of olive oil waste water on isolates of *Verticillium dahliae* Kleb. *in vitro*. *Acta Horticulturae*, (474), 753-756.
- Fracassetti, D., Gabrielli, M., Costa, C., Tomás-Barberán, F. A., & Tirelli, A. (2016). Characterization and suitability of polyphenols-based formulas to replace sulfur dioxide for storage of sparkling white wine. *Food Control*, 60, 606-614.
- Francis, I. L., & Williamson, P. O. (2015). Application of consumer sensory science in wine research. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21, 554-567.
- Frankel, E. N., German, J. B., Kinsella, J. E., Parks, E., & Kanner, J. (1993). Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet*, 341(8843), 454-457.
- Fredericks, I. N., du Toit, M., & Krügel, M. (2011). Efficacy of ultraviolet radiation as an alternative technology to inactivate microorganisms in grape juices and wines. *Food Microbiology*, 28(3), 510-517.
- Fugelsang, K. C., & Edwards, C. G. (2007). *Wine microbiology practical applications and procedures*. Boston, MA: Springer Science and Business Media, LLC.
- Fulcrand, H., Dueñas, M., Salas, E., & Cheynier, V. (2006). Phenolic reactions during winemaking and aging. *American journal of enology and viticulture*, 57(3), 289-297.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., & Omar, N. Ben. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1-2), 51-70.
- Gambutì, A., Rinaldi, A., Ugliano, M., & Moio, L. (2013). Evolution of phenolic compounds and astringency during aging of red wine: effect of oxygen exposure before and after bottling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), 1618-1627.
- Gao, Y., Tian, Y., Liu, D., Li, Z., Zhang, X.-X., Li, J.-M., Huang, J.-H., Wang, J.,

- & Pan, Q.-H. (2015). Evolution of phenolic compounds and sensory in bottled red wines and their co-development. *Food Chemistry*, 172, 565-574.
- Gao, Y., Zhang, G., Krentz, S., Darius, S., Power, J., & Lagarde, G. (2002). Inhibition of spoilage lactic acid bacteria by lysozyme during wine alcoholic fermentation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 8(1), 76-83.
- García-Granados López de Hierro, A., & Sánchez Parra, A. (2007). Procedimiento de aprovechamiento industrial de tirosol e hidroxitirosol contenidos en los subproductos sólidos de la molturación industrial de la aceituna. España. <http://www.google.es/patents/WO2007093659A1?cl=es>
- García-Puente Rivas, E., Alcalde-Eon, C., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, M. T. (2006). Behaviour and characterisation of the colour during red wine making and maturation. En *Analytica Chimica Acta* (Vol. 563, pp. 215-222).
- García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Cueva, C., Martín-Álvarez, P. J., & Moreno-Arribas, M. V. (2009). Inactivation of oenological lactic acid bacteria (*Lactobacillus hilgardii* and *Pediococcus pentosaceus*) by wine phenolic compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 107(3), 1042-1053.
- García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martínez-Rodríguez, A. J., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P. J., & Moreno-Arribas, M. V. (2008). Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*, 19(9), 835-841.
- García-Ruiz, A., Crespo, J., López-de-Luzuriaga, J. M., Olmos, M. E., Monge, M., Rodríguez-Álfaro, M. P., Martín-Álvarez, P. J., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2015). Novel biocompatible silver nanoparticles for controlling the growth of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in wines. *Food Control*, 50(0), 613-619.
- García-Ruiz, A., Cueva, C., González-Rompinelli, E. M., Yuste, M., Torres, M., Martín-Álvarez, P. J., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2012). Antimicrobial phenolic extracts able to inhibit lactic acid bacteria growth and wine malolactic fermentation. *Food Control*, 28(2), 212-219.
- García-Ruiz, A., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., & Bartolomé, B. (2011). Comparative study of the inhibitory effects of wine polyphenols on

the growth of enological lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 145(2–3), 426-431.

García-Ruiz, A., Requena, T., Peláez, C., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M. V., & Martínez-Cuesta, M. C. (2013). Antimicrobial activity of lacticin 3147 against oenological lactic acid bacteria. Combined effect with other antimicrobial agents. *Food Control*, 32(2), 477-483.

García-Ruiz, A., Rodríguez-Bencomo, J. J., Garrido, I., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V., & Bartolomé, B. (2013). Assessment of the impact of the addition of antimicrobial plant extracts to wine: Volatile and phenolic composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(10), 2507-2516.

García Martín, J. F., & Sun, D. W. (2013). Ultrasound and electric fields as novel techniques for assisting the wine ageing process: The state-of-the-art research. *Trends in Food Science and Technology*, 33(1), 40-53.

Garde-Cerdán, T., & Ancín-Azpilicueta, C. (2007). Effect of SO₂ on the formation and evolution of volatile compounds in wines. *Food Control*, 18(12), 1501-1506.

Garde-Cerdán, T., Arias, M., Martín-Belloso, O., & Ancín-Azpilicueta, C. (2016). Pulsed electric field and fermentation. En K. S. Ojha & B. K. Tiwari (Eds.), *Novel Food Fermentation Technologies* (pp. 85-123). Cham: Springer International Publishing.

Garde-Cerdán, T., Jarauta, I., Salinas, M. R., & Ancín-Azpilicueta, C. (2008). Comparative study of the volatile composition in wines obtained from traditional vinification and from the Ganimede method. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(10), 1777-1785.

Garde-Cerdán, T., López, R., Garijo, P., González-Arenzana, L., Gutiérrez, A. R., López-Alfaro, I., & Santamaría, P. (2014). Application of colloidal silver versus sulfur dioxide during vinification and storage of Tempranillo red wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20(1), 51-61.

Garde-Cerdán, T., Marsellés-Fontanet, A. R., Arias-Gil, M., Ancín-Azpilicueta, C., & Martín-Belloso, O. (2008). Influence of SO₂ on the evolution of volatile compounds through alcoholic fermentation of must stabilized by pulsed

- electric fields. *European Food Research and Technology*, 227(2), 401-408.
- Garde-Cerdán, T., Marsellés-Fontanet, A. R., Arias-Gil, M., Martín-Belloso, O., & Ancín-Azpilicueta, C. (2007). Influence of SO₂ on the consumption of nitrogen compounds through alcoholic fermentation of must sterilized by pulsed electric fields. *Food Chemistry*, 103(3), 771-777.
- Gawel, R. (1998). Red wine astringency: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 4(2), 74-95.
- Gawel, R., Oberholster, A., & Francis, I. L. (2000). A 'Mouth-feel Wheel': terminology for communicating the mouth-feel characteristics of red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(3), 203-207.
- Gerber, M., & Hoffman, R. (2015). The Mediterranean diet: health, science and society. *British Journal of Nutrition*, 113(S2), S4-S10.
- Gerogiannaki-Christopoulou, M., Athanasopoulos, P., Kyriakidis, N., Gerogiannaki, I. A., & Spanos, M. (2006). trans-Resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties. *Food Control*, 17(9), 700-706.
- Gil, M., Cabellos, J. M., Arroyo, T., & Prodanov, M. (2006). Characterization of the volatile fraction of young wines from the Denomination of Origin «Vinos de Madrid» (Spain). *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2), 145-153.
- Giugliano, D. (2000). Dietary antioxidants for cardiovascular prevention. *Nutrition, metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 10(1), 38-44.
- Godden, P., Francis, L., Field, J., Gishen, M., Coulter, A., Valente, P., ... Robinson, E. (2001). Wine bottle closures: physical characteristics and effect on composition and sensory properties of a Semillon wine 1. Performance up to 20 months post-bottling. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7(2), 64-105.
- Gómez-Míguez, M., González-Miret, M. L., & Heredia, F. J. (2007). Evolution of colour and anthocyanin composition of Syrah wines elaborated with prefermentative cold maceration. *Journal of Food Engineering*, 79(1), 271-278.
- Gómez-Míguez, M. J., Cacho, J. F., Ferreira, V., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2007). Volatile components of Zalema white wines. *Food Chemistry*, 100(4),

1464-1473.

