

DOCUMENTO
TECNICO

Da sinistra:
T.M. Pellicanò
M. Belcastro

***Teresa M. Pellicanò**
****Barbara Spalletta**
***Nino Russo**
***Marcella Belcastro**

* Dip.to di Chimica, Università
della Calabria (UNICAL),
Arcavacata di Rende (CS)

** Consorzio Agricolo Scavigno
- Aziende Agricole Odoardi,
Nocera Terinese (CZ)

DETERMINAZIONE DI CARBOIDRATI IN UVE SCAVIGNA E SAVUTO DOC DURANTE LA FERMENTAZIONE

Vista l'importanza dell'analisi del tenore zuccherino per prevedere il momento della vendemmia, vengono presentati i risultati di una indagine sul monitoraggio di diversi carboidrati in uve Scavigna e Savuto Doc. Allo scopo è stato utilizzato un metodo HPLC che si avvale dell'uso del rivelatore a diffusione di luce (ELSD).

Introduzione

La conoscenza del grado zuccherino è un parametro che permette di seguire la maturazione dell'uva nei suoi vari stadi e di trovare il momento esatto per la vendemmia (Varandas et al., 2004; Ribereau-Gayon, Dubourdieu, Doneche, & Lonvaud, 1998). E' indispensabile per trarre indicazioni sicure sulle eventuali correzioni da farsi sui mosti carenti di zucchero e per la preparazione di filtrati dolci.

Gli zuccheri principali del succo d'uva sono il D-glucosio e il D-fruttosio; sono detti "zuccheri riducenti" in quanto possiedono una funzione semiacetalica che permette di ridurre le soluzioni rameiche alcaline utilizzate per la loro determinazione. Durante la maturazione dell'uva il loro rapporto diminuisce da 1.5, durante l'invasatura, a meno di 1 alla maturità.

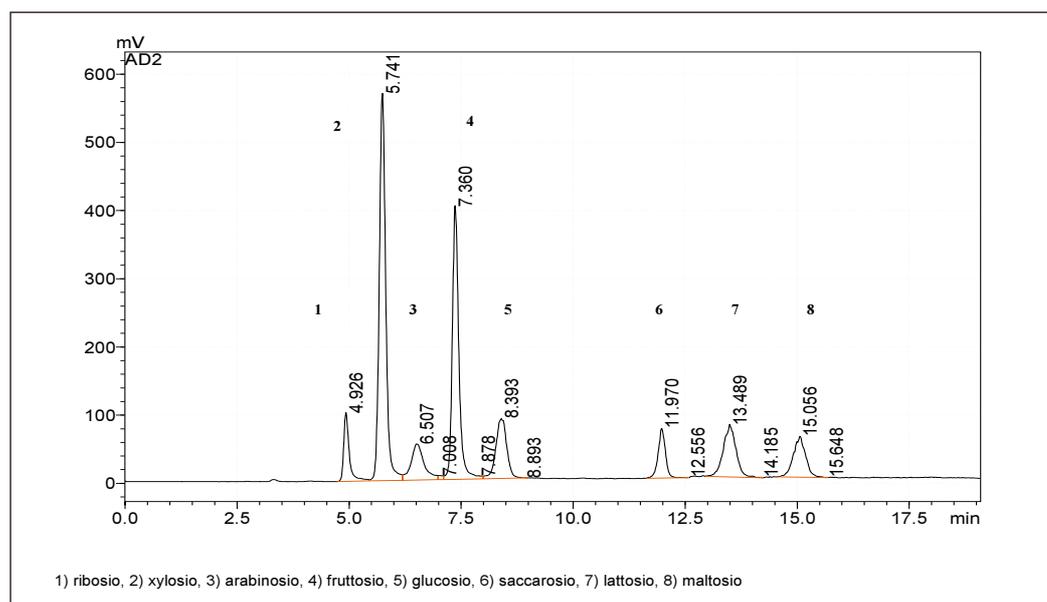
L'uva e il vino possono contenere isomeri del D-glucosio quali mannosio e galattosio e anche piccole quantità

di pentosi quali L-arabinosio, D-xilosio, D-ribosio, L-ramnosio. Questi zuccheri riducenti non vengono fermentati dai lieviti e contribuiscono con meno efficacia del fruttosio e del glucosio all'eventuale sapore dolce del vino.

