

Facile application de la RMN du carbone-13 à l'identification et à la quantification du glycérol dans les vins : études des vins provenant de Madagascar

José Toussaint RAZAFINDRABE* et Manoelson TIANASOA RAMAMONJY

*Département de Chimie Minérale et Chimie Physique, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo
BP906 - 101 Antananarivo, Madagascar*

* Correspondance, courriel : rjtoussaint@yahoo.fr

Résumé

Le glycérol est parmi les constituants majeurs qui influent sur la qualité des vins. En appliquant la séquence RMN de carbone-13 des sucres en mélanges complexes, nous avons réussi à identifier facilement le glycérol parmi les pics de carbone des extraits de vin et à le quantifier utilisant la méthode de Mazzoni. Les résultats ont montré ces vins dont la marge de variation de la teneur en glycérol se situe dans la plage des teneurs naturelles des vins sont indemnes de toute falsification et de contamination par champignon dont le *Botrytis cinerea*. Plus important, ces résultats sembleraient montrer que l'on pourrait utiliser les teneurs en glycérol comme indicateur chimiotaxomique. A notre connaissance, ce travail est le premier qui applique la RMN du carbone-13 à l'analyse directe du glycérol dans les mélanges complexes d'extrait de vin.

Mots-clés : *vin, glycérol, RMN du carbone-13, mélanges complexes, quantification, indicateur chimiotaxomique*

Abstract

Facile 13C-NMR application of the identification and quantitation of glycerol in wines: study of Wines from Madagascar

The glycerol is among the major constituents which is influencing the quality of wines. Glycerol was easily identified among the wine extract complex mixture peaks in applying the sugar NMR carbon-13 sequence and quantified using the Mazzoni method. Results showed that these wines are free of adulteration and of *Botrytis cinerea fungus* contamination as their range of glycerol concentration fall the range of natural occurrence of glycerol in wines. More importantly, these results would indicate that glycerol may be used as a chemotaxonomic indicator. At our knowledge, this work is the first to deal with the carbon-13 NMR for the glycerol direct analysis in the wine extract complex mixtures.

Keywords : *wine, glycerol, carbon-13 NMR, complex mixtures, quantification, chemotaxonomic indicator.*

1. Introduction

Le glycérol [1] tient un rôle majeur dans la composition du vin en étant la troisième composante après l'eau et l'alcool. Même si le glycérol, qui n'est pas du tout volatil et n'a pas ainsi d'impact direct sur les propriétés aromatiques du vin, il apporte à celui-ci son caractère coulant, gras moelleux très apprécié [2]. Et même si la teneur en glycérol n'est pas exigée dans les normes européennes de contrôle de la qualité des vins [3], sa détermination est très recherchée. Ainsi, de nombreuses méthodologies ont été utilisées pour la détermination des glycérols dans les vins. Une des plus anciennes la plus utilisée est la méthode chimique de colorimétrie de Rebeilen mais qui nécessite des traitements préalables de clarification et de purifications pour être fiable [4]. Les méthodes enzymatiques paraissent plus spécifiques dans l'analyse du glycérol mais peuvent être affectées par les teneurs en sucre telles que l'utilisation du déshydrogénase du glycérol par FIA [5]. L'utilisation du CPG nécessite une dérivation préalable du glycérol pour l'obtention des composés plus volatils ou sur colonne Chromosorb 101 nécessitant une dilution des échantillons avant analyse [6].