- Gómez-Rivas, L., Escudero-Abarca, B. I., Aguilar-Uscanga, M. G., Hayward-Jones, P. M., Mendoza, P., & Ramírez, M. (2004). Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(1), 16-22.
- González-Arenzana, L., Sevenich, R., Rauh, C., López, R., Knorr, D., & López-Alfaro, I. (2016). Inactivation of *Brettanomyces bruxellensis* by high hydrostatic pressure technology. *Food Control*, 59, 188-195.
- González-Centeno, M. R., Rosselló, C., Simal, S., Garau, M. C., López, F., & Femenia, A. (2010). Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: grape pomaces and stems. *LWT-Food Science and Technology*, 43(10), 1580-1586.
- González-Manzano, S., Dueñas, M., Rivas-Gonzalo, J. C., Escribano-Bailón, M. T., & Santos-Buelga, C. (2009). Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine. *Food Chemistry*, 114(2), 649-656.
- González-Rompinelli, E. M., Rodríguez-Bencomo, J. J., García-Ruiz, A., Sánchez-Patán, F., Martín-Álvarez, P. J., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2013). A winery-scale trial of the use of antimicrobial plant phenolic extracts as preservatives during wine ageing in barrels. *Food Control*, 33(2), 440-447.
- Gonzalez-Santiago, M., Martín-Bautista, E., Carrero, J. J., Fonolla, J., Baro, L., Bartolome, M. V, Gil-loyza, P., & Lopez-Huertas, E. (2006). One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development. *Atherosclerosis*, 188(1), 35-42.
- Gordillo, B., Cejudo-Bastante, M. J., Rodríguez-Pulido, F. J., Jara-Palacios, M. J., Ramírez-Pérez, P., González-Miret, M. L., & Heredia, F. J. (2014). Impact of adding white pomace to red grapes on the phenolic composition and color stability of Syrah wines from a warm climate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(12), 2663-2671.
- Gorena, T., Saez, V., Mardones, C., Vergara, C., Winterhalter, P., & von Baer,

- D. (2014). Influence of post-pruning storage on stilbenoid levels in *Vitis vinifera* L. canes. *Food Chemistry*, 155, 256-263.
- Granados-Principal, S., Quiles, J. L., Ramirez-Tortosa, C. L., Sanchez-Rovira, P., & Ramirez-Tortosa, M. C. (2010). Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutrition Reviews*, 68(4), 191-206.
- Grant-Preece, P., Fang, H., Schmidtke, L. M., & Clark, A. C. (2013). Sensorially important aldehyde production from amino acids in model wine systems: Impact of ascorbic acid, erythorbic acid, glutathione and sulphur dioxide. *Food Chemistry*, 141(1), 304-312.
- Green, J. A., Parr, W. V., Breitmeyer, J., Valentin, D., & Sherlock, R. (2011). Sensory and chemical characterisation of Sauvignon blanc wine: Influence of source of origin. *Food Research International*, 44(9), 2788-2797.
- Guebailia, H. A., Chira, K., Richard, T., Mabrouk, T., Furiga, A., Vitrac, X., ... Mérillon, J.-M. (2006). Hopeaphenol: the first resveratrol tetramer in wines from North Africa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25), 9559-9564.
- Guerrero, R. F., & Cantos-Villar, E. (2015). Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: a parameter review. *Trends in Food Science & Technology*, 42(1), 27-43.
- Guerrero, R. F., Garcia-Parrilla, M. C., Puertas, B., & Cantos-Villar, E. (2009). Wine, resveratrol and health: a review. *Natural product communications*, 4(5), 635-658.
- Guerrero, R. F., Puertas, B., Fernández, M. I., Palma, M., & Cantos-Villar, E. (2010). Induction of stilbenes in grapes by UV-C: Comparison of different subspecies of *Vitis*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 231-238.
- Guth, H. (1997). Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 3027-3032.
- Guzzo, F., Cappello, M. S., Azzolini, M., Tosi, E., & Zapparoli, G. (2011). The inhibitory effects of wine phenolics on lysozyme activity against lactic acid

- bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 148(3), 184-190.
- Håkansson, A. E., Pardon, K., Hayasaka, Y., de Sa, M., & Herderich, M. (2003). Structures and colour properties of new red wine pigments. *Tetrahedron Letters* (Vol. 44).
- Harbertson, J. F., & Spayd, S. (2006). Measuring Phenolics in the Winery. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 280-288.
- Harris, V., Jiranek, V., Ford, C. M., & Grbin, P. R. (2010). Inhibitory effect of hydroxycinnamic acids on *Dekkera* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(2), 721-729.
- Hashizume, K., & Samuta, T. (1999). Grape maturity and light exposure affect berry methoxypyrazine concentration. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(2), 194-198.
- He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C.-Q. (2012a). Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules*, 17(2), 1571-1601.
- He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C.-Q. (2012b). Anthocyanins and their variation in red wines II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Molecules*, 17(2), 1483-1519.
- He, S., & Yan, X. (2013). From resveratrol to its derivatives: new sources of natural antioxidant. *Current Medicinal Chemistry*, 20(8), 1005-1017.
- Heliawati, L., Kardinan, A., Mayanti, T., & Tjokronegoro, R. (2015). Piceatanol: anti-cancer compound from gewang seed extract. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol, 5(1), 110-113.
- Heras-Roger, J., Alonso-Alonso, O., Gallo-Montesdeoca, A., Díaz-Romero, C., & Darias-Martín, J. (2016). Influence of copigmentation and phenolic composition on wine color. *Journal of Food Science and Technology*.
- Heras-Roger, J., Pomposo-Medina, M., Díaz-Romero, C., & Darias-Martín, J. (2014). Copigmentation, colour and antioxidant activity of single-cultivar red wines. *European Food Research and Technology*, 239(1), 13-19.
- Herbst-Johnstone, M., Nicolau, L., & Kilmartin, P. A. (2011). Stability of varietal

thiols in commercial sauvignon blanc wines. *American journal of enology and viticulture*.

Hermosín-Gutiérrez, I., Lorenzo, E. S.-P., & Espinosa, A. V. (2005). Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chemistry*, 92(2), 269-283.

Hernanz, D., Gallo, V., Recamales, Á. F., Meléndez-Martínez, A. J., González-Miret, M. L., & Heredia, F. J. (2009). Effect of storage on the phenolic content, volatile composition and colour of white wines from the varieties Zalema and Colombard. *Food Chemistry*, 113(2), 530-537.

Hidalgo, J. (2003). *Tratado de enología, tomo I. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid*.

Houillé, B., Besseau, S., Delanoue, G., Oudin, A., Papon, N., Clastre, M., ... Lanoue, A. (2015). Composition and tissue-specific distribution of stilbenoids in grape canes are affected by downy mildew pressure in the vineyard. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(38), 8472-8477.

Hufnagel, J. C., & Hofmann, T. (2008). Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1376-1386.

Izquierdo-Cañas, P. M., García-Romero, E., Huertas-Nebreda, B., & Gómez-Alonso, S. (2012). Colloidal silver complex as an alternative to sulphur dioxide in winemaking. *Food Control*, 23(1), 73-81.

Jackowetz, J. N., Dierschke, S., & Mira de Orduña, R. (2011). Multifactorial analysis of acetaldehyde kinetics during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 44(1), 310-316.

Jackowetz, J. N., & Mira de Orduña, R. (2013). Survey of SO₂ binding carbonyls in 237 red and white table wines. *Food Control*, 32(2), 687-692.

Jackson, D. I., & Lombard, P. B. (1993). Environmental and Management Practices Affecting Grape Composition and Wine Quality - A Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44(4), 409-430.

Jackson, R. S. (2009). *Wine tasting: a professional handbook*. Academic Press.

