

**Feucht-Inkubation als alternative  
Nacherntebehandlung von Kakaobohnen -  
Einfluss auf die Aromabildung und  
Transformation nicht-flüchtiger Inhaltsstoffe**

**Dissertation**

**Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades (Dr. rer. nat.) des  
Fachbereichs Chemie - Fakultät für Mathematik, Informatik und  
Naturwissenschaften der Universität Hamburg**

**Institut für Lebensmittelchemie**

vorgelegt von

**Johannes Ansgar Schlüter**

Hamburg, Mai 2023

---

**Gutachter 1:**  
**Prof. Dr. Sascha Rohn**

**Gutachterin 2:**  
**Prof. Dr. Agnes Weiß**

Diese Dissertation wurde im Zeitraum von Oktober 2018 bis Mai 2023 unter der Leitung von Prof. Dr. Sascha Rohn (Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg) angefertigt. Die praktischen Arbeiten erfolgten an der Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften in Wädenswil (Schweiz) unter der Betreuung von Prof. Dr. Irene Chetschik.

**Tag der Disputation:**  
**Freigabe zur Veröffentlichung:**

**3. November 2023**  
**16. Dezember 2023**

---

Mein Dank gilt Prof. Dr. Sascha Rohn, Prof. Dr. Irene Chetschik, Prof. Dr. Tilo Hühn und Prof. Dr. Konrad Bernath, die mir als Betreuer und Arbeitskollegen bei der Verwirklichung dieser Forschungsarbeit sehr geholfen und mich unterstützt haben. Zudem danke ich Markus Kneubühl, Lisa Ullrich und Amandine André für die praktische Unterstützung im Labor.

### I. Verzeichnis der Veröffentlichungen

#### Beiträge zur kumulativen Dissertation:

**Schlüter, A.**; André, A.; Hühn, T.; Rohn, S.; Chetschik, I. Influence of aerobic- and anaerobic moist incubation on selected non-volatile constituents – comparison to traditionally fermented cocoa beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70, 16335–16346. doi: 10.1021/acs.jafc.2c06493

**Impact factor 2021 = 5.895**

**Schlüter, A.**; Hühn, T.; Kneubühl, M.; Chatelain, K.; Rohn, S.; Chetschik, I. Comparison of the aroma composition and sensory properties of dark chocolates made with moist incubated and fermented cocoa beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70, 4057–4065. doi: 10.1021/acs.jafc.1c08238

**Impact factor 2021 = 5.895**

**Schlüter, A.**; Hühn, T.; Kneubühl, M.; Chatelain, K.; Rohn, S.; Chetschik, I. Novel time- and location-independent postharvest treatment of cocoa beans: investigations on the aroma formation during "moist incubation" of unfermented and dried cocoa nibs and comparison to traditional fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68, 10336–10344. doi: 10.1021/acs.jafc.9b06119.

**Impact Factor 2020 = 5.279**

#### Weitere Veröffentlichungen:

Chetschik, I.; Ullrich, L.; **Schlüter, A.**; Chatelain, K.; Hühn, T. Flavour characterisation of chocolate & cocoa products produced by novel processing techniques.

In: *Cocotea2019: book of abstracts*. 5<sup>th</sup> International Congress on Cocoa Coffee and Tea, 2019, Bremen, Deutschland

Chetschik, I., Kneubühl, M., Chatelain, K., **Schlüter, A.**, Bernath, K., Hühn, T. Investigations on the aroma of cocoa pulp (*Theobroma cacao* L.) and its influence on the odor of fermented cocoa beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66, 2467–2472. doi: 10.1021/acs.jafc.6b05008.

## I. Verzeichnis der Veröffentlichungen

---

### Posterbeiträge:

**Schlüter, A.**; Hühn, T.; Kneubühl, M.; André, A.; Chatelain, K.; Rohn, S.; Chetschik, I.: Novel time- and location-independent postharvest treatment of cocoa beans: „moist incubation“ of unfermented and dried cocoa nibs. International Cocoa Organization (ICCO) - International symposium on cocoa research (ISCR). 5. – 7. Dez. 2022, Montpellier, Frankreich

**Schlüter, A.**; Hühn, T.; Chatelain, K.; Rohn, S.; Chetschik, I.: Novel postharvest treatments of cocoa and the influence on flavor properties of the products produced thereof. 12<sup>th</sup> Wartburg Symposium on Flavor Chemistry & Biology. 21. – 24. Mai 2019, Eisenach, Deutschland

Bieri, S., **Schlüter, A.**, Bernath, K., Hühn, T.: Incubation of unfermented and dried cocoa beans. Runder Tisch Kakao. 22. – 23. Juni 2017, Hamburg, Deutschland

Chetschik, I., Kneubühl, M., Chatelain, K., **Schlüter A.**, Bernath, K., Hühn, T. Investigations on the aroma of cocoa pulp (*Theobroma cacao* L.) and its influence on the odor of fermented cocoa beans. 11<sup>th</sup> Wartburg Symposium on Flavor Chemistry & Biology. 21. – 24. Juni 2016, Eisenach, Deutschland

### Vorträge:

**Schlüter, A.** Comparison of the aroma composition and sensory properties of dark chocolates made with moist incubated and fermented cocoa beans. Swiss Food Research – Arbeitskreis (AK) Schokolade Nr. 51. 15. Sept. 2022, Lindt & Sprüngli (Schweiz) AG, Kilchberg, Schweiz

## II. Inhaltsverzeichnis

I. Verzeichnis der Veröffentlichungen	I
II. Inhaltsverzeichnis	II
III. Abkürzungen	III
IV Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	IV
1 Kurzfassung	1
2 Abstract	3
3 Einleitung	5
4 Theoretischer Hintergrund	7
4.1 Geschichte der Kakaoverarbeitung	7
4.2 Herkunft und Einteilung	7
4.3 Aufbau und Inhaltsstoffe von Kakaofrüchten und Kakaosamen	8
4.3.1 Zellaufbau im frischen Kakaosamen	9
4.3.2 Proteine und freie Aminosäuren	10
4.3.3 Kohlenhydrate	11
4.3.4 Polyphenole	11
4.3.5 Methylxanthine	12
4.4 Kakaofermentation	13
4.4.1 Mikrobielle Fermentation der Fruchtpulpe	13
4.4.2 Interne oder enzymatische Fermentation	17
4.4.3 Einfluss der Fermentation auf qualitätsbestimmende Merkmale und die weitere Verarbeitung	21
4.5 Weiterverarbeitung von Rohkakao und Schokoladenherstellung	23
4.6 Die Bildung und Zusammensetzung des Kakaoaromas	24
4.6.1 Flüchtige Verbindungen im Kakao	24
4.6.2 Bewertung der Relevanz der flüchtigen Aromastoffe	25
4.6.3 Aromaaktive Verbindungen in Kakao und Schokolade	30
4.6.4 Bildungswege von Schlüsselaromastoffen im Kakao	35
5 Zusammenfassende Betrachtung und Zielsetzung	44
6 Methodenentwicklung	47
6.1 Rohmaterialien	47
6.2 Methoden	48
6.2.1 Probenvorbereitung für Inkubationsversuche	48

## II. Inhaltsverzeichnis

---

6.2.2	Rehydrierung der Kotyledonen	48
6.2.3	Inkubationsmedium	48
6.2.4	Inkubations- und Trocknungsparameter	49
7	Kumulativer Teil der Dissertation	53
7.1	Novel time- and location-independent postharvest treatment of cocoa beans: investigations on the aroma formation during “moist incubation” of unfermented and dried cocoa nibs and comparison to traditional fermentation (Publikation 1)	54
7.2	Comparison of the aroma composition and sensory properties of dark chocolates made with moist incubated and fermented cocoa beans (Publikation 2)	65
7.3	Influence of aerobic and anaerobic moist incubation on selected nonvolatile constituents – comparison to traditionally fermented cocoa beans (Publikation 3)	76
8	Zusammenfassende Diskussion	90
8.1	Aromabildung während der Feucht-Inkubation und Fermentation	90
8.1.1	Durch die Feucht-Inkubation induzierte Aromabildung	90
8.1.2	Vergleich der Aromabildung während der Feucht-Inkubation und Fermentation	92
8.2	Charakterisierung des Aromaprofils und der sensorischen Eigenschaften von Schokolade aus feucht-inkubiertem Kakao	97
8.2.1	Vergleich der Aromazusammensetzung in Schokoladen aus feucht-inkubiertem und fermentiertem Kakao	97
8.2.2	Bewertung des sensorischen Profils der Modellschokoladen	101
8.3	Transformation nicht-flüchtiger Inhaltsstoffe	104
8.3.1	Vergleich der Aromavorstufenbildung während der aeroben und anaeroben Feucht-Inkubation mit der Fermentation	104
8.3.2	Veränderungen der phenolischen Inhaltsstoffe und Methylxanthine während der anaeroben und aeroben Feucht-Inkubation und Fermentation	106
8.4	Schlussfolgerungen und Ausblick	107
	Literaturverzeichnis	115
	Anhang	130

## III. Abkürzungen

Aerobe mesophile Keime	AMK
Anaerobe mesophile Sporenbildner	AMS
Aromaextraktverdünnungsanalyse	AEVA
Fettfreie Trockensubstanz	ffTS
Flavor dilution factor	FD-Faktor
Flammenionisationsdetektor	FID
Gaschromatographie	GC
Gaschromatographie-Olfaktometrie	GC-O
Grad Celsius	°C
Gramm	g
Hochleistungsflüssigchromatographie	HPLC
Kilodalton	kDa
Kilogramm	kg
Kolonienbildende Einheiten	KBE
Liter	L
Massenspektrometrie	MS
Milligramm	mg
Millimeter	mm
Odor activity value	OAV
Quantitative descriptive analysis	QDA
Quadrupol time of flight	QTOF
Solvent assisted flavor evaporation	SAFE
Stabilisotopenverdünnungsanalyse	SIVA
Stunden	h
Trifluoressigsäure Pufferlösung	TFA
Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften	ZHAW



### IV. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

#### Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Unterschiedliche Größen, Farben und Formen reifer Kakaoschoten.....	8
Abbildung 2: Kakaoschoten im jungen und ausgewachsenen Stadium in Costa Rica (A) und aufgebrochene Kakaoschote mit den von Fruchtpulpe umgebenden Bohnen (B).....	9
Abbildung 3: Histologisches Schnittpräparat angefärbt mit Toluidinblau adaptiert nach Elwers (2008).....	10
Abbildung 4: Strukturformeln der im Kakao hauptsächlich vorkommenden monomeren Polyphenole (-)-Epicatechin, (+)-Catechin, der oligomeren Procyanidine Procyanidin B2, Procyanidin C1, Cinnamtannin A2, und dem Anthocyan Cyanidin-3-β-D-galactosid ....	12
Abbildung 5: Strukturformeln der Methylxanthine Theobromin und Coffein .....	13
Abbildung 6: Bohnen-Pulpe Gemisch in einer Fermentationskiste (A) und anschließende Abdeckung mit Bananenblättern (B) .....	14
Abbildung 7: Kakaobohnen vor der ersten Umschichtung und Homogenisierung (A) und vor der letzten Umschichtung (B) .....	15
Abbildung 8: Bohnen am Ende der Fermentation mit anhaftenden Resten der abgebauten Fruchtpulpe (A). Vorbereitung zur Homogenisierung und Trocknung auf Trockentischen (B). Vollständig getrocknete Bohnen (C) .....	16
Abbildung 9: Strukturformeln der Aminosäuren L-Leucin, L-Isoleucin, L-Phenylalanin .....	19
Abbildung 10: Strukturformeln von Saccharose, D-Glucose und D-Fructose.....	19
Abbildung 11: Chinonbildung am Beispiel von (-)-Epicatechin adaptiert nach Barišić et al. (2019).....	20
Abbildung 12: SAFE-Extraktionsvorrichtung nach Engel et al. (1999) .....	26
Abbildung 13: Schematische Darstellung einer GC-O Apparatur adaptiert nach Steinhaus (2020). (A) Injektor, (B) Kappillarsäule, (C) Splitter, (D) FID, (E) Sniffing Port.....	27

## IV. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

---

Abbildung 14: Schematische Darstellung des Prinzips einer Stabilisotopenverdünnungsanalyse adaptiert nach Steinhaus (2020). A: Analyt, S: Standard .....	28
Abbildung 15: Ethylesterbildung am Beispiel von 2-Methylbuttersäure und Ethanol .....	37
Abbildung 16: Strukturformeln ausgewählter Schlüsselaromastoffe von Kakao .....	38
Abbildung 17: Anfangsphase der Maillard-Reaktion adaptiert nach Parker (2015).....	40
Abbildung 18: Schematische Darstellung des Strecker-Abbaus adaptiert nach Parker (2015) und der von Granvogel et al. (2012) vorgeschlagenen Strecker-Säurebildung.....	42
Abbildung 19: Darstellung der Pyrazinbildung durch Kondensation von Aminoketonen adaptiert nach Parker (2015).....	43
Abbildung 20: Unfermentierte und getrocknete Kakaonibs mit Medium nach der Rehydrierung .....	49
Abbildung 21: Entwicklung der gemessenen Gehalte an primären Aminogruppen während der anaeroben Feucht-Inkubation über 120 h von unfermentiertem Kakaopulver, unfermentierten Kakaonibs, ganzen unfermentierten Bohnen mit Testa, der aeroben Feucht-Inkubation von unfermentierten Kakaonibs über 72 h und der fermentierten Referenzprobe.....	51
Abbildung 22: Flussdiagramm der Feucht-Inkubation und Fermentation nach der Ernte.....	52
Abbildung 23: Berechnete OAV der untersuchten Modellschokoladen.....	102
<b>Tabellenverzeichnis:</b>	
Tabelle 1: Ermittelte OAV in fermentierten Forastero- und Criollo Kakaobohnen vor und nach der Röstung geordnet nach Rangfolge der OAV in gerösteten Forasterobohnen.....	31
Tabelle 2: Konzentrationsbereiche geruchsaktiver Verbindungen in unfermentierten und fermentierten Kakaobohnen verschiedener Herkünfte vor und nach der Röstung.....	32
Tabelle 3: Hydrophobe Aminosäuren als Vorstufen für Aldehyde, Säuren, Alkohole und Ester .....	36

# 1 Kurzfassung

Während der traditionellen Nacherntebehandlung von Kakaobohnen wird die Bohnen umgebende zuckerhaltige Fruchtpulpe durch eine spontane Fermentation mikrobiologisch abgebaut. Durch die mikrobielle Bildung von Ethanol und Essigsäure ausserhalb der Bohnen erwärmt sich die Fermentationsmasse auf ca. 50 °C und Essigsäure diffundiert in die Kakaobohnen. Durch die Erwärmung und Ansäuerung des Samens wird der Keimling inaktiviert und die Zellstruktur zerstört. Dies ermöglicht den Kontakt bohneneigener Enzyme und weiterer Inhaltsstoffe wie Proteine, Zucker und Polyphenole in der Kotyledonmatrix, wodurch wichtige Aromavorstufen freigesetzt und die Bitterkeit und Adstringenz des Materials durch Oxidation und Polymerisation der Polyphenole herabgesetzt werden. Da örtlich unterschiedliche Fermentationspraktiken angewendet werden und der Prozess meist als ungesteuerte Spontanfermentation durchgeführt wird, sind Qualitätsschwankungen wie beispielsweise erhöhte Gehalte an Essigsäure, ein heterogener Fermentationsgrad der Bohnen oder Aromafehler keine Seltenheit.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine kontrollierbare alternative Nacherntebehandlung von unfermentierten und getrockneten Kakaobohnen entwickelt und der Einfluss auf die Aromabildung und Transformation nicht-flüchtiger Inhaltsstoffe untersucht. Unfermentierte getrocknete Bohnen sind lagerfähig und die bohneneigenen Enzyme weisen Restaktivität auf. Durch die Rehydrierung von unfermentierten Kakao Kotyledonen mit schwach saurer Lösung wurde der pH-Wert auf den Wirkungsbereich der bohneneigenen Enzyme (5,0 – 5,5) angepasst, bei 45 °C über 72 h unter aeroben oder anaeroben Bedingungen inkubiert und bei 40 °C getrocknet. Mit Methoden des Sensomics Ansatzes wurde der Einfluss dieser „Feucht-Inkubation“ auf die Bildung von Aromastoffen und Aromavorstufen und die Transformation qualitätsbestimmender nicht-flüchtiger Inhaltsstoffe vor und nach der Behandlung untersucht. Zudem wurde das Aroma nach weiterer Verarbeitung zu einem genussfähigen Produkt in Form von Modellschokolade mit ausgewählten Methoden des Sensomics Ansatzes charakterisiert.

Mit der Feucht-Inkubation konnten Zwischen- und Endprodukte produziert werden, die kakaotypische malzige und fruchtige Aromanoten, sowie geringe Adstringenz und Bitterkeit aufwiesen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Bildung der malzigen Strecker-Aldehyde 2- und 3-Methylbutanal und verschiedener fruchtiger Ester, während der Feucht-Inkubation in höheren Mengen im Vergleich zur Fermentation induziert wurde, während flüchtige Säuren wie

## Kurzfassung

---

Essigsäure (stechend) und 2- und 3-Methylbuttersäure (schweissig) und Pyrazine (erdig, röstartig) in deutlich geringerem Umfang gebildet wurden. Aromavorstufen wie D-Glucose, D-Fructose und freie Aminosäuren wurden in vergleichbaren oder höheren Mengen im Vergleich zur Fermentation freigesetzt. Durch die Anpassung der Sauerstoffverfügbarkeit konnte die Oxidation und Polymerisation der Polyphenole gesteuert werden. Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass eine zeit- und ortsunabhängige Nacherntebehandlung mit unfermentierten und getrockneten Kakaobohnen möglich ist, aus denen Produkte mit typischen qualitätsbestimmenden Merkmalen hergestellt werden können. Im Gegensatz zur mikrobiellen Fermentation ist die Behandlung kontrollierbar und reproduzierbar und bietet die Möglichkeit gezielt qualitätsbestimmende Merkmale wie den Gehalt an flüchtigen Säuren und die Bitterkeit und Adstringenz des Rohmaterials zu beeinflussen.

## 2 Abstract

During the traditional post-harvest treatment of cocoa beans, the sugar-containing fruit pulp surrounding the beans is microbiologically degraded by spontaneous fermentation. Due to the microbial formation of ethanol and acetic acid outside the beans, the fermentation mass heats up to about 50 °C and acetic acid diffuses into the cocoa beans. The heating and acidification of the seed inactivates the seedling and destroys the cell structure. This allows contact of bean-derived enzymes and other ingredients such as proteins, sugars and polyphenols in the cotyledon matrix, releasing important flavor precursors and reducing the bitterness and astringency of the material through oxidation and polymerization of polyphenols. Since locally different fermentation practices are used and the process is mostly carried out as an uncontrolled spontaneous fermentation, quality variations such as increased acetic acid contents, a heterogeneous fermentation degree of the beans or aroma defects are not uncommon.

In the present work, a controllable alternative postharvest treatment of unfermented and dried cocoa beans was developed and the influence on flavor formation and transformation of non-volatile ingredients was investigated. Unfermented dried beans are storable and the beans' own enzymes exhibit residual activity. By rehydrating unfermented cocoa cotyledons with weakly acidic solution, the pH was adjusted to the active range of the beans' own enzymes (5.0 – 5.5), incubated at 45 °C for 72 h under aerobic or anaerobic conditions, and dried at 40 °C. Sensomics approach methods were used to investigate the influence of this "moist incubation" on the formation of aroma compounds and aroma precursors and the transformation of quality-determining non-volatile ingredients before and after treatment. In addition, the aroma was characterized after further processing into an edible product in the form of model chocolate using selected methods of the Sensomics approach.

By applying the moist-incubation technique intermediate and final products could be produced that exhibited cocoa-typical malty and fruity aroma notes, as well as low astringency and bitterness. It was demonstrated that the formation of the malty Strecker-aldehydes 2- and 3-methylbutanal and various fruity esters was induced in higher amounts during moist-incubation in comparison to fermentation, while volatile acids such as acetic acid (pungent) and 2- and 3-methylbutanoic acid (sweaty) and pyrazines (earthy, roasty) were formed in much lower amounts. Flavor precursors such as D-glucose, D-fructose, free amino acids were released in comparable or higher amounts compared to fermentation. Oxidation and polymerization of polyphenols could be controlled by adjusting oxygen availability. The results indicate that time-

## **Abstract**

---

and location independent postharvest treatment with unfermented and dried cocoa beans could be used to obtain products with typical quality-determining characteristics. In contrast to microbial fermentation, the treatment is controllable and reproducible and offers the possibility of specifically influencing quality-determining characteristics such as the contents of volatile acids and the bitterness and astringency of the raw material.

### 3 Einleitung

Die Fermentation und Trocknung der Samen der Kakaopflanze (*Theobroma cacao* L.) sind bedeutende Schritte für die Ausbildung der erwünschten Aroma- und Geschmackseigenschaften von Rohkakao, der als Grundlage für die Herstellung der beliebten Süßware Schokolade dient.<sup>1</sup> Bei der traditionellen Nacherntebehandlung wird die die Bohnen anhaftende Pulpe durch spontane mikrobielle Fermentation abgebaut.<sup>2,3</sup> Auf diese Weise werden Aromastoffe und Aromavorstufen gebildet sowie Polyphenole transformiert, wodurch die Adstringenz und Bitterkeit des Rohmaterials abnehmen.<sup>4</sup> Es ist gängige Praxis, dass der Prozess unter einfachen Bedingungen in Holzkisten oder auf Bananenblättern auf dem Boden durchgeführt wird. Im Gegensatz zu anderen Fermentationsprozessen wie der Bier- oder Weinherstellung wird der Prozess nicht gesteuert oder unter standardisierten Bedingungen durchgeführt<sup>2</sup>, wodurch die qualitätsbestimmenden Merkmale des resultierenden Rohkakaos großen Schwankungen unterliegen.<sup>5</sup> Die Schokoladenindustrie ist mit der Herausforderung konfrontiert, aus einem nicht standardisierten Rohmaterial Produkte mit konstanter Qualität herzustellen.<sup>6</sup> In der Praxis kann es zu Fehlfermentationen kommen, die zur übermäßigen Bildung von flüchtigen und nicht-flüchtigen Säuren führen oder mitunter auch „schinkige“, „rauchige“, „modrige“, „käsige“, „fäkale“ oder „pilzige“ Fehlparfums nach sich ziehen können.<sup>7-9</sup> Die Aromabildung in Kakaobohnen während der Fermentation und Trocknung ist aufgrund der parallel ablaufenden äußeren mikrobiellen Fermentation der Fruchtpulpe und der biochemisch und chemischen Aromavorstufen- und Aromabildungsreaktionen sehr komplex und nicht vollständig ergründet.<sup>10</sup> In verschiedenen Studien wird darauf hingewiesen, dass das Aroma entscheidend von Mikroorganismen beeinflusst wird<sup>11-14</sup> und es gibt Hinweise darauf, dass mikrobiell gebildete Aromastoffe von außen in die Bohnen eindiffundieren.<sup>15</sup> Um die Aroma- und Aromavorstufenbildung und die erwünschten Umwandlungsprozesse der Inhaltsstoffe innerhalb der Kakaobohne zu ermöglichen, sind aber vor allem die durch den mikrobiellen Abbau der Pulpe induzierten Veränderungen der chemisch-physikalischen Bedingungen im Fermentationsansatz von Bedeutung.<sup>1,4,16,17</sup> So ist die mikrobielle Bildung von Essigsäure und die damit verbundene Temperaturerhöhung auf bis zu 50 °C entscheidend für die Inaktivierung des Keimlings, wodurch die erwünschten enzymatischen Umsetzungen in der Bohne stattfinden können, was für die Bildung der Schlüsselaromastoffe und eine Abnahme der Bitterkeit und Adstringenz essentiell ist.<sup>1,18</sup> Andererseits sind hohe Gehalte an Essigsäure unvorteilhaft für die sensorischen Eigenschaften der Endprodukte und Teilprozesse in der Schokoladenherstellung zielen darauf ab, die Essigsäure zu reduzieren.<sup>17</sup> Verschiedene

## Einleitung

---

Forschungsarbeiten hatten zum Ziel die Fermentation beispielsweise durch gezielte Zugabe von Starterkulturen<sup>13,14,19</sup>, einer vorgängigen Reduktion der Pulpe<sup>20-22</sup>, Optimierung der Mischzyklen<sup>20</sup> oder der Verwendung standardisierten Fermentern<sup>5,23</sup> reproduzierbarer zu gestalten und eine starke Säurebildung oder Fehleraromenbildung zu vermeiden. Zudem wurden „fermentationsähnliche“ Inkubationen von frischen Bohnen in gepufferten Medien durchgeführt, um die Vorgänge innerhalb der Bohnen in Abwesenheit von Mikroorganismen und den prozesstypisch schwankenden Bedingungen einer Fermentation zu untersuchen. Hiermit gelang es, wichtige Zusammenhänge bezüglich der Ansäuerung, den damit verbundenen strukturellen Veränderungen und Auswirkungen auf die Inhaltsstoffe zu beobachten.<sup>18,24-29</sup> Da dieser Prozess reproduzierbar und kontrollierbar ist, wurde die Anwendung als alternative Nacherntebehandlung in Betracht gezogen.<sup>30</sup>

Neue Ansätze für die Nacherntebehandlung von Kakao auf der Grundlage dieser Erkenntnisse könnten helfen, den Nachernteprozess reproduzierbarer und kontrollierbarer zu gestalten, um Fehlchargen und Qualitätsschwankungen der Rohmaterialien zu vermeiden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine Behandlung von unfermentierten und getrockneten Kakaobohnen entwickelt und untersucht werden, die gezielt die erwünschten Umwandlungsvorgänge der Inhaltsstoffe induziert. Anders als bei der fermentationsähnlichen Inkubation von frischen Bohnen in wässrigen Medien, sollten hier unfermentierte und getrocknete Bohnen, bzw. Kakaokotyledonen als Ausgangsmaterial dienen, da diese lager- und transportfähig sind, was eine orts- und zeitunabhängige Nacherntebehandlung ermöglicht.



# 4 Theoretischer Hintergrund

Im folgenden Abschnitt werden die theoretischen Grundlagen wiedergegeben, die zum Verständnis der Arbeitshypothesen und der Interpretation der Ergebnisse beitragen.

## 4.1 Geschichte der Kakaoverarbeitung

Bereits 1900 v.Chr. wurde Kakao als Grundlage für ein Getränk in Teilen von Mexico und Guatemala verwendet.<sup>31</sup> Die Azteken kultivierten die Bohnen in den folgenden Jahrhunderten und verwendeten Kakao neben der Zubereitung des Kakaogetränkes auch als Zahlungsmittel.<sup>32</sup> In Europa hielt die Kakaobohne Einzug, nachdem sie vom spanischen Eroberer und Entdecker Cortez im Jahre 1528 erstmals eingeführt wurde. Das Kakaogetränk fand zunächst wenig Anklang in Europa, was sich änderte als es mit Zucker gesüßt und Gewürzen verfeinert wurde.<sup>32</sup> 1828 wurde in Holland von van Houten erstmals eine Kakaopresse verwendet, um einen Teil des Fettes zu entfernen. Die Herstellung von Getränken wurde durch die Verwendung von Kakaopulver erleichtert und mit der zur Verfügung stehenden Kakaobutter folgte um 1847 die erste essbare Schokolade in Bristol (UK) auf dem Markt.<sup>32,33</sup> Mit der Erfindung der Milkschokolade von Daniel Peter in Vevey (CH) im Jahre 1875 stieg der Bedarf an Kakao stetig an und weltweit wurden im Jahr 2021/22 mehr als 5 Millionen Tonnen Rohkakao verarbeitet.<sup>33,34</sup>

## 4.2 Herkunft und Einteilung

Die Kakaopflanze wird überwiegend in tropischen Gebieten 20° nördlich und südlich des Äquators kultiviert und die heutigen Hauptanbaugebiete befinden sich in West-Afrika, Südamerika und Südostasien.<sup>16,35</sup> Es wird grundsätzlich zwischen den Varietäten Forastero, Criollo und Trinitario unterschieden.<sup>36</sup> Forastero stammt ursprünglich aus dem Amazonasgebiet und gilt als vergleichsweise robust gegen Pilz- und Viruskrankheiten, wodurch hohe Erträge erzielt werden können. Er wird heutzutage vor allem in Afrika und Südostasien angebaut und macht weltweit den größten Anteil (ca. 95 %) Kakao aus<sup>16,35,37,38</sup>, weswegen auch vom „bulk cocoa“ oder „Konsumkakao“ gesprochen wird. Pflanzen der Criollo Varietät liefern im Gegensatz niedrigere Erträge und sind anfälliger für Krankheiten, weshalb sie nur noch selten kultiviert werden.<sup>39</sup> Criollobohnen enthalten kaum Anthocyane, weshalb die frischen Kotyledonen weißlich bis rosa gefärbt sind, während das Innere der Bohnen anderer Varietäten hingegen im frischen Zustand violett erscheint.<sup>35,39,40</sup> Aufgrund des feineren und

## Theoretischer Hintergrund

komplexeren Aromas wird Criollo Kakao als „fine-flavor cocoa“ oder „Edelkakao“ gehandelt.<sup>35,38</sup> Trinitario entstammt einer Kreuzung zwischen Criollo und Forastero<sup>36</sup>, wobei die positiven Eigenschaften beider Varietäten vereint werden. Die Pflanzen sind weniger anfällig für Krankheiten, ihre Bohnen gelten aber aufgrund ihrer Aromaeigenschaften als Edelkakao.<sup>16,37,39</sup>

### 4.3 Aufbau und Inhaltsstoffe von Kakaofrüchten und Kakaosamen

Reife Kakaofrüchte werden im Durchschnitt ca. 10 – 30 cm lang, 5 – 12 cm breit und enthalten je nach Größe ca. 30 – 40 Samen.<sup>36,39</sup> Die morphologischen Eigenschaften der Schoten sind sortenabhängig und können von rund bis oval, mit und ohne Furchen, von glatt bis gewarzt variieren. Auch die Farbe ist je nach Reifegrad und Sorte unterschiedlich und reicht von grün, gelb, orange bis tiefrot (Abbildung 1).<sup>32,39</sup> Innerhalb der Schote sind die in der Fruchtpulpe eingebetteten Samen (Abbildung 2) in fünf Reihen entlang der innenliegenden Placenta angeordnet.<sup>39</sup>



Abbildung 1: Unterschiedliche Größen, Farben und Formen reifer Kakaoschoten (Bildquelle: Schlüter, A. 2020)



**Abbildung 2: Kakaoschoten im jungen und ausgewachsenen Stadium in Costa Rica (A) und aufgebrochene Kakaoschote mit den von Fruchtpulpe umgebenden Bohnen (B). (Bildquellen: Schlüter, A. 2020)**

Die Fruchtpulpe dient während der Fermentation als Substrat für die Mikroorganismen und enthält neben Wasser (82 – 87 %), Saccharose, D-Glucose und D-Fructose (10 – 13 %), Pentosane und Pektin (1 – 4 %), Citronensäure (1 – 3 %) und geringe Gehalte an Fett und Proteinen, Peptiden und Aminosäuren.<sup>16,41,42</sup> Sie ist fest mit der Testa (Samenschale) verwachsen, die die Speicherkeimblätter (Kotyledonen) und den Keimling umhüllt.<sup>39</sup> Die fleischigen Kotyledonen sind mehrfach in sich gefaltet und dienen vor allem der Einlagerung von Speicherstoffen, die während der Keimung als Nährstoff- und Energiereserven fungieren.<sup>43</sup> Frische unfermentierte Kotyledonen enthalten ca. 32 – 39 % Wasser, 30 – 32 % Fett, 8 – 10 % Proteine, 5 – 6 % Polyphenole, 2 – 3 % Cellulose, 4 – 6 % Stärke, 4 – 6 % Pentosane, 2 – 3 % Saccharose, 2 – 3 % Theobromin, 1 % Koffein, 1 % Säuren.<sup>4,5</sup> Nach der Fermentation und Trocknung dienen die Kotyledonen als Bruchstücke (Kakaonibs) für die Herstellung von Kakaomasse, nachdem die Testa und der Keimling entfernt wurden.

### **4.3.1 Zellaufbau im frischen Kakaosamen**

Im vitalen Kakaosamen lassen sich hauptsächlich zwei unterschiedliche Zelltypen differenzieren, in denen die Inhaltsstoffe zu verschiedenen Teilen lokalisiert sind. Das

## Theoretischer Hintergrund

Parenchym Gewebe besteht zu ca. 80 % aus Speicherzellen, die wiederum ca. 59 % Lipide in Form von 2 – 3 µm großen feinverteilten globulären Fettvakuolen, 21 % Proteinvakuolen, 8 % Stärke und 12 % Cytoplasma enthalten.<sup>44</sup> Der zweite Hauptzelltyp sind Idioblasten, die ca. 20 % der Zellen ausmachen. Sie enthalten hauptsächlich Polyphenole in Form einer großen Vakuole, aber auch Alkaloide und geringe Anteile Fettvakuolen sind enthalten.<sup>1,43</sup> Die Speicherzellen sind durchschnittlich ca. 20 – 25 µm im Durchmesser.<sup>43</sup> Abbildung 3 zeigt die Aufnahme eines histologischen Schnittpräparates eines frischen und reifen Kakaosamens aus der Dissertation von Elwers (2008).<sup>43</sup> Die unterschiedlichen Zelltypen sowie die Trennung der einzelnen Inhaltsstoffe sind deutlich zu erkennen. Die Polyphenolspeicherzellen erscheinen dunkelgrün. In den Protein- und Fettspeicherzellen sind die Lipide als ungefärbte globuläre Strukturen und die Speicherproteine als violette Einschlüsse erkennbar. Das Cytoplasma stellt die kontinuierliche Phase dar, in der die Lipidvakuolen dispergiert sind.<sup>28,43</sup>

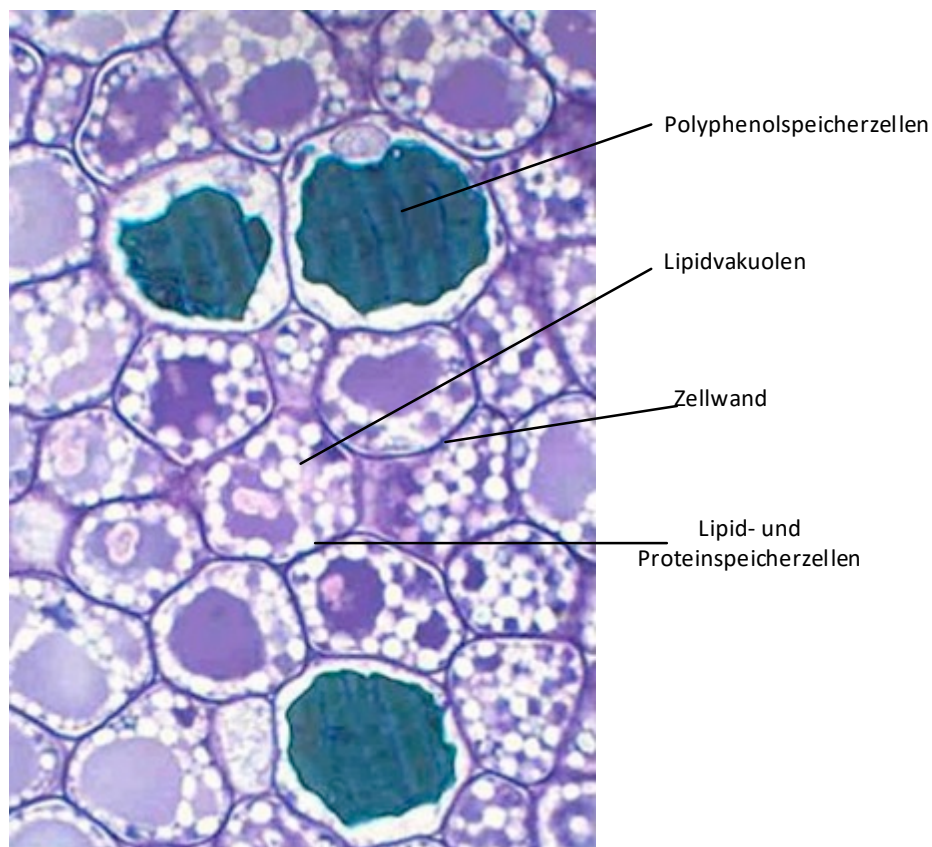


Abbildung 3: Histologisches Schnittpräparat angefärbt mit Toluidinblau adaptiert nach Elwers (2008)<sup>43</sup>

### 4.3.2 Proteine und freie Aminosäuren

Der Proteingehalt in der Trockensubstanz liegt bei ca. 10 – 16 % in unfermentierten Samen.<sup>1</sup> Die zwei Hauptfraktionen sind ein 21 kDa Albumin und ein 7S-Globulin, die jeweils ca. 52 %

## Theoretischer Hintergrund

---

und 43 % des Gesamtproteins ausmachen. Das Globulin setzt sich aus drei Peptiden mit Molekulargewichten von 47 kDa, 31 kDa und 14,5 kDa zusammen.<sup>1,41,45,46</sup> Sie sind vor allem in den Speicherzellen lokalisiert. Von besonderer Bedeutung ist die Globulin Fraktion, die als Quelle für spezifische Aromavorstufen wie hydrophobe Aminosäuren und hydrophile Peptide identifiziert wurde (vergl. 0).<sup>27</sup> Freie Aminosäuren sind im frischen Samen in Quantitäten von ca. 5,0 – 8,0 mg/g ffTS enthalten.<sup>1,47,48</sup>

### 4.3.3 Kohlenhydrate

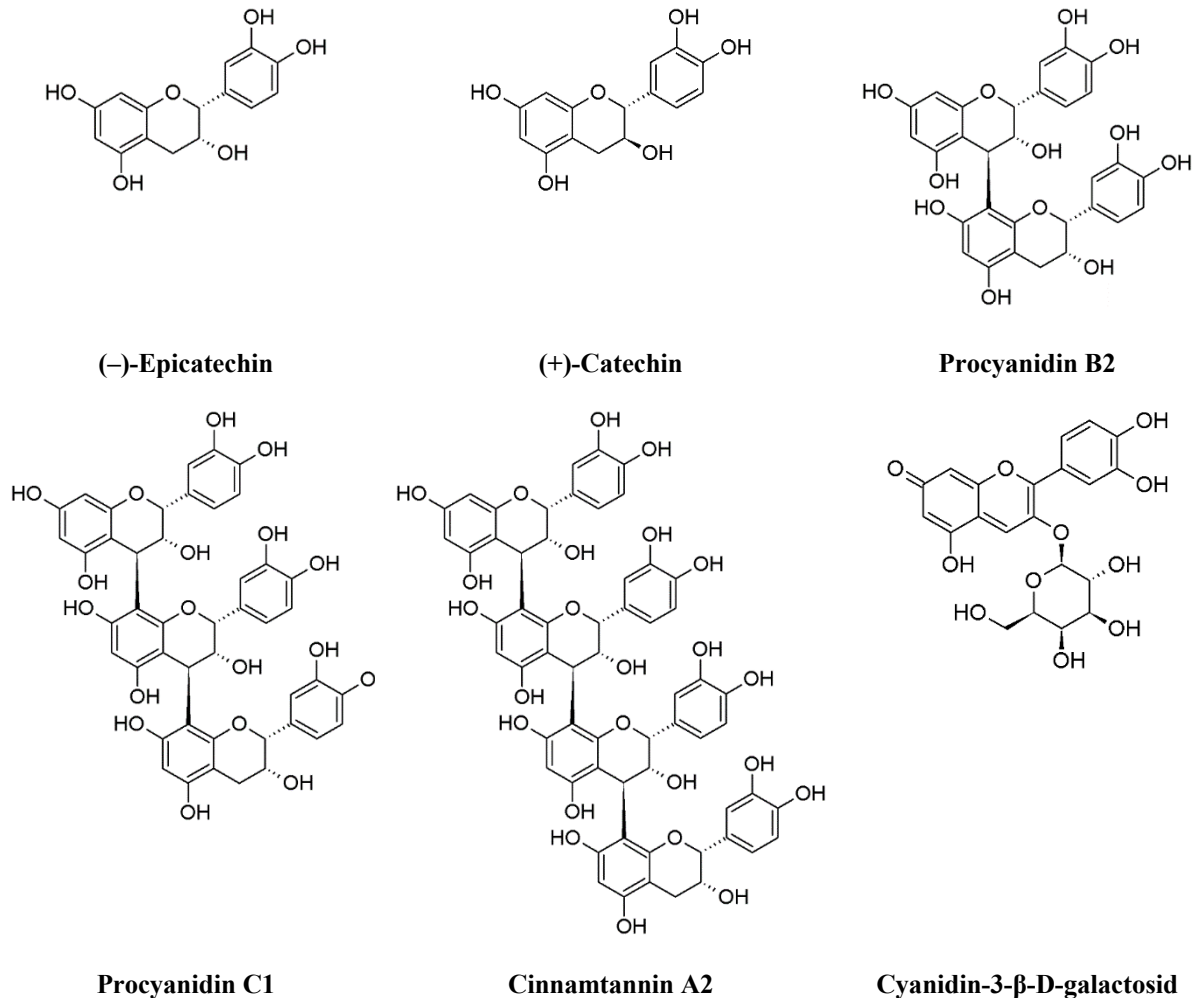
Neben den in Kakaosamen enthaltenen Polysacchariden wie beispielsweise Stärke, Pektin, Zellulose und Pentosane (ca. 12 %)<sup>1,49</sup> sind freie Zucker vor allem in Form von Saccharose mit Gehalten zwischen 30 – 50 mg/g ffTS im Kakaosamen enthalten.<sup>47</sup> Des Weiteren wurden die monomeren Zucker D-Fructose und D-Glucose und D-Galactose mit Gehalten bis ca. 5,0 mg/g ffTS gemessen.<sup>47</sup> In Spuren kommen weitere Zucker wie Raffinose, D-Sorbose, und Zuckeralkohole vor.<sup>49,50</sup> L-Arabinose und D-Galactose sind die hauptsächlich vorkommenden glycosidisch gebundenen Zuckeranteile (Glykone) der enthaltenen farbaktiven Anthocyane.<sup>51</sup>

### 4.3.4 Polyphenole

Die phenolischen Bestandteile sind vor allem in den Pigmentzellen oder Polyphenolspeicherzellen lokalisiert.<sup>43,52</sup> In frischen unfermentierten Samen sind ca. 5 – 6 % Polyphenole enthalten, welche sich zu ca. 37 % aus monomeren Flavan-3-olen, ca. 58 % aus Proanthocyanidinen und ca. 4 % Anthocyanen zusammensetzen.<sup>51</sup> Mengenmäßig dominierend ist das Monomer (–)-Epicatechin, welches im unfermentierten Samen mit ca. 35 – 44 mg/g ffTS etwa 35 % der gesamten enthaltenen Polyphenole ausmacht.<sup>53</sup> Als weitere Monomere wurden (+)-Catechin und in Spuren auch (+)-Gallocatechin und (–)-Epigallocatechin nachgewiesen.<sup>51</sup> Der größte Anteil der Proanthocyanidine im unfermentierten Samen besteht aus niederpolymerisierten (–)-Epicatechin Einheiten, wie beispielsweise Procyanidin B2 (Dimer), Procyanidin C1 (Trimer) und Cinnamtannin A2 (Tetramer).<sup>43,51,54</sup> In geringeren Mengen wurden auch Oligomere aus (–)-Epicatechin und (+)-Catechin Einheiten wie Procyanidin B1, Procyanidin B3, Procyanidin B4 nachgewiesen. Die monomeren Flavan-3-ole und niederpolymerisierten Proanthocyanidine bis zu drei Einheiten sind löslich und tragen zur Adstringenz und Bitterkeit von Kakao bei.<sup>17,43,55,56</sup> Die Adstringenz wird auf die Eigenschaft zurückgeführt mit Speichelprotein zu reagieren, wodurch sich ein trocknendes und raues Mundgefühl einstellt.<sup>57</sup>

## Theoretischer Hintergrund

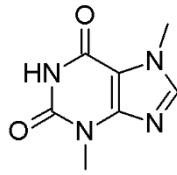
Anthocyane liegen vor allem als Cyanidin-3- $\beta$ -D-galactosid und Cyanidin-3- $\alpha$ -L-arabinosid vor und verleihen frischen Kakaokotyledonen die violette Farbe.<sup>43,51</sup> Die Strukturformeln der wichtigsten Polyphenole sind in Abbildung 4 dargestellt.



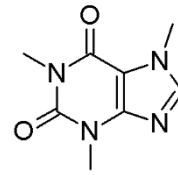
**Abbildung 4:** Strukturformeln der im Kakao hauptsächlich vorkommenden monomeren Polyphenole (-)-Epicatechin, (+)-Catechin, der oligomeren Procyanidine Procyanidin B2, Procyanidin C1, Cinnamtannin A2, und dem Anthocyan Cyanidin-3- $\beta$ -D-galactosid

### 4.3.5 Methylxanthine

Theobromin (3,7-Dimethylxanthin) und Koffein (1,3,7-Trimethylxanthin) sind die hauptsächlich vorkommenden Methylxanthine in Kakaobohnen.<sup>52</sup> Sie sind vor allem in den Polyphenolspeicherzellen lokalisiert<sup>58</sup> und tragen zur charakteristischen Bitterkeit von Kakao bei.<sup>52,59</sup> Der Gehalt von Theobromin liegt bei ca. 10 – 50 mg/g ffTS und Coffein ca. 1,0 – 6,0 mg/g ffTS in unfermentierten Kakaosamen.<sup>49,58</sup> Die Strukturformeln dieser Methylxanthine sind in Abbildung 5 dargestellt.



Theobromin (3,7-Dimethylxanthin)



Coffein (1,3,7-Trimethylxanthin)

Abbildung 5: Strukturformeln der Methylxanthine Theobromin und Coffein

### 4.4 Kakaofermentation

Unfermentierte Bohnen sind stark adstringent und bitter und weisen nach der Trocknung und der Röstung kein typisches Aroma auf. Daher gelten sie als ungeeignet für die Herstellung von sensorisch ansprechenden Endprodukten.<sup>1,4,19,35</sup> Die Fermentation gilt als essenzieller Schritt zur Herstellung von qualitativ hochwertigem Rohkakao, welcher durch weitere Verarbeitungsschritte wie Rösten, Zerkleinern und Conchieren zu Schokolade mit den typischen sensorischen Eigenschaften verarbeitet werden kann.<sup>4</sup>

Zu den Hauptzielen der Fermentation, gehören die Entfernung der Kakaopulpe, die Inaktivierung des Keimlings durch Ansäuerung und Wärmeentwicklung, die Haltbarmachung durch Trocknung, die Entwicklung von Aroma und Aromavorstufen, sowie die Oxidation und Polymerisation der Polyphenole.<sup>4,16</sup> Diese Ziele werden im Rahmen einer traditionellen Fermentation durch die spontane mikrobielle Fermentation der Fruchtpulpe erreicht, wodurch Umwandlungsvorgänge innerhalb der Bohne ausgelöst werden. In der Literatur wird in diesem Zusammenhang auch zwischen der äußeren mikrobiellen Fermentation und der inneren enzymatischen Fermentation differenziert.<sup>60</sup>

#### 4.4.1 Mikrobielle Fermentation der Fruchtpulpe

Nach der Ernte der reifen Kakaoschoten werden diese geöffnet und die Bohnen mit der anhaftenden Pulpe manuell entfernt. Das Bohnen-Pulpe Gemisch wird anschließend aufgehäuft oder in Fermentationskisten überführt und meistens mit Bananenblättern und Jutesäcken abgedeckt, um die Masse vor äußeren Einflüssen wie beispielsweise Tieren, Insekten und der Witterung zu schützen und Temperaturverluste zu minimieren (Abbildung 6).<sup>60</sup> Durch das unsterile Öffnen der Früchte und die Wiederverwendung von Fermentationskisten und Behältern wird die Masse mit der örtlichen wilden Mikroflora inokuliert, wodurch die spontane Fermentation initiiert wird.<sup>2,60</sup>

## Theoretischer Hintergrund



**Abbildung 6: Bohnen-Pulpe Gemisch in einer Fermentationskiste (A) und anschließende Abdeckung mit Bananenblättern (B). (Bildquelle: Schlüter A. 2020)**

Zu Beginn der Fermentation ist das Bohnen-Pulpe Gemisch bedingt durch die hochviskose Pulpe und den hohen Feuchtigkeitsgehalt luftundurchlässig und es herrschen überwiegend anaerobe Bedingungen außer in den Randzonen der Masse.<sup>60</sup> Zusammen mit dem niedrigen pH-Wert der Pulpe von 3,0 – 4,0 wird vor allem das Wachstum von Hefen begünstigt, die während der ersten 24 – 36 h dominieren.<sup>3,4</sup> Die Hefen metabolisieren den in der Pulpe enthaltenen Zucker und es wird Ethanol und CO<sub>2</sub> gebildet.<sup>3</sup> Neben dem mechanischen Druck der Masse, der dafür sorgt, dass ein Teil der Pulpe abfließt, verflüssigt sich die Pulpe zusätzlich durch pectinolytische Aktivität spezifischer Hefestämme wie z.B. *Kluyveromyces marxianus*.<sup>61</sup> Das semi-aerobe Milieu und die Verfügbarkeit von Citronensäure und Zuckern in der Pulpe als Substrat fördern das Wachstum von Milchsäurebakterien, v.a. *Lactobacillus fermentum*, *Lb. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* und *Lactococcus* (*Streptococcus*) *lactis* die ihre maximale Population zwischen 24 – 48 h erreichen.<sup>3</sup> Neben Milchsäure können bestimmte Spezies auch Essigsäure, Ethanol und CO<sub>2</sub> bilden.<sup>3</sup> Mit dem Abfließen der Pulpe und der ersten Durchmischung und Umschichtung des Haufens, meist nach ca. 24 – 48 h, steht zunehmend Sauerstoff zur Verfügung. Zusammen mit dem steigenden pH-Wert außerhalb der Bohnen durch den Abbau von Citronensäure und der Verfügbarkeit von Ethanol als Substrat wird das Wachstum von Essigsäurebakterien gefördert.<sup>3,4</sup> Durch die exotherme Oxidation von Ethanol zu Essigsäure durch die Essigsäurebakterien erwärmt sich die Fermentationsmasse auf ca.



## Theoretischer Hintergrund

45 – 50 °C.<sup>2,62</sup> Durch den Temperaturanstieg und die Diffusion von Essigsäure, Milchsäure und Ethanol in die Bohne, wird der Keimling inaktiviert, was für die erwünschten Transformationsvorgänge innerhalb der Bohne bedeutend ist.<sup>63</sup> Die Umschichtung und Homogenisierung des Fermentationsansatzes wird alle 1 – 3 Tage wiederholt bevor die Fermentation nach ca. 5 – 8 Tagen durch Trocknung der Bohnen verlangsamt, bzw. gestoppt wird (Abbildung 7 und Abbildung 8).<sup>5</sup>



**Abbildung 7: Kakaobohnen vor der ersten Umschichtung und Homogenisierung (A) und vor der letzten Umschichtung (B). (Bildquelle: Schlüter A. 2020)**

Der genaue Zeitpunkt wird durch die Begutachtung der äußeren und inneren Bohnenfärbung und Struktur (Schnittbild) sowie des Geruchs einer Bohnenstichprobe bestimmt und beruht in der Regel auf der Erfahrung und Gewohnheiten der Farmarbeiter.<sup>4,5,62</sup> Für die Trocknung werden die Bohnen auf Trockentischen, Kästen oder auch auf dem Boden ausgebreitet und mehrmals täglich gemischt, um eine homogene Trocknung zu gewährleisten und ein Zusammenkleben der Bohnen zu vermeiden (Abbildung 8). Bei einem Restfeuchtegehalt von 6 – 8 % sind die Bohnen lager- und transportfähig.<sup>4</sup>

## Theoretischer Hintergrund



Abbildung 8: Bohnen am Ende der Fermentation mit anhaftenden Resten der abgebauten Fruchtpulpe (A). Vorbereitung zur Homogenisierung und Trocknung auf Trockentischen (B). Vollständig getrocknete Bohnen (C). (Bildquellen: Schlüter, A. 2020)

### 4.4.2 Interne oder enzymatische Fermentation

#### *Strukturelle Veränderungen*

Durch die Erwärmung der Masse auf ca. 45 – 50 °C und die Diffusion von Ethanol und Essigsäure in das Bohneninnere wird der Keimling ca. 24 – 48 h nach Fermentationsbeginn inaktiviert und die Zellmembrane verlieren die ihre Struktur.<sup>60,62,63</sup> Die violetten Anthocyane diffundieren aus den Polyphenolzellen und verteilen sich im Cytoplasma. Durch die Absenkung des pH-Wertes durch das Eindiffundieren von Essigsäure gehen die Anthocyane in die farblose Form einer Pseudobase über, was eine Farbveränderung bewirkt.<sup>62</sup> Dies wurde als erstes von Knapp (1924) mit der Inaktivierung des Keimlings in Verbindung gebracht.<sup>64</sup> Zudem wird von einer Wasseraufnahme der Kakaosamen von ca. 3 – 5 % während der ersten 3 Tage berichtet.<sup>60</sup> Neben den Polyphenolen lösen sich weitere hydrophile Bestandteile wie die Speicherproteine, Zucker und auch zellwand- und membrangebundene Enzyme<sup>65</sup> in der wässrigen Phase, wodurch sie miteinander reagieren können.<sup>28,60,62</sup>

Parallel dazu verändert sich ebenfalls die Struktur der Lipidphase. Biehl (1973) führte fermentationsähnliche Inkubationen mit frischen Kakaobohnen durch, die den Bedingungen während der Fermentation nachempfunden sind, um eine bessere Kontrolle und Reproduzierbarkeit der Behandlung zu erreichen.<sup>28</sup> Dabei wurden frische Bohnen in einem Gefäß mit einem Acetatpuffer (pH 4,0) vermischt mit Filterpapierstückchen versetzt und über ca. 30 h zunächst anaerob und dann aerob inkubiert. Histologische Untersuchungen der Zellstruktur zeigten, dass die Lipidphase ihre globuläre Struktur verlor und zusammenfloß. Der Autor führte dies einerseits auf Lyse der Zellen nach dem Absterben des Keimlings und andererseits auf das Eindringen von Essigsäure durch die Zellmembrane zurück. Seiner Interpretation nach, kommt es zu einer Phasenumkehr während der Nacherntebehandlung innerhalb der Kotyledonmatrix. Während das Cytoplasma im frischen unfermentierten Samen die kontinuierliche Phase bildet, in der die globulären Lipidvakuolen dispergiert sind, bildet die fusionierte Fettphase nach vollständiger Fermentation die kontinuierliche Phase mit homogen vermischten hydrophilen Bestandteilen in wässrigen Einschlüssen. Nach der Trocknung sind die homogenisierten Aromavorstufen in Inklusionen im Fett eingeschlossen und können während der folgenden thermischen Behandlung miteinander reagieren und Aromastoffe hervorbringen.<sup>28</sup> Die beschriebene Phasenumkehr und Fusion der Lipidphase konnte in der Studie von Biehl (1973) auch während der direkten Trocknung von frischen Bohnen ohne Inkubation beobachtet werden. Der Autor führte dies auf eine Kontraktion der Zellen während

## Theoretischer Hintergrund

---

der Trocknung und die damit einhergehende Zerstörung der Lipidvakuolen und Zellmembrane zurück.<sup>28</sup> Kakaosamen weisen recalcitrante Eigenschaften auf, sind also empfindlich gegenüber Trocknung und Kälte. Die zellulären und subzellulären Strukturen werden zerstört oder beschädigt, wodurch die Keimfähigkeit eingeschränkt wird.<sup>66</sup> Da während der direkten Trocknung keine Essigsäure- und Wasseraufnahme stattfindet, wie dies bei der Fermentation der Fall ist, findet keine Verteilung und Homogenisierung der hydrophilen Bestandteile in der Kotyledonmatrix statt, wodurch keine Reaktion zwischen Enzym und Substrat möglich ist. Nach der Auffassung von Biehl (1973) bleiben die hydrophilen Inhaltsstoffe in der Matrix durch die kontinuierliche Lipidphase nach der Trocknung voneinander getrennt. Der Autor schlussfolgerte, dass der Kontakt nur durch einen weiteren wässrigen Prozessschritt ermöglicht werden könne, was bei der üblichen Kakaoverarbeitung nicht der Fall ist.<sup>28</sup>

### *Transformation der Inhaltsstoffe*

Im Kakaosamen wurde eine Vielzahl von Enzymen identifiziert. Im Hinblick auf die erwünschten Umwandlungsprozesse der Inhaltsstoffe während der Fermentation, spielen vor allem proteolytische Enzyme, Invertase und die Polyphenoloxidase eine bedeutende Rolle, da sie die Freisetzung spezifischer Aromavorstufen und die Polymerisation und Oxidation der Polyphenole ermöglichen.<sup>17,65</sup>

Durch die Diffusion von Milch- und Essigsäure sinkt der pH-Wert von ca. 6,3 – 6,8 in frischen unfermentierten Kotyledonen<sup>4</sup> in einen Bereich von ca. 4,0 – 5,5.<sup>18</sup> Die an der Bildung von Aroma Präkursoren beteiligten proteolytischen Enzyme weisen unterschiedliche Aktivitätsoptima auf, sodass der pH-Wert von entscheidender Bedeutung ist. Mohr (1976) zeigte mithilfe von Röstversuchen von isolierten Peptid- und Aminosäurefraktionen auf, dass neben den Aminosäuren auch spezifische Peptide für die kakaotypische Aromabildung unerlässlich sind.<sup>67</sup> Später konnten Voigt et al. (1994) mithilfe von fermentationsähnlichen Inkubationen frischer Bohnen und Inkubationen von isolierten Proteinfractionen nachweisen, dass der Abbau der 7S-Globuline durch das Zusammenwirken einer Aspartylendoprotease und Carboxypeptidase für die Bildung dieser Vorstufen verantwortlich ist. Die Aspartylendoprotease hydrolysiert das Protein als Endoprotease an Stellen mit hydrophoben Aminosäuren, die anschließend durch die Aktivität der Carboxypeptidase abgespalten werden. Es resultieren überwiegend hydrophile Peptide und freie hydrophobe Aminosäuren wie beispielsweise Leucin, Isoleucin und Phenylalanin (Abbildung 9), die als Aroma Präkursoren für verschiedene Schlüsselaromastoffe im Kakao bekannt sind (vergl. 0).<sup>1,27,68–70</sup> Die beteiligte Aspartylendoprotease weist ein Aktivitätsoptimum bei pH 3,0 auf, während das Optimum der

## Theoretischer Hintergrund

Carboxypeptidase bei pH 6,0 liegt.<sup>65</sup> Sinkt der pH-Wert innerhalb des Kotyledons während der Fermentation unter pH 5,0, werden vor allem hydrophobe Peptide durch die Aktivität der Aspartylendoprotease, aber nur geringe Mengen an hydrophoben Aminosäuren durch die geringe Aktivität der Carboxypeptidase freigesetzt. Zu starke Ansäuerung führt so zu einem verminderten Aromapotenzial.<sup>1,18</sup> Der optimale pH-Wert für das Zusammenwirken der Aspartylendoprotease und der Carboxypeptidase für die Aromavorstufenbildung liegt demnach bei pH 5,0 – 5,5, da in diesem Bereich beide Enzyme ausreichende Aktivität aufweisen.<sup>27,41,68,69</sup>

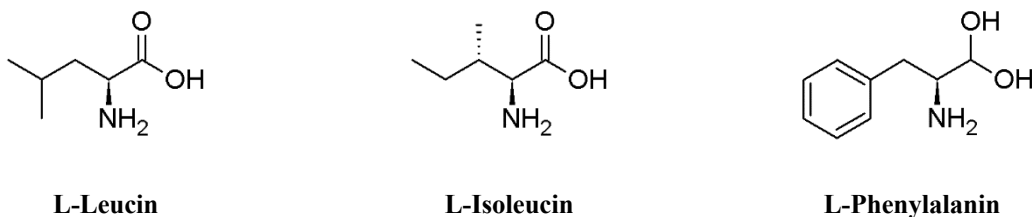


Abbildung 9: Strukturformeln der Aminosäuren L-Leucin, L-Isoleucin, L-Phenylalanin

Neben den Aminokomponenten dienen reduzierende Zucker als Aroma Präkursoren. Die in der frischen Bohne enthaltene Saccharose wird durch die bohneneigene Invertase hydrolysiert, wodurch die monomeren reduzierenden Zucker D-Glucose und D-Fructose freigesetzt werden.<sup>65</sup> Der resultierende Anteil an D-Glucose und D-Fructose in den vollständig fermentierten Bohnen entspricht bei Fermentationen nicht den theoretisch erreichbaren Ausbeuten, was auf Verluste durch Diffusionsvorgänge aus der Bohne in das umgebende Fermentationsmedium zurückgeführt wird.<sup>1,4</sup> Dies konnte auch bei fermentations-ähnlichen Inkubationen frischer Bohnen in gepufferten Medien beobachtet werden.<sup>47</sup> Die Strukturformeln der im Kakao hauptsächlich vorkommenden Zucker sind in Abbildung 10 dargestellt.

