

**Zusammensetzung und histologische Verteilung
der phenolischen Substanzen
in Samen von Massen- und Edelkakao-Varietäten
(*Theobroma cacao* L.)**

**Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
- Dr. rer. nat. –**

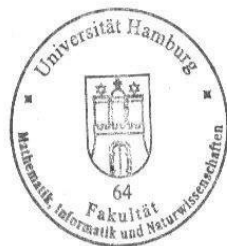
**des Departments Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg**

**vorgelegt von
Silke Elwers
aus Hamburg**

Hamburg, 2008

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herr Professor Dr. R. LIEBEREI
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. D. SELMAR
Tag der Disputation: 18. April 2008

Hamburg, den 04. April 2008



J. Ganzhorn
Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Meinem Mann Carsten
und unserer Tochter Lina, die zusammen mit dieser Arbeit gewachsen ist.

„Wir haben die Strapazen nur überlebt, weil wir genug Schokolade dabei hatten.“

Roald Engebret Gravning Amundsen (1872-1928)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Hintergrund	4
2.1	Phenolische Substanzen: Definition, Biosynthese und Literaturdaten zu ihren Vorkommen in Kakaosamen.....	4
2.1.1	Phenolische Substanzen, die über den Acetat/Malonat-Weg gebildet werden können	5
2.1.1.1	Phloroglucin.....	6
2.1.1.2	Benzoensäuren	6
2.1.1.3	Phenyllessigsäuren	7
2.1.2	Phenolische Substanzen, denen der Shikimisäure-Weg zugrunde liegt	8
2.1.2.1	Hydroxyzimtsäuren.....	10
2.1.2.2	Chlorogensäure, Neochlorogensäure	11
2.1.2.3	Phlorentinsäure	11
2.1.2.4	Aesculetin	12
2.1.2.5	Die Hydroxyzimtsäureamide (Hydroxycinnamic acid amides, HCAA).....	12
2.1.3	Die Gruppe der Flavonoide.....	16
2.1.3.1	Die Proanthocyanidine (Kondensierte Tannine).....	20
2.1.4	Literaturangaben zu den mono-, oligo- und polymeren Flavonoiden in Samen von <i>T. cacao</i> L.....	22
2.1.4.1	Die monomeren Flavan-3-ole (Catechine) in Kakaosamen.....	22
2.1.4.2	Die Anthocyane in Kakaosamen.....	23
2.1.4.3	Die Flavonole in Kakaosamen	24
2.1.4.4	Weitere Monomere aus der Gruppe der Flavonoide in Kakaosamen....	25
2.1.4.5	Die Proanthocyanidine in Kakaosamen	27
2.1.5	Die biologische Funktion der Flavonoide in Kakaosamen	28
2.1.6	Die Bedeutung der Kakao-Flavonoide aus verarbeitungstechnischer und ernährungswissenschaftlicher Sicht	29
2.2	Die Biologie, Variabilität und Verbreitung von <i>T. cacao</i> L.	32
2.2.1	Die biologischen Merkmale des Kakaobaums.....	32
2.2.1.1	Die Embryogenese von <i>T. cacao</i> L.....	33
2.2.1.2	Der Aufbau des reifen Kakaosamens.....	34
2.2.2	Die Variabilität von <i>T. cacao</i> L.	37
2.2.3	Die Klassifizierung und Verbreitung von <i>T. cacao</i> L.....	41
2.2.3.1	Der Criollo-Typ	42
2.2.3.2	Die Gruppe der Forasteros	44
2.2.3.3	Der Trinitario-Typ	46
2.2.3.4	„Moderne“ Kakaosorten	47

2.2.4	Die Klassifizierung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Kakaoproben	48
2.2.4.1	Proben der Lower Amazon Forasteros (LAF)	51
2.2.4.2	Beprobte Genotypen der Upper Amazon Forasteros (UAF)	52
2.2.4.3	Beprobte Klone des UAF-Typs „Nacional“	53
2.2.4.4	Beprobte Varietäten der Criollos	54
2.2.4.5	Untersuchte Trinitario-Varietäten	56
2.3	Die Auswirkung von Standortfaktoren auf den Polyphenolgehalt	58
2.4	Die Herkunft der untersuchten Proben.....	61
2.4.1	Ecuador	61
2.4.2	Venezuela.....	63
2.4.2.1	Versuchsfeld bei der Ortschaft Zea.....	64
2.4.2.2	Versuchsstationen San Juan de Lagunillas und Chama.....	65
2.4.3	Ghana	68
2.4.4	Malaysia.....	70
2.4.5	Reading bei London, Großbritannien	72
2.4.6	Trinidad.....	74
2.5	Die Verarbeitung frischer Kakaosamen zu Rohkakao mittels Fermentation und Trocknung	79
2.5.1	Biochemische Prozesse während der Fermentation und der Trocknung sowie deren Auswirkung auf die phenolischen Inhaltsstoffe.....	81
3	Material und Methoden.....	84
3.1	Die untersuchten Kakaoproben	84
3.1.1	Reife Samen definierter Klone und Anbauggebiete	84
3.1.2	Definierte Reifestadien	87
3.1.3	Fermentiertes Material	87
3.2	Erfassung der Standortfaktoren.....	88
3.3	Dokumentation und Konservierung der frischen Kakaoproben.....	88
3.4	Fermentation der untersuchten Criollo-Proben.....	89
3.5	Chemikalien	89
3.6	Entfettung der Kakaoproben für die chemische Analytik.....	89
3.7	Gewinnung eines Rohextrakts der phenolischen Inhaltsstoffe	90
3.8	Die quantitative Analyse der phenolischen Inhaltsstoffe.....	90
3.9	Die phenolischen Standardsubstanzen für die qualitative Analytik.....	90
3.10	Die Aufreinigung der Polyphenole für die RP-HPLC-Analytik.....	92
3.10.1	Extraktion der phenolischen Substanzen mit Ethylacetat.....	92
3.10.2	Aufreinigen der Anthocyane mit SEP-PAK Vac 6cc	92
3.10.3	Optimierte Extraktion und Aufreinigung aller phenolischen Inhaltsstoffe („methanolische Mikroextraktion“)	93
3.11	HPLC-PDA-Analytik.....	93

3.12 Saure Hydrolyse	94
3.13 Identifizierung und Quantifizierung des Hydroxyzimtsäureamids (+)-N-(E)-Caffeoyl-L-aspartat	94
3.14 Lichtmikroskopische Analytik des reifen und reifenden Keimblattgewebes von Kakaosamen	96
3.14.1 Die Auswahl des Kakaomaterials	96
3.14.2 Einbettung von Keimblattgewebe in LR White Medium Grade™	97
3.14.3 Erstellen von Semidünnschnitten.....	97
3.14.4 Färbung und Eindeckung der Schnittpräparate.....	98
3.14.5 Lichtmikroskopische Analyse der Semidünnschnitte.....	98
3.14.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse	99
4 Ergebnisse	100
4.1 Ergebnisse aus der Analyse des Gesamt-Polyphenolgehaltes reifer, unfermentierter Kakaosamen	100
4.2 Ergebnisse der RP-HPLC-Analytik reifer, unfermentierter Kakaosamen	101
4.2.1 Die Charakterisierung und Auftrennung der phenolischen Standards.....	101
4.2.2 Die Identifizierung der phenolischen Einzelsubstanzen unfermentierter, reifer Kakaoproben.....	103
4.2.2.1 Zusammenfassung der qualitativen Polyphenol-Analytik reifer, unfermentierter Kakaosamen per RP-HPLC-PDA	107
4.2.3 Die quantitative Auswertung der phenolischen Inhaltsstoffe	107
4.2.3.3 Der Gehalt an (-)-Epicatechin	108
4.2.3.4 Die Auswertung der Peakflächen des mutmaßlichen Procyanidins „C“	110
4.2.3.5 Ergebnisse aus der quantitativen Bestimmung der Anthocyane.....	112
4.2.3.6 Der Gehalt an (+)-Catechin.....	117
4.2.3.7 Der Gehalt an Protocatechusäure	117
4.2.4 Analyse der HCAA in frischen, reifen Kakaoproben	118
4.2.4.1 Untersuchung von Extrakten frischer Kakaosamen auf Clovamid.....	118
4.2.4.2 Die Identifizierung der Fraktion „A“	118
4.2.4.3 Die statistische Auswertung der Gehalte an Kaffeesäure-aspartat	121
4.3 Die Degradation der Polyphenole durch saure Hydrolyse mit 0,1 mol/l bzw. 1 mol/l HCl	124
4.4 Ergebnisse aus der Analyse der Reifestadien.....	126
4.5 Qualitative und quantitative Analyse der phenolischen Inhaltsstoffe von Criollo-Kakaosamen unterschiedlicher Fermentationsstadien.....	130
4.5.1 Vorbemerkung zu den untersuchten Proben	130
4.5.2 Die Auswertung der Einzelproben.....	131

4.5.3	Die Veränderung der durchschnittlichen Polyphenolgehalte im Verlauf der Fermentation und der anschließenden Trocknung.....	133
4.6	Histologische und cytologische Aspekte der Speicherung von Polyphenolen in Keimblättern von <i>T. cacao</i> L.	137
4.6.1	Vorbemerkungen zur Qualität der untersuchten Präparate.....	137
4.6.2	Ergebnisse aus der mikroskopischen Analyse der Reifestadien.....	138
4.6.3	Die cytologischen Merkmale des reifen Keimblattparenchyms von <i>T. cacao</i> L.....	144
4.6.3.1	Die typspezifischen Flächen der Polyphenol- und Speicherzellen.....	145
4.6.4	Der histologische Aufbau des reifen Keimblattgewebes von <i>T. cacao</i> L.....	150
4.6.4.1	Die Struktur der Leitbündelelemente.....	154
4.6.4.2	Epidermis und Trichome.....	154
5	Diskussion.....	157
5.1	Zur biochemischen Untersuchung der phenolischen Inhaltsstoffe reifer, unfermentierter Kakaosamen	157
5.1.1	Die qualitative Analytik einfacher phenolischer Verbindungen.....	157
5.1.1.1	Protocatechusäure und Phloroglucinol als mutmaßliche Abbauprodukte von (+)-Catechin	158
5.1.1.2	Aesculetin als mögliches Artefakt von Kaffeesäure-Derivaten.....	159
5.1.1.3	Weitere mögliche Artefakte aus der Gruppe der Phenolsäuren und Phenyllessigsäuren	159
5.1.1.4	Zum Vorkommen freier und mit Chinasäure veresterter Hydroxyzimtsäuren in Extrakten frischer Kakaosamen	160
5.1.2	Zur qualitativen Analytik der Flavonoide.....	161
5.1.2.1	Zur Gruppe der Flavan-3-ole	161
5.1.2.2	Zur Substanz Quercetin und ihrer Glycoside.....	161
5.1.2.3	Zur Gruppe der Anthocyane	162
5.1.3	Zusammenfassung der qualitativen Analytik phenolischer Monomere in reifen, unfermentierten Kakaosamen.....	162
5.1.4	Zur quantitativen Analyse der Flavonoide.....	164
5.1.5	Zur Qualität und Quantität von HCAA in Kakaosamen.....	166
5.1.5.1	Die genetische und standortspezifische Variabilität des Gehaltes an Kaffeesäure-aspartat.....	167
5.1.5.2	Zusammenfassung und Ausblick der HCAA-Analytik von Kakaosamen	169
5.2.	Zur Degradation der Kakao-Polyphenole während der sauren Hydrolyse	171
5.2.1	Die Veränderungen im Gehalt der monomeren Flavan-3-ole.....	171
5.2.2	Begründung der schnellen Degradierung der Substanz „C“ mit deren möglicher struktureller Identität.....	172

5.2.3	Protocatechusäure als mögliches Artefakt des Catechinabbaus	173
5.2.4	Zum Abbau von Kaffeesäure-aspartat durch saure Hydrolyse	173
5.2.5	In früheren Arbeiten beschriebene, weitere phenolische Substanzen entstehen nicht durch saure Hydrolyse.....	174
5.3	Biochemische Charakteristika der Reifestadien von Kakaosamen.....	174
5.4	Zur Veränderung der Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe im Verlauf der Fermentation von Criollo-Samen.....	176
5.4.1	Unterschiede im Polyphenolgehalt zwischen Samen derselben Charge und desselben Fermentationsstadiums	176
5.4.2	Zum Abbau von (-)-Epicatechin während der Fermentation.....	176
5.4.3	Zum Abbau von (+)-Catechin während der Fermentation.....	178
5.4.4	Zum Abbau von Kaffeesäure-aspartat während der Fermentation	179
5.5	Zur Histologie und Histogenese des Keimblattgewebes.....	181
5.5.1	Die Cytologie des reifenden Keimblattgewebes und seine Bedeutung für die Bestimmung des Zeitpunktes der Reife	181
5.5.2	Deutung der kontrastlosen Flächen in den Vakuolen der PZ im Keimblattgewebe von <i>T. cacao</i> L.....	183
5.5.3	Cytologische Besonderheiten der SZ in peripheren und LBE-nahen Bereichen des Keimblattgewebes.....	185
5.5.4	Mögliche Ursachen und Konsequenzen der größeren Keimblatt- Parenchymzellen des Criollo-Typs	185
5.5.5	Zur möglichen Histogenese der strukturellen Anordnung von SZ und PZ im Keimblattgewebe	187
5.5.6	Zur Verteilung der Polyphenolzellen im Keimblattgewebe	189
5.5.7	Zum Vorkommen phenolischer Inhaltsstoffe und ihrer oxidierenden Enzyme in der Epidermis und in ihren Trichomen	189
5.5.8	Biologische Funktion der phenolischen Inhaltsstoffe im Bereich der Leitbündelelemente des Kakao-Keimblattgewebes	192
5.5.9	Weiterführende Untersuchungen zur Lokalisation von Substanzen aus der Gruppe der HCAA in Kakaosamen	193
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	194
7	Verzeichnisse.....	198
7.1	Abkürzungsverzeichnis	198
7.2	Abbildungsverzeichnis	202
7.3	Tabellenverzeichnis.....	205
7.4	Literaturverzeichnis.....	206
8	Danksagung	230
9	Anhang	232

1 Einleitung

Kakao und Schokolade sind äußerst beliebte Konsumprodukte. Ihre Herstellung basiert auf Rohkakao, den fermentierten und anschließend getrockneten Samen des Kakaobaums *Theobroma cacao* L.. Ursprünglich aus dem Amazonasgebiet Südamerikas stammend, wird Kakao mittlerweile im gesamten Tropengürtel der Erde kultiviert.

Die Samen des Kakaobaums zeichnen sich durch ihren hohen Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen aus, welche etwa 12-18 % der entfetteten Trockenmasse (im Folgenden abgekürzt mit ff TM) ausmachen (Kim und Keeney 1984).

Die meisten phenolischen Inhaltsstoffe des Kakaosamens werden im Speicherkeimblattgewebe gelagert. Hier finden sich in einem Anteil von etwa 10 % - 20 % die Polyphenolzellen (Jaenicke 1973, Ziegler und Biehl 1988, Müller 1998). Diese Idioblasten werden fast vollständig von einer großen Vakuole ausgefüllt, deren Inhalt neben Purinalkaloiden (ca. 14 %) zu ca. 66,5 % aus phenolischen Substanzen besteht (Forsyth und Quesnel 1963).

Die genannten cytologischen und histologischen Details der Speicherung phenolischer Inhaltsstoffe wurden bisher nur allgemein für Kakaosamen dokumentiert. Mögliche Unterschiede zwischen einzelnen Kakaovarietäten, die sich auf deren Rohkakao-Qualität (s. u.) auswirken könnten, wurden in bisherigen Veröffentlichungen nicht thematisiert.

Nur Produkte aus geröstetem Rohkakao, den fermentierten und getrockneten Samen des Kakaobaums, besitzen das unverwechselbare Kakaoflavour, welches den Gesamteindruck von Kakaogeruch und -geschmack umfasst (Forsyth und Quesnel 1963). Das spezifische Flavour eines Rohkakaos entscheidet maßgeblich über dessen qualitative Einstufung als Edelkakao mit besonders aromatischem, außergewöhnlichem Flavour oder als Massenkakao ohne spezifisch hervorgehobene Flavour-Note.

Die Bitterkeit und Adstringens von Rohkakao lässt sich in erster Linie auf dessen phenolische Inhaltsstoffe zurückführen und beeinflusst die geschmackliche Wahrnehmung des Kakaoflavors. So korrelieren Clapperton *et al.* 1994b einzelne Flavour-Aspekte mit dem Gehalt an (-)-Epicatechin der verkosteten Proben. Einige Autoren zählen die Reaktionsprodukte der phenolischen Substanzen darüber hinaus zu den wichtigsten Komponenten des Kakaoflavors (Rohan and Conell 1964). Aufgrund der komplexen Zusammensetzung des Kakaoflavors aus zahlreichen, teils flüchtigen Einzelsubstanzen (Bugan 2007, Stark *et al.* 2006a) wird dies allerdings kontrovers diskutiert.

Phenolische Kakao-Inhaltsstoffe sind auch verantwortlich für den Branton des Rohkakaos, der die Färbung des Endprodukts Schokolade prägt. Er geht auf komplexe Kondensationsprodukte zwischen Polyphenolen und Proteinen zurück, welche sich im Verlauf der Fermentation und der Trocknung bilden (siehe 2.5). Zusätzlich wird die Färbung des Rohkakaos auch von der Ausgangsfarbe des Keimblattgewebes beeinflusst.

Diese variiert in Abhängigkeit vom Anthocyanengehalt von tiefviolett bis gelblich-weiß. So genannte „hell brechende“ Rohkakaosamen gehen auf anthocyanfreie Kakaosorten zurück.

Im Zeitalter des „Functional Food“ ist das antioxidative Potential phenolischer Inhaltsstoffe in den Fokus gerückt. Dieses basiert vor allem auf der *o*-Diphenolstruktur. In den letzten Jahren wurde eine große Zahl wissenschaftlicher Studien veröffentlicht, welche die präventivmedizinische Wirkung der Kakao-Polyphenole u. a. gegen Infarkt, Krebsentstehung, Arteriosklerose und entzündliche Prozesse im menschlichen Körper thematisierten (siehe 2.1.6). Gleichzeitig wurden Schokoladenprodukte mit gesteigerter antioxidativer Wirkung auf den Markt gebracht (z. B. „CocoaVia“-Produkte von Mars Inc. im Jahr 2004 und bereits 1998 „Polyphenol 3000“ von Meiji Seika Kaisha).

Zu den wichtigsten Qualitätsmerkmalen von Rohkakao sind demnach die darin enthaltenen Polyphenole und ihre Reaktionsprodukte zu zählen– sei es aufgrund geschmacklicher, farblicher oder gesundheitsbezogener Auswahlkriterien.

Die Vorstufen des Kakaoflavours bilden sich in den Kakaosamen erst im Verlauf ihrer Fermentation und der anschließenden Trocknung. Gleichzeitig können dabei bis zu 95 % der einzelnen phenolischen Komponenten verloren gehen, teils durch Oxidation und Komplexbildung, teils durch Auswaschung aus den Keimblättern (Kim und Keeney 1984, Kealey *et al.* 1998, Rohsius 2007). Dadurch kommt es einerseits zu einem Rückgang von Bitterkeit und Adstringens, welche sich im Übermaß negativ auf das gewünschte Flavour auswirken können (Clapperton *et al.* 1994b), andererseits nimmt jedoch auch das vorteilhafte, antioxidative Potential des Kakao ab. genotypspezifische Unterschiede bezüglich der für die Rohkakao-Qualität so entscheidenden Veränderungen der phenolischen Inhaltsstoffe während der Fermentation und der Trocknung wurden bisher noch kaum untersucht.

Neben der Prozessierung der Kakaosamen nach der Ernte prägt auch die Beschaffenheit des unfermentierten Ausgangsmaterials die Qualität des daraus herstellbaren Rohkakaos. So beschreiben Figueira *et al.* 1997 sowie Clapperton 1992 und Clapperton *et al.* 1994a und b einen Einfluss des Kakao-Genotyps auf das Kakao-Flavour, wohingegen der geographischen Herkunft höchstens eine untergeordnete Bedeutung beigemessen wird (Figueira *et al.* 1997). Auch der Reifegrad der verwendeten Kakaosamen spielt gemäß Hoskin und Dimick 1994 eine wichtige Rolle für sein Aromapotential. Die gleichen Autoren erwähnen auch einen möglichen Einfluss der Anbaumethodik, den sie jedoch als eher gering einstufen– mit der zweifelhaften Begründung, dass dieser Aspekt bisher noch kaum erforscht wurde.

Insgesamt gibt es nur sehr wenige Publikationen, die sich mit der Variabilität der qualitätsrelevanten Eigenschaften frischer Kakaosamen befassen. So wurde bisher noch

kaum untersucht, durch welche Faktoren die erheblichen Unterschiede im Gehalt phenolischer Inhaltsstoffe unfermentierter Kakaosamen verursacht werden. Zudem ist auch die Dokumentation des Abbaus phenolischer Inhaltsstoffe des Kakaosamens während der Fermentation und der Trocknung bisher lückenhaft. Frühere Studien zu diesem Thema befassen sich hauptsächlich mit der Gruppe der Procyanidine (siehe 2.1.4.5). Soweit der Autorin bekannt ist, wurde außerdem noch nie der fermentations- und trocknungsbedingte Abbau phenolischer Inhaltsstoffe von Proben des Edel-Kakaotyps „Criollo“ untersucht, dessen Rohkakao sich u. a. aufgrund seiner geringen Bitterkeit und Adstringens von den meisten anderen Kakaosorten erheblich unterscheidet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe biochemischer und lichtmikroskopischer Analyseverfahren eine große Bandbreite verschiedener Kakaovarietäten unterschiedlicher geographischer Herkunft auf ihren spezifischen Gehalt und die Verteilung vornehmlich der monomeren phenolischen Inhaltsstoffe untersucht. Ein Schwerpunkt lag hierbei auf der Untersuchung reifer, unfermentierter Samen; zusätzlich erfolgten Studien an reifenden Samen und die Analyse von Fermentationsstadien verschiedener Varietäten des Criollo-Typs.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Kenntnis über die intraspezifische Variabilität der phenolischen Inhaltsstoffe in Kakaosamen zu erweitern und dabei neue, bisher unbeachtete Aspekte und Einflussfaktoren zu erschließen. Letztere könnten auch bei der Gradierung eines Rohkakaos als Massen- oder Edelkakao von Bedeutung sein.

2 Hintergrund

2.1 Phenolische Substanzen: Definition, Biosynthese und Literaturdaten zu ihren Vorkommen in Kakaosamen

“The superiority of chocolate, both for health and nourishment, will soon give it the same preference over tea and coffee in America which it has in Spain.”