- Jackson, R. S., & Jakoby, W. B. (1995). Wine science. Principles and applications. *Analytical Biochemistry*, 225(1), 193.
- Jarauta, I., Ferreira, V., & Cacho, J. F. (2006). Synergic, additive and antagonistic effects between odorants with similar odour properties. *Developments in Food Science*, 43, 205-208.
- Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.-C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., & Adrian, M. (2002). Phytoalexins from the *Vitaceae*: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 50(10), 2731-2741.
- Jensen, J. S., Demiray, S., Egebo, M., & Meyer, A. S. (2008). Prediction of wine color attributes from the phenolic profiles of red grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 1105-1115.
- Jeong, S., Son, Y., Lee, J. H., Cheong, Y., Park, S. H., Chung, H., & Pae, H. (2015). Resveratrol analog piceatannol restores the palmitic acid-induced impairment of insulin signaling and production of endothelial nitric oxide via activation of anti-inflammatory and antioxidative heme oxygenase-1 in human endothelial cells. *Molecular Medicine Reports*, 12(1), 937-944.
- Jiranek, V., Grbin, P., Yap, A., Barnes, M., & Bates, D. (2008). High power ultrasonics as a novel tool offering new opportunities for managing wine microbiology. *Biotechnology Letters*, 30(1), 1-6.
- Karbowiak, T., Gougeon, R. D., Alinc, J.-B., Brachais, L., Debeaufort, F., Voilley, A., & Chassagne, D. (2010). Wine oxidation and the role of cork. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(1), 20-52.
- Karvela, E., Makris, D. P., Kalogeropoulos, N., & Karathanos, V. T. (2009). Deployment of response surface methodology to optimise recovery of grape (*Vitis vinifera*) stem polyphenols. *Talanta*, 79(5), 1311-1321.
- King, R. E., Bomser, J. A., & Min, D. B. (2006). Bioactivity of resveratrol. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(3), 65-70.
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51-63.

- Lafka, T.-I., Sinanoglou, V., & Lazos, E. S. (2007). On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, 104(3), 1206-1214.
- Lafon-Lafourcade, S., Lonvaud-Funel, A., & Carre, E. (1983). Lactic acid bacteria of wines: stimulation of growth and malolactic fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49(3), 349-352.
- Lambert, C., Richard, T., Renouf, E., Bisson, J., Waffo-Téguo, P., Bordenave, L., Ollat, N., Mérillon, J. M., & Cluzet, S. (2013). Comparative analyses of stilbenoids in canes of major *Vitis vinifera* L. cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(47), 11392-11399.
- Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma: a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(32), 97.
- Landete, J. M., Ferrer, S., & Pardo, I. (2007). Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control*, 18(12), 1569-1574.
- Landete, J. M., Ferrer, S., Polo, L., & Pardo, I. (2005). Biogenic amines in wines from three Spanish regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 1119-1124.
- Landrault, N., Larronde, F., Delaunay, J.-C., Castagnino, C., Vercauteren, J., Merillon, J.-M., Gasc, F., Cros, G., & Teissedre, P.-L. (2002). Levels of stilbene oligomers and astilbin in French varietal wines and in grapes during noble rot development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 2046-2052.
- Lang, G., & Buchbauer, G. (2012). A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(1), 13-39.
- Langreo, A., & Castillo, J. S. (2014). Estructura, organización y modelos empresariales. *JS Castillo, JS and R. Compés (eds.), Economía del vino en España y el mundo, Cajamar Caja Rural: Almería*, 141-174.
- Larrosa, M., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2003). Antioxidant capacity

- of tomato juice functionalised with enzymatically synthesised hydroxytyrosol. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(7), 658-666.
- Larrosa, M., Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2004). The grape and wine polyphenol piceatannol is a potent inducer of apoptosis in human SK-Mel-28 melanoma cells. *European Journal of Nutrition*, 43(5), 275-284.
- Lasanta, C., Roldán, A., Caro, I., Pérez, L., & Palacios, V. (2010). Use of lysozyme for the prevention and treatment of heterolactic fermentation in the biological aging of sherry wines. *Food Control*, 21(11), 1442-1447.
- Lathey, K. A., Bramley, B. R., & Francis, I. L. (2010). Consumer acceptability, sensory properties and expert quality judgements of Australian Cabernet sauvignon and Shiraz wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16(1), 189-202.
- Lawless, H. T., & Heymann, H. G. (1999). *Sensory Evaluation of Food—Principles and Practices*.
- Lee, J., & Rennaker, C. (2007). Antioxidant capacity and stilbene contents of wines produced in the Snake River Valley of Idaho. *Food Chemistry*, 105(1), 195-203.
- Leong, S. Y., Burritt, D. J., & Oey, I. (2016). Evaluation of the anthocyanin release and health-promoting properties of Pinot Noir grape juices after pulsed electric fields. *Food Chemistry*, 196, 833-841.
- Lesage-Meessen, L., Navarro, D., Maunier, S., Sigoillot, J. C., Lorquin, J., Delattre, M., Simon, J. L., Asther, M., & Labat, M. (2001). Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry*, 75(4), 501-507.
- Li, H., Guo, A., & Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*, 108(1), 1-13.
- Liang, M., Liu, R., Qi, W., Su, R., Yu, Y., Wang, L., & He, Z. (2013). Interaction between lysozyme and procyanidin: Multilevel structural nature and effect of carbohydrates. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1596-1603.
- Liburdi, K., Benucci, I., & Esti, M. (2014). Lysozyme in wine: an overview of

- current and future applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 1062-1073.
- Liburdi, K., Benucci, I., Palumbo, F., & Esti, M. (2016). Lysozyme immobilized on chitosan beads: Kinetic characterization and antimicrobial activity in white wines. *Food Control*, 63, 46-52.
- Lisanti, M. T., Gambuti, A., Genovese, A., Piombino, P., & Moio, L. (2014). Earthy off-flavour in wine: evaluation of remedial treatments for geosmin contamination. *Food Chemistry*, 154, 171-178.
- Liu, D., Xing, R. R., Li, Z., Yang, D. M., & Pan, Q. H. (2016). Evolution of volatile compounds, aroma attributes, and sensory perception in bottle-aged red wines and their correlation. *European Food Research and Technology*, 242(11), 1937-1948.
- Livingston, J. R., Peterson, J. J., Martinez, G. A., Peck, C. J., Garrett, A. R., Uhl, R. A., Thompson, B. H., Shrestha, G., Robison, R. A. & O'Neill, K. L. (2015). The antioxidant and DNA repair activities of resveratrol, piceatannol, and pterostilbene. *Journal of Food Research*, 4(5), p9.
- Lodovici, M., Guglielmi, F., Casalini, C., Meoni, M., Cheynier, V., & Dolara, P. (2001). Antioxidant and radical scavenging properties in vitro of polyphenolic extracts from red wine. *European Journal of Nutrition*, 40(2), 74-77.
- Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. En *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* (pp. 317-331). Springer.
- Lopes, P., Silva, M. A., Pons, A., Tominaga, T., Lavigne, V., Saucier, C., ... Dubourdieu, D. (2009). Impact of oxygen dissolved at bottling and transmitted through closures on the composition and sensory properties of a Sauvignon blanc wine during bottle storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10261-10270.
- López-Giral, N., González-Arenzana, L., González-Ferrero, C., López, R., Santamaría, P., López-Alfaro, I., & Garde-Cerdán, T. (2015). Pulsed electric field treatment to improve the phenolic compound extraction from Graciano, Tempranillo and Grenache grape varieties during two vintages.

- López, I., Santamaría, P., Tenorio, C., Garijo, P., Gutiérrez, A. R., & López, R. (2009). Evaluation of lysozyme to control vinification process and histamine production in Rioja wines. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(9), 1005-1012.
- López, N., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2008). Application of pulsed electric fields for improving the maceration process during vinification of red wine: Influence of grape variety. *European Food Research and Technology*, 227(4), 1099-1107.
- López, N., Puértolas, E., Hernández-Orte, P., Álvarez, I., & Raso, J. (2009). Effect of a pulsed electric field treatment on the anthocyanins composition and other quality parameters of Cabernet sauvignon freshly fermented model wines obtained after different maceration times. *LWT - Food Science and Technology*, 42(7), 1225-1231.
- Louli, V., Ragoussis, N., & Magoulas, K. (2004). Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. *Bioresource technology*, 92(2), 201-208.
- Loureiro, V., & Malfeito-Ferreira, M. (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 23-50.
- Lucena Cobos, B., Cáceres Clavero, F., Cruz Gómez, J. C., & Méndez Rodríguez, M. Á. (2004). Sistemas de certificación de la calidad en el sector agroalimentario español. *Distribución y consumo*, (76), 23-39.
- Lund, C. M., Thompson, M. K., Benkwitz, F., Wohler, M. W., Triggs, C. M., Gardner, R., Heymann, H., & Nicolau, L. (2009). New Zealand Sauvignon blanc distinct flavor characteristics: sensory, chemical, and consumer aspects. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60(1), 1-12.
- Luque-Rodríguez, J. M., Pérez-Juan, P., & Luque de Castro, M. D. (2006). Extraction of polyphenols from vine shoots of *Vitis vinifera* by superheated ethanol-water mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8775-8781.
- Lustrato, G., Alfano, G., Belli, C., Grazia, L., Iorizzo, M., & Ranalli, G. (2006).

