

Die Bestimmung von Ergosterol und Squalen in Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie

ULLRICH GILGE, MARTIN GEßNER, DANIEL HEßDÖRFER und JOSEF V. HERRMANN

Bayerische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau
D-97209 Veitshöchheim, Herrnstraße 8
E-Mail: Ullrich.Gilge@lwg.bayern.de

Die Substanzklasse der Sterole ist für die Stabilität und Funktionsfähigkeit der Membranen in und um die Hefezelle verantwortlich. Sie kann nach Zell-Lyse und Trennung von verseifbaren Lipiden entweder gas- oder flüssigkeitschromatographisch quantifiziert werden. Dabei präsentiert sich die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) auf Grund der geringen Flüchtigkeit der underivatisierten Sterole als besser geeignete Methode. Der Zweck dieser Arbeit ist die Etablierung eines leicht durchführbaren Zellaufschlusses sowie einer einfachen HPLC-Methode zur Bestimmung von Ergosterol und Squalen aus Hefezellen. Der Aufschluss mit alkalischer Verseifung gelingt in nur drei Minuten in der Siedehitze bei Anwendung von Ultraschall. Die Extraktion der nicht verseiften Komponenten erfolgt mit Pentan. Die Verwendung eines Acetonitril-Gradienten mit einem Wassergehalt zwischen 5 und 7 % gestattet die Trennung von Ergosterol und Squalen in 40 Minuten. Die Bestimmungsgrenzen wurden mit 11 bzw. 4 mg/l bestimmt, die Methode ist bis 1300 bzw. 300 mg/l linear. Die Präzision innerhalb eines Tages liegt bei 5,2 % bzw. 1,2 %, die Präzision von Tag zu Tag bei 5,2 % bzw. 2,1 %, die Wiederfindungen lagen zwischen 89 % und 97 % bei Variationskoeffizienten von 3,8 % bis 7,6 % (jeweils für Ergosterol bzw. Squalen). Mit dieser Methode konnte beispielhaft in einem Gäransatz die substanzielle Abnahme von Squalen bei gleichzeitiger Zunahme von Ergosterol nach Belüftung des Mostes aufgezeigt werden.

Schlagwörter: Hefen, Sterole, Ergosterol, Squalen, HPLC, Ultraschallaufschluss

Quantification of ergosterol and squalene in yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) using High-Performance Liquid Chromatography. Cellular lipids like fatty acids and sterols critical to membrane function are important to yeast vitality and integrity. Due to the low volatility of underivatized sterols, HPLC separation techniques are best for their quantization following cell lysis and separation of saponified lipids. The objective of this paper was to establish an easily feasible cell disintegration process as well as a simple HPLC-quantification method of ergosterol and squalene in yeast cell samples derived directly during fermentation. Cell lysis and saponification of lipids were successful after 3 minutes of sonification of boiling yeast slurry. For extraction and separation of non-saponified lipids and sterols pentane was used. Ergosterol and squalene were separated by HPLC in 40 minutes using an acetonitrile-water-gradient containing 5 % to 7 % water. Detection limit was 11 mg/l vs. 4 mg/l, linearity was up to 1300 mg/l vs. 300 mg/l, intra-day-precision was determined to be 5,2 % vs. 1,2 %, inter-day-precision was 5,2 % vs. 2,1 %, recovery-rates were 89 % vs. 97 %, reproducibility errors were 3,8 % vs. 7,6 % (for ergosterol and squalene each). In a test microvinification the effect of aeration on yeast performance could be documented in a decrease of squalene and a simultaneous increase of ergosterol with the method described.

Keywords: yeasts, sterols, ergosterol, squalene, HPLC, ultrasound disintegration

La détermination d'ergostérol et du squalène dans les cellules de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) par chromatographie liquide à haute pression. La classe de substances des stérols est responsable de la stabilité et du bon fonctionnement des membranes à l'intérieur et autour de la cellule de levure. Elle peut être quantifiée, par chromatographie liquide ou gazeuse, après lyse cellulaire et séparation des lipides insaponifiables. Dans ce contexte, la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) s'avère être la meilleure méthode grâce à la faible volatilité des stérols non déri-

vatisés. L'objectif du présent travail consiste à établir une méthode aisément réalisable de décomposition cellulaire et d'une méthode HPLC simple de détermination de l'ergostérol et du squalène dans les cellules de levure. La décomposition avec saponification alcaline est obtenue en l'espace de trois minutes seulement à température d'ébullition et avec des ultrasons. L'extraction des composants non saponifiés s'effectue à l'aide de pentane. L'utilisation d'un gradient de l'acétonitrile avec une teneur en eau entre 5 et 7 % permet la séparation de l'ergostérol et du squalène en l'espace de 40 minutes. Les limites de détection ont été fixées à 11 et 4 mg/l respectivement, la méthode est linéaire jusqu'à 1300 et 300 mg/l respectivement. La précision au cours d'une journée s'élève à 5,2 % et 1,2 %, la précision de jour en jour se situe à 5,2 % et 2,1 %, les recouvrements se situaient entre 89 % et 97 %, avec un coefficient de variation de 3,8 % à 7,6 % (pour l'ergostérol et le squalène respectivement). Cette méthode a permis de démontrer dans un levain, à titre d'exemple, la diminution substantielle du squalène et l'augmentation simultanée de l'ergostérol après aération du moût.