Thomas Jefferson (1743-1826)

Phenolische Substanzen bilden eine der größten und vielfältigsten Gruppen von Sekundärstoffen im Pflanzenreich. Letztlich zählen dazu alle Verbindungen, die mindestens eine Hydroxylgruppe besitzen, welche an ein aromatisches Kohlenstoff-Ringsystem gebunden ist (Waterman und Mole 1994).

Unterschiedlich definiert wird der häufig benutzte Terminus „Polyphenole“. Haslam 1998 verwendet diesen Begriff ausschließlich für pflanzliche Tannine, d. h. für komplexere phenolische Substanzen mit einer relativen Molmasse von mindestens 500. Damit gehörten nur oligo- und polymere phenolische Verbindungen zu den Polyphenolen. Da dies jedoch nicht dem gängigen Gebrauch dieses Begriffes entspricht, wird in der vorliegenden Arbeit der Ausdruck „Polyphenole“ auf Grundlage der Definition von Waterman und Mole 1994 verwendet. Demnach handelt es sich dabei um Substanzen mit mehr als einer Hydroxylgruppe an einem aromatischen Ringsystem (Abb. 1). Häufig finden sich mehrere aromatische Ringsysteme in einem Molekül, wie etwa in der weitaus größten Gruppe innerhalb der pflanzlichen Polyphenole, den Flavonoiden (siehe 2.1.3).

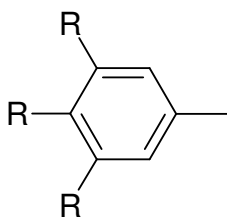


Abb. 1: Grundsätzliches Merkmal der Polyphenole: mindestens 2 OH-Gruppen an einem Aromaten (R: ≥ 2 OH-Gruppen)

Die überwiegende Mehrheit aller phenolischen Substanzen basiert auf einem oder mehreren der folgenden Bausteine:

- Erythrose-4-phosphat (Abb. 2 a), ein Metabolit aus dem Kohlenhydratstoffwechsel;
- Phosphoenolpyruvat (Abb. 2 b), ein energiereiches Stoffwechselzwischenprodukt der Glycolyse;
- Acetyl-Coenzym A (Abb. 2 c), ein „aktivierter“ Essigsäurerest;

- alternativ zu letzterem Malonyl-CoA (Abb. 2 d), das durch Carboxylierung aus Acetyl-CoA entsteht und auch ein wichtiges Zwischenprodukt des Fettsäure-Stoffwechsels darstellt.

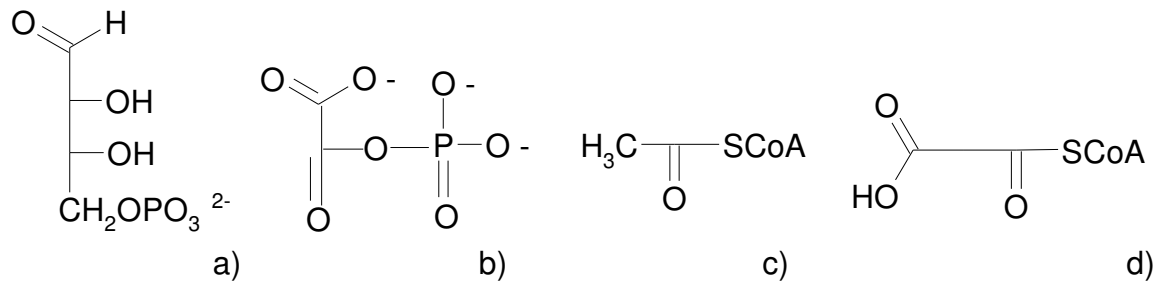


Abb. 2: Die Grundbausteine der phenolischen Inhaltsstoffe
 a) Erythrose-4 -Phosphat; b) Phosphoenolpyruvat; c) Acetyl-CoA; d) Malonyl-CoA

Im Folgenden werden Gruppen phenolischer Verbindungen sowie phenolische Einzelsubstanzen vorgestellt, welche durch frühere Veröffentlichungen als Inhaltsstoffe von Kakaosamen beschrieben wurden.

2.1.1 Phenolische Substanzen, die über den Acetat/Malonat-Weg gebildet werden können

Vornehmlich in Mikroorganismen wird eine Minderheit zumeist niedermolekularer phenolischer Verbindungen auf Basis des aktivierten Essigsäure-Restes Acetyl-CoA sowie von Malonyl-CoA synthetisiert (Abb. 2 c und d). Diese Substanzen kondensieren im Verlauf der Synthese zu Kohlenstoff-Ketten, in welchen jedes zweite Kohlenstoffatom einer Carbonylgruppe (=Ketogruppe) entspricht, weshalb sie als Ketidketten bezeichnet werden (Abb. 3). Moleküle, die ausschließlich aus solchen Ketidketten aufgebaut sind, werden daher zu den Polyketiden gezählt. Dieser Gruppe gehören nicht nur phenolische Substanzen an.

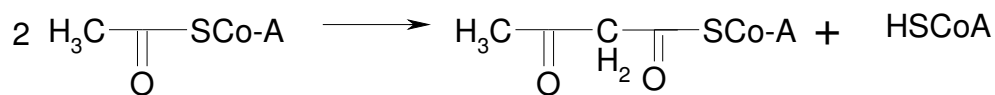


Abb. 3: Kondensierung von Acetyl-CoA (nach Waterman und Mole 1994)

In höheren Pflanzen leiten sich die hier aufgeführten phenolischen Verbindungen oftmals auch von Hydroxyzimtsäuren ab, so dass ihnen der Shikimisäureweg zugrunde liegt (Heß 1988, siehe 2.1.2). Im Folgenden wird jedoch ausschließlich ihre Ableitung vom Acetat/Malonat-Weg erläutert.

2.1.1.1 Phloroglucin

Das sehr einfach aufgebaute Phloroglucin wird durch den Ringschluss einer Triketid-Kette gebildet (Abb. 4):

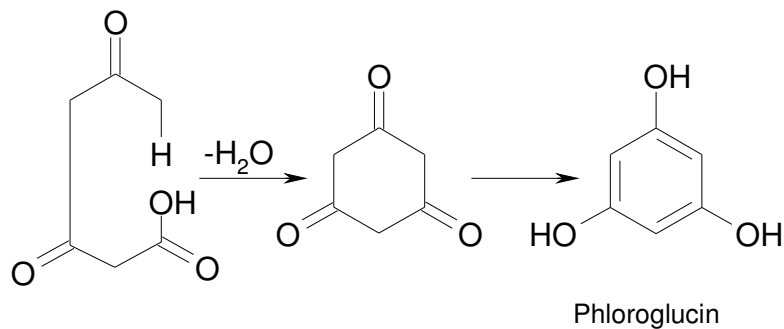


Abb. 4: Synthese von Phloroglucin (schematisiert, nach Waterman und Mole 1994)

Phloroglucin wird durch Kenyhercz und Kissinger 1978 in Kakaosamen beschrieben.

2.1.1.2 Benzoessäuren

Vertreter aus der Gruppe der Benzoessäuren werden aus insgesamt 4 Acetat-Einheiten aufgebaut. Abb. 5 zeigt ihre Synthese am Beispiel von Orsellinsäure.

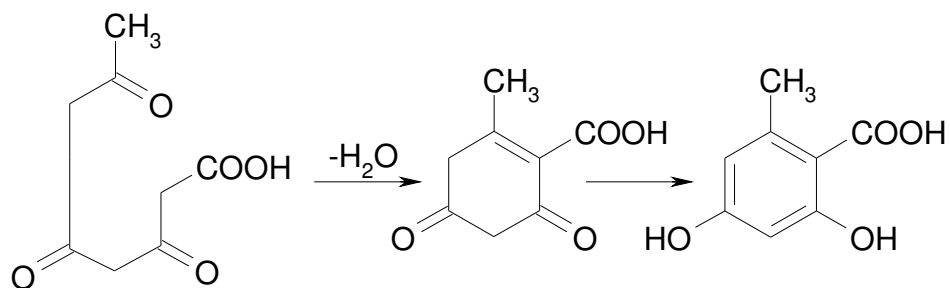


Abb. 5: Synthese der zu den Benzoessäuren gehörenden Orsellinsäure (nach Waterman und Mole 1994)

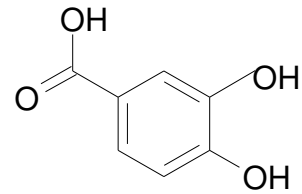
Folgende Benzoessäuren werden in der Literatur als phenolische Inhaltsstoffe von Kakaosamen beschrieben:

a) Protocatechusäure

Quesnel 1965; Kenyhercz und Kissinger 1978



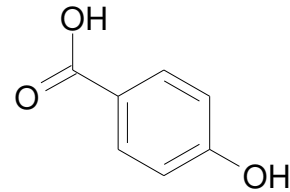
154.122

**b) 4-Hydroxybenzoesäure**

Quesnel 1965



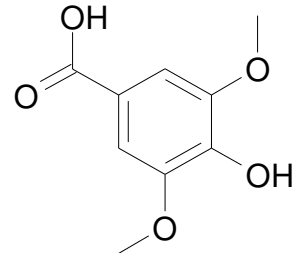
138.1226

**c) Syringasäure**

Quesnel 1965



198.175

**d) Vanillinsäure**

Quesnel 1965; Kenyhercz und Kissinger 1978



168.1488

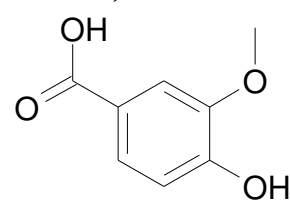
**2.1.1.3 Phenyllessigsäuren**

Abb. 6 stellt die Synthese der Phenyllessigsäuren aus einer Acetyl-CoA-Einheit und 3 Malonyl-CoA-Einheiten am Beispiel von 3,5-Dihydroxy-phenyllessigsäure dar.

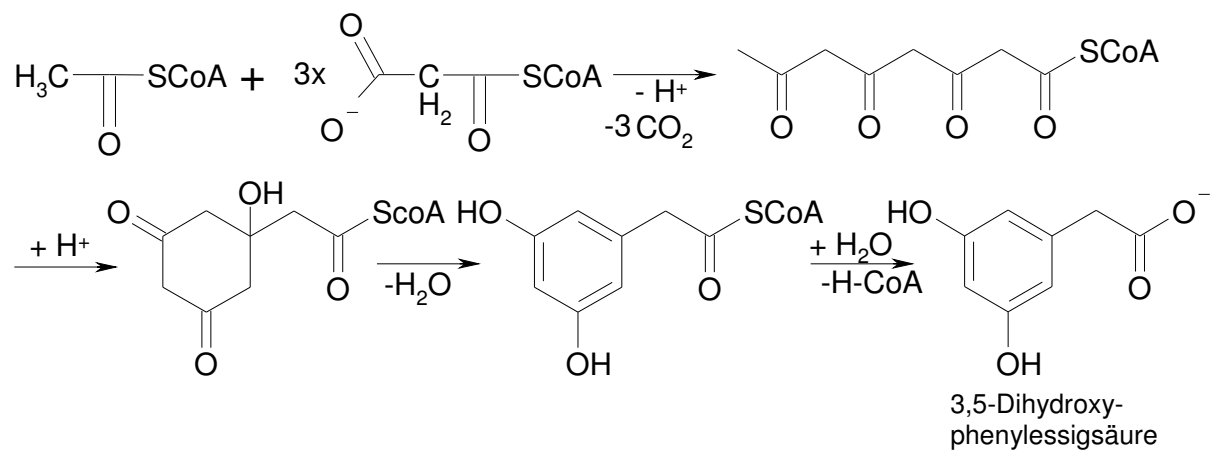


Abb. 6: Synthese der zu den Phenyllessigsäuren gehörenden 3,5-Dihydroxy-phenyllessigsäure (nach Li *et al.* 2001)

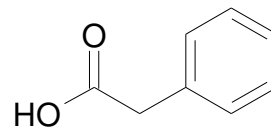
Als phenolische Inhaltsstoffe von Kakaosamen finden sich in der Literatur folgende Vertreter aus der Gruppe der Phenyllessigsäuren:

a) Phenyllessigsäure

Quesnel 1965

$C_8H_8O_2$

136.15

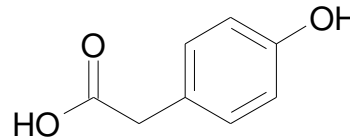


b) 4-Hydroxy-phenyllessigsäure

Quesnel 1965

$C_8H_8O_3$

152.1494

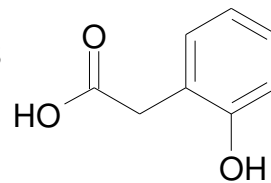


c) 2-Hydroxy-phenyllessigsäure

Quesnel 1965; Kenyhercz und Kissinger 1978

$C_8H_8O_3$

152.1494



2.1.2 Phenolische Substanzen, denen der Shikimisäure-Weg zugrunde liegt

Der Shikimisäure-Weg ist insgesamt weitaus komplexer als der in 2.1.1 vorgestellte Acetat/Malonat-Weg. Er basiert auf den Grundbausteinen Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat (Abb. 2 a und b), aus welchen in einer Reihe chemischer Reaktionen die Shikimisäure gebildet wird. Diese zeichnet sich durch ein C_6C_1 -Grundgerüst aus. Nach der Umwandlung der Shikimisäure in Chorismat erfolgt in weiteren Reaktionsschritten die Synthese der aromatischen Aminosäuren L-Tryptophan, L-Tyrosin und L-Phenylalanin (Abb. 7).

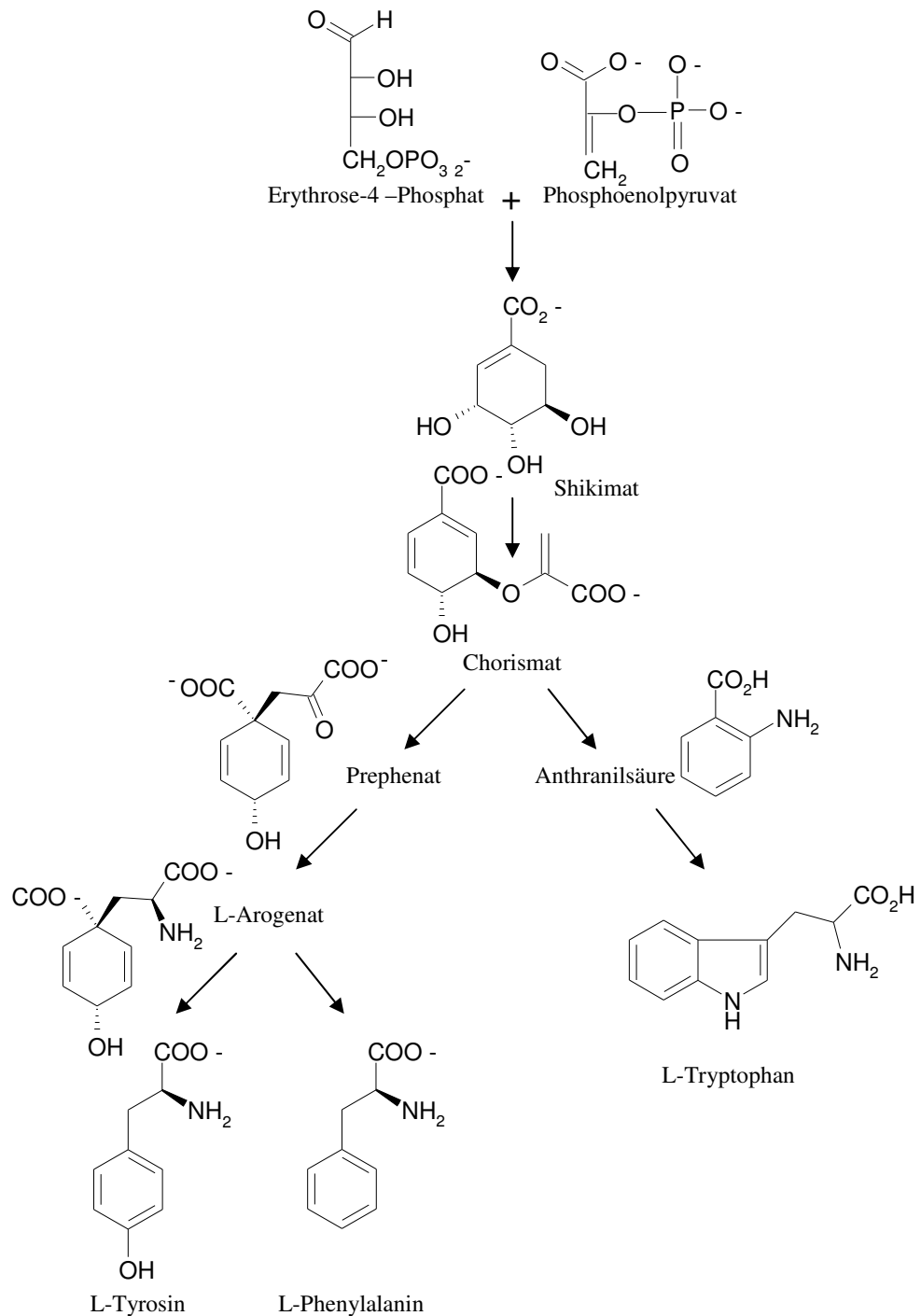


Abb. 7: Der Shikimisäure-Weg

Das durch ein C_6C_3 -Gerüst charakterisierte L-Phenylalanin bildet die Ausgangssubstanz in der Biosynthese aller Phenylpropanoide und ihrer Folgeprodukte. Seine Umwandlung zu *trans*-Zimtsäure stellt eine der wichtigsten Verknüpfungen zwischen dem pflanzlichen Primär- und Sekundärstoffwechsel dar. Diese wird durch das Enzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) katalysiert (Abb. 8).

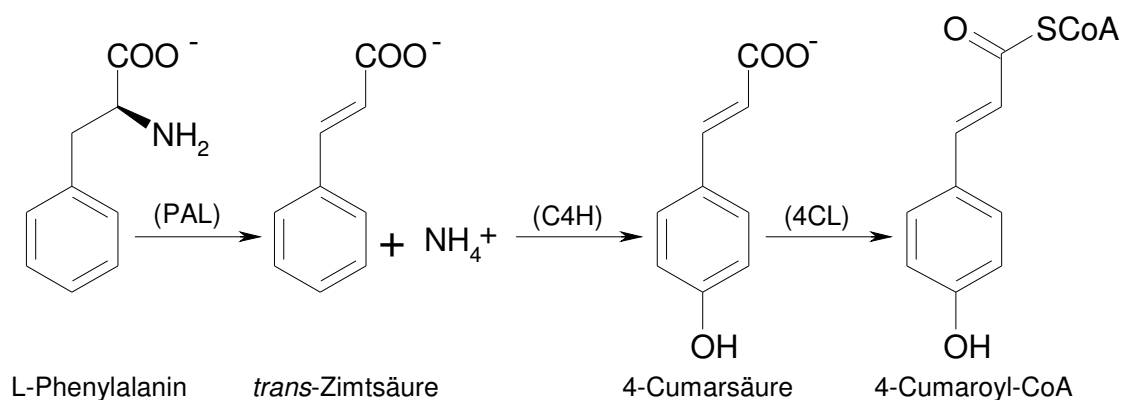


Abb. 8: Erste Schritte des Phenylpropanoid-Metabolismus.

(PAL): Phenylalanin-Ammonium-Lyase; (C4H): Cinnamat-4-Hydroxylase;

(4CL): 4-Cumarat-CoA-Ligase

2.1.2.1 Hydroxyzimtsäuren

Innerhalb des Phenylpropanoid-Metabolismus entsteht 4-Cumarsäure durch die Hydroxylierung von Zimtsäure, welche durch das Enzym Cinnamat-4-Hydroxylase katalysiert wird. Durch sequenzielle Hydroxylierung und Methoxylierung leiten sich von 4-Cumarsäure alle anderen Hydroxyzimtsäuren ab (Abb. 9). 4-Cumarsäure bildet nach ihrer enzymatischen Umwandlung in 4-Cumaroyl-CoA auch eine der beiden Ausgangssubstanzen der Flavonoid-Bioydnese (siehe Abb. 16).

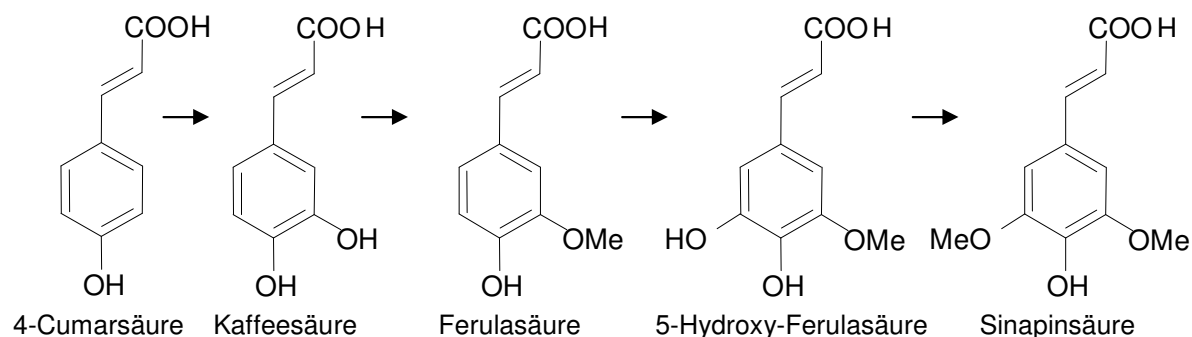


Abb. 9: Biosynthese der Hydroxyzimtsäuren

Als phenolische Inhaltsstoffe von Kakaosamen werden in der Literatur folgende Vertreter aus der Gruppe der freien Hydroxyzimtsäuren beschrieben:

- p-Cumarsäure; $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$; 164,16
(Quesnel 1965; Kenyhercz und Kissinger 1978; Abb. 9)
- Kaffeesäure; $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$; 180,16
(Rohan 1958; Jalal und Collin 1977; Kenyhercz und Kissinger 1978; Abb. 9)
- Ferulasäure; $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$; 194,19
(Quesnel 1965; Kenyhercz und Kissinger 1978; Abb. 9)

2.1.2.2 Chlorogensäure, Neochlorogensäure

Zu den Chlorogensäuren werden alle Verbindungen zwischen Hydroxyzimtsäuren und Chinasäure gezählt, welche ebenfalls auf dem Shikimisäure-Zyklus basiert. Chlorogensäuren finden sich in den vegetativen und generativen Organen vieler Pflanzenfamilien. So stellen sie einen großen Anteil der phenolischen Inhaltsstoffe von Kaffeebohnen (Clifford 1999).