- Scaling-up in industrial winemaking using low electric current as an alternative to sulfur dioxide addition. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 682-690.
- Lustrato, G., Alfano, G., De Leonardis, A., Macciola, V., & Ranalli, G. (2015). Inactivation of *Dekkera bruxellensis* yeasts in wine storage in brand new oak barrels using low electric current technology. *Annals of Microbiology*, 65(4), 2091-2098.
- Lustrato, G., Vigentini, I., De Leonardis, A., Alfano, G., Tirelli, A., Foschino, R., & Ranalli, G. (2010). Inactivation of wine spoilage yeasts *Dekkera bruxellensis* using low electric current treatment (LEC). *Journal of Applied Microbiology*, 109(2), 594-604.
- Maass, D., Moya Ramírez, I., García Román, M., Jurado Alameda, E., Ulson de Souza, A. A., Borges Valle, J. A., & Altmajer Vaz, D. (2016). Two-phase olive mill waste (alpeorujo) as carbon source for biosurfactant production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(7), 1990-1997.
- Macheix, J., Sapis, J., Fleuriet, A., & Lee, C. Y. (1991). Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 30(4), 441-486.
- Makris, D. P., Boskou, G., & Andrikopoulos, N. K. (2007). Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2), 125-132.
- Makris, D. P., Kallithraka, S., & Kefalas, P. (2006). Flavonols in grapes, grape products and wines: burden, profile and influential parameters. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(5), 396-404.
- Malfeito-Ferreira, M. (2011). Yeasts and wine off-flavours: a technological perspective. *Annals of microbiology*, 61(1), 95-102.
- MAPAMA. (2015a). Balance del vino. Recuperado a partir de http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/avances-superficies-producciones-agricolas/cuaderno_diciembre2016_tcm7-446712.pdf

- MAPAMA. (2015b). Encuesta de superficies y rendimientos de cultivos (ESYRCE). Recuperado a partir de http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/boletin2015_tcm7-424015.pdf
- MAPAMA. (2015c). Encuesta de viñedo 2015. Recuperado a partir de http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/memofinalvinedo_tcm7-443391.pdf
- MAPAMA. (2015d). Indicadores y ratios nacionales de la industria agroalimentaria. Recuperado a partir de http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/_indicadoresyratiosnacionalyccaa2014_tcm7-421227.pdf
- MAPAMA. (2015e). Informe anual de la industria alimentaria española periodo 2014-2015. Recuperado a partir de http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/_informeanualindustriaalimentaria2014-2015_tcm7-421229.pdf
- MAPAMA. (2015f). Superficies y producción. Recuperado 15 de febrero de 2017, a partir de <http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/vitivinicultura/>
- MAPAMA. (2016). Análisis de AICA sobre el mercado del aceite de oliva y de la aceituna de mesa. Recuperado a partir de http://www.upa.es/upa/_depot/_documentos/5c7d82572fa2e591459412535.pdf
- Marcobal, Á., Martín-Álvarez, P. J., Polo, M. C., Muñoz, R., & Moreno-Arribas, M. V. (2006). Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. *Journal of Food Protection*, 69(2), 397-404.
- Marsellés-Fontanet, A. R., Puig, A., Olmos, P., Mínguez-Sanz, S., & Martín-Belloso, O. (2009). Optimising the inactivation of grape juice spoilage organisms by pulse electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, 130(3), 159-165.
- Martínez-González, M. A., Salas-Salvadó, J., Estruch, R., Corella, D., Fitó, M.,

- & Ros, E. (2015). Benefits of the Mediterranean diet: insights from the PREDIMED study. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 58(1), 50-60.
- Martínez, J. A., Melgosa, M., Pérez, M. M., Hita, E., & Negueruela, A. I. (2001). Note. Visual and instrumental color evaluation in red wines. *Food Science and Technology International*, 7(5), 439-444.
- Masson, G., & Schneider, R. (2009). Key compounds of provence rosé wine flavor. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60(1), 116-122.
- Mateos, R., Cert, A., Pérez-Camino, M. C., & García, J. M. (2004). Evaluation of virgin olive oil bitterness by quantification of secoiridoid derivatives. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(1), 71-75.
- Mateos, R., Domínguez, M. M., Espartero, J. L., & Cert, A. (2003). Antioxidant effect of phenolic compounds, α -tocopherol, and other minor components in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(24), 7170-7175.
- Mateos, R., Espartero, J. L., Trujillo, M., Rios, J. J., León-Camacho, M., Alcudia, F., & Cert, A. (2001). Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2185-2192.
- Mayr, C., Geue, J., Holt, H., Pearson, W., & Francis, I. L. (2014). Characterization of the key aroma compounds in Shiraz wine by quantitation, aroma reconstitution, and omission studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- McRae, J. M., & Kennedy, J. A. (2011). Wine and grape tannin interactions with salivary proteins and their impact on astringency: a review of current research. *Molecules*.
- Medina, E., Brenes, M., Romero, C., García, A., & Castro, A. de. (2007). Main antimicrobial compounds in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(24), 9817-9823.
- Medina, E., Romero, C., de los Santos, B., de Castro, A., García, A., Romero, F., & Brenes, M. (2011). Antimicrobial activity of olive solutions from stored

- alpeorujo against plant pathogenic microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 6927-6932.
- Minuti, L., Pellegrino, R. M., & Tesei, I. (2006). Simple extraction method and gas chromatography–mass spectrometry in the selective ion monitoring mode for the determination of phenols in wine. *Journal of Chromatography A*, 1114(2), 263-268.
- Moein, S. (2015). Polyphenols and cancer: a review. *Molecular medicine Journal*, 1(1), 6-12.
- Mohan, V., Das, S., & Rao, S. (2015). Hydroxytyrosol, a dietary phenolic compound forestalls the toxic effects of methylmercury-induced toxicity in IMR-32 human neuroblastoma cells. *Environmental Toxicology*.
- Monagas, M., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2005). Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle: II. Non-anthocyanins phenolic compounds. *European Food Research and Technology*, 220(3), 331-340. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1109-9>
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2005). Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle: I. Anthocyanins and pyranoanthocyanins. *European Food Research and Technology*, 220(5-6), 607-614.
- Monge, M., & Moreno-Arribas, M. V. (2016). Applications of nanotechnology in wine production and quality and safety control. En V. M. Moreno-Arribas & B. Bartolomé Suáldea (Eds.), *Wine Safety, Consumer Preference, and Human Health* (pp. 51-69). Cham: Springer International Publishing.
- Morata, A., Benito, S., González, M. C., Palomero, F., Tesfaye, W., & Suárez-Lepe, J. A. (2012). Cold pasteurisation of red wines with high hydrostatic pressure to control *Dekkera/Brettanomyces*: effect on both aromatic and chromatic quality of wine. *European Food Research and Technology*, 235(1), 147-154.
- Morata, A., Calderón, F., González, M. C., Gómez-Cordovés, M. C., & Suárez, J. A. (2007). Formation of the highly stable pyranoanthocyanins (vitisins A and B) in red wines by the addition of pyruvic acid and acetaldehyde. *Food*

Chemistry, 100(3), 1144-1152.

- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Calderón, F., & Suárez, J. A. (2006). Effects of pH, temperature and SO₂ on the formation of pyranoanthocyanins during red wine fermentation with two species of *Saccharomyces*. *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), 123-129.
- Moreira, N., Lopes, P., Ferreira, H., Cabral, M., & de Pinho, P. G. (2016). Influence of packaging and aging on the red wine volatile composition and sensory attributes. *Food Packaging and Shelf Life*, 8, 14-23.
- Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2009). *Wine chemistry and biochemistry* (Vol. 233). Springer.
- Moreno-Labanda, J. F., Mallavia, R., Pérez-Fons, L., Lizama, V., Saura, D., & Micol, V. (2004). Determination of piceid and resveratrol in Spanish wines deriving from Monastrell (*Vitis vinifera* L.) grape variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(17), 5396-5403.
- Morrot, G., Brochet, F., & Dubourdieu, D. (2001). The color of odors. *Brain and language*, 79(2), 309-320.
- Murias, M., Jäger, W., Handler, N., Erker, T., Horvath, Z., Szekeres, T., ... Gille, L. (2005). Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure-activity relationship. *Biochemical Pharmacology*, 69(6), 903-912.
- Nardi, T., Vagnoli, P., Minacci, A., Gautier, S., & Siczkowski, N. (2014). Evaluating the impact of a fungal-origin chitosan preparation on *Brettanomyces bruxellensis* in the context of wine aging. *Wine studies*, 3, 13-15.
- Nassiri-Asl, M., & Hosseinzadeh, H. (2016). Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its bioactive constituents: an update. *Phytotherapy Research*, 30(9), 1392-1403.
- Naugler, C., McCallum, J. L., Klassen, G., & Strommer, J. (2007). Concentrations of trans-resveratrol and related stilbenes in Nova Scotia wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58(1), 117-119.
- Niaounakis, M., & Halvadakis, C. P. (2004). *Olive-mill waste management:*

literature review and patent survey. Dardanos.

- Nieto-Rojo, R., Luquin, A., & Ancín-Azpilicueta, C. (2015). Improvement of wine aromatic quality using mixtures of lysozyme and dimethyl dicarbonate, with low SO₂ concentration. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(12), 1965-1975.
- Nikolantonaki, M., & Waterhouse, A. L. (2012). A method to quantify quinone reaction rates with wine relevant nucleophiles: a key to the understanding of oxidative loss of varietal thiols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(34), 8484-8491.
- O'Donnell, C. P., Tiwari, B. K., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2010). Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science and Technology*, 21(7), 358-367.
- Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., Robards, K., & Stockmann, R. (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 823-837.
- Obied, H. K., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2007). Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food and Chemical Toxicology*, 45(7), 1238-1248.
- Officioso, A., Alzoubi, K., Lang, F., & Manna, C. (2016). Hydroxytyrosol inhibits phosphatidylserine exposure and suicidal death induced by mercury in human erythrocytes: possible involvement of the glutathione pathway. *Food and Chemical Toxicology*, 89, 47-53.
- OIV. (2011). *OIV-MA-C1-01: R2011. Maximum acceptable limits of various substances. Compendium of international methods of wine and must analysis* (2011, Vol. 2). Paris: Organisation International de la Vigne et du Vin.
- OIV. (2012). *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins*. Paris: Organisation International de la Vigne et du Vin.
- OIV. (2015). <http://www.oiv.int/es/bases-de-datos-y-estadisticas>. Recuperado

15 de febrero de 2017, a partir de <http://www.oiv.int/public/medias/4526/oiv-vine-wine-outlook-2012-escomplet.pdf>

- Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S., De Freitas, V., & Silva, A. M. S. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44(5), 1115-1126.
- Ortega, C., López, R., Cacho, J., & Ferreira, V. (2001). Fast analysis of important wine volatile compounds: development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts. *Journal of Chromatography A*, 923(1), 205-214.
- Österbauer, R. A., Matthews, P. M., Jenkinson, M., Beckmann, C. F., Hansen, P. C., & Calvert, G. A. (2005). Color of scents: chromatic stimuli modulate odor responses in the human brain. *Journal of Neurophysiology*, 93(6), 3434-3441.
- Ough, C. S., & Crowell, E. A. (1987). Use of sulfur dioxide in winemaking. *Journal of Food Science*, 52(2), 386-388.
- Ovesná, Z., Kozics, K., Bader, Y., Saiko, P., Handler, N., Erker, T., & Szekeres, T. (2006). Antioxidant activity of resveratrol, piceatannol and 3, 3', 4, 4', 5, 5'-hexahydroxy-trans-stilbene in three leukemia cell lines. *Oncology Reports*, 16(3), 617-624.
- Oyarzún, M. T., & Tartanac, F. (2002). Estudio sobre los principales tipos de sellos de calidad en alimentos a nivel mundial. Estado actual y perspectivas de los sellos de calidad en productos alimenticios de la agroindustria rural en América Latina. *Santiago de Chile, Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, enero*. Recuperado a partir de <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/publicaciones/calidad/BPM/diferenciacion/sellosdecalidadFAO.pdf>
- Paixão, N., Perestrelo, R., Marques, J. C., & Câmara, J. S. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry*, 105(1), 204-214.
- Panero, L., Motta, S., Petrozziello, M., Guaita, M., & Bosso, A. (2015). Effect of

- SO₂, reduced glutathione and ellagitannins on the shelf life of bottled white wines. *European Food Research and Technology*, 240(2), 345-356.
- Pati, S., Crupi, P., Benucci, I., Antonacci, D., Di Luccia, A., & Esti, M. (2014). HPLC-DAD-MS/MS characterization of phenolic compounds in white wine stored without added sulfite. *Food Research International*, 66, 207-215.
- Pawlus, A. D., Waffo-Teguo, P., Shaver, J., & Merillon, J.-M. (2012). Stilbenoid chemistry from wine and the genus *Vitis*, a review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 46(2), 57-111.
- Pazos, M., Alonso, A., Fernández-Bolaños, J., Torres, J. L., & Medina, I. (2006). Physicochemical properties of natural phenolics from grapes and olive oil byproducts and their antioxidant activity in frozen horse mackerel fillets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2), 366-373.
- Pazos, M., Alonso, A., Sánchez, I., & Medina, I. (2008). Hydroxytyrosol prevents oxidative deterioration in foodstuffs rich in fish lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3334-3340.
- Peinado, R. A., Moreno, J., Bueno, J. E., Moreno, J. A., & Mauricio, J. C. (2004). Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chemistry*, 84(4), 585-590.
- Pereira, V., Cacho, J., & Marques, J. C. (2014). Volatile profile of Madeira wines submitted to traditional accelerated ageing. *Food Chemistry*, 162, 122-134.
- Perestrelo, R., Fernandes, A., Albuquerque, F. F., Marques, J. C., & Câmara, J. S. (2006). Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: Identification of the main odorants compounds. *Analytica Chimica Acta*, 563(1), 154-164.
- Pérez-Calderón, R., Gonzalo-Garijo, M. A., Lamilla-Yerga, A., Mangas-Santos, R., & Moreno-Gastón, I. (2007). Recurrent angioedema due to lysozyme allergy. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 17(4), 264-266.
- Perez-Magarino, S., & Gonzalez-San Jose, M. L. (2004). Evolution of flavanols, anthocyanins, and their derivatives during the aging of red wines

- elaborated from grapes harvested at different stages of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1181-1189.
- Petrova, B., Cartwright, Z. M., & Edwards, C. G. (2016). Effectiveness of chitosan preparations against *Brettanomyces bruxellensis* grown in culture media and red wines. *OENO One*, 50(1), 49-56.
- Peynaud, E., & Ribereau-Gayon, P. (1971). The biochemistry of fruits and their products, vol. 2. Academic Press, New York.
- Picinelli, A., Bakker, J., & Bridle, P. (1994). Model wine solutions: effect of sulphur dioxide on colour and composition during ageing. *Vitis*, 33(1), 31-35.
- Pilatte, E., Nygaard, M., Cai Gao, Y., Krentz, S., Power, J., & Lagarde, G. (2000). Etude de l'effet du lysozyme sur différentes souches d'*Oenococcus oeni*. Applications dans la gestion de la fermentation malolactique. *Revue française d'oenologie*, (185), 26-29.
- Pineau, B., Barbe, J.-C., Van Leeuwen, C., & Dubourdieu, D. (2009). Examples of perceptive interactions involved in specific «red-» and «black-berry» aromas in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3702-3708.
- Piñeiro, Z., Cantos-Villar, E., Palma, M., & Puertas, B. (2011). Direct liquid chromatography method for the simultaneous quantification of hydroxytyrosol and tyrosol in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11683-11689.
- Piñeiro, Z., Guerrero, R. F., Fernandez-Marin, M. I., Cantos-Villar, E., & Palma, M. (2013). Ultrasound-assisted extraction of stilbenoids from grape stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Pons, A., Lavigne, V., Landais, Y., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (2010). Identification of a sotolon pathway in dry white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 7273-7279.
- Pons, M., Dauphin, B., La Guerche, S., Pons, A., Lavigne-Cruege, V., Shinkaruk, S., Bunner, D., Richard, T., & Darriet, P. (2011). Identification of impact odorants contributing to fresh mushroom off-flavor in wines: incidence of