Tra i disaccaridi presenti è stata segnalata la presenza di maltosio [4-O-(α -D-glucopiranosil)-D-glucopiranosio], lattosio [4-O-(β -D-galattopiranosil)-D-glucopiranosio] e saccarosio (α -D-glucopiranosil- β -D-fruttofuranoside). Questo non è naturalmente

Tab. 1 - Campionamento settimanale delle uve

Vitigni	A	B	C	D	E	F	G	H	I	L	M	N° campioni
Magliocco (SH)	x	x	x	x	x							5
Greco Nero (GN)	x	x	x	x	x	x						6
Gaglioffo (G)	x	x	x	x	x	x	x	x				7
Cabernet Sauvignon (CS)	x	x	x	x	x	x	x	x	x			9
Nerello Cappuccio (NC)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		10
Cabernet Franc (CF)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		10
Merlot (M)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	11
Totale campioni												58

Fig. 1 - Cromatogramma HPLC/ELSD della soluzione standard di carboidrati

1. ribosio; 2. xilosio; 3. arabinosio; 4. fruttosio; 5. glucosio; 6. saccarosio; 7. lattosio; 8. maltosio

presente nel vino, solo piccole quantità di questo disaccaride si trovano nell'uva all'atto della spremitura ma spariscono rapidamente nel giro di qualche ora.

Nei casi sospetti la ricerca del saccarosio nel vino, effettuata tramite varie tecniche analitiche, è uno dei parametri di controllo della genuinità.

Dal punto di vista chimico i carboidrati non possiedono un gruppo cromoforo per cui, una loro identificazione mediante rivelazione UV o fluorimetrica, risulta difficoltosa.

Allo scopo, il rivelatore maggiormente usato è l'indice di rifrazione che sfrutta la nota proprietà chimico-fisica di tale classe di composti di ruotare il piano della luce polarizzata.

La letteratura riporta diversi studi sulla determinazione degli zuccheri in matrici enologiche effettuati con diverse tecniche inclusa la cromatografia su carta, l'elettroforesi capillare (Ayestarán Guadalupe & León, 2004; Esau & Amerine, 1967; Nakashini & Yokotsuka, 1989; Yang Wei & Ming-Yu Ding, 2000) e la cromatografia liquida ad alta prestazione con rivelatore classico ad indice di rifrazione (Araujo Lima Rangel, & Segundo, 2000; Lima Neves Rangel, 1994; Nakashini, 1989; O'Flaherty Yang Sengupta, & Cholli, 2001).

Questo tuttavia, pur essendo molto usato nell'analisi dei carboidrati (Berthod, Chang Kullman, Armstrong, 1998; Glyad, 2002) presenta numerosi svantaggi quali la

sua bassa selettività, la forte dipendenza dalla temperatura, dal flusso e l'incompatibilità con l'eluizione a gradiente.

Il rivelatore evaporativo a diffusione di luce (ELSD) attualmente trova una vasta applicazione in tutti i campi della cromatografia liquida, compresa l'analisi GPC, ed oltre alla maggiore sensibilità il suo maggior vantaggio è la compatibilità con i gradienti per cui è possibile migliorare la separazione di classi di composti quali i carboidrati.