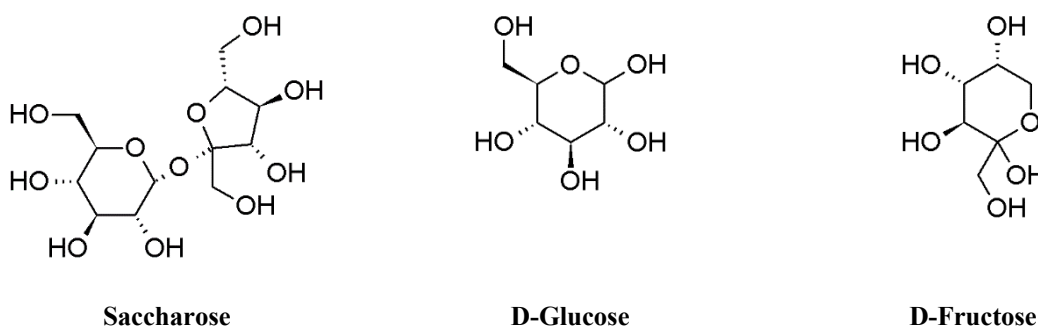


Abbildung 10: Strukturformeln von Saccharose, D-Glucose und D-Fructose

Die Veränderungen der Polyphenole während der Fermentation sind ebenfalls von großer Bedeutung für die sensorischen Eigenschaften des Endproduktes.<sup>71</sup> Die mengenmäßig

## Theoretischer Hintergrund

dominierenden monomeren Flavan-3-ole und oligomeren Proanthocyanidine wirken bitter und adstringierend.<sup>72</sup> Zudem wurde eine positive Korrelation zwischen dem Gehalt an Polyphenolen und Adstringenz, Bitterkeit und grünen Aromenoten, sowie eine negative Korrelation zwischen dem Gehalt an Polyphenolen und dem Aromapotentiale des Rohmaterials festgestellt.<sup>71-73</sup>

Die Anthocyane werden während der Fermentation in ihren Zuckeranteil, hauptsächlich L-Arabinose und D-Galactose, und die Anthocyanidine (Aglycone) durch die bohneigenen Glycosidasen hydrolysiert. Dies führt zu einem Ausbleichen der violetten Farbe in den Kotyledonen innerhalb von wenigen Tagen.<sup>51</sup> Die freigesetzten Anthocyanidine und die mengenmäßig dominierenden Flavan-3-ole und die niederpolymerisierten Proanthocyanidine oxidieren mit zunehmender Sauerstoffverfügbarkeit während der aeroben Phase der Fermentation und der Trocknung. Die Oxidation führt zur reaktiven Zwischenstufe der Chinone, welche mit Aminosäuren und Proteinen komplexieren können, wodurch hochpolymere Kondensate mit brauner Farbe entstehen und die Adstringenz und Bitterkeit abnimmt.<sup>1,65,71</sup> Die Chinonbildung ist in Abbildung 11 am Beispiel von (-)-Epicatechin dargestellt.

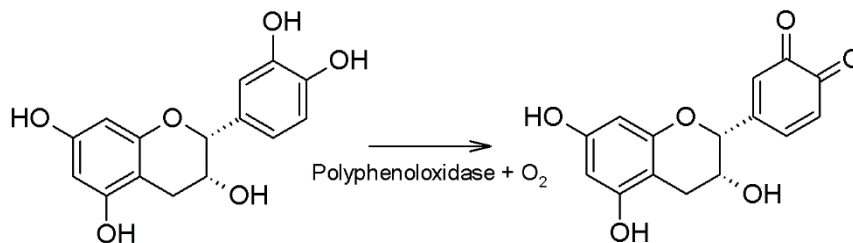


Abbildung 11: Chinonbildung am Beispiel von (-)-Epicatechin adaptiert nach Barišić et al. (2019)<sup>74</sup>

Diese Farbveränderung und die einsetzende Bräunung dient während der Fermentation als optische Kontrolle für den Fermentationsfortschritt und stellt auch die Grundlage für die photometrische Messung des Fermentationsindex und der Überprüfung des Fermentationsgrades durch den Schnitttest (Cut-Test) dar.<sup>75,76</sup> Da die Aktivität der Polyphenoloxidase während der Fermentation bereits nach 1 – 2 Tagen um mehr als 90 % abnimmt und während der Trocknung praktisch inaktiviert wird, wird vermutet, dass die geringe Restaktivität und vor allem die chemische Oxidation durch die hohe Sauerstoffverfügbarkeit für die erwünschten Bräunungsreaktionen in der späten Phase der Fermentation und während der Trocknung ausreichend sind.<sup>65</sup> Hansen et al. (1998) beobachteten während der ersten 1 – 3 Tagen der Fermentation eine Reduktion der Aktivität

der meisten Enzyme, außer einer Endoprotease und Glycosidase, welche auch nach vollständiger Fermentation und Trocknung Restaktivität aufwiesen.<sup>65</sup> Sie gingen davon aus, dass die Hemmung bzw. Inaktivierung durch den Temperaturanstieg, der Diffusion von Essigsäure und der Komplexbildung mit Polyphenolen verursacht wird. Während der Fermentation ist die tatsächliche Reaktionszeit der Enzyme mit den Substraten nach Ansicht der Autoren demnach sehr kurz. Unfermentierte und getrocknete Kakaobohnen wiesen in ihrer Studie die höchste Enzymaktivität auf.<sup>65</sup> Dies stimmt mit den Ergebnissen von Rohsius (2007) überein, die selbst nach 5-jähriger Lagerung hohe Enzymaktivität in unfermentierten getrockneten Kakaoproben messen konnte.<sup>39</sup>

Die Methylxanthine Theobromin und Coffein nehmen während der Fermentation um bis zu 30 % ab.<sup>16,77</sup> Dies wird vor allem auf Verluste durch Diffusion in die Testa und die umgebende Pulpe zurückgeführt.<sup>5,16</sup>

### **4.4.3 Einfluss der Fermentation auf qualitätsbestimmende Merkmale und die weitere Verarbeitung**

Die Nacherntebehandlung von Kakaobohnen ist eine der wenigen mikrobiologischen Fermentationen im Bereich der Lebensmittelherstellung, die als Spontanfermentation mit der örtlichen Mikroflora am Verarbeitungsort durchgeführt wird.<sup>2</sup> Von Farm zu Farm unterschiedliche Praktiken, nicht-kontrollierbare äußere Bedingungen, beispielsweise Temperaturschwankungen durch Witterung und Tages- und Nachtwechsel, führen zu Qualitätsschwankungen zwischen verschiedenen Chargen. Durch die eingesetzten einfachen Fermentationstechniken ist zudem auch ein heterogenes Fermentationsergebnis innerhalb der gleichen Charge kaum zu vermeiden.<sup>39</sup> Die Bohnen sind je nach Position im Fermentationsansatz, beispielsweise in den Randzonen oder Ecken von Fermentationskisten, schwankenden Expositionszeiten der umgebenden physikalisch-chemischen Bedingungen, bspw. der Säurekonzentration, Umgebungsfeuchtigkeit, Sauerstoffverfügbarkeit und Temperatur ausgesetzt.<sup>5</sup> Daraus resultieren unterschiedliche Fermentationsgrade, die sich in unterschiedlicher Färbung im Schnittbild der Bohnen zeigen, welches zur Qualitätsbeurteilung des Rohkakaos begutachtet wird. Es ist üblich, dass ein gewisser Prozentsatz nicht durchgehend braun (gut fermentiert), sondern auch violette (unterfermentiert) oder schiefbräunliche (unfermentiert) Färbung aufweist. In der Qualitätsbeurteilung wird dies ebenso wie Schimmel- oder Insektenbefall der Bohnen mit dem Schnitttest einer definierten Bohnenstichprobe ermittelt.<sup>35,39</sup> Rohsius (2007) untersuchte 120 Rohkakaoproben unterschiedlicher Provenienzen und stellte einen Schimmelbefall von bis zu 3 % der Bohnen bei 80 der 120 Proben fest.<sup>39</sup> Schimmel kann

## Theoretischer Hintergrund

---

erhöhte Gehalte von Mykotoxinen im Rohmaterial verursachen<sup>78</sup> und zur Bildung von „modrigen“ und „schimmeligen“ Fehlparomen führen.<sup>8</sup> Als potentielle Aromastoffe, die für diese Fehlparomen verantwortlich sein können, wurden in einer Studie von Porcelli et al. (2021) (-)-Geosmin (schimmelartig, nach Rote Beete), 4-Methoxy-2,5-dimethylfuran-3(2*H*)-one (karamellartig, modrig), 1*H*-Indol (fäkal, nach Mottenkugeln), and 3-Methyl-1*H*-indol (fäkal, nach Mottenkugeln) identifiziert.<sup>9</sup> Unter den 120 Rohkakaoproben in der Studie von Rohsius (2007) wiesen zudem die Hälfte aller Proben relativ hohe Anteile an schiefrigen und violetten Samen von mehr als 10 % der Bohnen auf. Die Autorin schlussfolgerte, dass die Heterogenität der qualitätsbestimmenden Merkmale von Rohkaka, vor allem auf unkontrollierte, zu früh abgebrochene oder nicht an das Material und die Bedingungen angepasste Fermentationen zurückzuführen ist.<sup>39</sup> Unter- oder unfermentierte Samen tragen durch die vergleichsweise hohen Restgehalte an niederpolymerisierten Polyphenolen zur Bitterkeit und Adstringenz bei. Hohe Anteile an unter- und unfermentierten Bohnen gehen zudem mit einem verminderten Aromapotentiale einher, da die Vorstufenbildung nur unzureichend stattgefunden hat.<sup>39</sup>

Darüber hinaus kann auch die übermäßige Bildung von Essigsäure während der Fermentation ein Problem darstellen. Hohe Gehalte wirken sich negativ auf die sensorischen Eigenschaften aus.<sup>1,2,41</sup> Daher wurden verschiedene Versuche unternommen die Essigsäurebildung während der Fermentation durch eine Vorbehandlung der Bohnen oder Schoten einzudämmen. Grundlage hierfür ist eine Reduktion der Pulpe, indem ein Teil durch Abpressen oder Ausbreiten der Bohnen vor dem Start der Fermentation entfernt wird. Hierdurch steht weniger Substrat für die Ethanol- und damit Essigsäurebildung zur Verfügung. Auch durch eine mehrtägige Lagerung der Schoten vor der Öffnung konnte eine geringere Säurebildung, während der anschließenden Fermentation beobachtet werden.<sup>2,21,22,32,37</sup> Dieser Effekt beruht vor allem auf der Reduktion des Pulpe Volumens und nicht auf der Reduktion des verfügbaren Zuckers. Durch das geringere Pulpe Volumen herrschen von Beginn der Fermentation semi-aerobe Bedingungen, was zu einer verminderten Ethanol Bildung und damit zu einer geringeren Essigsäurebildung führt.<sup>22,79</sup> Neben der Vermeidung einer übermäßigen Essigsäurebildung bei der Fermentation wird eine Reduktion von Essigsäure entlang der weiteren Verarbeitung von Kakaobohnen angestrebt. So wird die Säurereduktion als eines der Hauptziele der Röstung und des Conchierens genannt.<sup>1,17,80</sup> Zur Entsäuerung der Masse und die damit verbundene Möglichkeit die nötige Conchierzeit zu verkürzen, kommen auch Dünnschichtverdampfersysteme zum Einsatz. Hierbei wird die Kakaomasse in dünner Schicht erhitzt, wodurch die Säuregehalte um 20 – 40 % reduziert werden können und sich damit die nötige Conchierdauer um ca. 30 % verkürzen lässt.<sup>17</sup>



### 4.5 Weiterverarbeitung von Rohkakao und Schokoladenherstellung

Im Folgenden werden kurz die wichtigsten Schritte zur Herstellung von Schokolade zusammengefasst. Es gibt eine Vielzahl von verschiedenen Prozessanordnungen und Herangehensweisen zur Verarbeitung von Kakao und Herstellung von Schokolade, die sich je nach Hersteller, Region, Verwendungszweck, etc. voneinander unterscheiden. Die folgend beschriebenen Prozesse zeigen einen möglichen Weg zur Herstellung von dunkler- oder Milkschokolade auf.

Kakaobohnen weisen aufgrund der ungeschützten und offenen Fermentation und Trocknung einen hohen Verunreinigungsgrad an Fremdkörpern und eine sehr hohe mikrobielle Belastung ( $> 10^6$  kolonienbildende Einheiten pro Gramm; KBE/g) der Schalen auf.<sup>81</sup> Der fermentierte und getrocknete Kakao wird vor der Weiterverarbeitung zunächst über mehrere Stufen gereinigt, wodurch Fasern, Blätter, Steine, Sand, Metallteile, etc. entfernt werden.<sup>81</sup> Anschließend werden die Bohnen mit überhitztem Dampf oder durch gezielte Feuchtigkeitszugabe während der Röstung debakterisiert, um ggf. vorhandene pathogene Keime wie Salmonellen abzutöten.<sup>81,82</sup> Neben der Röstung ganzer Bohnen hat sich vor allem in der Kakaobutterindustrie auch die Nibs-röstung etabliert. In dem Fall werden die Bohnen oberflächlich kurz mit Infrarotstrahlen behandelt, wodurch sich die Schälbarkeit verbessert und rohe ungeröstete Nibs zur Weiterverarbeitung, beispielsweise zur Alkalisierung oder Röstung gewonnen werden können.<sup>81</sup> Um die Bohnen nach der Infrarotbehandlung oder nach der Ganzbohnenröstung von den Schalen zu befreien, werden sie grob in Nibs und Schalenteile zerbrochen und die leichteren Schalenteile anschließend mit einem Windsichter abgetrennt.<sup>81,82</sup> Die Röstung erfolgt in der Regel bei Temperaturen zwischen 110 – 140 °C.<sup>82</sup> Neben der Aromabildung gehört das Austreiben von Essigsäure und die Absenkung der Restfeuchtigkeit zu den Hauptzielen der Röstung.<sup>17</sup> Die Kakaonibs werden anschließend vermahlen, wodurch die Zellen aufgeschlossen und somit die Kakaobutter freigesetzt wird. Durch die Reibung während des Mahlprozesses erwärmt sich die Masse, sodass eine fließfähige Kakaomasse resultiert. Kakaomasse dient als Halbfabrikat für die Herstellung von Schokoladen und Süßwaren und als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Kakaobutter und Kakapulver. Hierfür wird das Fett aus der Kakaomasse mit hydraulischen Kolbenpressen abgepresst und anschließend teilweise raffiniert und deodorisiert. Der Presskuchen wird vermahlen und zu Kakaopulver verarbeitet.<sup>81</sup>

Für die Schokoladenherstellung werden zur Kakaomasse je nach Rezeptur weitere Zutaten wie Zucker und ggf. Milchpulver hinzugefügt und über Walzwerke auf eine Partikelgröße 15 – 22

um fein zerkleinert.<sup>83</sup> Durch die Feinvermahlung vergrößert sich die spezifische Oberfläche der Partikel. Das freie Fett wird durch die große spezifische Oberfläche immobilisiert und es bilden sich Agglomerate, sodass das Walzgut nach der Feinvermahlung eine pulvrige Struktur aufweist. Zur Fertigstellung der Schokolade wird dieses Walzgut „conchiert“. Zu den Hauptzielen des Conchierens gehört das Austreiben unerwünschter Essigsäure und Feuchtigkeit, die Freisetzung des immobilisierten Fettes und Umhüllung aller Partikel mit Kakaobutter und die Homogenisierung der Masse und Verteilung der Aromastoffe auf alle Partikel.<sup>80</sup>

Während des Conchierens wird das Walzgut geknetet, wodurch in der ersten „Trockenphase“ Partikelagglomerate mechanisch zerrieben werden. Durch den hohen mechanischen Energieeintrag erwärmt sich die Masse und durch das kontinuierliche Mischen und Überschlagen der Masse werden Feuchtigkeit und vor allem Essigsäure aus der Masse ausgetrieben.<sup>80</sup> Durch das Zerreiben der Agglomerate wird das immobilisierte Fett freigesetzt und die Partikel gleichmäßig mit Fett umhüllt. Es resultiert eine Suspension, in der alle Partikel in der kontinuierlichen Phase, der Kakaobutter, dispergiert sind. Zur Fertigstellung wird durch Zugabe von weiterer Kakaobutter und Lecithin als Emulgator die Viskosität der Masse und der letztlich gewünschte Fettgehalt eingestellt.<sup>80</sup> Die fertige Schokoladenmasse wird vor der Weiterverarbeitung temperiert, damit die Kristallisation während der Aushärtung in einer möglichst stabilen Form gefördert wird. Hierdurch wird die Anfälligkeit für Fettreif vermindert und die Schokolade weist einen knackigen Biss, den erwünschten Schmelz und eine glänzende Oberfläche auf.<sup>84</sup>

## **4.6 Die Bildung und Zusammensetzung des Kakaoaromas**

### **4.6.1 Flüchtige Verbindungen im Kakao**

Die Zusammensetzung der frischen reifen Bohnen wird durch die genetischen Voraussetzungen, Anbaubedingungen und Umwelteinflüsse bestimmt und bildet die Grundlage für die Aromaentwicklung in den Kakaobohnen während der Fermentation, Trocknung und Röstung.<sup>1,85</sup> Vergleichbar mit anderen fermentierten und thermisch behandelten Lebensmitteln wie Kaffee, Brot oder Bier, ist die Dynamik der Bildung von flüchtigen Verbindungen über die verschiedenen Verarbeitungsstufen die zur letztlichen Zusammensetzung des Aromas im Endprodukt führen sehr komplex.<sup>52</sup> Zu Beginn der Aromaforschung wurde die Annahme getroffen, dass alle flüchtigen Verbindungen für das Aroma verantwortlich sind.

## Theoretischer Hintergrund

---

Dementsprechend wurde der Fokus darauf gelegt möglichst viele Verbindungen zu identifizieren.<sup>86</sup> Die ersten dokumentierten Untersuchungen zur Aufklärung des Aromas von Kakaobohnen führten Bainbridge und Davies (1912) durch. Sie gewannen durch Wasserdampfdestillation und mehrerer Fraktionierungs- und Aufreinigungsschritte 24 g Aromakonzentrat aus 2000 kg Kakaobohnen in dem sie Ethanol, Säuren, Ester und Linalool identifizieren konnten.<sup>87</sup> Mit zunehmendem Fortschritt der instrumentellen Analytik und der Aromaforschung in den folgenden Jahrzehnten konnten vor allem mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie immer mehr flüchtige Verbindungen identifiziert werden. Dabei konnten im Kakao keine Einzelsubstanzen ausgemacht werden, die das Kakaoaroma prägen, sondern die Verhältnisse der Konzentrationen der einzelnen Aromastoffe sind für die Aromaqualität verantwortlich.<sup>17,86,88,89</sup> Bis heute wurden über 700 flüchtige Verbindungen in gerösteten Kakaobohnen identifiziert<sup>90</sup>, wobei die Pyrazine mit mehr als 100 verschiedenen Verbindungen die größte Fraktion bilden.<sup>17</sup> Des Weiteren gehören wichtige Aromastoffe zu den Substanzklassen der Aldehyde, Säuren, Ester, Alkohole, Furane, Furanone, Schwefelverbindungen, Phenole, Ketone, Terpene und Pyrrole.<sup>17,86,88,89,91</sup>

### 4.6.2 Bewertung der Relevanz der flüchtigen Aromastoffe

Aromastoffe werden über Geruchsrezeptoren im Nasen- und Rachenraum beim Verzehr des Lebensmittels wahrgenommen. Von Bedeutung sind vor allem die Aromastoffe, deren Konzentration die Geruchsschwellenwerte überschreitet, d.h. dass sie in den vorhandenen Konzentrationen auch wahrgenommen werden können. Die Anwesenheit der vielen flüchtigen Verbindungen lässt noch keine Aussage über die Relevanz der einzelnen Stoffe im Aroma des Lebensmittels zu. Eine Identifikation und Quantifizierung möglichst vieler flüchtigen Verbindungen ist also nicht zielführend.<sup>92</sup> Die Geruchsschwellenwerte sind stoffspezifisch und u.a. von dem Dampfdruck, der Temperatur und den Wechselwirkungen mit anderen Inhaltsstoffen in der Lebensmittelmatrix abhängig.<sup>52</sup> Ein Ziel der Aromaforschung ist es, unter den zahlreichen, im Lebensmittel vorkommenden flüchtigen Verbindungen, diejenigen zu identifizieren, die einen Beitrag zum Gesamtaroma leisten. Die Aufklärung des Aromas eines Lebensmittels wird dabei mithilfe von kombinierten instrumentellen und sensorischen Analysen erreicht.<sup>52</sup> Diese Herangehensweise wurde früher „molecular sensory science concept“, also als „Konzept der molekularen Sensorik“ bezeichnet und ist heutzutage unter dem Begriff „Sensomics“ bekannt. Es umfasst die systematische Untersuchung oder Decodierung der chemischen Verbindungen, die für den charakteristischen Aromaeindruck eines Lebensmittels verantwortlich sind.<sup>93</sup>

## Theoretischer Hintergrund

---

Zusammengefasst gehören die folgenden Schritte dazu<sup>52,93</sup>:

- Isolierung der flüchtigen Inhaltsstoffe
- Screening, Identifizierung und Gewichtung der Aromastoffe mittels Gaschromatographie-Olfaktometrie und Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA)
- Quantifizierung mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA)
- Berechnung von Aromawerten
- Aromasimulation und Weglassversuche

### *Extraktion und Isolierung*

Die flüchtigen Verbindungen müssen möglichst schonend von den nicht-flüchtigen Bestandteilen isoliert werden, damit keine Artefakte beispielsweise durch erhöhte Temperaturen entstehen.<sup>52</sup> Hierfür eignet sich besonders die „solvent assisted flavor evaporation“ (SAFE) Destillationsapparatur (Abbildung 12).<sup>94</sup> Feste Lebensmittelproben werden hierfür zerkleinert und zuerst mit vorzugsweise niedrig siedenden unpolaren Lösungsmitteln wie Diethylether oder Dichlormethan extrahiert. Der Extrakt wird dann unter hohem Vakuum und Temperaturen von max. 40 °C mithilfe der SAFE-Apparatur abdestilliert, in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Rundkolben aufgefangen und anschließend mithilfe einer Vigreuxkolonne aufkonzentriert.<sup>52,92</sup>

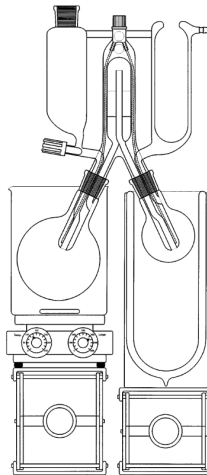
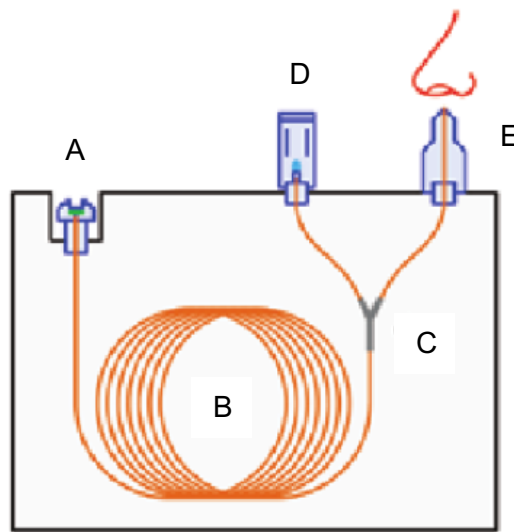


Abbildung 12: SAFE-Extraktionsvorrichtung nach Engel et al. (1999)<sup>94</sup>

## Theoretischer Hintergrund

### *Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA) mittels Gaschromatographie-Olfaktometrie (GC-O)*

Der aufkonzentrierte Extrakt wird chromatographisch mit einem Gaschromatographen aufgetrennt, wobei am Ende der Kapillare ein Splitter den Trägergasstrom zu gleichen Teilen zu einem Detektor, bspw. einem Flammenionisationsdetektor (FID) oder ein Massenspektrometer (MS) und einem beheizten „sniffing port“ geleitet wird. An dem Sniffing Port wird der entweichende Trägergasstrom orthonasal abgerochen und die Geruchsqualität und die zugehörige Retentionszeit festgehalten (Abbildung 13).<sup>92</sup>



**Abbildung 13: Schematische Darstellung einer GC-O Apparatur adaptiert nach Steinhaus (2020).<sup>92</sup> (A) Injektor, (B) Kapillarsäule, (C) Splitter, (D) FID, (E) Sniffing Port**

Für die AEVA wird eine Verdünnungsreihe mit dem Extrakt und dem verwendeten Lösungsmittel erstellt, indem jeweils im Verhältnis 1:2 verdünnt wird. Die so erhaltenen Verdünnungen von 1:2, 1:4, 1:8, ..., bis 1:2048 werden nacheinander mittels GC-O analysiert, bis kein Aromastoff orthonasal mehr wahrnehmbar ist. Die Einzelsubstanzen erhalten den „Flavor Dilution Faktor“ (FD-Faktor), der der letzten Verdünnungsreihe entspricht, bei dem die Komponente orthonasal detektiert werden konnte.<sup>92</sup> Die verteilten FD-Faktoren geben somit einen Hinweis darauf, welche Verbindungen in der untersuchten Probe mit großer Wahrscheinlichkeit einen wichtigen Beitrag zum Gesamtaroma leisten. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die flüchtigen Verbindungen durch den Trennvorgang in der Kapillarsäule und der Ofen-Temperatur des GC konzentriert und vollständig verflüchtigt aus dem Sniffing Port austreten, womit unterschiedliche Flüchtigkeiten und Matrixeffekte, sowie möglicherweise auftretende Verluste durch die Probenaufarbeitung unberücksichtigt

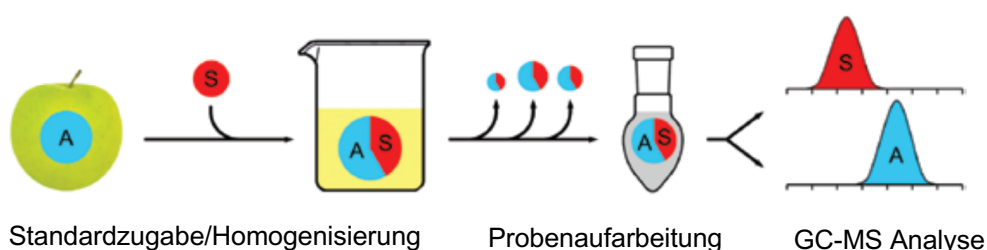
## Theoretischer Hintergrund

bleiben.<sup>52,92</sup> Besonders schwerflüchtige Komponenten werden so evtl. überbewertet, da bei dem eigentlichen Verzehr wesentlich geringere Temperaturen herrschen. Dieses Vorgehen eignet sich daher vor allem als Screening Methode zur Detektion der wichtigsten geruchsaktiven Verbindungen und zur vergleichenden Analyse verschiedener Proben gleicher Matrix.<sup>95</sup>

Die Identifikation der Verbindungen erfolgt mithilfe des Vergleichs massenspektrometrischer Daten, der Retentionsindizes auf zwei unterschiedlichen Säulen und dem Vergleich der Geruchsqualität im Vergleich zu einer Referenzsubstanz.<sup>52</sup>

### *Quantifizierung mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA)*

Nachdem die Zielaromastoffe identifiziert wurden, können sie in einem nächsten Schritt quantifiziert werden. Hierfür eignet sich besonders die SIVA, wobei ein meist mit  $^2\text{H}$  oder  $^{13}\text{C}$  markiertes Isotopomer des Analyten in bekannter Konzentration zu Beginn der Probenaufarbeitung, bzw. während der Extraktion dazugegeben wird. Es folgt eine ausreichende Equilibrationszeit, sodass sich Standard und Analyt homogen in der Matrix und dem Lösungsmittel verteilen können.<sup>92</sup> Durch die praktisch identischen physikalischen und chemischen Eigenschaften des Isotopomers und des Analyten, sind die möglichen Verluste bei der Probenaufarbeitung (Extraktion, Konzentrierung) und der chromatographischen Analyse für beide Komponenten gleich.<sup>96</sup> Standard und Analyt können nach der Auftrennung des Stoffgemisches im GC-MS durch die Detektion spezifischer Ionen voneinander unterschieden werden. Durch die bekannte Zudosierung des Standards, einer Kalibriergerade und dem Verhältnis der Peakflächen des Analyten und des markierten Standards, kann so die Konzentration des Analyten berechnet werden.<sup>52,92,96</sup> Das Prinzip der SIVA ist schematisch in Abbildung 14 dargestellt.



**Abbildung 14: Schematische Darstellung des Prinzips einer Stabilisotopenverdünnungsanalyse adaptiert nach Steinhaus (2020)<sup>92</sup>. A: Analyt, S: Standard**

## Theoretischer Hintergrund

---

### *Berechnung von Aromawerten oder „odor-activity values“*

Eine genauere Auskunft über den Beitrag einzelner Aromastoffe zum Gesamtaroma, kann durch die Berechnung von „Aromawerten“ (AW), bzw. „odor-activity values“ (OAV) erreicht werden. Dieser Begriff wurde von Rothe und Thomas (1963) erstmals definiert und gibt den Faktor an, um wieviel die Konzentration des Aromastoffes im Lebensmittel die Geruchsschwelle des Stoffes übersteigt.<sup>97</sup> Komponenten mit einem  $OAV < 1$  leisten in der Regel keinen wesentlichen Beitrag zum Aromaprofil des Produktes. Per Definition sind die Verbindungen aromaaktiv, die einen  $OAV \geq 1$  aufweisen.<sup>92,98</sup> Die Geruchsschwellenwerte werden experimentell in einer Matrix bestimmt, die den Eigenschaften des untersuchten Lebensmittels am nächsten kommt.<sup>92,97</sup> In der Praxis geschieht dies meist durch orthonasale Beurteilung von Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen in Wasser oder Öl des Zielaromastoffes. Die Geruchsschwelle eines Aromastoffes ist demnach die tiefste Konzentration, in der die Verbindung wahrgenommen und identifiziert werden kann.<sup>52</sup> Mit den Ergebnissen der Aromawertberechnung kann eine Rangfolge der quantifizierten Aromastoffe erstellt werden, die einen Hinweis über den Beitrag der Verbindung zum Gesamtaroma gibt. Dabei ist zu beachten, dass Wechselwirkungen mit anderen Inhalts- oder Aromastoffen und Matrixeffekte Maskierungs- oder additive Effekte bewirken können, wodurch sich die Geruchsschwellenwerte verändern.<sup>52,98</sup> Weitere Studien zeigten additive Effekte bspw. von Aldehyden, die in Mischungen detektiert werden konnten, obwohl sie als Einzelsubstanzen einen  $OAV < 1$  aufwiesen.<sup>99</sup> Solche Wechselwirkungen werden bei der Ermittlung von Geruchsschwellenwerten, die zur Berechnung von OAV zu Rate gezogen werden, in der Regel nicht berücksichtigt. Die OAV geben Aufschluss über die Komponenten, die mit großer Wahrscheinlichkeit zu den Schlüsselaromastoffen gehören. Um sicherzustellen, dass alle Schlüsselaromastoffe durch die Anwendung der AEVA identifiziert wurden und welche Verbindungen für das charakteristische Aroma des Lebensmittels von Bedeutung sind, können Aromasimulationen und Weglassversuche durchgeführt werden. Für die Aromasimulation werden Aromastoffe mit einem  $OAV \geq 1$  in den gefundenen Konzentrationen in eine geeignete Matrix eingebracht und das Aromaprofil sensorisch mit der untersuchten Lebensmittelprobe verglichen. Mit dieser Vorgehensweise konnte u.a. erfolgreich das Aroma verschiedener Weinsorten, Olivenöl, Pommes Frites, gekochtes Fleisch, Kaffee und Kakaomasse rekombiniert werden.<sup>86,98</sup> In Weglassversuchen werden dann einzelne oder mehrere Aromastoffe in den Rekombinaten weggelassen. Diese werden anschließend sensorisch mit einem Triangeltest (zwei vollständige Rekombinate und eine Probe, in der ein Aromastoff weggelassen wurde) durch Prüfer evaluiert. Wird eine Probe durch eine signifikante Anzahl

von Prüfern als unterschiedlich identifiziert, so kann davon ausgegangen werden, dass die fehlenden Substanzen zu den Schlüsselaromastoffen gehören.<sup>52,92</sup> Ergebnisse verschiedener Untersuchungen zeigten, dass Aromastoffe mit sehr hohem OAV nicht zwingend zu den Schlüsselaromastoffen gehören müssen, wohingegen andere Verbindungen mit tiefem OAV für das charakteristische Aromaprofil entscheidend sein können. So kamen Reiners und Grosch (1998) bei der Untersuchung verschiedener Olivenöle zu dem Ergebnis, dass sich das Aromaprofil eines Rekombinates ohne Acetaldehyd nicht signifikant vom Ausgangsprodukt unterscheiden ließ, obwohl dieser Aromastoff den höchsten OAV aufwies.<sup>100</sup> Ähnliche Beobachtungen wurden auch für Einzelsubstanzen mit hohen OAV in Studien zu geröstetem Kaffee (Isobutyl-3-methoxypyrazin) und Pommes Frites (3-Methylsulfanylpropanal) gemacht.<sup>101,102</sup> Dies verdeutlicht, dass die Rangfolge der Aromastoffe, die sich aus der Kalkulation der OAV zwar eine genauere Aussage zulässt, als die Rangfolge nach FD-Faktoren, ohne aufwendige Weglassversuche jedoch auch nur begrenzt aussagekräftig ist.

### 4.6.3 Aromaaktive Verbindungen in Kakao und Schokolade

Mit den beschriebenen Methoden konnte in den letzten Jahrzehnten das Verständnis über die Aromabildung im Kakao ausgebaut und die Schlüsselaromastoffe identifiziert werden. Schnermann und Schieberle (1997) wendeten die Methodik als erste auf Kakaoprodukte an.<sup>103</sup> Die Ergebnisse der AEVA von Kakaomasse zeigten die höchsten FD-Faktoren für 2- und 3-Methylbuttersäure (schweißig), 3-Methylbutanal (malzig), Ethyl-2-methylbutanoat (fruchtig), sowie Hexanal (grün), 2-Methoxy-3-isopropylpyrazin (erdig, bohnenartig), 2-Methyl-3-(methylthio)furan (fleischartig) und (E)-2-octenal (fettig, wachsartig). Eine Quantifizierung mittels SIVA wurde in dieser Studie nicht durchgeführt. Counet et al. (2002) führten eine AEVA an Schokoladenmasse durch und ermittelten die höchsten FD-Faktoren für die Strecker-Aldehyde 3-Methylbutanal (malzig), 2-Methylpropanal (malzig), Phenylacetaldehyde (honigartig) und die erdig/röstartig riechenden Verbindungen 2,3-Dimethylpyrazin, Tetramethylpyrazin und 3,5(oder 3,6)-Diethyl-2-methylpyrazin. Ihrer Ansicht nach zeigten 2- und 3-Methylbutanal sowie 2-Methylpropanal während der durchgeführten GC-O einen ausgeprägten schokoladenartigen Geruch.<sup>104</sup>

Frauendorfer und Schieberle (2008, 2019) untersuchten das Aroma von fermentierten Forastero- und Criollo Kakaobohnen, sowie die thermisch induzierten Veränderungen während der Röstung mittels AEVA und berechneten die OAV nach Quantifizierung mittels SIVA.<sup>89,105,106</sup> Unter der Vielzahl an identifizierten flüchtigen Verbindungen wurden 20 – 27



## Theoretischer Hintergrund

aromaaktive Substanzen in ungerösteten und gerösteten Forastero bzw. Criollo-Bohnen identifiziert. Die ermittelten OAV, die Konzentrationsbereiche und die orthonasale Geruchsqualität der identifizierten Schlüsselverbindungen der Studien von Frauendorfer und Schieberle (2008, 2019) und Bugan (2007) und sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 abgebildet.

**Tabelle 1: Ermittelte OAV in fermentierten Forastero- und Criollo Kakaobohnen vor und nach der Röstung adaptiert nach Frauendorfer (2008<sup>a</sup>, 2019<sup>b</sup>) geordnet nach Rangfolge der OAV in gerösteten Forasterobohnen**

Probe	Criollo (fermentiert) <sup>a</sup>		Forastero (fermentiert) <sup>b</sup>	
	Ungeröstet	Geröstet	Ungeröstet	Geröstet
OAV				
Essigsäure	8870	2660	14500	4920
3-Methylbutanal	123	2610	85	2030
3-Methylbuttersäure	424	440	645	786
Phenylacetaldehyd	3	250	2,8	245
Ethyl-2-methylbutanoat	138	135	162	69
Methylpropansäure	51	73	44	69
2-Methylbutanal	4	32	4,6	54
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	43	65	55	50
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	< 1,0	48	< 1,0	40
2-Acetyl-1-pyrrolin	< 1,0	42	< 1,0	39
2-Methylbuttersäure	17	17	30	36
Ethyl-2-methylpropanoat	25	21	29	32
Linalool	3,2	3,5	18	17
δ-Octenolacton	2,3	2,4	16	16
2-Phenylethanol	17	36	9,9	16
2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	2,4	6,6	4	14
Phenyllessigsäure	14	16	12	13
Dimethyltrisulfid	3,6	21	1,0	10
2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin	2,3	7,6	1,8	6,6
2-Methoxyphenol	6,9	14	3,8	6,3
Buttersäure	4,2	4,2	4,4	4,1
2-Phenylethylacetat	4,0	4,0	4,2	4,1
2,3,5-Trimethylpyrazin	< 1,0	3,2	< 1,0	2,9
2-Methyl-3-(methyldithio)-furan	< 1,0	1,5	< 1,0	1,4
2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazin	< 1	1,0	< 1,0	< 1,0
3-Isobutyl-2-methoxypyrazin	1,3	1,2	< 1,0	< 1,0
2-Heptanol	4,4	4,1	< 1,0	< 1,0

## Theoretischer Hintergrund

**Tabelle 2: Konzentrationsbereiche geruchsaktiver Verbindungen in unfermentierten und fermentierten Kakaobohnen verschiedener Herkünfte vor und nach der Röstung adaptiert aus den Studien von Bugan (2007)<sup>a</sup> und Frauendorfer (2008, 2019)<sup>b,c</sup>. (n.q.= nicht quantifiziert)**

Kakaoprobe	unfermentiert	fermentiert	fermentiert (geröstet)
Verbindung	Gehalt (µg/kg)		
<b>Säuren</b>			
Essigsäure	190.000-200.000 <sup>a</sup>	1.100.000-4.200.000 <sup>a,b,c</sup>	330.000-695.000 <sup>a,b,c</sup>
2-Methylbuttersäure	18-26 <sup>a</sup>	3.300-6.100 <sup>a,b,c</sup>	3.500-7.400 <sup>a,b,c</sup>
3-Methylbuttersäure	43-49 <sup>a</sup>	6.000-14.200 <sup>a,b,c</sup>	9.700-17.300 <sup>a,b,c</sup>
Phenyllessigsäure	n.q.	4.450-5.080 <sup>b,c</sup>	4.740-5.700 <sup>b,c</sup>
Methylpropansäure	n.q.	8.300-9.700 <sup>b,c</sup>	12.700-13.900 <sup>b,c</sup>
Buttersäure	30-170 <sup>a</sup>	370-600 <sup>a,b,c</sup>	400-570 <sup>a,b,c</sup>
<b>Alkohole</b>			
2-Phenylethanol	n.q.	2.100-3.500 <sup>b,c</sup>	3.400-7.500 <sup>b,c</sup>
2-Heptanol	n.q.	190-1.160 <sup>b,c</sup>	143-1.070 <sup>b,c</sup>
<b>Aldehyde</b>			
2-Methylbutanal	109-140 <sup>a</sup>	560-2.100 <sup>a,b,c</sup>	3.800-7.560 <sup>a,b,c</sup>
3-Methylbutanal	58-120 <sup>a</sup>	1.100-3.900 <sup>a,b,c</sup>	5.500-33.900 <sup>a,b,c</sup>
Phenylacetaldehyd	16-42 <sup>a</sup>	61-330 <sup>a,b,c</sup>	63-5.500 <sup>a,b,c</sup>
<b>Ester</b>			
Ethyl-2-methylbutanoat	5,0-11 <sup>a</sup>	18-45 <sup>a,b,c</sup>	19-44 <sup>a,b,c</sup>
Ethyl-3-methylbutanoat	12-20 <sup>a</sup>	45-105 <sup>a,b,c</sup>	54-73 <sup>a,b,c</sup>
2-Phenylethylacetat	30-42 <sup>a</sup>	73-2.400 <sup>a,b,c</sup>	930-2.300 <sup>a,b,c</sup>
Ethyl-3-phenylprop-2-enoat	23-76 <sup>a</sup>	160 <sup>a</sup>	76 <sup>a</sup>
Ethyl-3-phenylpropanoat	3,2-11 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>
Ethyl-2-methylpropanoat	n.q.	31-36 <sup>b,c</sup>	26-40 <sup>b,c</sup>
<b>Furanone</b>			
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	n.q.	17-84 <sup>a,b,c</sup>	990-4.000 <sup>a,b,c</sup>
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	n.q.	8,6-11 <sup>b,c</sup>	10-13 <sup>a,b,c</sup>
<b>Pyrazine</b>			
2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin	2,0 <sup>a</sup>	2,9-29 <sup>a,b,c</sup>	15-120 <sup>a,b,c</sup>
2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazin	n.q.	14-19 <sup>b,c</sup>	50-56 <sup>b,c</sup>
2,3,5-Trimethylpyrazin	n.q.	170-190 <sup>b,c</sup>	830-920 <sup>a,b,c</sup>
2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	0,75-2,0 <sup>a</sup>	1,2-2,5 <sup>a,b,c</sup>	3,3-48 <sup>a,b,c</sup>
3-Isobutyl-2-methoxypyrazin	n.q.	0,54-1,0 <sup>b,c</sup>	0,40-0,94 <sup>b,c</sup>
<b>Andere Verbindungen</b>			
Dimethyltrisulfid	n.q.	2,4-9,1 <sup>b,c</sup>	26-53 <sup>b,c</sup>
2-Methyl-3-(methylthio)-furan	n.q.	0,13-0,18 <sup>b,c</sup>	0,56-0,59 <sup>b,c</sup>
2-Methoxyphenol	2,0 <sup>a</sup>	33-170 <sup>a,b,c</sup>	100-230 <sup>a,b,c</sup>
Linalool	n.q.	120-680 <sup>b,c</sup>	130 <sup>b,c</sup>
2-Acetyl-1-pyrrolin	n.q.	n.q.	3,9-4,2 <sup>b,c</sup>

## Theoretischer Hintergrund

---

Zu den aromaaktiven Verbindungen mit den höchsten OAV (> 10) in fermentierten ungerösteten Bohnen gehörten die Säuren Essigsäure (stechend), 2- und 3-Methylbuttersäure (schweißig), 3-Methylpropansäure (schweißig) und Phenylessigsäure (blumig, honigartig), der Strecker-Aldehyd 3-Methylbutanal (malzig), die Ester Ethyl-2-methylbutanoat (fruchtig) und Ethyl-2-methylpropanoat (fruchtig), das Furanon 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5*H*)-furanon (würzig) und die blumigen Verbindungen 2-Phenylethanol und Linalool. Durch die Röstung der Bohnen nahmen vor allem die Konzentrationen und damit die OAV der Strecker-Aldehyde 2- und 3-Methylbutanal (malzig) und Phenylacetaldehyd (blumig, honig-artig) zu, während die Gehalte an Essigsäure (stechend) zu ca. 50 – 70 % abnahmen. Zudem stiegen nach der Röstung die Konzentrationen und damit der OAV von dem Furanon 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (karamell-artig) und 2-Acetyl-1-Pyrrolin (popkorn-artig), die als erdig beschriebenen Pyrazine 2,3,5-Trimethylpyrazin, 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin, 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin, der kohlsartig riechenden Verbindung Dimethyltrisulfid und dem rauchig riechendem 2-Methoxyphenol. Die Autoren merkten an, dass ihre Ergebnisse keinen Hinweis auf eindeutige qualitative und quantitative Unterschiede in der Zusammensetzung der Aromafraktion zwischen Forastero- und Criollo-Kakao geben. Sie führten dies auf die identischen Röstbedingungen zurück.<sup>105,106</sup> Bagan (2007) untersuchte die Dynamik der Aromabildung während der Fermentation beginnend von unfermentierten Bohnen aus Ghana und Indonesien. Sie zog Proben zu unterschiedlichen Fermentationszeitpunkten und analysierte die Proben zudem vor und nach der Röstung.<sup>88</sup> Sie konnte die meisten von Frauendorfer und Schieberle (2008, 2019) identifizierten Schlüsselverbindungen wie die verschiedenen Säuren und Strecker-Aldehyde und eine Reihe fruchtiger Ester wie Ethyl-2-methylbutanoat, Ethyl-3-methylbutanoat, 2-Phenylethylacetat, Ethyl-3-phenylprop-2-enoat, Ethyl-3-phenylpropanoat, Ethyl-2-methylpropanoat bereits im unfermentierten Samen nachweisen (Tabelle 2).<sup>88,105,106</sup> Besonders hohe FD-Faktoren erreichten zudem 2-Isopropyl-3-methoxypyrazin (erbsig), 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin (nach Paprika), 3-Hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5*H*)-one (würzig) und 2-Phenylethanol (blumig). Durch die Fermentation stiegen vor allem die Gehalte der Säuren, Ester und Strecker-Aldehyde an. Die durch die Röstung induzierten Veränderungen deckten sich mit den Beobachtungen von Frauendorfer und Schieberle (2008, 2019).<sup>105,106</sup> Anhand ihrer Ergebnisse teilte sie die Aromastoffe in drei Kategorien ein. Die erste Gruppe beinhaltet Aromastoffe, die vor allem biochemisch und nicht thermisch gebildet werden. Sie sind entweder bereits nativ in der Bohne vorhanden, werden während der Fermentation mikrobiologisch außerhalb der Bohne gebildet und diffundieren in die Bohnen oder ihre Bildung erfolgt biochemisch innerhalb der Bohne. Sie nehmen während der Fermentation zu

## Theoretischer Hintergrund

---

und durch die anschließende Röstung ab oder bleiben konstant. Hierzu gehören beispielsweise die Säuren und Ester. Die zweite Gruppe besteht aus Aromastoffen, die vor und nach der Fermentation nicht oder nur in geringen Mengen vorliegen, aber durch die Röstung signifikant ansteigen. Als Beispiel hierfür wird 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (karamell-artig) genannt. Die dritte Gruppe beinhaltet Aromastoffe, die in unfermentierten Bohnen in geringen Mengen nachgewiesen wurden und sowohl während der Fermentation und Trocknung als auch durch die Röstung signifikant ansteigen. Hierzu zählen vor allem die Strecker-Aldehyde.<sup>88</sup>

In aktuelleren Untersuchungen von Seyfried und Granvogl (2019), Chetschik et al. (2019) und Ullrich et al. (2022) wurden die Schlüsselaromastoffe von verschiedenen dunklen Schokoladen bestimmt.<sup>107-109</sup> Auch nach weiteren Verarbeitungsschritten, beispielsweise der Kakaomassenherstellung und dem Conchieren, gehören die gleichen oben beschriebenen Verbindungen zu den Schlüsselaromastoffen, wobei sich vor allem die Konzentrationsverhältnisse der Aromastoffe zueinander verschieben. Das Conchieren dient, wie oben beschrieben, neben der Entfeuchtung und Homogenisierung der Schokoladenmasse unter anderem der Reduktion von eher unerwünschten Aromastoffen wie Essigsäure und 2- und 3-Methylbuttersäure.<sup>4,17,49,80</sup> Neben den Säuren gehen aber auch weitere vor allem leichtflüchtige Aromastoffe wie Ester, Alkohole und Aldehyde während des Conchierens verloren<sup>17,104,110</sup>, sodass die Aromaintensität insgesamt abnimmt und die Schokolade bspw. weniger fruchtig wirkt.<sup>111,112</sup> Zwar gibt es auch Hinweise, dass Aromastoffe während des Conchierens gebildet werden<sup>104,113</sup>, jedoch wird weitgehend davon ausgegangen, dass der positive Effekt auf der Reduktion der Säuren, der Homogenisierung der Masse und der Übertragung von Aromastoffen auf Zuckerpartikel beruht.<sup>17,80,114</sup>

In den Studien von Seyfried und Granvogl (2019) und Ullrich et al. (2022), wurden interessanterweise sehr hohe OAV für das kohlartig riechende Dimethyltrisulfid bestimmt, sodass diese Verbindung nach ihren Ergebnissen vermutlich zu den Schlüsselaromastoffen gehört.<sup>107,109</sup> Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass ein sehr tiefer Geruchsschwellenwert von 0,03 µg/kg für die Berechnung verwendet wurde. In den Studien von Frauendorfer und Schieberle (2008, 2019) andererseits, wurden die OAV von Dimethyltrisulfid mit einem höheren Geruchsschwellenwert von 2,5 µg/kg berechnet, sodass diese Verbindung eher tiefe OAV in geröstetem und ungeröstetem Kakao errichte.

### 4.6.4 Bildungswege von Schlüsselaromastoffen im Kakao

Die Bildung von Aromastoffen in Kakaobohnen während der Fermentation und Trocknung sowie der Röstung ist aufgrund der parallel ablaufenden Prozesse äußerst komplex und nicht vollständig aufgeklärt. In der Bohne werden reduzierende Zucker, freie Aminosäuren und Peptide freigesetzt, die im Verlauf der Fermentation, Trocknung und Röstung innerhalb der Kotyledonen zu Schlüsselaromastoffen umgesetzt werden können. Gleichzeitig führt die mikrobielle Aktivität außerhalb der Bohne ebenfalls zur Bildung von Aromastoffen, die zumindest zum Teil in die Bohnen diffundieren können.<sup>15</sup> Der Bildung von Aromastoffen durch Hefen wird in mehreren Studien eine entscheidende Rolle für die Aromaqualität des Endproduktes zugeschrieben.<sup>11,12,14</sup> Andererseits sind viele der Schlüsselaromastoffe wie Essigsäure, 2- und 3- Methylbuttersäure, 2- und 3-Methylbutanal, Ethyl-2-Methylbutanoat, Ethyl-3-Methylbutanoat, 2-Phenylethanol, Phenylacetaldehyd u.a. Zwischen- oder Endprodukte des Aminosäuremetabolismus in Pflanzen, der unter anderem während der Fruchtreifung vonstattengeht.<sup>115,116</sup> In Früchten und Blüten dient die Bildung von Aromastoffen aus den wichtigsten Vorläufern L-Leucin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Methionin und L-Phenylalanin dabei z.B. der Anlockung von Tieren und Insekten, die als Bestäuber oder durch den Verzehr der Früchte zur Verteilung der Samen und damit zur Reproduktion beitragen.<sup>115</sup> Diese Aminosäuren sind essentiell und können vom Menschen und den meisten Wirbeltieren und Insekten nicht synthetisiert werden.<sup>117,118</sup> Daher wird ein Zusammenhang zwischen der Attraktion von Tieren durch Aromastoffe vermutet, die aus diesen essentiellen Aminosäuren gebildet werden können.<sup>119-121</sup> Tabelle 3 enthält eine Übersicht der wichtigsten Aminosäuren als Vorstufen verschiedener Schlüsselaromastoffe von Kakao nach Ziegler und Biehl (2003, 2017)

## Theoretischer Hintergrund

**Tabelle 3: Hydrophobe Aminosäuren als Vorstufen für Aldehyde, Säuren, Alkohole und Ester adaptiert nach Ziegler und Biehl (2003, 2017)<sup>1,17</sup>**

Aminosäure	Aldehyd	Säure	Alkohol	Ester
L-Alanin	Acetaldehyd	Essigsäure	Ethanol	Ethyl Acetat
L-Valin	2-Methylpropanal	Methylpropansäure	2-Methyl-1-propanol	Ethyl-2-methylpropanoat
L-Leucin	3-Methylbutanal	3-Methylbuttersäure	3-Methyl-1-butanol	Ethyl-3-methylbutanoat
L-Isoleucin	2-Methylbutanal	2-Methylbuttersäure	2-Methyl-1-butanol	Ethyl-2-methylbutanoat
L-Phenylalanin	Phenylacetaldehyd	Phenylelessigsäure	2-Phenylethanol	2-Phenylethylacetat

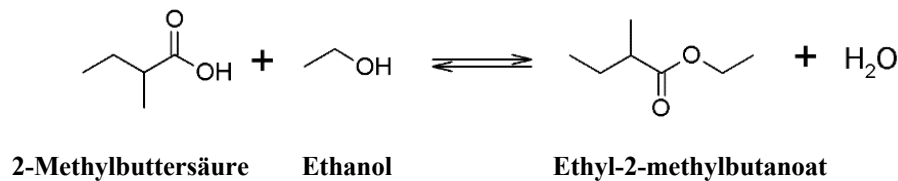
Essigsäure ist der mengenmäßig dominierende Aromastoff in Kakao und Schokolade. In unfermentierten und getrockneten Bohnen konnte Essigsäure bereits mit 0,19 g/kg quantifiziert werden.<sup>88</sup> Der größte Teil der Essigsäure, der in fermentiertem Kakao nachgewiesen werden kann, wird aber während der Fermentation mikrobiologisch gebildet und gelangt durch Diffusion in die Bohnen. Essigsäurebakterien sind obligat aerobe Bakterien und oxidieren den durch die Hefen gebildeten Ethanol in der aeroben Phase der Fermentation zu Essigsäure.<sup>3</sup> Entlang der gesamten Prozesskette bis zur fertigen Schokolade weist diese Verbindung sehr hohe Konzentrationen und OAV auf. Holm et al. (1993) untersuchten 54 fermentierten Kakaoproben unterschiedlicher Herkünfte und wiesen Gehalte von 1,3 – 11,8 g/kg nach.<sup>122</sup> Hohe Gehalte an Essigsäure gelten als nachteilig für das Kakaoaroma.<sup>1,2,4,17</sup>

Zu den weiteren wichtigen Säuren gehören 2- und 3-Methylbuttersäure und Phenylelessigsäure. Es wird angenommen, dass 2- und 3-Methylbuttersäure und Phenylelessigsäure sowie weitere kurzkettige Fettsäuren gegen Ende der Fermentation durch verschiedene *Bacillus* Arten aus Aminosäuren gebildet werden, und sie ebenso wie die Essigsäure durch Diffusion in die Bohne gelangen.<sup>1,2,123,124</sup> Auch eine Bildung durch Hefen aus den entsprechenden Aminosäuren ist möglich.<sup>125</sup> Ebenso ist eine biochemische Bildung innerhalb der Bohne möglich, da diese Säuren sowie die weiteren flüchtigen Derivate der Aminosäuren (Tabelle 3) Zwischenprodukte aus dem Aminosäuremetabolismus in Pflanzen sind<sup>115,116</sup> und geringe Mengen bereits in unfermentierten und getrockneten Samen gemessen werden können.<sup>88</sup> Zudem können diese Säuren ebenso wie Phenylelessigsäure während des Strecker-Abbaus der Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Phenylalanin entstehen.<sup>126</sup> 2- und 3-Methylbuttersäure werden in der Literatur als „ranzig“<sup>106</sup> und „schweissig“<sup>88,103,105</sup> und mitunter auch als „fruchtig“<sup>107</sup> beschrieben. Diese Verbindungen gehören zu den Schlüsselkomponenten, können aber in zu hohen

## Theoretischer Hintergrund

Konzentrationen zu einem Off-Flavor beitragen.<sup>2,4,10,17,124</sup> Die Aromaqualität von Phenyllessigsäure wird als „bienenwachs-artig“ und „honigartig“<sup>105–107</sup> beschrieben.

Fruchtige Ester gehören zu den wichtigsten Aromastoffen von Früchten und können in Pflanzenzellen während der Fruchtreife aus Acyl-CoA aus der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren oder dem Aminosäurestoffwechsel und Alkoholen gebildet werden.<sup>52,127</sup> Coenzym A und  $\alpha$ -Decarboxylase wurden in Kakaobohnen nachgewiesen und von Purr et al. (1963) mit der Aromabildung während der Fermentation in Verbindung gebracht.<sup>128</sup> Verschiedene Ester sind bereits im unfermentierten Samen vorhanden.<sup>88</sup> Da die Estergehalte während der Fermentation stark ansteigen, wird gegenwärtig aber vor allem eine mikrobielle Bildung durch Hefen außerhalb der Bohne und die anschließende Diffusion in die Bohnen vermutet.<sup>11,12,129</sup> Durch den Metabolismus der Hefen von Aminosäuren, beispielsweise Phenylalanin, können höhere Alkohole wie 2-Phenylethanol synthetisiert werden, welcher mit Essigsäure verestert 2-Phenylethylacetat hervorbringt.<sup>125</sup> Ethyl 2- und Ethyl 3-methylbutanoat entstehen durch die Veresterung von Ethanol und 2- und 3-Methylbuttersäure (Abbildung 15).<sup>17</sup>



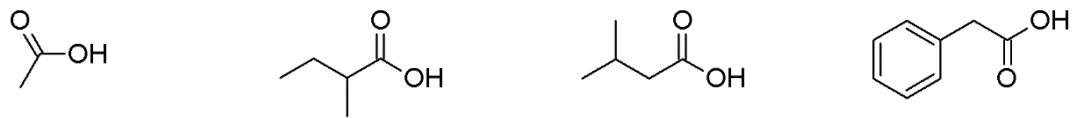
**Abbildung 15: Ethylesterbildung am Beispiel von 2-Methylbuttersäure und Ethanol**

Zu den weiteren wichtigen Estern gehört Ethyl-3-phenylprop-2-enoat dessen Vorläufer die *trans*-Zimtsäure, einem Derivat von L-Phenylalanin, und Ethanol sind. Die Biosynthese der Aminosäure L-Phenylalanin in Pflanzen erfolgt über den Shikimisäureweg und liefert damit den Vorläufer für Phenylpropanoide, die die Grundlage für den Aufbau von sekundären Pflanzenstoffen wie beispielsweise Flavonoide aber auch Ester wie Ethyl-3-phenylprop-2-enoat bilden.<sup>130,131</sup>

Die Strukturformeln ausgewählter Schlüsselaromastoffe von Kakao sind Abbildung 16 dargestellt.