- their reactivity with nitrogen compounds on the decrease of the olfactory defect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 3264-3272.
- Pozo-Bayón, M. Á., G-Alegría, E., Polo, M. C., Tenorio, C., Martín-Álvarez, P. J., Calvo de la Banda, M. T., Ruiz-Larrea, F., & Moreno-Arribas, M. V. (2005). Wine volatile and amino acid composition after malolactic fermentation: effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8729-8735.
- Proestos, C., Bakogiannis, A., Psarianos, C., Koutinas, A. A., Kanellaki, M., & Komaitis, M. (2005). High performance liquid chromatography analysis of phenolic substances in Greek wines. *Food Control*, 16(4), 319-323.
- Puértolas, E., López, N., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2010). Potential applications of PEF to improve red wine quality. *Trends in Food Science & Technology*, 21(5), 247-255.
- Puértolas, E., López, N., Condón, S., Raso, J., & Álvarez, I. (2009). Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *International journal of food microbiology*, 130(1), 49-55.
- Puértolas, E., Saldaña, G., Álvarez, I., & Raso, J. (2010). Effect of Pulsed Electric Field Processing of Red Grapes on Wine Chromatic and Phenolic Characteristics during Aging in Oak Barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2351-2357.
- Puértolas, E., Saldaña, G., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2009). A comparison of the effect of macerating enzymes and pulsed electric fields technology on phenolic content and color of red wine. *Journal of food science*, 74(9), C647-C652.
- Puértolas, E., Saldaña, G., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2010). Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle. *Food Chemistry*, 119(3), 1063-1070.
- Puig, A., Olmos, P., Quevedo, J. M., Guamis, B., & Mínguez, S. (2008). Microbiological and sensory effects of musts treated by high-pressure homogenization. *Food Science and Technology International*, 14(5 suppl), 5-11.

- Qin, G., & Meng, Z. (2009). Effects of sulfur dioxide derivatives on expression of oncogenes and tumor suppressor genes in human bronchial epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology*, 47(4), 734-744.
- Raafat, D., & Sahl, H. (2009). Chitosan and its antimicrobial potential—a critical literature survey. *Microbial biotechnology*, 2(2), 186-201.
- Ramos-Cormenzana, A., Juárez-Jiménez, B., & Garcia-Pareja, M. P. (1996). Antimicrobial activity of olive mill wastewaters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 38(3-4), 283-290.
- Rapp, A., & Mandery, H. (1986). Wine aroma. *Experientia*, 42(8), 873-884.
- Rapp, A., & Versini, G. (1995). Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. *Developments in Food Science*, 37, 1659-1694.
- Rathnayake, I., Ismail, H., Azahari, B., Darsanasiri, N. D., & Rajapakse, S. (2012). Synthesis and characterization of nano-silver incorporated natural rubber latex foam. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 51(6), 605-611.
- Rayne, S., Karacabey, E., & Mazza, G. (2008). Grape cane waste as a source of trans-resveratrol and trans-viniferin: high-value phytochemicals with medicinal and anti-phytopathogenic applications. *Industrial Crops and Products*, 27(3), 335-340.
- Recamales, Á. F., Sayago, A., González-Miret, M. L., & Hernanz, D. (2006). The effect of time and storage conditions on the phenolic composition and colour of white wine. *Food Research International*, 39(2), 220-229.
- Remize, F., Sablayrolles, J. M., & Dequin, S. (2000). Re-assessment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerol production in wine. *Journal of Applied Microbiology*, 88(3), 371-378.
- Renaud, S. C., Guéguen, R., Conard, P., Lanzmann-Petithory, D., Orgogozo, J.-M., & Henry, O. (2004). Moderate wine drinkers have lower hypertension-related mortality: a prospective cohort study in French men. *The American journal of clinical nutrition*, 80(3), 621-625.
- Renaud, S. de, & de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French

- paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339(8808), 1523-1526.
- Renouf, V., Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. (2005). Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 316-327.
- Renouf, V., Strehaiano, P., & Lonvaud-Funel, A. (2008). Effectiveness of dimethyldicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine. *Food Control*, 19(2), 208-216.
- Rentzsch, M., Schwarz, M., Winterhalter, P., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). Formation of hydroxyphenyl-pyranoanthocyanins in Grenache wines: precursor levels and evolution during aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4883-4888.
- Ribeiro de Lima, M. T., Waffo-Téguo, P., Teissedre, P. L., Pujolas, A., Vercauteren, J., Cabanis, J. C., & Mérillon, J. M. (1999). Determination of stilbenes (trans-astringin, cis- and trans-piceid, and cis- and trans-resveratrol) in Portuguese wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(7), 2666-2670.
- Ribéreau-Gayon, J. (1975). *Traité d'œnologie, sciences et techniques du vin*. Dunod. Paris. FR.
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook of enology: the microbiology of wine and vinifications* (2nd ed., Vol. 1). Chichester: Wiley.
- Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of enology: the chemistry of wine stabilization and treatments* (2nd ed., Vol. 2). Chichester: Wiley.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
- Rivière, C., Richard, T., Quentin, L., Krisa, S., Mérillon, J.-M., & Monti, J.-P. (2007). Inhibitory activity of stilbenes on Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(2), 1160-1167.

- Rizzotti, L., Levav, N., Fracchetti, F., Felis, G. E., & Torriani, S. (2015). Effect of UV-C treatment on the microbial population of white and red wines, as revealed by conventional plating and PMA-qPCR methods. *Food Control*, 47, 407-412.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66(4), 401-436.
- Rodríguez-Morató, J., Xicota, L., Fitó, M., Farré, M., Dierssen, M., & de la Torre, R. (2015). Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. *Molecules*, 20(3), 4655-4680.
- Roig, A., Cayuela, M. L., & Sánchez-Monedero, M. A. (2006). An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*, 26(9), 960-969.
- Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Zarazaga, M., Torres, C., & Ruiz-Larrea, F. (2007). Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 116(1), 32-36.
- Roldán, A., Lasanta, C., Caro, I., & Palacios, V. (2012). Effect of lysozyme on «flor» velum yeasts in the biological aging of sherry wines. *Food Microbiology*, 30(1), 245-252.
- Romain, C., Gaillet, S., Carillon, J., Vidé, J., Ramos, J., Izard, J.-C., Cristol, J.-P., & Rouanet, J.-M. (2012). Vineatrol and cardiovascular disease: beneficial effects of a vine-shoot phenolic extract in a hamster atherosclerosis model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(44), 11029-11036.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., & Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International journal of food microbiology*, 86(1), 169-180.
- Romano, P., & Suzzi, G. (1993). Sulfur dioxide and wine microorganisms. En G. H. Fleet (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology* (pp. 373-393). Ed., Harwood Academic Publishers GmbH.
- Romero, C., Brenes, M., Yousfi, K., García, P., García, A., & Garrido, A. (2004).

- Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 479-484.
- Ros, E., Martínez-González, M. A., Estruch, R., Salas-Salvadó, J., Fitó, M., Martínez, J. A., & Corella, D. (2014). Mediterranean diet and cardiovascular health: teachings of the PREDIMED study. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 5(3), 330S-336S.
- Rudnitskaya, A., Nieuwoudt, H. H., Muller, N., Legin, A., du Toit, M., & Bauer, F. F. (2010). Instrumental measurement of bitter taste in red wine using an electronic tongue. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(7), 3051-3060.
- Sacchi, K. L., Bisson, L. F., & Adams, D. O. (2005). A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(3), 197-206.
- Sáenz-Navajas, M.-P., Avizcuri, J.-M., Ballester, J., Fernández-Zurbano, P., Ferreira, V., Peyron, D., & Valentin, D. (2015). Sensory-active compounds influencing wine experts' and consumers' perception of red wine intrinsic quality. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 400-411.
- Sáenz-Navajas, M.-P., Ferreira, V., Dizey, M., & Fernández-Zurbano, P. (2010). Characterization of taste-active fractions in red wine combining HPLC fractionation, sensory analysis and ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*, 673(2), 151-159.
- Saint-Cricq de Gaulejac, N., Vivas, N., & Glories, Y. (1998). *Maturité phénolique: définition et contrôle*. Lattes, FRANCE: Union des oenologues de France.
- Salaha, M.-I., Kallithraka, S., Marmaras, I., Koussissi, E., & Tzourou, I. (2008). A natural alternative to sulphur dioxide for red wine production: influence on colour, antioxidant activity and anthocyanin content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8), 660-666.
- Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2014). Vine-shoot waste aqueous extracts for re-use in agriculture obtained by different extraction techniques: phenolic, volatile, and mineral compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(45), 10861-10872.

- Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2016). Effect of toasting on non-volatile and volatile vine-shoots low molecular weight phenolic compounds. *Food Chemistry*, *204*, 499-505.
- Santos-Buelga, C., & Freitas, V. de. (2009). Influence of phenolics on wine organoleptic properties. En M. V. Moreno-Arribas & M. C. Polo (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry* (pp. 529-570). New York, NY: Springer New York.
- Santos-Buelga, C., & Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds—nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(7), 1094-1117.
- Santos, M. C., Nunes, C., Cappelle, J., Gonçalves, F. J., Rodrigues, A., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2013). Effect of high pressure treatments on the physicochemical properties of a sulphur dioxide-free red wine. *Food Chemistry*, *141*(3), 2558-2566.
- Santos, M. C., Nunes, C., Jourdes, M., Teissedre, P.-L., Rodrigues, A., Amado, O., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2016). Evaluation of the potential of high pressure technology as an enological practice for red wines. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *33*, 76-83.
- Santos, M. C., Nunes, C., Rocha, M. A. M., Rodrigues, A., Rocha, S. M., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2015). High pressure treatments accelerate changes in volatile composition of sulphur dioxide-free wine during bottle storage. *Food Chemistry*, *188*, 406-414.
- Santos, M. C., Nunes, C., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2012). Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *European Food Research and Technology*, *234*(1), 1-12.
- Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1999). Interactions of grape seed tannins with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(1), 42-47.
- Sarni-Manchado, P., Fulcrand, H., Souquet, J. M., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1996). Stability and color of unreported wine anthocyanin-derived pigments. *Journal of Food Science*, *61*(5), 938-941.

- Sarrazin, E., Dubourdieu, D., & Darriet, P. (2007). Characterization of key-aroma compounds of botrytized wines, influence of grape botrytization. *Food Chemistry*, 103(2), 536-545.
- Saucier, C., & Waterhouse, A. L. (1999). Synergetic activity of catechin and other antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(11).
- Schaffer, S., & Podstawa, M. (2007). Hydroxytyrosol-rich olive mill wastewater extract protects brain cells in vitro and ex vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13), 5043-5049.
- Schreier, P., & Jennings, W. G. (1979). Flavor composition of wines: a review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 12(1), 59-111.
- Schwarz, B., & Hofmann, T. (2008). Is there a direct relationship between oral astringency and human salivary protein binding? *European Food Research and Technology*, 227(6), 1693.
- Schwarz, M., Hofmann, G., & Winterhalter, P. (2004). Investigations on anthocyanins in wines from *Vitis vinifera* cv. Pinotage: factors influencing the formation of Pinotin A and its correlation with wine age. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 498-504.
- Schwarz, M., Jerz, J., & Winterhalter, P. (2003). Isolation and structure of Pinotin A, a new anthocyanin derivative from Pinotage wine. *Vitis*, 42(2), 105-106.
- Selani, M. M., Contreras-Castillo, C. J., Shirahigue, L. D., Gallo, C. R., Plata-Oviedo, M., & Montes-Villanueva, N. D. (2011). Wine industry residues extracts as natural antioxidants in raw and cooked chicken meat during frozen storage. *Meat science*, 88(3), 397-403.
- Semidalas, C., Semidalas, E., Matsoukas, M. T., Nixarlidis, C., & Zoumpoulakis, P. (2016). In silico studies reveal the mechanisms behind the antioxidant and anti-inflammatory activities of hydroxytyrosol. *Medicinal Chemistry Research*, 25(11), 2498-2511.
- Serra, A. T., Matias, A. A., Nunes, A. V. M., Leitão, M. C., Brito, D., Bronze, R., ... Duarte, C. M. (2008). In vitro evaluation of olive- and grape-based natural extracts as potential preservatives for food. *Innovative Food Science*

& *Emerging Technologies*, 9(3), 311-319.

- Silva Ferreira, A. C., Guedes de Pinho, P., Rodrigues, P., & Hogg, T. (2002). Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5919-5924.
- Silva Ferreira, A. C., Hogg, T., & Guedes de Pinho, P. (2003). Identification of key odorants related to the typical aroma of oxidation-spoiled white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1377-1381.
- Silver, S., Phung, L. T., & Silver, G. (2006). Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(7), 627-634.
- Singleton, V. L., & Trousdale, E. (1983). White wine phenolics: varietal and processing differences as shown by HPLC. *American journal of enology and viticulture*, 34(1), 27-34.
- Sioumis, N., Kallithraka, S., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2006). Kinetics of browning onset in white wines: influence of principal redox-active polyphenols and impact on the reducing capacity. *Food Chemistry*, 94(1), 98-104.
- Sioumis, N., Kallithraka, S., Tsoutsouras, E., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2005). Browning development in white wines: dependence on compositional parameters and impact on antioxidant characteristics. *European Food Research and Technology*, 220(3-4), 326-330.
- Smit, A. Y., Du Toit, W. J., & Du Toit, M. (2008). Biogenic amines in wine: understanding the headache. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 29(2).
- Smoliga, J. M., Baur, J. A., & Hausenblas, H. A. (2011). Resveratrol and health—a comprehensive review of human clinical trials. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(8), 1129-1141.
- Soares, S., Brandão, E., Mateus, N., & De Freitas, V. (2015). Sensorial properties of red wine polyphenols: astringency and bitterness. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.

- Soares da Costa, M., Gonçalves, C., Ferreira, A., Ibsen, C., Guedes de Pinho, P., & Silva Ferreira, A. C. (2004). Further insights into the role of methional and phenylacetaldehyde in lager beer flavor stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7911-7917.
- Somers, T. C. (1986). Evolution of red wines I. Ambient influences on colour composition during early maturation. *Vitis*, 25, 31-39.
- Sonni, F., Cejudo Bastante, M. J., Chinnici, F., Natali, N., & Riponi, C. (2009). Replacement of sulfur dioxide by lysozyme and oenological tannins during fermentation: influence on volatile composition of white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(4), 688-696.
- Sonni, F., Chinnici, F., Natali, N., & Riponi, C. (2011). Pre-fermentative replacement of sulphur dioxide by lysozyme and oenological tannins: effect on the formation and evolution of volatile compounds during the bottle storage of white wines. *Food Chemistry*, 129(3), 1193-1200.
- Souquet, J.-M., Labarbe, B., Le Guernevé, C., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2000). Phenolic composition of grape stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1076-1080.
- Stark, T., Wollmann, N., Lösch, S., & Hofmann, T. (2011). Quantitation of resveratrol in red wines by means of stable isotope dilution Analysis-Ultra-Performance Liquid Chromatography-Quantitative-Time-of-Flight Mass Spectrometry and cross validation. *Analytical Chemistry*, 83(9), 3398-3405.
- Stone, H., Bleibaum, R., & Thomas, H. A. (2012). *Sensory evaluation practices* (4th ed.). San Diego: Academic press.
- Styger, G., Prior, B., & Bauer, F. F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(9), 1145.
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J. A., Morata, A., & Calderón, F. (2007). The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review. *Food Chemistry*, 102(1), 10-21.
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 139.