Il segnale misurato si basa sulla luce diffusa dalle particelle dell'analita e consta di tre fasi: nebulizzazione, evaporazione e rivelazione (Dreux, La Fosse, & Morin-Allory, 1996; Yong, & Dolan, 2004). L'eluato croma-

Tab. 2 - Campionamento giornaliero dei mosti

Vitigni	Periodo prelievo	N° campioni
Magliocco (SH)	28/09 - 04/10	7
Greco Nero (GN)	29/09 - 05/10; 11 e 18/10	9
Gaglioffo (G)	19/10 - 26/10	8
Cabernet Sauvignon (CS)	25/10; 28/10 - 04/11	9
Nerello Cappuccio (NC)	29/10; 06 - 17/11	13
Cabernet Franc (CF)	28/10 - 13/11	17
Merlot (M)	05/11; 15 - 21/11	8
Totale campioni		71

Tab. 3 - Prestazione del metodo HPLC-ELSD per l'analisi di carboidrati in campioni di uve e mosti

Carboidrati	Precisione (%)	Recupero (%)	Riproducibilità (%)
D-ribosio	4.0±0.2	97.0	3.4±0.2
D-xilosio	4.4±0.3	96.2	3.3±0.4
D-fruttosio	4.2±0.4	98.0	3.5±0.6
D-glucosio	3.8±0.2	96.0	3.1±0.4
Saccarosio	4.0±0.3	97.3	2.6±0.2
D-lattosio	3.9±0.3	96.8	2.2±0.3
D-maltosio	3.6±0.2	97.5	2.5±0.5

tografico ed il gas nebulizzante (N₂ o aria) vengono miscelati insieme nel nebulizzatore per formare un aerosol che entra in un tubo riscaldato (drift tube) dove la fase mobile evapora lasciando libere le particelle dei soluti non volatili. Ogni analita rimasto esiste come micro-particelle private del solvente che entrano nella cella ottica del rivelatore, dove diffondono il raggio luminoso emesso da un filamento al tungsteno; questa diffusione, raccolta da fibre ottiche e rivelata da un fotomoltiplicatore, dà luogo ad un segnale proporzionale alla concentrazione dell'analita (Megoulas, & Koupparis, 2004).

In questo studio il classico metodo basato sull'utilizzo di una miscela di acetonitrile ed acqua (75:25) ad eluzione isocratica è stato ottimizzato con l'ausilio del rivelatore ELSD.

È stato possibile identificare e quantificare diversi carboidrati tra mono- di- e tri-saccaridi (maltosio, lattosio, arabinosio, saccarosio, D-glucosio, D-fruttosio, D-

xilosio e D-ribosio) in in uve rosse e mosti durante il processo di maturazione e fermentazione.

I campioni provengono da sette varietà di vitigni (autoctoni ed alloctoni) caratteristici delle Doc Calabresi Scavigna e Savuto.

Materiali e metodi

Gli standard di D-ribosio, D-(+) xilosio, L-(+) arabinosio, D-fruttosio, D-glucosio, D-(+) saccarosio, D-(+) lattosio, D-maltosio, sia i solventi utilizzati: acetonitrile e H₂O per HPLC sono stati reperiti dal commercio.

Le soluzioni standard sono state preparate alla concentrazione di 4000 mg/L in acqua bi-distillata ottenuta mediante sistema Milli-Q e conservate a -4 °C fino al momento dell'analisi.

Differenti diluizioni sono state utilizzate per i test di calibrazione. Prima dell'analisi HPLC tutte le soluzioni sono state filtrate attraverso filtro GMF Whatman da 0.45µm.

Campionatura e preparazione. Come riportato nelle Tabb. 1 e 2 un totale di 129 campioni (uve e mosti), ottenuti da sette diverse varietà di vitigni, sono stati analizzati per valutare la distribuzione di diversi pentosi, esosi e disaccardi durante il processo di maturazione e di fermentazione.

Delle sette varietà di uva quattro sono tipiche del territorio lamentino nello specifico Magliocco (SH), Greco Nero (GN), Gaglioffo (G) e Nerello Cappuccio (NC) mentre le ultime tre appartengono a varietà alloctone quali Cabernet Sauvignon (CS), Cabernet Franc (CF) e Merlot (M). L'intera campionatura proveniva dai vigneti dell'"Azienda Agricola Odoardi" sita in Nocera Terinese e si riferisce alla vendemmia del 2005.