Verbindungen zwischen Kaffee- und Chinasäure wurden durch Rohan 1958, Rohan und Connell 1964 sowie durch Jalal und Collin 1977 in Kakaoextrakten identifiziert. Dabei handelt es sich einerseits um „klassische“ Chlorogensäure (5-Caffeoyl-chinasäure; Abb. 10), andererseits um Neochlorogensäure (3-Caffeoyl-chinasäure), die ausschließlich von Rohan 1958 sowie Rohan und Connell 1964 beschrieben wird (Abb. 10).

Unter den Veröffentlichungen jüngerer Datums bestätigt ausschließlich Wollgast 2005 das Vorhandensein von Chlorogensäure in Extrakten aus Kakaosamen.

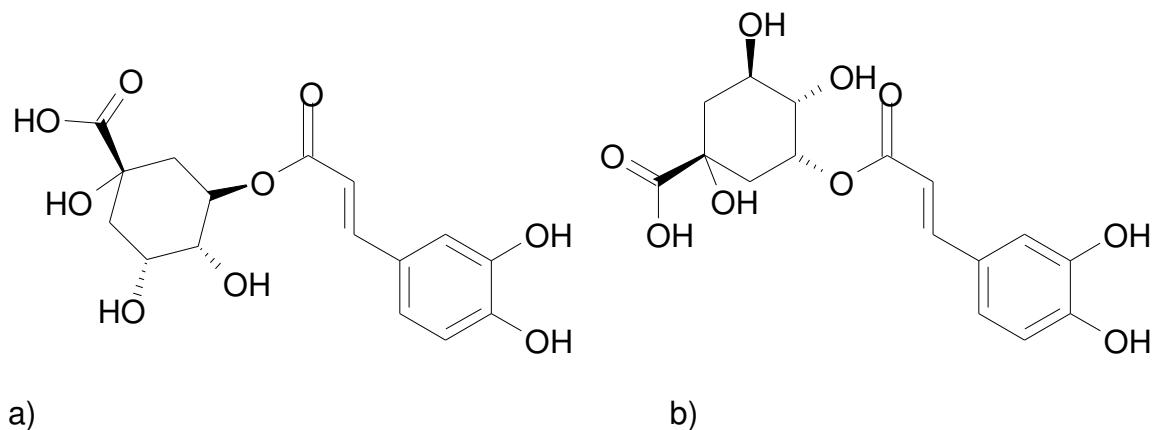


Abb. 10: Chlorogensäuren ($C_{16}H_{18}O_9$), die in Kakaoextrakten identifiziert wurden.
a) Chlorogensäure; b) Neochlorogensäure

2.1.2.3 Phloretinsäure

Phloretinsäure ($C_9H_{10}O_3$; 166,17) kommt laut Quesnel 1965 im Keimblattgewebe von Kakaosamen vor. Sie unterscheidet sich von den Hydroxyzimtsäuren durch die fehlende Doppelbindung in der Kohlenstoffkette ihres Säurerestes (Abb. 11).

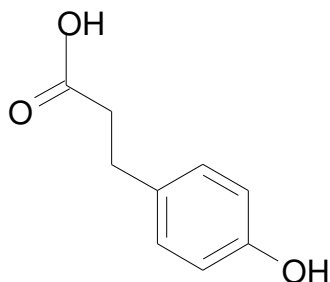


Abb. 11: Phloretinsäure

2.1.2.4 Aesculetin

Aesculetin gehört zur Gruppe der Cumarine, welche durch *o*-Hydroxylierung aus Hydroxyzimtsäuren gebildet werden. Nach Satô 1967 leitet sich Aesculetin aus Kaffeesäure ab (Abb. 12). Im unversehrten pflanzlichen Gewebe liegt die Substanz zumeist als Glycosid Aesculin vor und entsteht erst im Zuge von Verletzungen und Welkeprozessen. Die Substanz wurde von Quesnel 1965 in Kakaosamen beschrieben.

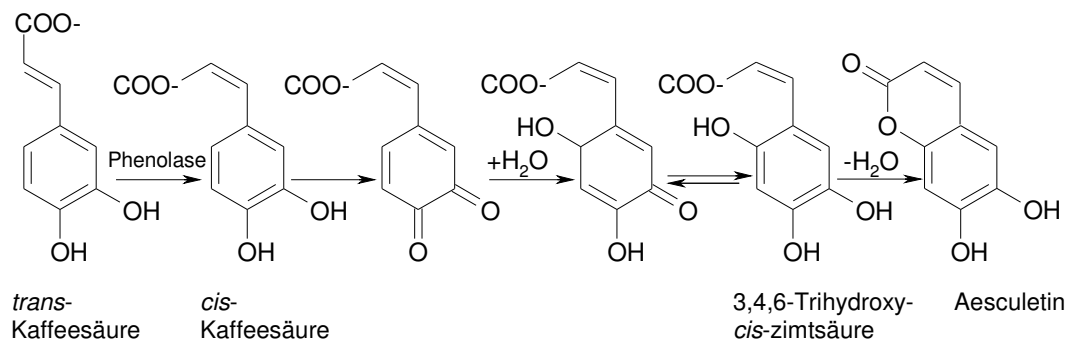


Abb. 12: Bildung des Cumarins Aesculetin (nach Satô 1967)

2.1.2.5 Die Hydroxyzimtsäureamide (Hydroxycinnamic acid amides, HCAA)

Neben den Proanthocyanidinen und den Flavonolglycosiden (siehe 2.1.3) bilden Ester, Glycoside und Amide der verschiedenen Hydroxyzimtsäuren die größte Gruppe phenolischer Inhaltsstoffe im Pflanzenreich. In erster Linie handelt es sich hierbei um Verbindungen mit *p*-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure und Sinapinsäure (Haslam 1998).

Die im Folgenden mit HCAA abgekürzte Gruppe der Hydroxyzimtsäureamide lässt sich in basische und neutrale Amide untergliedern. Basische Amide besitzen eine primäre Aminfunktion und sind wasserlöslich. Sie beinhalten typischerweise aliphatische Di- und Polyamine wie Putrescin, Cadaverin, Spermidin und Spermin (Facchini *et al.* 2002).

Die schlecht ionisierbaren neutralen Amide sind unlöslich in Wasser und enthalten überwiegend aromatische Amine wie Octopamin, Tryptamin oder Tyramin (Facchini *et al.* 2002).

Während an Amine gekoppelte Hydroxyzimtsäuren bereits umfassend in vielen Pflanzenfamilien beschrieben wurden, gibt es bisher noch sehr wenige Veröffentlichungen über Verbindungen zwischen Hydroxyzimtsäuren und Aminosäuren. Diese werden von den meisten bisher untersuchten Arten offenbar gar nicht oder im Vergleich zu anderen HCAA in unbedeutenden Mengen gebildet.

Verbindungen zwischen Hydroxyzimtsäuren und Aminosäuren wurden z. B. aus Samen der Gattung *Coffea* L. isoliert. Bis zu 14 % der Trockenmasse von Kaffeebohnen bestehen aus Verbindungen mit Kaffeesäure und anderen Zimtsäuren, bei denen es sich überwiegend um Chinasäure-Derivate handelt (Farah und Donangelo 2006). Daneben

enthalten insbesondere die in Angola angebauten *C. robusta* L.-Sorten verschiedene HCA-Aminosäureverbindungen, die sich quantitativ zwischen 0,4 und 6,7 g kg⁻¹ Trockenmasse bewegen (Clifford und Knight 2004). Dabei handelt es sich vor allen Dingen um Kaffeesäure, aber auch Cumar- und Ferulasäure, welche mit den Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin verknüpft sind.

Von den Hydroxyzimtsäure-Aminosäure-Amiden wurden außerdem die so genannten Clovamide beschrieben, welche zum erstenmal von Yoshikawa *et al.* 1974 aus *Trifolium pratense* L. isoliert wurden. Bei diesen HCAA handelt es sich um Verbindungen zwischen Kaffee- oder Cumarsäure mit den aromatischen Aminosäuren *L*-DOPA oder Tyrosin (Abb. 13 a und b). In *T. cacao* L. wurden HCAA erstmals von Sanbongi *et al.* 1998 beschrieben, welche die Substanzen Clovamid (*N-trans*-caffeoyl-*L*-DOPA) und Dideoxyclovamid (*N-trans-p*-cumaroyl-*L*-tyrosin) aus Kakaomasse isolierten (Abb. 13 a). Alemanno *et al.* 2003 identifizierten außer diesen beiden Substanzen noch das Monodeoxyclovamid *N-trans*-caffeoyl-*L*-tyrosin in Zellkulturen, in frischen Samen sowie in Kalluskulturen von *T. cacao* L. (Abb. 13 a). Wollgast 2005 isolierte insgesamt 4 Clovamide aus prozessiertem Kakaosamen, neben den 3 zuvor genannten Substanzen das Monodeoxyclovamid *N-trans*-cumaroyl-*L*-Dopa (Abb. 13 a).

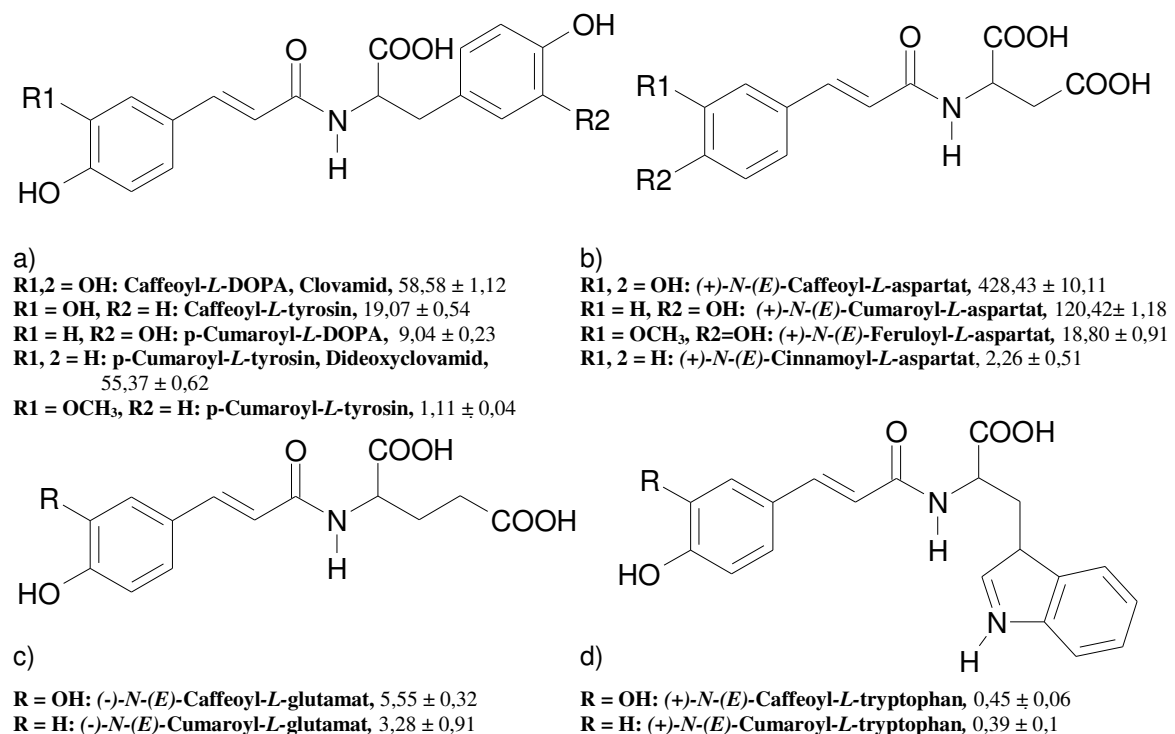


Abb. 13: Molekülstrukturen aller bisher in *T. cacao* L. nachgewiesenen Zimtsäureamide mit den durch Stark *et al.* 2006b in gerösteten Kakaopulver gefundenen Mengen [mg kg⁻¹]

Die bisher umfangreichste Beschreibung der HCAA aus *T. cacao* L. findet sich in den Veröffentlichungen von Stark *et al.* 2005, Stark *et al.* 2006b, sowie Stark und Hofmann 2005. Insgesamt 13 verschiedene Moleküle dieser Gruppe werden in fermentierten und gerösteten Kakaopulver nachgewiesen und auch quantifiziert. Neben

den 4 oben beschriebenen Clovamiden handelt es sich dabei um Verbindungen der Hydroxyzimtsäuren Kaffeesäure, Cumarsäure, Zimtsäure und Ferulasäure mit den Aminosäure-Resten Aspartat, Glutamat, sowie um Spuren zweier Verbindungen mit Tryptophan (Abb. 13).

(+)-*N*-(*E*)-Caffeoyl-*L*-aspartat (Kaffeesäure-aspartat; ca. 430 mg kg⁻¹ Kakaopulver) und (+)-*N*-(*E*)-Cumaroyl-*L*-aspartat (ca. 120 mg kg⁻¹) sind unter den von Stark *et al.* 2006b quantifizierten HCAA die mengenmäßig wichtigsten Substanzen. Die bereits zuvor beschriebenen Clovamide werden mit vergleichsweise deutlich geringeren Gehalten von bis etwa 58 mg kg⁻¹ gefunden. Von allen weiteren HCAA wurden nur Mengen von unter 6 mg kg⁻¹ nachgewiesen. Sie spielen somit eine untergeordnete Rolle (Abb. 13).

Bestätigt werden die Arbeiten der Arbeitsgruppe Hofmann (Institut für Lebensmittelchemie, Universität Münster) durch die Publikation von Tomas-Barberán *et al.* 2007, welche einige der genannten Verbindungen aus Kakaopulver isoliert haben, darunter Kaffeesäure-aspartat als die Substanz mit der weitaus höchsten Quantität.

Bisher ist die Biosynthese von HCAA besonders ausführlich am Beispiel der Tyramin-Amide untersucht worden, welche im Pflanzenreich weit verbreitet sind. Katalysiert durch das Enzym Tyramin-Hydroxycinnamoyltransferase THT kommt es dabei zu einer Kondensation von dem aus der Aminosäure Tyrosin abgeleiteten Tyramin mit einem Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester (Abb. 14). Bei letzteren handelt es sich um wichtige Zwischenprodukte der Phenylpropanoidsynthese (Abb. 8). Sie dienen auch als Ausgangssubstanzen für alle anderen bisher im Pflanzenreich beschriebenen Biosynthesen von HCAA (Facchini *et al.* 2002).

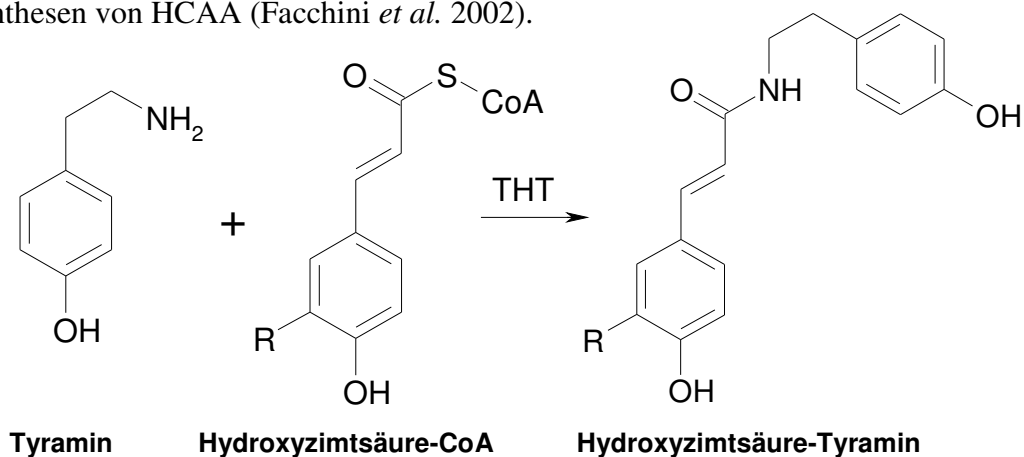


Abb. 14: Biosynthese von Hydroxyzimtsäure-Tyramin.
THT: Tyramin-Hydroxycinnamoyltransferase

Die Bildung von HCAA in der Pflanze wird mit einer ganzen Reihe physiologischer Prozesse, wie etwa der Blüteninduktion und -bildung, der sexuellen Differenzierung, der Knollenbildung, der Zellteilung und -differenzierung in Zusammenhang gebracht. Abgeleitet wird die Bedeutung der HCAA zumeist von einer Zu- oder Abnahme in der

Konzentration dieser Substanzen in den jeweils untersuchten Pflanzenteilen (Facchini *et al.* 2002).

Bonneau *et al.* 1994 beschreiben den Gehalt von HCAA in Embryo und Endosperm von Reissamen und deren Abbau während der Keimung. Sie finden diese Substanzen in wesentlich höheren Konzentrationen in Reissamen mit hohem Keimungspotential als in solchen mit niedrigem Keimungspotential. Aus ihren Untersuchungen schließen die Autoren, dass die Stoffgruppe als Speicher für Amine dienen könnte, welche bei der Keimung für die Zellteilung und -streckung zur Verfügung gestellt werden. Nach Facchini *et al.* 2002 ist jedoch die Bedeutung der HCAA als Speichersubstanzen durch die bisher durchgeführten wissenschaftlichen Arbeiten keineswegs bewiesen, da nicht alle zum Thema veröffentlichten Studien einen Zusammenhang zwischen den Mengen freier und konjugierter Amine belegen. Auch ihre Funktion bei allen anderen oben beschriebenen Wachstums- und Entwicklungsprozessen wird kontrovers diskutiert (Facchini *et al.* 2002).

Durch zahlreiche Studien belegt ist hingegen die Bildung von HCAA als Teil des aktiven Abwehrmechanismus von Pflanzen gegen Pathogene und als Reaktion auf mechanische Verletzungen oder andere Stress auslösende Faktoren (Facchini *et al.* 2002).

Am Beispiel der *Solanaceae* ist die Polymerisation der HCAA in den Zellwänden besonders ausführlich untersucht worden. Die Zellwände werden dadurch gefestigt und ihre Verdaulichkeit wird reduziert. So finden sich HCAA beispielsweise als kovalent gebundene Komponenten im natürlichen und im nach Verletzung gebildeten Periderm von Kartoffeln (Negrel *et al.* 1996). HCAA gelten auch als mögliche Bestandteile des polyaromatischen Teils von Suberin (Bernards *et al.* 1995).

Tebayashi *et al.* 2000 weisen eine Anreicherung der auch aus *T. cacao* L. isolierten Clovamide (s. o.) in Wurzeln von *Trifolium pratense* L. nach, denen Jasmonsäure zugeführt wurde. Jasmonsäure gilt als Signalstoff der pflanzlichen Stressreaktion, da sich ihre Konzentration in pflanzlichen Geweben nach Einwirkung äußerer Einflüsse wie mechanischer Verletzung und der Infektion mit Pathogenen erhöht (Creelman and Mullet 1997). Auch Alemanno *et al.* 2003 gehen von einer stressinduzierten Synthese der von ihnen aus Kakao isolierten HCAA (s. o.) aus.

Neben den Pathogenen und Herbivoren erhöhen u. a. auch die Stressfaktoren Ozon und UV-Licht den HCAA-Gehalt im Pflanzengewebe.

Über die biologische Funktion von HCAA ist bisher wenig bekannt. Sie besitzen eine mögliche Bedeutung als Wachstumsinhibitoren, sowie als Stoffe mit antibiotischer oder antiviraler Wirkung (Facchini *et al.* 2002). Da von Stark und Hofmann 2005 eine Adstringens der Kakao-HCAA nachgewiesen wurde (s. u.), kann davon ausgegangen werden, dass diese Stoffe auch als Repellents gegen den Verzehr der Samen durch einige der natürlichen Verbreiter der Früchte (z. B. Affen und Nagetiere) dienen.

In den letzten Jahren wurden gehäuft Studien veröffentlicht, die sich mit der physiologischen und der möglichen gesundheitsfördernden Wirkung von Vertretern aus der Gruppe der Clovamide (Abb. 13 a) auseinandersetzen. Sopheak und Lewis 2002 weisen eine hohe antioxidative Aktivität und Radikalfängerwirkung dieser Substanzen nach. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch Ley und Bertram 2003, die betonen, dass die von ihnen untersuchten Clovamide stärkere Radikalfänger sind als die in der Nahrungsmittel- und Kosmetikindustrie häufig verwendeten Antioxidantien Ascorbinsäure und α -Tocopherol. Auch Spasova *et al.* 2006 untersuchen die antioxidative Aktivität von HCA-Aminosäureverbindungen, sehen aber noch weiteren Klärungsbedarf bezüglich der Abhängigkeit des antioxidativen Potentials von der Molekülstruktur.

Durch Park 2005a und b sowie Park und Schoene 2006 werden Clovamidverbindungen nach oraler Aufnahme im Blutplasma von Mäusen nachgewiesen.

Park 2005b belegt die Funktion zweier Clovamidverbindungen als β -Adrenozeptor-Agonisten, einer Stoffgruppe, die bei der symptomatischen Behandlung von Herz- und Lungenerkrankungen zum Einsatz kommt. β -Adrenozeptoren sind eine Gruppe phylogenetisch verwandter Rezeptoren, die insbesondere durch das Hormon Adrenalin aktiviert werden und u. a. eine wichtige physiologische Rolle bei der Herzstimulation, der Bronchialerweiterung und bei der Thermogenese spielen. Park und Schoene 2006 beschreiben die Wirksamkeit von Clovamiden bei der Minderung der Verklumpung von Blutplättchen im Organismus, welche ihrerseits zu den Mitverursachern von Arteriosklerose, *Angina pectoris*, Herzmuskelerkrankungen und Schlaganfällen gezählt werden.

Park 2005a und b sowie Park und Schoene 2006 gehen davon aus, dass die gesundheitsfördernden Effekte des Konsums von Kakaoprodukten (siehe 2.1.6) auch auf den HCAA-Gehalt in Kakaosextrakten zurückzuführen ist.

Während die physiologische Wirksamkeit der Clovamide somit bereits in mehreren aktuellen Studien thematisiert wurde, stehen ähnliche Untersuchungen im Zusammenhang mit den anderen in Kakao gefundenen HCAA noch aus. Stark und Hofmann 2005 untersuchten diese Substanzen in Hinblick auf ihre **aromarelevanten Eigenschaften**. Die HCAA von Kakao zeigen demnach eine adstringierende Wirkung, deren Ausprägung in erster Linie vom Aminosäure-Rest abhängt. Verbindungen mit den aliphatischen Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure zeichneten sich zusätzlich noch durch ihren sauren Geschmack aus.