## Theoretischer Hintergrund

---

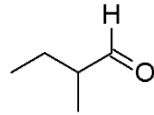


Essigsäure

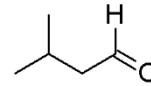
2-Methylbuttersäure

3-Methylbuttersäure

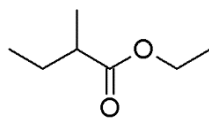
Phenyllessigsäure



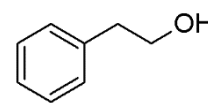
2-Methylbutanal



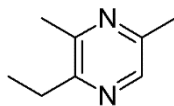
3-Methylbutanal



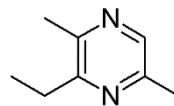
Ethyl-2-Methylbutanoat



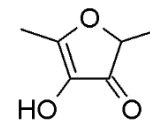
2-Phenylethanol



2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin



2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazin



4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon

Abbildung 16: Strukturformeln ausgewählter Schlüsselaromastoffe von Kakao

Neben der möglichen biochemischen Bildung von Aromastoffen, ist vor allem die Aromabildung während der Trocknung und Röstung durch Maillard-Reaktion von Bedeutung.<sup>1,17</sup> Die Maillard-Reaktion findet in Lebensmitteln immer bei gleichzeitigem Vorkommen von freien Aminosäuren und reduzierenden Zuckern statt und wird durch erhöhte Temperaturen und tiefe aW-Werte beschleunigt.<sup>52</sup>

Die Anfangsphase der Maillard-Reaktion ist in Abbildung 17 dargestellt. Zunächst kondensiert unter Abspaltung von H<sub>2</sub>O ein reduzierender Zucker mit einer Aminosäure, wobei N-substituierte Glycosilamine entstehen. Ist der reduzierende Zucker eine Ketose wie D-Fructose, entsteht als Zwischenstufe das Heyns-Produkt, bei Aldosen wie D-Glucose werden Amadoriverbindungen gebildet.<sup>132</sup> Die beteiligten Aminogruppen können sowohl von freien Aminosäuren als auch von terminalen Aminosäuren von Proteinen oder Peptiden stammen.<sup>133</sup> Aus Heyns-, bzw. Amadoriverbindungen werden über 1,2- oder 2,3-Enolisierungen, unter Abspaltung der Aminogruppe reaktive  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen, wie bspw. das 3-



## Theoretischer Hintergrund

---

Desoxyoson oder das 1-Desoxyoson gebildet.<sup>132</sup> Ihre Umlagerung und der Abbau bringt verschiedenste Fragmentierungsprodukte sowie weitere  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen hervor, aus denen eine Vielzahl weiterer Aromastoffe wie beispielsweise das nach Karamell riechende 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (Furaneol) entstehen können.<sup>52,132</sup>

# Theoretischer Hintergrund

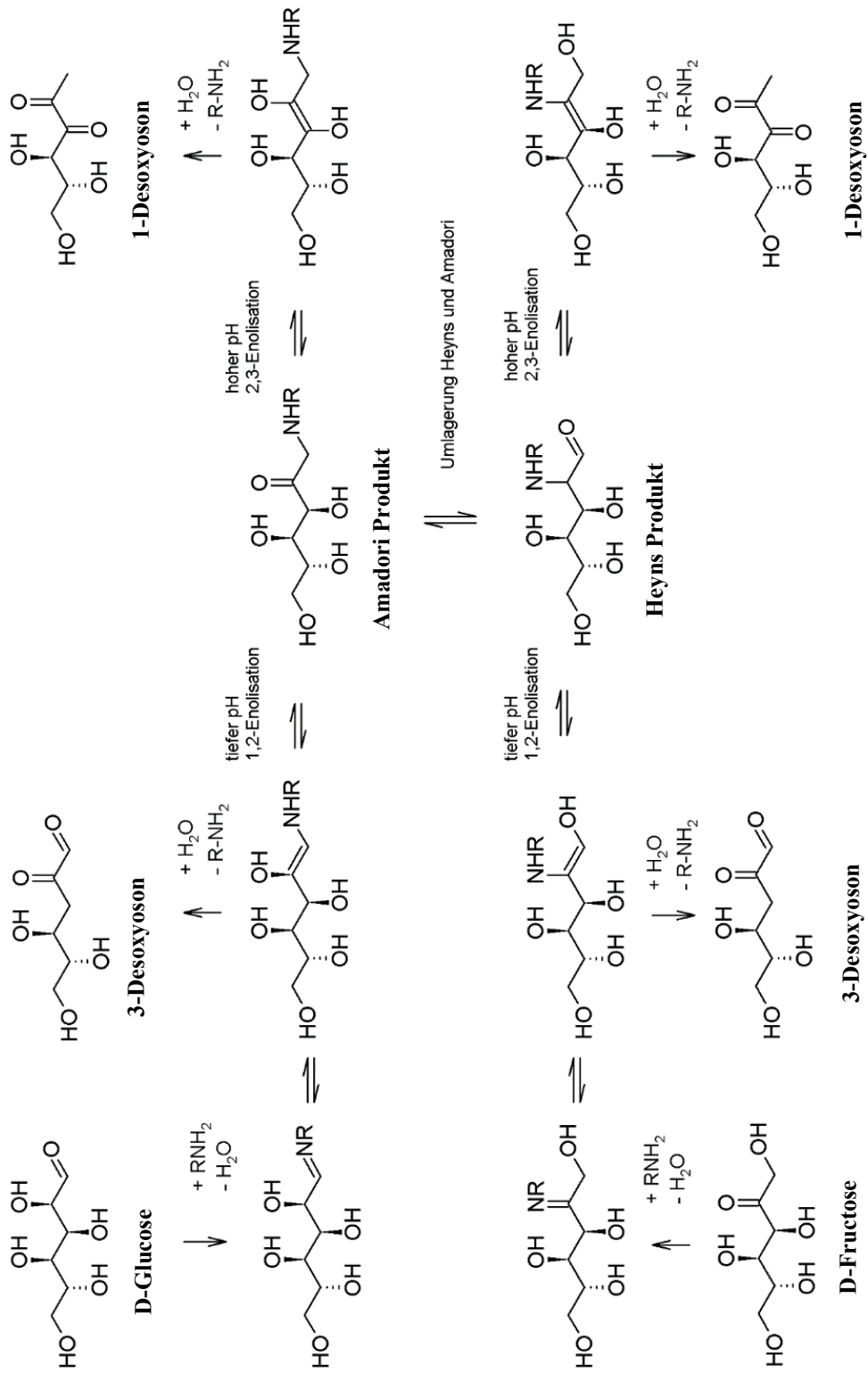


Abbildung 17: Anfangsphase der Maillard-Reaktion adaptiert nach Parker (2015).<sup>132</sup>

## Theoretischer Hintergrund

---

Eine Nebenreaktion von besonderer Bedeutung ist der Strecker-Abbau, bei dem die wichtigen Strecker-Aldehyde gebildet werden. Hierbei kondensiert eine Aminosäure unter Abspaltung von Wasser mit einer  $\alpha$ -Dicarbonylverbindung. Durch oxidative Decarboxylierung resultiert ein um ein C-Atom verkürzter Strecker-Aldehyd der reagierenden Aminosäure.<sup>132</sup> Auf diese Weise können im Kakao aus den Aminosäuren Phenylalanin, Valin, Leucin und Isoleucin die jeweiligen Strecker-Aldehyde Phenylacetaldehyde, 2-Methylpropanal, 3- und 2-Methylbutanal entstehen. Neben den Desoxyosonen aus der Umlagerung von Amadori- und Heyns-Verbindungen als beteiligte  $\alpha$ -Dicarbonylverbindung, können auch Chinone als Produkt der enzymatischen oder chemischen Oxidation von Polyphenolen den Strecker-Abbau induzieren.<sup>134–137</sup> Auch eine direkte oxidative Bildung aus Amadori- und Heyns-Verbindungen konnte experimentell bestätigt werden.<sup>138</sup> Zudem wurde die Bildung von Strecker-Aldehyden in geröstetem und ungeröstetem Kakao und anderen trockenen Lebensmitteln bei Kontakt mit Wasser festgestellt, wobei Oxazoline als Zwischenstufe angenommen werden.<sup>139–141</sup> Neben den Strecker-Aldehyden können vor allem unter oxidativen Bedingungen die entsprechenden „Strecker-Säuren“, beispielsweise 2-Phenylelessigsäure aus Phenylalanin oder 2- und 3-Methylbuttersäure aus Leucin und Isoleucin gebildet werden.<sup>52,126</sup> Der Strecker-Abbau und die Bildung von Strecker-Säuren sind in Abbildung 18 ersichtlich

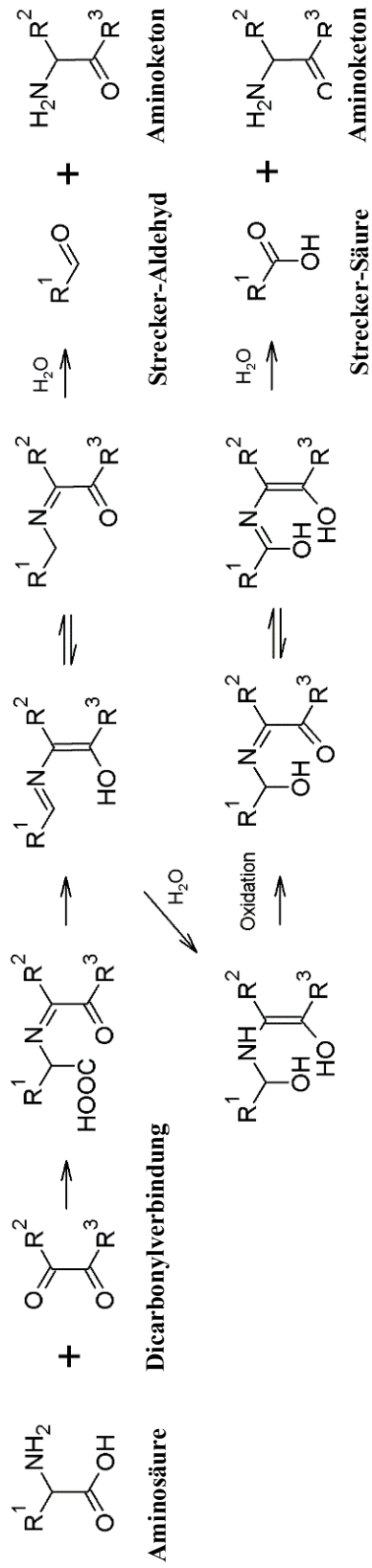
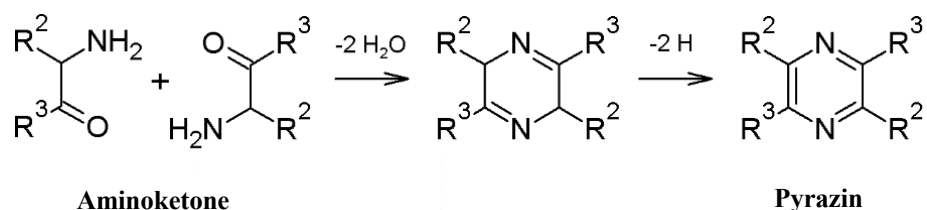


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Strecker-Abbaus adaptiert nach Parker (2015) und der von Granvogl et al. (2012) vorgeschlagenen Strecker-Säurebildung<sup>132,139</sup>

## Theoretischer Hintergrund

Die während des Strecker-Abbaus freigesetzten  $\alpha$ -Aminoketone können in einer weiteren Folgereaktion zu Dihydropyrazinen kondensieren, welche durch Oxidation zu den korrespondierenden Pyrazinen reagieren. Alternativ kann das Dihydropyrazin Anion nach Deprotonierung durch Aldolkondensation mit einer Carbonylverbindung reagieren. Ist diese Carbonylverbindung ein Strecker-Aldehyd resultieren aminosäurespezifische Pyrazine.<sup>132,142</sup> Abbildung 19 zeigt schematisch die Pyrazinbildung aus Aminoketonen auf.



**Abbildung 19: Darstellung der Pyrazinbildung durch Kondensation von Aminoketonen adaptiert nach Parker (2015)<sup>132</sup>**

Neben freien Aminosäuren wird die Bildung von Pyrazinen aus Peptiden vermutet. Zou et al. (2018) führten Versuche mit Modellsystemen mit dem Dipeptid aus L-Alanin und L-Leucin und Xylose, sowie den einzelnen freien Aminosäuren durch. Bei Verwendung der Dipeptide als Edukte wurden signifikant höhere Gehalte an Pyrazinen gebildet. Bei der Reaktion mit beiden einzelnen freien Aminosäuren resultierten hingegen mehr Strecker-Aldehyde.<sup>143</sup> Dies stimmt auch mit den Ergebnissen von Scalone et al. (2015) überein.<sup>142</sup> Sie führten Modellversuche mit D-Glucose, Molkeproteinen und Molkehydrolysaten mit Peptiden sowie freien Aminosäuren durch und stellten ebenfalls die höchste Pyrazinausbeute bei Verwendung des Hydrolysates mit Peptiden fest. Kürzlich wurden in einer Studie von D'Souza et al. (2018) in fermentiertem Kakao mehr als 800 verschiedene Peptide charakterisiert<sup>144</sup> und Andruszkiewicz et al. (2020) konnten eine Vielzahl von Amadori-, bzw. Heyns-Verbindungen in Kakaobohnen identifizieren, die Di- und Tripeptide als Aminokomponente enthalten.<sup>145</sup> Die Autoren vermuteten einen Zusammenhang zwischen diesen Verbindungen und der Aromaqualität des Rohmaterials.

### 5 Zusammenfassende Betrachtung und Zielsetzung

Aus der Literatur lassen sich folgende Erkenntnisse zusammenfassen:

Die Transformation der Inhaltsstoffe innerhalb des Kotyledongewebes während der Nacherntebehandlung ist unerlässlich für die typische Aromabildung und Ausbildung der Geschmackseigenschaften. Die Inaktivierung des Keimlings, der Verlust der zellulären Integrität, die Solubilisierung und Durchmischung der Inhaltsstoffe, die Einstellung des pH-Wertes in den Kotyledonen im Bereich 5,0 – 5,5 und die Verfügbarkeit von Sauerstoff sind Schlüsselfaktoren für diese Umwandlungsprozesse in der Bohne. Die Schlüsselfaktoren werden während der traditionellen Fermentation und Trocknung durch die strenge Abfolge ineinandergreifender Vorgänge durch den mikrobiellen Abbau der Pulpe erreicht. Durch Hefen wird Ethanol gebildet und die Pulpe verflüssigt, wodurch zunehmend aerobe Bedingungen herrschen. Damit wird die Essigsäurebildung durch Essigsäurebakterien und so die Erwärmung der Masse ermöglicht. Essigsäure diffundiert in die Bohnen und bewirkt zusammen mit der Erwärmung die Inaktivierung des Keimlings, was zum Verlust der Zellstruktur führt. Enzym und Substrat können miteinander in Kontakt treten, wodurch Aromavorstufen wie D-Glucose und D-Fructose aus Saccharose sowie hydrophile Peptide und hydrophobe Aminosäuren aus der Proteinfraction gebildet werden. Zunehmend aerobe Bedingungen während der Fermentation fördern die Oxidation und Polymerisation von Polyphenolen, wodurch die Adstringenz und Bitterkeit abnehmen. Während der Fermentation und Trocknung wird eine enzymatische und nicht-enzymatische Bildung von Aromastoffen aus diesen Vorstufen angenommen. Vor allem während der nachfolgenden Röstung werden Aromastoffe aus Vorstufen durch Maillard-Reaktion gebildet. Darüber hinaus werden Aromastoffe wie beispielsweise Essigsäure durch Mikroorganismen außerhalb der Bohnen gebildet und diffundieren zumindest zum Teil in die Bohnen. Eine übermäßige Säurebildung während der Nacherntebehandlung sollte vermieden werden, da sich dies negativ auf die sensorischen Eigenschaften auswirkt. Daher sind weitere Verarbeitungsschritte, wie beispielsweise das Rösten, das Conchieren oder die Massebehandlung mittels Dünnschichtverdampfungsverfahren darauf ausgerichtet diese Säuren zu entfernen. In der Praxis kommt es zu Qualitätsschwankungen und Aromafehlern im Rohmaterial, bedingt durch nicht standardisierte Prozesse und Fehlfermentationen.

Durch direkte Trocknung der Bohnen wird der Keimling der Bohnen ebenfalls inaktiviert. Die Zellstruktur verändert sich auf ähnliche Weise wie während der Fermentation. Die Enzyme

## Zusammenfassende Betrachtung und Zielsetzung

---

bleiben aktiv, aber getrennt von Substraten, da Wasser nicht als mobile Reaktionsphase zur Verfügung steht. Sie sind daher lagerfähig und können zeit- und ortsunabhängig verarbeitet werden.

In der Theorie erfüllen unfermentierte Kakaokotyledonen also die Kriterien, die zur erwünschten Umwandlung der Inhaltsstoffe während der Nacherntebehandlung führen. Diese Umwandlungsprozesse sollten sich künstlich ohne die Mitwirkung vom mikrobiellen Metabolismus herbeiführen lassen, indem die nötigen Bedingungen, also die Ansäuerung, Erwärmung und die Verfügbarkeit von Sauerstoff, gezielt geschaffen werden. Basierend auf den Erkenntnissen aus der Literatur sollte im Rahmen dieser Arbeit ein neuer Ansatz zur Nacherntebehandlung von Kakaobohnen erarbeitet und evaluiert werden. Für die Entwicklung der Methode und der Evaluation des Verfahrens wurden folgende Arbeitshypothesen formuliert:

1. Das dehydrierte Kotyledongewebe unfermentierter und direkt getrockneter Kakaobohnen lässt sich rehydrieren. Die aufgenommene Feuchtigkeit kann als Reaktionsmedium zwischen Enzymen und Substraten dienen.
2. Durch die Rehydrierung mit saurer Lösung, kann der pH-Wert im Kotyledon auf den theoretisch optimalen Wirkungsbereich der bohneeigenen Enzyme (pH-Wert 5,0 – 5,5) eingestellt werden
3. Durch gezielte Erwärmung auf 45 °C und Inkubation über eine festgelegte Dauer werden chemische Umwandlungsreaktionen der Inhaltsstoffe gefördert, ohne die Enzymtätigkeit durch zu hohe Temperatur oder übermäßige Ansäuerung zu hemmen.
4. Aromavorstufen wie reduzierende Zucker und freie Aminosäuren werden freigesetzt
5. Durch die Inkubation und künstliche Trocknung nehmen die Gehalte an Schlüsselaromastoffen zu
6. Im Gegensatz zur Fermentation werden weniger flüchtige Säuren gebildet, deren Ursprung während der Fermentation vor allem Mikroorganismen zugeschrieben wird
7. Die forcierte Verfügbarkeit von Sauerstoff induziert die Oxidation und Polymerisation von Polyphenolen. Der Gehalt an monomeren Polyphenolen und niederpolymerisierten Proanthocyanidinen nimmt ab. Sensorisch wird die Adstringenz und Bitterkeit dadurch reduziert

Zur Überprüfung der Arbeitshypothesen 1 – 3 sollte zunächst durch Kleinversuche abgeklärt werden, ob eine Rehydrierung von unfermentierten und getrockneten Bohnen möglich ist, der

## Zusammenfassende Betrachtung und Zielsetzung

---

pH-Wert eingestellt werden kann und die anschliessende Inkubation zu einer Steigerung von Aromavorstufen und Bildung von Aromastoffen führt (vergl. 0).

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss dieser Behandlung auf die Bildung von Aromastoffen und Aromavorstufen und die Transformation qualitätsbestimmender nicht-flüchtiger Inhaltsstoffe vor und nach der Behandlung zu überprüfen und mit einer Referenzfermentation zu vergleichen. Zudem sollte das Aroma nach weiterer Verarbeitung zu einem genussfähigen Produkt in Form von Modellschokolade charakterisiert werden (Arbeitshypothesen 4 – 7).

Für die Untersuchungen zur Aromabildung sollten Methoden des Sensomics Ansatzes eingesetzt werden, um Unterschiede in der Aromafraktion zwischen den Proben instrumentell analytisch und sensorisch zu erfassen. Mit der GC-O und AEVA sollten zunächst die geruchsaktiven Verbindungen identifiziert werden, um das Aromaprofil der Proben vergleichen zu können. Die Schlüsselverbindungen sollten anschliessend mittels SIVA quantifiziert und die OAV berechnet werden, um Rückschlüsse über ihren Beitrag zum Aromaprofil ziehen zu können. Um den Einfluss der Behandlung auf die nicht-flüchtigen qualitätsbestimmenden Inhaltsstoffe zu untersuchen, sollte der Fokus vor allem auf die Quantifizierung der monomeren Aromavorstufen, also den reduzierenden Zuckern D-Glucose und D-Fructose und den freien Aminosäuren, sowie den Veränderungen der monomeren Flavan-3-ole und niederpolymerisierten Proanthocyanidine gesetzt werden.



# 6 Methodenentwicklung

Folgend werden die Rohmaterialienherstellung und die Vorversuche mit den daraus gewonnenen Erkenntnissen beschrieben. Mithilfe dieser Ergebnisse wurde das Inkubationsprotokoll festgesetzt, wie es für die Versuche der drei Veröffentlichungen angewendet wurde. Um den in dieser Arbeit verwendeten Ansatz von der Inkubation von frischen Bohnen abzugrenzen, wird die Inkubation von unfermentiertem und getrocknetem Kakaomaterial folgend als „Feucht-Inkubation“ bezeichnet.

## 6.1 Rohmaterialien

Die unfermentierten und fermentierten Kakaobohnen stammen von einer Kakaofarm in Bijagua, Costa Rica. Für die Methodenentwicklung und die ersten zwei Veröffentlichungen wurden Kakaobohnen der Sorte Trinitario der Ernte 2016 verwendet. Für die dritte Publikation wurde eine neuere Charge fermentierter und unfermentierter Kakao der Ernte des Jahres 2020 verwendet, die auf die gleiche Weise hergestellt wurden.

Die reifen Schoten wurden geerntet, innerhalb von 24 h geöffnet und ein Teil der Bohnen (Charge 2016 ca. 600 kg, Charge 2020 ca. 100 kg) direkt durch Ausbreiten auf Trocknungstischen mit einem Maschenboden getrocknet, um ein Abfließen der überschüssigen Pulpe und eine gleichmäßige Durchlüftung zu gewährleisten. Die Bohnen wurden mehrmals täglich durchmischt und homogenisiert, bis ein Feuchtigkeitsgehalt unter 6 % erreicht wurde (ca. 10 Tage). Für die Vergleichsfermentation wurde ein weiterer Teil der Bohnen (ca. 800 kg) in die erste von vier stufenweise arrangierten Fermentationskisten überführt und mit Bananenblättern und Jutesäcken abgedeckt. Nach 48 h wurde die aerobe Phase durch den Transfer in die zweite Kiste eingeleitet und das Bohnen-Pulpe Gemisch wurde homogenisiert. Dieser Vorgang wurde nach ca. 72 h und 96 h wiederholt und die Fermentation schließlich nach ca. 120 h durch Ausbreiten auf Trocknungstischen abgebrochen. Die Trocknung der fermentierten Bohnen erfolgte auf die gleiche Art und Weise wie für die unfermentierten Bohnen beschrieben wurde. Die getrockneten Rohmaterialien wurden in Kunststoffsäcke gefüllt und mit Kabelbindern verschlossen in Jutesäcken verpackt nach Wädenswil (CH) versendet, wo sie bis zur Verwendung bei ca. 12 °C gelagert wurden.

### 6.2 Methoden

#### 6.2.1 Probenvorbereitung für Inkubationsversuche

Die unfermentierten Bohnen wurden mit einem Labor-Kakaobrecher (Limprimita cocoa breaker, Capco/Castlebroom Engineering, Ltd., Ipswich, U.K.) grob zerbrochen und die Schalen mittels Windsichter (Cocoa winnower large, Capco/Castlebroom Engineering, Ltd., Ipswich, U.K.) entfernt. Für die Inkubationsversuche mit Kakaonibs wurde der Kernbruch mit zwei Sieben mit einer Maschenweite von 3 mm und 6 mm gesiebt und nur Nibs innerhalb dieser Größenklasse verwendet.

#### 6.2.2 Rehydrierung der Kotyledonen

Um die Wasseraufnahmefähigkeit des Materials zu bestimmen, wurden 150 g Nibs abgewogen und 24 h in Wasser eingelegt. Anschließend wurde das überschüssige Wasser entfernt und die abgetropften Nibs zurückgewogen. Auf diese Weise wurde eine Aufnahmekapazität von ca. 53 % (80 g) des Ausgangsgewichts der Nibs ermittelt. Der Feuchtigkeitsgehalt der rehydrierten Nibs lag damit unter Berücksichtigung der Ausgangsfeuchtigkeit von 3 % (bestimmt mit der Trockenschrankmethode, siehe Anhang I) bei ca. 34 %. Laut Literatur beträgt der Feuchtigkeitsgehalt frischer Kakaosamen zwischen 32 – 46 %.<sup>26</sup> Daraus lässt sich schließen, dass die Kotyledonen annähernd auf den Ausgangswassergehalt rehydriert werden konnten. Um die Rehydrierung des Kakaomaterials zu unterstützen, wurden für weitere Versuche Nibs und Medium in dem oben ermittelten Verhältnis in Vakuumsäcke gefüllt, vakuumiert und für ca. 12 h im Kühlschrank bei 4 °C gelagert, bevor die Inkubation gestartet wurde (Abbildung 20). Durch dieses Vorgehen wurde sichergestellt, dass während der Feucht-Inkubation kein überschüssiges Medium vorhanden war, was zu einem Verlust der Inhaltsstoffe führen könnte.

#### 6.2.3 Inkubationsmedium

Für das Medium wurde Milchsäure als Säuerungsmittel verwendet, da ein Ziel der Versuche darin bestand, möglichst geringe Essigsäuregehalte im Material nach der Behandlung zu realisieren. Laut Literaturangaben beträgt die Konzentration von Milchsäure ca. 0,6 – 11,1 g/kg Kakao nach der Fermentation.<sup>122</sup> Für die Versuche wurde ein Zielgehalt im mittleren Bereich von ca. 5 g/kg Kakao festgesetzt. Unter Berücksichtigung der Wasseraufnahme muss die Konzentration des Mediums demnach 0,1 mol/L betragen, unter der Voraussetzung, dass das

## Methodenentwicklung

---

Medium und die enthaltene Milchsäure restlos von dem Kotyledongewebe aufgenommen werden. Durch Vorversuche wurde ermittelt, dass sich auf diese Weise ein pH-Wert im angestrebten Bereich zwischen 5,0 – 5,5 in den Kotyledonen einstellen ließ (Methode zur pH-Wert Messung siehe 7.1).



**Abbildung 20: Unfermentierte und getrocknete Kakaonibs mit Medium nach der Rehydrierung.**  
(Bildquelle: Schlüter, A. 2019)

Da bereits geringe Konzentrationen an Ethanol ab 2 – 3 % mikrobielles Wachstum hemmen können, wurden dem Medium 5 % Ethanol hinzugefügt.<sup>146</sup> Im Rahmen von internen Voruntersuchungen wurden die Keimzahlen aerober mesophiler Keime (AMK), anaerober mesophiler Sporenbildner (AMS), Hefen, Milchsäurebakterien und Essigsäurebakterien in den unfermentierten und getrockneten Nibs während der Feucht-Inkubation über 72 h (24 h anaerob und 48 h aerob) bestimmt. Es konnte kein mikrobielles Wachstum beobachtet werden. Die Keimzahlen lagen nach der Inkubation im Bereich der Ausgangskonzentration (interne unveröffentlichte Ergebnisse).<sup>147</sup>

### 6.2.4 Inkubations- und Trocknungsparameter

Da während der traditionellen mikrobiellen Fermentation Temperaturen von ca. 40 – 50 °C erreicht werden<sup>62</sup>, wurde eine Inkubationstemperatur von 45 °C festgesetzt, um die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen.

## Methodenentwicklung

---

In einer Versuchsreihe sollte die Zunahme an Aromavorstufen verifiziert, die nötige Inkubationsdauer und der Einfluss der Partikelgröße während der Inkubation ermittelt werden. Hierzu wurden anaerobe Feucht-Inkubationen mit ganzen Bohnen, mit geschälten Nibs und mit zerkleinerten Nibs (Pulver) über 120 h durchgeführt. Die Materialien wurden dazu in Portionen zu 150 g mit 80 g des Mediums rehydriert, wie es unter 6.2.2 – 6.2.3 beschrieben wurde und anschließend über 120 h bei 45 °C inkubiert. Alle 24 h wurde eine Probe entnommen und anschließend im Trockenschrank bei 40 °C über 24 h getrocknet.

Für die Überprüfung, ob die Behandlung zu einer Zunahme an Aromavorstufen führte, wurde eine abgewandelte Methode zur photometrischen Bestimmung der primären Aminogruppen auf der Grundlage der Methode von Church et al. (1983, 1985) angewendet.<sup>148,149</sup> Das Material wurde nach der gleichen Methodik wie in Publikation 3 beschrieben nach der Trocknung der Nibs aufgearbeitet, entfettet und mit Trifluoressigsäure Pufferlösung (TFA) nach Murthy et al. (1997) extrahiert (vergl. 7.3).<sup>150</sup> Die Extrakte wurden für die Bestimmung des Gehaltes an primären Aminogruppen verwendet. Die Methode und verwendete Kalibriergerade ist in Anhang II und Anhang III aufgeführt.

Die Mittelwerte aus jeweils drei separaten Probenaufarbeitungen sind in Abbildung 21 dargestellt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigten, dass die primären Aminogruppen durch die anaerobe Feucht-Inkubation von Kakaopulver, Kakaonibs und ganzer Bohnen zunahmten, was auf eine erfolgreiche Freisetzung freier Aminosäuren durch proteolytische Enzyme hindeutet. Zwischen der Verwendung von Pulver und Nibs bestand nur ein geringer Unterschied in der Dynamik der Zunahme. Nach 72 h Inkubationszeit konnte nur noch eine minimale Steigerung der primären Aminogruppen gemessen werden, sodass die Inkubationszeit für Folgeversuche auf 72 h festgelegt wurde. Da die Trocknung von Kakaonibs im Vergleich zur Trocknung von Pulver deutlich einfacher in der Probenhandhabung war und die Zunahme an primären Aminogruppen bei Verwendung ganzer Bohnen geringer ausfiel, wurde für weitere Versuche die Verwendung von Nibs festgelegt.

Die anaerob inkubierten Proben wurden durch einfaches Verkosten der vermahlenden getrockneten Nibs auf ihre sensorischen Eigenschaften überprüft. Sie zeigten ein schwaches Aroma und sehr stark ausgeprägte Bitterkeit und Adstringenz auf. Dies war vermutlich auf den begrenzten Kontakt mit Sauerstoff während der Behandlung zurückzuführen, der auf die Dauer der Trocknung begrenzt war, sodass nur eine geringe Oxidation und Polymerisation der Polyphenole erfolgen konnte.

## Methodenentwicklung

Daher wurde in einem weiteren Versuch die Feucht-Inkubation von Nibs unter aeroben Bedingungen über 72 h getestet. Hierfür wurde der Vakuumbbeutel nach der Rehydrierung geöffnet, mit O<sub>2</sub> befüllt und erneut versiegelt. Die Inkubation und Trocknung erfolgten nach der gleichen Vorgehensweise. Sensorisch zeigte die aerob inkubierte Variante im Gegensatz zu den anaerob inkubierten Probe ein typisches Kakaoaroma, geringe Säure, Adstringenz und Bitterkeit. Die Bestimmung der primären Aminogruppen zeigte ebenfalls eine Zunahme von 6,3 mg/g ffTS im unfermentierten und getrockneten Rohmaterial auf 14,7 mg/g ffTS nach der aeroben feucht-Inkubation. Im fermentierten Referenzmaterial wurde ein etwas höherer Gehalt von 17,2 mg/g ffTS gemessen (Abbildung 21).

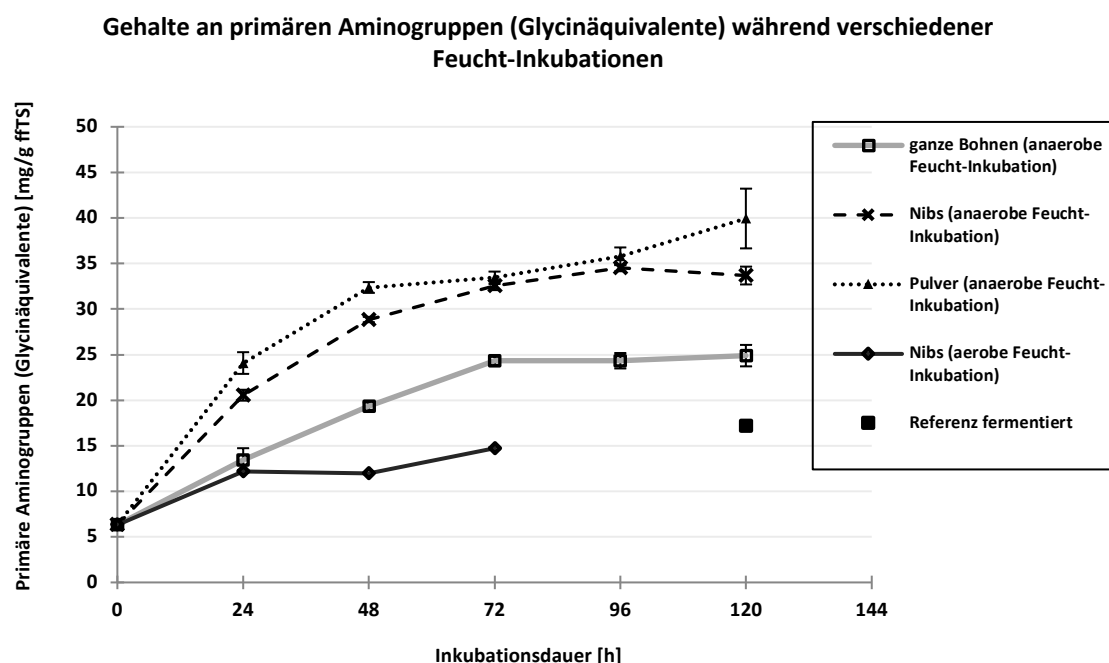


Abbildung 21: Entwicklung der gemessenen Gehalte an primären Aminogruppen während der anaeroben Feucht-Inkubation über 120 h von unfermentiertem Kakaopulver, unfermentierten Kakaonibs, ganzen unfermentierten Bohnen mit Testa, der aeroben Feucht-Inkubation von unfermentierten Kakaonibs über 72 h und der fermentierten Referenzprobe.

Da eine annähernd vergleichbare Zunahme an primären Aminogruppen im Vergleich zum fermentierten Material und positive sensorische Eigenschaften aus der aeroben Feucht-Inkubation resultierten, wurde diese Behandlung für weitere Untersuchungen beibehalten. Das Vorgehen zur Feucht-Inkubation von unfermentierten und getrockneten Kakaonibs ist in Abbildung 22 als Flussdiagramm dargestellt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit den Ergebnissen der Methodenentwicklung die Arbeitshypothesen 1 – 3 bestätigt werden konnten.

## Methodenentwicklung

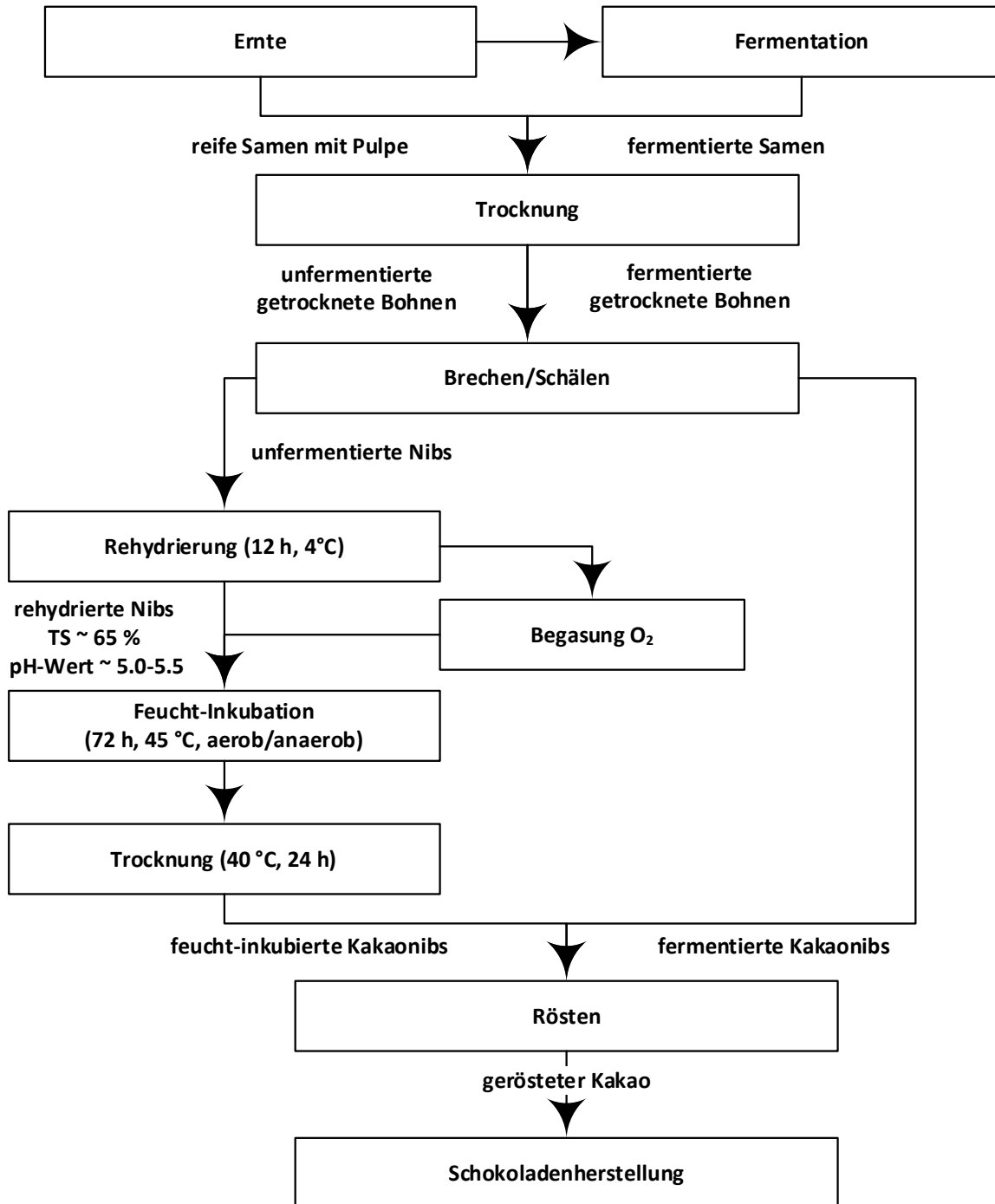


Abbildung 22: Flussdiagramm der Feucht-Inkubation und Fermentation nach der Ernte

## 7 Kumulativer Teil der Dissertation

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Dissertation anhand ausgewählter wissenschaftlicher Publikationen dargestellt.

Im ersten Beitrag wurden die wichtigsten Aromastoffe im unfermentierten und getrockneten Rohmaterial, nach der Feucht-Inkubation und der traditionellen Fermentation identifiziert und quantifiziert. Gegenstand der zweiten Publikation war die Charakterisierung der Aromafraktion des Materials nach der Röstung und die sensorische Profilierung nach der Weiterverarbeitung zu Schokoladeprototypen. In der dritten Veröffentlichung wurde der Einfluss der Behandlung auf die qualitätsbestimmenden Inhaltsstoffe vor- und nach der Nacherntebehandlung bestimmt, um eine Aussage über die Veränderungen der Geschmacksstoffe und die Bildung von Aromavorstufen treffen zu können. Die drei Publikationen werden folgend abgebildet und mit kurzen Synopsen miteinander verknüpft. Im Anschluss erfolgt eine zusammenfassende Diskussion über die Ergebnisse und daraus abgeleiteten Erkenntnisse der Veröffentlichungen.

Die Publikationen wurden alle in der Fachzeitschrift *Journal of Agricultural and Food Chemistry* veröffentlicht.

## 7.1 Publikation 1

### **Novel time- and location-independent postharvest treatment of cocoa beans: investigations on the aroma formation during "moist incubation" of unfermented and dried cocoa nibs and comparison to traditional fermentation**

**Schlüter, A.;** Hühn, T.; Kneubühl, M.; Chatelain, K.; Rohn, S.; Chetschik, I.

*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68, 10336–10344

**Impact Factor 2020 = 5.279**

#### Synopse:

Die traditionelle Fermentation von Kakaobohnen ist für die Aromabildung und Freisetzung von Aromapräkursoren von entscheidender Bedeutung. Einerseits wird die enzymatische Bildung von Aromapräkursoren in der Bohne durch den mikrobiellen Abbau der Kakaopulpe und die damit verbundene Anreicherung von Essigsäure im Kakaosamen ermöglicht. Andererseits muss die Essigsäure während der weiteren Verarbeitung der Kakaobohnen wieder ausgetrieben werden. Der Beitrag von Aromastoffen, die mikrobiellen Ursprungs sind und durch Diffusion in die Bohne gelangen, ist nicht vollständig aufgeklärt. Durch eine direkte Trocknung der Bohnen nach der Ernte, werden lager- und transportfähige Bohnen erhalten, deren Enzymkomplex aktiv ist. Durch eine gezielte Applikation der Schlüsselparameter, die während der mikrobiellen Fermentation für die erwünschte Aromapräkursoren- und Aromabildung, sowie die Transformation der Polyphenole von Bedeutung ist, sollten vergleichbare Reaktionen in unfermentierten und getrockneten Kakaobohnen durch die Feucht-Inkubation induziert werden. Ziel dieser Untersuchung war die Identifizierung und Quantifizierung der wichtigsten Aromastoffe im verwendeten Rohmaterial vor- und nach der Feucht-Inkubation im Vergleich zur traditionellen Fermentation. Extrakte der Rohmaterialien wurden mittels SAFE-Destillation gewonnen und mittels GC-O eine vergleichende AEVA durchgeführt, um die aroma-aktiven Verbindungen der Proben zu ermitteln und anhand von FD-Faktoren zu gewichten. Mithilfe von GC-MS, den orthonasalen Geruchsqualitäten und den ermittelten Retentionsindices der Verbindungen wurden die Aromastoffe identifiziert. Ausgewählte Aromastoffe wurden anschließend mithilfe einer SIVA mittels GC-MS quantifiziert, um qualitative und quantitative



## Kumulativer Teil der Dissertation

---

Vergleiche über die Zusammensetzung der Aromafraktion der unterschiedlichen Materialien zu ermöglichen. Zudem wurde mithilfe eines Sensorikpanels ein Geruchsprofil erstellt.

Das Rohmaterial für diese Studie stammte von einer Farm in Costa Rica (Ernte 2016). Während der Ernte wurde ein Teil der Bohnen direkt getrocknet, womit die Fermentation weitestgehend unterbunden werden konnte und die Bohnen somit lager- und transportfähig waren. Der andere Teil der Ernte wurde einer traditionellen Kastenfermentation unterzogen, wie es auf der Farm üblich ist. Die unfermentierten und fermentierten Kakaobohnen wurden nach Wädenswil (CH) transportiert, wo die Durchführung der Versuche und die Analysen in den Laboratorien und Technikumsräumen der Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften (ZHAW) stattfand.

Der Eigenanteil dieser Publikation liegt bei 70 %.

Reprinted with permission from Schlüter, A.; Hühn, T.; Kneubühl, M.; Chatelain, K.; Rohn, S.; Chetschik, I. Novel Time- and Location-Independent Postharvest Treatment of Cocoa Beans: Investigations on the Aroma Formation during "Moist Incubation" of Unfermented and Dried Cocoa Nibs and Comparison to Traditional Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2020; 68 (38): 10336-10344. Copyright 2020 American Chemical Society

# Novel Time- and Location-Independent Postharvest Treatment of Cocoa Beans: Investigations on the Aroma Formation during “Moist Incubation” of Unfermented and Dried Cocoa Nibs and Comparison to Traditional Fermentation

Ansgar Schlüter, Tilo Hühn, Markus Kneubühl, Karin Chatelain, Sascha Rohn, and Irene Chetschik\*<sup>✉</sup>

Life Sciences and Facility Management, Zurich University of Applied Sciences (ZHAW), 8820 Wädenswil, Switzerland

## Supporting Information

**ABSTRACT:** The aroma properties of cocoa nibs obtained by applying a novel postharvest treatment were investigated using methods of the molecular sensory science approach, i.e., solvent extraction and solvent-assisted flavor evaporation, aroma extract dilution analysis (AEDA), stable isotope dilution analysis, calculation of odor activity values (OAVs), and orthonasal sensory evaluation; those properties were then compared to the unfermented and dried raw material and a traditionally fermented sample of the same harvest. For the treatment, unfermented and dried cocoa nibs were, first, rehydrated with lactic acid and ethanol solution to adjust the pH value to 5.1 and, second, incubated under aerobic conditions for 72 h at 45 °C and subsequently dried. This treatment was used to induce enzymatic reactions within the cotyledon matrix, which also occur inside the bean during microbial fermentation of the surrounding fruit pulp. The results of the AEDA showed that many of the key aroma compounds found in fermented and dried cocoa increased during the incubation treatment. Especially some “fruity” esters were found with an equal or even higher flavor dilution (FD) factor in the incubated sample compared to the fermented sample, whereas the fermented sample showed high FD factors for “pungent, sour” and “sweaty” acids, such as acetic acid and 2- and 3-methylbutanoic acids. The quantitative data and calculated OAVs for the samples supported the findings of the AEDA, underlining the potential of this approach as a controllable and reproducible alternative postharvest treatment.

**KEYWORDS:** *cocoa postharvest treatment, cocoa incubation, cocoa fermentation, cocoa aroma formation, stable isotope dilution analysis (SIDA)*

## INTRODUCTION

Postharvest treatment of fresh cocoa beans is a crucial step along the processing chain from the tree to a finished product, like chocolate. During fermentation and drying, the adhering pulp of the beans is removed, the germ is inactivated, and moisture in the beans is reduced to provide storability of raw cocoa. Moreover, it is a very important step for the formation of cocoa aroma and taste as a result of biochemical processes leading to the liberation of aroma precursors, formation of aroma compounds, and transformation of taste-active compounds, such as polyphenols.<sup>1,2</sup>

During standard postharvest treatment, cocoa pods are opened manually after harvest and the fresh cocoa beans with the adhering mucilaginous pulp are removed. The bean–pulp mass is then usually heaped up or filled in wooden fermentation boxes or baskets and subsequently covered.<sup>3</sup> These processes are usually not performed in a sterile environment, and non-sterile instruments and fermentation containers are used; therefore, the mass is inoculated with ubiquitous microbial flora, leading to a spontaneous fermentation.<sup>1</sup> In the initial phase of fermentation, yeasts are dominant and degrade the cocoa pulp surrounding the cocoa beans, metabolizing carbohydrates under anaerobic conditions, leading to the formation of ethanol and carbon dioxide.<sup>4</sup> As a result of pectinolytic activity of the involved yeasts, pulp liquefies and drains off.<sup>5</sup> After the yeasts, lactic acid bacteria dominate the fermentation and lactic acid is produced. During the subsequent aerobic phase of fermentation, supported

by occasional mixing or turning of the mass, acetic acid bacteria metabolize ethanol to acetic acid, causing a rise in the temperature up to approximately 50 °C.<sup>3</sup> The pH value of the cocoa beans drops as a result of the uptake of lactic and acetic acids from initially approximately 6.4 down to 4.0–5.0.<sup>4</sup> This induces the inactivation of the embryo and initiates the degradation of cell walls and membranes, facilitating contact of endogenous enzymes with matrix ingredients, such as proteins, carbohydrates, and polyphenols, within the cytoplasm throughout the bean.<sup>6,7</sup> During this treatment, important aroma precursors, such as peptides, amino acids, and glucose and fructose are liberated.<sup>8,9</sup> Furthermore, polyphenols are oxidized and transformed, resulting in the browning of the bean and a reduction of bitterness and astringency.<sup>10,11</sup> Typically, after 5–7 days of fermentation, the beans are then spread for sun drying on the ground or trays, until the moisture content of the beans is below approximately 7%, which provides storability for transportation.<sup>12</sup> An alternative drying method is using artificial dryers with moderate temperatures up to 60 °C.<sup>3</sup> During the

**Special Issue:** 12th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry and Biology

**Received:** September 28, 2019

**Revised:** December 14, 2019

**Accepted:** December 16, 2019

**Published:** December 30, 2019

drying process, oxidation and polymerization of polyphenols continue and undesired volatile acids are reduced to some extent.<sup>13</sup> Already after drying, thermally induced compounds, such as Strecker aldehydes, furanones, and pyrazines, can be detected in low contents.<sup>14,15</sup>

Cocoa bean fermentation can be considered as a spontaneous process, which is not easy to control; natural fluctuations of raw material, unstandardized fermentation techniques, and natural variables, such as changing weather conditions, during postharvest processing have a great influence on the final quality of the dried product.<sup>1,16</sup> Therefore, quality fluctuations are often an issue in the chocolate industry.

A lot of previous research has focused on investigating the influence of different fermentation methods, such as heap and box fermentations, pre-conditioning of the beans in terms of partial removal of the pulp or pod-storage periods, the influence of the microbial flora on the cocoa bean, and the use of starter cultures, with the aim for a better process control.<sup>17–20</sup> Moreover, since the 1960s, *in vitro* trials with pH-adjusted solutions and controlled temperature profiles based on the traditional fermentation technique/process were conducted, to investigate enzymatic degradation of dried protein extracts from cocoa beans, with the aim to possibly understand the processes within the cocoa beans induced by fermentation more thoroughly.<sup>21</sup> Later such “fermentation-like incubation” or “artificial fermentation” trials were conducted with fresh whole beans, to mimic the crucial parameters of natural fermentation without proliferation of microorganisms aiming to study in depth the chemical and structural changes inside cocoa beans and to possibly gain a better process control during postharvest treatment.<sup>22–24</sup> This way, it could be shown that not the microorganisms themselves but their metabolism and metabolites create the conditions in the fermentation heap and beans, i.e., the rise in the temperature, the acidification of the tissue of heap and beans, and thereby inactivation of the embryo, which are all factors facilitating the most important biochemical transformations within the beans. These crucial steps lead to the diffusion and homogenization of soluble constituents throughout the bean, enabling the contact of enzymes and substrates until the beans are dried to their final moisture content of approximately 7%.<sup>6,8</sup> Further research demonstrated that a phase inversion within the bean takes place during fermentation, which leaves aqueous inclusions with dissolved constituents trapped inside a continuous fat phase.<sup>25</sup> On the contrary, when fresh beans are dried instantly after harvest, the seed also loses viability and the same phase inversion takes place but there is no prior release and homogenization of enzymes and substrate into the aqueous phase within the beans; therefore, potential reactants for aroma and aroma precursor formations stay separated, unless the beans would be further processed with moisture.<sup>25</sup>

The activity of the remaining enzymes in under- or unfermented cocoa was also the subject of a prior investigation.<sup>26</sup> *In vitro* incubation trials with defatted cocoa powders made from unfermented and dried cocoa showed sufficient remaining activity to reach equal aroma precursor concentrations compared to regular fermented cocoa.

In a more recent study investigating incubations of fresh cocoa beans in acetic acid solutions, it was reported for the first time that a prototype chocolate was made from the material after drying.<sup>23</sup> First results showed pleasant and typical chocolate taste with slight astringency, bitterness, and acidity. However, the sensory data were not published, and aroma formation

during incubation of cocoa beans has not yet been analyzed on a molecular level.

Although incubation-like fermentation of fresh beans could be proven as an alternative postharvest treatment technique, it is not yet feasible to be successfully implemented on farm sites, because of the high economical costs for farmers, who would be required to put a sophisticated infrastructure in place.

To possibly overcome this problem, a novel approach for postharvest treatment has been set up. Unfermented and dried cocoa nibs, thus, storable and easy to transport, were used to test a time- and location-independent postharvest treatment by means of rehydration, adjusting the pH of the nibs, followed by incubation with subsequent artificial drying. The aim of this study was to investigate the effect of such an incubation treatment of unfermented and dried cocoa nibs on the resulting aroma constitution of the material after drying and to compare it (a) to the material before treatment and (b) with traditionally fermented and dried cocoa beans of the same harvest. For this reason, methodologies of the molecular sensory science approach, such as sensory analysis, screening for aroma compounds by gas chromatography–olfactometry (GC–O) in combination with aroma extract dilution analysis (AEDA), and quantitation by stable isotope dilution analysis (SIDA), were used,<sup>27</sup> with the aim to gain a better understanding on the aroma formation during incubation.

## MATERIALS

**Chemicals.** For identification and determination of retention indices, the following chemicals were used (sources given in parentheses): acetic acid, 4-allyl-2-methoxyphenol, butanoic acid, 2,3-diethyl-5-methylpyrazine, dimethyl trisulfide, 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazin, ethyl 2-methylbutanoate, ethyl 3-methylbutanoate, ethyl 4-methylpentanoate, ethyl methylpropanoate, ethyl 3-phenylprop-2-enoate, ethyl 3-phenylpropionate, 3-ethylphenol, ethyl phenylacetate, 2-heptanol, 3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(*SH*)-one, 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(*2H*)-furanone, 2-isobutyl-3-methoxy-pyrazine, 2-isopropyl-3-methoxy-pyrazine, linalool, 2-methoxyphenol, 2- and 3-methylbutanals, 3-methyl-1-butanol, 2- and 3-methylbutanoic acids, 3-methylindole, 2-methyl-3(methyl-dithio)furane, methyl 3-phenylprop-2-enoate, methylpropanoic acid, (*E,E*)-2,4-nonadienal, (*E,Z*)-2,6-nonadienal, 1-octen-3-one, phenylacetaldehyde, phenylacetic acid, 2-phenylethanol, 2-phenylethyl acetate (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland), 2-heptanol acetate (BOC Sciences, Shirley, NY, U.S.A.), and *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal (AromaLAB GmbH, Martinsried, Germany).

For quantitation, the following isotopically substituted standards were used (sources given in parentheses): 2-(<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)methylbutanal, ethyl 3-(<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)methyl-1-(2,2,3,4,4,4-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>)butanoate, (<sup>2</sup>H<sub>6</sub>)dimethyl trisulfide, 2-(<sup>2</sup>H<sub>5</sub>)ethyl-3,6-dimethylpyrazine, 3-(<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)methyl-(2,2,3,4,4,4-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>)-butanoic acid, ethyl (2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>)phenylacetate, 2-(<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)-methoxyphenol, 2-(2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>)phenylethanol, 4-ethyl-(2,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)-phenol, 2-methyl-5-(<sup>13</sup>C)methyl-4-hydroxy-2,3-dihydro-(5-<sup>13</sup>C)furan-3-one (AromaLAB GmbH, Martinsried, Germany), and (<sup>13</sup>C<sub>2</sub>)acetic acid (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland).

For the incubation trials, lactic acid (Sigma-Aldrich, Inc., Buchs, Switzerland) and ethanol (Alcosuisse AG, Bern, Switzerland) were used.

**Raw Materials.** Cocoa of Trinitario variety was obtained from a cocoa supplier in Costa Rica during the harvest of 2016. The pods were harvested and opened within 24 h. The bean–pulp mass was removed and transferred to the first of four perforated wooden fermentation boxes arranged in tiers with a capacity of approximately 800 kg of bean–pulp mass. The mass was covered with banana leaves and fermented for 48 h before it was transferred to the next box in to aerate and mix the mass. This mixing step was repeated after approximately 72 and 96 h, respectively, before fermentation was stopped by drying after approximately 120 h. The beans were dried in a drying hall on tables

**Table 1.** Odor-Active Compounds Identified in Aroma Distillates Isolated from Incubated and Dried Cocoa, Unfermented and Dried Cocoa, and Traditionally Fermented and Dried Cocoa during AEDA

number <sup>b</sup>	odorant <sup>c</sup>	odor quality <sup>d</sup>	retention index			FD factor <sup>e</sup>	
			FFAP	OV-1701	incubated cocoa	unfermented cocoa	fermented cocoa
1	2- and 3-methylbutanals <sup>f</sup>	malty		714	8 <sup>e</sup>		
2	ethyl methylpropanoate <sup>f</sup>	fruity	954	810	64		64
3	ethyl 2-methylbutanoate <sup>g</sup>	fruity	1041	905	128	128	512
4	ethyl 3-methylbutanoate <sup>g</sup>	fruity	1059	908	64	16	64
5	ethyl 4-methylpentanoate <sup>g</sup>	fruity	1180		32	32 <sup>i</sup>	4
6	3-methyl-1-butanol <sup>g</sup>	malty	1204		16	4	
7	2-heptanol acetate <sup>g</sup>	fruity	1255		32	16 <sup>i</sup>	4
8	1-octen-3-one <sup>h</sup>	mushroom-like	1293	1072	32	4 <sup>i</sup>	32
9	2-heptanol <sup>g</sup>	citric, sweet	1313		32	32 <sup>i</sup>	128
10	dimethyl trisulfide <sup>h</sup>	cabbage-like	1360	967			128
11	unknown	earthy	1403			32	32
12	2-isopropyl-3-methoxypyrazine <sup>h</sup>	bell pepper-like	1418		32	32	32
13	acetic acid <sup>g</sup>	pungent, sour	1441		256	128	1024
14	2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine <sup>h</sup>	earthy	1450	1152	32	8	128
15	2,3-diethyl-5-methylpyrazine <sup>h</sup>	earthy	1483	1228	4	16 <sup>i</sup>	4
16	unknown	bell pepper-like	1498			4	4
17	2-isobutyl-3-methoxypyrazine <sup>h</sup>	bell pepper-like	1510	1241	128	64	256
18	linalool <sup>e</sup>	citrus-like, bergamot-like	1543	1195	16		16
19	methylpropanoic acid <sup>g</sup>	pungent, sweaty	1557				512
20	( <i>E,Z</i> )-2,6-nonadienal <sup>g</sup>	fatty, green	1572			4	4
21	butanoic acid <sup>g</sup>	rancid	1617		8	16	16
22	phenylacetaldehyde <sup>h</sup>	sweet, honey	1634	1193	32		16
23	2-methyl-3(methylthio)furan <sup>h</sup>	meaty, nutty	1653	1271			64
24	2- and 3-methylbutanoic acids <sup>h</sup>	pungent, sweaty	1666		128	16	512
25	unknown	fruity, cinnamon-like	1676		128		
26	( <i>E,E</i> )-2,4-nonadienal <sup>h</sup>	fatty, green	1686	1348	32	4 <sup>i</sup>	4
27	unknown	meaty, nutty	1712			8	256
28	ethyl phenylacetate <sup>g</sup>	flowery, fruity	1783	1364	32	4	64
29	2-phenylethyl acetate <sup>g</sup>	dried fruits-like, flowery	1802	1477	256	16	256
30	2-methoxyphenol <sup>g</sup>	smoky	1854	1226	16	4	1024
31	ethyl 3-phenylpropionate <sup>h</sup>	dried fruits-like, flowery	1873		64	16	
32	2-phenylethanol <sup>g</sup>	flowery	1896	1283	1024	256	1024
33	<i>trans</i> -4,5-epoxy-( <i>E</i> )-2-decenal <sup>h</sup>	metallic	1996		8	16	
34	unknown	sweet, fruity	2020		8		
35	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i> )-furanone <sup>h</sup>	caramel-like	2035	1240	64	16	64
36	methyl 3-phenylprop-2-enoate <sup>h</sup>	fruity, cinnamon-like	2068		4		16
37	ethyl 3-phenylprop-2-enoate <sup>g</sup>	fruity, cinnamon-like	2122		512	256	256
38	4-allyl-2-methoxyphenol <sup>h</sup>	smoky	2164		4	4 <sup>i</sup>	4
39	3-ethylphenol <sup>h</sup>	phenolic, animalic	2188		256	128 <sup>i</sup>	1024
40	3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5 <i>H</i> )-one <sup>h</sup>	seasoning	2208	1347	128	8	64
41	unknown	flowery	2314		8		64
42	unknown	cardboard-like	2326		4	8	16
43	3-methylindole <sup>h</sup>	mothball-like	2490				4
44	phenylacetic acid <sup>g</sup>	beeswax-like	2576		4	4	64

<sup>a</sup>Flavor dilution factor determined by AEDA on capillary free fatty acid phase (FFAP). <sup>b</sup>Number of identified compound based on the retention index on FFAP. <sup>c</sup>Odorant name. <sup>d</sup>Odor quality perceived at the sniffing port. <sup>e</sup>Flavor dilution factor determined by AEDA on capillary OV-1701. <sup>f</sup>Identification based on the retention index and odor quality of the compound found in the literature.<sup>14,15</sup> <sup>g</sup>Identification by comparison of the odor quality at the sniffing port, mass spectrum (EI mode), and retention index on FFAP to the reference substance. <sup>h</sup>Identification by comparison of the odor quality at the sniffing port and retention index on FFAP to the reference substance. <sup>i</sup>Substances not yet reported in unfermented and dried cocoa.

for approximately 10 days under continuous mixing of the cocoa beans. For the unfermented material, the bean–pulp mass was directly dried with the same method. The dried fermented and unfermented beans were filled in jute bags and shipped to Switzerland. Until further use, the beans were stored at 12 °C.