L'analyse directe des vins être effectuée par HPLC utilisant des colonnes échangeuses d'anion et par couplage avec IR par transformé de Fourier, permet de détecter simultanément le glycérol avec des sucres et des acides [7]. Les travaux de Casanova *et coll.* sur des familles de composés dans des mélanges complexes naturels tels que les composés phénoliques dans les liquides de pyrolyse des bois [8] ou les huiles essentielles [9], les composés triterpéniques dans les bouchons de lièges [10]; les miels et les extraits lipidiques [11], les résines et huiles essentielles de pin [12] ou les sucres des extraits éthanoliques de bois [13] en utilisant l'analyse directe avec RMN du carbone-13 assistée par ordinateur sans séparation préalable ont démontré la facilité et fiabilité de cette méthode éminemment non invasive. Dans une étude antérieure, nous avons appliqué cette méthodologie dans l'analyse qualitative et quantitative des sucres dans des vins de Madagascar [14] en reprenant l'approche de Mazzoni pour les sucres des miels de Corse que Tianasoa Ramamonjy a repris pour l'étude des miels de Madagascar [15]. Dans la poursuite de cette étude sur les constituants des vins, nous avons, dans la foulée, appliquée la même méthodologie pour l'étude du glycérol provenant des mêmes extraits bruts de vins provenant de quatre régions différentes de Madagascar. Les valeurs des déplacements chimiques des carbones en fonction des intensités des signaux de chaque vin sont reportées dans un tableau. Elles seront suivies par des discussions et études comparatives avec des données de la littérature.

2. Méthodologie

2-1. Échantillonnage

Les champs de vignoble se trouvent sur les hauts plateaux, et se situent à une altitude moyenne de 1400 mètres. Quatre localités ont été choisies : Antananarivo (capital), Antsirabe, Fianarantsoa et Ambalavao. Tous les échantillons de vin ont été collectés pendant une période de trois années allant de 2008 à 2011 auprès des producteurs eux-mêmes et étiquetés : TANA (région d'Antananarivo); ATB (région d'Antsirabe); FIANAR (région de Fianarantsoa et ABLV (région d'Ambalavao) et *qualifiés* avec R (rouge) et B (blanc).

Région d'Antananarivo. Les terrains de vignobles situés dans une cuvette se trouvant à Androhibe : TANA B : (vignoble d'Androhibe); TANA R (même localité); TANA sp : (Vin blanc de messe spécial) - **Région d'Antsirabe.** La région d'Antsirabe, terrain volcanique à climat le plus froid de l'île (160 km d'Antananarivo) : ATB B (160 Km d'Antananarivo); ATB R (même site). - **Région de Fianarantsoa** : 400 km

d'Antananarivo. Trois échantillonnages FIANAR B : (Antalatan' Ampano, 420Km d'Antananarivo) ; FIANAR R : (400Km d'Antananarivo). - **Région d'Ambalavao**. ABLV B (Vatoavo, 450 Km d'Antananarivo) ; ABLV R: (Société Ambalavao ville, 454 km d'Antananarivo).

2-2. Appareillage

Les mesures RMN ont été effectués à l'aide d'un spectromètre « Bruker Avance 400 » opérant à 9,4T (400,13 pour ^1H ; 100,63 MHz pour ^{13}C).

2-3. Préparation des échantillons de vin

Les échantillons de vin (150 mL) sont évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif à basse pression (45 mPa) jusqu'à l'obtention d'une substance mielleuse de couleur brune a été obtenue. Cet extrait pesé est conservé sans précautions spéciales pour les enregistrements des spectres de la RMN ^{13}C .

3. Analyse

Préparation des échantillons pour analyse RMN. Environ 50-70 mg d'extrait de vin (pesé et noté soigneusement) sont dissous dans un bêcher dans du mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 95:5 en volume au l'on ramène ensuite à 0,5 ml après transfert dans un tube RMN de 5mm. On ajoute avec précaution quelques gouttes de dioxanne-1,4 (5-7 mg) et dont on note soigneusement la masse qui va servir de référence interne pour l'enregistrement du spectre RMN [15].