Le uve, a partire dal 23/08/2005 e fino a completa maturazione, sono state campionate settimanalmente da 13 grappoli rappresentativi di ogni filare. Per ogni prelievo sono state registrate le condizioni climatiche e questo è stato identificato con una lettera dell'alfabeto.

Dagli acini totali (n. tot) ne sono stati prelevati 400; questi sono stati privati della polpa, del vinacciolo, del raspo e della buccia e conservati a -80°C fino al momento dell'analisi. Gli acini residui di ogni prelievo sono stati conservati in aliquote a -80°C.

La polpa su cui è stata effettuata la determinazione analitica è stata omogeneizzata e filtrata; una aliquota pari ad 1 ml è stata diluita a 100 ml con acqua (HPLC grade) e filtrata su filtro GMF Whatman da 0.45µm prima dell'analisi HPLC/ELSD.

I campioni di mosto, ottenuti dalle varietà di uva considerate, sono stati prelevati giornalmente fino alla fine della fermentazione alcolica (svinatura). In questo caso è stata effettuata una diluizione 1:50 del campione e prima della determinazione analitica una filtrazione di filtro da 0.45 µm GMF Whatman.

Tab. 4 - Concentrazione di carboidrati (g/L) determinati mediante HPLC-ELSD nei campioni di uva al momento del primo prelievo*

Varietà	Ribosio	Xilosio	Fruttosio	Glucosio	Saccarosio	Lattosio	Maltosio	Glu /Frutt
Magliocco A	0.57±0.21	0.06±0.13	95.40±0.07	113.60±0.15	8.34±0.08	7.08±0.10	<0.030	1.19
Gaglioffo A	0.65±0.12	0.09±0.20	101.60±0.04	97.10±0.07	9.02±0.06	8.63±0.12	0.71±0.06	0.95
Nerello Cappuccio A	0.83±0.05	0.04±0.15	98.20±0.17	100.0±0.09	8.68±0.12	6.52±0.15	<0.030	1.02
Greco Nero A	0.65±0.07	0.04±0.12	105.60±0.08	103.70±0.19	8.89±0.15	7.45±0.06	<0.030	0.98
Cabernet Sauvignon A	0.70±0.10	0.03±0.18	120.00±0.18	122.80±0.23	9.70±0.07	9.43±0.05	0.75±0.08	1.02
Cabernet Franc A	0.54±0.15	<0.024	87.70±0.09	93.30±0.06	8.22±0.06	7.03±0.09	0.49±0.10	1.06
Merlot A	0.78±0.11	<0.024	104.50±0.10	97.60±0.10	8.93±0.10	8.37±0.08	<0.030	0.93
Minimo	0.54	0.03	87.70	93.30	8.22	6.52	0.49	0.93
Massimo	0.83	0.09	120.00	122.80	9.70	9.43	0.75	1.19
Media	0.67	0.05	101.80	104.00	8.82	7.78	0.65	1.02

* *media±DS dello stesso campione analizzato in triplicato*

Analisi HPLC/ELSD. Le analisi sono state effettuate utilizzando un sistema HPLC Shimadzu corredato di due pompe 10 AT vp, un sistema di controllo SCL-10Avp, un degasser GT-154, un forno CTO-10 Avp ed una auto-campionatore SIL-10AF con autoiniettore con loop da 50 µL.

I carboidrati sono stati separati su colonna cromatografica Supelcosil LC-NH2 (250 x 4.6 mm, 5 µm,) termostata a 40°C, mediante eluizione a gradiente di acqua (A) e acetonitrile (B): 0.01-5.00 min 85% B isocratico; 5.01-15.00 min, 85-75% B; 15.01-20.00 min, 75-85% B; 20.01-25.00 min, 85 % B isocratico. Il flusso di esercizio era di 1.5 mL/min ed ha permesso di eseguire l'analisi in tempi brevi (15 min) senza pre-trattare il campione. Il volume di campione iniettato era pari a 5 µL.