**Incubation of Cocoa Material.** To obtain the nibs for incubation trials, the beans were broken (Limprimita cocoa breaker, Capco/

Castlebroom Engineering, Ltd., Ipswich, U.K.), deshelled (cocoa winnower large, Capco/Castlebroom Engineering, Ltd., Ipswich, U.K.), and classified by manually sieving through a 6 and 3 mm sieve, to make sure only nibs within this size range were used.

Eight portions of 150 g ( $\pm 0.1$  g) of unfermented and dried cocoa nibs were filled into polypropylene vacuum bags with the size of 20 × 30 cm (VC999 Verpackungssysteme AG, Herisau, Switzerland). To each

bag, 80 g ( $\pm 0.1$  g) of 0.1 mol/L lactic acid solution containing 5% (v/v) ethanol was added, to adjust the pH value from 6.3 to 5.1 in the nibs and reach a final moisture content of 35% as determined in pre-trials. The addition of ethanol resulted in the suppression of the proliferation of microorganisms because it could be proofed in preliminary experiments (unpublished results). The bags were evacuated and sealed with a vacuum chamber machine (type K4, VC999 Verpackungssysteme AG, Herisau, Switzerland) to a pressure of <200 Pa and stored for 12 h at 4 °C to rehydrate the cocoa samples prior to incubation. Subsequently, the bags were opened and fumigated with oxygen to simulate the aerobic phase of traditional fermentation (type Biogon, PanGas AG, Dagmersellen, Switzerland) using the vacuum chamber machine (as described above) and sealed afterward, respectively. The incubations were performed in a laboratory incubator (B 5042, Heraeus GmbH, Hanau, Germany) at 45 °C for 72 h, mixing the nibs every 12 h by manual shaking of the bags. To stop the treatment, the sample bags were opened and the material of all bags was mixed before drying in aluminum trays with a layer thickness of a maximum of 1 cm under occasional turning in a laboratory oven with air circulation (VD23, Binder GmbH, Tuttlingen, Germany) at 40 °C for 24 h. Thereby, the final products reached a moisture content of <6%. The samples are hereafter referred to as “incubated”, “unfermented”, and “fermented” in the text. The incubation of the beans was performed under strict aerobic conditions as a result of the fact that sensory evaluations of cocoa materials obtained from incubation trials for 72 h under aerobic conditions showed more pleasant aroma qualities in contrast to the samples incubated under anaerobic conditions, as determined during pre-studies (unpublished data).

## METHODS

**Measurement of the pH Value.** For the determination of the pH value, 5  $\pm$  0.1 g of cocoa bean mass was frozen with liquid nitrogen and milled with a laboratory hammer mill (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Germany). Then, 45 mL of boiling deionized water was added. Before the pH value was measured (pH-meter type 827 pH lab, Metrohm AG, Herisau, Switzerland), the cocoa and deionized water slurry was cooled to 20 °C by stirring in a thermostated water bath.

**Measurement of the Moisture Content.** A total of 5  $\pm$  0.1 g of sample was milled, as described above, and dried in a laboratory oven (VD23, Binder GmbH, Tuttlingen, Germany) at 103  $\pm$  1 °C for 4–6 h using sea sand for homogeneous drying until weight equilibrium was reached.

**Orthonasal Sensory Analysis.** The sensory analysis was performed with a panel of six trained panelists. The panel was trained with the following reference substances dissolved in sunflower oil for the given aroma perception given in parentheses: 3-methyl 1-butanol (malty), ethyl 2-methylbutanoate (fruity), phenylacetaldehyde (floral), acetic acid (pungent), and 3-methylbutanoic acid (sweaty) (Sigma-Aldrich, Inc., Buchs, Switzerland).

For the evaluation of the cocoa material, 20  $\pm$  1 g of sample was milled as described above and subsequently filled into a closed Erlenmeyer flask. For the orthonasal evaluation, the samples were randomized and the panel assessed the intensity of the selected aroma attributes with scores between 0 (not detectable) and 5 (strong). The results were calculated as means ( $n = 6$ ).

**Isolation of Volatiles for GC–O.** Aroma-active compounds were isolated in the same manner as previously described.<sup>28</sup>

For the isolation of the volatile compounds, 20 g of cocoa material was frozen in liquid nitrogen, milled with a laboratory hammer mill (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Germany), and extracted with 200 mL of diethyl ether by vigorous stirring at room temperature for 12 h. Separation of the volatiles from the non-volatiles was performed using a solvent-assisted flavor evaporation (SAFE) distillation unit, and the extract was subsequently concentrated to a final volume of 300  $\mu$ L as previously described.<sup>28</sup>

**Quantitation of Selected Aroma Compounds.** For the quantitation of relevant aroma compounds in the samples identified by GC–O, SIDA was applied. Sample preparation was performed in the same

manner as previously described.<sup>28,29</sup> To detect compounds in high and low concentrations, 2 and 50 g of sample were extracted with 20 and 200 mL of diethyl ether, respectively, after isotopically substituted internal standards were added. To calculate the concentrations of the target compounds, a three-point calibration line was used. The calibration lines were generated by analysis of mixtures of analytes and isotopically substituted standards in three different ratios and plotting the area ratios of selected ions of standard and analytes against the ratio of the respective concentrations. The absolute amounts of the analytes in the samples were determined via the calibration line. The ions used for quantitation and the calibration lines can be found in Table S1 of the Supporting Information. All samples were analyzed in triplicates, and the results were calculated as means.

**GC–O and Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS).** GC–O in combination with AEDA, identification, and SIDA with GC–MS of selected compounds was performed in the same manner, using the same equipment, as previously described.<sup>28,29</sup>

## RESULTS AND DISCUSSION

**Identification of Odor-Active Constituents in Fermented, Unfermented, and Incubated Samples.** Table 1 shows the results of the performed AEDA. Overall, 44 compounds with a flavor dilution (FD) factor of >4 have been detected in the investigated cocoa materials: 39 compounds in the fermented–dried sample, 35 compounds in the incubated sample, and 32 compounds in the unfermented–dried sample, respectively. Thereby, 7 of the before mentioned aroma compounds with a FD factor of >4 could not be identified by the identification criteria mentioned in Table 1.

Many of the well-known key aroma compounds of fermented and dried cocoa, such as ethyl 2- and ethyl 3-methylbutanoates, acetic acid, 2-ethyl 3,5-dimethylpyrazine, 2,3-diethyl 5-methylpyrazine, 2-isopropyl-3-methoxy-pyrazine, 2-isobutyl-3-methoxy-pyrazine, butanoic acid, 2- and 3-methylbutanoic acids, 2-phenylethyl acetate, 2-methoxyphenol, 2-phenylethanol, 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone, ethyl phenylacetate, ethyl 3-phenylprop-2-enoate, 3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5*H*)-one, and phenylacetic acid, could be detected in the unfermented, incubated, and traditionally fermented samples. This is in agreement with the literature, where all of these key odorants are already detectable during AEDA or have been quantitated in unfermented cocoa.<sup>15,29</sup>

The incubated sample showed the highest FD factors for 2-phenylethanol (FD of 1024) and ethyl 3-phenylprop-2-enoate (FD of 512). The unfermented material showed lower FD factors in comparison to the other samples, with the highest FD factor of 256 for the floral 2-phenylethanol and the fruity ethyl 3-phenylprop-2-enoate in comparison to the fermented and incubated samples. In the fermented sample, the odorants acetic acid, 2-methoxyphenol, 2-phenylethanol, and 3-ethylphenol could be detected with the highest FD factor of 1024. Overall, the fermented sample showed more odor-active compounds with high FD factors.

Esters with fruity odors, such as ethyl methylpropanoate, ethyl 3-methylbutanoate, ethyl 4-methylpentanoate, 2-heptanol acetate, 2-phenylethyl acetate, ethyl 3-phenylpropionate, and ethyl 3-phenylprop-2-enoate, were analyzed with an equal or even higher FD factor in the incubated sample compared to the other samples, suggesting a possible biochemical formation during incubation.

In contrast to that, the traditionally fermented sample showed higher FD factors in comparison to the unfermented and incubated samples, especially for the unpleasant smelling odorants acetic acid, methyl propanoic acid, butanoic acid,

**Table 2.** Results of the Quantitation of the Odorants from Incubated and Dried Cocoa, Unfermented and Dried Cocoa, and Traditionally Fermented and Dried Cocoa

odorant <sup>a</sup>	content ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )					
	incubated cocoa		unfermented cocoa		fermented cocoa	
	mean	RSD <sup>b</sup> (%)	mean	RSD <sup>b</sup> (%)	mean	RSD <sup>b</sup> (%)
acids						
acetic acid	166000	5.1	377000	0.5	1050000	1.5
2-methylbutanoic acid	6470	1.1	2410	21.4	20100	2.5
3-methylbutanoic acid	3700	1.7	3270	35.5	72500	2.9
alcohols						
2-phenylethanol	1990	4.9	1970	1.5	1790	6.6
aldehydes						
3-methylbutanal	4480	4.7	139	33.1	622	9.4
2-methylbutanal	2010	3.5	60.7	10.2	705	1.3
esters						
ethyl phenylacetate	963	1.6	34.4	1.6	281	0.8
ethyl 3-methylbutanoate	120	6.9	<14		34.2	2.7
2-phenylethyl acetate	110	1.4	99.1	0.4	1300	1.2
ethyl 2-methylbutanoate	58.2	3.2	9.56	7.7	22.1	2.8
furanones						
4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	0.6	8.3	4.79	33.3	26.6	11
phenols						
2-methoxyphenol	0.19	24.2	1.11	11.2	221	6.0
3-ethylphenol	<1.4		<1.4		7.66	8.7
pyrazines						
2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	1.86	6.6	3.93	5.3	39.5	3.1
2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine	0.98	3.5	0.8	1.3	0.63	1.8
other odorants						
dimethyl trisulfide	<0.6		<0.6		2.5	15

<sup>a</sup>Odorant name. <sup>b</sup>Relative standard deviation was calculated from quantitative data obtained from three extractions of each sample.

and 2- and 3-methylbutanoic acids with FD factors of 1024, 512, 16, and 512, respectively. These acids are well-known as major compounds of fermented cocoa but have also been found in unfermented cocoa.<sup>15</sup>

Furthermore, methyl propanoic acid, dimethyl trisulfide and 2-methyl-3-(methylthio)furan were detected exclusively in the traditionally fermented cocoa with high FD factors, indicating a possible formation during microbial fermentation and presumably a subsequent diffusion into the cocoa beans.<sup>14,15</sup>

Linalool has only been detected in the incubated and fermented samples (FD of 16). This is in accordance with a previous study, indicating that linalool may be released from glycosides within the bean during postharvest treatment.<sup>29</sup> On the other hand, the malty odorant 3-methyl 1-butanol could only be detected in the unfermented (FD of 4) and incubated (FD of 16) samples, suggesting a possible degradation during fermentation into the corresponding acid or transformation to the respective ester. Further malty smelling compounds, such as the Strecker aldehydes 2- and 3-methylbutanals, were only perceivable in the incubated sample during AEDA with a relatively low FD factor of 8.

The heterocyclic odorants 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone and 3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5H)-one were analyzed with higher FD factors in the fermented and incubated samples. This is in accordance with another study, where both odorants were detectable in unfermented cocoa and increased during fermentation.<sup>15</sup>

**Quantitation of Selected Aroma Compounds in Fermented, Unfermented, and Incubated Cocoa Samples.** The results of the quantitation of selected aroma

compounds in the incubated and dried, unfermented and dried, and fermented and dried cocoa are shown in Table 2.

Among the acids, acetic acid was the most abundant compound in all of the samples, followed by 2- and 3-methylbutanoic acids and methylpropanoic acid. The incubated sample showed the lowest concentration of acetic acid (166 000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), followed by the unfermented sample (377 000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) and the fermented sample (1 050 000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). The values for the unfermented and fermented samples are well in alignment with the values found in the literature.<sup>14,15,30</sup> The incubated sample showed lower acetic acid concentrations, suggesting possible losses during incubation and drying, and clearly shows that acetic acid is not formed during the moist incubation as opposed to the traditional fermentation. Furthermore, 2-methylbutanoic acid was found in higher levels in the fermented sample (20 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) compared to the incubated and unfermented samples (6470 and 2410  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). 3-Methylbutanoic acid was found with 20-fold higher levels in the fermented sample (72 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) compared to the incubated (3700  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) and unfermented (3270  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) material. These acids are known to be formed during the aerobic phase of the fermentation by microbial conversion of the precursors leucine and isoleucine.<sup>31,32</sup> Moreover, they may also be formed enzymatically inside the bean during regular plant metabolism, although to a much lesser extent in comparison to the microbial formation. This way, their presence in the dried and unfermented cocoa seems reasonable and in alignment with the findings of previous investigations.<sup>15,33</sup> Furthermore, they have also been reported to be generated during the Strecker reaction in the presence of oxygen.<sup>34</sup> Even though the drying temperature after incubation

and during drying of the unfermented sample was below 40 °C, it is also possible that these acids derive from the Strecker degradation of amino acids during the drying process. High contents of short-chained carboxylic acids are undesired in the final product, because their sensory perception is described as mostly pungent, rancid, cheesy, or vomit-like.<sup>15,35</sup> Therefore, some of the downstream processes during chocolate manufacture, such as roasting and conching, aim at reducing these compounds.<sup>36</sup> Using the incubation as a postharvest treatment may therefore minimize processing times and costs, because these later downstream processes may not be needed.

For the quantitated alcohols, 2-phenylethanol was found in comparable concentrations (1990 µg/kg) in both the incubated and dried as well as the unfermented and dried material (1970 µg/kg). The content in the fermented and dried sample was a little lower in comparison (1790 µg/kg). In a previous study, it was shown that 2-phenylethanol is already present in small concentrations in unfermented and fresh cocoa beans and increases drastically during fermentation.<sup>29</sup> The occurrence of 2-phenylethanol in fermented cocoa has mainly been linked to the metabolism of yeasts via the Ehrlich pathway.<sup>37</sup> The presence of this compound in similar concentrations in the incubated, unfermented, and fermented samples however shows that an enzymatic formation or release from glucosides is also possible.<sup>33,38,39</sup> The lower amount of 2-phenylethanol in the traditionally fermented sample obtained in this investigation compared to the unfermented and incubated material might suggest that 2-phenylethanol is converted by microorganisms into further well-known cocoa aroma compounds, such as phenylacetic acid or 2-phenylethyl acetate.<sup>40</sup> The results of the quantitation of 2-phenylethyl acetate also support this assumption. This compound was the only ester that was found with a much higher concentration in the traditionally fermented sample (1300 µg/kg) compared to the incubated sample (110 µg/kg) and the unfermented sample (99.1 µg/kg). The incubated and dried sample contained higher levels of the esters ethyl 2- and ethyl 3-methylbutanoates (58.2 and 120 µg/kg) compared to the unfermented and dried (9.56 and <14 µg/kg) and fermented and dried (22.1 and 34.2 µg/kg) samples. Furthermore, a much higher level was found for ethyl phenylacetate (963 µg/kg) in the incubated sample than in the unfermented (34.4 µg/kg) and traditionally fermented (281 µg/kg) samples. The higher levels of esters in the incubated sample may be linked to the addition of 5% ethanol to the incubation medium, which may have resulted in a promoted formation of these esters via cocoa enzymes during incubation.

The Strecker aldehydes 2- and 3-methylbutanals were found with the highest concentrations in the incubated and dried sample (2010 and 4480 µg/kg), followed by the traditionally fermented sample (705 and 622 µg/kg) and unfermented and dried sample (60.7 and 139 µg/kg). The values given in the literature for 2- and 3-methylbutanals in fermented cocoa range between 1100 and 3900 µg/kg.<sup>14,15</sup> The values obtained in this study are well in line with those found in the literature; however, the levels of the traditionally fermented sample were analyzed in somewhat lower quantities. These aldehydes can derive from their corresponding amino acids by thermal formation but are also intermediates of the amino acid metabolism within plant cells.<sup>38,40</sup> The results may indicate a promoted release of the corresponding precursors, like amino acids, during incubation in comparison to the traditional fermentation and a subsequent conversion of those during the drying step. Furthermore, the addition of water to dry-processed foods is also known to

promote the release of Strecker aldehydes from precursors,<sup>41</sup> whereby oxazolines are assumed as potential precursors.<sup>42</sup> However, oxazolines could not be proven until now in dried foods. In a previous investigation, the quantitated levels of Strecker aldehydes in chocolates made from fermented and dried nibs applying a novel technological process using water without a traditional roasting step were comparable to the levels found in traditionally manufactured chocolate,<sup>28</sup> indicating that there must be precursors releasing Strecker aldehydes upon the reaction with water. Therefore, the high contents of the Strecker aldehydes in the incubated sample in comparison to the other two samples might be explained by the fact that those compounds are released from yet unknown precursors upon the contact of water during the moist incubation.

Among the furanones, 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone was found with the highest concentration in the fermented sample (26.6 µg/kg), followed by the unfermented (4.79 µg/kg) and incubated (0.6 µg/kg) samples. The values for the fermented and unfermented samples are in accordance with values given in the literature, whereby this compound could not be detected in unfermented cocoa and reached levels to approximately 35 µg/kg after fermentation and drying.<sup>14,15</sup> 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone is a known sugar degradation product, which is mostly supposed to be thermally generated; therefore, a formation during drying from carbohydrates seems possible to a small extent.<sup>15</sup> However, in comparison, the higher amounts obtained in the fermented sample might indicate a promoted microbial formation of the required precursors during fermentation and the formation of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone during drying.

2-Methoxyphenol was found in more than 200-fold higher concentrations in the fermented sample (221 µg/kg) compared to the unfermented (1.11 µg/kg) and incubated (0.19 µg/kg) samples, which is in accordance with concentrations given in the literature for unfermented and fermented samples.<sup>14,15,29</sup> This clearly indicates a fermentative formation with subsequent diffusion into the bean. Interestingly, the contents in the incubated and unfermented samples are very low, even though 2-methoxyphenol is also assumed to be formed enzymatically from ferulic acid inside the bean during fermentation and may also be formed thermally during drying.<sup>15</sup> The obtained results indicate that the availability of the presumed precursor ferulic acid, which may derive from lignin or glycosides, is much higher during fermentation. Thus, a microbial-induced release from the testa or pulp containing lignin or the corresponding glycosides seems reasonable.<sup>43</sup> An interesting fact is that the testa was removed prior to incubation, which also supports the assumption that the high content in the fermented sample mostly derives from outside the cotyledon. 3-Ethylphenol could only be quantified in the fermented sample (7.66 µg/kg), even though it was also detectable during AEDA in the other samples.

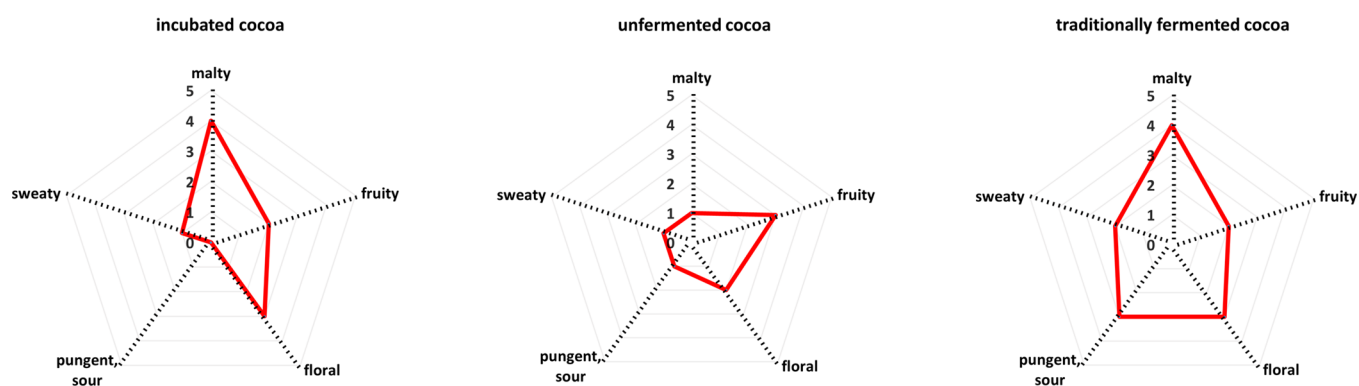
2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazine showed little differences between the different samples, with the highest value obtained in the incubated sample. However, contents found in the literature are about 15-fold higher, suggesting variation between the different types of cocoa used.<sup>14</sup> On the other hand, the values obtained for 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine showed greater variation between the different treatments in the investigated materials. The highest value was measured for the fermented sample (39.5 µg/kg), which is well in line with values found in the literature.<sup>14,15</sup>

Dimethyl trisulfide could not be detected in the incubated and unfermented samples but could be quantified in the fermented

**Table 3.** OAVs Calculated For Incubated and Dried Cocoa, Unfermented and Dried Cocoa, and Traditionally Fermented and Dried Cocoa

odorant <sup>a</sup>	odor threshold <sup>b</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	OAV		
		incubated cocoa	unfermented cocoa	fermented cocoa
acetic acid	124 <sup>c</sup>	1340	3040	8440
3-methylbutanal	13 <sup>c</sup>	340	11	48
ethyl 2-methylbutanoate	0.26 <sup>c</sup>	220	37	85
ethyl 3-methylbutanoate	0.62 <sup>c</sup>	190	<1	55
3-methylbutanoic acid	22 <sup>c</sup>	170	150	3300
2-methylbutanoic acid	203 <sup>d</sup>	32	12	99
2-methylbutanal	140 <sup>c</sup>	14	<1	5
2-phenylethanol	211 <sup>c</sup>	9	9	8
ethyl phenylacetate	300 <sup>e</sup>	3	<1	<1
2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	2.2 <sup>c</sup>	<1	2	18
2-methoxyphenol	16 <sup>c</sup>	<1	<1	14
2-phenylethyl acetate	233 <sup>d</sup>	<1	<1	6
4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	25 <sup>f</sup>	<1	<1	1
dimethyl trisulfide	2.5 <sup>c</sup>	<1	<1	1

<sup>a</sup>Odorant name. <sup>b</sup>Orthonasal threshold value determined in oil. <sup>c</sup>Orthonasal threshold value determined in oil according to ref 46. <sup>d</sup>Orthonasal threshold value determined in oil according to ref 47. <sup>e</sup>Orthonasal threshold value determined in oil according to ref 48. <sup>f</sup>Odor activity value calculated as the ratio of the amount in the sample to the threshold value determined in oil.

**Figure 1.** Orthonasal sensory profiles of the incubated and dried, unfermented and dried, and fermented and dried cocoa material.

sample with 2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , which is in line with values obtained in the literature.<sup>14</sup> In addition to that, this compound was only detectable in the fermented sample during AEDA.

Volatile sulfurous compounds, such as dimethyl trisulfide, can derive from enzymatic degradation of sulfur-containing amino acids, such as methionine.<sup>44</sup> Methionine can be found in cocoa beans, meaning that an enzymatic formation within the bean is possible. The exclusive presence of dimethyl trisulfide in the traditionally fermented sample might be related to the lysis of yeast cells, resulting in the release of sulfurous amino acids as precursors for the dimethyl trisulfide formation, as recently demonstrated for wines with elevated amounts of this odorant.<sup>45</sup>

**Odor Activity Values (OAVs) and Orthonasal Sensory Profiles.** The calculated OAVs are shown in Table 3. The highest values for all samples were calculated for acetic acid, with the fermented sample reaching an OAV of 8440, the unfermented sample reaching an OAV of 3040, and the incubated sample reaching an OAV of 1340, respectively. The sweaty 2- and 3-methylbutanoic acids were also among the most odor-active compounds in both the incubated and unfermented samples, respectively, but values reached in the fermented and dried sample were up to 20 times higher. This can also be seen in the aroma profiles given in Figure 1. The traditionally fermented sample reached higher scores for the attributes “pungent” and

“sweaty” compared to the incubated and unfermented samples. Furthermore, calculated OAVs for 2- and 3-methylbutanals in the incubated sample were 3–7-fold higher compared to the fermented sample. “Malty” notes were evaluated with equal intensity in the incubated and fermented samples by the sensory panel, but low intensities were perceived in the unfermented cocoa. Moreover, about 3-fold higher OAVs for the “fruity” esters ethyl 2- and ethyl 3-methylbutanoates were calculated for the incubated sample compared to the fermented sample. In addition to that, the fruity ethyl phenylacetate showed aroma activity only in the incubated sample, whereas 2-phenylethyl acetate reached an OAV of >1 only in the fermented sample. Although the incubated sample showed overall the highest OAV for the fruity smelling esters in comparison to the other samples, the unfermented sample was rated with the highest score for “fruity” during sensory analysis. “Floral” 2-phenylethanol reached comparable OAVs in all samples, reaching 9-fold the odor threshold level, although it was rated a little bit higher by the panel in the incubated and fermented material.

Furthermore, the fermented sample showed aroma activity values of >1 for the odorants 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine, 2-methoxyphenol, 2-phenylethyl acetate, dimethyl trisulfide, and 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, whereas these com-



pounds showed no aroma activity in the incubated and unfermented samples.

The study showed that the used incubation treatment of unfermented and dried cocoa facilitates contact of enzymes and substrates within the cotyledon tissue. The incubation clearly promoted the formation of many well-known key aroma compounds of cocoa beans, supposedly via enzymatic formation within the beans. On one hand, higher quantities of “malty” and “fruity” odorants were measured in comparison to the fermented sample, indicating an enzymatic formation of these compounds, presumably supported by aerobic conditions, the presence of ethanol during incubation, and a higher drying temperature. On the other hand, compounds linked to negative attributes as “pungent, sour” and “sweaty”, i.e., acetic acid and 2- and 3-methylbutanoic acids, have been quantitated with much lower concentrations in the incubated sample compared to the fermented sample, suggesting that “sweaty” and “pungent, sour” aroma compounds are preferably formed by microbial activity. However, these compounds were repeatedly reported to be among the key aroma compounds in cocoa, even though the positive contributions of these odorants on the overall perception of cocoa aroma has not yet been thoroughly investigated. The findings show that this novel postharvest treatment has the potential to serve as a controllable and reproducible postharvest treatment, yielding cocoa material with less microbial-originated aroma compounds, such as volatile acids. This could not only be of impact for traditional chocolate manufacture, where many of the processing steps, like roasting or conching, aim at reducing these compounds, but it is also of importance for new technologies, which process cocoa nibs without roasting.<sup>32</sup>

To fully understand the consequences of the different aroma compositions within the beans derived from raw materials and estimate the true potential of the moist incubation of unfermented and dried cocoa, future trials should include a roasting step and the measurement of the aroma-active compounds of the final product, chocolate.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.9b06119>.

Cocoa odorants, standards, selected ions ( $m/z$ ) of analytes and standards, and calibration lines used for quantitation (Table S1) (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Telephone: +41-58-934-5651. Fax: +41-58-934-5001. E-mail: [irene.chetschik@zhaw.ch](mailto:irene.chetschik@zhaw.ch).

### ORCID

Irene Chetschik: 0000-0002-7009-6357

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Markus Kneubühl for his outstanding technical support, all of the participants of the ZHAW Cocoa/Chocolate Sensory Panel, and the Sensory Systems Chemistry Group at Leibniz-LSB@TUM for providing the odor threshold values of ethyl phenylacetate and 3-ethylphenol.

## ■ ABBREVIATIONS USED

AEDA, aroma extract dilution analysis; FD, flavor dilution; FFAP, free fatty acid phase; GC–MS, gas chromatography–mass spectrometry; GC–O, gas chromatography–olfactometry; OAV, odor activity value; SAFE, solvent-assisted flavor evaporation; SIDA, stable isotope dilution analysis; ZHAW, Zurich University of Applied Sciences

## ■ REFERENCES

- (1) Lopez, A. S.; Dimick, P. Cocoa fermentation. In *Biotechnology: Enzymes, Biomass, Food and Feed*; Reed, G., Nagodawithana, T. W., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 1995; pp 561–577.
- (2) Nigam, P. S.; Singh, A. Cocoa and Coffee Fermentations. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2nd ed.; Blatt, C., Tortorello, M., Eds.; Elsevier, Inc.: Cambridge, MA, 2014; pp 485–492.
- (3) Schwan, R. F.; Wheals, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, *44*, 205–221.
- (4) Biehl, B.; Ziegler, G. Cocoa: Chemistry of processing—Production, products, and use. In *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*; Caballero, B., Ed.; Academic Press: Amsterdam, Netherlands, 2003; pp 1436–1448, 1448–1463.
- (5) Schwan, R. F.; Cooper, R. M.; Wheals, A. E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *21*, 234–244.
- (6) Roelofsens, P. A. Fermentation, drying, and storage of cacao beans. *Adv. Food Res.* **1958**, *8*, 225–296.
- (7) Quesnel, V. C. Agents inducing the death of cacao seeds during fermentation. *J. Sci. Food Agric.* **1965**, *16*, 441–447.
- (8) Rohan, T. A. The precursors of chocolate aroma: A comparative study of fermented and unfermented cocoa beans. *J. Food Sci.* **1964**, *29*, 456–459.
- (9) Voigt, J.; Heinrichs, H.; Voigt, G.; Biehl, B. Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa seeds. *Food Chem.* **1994**, *50*, 177–184.
- (10) Misnawi, S. J. Physico-chemical changes during cocoa fermentation and key enzymes involved. *Rev. Penelit. Kopi dan kakao* **2008**, *24*, 47–64.
- (11) De Taeye, C.; Eyamo Evina, V.; Caullet, G.; Niemenak, N.; Collin, S. Fate of anthocyanins through cocoa fermentation. Emergence of new polyphenolic dimers. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 8876–8885.
- (12) Fowler, M. S.; Coutel, F. Cocoa beans: From tree to factory. In *Beckett's Industrial Chocolate Manufacture and Use*; Beckett, S. T., Fowler, M. S., Ziegler, G. R., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, U.K., 2017; pp 9–49.
- (13) Jinap, S.; Thien, J.; Yap, T. N. Effect of drying on acidity and volatile fatty acids content of cocoa beans. *J. Sci. Food Agric.* **1994**, *65*, 67–75.
- (14) Frauendorfer, F. Zum Einfluss des Röstvorgangs auf die Bildung wertgebender Aromastoffe in Kakao. Ph.D. Thesis, Technical University of Munich, Munich, Germany, 2003 (in German).
- (15) Bagan, S. J. Einfluss von Fermentationsdauer und Röstung auf die Bildung von Aromastoffen und Aromaprekursoren in Konsumkakao. Ph.D. Thesis, Technical University of Munich, Munich, Germany, 2007 (in German).
- (16) Kongor, J. E.; Hinnah, M.; de Walle, D. V.; Afoakwa, E. O.; Boeckx, P.; Dewettinck, K. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile—A review. *Food Res. Int.* **2016**, *82*, 44–52.
- (17) Afoakwa, E. O.; Kongor, J. E.; Budu, A. S.; Mensah-Brown, H.; Takrama, J. F. Changes in biochemical and physico-chemical qualities during drying of pulp preconditioned and fermented cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *Afr. J. Food, Agric. Nutr. Dev.* **2014**, *2*, 9651–9670.
- (18) Crafaek, M.; Keul, H.; Eskildsen, C. E.; Petersen, M. A.; Saerens, S.; Blennow, A.; Skovmand-Larsen, M.; Swiegers, J. H.; Petersen, G. B.; Heimdal, H.; Nielsen, D. S. Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Res. Int.* **2014**, *63*, 306–316.

- (19) Said, M. B.; Jayawardena, M. P. G. S.; Samarakoddy, R. J.; Perera, W. T. Preconditioning of fresh cocoa beans prior to fermentation to improve quality: A commercial approach. *Planter* **1990**, *66*, 332–345.
- (20) Biehl, B.; Meyer, B.; Said, M. B.; Samarakoddy, R. J. Bean spreading: A method for pulp preconditioning to impair strong nib acidification during cocoa fermentation in Malaysia. *J. Sci. Food Agric.* **1990**, *51* (1), 35–45.
- (21) Biehl, B. Proteinhydrolyse während der Kakaofermentation in Abhängigkeit von Wechselwirkungen mit Polyphenolen unter anaeroben und aeroben Bedingungen (in German). *Z. Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1967**, *133*, 145–158.
- (22) Biehl, B.; Brunner, E.; Passern, D.; Quesnel, V. C.; Adomako, D. Acidification, proteolysis and flavour potential in fermenting cocoa beans. *J. Sci. Food Agric.* **1985**, *36*, 583–598.
- (23) Kadow, D.; Niemenak, N.; Rohn, S.; Lieberei, R. Fermentation-like incubation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.)—Reconstruction and guidance of the fermentation process. *LWT - Food Sci. Technol.* **2015**, *62*, 357–361.
- (24) Eyamo Evina, V.; De Taeye, C.; Niemenak, N.; Youmbi, E.; Collin, S. Influence of acetic and lactic acids on cocoa flavan-3-ol degradation through fermentation-like incubations. *LWT - Food Sci. Technol.* **2016**, *68*, 514–522.
- (25) Biehl, B. Veränderungen der subzellulären Struktur in Keimblättern von Kakaosamen (*Theobroma cacao* L.) während der Fermentation und Trocknung (in German). *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1973**, *153*, 137–150.
- (26) Jinap, S. M.; Nazamid, S.; Jamilah, B. Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effect on aroma precursor formation. *Food Chem.* **2002**, *78*, 407–417.
- (27) Schieberle, P.; Hofmann, T. Mapping the combinatorial code of food flavors by means of molecular sensory science approach. In *Food Flavors: Chemical, Sensory and Technological Properties*; Jelen, H., Ed.; CRC Press: New York, 2011; pp 413–438.
- (28) Chetschik, I.; Pedan, V.; Chatelain, K.; Kneubühl, M.; Hühn, T. Characterization of the flavor properties of dark chocolates produced by a novel technological approach and comparison with traditionally produced dark chocolates. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 3991–4001.
- (29) Chetschik, I.; Kneubühl, M.; Chatelain, K.; Schlüter, A.; Bernath, K.; Hühn, T. Investigations on the aroma of cocoa pulp (*theobroma cacao* L.) and its influence on the odor of fermented cocoa beans. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 2467–2472.
- (30) Frauendorfer, F.; Schieberle, P. Changes in key aroma compounds of Criollo cocoa beans during roasting. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10244–10251.
- (31) Voigt, J.; Biehl, B.; Heinrichs, H.; Kamaruddin, S.; Marsoner, G. G.; Hugi, A. In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: Aroma-related peptides generated from cocoa-seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. *Food Chem.* **1994**, *49*, 173–180.
- (32) Lopez, A.; Quesnel, V. C. Volatile fatty acid production in cacao fermentation and the effect on chocolate flavour. *J. Sci. Food Agric.* **1973**, *24*, 319–326.
- (33) Siegmund, B. Biogenesis of aroma compounds. In *Flavour Development, Analysis and Perception in Food and Beverages*; Parker, J. K., Elmore, J. S., Methven, L., Eds.; Elsevier, Ltd.: New York, 2015; pp 127–149.
- (34) Schieberle, P.; Hofmann, T. New results on the formation of important maillard aroma compounds. In *Advances in Flavours and Fragrances: From the Sensation to the Synthesis*; Swift, K. A. D., Ed.; The Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K., 2002; pp 163–177.
- (35) Parker, J. K. Introduction to aroma compounds in foods. In *Flavour Development, Analysis and Perception in Food and Beverages*; Parker, J. K., Elmore, J. S., Methven, L., Eds.; Elsevier, Ltd.: New York, 2015; pp 3–30.
- (36) Ziegleder, G. Verfahrenstechnische Einflüsse auf Kakaoaroma I, II. *Zucker- Suesswaren Wirtsch.* **1993**, *46*, 60–64, 131–133 (in German).
- (37) Ehrlich, F. The chemical processes accompanying yeast fermentation (in German). *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1907**, *40*, 1027–1047.
- (38) Dudareva, N.; Klempien, A.; Muhlemann, J. K.; Kaplan, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytol.* **2013**, *198*, 16–32.
- (39) Buttery, R. G.; Takeoka, G.; Teranishi, R.; Ling, L. C. Tomato Aroma Components. Identification of glycoside hydrolysis volatiles. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 2050–2053.
- (40) Ziegleder, G. Flavour development in cocoa and chocolate. In *Industrial Chocolate Manufacture and Use*, 4th ed.; Beckett, S. T., Ed.; Wiley Blackwell: Oxford, U.K., 2009; pp 169–191.
- (41) Buhr, K.; Pammer, C.; Schieberle, P. Influence of water on the generation of strecker aldehydes from dry processed foods. *Eur. Food Res. Technol.* **2010**, *230*, 375–381.
- (42) Granvogl, M.; Beksan, E.; Schieberle, P. New insights into the aroma formation of aroma-active Strecker aldehydes from 3-oxazolines as transient intermediates. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 6312–6322.
- (43) Pettipher, G. L. Analysis of cocoa pulp and the formulation of a standardised artificial cocoa pulp medium. *J. Sci. Food Agric.* **1986**, *37*, 297–309.
- (44) Landaud, S.; Helinck, S.; Bonnarne, P. Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *77*, 1191–1205.
- (45) Nishibori, N.; Kuroda, A.; Yamada, O.; Goto-Yamamoto, N. Factors affecting dimethyl trisulfide formation in wine. *Food Sci. Technol. Res.* **2017**, *23*, 241–248.
- (46) Rychlik, M.; Schieberle, P.; Grosch, W. *Compilation of Odor Thresholds, Odor Qualities and Retention Indices of Key Food Odorants*; Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie: Garching, Germany, 1998.
- (47) Frauendorfer, F.; Schieberle, P. Identification of the key aroma compounds in cocoa powder based on molecular sensory correlations. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5521–5529.
- (48) Kreissl, J.; Mall, V.; Steinhaus, P.; Steinhaus, M. *Leibniz-LSB Odorant Database, Version 1.0*; Leibniz-Institute for Food Systems Biology at the Technical University of Munich: Freising, Germany, 2019; <https://www.leibniz-lsb.de>.

## 7.2 Publikation 2

### **Comparison of the aroma composition and sensory properties of dark chocolates made with moist incubated and fermented cocoa beans**

**Schlüter, A.;** Hühn, T.; Kneubühl, M.; Chatelain, K.; Rohn, S.; Chetschik, I.

*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70, 4057–4065

**Impact Factor 2021 = 5.895**

Synopse:

Im Rahmen der ersten Veröffentlichung wurde ein qualitativer und quantitativer Vergleich der Aromabildung während der Feucht-Inkubation und Fermentation vorgenommen. Zu den wichtigsten festgestellten Unterschieden zählte der höhere Anteil an Estern und Strecker-Aldehyden nach der Feucht-Inkubation und der geringere Gehalt an flüchtigen Säuren im Vergleich zur traditionellen Fermentation. Es konnte gezeigt werden, dass die Feucht-Inkubation zur Bildung von Schlüsselaromastoffen führt.

Da neben der Nacherntebehandlung die Röstung zu den wichtigsten Prozessen gehört, die zur Entwicklung des Aromas beitragen, war das Ziel der zweiten Studie die Charakterisierung des Aromaspektrums der Rohmaterialien (feucht inkubiert, unfermentiert, fermentiert) nach einem thermischen Röstungsschritt und der Herstellung einer verzehrbaren Modellschokolade. Hierfür wurden die Versuchsmaterialien geröstet und mithilfe von Zucker und Kakaobutter dunkle Modellschokoladen mit einem Kakaoanteil von 70 % hergestellt. Mithilfe von GC-O und GC-MS wurden die wichtigsten Aromastoffe identifiziert und nach der Durchführung eines einer AEVA mit FD-Faktoren gewichtet. Ausgewählte Aromastoffe wurden anschließend mittels SIVA mit GC-MS quantifiziert. Durch Anwendung der quantitativen deskriptiven Analyse (QDA-Methode) nach ISO 13299 wurde mithilfe eines Schokoladenpanels ein sensorisches Profil der Modellschokoladen erstellt, um die Aroma- und Geschmackseigenschaften zu bestimmen.

Das Rohmaterial für diese Studie stammte von einer Farm in Costa Rica (Ernte 2016). Während der Ernte wurde ein Teil der Bohnen direkt getrocknet, womit die Fermentation weitestgehend unterbunden werden konnte und die Bohnen lager- und transportfähig waren. Der andere Teil der Ernte wurde einer traditionellen Kastenfermentation unterzogen, wie es auf der Farm üblich ist. Die unfermentierten und fermentierten Kakaobohnen wurden nach Wädenswil (CH)

## Kumulativer Teil der Dissertation

---

transportiert, wo die Durchführung der Versuche und die Analysen in den Laboratorien und Technikumsräumen der Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften (ZHAW) durchgeführt wurde

Der Eigenanteil dieser Publikation liegt bei 65 %.

Reprinted with permission from Schlüter, A.; Hühn, T.; Kneubühl, M.; Chatelain, K.; Rohn, S.; Chetschik, I. Comparison of the Aroma Composition and Sensory Properties of Dark Chocolates Made with Moist Incubated and Fermented Cocoa Beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2022; 70 (13): 4057-4065. Copyright 2022 American Chemical Society

# Comparison of the Aroma Composition and Sensory Properties of Dark Chocolates Made with Moist Incubated and Fermented Cocoa Beans

Ansgar Schlüter, Tilo Hühn, Markus Kneubühl, Karin Chatelain, Sascha Rohn, and Irene Chetschik\*

Cite This: *J. Agric. Food Chem.* 2022, 70, 4057–4065

Read Online

ACCESS |



Metrics &amp; More



Article Recommendations



Supporting Information

**ABSTRACT:** In a previous investigation, “moist incubation” was described as a novel postharvest treatment for cocoa and the aroma composition of the resulting cocoa nibs was compared to unfermented and fermented cocoa nibs. For this treatment, unfermented and dried nibs are rehydrated with an aqueous solution containing lactic acid and ethanol to adjust the pH value and are subsequently incubated at 45 °C under aerobic conditions for 72 h before drying. The aim of the present study was to investigate the sensory properties and aroma composition of dark chocolates made of these materials after roasting. Therefore, gas chromatography–olfactometry (GC-O) in combination with aroma extract dilution analysis (AEDA), quantitation with isotopically labeled standards, odor activity value (OAV) determination, and sensory analysis were performed. The three different chocolates had distinct sensory and OAV profiles. The sensory profiles showed a higher intensity of fruity aroma notes and a lower intensity of bitterness and astringency in the chocolate made with the moist incubated cocoa, while the chocolate made of fermented cocoa reached higher scores in the roasty aroma notes. Furthermore, higher OAVs were determined for the Strecker aldehydes in the chocolate made of the moist incubated cocoa, whereas higher OAVs for the pyrazines and the acids were detected in the chocolate made of fermented cocoa. In contrast, the chocolate produced with the unfermented cocoa showed low cocoa specific aroma notes and high levels of astringency and bitterness. The detected differences reveal interesting insights into the influence of different postharvest treatments on the resulting aroma composition in the final chocolate. Furthermore, the alternative postharvest treatment was demonstrated to result in chocolates with a pleasant sensory profile.

**KEYWORDS:** *cocoa postharvest treatment, cocoa incubation, dark chocolate, cocoa aroma formation, sensory evaluation*

## INTRODUCTION

Cocoa is the main ingredient for chocolate, being one of the most favored sweets worldwide, beloved for its very distinct sensory properties. Before fresh cocoa beans can provide a desired aroma as well as the favored slight bitterness and astringency, biochemical transformation within the fresh beans' chemical composition is needed. During the traditional postharvest treatment, a spontaneous microbial degradation of the adhering fruit pulp surrounding the beans leads to conditions inducing the desired biochemical changes in the beans.<sup>1,2</sup> The key factors can be summarized as the acidification of the beans' tissue, targeting a pH value of approximately 4.5–5.5, a temperature rise to approximately 45–50 °C, and the availability of oxygen.<sup>2</sup>

The reconstruction of the traditional fermentation process under controlled conditions *in vitro* without the influence of microorganisms was the subject of many previous studies.<sup>3–7</sup> For this “fermentation-like incubation”, beans were removed from the fresh cocoa pod, depulped, and then incubated at controlled temperatures in pH-adjusted solutions. It was shown that the formation of aroma-relevant precursors as well as a directed transformation of polyphenols<sup>5</sup> could be achieved to the same extent as during traditional fermentations, so a possible commercial use was discussed.<sup>4</sup> However, this process is restricted to the use of fresh beans; hence, the process has to take place on or close to a farm site.

Furthermore, rather high expenditures for infrastructure are needed. Therefore, an alternative approach independent of time and location, referred to as “moist incubation”, has been proposed.<sup>8</sup> In contrast to the fermentation-like incubation using beans freshly removed from the cocoa pod, for the moist incubation, unfermented and dried cocoa nibs are used, which are storable and may be transported to any production site. For the treatment, unfermented and dried nibs are rehydrated with an aqueous solution containing lactic acid and ethanol to adjust the pH value and are subsequently incubated at 45 °C under aerobic conditions for 72 h before drying. During a first investigation,<sup>8</sup> the aroma formation before and after this treatment was investigated on a molecular level and compared to fermented cocoa. The results indicated that aroma formation within the beans can be achieved independently of microbial degradation of the pulp, when applying the moist incubation treatment on unfermented and dried beans. However, the results showed differences in the abundance of

**Received:** December 23, 2021

**Revised:** March 2, 2022

**Accepted:** March 4, 2022

**Published:** March 22, 2022

certain cocoa key odorants. Esters and Strecker aldehydes were found in equal or higher quantities in the moist incubated sample compared to the fermented sample. On the other hand, the fermented sample showed higher quantities in compounds such as acetic acid and 2- and 3-methylbutanoic acid. The material was investigated after applying the postharvest treatment including a drying step to directly compare the effect of the applied postharvest treatment without further processing like roasting. However, it remained unclear if the detected differences are still detectable in the final product, the chocolate.

Therefore, the aim of the present study was to characterize the sensory properties and decode the aroma profiles on a molecular level of the same materials used in the previous study (moist incubated, fermented, and unfermented cocoa)<sup>8</sup> after processing them into model chocolates. Gas chromatography–olfactometry (GC-O) in combination with aroma extract dilution analysis (AEDA), quantitation with isotopically labeled standards, and sensory analysis<sup>9</sup> were performed to decode the aroma properties of the three model chocolates on the molecular level and gain further insights into the influence of the different postharvest treatments on the generation of cocoa key odorants in the final products, the chocolate.

## MATERIAL AND METHODS

**Chemicals.** For identification and determination of retention indices, the following chemicals were used: acetic acid, (*E,E*)-2,4-decadienal, 2,3-diethyl-5-methylpyrazine, dimethyl trisulfide, 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine, ethyl 2-methylbutanoate, ethyl 3-methylbutanoate, ethyl methylpropanoate, 2-ethyl-5-methylpyrazine, ethyl 3-phenylprop-2-enoate, ethyl 3-phenylpropanoate, 3-ethylphenol, ethyl phenylacetate, 3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(*SH*)-one, 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(*2H*)-furanone, 2-isobutyl-3-methoxypyrazine, 2-methoxyphenol, 2- and 3-methylbutanal, 2- and 3-methylbutanoic acid, 2-methyl-3(methylthio)furan, methylpropanoic acid, (*E,E*)-2,4-nonadienal, phenylacetic acid, 2-phenylethanol, 2-phenylethyl acetate, and trimethylpyrazine were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Switzerland).

For quantitation, the following isotopically substituted standards were used: 2-(<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)methylbutanal, 3-(<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)methyl(3,4,4,4-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>)-butanal, ethyl 3-(<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)methyl(2,2,3,4,4,4-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>)butanoate, (<sup>2</sup>H<sub>6</sub>)-dimethyl trisulfide, 2-(<sup>3</sup>H<sub>2</sub>)methyl-3,5-dimethylpyrazine, 2-(<sup>2</sup>H<sub>5</sub>)-ethyl-3,6-dimethylpyrazine, 2-(1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)ethyl-3(1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)ethyl-5-(<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)-methylpyrazine, 2-methyl-3-(<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)methylthiofuran, 3-(<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)methyl-(2,2,3,4,4,4-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>)butanoic acid, 2-(<sup>2</sup>H<sub>5</sub>)phenylethyl acetate, (<sup>2</sup>H<sub>5</sub>)ethyl-3-phenylpropanoate, 2-(<sup>2</sup>H<sub>5</sub>)phenylethanol, 4-hydroxy-2-methyl-5-(<sup>13</sup>C)methyl(5-<sup>13</sup>C)furan-3(*2H*)-one, ethyl-3-(<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)phenyl(2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)prop-2-enoate, phenyl(<sup>13</sup>C<sub>2</sub>)acetic acid (AromaLAB GmbH, Martinsried, Germany), (<sup>13</sup>C<sub>2</sub>)acetic acid (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

**Raw Materials.** Moist incubated and dried cocoa, unfermented and dried cocoa, as well as fermented and dried cocoa material as obtained in the previous study<sup>8</sup> were used to prepare the prototype chocolates. Cocoa of the cultivar Trinitario was harvested on a farm in Costa Rica, and a batch of approximately 800 kg was filled in a wooden fermentation box and covered with banana leaves to start the fermentation. Mixing and aeration by transferring the mass to the next box was first performed after 48 h and was repeated every 24 h until a total fermentation time of approximately 120 h was reached. The beans were then spread on trays in a drying hall and dried under occasional mixing for approximately 10 days. To obtain unfermented material, one part of the fresh beans was directly spread on wooden drying trays to suppress fermentation and dried on trays in the same way as fermented cocoa beans. Samples of fermented and unfermented beans were shipped to Switzerland and stored at 12 °C until they were broken and deshelled to obtain unfermented and fermented cocoa nibs. For the moist incubated material eight portions

of 150 g (±0.1 g), unfermented nibs were rehydrated under vacuum in a sealed bag for 12 h at 4 °C with 80 g (±0.1 g) of an aqueous solution containing lactic acid (0.1 mol/L) and ethanol (5% v/v) to reach a pH value in the cocoa solids of 5.1 and a final moisture content of 35%. The bags were then opened, fumigated with oxygen, sealed, and then incubated at 45 °C for 72 h in a laboratory incubator under occasional mixing by turning the bags every 12 h. After incubation, the material was mixed and dried on trays using a laboratory oven at 40 °C for 24 h in a laboratory oven with air circulation under occasional turning until a final moisture content <6% was reached.

For the formulation of the chocolate prototypes, commercially available deodorized cocoa butter (Carma, Barry Callebaut AG, Zurich, Switzerland), white crystal sugar (Schweizer Zucker AG, Frauenfeld, Switzerland), and sunflower-lecithin (Bunge Ltd., Chesterfield) were used.

**Preparation of Prototype Chocolates.** Sample materials were frozen with liquid nitrogen (PanGas AG, Dagmersellen, Switzerland) and ground with a kitchen blender (Thermomix, Vorwerk AG, Dierikon, Switzerland) to a particle size <2 mm. To provide a reproducible, homogeneous, quick roasting, and subsequent quick cooling of the cocoa material, an adapted roasting method based on a thin-layer roasting technique developed by Mohr (1970)<sup>10</sup> was performed: approximately 50 g of finely ground cocoa powder was evenly distributed with a maximum layer thickness of 3 mm on one half of a 30 cm × 60 cm sheet of aluminum foil and covered with the other half after folding in the middle. The edges were folded to keep the cocoa powder in place. These envelopes were then roasted for 10 min in an oven (type H 5081-60 BP, Miele AG, Spreitenbach, Switzerland) between two preheated (125 ± 2 °C) tailor-made solid aluminum plates (35 cm × 30 cm × 1.5 cm) with a thermocouple (type T, EBI 40 TC-01, Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Ingolstadt, Germany) attached measuring the temperature of the plate at the point of contact with the envelope. Pretrials showed that the temperature of the cocoa powder inside the envelope reached the temperature of the aluminum plates within 60 s. A roasting time of 10 min was defined in pretrials, in which this process time resulted in the most balanced aroma profile of the material. After the roasting, the envelopes were removed and placed flat on a steel surface to quickly cool down to room temperature. The roasted cocoa material was hereafter mixed with crystal sugar and refined two times with a three-roll refiner (Type SDY 200, Bühler AG, Uzwil, Switzerland) to reach a particle size below 25 μm. This premix was manually homogenized with cocoa butter and lecithin to prepare a 70% prototype chocolate, containing 50% cocoa mass, 20% cocoa butter, 29.5% sugar, and 0.5% lecithin. The chocolate masses were not conched to avoid further changes in the aroma constitution after roasting. Pretrials showed that good textural properties can be achieved by this preparation technique. The chocolates were then manually precrystallized and filled in chocolate bar molds. After complete crystallization, the bars were wrapped in aluminum foil, vacuum packed, and frozen at −20 °C until used for analysis. The chocolate samples are hereafter referred to as “incubated chocolate”, “fermented chocolate”, and “unfermented chocolate”.

## METHODS

**Sensory Analysis.** The sensory evaluation of the obtained chocolates was carried out in the form of profiling with a trained panel (*n* = 8), referring to the quantitative descriptive analysis (QDA) method, and according to the ISO 13299:2016 standard. Altogether, 10 attributes in the three main categories aroma, taste, and texture were defined (Table S1). For profiling of the chocolate samples, the intensity of the chosen attributes was rated on a continuous line scale from “0 = not perceivable” to “10 = very intense”. These evaluations were done in the sensory lab of the Zurich University of Applied Sciences (ZHAW), Wädenswil, Switzerland. The samples were blinded by labeling with random three-digit codes. The experimental design was set up according to a randomized complete block design (RCBD), meaning that each sample was randomly assigned to each

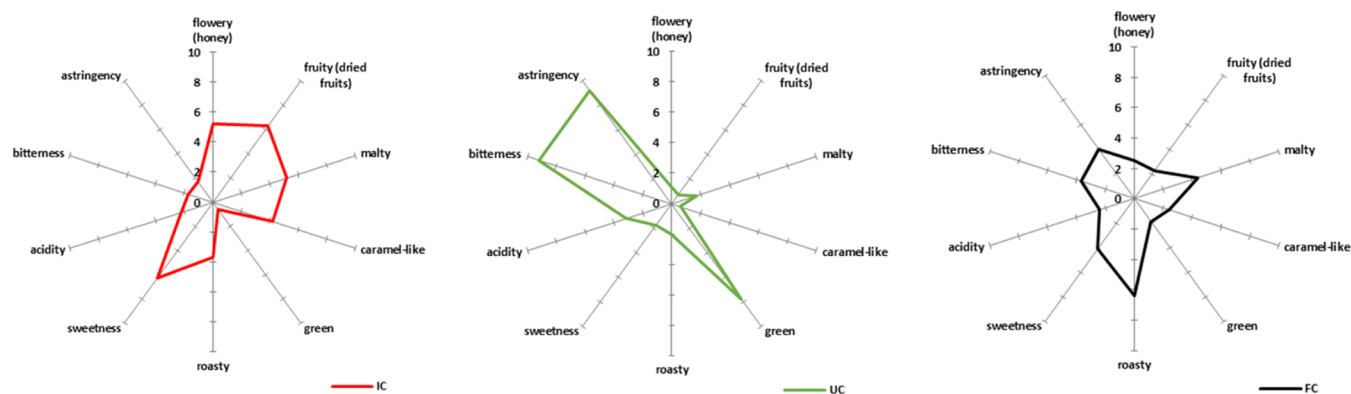


Figure 1. Sensory profiles of the incubated chocolate (IC), unfermented chocolate (UC), and fermented chocolate (FC).

Table 1. Flavor Dilution Factors of Compounds Determined in Aroma Distillates Isolated from Incubated Chocolate (IC), Unfermented Chocolate (UC), and Fermented Chocolate (FC) during AEDA

no. <sup>a</sup>	odorant <sup>b</sup>	odor quality <sup>c</sup>	retention index on		FD factor <sup>d</sup>		
			FFAP	OV-1701	IC	UC	FC
1	2- and 3-methylbutanal <sup>e,f</sup>	malty	927	710	256	16	128
2	ethyl methylpropanoate <sup>g</sup>	fruity	950	818	8	<4	<4
3	ethyl 2-methylbutanoate <sup>g</sup>	fruity	1019	907	8	<4	16
4	ethyl 3-methylbutanoate <sup>g</sup>	fruity	1042	910	8	<4	<4
5	dimethyl trisulfide <sup>g</sup>	cabbage-like	1358	1030	64	<4	16
6	2-ethyl 5-methylpyrazine <sup>g</sup>	earthy	1376	n.d.	4	<4	<4
7	trimethylpyrazine <sup>g</sup>	earthy	1391	1080	4	<4	64
8	2-isopropyl-3-methoxypyrazine <sup>g</sup>	bell pepper-like	1414	1139	4	<4	16
9	2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine <sup>g</sup>	earthy	1430	1153	4	4	256
10	acetic acid <sup>h</sup>	pungent	1439	n.d.	64	16	256
11	2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine <sup>g</sup>	earthy	1446	1160	<4	<4	16
12	2,3-diethyl-5-methylpyrazine <sup>g</sup>	earthy	1475	1220	<4	<4	64
13	2-isobutyl-3-methoxypyrazine <sup>g</sup>	bell pepper-like	1505	1239	4	16	16
14	methylpropanoic acid <sup>h</sup>	pungent, sweaty	1551	n.d.	4	<4	16
15	2-methyl-3(methylthio)furan <sup>g</sup>	meaty, nutty	1649	1265	128	16	64
16	2- and 3-methylbutanoic acid <sup>h</sup>	pungent, sweaty	1653	n.d.	128	16	128
17	(E,E)-2,4-nonadienal <sup>g</sup>	fatty, green	1686	1350	8	<4	64
18	unknown	meaty, nutty	1714	n.d.	256	16	128
19	ethyl phenylacetate <sup>h</sup>	flowery, fruity	1769	1360	4	<4	16
20	(E,E)-2,4-decadienal <sup>h</sup>	fatty, green	1795	n.d.	64	<4	128
21	2-phenylethyl acetate <sup>h</sup>	dried fruits-like, flowery	1799	1477	4	4	16
22	2-methoxyphenol <sup>g</sup>	smoky	1849	1226	4	<4	256
23	ethyl 3-phenylpropionate <sup>g</sup>	dried fruits-like, flowery	1867	n.d.	256	128	128
24	2-phenylethanol <sup>h</sup>	flowery	1898	1283	256	128	256
25	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone <sup>h</sup>	caramel-like	2025	1240	1024	128	1024
26	ethyl 3-phenylprop-2-enoate <sup>g</sup>	fruity, cinnamon-like	2118	n.d.	128	128	128
27	3-ethylphenol <sup>g</sup>	phenolic, animalic	2170	n.d.	<4	16	<4
28	3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5H)-one <sup>g</sup>	seasoning	2190	1347	16	16	16
29	phenylacetic acid <sup>g</sup>	beeswax-like	2546	n.d.	32	16	64

<sup>a</sup>Number of identified compounds based on retention index on capillary column FFAP. <sup>b</sup>Odorant name. <sup>c</sup>Odor quality perceived at sniffing port. <sup>d</sup>Flavor dilution factor determined by AEDA on capillary FFAP. <sup>e</sup>Flavor dilution factor determined by AEDA on capillary OV-1701. <sup>f</sup>Identification based on retention index and odor quality of compound found in the literature.<sup>34</sup> <sup>g</sup>Identification by comparison of odor quality at sniffing port and retention index on FFAP with reference substance. <sup>h</sup>Identification by comparison of odor quality at sniffing port, mass spectrum, and retention index on FFAP with reference substance.

panelist and each panelist was then evaluating all three samples in one single session. Panelists were invited for an additional session to do a second evaluation of all three test samples. The presentation of the samples was carried out one by one, following a sequential-monadic presentation order. For neutralization between the samples, water and saltless crackers were used. The data were analyzed using the statistical software XLSTAT 2018 (Addinsoft, New York), carrying out a two-way analysis of variance (ANOVA) and a post hoc test

(Fisher's L.S.D.) to determine significant differences between the samples. The results of the evaluation and the corresponding standard deviations can be found in Table S2.