2.1.3 Die Gruppe der Flavonoide

Unter den pflanzlichen, phenolischen Sekundärstoffen dominieren die Flavonoide in Vielfalt und Verbreitung (Haslam 1998). Die gemeinsame Basis aller Substanzen aus dieser Gruppe bildet das 2-Phenyl-chroman, eine aus 3 Ringen „A“, „B“ und „C“ aufgebaute C₁₅-Struktur (Abb.15).

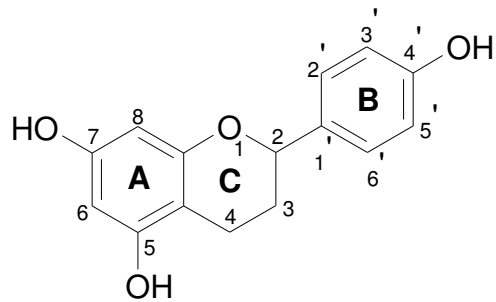


Abb. 15: 2-Phenyl-chroman mit dem für die meisten Flavonoide typischen Hydroxylierungs-Grundmuster

Abb. 15 zeigt eine Hydroxylierung des 2-Phenyl-chromans an den Positionen 5, 7 und 4'. Diese 3 Hydroxygruppen sind charakteristisch für die meisten Flavonoide und liegen in der Biosynthese dieser Stoffgruppe begründet.

Die Substanzen 4-Cumaroyl-CoA (aus dem Shikimisäure-Weg, Abb. 7) und Malonyl-CoA (aus dem Acetat/Malonat-Weg, Abb. 2 d) dienen in allen Pflanzenspezies als die beiden Substrate der Chalkonsynthase, welche das Schlüsselenzym des Flavonoidstoffwechsels ist. Abb. 16 zeigt die Synthese von Naringenin-Chalcon aus diesen beiden Substanzen, sowie dessen Umwandlung in Naringenin.

Das Chalcon stellt das zentrale C₁₅-Zwischenprodukt für die Synthese aller Flavonoide dar.

Da eine weitere Hydroxylierung bzw. Methoxylierung des Rings B wahrscheinlich erst nach Formierung der C₆C₃C₆-Struktur erfolgt, leitet sich die Herkunft der verschiedenen Klassen von Flavonoiden, mit wenigen Ausnahmen, von dem Flavanon Naringenin ab (Haslam 1998).

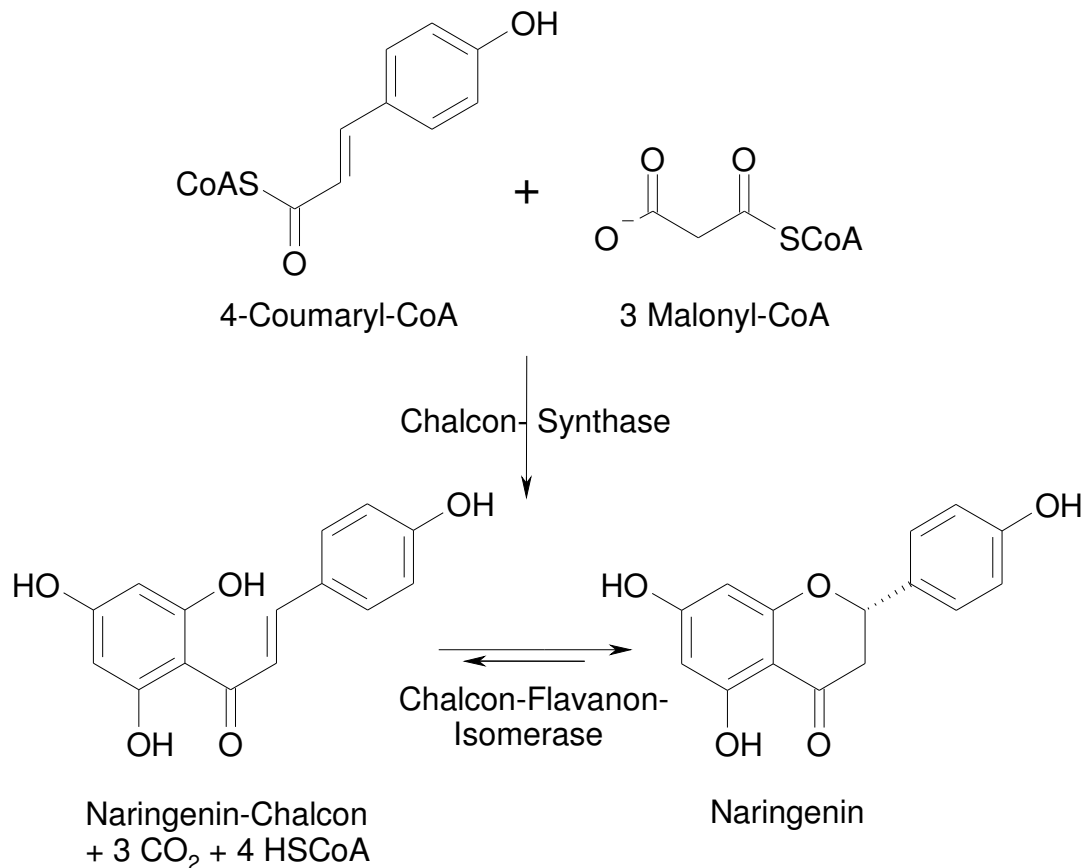


Abb. 16: Die Bildung der Schlüsselsubstanzen der Flavonoid-Biosynthese

Die einzelnen Flavonoide differenzieren sich durch

1. den Grad der Hydroxylierung, speziell am Ring „B“,
2. Methylierung von freien Hydroxylgruppen,
3. O-Acylierung,
4. O- und C-Glycosylierung,
5. O- und C-Isoprenylierung des 2-Phenyl-chroman-Grundgerüsts.

Die Klassifizierung der Flavonoide basiert auf strukturellen Unterschieden am heterozyklischen C-Ring. Abb. 17 zeigt die verschiedenen Klassen der Flavonoide und deren metabolische Beziehung zueinander. Während die chemische Ableitung der einzelnen Klassen voneinander bereits gut dokumentiert ist, gibt es noch Forschungsbedarf bezüglich einiger der an den Reaktionen beteiligten Enzyme (Haslam 1998).

Mit Ausnahme der Flavan-3-ole werden Flavonoide meistens in glycosylierter Form im pflanzlichen Gewebe gespeichert. Für die Klasse der Anthocyane ist die Glycosylierung sogar ein obligatorisches Merkmal (Abb. 17).

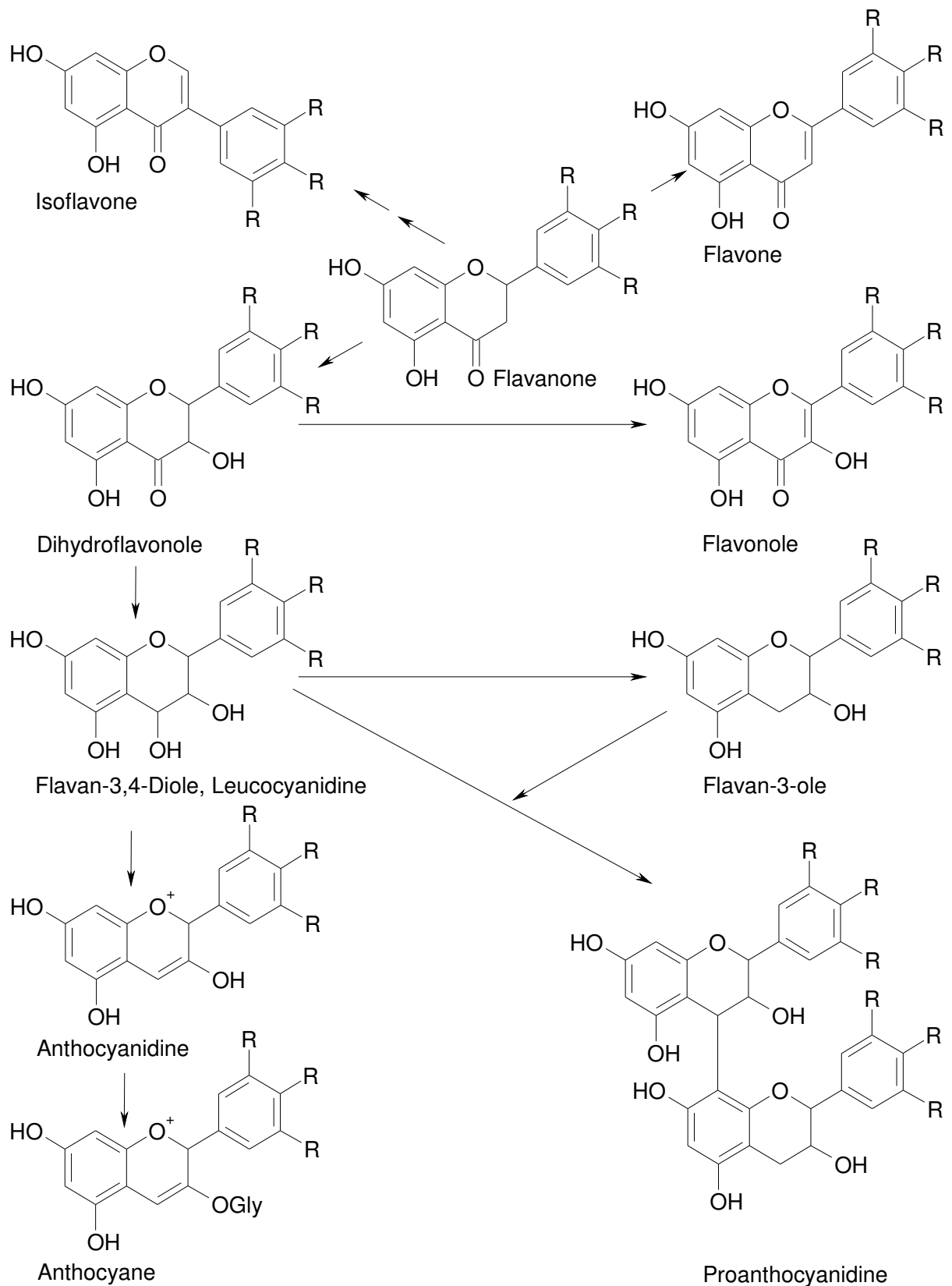


Abb. 17: Die Klassen der Flavonoide und ihre metabolische Ableitung voneinander (nach Haslam 1998)
 Ring A ist mit der für viele Flavonoide typischen Hydroxylierung an Position 5 und 7 dargestellt. Als Beispiel für die Proanthocyanidine wird ein Dimer mit einer [4→8] Verknüpfung aufgeführt.

2.1.3.1 Die Proanthocyanidine (Kondensierte Tannine)

Zu den Proanthocyanidinen werden alle Stoffe gezählt, die aus mindestens 2 Flavan-3-ol-Bausteinen aufgebaut sind. Meistens sind diese Untereinheiten über die Positionen 4 und 8 miteinander verbunden. Daneben treten jedoch auch andere Verknüpfungsmuster auf (z. B. zwischen den Positionen 4 und 6).

Je nach Hydroxylierungsgrad der B-Ringe werden Procyanidine (Abb. 18, R = H) und Prodelphinidine (Abb. 18, R = OH) voneinander differenziert. Selten kommen auch Untereinheiten mit abweichender Hydroxylierung, wie etwa die Propelargonidine, vor. Weit verbreitet sind außerdem Proanthocyanidine, die aus Untereinheiten mit voneinander abweichenden Hydroxylierungsmustern bestehen.

Moleküle mit bis zu 6 Flavan-3-ol Untereinheiten sind wasserlöslich und werden zu den oligomeren Proanthocyanidinen gezählt. Die längerkettigen Polymere sind unlöslich in Wasser. Sie werden untergliedert in Stoffe, die in wässrigem Methanol löslich sind, und Substanzen, die sich nicht aus Pflanzenmaterial extrahieren lassen. Diese vollkommen unlösliche Fraktion macht in einigen daraufhin untersuchten Leguminosen sogar den größten Anteil der in der Pflanze enthaltenen Proanthocyanidine aus (Bate-Smith 1973a). Lösliche polymere Proanthocyanidine können aus bis zu 40 Flavan-3-ol-Einheiten bestehen, der Durchschnitt liegt bei etwa 6 bis 12 solcher Bausteine.

Da sowohl die Anzahl der Flavan-3-ol Untereinheiten als auch deren Hydroxylierung und Verknüpfungsmuster variieren, gibt es Proanthocyanidine in nahezu unendlich vielen Variationen. Da im Pflanzenreich jedoch das stereoisomere Paar (+)-Catechin und (-)-Epicatechin unter den Flavan-3-olen am weitesten verbreitet ist, sind die aus Catechinbausteinen gebildeten Procyanidine am häufigsten- maßgeblich jene, deren Bausteine über die Positionen 4 und 8 verknüpft sind.

Je nach Position der Verknüpfung und Flavan-3-ol Bausteinen gibt es eine aus Buchstaben und Ziffern aufgebaute Nomenklatur der Procyanidine. Folgende 4 Dimere sind unter dem im Pflanzenreich verbreiteten Procyanidinen am weitesten verbreitet:

- Procyanidin B-1; Epicatechin [4 β →8]-Catechin;
- Procyanidin B-2; Epicatechin [4 β →8]-Epicatechin;
- Procyanidin B-3; Catechin [4 β →8]-Catechin;
- Procyanidin B-4; Catechin [4 β →8]-Epicatechin.

Wesentliche Schritte der Proanthocyanidin-Biosynthese sind noch ungeklärt. So ist bisher noch nicht bekannt, ob diese unter enzymatischer Kontrolle steht (Haslam 1998). Nach aktueller Theorie entstehen die Proanthocyanidine als Nebenprodukte der Prozesse, aus welchen ihre Bausteine, die monomeren Flavan-3-ole, hervorgehen. Ein dimeres über die Positionen 4 und 8 verknüpftes Proanthocyanidin wird demnach aus jeweils einem

Flavan-3-ol und einem Chinonmethid synthetisiert. Letztere entstehen unter Abspaltung von H_2O aus den Flavan-3,4-Diolen und gelten als Präkursoren der Flavan-3-ole.

Durch Verknüpfung mit weiteren Chinonmethiden bauen sich nach der hier vorgestellten Theorie oligomere und polymere Proanthocyanidine mit Verknüpfungen an den Positionen 4 und 8 (seltener an den Positionen 4 und 6) auf (Abb. 18).

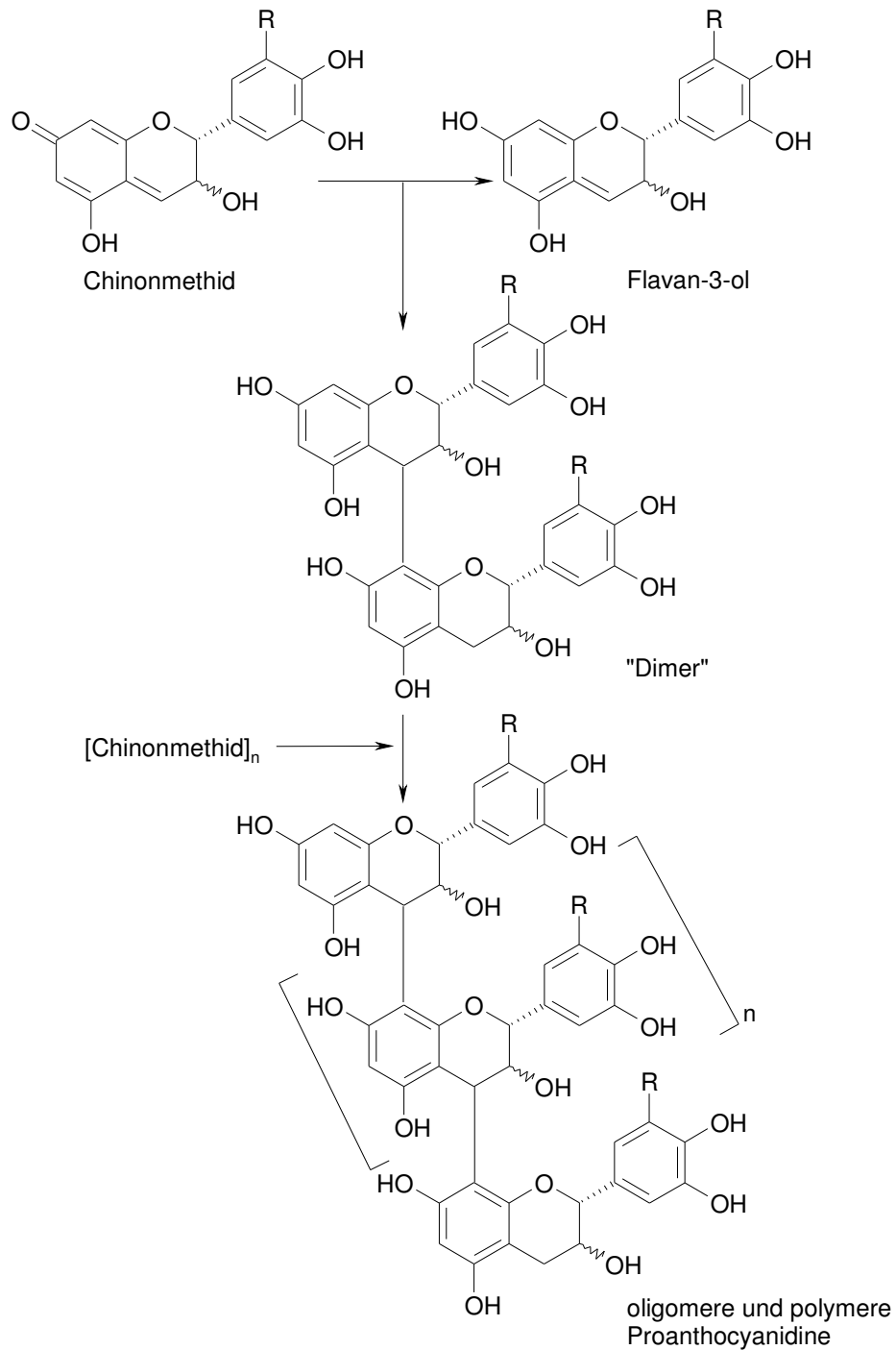


Abb. 18: Die Biosynthese der Proanthocyanidine (nach Haslam 1998)

2.1.4 Literaturangaben zu den mono-, oligo- und polymeren Flavonoiden in Samen von *T. cacao* L.

Die Arbeit von Forsyth 1952a gehört zu den ersten Veröffentlichungen, welche einen umfassenden Überblick über den Gehalt phenolischer Substanzen und hier speziell der Flavonoide im Keimblattgewebe frischer Kakaosamen vermitteln sollen. Viele Aspekte der Pionierarbeit, welche der genannte Autor mit dieser und weiteren in den folgenden Jahren veröffentlichten Studien geleistet hat, wurden später mit Hilfe weitaus modernerer Analyseverfahren bestätigt.

2.1.4.1 Die monomeren Flavan-3-ole (Catechine) in Kakaosamen

Vertreter der Flavonoide dominieren auch unter den phenolischen Substanzen in Samen von *T. cacao* L. Dies liegt vor allen Dingen an dem großen Anteil der Flavan-3-ole oder auch Catechine am Gesamt-Polyphenolgehalt von *T. cacao* L..

Unter den löslichen phenolischen Einzelsubstanzen im Keimblattgewebe von *T. cacao* L. dominiert das monomere Flavan-3-ol (-)-Epicatechin (Abb. 19). Hier wurde dieses Flavonoid erstmals durch Adam *et al.* 1931 identifiziert und findet sich zusammen mit den aus ihm gebildeten Oligo- und Polymeren (siehe 2.1.4.5) offenbar in den Samen sämtlicher Arten der Gattung *Theobroma* L. (Griffiths 1960).

Der Anteil von (-)-Epicatechin am entfetteten Trockengewicht frischer Kakaosamen schwankt in Abhängigkeit von der untersuchten Kakaoprobe. So finden z. B. Kim und Keeney 1984 in 8 verschiedenen Genotypen Mengen zwischen 43270 und 21890 mg Epicatechin kg^{-1} ff TM; Tomas-Barberán *et al.* 2007 quantifizieren 25650 mg kg^{-1} ff TM, und in den von Gotti *et al.* 2006 untersuchten Kakaoproben liegt der Anteil bei 15300 bzw. 5700 mg kg^{-1} ff TM. Weitere Literaturdaten liefen wieder andere Werte, die überwiegend innerhalb des genannten Bereiches liegen.

Während Kim und Keeney 1984 die praktische Bedeutung der von ihnen gefundenen Unterschiede im (-)-Epicatechingehalt verschiedener Kakaoklone in Frage stellen, hält Clapperton *et al.* 1994b den spezifischen Gehalt an (-)-Epicatechin frischer Kakaosamen für genetisch determiniert. Der Autor diskutiert die Bedeutung des Ausgangsgehaltes an (-)-Epicatechin in frischen Kakaosamen als entscheidend für die Qualität des nach Abschluss der Kakaoverarbeitung entstehenden Flavours. Im Gegensatz dazu findet Griffiths 1960 keine klonspezifischen Unterschiede in Gehalt und Zusammensetzung der phenolischen Inhaltsstoffe.

Der Zusammenhang des (-)-Epicatechingehaltes mit der geographischen Herkunft frischer Kakaosamen wurde bisher noch kaum untersucht. Laut Figueira *et al.* 1997 spielt die geographische Herkunft jedoch nur für die Härte des Kakaofetts, aber nicht für dessen Flavour (und somit für dessen Catechingehalt) eine Rolle.

Zusammen mit seinem diastereoisomeren Gegenstück (-)-Epicatechin ist das (+)-Catechin (Abb. 19) der am weitesten verbreitete Vertreter aus der Gruppe der Flavan-3-ole im Pflanzenreich (Haslam 1998). Im Vergleich zum (-)-Epicatechin ist der Gehalt dieser Verbindung im Keimblattgewebe reifer Kakaosamen jedoch deutlich geringer. So finden Tomas-Barberán *et al.* 2007 646 mg (+)-Catechin kg⁻¹ ff TM, während Gotti *et al.* 2006 Gehalte von 450 bzw. 140 mg kg⁻¹ ff TM an dieser Substanz quantifizieren. Auch bezüglich des Gehaltes an (+)-Catechin gibt es somit starke, probenspezifische Unterschiede, zu deren Ursachen jedoch bisher keine Studien vorliegen.