La rivelazione è stata ottenuta utilizzando un rivelatore evaporativo a diffusione di luce è stato settato alle seguenti condizioni: nebulizzazione alla pressione gas carrier (N₂) di 300 KPa, evaporazione a 60°C (drift tube) e rivelazione a gain 8. I dati sono stati raccolti mediante apposito software.

Performances strumentali. In Tab. 3 sono riportate le prestazioni del metodo

HPLC/ELSD proposto. Le curve di calibrazione sono state ottenute preparando le soluzioni di carboidrati standard in un intervallo pari a 20-2000 mg/L. Il limite di rivelabilità strumentale teorico è stato calcolato utilizzando l'espressione 3σ/S.

Il recupero è stato effettuato su campioni di uve aggiunti, a differenti livelli, di quantità note di ciascun composto considerato. Le analisi sono state effettuate in triplicato. I risultati ottenuti variano dal 96.2% al 98.0%.

Risultati e discussione

Il cromatogramma in Fig. 1 riporta l'andamento relativo alla miscela di standard di carboidrati usati. Il contenuto di carboidrati delle sette varietà di uve relativo alla prima settimana di prelievo, al momento della vendemmia e della svinatura è riportato nelle Tab. 4-6.

I livelli di arabinosio sono per l'intera campionatura al di sotto dei limiti di rivelabilità strumentali.

I risultati ottenuti evidenziano, quanto noto da tempo, che il fruttosio e il glucosio sono gli zuccheri maggiormente presenti in tutti i campioni in particolare il loro rapporto (Glu/Frutt) varia in media da 1.02 all'inizio del

campionamento fino ad arrivare ad 1 nella fase di svinatura. Chiaramente il loro valore va ad aumentare durante le settimane dal campionamento fino al momento della vendemmia con valori medi massimi compresi tra 114.21 g/L e 122.51 g/L rispettivamente. Alla prima settimana di prelievo (Tab. 4) la varietà di uva Cabernet Franc presenta i valori più bassi per tutti i carboidrati considerati tranne che per il lattosio.

I campioni di uva da cv. Cabernet Sauvignon presentano i più alti valori di fruttosio e glucosio (120.0 g/L e 122.80 g/L); al contrario, come suddetto, per le uve da vitigni Cabernet Franc è stato trovato il valore più basso per i suddetti zuccheri (87.70 g/L e 93.30 g/L).

La concentrazione di ribosio varia da 0.54 g/L nelle uve da vitigno Cabernet Franc a 0.83 g/L nelle uve da cv. Nerello Cappuccio.

I livelli di xilosio sono compresi tra 0.037 g/L e 0.096 g/L; per due dei tre vitigni alloctoni sono inferiori al limite strumentale. In generale per i campioni di uve da cv. Cabernet Sauvignon si sono ottenuti i valori più alti sia per gli esosi che per i disaccaridi con valori di saccarosio, lattosio e maltosio pari a 9.70 g/L, 9.43 g/L e 0.75 g/L rispettivamente.

Tab. 5 - Concentrazione di carboidrati (g/L) determinati mediante HPLC-ELSD nei campioni di uva al momento della vendemmia*