3-1. Analyse par RMN du carbone-13. T

Tous les spectres RMN ont été enregistrés sur appareil Bruker Avance 400 opérant à 9,4 T (400,13 pour ^1H ; 100,63 MHz pour ^{13}C) avec une sonde de 5mm et à la température ambiante de 21°C. Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au dioxanne-1,4 comme pris comme référence interne à ($^{13}\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$; 67,12 ppm). Les enregistrements sont effectués avec une largeur spectrale complète de 250 ppm avec découplage standard en mode CPD (Composite Phase Decoupling) avec les paramètres suivants : largeur d'impulsion = 2,67 μs (angle de Ernst égal à 30°); temps d'acquisition = 1,3 s (64K de données); temps de relaxation : 1 s (donnant un temps total de répétition de 2,3 s. La résolution digitale est de 0,183 Hz/pt ; le nombre d'accumulation est de 3000 pour un échantillon. Les données de FID sont multipliées par une fonction exponentielle (1,0 Hz) avant transformée de Fourier [15].

3-2. Identification et quantification du glycérol dans les extraits

Une liste de données RMN du carbone-13 des différents sucres ainsi que le glycérol contenus dans chaque extrait est obtenue à partir des bases de données du Laboratoire de Chimie et Biomasse ainsi que des données provenant des recherches effectuées sur Internet (SDBS ; NMRSHFTDB). L'identification et la quantification du glycérol ont été alors effectuées à partir de cette liste enregistrée sur simple feuille de calcul Excel en tenant compte des écarts moyens de la moyenne des intensités des pics du glycérol [15].

4. Résultats et discussion

Tamate et Bradbury ont identifié et quantifié divers sucres simples par l'observation de certaines résonances caractéristiques dont les carbones anomériques et les hauteurs des signaux à la place des intégrations avec le dioxane-1,4 comme référence interne [16]. Cette approche utilisant la moyenne des intensités des signaux de certains carbones caractéristiques similaires possédant des temps de relaxation T1 comparables s'utilise aussi dans l'analyse des huiles végétales avec des mono-, di- et triglycérides. Mazzoni dans ses études sur les miels par la RMN du carbone-13 a utilisé extensivement les intensités moyennes de signaux rmn des sucres en général et des intensités des carbones anomériques en particulier pour effectuer l'analyse quantitative des sucres [11]. Cette méthodologie aussi a été reprise par Tianasoa Ramamonjy pour comparer les sucres de Madagascar avec ceux de Corse [15]. Ainsi, la quantification on calcule la valeur moyenne de l'intensité I_c des carbones de chaque extrait de vin du glycérol qui sera effectué en comparaison aux intensités des pic I_D des quatre carbones du dioxane-1,4 utilisé comme standard interne. On pose : m_D : quantité du dioxane-1,4 en mg et M_D sa masse molaire ; m_c : quantité du glycérol en mg et M_c sa masse molaire. On obtient alors la quantité m_c de glycérol contenu dans chaque extrait issu de 150 mL d'échantillon de vin (1) :

$$m_c = 4 \frac{I_c \times M_c \times m_D}{I_D \times M_D} \quad (1)$$

Connaissant la masse m_c de l'extrait de volume $v_E = 150$ mL, on en déduit la concentration du glycérol dans l'échantillon de vin avec m_V étant la masse de l'extrait prélevé pour l'expérience RMN (2) :

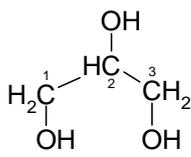
$$C = \frac{m_c \times m_E}{0,15 m_V} \quad (2)$$

Le composé C étant le glycérol. Les valeurs dont l'écart moyen se trouvant au voisinage de 10 % seront retenues.

4-1. Résultats

Le glycérol à l'état pur est une substance non volatile avec un point d'ébullition de 290°C. C'est un produit relativement polaire dont les déplacements chimiques varient significativement avec les solvants. Les valeurs de déplacements chimiques et le rapport des intensités théoriquement égal à 2 dans le tableau 1 qui suit suffisent à identifier le glycérol sans équivoque dans les extraits de vins.