Mots clés : Levures, stérols, ergostérol, squalène, HPLC, décomposition par ultrasons

Während der Weinbereitung werden die Hefen in verschiedener Weise kritischen physikalischen und physiologischen Stresssituationen ausgesetzt. Ist es zu Beginn der Gärung die hohe Zuckerkonzentration im Most, so gewinnt während der Gärung die zunehmende Alkoholkonzentration an Bedeutung, durch die die Hefen somit während des gesamten Gärverlaufs wechselnden extremen osmotischen Stressbedingungen ausgesetzt sind. Sind in den Mosten die Gehalte an hefeverfügbaren Stickstoffverbindungen (Ammonium-Ionen, Aminosäuren) auf Grund der sortenspezifischen Eigenart (z. B. 'Kerner', 'Riesling') oder auf Grund von Trockenstress während der Vegetationsperiode nicht ausreichend vorhanden, so hat dies zusätzlich eine drastische Verschlechterung der Vitalität der Hefen zur Folge (HERRMANN et al., 2008).

Bedingt durch eine Reihe von Faktoren haben sich zwar in den letzten Jahren die natürlichen und technischen Voraussetzungen für die Weinbereitung erheblich verbessert, gleichzeitig verstärkten sich damit aber auch die für die Gärhefen kritischen Dispositionen. Beispielsweise haben durch veränderte klimatische Bedingungen in den letzten zehn Jahren die natürlichen Zuckergehalte in den Mosten um durchschnittlich 20 g/l zugenommen und damit korrespondierend zu höheren Alkoholgehalten am Ende der Gärung geführt. Aspekte der Weinstilistik und Sensorik mit dem Wunsch nach fruchtigen, sorten- und gebietstypischen Weinen erfordern höhere Klärgrade der Moste, kühlere Gärtemperaturen und mitunter die Verwendung betont gärschwacher Hefestämme. All dies sind Faktoren, die die Gärleistung der Hefen beeinträchtigen und in der önologischen Praxis immer häufiger zu Gärstörungen und Gärstockungen bis hin zum Verderb ganzer Weinpartien führen (HERRMANN et al., 2009).

Untersuchungen zeigen, dass die Vitalität der Hefe, neben der ausreichenden Versorgung mit Nährstoffen und Spurenelementen, in erster Linie durch die Stabilität und Funktionsfähigkeit der Membranen in und um die Hefezelle (Plasmalemma) gerade unter den multiplen Stressbedingungen beeinflusst wird (FORNAIRON-BONNEFOND et al., 2003). Es sind die Membranen, die als physikalisch-chemische Barrieren einerseits das Zellinnere vor zu hohen Zuckerkonzentrationen schützen, und andererseits den von den Hefezellen gebildeten Alkohol nach außen transportieren und damit die Hefezellen vor „Vergiftungen“ schützen (INGRAM und BUTTKE, 1984; MUNOZ und INGLEDEW, 1989). Neben den Phospholipiden und den Sphingolipiden sind vor allem die Sterole für essenzielle Funktionen der Membranen von grundlegender Bedeutung. Sterole sind die wichtigsten Strukturlipide der Membranen. Sie regulieren die Membranfluidität und die Membranpermeabilität (GARCÍA et al., 2006; MÜLLER, 2002). Sterole sind zudem für die Aktivierung membrangebundener Enzyme (ATPasen) verantwortlich, sie sind in den Transport von Aminosäuren eingebunden und haben eine regulierende Funktion im Zellzyklus. Sterole bestimmen und sichern damit wesentliche Funktionen des Zellstoffwechsels und sind für die Lebensfähigkeit und Stressbewältigung der Hefen unabdingbar (DAUM et al., 1998).

Die Biogenese der Sterole erfolgt nur unter der Mitwirkung von molekularem Sauerstoff. Im Hefemanagement der Bierbrauerei werden Hefeansatz und Würze zur Verbesserung der hefeeigenen Synthese von Sterolen und ungesättigten Fettsäuren standardmäßig belüftet (KIRSOP, 1974). Die im Brauereiwesen vorhandenen Verfahrensweisen und Erkenntnisse wurden bisher wegen der grundsätzlichen Verschiedenheiten beim Hefemanagement und der Gärung nicht in die

önologische Praxis übertragen. In Forschungsarbeiten des Fachzentrums Analytik der LWG in den Jahren 2006 bis 2008 konnte aber im 25 l- bis 100 l-Maßstab sehr deutlich gezeigt werden, dass durch die Belüftung des Hefeansatzes prinzipiell die Anzahl der Hefen um das Zehnfache gesteigert und die Fitness der Hefen dabei beträchtlich verbessert werden konnte (HERRMANN et al., 2008).