Das diastereoisomere Paar (+)-Gallocatechin und (-)-Epigallocatechin (Abb. 19) kommt laut Haslam 1998 vor allen Dingen in entwicklungsgeschichtlich älteren Pflanzenfamilien wie etwa den *Coniferae* vor. Dennoch gibt es auch Publikationen, welche einen Nachweis dieser Inhaltsstoffe in *T. cacao* L. dokumentieren.

Forsyth 1952a identifizierte erstmals Spuren von Epigallocatechin und Gallocatechin (mit jeweils unbekannter optischer Rotation) in einem Extrakt frischer Kakaosamen. Derselbe Autor identifizierte die beiden von ihm gefundenen Substanzen einige Jahre später als (+)-Gallocatechin und (-)-Epigallocatechin (Forsyth 1955). Beide Flavan-3-ole werden auch von Rohan 1958 und Griffiths 1960 im Keimblattgewebe der von ihnen untersuchten Kakaoextrakte gefunden.

Unter den Publikationen jüngeren Datums, welche sich mit der Analytik phenolischer Inhaltsstoffe von *T. cacao* L. auseinandersetzen, werden nur von Wollgast 2005 die Flavan-3-ole (+)-Gallocatechin und (-)-Epigallocatechin erneut nachgewiesen. Der Autor findet dabei geringste Mengen beider Substanzen, welche um ein Vielfaches unter dem Gehalt an den beiden anderen Catechinen (s. o.) liegen, und welche er daher auch nicht quantitativ auswertet.

Sánchez-Rabareda *et al.* 2003 können trotz gezielter Suche nach diesen beiden Substanzen nicht einmal Spuren von (+)-Gallocatechin und (-)-Epigallocatechin in Samen von *T. cacao* L. nachweisen.

2.1.4.2 Die Anthocyane in Kakaosamen

Griffiths 1960, der die Samen verschiedener Arten der Gattung *Theobroma* auf ihren Gehalt phenolischer Inhaltsstoffe untersuchte, wies nur in Samen von *T. cacao* L. Anthocyane nach. Diese werden in unterschiedlicher Konzentration in die Polyphenolzellen der Keimblätter eingelagert, deren Färbung dadurch von Tiefviolett über Rosa bis zum Gelblich-Weiß (frei von Anthocyanen) variiert.

Im Durchschnitt machen Anthocyane nur etwa 4 % (Forsyth und Quesnel 1963, Bitsch 2002) bzw. 4,5 % (Baigrie 1994) des Polyphenolgehaltes von Kakaosamen aus. Der weitaus größte Anteil wird dabei von Cyanidin-3-β-D-galactosid und Cyanidin-3-α-L-arabinosid gebildet (Abb. 19). Diese beiden Substanzen wurden in Kakaosamen erstmals durch Forsyth und Quesnel 1957 identifiziert. 2 weitere Cyanidine, ein Rutinosid

sowie ein mit einer Pentose verknüpftes Cyanidin, wurden unlängst durch Cakirer 2003 in Kakaosamen nachgewiesen. Die beiden Substanzen sind jedoch offenbar nur in geringsten Spuren vorhanden und spielen somit für den Gesamtgehalt phenolischer Kakao-Inhaltsstoffe keine Rolle.

2.1.4.3 Die Flavonole in Kakaosamen

Die bisher veröffentlichten Nachweise von Vertretern aus der Gruppe der Flavonole in Samen von *T. cacao* L. beschränken sich auf Quercetin und einige seiner Glycoside (Abb. 19).

Diese Substanzen werden erstmals von Rohan und Connell 1964 dokumentiert, welche Quercetin sowie Quercetin-3-*o*-glucosid aus den Keimblättern von *T. cacao* L. isolierten. Neben freiem Quercetin und seinem Glucosid wurden inzwischen noch Quercetin-3-*o*-galactosid, Quercetin-3-*o*-arabinosid und Quercetin-3-*o*-Glucuronid aus Kakaosamen isoliert. Tab. 1 ordnet diesen Substanzen die jeweiligen Veröffentlichungen zu, in welchen sie als Inhaltsstoff von Kakaosamen dokumentiert werden:

Tab. 1: Veröffentlichte Nachweise von Quercetin und seinen Glycosiden in Kakaosamen

Substanz	Publikation
Quercetin-3- <i>o</i> -glucosid	a - f, h, j
Quercetin-3- <i>o</i> -galactosid	b, f - i
Quercetin-3- <i>o</i> -arabinosid	c, d, f - j
Quercetin-3- <i>o</i> -glucuronid	e, g
Quercetin	a, c, e, g, j

a: Rohan und Connell 1964; **b:** Jalal und Collin 1977; **c:** Sanbongi *et al.* 1998; **d:** Hammerstone *et al.* 1999; **e:** Lamuela-Raventós *et al.* 2001; **f:** Sánchez-Rabaneda *et al.* 2003; **g:** Wollgast 2005; **h:** Stark *et al.* 2005; **i:** Leco Corporation 2006; **j:** Tomas-Barberán *et al.* 2007

Seltener als Veröffentlichungen zum qualitativen Nachweis von Quercetin und seinen Glycosiden in Kakaosamen sind Publikationen, in denen der Gehalt an diesen Substanzen auch quantitativ ermittelt wurde. Lamuela-Raventós *et al.* 2001 finden 230 mg kg⁻¹ Quercetin-3-*o*-glucosid (Isoquercitrin), 50 mg kg⁻¹ Quercetin-3-glucuronid und 20 mg kg⁻¹ Quercetin in Kakao, wobei nicht spezifiziert wird, ob sich die Mengenangaben auf einen Extrakt frischer oder fermentierter Samen mit oder ohne Einbeziehung des Fettgehaltes beziehen.

Tomas-Barberán *et al.* 2007 finden in frischen Kakaosamen 90 mg kg⁻¹ TM Quercetin, 300 mg kg⁻¹ TM Quercetin-arabinosid, sowie 250 mg kg⁻¹ TM eines Quercetin-hexosids, bei dem es sich nach Angaben der Autoren möglicherweise um ein Glucosid handelt. Die in Kakaosamen vorhandenen Mengen an Quercetin und seinen Glycosiden sind demnach

sehr gering und machen nach Wollgast 2005 gemeinsam etwa einen Anteil von 2-5 % am Gesamt-Polyphenolgehalt fermentierter Kakaosamen aus.

Wollgast 2005 stellt eine Zunahme des freien Quercetins im Verlauf der Weiterverarbeitung von Rohkakao fest und geht davon aus, dass dies auf eine Deglycosylierung der vorhandenen Quercetin-glycoside infolge der Prozessierung zurückzuführen ist. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei dem in Kakaosamen nachgewiesenen, freien Quercetin möglicherweise grundsätzlich um ein Artefakt handelt, dass in unbehandelten frischen Kakaosamen nicht vorkommt.

2.1.4.4 Weitere Monomere aus der Gruppe der Flavonoide in Kakaosamen

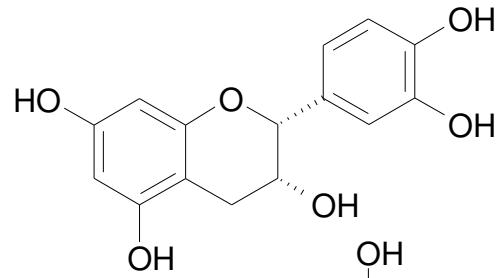
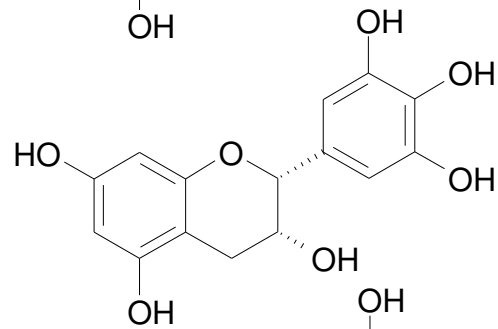
Neben den oben aufgeführten phenolischen Inhaltsstoffen finden sich in Kakaosamen einige weitere Substanzen aus der Gruppe der monomeren Flavonoide, deren Existenz durch einige Veröffentlichungen der letzten Jahre mit Hilfe modernster Analyseverfahren nachgewiesen wurde. Obwohl diese Flavonoide in den jeweiligen Publikationen nicht quantifiziert werden, ist anzunehmen, dass diese nur in Spuren im Kotyledonargewebe vorhanden sind und bezogen auf den Gesamtgehalt phenolischer Inhaltsstoffe von Kakao keine Rolle spielen.

Sánchez-Rabaneda *et al.* 2003 isolierten per LC/ESI/MS- Verfahren aus einem Extrakt frischer Kakaosamen die Flavone Apigenin, Vitexin, Isovitexin sowie Luteolin und dessen Glycoside Luteolin-7-*o*-glucosid, Isoorientin und Orientin. Daneben identifizieren die Autoren das Flavanon Naringenin und sein -7-*o*-glucosid. Letztgenannte Substanz wird ebenso wie Luteolin-7-*o*-glucosid auch von Stark *et al.* 2005 nachgewiesen. Die Autoren identifizieren im Kakaoextrakt außerdem Apigenin-8-C-glucosid sowie Apigenin-6-C-glucosid.

Die Substanzen Isovitexin, Vitexin und 7-*o*-glucoside von Apigenin, Luteolin and Chrysoeriol wurden bereits von Jalal und Collin 1977 aus Blättern von *T. cacao* L. isoliert, wo sie offenbar in größeren Mengen vorkommen als in den Kakaosamen.

Flavan-3-ole**(-)-Epicatechin**

L-Epicatechin

 $C_{15}H_{14}O_6$; 290,27**(-)-Epigallocatechin** $C_{15}H_{14}O_7$; 306,3**(+)-Catechin**

Cianidanol; D-Catechin;

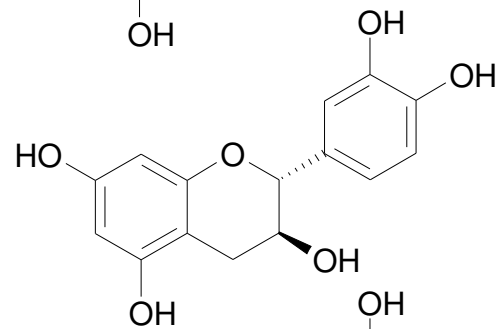
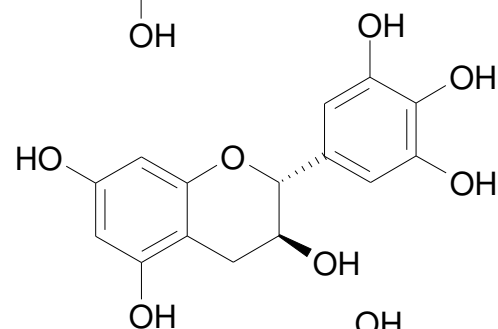
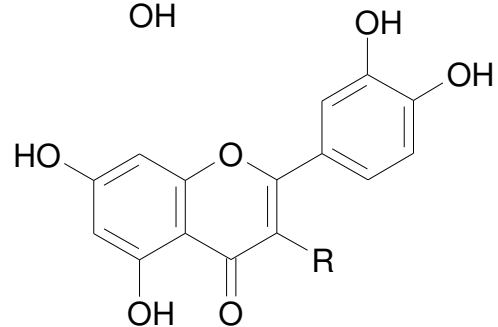
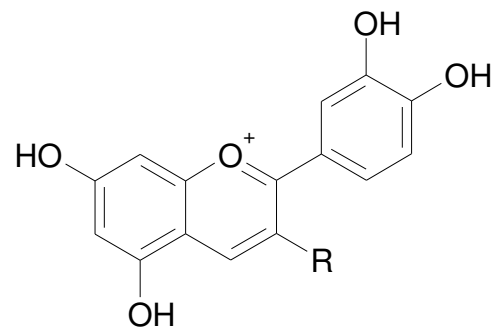
 $C_{15}H_{14}O_6$; 290,27**(+)-Gallocatechin** $C_{15}H_{14}O_7$; 306,3**Flavonole****R=OH: Quercetin** $C_{15}H_{10}O_7$; 302,24**R=Galactose: Quercetin-3-galactosid, Hyperin** $C_{21}H_{20}O_{12}$; 464,39**R=Glucose: Quercetin-3-glucosid, Isoquercitrin** $C_{21}H_{20}O_{12}$; 464,39**Anthocyane****R=Galactose:****Cyanidin-3-beta-D-galactosid** $C_{21}H_{21}O_{11}$; 484,84**R=Arabinose:****Cyanidin-3-alpha-L-arabinosid** $C_{20}H_{19}O_{10}$; 454,82

Abb. 19: In Samen von *T. cacao* L. beschriebene, monomere Flavonoide mit Molekulargewicht in $[g\ mol^{-1}]$

2.1.4.5 Die Proanthocyanidine in Kakaosamen

Aufgrund der mutmaßlichen ernährungsphysiologischen Bedeutung der Proanthocyanidine (siehe 2.1.6) bildet die Analyse dieser Substanzen aus Kakaosamen einen Forschungsschwerpunkt von Mars Inc. (Hackettstown, New Jersey, USA). Seit Hammerstone *et al.* 1999 und Adamson *et al.* 1999 werden regelmäßig Arbeiten über diese Stoffgruppe veröffentlicht. Zuletzt publizierten Kelm *et al.* 2006 ein neues Verfahren zur Auftrennung der einzelnen Oligomere.

Aufgrund der Dominanz von (-)-Epicatechin unter den Flavan-3-olen (siehe 2.1.4.1) handelt es sich bei den Proanthocyanidinen in Kakaosamen hauptsächlich um Procyanidine (siehe 2.1.3.1). Nach Porter *et al.* 1991 sowie Wollgast 2005 ist das Dimer B-2 das mengenmäßig wichtigste Procyanidin in Kakaosamen (s. o.), gefolgt von dem Trimer Procyanidin C-1 (3 [4 β →8] verknüpfte Epicatechin-Einheiten) und dem Dimer B-5 (2 [4 β →6] verknüpfte Epicatechin-Einheiten). Daneben kommen auch dimere und trimere Procyanidine des A-Typs vor, die mit Arabinose oder Galactose verknüpft sind (Porter *et al.* 1991, Wollgast 2005).

Lambert *et al.* 2003 finden mit 20800 bis 80500 mg kg⁻¹ Trockenmasse sehr unterschiedliche Procyanidingehalte in frischen Kakaosamen verschiedener geographischer und genetischer Herkunft. Adamson *et al.* 1999 finden in Rohkakaomasse Gehalte von 6600 bis 15500 mg kg⁻¹ an Procyanidinen (Di- bis Decamere). Nach ihren Ergebnissen liegt der Gehalt aller Procyanidine zusammen ungefähr 3mal höher als jener der monomeren Flavan-3-ole, wobei der prozentuale Anteil der einzelnen Oligomere am Gesamt-Procyanidingehalt mit zunehmender Größe abnimmt. Der von Adamson *et al.* 1999 ermittelte Gehalt an dimeren Procyanidinen liegt bei etwa 80 % bis 90 % des Gehaltes an monomeren Flavan-3-olen ((+)-Catechin und (-)-Epicatechin). Ein ähnliches Mengenverhältnis zwischen (-)-Epicatechin und Procyanidin B-2 ermitteln auch Tomas-Barberán *et al.* 2007. Dieses Mengenverhältnis zwischen monomeren Flavan-3-olen und Procyanidinen in Rohkakaomasse wird durch Kealey *et al.* 1998, Counet *et al.* 2004 und Wollgast 2005 nicht bestätigt. Übereinstimmend ermitteln auch diese Autoren eine Abnahme der Menge an Oligomeren in Abhängigkeit von ihrer Größe, jedoch liegt ihr Gesamtgehalt nur bei höchstens 2/3 des Gehaltes an monomeren Flavan-3-olen. Der Gehalt an dimeren Procyanidinen beträgt dabei nur etwa die Hälfte des Gehaltes an monomeren Flavan-3-olen.

2.1.5 Die biologische Funktion der Flavonoide in Kakaosamen

Als mengenmäßig dominierende Gruppe phenolischer Inhaltsstoffe in Samen von *T. cacao* L. sind es vor allen Dingen die mono-, oligo- und polymeren Catechine, deren spezifische Eigenschaften auf ihre biologische Funktion schließen lassen sollten. Eine entscheidende Bedeutung dürfte dabei ihrer Wirkung als Repellents gegen Herbivoren zukommen. Diese wurde in Bezug auf pflanzliche Tannine erstmals durch Bate-Smith 1973b postuliert. Dabei bezieht sich der Autor vor allen Dingen auf die Eigenschaft der Tannine, mit Proteinen zu kondensieren. Dadurch wird einerseits deren Verfügbarkeit im verzehrten Gewebe herabgesetzt, andererseits kommt es zu einer Inaktivierung von Verdauungsenzymen im Körper des Prädatoren.

Nach Stark *et al.* 2005 sowie Hansen *et al.* 1998 tragen die mono- und oligomeren Flavan-3-ole in Kakaosamen maßgeblich zum bitteren Geschmack und zur Adstringens (und somit zur Repellent-Wirkung) von Kakao bei. Innerhalb der Gruppe zeichnen sich die monomeren Flavan-3-ole durch einen eher bitteren Geschmack aus, während polymere Flavan-3-ole eher adstringierend als bitter sind. Hierbei sind vor allen Dingen die löslichen Komponenten aus der Gruppe der polymeren Flavan-3-ole für die Adstringens verantwortlich (Bonvehi und Coll 1997).

Im Falle von Kakaosamen liegt es nahe, von einer Funktion der mono- und oligomeren Catechine als Repellents auszugehen, denn Kakaosamen werden in ihrer natürlichen Umgebung vor allen Dingen durch Affen, Nager und Vögel verbreitet, welche die süße Fruchtpulpa verzehren. Mit Sicherheit würden diese Tiere auch die nährstoffreichen und nur von einer dünnen Testa umgebenen Samen als Nahrungsquelle nutzen, wenn diese nicht durch ihren hohen Gehalt an Procyanidinen geschützt wären.

Zusätzlich gibt es Hinweise auf die Bedeutung phenolischer Kakao-Inhaltsstoffe in der Abwehr von Pilzkrankheiten. Brownlee *et al.* 1990 und 1992 sowie Andebrhan *et al.* 1995 wiesen nach, dass Kakao-Procyanidine das Wachstum des Pilzes *Moniliophthora perniciosa* (ehem. *Crinipellis perniciosa*) hemmen, der die so genannte "Hexenbesen-Krankheit" auslöst. Ndoumou *et al.* 1995 isolierten höhere Gehalte an Flavonoiden aus Fruchtwänden und Samen von Kakao-Klonen, welche eine größere Resistenz gegen die so genannte „Black Pod Disease“ aufwiesen. Diese Pilzkrankheit wird durch mehrere Arten der Gattung *Phytophthora* verursacht. Nach Blaha und Letode 1987 erhöhen sich die Konzentrationen phenolischer Inhaltsstoffe in den Fruchtwänden von Kakao nach der Infektion mit *Phytophthora*. Dabei scheint sich die Fungizid-Wirkung der Procyanidine mit steigendem Polymerisierungsgrad zu verstärken. Laut Scalbert 1991 basieren die antimikrobiellen Eigenschaften der Tannine auf deren Kapazität, organische Substanzen zu binden. Diese erhöht sich mit steigendem Molekulargewicht der Procyanidine.

2.1.6 Die Bedeutung der Kakao-Flavonoide aus verarbeitungstechnischer und ernährungswissenschaftlicher Sicht

Die Adstringenz der mono- bis polymeren Procyanidine, auf welcher ihre biologische Funktion innerhalb des Kakaosamens wahrscheinlich basiert (s. o.), spielt auch für die Qualität des Kakaoflavors eine Rolle. Zumeist wirken sich hier stark ausgeprägte Bitterkeit und Adstringenz eher negativ auf das gewünschte Aroma aus (Clapperton *et al.* 1994a und b). Eine Ausnahme scheinen hierbei die mit Zuckerresten verknüpften Kakao-Anthocyane zu bilden, welche offenbar keine ausgeprägten bitteren oder adstringierenden Eigenschaften besitzen (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. T. Hofmann, Lebensmittelchemisches Institut, Universität Münster, 2006).

Zu den allgemein positiv bewerteten Eigenschaften der Kakao-Flavonoide gehört hingegen ihre antioxidative Aktivität. Letztere wird nach Rice-Evans *et al.* 1997 durch folgende Attribute determiniert:

- Das Reduktionspotential, d. h. die Fähigkeit des Moleküls, H⁺-Ionen abzugeben bzw. Elektronen aufzunehmen,
- Die Stabilität des resultierenden, aus dem Antioxidans hervorgegangenen Radikals,
- Das Potential, Chelatkomplexe mit Übergangsmetallen zu bilden.

Die antioxidative Aktivität der Flavonoide basiert auf ihrem hydroxylierten Phenylchroman-Ringsystem (Abb. 15), innerhalb dessen sich ein ungepaartes Elektron besonders energiearm delokalisieren und somit stabilisieren lässt.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche *in vitro* Verfahren zur Messung des antioxidativen Potentials einer Substanz entwickelt. Besonders häufig angewandt wird der TEAC –Test (= Trolox® Equivalent Antioxidative Capacity), welcher in seinem Grundprinzip von Miller *et al.* 1993 entwickelt wurde. Auf Basis dieses Verfahrens kann eine Hierarchie der antioxidativen Aktivität einzelner Flavonoide aufgestellt werden, die sich durch Unterschiede ihres molekularen Aufbaus auszeichnen. So tragen nach Rice-Evans *et al.* 1997 folgende strukturellen Details offenbar maßgeblich zur Steigerung der antioxidativen Aktivität bei:

- Das Vorhandensein einer *o*-3', 4'-dihydroxy-Substitution am Ring B,
- Der Besitz einer meta- 5,7-dihydroxy-Gruppe am Ring A,
- Die Kombination einer 2,3-Doppelbindung mit einer 4-Ketogruppe und einer 3-Hydroxygruppe am Ring C.