Tableau 1 : Variation des δ (ppm) carbones du glycérol suivant les solvants

	Carbone	δ (DMSO) ^a	δ (D ₂ O) ^b	Intensité des pics (DMSO)	
	CHOH	72,37	73,7	540	Rapport des intensités pics
	CH2OH	63,05	64,5	1000	1,852

^a: Données provenant du Système de Data Base Spectral (SDBS); ^b : données d'autres littératures

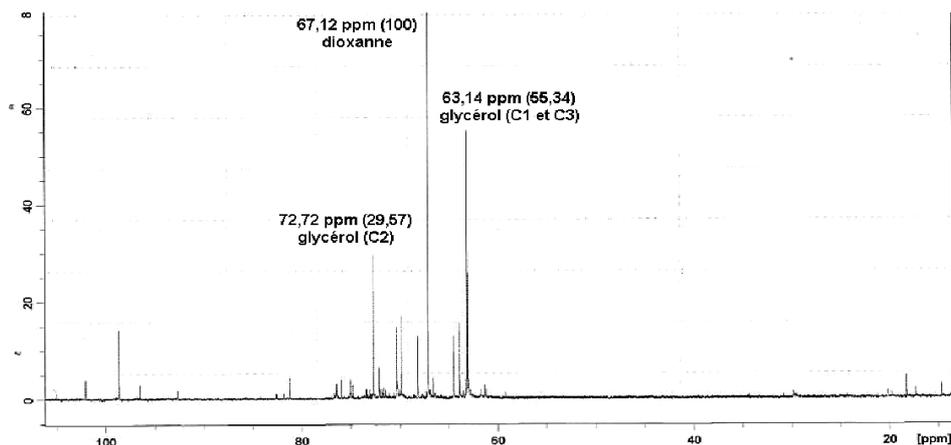


Figure 1 : Spectre de RMN¹³C typique à 100,63 MHz d'un extrait de vin dans du H₂O/D₂O 95 :5 en volume avec le dioxanne-1,4 comme référence interne.

Les mesures RMN du glycérol dans les extraits de vin sont consignées (**Tableau 2**):

Tableau 2 : Identification du glycérol dans les différents échantillons de vins

Échantillon	Nature	δ ₁ (C ₂)	Intensité (C ₂)	δ ₂ (C ₁ & C ₃)	Intensité (C ₁ & C ₃)	Rapport intensité
ATB R	rouge	72,73	29,63	63,28	60,22	2,032
TANA R	rouge	72,73	30,46	63,14	62,93	2,066
FIANAR R	rouge	72,73	16,62	63,15	33,46	2,013
ABLV R	rouge	72,73	29,75	63,15	60,46	2,032
TANA B	blanc	72,72	29,57	63,14	55,34	1,871
ATB B	blanc	72,72	24,26	63,15	45,5	1,876
FIANAR B	blanc	72,73	12,89	63,15	26,34	2,043
ABLV B	blanc	72,73	18,28	63,15	38,44	2,103
TANA SP	blanc	72,73	20,86	63,15	39,97	1,916

Tableau 3 : Quantification du glycérol dans les différents échantillons de vins

Échantillon	Nature	me	m _D	δ ₁	intensité	δ ₂	intensité	rapport intensité	mG (mg)	concentration (g/L)
TANA B	Blanc spécial	42,6	9	72,73	20,86	63,15	39,97	1,916	0,13	0,90
TANA R	rouge	42,6	9	72,73	30,46	63,14	62,93	2,066	0,51	3,4
ABLV B	blanc	49,6	11	72,73	18,28	63,15	38,44	2,103	0,51	3,4
TANA B	blanc	62,2	6	72,72	29,57	63,14	55,34	1,871	0,23	1,37
ABLV R	rouge	62,5	9	72,73	29,75	63,15	60,46	2,032	0,36	2,37
ATB B	blanc	62,3	9	72,72	24,26	63,15	45,5	1,876	0,14	0,93
ATB R	rouge	62,9	10	72,73	29,63	63,28	60,22	2,032	0,2	1,33
FIANAR B	blanc	61,4	10,1	72,72	12,89	63,15	26,34	2,05	0,09	0,6
FIANAR R	rouge	61,3	11	72,73	16,62	63,15	33,46	2,013	0,12	0,81
Moyenne				72,73		63,164		2,005		
Écart-type				0,004		0,047		0,085		
Écart				0,01%		0,07%		4,25%		

L'identification des pics du glycérol se faisant sans équivoque, et comme on ne se préoccupe pas des autres constituants, nous avons repris cette méthode pour quantifier uniquement le glycérol dans chaque extrait. Les résultats sont consignés dans le tableau qui suit.