**Sample Preparation and Isolation of Volatiles for GC-O Analysis and Quantitation.** Aroma compounds were isolated in the same manner as previously described.<sup>8,11</sup> To prepare an extract for the GC-O analysis and identification of aroma compounds 20 g of chocolate were cut into fine pieces with a kitchen knife and extracted

with 200 mL diethyl ether by stirring at room temperature for 12 h. For the quantitation of compounds in high and low concentrations, samples of 2 and 50 g were extracted with 20 and 200 mL, respectively, in the same manner, after isotopically labeled standards of the target compounds were added. Separation of the volatiles from the nonvolatiles for the GC-O extract as well as the extracts used for quantitation was performed using a SAFE distillation unit, and the extract was subsequently concentrated to a final volume of 300  $\mu$ L.

**Identification of Aroma Compounds Using Gas Chromatography–Olfactometry (GC-O) and Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS).** GC-O in combination with AEDA and identification with GC-MS of selected compounds was performed in the same manner, using the same equipment, as previously described.<sup>8,11,12</sup>

**Quantitation of Selected Aroma Compounds.** The quantitation of selected compounds was done in the same manner, using the same equipment, as previously described.<sup>8</sup> The concentration of target compounds was calculated using a five-point calibration line. To obtain the calibration lines, mixtures of analytes and isotopically substituted standards in five different ratios (1:5, 1:2; 1:1, 2:1; 5:1) were analyzed. The peak area ratios of selected ions of standard and analytes were plotted against the ratios of the respective concentrations. Quantitation of analytes in the samples was determined with the calibration line using linear regression. The ions used for quantitation and the calibration lines can be found in Supporting Information Table S3. All samples were analyzed in triplicate (unless stated differently in the results table), and the results were calculated as mean values.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Sensory Profiles of the Dark Chocolates Made with Incubated, Fermented, and Unfermented Chocolates.

The sensory scores in the defined attributes and the illustrated sensory profiles are shown in Figure 1. While the incubated and fermented chocolates were described as having a differing, but typical dark chocolate flavor profile with the pleasant attributes of dark chocolate such as malty, roasty, fruity, and flowery aroma notes, as well as slight bitterness and low astringency, the unfermented chocolate was not perceived as typical. The data showed a significant difference ( $\alpha = 0.05$ ) in many of the attributes between the three samples (Table S1). The incubated chocolate showed a somewhat higher intensity score among flowery, fruity, malty, and caramel-like aroma notes. On the other hand, roasty aroma notes were rated higher in the fermented chocolate. The unfermented chocolate was rated with an overall low aroma intensity with the highest score for the attribute green. Furthermore, the samples showed differences in the perception of the taste attributes. The incubated chocolate was perceived sweeter than the other chocolates. Additionally, the bitterness and astringency were perceived in a lower intensity compared to the other samples. Among the three samples, the unfermented chocolate reached the highest scores for both attributes, suggesting that the desired transformation of polyphenols, usually induced by the fermentation, and drying, was suppressed compared to the moist incubation and fermentation.

### Identification of Odor-Active Constituents in the Incubated, Fermented, and Unfermented Chocolates.

Table 1 shows the results of the performed AEDA. Overall, 29 compounds with a flavor dilution factor (FD factor)  $>4$  have been detected in the investigated chocolates: 26 compounds in the incubated chocolate sample, 25 compounds in the fermented chocolate, and 15 compounds in the unfermented chocolate. One aroma compound with an FD factor  $>4$  could not be identified by the identification criteria mentioned in Table 1.

Many well-known aroma compounds that have also been previously found in roasted cocoa and dark chocolates such as 2- and 3- methylbutanal, 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine, acetic acid, 2-isobutyl-3-methoxy-pyrazine, 2-methyl-3-(methylthio)-furan, 2- and 3-methylbutanoic acid, 2-phenylethyl acetate, ethyl 3-phenylpropionate, 2-phenylethanol, 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone, ethyl 3-phenyl-prop-2-enoate, 3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5*H*)-one, and phenylacetic acid<sup>11,13</sup> were detected in all samples analyzed during this investigation. Additionally, an unknown compound with a meaty and nutty odor was detected with a high FD factor of 256 in the incubated chocolate and an FD factor of 128 in the fermented chocolate. This unknown compound was also detected with a somewhat lower intensity in the unfermented chocolate with an FD factor of 16.

Overall, the fermented and incubated chocolates showed a comparable number of typical dark chocolate and cocoa key aroma compounds, with comparable FD factors. As expected, fewer compounds with generally lower FD factors were detected in the unfermented chocolate, indicating a higher concentration of aroma precursors present in the material after fermentation or moist incubation.

The highest FD factor of 1024 was found for the caramel-like 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone in both the fermented and incubated chocolates. This fact fits well with previous findings, where 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone was identified as one of the key odorants in the cocoa mass after roasting and also in chocolate.<sup>11,14–16</sup>

A major difference in the AEDA results can be seen for the earthy, nutty, and roasty smelling pyrazines. 2,3,5-Trimethylpyrazine, 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine, 2-ethyl 3,5-dimethylpyrazine, and 2,3-diethyl 5-methylpyrazine were detected with higher FD factors in the fermented chocolate compared to the incubated chocolate, whereas only 2,3,5-trimethylpyrazine and 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine were detected with a low FD factor of 4. In the past, many different pyrazines have been identified in the aroma of roasted cocoa and chocolate and they are generally regarded as important contributors to the aroma of chocolate.<sup>17–19</sup> In contrast, a recent study where roasted Forastero beans were analyzed concluded that the pyrazines are of minor importance for the cocoa aroma.<sup>14</sup>

Furthermore, another difference between the aroma composition of the three chocolates of the present study was detected among the organic acids, acetic acid, 2- and 3-methylbutanoic acid, and methylpropanoic acid. These components showed higher FD factors in the fermented chocolate compared to the incubated and the unfermented chocolate. Even though they are usually referred to unpleasant odor descriptions such as pungent, sour, vinegar-like, sweaty, or rancid, in many studies, these acids reach the highest FD factors and consequently reach very high odor activity values in cocoa and chocolate.<sup>13–16,20</sup> The fact that many traditional chocolate-making processing steps, such as drying, roasting, thin-layer treatment of cocoa liquor, and conching, aim at reducing these compounds<sup>19,21,22</sup> underlines that these compounds, especially when present in high concentrations, are rather undesirable.

Furthermore, the important malty Strecker aldehydes 2- and 3-methylbutanal were detected with comparable FD factors in the incubated chocolate and in the fermented chocolate, respectively. These compounds can be directly linked to the presence of their parent amino acids leucine and isoleucine in the raw material. These amino acids are known to be



**Table 2. Results of the Quantitation of the Odorants in the Incubated Chocolate (IC), Unfermented Chocolate (UC), and Fermented Chocolate (FC)**

sample odorant <sup>a</sup>	IC		UC		FC	
	content ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )					
	mean	rel. SD <sup>b</sup> (%)	mean	rel. SD <sup>b</sup> (%)	mean	rel. SD <sup>b</sup> (%)
acetic acid	23 400	3.3	40 000	2.5	55 700	2.5
2-methylbutanoic acid	418	1.4	134	4.4 <sup>c</sup>	1760	3.0
3-methylbutanoic acid	1330	1.8	189	1.0 <sup>c</sup>	3450	3.2
phenylacetic acid	2950	3.4	724	12.5	4210	1.7
2-phenylethanol	1880	0.5	1830	0.5	1530	0.3
2-methylbutanal	274	1.2	53.1	2.2 <sup>c</sup>	104	0.0
3-methylbutanal	916	3.0	208	10.9	587	8.0
ethyl 3-methylbutanoate	3.94	2.8	0.56	13.6 <sup>c</sup>	1.88	2.4
2-phenylethyl acetate	36.6	3.1	42.5	0.3 <sup>c</sup>	257	1.1
ethyl-3-phenylprop-2-enoate	48.3	0.4	33.6	4.4	64.0	4.1
ethyl-3-phenylpropanoate	10.0	1.2	3.93	1.3	3.46	2.4
4-hydroxy-2,5-dimethyl-3-(2H)-furanone	504	1.9	72.7	1.1	548	4.1
2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	7.91	1.5	8.88	0.8	111	0.7
2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine	26.0	0.3	15.7	1.0	120	0.8
2,3,5-trimethylpyrazine	7.11	4.7	6.34	0.5	136	0.7
2,3-diethyl-5-methylpyrazine	0.23	8.9	0.13	3.2	1.84	16.0
dimethyl trisulfide	6.31	2.2	0.69	11.0	4.45	2.5
2-methyl-3-(methylthio)-furan	0.29	4.1	0.24	6.7	0.21	8.8

<sup>a</sup>Odorant name. <sup>b</sup>Relative standard deviation was calculated from quantitative data obtained from three extractions of each sample. <sup>c</sup>Relative standard deviation was calculated from quantitative data obtained from two extractions of the sample.

important precursors released during fermentation within the bean.<sup>2,22</sup> Only minor differences were detected in terms of FD factors between the fermented and incubated chocolates for the fruity and flowery esters. While ethyl methylpropanoate, ethyl 2-methylbutanoate, ethyl 3-methylbutanoate, ethyl phenylacetate, and 2-phenylethyl acetate reached rather low FD factors in the incubated and fermented chocolates, ethyl 3-phenylpropionate and ethyl 3-phenylprop-2-enoate showed high FD factors. Furthermore, the flowery-smelling alcohol 2-phenyl-ethanol was detected in all three chocolates with a relatively high FD factor of 256 for the fermented and incubated chocolate and FD 128 for the unfermented chocolate sample, respectively. Previous studies showed that this odorant is already present in unfermented cocoa and concentrations do not change significantly during roasting.<sup>14–16</sup>

Other well-known odorants of cocoa and chocolate such as the cabbage-like dimethyl trisulfide and the cooked meat-like 2-methyl-3-(methylthio)furan showed slightly higher FD factors in the incubated chocolate compared to the fermented chocolate. In the unfermented chocolate, dimethyl trisulfide could not be detected and 2-methyl-3-(methylthio)furan showed a lower FD factor in comparison to the incubated and fermented chocolates. Other studies showed that these odorants are present in cocoa after fermentation and increase during roasting.<sup>14–16</sup> In a recent study, where two commercially available dark chocolates with 90 and 99% cocoa content were investigated, dimethyl trisulfide reached the highest FD factors during GC-O analysis and even showed the highest OAV during quantitation of both samples, underlining the importance of these compounds for the cocoa aroma.<sup>13</sup>

Furthermore, the fatty and green components (*E,E*)-2,4-nonadienal and (*E,E*)-2,4-decadienal were detected in the incubated chocolate with FD factors of 4 and 64 and in the fermented chocolate with slightly higher FD factors of 64 and

128, respectively. These compounds have been identified in chocolate and cocoa and are known to be thermally induced lipid oxidation products.<sup>23,24</sup> However, both compounds were not detected in the unfermented chocolate.

Another main difference in the GC-O profiles of the samples was found for the phenolic and animalic smelling 3-ethylphenol and the smoky smelling 2-methoxyphenol. 3-Ethylphenol was exclusively detected in the unfermented chocolate with an FD factor of 16. 2-Methoxyphenol was detected with a high FD factor of 256 in the fermented chocolate. On the other hand, the incubated chocolate showed a low FD factor of 4, and this odorant was not detectable in the unfermented chocolate. The same trend for this compound was observed in the corresponding unroasted raw materials, suggesting that its formation is strongly linked to microbial activity during fermentation.<sup>8</sup>

**Quantitation of Selected Aroma Compounds in the Investigated Chocolate Samples.** The results of the quantitation of the selected aroma compounds in the incubated, fermented, and unfermented chocolates are shown in Table 2. Among the quantitated volatiles, acetic acid was the most abundant compound in all of the samples. The lowest concentration was measured in the incubated chocolate (23.4 mg/kg), followed by the unfermented chocolate (40.0 mg/kg). The fact that less acetic acid was found in the incubated chocolate is in accordance with the values measured in the raw material before roasting. This way, a loss of acetic acid during the drying step of this treatment procedure can be suggested.<sup>8</sup> The higher value for the fermented chocolate (55.7 mg/kg) is in accordance with another study, where quantities of 53.7–87.7 mg/kg were found in commercially available dark chocolates with cocoa contents ranging from 70 to 85%.<sup>11</sup> Furthermore, higher concentrations of 2- and 3-methylbutanoic acid were also measured in the fermented chocolate (1,760 and 3,450  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) compared to the incubated chocolate (418 and 1,330  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). In other studies, concentrations

ranging from 391 to 1,670  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for 2-methylbutanoic acid and from 438 to 3,320  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for 3-methylbutanoic acid were measured, showing that the values obtained in the present study can be compared to the ones of commercially available chocolates.<sup>11,13</sup> For the unfermented chocolate, far lower concentrations for these compounds were observed (135 and 195  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). 2- and 3-Methylbutanoic acids are known to increase during traditional fermentation, but they can also be generated during Strecker degradation from their corresponding parent amino acids leucine and isoleucine during thermal treatment.<sup>1,21,25</sup> A slight increase after roasting of cocoa beans was detectable in different studies.<sup>14–16</sup> Therefore, the high concentrations in the fermented chocolate of the present study may derive from both processing steps—fermentation and subsequent roasting—while the moderate content of the incubated chocolate might be linked to the formation of these compounds during the roasting process.

Interesting results were also found for the malty compounds 2- and 3-methylbutanal. These odorants showed higher concentrations in the incubated chocolate (274 and 916  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) compared to the fermented chocolate (104 and 587  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) and the unfermented chocolate (53.1 and 208  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). The same trend was found when the raw material was analyzed before roasting and preparation of chocolate. These important compounds are known to be formed by Strecker degradation from their parent  $\alpha$ -amino acids leucine and isoleucine.<sup>24</sup> Previous studies showed that Strecker aldehydes can be released upon contact with water in dry foods<sup>26,27</sup> and also from fermented and dried, unroasted cocoa beans after treatment with water.<sup>28</sup> The results of the present study suggest that the combined effect of the moist treatment as well as the formation of aldehydes during drying and subsequent roasting could lead to overall higher amounts in the incubated chocolate in comparison to the fermented chocolate.

Furthermore, the pyrazine concentrations of the incubated chocolate for 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (7.91  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine (26.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), 2,3,5-trimethylpyrazine (7.11  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), and 2,3-diethyl-5-methylpyrazine (0.23  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) were comparable to the concentrations found in the unfermented chocolate (8.88, 15.7, 6.34, and 0.13  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), while the concentrations in the fermented chocolate showed 5- to 20-fold higher values (111, 120, 136, 1.84  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Pyrazines are known to be formed from  $\alpha$ -aminoketones during Strecker degradation in the Maillard reaction,<sup>29</sup> but it was shown by Scalone et al. (2015) that they may also derive from oligopeptides.<sup>30</sup> Furthermore, it was shown that the use of oligopeptides as precursors promotes pyrazine formation compared to the use of free amino acids in model systems.<sup>30,31</sup> Short peptides have gained increasing attention as being significantly responsible precursors for cocoa aroma formation. Recently, 34 Amadori and Heyns compounds deriving from di- and tripeptides in fermented and dried cocoa have been identified for the first time.<sup>32</sup> Unfortunately, the authors did not investigate the volatile profiles deriving from these Maillard reaction intermediates. However, their presence in fermented and dried cocoa and the findings that oligopeptides are known to promote the formation of pyrazines suggest that these precursors may have been formed to a larger extent during microbial fermentation compared to the moist incubation. Furthermore, the results in a study from Zou et al. (2018) showed a promoted formation of Strecker aldehydes when free amino acids were used as Maillard reaction precursors compared to oligopeptides.<sup>31</sup> The higher quantities of

pyrazines found in the fermented sample and the higher quantities of Strecker aldehydes in the incubated sample could therefore indicate that the formation of peptides was promoted during fermentation, while higher quantities of free amino acids were generated after the moist incubation treatment. However, this has to be proven by the respective precursor measurements in the different materials. A possible reason for the different precursor formation may be due to differences in the pH value reached in the cotyledon during the postharvest treatment. It is known that lower pH values reached during fermentation promote the formation of oligopeptides, while higher pH values promote the formation of amino acids, especially the important precursors leucine, isoleucine, valine, and phenylalanine.<sup>33</sup>

The floral-smelling 2-phenylethanol was quantitated in comparable amounts in the incubated (1,880  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) and the unfermented chocolate (1,830  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), while lower amounts were found in the fermented chocolate (1,530  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). This is in accordance with values obtained during a previous study, where lower amounts were measured in the fermented cocoa beans.<sup>8</sup> 2-Phenylethanol can be converted by microorganisms to form phenylacetic acid and 2-phenylethyl acetate during fermentation.<sup>22</sup> This is also in line with the higher concentrations for the beeswax-like phenylacetic acid and 2-phenylethyl acetate in the fermented sample compared to the incubated and the unfermented chocolates. Another ester that was found with a slightly higher concentration in the fermented chocolate is ethyl 3-phenylprop-2-enoate (64.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) compared to the incubated (48.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) and unfermented chocolates (33.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). On the other hand, the esters ethyl 3-methylbutanoate and ethyl 3-phenylpropanoate were measured in higher concentrations in the incubated chocolate with 3.94 and 10.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  compared to 1.88 and 3.46  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in the fermented chocolate and 0.56 and 3.93  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in the unfermented chocolate, suggesting that these esters may have been formed to a larger extent enzymatically in the cocoa bean material during the moist incubation.

Another important odorant is the caramel-like 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone. It reached the highest FD factors in the AEDA with a comparable concentration in the incubated chocolate (504  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) compared to the fermented chocolate (548  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), while the unfermented chocolate showed a much lower concentration (72.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). These results are in line with concentrations given in the literature.<sup>11,14–16</sup>

In addition to that, two sulfur-containing odorants were quantitated: the cabbage-like dimethyl trisulfide and the meaty and nutty 2-methyl-3(methyldithio)furanone. Both odorants have been identified in fermented cocoa beans and an increase in their concentrations was shown during roasting.<sup>14,15</sup> In the incubated and fermented chocolates of the present study, concentrations of dimethyl trisulfide were comparable, reaching 6.31 and 4.45  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively, being in line with values given in the literature.<sup>11,13–15</sup> On the other hand, the concentration of this odorant was drastically lower in the unfermented chocolate with 0.69  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , suggesting that the corresponding precursors were formed during the moist incubation treatment and the fermentation in comparable intensities, while the necessary precursors were missing in the unfermented chocolate.

#### Comparison of the Calculated Odor Activity Values.

The calculated OAVs of the odorants in the investigated chocolates are shown in Table 3. Eleven compounds with an

**Table 3. Odor Activity Values Calculated for the Incubated Chocolate (IC), Unfermented Chocolate (UC), and Fermented Chocolate (FC)**

odorant <sup>a</sup>	odor threshold <sup>b</sup> [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	OAV <sup>c</sup>		
		IC	UC	FC
dimethyl trisulfide	0.03	210	<1	148
3-methylbutanoic acid	11	121	17	314
phenylacetic acid	26	113	28	162
acetic acid	350 <sup>d</sup>	67	114	159
3-methylbutanal	15	61	14	39
4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	27	19	3	20
2-methylbutanal	34	8	<1	5
2-phenylethanol	490	4	4	3
2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	1.7	5	4	65
ethyl 3-methylbutanoate	0.98	4	1	2
2-methylbutanoic acid	110	4	<1	16
2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine	76	<1	<1	2

<sup>a</sup>Odorant name. <sup>b</sup>Orthonasal threshold value determined in oil according to ref 34. <sup>c</sup>Odor activity value calculated as the ratio of amount in the sample to the threshold value determined in oil. <sup>d</sup>Orthonasal threshold value determined in oil according to ref 35.

OAV > 1 were detected in the incubated chocolate, 12 in the fermented, and 8 in the unfermented chocolate. Overall, the incubated and fermented chocolates reached higher values compared to the unfermented chocolate. The values determined for the incubated chocolate were somehow lower in comparison to the OAVs of the fermented chocolate. A major difference in the OAV profile of these two chocolates is the 13-fold higher OAV for 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine in the fermented chocolate, and the somewhat higher OAV determined for the Strecker aldehydes 2- and 3-methylbutanal in the incubated chocolate.

The highest OAV in the incubated chocolate were observed for dimethyl trisulfide (210), 3-methylbutanoic acid (120), and phenylacetic acid (114), followed by acetic acid (61), 3-methylbutanal (61), and 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (19). On the other hand, the fermented chocolate showed the highest values for 3-methylbutanoic acid (313), phenylacetic acid (162), and dimethyl trisulfide (148), followed by acetic acid (145) and 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (65). The highest OAV in the unfermented chocolate was reached by acetic acid (104), followed by phenylacetic acid (18) and 3-methylbutanal (14).

The different OAVs for all odorants of the three chocolates are reflected in the differences found for their sensory profiles. The high OAVs of pyrazines in the fermented sample might be linked to the intense perception of the attribute roasty, and the lower scores in the fruity and flowery perception in comparison to the incubated sample during sensory evaluation. However, the fact that the incubated and the fermented chocolate both showed typical dark chocolate aroma properties despite the low amounts of pyrazines in the incubated sample confirms the findings of Frauendorfer et al. (2019) that pyrazines are of negligible importance for the cocoa aroma.<sup>14</sup> Furthermore, a 2-fold higher OAV for the fruity ester ethyl 3-methylbutanoate was determined for the incubated chocolate (4) in comparison to the fermented chocolate (2). Even though these OAVs were both comparably low, it is possible that fruity and flowery notes were suppressed by the stronger roasty aroma notes in the fermented chocolate, while the low concentrations of pyrazines support the flowery and fruity aroma perception of the incubated chocolate.

A major difference in the aroma composition has been discovered among the pyrazines, which were measured in

much higher concentrations in the fermented chocolate compared to the incubated and unfermented chocolates. This may be due to a promoted formation of oligopeptides during fermentation, while the higher amounts of Strecker aldehydes in the incubated chocolate suggest a promoted formation of free amino acids.

The aroma of all chocolates was perceived as different from each other, which is not surprising, because of the given differences of the postharvest treatments used in comparison. Overall, the fermented and incubated chocolates showed a typical aroma and taste profile. In comparison, the unfermented chocolate did not elicit the pleasant attributes of dark chocolate, such as malty, roasty, fruity, and flowery aroma notes and was mostly perceived as green. Thereby, the green odor impression might be a result of the low abundances of 2- and 3-methylbutanal, pyrazines, dimethyl trisulfide, 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, and dimethyl trisulfide, and on the other hand, the relatively high odor activity value of acetic acid and also the presence of 2-isobutyl-3-methoxypyrazine, whose concentration and OAV were not determined due to its relatively low FD factor. Furthermore, a high astringency and bitterness could be perceived in the unfermented chocolate. In this study, it was observed that reduction of astringency and bitterness as reached during fermentation and drying, can also be achieved by applying the moist incubation treatment. This might be linked to the extent of polyphenol oxidase activity of the incubated cocoa tissue in addition to the use of an oxygen atmosphere during the incubation, as well as the contact of the incubated cocoa powder during drying. The present study showed that the moist incubation treatment of unfermented and dried nibs provides an intermediate product, which can be used to produce a chocolate with a pleasant aroma and taste. Thus, the proposed technique has the potential to serve as an alternative reproducible time- and location-independent postharvest treatment, which can be easily controlled. Besides, this study gives interesting insights into the formation of typical cocoa aroma compounds, especially the Strecker aldehydes and pyrazines, which were formed to different extents, depending on the applied postharvest treatment. To understand the underlying mechanisms leading to the obtained aroma and taste profile, more research regarding the nonvolatile components is necessary.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.1c08238>.

Attributes, definitions, and references for the evaluation of the incubated, unfermented, and fermented chocolates (Table S1); mean scores of attributes, *p*-values from ANOVA, and results from post hoc test (Fisher's L.S.D.) from the sensory evaluation of the incubated, unfermented, and fermented chocolates (Table S3) and cocoa odorants, standards, selected ions (*m/z*) of analytes, standards, and calibration lines used for quantitation (Table S3) (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

Irene Chetschik – Life Sciences and Facility Management, Zurich University of Applied Sciences (ZHAW), 8820 Wädenswil, Switzerland; [orcid.org/0000-0002-7009-6357](https://orcid.org/0000-0002-7009-6357); Phone: +41 58 934 5651; Email: [irene.chetschik@zhaw.ch](mailto:irene.chetschik@zhaw.ch); Fax: +41 58 934 5001

### Authors

Ansgar Schlüter – Life Sciences and Facility Management, Zurich University of Applied Sciences (ZHAW), 8820 Wädenswil, Switzerland; Hamburg School of Food Science, Institute of Food Chemistry, University of Hamburg, 20146 Hamburg, Germany

Tilo Hühn – Life Sciences and Facility Management, Zurich University of Applied Sciences (ZHAW), 8820 Wädenswil, Switzerland

Markus Kneubühl – Life Sciences and Facility Management, Zurich University of Applied Sciences (ZHAW), 8820 Wädenswil, Switzerland

Karin Chatelain – Life Sciences and Facility Management, Zurich University of Applied Sciences (ZHAW), 8820 Wädenswil, Switzerland

Sascha Rohn – Hamburg School of Food Science, Institute of Food Chemistry, University of Hamburg, 20146 Hamburg, Germany; Institute of Food Technology and Chemistry, Technische Universität Berlin, 13355 Berlin, Germany

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.1c08238>

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Lisa Ullrich for her outstanding technical support and all of the participants of the ZHAW Cocoa/Chocolate Sensory Panel.

## ■ ABBREVIATIONS USED

AEDA, aroma extract dilution analysis; FD, flavor dilution; FFAP, free fatty acid phase; GC-MS, gas chromatography–mass spectrometry; GC-O, gas chromatography–olfactometry; OAV, odor activity value; SAFE, solvent-assisted flavor evaporation; ZHAW, Zurich University of Applied Sciences

## ■ REFERENCES

- (1) Lopez, A. S.; Dimick, P. Cocoa fermentation. In *Biotechnology: Enzymes, Biomass, Food and Feed*; Reed, G., Nagodawithana, T. W., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 1995; pp 561–577.
- (2) Biehl, B.; Ziegler, G. Cocoa: Chemistry of processing. In *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*; Caballero, B., Ed.; Academic Press: Amsterdam, Netherlands, 2003; Vol. 9, pp 1436–1448.
- (3) Biehl, B. Proteinhydrolyse während der Kakaofermentation in Abhängigkeit von Wechselwirkungen mit Polyphenolen unter anaeroben und aeroben Bedingungen (in German). *Z. Lebensm.-Unters. -Forsch.* **1967**, *133*, 145–158.
- (4) Kadow, D.; Niemenak, N.; Rohn, S.; Lieberei, R. Fermentation-like incubation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) – Reconstruction and guidance of the fermentation process. *LWT-Food Sci. Technol.* **2015**, *62*, 357–361.
- (5) Eyamo Evina, V. J.; De Taeye, C.; Niemenak, N.; Youmbi, E.; Collin, S. Influence of acetic and lactic acids on cocoa flavan-3-ol degradation through fermentation-like incubations. *LWT-Food Sci. Technol.* **2016**, *68*, 514–522.
- (6) Biehl, B.; Brunner, E.; Passern, D.; Quesnel, V. C.; Adomako, D. Acidification, Proteolysis and Flavour Potential in Fermenting Cocoa Beans. *J. Sci. Food. Agric.* **1985**, *36*, 583–598.
- (7) John, W. A.; Böttcher, N. L.; Behrends, B.; Corno, M.; D'souza, R. N.; Kuhnert, N.; Ullrich, M. S. Experimentally modelling cocoa bean fermentation reveals key factors and their influences. *Food Chem.* **2020**, *302*, No. 125335.
- (8) Schlüter, A.; Hühn, T.; Kneubühl, M.; Chatelain, K.; Rohn, S.; Chetschik, I. Novel Time- And Location-Independent Postharvest Treatment of Cocoa Beans: Investigations on the Aroma Formation during moist Incubation of Unfermented and Dried Cocoa Nibs and Comparison to Traditional Fermentation. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 10336–10344.
- (9) Schieberle, P.; Hofmann, T. Mapping the Combinatorial Code of Food Flavors by Means of Molecular Sensory Science Approach. In *Food Flavors: Chemical. In Sensory and Technological Properties*; Jelen, H., Ed.; CRC Press: New York, USA, 2011; pp 413–438.
- (10) Mohr, W. Über das Rösten von Kakaobohnen (in German). *Fette, Seifen, Anstrichmittel.* **1970**, *72*, 695–703.
- (11) Chetschik, I.; Pedan, V.; Chatelain, K.; Kneubühl, M.; Hühn, T. Characterization of the Flavor Properties of Dark Chocolates Produced by a Novel Technological Approach and Comparison with Traditionally Produced Dark Chocolates. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 3991–4001.
- (12) Chetschik, I.; Kneubühl, M.; Chatelain, K.; Schlüter, A.; Bernath, K.; Hühn, T. Investigations on the Aroma of Cocoa Pulp (*Theobroma cacao* L.) and Its Influence on the Odor of Fermented Cocoa Beans. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 2467–2472.
- (13) Seyfried, C.; Granvogel, M. Characterization of the Key Aroma Compounds in Two Commercial Dark Chocolates with High Cocoa Contents by Means of the Sensomics Approach. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 5827–5837.
- (14) Frauendorfer, F.; Schieberle, P. Key aroma compounds in fermented Forastero cocoa beans and changes induced by roasting. *Eur. Food Res. Technol.* **2019**, *245*, 1907–1915.
- (15) Frauendorfer, F.; Schieberle, P. Changes in key aroma compounds of Criollo cocoa beans during roasting. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10244–10251.
- (16) Bagan, S. J. *Einfluss von Fermentationsdauer und Röstung auf die Bildung von Aromastoffen und Aromaprekursoren in Konsumkakao*; Technical University of Munich: Munich, Germany, 2007 (in German).
- (17) Gill, M. S.; Macleod, A. J.; Moreau, M. Volatile components of cocoa with particular reference to glucosinolate products. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 1937–1942.
- (18) Counet, C.; Callemien, D.; Ouwerx, C.; Collin, S. Use of gas chromatography-olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2385–2391.

- (19) Afoakwa, E. O.; Paterson, A.; Fowler, M.; Ryan, A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2008**, *48*, 840–857.
- (20) Ziegleder, G. Verfahrenstechnische Einflüsse auf Kakaoaroma I, II (in German). *Zucker- und Suesswaren Wirtsch.* **1993**, *46*, 131–133.
- (21) Lopez, A.; Quesnel, V. C. Volatile fatty acid production in cacao fermentation and the effect on chocolate flavour. *J. Sci. Food Agric.* **1973**, *24*, 319–326.
- (22) Ziegleder, G. Flavour development in cocoa and chocolate. In *Becketts Industrial Chocolate Manufacture and Use*; Beckett, S. T., Fowler, M. S., Ziegler, G. R., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd., 2017; Vol. 48, pp 185–215.
- (23) Schieberle, P.; Pfner, P. Characterization of key odorants in chocolate. In *Flavor Chemistry: 30 Years of Progress*; Teranishi, R., Wick, E. L., Hornstein, L., Eds.; Springer: Boston, 1999; Vol. 101, pp 147–153.
- (24) Parker, J. K. Thermal generation of aroma. In *Flavour Development, Analysis and Perception in Food and Beverages*; Parker, J. K., Elmore, J. S., Methven, L., Eds.; Elsevier Ltd.: New York, 2015; Vol. 106, pp 151–185.
- (25) Schieberle, P.; Hofmann, T. New results on the formation of important Maillard aroma compounds. In *Advances in Flavours and Fragrances: From the Sensation To the Synthesis*; Swift, K. A. D., Schieberle, P., Hofmann, T., Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2002; pp 163–177.
- (26) Granvogel, M.; Beksan, E.; Schieberle, P. New insights into the formation of aroma-active Strecker aldehydes from 3-oxazolines as transient intermediates. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 6312–6322.
- (27) Buhr, K.; Pammer, C.; Schieberle, P. Influence of water on the generation of Strecker aldehydes from dry processed foods. *Eur. Food Res. Technol.* **2010**, *230*, 375–381.
- (28) Ullrich, L.; Neiens, S.; Hühn, T.; Steinhaus, M.; Chetschik, I. Impact of Water on Odor-Active Compounds in Fermented and Dried Cocoa Beans and Chocolates Made thereof. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 8504–8510.
- (29) Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. *Food Chem.*; 4th; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 2009.
- (30) Scalone, G. L. L.; Cucu, T.; De Kimpe, N.; De Meulenaer, B. Influence of Free Amino Acids, Oligopeptides, and Polypeptides on the Formation of Pyrazines in Maillard Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 5364–5372.
- (31) Zou, T.; Liu, J.; Song, H.; Liu, Y. Discovery of Amadori-Type Conjugates in a Peptide Maillard Reaction and Their Corresponding Influence on the Formation of Pyrazines. *J. Food Sci.* **2018**, *83*, 1588–1595.
- (32) Andruszkiewicz, P. J.; DSouza, R. N.; Corno, M.; Kuhnert, N. Novel Amadori and Heyns compounds derived from short peptides found in dried cocoa beans. *Food Res. Int.* **2020**, *133*, No. 109164.
- (33) Biehl, B.; Ziegleder, G. Cocoa: Chemistry of processing. In *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*; Caballero, B., Ed.; Academic Press: Cambridge, 2003; Vol. 9, pp 1436–1448.
- (34) Kreissl, J.; Mall, V.; Steinhaus, P.; Steinhaus, M. *Leibniz-LSB Odorant Databas*. Version 1.0; Leibniz-Institute for Food Systems Biology at the Technical University of Munich: Freising, Germany, <https://www.leibniz-lsb.de>, 2019.
- (35) Poehlmann, S.; Schieberle, P. Characterization of the Aroma Signature of Styrian Pumpkin Seed Oil (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo* var. *Styriaca*) by Molecular Sensory Science. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 2933–2942.

### 7.3 Publikation 3

#### **Influence of aerobic- and anaerobic moist incubation on selected non-volatile constituents – comparison to traditionally fermented cocoa**

**Schlüter, A.;** André, A.; Hühn, T.; Rohn, S.; Chetschik, I.

*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70, 16335–16346

**Impact Factor 2021 = 5.895**

#### Synopse:

Im Rahmen der ersten zwei Publikationen wurde der Fokus auf die Aromabildung während der Feucht-Inkubation im Vergleich zur Fermentation und der resultierenden Endprodukte gelegt. Es konnte gezeigt werden, dass die Feucht-Inkubation zur Bildung von Schlüsselaromastoffen führte. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass aus dem feucht-inkubiertem Material dunkle Schokoladen hergestellt werden konnten, die typische sensorische Eigenschaften aufwiesen.

In der dritten Publikation wurde die Feucht-Inkubation sowohl unter anaeroben als auch aeroben Bedingungen durchgeführt. Ziel dieser Untersuchung war es zu ermitteln, wie sich die Sauerstoffverfügbarkeit auf die Ausbeuten an Aromavorstufen auswirkt und den Einfluss auf die im Kakao enthaltenen Polyphenole und Methylxanthine zu bestimmen. Neben photometrischen Messungen des Gesamtphenolgehaltes, des Gesamtgehaltes an Flavan-3-olen und des Fermentationsindexes wurden die monomeren und niederpolymerisierten Verbindungen (–)-Epicatechin, (+)-Catechin, Procyanidin B2, Procyanidin C1 und Cinnamtannin A2 sowie die Gehalte an Theobromin und Koffein mittels HPLC-MS (QTOF) in unfermentierten, fermentierten, aerob feucht-inkubierten und anaerob feucht-inkubierten Kakaonibs gemessen. Zudem erfolgte eine enzymatische Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose, sowie die Quantifizierung der freien Aminosäuren mittels HPLC-FLD, um die Aromavorstufenbildung vergleichen zu können. Anhand der erzielten Resultate sollte evaluiert werden, ob die Feucht-Inkubation in der Praxis als eine kontrollierbare Nacherntebehandlung verwendet werden könnte.

Das Rohmaterial für diese Studie stammte von einer Farm in Costa Rica (Ernte 2020). Während der Ernte wurde ein Teil der Bohnen direkt getrocknet, womit die Fermentation weitestgehend unterbunden werden konnte und die Bohnen lager- und transportfähig sind. Der andere Teil der Ernte wurde einer traditionellen Kastenfermentation unterzogen, wie es auf der Farm üblich ist.

## Kumulativer Teil der Dissertation

---

Die unfermentierten und fermentierten Kakaobohnen wurden nach Wädenswil (CH) transportiert, wo die Durchführung der Versuche und die Analysen in den Laboratorien und Technikumsräumen der Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften (ZHAW) durchgeführt wurden.

Der Eigenanteil dieser Publikation liegt bei 65 %.

Reprinted with permission from Schlüter, A.; André, A.; Hühn, T.; Rohn, S.; Chetschik, I. Influence of Aerobic- and Anaerobic Moist Incubation on Selected Non- Volatile Constituents – Comparison to Traditionally Fermented Cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2022; 70 (51): 16335–16346. Copyright 2022 American Chemical Society

# Influence of Aerobic and Anaerobic Moist Incubation on Selected Nonvolatile Constituents—Comparison to Traditionally Fermented Cocoa Beans

Ansgar Schlüter, Amandine André, Tilo Hühn, Sascha Rohn, and Irene Chetschik\*



Cite This: *J. Agric. Food Chem.* 2022, 70, 16335–16346



Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

**ABSTRACT:** Recently, moist incubation has been proposed as an alternative postharvest processing method for cocoa beans. During this treatment, unfermented and dried cocoa nibs are rehydrated with a lactic acid solution containing ethanol and subsequently incubated for 72 h at 45 °C before drying. Previous studies focused on the aroma formation during this treatment and the further processing of chocolate. The current study focused on the influence of aerobic and anaerobic moist incubation on selected nonvolatile components in comparison with the unfermented raw material and traditionally fermented cocoa. Total phenolic content and total flavan-3-ol content, contents of (+)-catechin, (–)-epicatechin, procyanidins B2 and C1, cinnamtannin A2, methylxanthines (theobromine and caffeine), contents of sugars (sucrose, D-glucose, and D-fructose) and free amino acids (17 proteinogenic amino acids) were determined. The fermentation index was also evaluated. The aerobically incubated and fermented cocoa showed low levels of phenolic compounds in comparison to the unfermented cocoa and the anaerobically incubated cocoa. The level of methylxanthines was unaffected by all treatments. The contents of reducing sugars were more than 2-fold higher after both incubation treatments compared to fermentation. The level of free amino acids liberated was highest after anaerobic incubation followed by fermentation and aerobic incubation. The aerobically incubated cocoa showed the highest FI, while the anaerobically incubated cocoa may be considered under-fermented (FI <1.0). Statistical analysis (ANOVA) showed significant differences between all treatments, which was verified by principal component analysis.

**KEYWORDS:** *cocoa postharvest treatment, cocoa incubation, polyphenols, aroma precursors*

## INTRODUCTION

Cocoa with its distinct flavor properties serves as the basis for a broad variety of chocolate and confectionary products consumed and is highly appreciated worldwide. During traditional postharvest processing, ripe and fresh cocoa beans are subjected to microbial fermentation of the fruit pulp and subsequent drying before further processing into consumable cocoa-based products. After harvest, beans and the surrounding fruit pulp are removed manually from the cocoa pods and put in wooden boxes or on heaps before covering them with banana leaves or jute bags.<sup>1</sup> During the early anaerobic stage of fermentation, sugars and citric acid contained in the fruit pulp are metabolized by yeasts and lactic acid bacteria under anaerobic conditions yielding mainly ethanol, CO<sub>2</sub>, and lactic acid.<sup>2</sup> Due to drainage of the fruit pulp, which is supported by the pectinolytic activity of certain yeast strains, oxygen availability within the pile of biomass increases.<sup>3</sup> With increasing aerobic conditions usually supported by periodic turning and mixing of the beans, acetic acid bacteria proliferate, metabolizing ethanol into acetic acid. This causes the temperature to rise to approximately 45–50 °C within the fermentation mass.<sup>1,2</sup> The acidification of the beans by the diffusion of acidic and lactic acid to reach a pH value within the beans between 4.5 and 5.5, combined with the rise in temperature, leads to the death of the embryo. This initiates the breakdown of the cell structure within the bean, so endogenous enzymes and beans' major constituents, that is,

soluble proteins, carbohydrates, and polyphenols, get into contact by diffusion to form important aroma precursors and facilitate the transformation of phenolic compounds.<sup>4,5</sup> Sucrose is degraded by invertase to the monomeric reducing sugars D-glucose and D-fructose.<sup>6</sup> Proteins are hydrolyzed by proteolytic enzymes to a variety of peptides and free amino acids.<sup>5,7</sup> Especially, hydrophobic amino acids such as phenylalanine, valine, leucine, isoleucine, and hydrophilic peptides have been identified as specific cocoa aroma precursors. They are released by the sequenced activity of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase preferably at a pH value of 5.0–5.5.<sup>4,5</sup> During the later stages of fermentation when oxygen availability in the fermenting mass increases, flavan-3-ols such as (–)-epicatechin and (+)-catechin and short-chained procyanidins such as procyanidin B1 [dimer with one unit (–)-epicatechin and one unit (+)-catechin], procyanidin B2 [dimer with two units (–)-epicatechin], procyanidin C1 [trimer with three units (–)-epicatechin], and cinnamtannin A2 [tetramer with four units (–)-epicatechin] are oxidized to

**Received:** September 19, 2022

**Revised:** November 20, 2022

**Accepted:** November 30, 2022

**Published:** December 16, 2022



form polymeric tannins.<sup>8</sup> These polymers can form complexes with other constituents such as proteins, lowering the astringency and bitterness of the raw material.<sup>1,4</sup> The chemical- and enzyme-catalyzed oxidation, polymerization, and complexation reactions of the polyphenols are responsible for the browning of the cocoa beans. The browning continues during drying, which is typically initiated after approximately 5–8 days after the start of fermentation by spreading the beans to sun-dry or using artificial dryers.<sup>1</sup>

Many recent studies used the incubation of fresh cocoa seeds to study the transformations within the beans without the influence of microorganisms. Fresh seeds were incubated in pH-adjusted solutions under controlled temperature and oxygen regimes, which were adjusted to simulate the conditions during fermentation.<sup>9–12</sup> It was shown that the desired transformations of major components in the beans such as sugars, proteins, and polyphenols could be achieved as well.<sup>11,12</sup> Thus, a possible implementation of this process on cocoa farms is discussed controversially. However, upscaling this process may not be feasible because of the expensive infrastructure(s) required.

Recent studies proposed “moist incubation” of unfermented and dried cocoa nibs as a possible time- and location-independent postharvest treatment.<sup>13,14</sup> During this treatment, the beans are sun-dried immediately after harvest to a moisture content of approximately 6–8% to be stable for transportation or storage. During drying, the embryo is inactivated, while the beans’ endogenous enzymes stay active but are separated from their substrates.<sup>15–17</sup> After deshelling the beans, the nibs are rehydrated with a lactic acid solution containing ethanol to reach a pH value of ~5.0. This presumably facilitates contact between enzymes and substrates in the same manner as during fermentation. The nibs are then incubated at 45 °C for approximately 72 h under aerobic conditions before drying. It was shown that this method can be used to produce chocolate with pleasant flavor properties.<sup>13,14</sup> Fruity esters and malty Strecker aldehydes were found in higher quantities in the moist incubated samples in comparison to fermented cocoa. On the other hand, volatile acids with unpleasant odor qualities such as acetic acid and 2- and 3-methylbutanoic acid were found in higher quantities in the fermented samples. These previous studies focused on the identification and quantification of some key aroma compounds, but no measurements of nonvolatile components were made. Furthermore, the moist incubations done in the previous studies were conducted under strict aerobic conditions. It is well known that the availability of oxygen during postharvest processing plays an important role in supporting the oxidation of phenolic substances and the browning process.<sup>1</sup> After the analysis of the sensory impact and the influence on aroma generation which was conducted in the previous investigations, the impact of the treatment on the nonvolatile constituents should be examined. Consequently, the aim of the present study was to investigate the effect of moist incubation with and without the addition of oxygen on the evolution of important nonvolatile components, such as flavan-3-ols, caffeine, theobromine, sugars, and free amino acids in comparison to traditional fermentation.

## MATERIALS AND METHODS

**Raw Materials and Experiments.** The raw materials were obtained from the same source and were processed in the same manner as described before.<sup>13,14</sup> Cocoa of the cultivar Trinitario was harvested in a farm in Bijagua, Costa Rica, during the harvest of 2021,

and the batch was separated to obtain fermented and unfermented cocoa beans: approximately 80 kg of the batch was directly spread as a single bean layer on drying trays with a meshed bottom (mesh size ~0.75 cm) to allow for excessive pulp to drain off and support sufficient aeration. The beans were turned, mixed, and kneaded manually at least two times per day to support homogeneous drying and avoid the formation of bean clusters. Drying was finished when a final moisture content of ~6–8% was reached in the beans. To produce the reference, the traditionally fermented cocoa beans, about 80 kg of the fresh beans were filled in a wooden fermentation box and covered with banana leaves to start the fermentation. Mixing and aeration were performed manually after 48 h and were repeated every 24 h until a total fermentation time of approximately 120 h was reached. The beans were then dried as described above to stop the fermentation. About 20 kg of these samples was packed in a plastic bag and closed with a cable tie to prevent the beans from possible rehumidification, transported by air cargo to Wädenswil, Switzerland, and stored at 12 °C until further processing. The beans were broken and deshelled using a lab-scale breaker (Limprimita cocoa breaker, Capco/Castlebrook Engineering, Ltd., Ipswich, U.K.) and winnower (cocoa winnower large, Capco/Castlebrook Engineering, Ltd., Ipswich, U.K.) to obtain unfermented and fermented cocoa nibs. The moist incubations were performed as described before<sup>13,14</sup> with the difference that they were conducted under aerobic as well as anaerobic conditions to investigate the influence of forced and suppressed aeration on the yield of the different analytes.

For the aerobic moist incubation, three portions of 20 g ( $\pm 0.1$  g) of unfermented nibs were rehydrated under vacuum in a sealed bag for 12 h at 4 °C with 10.6 g ( $\pm 0.01$  g) of an aqueous solution containing lactic acid (0.1 mol/L) and ethanol (5% v/v) to reach a pH value of 5.2 in the cocoa solids and a final moisture content of approximately 35%. The bags were then opened, fumigated with oxygen, sealed, and then incubated at 45 °C for 72 h in a laboratory incubator under occasional mixing by turning and kneading the bags every 12 h. After incubation, the samples were dried on trays at 40 °C for 24 h in a laboratory oven with air circulation under occasional turning until a final moisture content <6% was reached. For the anaerobically incubated material, the same protocol was followed with the difference that the vacuum bags were kept sealed until the end of incubation time, so the material was only subjected to oxygen during drying.

From the fermented and unfermented cocoa, only one batch was available. For their analysis, three random samples of 15 g of deshelled nibs were taken and defatted. The results are expressed as mean values with the calculated standard deviations (SDs) ( $n = 3$ ).

The incubation experiments were performed in triplicates. For analysis, three random samples of each batch were taken, defatted, and analyzed individually, leading to nine replicates for each incubation treatment ( $n = 9$ ). The results are expressed as mean values with the calculated SDs.

The materials are hereafter referred to as “unfermented cocoa”, “aerobically incubated cocoa”, “anaerobically incubated cocoa”, and “fermented cocoa”.

**Chemicals and Reagents.** All solvents and chemicals that were used were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Switzerland) unless a differing supplier is given in parenthesis.

**Chemicals Used for Sample Preparation, Extraction, and Analysis.** Acetic acid, dimethylsulfoxide, ethanol absolute (VWR International GmbH, Dietikon), Folin and Ciocalteu reagent (2 N), *n*-hexane (VWR International GmbH, Dietikon), hydrochloric acid (37%), L-(+)-lactic acid, OPA reagent, potassium hexacyanoferrate(II) trihydrate (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany), sodium acetate (Carl Roth GmbH & Co. KG, Germany), sodium carbonate, trifluoroacetic acid, and zinc acetate dihydrate (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany) were used.

**Solvents and Chemicals Used for HPLC–MS/MS, HPLC–UV/Vis, and HPLC–FLD Analysis (MS Grade).** Acetone, acetonitrile, ammonium acetate, Borax, formic acid, methanol, sulfuric acid, and water (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany) were used.

**Standards Used for Identification and Quantitation.** For the preparation of standards for identification and quantitation, the following substances were used: L-alanine, L-arginine, L-asparagine, L-aspartic acid, caffeine, L-glutamine, L-glutamic acid, L-glycine, L-histidine, L-isoleucine, L-leucine, L-lysine, L-methionine, L-phenylalanine, L-serine, theobromine, TraceCERT (amino acid standard mix), L-tryptophan, L-tyrosine, L-valine. (+)-Catechin, cinnamtannin A2, (–)-epicatechin, procyanidin B2, and procyanidin C1 were purchased from PhytoLab GmbH und Co. KG (Vestenbergsgreuth, Germany). For enzymatic sugar measurements, the Enzytec sugar standard (E8445) (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany) was used for calibration.

## METHODS

**Sample Preparation.** The preparation of the cocoa material was performed in the same manner as described by Pedan et al. (2016) with slight modifications.<sup>18</sup> The dried cocoa nibs were frozen with liquid nitrogen and ground for 30 s to a fine powder using a laboratory mill (A 11 basic analytical mill, IKA Werke GmbH und Co. KG, Staufen, Germany). The ground samples were defatted with *n*-hexane (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Germany) eight times using the following protocol: the sample material and hexane were extracted in a 50 mL tube with a sample-to-solvent ratio of 1:3 (w/v) for 10 min using an overhead shaker (Reax 2, Heidolph Instruments GmbH und Co. KG, Schwabach, Germany) before centrifugation at 2880g (Type 5810, Vaudaux-Eppendorf, Schönenbuch, Switzerland) for additional 10 min. The solvent was then decanted before the next defatting cycle was started using a fresh solvent. After the final defatting cycle, the sample material was spread in a Petri dish and dried under the fume hood overnight to evaporate excess hexane. The material was then kept at –20 °C in sealed bags until further analysis.

**Extraction of Samples.** For the determination of different analytes, three different extracts were prepared.

**Acetone/Water Extracts for the Analysis of Phenolic Compounds and Methylxanthines.** Extracts were prepared as described by Pedan et al. (2016) with slight modifications.<sup>18</sup> Samples of 0.5 g ( $\pm 0.01$  g) were extracted three times with 1.5 mL of 50% acetone in water (v/v) at 50 °C for 8 min using a heated laboratory shaker (Hettich AG, Tuttlingen, Germany) and subsequently centrifuged at 2880g for 5 min (Type 5810, Vaudaux-Eppendorf AG, Schönenbuch, Switzerland). After centrifugation, supernatants were combined and subsequently filtered through a syringe filter (RC membrane, 0.2  $\mu$ m, Phenomenex Helvetia GmbH, Basel, Switzerland) into glass vials, which were then sealed and maintained at –20 °C until further analysis.

**Trifluoroacetic Acid Extracts for the Analysis of Free Amino Acids.** Extractions for the determination of free amino acids were performed in the same manner as described for the acetone/water extracts, except that 0.30 g ( $\pm 0.01$  g) of the sample was extracted three times with 1 mL of a modified solution to extract free amino acids from the study by Murthy et al. (1997), containing 0.11 mol/L trifluoro acetic acid, 0.22 mol/L sodium acetate, and 0.33 mol/L acetic acid.<sup>19</sup>

**Water Extracts for the Analysis of Sugars.** Extracts for the determination of sugars were obtained using the same protocol, except that 0.50 g ( $\pm 0.01$  g) of the defatted sample was extracted with water. After complete extraction, Carrez clarification was performed by adding 0.25 mL of potassium hexacyanoferrate(II) trihydrate (150 g/L) and 0.25 mL of zinc acetate dihydrate (230 g/L) to the combined supernatants to precipitate proteins. After centrifugation, the clear supernatant was filtered through a syringe filter (RC membrane, 0.2  $\mu$ m, Phenomenex Helvetia GmbH, Basel, Switzerland) and kept in sealed glass vials at –20 °C until further analysis.

**Analysis. Total Phenolic Content.** The total phenolic content (TPC) was determined based on the method described by Blois (1958).<sup>20</sup> First, the acetone/water extracts of the samples were diluted with water 1:400. Then, 20  $\mu$ L of the diluted sample extract, 20  $\mu$ L of Folin reagent (25% solution (v/v) prepared with 2 N Folin reagent in water), and 80  $\mu$ L of a sodium carbonate/water solution

(100 g/L) were mixed in a 96-well plate and incubated at room temperature in the dark for 2 h. The absorption of the samples was then measured using an automated UV/vis-spectrophotometer (BioTek Instruments Epoch 2, Agilent Technologies AG, Switzerland) at 750 nm. For the calibration, standard solutions in the range of 0.01 mg/mL to 0.06 mg/mL with (–)-epicatechin were prepared in the same manner, and water was used as a blank.

Every sample was measured in duplicates, and the means were used for further calculations. The TPC was calculated using linear regression. Calibration equations are shown in Table S1. The results are expressed as milligram (–)-epicatechin equivalents per gram of fat-free dry matter of the sample (mg EE/g ffdm).

**Total Content of Flavan-3-ols.** The total flavan-3-ol content (TFC) was determined using the method described by Payne et al. (2010) with minor modifications.<sup>21</sup> To prepare the 4-(dimethylamino)cinnamaldehyde (DMAC) solution, 0.0300 g ( $\pm 0.001$  g) of DMAC was added to 30 mL of a 10% hydrochloric acid/ethanol solution (v/v). This solution was stored at 4 °C for at least 15 min before use. For the measurements, 50  $\mu$ L of acetone/water extract of the sample was pipetted in a 96-well plate and mixed with 250  $\mu$ L of the DMAC solution. The absorption at 640 nm was read immediately using an automated plate reader as described for the TPC measurements. For a five-point calibration, procyanidin B2 at the concentrations of 0.001–0.1 mg/mL in 50% methanol in water (v/v) was prepared. Ethanol was used as a blank. The unfermented samples were diluted 1:2 using ethanol to meet a concentration within the calibration range. Every sample was measured in duplicates, and the means were used for further calculations. The TFC was calculated using linear regression. Calibration equations are shown in Table S1. The results are expressed as milligram procyanidin B2 equivalents per gram of fat-free dry matter of the sample (mg PE/g ffdm).

**Quantitation of Selected Flavan-3-ols, Procyanidins, and Methylxanthines (HPLC–MS/MS).** As determined, the acetone/water extracts were diluted prior to the analysis with a solution containing 50% (v/v) acetonitrile in water: 1:100 for the unfermented beans, 1:4 for the fermented beans, and 1:2 for the incubated beans.

High-performance liquid chromatography (HPLC)–mass spectrometry (MS)/MS analysis was conducted on a system consisting of an Agilent 1290 Infinity II chromatographic system coupled to an Agilent 6530 Q-TOF mass spectrophotometer. The separation of analytes was performed using an Agilent Poroshell 120 EC-C18 (2.1  $\times$  150 mm, 2.7  $\mu$ m) column preceded by a guard column (Agilent Poroshell 120 EC-18, 2.1  $\times$  5 mm, 2.7  $\mu$ m). The flow rate was set to 0.7 mL/min, and the column temperature was set at 35 °C. The two elution mobile phases were made up of water +0.1% formic acid (FA) (mobile phase A) and acetonitrile +0.1% FA. HPLC gradient: 0–3 min, 5% B; 5 min, 9% B; 10 min, 9% B; 12 min, 20% B; 14 min, 24% B; 19 min, 25% B; 21 min, 30% B, 22–30 min, 100% B; 30.10–37 min, 5% B. The injection volume was 2  $\mu$ L. UV spectra were recorded at 275, 320, and 360 nm.

The MS analyses were performed using an Agilent 6530 Q-TOF instrument in negative ionization mode (ESI<sup>–</sup>) in the spectral range of 100–3200 Da. Nitrogen served as the nebulizer and collision gas. The MS parameters were as follows: gas temperature, 350 °C; drying gas, 10 L/min; nebulizer, 40 psi; sheath gas temperature, 350 °C; sheath gas flow, 11 L/min; capillary voltage, 4000 V.

For the analysis of the methylxanthines, the acetone/water extracts were diluted 1:100 with 50% (v/v) acetonitrile in water. The HPLC parameters were identical, and the MS analyses were performed using an Agilent 6530 Q-TOF instrument in positive ionization mode (ESI<sup>+</sup>), in the spectral range of 100–3200 Da. Nitrogen served as the nebulizer and collision gas. The MS parameters were as follows: gas temperature, 350 °C; drying gas, 10 L/min; nebulizer, 40 psi; sheath gas temperature, 350 °C; sheath gas flow, 11 L/min; capillary voltage, 4000 V. Pure substances were used for the determination of retention times and for the preparation of calibration lines (see Table S1). The contents of individual substances were calculated using linear regression. The results are expressed as mg/g ffdm.