Frühe Untersuchungen zur antioxidativen Aktivität von Kakaoextrakten setzen einen Schwerpunkt auf ihre Eigenschaft, verderbliche Inhaltsstoffe in Nahrungsmitteln wie etwa Butterfett (Mueller 1954) oder Sonnenblumenöl (Ziegleder und Sandmeier 1981) zu stabilisieren. Zu einer deutlichen Verlagerung dieses Schwerpunktes kam es in den späten 90er Jahren, nachdem die Kakao- und Schokoladenindustrie den Begriff des „Functional Food“ auch auf ihre Produktpalette übertragen hatte. Seither erscheinen jedes Jahr Dutzende von Publikationen, welche sich mit der ernährungsphysiologisch positiven Wirksamkeit von Kakao-Polyphenolen (und hier maßgeblich den Flavan-3-olen und den daraus abgeleiteten Procyanidinen) auseinandersetzen. In erster Linie basierend auf der antioxidativen Kapazität dieser Substanzen werden ihnen u. a. folgende gesundheitsrelevante Eigenschaften zugeschrieben:

- Positive Beeinflussung des Herz-Kreislaufsystems durch Verhinderung von Arteriosklerose, LDL-Oxidation und Aktivierung von Blutplättchen sowie durch Dilatation der Arterien etc. (Rein *et al.* 2000, Karim *et al.* 2000, Osakabe *et al.* 2002, Mao *et al.* 2003, Engler *et al.* 2004, Sies *et al.* 2005, Perré 2005, Heiss *et al.* 2005, Schroeter *et al.* 2006 u. a.),
- Antimutagene Eigenschaften und Verhinderung von Krebsentstehung (Jourdain *et al.* 2006, Kenny *et al.* 2004, Yamagishi *et al.* 2000 u. a.),
- Modulation des menschlichen Immunsystems (Ramiro *et al.* 2005a und b, Sanbongi *et al.* 1997 u. a.),
- Schutz von Zellmembranen u. a. durch den Erhalt ihrer Fluidität und Schutz vor Oxidation (Verstraeten *et al.* 2004 und 2005).

Eine ausführliche Darstellung aller bisher publizierten Aspekte der möglichen gesundheitsrelevanten Bedeutung von Kakao-Polyphenolen würde den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen. Übersichtsartikel zu diesem Themenbereich wurden u. a. von Wollgast und Anklam 2000a, Borchers *et al.* 2000, Engler und Engler 2004, Lamuela-Raventós 2005, Wollgast 2005 sowie von Ding *et al.* 2006 veröffentlicht.

Die ernährungsphysiologisch positive Wirkung des Kakao-Konsums wird neben den darin enthaltenen monomeren Flavonoiden auch den mengenmäßig leicht überwiegenden, oligo- und polymeren Procyanidinen zugeschrieben (siehe 2.1.4.5). Eine mögliche Beeinflussung des Stoffwechsels durch phenolische Substanzen hängt jedoch stark ab von deren Bioverfügbarkeit, d. h. von deren Aufnahme in den systemischen Kreislauf, und hier speziell den Blutkreislauf. Tatsächlich wird eine Resorption physiologisch wirksamer Mengen monomerer Flavonoide im Magen-Darm-Trakt durch zahlreiche *in vivo* Studien belegt. So finden Holt *et al.* 2002 zum Zeitpunkt von 2 h nach der Aufnahme eines Kakaoextraktes durchschnittlich $5,92 \mu\text{mol l}^{-1}$ (-)-Epicatechin im Blutplasma menschlicher Probanden. Von den oligo- und polymeren Procyanidinen sind nach dem Konsum von Kakaoextrakten jedoch allenfalls Dimere, und auch diese nur in

vergleichsweise geringen Mengen im nanomolaren Bereich im Blut nachweisbar (Holt *et al.* 2002, Baba *et al.* 2002). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die ernährungsphysiologische Relevanz oligo- und polymerer Procyanidine aus Kakao eher gering ist, da die Wirkung dieser Substanzen aufgrund fehlender Resorption auf den Gastro-Intestinaltrakt beschränkt bleibt.

Fraglich ist bis heute, ob Procyanidine während ihrer Passage durch den Magen-Darm-Trakt z. T. in ihre (-)-Epicatechin-Monomere aufgespalten werden, welche anschließend resorbiert werden könnten. Für diese Möglichkeit spricht eine Studie von Zhu *et al.* 2002, in welcher oligomere Procyanidine mit Hilfe künstlicher Verdauungssäfte degradiert werden. Laut einer *in vivo* Untersuchung von Rios *et al.* 2002 bleiben Kakao-Procyanidine im menschlichen Verdauungssystem jedoch stabil.

2.2 Die Biologie, Variabilität und Verbreitung von *T. cacao* L.

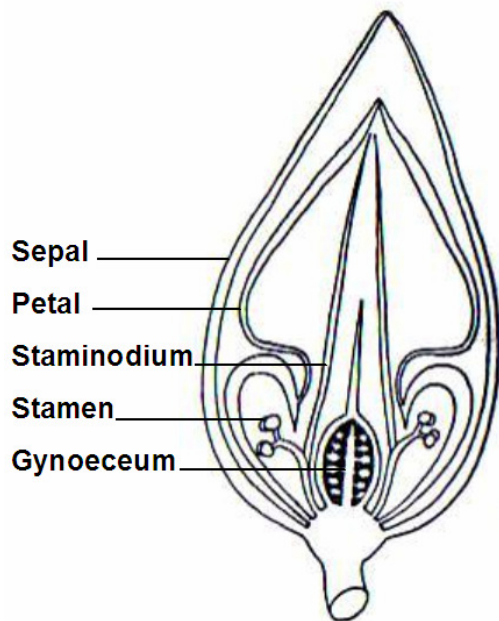
2.2.1 Die biologischen Merkmale des Kakaobaums

Der Kakaobaum *Theobroma cacao* L. gehört zur Familie der *Malvaceae* (Alverson *et al.* 1999). Er bildet eine von 22 Arten seiner Gattung, die im tropischen Süd- und Mittelamerika beheimatet ist (Cuatrecasas 1964). Ausschließlich die Samen von *T. cacao* L. werden zur kommerziellen Herstellung von Kakao- und Schokoladenprodukten verwendet. Sie verleihen der Art eine große ökonomische Bedeutung, sodass sie mittlerweile im gesamten Tropengürtel der Erde angebaut wird, teilweise sogar außerhalb des Bereiches zwischen 20° nördlicher und 20° südlicher Breite.

T. cacao L. ist ein kleiner, sympodial wachsender Baum, der in Kultur selten höher als 4-8 m wird (Abb. 20 b, Lieberei und Reisdorff 2007). Ursprünglich stammt er aus dem Unterwuchs des amazonischen Regenwaldes. Angepasst an die dort vorherrschenden klimatischen Bedingungen ist der Kakaobaum abhängig von hoher Luftfeuchtigkeit und konstant warmen Temperaturen, die im Idealfall meist zwischen 20°C und 30°C liegen (Cuatrecasas 1964). Er benötigt eine jährliche Niederschlagsmenge von 2.000-8.000 mm und gedeiht nur bei ausreichender Beschattung. Seine natürlichen Standorte finden sich meist auf relativ fruchtbaren und neutralen Böden in den Niederungen tropischer Urwaldflüsse.

Ab einem Alter von 3–6 Jahren erfolgt die physiologische Reife eines Kakaobaums (Saunders *et al.* 2004). Nun können sich das ganze Jahr über etwa 1 cm große Blüten in kleinen Polstern an Stamm (Kauliflorie) und an den stärkeren Seitenästen (Ramiflorie) des Baumes bilden.

Aus den oberständigen, mit 5 Fruchtfächern und einer axialen Plazenta versehenen Fruchtknoten (Abb. 20 a) wachsen nach erfolgreicher Bestäubung innerhalb von etwa 5 bis 6 Monaten etwa 20 bis 30 cm lange, zumeist oval-längliche Trockenbeeren heran (Lieberei und Reisdorff; Abb. 20 b). Ihr Exo- und Mesokarp ist fest und faserig, während das Endokarp und die Scheidewände im Verlauf der Reife zu einem süß-aromatischen, gelblichen Mus verschleimen, das die Testa der großen Samen fest umschließt (Abb. 21, Roth 1977). Diese Fruchtpulpa wird an den natürlichen Standorten des Kakaobaumes von Säugetieren (Affen und diverse Nager) und großen Vögeln konsumiert. Diese brechen dafür das Perikarp der im reifen Zustand am Baum verbleibenden Kakaofrüchte auf (Cuatrecasas 1964; dos Santos *et al.* 1992). Die länglich-ovalen Samen werden dabei nicht verzehrt.



a)



b)

Abb. 20: *T. cacao* L.; Wuchsform, Blüten und Früchte.

a) Blütenknospe längs (Quelle: Cuatrecasas 1964);

b) Kakaobaum (Criollo): sympodiale Wuchsform mit Früchten am Stamm und an den Seitenästen
(Foto von Alexis Zambrano, INIA Mérida)

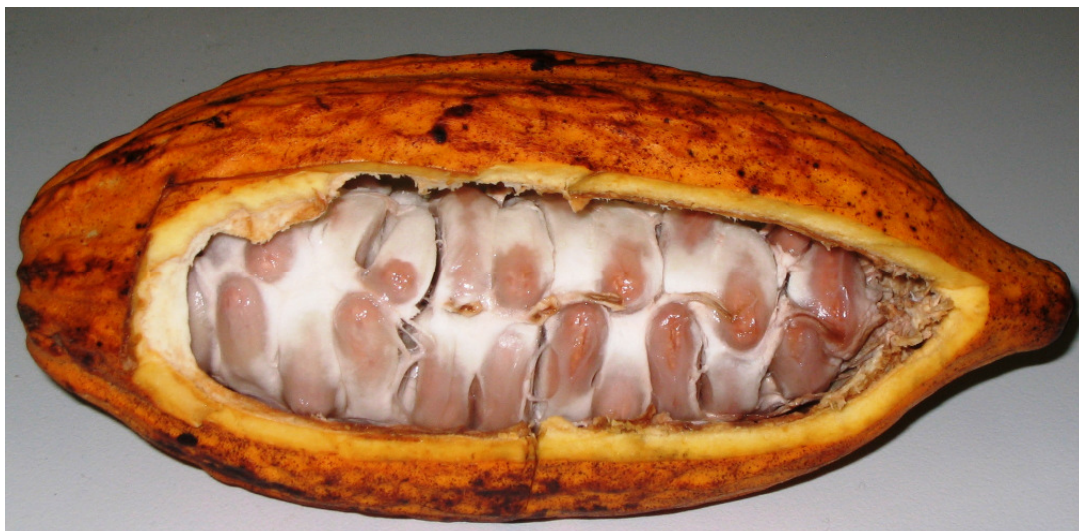


Abb. 21: Frucht von *T. cacao* L., geöffnet

2.2.1.1 Die Embryogenese von *T. cacao* L.

Die frühe Entwicklung der befruchteten Samenanlage von *T. cacao* L. wird ausführlich in Cheesman 1927 beschrieben. Demzufolge beginnt etwa 3 Tage nach der Befruchtung

zunächst die Entwicklung des Endosperms. Dieses wächst über einen Zeitraum von etwa 50 Tagen ausschließlich nuklear. Erst anschließend kommt es im Bereich der Mikropyle zur Ausbildung erster Zellwände. Von diesem Zeitpunkt an wächst das Endosperm sehr rasch, wobei das zuvor gut ausgeprägte Perisperm schnell abgebaut wird.

Die Zygote teilt sich laut Cheesman 1927 erst ungefähr 40 bis 50 Tagen nach der Befruchtung zum ersten Mal. Der Autor findet etwa 90 Tage nach der Befruchtung (in einer Frucht von ca. 10 cm Länge) einen zu diesem Zeitpunkt kugelförmigen Embryo mit einem Durchmesser von etwa 0,2 mm (Abb. 22 a). Dieser erreicht anschließend das für dikotyle Embryos typische herzförmige Stadium (Abb. 22 b) und bildet zumindest in der somatischen Embryogenese ein Haustorium aus (Dos Santos und Machado 1989). Der junge Embryo wächst laut Cheesman 1927 noch bis etwa 120 Tage nach der Befruchtung sehr langsam, sodass er zu diesem Zeitpunkt erst ungefähr 3,5 mm lang ist. Neben einer Embryonalachse mit Spross- und Wurzelpol zeigt er nun 2 bereits gut entwickelte Kotyledonen mit ausgeprägten Blattadern (Abb. 22 c).

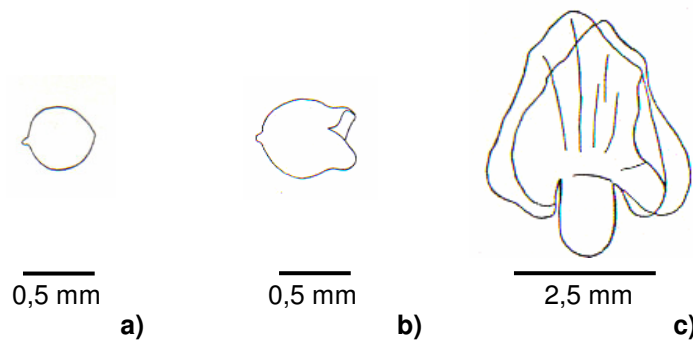


Abb. 22: Frühe Embryonalstadien von *T. cacao* L. nach Cheesman 1927
a), b): aus einer ca. 90 Tage alten Frucht, **c)** etwa 120 Tage nach der Befruchtung

Anschließend folgt eine Phase sehr schnellen Wachstums, welches ein 130 bis 150 Tage alter Embryo nahezu abgeschlossen hat (Cheesman 1927). Neben einer Streckung der Embryonalachse auf etwa 7 mm wachsen dabei vor allen Dingen die Speicherkeimblätter heran. Dabei erreichen sie rasch die von den Integumenten vorgegebenen räumlichen Begrenzungen und beginnen sich während ihres fortgesetzten Wachstums immer stärker zu furchen und zu falten (Abb. 24). Im reifen Samen füllen die Keimblätter fast den gesamten zur Verfügung stehenden Raum innerhalb der Samenschale aus während das Endosperm weitestgehend degeneriert (Sossou Dangou *et al.* 2002).

2.2.1.2 Der Aufbau des reifen Kakaosamens

Reife Kakaosamen sind bis zu 40 mm lang und 22 mm breit. Ihre ledrige Testa ist etwa 350 bis 400 μm dick und geht aus 2 Integumenten hervor (Abb. 23). Dabei besteht der Bereich des inneren Integuments aus wenigen, stark zusammengedrückten Zelllagen und schließt nach außen mit einer leicht lignifizierten Sklereidschicht ab, deren Durchmesser bei knapp 10 μm liegt (Andersson *et al.* 2006, Müller 1998). Das aus dem

äußeren Integument gebildete Gewebe ist dicker und stärker ausdifferenziert. Es enthält neben einem Leitbündelsystem auch große, mit Schleim gefüllte Räume, welche eine enorme Quellbarkeit besitzen (Abb. 23). In der gesamten Testa von *T. cacao* L. verteilt finden sich auch Polyphenolspeicherzellen (Andersson et al. 2006, Müller 1998, Cheesman 1927).

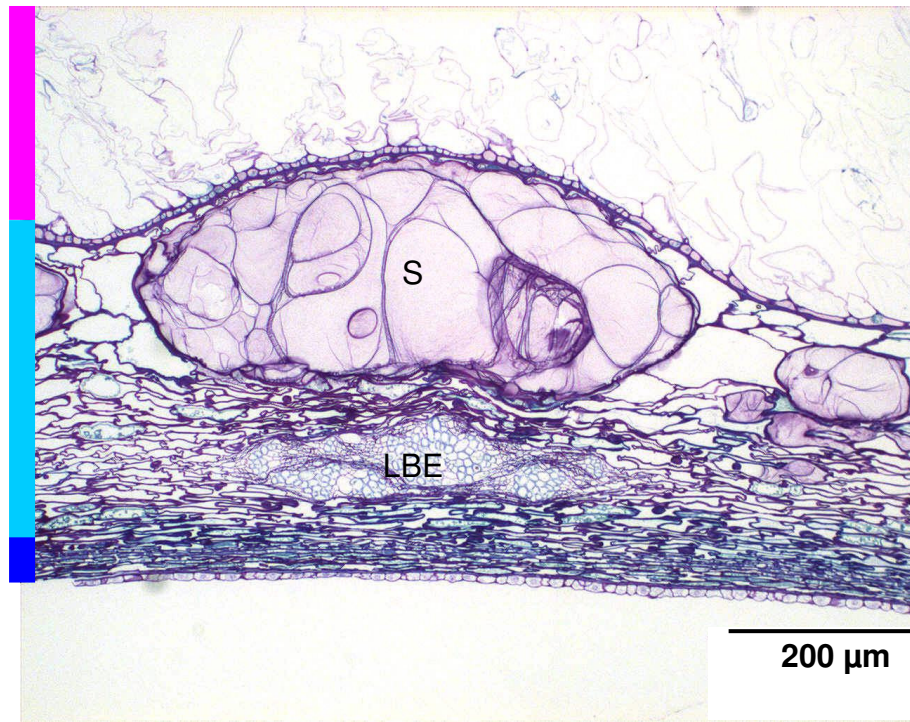


Abb. 23: Semidünnschnitt durch die Testa von *T. cacao* L. (Präparation siehe 3.14.4) **rosa Balken:** anhaftende Pulpa; **hellblauer Balken:** äußeres Integument; **dunkelblauer Balken:** inneres Integument; **S:** Schleimzellen; **LBE:** Leitbündelelement

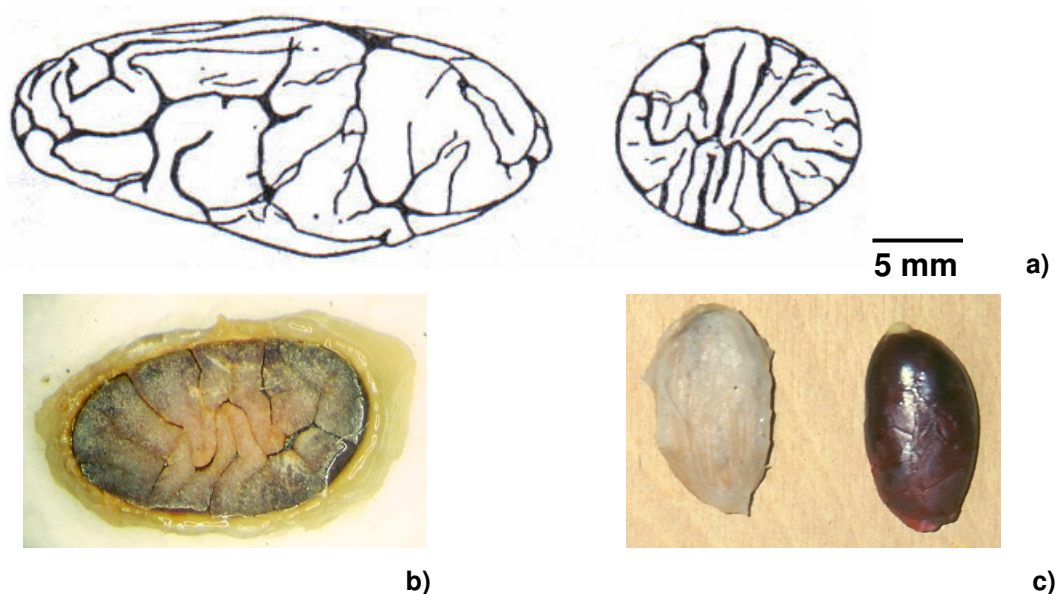


Abb. 24: *T. cacao* L., Embryo und Samen.
a) Seitenansicht (links) und Querschnitt (rechts) (Quelle: Cuatrecasas 1964);
b) Querschnitt durch reifen Forastero-Samen; **c)** Forastero-Samen mit Testa und anhaftender Pulpa (links), sowie ohne Testa (rechts)

Zwischen Testa und Embryo des reifen Kakaosamens sind Reste des Endosperms in Form einer zarten Zellschicht zu finden, die auch als „Silberhäutchen“ bezeichnet wird. Das Silberhäutchen umhüllt den großen Embryo bis in die von den Keimblättern gebildeten Furchen hinein (Müller 1998, Cheesman 1927).

Über 90 % des Embryos werden von den beiden fleischigen Speicherkeimblättern gebildet (Duncan und Todd 1972). Diese sind mehrfach in sich gefaltet und stark gefurcht bzw. ruminiert (Abb. 24).

Die von einem Netz aus Leitbündelelementen und Prokambiumsträngen durchzogenen Kotyledonen von *T. cacao* L. dienen in erster Linie der Einlagerung von Speicherstoffen, welche bei der Keimung als Energiereserven zur Verfügung stehen. Das Speichergewebe besteht zu etwa 90 % aus polyedrischen, nahezu isodiametrischen Speicherzellen (SZ). Ihr Durchmesser beträgt im Durchschnitt etwa 20-25 µm. Die SZ sind nahezu vollständig von den eingelagerten Reservestoffen ausgefüllt. Ca. 60 % des Zellinhalts wird von Lipidvakuolen eingenommen, etwa 25 % von Proteinvakuolen und etwa 5 % von stärkehaltigen Plastiden (Müller 1998).

Das Speichergewebe enthält einen Anteil von etwa 10 % Idioblasten, die große Mengen phenolischer Substanzen speichern und daher als Polyphenolzellen (PZ) bezeichnet werden. Von den SZ unterscheiden sie sich durch eine große Vakuole, die nach Jaenicke 1973 im Durchschnitt 79 % des Gesamtzellinhalts ausfüllt. In diese Vakuole werden polyphenolische Substanzen, aber auch die Purinalkaloide Theobromin, Theophyllin und Coffein eingelagert (Jaenicke 1973). Das restliche Zelllumen enthält neben Zellkern und -plasma noch etwa 9 % Lipidvakuolen und stärkehaltige Plastiden. Die Form der PZ schwankt von isodiametrisch bis stark prosenchymatisch, wobei die Länge der Zellen ein Vielfaches ihrer Breite betragen kann. Auch die isodiametrischen PZ sind in der Regel größer als die sie umgebenden SP-Zellen und besitzen Durchmesser von 30-35 µm (Müller 1998).

Die Epidermis des Speicherkotyledonargewebes besteht aus 20-40 µm langen Zellen. Auch die Epidermiszellen enthalten Reservestoffe. Mit 10 % Lipidvakuolen, 39 % Proteinvakuolen und 5 % stärkehaltigen Plastiden ist der Anteil an Reservestoffen jedoch erheblich geringer als bei den SZ (Jaenicke 1973). Vereinzelt bildet die Epidermis mehrzellige, meist keulenförmige Trichome aus. Diese können bis etwa 100 µm lang werden. In den Vakuolen der Trichomzellen sind Substanzen eingelagert, deren Färbeeigenschaften sie als phenolische Inhaltsstoffe kennzeichnen (Müller 1998). Nach dos Santos und Machado 1989 wachsen diese Trichome auf der gesamten Oberfläche der Kotyledonen, sind jedoch häufiger auf der adaxialen (= „der Achse zugewandten“) Seite.