4-2. Discussion

On observe une homogénéité élevée des déplacements chimiques avec une moyenne de 72,73 ppm pour le carbone secondaire C2 correspondant à un écart moyen de 0,01 % et une moyenne de 63,16 ppm pour les deux carbones primaires isochrones C1 et C2 avec un écart moyen de 0,07 % (**Tableau 3**). Le rapport des intensités entre les deux types de carbone correspond au rapport théorique de 2 avec un écart moyen de 4,25 %. Nos résultats montrent trois classes de concentration moyenne selon le tableau ci-dessous :

Tableau 4 : Classe des échantillons de vins étudiés

Provenance	type	g/L	Provenance	type	g/L
FIANAR B	blanc	0,6	ABLV R	rouge	2,37
FIANAR R	rouge	0,81	ABLV R	rouge	2,37
TANA B	Blanc spécial	0,9	ABLV B	blanc	3,4
ATB B	blanc	0,93	TANA R	rouge	3,4
Classe 1	moyenne	0,81	Classe 3	moyenne	3,06
ATB R	rouge	1,33			
TANA B	blanc	1,37			
Classe 2	moyenne	1,35			

Pour mieux situer les vins de Madagascar, des teneurs en glycérol dans différents vins étrangers seront répertoriés dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Teneur en glycérol dans des différents échantillons de vins étrangers

Pays	Nombre d'échantillons	teneur glycérol (g/L)	Teneur moyenne (g/L)
Autriche	525	4,0-35,7	19,85
France	71	6,59-23,0	8,6
Allemagne	146	2,0-20,0	7,7
Italie	87	3,26-12,40	7,83
Japon	80	3,57-9,59	7,1
URSS	13	1,11-4,32	2,9
USA	100	1,9-14,7	7,2
Croatie	13	5,6-10,43	7,75
Espagne	21	4,23-8,58	6,41
Croatie	20	5,03-11,0	6,99

La teneur en glycérol varie naturellement dans les vins entre 1-10 g/L selon Rankine *et Coll.* [17] ou Ough *et Coll.* [18] ; ou en terme de rapport glycérol/Ethanol, Riberau a trouvé une moyenne de 8 g de glycérol par 100 g d'éthanol [19]. On connaît bien que le glycérol rehausse d'une façon importante l'onctuosité et l'épaississement des vins, mais Noble *et coll.* ont étudié qu'un seuil de concentration de 25,8 g/L est le minimum pour qu'on perçoit une augmentation de la viscosité des boissons [20]. La plage de concentration des teneurs en glycérol de nos échantillons 0,6 à 3,4 g/L se situe entre l'intervalle trouvé par Rankine *et Coll.* [18] ou Ough *et Coll.* [19]. Ce résultat laisse supposer qu'il est assez improbable qu'il y ait une falsification par ajout de glycérol industriel et qu'il y ait une contamination par des champignons dont le *Botrytis cinerea*. D'autre part, elle montre une variation comparable avec celle des vins de l'ancien URSS dont les taux varient de 1,11-4,32 g/L. Ce dernier renseigne sur le teneur en glycérol de quelques échantillons de vins étrangers rassemblés par *Sehovic et coll.* [21].