**Quantitation of Free Amino Acids (HPLC–FLD).** The free amino acids were quantitated using an Agilent 1260 Infinity HPLC (Agilent

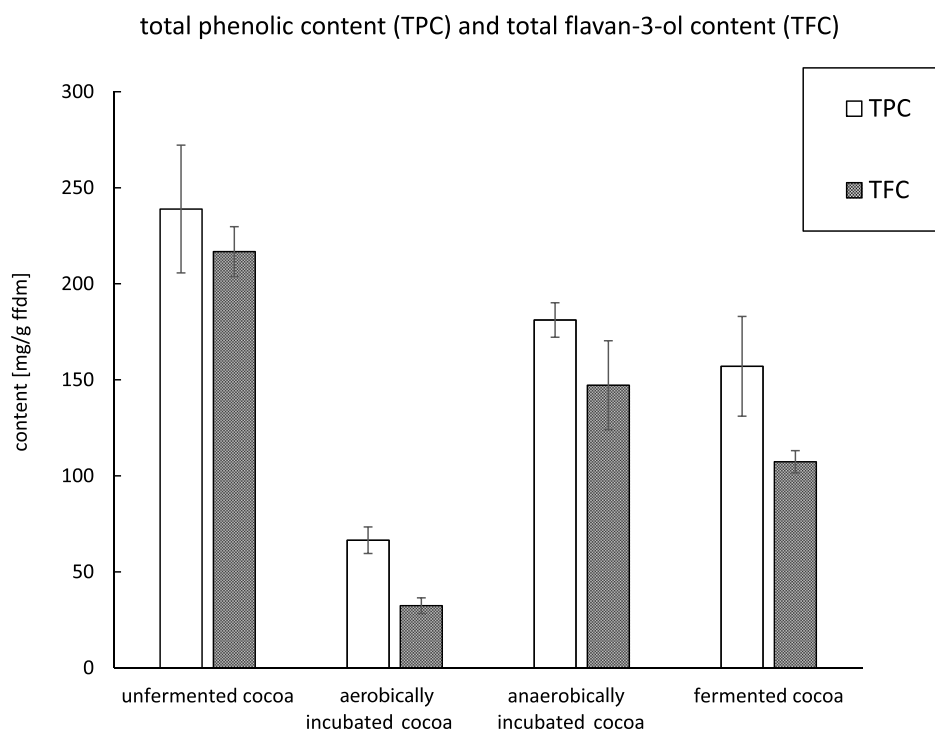
**Table 1. Results of the Determination of Phenolic Compounds, Methylxanthines, Sugars, Amino Acids, and FI in Unfermented Cocoa, Aerobically Incubated Cocoa, Anaerobically Incubated Cocoa, and Fermented Cocoa**

compound	content [mg/g ffdm]							
	unfermented cocoa		aerobically incubated cocoa		anaerobically incubated cocoa		fermented cocoa	
	mean	SD <sup>a</sup>	mean	SD <sup>b</sup>	mean	SD <sup>b</sup>	mean	SD <sup>a</sup>
Phenolic Compounds								
TPC <sup>c</sup>	239 <sub>c</sub>	33.3	66.5 <sub>a</sub>	6.91	181 <sub>b</sub>	8.98	157 <sub>b</sub>	26.0
TFC <sup>d</sup>	217 <sub>d</sub>	13.0	32.4 <sub>a</sub>	4.09	147 <sub>c</sub>	23.1	107 <sub>b</sub>	5.79
(+)-catechin	1.67 <sub>c</sub>	0.06	0.04 <sub>a</sub>	0.00	1.5 <sub>c</sub>	0.22	0.43 <sub>b</sub>	0.03
(-)-epicatechin	38.9 <sub>c</sub>	0.96	0.33 <sub>a</sub>	0.05	29.9 <sub>b</sub>	4.23	2.72 <sub>a</sub>	0.07
procyanidin B2	22.0 <sub>c</sub>	0.92	0.17 <sub>a</sub>	0.04	17.5 <sub>b</sub>	2.87	1.56 <sub>a</sub>	0.10
procyanidin C1	11.6 <sub>c</sub>	1.07	0.15 <sub>a</sub>	0.03	8.41 <sub>b</sub>	1.54	1.35 <sub>a</sub>	0.30
cinnamtannin A2	13.3 <sub>c</sub>	2.45	0.13 <sub>a</sub>	0.03	9.21 <sub>b</sub>	1.80	1.16 <sub>a</sub>	0.31
Methylxanthines								
theobromine	29.5 <sub>a</sub>	4.58	27.9 <sub>a</sub>	1.45	28.3 <sub>a</sub>	1.71	28.0 <sub>a</sub>	1.26
caffeine	8.64 <sub>a</sub>	0.65	8.63 <sub>a</sub>	0.52	8.28 <sub>a</sub>	0.51	8.38 <sub>a</sub>	0.22
Sugars								
sucrose	36.3 <sub>b</sub>	1.12	n.d.		n.d.		0.60 <sub>a</sub>	0.06
D-glucose	2.52 <sub>a</sub>	0.32	20.4 <sub>b</sub>	1.10	18.5 <sub>b</sub>	2.00	4.95 <sub>a</sub>	0.11
D-fructose	2.63 <sub>a</sub>	1.28	20.4 <sub>d</sub>	1.70	17.9 <sub>c</sub>	1.37	11.7 <sub>b</sub>	0.22
total reducing sugars <sup>e</sup>	5.15 <sub>a</sub>	0.73	40.8 <sub>d</sub>	1.85	36.3 <sub>c</sub>	1.28	16.6 <sub>b</sub>	0.31
Amino Acids								
L-aspartic acid	0.15 <sub>a</sub>	0.01	0.28 <sub>b</sub>	0.03	0.31 <sub>c</sub>	0.02	0.33 <sub>c</sub>	0.01
L-glutamic acid	0.97 <sub>a</sub>	0.13	1.09 <sub>ab</sub>	0.10	1.2 <sub>b</sub>	0.07	1.27 <sub>b</sub>	0.00
L-asparagine	0.32 <sub>a</sub>	0.03	0.38 <sub>b</sub>	0.03	0.51 <sub>c</sub>	0.03	0.42 <sub>b</sub>	0.00
L-serine	0.13 <sub>a</sub>	0.01	0.36 <sub>b</sub>	0.03	0.47 <sub>c</sub>	0.03	0.39 <sub>b</sub>	0.01
L-histidine	0.26 <sub>d</sub>	0.02	0.02 <sub>a</sub>	0.00	0.21 <sub>c</sub>	0.02	0.14 <sub>b</sub>	0.00
L-glutamine	0.19 <sub>b</sub>	0.01	0.15 <sub>a</sub>	0.01	0.25 <sub>c</sub>	0.01	0.18 <sub>b</sub>	0.01
L-glycine	0.08 <sub>a</sub>	0.01	0.09 <sub>a</sub>	0.00	0.23 <sub>b</sub>	0.01	0.21 <sub>b</sub>	0.01
L-arginine	0.23 <sub>a</sub>	0.01	0.56 <sub>b</sub>	0.04	1.27 <sub>d</sub>	0.06	1.00 <sub>c</sub>	0.00
L-alanine	0.70 <sub>a</sub>	0.07	1.29 <sub>c</sub>	0.07	1.41 <sub>d</sub>	0.09	1.02 <sub>b</sub>	0.02
L-lysine	0.13 <sub>a</sub>	0.01	0.61 <sub>b</sub>	0.03	1.13 <sub>c</sub>	0.06	1.15 <sub>c</sub>	0.11
L-tyrosine	0.39 <sub>a</sub>	0.07	0.56 <sub>b</sub>	0.04	0.98 <sub>c</sub>	0.08	0.92 <sub>c</sub>	0.05
L-valine	0.38 <sub>a</sub>	0.03	0.80 <sub>c</sub>	0.06	0.69 <sub>b</sub>	0.07	0.64 <sub>b</sub>	0.02
L-methionine	n.d.		n.d.		0.30 <sub>a</sub>	0.04	0.13 <sub>b</sub>	0.01
L-tryptophan	0.07 <sub>b</sub>	0.02	0.04 <sub>a</sub>	0.00	0.10 <sub>b</sub>	0.02	0.16 <sub>c</sub>	0.01
L-phenylalanine	0.60 <sub>a</sub>	0.06	1.02 <sub>b</sub>	0.07	1.81 <sub>c</sub>	0.09	1.79 <sub>c</sub>	0.05
L-isoleucine	0.29 <sub>a</sub>	0.03	0.37 <sub>b</sub>	0.03	0.41 <sub>bc</sub>	0.03	0.44 <sub>c</sub>	0.01
L-leucine	0.44 <sub>a</sub>	0.05	1.83 <sub>b</sub>	0.09	2.59 <sub>c</sub>	0.17	2.29 <sub>c</sub>	0.23
total hydrophobic amino acids <sup>f</sup>	2.88 <sub>a</sub>	0.29	5.91 <sub>b</sub>	0.32	8.31 <sub>d</sub>	0.37	7.39 <sub>c</sub>	0.36
total other amino acids	2.46 <sub>a</sub>	0.21	3.54 <sub>b</sub>	0.22	5.57 <sub>d</sub>	0.25	5.08 <sub>c</sub>	0.10
total amino acids	5.33 <sub>a</sub>	0.49	9.46 <sub>b</sub>	0.52	13.9 <sub>d</sub>	0.56	12.5 <sub>c</sub>	0.27
Other								
FI	0.36 <sub>a</sub>	0.00	1.72 <sub>d</sub>	0.02	0.65 <sub>b</sub>	0.01	1.19 <sub>c</sub>	0.01

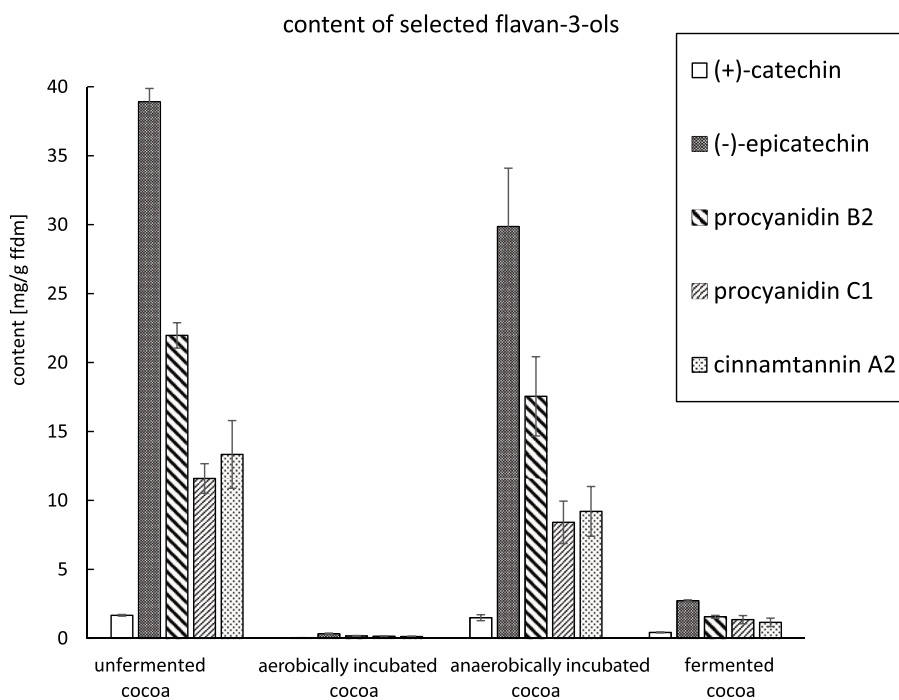
<sup>a</sup>Mean and SD were calculated from extractions of three random samples from the same batch of raw material ( $n = 3$ ). <sup>b</sup>Mean and SD were calculated from data obtained from three experimental replicates with three random samples of each experiment ( $n = 9$ ). <sup>c</sup>Total polyphenol content expressed as milligram (-)-epicatechin equivalents per gram of fat-free dry matter (mg EE/g ffdm). <sup>d</sup>Total flavan-3-ol content expressed as milligram procyanidin B2 equivalents per gram of fat-free dry matter (mg PE/g ffdm). <sup>e</sup>Sum of D-glucose and D-fructose. <sup>f</sup>Sum of L-alanine, L-tyrosine, L-valine, L-methionine, L-tryptophan, L-phenylalanine, L-isoleucine, and L-leucine. Values with different letters within one row show a significant difference between treatments according to the Tukey (HSD) test with a significance level of 95% ( $p < 0.05$ ).

Technologies (Schweiz) AG, Basel, Switzerland) system with a fluorescent detector (FLD). TFA extracts were derivatized prior to injection by programming the autosampler of the HPLC: 1  $\mu$ L of the TFA extract was mixed with 2  $\mu$ L of the Borax solution (25 mmol/L in water), then 3  $\mu$ L of OPA reagent was added and mixed, and finally, 1  $\mu$ L of a 10% (v/v) acetic-acid-in-water solution was added and mixed. The derivatized sample solution (7  $\mu$ L) was injected into the column (Agilent Poroshell 120 EC-C18 2.1  $\times$  50 mm, 2.7  $\mu$ m) at 20  $^{\circ}$ C. As mobile phase A, ammonium acetate buffer (50 mmol/L in water) was used. As mobile phase B, a solution made of 40% acetonitrile, 40% methanol, and 20% water (v/v/v) was used. HPLC

gradient: 0 min: 15% B; 3 min: 30% B; 10 min: 45% B; 12 min: 53% B; 20 min: 100% B. Fluorescent spectra were recorded at 340 nm (Ex) and 450 nm (Em). For identification of the individual amino acids and the determination of the corresponding retention times, an amino acid standard mix and solutions of each individual substance were used. Calibration lines were prepared by diluting the standard mix. Calibration ranges and equations are shown in Table S1. The fermented, aerobically incubated, and anaerobically incubated samples were diluted 1:2 to meet the calibration range. The contents of individual substances were calculated using linear regression. The results are expressed as mg/g ffdm. For evaluation, interpretation, and



**Figure 1.** TPC and TFC content determined in the unfermented cocoa, aerobically incubated cocoa, anaerobically incubated cocoa, and fermented cocoa. SDs are shown as bars.

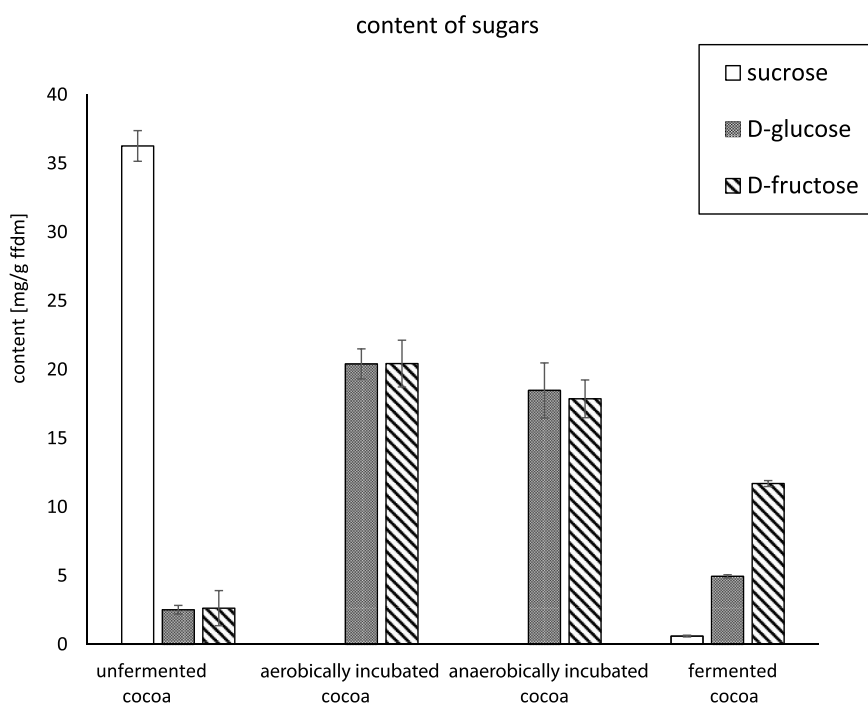


**Figure 2.** Contents of selected flavan-3-ols determined in the unfermented cocoa, aerobically incubated cocoa, anaerobically incubated cocoa, and fermented cocoa. SDs are shown as bars.

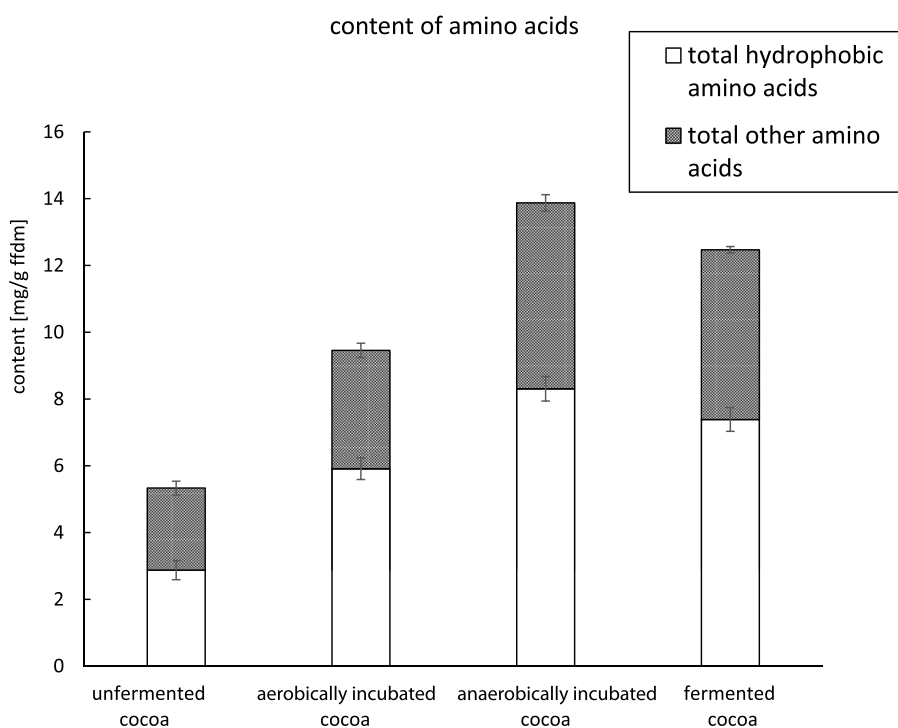
illustration of the results, amino acids were split into two groups and the amounts of the individual compounds were summed up: hydrophobic (L-alanine, L-tyrosine, L-valine, L-methionine, L-tryptophan, L-phenylalanine, L-isoleucine, and L-leucine) and other amino acids (L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-asparagine, L-serine, L-histidine, L-glutamine, L-glycine, L-arginine, and L-lysine).

**Quantitation of Sugars (Enzyme Assays).** Sucrose, D-glucose, and D-fructose were determined using enzymatic assays Enzytec Liquid D-glucose (E8140), sucrose/D-glucose (E8180), D-glucose/D-fructose

(E8160) (r-biopharm AG, Darmstadt, Germany) using an automated biochemistry analyzer (Type: Chemwell 2910, Awareness Technology Inc., Palm City, USA). The system was equipped with 96-well plates, and the temperature was set at 37 °C for incubation after each pipetting step according to the specific assay. Absorbance readings were made at 340 nm. For calibration, the Enzytec sugar standard (E8445) (r-biopharm AG, Darmstadt, Germany) was used. Calibration lines were prepared by diluting the standard mix. Calibration ranges and equations are shown in Table S1. The



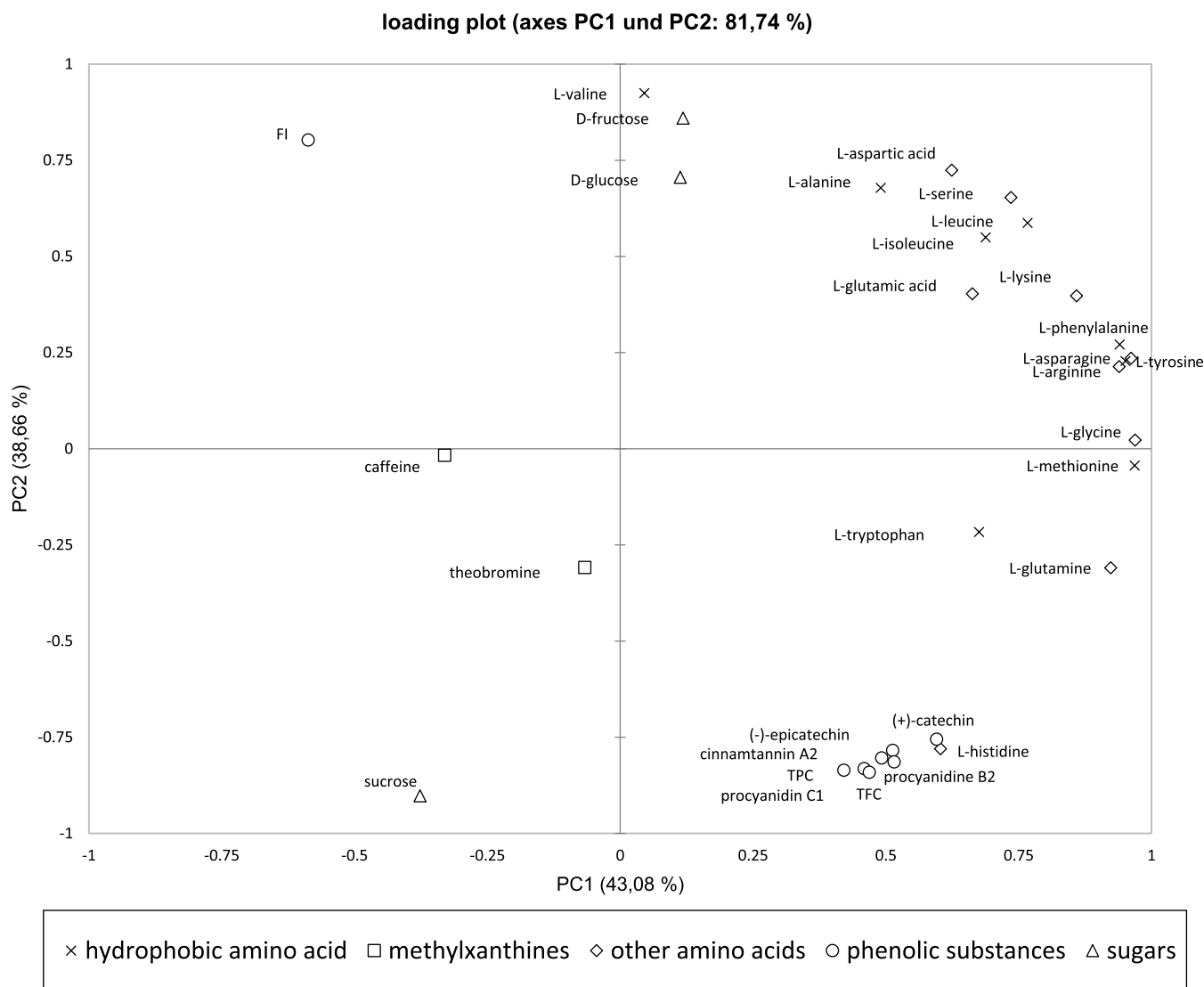
**Figure 3.** Amount of sucrose, D-glucose, and D-fructose determined in the unfermented cocoa, aerobically incubated cocoa, anaerobically incubated cocoa, and fermented cocoa. SDs are shown as bars.



**Figure 4.** Amount of total hydrophobic and other amino acids determined in the unfermented cocoa, aerobically incubated cocoa, anaerobically incubated cocoa, and fermented cocoa. SDs are shown as bars.

contents of individual substances were calculated using linear regression. The measuring principle of all assays is based on the detection of NADH with D-glucose as an intermediate, which is achieved by the inversion of sucrose and subsequent isomerization of D-fructose to D-glucose (E8180) or direct isomerization of D-fructose (E8160). To calculate the specific contents of sucrose and D-fructose, the amount of D-glucose (E8140) was subtracted from the results of the other assays. The results are expressed as mg/g ffdm.

**Determination of the Fermentation Index.** The fermentation indexes (FIs) of the samples were determined by the method described by Gourieva and Tserrevitinov (1979) with minor modifications.<sup>22</sup> 0.1 g ( $\pm 0.01$  g) was extracted with 10 mL of a hydrochloric acid/water solution (3:97 v/v) at 4 °C for approximately 15 h. After centrifugation, the absorption of the supernatants was measured at 460 and 530 nm using an automated UV/vis-spectrophotometer (BioTek Instruments Epoch 2, Agilent Technologies AG, Switzerland). The FI is defined as the ratio of the



**Figure 5.** Loading plot of PCA.

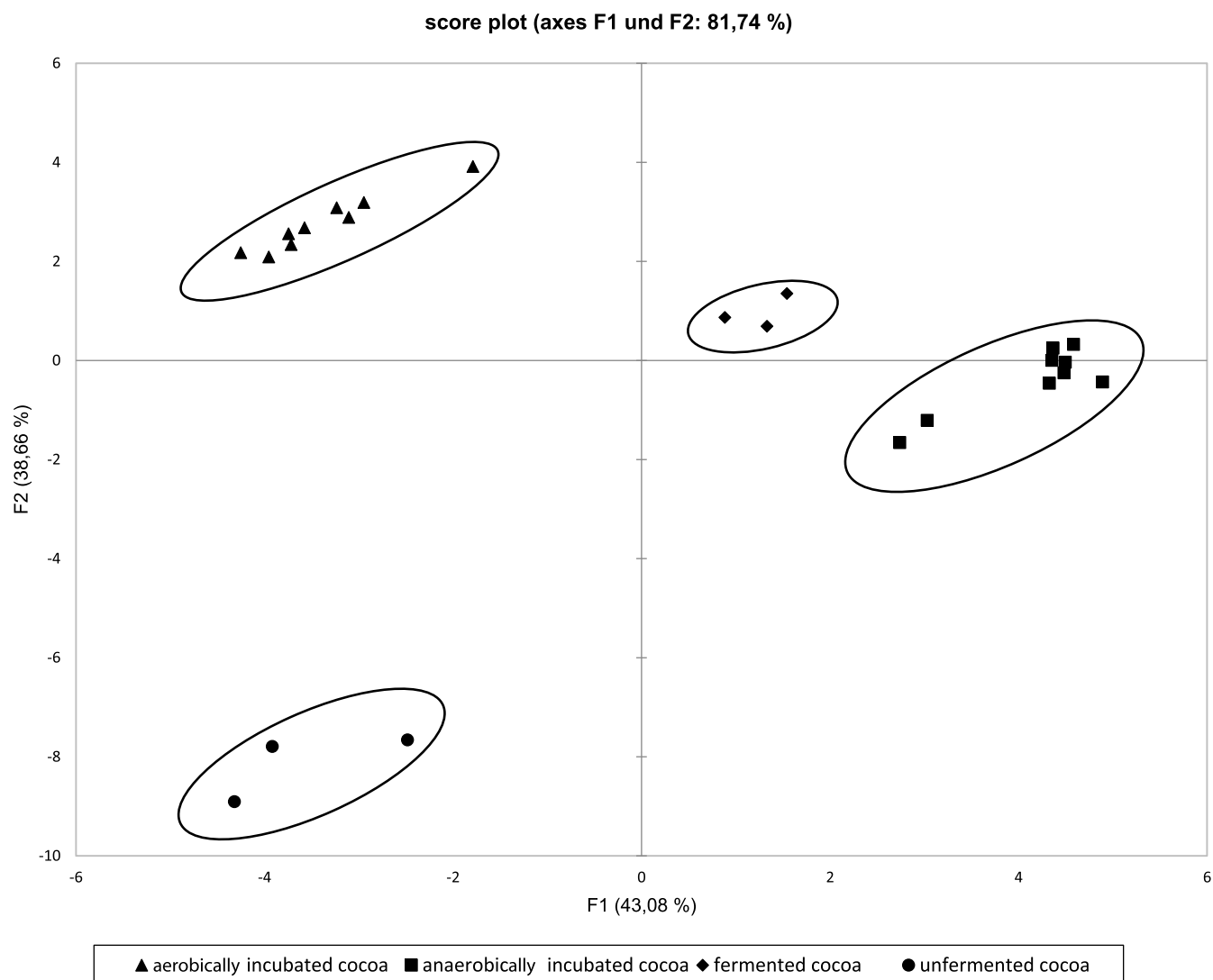
absorption measured at 460 nm and 530 nm (FI = A460/A530). Values  $\geq 1.0$  are considered well fermented, and values  $\leq 1.0$  are considered under-fermented.

**Statistical Analysis.** The complete data set was evaluated by analysis of variance (ANOVA) using XLSTAT (version 2022.2.1, Addinsoft Inc. USA) between the calculated means of the samples. Significant differences were tested using Tukey's honestly significant difference (HSD) test with a confidence interval of 95% ( $p < 0.05$ ). The results are shown in Table 1. Different letters within one row indicate significant differences between the means of samples. Principal component analysis (PCA) was performed with the complete data set to visualize the differences and similarities of the samples by reducing the dimensions.<sup>23</sup> The loading and score plots of the PCA are displayed in Figures 5 and 6, respectively.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Determination of Phenolic Compounds and Methylxanthines. TPC and TFC.** The results of TPC and TFC analysis are shown in Figure 1 and Table 1. For the unfermented cocoa sample, a TPC of 239 mg EE/g ffdm was measured. The contents in unfermented Trinitario, Forastero, and Criollo samples range from 120 to 140 mg EE/g ffdm according to the literature.<sup>24</sup> The results of the present study showed a high TPC in comparison. This may be

caused by differences in the workup procedure used and variations between raw materials. After fermentation and anaerobic incubation, a significant decrease of approximately 25 and 35% to a final content of 181 and 157 mg EE/g ffdm, respectively, was measured. For fermented cocoa beans, the values found in the literature range from 40 to 140 mg EE/g ffdm.<sup>25</sup> Considering the high initial TPC content measured in the unfermented cocoa sample, the comparably high values obtained after fermentation and anaerobic incubation are plausible. After aerobic incubation, a significantly lower TPC of 66.5 mg EE/g was measured, which corresponds to a total decrease of approximately 70%. The activity of polyphenol oxidases is known to be reduced to below 5% of the initial activity during fermentation and drying.<sup>16,26</sup> However, browning continues throughout postharvest processing, despite low activity levels. It is assumed that the remaining low polyphenol oxidase activity in combination with chemical oxidation is sufficient for further oxidation and browning of phenolic compounds.<sup>8,16,26</sup> The steep decrease of the TPC induced by aerobic incubation may therefore be caused by the excessive availability of oxygen. Higher polymerization products, such as condensed tannins, may have been formed, which can further react with proteins, peptides, and amino



**Figure 6.** Score plot of PCA.

acids to form insoluble complexes.<sup>27,28</sup> The results of the TFC measurements show a similar trend. In the unfermented sample, an initial concentration of 217 mg PE/g ffdm was measured. The fermented and anaerobic samples showed a significantly lower concentration of 107 and 147 mg PE/g ffdm, respectively. On the other hand, a significantly lower content of 32.4 mg PE/g ffdm was measured in the aerobic sample. In TFC determination, DMAC specifically reacts with the monomeric flavan-3-ols (–)-epicatechin, (+)-catechin, epigallocatechin, galocatechin, their respective gallates, oligomeric procyanidins of cocoa up to  $n = 4$ , and A-type procyanidins.<sup>21</sup> A higher loss of these compounds was induced by the aerobic treatment (–85%) compared to fermentation (–51%) and anaerobic incubation (–32%). The comparably moderate reduction of the TFC in the anaerobic sample is most likely due to the limited availability of oxygen during the incubation process. The low TFC measured in the aerobic sample, on the other hand, suggests that the treatment supports oxidation and polymerization of these compounds to higher condensed tannins, which cannot be detected with the used method.<sup>21</sup>

**Selected Flavan-3-ols and Procyanidins.** The results of the HPLC–MS/MS measurements of the most abundant flavan-3-ols are displayed in Figure 2 and Table 1.

Among the monomeric flavan-3-ols, (–)-epicatechin is known to be the most abundant compound in unfermented cocoa beans, reaching concentrations between 30 and 50 mg/g ffdm,<sup>8,24–26,29–31</sup> which is well in accordance with our result of 38.9 mg/g ffdm measured in the unfermented sample. (+)-Catechin is present in lower amounts in the unfermented sample with 1.67 mg/g ffdm, which is also in the range of 0.5–8.0 mg/g ffdm found in the literature.<sup>24–26,31,32</sup>

The significant decrease of (–)-epicatechin measured after aerobic incubation and fermentation is comparable, with only 0.33 mg/g ffdm left in the aerobically incubated sample and 2.72 mg/g ffdm in the fermented sample. On the other hand, the anaerobic incubation induced a significant but much lower reduction of (–)-epicatechin with a measured concentration of 29.9 mg/g ffdm after the treatment. During fermentation, a steep decrease in (–)-epicatechin has been observed in several studies within the first 72 h, which is assumed not only to be caused by oxidation and polymerization reactions but also by exudations of soluble phenols out of the beans during fermentation.<sup>24,29,30</sup>

The results obtained for procyanidin B2, procyanidin C1, and cinnamtannin A2 [the dimer, trimer, and tetramer of (–)-epicatechin, respectively] show the same trend. While initial contents of 22.0, 11.6, and 13.3 mg/g ffdm were measured in the unfermented sample, only traces of these compounds were measured after aerobic incubation. The fermented sample also showed a significant decrease of  $\geq 90\%$  with 0.16 mg/g ffdm procyanidin B2, 1.35 mg/g ffdm procyanidin C1, and 1.16 mg/g ffdm cinnamtannin A2, respectively. On the other hand, values obtained in the anaerobically incubated samples also showed a significant but lower reduction of approximately 20–30% of the initial content, reaching a final concentration of 17.5 mg/g ffdm procyanidin B2, 8.41 mg/g ffdm procyanidin C1, and 9.21 mg/g ffdm cinnamtannin A2. This suggests the oxidation and polymerization of the monomer (–)-epicatechin and the measured (–)-epicatechin-based proanthocyanidins procyanidin B2, procyanidin C1, and cinnamtannin A2 are promoted during the aerobic incubation and fermentation equally, while the anaerobic incubation left a higher proportion of these compounds in the final raw material.

**Methylxanthines.** The results obtained for the quantitation of caffeine and theobromine can be found in Table 1. According to the literature, among the methylxanthines, theobromine and caffeine can be found in concentrations ranging approximately from 10.0 to 30.0 and 1.00 to 6.00 mg/g ffdm, respectively, in unfermented cocoa.<sup>33,34</sup> During fermentation, a loss of theobromine and caffeine of approximately 30% in the first 72 h has been reported, most likely due to diffusion out of the beans.<sup>33</sup> The theobromine and caffeine contents of 29.5 and 8.64 mg/g ffdm analyzed in the unfermented materials are well in accordance with the values given in the literature. The present results showed that none of the applied postharvest treatments of the current study caused a significant decrease in these compounds, suggesting that the fermentation as well as the incubation do not affect the level of methylxanthines.

**Determination of Sugars and Amino Acids. Sugars.** The results of the sugar analysis are shown in Figure 3 and Table 1. In the unfermented cocoa, an initial sucrose, D-glucose, and D-fructose content of 36.3, 2.53, and 2.63 mg/g ffdm was determined, respectively, which is in accordance with the contents reported in the literature.<sup>35,36</sup> One major goal of postharvest processing is the release of D-glucose and D-fructose from sucrose caused by invertase activity to act as aroma precursors during further processing.<sup>16</sup> Both incubation treatments as well as the fermentation caused a significant reduction of sucrose and a significant increase in the reducing sugars. After incubation treatments, there was no sucrose detectable in the incubated samples, while only traces were found in the fermented sample. However, D-glucose and D-fructose were measured with a much higher content after both incubation treatments in comparison to the fermentation. The highest contents of 20.4 mg/g ffdm were measured for both D-glucose and D-fructose after aerobic incubation, while the contents measured in the aerobically incubated sample were comparable (18.5 and 17.9 mg/g ffdm). On the other hand, a significantly lower content of 4.95 mg/g ffdm of D-glucose and 11.7 mg/g ffdm of D-fructose was measured in the fermented sample. In theory, the contents of D-glucose and D-fructose should approximately sum up to the initial sucrose content before postharvest processing, which is roughly the case for aerobic and anaerobically incubated cocoa. The lower contents

measured in the fermented sample, however, only add up to approximately 45% of the initial sucrose content. This difference has been reported by several authors, who concluded that parts of the monomeric sugars are lost by exudations out of the beans and drain away with fermentation sweatings.<sup>1,4,35,36</sup> On the contrary, the incubation treatments were performed in a closed system, where no exudations, and therefore only minimal losses, can occur. In conclusion, both incubation treatments yield more reducing sugars in comparison to fermentation; thus, more of these aroma precursors are available for aroma formation during further processing such as roasting.

**Amino Acids.** Amino acids play a major role in aroma formation during the processing of cocoa beans. Especially, hydrophobic amino acids and hydrophilic peptides released during fermentation have been identified as key components of cocoa flavor.<sup>5,37,38</sup>

The measured amounts of free hydrophobic and other amino acids are illustrated in Figure 4. The results for individual amino acids are shown in Table 1. A significant increase in the amount of total free amino acids was detected for all applied postharvest treatments. While 5.33 mg/g ffdm total free amino acids were measured in the unfermented sample, the highest increase was measured in the anaerobically incubated sample with 13.77 mg/g ffdm, which was significantly higher in comparison to the fermented sample where 12.31 mg/g ffdm was measured. The measured contents of total free amino acids were well in line with values given in the literature, where an initial content of unfermented cocoa ranging from approximately 5.00–8.00 mg/g ffdm and after fermentation contents of up to 24.0 mg/g have been reported.<sup>25,36,39,40</sup> However, in the aerobically incubated sample, a significantly lower concentration of total free amino acids of 9.40 mg/g ffdm was determined. This lower content in comparison to the fermented and anaerobically incubated cocoa may be caused by interactions with flavan-3-ols. The oxidation of flavan-3-ols leads to the corresponding *o*-quinone form, which can react with the nucleophilic groups of proteins, peptides, and amino acids to form insoluble complexes.<sup>27</sup> Furthermore, it is known from different processes, such as tea-, tobacco-, and wine-making, that the reaction of *o*-quinones may induce Strecker degradation of amino acids, resulting in the corresponding Strecker aldehydes.<sup>27</sup> A connection between aroma formation and the oxidation of phenolic compounds during cocoa fermentation has been suggested by several authors before.<sup>1,41,42</sup> However, the possible importance of the interaction of phenolic- and amino compounds for aroma formation during postharvest processing of cocoa has not been a subject of attention in more recent research works. The low levels of flavan-3-ols and lower levels of free amino acids measured in the aerobically incubated cocoa of the present study may explain the results obtained in one of our previous studies, where higher contents of Strecker aldehydes were measured before and after roasting in the aerobically incubated material in comparison to the fermented cocoa.<sup>13,14</sup> However, lower measured contents of free amino acids in the aerobically incubated cocoa suggested that the aroma formation potential during further processing such as roasting is limited in comparison to anaerobic incubation and fermentation. The results of both studies indicate that the availability of oxygen during postharvest processing may play a major role in the formation of aroma compounds. Increasing the availability of oxygen during



fermentation could also be achieved by increasing the frequency of mass turning and mixing, but it is connected to higher acidification of the beans by promoting acetic acid and lactic acid bacteria growth.<sup>43</sup> Although acetic acid and its formation were shown to be of major importance during fermentation by inducing bean death, supporting enzyme–substrate reactions by lowering the pH value and diffusing throughout the bean, excess acidification is detrimental to flavor.<sup>9</sup> Our results suggest that the desired transformation can also be achieved using lactic acid with the proposed moist incubation of unfermented and dried cocoa cotyledons. In comparison to traditional fermentation, however, moist incubation allows direct control of key postharvest processing parameters such as the degree of acidification and oxygen availability.

**Determination of the FI.** The FI was measured to evaluate the degree of fermentation of the samples. Values  $\geq 1.0$  indicate a higher level of brownness and are considered well fermented. FI values  $\leq 1.0$  indicate a higher proportion of red color and are considered under-fermented.<sup>22</sup> The unfermented cocoa and the anaerobically incubated cocoa both reached an FI  $< 1.0$  with 0.36 and 0.65, respectively. The aerobically incubated cocoa and the fermented cocoa, on the other hand, showed an FI of 1.72 and 1.19. The limited availability of oxygen during anaerobic incubation therefore inhibited browning, which also correlated with the high values obtained for the measurements of the phenolic compounds. The aerobically incubated cocoa and the fermented cocoa were considered well fermented.

**Principal Component Analysis.** The two first principal components (PC1 and PC2) explained a total of 81.7% of the variance in the data with 43.1% (PC1) and 38.7% (PC2), respectively. The loading plot and score plot are shown in Figures 5 and 6, respectively. The loading plot shows that PC1 was highly influenced by different amino acids, especially L-glycine, L-methionine, L-tyrosine, L-arginine, L-asparagine, and L-phenylalanine on the positive side of the PC1 axis (correlation between variable and factor  $> 0.9$ ). L-Valine, D-glucose, and D-fructose, on the other hand, had the highest influence on the positive side of the PC2 axis. The phenolic compounds (TPC, TFA, and flavan-3-ols) also strongly influenced the positive side of the PC1 axis while being on the lower right quadrant on the negative side of the PC2 axis. In the score plot in Figure 6, all treatments form distinct clusters underlining the significant differences between the samples.

The fermented sample cluster is located around the cross section of PC1 and PC2. The fermented samples are characterized by low amounts of reducing sugars and phenolic compounds, high amounts of amino acids, and a high FI. The cluster corresponding to the anaerobically incubated cocoa is located on the positive side of the PC1 axis and is characterized by higher amounts of free amino acids and phenolic compounds than one of the fermented samples. The cluster formed by the aerobically incubated samples is located in the upper left quadrant of the PCA. This cluster is characterized by low amounts of phenolic compounds a high FI as well as high contents of reducing sugars. The cluster corresponding to the unfermented cocoa samples is located in the lower left quadrant and is characterized by high contents of sucrose and phenolic compounds, while low amounts of amino acids and reducing sugars and a low FI were determined.

Overall, it can be summarized that there are significant differences among the aerobically incubated cocoa, the anaerobically incubated cocoa, and the fermented and unfermented cocoa regarding their composition of selected cocoa nonvolatiles. Aerobic incubation and fermentation lead to a strong reduction of phenolic compounds, while anaerobic incubation reduced these compounds to a lesser extent. The availability of oxygen may therefore be adapted during incubation to control the final concentration of phenolic substances in the resulting material. This provides the opportunity to influence the content of bioactive compounds (low polymerized flavanols), which are also responsible for the bitterness and astringency in cocoa. Furthermore, it was shown that both moist incubation treatments lead to a comparable release of free amino acids and twofold higher amounts of reducing sugars during fermentation. The obtained results underline the findings of our previous investigations that moist incubation can serve as a controllable alternative postharvest treatment, which results in a cocoa raw material with high flavor potential.<sup>13,14</sup>

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.2c06493>.

Information on calibration and detection parameters used for the analysis of the different quantitated compounds (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

Irene Chetschik – School of Life Sciences and Facility Management, Institute of Food and Beverage Innovation, Research Group Food Chemistry, ZHAW Zurich University of Applied Sciences, 8820 Wädenswil, Switzerland; [orcid.org/0000-0002-7009-6357](https://orcid.org/0000-0002-7009-6357); Phone: +41 58 934 5651; Email: [irene.chetschik@zhaw.ch](mailto:irene.chetschik@zhaw.ch); Fax: +41 58 934 5001

### Authors

Ansgar Schlüter – School of Life Sciences and Facility Management, Institute of Food and Beverage Innovation, Research Group Food Chemistry, ZHAW Zurich University of Applied Sciences, 8820 Wädenswil, Switzerland; University of Hamburg, Hamburg School of Food Science, Institute of Food Chemistry, 20146 Hamburg, Germany

Amandine André – School of Life Sciences and Facility Management, Institute of Food and Beverage Innovation, Research Group Food Chemistry, ZHAW Zurich University of Applied Sciences, 8820 Wädenswil, Switzerland

Tilo Hühn – School of Life Sciences and Facility Management, Institute of Food and Beverage Innovation, Research Group Food Chemistry, ZHAW Zurich University of Applied Sciences, 8820 Wädenswil, Switzerland

Sascha Rohn – University of Hamburg, Hamburg School of Food Science, Institute of Food Chemistry, 20146 Hamburg, Germany; Institute of Food Technology and Chemistry, Technische Universität Berlin, 13355 Berlin, Germany

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jafc.2c06493>

## Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ABBREVIATIONS

ANOVA, analysis of variance; DMAC, 4-(dimethylamino)-cinnamaldehyde; EE, (–)-epicatechin equivalents; Em, emission; Ex, excitation; FI, fermentation index; FLD, fluorescence detector; HPLC, high-performance liquid chromatography; MS/MS, tandem mass spectrometry; PE, procyanidin B2 equivalents; PCA, principal component analysis; PC1, principal component 1; PC2, principal component 2; SD, standard deviation; TFC, total flavan-3-ol content; TPC, total phenolic content

## REFERENCES

- (1) Lopez, A. S.; Dimick, P. Cocoa fermentation. In *Biotechnology: Enzymes, Biomass, Food and Feed*; Reed, G., Nagodawithana, T. W., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 1995; pp 561–577.
- (2) Schwan, R. F.; Wheals, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, *44*, 205–221.
- (3) Afoakwa, E. O. *Cocoa Production Processing Technology*; CRC-Press: Boca-Raton, USA, 2014; pp 131–134.
- (4) Biehl, B.; Ziegler, G. Cocoa: Chemistry of processing. In *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*; Caballero, B., Ed.; Academic Press: Amsterdam, Netherlands, 2003; pp 1436–1448.
- (5) Voigt, J.; Heinrichs, H.; Voigt, G.; Biehl, B. Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa seeds. *Food Chem.* **1994**, *50*, 177–184.
- (6) Rohan, T. A.; Stewart, T. The Precursors of Chocolate Aroma: Production of Reducing Sugars during Fermentation of Cocoa Beans. *J. Food Sci.* **1967**, *32*, 399–402.
- (7) Scollo, E.; Neville, D. A. C.; Oruna-Concha, M. J.; Trotin, M.; Umaharan, P.; Sukha, D.; Kalloo, R.; Cramer, R. Proteomic and peptidomic UHPLC-ESI MS/MS analysis of cocoa beans fermented using the Styrofoam-box method. *Food Chem.* **2020**, *316*, 126350.
- (8) Wollgast, J.; Anklam, E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and qualification. *Food Res. Int.* **2000**, *33*, 423–447.
- (9) Biehl, B.; Brunner, E.; Passern, D.; Quesnel, V. C.; Adomako, D. Acidification, Proteolysis and Flavour Potential in Fermenting Cocoa Beans. *J. Sci. Food Agric.* **1985**, *36*, 583–598.
- (10) John, W. A.; Böttcher, N. L.; Behrends, B.; Corno, M.; D'souza, R. N.; Kuhnert, N.; Ullrich, M. S. Experimentally modelling cocoa bean fermentation reveals key factors and their influences. *Food Chem.* **2020**, *302*, 125335.
- (11) Kadow, D.; Niemenak, N.; Rohn, S.; Lieberei, R. Fermentation-like incubation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) – Reconstruction and guidance of the fermentation process. *LWT-Food Sci. Technol.* **2015**, *62*, 357–361.
- (12) Evina, V. J. E.; De Taeye, C.; Niemenak, N.; Youmbi, E.; Collin, S. Influence of acetic and lactic acids on cocoa flavan-3-ol degradation through fermentation-like incubations. *LWT-Food Sci. Technol.* **2016**, *68*, 514–522.
- (13) Schlüter, A.; Hühn, T.; Kneubühl, M.; Chatelain, K.; Rohn, S.; Chetschik, I. Novel Time- And Location-Independent Postharvest Treatment of Cocoa Beans: Investigations on the Aroma Formation during Moist Incubation of Unfermented and Dried Cocoa Nibs and Comparison to Traditional Fermentation. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 10336–10344.
- (14) Schlüter, A.; Hühn, T.; Kneubühl, M.; Chatelain, K.; Rohn, S.; Chetschik, I. Comparison of the Aroma Composition and Sensory Properties of Dark Chocolates Made with Moist Incubated and Fermented Cocoa Beans. *J. Agric. Food Chem.* **2022**, *70*, 4057–4065.
- (15) Biehl, B. Veränderungen der subzellulären Struktur in Keimblättern von Kakaosamen (*Theobroma cacao* L.) während der

Fermentation und Trocknung (in German). *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **1973**, *153*, 137–150.

(16) Hansen, C. E.; Olmo, M.; Burri, C. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *77*, 273–281.

(17) Misnawi, J.; Jinap, S.; Nazamid, S.; Jamilah, B. Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effect on aroma precursor formation. *Food Chem.* **2002**, *78*, 407–417.

(18) Pedan, V.; Fischer, N.; Rohn, S. An online NP-HPLC-DPPH method for the determination of the antioxidant activity of condensed polyphenols in cocoa. *Food Res. Int.* **2016**, *89*, 890–900.

(19) Murthy, M. V. R.; Padmanabhan, S.; Ramakrishna, M.; Lonsane, B. K. Comparison of nine different caseinolytic assays for estimation of proteinase activity and further improvement of the best method. *Food Biotechnol.* **1997**, *11*, 1–23.

(20) Blois, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **1958**, *181*, 1199–1200.

(21) Payne, M. J.; Hurst, W. J.; Stuart, D. A.; Ou, B.; Fan, E.; Ji, H.; Kou, Y. Determination of total procyanidins in selected chocolate and confectionery products using DMAC. *J. AOAC Int.* **2010**, *93*, 89–96.

(22) Gourieva, K. B.; Tserrevitinov, O. B. Flat soffit doubly prestressed, composite, roof ceiling construction for large span industrial buildings. BG 64654 B1, 1979.

(23) Bartholomew, D. J. Principal Components Analysis. In *International Encyclopedia of Education*, 3rd edition; Peterson, P., Baker, E., McGaw, B., Eds.; Elsevier Science: Amsterdam, Netherlands, 2010; pp 374–377.

(24) Elwers, S.; Zambrano, A.; Rohsius, C.; Lieberei, R. Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, *229*, 937–948.

(25) Rohsius, C. *Die Heterogenität der biologischen Ressource Rohkakao*; University of Hamburg: Hamburg, Germany, 2007.

(26) Misnawi, J.; Selamat, S.; Bakar, J.; Saari, N. Oxidation of polyphenols in unfermented and partly fermented cocoa beans by cocoa polyphenol oxidase and tyrosinase. *J. Sci. Food Agric.* **2002**, *82*, 559–566.

(27) Bittner, S. When quinones meet amino acids: Chemical, physical and biological consequences. *Amino Acids* **2006**, *30*, 205–224.

(28) Versari, A.; du Toit, W.; Parpinello, G. P. Oenological tannins: A review. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2013**, *19*, 1–10.

(29) Albertini, B.; Schoubben, A.; Guarnaccia, D.; Pinelli, F.; Della Vecchia, M.; Ricci, M.; Di Renzo, G. C.; Blasi, P. Effect of Fermentation and Drying on Cocoa Polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 9948–9953.

(30) Kim, H.; Keeney, P. G. (–) - Epicatechin Content in Fermented and Unfermented Cocoa Beans. *J. Food Sci.* **1984**, *49*, 1090–1092.

(31) Stoll, L. *Biochemische Indikatoren für Keimung und Fermentation in Samen von Kakao (*Theobroma cacao* L.)*; University of Hamburg: Hamburg, Germany, 2010.

(32) Misnawi, J.; Jinap, S. Effect of Cocoa Bean Polyphenols on Sensory Properties and Their Changes During Fermentation. *Pelita Perkebunan* **2003**, *19*, 90–103.

(33) Aprotosoie, A. C.; Luca, S. V.; Miron, A. Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products-An Overview. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2016**, *15*, 73–91.

(34) Ziegler, G. Flavour development in cocoa and chocolate. In *Beckett's Industrial Chocolate Manufacture and Use*; Beckett, S. T., Fowler, M. S., Ziegler, G., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd.; Chichester, United Kingdom, 2017; pp 185–215.

(35) Megias-Pérez, R.; Grimbs, S.; D'Souza, R. N.; Bernaert, H.; Kuhnert, N. Profiling, quantification, and classification of cocoa beans based on chemometric analysis of carbohydrates using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Food Chem.* **2018**, *258*, 284–294.

(36) Niemenak, N.; Eyamo, J. V. E.; Djabou, S. A. M.; Tchoutcheu, A. G. N.; Bernhardt, C.; Lieberei, R.; Bisping, B. Assessment of the profile of free amino acids and reducing sugars of cacao beans from

local Cameroonian Trinitario (SNK varieties) and Forastero (TIKO varieties) using fermentation-like incubation. *J. Appl. Bot. Food Qual.* **2020**, *93*, 321–329.

(37) Kirchhoff, P.-M.; Biehl, B.; Crone, G. Peculiarity of the accumulation of free amino acids during cocoa fermentation. *Food Chem.* **1989**, *31*, 295–311.

(38) Mohr, W.; Landschreiber, E.; Severin, T. Zur Spezifität des Kakaoaromas (in German). *Fette Seifen Anstrichm.* **1976**, *78*, 88–95.

(39) Rottiers, H.; Sosa, D. A. T.; De Winne, A.; Ruales, J.; De Clippeleer, J.; De Leersnyder, I.; De Wever, J.; Everaert, H.; Messens, H.; Dewettinck, K. Dynamics of volatile compounds and flavor precursors during spontaneous fermentation of fine flavor Trinitario cocoa beans. *Eur. Food Res. Technol.* **2019**, *245*, 1917–1937.

(40) Hashim, P.; Selamat, J.; Muhammad, S. K. S.; Ali, A. Changes in Free Amino Acid, Peptide-N, Sugar and Pyrazine Concentration during Cocoa Fermentation. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *78*, 535–542.

(41) Purr, A.; Morcinek, H.; Springer, R. Zur Kenntnis enzymatischer Vorgänge in Kakaobohnen während der Fermentierung, insbesondere im Hinblick auf die Möglichkeiten der Aromabildung (in German). *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **1963**, *123*, 341–354.

(42) Biehl, B. Proteinhydrolyse während der Kakaofermentation in Abhängigkeit von Wechselwirkungen mit Polyphenolen unter anaeroben und aeroben Bedingungen (in German). *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **1966**, *133*, 145–158.

(43) Camu, N.; Gonzalez, A.; De Winter, T.; Van Schoor, A.; De Bruyne, K.; Vandamme, P.; Takrama, J.; Addo, S.; De Vuyst, L. Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 86–98.

# 8 Zusammenfassende Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse der drei Fachpublikationen übergreifend diskutiert und mit dem aktuellen Kenntnisstand der Aroma- und Geschmacksbildung während der Nacherntebehandlung und Verarbeitung von Kakaobohnen in Bezug gesetzt.

## 8.1 Aromabildung während der Feucht-Inkubation und Fermentation

Während der Methodenentwicklung wurden sensorische Voruntersuchungen der Materialien (aerob feucht-inkubiert, unfermentiert, fermentiert) in Form einfacher Degustationen der zerkleinerten Proben nach der Trocknung durchgeführt. Das aerob feucht-inkubierte Material wies ein deutliches Kakaoaroma und eine tiefe Bitterkeit, Adstringenz und Säure auf. Der unfermentierte und getrocknete Kakao hingegen zeichnete sich vor allem durch eine unangenehme starke Bitterkeit und Adstringenz und fehlendes Kakaoaroma aus. Das Aroma des fermentierten Materials wurde als typisch aber etwas abweichend von dem Aroma des aerob feucht-inkubierten Materials beurteilt. Im Rahmen der ersten Publikation durchgeführten Untersuchungen war also insbesondere die Verifizierung von Interesse, ob die aerobe Feucht-Inkubation zur Bildung von Schlüsselaromastoffen führt (Arbeitshypothese 5), welche Aromastoffe in welchem Umfang im Vergleich zum unfermentierten und getrockneten Ausgangsmaterial gebildet werden und welche Unterschiede im Vergleich zum fermentierten Material bestehen. Ebenfalls sollten die Ergebnisse Aufschluss darüber geben, ob sich tiefere Gehalte an eher unerwünschten Säuren wie Essigsäure und 2- und 3-Methylbuttersäure realisieren lassen (Arbeitshypothese 6). Die Methoden des Sensomics Ansatzes sind hierfür besonders geeignet, da sowohl qualitative als auch quantitative Unterschiede zwischen Proben der gleichen Matrix untersucht werden können. Im ersten Schritt wurde die AEVA mittels GC-O als Screening-Verfahren zur Ermittlung der wichtigsten aroma-aktiven Verbindungen durchgeführt, die anschließend mittels GC-MS identifiziert wurden. Die wichtigsten Schlüsselverbindungen wurden dann mittels SIVA quantifiziert und die OAV berechnet, um einen Hinweis auf den Beitrag der Aromastoffe zum Gesamtaroma zu erhalten. Die Proben wurden zudem durch eine orthonasale Beurteilung miteinander verglichen.

### 8.1.1 Durch die Feucht-Inkubation induzierte Aromabildung

Unter den quantifizierten Verbindungen in unfermentiertem und getrockneten Rohmaterial, also dem Ausgangsmaterial für die Feucht-Inkubation, gehörten Essigsäure (stechend), 2- und

## Zusammenfassende Diskussion

---

3-Methylbuttersäure (schweißig), Ethyl-2-methylbutanoat (fruchtig), 3-Methylbutanal (malzig) und 2-Phenylethanol (blumig) und 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin (erdig, röstartig) zu den aroma-aktiven Verbindungen ( $OAV \geq 1$ ). Es existieren in der Literatur kaum Studien, in denen das Aroma von unfermentierten Bohnen analysiert wurde. Die einzige dem Autor bekannte Studie stammt von Bagan (2007).<sup>88</sup> Sie untersuchte in ihrer Arbeit ebenfalls direkt getrocknete unfermentierte Kakaobohnen aus Sulawesi und Ghana mittels SIVA. In ihrer Studie wurden in unfermentiertem getrockneten Kakao auch die höchsten Konzentrationen für Essigsäure gemessen (190 – 200 mg/kg)<sup>88</sup>, was vergleichbar mit den von Schlüter et al. (2020) gemessenen Gehalten ist (377 mg/kg).<sup>151</sup> Chetschik et al. (2018) hingegen ermittelten einen tieferen Gehalt an Essigsäure von 0,36 mg/kg in frischen, direkt nach der Ernte eingefrorenen Bohnen ohne Sonnentrocknung.<sup>152</sup> Es ist davon auszugehen, dass auch bei der direkten Trocknung von Kakaobohnen mit der anhaftenden Pulpe ein mikrobieller Abbau der Inhaltsstoffe der Pulpe beginnt. So können beispielsweise heterofermentative Milchsäurebakterien Glucose verstoffwechseln und neben Milchsäure auch Essigsäure bilden.<sup>2</sup> Es ist möglich, dass ein Teil dieser Essigsäure während der Sonnentrocknung in die Bohnen diffundierte und somit für die vergleichsweise hohe Konzentration in unfermentierten und getrockneten Bohnen verantwortlich war.

Eine Aromawertberechnung mit den von Bagan (2007) ermittelten Daten zeigt auf, dass Essigsäure in unfermentierten und getrockneten Bohnen den höchsten OAV erreichte. Darüber hinaus wurden  $OAV \geq 1$  für die Strecker-Aldehyde 2- und 3-Methylbutanal (malzig), Phenylacetaldehyd (nach Bienenwachs) und 3-Methylthiopropionaldehyd (nach gekochter Kartoffel), für die fruchtigen Ester Ethyl-2-methylbutanoat, Ethyl-3-methylbutanoat, die Säuren Buttersäure sowie 2- und 3 Methylbuttersäure (schweißig), die erdig/röstartigen Pyrazine 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin und 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin, und das rauchige 2-Methoxyphenol in unfermentierten getrockneten Kakaobohnen bestimmt.<sup>88</sup> Eine mikrobielle Bildung dieser Aromastoffe oder eine thermische Bildung während der Sonnentrocknung ist denkbar. Um genau zu differenzieren, welche Aromastoffe bereits nativ in der Bohne vorhanden sind, müssten Kakaobohnen im frischen ungetrockneten Zustand analysiert werden.

Die Bestimmung der Konzentrationen der aroma-aktiven Komponenten nach der Feucht-Inkubation zeigte im Vergleich zum unfermentierten getrockneten Ausgangsmaterial deutlich, dass die Feucht-Inkubation die Bildung vieler Schlüsselaromastoffe induzierte. Die Gehalte der Strecker-Aldehyde 2- und 3-Methylbutanal stiegen um den Faktor 32, bzw. 33 an. Darüber hinaus wurde ebenfalls eine deutliche Konzentrationszunahme der quantifizierten Ester Ethyl-

2-phenylacetat (Faktor 27), Ethyl-3-methylbutanoat (mind. Faktor 8) und Ethyl-2-methylbutanoat (Faktor 6) gemessen, wobei die Konzentration von Ethyl-3-methylbutanoat im unfermentierten Ausgangsmaterial unterhalb der Bestimmungsgrenze lag. Eine leichte Zunahme wurde ebenfalls für 2-Methylbuttersäure (Faktor 2,7), 2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazin (Faktor 1,2), Phenylethylacetat (Faktor 1,1) und 3-Methylbuttersäure (Faktor 1,1) gemessen. Andererseits nahmen die Konzentrationen verschiedener Verbindungen im Vergleich zum Ausgangsmaterial ab. So wurden nach der Feucht-Inkubation im Vergleich zum Ausgangsmaterial vor der Behandlung tiefere Gehalte an Essigsäure, 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon, 2-Methoxyphenol und 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin gemessen. Die Abnahme ist vermutlich auf eine geringe Neubildung während der Inkubation und eine mögliche thermische Reduktion während der Trocknung bei 40 °C über 24 h zurückzuführen. Grundsätzlich kann davon ausgegangen werden, dass ein gewisser Anteil aller flüchtigen Verbindungen durch die Trocknung mitsamt der Feuchtigkeit entfernt wird. Ob gesamthaft eine Zu- oder Abnahme festgestellt werden kann, hängt demnach davon ab, ob die während der Feucht-Inkubation und Trocknung neu gebildete Menge der einzelnen Verbindungen den durch die Trocknung verflüchtigten Anteil übersteigt.

Die Hypothese, dass durch die Feucht-Inkubation Schlüsselaromastoffe gebildet werden, konnte anhand der Ergebnisse weitgehend bestätigt werden. Während eine Konzentrationssteigerung vor allem der Strecker-Aldehyde und Ester aufgezeigt werden konnte, blieben die Konzentrationen anderer Verbindungen konstant oder nahmen leicht ab.