Um den Sterolgehalt der Hefezellen bei der alkoholischen Gärung zu messen, existieren verschiedene Methoden. Dabei wird in der Literatur eine Kombination von mechanischen (Glasperlen oder Gefriertrocknung) und chemischen (alkalische Verseifung) Aufschlussverfahren, gefolgt von Extraktion mit Chloroform/Methanol oder Dimethylsulfoxid/Hexan und einer gas- oder flüssigkeitschromatographischen Trennung eingesetzt (DAUM et al., 1999; RENCKEN et al., 1995; LE FUR et al., 1999; QUAN ZHOU et al., 2002; BELVISIO et al., 2004; BELTRAN et al., 2008; XU et al., 1988; MANNAZZU et al., 2008; LAGARDA et al., 2006). Der Wunsch nach einem leicht durchführbaren und schnellen Zellaufschluss-Verfahren, nach der Verwendung von weniger toxischen Reagenzien sowie einer einfachen HPLC-Bestimmungsmethode der wichtigsten in der Hefe vorkommenden Sterole stand im Mittelpunkt dieser Arbeit. Mit den hier vorgestellten Methoden wurde daraufhin eine önologische Versuchsreihe in Zusammenarbeit mit der Forschungsanstalt Geisenheim und der Universität Gießen überprüft.

Material und Methoden

Chemikalien

Alle Chemikalien waren von analytischer Reinheit, soweit nicht anders vermerkt. HPLC-Wasser und Methanol waren von der Fa. Baker (Deventer, Niederlande), Kaliumhydroxid-Plättchen und wasserfreies Natriumsulfat von der Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland) und Methanol, Isopropanol sowie Pentan von der Fa. AppliChem (Darmstadt, Deutschland).

Der Standard für Ergosterol war von der Fa. ABCR (Karlsruhe, Deutschland), die Standards für Lanosterol von Fa. Sigma (Taufkirchen, Deutschland), Fa. MP-Biomedicals (Illkirch, Frankreich) und Fa. ABCR, der Standard für Stigmasterol von der Fa. Sigma und der Squalen-Standard von der Fa. Roth (Karlsruhe, Deutschland).

Instrumentation und HPLC-Analytik

Es standen ein Ultraschallbad (Transsonic T 570/H, Fa. Elma, Singen/Hohentwiel) sowie eine Vakuumbuchse (10er-Vakuumbuchse für SPE-Kartuschen; Fa. Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) zur Verfügung. Die HPLC-Anlage bestand aus zwei Pumpen (Typ 225), einem Diodenarraydetektor (DAD-100), dem Degaser (Gastorr DG-14), alle von der Fa. Bischoff (Leonberg, Deutschland) und dem Autosampler (Basic Marathon, Fa. Spark, Niederlande). Das Injektionsvolumen der Probenschleife betrug 20 µl. Als Chromatographie-Software diente das McDAqu32-DAD-100Control-System (Fa. Bischoff, Leonberg, Deutschland). HPLC-Vials (2 ml) und Mikroeinsätze (30 x 5 mm) waren von der Fa. Roth (Karlsruhe).

Als analytische Säule fand eine Umkehrphasensäure (Prontosil Eurobond C18, 5 µm, 125 x 4 mm; Fa. Bischoff, Leonberg, Deutschland) Verwendung.

Die Separierung im HPLC-System gelang mit einem Acetonitril-Wasser Gradienten (Eluent A: 20 % Wasser in Acetonitril; Eluent B: 100 % Acetonitril) und folgendem Gradientenprogramm: Start 65 % B, 20 Minuten 75 % B, 30 Minuten 75 % B, 31 Minuten 65 % B, Equilibrierung bis 40 Minuten. Die Detektion erfolgte bei 202 nm (Lanosterol, Stigmasterol, Squalen) bzw. 275 nm (Ergosterol), die Flussrate betrug 1 ml/min bei einer Säulentemperatur von 40 °C.