Ces résultats sont assez disparates ne permettant pas de conclure quant à l'influence de la nature rouge ou blanc sur le taux de glycérol. Toutefois, l'inspection de ces classes permettent de remarquer que :

- les vins de TANA se répartissent dans les trois classes de concentration ;
- les vins de Fianarantsoa (FIANAR) rouges et blancs sembleraient montrer une certaine homogénéité en appartenant tous à la classe 1 de teneur moyenne de 0,81 g/L, la plus faible ;
- de la même façon mais à l'autre extrémité du spectre, les vins d'Ambalavao (ABLV) rouges et blancs sembleraient montrer une certaine homogénéité en s'insérant tous dans la classe 3 de teneur moyenne 3,06 g/L, la plus élevée ;
- et finalement les vins d'Antsirabe (ATB) se répartissent dans les deux classes 1 la plus faible et 2 la classe intermédiaire (1,35 g/L).

Notons que plusieurs facteurs influent sur la teneur du glycérol dans les vins dont la variété des grappes, le degré de maturité, la nature des levures, le degré de maturité, la quantité de sucre initiale, les conditions de fermentation telles que la température, le pH des moûts, la concentration en SO₂, [17,18] ainsi que le savoir-faire des cultivateurs et des fabricants. Mais il est à remarquer que l'infection des grappes par le champignon *Botrytis cinerea* accroît aussi avec la quantité de glycérol avant même la fermentation. Néanmoins, ces derniers résultats montrent que l'analyse du glycérol semblerait tendre vers une certaine propriété chimiotaxinomique que pourrait avoir le glycérol dans les vins et qui ne dépendrait pas de la nature du vin rouge ou blanc.

5. Conclusion

La technique de la RMN du carbone 13 ne nécessitant pas ou peu de traitements préalables des mélanges naturels est une méthode efficace et fiable pour une directe identification et la quantification des familles de constituants organiques présents dans les vins. Elle se révèle d'utilisation encore plus facile dans le cas d'analyse du glycérol qui est le troisième composant majeur des vins après l'eau et l'éthanol mais dont l'analyse est laborieuse ou contraignante en utilisant d'autres méthodes. Nos analyses permettent d'indiquer que les vins étudiés sont indemnes de falsification avec des teneurs variant dans une marge relativement étroite incluse dans la plage de teneur naturelle des glycérols des vins et qu'une contamination par le champignon *Botrytis cinerea* reste improbable. La connaissance des teneurs en glycérol pourrait contribuer à l'élaboration d'un indicateur chimiotaxinomique facilitant la caractérisation des vins d'une part, mais d'autre part à mieux comprendre les phénomènes de fermentation en vin pour mieux améliorer ses qualités.

Remerciements

Nous adressons nos vifs remerciements à l'Agence Universitaire de la Francophonie d'avoir octroyé une bourse pour M. Tianasoa Ramamonjy Manoelson pour le Centre de recherche sur les systèmes physiques de l'environnement de l'Université de Corse pour stage RMN, aux Professeurs Joseph Casanova, Vincent Castola, Ange Bigelli et Félix Toma ainsi que Dr Kai Liu pour leur accueil au Laboratoire de Chimie et Biomasse au moment de ce stage.