Varietà	Ribosio	Xilosio	Fruttosio	Glucosio	Saccarosio	Lattosio	Maltosio	Glu /Frutt
Magliocco E	1.02±0.10	0.38±0.10	117.81±0.09	139.44±0.07	8.45±0.07	7.08±0.08	<0.030	1.18
Gaglioffo H	1.12±0.06	0.43±0.14	112.24±0.12	121.90±0.21	9.40±0.12	7.36±0.17	1.52±0.17	1.09
Nerello Cappuccio L	1.06±0.08	0.37±0.09	118.58±0.07	115.50±0.13	8.41±0.16	7.09±0.13	<0.030	0.97
Greco Nero F	0.87±0.10	0.44±0.08	124.53±0.03	134.76±0.04	9.92±0.06	9.19±0.18	1.66±0.08	1.08
Cabernet Sauvignon I	1.09±0.08	0.38±0.08	96.46±0.02	110.34±0.05	8.36±0.14	7.02±0.07	<0.030	1.14
Cabernet Franc L	1.20±0.14	<0.024	113.13±0.22	114.59±0.14	8.50±0.09	7.10±0.07	151±0.15	1.01
Merlot M	1.17±0.12	<0.024	116.73±0.26	121.06±0.21	9.04±0.11	7.30±0.06	1.26±0.18	1.04
Minimo	0.87	0.37	96.46	110.34	8.36	7.02	1.26	0.97
Massimo	1.20	0.44	124.53	134.76	9.92	9.19	1.66	1.18
Media	0.93	0.40	114.21	122.51	8.87	7.45	1.48	1.07

* *media±DS dello stesso campione analizzato in triplicato*

Al momento della vendemmia (Tab. 5) il livello dei carboidrati aumenta; il rapporto glucosio:fruttosio varia da 0.97 nelle uve Nerello Cappuccio a 1.18 nel campione Magliocco.

Come mostrato in Fig. 2 il campione di uva da cv. Greco Nero presenta i valori più alti di fruttosio e glucosio (124.53 g/L e 134.76 g/L) mentre l'uva da cv. Cabernet Sauvignon i valori più bassi pari a 96.46 g/L e 110.34 g/L rispettivamente.

Le uve da varietà Greco Nero, in generale, mostrano i valori più alti per tutti i carboidrati considerati e il minimo valore per il ribosio (0.87 g/L).

Al contrario, i campioni di Cabernet Sauvignon al momento della vendemmia, presentano i valori più bassi di esosi e disaccaridi rispetto ai valori ottenuti dal primo prelievo.

Il tenore di xilosio risulta inferiore al limite di rivelabilità per i vitigni Merlot e Cabernet Franc; mentre presenta il valore maggiore nel campione di uva da cv. Greco Nero (0.44 g/L) e minore nelle uve Nerello Cappuccio (0.37 g/L).

Come riportato in tabella 6 la concentrazione di fruttosio eguaglia quella del glucosio; il loro rapporto in media è unitario. I campioni di mosto Nerello Cappuccio e

Cabernet Sauvignon presentano i valori più alti e più bassi dei due zuccheri rispettivamente. Tra i pentosi analizzati il ribosio è presente in tutti i campioni in concentrazioni comprese tra 0.23 g/L per il mosto ottenuto da vitigni Cabernet Franc e 0.38 g/L per il Nerello Cappuccio. La concentrazione di xilosio è inferiore ai limiti di rivelabilità strumentali per i mosti ottenuti da cv. Magliocco, Cabernet Franc e Merlot mentre negli altri è presente in concentrazioni che variano da 0.37 a 0.44 g/L. I livelli di saccarosio sono al di sotto del limite di rivelabilità strumentale per tutti i campioni.

Il tenore medio di lattosio e maltosio è pari a 0.26 g/L e 0.21 g/L rispettivamente; in particolare il mosto Cabernet Sauvignon presenta i valori più alti per entrambi i disaccaridi.

Considerazioni conclusive

In questo lavoro è stato utilizzato un metodo HPLC con rivelatore evaporativo a diffusione di luce (ELSD) per la determinazione di diversi carboidrati tra mono- e tri-saccaridi in uve rosse e mosti durante il processo di maturazione e fermentazione. I campioni proven-

gono da sette varietà di vitigni (autoctoni ed alloctoni) caratteristici delle Doc Calabria Scavigna and Savuto.