Gäransatz

Zur Vergärung kam eine kaltsteril eingelagerte Süßreserve (Gebiets-Winzergenossenschaft Repperndorf) (177 g/l vergärbare Zucker, pH-Wert = 2,96, 8,1 g/l Gesamtsäure) die mit einer 3 % Wasserstoffperoxid-Lösung auf 24 mg/l Gesamt-SO₂ entschwefelt wurde. Zur Sicherstellung von strikt anaeroben Bedingungen wurde der im Most gelöste Sauerstoff mittels eines Stickstoffstroms über eine Laborfritte (Fa. Schott, Mainz, Deutschland) entfernt. Die Vergärung fand bei 20 °C in einer 2,5 l-Steilbrustflasche mit der Reinzuchtheife Oenoferm-Tipico (15 g/hl, nach Herstellerangaben rehydriert; Fa. Erbslöh, Geisenheim, Deutschland) unter permanentem Rühren auf einem Laborschüttler (Fa. Braun, Leipzig, Deutschland) über 14 Tage statt. Die Belüftung erfolgte 48 Stunden nach Hefezusatz über die o. g. Fritte, wobei mittels der O₂-Mess-Sonde CellOx 325 (Fa. WTW, Weilheim, Deutschland) eine Konzentration von ca. 8 mg/l freiem Sauerstoff im Gäransatz eingestellt wurde.

Probenvorbereitung

Aus einem Gäransatz werden nach erfolgter Zählung (Gesamtkeimzahl, gemessen in einer Thoma-Kammer) 1×10^9 Hefezellen abzentrifugiert, mit 1 ml Wasser vorsichtig aufgerührt, quantitativ in ein 2 ml-Eppendorf-Gefäß überführt, mit 1 ml Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Der abgetropfte Niederschlag wird in 75 μ l Wasser resuspendiert und unter Rühren mit 1 ml methanolischer KOH-Lösung und 20 μ l Stigmasterol als internem Standard versetzt, danach mit Clips verschlossen und für drei Minuten im Ultraschallbad bei 90 °C behandelt. Dann wird in kaltem Wasser abgekühlt und viermal mit je 500 μ l Pentan extrahiert. Die organische Phase wird durch Zugabe einer Mikrospatelspitze Na_2SO_4 für 30 Minuten im Kühlschrank getrocknet. Man zentrifugiert kurz, dekantiert in neue Eppendorf-Röhrchen und entfernt das Solvens in der Vakuum-Box mit einem Stickstoffstrom. Die semikristallinen Rückstände werden in je 200 μ l Isopropanol aufgenommen, zentrifugiert, in einen Mikroeinsatz pipettiert, in HPLC-Vials eingesetzt und chromatographisch vermessen.

Ergebnisse

Kalibration

Ergosterol (651 mg/l) und Squalen (152 mg/l) werden in Gegenwart des internen Standards Stigmasterol (1086 mg/l) in vierfacher Wiederholung durch eine Einpunkt-Messung kalibriert, wobei die Berechnungsbasis die Peakfläche war. Für Lanosterol existiert kein qualitativ befriedigender Standard, obwohl von drei Firmen Standards ausprobiert wurden. Diese Substanz findet aus diesem Grund keinen Eingang in die folgenden Ergebnisse und wurde auf Stigmasterol berechnet.

Die Linearität (Peakfläche vs. Konzentration) wurde in elf Standardkonzentrationen im Triplikat bestimmt und reicht bis über 1300 mg/l bzw. 300 mg/l (Ergosterol bzw. Squalen) bei einem Korrelationskoeffizienten von je $R^2 > 0,999$.

Die Nachweisgrenze (Limit of detection; LOD), definiert als dreimaliges Signal/Rausch-Verhältnis ($S/N = 3$), lag bei 3,6 mg/l bzw. 1,2 mg/l (Ergosterol bzw. Squalen). Die Bestimmungsgrenze (Limit of quantifi-

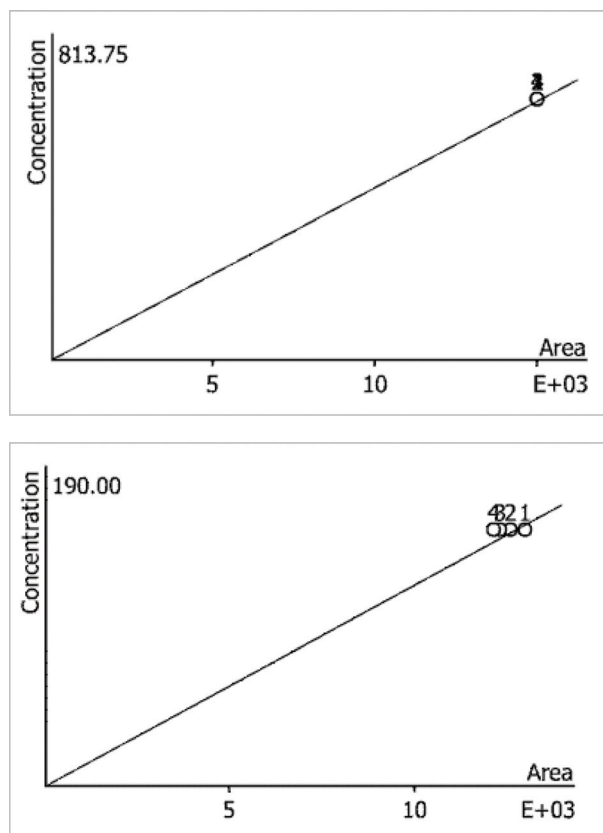


Abb. 1 und 2: Kalibration von Ergosterol und Squalen.

cation; LOQ), definiert als zehnfaches Signal/Rausch-Verhältnis ($S/N = 10$), wurde mit 11,2 mg/l bzw. 4,2 mg/l (Ergosterol bzw. Squalen) bestimmt (MILLER und MILLER, 1988).