Die länglich-runde Embryonalachse ist etwa 7 mm lang und setzt sich aus einem Epikotyl mit spärlich entwickelter Plumula, einem Hypokotyl sowie einem Wurzelmeristem mit Wurzelkappe zusammen (Duncan und Todd 1972).

Kakaosamen sind recalcitrant; nach der Reife lässt sich ihre Keimfähigkeit auch unter optimalen Lagerungsbedingungen (bei 16 °C in der Frucht unter Vermeidung von Flüssigkeitsverlust) nur für maximal 2-3 Monate erhalten (Li und Sun 1999). Die Anpassung der Kakaosamen an tropisches Klima zeigt sich auch an ihrer fehlenden Kältetoleranz: Die Samen sterben schon nach kurzer Zeit ab, wenn sie Temperaturen von unter 10 °C ausgesetzt werden (Cuatrecasas 1964).

Im Gegensatz zu verschiedenen anderen *Theobroma*-Arten keimen die Samen von Kakao epigäisch, wobei die Speicherkeimblätter aufklappen, um nach einigen Wochen abzusterben und zu Boden zu fallen. Das Ergrünen der Keimblätter in diesem Zeitraum zeigt, dass sie sich neben ihrer Funktion als Reservestoffspeicher auch an der Photosynthese beteiligen (Abb. 25).



Abb. 25: Sämlinge von *T. cacao* L., ca. 8 Wochen alt

2.2.2 Die Variabilität von *T. cacao* L.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden die nachstehenden Begriffe zur intraspezifischen Differenzierung folgendermaßen verwendet:

- Gruppe:** Sammelbegriff für traditionell miteinander in Beziehung gebrachte Kakao-Typen (s. u.), hier für den Begriff „Forastero“ verwendet (siehe 2.2.3.2)
- Typ:** Traditioneller Sammelbegriff zur Bezeichnung einer oder mehrerer miteinander in Beziehung gebrachter Kakao-Populationen (siehe 2.2.3.1 bis 2.2.3.3)
- Population:** Individuen der gleichen Art, die aufgrund ihrer Entstehungsprozesse miteinander verbunden sind, da sie (ursprünglich) aus derselben Fortpflanzungsgemeinschaft und aus demselben, einheitlichen Areal stammen
- Varietät:** Individuen aus derselben Population, welche ähnliche phänotypische und physiologische Eigenschaften besitzen

Sorte:	kultivierte Varietät
Klon:	Gruppe von Individuen mit demselben, definiertem Genotyp, d. h. mit demselben Satz von Genen

Das Mannigfaltigkeitszentrum von *T. cacao* L. liegt in Amazonien, einem Gebiet mit einer Fläche von mehr als 6 Millionen km². Es ist von einem Netz aus Flusssystemen durchzogen. Allein in den Hauptfluss Amazonas münden ca. 10.000 Flüsse, von denen 17 Flüsse länger als der Rhein sind. Entlang dieser verschiedenen Flusssysteme breiteten sich isoliert voneinander Kakaopopulationen aus, die sich genetisch entsprechend stark voneinander unterscheiden (Bartley 2005).

Neben der Entstehung genetischer Variabilität durch isolierte Kakaopopulationen, welche sich im Zuge der Ausbreitung entlang der amazonischen Flüsse gebildet haben, gab es bereits in präkolumbischer Zeit Kulturformen des Kakaos mit genetischen Merkmalen, die von den wilden Populationen abwichen (siehe 2.2.3.1). Inzwischen sind durch die Verbreitung des Kakaobaumes im gesamten Tropengürtel der Erde sowie durch gezielte Zuchtprogramme viele weitere Populationen und Kultursorten entstanden.

Sowohl die natürlichen als auch die kultivierten Populationen von *T. cacao* L. variieren in Farbe und Form der jungen Blätter und der Blüten; ebenso in der Wuchsform der Bäume, welche für den Plantagenanbau eine bedeutende Rolle spielt. In den modernen Kakao-Zuchtprogrammen stehen vor allen Dingen die Krankheitsresistenz und die Produktivität der Kakaobäume im Fokus. Im geringeren Maße geht es daneben auch um Eigenschaften, die in direktem Zusammenhang mit der Rohkakao-Qualität stehen.

Von erheblicher Bedeutung für die Produktivität eines Kakaobaums ist seine Selbst-Kompatibilität, d. h. in welchem Maß die Bestäubung seiner Blüten durch den eigenen Pollen bzw. durch Pollen aus der gleichen Population erfolgen kann. Selbst-kompatible Klone und Populationen tragen in der Regel deutlich mehr Früchte als selbst-inkompatible (Bartley 2005). Die bei Kakao weit verbreitete Selbst-Inkompatibilität wird durch mehrere Allele gleichzeitig hervorgerufen, die sich in ihrer Dominanz voneinander unterscheiden. Der Mechanismus bewirkt, dass keine Befruchtung von Eizellen durch Pollen möglich ist, welche dasselbe Allel tragen. Es existieren jedoch auch neutrale Allele, die keinen Inkompatibilitätsmechanismus in Gang setzen, auch wenn sie in Pollen und Eizelle identisch vorliegen. Je nachdem, ob ein Kakaoklon homo- oder heterozygoter Träger der jeweiligen Allele ist, führt eine Selbstbestäubung zu einer 25, 50 oder 100%igen Befruchtung oder diese findet gar nicht statt. Eine vollständige Erforschung dieses komplizierten Mechanismus steht noch aus (Bartley 2005).

Weltweit führt eine große Zahl meist durch Pilzinfektionen verursachter Kakao-Krankheiten mit unterschiedlicher lokaler Bedeutung zu hohen Ernteverlusten. Besonders hervorzuheben sind hier die durch *Moniliophthora perniciosa* hervorgerufene

„Hexenbesen-Krankheit“ und die von *Phytophthora palmivora* ausgelöste „Black Pod Disease“. Diese und andere Kakao-Krankheiten sowie verschiedene Pflanzenparasiten gefährden die Rentabilität des Kakaoanbaus in einigen Gebieten erheblich. Seit etwa der Mitte des vergangenen Jahrhunderts widmen sich Kakao-Zuchtprogramme daher vor allen Dingen der Produktion von besonders resistenten Varietäten. Dabei spielen einzelne Kakaopopulationen aus dem Gebiet des oberen Amazonaslaufs eine wichtige Rolle, die sich durch eine besonders hohe Krankheitsresistenz auszeichnen (siehe 2.2.3.4).

Neben ihrer Anzahl spielt auch die Größe der Kakaofrüchte eine wichtige Rolle für die Produktivität eines Kakaobaums. Diese variiert in der Länge zwischen 6 und 35 cm, bei 5 bis 12 cm Breite. Die Früchte enthalten zwischen 16 und 60 Samen (Cuatrecasas 1964). Die Fruchtgröße ist dabei jedoch weniger stark genetisch determiniert als z. B. die Größe der Kakaosamen (s. u.).

Die mechanischen Eigenschaften der Fruchtwand schwanken je nach Varietät zwischen dick, hart und holzig bzw. dünn, weich und ledrig (Bartley 2005). Ihre Oberfläche variiert zwischen glatt und glänzend (wie bei der Criollo-Population Porcelana, siehe 2.2.4.4) sowie rau und warzig (wie etwa bei den auch als „Lagarto“ bezeichneten Pentagonum-Sorten, siehe 2.2.4.4).

Eine große Vielfalt besteht auch in der Form der Kakaofrüchte. Hier gibt es alle Varianten zwischen entweder langgestreckt, zugespitzt und tief gefurcht oder nahezu rund. Die Fruchtform stellt unter anderem für die Populationen „Amelonado“ (span. melonenförmig, siehe 2.2.4.1) und „Pentagonum“ (siehe 2.2.4.4) das namensgebende Attribut dar.

Die Größe und Form der Kakaofrüchte beeinflusst die Größe und Form ihrer Samen, da diese nur den Raum ausfüllen können, der ihnen in der Frucht zur Verfügung steht. Jedoch enthalten in Form und Größe identische Früchte verschiedener Varietäten nicht immer gleich große Samen. So finden sich nach Bartley 2005 in Früchten der ecuadorianischen „Nacional“-Population deutlich größere Samen als in vergleichbaren Früchten anderer Kakaopopulationen.

Kakaosamen sind je nach Varietät, Fruchtform und Lokalisation in der Frucht ellipsoid, ei- oder mandelförmig, sowie mehr oder weniger unregelmäßig abgeflacht. Maßgeblich abhängig vom Genotyp der Mutterpflanze, schwankt das Samen-Trockengewicht zwischen 0,7 g und bis zu 2 g, wobei die Ausbildung kleinerer Samen dominant vererbt wird (Bartley 2005).

Neben der Form und Größe der Kakaosamen variieren auch die Eigenschaften der Testa, die je nach Genotyp unterschiedlich dick sein kann. Zur möglichen Bedeutung dieses Aspekts für die Aromaentwicklung während der Kakaofermentation wurden bisher nur wenige Studien veröffentlicht (u. a. Lambert und Aitken 2000, Rohsius 2007, Andersson et al. 2006).

Von herausragender Bedeutung für die Rohkakao-Produktion sind die Eigenschaften der frischen Speicherkeimblätter, denn sie liefern den Reaktionsraum und die Ausgangssubstanzen für die Entstehung des Kakaoaromas.

Der histologische Aufbau des Speicherkeimblattgewebes und dessen klonspezifische Variabilität wurde in der vorliegenden Arbeit ebenso untersucht wie deren individuelle Polyphenolgehalte, welchen der Kakao seine Adstringens und einen großen Teil seiner Bitterkeit verdankt (siehe 2.1.5). Anwesenheit, Gehalt und Verteilung der Anthocyane im Keimblattgewebe ruft die violette Färbung der frischen Kakaosamen hervor. Samen, welche frei von Anthocyanen sind, weisen eine gelblich-weiße Färbung auf. Daneben gibt es Kakaosamen in der gesamten Bandbreite an Anfärbungen von zartrosa bis tiefviolett, darunter auch solche, deren sameninterne Anthocyankonzentration uneinheitlich ist, sodass sie gesprenkelt bzw. marmoriert sind.

Die genetischen Grundlagen des Anthocyangehaltes in Kakao wurden bereits in mehreren Studien untersucht. Diese haben gezeigt, dass hier ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren zugrunde liegt.

Genotypen mit „weißen“, anthocyanfreien Samen können Träger des Anthocyan-Inhibitorgens sein (Bartley 2005). Die homozygote Präsenz dieses Gens bewirkt die Abwesenheit von Anthocyanen in allen Pflanzenteilen, wie z. B. auch der Fruchtwand, die in diesem Fall grün ist. Das mutierte Allel ist rezessiv und führt daher in heterozygoten Individuen erst nach Selbstbestäubung zu teilweise weißen Samen. Auch Individuen, die für das Gen homozygot sind, weisen manchmal eine leichte Fruchtfärbung und leicht gefärbte Keimblätter auf. Die Durchsetzungskraft des Allels ist demnach möglicherweise nicht vollkommen.

Unter den Genotypen aus der Amazonasregion kommt das Allel recht häufig vor und findet sich auch in zentralamerikanischen Populationen. Ein bekannter Träger des Anthocyan-Inhibitorgens im homozygoten Status ist der Klon „Catongo“ (siehe 2.2.4.1). Innerhalb vieler Criollos (siehe 2.2.3.1) mit weißen Keimblättern fehlt laut Bartley 2005 die genetische Grundlage für die Anthocyan synthese im Keimblattgewebe. Die weiße Keimblattfarbe wird daher nicht durch das Anthocyan-Inhibitorgen verursacht.

Gesprenkelte und marmorierte Samen sind innerhalb des Criollo-Typs und seiner Hybriden weit verbreitet. Hier wird die Keimblattfärbung partiell beeinflusst durch das Gen, welches die Farbe der (in diesem Fall roten) Fruchtoberfläche bestimmt und durch die vereinigten Faktoren, welche den Zusammenhang der Farbe neu austreibender Blätter mit der Keimblattfarbe herstellen.

In Fällen, in denen nur ein einfacher Effekt vorliegt, der über die Pigmentierung bzw. Farblosigkeit der Keimblätter entscheidet, ist die Pigmentierung gegenüber der Farblosigkeit dominant. Unklar ist, wie eindeutig die Pigmentierung genetisch festgelegt ist; denn innerhalb vieler Früchte kommt es zu Farbabstufungen (Bartley 2005).

2.2.3 Die Klassifizierung und Verbreitung von *T. cacao* L.

Der Versuch, eine Klassifizierung für die enorme Vielfalt der Art *T. cacao* L. zu entwickeln, wurde bereits durch Morris 1882 unternommen. Er untergliedert die Art in die Gruppen „Criollo“ (span. kreolisch) und „Forastero“ (span. fremd, auswärtig). Diese beiden Begriffe verwendet auch Cheesman 1944, der *T. cacao* L. unter diesen Bezeichnungen in 2 morphogeographische Gruppen aufteilt. Cuatrecasas 1964 schlägt eine Trennung der Art in die beiden Subspezies *T. cacao* ssp. *cacao* und *T. cacao* ssp. *sphaerocarpum* vor, die den beiden oben genannten Gruppen entsprechen.

Unter der Bezeichnung „Trinitario“ wird ein dritter Kakao-Typ von den beiden oben genannten differenziert (s. u.).

Cuatrecasas 1964 bezeichnet seine Gliederung der Art *T. cacao* L. als „provisorisch“ und notiert: „A correct classification of all forms will only be possible after careful and extensive genetic research.“ (Cuatrecasas 1964).

In den letzten Jahren wurde ausgiebig an einer Methode zur Klassifizierung von Kakao auf Basis seiner genetischen Variabilität gearbeitet. Von besonderer Bedeutung ist hierbei eine in Saunders *et al.* 2004 beschriebene Kooperation der Kakao-Genbank der USDA (United States Department of Agriculture) in Puerto Rico mit den Genbanken und Forschungsabteilungen der CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza) in Costa Rica und der CRU (Cocoa Research Unit) in Trinidad und Tobago. Dabei wurde ein Verfahren zur Erstellung eines genetischen Fingerprintings aller international zur Verfügung stehenden Kakao-Klonbestände entwickelt. Zur genetischen Identifizierung der Kakaoklone wurden 15 SSR-Primer ausgewählt, welche von den untersuchten Sequenzen die höchste Reproduzierbarkeit und Konsistenz innerhalb eines Kakao-Genotyps aufweisen und zugleich eine eindeutige Differenzierung von abweichenden Genotypen ermöglichen. Diese 15 Primer tragen zum internationalen molekularen Standard für das DNA-Fingerprinting von *T. cacao* L. bei (Saunders *et al.* 2004). Auf dieser Grundlage wird in Kürze ein internationales Codifizierungssystem für die Art *T. cacao* L. zur Verfügung stehen.

Neben dem oben beschriebenen Projekt widmen sich weitere Forschungsarbeiten der genetischen Entschlüsselung von *T. cacao* L. (Motamayor *et al.* 2002, Motamayor *et al.* 2003 u. a.). Die bisherigen Ergebnisse stellen, wie von Cuatrecasas 1964 prognostiziert, wichtige Aspekte der traditionellen Klassifizierung der Art in Frage (s. u.). Bisher gibt es jedoch zu einer Gruppierung der Art *T. cacao* L. in „Forasteros“, „Criollos“ und „Trinitarios“ noch keine nutzbaren Alternativen; und viele der im Rahmen der vorliegenden Arbeit beprobten Klone wurden auch noch nicht molekulargenetisch untersucht. Daher wurden die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben bei der Auswertung entsprechend der traditionellen Klassifizierung untergliedert, zumal diese bezogen auf die traditionell angebauten Kakaopopulationen eine solide genetische

Grundlage besitzt: Studien von Motamayor *et al.* 2002, Motamayor *et al.* 2003 u. a. belegen, dass die Typ-interne genetische Variabilität jeweils deutlich unter der Variabilität innerhalb der Art insgesamt liegt.

Eine ausführliche Definition der innerhalb der vorliegenden Arbeit genutzten Nomenklatur zur Gruppierung der untersuchten Kakaoprobe findet sich in den folgenden Kapiteln.

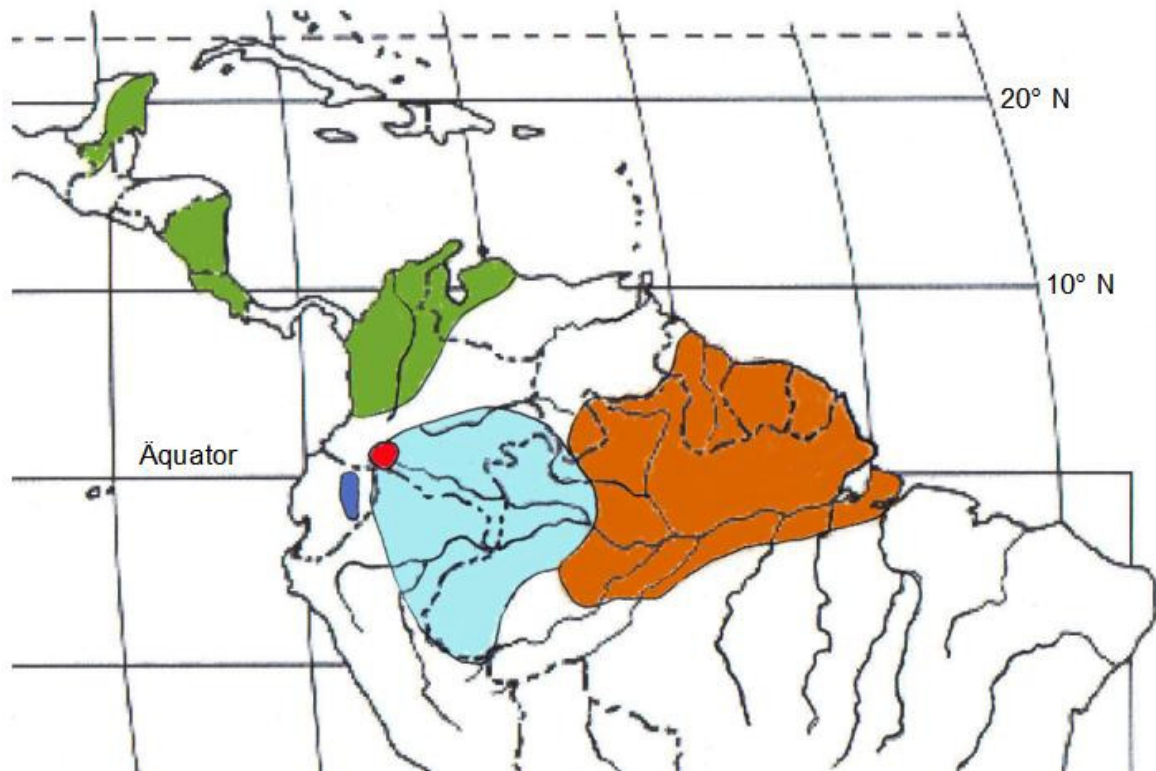


Abb. 26: stark vereinfachtes Schema der präkolumbischen Verbreitung von *T. cacao* L. (nach Bartley 2005 und Parra 2000)

grün: Criollo
braun: LAF
hellblau: UAF
dunkelblau: UAF-Varietät „Nacional“ westlich der Anden
rot: mutmaßliches Diversitätszentrum von *T. cacao* L.

2.2.3.1 Der Criollo-Typ

Zur Zeit der Entdeckung Amerikas war der Criollo-Kakao in Mittelamerika und im Hinterland der Nordküste Südamerikas verbreitet, wo er heute, wild oder kultiviert, von Mexiko bis Venezuela vorkommt (Abb. 26, grüner Bereich). Bereits in präkolumbischer Zeit wurde Criollo-Kakao durch die im Gebiet ansässigen Indianervölker angebaut und spielte in den Hochkulturen der Azteken und der Maya eine bedeutende Rolle. So leitet sich der Begriff „Schokolade“ von dem aztekischen Wort „Xocoatl“ („Bitter-Wasser“) ab. Die Maya verwendeten Rohkakaobohnen als Geldmünzen. Das anregende Schokoladengetränk kam u. a. bei kultischen Ritualen zur Anwendung (Wolters 1999), woran der lateinische Name „*Theobroma*“ (Getränk der Götter) noch heute erinnert.

Die Grundform einer Criollo-Frucht ist länglich, warzig, schief zugespitzt und tief gefurcht (Wolters 1999). Die großen, rundlichen Samen sind entweder farblos oder zeigen ein blasses Violett (Moreno 2000). Neben Populationen mit diesen „typischen“ Fruchtformen gibt es noch solche, deren Früchte von diesem Schema abweichen. Besondere Bedeutung kommt dabei den Populationen „Porcelana“ und „Pentagona“ zu, die im Abschnitt 2.2.4.4 genauer beschrieben werden.

In dem gegenwärtigen Trend zur Herstellung besonders edler und sortenreiner Schokoladenprodukte spielen die Kakaos vom Typ Criollo eine äußerst wichtige Rolle.

Rohkacao aus Criollo-Samen besitzt einen im Vergleich zum Forastero höheren Coffeingehalt und ein feineres Flavour, das auch weniger bitter ist als jenes von Forastero-Kacao (Wolters 1999). Criollo-Kacao wird daher zu den hochwertigsten Edelkakaos gezählt.

Der geringe Ertrag sowie die hohe Anfälligkeit für Krankheiten beeinträchtigen die Kultivierung von Criollo-Kacao (Montamayor 2000). Selbst in Venezuela, dem heute wichtigsten Anbauland für diesen Typ, sind die Bestände durch die Einführung widerstandsfähigerer und ertragreicherer, aber qualitativ minderwertigerer Kacaosorten aus den meisten Regionen verdrängt worden (Moreno 2000). Laut Motamayor 2000, Motamayor *et al.* 2002, Motamayor und Lanaud 2002 handelt es sich bei wenigen der verbliebenen Populationen um „echte“ oder „ancient Criollos“, die genetisch ausschließlich auf den präkolumbischen Kultursorten basieren. Dies sind zumeist alte Bäume auf abgelegenen Farmen des Verbreitungsgebiets sowie wild wachsende Individuen im Bereich alter Indianer-Kulturstätten wie etwa im Lacandona-Regenwald von Chiapas, Mexiko. Selbst bei den auf internationalen Genbanken konservierten Criollo-Klonen handelt es sich offenbar überwiegend um „moderne“ Criollos, welche aufgrund der Einkreuzung von Forastero-Genen nicht mehr von traditionell als „Trinitarios“ bezeichneten Populationen zu differenzieren sind (Motamayor *et al.* 2002).