### **8.1.2 Vergleich der Aromabildung während der Feucht-Inkubation und Fermentation**

#### *Säuren*

Im Vergleich zur traditionellen Fermentation wurden nach der Feucht-Inkubation tiefere Gehalte der Säuren gemessen, die während der industriellen Verarbeitung von Kakao zu Schokolade, beispielsweise während der Röstung, einer Massebehandlung oder dem Conchieren, reduziert werden sollen. Im Vergleich zur feucht-inkubierten Probe wurden etwa zwanzigfach höhere Gehalte an 2- und 3-Methylbuttersäure und ungefähr die sechsfache Menge an Essigsäure im fermentierten Kakao gemessen. Bei der Fermentation wird Essigsäure durch Essigsäurebakterien aus Ethanol gebildet und diffundiert in die Bohnen.<sup>25</sup> Die vergleichsweise tiefen gemessenen Gehalte der Essigsäure im feucht-inkubierten Material deuten darauf hin, dass während der Feucht-Inkubation keine Essigsäurebakterien aktiv waren, obwohl Ethanol

## Zusammenfassende Diskussion

---

als Substrat im Medium zur Verfügung stand und aerobe Bedingungen herrschten. Da im Vergleich zum unfermentierten Rohmaterial sogar ein Rückgang der Essigsäurekonzentration gemessen wurde, ist davon auszugehen, dass ein Teil der Essigsäure während der Trocknung entfernt wurde. Während der in der Praxis teilweise angewandten „künstlichen“, also durch erhöhte Temperatur und Konvektion unterstützten Trocknung von fermentierten Bohnen in Trocknungsanlagen, ist bekannt, dass höhere Gehalte an flüchtigen Säuren im Vergleich zur langsamen Sontrocknung in den Kotyledonen verbleiben.<sup>5,32</sup> Dies wird auf die schnelle Austrocknung der Randschichten und Testa zurückgeführt, die dadurch als Barriere für diese Verbindungen fungieren.<sup>35</sup> Bei der durchgeführten Trocknung der feucht-inkubierten Nibs bei 40 °C unter Konvektion im Trockenschrank hingegen, wurde das Abdampfen von Essigsäure und der Feuchtigkeit vermutlich durch die vergrößerte Oberfläche im Vergleich zu ganzen Bohnen und das vorige Entfernen der Schale unterstützt.

Im Gegensatz zur Essigsäure, die durch die Feucht-Inkubation und künstliche Trocknung um etwa die Hälfte reduziert wurde, konnte für 2- und 3-Methylbuttersäure nach der Feucht-Inkubation ein leichter Anstieg verzeichnet werden. Für die Bildung dieser Verbindungen während der Fermentation werden in der Literatur vor allem thermotolerante aerobe sporenbildende *Bacillus* Spezies verantwortlich gemacht, die in der späten Phase der Fermentation aus den Bohnen herausdiffundierende Aminosäuren metabolisieren.<sup>1,2,124</sup>

Zwar lässt sich eine mikrobielle Bildung während der Feucht-Inkubation nicht vollständig ausschließen, da die Inkubationen nicht unter sterilen Bedingungen stattfanden. Wie aber unter 0 beschrieben, zeigten die Keimzahlen aerober mesophile Keime (AMK), anaerober mesophiler Sporenbildner (AMS), Hefen, Milchsäurebakterien und Essigsäurebakterien während der Feucht-Inkubationen (anaerob 24 h, aerob 48 h) im Rahmen der Voruntersuchungen kein Wachstum.<sup>147</sup> Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die erhöhte Temperatur von 45 °C während der Feucht-Inkubation zurückzuführen. So wird in der Literatur der Rückgang der Keimzahlen der Hefen nach ca. 48 – 72 h und auch der Milchsäure- und Essigsäurebakterien nach ca. 72 – 96 h vor allem auf die erhöhte Temperatur > 40 °C zurückgeführt<sup>3,62</sup>, da nur wenige thermotolerante Spezies unter diesen Bedingungen wachsen können.<sup>62</sup> Eine Beteiligung von Mikroorganismen an der Bildung von 2- und 3-Methylbuttersäure während der Feucht-Inkubation ist also eher unwahrscheinlich.

2- und 3-Methylbuttersäure sind Derivate der essenziellen Aminosäuren L-Leucin und L-Isoleucin und können als Zwischenstufe während des pflanzlichen Aminosäuremetabolismus gebildet werden.<sup>115,116</sup> Sie wurden in verschiedenen Früchten, bspw. Erdbeeren, Tomaten,

## Zusammenfassende Diskussion

---

Weintrauben<sup>116</sup> und auch frischen Kakaobohnen gemessen.<sup>152</sup> Grundsätzlich ist also eine enzymatische Bildung innerhalb der Bohne möglich. Da vor allem unter oxidativen Bedingungen während der Reaktion von reduzierenden Zuckern und freien Aminosäuren neben den Strecker-Aldehyden auch die korrespondierenden Strecker-Säuren gebildet werden können<sup>52,126</sup>, erscheint auch eine nicht-enzymatische Bildung aus den Vorstufen Leucin und Isoleucin während der Feucht-Inkubation und Trocknung möglich.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass durch die Feucht-Inkubation tiefere Gehalte der Säuren im Vergleich zur Fermentation gebildet werden. Durch die Ergebnisse konnte die Arbeitshypothese 6 bestätigt werden.

### *Strecker-Aldehyde*

Die erhöhte Bildung der Strecker-Aldehyde während der Feucht-Inkubation ist besonders interessant. Diese Strecker-Aldehyde wurden in vielen Studien als wichtige Aromastoffe für das Kakaoaroma genannt.<sup>86,88,105–107,109</sup> Einerseits erreichen diese Komponenten hohe Konzentrationen und OAV. Andererseits wird der Geruchseindruck von 2- und 3-Methylbutanal als „malzig“<sup>88,105–107,109,141</sup> aber auch „schokoladenartig“<sup>10,104</sup> beschrieben.

2- und 3-Methylbutanal können während des Strecker-Abbaus aus den Vorläufern L-Isoleucin und L-Leucin gebildet werden. Der Strecker-Abbau von Aminosäuren wird durch  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen initiiert, die im Zuge der Maillard-Reaktion in Nebenreaktion entstehen. So können 1- oder 3-Deoxyosone sowie deren Abbauprodukte wie Glyoxal, 2,3-Butandion oder 2-Oxopropanal als beteiligte  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen fungieren.<sup>137</sup> Auch wenn die Temperatur während der durchgeführten Trocknung des feucht-inkubierten Kakaos mit 40 °C eher tief war, ist eine Strecker-Aldehyd Bildung im Zuge der Maillard-Reaktion möglich, da die Maillard-Reaktion auch bei Raumtemperatur stattfinden kann.<sup>153</sup> Durch eine Temperaturerhöhung wird in erster Linie die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht, bestimmte Teilreaktionen setzen aber eine höhere Aktivierungsenergie voraus, sodass gewisse Reaktionsprodukte vor allem bei erhöhten Temperaturen gebildet werden.<sup>154</sup>

Verschiedene Teilreaktionen der Maillard-Reaktion sind zudem abhängig von der Wasseraktivität. Bei Teilreaktionen bei denen Wasser frei wird, beispielsweise Kondensationsreaktionen unter Wasserabspaltung, wird die Reaktion durch einen hohen Anteil freien Wassers gehemmt.<sup>154</sup> Für die Maillard-Reaktion muss jedoch ein gewisser Anteil Wasser als Reaktionsmedium zur Verfügung stehen. Bei sehr tiefen  $a_W$ -Werten ist die Mobilität der Reaktanden eingeschränkt, wodurch die Reaktion ebenfalls gehemmt wird. Bei höheren



## Zusammenfassende Diskussion

---

Wassergehalten ist die Mobilität gewährleistet, die Konzentration der Reaktanden jedoch tiefer, wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit abnimmt.<sup>155</sup> Es ist denkbar, dass durch den Wasserentzug während der Trocknung und die damit verbundene Konzentrierung der Reaktanden die Maillard-Reaktion und ferner auch die Strecker-Aldehyd Bildung dementsprechend gefördert wurde.<sup>132</sup>

Darüber hinaus ist bekannt, dass auch während der Oxidation von Polyphenolen gebildeten Chinone als  $\alpha$ -Dicarbonylverbindung den Strecker-Abbau induzieren können.<sup>134</sup> Bei der Herstellung von Schwarztee beispielsweise, führt die Oxidation von Catechin und die Reaktion der entstehenden Chinone mit Aminosäuren zur Bildung von Strecker-Aldehyden.<sup>136</sup> Da während der durchgeführten aeroben Feucht-Inkubation die Oxidation der Polyphenole gefördert wurde und tiefere Gehalte an freien Aminosäuren von Schlüter et al. (2022) gemessen wurden (siehe 7.3), kann angenommen werden, dass ein Teil der gebildeten Strecker-Aldehyde vor der thermischen Trocknung durch die Reaktion von freien Aminosäuren mit Chinonen gebildet wurde.

Neben der thermischen Bildung der Strecker-Aldehyde und der Reaktion mit Chinonen, ist es ebenfalls möglich, dass ein Teil der gebildeten Strecker-Aldehyde durch den Kontakt mit Wasser, bzw. in diesem Fall mit dem Inkubationsmedium induziert wurde. Verschiedene Autoren konnten eine Zunahme der Strecker-Aldehyde in geröstetem und ungeröstetem Kakao durch den Kontakt mit Wasser beobachten,<sup>140,141</sup> wobei angenommen wird, dass die Freisetzung aus 3-Oxazolinen erfolgt.<sup>139</sup> Daher wird ihnen insbesondere für die retronasale Aromawahrnehmung bei dem Verzehr von Schokolade eine wichtige Rolle zugeschrieben, da sie bei Kontakt mit dem Speichel im Mund freigesetzt werden können.<sup>105,139,141</sup> Ob die entsprechenden Vorstufen auch in unfermentiertem und getrockneten Kakaobohnen vorhanden sind, und ein Teil der Zunahme der Strecker-Aldehyde aufgrund der Wasserzugabe erfolgte, kann ohne zusätzliche Untersuchungen nicht genau beantwortet werden.

Ebenso wie die Säuren können die Strecker-Aldehyde enzymatisch während des Aminosäurestoffwechsels gebildet werden.<sup>115,116</sup> Ein Teil der Konzentrationszunahme könnte damit ebenfalls erklärt werden.

## Zusammenfassende Diskussion

---

### *Ester*

Neben den Strecker-Aldehyden wurden interessanterweise im feucht-inkubierten Material im Vergleich zum fermentierten Material höhere Gehalte einiger Ester gemessen, deren Bildung während der traditionellen Fermentation vor allem auf den Metabolismus von Hefen zurückgeführt wird.<sup>11,12,49</sup>

Wie bereits erwähnt, ist eine Beteiligung von Hefen an der Aromabildung während der Feucht-Inkubation eher unwahrscheinlich, da nur wenige Spezies bei Temperaturen > 40 °C aktiv sein können.<sup>156</sup>

Die Zunahme der Ester deutet auf eine biochemische Bildung durch bohneeigene Enzyme während der Feucht-Inkubation hin. Ethyl-2- und Ethyl-3-methylbutanoat entstehen durch Veresterung von Ethanol und 2- und 3-Methylbuttersäure. Die Ethylesterbildung während der Reifung von Früchten wird durch Ethanolbildung gesteigert.<sup>127</sup> Da Ethanol zum Inkubationsmedium zugefügt wurde und 2- und 3-Methylbuttersäure bereits in unfermentiertem und getrocknetem Samen vorhanden waren, bzw. eine Bildung während der Feucht-Inkubation beobachtet werden konnte, standen die Vorläufer zur Bildung dieser Ester zur Verfügung. Die Ethanolzugabe zum Inkubationsmedium diente ursprünglich zur möglichen Senkung mikrobieller Aktivität, da bereits geringe Konzentrationen das mikrobielle Wachstum hemmen können.<sup>146,157</sup> Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Bildung von Ethanol durch Hefen und die anschließende Diffusion in die Bohnen während der Fermentation auch zur Esterbildung in den Bohnen beitragen könnte. Bisher wird vor allem davon ausgegangen, dass die Ester von Hefen in der Pulpe gebildet werden und durch Diffusion in die Bohnen gelangen.<sup>11,12,129</sup> Darüber hinaus ist eine chemische nicht-enzymatisch katalysierte Bildung dieser Ester ebenfalls möglich, ohne Katalysatoren jedoch sehr langsam.<sup>154</sup>, sodass die Zunahme der Ester vermutlich auf die enzymatische Bildung zurückzuführen ist.

Da die Strecker-Aldehyde neben der Fermentation und Trocknung vor allem während der Röstung gebildet werden, ließ sich im Rahmen der ersten Publikation nicht beantworten, ob das Potential zur Bildung dieser wichtigen Verbindungen im feucht-inkubierten Material im Gegensatz zum fermentierten Material ggf. bereits zu einem großen Teil ausgeschöpft war. Zudem ließ sich aufgrund der Unterschiede in den Verhältnissen der Aromastoffe zueinander im fermentierten und feucht-inkubierten Material nicht beantworten, welche sensorischen Eigenschaften das Material nach einem Röstschrift, bzw. in Form einer verzehrbaren Schokolade aufweist. Die Aufklärung dieser Sachverhalte war Gegenstand der zweiten Untersuchungsreihe.

### **8.2 Charakterisierung des Aromaprofils und der sensorischen Eigenschaften von Schokolade aus feucht-inkubiertem Kakao**

Feucht-inkubierte, unfermentierte und getrocknete sowie fermentierte Kakaonibs wurden einem Röstschrift in Form einer Dünnschichtröstung in Anlehnung an die Methodik von Mohr (1970) unterzogen und anschließend zu Modellschokoladen mit 70 % Gesamtkakaogehalt verarbeitet.<sup>158</sup> Übergeordnetes Ziel dieser Untersuchung war es, die Aromafraktion nach der thermischen Behandlung und Weiterverarbeitung zu Schokoladenmustern zu charakterisieren und zu vergleichen, sowie die sensorischen Eigenschaften der Endprodukte zu bestimmen. Da die Aromastoffe nach der Feucht-Inkubation und Fermentation unterschiedliche Verhältnisse zueinander aufwiesen, war nicht klar, ob diese Unterschiede nach der Verarbeitung bestehen blieben und wie sich das auf den Aromacharakter eines Endproduktes auswirken würde.

Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob das Potential zur Bildung von Strecker-Aldehyden während der Feucht-Inkubation bereits ausgeschöpft war. Es war denkbar, dass durch die postulierte Bildung im Zuge der thermischen Trocknung, der oxidativen Bildung über Chinone, der enzymatischen Bildung oder dem Kontakt mit Wasser der größte Teil der Vorstufen im Vergleich zum fermentierten Material bereits umgesetzt wurde. Es war also möglich, dass die Gehalte an Strecker-Aldehyden im fermentierten Material nach der Röstung im Vergleich höher ausfielen.

#### **8.2.1 Vergleich der Aromazusammensetzung in Schokoladen aus feucht-inkubiertem und fermentiertem Kakao**

##### *Säuren*

Die gemessenen Gehalte an Essigsäure, 2- und 3-Methylbuttersäure zeigten, dass auch im Endprodukt tiefere Konzentrationen dieser Säuren in der Schokolade aus feucht-inkubiertem Material im Vergleich zur Schokolade aus fermentiertem Kakao vorlagen. Aufgrund der Ergebnisse der ersten Publikation und der Tatsache, dass v.a. Essigsäure während der Röstung reduziert wird<sup>88,105,106</sup>, war zu erwarten, dass auch im Endprodukt im Vergleich tiefere Konzentrationen in der Probe aus feucht-inkubiertem Material resultieren. In den Studien von Frauendorfer und Schieberle (2008, 2019) sowie von Bugan (2007) nahmen die Gehalte an 2- und 3-Methylbuttersäure nach der Röstung zu, was die Autoren auf den Strecker-Abbau zurückführten. Auffällig ist vor allem die hohe Konzentration an 3-Methylbuttersäure in der

## Zusammenfassende Diskussion

---

Schokolade aus feucht-inkubiertem Material, womit nach der Berechnung der Aromawerte der zweithöchste OAV von 121 resultiert. Dementsprechend kann vermutet werden, dass diese Verbindung einen bedeutenden Beitrag zum Gesamtaroma leistet. In der Schokolade aus fermentiertem Material wurde für 3-Methylbuttersäure der höchste OAV von 321 unter allen Verbindungen bestimmt, was ebenfalls darauf hindeutet, dass 3-Methylbuttersäure einen wesentlichen Beitrag zum Aroma leistet. In der Untersuchung von Ullrich et al. (2022) wurden sechs Muster dunkler Schokolade untersucht. 3-Methylbuttersäure wies in allen Schokoladenproben nach Essigsäure den zweithöchsten OAV auf, was die Bedeutung dieser Verbindung unterstreicht.<sup>109</sup>

Als weitere Strecker-Säure wurde die nach Bienenwachs riechende Phenyllessigsäure mit Phenylalanin als Vorläufer quantifiziert. Insgesamt wurde eine höhere Konzentration in der fermentierten Probe gemessen, sodass ein etwas höherer OAV von 162 gegenüber 113 in der feucht-inkubierten Probe resultierte. In der Rangfolge der OAV unter allen Verbindungen kommt Phenyllessigsäure auf den dritten Rang in beiden Mustern, womit davon auszugehen ist, dass diese Verbindung einen Beitrag zum Gesamtaroma der beiden Schokoladen leistet.

Der Stellenwert der Säuren für das Gesamtaroma erscheint kontrovers. Einerseits soll eine übermäßige Bildung während der Fermentation vermieden und die Gehalte während der weiteren Verarbeitung möglichst reduziert werden. Dies gilt vor allem für Essigsäure und 2- und 3-Methylbuttersäure. Andererseits erreichen sie die höchsten OAV in Kakao und Schokoladen, weswegen davon auszugehen ist, dass sie wesentlich zum Kakaoaroma beitragen.

### *Strecker-Aldehyde*

In der Untersuchung im Rahmen der ersten Publikation wurde etwa die dreifache Menge an 2-Methylbutanal und die sechsfache Menge an 3-Methylbutanal im feucht-inkubierten Material im Vergleich zum fermentierten Kakao gemessen. Nach der Röstung und Verarbeitung zu Schokolade wurden ebenfalls höhere Gehalte dieser Verbindungen in der Schokolade aus feucht-inkubiertem Material gemessen. Zwar war der Unterschied nicht mehr so deutlich ausgeprägt (Faktor 1,5 bis 2,5), es konnte jedoch eindeutig bestätigt werden, dass das Potential zur Bildung dieser Aromastoffe noch nicht durch die Feucht-Inkubation und Trocknung ausgeschöpft war. Dies deutete darauf hin, dass insgesamt vergleichbare Mengen, bzw. etwas mehr der spezifischen Aromavorläufer L-Leucin und L-Isoleucin durch die Feucht-Inkubation im Vergleich zur Fermentation gebildet wurden und somit das Potential zur Bildung von 2- und 3-Methylbutanal durch die aerobe Feucht-Inkubation etwas höher war.

## Zusammenfassende Diskussion

---

### *Ester*

In den Schokoladen aus feucht-inkubiertem Material wurden höhere Gehalte der Ester Ethyl-3-methylbutanoat und Ethyl-3-phenylpropanoat im Vergleich zur Schokolade aus fermentiertem Kakao bestimmt, während tiefere Gehalte an 2-Phenylethylacetat und Ethyl-3-phenylprop-2-enoat gemessen wurden. Laut den berechneten OAV wies in beiden Proben lediglich Ethyl-3-methylbutanoat einen OAV  $>1$  auf. Mit einem OAV von 4 in der Schokolade aus feucht-inkubiertem Material und einem OAV von 2 in der Schokolade aus fermentiertem Material sind die Werte im Vergleich zu den anderen Aromastoffen zwar eher tief. Ullrich et al. (2022) untersuchten in ihrer Studie sechs Muster dunkler Schokoladen unter denen drei Muster ein ausgeprägtes fruchtiges Aromaprofil, zwei Muster ein intensives Kakao- und Röstaroma und ein Muster vor allem blumige Noten aufwiesen. Statistisch konnte nachgewiesen werden, dass die Schokoladen mit fruchtigem Aromaprofil im Vergleich höhere OAV unter den Estern zeigten. Dabei wurden jedoch auch unter den fruchtigen Mustern eher tiefe OAV von ca. 2 bis 8 bestimmt, während die anderen Muster unter den Estern OAV von 1 bis 5 aufwiesen. Somit erscheint es plausibel, dass auch bei tiefen OAV unter den Estern im feucht-inkubierten Material ein ausgeprägtes fruchtiges Aroma wahrgenommen werden konnte (vergl. 8.2.2)

### *Pyrazine*

Ein wesentlicher Unterschied zwischen der Schokolade aus feucht-inkubiertem und fermentiertem Kakao wurde unter den erdig/röstartigen Pyrazinen festgestellt. In der Schokolade aus feucht-inkubiertem Kakao wurde für 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin ein eher tiefer OAV von 5 berechnet. In der Schokolade aus fermentiertem Kakao hingegen wurde für diese Verbindung ein OAV von 65 ermittelt und zusätzlich wies 2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazin einen OAV von 2 auf.

Pyrazine werden vor allem bei der thermischen Behandlung von Lebensmitteln bei Temperaturen  $> 100$  °C als Nebenreaktion der Maillard-Reaktion, bzw. des Strecker-Abbaus durch Kondensation der freiwerdenden  $\alpha$ -Aminoketone gebildet, wodurch Dihydropyrazine entstehen.<sup>127</sup> Es wird angenommen, dass aminosäurespezifische Pyrazine durch Aldolkondensation des Dihydropyrazin Anions mit einem aminosäurespezifischen Strecker-Aldehyd gebildet werden. Als Vorstufen für 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin schlugen Cerny und Grosch (1993) Alanin, bzw. Acetaldehyd als entsprechenden Aldehyd vor. In mehreren Studien wurde beobachtet, dass bei der Reaktion von Di- oder Oligopeptiden höhere Ausbeuten an Pyrazinen gemessen werden konnten als bei der Verwendung der entsprechenden freien Aminosäuren, wo mehr Strecker-Aldehyde resultierten.<sup>142,143</sup> Ein höherer Gehalt an

## Zusammenfassende Diskussion

---

Oligopeptiden könnte eine mögliche Erklärung für die höheren Konzentrationen an Pyrazinen im fermentierten Kakao sein.

Der Aromabeitrag von Pyrazinen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Aufgrund der hohen Anzahl an verschiedenen Pyrazinen ( $> 100$ )<sup>17</sup> und den möglichen additiven Effekten aufgrund der ähnlichen Geruchsqualitäten<sup>106</sup>, dem hohen Massenanteil unter allen flüchtigen Verbindungen von ca. 40 %<sup>159</sup> und des signifikanten Anstieges während der Fermentation und Röstung, wird ihr Beitrag als wichtig erachtet.<sup>10,17,104</sup> Das Verhältnis von Tetramethylpyrazin zu Trimethylpyrazin wurde von Ziegler (1982) als Röstindex vorgeschlagen, da der Gehalt an Trimethylpyrazin linear während der Röstung zunimmt.<sup>160</sup> Mit zunehmender Röstintensität und damit verbundener Zunahme der Pyrazine berichtet der Autor der Studie aber auch von sensorisch negativ zu bewertenden überrosteten Noten.<sup>160</sup> Der Aromaeindruck der thermisch gebildeten Pyrazine wie 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin, 2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazin und 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin wird je nach Studie als „kakao-artig“, „nussig“, „kaffee-artig“<sup>104</sup> aber vor allem als „erdig“ und „röstig“ beschrieben.<sup>105–107,109</sup> Dies lässt vermuten, dass diese Komponenten vor allem das Röstaroma prägen. Dies stimmt mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie überein, da die Schokolade aus feucht-inkubiertem Kakao nicht als untypisch wahrgenommen wurde, jedoch geringer in der Kategorie „röstartig“ bewertet wurde. Da nur wenige Pyrazine in der Untersuchung von Frauendorfer und Schieberle (2019) zur Aromabildung während der Röstung von Forastero Kakaobohnen einen OAV  $> 1$  erreichten, schlussfolgerten die Autoren, dass die Pyrazine keine Schlüsselkomponenten für das Kakaoaroma sind.<sup>105</sup> Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Ullrich et al. (2022) in ihrer Studie, in der dunkle Schokoladen mit besonders deutlichem intensivem Kakaoaroma und einer Röstnote nicht mit hohen Konzentrationen an Pyrazinen, bzw. hohen OAV der Pyrazine korrelierten.<sup>109</sup>

### *Weitere Verbindungen*

Interessanterweise wurden in den Schokoladen aus feucht-inkubiertem und aus fermentiertem Kakao sehr hohe OAV von 210 und 148 für den kohlsartig riechenden Aromastoff Dimethyltrisulfid ermittelt. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass ein sehr tiefer Geruchsschwellenwert von 0,03  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (orthonasal in Öl) zur Berechnung aus den Studien von Seyfried und Granvogl (2019) und Ullrich et al. (2021, 2022) verwendet wurde, in denen Dimethyltrisulfid ebenfalls zu den Verbindungen mit den höchsten OAV in Kakao, bzw. dunklen Schokoladen gehörte.<sup>107,109,141</sup> In Studien von Frauendorfer und Schieberle (2008, 2019) und Chetschik et al. (2019) und Schlüter et al. (2020) wurde ein höherer

## Zusammenfassende Diskussion

---

Geruchsschwellenwert von 2,5 µg/kg verwendet, sodass Dimethyltrisulfid eher tiefe OAV erreichte.<sup>105,106,108,151</sup> Dies verdeutlicht, dass die Ergebnisse auch kritisch vor dem Hintergrund der verwendeten Schwellenwerte betrachtet werden müssen und die Höhe des erreichten OAV allenfalls als Hinweis zum Aromabeitrag der untersuchten Komponente zum Gesamtaroma gedeutet werden muss.

Als weitere aroma-aktive Verbindung wurde das nach Karamell riechende 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon quantifiziert. Diese Verbindung ist als wichtiger Aromastoff in geröstetem Kakao und Schokolade bekannt<sup>88,105,106,132</sup> und wird vor allem während der Röstung im Zuge der Maillard-Reaktion als Zuckerabbauprodukt von D-Fructose oder D-Glucose aus 1-Desoxyoson und dessen Oxidationsprodukt 2-Oxopropanal gebildet.<sup>161</sup> In den Schokoladen aus fermentiertem und feucht-inkubiertem Material erreichte dieser Aromastoff vergleichbar hohe OAV von 20 und 19. Des Weiteren wurde als aroma-aktive Verbindung die blumig riechende Verbindung 2-Phenylethanol mit einem vergleichbarem OAV von 4 in der Schokolade aus feucht-inkubiertem und 3 in der Schokolade aus fermentiertem Kakao ermittelt.

### 8.2.2 Bewertung des sensorischen Profils der Modellschokoladen

In der Untersuchung von Bugan (2007) wurden die Aromastoffe von 7 Tage fermentierten gerösteten Kakaobohnen aus Sulawesi und Ghana mit den Methoden des Sensomics-Konzeptes untersucht. Neben der Identifikation der Schlüsselaromaverbindungen mittels GC-O und AEVA und einer Quantifizierung mittels SIVA wurde mit sensorischen Triangeltests untersucht, ob sich die Proben signifikant voneinander unterscheiden. Beide Proben wiesen bezüglich der Schlüsselaromastoffe Konzentrationen in Bereichen auf, die der Bandbreite der gefundenen Werte in der Literatur entsprechen. Im Triangeltest mit einem trainierten Panel konnten die Proben dennoch signifikant voneinander unterschieden werden. Die Autorin führte dies vor allem auf die unterschiedlichen Verhältnisse der Schlüsselaromastoffe zueinander zurück, da während der GC-O keine abweichenden Einzelsubstanzen identifiziert werden konnten, wodurch sich die Proben eindeutig voneinander unterscheiden liessen.<sup>88</sup> Die Ergebnisse der Studie von Ullrich et al. (2022) in der Schokoladen mit unterschiedlichen sensorischen Profilen untersucht wurden, zeigten ebenfalls vor allem Unterschiede in den Verhältnissen der Aromastoffe zueinander.<sup>109</sup> Die unterschiedlichen Quantitäten und damit unterschiedliche Verhältnisse der Schlüsselaromastoffe in Schokolade aus feucht-inkubiertem Kakao und fermentiertem Kakao zueinander ließen also erwarten, dass sich die Aromaprofile der Schokoladen voneinander unterscheiden würden. Dies konnte mit der Erstellung der

## Zusammenfassende Diskussion

sensorischen Profile durch trainierte Prüfer bestätigt werden. Hervorzuheben ist, dass die Schokoladen aus feucht-inkubiertem und fermentiertem Material ein für dunkle Schokoladen typisches Aroma aufwiesen, während die Schokolade aus unfermentiertem Material keine typischen Merkmale zeigte.

Die OAV der feucht-inkubierten Schokolade und der fermentierten Schokolade sind in Abbildung 23 visualisiert. Die Rangfolge der OAV für die Schokolade aus feucht-inkubiertem Material ist folgende: Dimethyltrisulfid (210), 3-Methylbuttersäure (121), Phenylelessigsäure (113), Essigsäure (67), 3-Methylbutanal (61) und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (19), 2-Methylbutanal (8), 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin (5), 2-Phenylethanol (4), Ethyl-3-methylbutanoat (4) und 2-Methylbuttersäure (2). Die Schokolade aus fermentiertem Kakao wies gesamthaft in der Summe einen höheren Gehalt an Schlüsselaromastoffen auf und die Reihenfolge war unterschiedlich: 3-Methylbuttersäure (314), Phenylelessigsäure (162), Essigsäure (159), Dimethyltrisulfid (148), 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin (65), 3-Methylbutanal (39) und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (20), 2-Methylbuttersäure (16), 2-Methylbutanal (5), 2-Phenylethanol (3), Ethyl-3-methylbutanoat (2) und 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin (2).

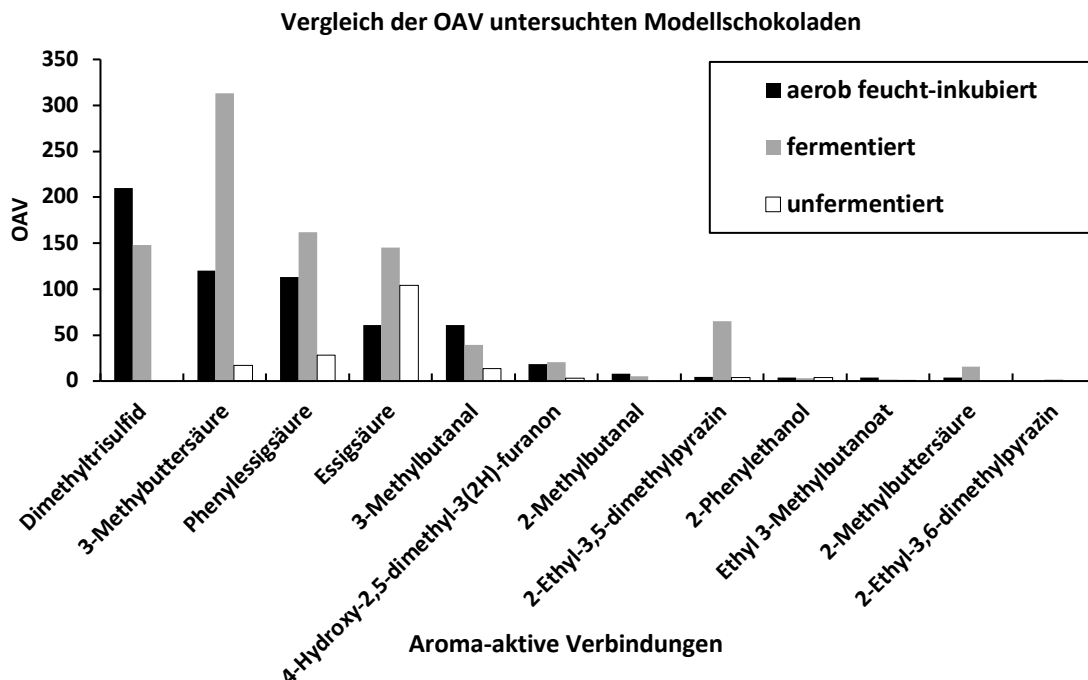


Abbildung 23: Berechnete OAV der untersuchten Modellschokoladen

Bei der Betrachtung der OAV wird deutlich, dass die Schokolade aus fermentiertem Kakao vor allem hohe OAV unter den Säuren aufwies. Die Säuren gehörten ebenfalls zu den Verbindungen mit den höchsten OAV in der Schokolade aus feucht-inkubiertem Kakao, wiesen



## Zusammenfassende Diskussion

---

aber im Vergleich tiefere OAV auf. Es ist möglich, dass durch die verschiedenen Verhältnisse der Aromastoffe zueinander, verschiedene Aromaattribute in der Schokolade aus feucht-inkubiertem Kakao höher bewertet wurden.

Die Schokolade aus feucht-inkubiertem Material wurde von den Prüfern höher in den Aromaattributen „blumig-honigartig“, „fruchtig“ und „karamell-artig“ bewertet, während die Schokolade aus fermentiertem Kakao deutlich höher in der Kategorie „röstartig“ bewertet wurde. Die blumige Note könnte durch die nach Bienenwachs riechende Phenylelessigsäure und die blumige Verbindung 2-Phenylethanol hervorgerufen worden sein. Phenylelessigsäure wies nach Dimethyltrisulfid und 3-Methylbuttersäure den höchsten OAV in der Schokolade aus feucht-inkubiertem Material auf, so dass angenommen werden kann, dass diese Verbindung einen entscheidenden Beitrag zum Aromaprofil leistete. Interessanterweise waren die ermittelten Konzentrationen der einzigen fruchtigen Verbindung Ethyl-3-methylbutanoat und die errechneten OAV für beide Proben relativ tief. Wie bereits oben ausgeführt, lagen in der Studie von Ullrich et al. (2022) die berechneten OAV für fruchtige Ester auch in als fruchtig beurteilten Schokoladenproben eher tief.<sup>109</sup> Auch die Karamellnote, die vermutlich auf die nach Karamell riechende Verbindung 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon zurückzuführen ist, wurde höher in der Schokolade aus feucht-inkubiertem Kakao bewertet. Da der OAV von 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin in der Schokolade aus fermentiertem Material vergleichsweise hoch war (65), ist es möglich, dass die Röstnote der Pyrazine die fruchtigen, blumigen und karamell-artigen Aromaeindruck überdeckte, bzw. dass durch die fehlende Note der Pyrazin in der Schokolade aus feucht-inkubiertem Kakao die Fruchtigkeit, Blumigkeit und Karamellnote stärker hervortreten konnte.

Ein weiterer interessanter Unterschied ergab sich in der Bewertung der Bitterkeit und Adstringenz. Die Schokolade aus feucht-inkubiertem Kakao wurde als weniger bitter und adstringent beurteilt. Während der Feucht-Inkubation wurden die verwendeten Vakuumbutel mit O<sub>2</sub> begast, um die Oxidation der Polyphenole und die Bräunung zu fördern. Die Ergebnisse der sensorischen Evaluation deuteten darauf hin, dass die forcierte Verfügbarkeit von Sauerstoff während der Feucht-Inkubation die Oxidation der Polyphenole förderte, wodurch das Endprodukt sensorisch weniger bitter und adstringent wirkte.

Um die Ergebnisse der Vorversuche und der ersten zwei Veröffentlichungen analytisch zu untermauern, wurde in der Folgeuntersuchung der Fokus auf die nicht-flüchtigen Inhaltsstoffe, insbesondere der Aromavorstufen und phenolischen Inhaltsstoffe gesetzt.

### 8.3 Transformation nicht-flüchtiger Inhaltsstoffe

Neben der Aromabildung wird in der Literatur vor allem die Bildung von Aromavorstufen wie D-Fructose und D-Glucose aus Saccharose und freien Aminosäuren und Peptiden aus den Reserveproteinen der Kakaobohnen während der Nacherntebehandlung beschrieben.<sup>1,17,27,162,163</sup> Darüber hinaus ist die Oxidation und Polymerisation von Polyphenolen von Bedeutung, da somit die Bräunung induziert und die Bitterkeit und Adstringenz des Materials abgeschwächt wird.<sup>1,4</sup>

Im Rahmen der dritten Veröffentlichung wurde neben der Feucht-Inkubation unter aeroben Bedingungen wie sie in den vorigen Publikationen beschrieben wurde, eine Behandlung unter Sauerstoffausschluss durchgeführt, wo die verwendeten Vakuumsäcke nach der Rehydrierungsphase nicht geöffnet und mit O<sub>2</sub> begast, sondern während der gesamten Inkubationsdauer geschlossen gehalten wurden.<sup>164</sup> Die Kontaktzeit mit Sauerstoff war bei dieser Versuchsvariante auf die Dauer der künstlichen Trocknung über ca. 24 h bei 40 °C begrenzt. Die Gehalte an Saccharose, D-Fructose, D-Glucose und der freien Aminosäuren wurden im unfermentierten und getrockneten Ausgangsmaterial nach der Fermentation und nach aerober- sowie anaerober Feucht-Inkubation gemessen, um die Bildung von Aromavorstufen während der unterschiedlichen Nacherntebehandlungen zu untersuchen. Neben den Aromavorstufen wurde der Gesamtphenolgehalt und Gesamtgehalt an Flavan-3-olen mittels photometrischer Methoden bestimmt. Um die durch die Nacherntebehandlungen induzierten Veränderungen der monomeren Flavan-3-ole und niederpolymerisierten Proanthocyanidine zu beleuchten, die u.a. für die Bitterkeit und Adstringenz verantwortlich sind, wurden die Gehalte der monomeren Polyphenole (–)-Epicatechin und (+)-Catechin, sowie der Oligomere Procyanidin B2 ((–)-Epicatechin Dimer), Procyanidin C1 ((–)-Epicatechin Trimer) und Cinnamtannin A2 ((–)-Epicatechin Tetramer) mittels HPLC-MS quantifiziert. Zusätzlich wurde auch der Einfluss auf die Methylxanthine Theobromin und Koffein untersucht, sowie der Fermentationsindex gemessen, der in vielen Literaturstellen als Indikator für den Fermentationsgrad einer Probe angegeben wird.<sup>29,75,165,166</sup>

#### 8.3.1 Vergleich der Aromavorstufenbildung während der aeroben und anaeroben Feucht-Inkubation mit der Fermentation

Die Ergebnisse der dritten Veröffentlichung bestätigten die Arbeitshypothese 4, dass eine Zunahme der Aromavorstufen durch die aerobe und anaerobe Feucht-Inkubation von

## Zusammenfassende Diskussion

---

unfermentierten und getrockneten Kakaobohnen erreicht werden kann. Die nativ in den Bohnen vorliegende Saccharose wurde sowohl während der traditionellen Fermentation und der aeroben- und anaeroben Feucht-Inkubation fast vollständig hydrolysiert. Der Gehalt an reduzierenden Zuckern nahm damit von 5,15 mg/g ffTS im unfermentierten und getrockneten Rohmaterial auf 16,6 mg/g ffTS im fermentierten Kakao, 40,8 mg/g ffTS in der aerob feucht-inkubierten Probe und 36,3 mg/g ffTS in der anaerob inkubierten Probe zu. Interessanterweise wurden signifikant weniger reduzierende Zucker in der fermentierten Probe gemessen. Aus der Literatur ist bekannt, dass nach der Fermentation in den Kakaobohnen geringere Gehalte an D-Fructose und D-Glucose quantifizierbar sind, als theoretisch bei vollständiger Hydrolyse der Saccharose entstehen würde.<sup>1,4,17</sup> Dies wird vor allem auf die Diffusion von Zuckern während der Fermentation aus den Bohnen in das umliegende Fermentationsmedium zurückgeführt.<sup>1,4,17</sup> Dies könnte auch der Grund für die tieferen Gehalte in der fermentierten Probe gewesen sein. Bei der Feucht-Inkubation erfolgte die Behandlung in einem geschlossenen System, sodass keine, bzw. nur geringe Verluste wertbestimmender Inhaltsstoffe durch Diffusion in die Schalen oder das die Bohnen umgebende Fermentationsmedium stattfinden konnten. Der Gehalt an reduzierenden Zuckern gilt als der limitierende Faktor bei der Aromabildung während der Röstung, da ihr Umsatz im Vergleich zu den Aminosäuren deutlich höher ist. Die Aminogruppen der Aminosäuren fungieren während Teilreaktionen der Maillard-Reaktion lediglich als Katalysator und werden somit in geringerem Ausmaß verbraucht.<sup>17,167</sup> Ziegleder (1993) führte Versuche mit Kakaonibs durch, die zuvor mit einer D-Glucoselösung (1 %) behandelt wurden. Seinen Ergebnissen zufolge wies der vorbehandelte Kakao das intensivere Aroma auf. Zudem stellte er fest, dass der Umsatz an Aminosäuren um 10 % im Vergleich zur Röstung von unbehandeltem Kakao stieg und im Endprodukt signifikant höhere Gehalte an Phenyllessigsäure gemessen wurden.<sup>168</sup> Dies verdeutlicht, dass eine möglichst hohe Ausbeute an reduzierenden Zuckern durch die Nacherntebehandlung angestrebt werden sollte, um die Aromabildung während der Weiterverarbeitung zu maximieren.

Bei den freien Aminosäuren wurden signifikante Unterschiede zwischen allen Nacherntebehandlungen festgestellt. Im unfermentierten getrockneten Rohmaterial wurden 2,88 mg/g ffTS hydrophobe Aminosäuren gemessen. Durch die aerobe und anaerobe Feucht-Inkubation wurde die Freisetzung von hydrophoben Aminosäuren induziert. Nach der aeroben Feucht-Inkubation wurde ein Gehalt von 5,91 mg/g ffTS und nach anaerober Feucht-Inkubation ein Gehalt von 8,39 mg/g gemessen. Im Vergleich dazu lag der Gehalt im fermentierten Kakao von 7,39 mg/g ffTS zwischen den beiden Inkubationsvarianten. Besonders interessant ist der geringere Gehalt an freien hydrophoben Aminosäuren im aerob feucht-inkubiertem Kakao.

## Zusammenfassende Diskussion

---

Dies könnte mit der forcierten Sauerstoffverfügbarkeit bei dieser Versuchsvariante zusammenhängen. Einerseits könnte dies darauf zurückzuführen sein, dass die enzymatische Freisetzung von Aminosäuren durch die Reaktion von Polyphenolen mit Enzymen, bzw. Proteinen gehemmt wurde.<sup>62,169</sup> Es wird angenommen, dass die strenge Abfolge der anaeroben- und aeroben Phase während der Fermentation von besonderer Bedeutung ist. In der ersten Phase ist wenig Sauerstoff verfügbar und die enzymatische Freisetzung von Vorstufen kann somit ungehindert erfolgen. Während der oxidativen Phase der Fermentation werden die Enzyme zunehmend inaktiviert.<sup>4,65</sup> Durch die Polymerisation der Polyphenole und mögliche Komplexierung mit Proteinen entstehen in dieser Phase Bräunungsprodukte wie Melanoidine und die Bitterkeit und Adstringenz wird herabgesetzt.<sup>62,128,169</sup> Zwar wurden insgesamt weniger freie Aminosäuren nach der aeroben Feucht-Inkubation analysiert, was auf eine Hemmung der Enzyme hinweisen könnte. Reduzierende Zucker wurden jedoch während der aeroben Feucht-Inkubation im Vergleich zur anaeroben Feucht-Inkubation in vergleichbaren Mengen freigesetzt, was gegen eine Hemmung oder gar Inaktivierung der Enzyme in Folge von Reaktion mit Polyphenolen spricht. Andererseits könnte ein Teil der freigesetzten Aminosäuren zu Strecker-Aldehyden umgesetzt worden sein, da durch die oxidativen Bedingungen vermehrt Chinone gebildet werden, die den Strecker-Abbau der Aminosäuren induzieren können.<sup>134-137</sup> Dies könnte also die im Rahmen der ersten Veröffentlichung höheren Gehalte der Strecker-Aldehyde in den Kakaonibs nach der aeroben Feucht-Inkubation erklären.<sup>151</sup> Purr et al. (1963) vermuteten schon früh einen Zusammenhang zwischen der Chinonbildung und der Bildung von Aromastoffen aus Aminosäuren.<sup>128</sup> Die Ergebnisse unterstreichen diese Hypothese. Wird davon ausgegangen, dass ein möglichst hoher Anteil an Aminosäuren mit einem hohen Aromapotentiale einhergeht, müsste das anaerob feucht-inkubierte Material nach einem Röstvorgang höhere Gehalte an vorwiegend thermisch gebildeten Aromastoffen im Vergleich zur aerob feucht-inkubierten Variante aufweisen. Dies wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, da die Aromaanalytik auf die Inkubationsvariante beschränkt wurde, die laut den Voruntersuchungen die vielversprechendsten sensorischen Eigenschaften aufwies (vergl. 0).

### **8.3.2 Veränderungen der phenolischen Inhaltsstoffe und Methylxanthine während der anaeroben und aeroben Feucht-Inkubation und Fermentation**

Die Quantifizierung von (-)-Epicatechin und (+)-Catechin, sowie der Oligomere Procyanidin B2 ((-)-Epicatechin Dimer), Procyanidin C1 ((-)-Epicatechin Trimer) und Procyanidin A2 ((-)-Epicatechin Tetramer) zeigte, dass die Gehalte durch die aerobe Feucht-Inkubation um

## Zusammenfassende Diskussion

---

über 97 % und im fermentierten Kakao zwischen 75 – 93 % im Vergleich zum unfermentierten und getrockneten Rohmaterial abnahmen. Nach der anaeroben Feucht-Inkubation hingegen, betrug die Reduktion nur 10 – 30 %. Während der anaeroben Feucht-Inkubation war die Wirkdauer von freiem Sauerstoff auf den Zeitraum der Trocknung begrenzt. Während der aeroben Feucht-Inkubation hingegen, war Sauerstoff während des gesamten Prozesses verfügbar. Demnach förderte die Feucht-Inkubation die Oxidation und Polymerisation der monomeren Flavan-3-ole und der niederpolymerisierten Proanthocyanidine, während dies durch die anaerobe Feucht-Inkubation eingeschränkt wurde. Laut der Studie von Stark et al. (2006) gehören die Flavan-3-ole (+)-Catechin, (-)-Epicatechin und die aus (-)-Epicatechin Einheiten bestehenden Proanthocyanidine bis zu einer Kettenlänge von neun Einheiten zu den Verbindungen in geröstetem Kakao, die gleichzeitig zum bitteren Geschmack und Adstringenz beitragen, während die höher polymerisierten Proanthocyanidine keinen Einfluss auf den Geschmack von Kakao haben.<sup>56</sup> Neben verschiedenen Diketopiperazinen wie Cyclo (L-Pro-L-Val) wird die Bitterkeit vor allem durch die Methylxanthine Theobromin und Coffein verursacht.<sup>59</sup> Theobromin und Coffein zeigten in der vorliegenden Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Proben. Auch in der fermentierten Probe konnte kein signifikanter Unterschied zu der unfermentierten und getrockneten Probe festgestellt werden, wie es in der Literatur beschrieben wird.<sup>16,77</sup> Die von Schlüter et al. (2022) festgestellte tiefe Bitterkeit und Adstringenz der Schokolade aus aerob feucht-inkubiertem Kakao<sup>170</sup>, ist somit vermutlich vor allem auf die niedrigen Gehalte der monomeren und niederpolymerisierten Polyphenole zurückzuführen. Mit den Ergebnissen konnte somit die Arbeitshypothese 7 bestätigt werden. Durch die hohe Sauerstoffverfügbarkeit während der aeroben Feucht-Inkubation nahmen die Gehalte an monomeren Flavan-3-olen und niederpolymerisierten Proanthocyanidinen ab. Dies führte im Endprodukt zu einer geringen Bitterkeit und Adstringenz.

### 8.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

In vielen Literaturstellen wird beschrieben, dass der mikrobielle Abbau der Pulpe bei der Kakaofermentation nicht direkt für die Aromabildung verantwortlich ist. Der Metabolismus der beteiligten Mikroorganismen sorgt in erster Linie dafür, dass die chemisch-physikalischen Bedingungen geschaffen werden, sodass in der Bohne Aromapräkursoren und Aromastoffe gebildet werden können und die Transformation der Polyphenole ermöglicht wird.<sup>2,4,10,17,60,62</sup> Demgegenüber steht die mikrobielle Bildung von eher negativ assoziierten Aromastoffen wie Essigsäure und 2- und 3-Methylbuttersäure, aber auch positiv bewerteten Verbindungen wie

## Zusammenfassende Diskussion

---

verschiedene Ester, die mikrobiell gebildet werden und von denen angenommen wird, dass sie durch Diffusion in die Bohnen gelangen. Vor allem die Arbeiten mit fermentations-ähnlichen Inkubationen von frischen Kakaobohnen auf der Grundlage der Arbeiten von Biehl (1973, 1982) verdeutlichten, dass die Schlüsselp Parameter, die die Veränderungen in der Bohne hervorrufen, auch künstlich unter kontrollierten Bedingungen herbeigeführt werden können.<sup>18,24,27-30,39,171</sup> Diese fermentationsähnlichen Inkubationen mit frischen Kakaobohnen wurden entwickelt, da die traditionelle mikrobielle Fermentation wechselnden äußeren Einflüssen unterliegt, die zu schwankenden Resultaten führen und nicht so einfach im Labor der Forschenden durchgeführt werden kann.<sup>171</sup>

Der Ansatz diese Behandlung anzupassen und auf unfermentierte Kakaokotyledonen zu übertragen, ist aus der intensiven Literaturrecherche und dem Umstand entstanden, dass eine fermentationsähnliche Inkubation von frischen Kakaobohnen zwar grundsätzlich möglich ist, jedoch die praktische Implementierungsmöglichkeit und mögliche kommerzielle Nutzung eines solchen Verfahrens begrenzt erscheint. Frische Kakaofrüchte weisen im Verhältnis zur erwartenden Ausbeute an getrockneten Bohnen ein hohes Gewicht und Volumen auf. Zudem sind die frischen Früchte nur bedingt lagerfähig, sodass eine Weiterverarbeitung möglichst zeitnah nach der Ernte erfolgen muss. Ein Transport der Schoten über weite Distanzen wäre dementsprechend kaum wirtschaftlich. Die Installation einer Inkubationsanlage für frische Bohnen müsste also ortsnah erfolgen und setzt im Vergleich zur traditionellen Verarbeitung teure Infrastruktur voraus. Da unfermentierte und getrocknete Bohnen lagerfähig sind, lassen sie sich günstig transportieren und die Nacherntebehandlung könnte an jedem beliebigen Ort erfolgen. Die Verfahrensparameter der Feucht-Inkubation lassen sich im Gegensatz zur mikrobiellen Fermentation steuern, wodurch die Behandlung eine höhere Reproduzierbarkeit aufweist und sich Qualitätsschwankungen minimieren ließen.

Von Interesse für eine praktische Anwendung des Verfahrens und mögliche weiterführende Versuche, könnte insbesondere die Variation und Optimierung der Verfahrensparameter sein, um gezielt die qualitätsbestimmenden Eigenschaften des Endproduktes zu beeinflussen. Zu den variablen Parametern gehört die Zusammensetzung und Konzentration der Säure des Inkubationsmediums, das Temperatur-Zeitprofil der Inkubation, die Anpassung des verfügbaren Sauerstoffs und das Temperatur-Zeitprofil der künstlichen Trocknung. Zwar wurden während der Voruntersuchungen im Rahmen der Methodenentwicklung unterschiedliche Verfahrensparameter ausprobiert, sodass das Protokoll zur Feucht-Inkubation festgelegt werden konnte. Es wurde aber größtenteils mit einfacher Analytik begleitet und die

## Zusammenfassende Diskussion

---

Einflüsse der verschiedenen Verfahrensparameter wurden nicht systematisch auf ihre Auswirkungen untersucht.

Durch die Veränderung der Zusammensetzung des Inkubationsmediums kann der im Kotyledongewebe erreichte pH-Wert angepasst werden. Es wurde bewusst Milchsäure eingesetzt, da im Regelfall während der traditionellen Fermentation und Weiterverarbeitung die Gehalte an Essigsäure möglichst tief gehalten werden sollten. Vor diesem Hintergrund erschien der Einsatz von Essigsäure nicht zielführend. Andererseits weist Essigsäure im Gegensatz zu beispielsweise Milchsäure oder Citronensäure den Vorteil auf, dass sie flüchtig ist und so zu einem Teil durch die Folgeprozesse wieder reduziert werden kann. Zudem erreicht Essigsäure in traditionell fermentiertem Kakao und in den Endprodukten sehr hohe OAV und gilt damit als einer der Schlüsselaromastoffe. Die Ergebnisse der ersten und zweiten Publikation zeigten, dass Essigsäure auch ohne die mikrobielle Fermentation zu den aromaaktiven Verbindungen mit hohen OAV gehört. Welchen Beitrag Essigsäure sowie die anderen Aromastoffe zum gesamten Aromaprofil leisten, ließe sich über systematische Weglassversuche mit Aromarekombinaten herausfinden. In der Literatur lassen sich nur wenige Studien finden, in denen Rekombinationsversuche und sensorische Evaluationen durchgeführt, um zu überprüfen, ob alle relevanten Aromastoffe mittels AEVA und SIVA identifiziert und quantifiziert werden konnten. Frauendorfer (2003) charakterisierte mit dem Sensomics Ansatz das Aroma von Kakaopulver und überprüfte seine Ergebnisse mithilfe eines Rekombinates der Aromastoffe aufgelöst in Öl, welches er mit entaromatisiertem Kakaopulver vermischte und durch ein Sensorikpanel prüfen ließ. Das Rekombinat zeigte sehr hohe Übereinstimmung mit dem Probematerial.<sup>89</sup> Weigl (2006) hingegen untersuchte das Aroma von gerösteter Kakaomasse auf molekularer Ebene und konnte seine Ergebnisse ebenfalls mit der sensorischen Überprüfung verifizieren.<sup>86</sup> Seyfried et al. (2019) charakterisierten das Aroma von zwei unterschiedlichen dunklen Schokoladen. Die Rekombinate wiesen während der sensorischen Überprüfung ebenfalls sehr gute Übereinstimmung mit dem Geruchsprofil der Ausgangsmaterialien auf.<sup>107</sup> Systematische Weglassversuche, die Aussagen zum Stellenwert der einzelnen Aromasubstanzen wie beispielsweise Essigsäure geben könnten, wurden jedoch bisher nicht durchgeführt. Dies wäre Gegenstand zukünftiger Untersuchungen und könnte Aufschluss darüber geben, welche Komponenten für das typische Aroma von Kakao zwingend notwendig sind. Darüber hinaus ließe sich der Einfluss einzelner Verbindungen auf bestimmte sensorische Ausprägungen, bspw. Fruchtigkeit, Blumigkeit, intensive Kakao-Note, Röstnote, etc. bestimmen. Besonders interessant ist die Diskrepanz zwischen den eher negativ behafteten Aromaqualitäten der verschiedenen Säuren und den sehr hohen OAV, die für diese

## Zusammenfassende Diskussion

---

Verbindungen in Kakao und Kakaoprodukten in vielen Studien ermittelt wurden. Insbesondere die Tatsache, dass eine übermäßige Bildung vermieden und ihre Gehalte während der Prozessierung gesenkt werden sollen, spricht gegen ihren positiven Beitrag zum Kakaoaroma. Allerdings ist auch zu berücksichtigen, dass das Spektrum der aroma-aktiven Verbindungen und die Verhältnisse der Aromastoffe zueinander das Aromaprofil prägen. Außerdem sind auch Wechselwirkungen mit nicht-flüchtigen Inhaltsstoffen bekannt, die ebenfalls Einfluss auf das Aromaprofil haben. In diesem Sinne ist die simple Betrachtung der Aromaqualität von Einzelverbindungen und die Einteilung in „gute“ und „schlechte“ oder „erwünschte“ und „unerwünschte“ Aromastoffe eine Vereinfachung. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse deuten zumindest daraufhin, dass auch bei geringeren Gehalten an Essigsäure und geringen Quantitäten an Pyrazinen ein kakaotypisches Aromaprofil resultiert.

Mit der Variation der Ansäuerung könnten in zukünftigen Versuchen gezielt die sauren Geschmackseigenschaften des resultierenden Rohmaterials eingestellt werden. Es ist bekannt, dass verschiedenen Säuren sensorisch unterschiedliche Säureintensitäten aufweisen.<sup>172</sup> Der Essigsäure wird eine besondere Rolle während der mikrobiellen Fermentation zugeschrieben, da sie für die Inaktivierung des Keimlings sorgt<sup>63</sup> und durch die Penetration von Zellmembranen eine Durchmischung und Verteilung der löslichen Komponenten innerhalb der Kotyledonen ermöglicht.<sup>18,25</sup> Die enzymatische Vorstufenbildung während der Feucht-Inkubation, ließ sich den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nach auch durch die Verwendung von Milchsäure im Medium induzieren. Die Zellmembrane scheinen also durch die Trocknung ausreichend zerstört worden zu sein, um einen freien Stoffaustausch und die Durchmischung der hydrophilen Bestandteile zu ermöglichen. Welche Auswirkungen eine Variation der Säurekonzentration und der verwendeten Säure auf den Prozess hat, könnte in Folgeversuchen aufgeklärt werden.

Es ist davon auszugehen, dass eine Anpassung und Variation des Temperatur-Zeitprofils während der Feucht-Inkubation ebenfalls einen Einfluss auf die Vorstufenbildung und Transformation der Inhaltsstoffe hat. Im Vergleich zur traditionellen Fermentation (ca. 5 – 8 Tage Fermentationsdauer und bis ca. 14 Tage Trocknungsdauer<sup>5</sup>) ist die Behandlungszeit der durchgeführten Feucht-Inkubation (Rehydrierung 12 h, Inkubation 72 h und Trocknung ca. 24 h) eher kurz. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass die komplexen Vorgänge während der mikrobiellen Fermentation aufeinander aufbauen und daher vergleichsweise langsam vonstattengehen. Zu Beginn steht die alkoholische Gärung durch Hefen, die das nötige Substrat für die Essigsäureproduktion liefert, wodurch nach ca. 24 – 48 h der Keimling



## Zusammenfassende Diskussion

---

inaktiviert wird. Die Testa wirkt dabei als Barriere und die Diffusions- und Umsetzungsvorgänge in der Bohne benötigen Zeit. Zudem ist die Einwirkung von Sauerstoff durch die Testa beschränkt. Während der Feucht-Inkubation hingegen, ist der Keimling bereits inaktiviert und die Testa wurde bewusst vor der Behandlung entfernt, da die Ergebnisse der Voruntersuchungen eine schnellere und höhere Bildung an primären Aminogruppen bei der Verwendung von Nibs im Gegensatz zur Feucht-Inkubation von ganzen Bohnen zeigten (vergl. 0). Die kleine Teilchengröße erleichtert vermutlich das Eindiffundieren des Mediums während der Rehydrierung und beschleunigt so die erwünschten Vorgänge in den Kotyledonen. Zudem ist die Oberfläche vergrößert, sodass der Kontakt mit Sauerstoff gefördert und die Oxidation und Polymerisation der Polyphenole erleichtert wird. Durch die Variation des Temperatur-Zeitprofils während der Feucht-Inkubation könnte der Prozess weiter optimiert werden. Es ist möglich, dass die Temperatur auf 50 °C -55 °C erhöht werden kann, ohne die beteiligten Enzyme zu hemmen oder zu inaktivieren. So könnte der Prozess ggf. zusätzlich beschleunigt und hinsichtlich der Aroma- und Aromapräkursorbildung optimiert werden.