Die Präzision innerhalb eines Tages wurde mit 19 aufeinander folgenden Injektionen eines Standards (130 mg/l Ergosterol, 1086 mg/l Stigmasterol und 30,3 mg/l Squalen) bestimmt. Bei den Peakflächen betrug der Variationskoeffizient 0,2 % für Ergosterol, 5,9 % für Stigmasterol und 4,6 % für Squalen. Unter Verwendung von Stigmasterol als internem Standard bei der Kalibration wurde ein Variationskoeffizient von 5,2 % für Ergosterol und 1,2 % für Squalen gefunden. Die Präzision von Tag zu Tag wurde mit einem aliquotierten und eingefrorenen Standard über 14 aufeinander folgende Tage gemessen und betrug 5,2 % bei Ergosterol und 2,1 % bei Squalen.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde eine Probe mit 3,0 μ l Isopropanol, 6,8 μ l Ergosterol-Standard (95 mg/l) und 15,0 μ l Squalen-Standard (227

mg/l) (Zusatz 1) bzw. 20 µl Ergosterol-Standard (279 mg/l) und 5,0 µl Squalen-Standard (76 mg/l) (Zusatz 2) versetzt und in vierfacher Wiederholung extrahiert. Als Blank (im Duplikat) diente die gleiche Probe mit einem Zusatz von 25 µl Isopropanol. Die Wiederfindungsraten betragen 93 % (VK = 6,9 %) bzw. 93 % (VK = 6,2 %) bei Zusatz 1 und 97 % (VK = 3,8 %) bzw. 89 % (VK = 7,6 %) bei Zusatz 2.

Tab. 1: Messreihe mit Sterol-Standards. Angegeben sind die Konzentrationen (mg/l) an Ergosterol und Squalen sowie die Peakflächen (mAU*sec), Kennzahlen und Bestimmtheitsmaß der linearen Regression

	Ergosterol		Squalen	
	Konzentration	Peakfläche	Konzentration	Peakfläche
1	1302	29354104	303	24712348
2	651	14671285	152	11953655
3	326	7299768	75,8	6080733
4	163	3615404	37,9	3027187
5	81,4	1786060	18,9	1474676
6	40,7	872817	9,47	717037
7	20,3	437841	4,73	361141
8	10,2	230165	2,37	187545
9	5,09	113346	1,18	95975
10	2,54	51296	0,59	47773
11	1,27	31586	0,30	25657
Steigung	0,00004		0,00001	
Achsenabschnitt	0,997		0,561	
r ²	1,00000		0,99989	

Tab. 2: Limit of detection und Limit of quantification bei Ergosterol und Squalen in mg/l. Graphische Ermittlung von Noise (Grundrauschen; mAU*sec) aus den Lösungen 7 – 11 (Tab. 1), Kennzahlen und Bestimmtheitsmaß der linearen Regression

	Ergosterol	Squalen	Ergosterol	Squalen
Noise (graph.)	0,70	0,75		
LOD (s/n = 3)	2,10	2,25	3,6	1,2
LOQ (s/n = 10)	7,00	7,50	11,2	4,2
Steigung			1,563	0,570
Achsenabschnitt			0,273	-0,064
r ²			0,9999	0,9997

Tab. 3: Präzision innerhalb eines Tages für Ergosterol und Squalen, Messwerte und Mittel (mg/l) sowie Variationskoeffizient (%)

	Ergosterol	Squalen
1	100,2	31,9
2	109,9	32,8
3	115,9	33,0
4	119,8	33,4
5	121,3	33,6
6	121,9	33,5
7	123,1	33,9
8	124,0	33,5
9	124,3	33,3
10	124,3	33,4
11	124,3	33,5
12	124,4	33,6
13	124,3	33,4
14	124,1	33,4
15	124,3	33,5
16	124,4	33,5
17	124,0	33,4
18	123,8	33,5
19	123,2	33,6
Mittelwert	121,1	33,4
Variationskoeffizient	5,2%	1,2%

Tab. 4: Präzision von Tag zu Tag für Ergosterol und Squalen, Messwerte und Mittel (mg/l) sowie Variationskoeffizient (%)