Références

- [1] - R. B. BOULTON, V. L. SINGLETON, L. F. BISSON, E. R. KUNKEE, "Principles and practices of winemaking", Chapman and Hall, New York (1996) 146-150.
- [2] - P. RIBEREAU-GAYON, Y. GLORIES, A. MAUJEAN, D DUBOURDIEU, "Handbook of enology, volume 2, the chemistry of wine, stabilization and treatments" West Sussex, England: Wiley, (2000) 46.
- [3] - EUROPEAN ECONOMIC COMMUNITY, "Methods of Community Analyses of Wines". Regulation no. 1108/82 of the Commission April 21 1982. European Economic Community, Brussels, Belgium, 1982.
- [4] - R. S. JACKSON, "Wine Science, Principles and Applications", S. L. Taylor (ed.), Academic press, Inc., S. Diego, (1994) 186.
- [5] - H. REBELEIN, "Simplified process for determination of glycerol and butylenes glycol in wine", Z. Lebensm. Untersuch. Forsch. 105 (1956) 296-31.
- [6] - D. SEHOVIC, R. HIROVATIN, "International Symposium on Chromatographic and Electrophoretic Techniques", Bled, October (1994) 10-13.
- [7] - S. KONDRUWEIT, B. A. A. DREMEL, R. D. SCHMIDT, "New chemiluminometric method for the determination of glycerol in wine by flow-injection analysis with immobilized glycerol dehydrogenase in combination with NADH oxidase", *Anal. Lett.* 27 (1994) 1489.
- [8] - A. BIGELLI, F. TOMI, J. CASANOVA, "Computer-aided carbon-13 NMR study of phenols contained in liquids produced by pyrolysis of biomass", *Biomass Bioenergy* 6 (1994) 461–464.
- [9] - F. TOMI, P. BRADESI, A. BIGHELLI, J. CASANOVA, "Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy", *J. Magn. Reson. Anal.* 1 (1995) 25–34.
- [10] - V. CASTOLA, A. BIGHELLI, J. CASANOVA, "Direct qualitative and quantitative analysis of triterpenes using C-13 NMR spectroscopy exemplified by dichloromethanic extracts of cork", *Appl. Spectrosc.* 53 (1999) 344–350.
- [11] - V. MAZZONI, Analyse de mélanges naturels par RMN du carbone-13: extraits lipidiques, miels et huiles essentielles, Thèse de Doctorat de l'Université de Corse (1998).
- [12] - R. SERGE, Apport de la RMN du carbone-13 à l'analyse d'huiles essentielles et d'oléorésines. Thèse de Doctorat, Université de Corse Pascal Paoli (2000).
- [13] - EMILIE DUQUESNOY, VINCENT CASTOLA and JOSEPH CASANOVA, "Identification and quantitative determination of carbohydrates in ethanolic extracts of two conifers using 13C NMR spectroscopy", *Carbohydrate Research* 343 (2008) 893–902.
- [14] - J. T. RAZAFINDRABE et Coll., "Application de la RMN du 13-C pour l'identification des vins rouges par leurs sucres ». Article accepté dans la revue Afrique Science Volume 5 N°1 (JANVIER 2009).
- [15] - TIANASOA RAMAMONJY MANOELSON, « Apports des Techniques RMN, 1D et 2D aux Analyses Structurales. Apports des Techniques RMN du Carbone-13 à l'Analyse Quantitative des Mélanges Complexes d'Intérêts Industriel et Nutritionnel", Thèse de Doctorat de l'Université d'Antananarivo (2008).

- [16] - J. TAMATE, J. H. BRADBURY, "Determination of Sugars in Tropical Root Crops Using NMR Spectroscopy: Comparison with H.P.L.C. Method", *J. Sci. Food Agric.* 36 (1985) 1291-1302.
- [17] - B. C. RANKINE D.A. BRIDSON, "Glycerol in Australian wines and factors influencing its formation". *Am. J. Enol. Viticult* 22 (1971) 6-12.
- [18] - C. S. OUGH, D. FONG, M. A. AMERINE, "Glycerol in wine: determination and some factors affecting", *Am. J. Enol. Viticult.* 23 (1972) 1-5.
- [19] - P. RIBEREAU-GAYON, D. DUBOURDIEU, B. DONECHE, A. LONVAUD, "Handbook of enology, volume 1, the microbiology of wine and vinifications", West Sussex, England: Wiley (2000) 60.
- [20] - A. C. NOBLE, G. F. BURSICK, "The contribution of glycerol to perceived viscosity and sweetness in white wine", *Am. J. Enol. Viticult.* 35 (1984) 110-113.
- [21] - SEHOVIC, V. PETRAVIC, and MARIC, "Glycerol and Wine Industry Glycerol Determination in Grape Must and Wine", *Kem. Ind.* 53 (2004) 11 505-516.