I risultati ottenuti mostrano che il fruttosio ed il glucosio sono i carboidrati presenti in maggiore quantità; il contenuto di saccarosio sono al di sotto del limite di rivelabilità strumentale per i campioni di mosto mentre i livelli di mannosio, galattosio e arabinosio sono per l'intera campionatura al di sotto dei limiti di rivelabilità strumentali.

Durante la vendemmia il campione di uva della varietà Greco Nero presenta i valori più alti di fruttosio e glucosio mentre l'uva Cabernet Sauvignon i valori più bassi.

In generale, i campioni della varietà Greco Nero mostrano i valori più alti per tutti i carboidrati considerati tranne che per il ribosio.

Il metodo si è rivelato preciso, veloce e sensibile per cui può essere adatto per le analisi di routine.

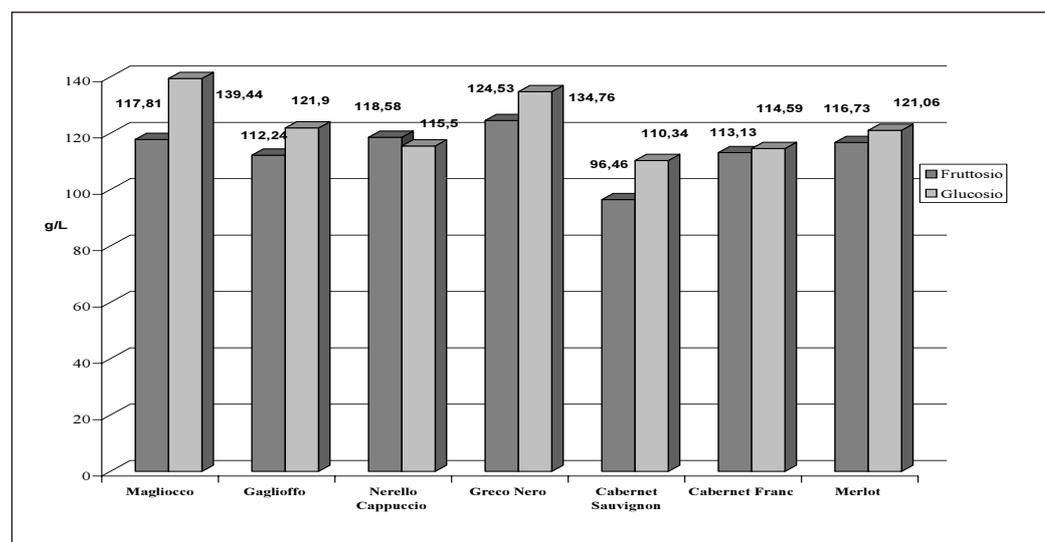
Riassunto

Nel presente studio viene utilizzato un metodo HPLC in fase inversa che si avvale dell'utilizzo del rivelatore a diffusione di luce (ELSD) per la determinazione di diversi carboidrati tra mono-

Tab. 6 - Concentrazione degli zuccheri (g/L) determinati mediante HPLC-ELSD nei campioni di mosto al momento della svinatura*

Varietà	Ribosio	Xilosio	Fruttosio	Glucosio	Saccarosio	Lattosio	Maltosio	Glu /Frutt
Magliocco E	1.02±0.10	0.38±0.10	117.81±0.09	139.44±0.07	8.45±0.07	7.08±0.08	<0.030	1.18
Magliocco 7	0.34±0.12	<0.024	0.17±0.09	0.17±0.09	<0.007	0.27±0.11	0.19±0.08	1.00
Gaglioffo 8	0.34±0.10	0.43±0.14	0.20±0.05	0.20±0.05	<0.007	0.34±0.10	0.13±0.11	1.00
Nerello Cappuccio 13	0.38±0.10	0.37±0.09	0.43±0.13	0.43±0.06	<0.007	0.27±0.10	0.14±0.05	1.00
Greco Nero 9	0.31±0.06	0.44±0.08	0.42±0.07	0.41±0.12	<0.007	0.27±0.09	0.27±0.07	0.99
Cabernet Sauvignon 9	0.29±0.08	0.38±0.08	0.13±0.06	0.13±0.15	<0.007	0.37±0.08	0.35±0.14	0.99
Cabernet Franc 17	0.23±0.11	<0.024	0.34±0.10	0.32±0.07	<0.007	0.28±0.12	0.20±0.03	0.94
Merlot 8	0.37±0.09	<0.024	0.15±0.03	0.17±0.09	<0.007	0.37±0.10	0.16±0.08	1.09
Minimo	0.23	0.37	0.13	0.13	<0.007	0.27	0.13	0.94
Massimo	0.38	0.44	0.43	0.43	<0.007	0.37	0.35	1.09
Media	0.32	0.23	0.26	0.26	0.00	0.26	0.21	1.00