	Ergosterol	Squalen
1	94	31
2	105	33
3	109	33
4	111	33
5	114	34
6	110	32
7	109	33
8	101	33
9	109	32
10	105	32
11	101	32
12	103	32
13	101	32
14	106	32
Mittelwert	105,5	32,5
Variationskoeffizient	5,2%	2,1%

Tab. 5: Wiederfindungen für Ergosterol und Squalen, Messwerte und Mittel (mg/l), Wiederfindung und Variationskoeffizient (%) bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen (niedrig↓ bzw. hoch↑)

Ergosterol↓ und Squalen↑	Ergosterol	Squalen
Blank	50,5	156
Zusatz 1	132	371
Zusatz 1	133	339
Zusatz 1	151	394
Zusatz 1	148	365
Mittel	139	367
Wiedergewinnung	93%	93%
Variationskoeffizient	6,9%	6,2%

Ergosterol↑ und Squalen↓	Ergosterol	Squalen
Blank	50,5	156
Zusatz 2	331	222
Zusatz 2	316	218
Zusatz 2	328	208
Zusatz 2	305	248
Mittel	320	224
Wiedergewinnung	97%	89%
Variationskoeffizient	3,8%	7,6%

Anwendungsbeispiel

Die präsentierte Analysenmethode wurde anhand einer önologischen Fragestellung in einem Mikroviniifikationsansatz überprüft. In den Abbildungen sind die Chromatogramme eines Hefeansatzes 48 Stunden nach Hefezusatz unmittelbar vor Belüftung (Abb. 3) und sechs Stunden nach Belüftung (Abb. 4) dargestellt.

Diskussion

Mit dem Zellaufschluss unter Ultraschall-Bedingungen kann der Zeitbedarf vom Gäransatz bis zur Messung, beispielsweise im Vergleich zu Verfahren, die eine Lyophilisation oder die Verwendung von Glasperlen erfordern, erheblich reduziert werden. Schon nach zwei bis drei Minuten Aufschlussdauer im Ultraschallbad werden die Sterole freigesetzt. Rechnet man die weiteren Schritte, wie Zellzählung, Zentrifugation,

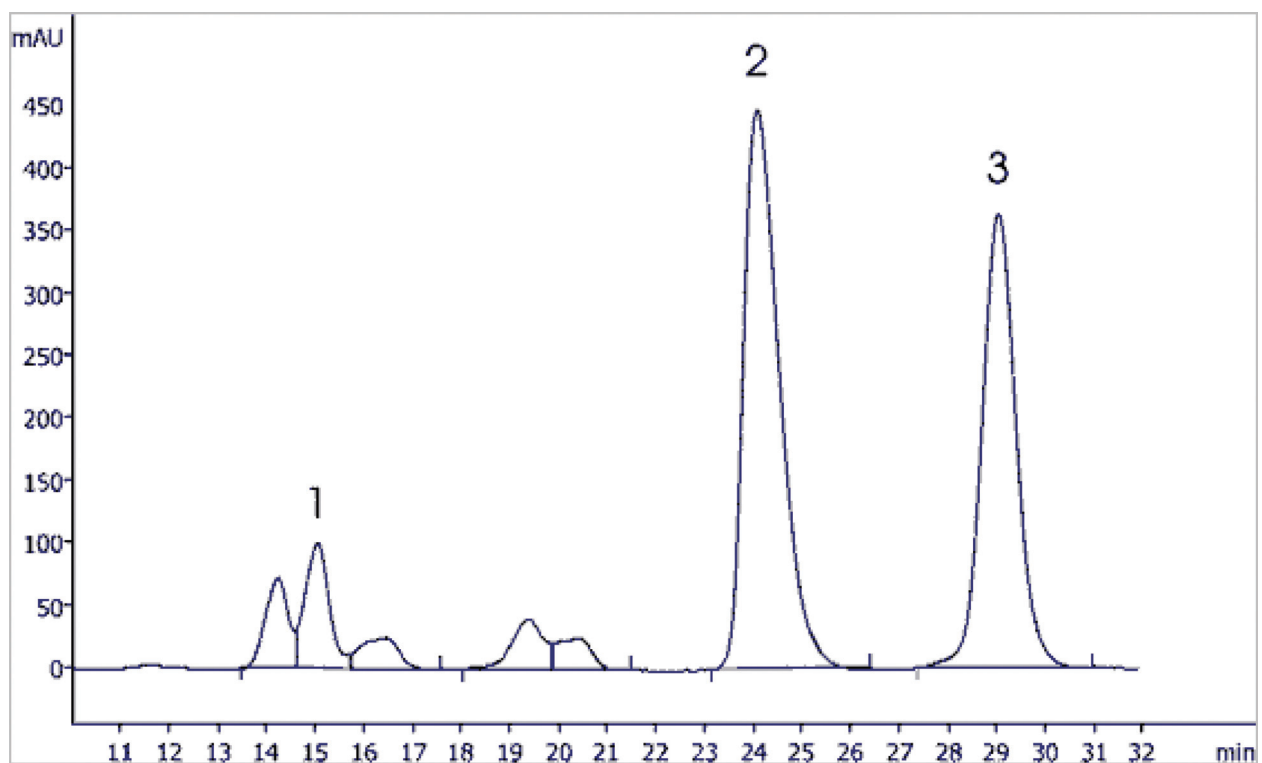


Abb. 3: Hefeansatz 48 Stunden nach Hefezusatz unmittelbar vor Belüftung (1: Ergosterol, 2: int. Standard Stigmatsterol, 3: Squalen)