Die Unterschiede in der Vorstufenbildung und der Oxidation der phenolischen Inhaltsstoffe nach der anaeroben und aeroben Feucht-Inkubation, wie sie im Rahmen der dritten Publikation beobachtet wurden, deuten darauf hin, dass die gezielte Anpassung und Variation der Sauerstoffverfügbarkeit für die Steuerung und Optimierung des Prozesses von besonderem Interesse sein könnten. Wurde die Sauerstoffzufuhr weitestgehend unterbunden, konnten die höchsten Gehalte an Aromavorstufen gemessen werden. Gleichzeitig wies das anaerob feucht-inkubierte Material die höchsten Gehalte an monomeren Polyphenolen und niederpolymerisierten Proanthocyanidinen auf, was neben den Messungen mittels HPLC-MS (QTOF) auch durch die photometrische Bestimmung des Gesamtgehaltes an Phenolen und Flavan-3-olen und durch den tiefen Fermentationsindex unterstrichen wurde. Die anaerobe Feucht-Inkubation bietet die Möglichkeit Rohmaterial mit einem hohen Aromavorstufengehalt im Sinne von D-Glucose, D-Fruktose und freien Aminosäuren und sehr hohen Gehalten an niederpolymerisierten Polyphenolen herzustellen. Mit der Steuerung des Oxidationsgrades könnte der Gehalt der niederpolymerisierten phenolischen Verbindungen gesteuert und damit die resultierende Bitterkeit und Adstringenz angepasst werden. Auf diese Weise ließen sich maßgeschneiderte Zwischenprodukte herstellen, die gezielt zur Einstellung der Geschmackseigenschaften von Kakaomasse verwendet werden könnten. Darüber hinaus könnte der Gehalt an Flavan-3-olen und Proanthocyanidinen und damit das anti-oxidative Potential im Endprodukt gezielt angepasst werden. Diese Inhaltsstoffe sind insbesondere in den letzten

## Zusammenfassende Diskussion

---

Jahren in den Fokus der Forschung und Industrie gerückt, da sie ein hohes antioxidatives Potential aufweisen und so Herz- Kreislaufkrankungen vorbeugen können.<sup>173</sup>

Die gewonnenen Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit können folgendermaßen zusammengefasst werden. Die verwendeten unfermentierten und getrockneten Kakaobohnen wiesen die strukturellen und chemischen Eigenschaften auf, sodass die während der mikrobiellen Fermentation angestrebten chemischen und biochemischen Transformationsvorgänge innerhalb der Kotyledonmatrix *in vitro* herbeigeführt werden konnten. Durch die gezielte Rehydrierung der Matrix mit einem sauren Inkubationsmedium ließ sich der pH-Wert auf 5,0 bis 5,5 anpassen, der für die enzymatische Aromavorstufenfreisetzung als optimal gilt. Durch die thermische Inkubation bei 45 °C und anschließende Trocknung wurden nicht nur Vorstufen freigesetzt, sondern auch verschiedene Schlüsselaromastoffe, insbesondere die Strecker-Aldehyde 2- und 3-Methylbutanal, verschiedene Ester nicht-enzymatisch und/oder enzymatisch innerhalb der Bohne aus Vorstufen gebildet. Auf der anderen Seite wurden geringere Gehalte an Säuren wie Essigsäure und 2- und 3-Methylbuttersäure gemessen, die während der traditionellen Fermentation vor allem durch Mikroorganismen gebildet werden und durch Diffusion in die Bohnen gelangen. Durch die gezielte Einwirkung von Sauerstoff konnte der Grad der Oxidation und Polymerisation der phenolischen Inhaltsstoffe angepasst werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Feucht-Inkubation die Voraussetzungen zu einer alternativen Nacherntebehandlung erfüllt. Die hergestellte Schokolade aus dem feucht-inkubierten Kakao wies leicht abweichende sensorische Eigenschaften im Vergleich zu traditionell fermentiertem Kakao auf. Die sensorische Profilierung zeigte jedoch kein für dunkle Schokolade untypisches Aroma- und Geschmacksprofil, sondern ansprechende sensorische Eigenschaften. Als mögliche Vorteile des Verfahrens sind vor allem die Reproduzierbarkeit und die mögliche Steuerung qualitätsbestimmender Eigenschaften des Materials zu nennen. Inhomogenes Rohmaterial aufgrund von Fehlfermentationen, Fehlchargen aufgrund von fermentationsbedingten hohen Gehalten an Essigsäure im Rohmaterial oder starke Bitterkeit und Adstringenz durch hohe Anteile an unterfermentierten (violetten) Bohnen, könnten vermieden werden.

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen wurden Ergebnisse generiert, die neue Einsichten zur Aromabildung in Kakao während der Nacherntebehandlung hervorbrachten. So deuten die Ergebnisse daraufhin, dass die mikrobiologischen Stoffwechselprodukte, die in die Bohnen eindiffundieren, bspw. Ethanol und Essigsäure, als Vorstufen für die enzymatische

## Zusammenfassende Diskussion

---

Acetat- und Ethylesterbildung innerhalb der Bohne dienen können. Des Weiteren lässt sich aufgrund der Ergebnisse vermuten, dass die Sauerstoffverfügbarkeit mit der Bildung von Strecker-Aldehyden über die Reaktion von freien Aminosäuren mit oxidativ gebildeten Chinonen in Zusammenhang steht. Mit dem verfolgten Ansatz ließ sich zeigen, dass sich die Bildung wichtiger Aromastoffe unabhängig der mikrobiellen Fermentation der Fruchtpulpe induzieren ließ. Durch die Feucht-Inkubation bietet sich daher die Möglichkeit, das Aromapotential verschiedener Varietäten und Genotypen unabhängig von Fermentationstechniken, unterschiedlichen örtlichen Mikroorganismenpopulationen und schwankenden chemisch-physikalischen Prozessparametern zu untersuchen.

Da bei einer möglichen Nutzung des Verfahrens durch die Feucht-Inkubation und Trocknung zusätzlicher Arbeitsaufwand entsteht, ist mit zusätzlichen Kosten für die Verarbeiter zu rechnen. Je nach Anwendung könnten die Zusatzkosten durch die bessere Reproduzierbarkeit und der Herstellung maßgeschneiderter Produkte ausgeglichen werden. Fehlchargen werden vermieden und es kann eine gleichbleibende Produktqualität gewährleistet werden. Zudem ließen sich ggf. kürzere Conchierzeiten realisieren, was zu einer erhöhten Linienauslastung und geringeren Prozesskosten führen würde. Außerdem bietet die Möglichkeit verschiedene qualitätsbestimmende Merkmale der Rohmaterialien gezielt anzupassen, wie beispielsweise der Gehalt an monomeren und niederpolymerisierten Polyphenolen, maßgeschneiderte Produkte herzustellen und damit neue Geschäftsfelder und Einsatzmöglichkeiten der Produkte zu eröffnen.

Abschließend sollten die möglichen Auswirkungen auf sozio-ökonomische Faktoren der anbauenden Regionen thematisiert werden. Eine praktische Umsetzung des Verfahrens könnte nach sich ziehen, dass ein noch größerer Teil der Wertschöpfung aus den Händen der Kakaoproduzenten abfließt. Dies sollte unter allen Umständen vermieden werden. Andererseits ist die einfache Trocknung von Kakaobohnen weitaus weniger arbeitsintensiv als die Durchführung einer mehrtägigen Fermentation und Trocknung, wodurch sich der Arbeitsaufwand vor Ort und damit die Produktionskosten verringern. Eine weitere Chance bietet sich durch die vollständige Gewinnung der Kakaopulpe, da sie nicht als Substrat für die Fermentation dienen muss. Dies könnte es Kakaobauern ermöglichen mit dem Verkauf von Kakaopulpe neue Einnahmequellen zu generieren. Einerseits können auf Kakaopulpe basierte Produkte wie Getränke oder Konfitüre lokal verkauft und konsumiert werden. Andererseits sind seit jüngster Zeit verschiedene Schokoladen auf dem Markt erhältlich, die zu 100 % mit Zutaten aus der Kakaofrucht hergestellt werden. Kakaopulpe wird hierbei als Zuckerersatz, bzw.

## Zusammenfassende Diskussion

---

Süßungsmittel verwendet, sodass die gewinnbringende Vermarktung von Kakaopulpe möglich erscheint. Die Gewinnung und Haltbarmachung der Kakaopulpe setzt aber auch technische Infrastruktur voraus, die für den größten Teil der weltweiten, meist kleinbäuerlich operierenden Kakaoproduzenten nur schwer finanzierbar wäre.

## Literaturverzeichnis

1. Biehl, B.; Ziegleder, G. Cocoa: Chemistry of processing/Production, products, and use. In *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*; Caballero, B., Ed.; Academic Press: Amsterdam, Niederlande, 2003; 1436–1463
2. Schwan, R. F.; Wheals, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2004, 44, 205–221
3. Schwan, R. F.; de Melo Pereira, G. V.; Fleet, G.H. Microbial activities during cocoa fermentation. In *Cocoa and Coffee Fermentations*; Schwan, R. F.; Fleet, G. H., Eds.; CRC Press: Boca Raton, USA, 2015; 130–192
4. Lopez, A. S.; Dimick, P. Cocoa fermentation. In *Biotechnology: Enzymes, Biomass, Food and Feed*; Reed, G.; Nagodawithana, T. W., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Deutschland, 1995; 561–577
5. Amoa-Awua, W. K. Methods of cocoa fermentation and drying. In *Cocoa and Coffee Fermentations*; Schwan, R. F.; Fleet, G. H., Eds.; CRC Press: Boca Raton, USA, 2015; 71–128
6. Calvo, A. M.; Botina, B. L.; García, M. C.; Cardona, W. A.; Montenegro, A. C.; Criollo, J. Dynamics of cocoa fermentation and its effect on quality. *Scientific Reports*, 2021, 11, 16746
7. Ney, K. H. Cocoa Off-Flavors. In *Off-Flavors in Foods and Beverages*; Charalambous, G. Ed.; Elsevier: Amsterdam, Niederlande: 1992; 28, 419–432
8. Füllemann, D.; Steinhaus, M. Characterization of odorants causing smoky off-flavors in cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68, 10833–10841
9. Porcelli, C.; Neiens, S. D.; Steinhaus, M. Molecular background of a moldy-musty off-flavor in cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69, 4501–4508
10. Afoakwa, E. O.; Paterson, A.; Fowler, M.; Ryan, A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2008, 48, 840–857
11. Ho, V. T. T.; Zhao, J.; Fleet, G. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 174, 72–87
12. Koné, M. K.; Guéhi, S. T.; Durand, N.; Ban-Koffi, L.; Berthiot, L.; Tachon, A. F.; Brou, K.; Boulanger, R.; Montet, D. Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. *Food Research International*, 2016, 89, 910–917

## Literaturverzeichnis

---

13. Crafac, M.; Keul, H.; Eskildsen, C. E.; Petersen, M. A.; Saerens, S.; Blennow, A.; Skovmand-Larsen, M.; Swiegers, J. H.; Petersen, G. B.; Heimdal, H.; Nielsen, D. S. Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Research International*, 2014, 63, 306–316
14. Crafac, M.; Mikkelsen, M. B.; Saerens, S.; Knudsen, M.; Blennow, A.; Lowor, S.; Takrama, J.; Swiegers, J. H.; Petersen, G. B.; Heimdal, H.; Nielsen, D. S. Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 167, 103–116
15. Eskes, B.; Ahnert, D.; Assemat, S.; Seguine, E. Evidence for the effect of the cocoa bean flavour environment during fermentation on the final flavour profile of cocoa liquor and chocolate. *17th International Cocoa Research Conference (COPAL)*. 2006. Yaoundé, Cameroun
16. Nigam, P. S.; Singh, A. Cocoa and Coffee Fermentations. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*; Blatt, C. & Torturello, M., Eds.; Elsevier: Cambridge, UK, 2014; 485–492
17. Ziegleder, G. Flavour development in cocoa and chocolate. In *Industrial Chocolate Manufacture and Use: Fifth Edition*; Beckett, S. T.; Fowler M. S.; Ziegler G. R. Eds.; Wiley Blackwell: Oxford, UK, 2017; 185–216
18. Biehl, B.; Brunner, E.; Passern, D.; Quesnel, Victor. C.; Adomako, D. Acidification, proteolysis and flavour potential in fermenting cocoa beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1985, 36, 583–598
19. De Vuyst, L.; Weckx, S. The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 1–13
20. Camu, N.; González, Á.; De Winter, T.; Van Schoor, A.; De Bruyne, K.; Vandamme, P.; Takrama, J. S.; Addo, S. K.; De Vuyst, L. Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74, 86–98
21. Biehl, B.; Meyer, B.; bin Said, M.; Samarkoddy, R. J. Bean spreading: a method for pulp preconditioning to impair strong nib acidification during cocoa fermentation in Malaysia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1990, 51, 35–45

## Literaturverzeichnis

---

22. Meyer, B.; Biehl, B.; Bin Said, M.; Samarkoddy, R. J. Post-harvest pod storage: A method for pulp preconditioning to impair strong nib acidification during cocoa fermentation in Malaysia *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1989, 48, 285–304
23. de Melo Pereira, G. V.; Magalhães, K. T.; de Almeida, E. G.; da Silva Coelho, I.; Schwan, R. F. Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: influence on the dynamics of microbial populations and physical-chemical properties. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 161, 121–133
24. Biehl, B.; Passern, D. Proteolysis during fermentation-like incubation of cocoa seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1982, 33, 1280–1290
25. Biehl, B.; Passern, D.; Sagemann, W. Effect of acetic acid on subcellular structures of cocoa bean cotyledons. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1982, 33, 1101–1109
26. Biehl, B.; Quesnel, V. C.; Passern, D.; Sagemann, W. Water uptake by cocoa seeds during fermentation-like incubation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1982, 33, 1110–1116
27. Voigt, J.; Heinrichs, H.; Voigt, G.; Biehl, B. Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa seeds. *Food Chemistry*, 1994, 50, 177–184
28. Biehl, B. Veränderungen der subcellulären Struktur in Keimblättern von Kakaosamen (*Theobroma cacao* L.) während der Fermentation und Trocknung. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 1973, 153, 137–150
29. Eyamo E.; Victor J.; De Taeye, C.; Niemenak, N.; Youmbi, E.; Collin, S. Influence of acetic and lactic acids on cocoa flavan-3-ol degradation through fermentation-like incubations. *LWT - Food Science and Technology*, 2016, 68, 514–522
30. Kadow, D.; Niemenak, N.; Rohn, S.; Lieberei, R. Fermentation-like incubation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) – Reconstruction and guidance of the fermentation process. *LWT - Food Science and Technology*, 2015, 62, 357–361
31. Powis, T. G.; Hurst, W. J.; del Carmen Rodríguez, M.; Ortiz C. P.; Blake, M.; Cheetham, D.; Coe, M. D.; Hodgson, J. G. Oldest Chocolate in the New World. *Antiquity*, 2007, 314
32. Wood, G. A. R. History and Development. In *Cocoa: Fourth Edition*; Wood, G. A. R.; Lass, R. A. Eds.; Blackwell Science: Oxford, UK, 1985; 1–10
33. Beckett, S. T. Traditional chocolate making. In *Industrial Chocolate Manufacture and Use: Fifth Edition*; Beckett, S. T.; Fowler M. S.; Ziegler G. R. Eds.; Wiley Blackwell: Oxford, UK, 2017; 1–8

## Literaturverzeichnis

---

34. International cocoa Organization (ICCO). Grindings of Cocoa Beans. *Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics*, Vol. XLIX, No.1, Cocoa year 2022/23, 2023, <https://www.icco.org/february-2023-quarterly-bulletin-of-cocoa-statistics/>
35. Fowler, M. S.; Coutel, F. Cocoa beans: from tree to factory. In *Industrial Chocolate Manufacture and Use: Fifth Edition*; Beckett, S. T.; Fowler M. S.; Ziegler G. R. Eds.; Wiley Blackwell: Oxford, UK, 2017; 9–49
36. Toxopeus, H. Botany, Types and Populations. In *Cocoa: Fourth Edition*; Wood, G.A.R.; Lass, R.A. Eds.; Blackwell Science: Oxford, UK, 1985; 11–37
37. Afoakwa, E. O. Cocoa Production and Processing Technology; CRC Press: Boca Raton, USA, 2014
38. Afoakwa, E. O. Chocolate Science and Technology: Second Edition; Wiley Blackwell: Oxford, UK, 2016
39. Rohsius, C. Die Heterogenität der biologischen Ressource Rohkakao. Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg, Deutschland, 2007
40. Elwers, S.; Zambrano, A.; Rohsius, C.; Lieberei, R. Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). *European Food Research and Technology*, 2009, 229, 937–948
41. Voigt, J.; Lieberei, R. Biochemistry of cocoa fermentation. In *Cocoa and Coffee Fermentations*, Schwan, R.F.; Fleet, G.H. Eds.; CRC Press, Boca Raton, USA, 2015; 193–226
42. Pettipher, G. L. Analysis of cocoa pulp and the formulation of a standardised artificial cocoa pulp medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1986, 37, 297–309
43. Elwers, S. Zusammensetzung und histologische Verteilung der phenolischen Substanzen in Samen von Massen- und Edelkakao-Varietäten (*Theobroma cacao* L.). Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg, Deutschland, 2008
44. Biehl, B.; Wewetzer, C.; Passern, D. Vacuolar (storage) proteins of cocoa seeds and their degradation during germination and fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1982, 33, 1291–1304
45. Spencer, M. E.; Hodge, R. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the major storage proteins of *Theobroma cacao*. *Planta*, 1992, 186, 528–535
46. Voigt, J.; Biehl, B.; Wazir, S. K. S. The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. *Food Chemistry*, 1993, 47, 145–151
47. Niemenak, N.; Eyamo, J. V. E.; Djabou, S. A. M.; Tchoutcheu, A. G. N.; Bernhardt, C.; Lieberei, R.; Bisping, B. Assessment of the profile of free amino acids and reducing



## Literaturverzeichnis

---

- sugars of cacao beans from local Cameroonian Trinitario (SNK varieties) and Forastero (TIKO varieties) using fermentation-like incubation. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 2020, 93, 321–329
48. Rottiers, H.; Sosa, D. A. T.; De Winne, A.; Ruales, J.; De Clippeleer, J.; De Leersnyder, I.; De Wever, J.; Everaert, H.; Messens, H.; Dewettinck, K. Dynamics of volatile compounds and flavor precursors during spontaneous fermentation of fine flavor Trinitario cocoa beans. *European Food Research and Technology*, 2019, 245, 1917–1937.
49. Aprotosoia, A. C.; Luca, S. V.; Miron, A. Flavor chemistry of cocoa and cocoa products-an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2016, 15, 73–91.
50. Reineccius, G. A.; Andersen, D. A.; Kavanagh, T. E.; Keeney, P. G. Identification and quantification of the free sugars in cocoa beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1972, 20, 199–202
51. Wollgast, J.; Anklam, E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and qualification. *Food Research International*, 2000, 33, 423–447
52. Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer: Berlin/Heidelberg, Deutschland, 2008
53. Kim, H.; Keeney, P. G. (-)-Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. *Journal of Food Science*, 1984, 49, 1090–1092
54. Porter, L J; Ma, Z; Chan, B G. Cacao procyanidins: major flavanoids and identification of some minor metabolites. *Phytochemistry*, 1991, 30, 1657–1663
55. Serra Bonvehí, J.; Ventura Coll, F. Evaluation of bitterness and astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder. *Food Chemistry*, 1997, 60, 365–370
56. Stark, T.; Bareuther, S.; Hofmann, T. Sensory-guided decomposition of roasted cocoa nibs (Theobroma cacao) and structure determination of taste-active polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 5407–5418
57. Valentová, H; Panovská, Z. Sensory evaluation / taste. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition: Second Edition*; Caballero, B. Ed.; Academic Press: Oxford, UK, 2003; 5180–5187
58. Stoll, L. Biochemische Indikatoren für Keimung und Fermentation in Samen von Kakao (Theobroma cacao L.). Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg, Deutschland, 2010

## Literaturverzeichnis

---

59. Stark, T.; Bareuther, S.; Hofmann, T. Molecular definition of the taste of roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*) by means of quantitative studies and sensory experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54, 5530–5539
60. Roelofsen, P. A. Fermentation, drying and storage of cocoa beans. *Advances in Food Research*, 1958, 8, 225–296
61. Schwan, R. F.; Cooper, R. M.; Wheals, A. E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, 21, 234–244
62. Forsyth, W. G. C; Quesnel, V. C. The mechanisms of cocoa curing. In *Advances in Enzymology*; Volume 15, Nord, F. F., Ed.; John Wiley and Sons Inc.: New York, USA, 1963; 457–492
63. Quesnel, V. C. Agents inducing the death of cocoa seeds during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1965, 16, 441–447
64. Knapp, A.W. The fermentation of cacao. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1924, 43, 402–407
65. Hansen, C. E.; Del Olmo, M.; Burri, C. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1998, 77, 273–281
66. Li, C.; Sun, W.Q. Desiccation sensitivity and activities of free radical-scavenging enzymes in recalcitrant *Theobroma cacao* seeds. *Seed Science Research*, 1999, 9, 209–217
67. Mohr, W.; Landschreiber, E.; Severin, Th. Zur Spezifität des Kakaoaromas. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1976, 78, 88–95
68. Voigt, J.; Biehl, B.; Heinrichs, H.; Voigt, G. Die Bildung kakaospezifischer Aromavorstufen aus dem Reserveglobulin des Kakaosamens. In *Angewandte Botanik Berichte*, 1994, 5, 138–147
69. Biehl, B.; Voigt, J. Nacherntebehandlung, Fermentation, Proteolyse und Bildung der Aromavorstufen beim Kakao. In *Angewandte Botanik Berichte*, 1994, 5, 124–137
70. Kirchhoff, P.-M.; Biehl, B.; Crone, G. Peculiarity of the accumulation of free amino acids during cocoa fermentation. *Food Chemistry*. 1989, 31, 295–311
71. Misnawi; Jinap, S. Effect of cocoa bean polyphenols on sensory properties and their changes during fermentation. *Pelita Perkebunan*, 2003, 19, 90–103
72. Luna, F.; Crouzillat, D.; Cirou, L.; Bucheli, P. Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa liquor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50, 3527–3532

## Literaturverzeichnis

---

73. Counet, C.; Ouwerx, C.; Rosoux, D.; Collin, S. Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, 6243–6249
74. Barišić, V.; Kopjar, M.; Jozinović, A.; Flanjak, I.; Ačkar, Đ.; Miličević, B.; Šubarić, D.; Jokić, S.; Babić, J. The chemistry behind chocolate production. *Molecules*, 2019, 24, 3163
75. Misnawi; Jinap, S.; Jamilah, B.; Nazamid, S. Effects of incubation and polyphenol oxidase enrichment on colour, fermentation index, procyanidins and astringency of unfermented and partly fermented cocoa beans. *International Journal of Food Science and Technology*, 2003, 38, 285–295
76. Kongor, J. E.; Takrama, J. F.; Budu, A. S.; Mensah-Brown, H.; Afoakwa, E. O. Effects of fermentation and drying on the fermentation index and cut test of pulp pre-conditioned Ghanaian cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *Journal of Food Science and Engineering*, 2013, 3, 625–634
77. Febrianto, N. A.; Zhu, F. Changes in the composition of methylxanthines, polyphenols, and volatiles and sensory profiles of cocoa beans from the Sul 1 genotype affected by fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68, 8658–8675
78. Copetti, M. V.; Iamanaka, B. T.; Pitt, J. I.; Taniwaki, M. H. Fungi and mycotoxins in cocoa: From farm to chocolate. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 178, 13–20
79. Biehl, B.; Meyer, B.; Crone, G.; Pollmann, L.; Bin Said, M. Chemical and physical changes in the pulp during ripening and post-harvest storage of cocoa pods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1989, 48, 189–208
80. Beckett, S.T.; Paggios, K.; Roberts, I. Conching. In *Industrial Chocolate Manufacture and Use: Fifth Edition*; Beckett, S. T.; Fowler M.S.; Ziegler G. R. Eds.; Wiley Blackwell: Oxford, UK, 2017; 241–273
81. Kamphuis, H. J. Production of cocoa mass, cocoa butter and cocoa powder. In *Industrial Chocolate Manufacture and Use: Fifth Edition*; Beckett, S. T.; Fowler M.S.; Ziegler G. R. Eds.; Wiley Blackwell: Oxford, UK, 2017; 50–71
82. Stauffer, M. B. Quality control and shelf life. In *Industrial Chocolate Manufacture and Use: Fifth Edition*; Beckett, S. T.; Fowler M.S.; Ziegler G. R. Eds.; Wiley Blackwell: Oxford, UK, 2017; 532–554
83. Ziegler, G.R.; Hogg, R. Particle size reduction. In *Industrial Chocolate Manufacture and Use: Fifth Edition*; Beckett, S. T.; Fowler M.S.; Ziegler G. R. Eds.; Wiley Blackwell: Oxford, UK, 2017; 216–240

## Literaturverzeichnis

---

84. Windhab, E. J. Tempering. In *Industrial Chocolate Manufacture and Use*: Fifth Edition; Beckett, S. T.; Fowler M.S.; Ziegler G. R. Eds.; Wiley Blackwell: Oxford, UK, 2017; 314–355
85. Kongor, J. E.; Hinneh, M.; Van de Walle, D.; Afoakwa, E. O.; Boeckx, P.; Dewettinck, K. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile - A review. *Food Research International*, 2016, 82, 44–52
86. Weigl, M. Molekulare Charakterisierung wertgebender Aromastoffe in Edelkakaomasse: Klärung von Aromabildungsreaktionen beim Rösten von fermentierten Kakaobohnen. Dissertation, Technische Universität München, München, Deutschland, 2006
87. Bainbridge, J. S.; Davies, S. H. The essential oil of cocoa. *Journal of the Chemical Society*, 1912. 2209–2231
88. Bugan, S. J. Einfluss von Fermentationsdauer und Röstung auf die Bildung von Aromastoffen und Aromaprekursoren in Konsumkakao. Dissertation, Technische Universität München, München, Deutschland, 2007
89. Frauendorfer, F. Zum Einfluss des Röstvorgangs auf die Bildung wertgebender Aromastoffe in Kakao. Dissertation, Technische Universität München, München, Deutschland, 2003
90. van Dongen, W.; Donders, J.; Wiggers, B. VCF-Volatile Compounds in Foods. Database version 16.10. <https://www.vcf-online.nl/VcfHome.cfm>.
91. Marseglia, A.; Musci, M.; Rinaldi, M.; Palla, G.; Caligiani, A. Volatile fingerprint of unroasted and roasted cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) from different geographical origins. *Food Research International*, 2020, 132, 109101
92. Steinhaus, M. Gas chromatography–olfactometry: principles, practical aspects and applications in food analysis. In *Advanced Gas Chromatography in Food Analysis*; Tranchida, P. Q., Ed.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2020; 337–399
93. Granvogl, M.; Schieberle, P. The sensomics approach: A useful tool to unravel the genuine aroma blueprint of foods and aroma changes during food processing. *Comprehensive Analytical Chemistry*; Cordero, C. E. I. Ed.; Elsevier, Amsterdam, Niederlande, 2022, 96, 41–68
94. Engel, W.; Bahr, W.; Schieberle, P. Solvent assisted flavour evaporation - a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *European Food Research and Technology*, 1999, 209, 237–241

## Literaturverzeichnis

---

95. Schieberle, P. New developments in methods for analysis of volatile flavor compounds and their precursors. In *Characterization of Food - Emerging Methods*; Gaonkar, A. G., Ed.; Elsevier, Amsterdam, Niederlande; 1995; 403–431
96. Rychlik, M.; Asam, S. Stabilisotopenverdünnungsanalysen zur Quantifizierung organischer Spurenkomponenten in der Lebensmittelanalytik. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*, 2009, 21, 470–482
97. Rothe, M.; Thomas, B. Aromastoffe des Brotes. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 1963, 119, 302–310
98. Grosch, W. Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission. *Chemical Senses*, 2001, 26, 533–545
99. Goudagni, D. G.; Buttery, R.; Okano, S.; Burr, H. K. Additive effect of sub-threshold concentrations of some organic compounds associated with food aromas. *Nature*, 1963, 200, 1288–1289
100. Reiners, J.; Grosch, W. Odorants of virgin olive oils with different flavor profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46, 2754–2763
101. Wagner, R. K.; Grosch, W. Key odorants of French fries. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1998, 75, 1385–1392
102. Czerny, M.; Grosch, W. Potent odorants of raw Arabica coffee. Their changes during roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48, 868–872
103. Schnermann, P.; Schieberle, P. Evaluation of key odorants in milk chocolate and cocoa mass by aroma extract dilution analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45, 867–872
104. Counet, C.; Callemien, D.; Ouwerx, C.; Collin, S. Use of gas chromatography-olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50, 2385–2391
105. Frauendorfer, F.; Schieberle, P. Key aroma compounds in fermented Forastero cocoa beans and changes induced by roasting. *European Food Research and Technology*, 2019, 245, 1907–1915
106. Frauendorfer, F.; Schieberle, P. Changes in key aroma compounds of Criollo cocoa beans during roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56, 10244–10251
107. Seyfried, C.; Granvogl, M. Characterization of the key aroma compounds in two commercial dark chocolates with high cocoa contents by means of the sensomics approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67, 5827–5837

## Literaturverzeichnis

---

108. Chetschik, I.; Pedan, V.; Chatelain, K.; Kneubühl, M.; Hühn, T. Characterization of the flavor properties of dark chocolates produced by a novel technological approach and comparison with traditionally produced dark chocolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67, 3991–4001
109. Ullrich, L.; Casty, B.; André, A.; Hühn, T.; Steinhaus, M. Chetschik, I. Decoding the fine flavor properties of dark chocolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70, 13730–13740
110. Owusu, M.; Petersen, M. A.; Heimdal, H. Effect of fermentation method, roasting and conching conditions on the aroma volatiles of dark chocolate. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2012, 36, 446–456
111. Owusu, M.; Petersen, M. A.; Heimdal, H. Relationship of sensory and instrumental aroma measurements of dark chocolate as influenced by fermentation method, roasting and conching conditions. *Journal of Food Science and Technology*, 2013, 50, 909–917
112. Plumas, B.; Hashim, L.; Chaveron, H. Measurement of the olfactive intensity of chocolates by differential olfactometry. *Food Control*, 1996, 7, 117–120
113. Braga, S.; Oliveira, L. F.; Hashimoto, J. C.; Gama, M. R.; Efraim, P.; Poppi, R. J.; Augusto, F. Study of volatile profile in cocoa nibs, cocoa liquor and chocolate on production process using GC × GC-QMS. *Microchemical Journal*, 2018, 141, 353–361
114. Augusto, P. P. C.; Bolini, H.M.A. The role of conching in chocolate flavor development: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2022, 21, 3274–3296
115. Maoz, I.; Lewinsohn, E.; Gonda, I. Amino acids metabolism as a source for aroma volatiles biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 2022, 67, 102221
116. Schwab, W.; Davidovich-Rikanati, R.; Lewinsohn, E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal*, 2008, 54, 712–732
117. Chen, P S. Amino Acid and Protein Metabolism in Insect Development. *Advances in Insect Physiology*, 1966, 3, 53–132
118. Dabrowski, K.; Terjesen, B. F.; Zhang, Y.; Phang, J. M.; Lee, K. A concept of dietary dipeptides: a step to resolve the problem of amino acid availability in the early life of vertebrates. *Journal of Experimental Biology*, 2005, 208, 2885–2894
119. Van der Pijl, L. Principles of dispersal in higher plants: Third edition; Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, Deutschland, 1982
120. Cipollini, M.L. Secondary metabolites of vertebrate-dispersed fruits: evidence for adaptive functions. *Revista chilena de historia natural*, 2000, 73, 421–440

## Literaturverzeichnis

---

121. Goff, S. A.; Klee, H. J. Plant volatile compounds: sensory cues for health and nutritional value? *Science*, 2006, 311, 815–819
122. Holm, C. S.; Aston, J. W.; Douglas, K. The effects of the organic acids in cocoa on the flavour of chocolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1993, 61, 65–71
123. Rodriguez-Campos, J.; Escalona-Buendía, H. B.; Contreras-Ramos, S. M.; Orozco-Avila, I.; Jaramillo-Flores, E.; Lugo-Cervantes, E. Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. *Food Chemistry*, 2012, 132, 277–288
124. Lopez, A.; Quesnel, V. C. Volatile fatty acid production in cacao fermentation and the effect on chocolate flavour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1973, 24, 319–326
125. Dzialo, M. C.; Park, R.; Steensels, J.; Lievens, B.; Verstrepen, K. J. Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS Microbiological Reviews*, 2017, 41, 95–128
126. Hofmann, T.; Münch, P.; Schieberle, P. Quantitative model studies on the formation of aroma-active aldehydes and acids by Strecker-type reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48, 434–440
127. Parker, J.K. Introduction to aroma compounds in foods. In *Flavour Development, Analysis and Perception in Food and Beverages*; Parker, J. K., Elmore, J. S.; Methven, L., Eds.; Elsevier: Amsterdam, Niederlande, 2015, 3–30
128. Purr, A.; Morcinek, H.; Springer, R. Zur Kenntnis enzymatischer Vorgänge in Kakaobohnen während der Fermentierung, insbesondere im Hinblick auf die Möglichkeiten der Aromabildung. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 1963, 123, 341–352
129. Meersman, E.; Steensels, J.; Struyf, N.; Paulus, T.; Saels, V.; Mathawan, M.; Allegaert, L.; Vrancken, G.; Verstrepen, K. J. Tuning chocolate flavor through development of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* starter cultures with increased acetate ester production. *Applied Environmental Microbiology*, 2016, 82, 732–746
130. Saltveit, M. E. Synthesis and metabolism of phenolic compounds. In *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health: Second Edition*. Yahia, E. M. Ed.; Wiley Blackwell: Oxford, UK, 2017, 115–123
131. Gonda, I.; Davidovich-Rikanati, R.; Bar, E.; Lev, S.; Jhirad, P.; Meshulam, Y.; Wissotsky, G.; Portnoy, V.; Burger, J.; Schaffer, A.; Tadmor, Y.; Giovannoni, J.; Fei, Z.; Fait, A.; Katzir, N.; Lewinsohn, E. Differential metabolism of L-phenylalanine in the

## Literaturverzeichnis

---

- formation of aromatic volatiles in melon (*Cucumis melo* L.) fruit. *Phytochemistry*, 2018, 148, 122–131
132. Parker, J.K. Thermal generation of aroma. In *Flavour Development, Analysis and Perception in Food and Beverages*; Parker, J. K., Elmore, J. S.; Methven, L., Eds.; Elsevier: Amsterdam, Niederlande, 2015, 151–185
133. Martins, S.; Jongen, W.; Van Boekel M. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology*, 2001, 11, 364–373
134. Rizzi, G. P. Formation of strecker aldehydes from polyphenol-derived quinones and  $\alpha$ -amino acids in a nonenzymic model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54, 1893–1897
135. Delgado, R. M.; Zamora, R.; Hidalgo, F. J. Contribution of phenolic compounds to food flavors: Strecker-type degradation of amines and amino acids produced by o - And p - diphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63, 312–318
136. Bittner, S. When quinones meet amino acids: Chemical, physical and biological consequences. In *Amino Acids*, 2006, 30, 205–224
137. Rizzi, G.P. The Strecker degradation of amino acids: Newer avenues for flavor formation. *Food Reviews International*, 2008, 24, 416–435
138. Hofmann, T.; Schieberle, P. Formation of aroma-active Strecker-aldehydes by a direct oxidative degradation of Amadori compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48, 4301–4305
139. Granvogl, M.; Beksan, E.; Schieberle, P. New insights into the formation of aroma-active Strecker aldehydes from 3-oxazolines as transient intermediates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60, 6312–6322
140. Buhr, K.; Pammer, C.; Schieberle, P. Influence of water on the generation of Strecker aldehydes from dry processed foods. *European Food Research and Technology*, 2009, 230, 375–381
141. Ullrich, L.; Neiens, S.; Hühn, T.; Steinhaus, M.; Chetschik, I. Impact of water on odor-active compounds in fermented and dried cocoa beans and chocolates made thereof. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69, 8504–8510
142. Scalone, G. L. L.; Cucu, T.; De Kimpe, N.; De Meulenaer, B. Influence of free amino acids, oligopeptides, and polypeptides on the formation of pyrazines in Maillard model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63, 5364–5372



## Literaturverzeichnis

---

143. Zou, T.; Liu, J.; Song, H.; Liu, Y. Discovery of Amadori-type conjugates in a peptide Maillard reaction and their corresponding influence on the formation of pyrazines. *Journal of Food Science*, 2018, 83, 1588–1595
144. D'Souza, R. N.; Grimbs, A.; Grimbs, S.; Behrends, B.; Corno, M.; Ullrich, M. S.; Kuhnert, N. Degradation of cocoa proteins into oligopeptides during spontaneous fermentation of cocoa beans. *Food Research International*, 2018, 109, 506–516
145. Andruszkiewicz, P. J.; D'Souza, R. N.; Corno, M.; Kuhnert, N. Novel Amadori and Heyns compounds derived from short peptides found in dried cocoa beans. *Food Research International*, 2020, 133, 109164
146. Kalathenos, P.; Russell, N. J. Ethanol as a food preservative. In *Food Preservatives: Second Edition*; Russell, N. J.; Gould, G. W., Eds.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, USA, 2003; 196–217
147. Roth, C. Inkubation von Kakaobohnen mit Zugabe von Starterkulturen. Bachelor Thesis (unveröffentlicht). Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften, Wädenswil, Schweiz, 2018
148. Church, F. C.; Porter, D. H.; Catignani, G. L.; Swaisgood, H. E. An o-phthalaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. *Analytical Biochemistry*, 1985, 146, 343–348
149. Church, F. C.; Swaisgood, H. E.; Porter, D. H.; Catignani, G. L. Spectrophotometric Assay Using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 1983, 66, 1219–1227
150. Murthy, M. V. R.; Padmanabhan, S.; Ramakrishna, M.; Lonsane, B.K. Comparison of nine different caseinolytic assays for estimation of proteinase activity and further improvement of the best method. *Food Biotechnology* 1997, 11, 1–23
151. Schlüter, A.; Hühn, T.; Kneubühl, M.; Chatelain, K.; Rohn, S.; Chetschik, I. Novel time- and location-independent postharvest treatment of cocoa beans: investigations on the aroma formation during moist incubation of unfermented and dried cocoa nibs and comparison to traditional fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68, 10336–10344
152. Chetschik, I.; Kneubühl, M.; Chatelain, K.; Schlüter, A.; Bernath, K.; Hühn, T. Investigations on the aroma of cocoa pulp (*Theobroma cacao* L.) and its influence on the odor of fermented cocoa beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66, 2467–2472
153. Nursten, H. E. *The Maillard Reaction—Chemistry, Biochemistry and Implications*. Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2005

## Literaturverzeichnis

---

154. Reineccius, G. Flavor Chemistry and Technology: Second Edition, CRC Press: Boca Raton, USA, 2005
155. Chiou, R. Y. Y.; Tsai, T. Characterization of peanut proteins during roasting as affected by initial moisture content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1989, 37, 1377–1381
156. Shi, D.; Wang, C.; Wang, K. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2009, 36, 139–147
157. Shibasaki, I. Food preservations with non traditional antimicrobial agents. *Journal of Food Safety*, 1982, 4, 35–58
158. Mohr, W. Über das Rösten von Kakaobohnen I. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1970, 72, 695–703
159. Gill, M. S.; Macleod, A. J.; Moreau, M. Volatile components of cocoa with particular reference to glucosinolate products. *Phytochemistry*, 1984, 23, 1937–1942
160. Ziegleder, G. Gaschromatographische Röstgradbestimmung von Kakao über methylierte Pyrazine. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 1982, 78, 77–81
161. Majcher, M. Saccharides-derived flavor compounds. In *Food Flavors: Chemical, Sensory and Technological Properties*; Jeleń, H., Ed.; CRC Press: Boca Raton, USA, 2012; 95–119
162. Rohan, T. A.; Stewart, T. The precursors of chocolate aroma: production of reducing sugars during fermentation of cocoa beans. *Journal of Food Science*, 1967, 32, 399–402
163. Rohan, T. A.; Stewart, T. The precursors of chocolate aroma: production of free amino acids during fermentation of cocoa beans. *Journal of Food Science*, 1967, 32, 395–398
164. Schlüter, A.; André, A.; Hühn, T.; Rohn, S.; Chetschik, I. Influence of Aerobic and Anaerobic Moist Incubation on Selected Nonvolatile Constituents-Comparison to Traditionally Fermented Cocoa Beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70, 16335–16346
165. Romero-Cortes, T.; Salgado-Cervantes, M. A.; García-Alamilla, P.; García-Alvarado, M. A.; del C Rodríguez-Jimenes, G.; Hidalgo-Morales, M.; Robles-Olvera, V. Relationship between fermentation index and other biochemical changes evaluated during the fermentation of Mexican cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, 93, 2596–2604
166. Afoakwa, E.; Quao, J.; Budu, A. S.; Takrama, J.; Saalia, F. K. Influence of pulp-preconditioning and fermentation on fermentative quality and appearance of Ghanaian

## Literaturverzeichnis

---

- cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *International Food Research Journal*, 2012, 19, 127–133
167. Oberparleiter, S. Untersuchungen zu Aromavorstufen und Aromabildung von Kakao. Dissertation. Ludwigs-Maximilians-Universität München, München, Deutschland, 1996
168. Ziegleder, G. Verfahrenstechnische Einflüsse auf Kakaoaroma I, II. *Zucker- und Süßwarenwirtschaft*, 1993, 46, 60–64, 131–133
169. Biehl, B. Proteinhydrolyse während der Kakaofermentation in Abhängigkeit von Wechselwirkungen mit Polyphenolen unter anaeroben und aeroben Bedingungen. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung*, 1966, 133, 145–158
170. Schlüter, A.; Hühn, T.; Kneubühl, M.; Chatelain, K.; Rohn, S.; Chetschik, I. Comparison of the aroma composition and sensory properties of dark chocolates made with moist incubated and fermented cocoa beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70, 4057–4065
171. Biehl, B.; Passern, U.; Passern, D. Subcellular structures in fermenting cocoa beans. Effect of aeration and temperature during seed and fragment incubation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1977, 28, 41–52
172. Ramos Da Conceicao Neta, E.; Johanningsmeier, S. D.; McFeeters, R.F. The chemistry and physiology of sour taste - A review. *Journal of Food Science*, 2007, 72, 33–38
173. García, L. C.; Hernández, A. N. M. Beneficial effects of cocoa and dark chocolate polyphenols on health. *The FASEB Journal*, 2020, 34, 1
174. Matissek, R.; Fischer, M.; Steiner, G. *Lebensmittelanalytik*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, Deutschland, 2018

### Anhang

- Anhang I:** Trockenschrankmethode zur Bestimmung der Trockensubstanz
- Anhang II:** Methode zur Bestimmung der primären Aminogruppen
- Anhang III:** Kalibriergerade zur Bestimmung der primären Aminogruppen
- Anhang IV:** Verwendete Chemikalien
- Anhang V:** Eidesstattliche Erklärung

# Anhang I: Trockenschränkmethod zur Bestimmung der Trockensubstanz von Kakaobohnen

Die Trockensubstanz wurde auf der Grundlage der Trockenschränkmethod nach Matissek et al. (2018) bestimmt).<sup>174</sup>

Wägeschale, ca. 10 g Seesand und Glasstab im Trockenschränk bei 120 °C über Nacht trocknen, im Exsikkator auf Raumtemperatur abkühlen und auswiegen. 5 g ( $\pm 0.01$  g) des frisch gemahlten Probenmaterials in der zuvor ausgewogenen Wägeschale mit Seesand und Glasstab einwiegen und 15 Minuten im Trockenschränk bei 103 °C ( $\pm 1$  °C) schmelzen lassen, dann vorsichtig mit dem Glasstab homogenisieren. Anschliessend 4 h im Trockenschränk trocknen, im Exsikkator auf Raumtemperatur abkühlen und auswiegen.

Die prozentuale Trockensubstanz (TS) berechnet sich wie folgt:

$$TS = \frac{m_2 - m_1}{E} * 100$$

$m_1$  = Masse Wägeschale mit Seesand und Glasstab [g]

$m_2$  = Masse Wägeschale mit Seesand und Glasstab und Probe nach der Trocknung [g]

E = Einwaage Probe

# Anhang II: Methode zur Bestimmung der primären Aminogruppen

Die primären Aminogruppen wurden auf Grundlage der von Church et al. (1983, 1985) beschriebenen Methode mit leichten Modifikationen bestimmt.<sup>148,149</sup> Das Prinzip der Messmethode beruht auf der photometrischen Messung bei 340 nm eines Reaktionsproduktes (Isoindolderivat) der primären Aminogruppe einer Aminosäure mit einer Thiolgruppe und o-Phtaldialdehyd (OPA).

### *Reagenz für den Blank:*

0.5 g ( $\pm$  0.01 g) Natriumtetraborat in 50 mL Messkolben mit ca. 20 mL dest. Wasser lösen. 0.5 g ( $\pm$  0.01 g) Natriumdodecylsulfat mit weiteren 20 mL dest. Wasser lösen quantitativ zur Natriumtetraboratlösung überführen. 100  $\mu$ L  $\beta$ -Mercaptoethanol zufügen und zur Marke auffüllen.

### *OPA-Reagenz:*

Die Herstellung erfolgt analog zur Herstellung des Reagenzes für den Blank. Vor dem Auffüllen zur Marke werden 40 mg o-Phtaldialdehyd in 1 mL Methanol gelöst hinzugefügt.

### *Extraktionslösung:*

Die Extraktionslösung (TFA) setzt sich aus 0.11 mol/L Trifluoressigsäure, 0.22 mol/L Natriumacetat und 0.33 mol/L Essigsäure zusammen (Murthy, et al., 1997).<sup>150</sup>

### *Messung und Erstellen der Kalibriergerade:*

Für die Kalibriergerade werden 0.180 g/L Glycin in einem Liter der Extraktionslösung gelöst und schrittweise auf 0.090 g/L, 0.045 g/L, 0.023 g/L verdünnt. Die Messung erfolgt im Photometer bei 340 nm Wellenlänge. 100  $\mu$ L der jeweiligen Kalibrierlösung werden mit 1 mL OPA in eine Messküvette pipettiert, gemischt und die maximale Absorption abgelesen. Die Messung der Proben erfolgt analog. Bei einem Absorptionswerten ausserhalb des kalibrierten Bereichs wird mit TFA verdünnt.

## Anhang

---

Mithilfe der linearen Regression wird in MS-Excel die Funktionsgleichung der allgemeinen Form

$$y = m \times x + b$$

erstellt. Dabei gilt:

- $y$  : Absorptionsmaximum
- $m$  : Steigung der Kalibriergerade
- $x$  : Konzentration an Glycin in der Lösung [g/L]
- $b$  : Schnittpunkt der Kalibriergerade mit y-Achse

Nach Umstellen der Gleichung kann die Konzentration an Glycinäquivalenten in der extrahierten Probe ( $x_p$ ) in g/L berechnet werden.

$$x_p = \frac{(y-b)}{m}$$

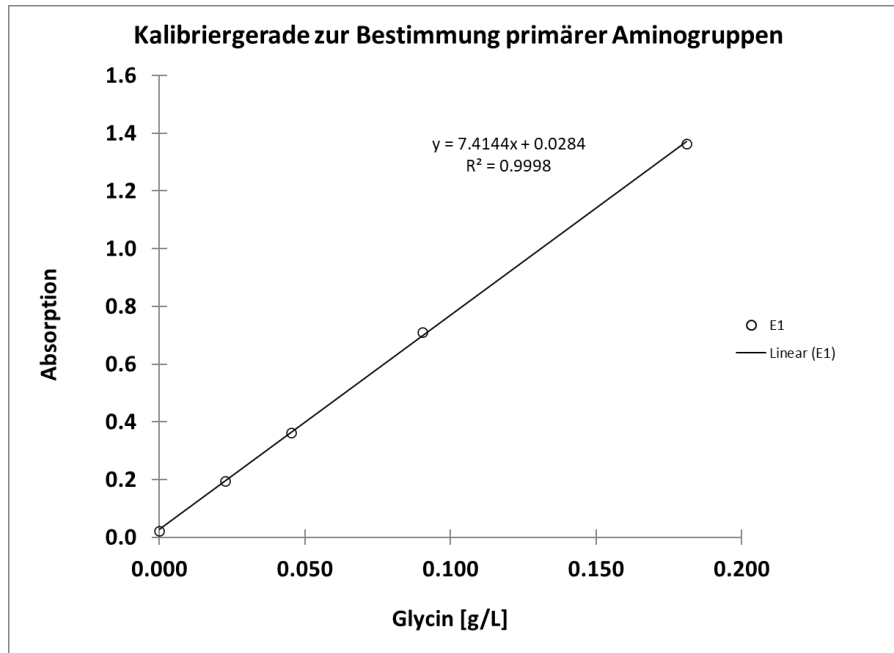
Die Umrechnung der Ergebnisse auf den Gehalt an primären Aminogruppen Probematerial erfolgt folgendermassen:

$$A = \frac{VF \times x_p \times V_{ex}}{E_p}$$

Dabei gilt:

- $A$ : Gehalt an primären Aminogruppen ausgedrückt als Glycin [kg/kg EW]
- $VF$ : Verdünnungsfaktor
- $x_p$ : Berechnete Konzentration in der gemessenen Probe [kg/L]
- $V_{ex}$ : Verwendete Menge Extraktionslösung [L]
- $E_p$ : Einwaage der Probe [kg]

## Anhang III: Kalibriergerade zur Bestimmung der primären Aminogruppen





## **Anhang IV: Verwendete Chemikalien**

<b>Name der Chemikalie</b>	<b>CAS-Nummer</b>	<b>H-Sätze</b>	<b>P-Sätze</b>	<b>Piktogramme/Signalwort</b>
Aceton	67-64-1	H225, H319, H336	P210, P305+P351+P338, P403+P233	GHS02, GHS07, Gefahr
Acetonitril	75-05-8	H225, H302, H312, H332, H319	P210, P280, P305+P351+P338, P403+P235	GHS02, GHS07, Gefahr
L-Alanine	56-41-7	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
4-Allyl-2-methoxyphenol	97-53-0	H317, H319	P261, P264, P272, P280, P302+352, P305 + P351 + P338	GHS07, Achtung
Ameisensäure	64-18-6	H226, H290, H302, H314, H331	P210, P280, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338 P310	GHS02, GHS05, GHS06, Gefahr
Ammoniumacetat	631-61-8	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
L-Arginine	74-79-3	H319	P280, P305+P351+P338	GHS07, Achtung
L-Asparagine	5794-13-8	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
L-Asparaginsäure	56-84-8	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Buttersäure	107-92-6	H302, H314	P270, P280, P302+P352, P305+P351+P338, P310	GHS05, GHS07, Gefahr
(+)-Catechin	154-23-4	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Cinnamtannin A2	86631-38-1	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		

**Tabelle wird fortgesetzt**

Name der Chemikalie	CAS-Nummer	H-Sätze	P-Sätze	Piktogramme/Signalwort
Coffein	58-08-2	H302	P270	GHS07, Achtung
(E,E)-2,4-decadienal	25152-84-5	H312, H315, H319	P280, P264, P302+P352, P317, P321, P362+P364, P332+P317, P305+P351+P338	GHS07, Achtung
Dichlormethan	75-09-2	H315, H319, H336, H351	P261, P280, P302+P352, P305+P351+P338, P308+P313	GHS07, GHS08, Achtung
Diethylether	60-29-7	H224, H302, H336	P210, P243, P261, P303+P361+P353, P304+P340, P312	GHS02, GHS07, Gefahr
2,3-Diethyl-5-methylpyrazin	18138-04-0	H302 + H312 + H332	P261, P264, P280, P301 + P312, P302 + P352 + P312, P304 + P340 + P312	GHS07, Achtung
dimethylsulfoxide	67-68-5	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Dimethyltrisulfid	3658-80-8	H226, H302, H315, H319, H335	P210, P233, P240, P301 + P312, P303 + P361 + P353, P305 + P351 + P338	GHS02, GHS07, Achtung
Enzymkit (r-biopharm E8140)		Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Enzymkit (r-biopharm E8140)		Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Enzymkit (r-biopharm E8180)		H360D, H315, H319	P280, P305+P351+P338, P321, P308+P313	GHS07, GHS08, Gefahr
(-)-Epicatechin	490-46-0	H315, H319, H335	P261, P302+P352, P305+P351+P338	GHS07, Achtung

**Tabelle wird fortgesetzt**

<b>Name der Chemikalie</b>	<b>CAS-Nummer</b>	<b>H-Sätze</b>	<b>P-Sätze</b>	<b>Piktogramme/Signalwort</b>
Essigsäure	64-19-7	H226, H314	P210, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P310	GHS02, GHS05, Gefahr
Ethanol	64-17-5	H225, H319	P210, P233, P241, P243, P303+P361+P353, P337+P313, P403+P235	GHS02, GHS07, Gefahr
2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin	13925-07-0	H302	P264, P270, P301+P317, P330, P501	GHS07, Achtung
Ethyl-2-methylbutanoat	7452-79-1	H226	P210	GHS02, Achtung
Ethyl-3-methylbutanoat	108-64-5	H227	P210	GHS02, Achtung
Ethyl-4-methylpentanoat	25415-67-2	H226		GHS02, Achtung
Ethyl-2-methylpropanoat	97-62-1	H225	P210, P233, P240, P241, P242, P243	GHS02, Gefahr
2-Ethyl-5-methylpyrazin	13360-64-0	H226, H302	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P280, P264, P270, P303+P361+P353, P301+P317, P330, P403+P235, P501	GHS02, GHS07, Achtung
Ethyl-3-phenylprop-2-enoate	103-36-6	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Ethyl-3-phenylpropionate	2021-28-5	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2009		

**Tabelle wird fortgesetzt**

Name der Chemikalie	CAS-Nummer	H-Sätze	P-Sätze	Piktogramme/Signalwort
3-Ethylphenol	620-17-7	H315, H318, H335, H302 + H312 + H332	P261, P280, P301 + P312, P302 + P352 + P312, P304 + P340 + P312, P305 + P351 + P338	GHS05, GHS07, Gefahr
Ethyl-2-phenylacetate	101-97-3	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Folin and Ciocalteu reagent (2 N)		H290, H302, H314	P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P310	GHS05, GHS07, Gefahr
L-Glutamin	56-85-9	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
L-Glutaminsäure	56-86-0	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
L-Glycin	56-40-6	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
2-Heptanol	543-49-7	H226, H312, H319	P210, P233, P240, P280, P303 + P361 + P353, P305 + P351 + P338	GHS02, GHS07, Achtung
2-Heptylacetat	112-06-1	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
n-Hexan	110-54-3	H225, H304, H315, H336, H361, H373, H411	P202, P280, P303+P361+P353, P304+P340, P308+P313	GHS02, GHS07, GHS08, GHS09
L-Histidin,	71-00-1	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		

**Tabelle wird fortgesetzt**

<b>Name der Chemikalie</b>	<b>CAS-Nummer</b>	<b>H-Sätze</b>	<b>P-Sätze</b>	<b>Piktogramme/Signalwort</b>
3-Hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5H)-on	28664-35-9	H302	P264, P27, P301+P312, P330, P501	GHS07, Achtung
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	3658-77-3	H302, H314, H317	P260, P270, P280, P301 + P312, P303 + P361 + P353, P305 + P351 + P338	GHS07, Achtung
2-Isobutyl-3-methoxypyrazin	24683-00-9	H315, H319, H335	P261, P264, P271, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338	GHS07, Achtung
L-Isoleucin	73-32-5	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
2-Isopropyl-3-methoxypyrazin	25773-40-4	H302	P264, P270, P301+P317, P330, P501	GHS07, Achtung
Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat	14459-95-1	H412	P273	
L-Leucin	61-90-5	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Linalool	78-70-6	H315, H317, H319	P261, P264, P272, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338	GHS07, Achtung
L-Lysin	39665-12-8	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
β-Mercaptoethanol	60-24-2	H301+H331, H310, H315, H317, H318, H373, H410	P273, P280, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P310	GHS05, GHS06, GHS08, GHS09, Gefahr
Methanol	67-56-1	H225, H301+H311+H331, H370	P210, P270, P280, P303+P361+P353, P304+P340, P308+P311	GHS02, GHS06, GHS08

**Tabelle wird fortgesetzt**

<b>Name der Chemikalie</b>	<b>CAS-Nummer</b>	<b>H-Sätze</b>	<b>P-Sätze</b>	<b>Piktogramme/Signalwort</b>
L-Methionin	63-68-3	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
2-Methoxyphenol	90-05-1	H302, H315, H319	P264, P270, P280, P301 + P312, P302 + P352, P305 + P351 + P338	GHS07, Achtung
2-Methylbutanal	96-17-3	H225, H401, H411	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P273, P280, P303+P361+P353, P370+P378, P391, P403+P235, P501	GHS02, GHS07, Gefahr
3-Methylbutanal	590-86-3	H225, H317, H319	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P261, P264+P265, P271, P272, P273, P280, P302+P352, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P319, P321, P333+P313, P337+P317, P362+P364, P370+P378, P391, P403+P233, P403+P235, P405, P501	GHS02, GHS07, GHS09, Gefahr
3-Methyl-1-butanol	123-51-3	H226, H332, H335	P210, P280, P303+P361+P353, P304+P340, P312, P403+P235	GHS02, GHS07, Achtung
2-Methylbuttersäure	116-53-0	H290, H302 + H312, H314	P234, P270, P280, P301 + P312, P303 + P361 + P353, P305 + P351 + P338	GHS02, GHS05, Gefahr

**Tabelle wird fortgesetzt**

Name der Chemikalie	CAS-Nummer	H-Sätze	P-Sätze	Piktogramme/Signalwort
3-Methylbuttersäure	503-74-2	H314	P280, P301 + P330 + P331, P303 + P361 + P353, P304 + P340 + P310, P305 + P351 + P338, P363	GHS05, Gefahr
3-Methylindol	83-34-1	H411	P273, P391, P501	GHS05
2-Methyl-3(methyldithio)furan	65505-17-1	H301	P270, P264, P301+P310+P330, P405, P501	GHS06
Methyl-3-phenylprop-2-enoate	103-26-4	H303, H317	P261, P272, P280, P302 + P352, P312, P333 + P313, P362 + P364	GHS07, Achtung
Methylpropansäure	79-31-2	H226, H302, H311, H314	P210, P233, P280, P301 + P312, P303 + P361 + P353, P305 + P351 + P338	GHS02, GHS05, GHS06, Gefahr
L-(+)-Milchsäure	79-33-4	H314	P280, P302+P352, P305+P351+P338, P310	GHS05
Natriumacetat	127-09-3	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Natriumcarbonat	497-19-8	H319	P305+P351+P338, P337+P313	GHS07
Natriumdodecylsulfat	151-21-3	H228, H302 + H332, H315, H318, H335, H412	P210, P273, P280, P301 + P312, P304 + P340 + P312, P305 + P351 + P338	GHS02, GHS05, GHS07, Gefahr
Natriumsulfat	7757-82-6	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Natriumtetraborat (Borax)	1330-43-4	H 319, H360	P201, P261, P280, P305+P351+P338, P308+P313	GHS07, GHS08, Gefahr

**Tabelle wird fortgesetzt**



Name der Chemikalie	CAS-Nummer	H-Sätze	P-Sätze	Piktogramme/Signalwort
(E,E)-2,4-Nonadienal	5910-87-2	H227	P210, P280, P370+P378, P403+P235, P501	GHS02, Achtung
(E,Z)-2,6-Nonadienal	557-48-2	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
1-Octen-3-on	4312-99-6	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
OPA reagent	643-79-8	H290, H302, H314, H317, H360, H411	P202, P273, P280, P303 + P361 + P353, P304 + P340 + P310, P305 + P351 + P338	GHS05, GHS07, GHS08, GHS09, Gefahr
Phenylacetaldehyd	122-78-1	H302, H314, H317, H412	P261, P273, P280, P301 + P312, P303 + P361 + P353, P305 + P351 + P338	GHS05, GHS07, Gefahr
L-Phenylalanin	63-91-2	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Phenylelessigsäure	103-82-2	H319	P305 + P351 + P338	GHS07, Achtung
2-Phenylethanol	60-12-8	H302, H319	P270, P280, P305+P351+P338, P337+P313	GHS07, Achtung
2-Phenylethylacetat	93-92-5	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Procyanidin B2	29106-49-8	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Procyanidin C1	37064-30-5	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Salzsäure	7647-01-0	H314	P280, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338	GHS05, GHS07, Gefahr

**Tabelle wird fortgesetzt**

<b>Name der Chemikalie</b>	<b>CAS-Nummer</b>	<b>H-Sätze</b>	<b>P-Sätze</b>	<b>Piktogramme/Signalwort</b>
Schwefelsäure	7664-93-9	H290, H314	P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P310	GHS05, Gefahr
L-Serin	56-45-1	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Theobromine	83-67-0	H302	P270	GHS07, Achtung
Trans-4,5-epoxy-(E)-2-decenal	134454-31-2	H225, H319, H336	P210, P370 + P378	GHS02, GHS07, Gefahr
Trifluoressigsäure	76-05-1	H290, H314, H332, H412	P260, P280, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P312	GHS05, GHS07, Gefahr
Trimethylpyrazin	14667-55-1	H226, H302, H315, H319, H335	P210, P301 + P312 + P330, P302 + P352, P305 + P351 + P338	GHS02, GHS07, Achtung
L-Tryptophan	73-22-3	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
L-Tyrosin	60-18-4	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
L-Valin	72-18-4	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäss der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Zincacetat Dihydrat	5970-45-6	H302, H318, H411	P273, P280, P301+P312, P305+P351+P338	GHS05, GHS07, GHS09, Gefahr

## Anhang V: Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Bern, den 21. Mai

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. Schlüter', written over a horizontal line.

Johannes Ansgar Schlüter