* media±DS dello stesso campione analizzato in triplicato

Fig. 2 - Andamento di glucosio e fruttosio (g/L) nei campioni di uva al momento della vendemmia

di- e tri-saccaridi in uve rosse e mosti durante il processo di maturazione e fermentazione. I campioni provengono da sette varietà di vitigni (autoc-toni ed alloctoni) caratteristici delle Doc Calabresi Scavi-gna and Savuto. Dai risultati ottenuti si evince che i livelli di mannosio, galattosio e arabinosio sono per l'intera campionatura al di sotto dei limiti di rivelabilità strumentali. Il metodo si è rivelato preciso, veloce e sensibile per cui può essere adatto per le analisi di routine.

Ringraziamenti. Si ringrazia il POR Calabria 2000-2006 VACAVISS.

Bibliografia

Araujo A. N., Lima Jose L.F.C., Rangel A.O.S.S., & Segundo M. A. (2000). Sequential injection system for the spectrophotometric determination of reducing sugars in wines *Talanta*, 52, 59-66

Ayestarán B., Guadalupe Z., & León D. (2004). Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Analytica Chimica Acta*, 513, 29-39

Berthod A., Chang S.S.C., Kullman J.P.S., Armstrong D.W. (1998). Practice and me-

chanism of HPLC oligosaccharide separation with a cyclodextrin bonded phase. *Talanta*, 47, 1001-1012

Esau P. & Amerine M.A. (1967). Quantitative estimation of residual sugars in wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 17, 265-267

Glyad V. M (2002). Determination of monosaccharides, disaccharides and oligosaccharides in the same plant sample by High-Performance Liquid Chromatography. *Russian Journal of Plant Physiology*, 49, 277-282.

Nakashini K. & Yokotsuka K. (1989). Isolation of two glucodisaccharides from Japanese Wines. *J. of Fermentation*

and Bioengineering, 67,148-152.

O'Flaherty B., Yang W. P., Sengupta S., Cholli A.L. (2001). Fast detection of anionic components in sugar and wine samples using a novel device based on capillary zone electrophoresis. *Food Chemistry*, 74, 111-118

Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujen A. & Dubourdiou D. (2003). Trattato di enologia II Ed. Ed. agricole - Sole 24 Ore, Bologna, Italy, charter 3, 59-85

Torto N, Buttler T, Gorton L, Marko-Varga G., & Stålbbrand H. (1995). Monitoring of enzymatic hydrolysis of ivory nut mannan using on-line microdialysis sampling and anion-exchange chromatography with integrated pulsed electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta*, 313, 15-24

Varandas, S., Teixeira, M. J., Marques, J. C., Aguiar, A., Alves, A., Bastos, M. M. S. M. (2004). Glucose and fructose levels on grape skin: interference in *Lobesia botrana* behaviour. *Anal Chim Acta*, 513, 351-355

Yang Wei & Ming-Yu Ding (2000). Analysis of carbohydrates in drinks by high-performance liquid chromatography with a dynamically modified amino column and evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A*, 904, 113-117