Extraktion und Abdampfen der organischen Phase, dazu, kann eine Person je nach Kapazität der Vakuumb-Box mindestens zehn Proben an einem Vormittag zur Messung vorbereiten. Mit dem Extraktionsmittel Pentan steht im Vergleich zu den üblicherweise verwendeten Kombinationen Chloroform/Methanol oder Dimethylsulfoxid/Hexan ein sehr lipophiles, leicht flüchtiges und wenig toxisches Reagenz zu Verfügung. Zusätzlich kann Pentan nur minimale Spuren an Wasser aufnehmen und bildet nicht so wie Chloroform das toxische Abbauprodukt Phosgen. Ein schmaler Acetonitril-Wasser-Gradient ermöglicht einfache chromatographische Bedingungen mit nur einem organischen Lösungsmittel ohne die Verwendung von Puffersalzen. Die Überprüfung der praktischen Eignung der Methode erfolgt im Zuge eines önologischen Projektes, welches unter anderem Fragen zur Biosynthese von Sterolen und Fettsäuren in Hefezellen unter dem Einfluss der Belüftung beantworten soll (HEßDÖRFER, in Vorbereitung).

Literatur

- BELTRAN, G., NOVO, M., GUILLAMÓN, J.M., MAS, A. and ROZÉS, N. 2008: Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 169-177
- BELVISO, S., BARDI, L., BIONDI-BARTOLINI, A. and MARZONA M. 2004: Lipid nutrition of *Saccharomyces cerevisiae* in winemaking. *Can. J. Microbiol.* 50: 669-674
- DAUM, G., LEES, N.D., BARD, M. and DICKSON, R. 1998: Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 1471-1510
- DAUM, G., TULLER, G., NEMEC, T., HRASTNIK, C., BALLIANO, G., CATTEL, L., MILLA, P., ROCCO, F., CONZELMANN, A., VIONNETT, C., KELLY, D.E., KELLY, S., SCHWEIZER, E., SCHÜLLER, H.-J., HOJAD, U., GREINER, E. and FINGER, K. 1999: Systematic analysis of yeast strains with possible defects in lipid metabolism. *Yeast* 15: 601-614
- FORNAIRON-BONNEFOND, C., AGUERA, E., DEYTIEUX, C., SABLAYROLLES, J.-M. and SALMON, J.-M. 2003: Impact of oxygen addition during enological fermentation on sterol contents in yeast lees and their reactivity towards oxygen. *J. Biosci. Bioeng.* 95(5): 496-503
- GARCÍA, A.P., MARTINEZ, C.S., HERAZ, J., ORTIZ-JULIEN, A. and