- Swiegers, J. H., Francis, I. L., Herderich, M. J., & Pretorius, I. S. (2006). Meeting consumer expectations through management in vineyard and winery. *Wine Industry Journal*, 21(1), 34-43.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., & Dommes, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113(4), 1226-1233.
- Tabilo-munizaga, G., Ann, T., Villalobos-carvajal, R., Moreno-osorio, L., Salazar, F. N., Pérez-won, M., & Acuña, S. (2014). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on the protein structure and thermal stability of Sauvignon blanc wine, 155, 214-220.
- Tagliaferro, L., Officioso, A., Sorbo, S., Basile, A., & Manna, C. (2015). The protective role of olive oil hydroxytyrosol against oxidative alterations induced by mercury in human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 82, 59-63.
- Taillandier, P., Joannis-Cassan, C., Jentzer, J.-B., Gautier, S., Sieczkowski, N., Granes, D., & Brandam, C. (2015). Effect of a fungal chitosan preparation on *Brettanomyces bruxellensis*, a wine contaminant. *Journal of Applied Microbiology*, 118(1), 123-31.
- Talcott, S. T., Brenes, C. H., Pires, D. M., & Del Pozo-Insfran, D. (2003). Phytochemical stability and color retention of copigmented and processed muscadine grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 957-963.
- Tao, Y., Wu, D., Sun, D.-W., Górecki, A., Błaszczak, W., Fornal, J., & Jeliński, T. (2013). Quantitative and predictive study of the evolution of wine quality parameters during high hydrostatic pressure processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 81-90.
- Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, A. D., & Garcia-Viguera, C. (2014). Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Threlfall, R. T., & Morris, J. R. (2002). Using dimethyldicarbonate to minimize sulfur dioxide for prevention of fermentation from excessive yeast

- contamination in juice and semi-sweet wine. *Journal of food science*, 67(7), 2758-2762.
- Tirelli, A., & De Noni, I. (2007). Evaluation of lysozyme stability in young red wine and model systems by a validated HPLC method. *Food Chemistry*, 105(4), 1564-1570.
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., & Cullen, P. J. (2009). Effect of non thermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices. *Trends in Food Science and Technology*, 20(3-4), 137-145.
- Tsukamoto, I., Yim, B., Stavarache, C. E., Furuta, M., Hashiba, K., & Maeda, Y. (2004). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by ultrasonic irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(2), 61-65.
- Ugliano, M. (2013). Oxygen contribution to wine aroma evolution during bottle aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(26), 6125-6136.
- Ugliano, M., Dieval, J. B., Siebert, T. E., Kwiatkowski, M., Aagaard, O., Vidal, S., & Waters, E. J. (2012). Oxygen consumption and development of volatile sulfur compounds during bottle aging of two Shiraz wines. Influence of pre- and postbottling controlled oxygen exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(35), 8561-8570.
- Ugliano, M., & Henschke, P. (2009). Yeasts and wine flavour. En M. V. Moreno-Arribas & M. C. Polo (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry* (pp. 313-392). Springer New York.
- Ugliano, M., Kwiatkowski, M., Vidal, S., Capone, D., Siebert, T., Dieval, J.-B., ... Waters, E. J. (2011). Evolution of 3-mercaptohexanol, hydrogen sulfide, and methyl mercaptan during bottle storage of Sauvignon blanc wines. Effect of glutathione, copper, oxygen exposure, and closure-derived oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2564-2572.
- Valero, E., Moyano, L., Millan, M. C., Medina, M., & Ortega, J. M. (2002). Higher alcohols and esters production by *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of the initial oxygenation of the grape must. *Food Chemistry*, 78(1), 57-61.
- Vally, H., Misso, N. L. A., & Madan, V. (2009). Clinical effects of sulphite additives. *Clinical & Experimental Allergy*, 39(11), 1643-1651.

- Vally, H., & Thompson, P. J. (2001). Role of sulfite additives in wine induced asthma: single dose and cumulative dose studies. *Thorax*, 56(10), 763-769.
- Vaquero, M. J. R., Alberto, M. R., & de Nadra, M. C. M. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, 18(2), 93-101.
- Vidal, S., Francis, L., Noble, A., Kwiatkowski, M., Cheynier, V., & Waters, E. (2004). Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 57-65.
- Vilaplana Pérez, C., Auñon Calles, D., García Flores, L. A., & Gil-Izquierdo, A. (2014). Hydroxytyrosol and potential uses in cardiovascular diseases, cancer and AIDS. *Frontiers in Nutrition*, 1.
- Visioli, F., Bellomo, G., Montedoro, G., & Galli, C. (1995). Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis*, 117(1), 25-32.
- Visioli, F., Vinceri, F. F., & Galli, C. (1995). «Waste waters» from olive oil production are rich in natural antioxidants. *Experientia*, 51(1), 32—34.
- Vitrac, X., Bornet, A., Vanderlinde, R., Valls, J., Richard, T., Delaunay, J.-C., ... Teissédre, P.-L. (2005). Determination of stilbenes (δ -viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis-and trans-resveratrol, ϵ -viniferin) in Brazilian wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5664-5669.
- Vitrac, X., Monti, J.-P., Vercauteren, J., Deffieux, G., & Mérillon, J.-M. (2002). Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 103-110.
- Waffo-Teguo, P., Krisa, S., Richard, T., & Mérillon, J.-M. (2008). Grapevine stilbenes and their biological effects. En *Bioactive Molecules and Medicinal Plants* (pp. 25-54). Springer.
- Waterhouse, A. L., Frost, S., Ugliano, M., Cantu, A. R., Currie, B. L., Anderson, M., Chassy, A. W., Vidal, S., Diéval, J.-B., Aagaard, O., & Heymann, H. (2016). Sulfur dioxide – oxygen consumption ratio reveals differences in

- bottled wine oxidation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 67(4), 449-459.
- Waterhouse, A. L., & Laurie, V. F. (2006). Oxidation of wine phenolics: a critical evaluation and hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 306-313.
- Weber, P., Kratzin, H., Brockow, K., Ring, J., Steinhart, H., & Paschke, A. (2009). Lysozyme in wine: a risk evaluation for consumers allergic to hen's egg. *Molecular nutrition & food research*, 53(11), 1469-1477.
- Weber, P., Steinhart, H., & Paschke, A. (2007). Investigation of the allergenic potential of wines fined with various proteinogenic fining agents by ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 3127-3133.
- Weston, L. A. (2000). Grape and Wine Tannins and Phenolics: Their Roles in Flavor, Quality and Human Health.
- Xia, E.-Q., Deng, G.-F., Guo, Y.-J., & Li, H.-B. (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), 622-646.
- Yang, N., Huang, K., Lyu, C., & Wang, J. (2016). Pulsed electric field technology in the manufacturing processes of wine, beer, and rice wine: a review. *Food Control*, 61, 28-38.
- Yangui, T., Dhouib, A., Rhouma, A., & Sayadi, S. (2009). Potential of hydroxytyrosol-rich composition from olive mill wastewater as a natural disinfectant and its effect on seeds vigour response. *Food Chemistry*, 117(1), 1-8.
- Yáñez, M., Fraiz, N., Cano, E., & Orallo, F. (2006). (-)-Trans- ϵ -viniferin, a polyphenol present in wines, is an inhibitor of noradrenaline and 5-hydroxytryptamine uptake and of monoamine oxidase activity. *European Journal of Pharmacology*, 542(1), 54-60.
- Yaun, B. R., Sumner, S. S., Eifert, J. D., & Marcy, J. E. (2004). Inhibition of pathogens on fresh produce by ultraviolet energy. *International Journal of Food Microbiology*, 90(1), 1-8.
- Yurdugül, S., & Bozoglu, F. (2002). Studies on an inhibitor produced by lactic

acid bacteria of wines on the control of malolactic fermentation. *European Food Research and Technology*, 215(1), 38-41.

Zamora, F. (2013). La química del color del vino. *ACENOLOGÍA*, 140.

Zhang, H., Jia, R., Wang, C., Hu, T., & Wang, F. (2014). Piceatannol promotes apoptosis via up-regulation of microRNA-129 expression in colorectal cancer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 452(3), 775-781.

Zhao, W., Yang, R., Hua, X., Zhang, W., Tang, Y., & Chen, T. (2010). Inactivation of polyphenoloxidase of pear by Pulsed Electric Fields. *International Journal of Food Engineering*, 6(3).

Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., & Nury, F. S. (1995). Volatile acidity. En *Wine analysis and production* (pp. 192-198). Springer.

Zuzuarregui, A., Carrasco, P., Palacios, A., Julien, A., & Olmo, M. (2005). Analysis of the expression of some stress induced genes in several commercial wine yeast strains at the beginning of vinification. *Journal of applied microbiology*, 98(2), 299-307.