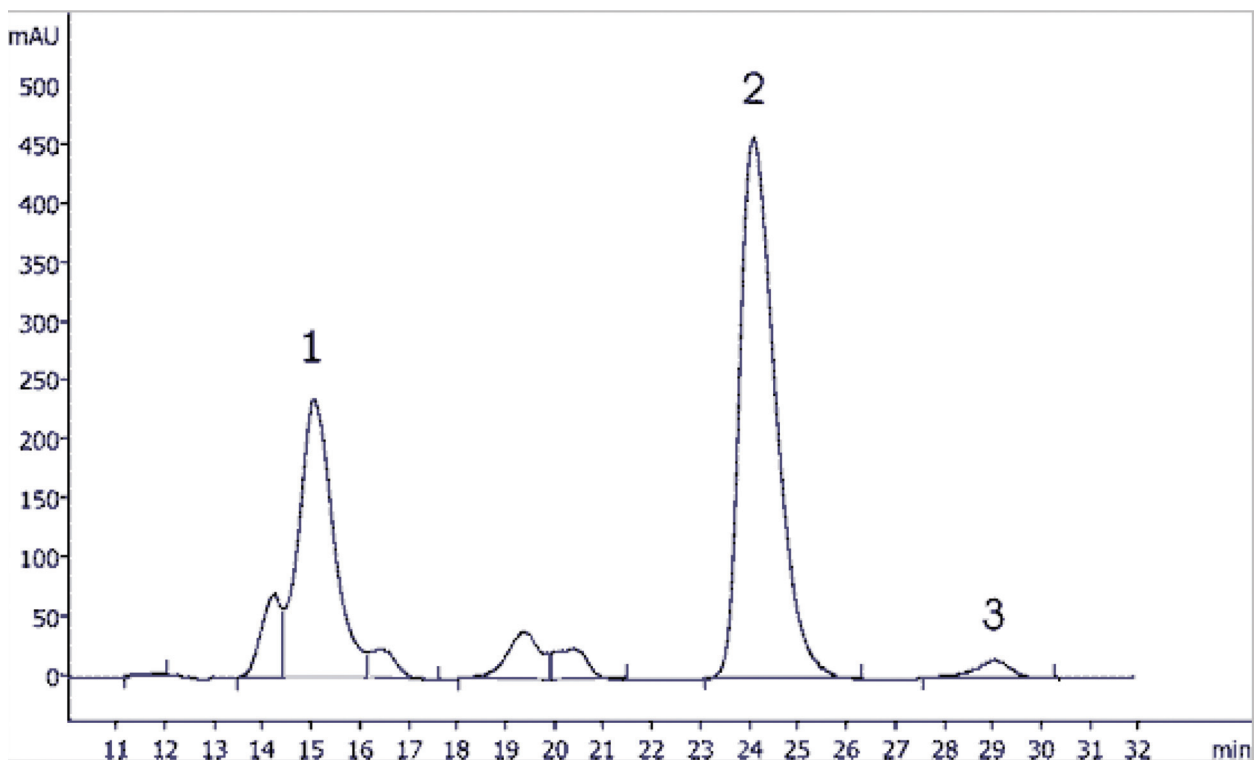


Abb. 4: Hefeansatz sechs Stunden nach Belüftung (1: Ergosterol, 2: int. Standard Stigmasterol, 3: Squalen)

- SALMON, J.-M. 2006: How to ensure and improve wine fermentation by first protecting the yeast. www.Wynboer.co.za/recentarticles/200611yeast.php3
- HERRMANN, J.V., MAIER, C. und SCHINDLER, E. 2008: Gut belüftete Hefen sind vitaler und gärstärker. *Rebe und Wein*: (8): 13-17
- HERRMANN, J.V., SCHINDLER, E., MAIER, C. und MILTENBERGER, R. 2009: Behebung von Gärstörungen – Der zweite Versuch. *Dt. Weinmagazin* (18): 10-13
- INGRAM, L.O. and BUTTKE, T.M. 1984: Effects of alcohols on microorganisms. *Adv. Microbial Physiol.* 25: 253-300
- KIRSOP, B.H. 1974: Oxygen in brewery fermentation. *J. Inst. Brewing* 80: 252-259
- LAGARDA, M.J., GARCÍA-LLATAS, G. and FARRÉ, R. 2006: Analysis of phytosterols in foods. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 41(5): 1486-1496
- LE FUR, Y., MAUME, G., FEUILLAT, M. and MAUME, B.F. 1999: Characterization by Gas Chromatography/Mass Spectrometry of sterols in *Saccharomyces cerevisiae* during autolysis. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2860-2864
- MANNAZZU, I., ANGELOZZI, D., BELVISO, S., BUDRONI, M., FARRIS, G.A., GOFFRINI, P., LODI, T., MARZONA, M. and BARDI, L. 2008: Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation on synthetic medium: Cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 84-91
- MILLER, J.C. and MILLER, J.N. (1988): *Statistics for analytical chemistry*. 2nd ed. – Chichester: Ellis Horwood, 1988
- MÜLLER, J. (2002): *Analytik von freien Sterolen und Entwicklung einer Screening-Methode zur Charakterisierung des Inhibitionsverhaltens neuer Sterolbiosyntheseinhibitoren*. – München: Diss. Ludwig-Maximilians-Universität, 2002
- MUNOZ, E. and INGLEDEW, W.M. 1989: Effect of yeast hulls on stuck and sluggish wine fermentations: Importance of the lipid component. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55(6): 1560-1564
- QUAN ZHOU, LIN ZHANG, XUE-QI FU and GUO-QIANG CHEN 2002: Quantitation of yeast ceramides using high-performance liquid chromatography-evaporative light-scattering detection. *J. Chromatogr. B*, 780: 161-169
- RENCKEN, I., FLEMING, V., MEIJERING, I. and AXCELL, B. 1995: Determination of selected sterols and fatty acids in yeast. *J. Chromatogr. Sci.* 33: 525-530
- XU, S., NORTON, R.A., CRUMLEY, F.G. and NES, W.D. 1988: Comparison of chromatographic properties of sterols, select additional steroids and triterpenoids: gravity flow column liquid chromatography, thin-layer-chromatography, gas-liquid-chromatography and high performance chromatography. *J. Chromatogr. A*, 452: 377-398

Manuskript eingelangt am 17. März 2010