Der Anteil von Criollo-Kacao an der Welt-Rohkakaoproduktion liegt, auch wenn nicht nur sortenreine Varietäten zugrunde gelegt werden, bei deutlich unter 5%. Möglicherweise wird authentischer Criollo-Kacao überhaupt nicht mehr auf dem freien Markt gehandelt (Rohsius 2007).

Motamayor *et al.* 2002 widersprechen der Hypothese von Cuatrecasas 1964, nach welcher es sich bei Criollo-Kacao um eine Subspezies handelt, die sich unabhängig von den südamerikanischen Populationen in Zentralamerika entwickelt hat (s. o.). Nach den in dieser Veröffentlichung vorgestellten Ergebnissen aus RFLP- und Mikrosatelliten-Analytik ist echter Criollo-Kacao enger verwandt mit einigen Forastero-Populationen aus Kolumbien und Ecuador als diese mit Forastero-Populationen anderer Herkunft (s. u.). Die in neueren Studien nachgewiesene geringe genetische Variabilität des Criollo-Typs lässt darauf schließen, dass sich alle echten Criollos von einer kleinen ursprünglichen

Population ableiten lassen (Motamayor *et al.* 2000, Motamayor *et al.* 2002, Motamayor und Lanaud 2002).

Die genannten Autoren gehen davon aus, dass es sich bei den authentischen Criollos um durch menschliche Zuchtauswahl geprägte Populationen handelt. Das milde Aroma der Kakaosamen, deren kurzen Fermentationszeiten und ihr höherer Koffeingehalt (anregende Wirkung), sowie die Selbst-Kompatibilität der Bäume (höherer Ertrag) passen zu dieser Theorie.

Motamayor *et al.* 2002 halten es für möglich, dass die ursprüngliche Herkunft des Criollo-Kakaos in West-Venezuela am Fuße der Anden zu suchen ist, der Herkunft der innerhalb der vorliegenden Arbeit verwendeten Criollo-Proben (siehe 2.2.4.4). Historische Daten beweisen die Verbreitung von Kakao in Venezuela vor der Eroberung des Gebietes durch die Spanier, wo er auch schon in präkolumbischer Zeit angebaut wurde (Motamayor *et al.* 2002, Bartley 2005). Durch Wanderbewegungen und Handelsbeziehungen indianischer Kulturen könnte der Criollo-Kakao von hier aus nach Zentralamerika gelangt sein.

Nach der ethnologisch ausgerichteten Publikation von Wolters 1999 lässt sich der heutige Criollo-Kakao von Kultursorten aus West-Ecuador ableiten, die in präkolumbischer Zeit von den dort ansässigen Indianervölkern nach Mittelamerika eingeführt wurden. Durch ihre Wanderbewegungen und Handelsbeziehungen, teils mit Hilfe von Küstenschifffahrt, sind auch diverse andere Kulturpflanzen nach Zentralamerika gelangt (Wolters 1999).

Trotz Abweichungen im Detail stimmen alle Autoren, die sich in jüngster Zeit mit der Herkunft des Criollo-Kakaos auseinandersetzen, darin überein, dass es sich dabei um eine indianische Kulturform handelt, welche sich von Forastero-Kakao ableiten lässt und durch den Menschen nach Zentralamerika gelangt ist.

2.2.3.2 Die Gruppe der Forasteros

Das ursprüngliche Verbreitungsgebiet der unter der Bezeichnung „Forastero“ zusammengefassten Kakaopopulationen liegt in dem riesigen Gebiet von Amazonien und Guayana und schließt das Mannigfaltigkeitszentrum der Art mit ein (Abb. 26, roter Bereich).

Schon in präkolumbischer Zeit nutzten die im Verbreitungsgebiet lebenden Indianerkulturen den Forastero-Kakao, jedoch hauptsächlich als Produzenten einer süßen Fruchtpulpa, welche frisch konsumiert oder zu alkoholischen Getränken vergoren wurde. Die Früchte wurden zu diesem Zweck von mehr oder weniger wild wachsenden Bäumen im Urwald gesammelt. Eine indigene Selektion des Forastero-Kakaos hinsichtlich qualitativer Eigenschaften der Samen fand daher laut Wolters 1999 nicht statt, abgesehen vielleicht von der „Nacional“-Population in Ecuador (s. u.).

Die Forastero-Kakaos wird untergliedert in „Upper Amazon Forastero“ (UAF) und „Lower Amazon Forastero“ (LAF), entsprechend den geographischen Ursprungsgebieten am oberen oder unteren Abschnitt des Amazonas-Flussgebiets (Abb. 26, blauer und

brauner Bereich). Der letztgenannte Typ schließt jedoch noch weitere Populationen entlang des Orinoco und aus der Region Guayana ein (Montamayor *et al.* 2000).

Nach Motamayor *et al.* 2002 gibt es keine genetische Grundlage für die genannte Untergliederung des Forastero-Kakaos. Angesichts der Größe der mit den Begriffen „Upper Amazon“ and „Lower Amazon“ umgrenzten Gebiete und ihrer Zergliederung in tausende von Flusssystemen, die von separaten Kakaopopulationen besiedelt werden, ist dies nicht verwunderlich.

Sowohl innerhalb der UAFs als auch der LAFs gibt es eine große genetische Variabilität (Motamayor *et al.* 2003). Einige UAF-Populationen stehen laut Motamayor *et al.* 2003 dem Criollo-Kakao genetisch näher als anderen Populationen aus der Forastero-Gruppe. Daher kann Forastero-Kakao nicht als eigene Unterart vom Criollo-Kakao abgegrenzt werden, wie von Cuatrecasas 1964 vorgeschlagen.

Mit dem kommerziellen Anbau von Forastero-Kakao wurde im 17. Jahrhundert in Ecuador begonnen. Hier wurde westlich der Anden offenbar bereits in präkolumbischer Zeit eine später als „Nacional“ bezeichnete Varietät kultiviert, die sich durch ein bis heute berühmtes, blumiges Flavour auszeichnet (Abb. 26, dunkelblauer Bereich).

Laut der meisten Beschreibungen zeichnet sich der Nacional-Typ durch relativ große, grüne Früchte mit sich leicht verjüngender Basis aus, deren relativ dicke Fruchtwand eine raue Oberfläche besitzt (Bartley 2005). Die Samen sind größer und besitzen ein helleres Violett als jene von ähnlich aussehenden Früchten anderer Varietäten.

Nach Bartley 2005 weist die niedrige genetische Variabilität des ecuadorianischen Nacional - Kakaos darauf hin, dass die Population sich nicht spontan in der Küstenzone Ecuadors verbreitet hat. Das Material, von dem sich der „Nacional“-Kakao ableitet, stammt nach seinen Angaben wahrscheinlich aus dem Gebiet des Oberlaufs des Flusses Marañon am Fuße der Anden. Damit handelt es sich nach traditioneller Klassifizierung um Upper Amazon Forasteros.

RAPD -, RFLP - und Mikrosatelliten - Studien zeigen eine deutliche genetische Abweichung des Nacional - Kakaos von anderen als Forasteros klassifizierten Populationen (Lerceteau *et al.* 1997, Motamayor *et al.* 2002, Motamayor und Lanaud 2002). Nach Motamayor *et al.* 2002 sowie Motamayor und Lanaud 2002 stehen die ecuadorianischen Nacional-Kakaos den ursprünglichen Criollo-Varietäten genetisch näher als den anderen südamerikanischen Forasteros. Diese Befunde unterstützen die Hypothese von Wolters 1999, nach welcher der Kakaobaum durch die Indianerkulturen West-Ecuadors auf dem Seewege nach Mittelamerika eingeführt wurde.

Der Anbau des „Nacional“-Kakaos blieb hingegen weitestgehend auf sein Herkunftsland Ecuador beschränkt. Erst 1937 führte F. J. Pound unter dem Sammelbegriff „Refractario“ Kakaomaterial aus Peru und Ecuador nach Trinidad ein (Bartley 2001). Dieses heterogene Material, das wahrscheinlich auch Einkreuzungen aus „Nacional“-Populationen enthält,

wurde von Pound vor allen Dingen hinsichtlich seiner Resistenz gegenüber *Moniliophthora perniciosa* selektiert.

1746 begann ein einzelner Geschäftsmann mit dem Anbau von Kakao in Bahia/ Brasilien. Er verwendete dabei eine aus Pará eingeführte LAF-Varietät (Wood 1991). Deren Früchte sind rundlich bis ellipsoid, ziemlich glatt und nur schwach gefurcht. Die Samen haben dunkelviolette Keimblätter (Wolters 1999). Forasteros, welche die hier beschriebene, Fruchtform besitzen, werden auch als Amelonados (span. „melonenförmig“) bezeichnet.

Der in Bahia kultivierte Amelonado-Kakao wurde schon bald in andere Gebiete exportiert. Nach Motamayor *et al.* 2003 leitet sich von ihm der Forastero-Anteil im Erbgut aller traditionellen Trinitarios (s. u.) ab. Mit großer Wahrscheinlichkeit bildet er auch die genetische Herkunft des als „West African Amelonado“ bekannten LAF-Typs, der bis heute auf den westafrikanischen Kakaopflanzungen dominiert (siehe 2.2.4.1).

Die genetische Variabilität der in Bahia angebauten Amelonados ist, ähnlich wie jene des Nacional-Kakaos aus Ecuador, laut Motamayor *et al.* 2003 sehr gering.

Gegenwärtig liefert die Forastero-Gruppe insgesamt etwa 85 % der weltweiten Kakaoproduktion. Abgesehen von Ausnahmen wie dem ecuadorianischen Nacional-Kakao (s. o.) handelt es sich dabei um Massenkakao.

2.2.3.3 Der Trinitario-Typ

Die Trinitarios besitzen Merkmale sowohl der Criollos als auch der Forasteros. Morphologisch gleichen ihre Früchte häufig stark jenen der Criollos. Die Keimblätter ihrer Samen zeigen die unterschiedlichsten Farbnuancen von weiß bis dunkelviolett.

Trinitarios liefern, ähnlich wie die Criollos, einen Rohkakao von zumeist hoher Flavour-Qualität. Vergleichbar mit den Eigenschaften der Forasteros sind ihre im Allgemeinen recht hohen Erträge, welche auch durch ihre im Vergleich zum Criollo-Kakao höhere Krankheitsresistenz gewährleistet werden.

Nach Cuatrecasas 1964 stammen die Vorläufer des Trinitario-Typs aus dem Orinoco-Delta Venezuelas, wo sie durch Kreuzungen zwischen Forasteros und Criollos entstanden. Individuen dieses Typs wurden in Trinidad eingeführt. Ihr genetisches Material vermischte sich mit jenem der dort vorhandenen Criollo-Populationen, welche im Laufe der Zeit durch Anpflanzungen des neuen Kakaotyps ersetzt wurden. Von Trinidad gelangte er zurück nach Venezuela und erhielt dort seine heute gängige Bezeichnung „Trinitario“.

Basierend auf RFLP- und Mikrosatelliten-Studien entwerfen Motamayor *et al.* 2003 ein davon abweichendes Szenario. Ihm zufolge leitet sich der Forastero-Anteil im Erbgut der Trinitario-Varietäten von dem in Bahia kultivierten Amelonado-Kakao (siehe 2.2.3.2) ab. Demnach gelangte dieser LAF-Typ im 18. Jahrhundert nach Trinidad, Venezuela, Mittelamerika und auf die karibischen Inseln. Zur Hybridisierung mit den dort

kultivierten Criollos, deren genetische Variabilität ebenfalls sehr gering ist (s. o.), könnte es im gesamten Gebiet gekommen sein. Daher muss der Ursprungsort der Trinitarios nicht auf Trinidad beschränkt sein.

Nach Motamayor *et al.* 2003 unterscheiden sich die vielen auf den internationalen Kakao-Genbanken gehaltenen Trinitarios hauptsächlich in dem Anteil von Allelen, welche mit den ursprünglichen Criollo- bzw. mit den Amelonado-Eltern geteilt werden. Viele der hier konservierten Klone unterscheiden sich somit genetisch kaum voneinander, und ihre Anzahl könnte demnach drastisch reduziert werden.

Nach Bartley 2005 wird der Begriff „Trinitario“ außer für die traditionellen Populationen oben beschriebenen Ursprungs auch für Kakaomaterial anderer, z. T. auch schlicht unbekannter genetischer Herkunft verwendet. So finden sich darunter auch Populationen mit genetischen Anteilen von Upper Amazon Forasteros aus den Sammlungen, die ab 1938 von F. J. Pound u. a. durchgeführt wurden (s. u.). In der hier vorliegenden Arbeit werden diese aus neueren Züchtungen stammenden Kakaosorten von den traditionellen Trinitarios abgegrenzt.

Bereits ab 1825 begannen die ertragreichen und widerstandsfähigen Trinitarios die Criollos von den Kakaoplantagen Lateinamerikas und auch die Nacional-Kakaos aus Ecuador (s. o.) zu verdrängen. Die Angaben zu dem Anteil der Trinitarios an der Gesamt-Kakaoproduktion schwanken zwischen 10 % und 15 %, sicherlich auch in Abhängigkeit von der Definition des Begriffs „Trinitario“. Bei weitem nicht alle Trinitario-Rohkakaos werden zu den Edelkakaos gerechnet. So zählt beispielsweise der rotgetönte Trinitario-Rohkakao aus Kamerun nicht dazu (ICCO 2007b).

2.2.3.4 „Moderne“ Kakaosorten

Kakao-Krankheiten wie etwa der durch den Pilz *Moniliophthora perniciosa* hervorgerufene „Hexenbesen“ führen zu hohen Ernteverlusten im kommerziellen Kakaoanbau. Schon in der ersten Hälfte des vorigen Jahrhunderts versuchte man dieses Problem durch Selektion und Züchtung krankheitsresistenter Sorten in den Griff zu bekommen. Im Rahmen solcher Bemühungen wurden unter der Leitung von F. J. Pound zwischen 1937 und 1942 von Trinidad aus mehrere Expeditionen in das Gebiet des oberen Amazonaslaufes durchgeführt, um resistentes Kakaomaterial aus den dort vorhandenen Wildbeständen zu sammeln (ICG, T 2007). Seither bilden UAF-Forasteros einen wichtigen Bestandteil von Zuchtprogrammen für resistenterere und ertragreichere Kakaosorten. Ab 1950 wurden kommerzielle Kakaopflanzungen weltweit durch Material aus solchen Züchtungen ergänzt. Diese lassen sich genetisch teils ausschließlich von UAF-Populationen ableiten, teils handelt es sich um Kreuzungen dieses Materials mit traditionellen Kultursorten, z. B. aus dem Trinitario-Typ.

Bis heute bestehen immer noch etwa 70 % des kommerziell angebauten Kakaos aus den traditionellen LAF-, Criollo- und Trinitariokulturen mit ihrer relativ geringen genetischen Variabilität (Motamayor *et al.* 2003).

2.2.4 Die Klassifizierung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Kakaoproben

Im Folgenden werden die innerhalb der vorliegenden Arbeit untersuchten Kakao-Klone beschrieben und einem der oben vorgestellten Typen zugeordnet.

Trotz der weitestgehend künstlichen und teilweise diffusen Klassifizierung von Kakao in Criollos, Forasteros und Trinitarios gibt es starke Argumente dafür, dieses traditionelle System auch für die Vergleichsstudien der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kakaoproben zu verwenden. So bilden die Criollo-Varietäten zwar nach Motamayor 2000, Motamayor *et al.* 2002 sowie Motamayor und Lanaud 2002 keine eigene Unterart, doch sie stehen in enger genetischer Beziehung zueinander und besitzen spezifische Eigenschaften, welche sie als Typ von allen anderen Kakao-Varietäten unterscheiden. Beides gilt erwiesenermaßen auch für den Nacional-Typ und für die traditionellen Trinitarios.

Der LAF-Typ besitzt zwar keine genetische Definition, jedoch haben die 2 in der vorliegenden Arbeit untersuchten LAF-Klone einen gemeinsamen genetischen Ursprung: Sie leiten sich beide von traditionellen Kultursorten aus Bahia in Brasilien ab (siehe 2.2.4.1).

Bei den analysierten UAF-Klonen ist die genetische Verwandtschaft vermutlich am geringsten. Immerhin handelt es sich jedoch bei allen Proben um Material aus Peru, und teilweise lässt sich dieses auch von den gleichen Populationen ableiten (siehe 2.2.4.2).

Die Kerndaten der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kakaoklone sind in den Tabellen 2 (Forasteros) und 3 (Criollos und Trinitarios) zusammengefasst. Anschließend erfolgt für jeden Klon eine ausführliche Beschreibung ihrer in der Literatur dokumentierten, für die durchgeführte Arbeit relevanten Eigenschaften.

Klon/ Varietät	geographische Herkunft	genetische Herkunft	Typ	reife Früchte, Farbe/Form	IG Samen nach ICGD [g]	typische Samenfarbe	selbst- kompatibel	Krankheits- resistenz	Besonderheiten
Amelonado	Westafrika	traditionelle LAF- Kulturen aus Bahia/ Brasilien	LAF	gelb, Amelonado-Form	-	violett	ja	-	häufigste Kakao- Varietät Afrikas
Catongo	Brasilien, Bahia, Uruçuca	Mutante des Comun - Typs aus Bahia/ Brasilien	LAF	gelb, Amelonado-Form	1,10 - 1,21	weiß	ja	eher schwach	homozygoter Träger des Anthocyan- Inhibitorgens
EET 59	Ecuador	angeblich reiner "Nacional"-Typ	Nacional	gelb/grün, Amelonado-Form	ca. 1,5	hellviolett	nein	unklar	
EET 95	Ecuador	"Nacional" × "Venezola no Amarillo"	Nacional	gelb/grün, Amelonado-Form	1,54 - 1,87	violett/ tiefviolett	ja	unklar	Arriba-Flavour
EET 390	Ecuador	EET 238 (Nacional × Venezolano Amarillo) × SCA 12	Nacional	gelb/grün, Amelonado-Form	0,65 - 1,00	-	nein	unklar	-
NA 33	Peru, Rio Nanay	Wildsammlung	UAF	gelb, Amelonado-Form	0,7 - 0,78	tiefviolett	unklar	hoch	hohes Aromapotential der Samen
SCA 6	Peru, Rio Ucayali	Wildsammlung	UAF	gelb, Cundeamor (Balsampfe- Form)	0,55 - 0,65	violett	nein	hoch	"blumiges" Flavour, wichtiger Klon in Zuchtprogrammen
T63/967	Ghana	PA35 × NA32	UAF	gelb, Amelonado-Form	"klein"	violett	ja	eher schwach	in Ghana wichtige neue Zuchtsorte
T79/501	Ghana	NA32 × PA7	UAF	gelb, Amelonado-Form	"mittel"	violett	ja	hoch	in Ghana wichtige neue Zuchtsorte
T85/799	Ghana	IMC60 × NA34	UAF	gelb, Amelonado-Form	"mittel"	violett	ja	hoch	in Ghana wichtige neue Zuchtsorte

Tab. 2: Eigenschaften der untersuchten Forastero-Klone (LAF, UAF und Nacional)

Klon/ Varietät	geographische Herkunft	genetische Herkunft	Typ	reife Früchte, Farbe/Form	IG Samen nach ICGD [g]	typische Samenfarbe	selbst- kompatibel	Krankheits- resistenz	Besonderheiten
Porcelana	Venezuela, westlich des Maracaibo-Sees	ursprünglicher Criollo	Criollo	rot oder grün Porcelana-Form	-	weiß bis hellrosa	ja	schwach	hohes Aromapotential
Guasare	Venezuela, Rio Guasare	ursprünglicher Criollo	Criollo	grünlich-gelb, Criollo-Form	-	weiß	ja	robuster als Porcelana	hohes Aromapotential
Criollo Merida	Venezuela, Mérida und Tachira am Fuße der Anden	ursprünglicher Criollo	Criollo	rot, grün oder beides	-	weiß	ja	schwach	hohes Aromapotential
Pentagona	Venezuela, Mérida am Fuße der Anden	ursprünglicher Criollo	Criollo	rot, Grün-Anteile möglich, Pentagona-Form	-	weiß bis tiefviolett	ja	schwach	hohes Aromapotential
ICS 95	Trinidad	Tritarario × Criollo	Tritarario	rot, Criollo-Form	1,5	-	ja	hoch	Elternpflanze vieler moderner Zuchtsorten
BR 25	Malaysia, Sabah, Balung River	unbekannt	Tritarario	rot Amelonado-Form	-	tiefviolett	ja	hoch	in Malaysia kommerziell angebaute Kultursorte
KKM 22	Malaysia, Festland	UAWA 18 × T.S. 15/43.352	Tritarario	gelb Amelonado-Form	1,09	rotviolett	unbekannt	moderat	in Malaysia kommerziell angebaute Kultursorte
PBC 123	Malaysia, Selangor	unbekannt	Tritarario	rot Amelonado-Form	1,04 - 1,10	-	ja	hoch	in Malaysia kommerziell angebaute Kultursorte
UIT 1	Malaysia, Trinidad	ICS-Kreuzungen (39, 40 oder 60),	Tritarario	grün Criollo-Form	0,78 - 0,7	hellviolett	nein	recht hoch	schwaches Flavour

Tab. 3: Eigenschaften der untersuchten Criollos und Tritararios

2.2.4.1 Proben der Lower Amazon Forasteros (LAF)

Amelonado (Anhang; Abb. 86)

Der Begriff „Amelonado“ beschreibt eine spezifische Fruchtform (span. melonenförmig). Es handelt sich dabei um breite, kurze Früchte, die manchmal stumpf, manchmal spitz zulaufen. Im Bereich des Stielansatzes kann die Frucht flaschenhalsförmig verengt sein. Die Fruchtschale ist glatt und weist zehn Furchen auf.

Ohne zusätzliche Informationen - z. B. über die Herkunft - reicht der Begriff „Amelonado“ nicht zur Bezeichnung einer Varietät aus. Dafür wird er jedoch international auf vielen Genbanken fälschlicherweise verwendet.

Das in der vorliegenden Studie verwendete Amelonado-Material aus Ghana gehört zur Population der der West African Amelonados (WAA). Die Herkunft des Amelonado-Klons aus Trinidad leitet sich nach Angaben von Prof. Dr. D. Butler (CRU, UWI) ebenfalls von WAA-Material ab.

Diese selbstkompatible und sehr homogene Varietät besitzt die typische Fruchtform und ist die traditionell angebaute und noch immer weitaus häufigste Kakaopopulation Westafrikas.

Zur genetischen Herkunft des WAA gibt es unterschiedliche Angaben. Bartley 2005 sieht die Herkunft des Ursprungsmaterials als völlig ungeklärt an. Edwin und Masters 2005 gehen davon aus, dass das Ausgangsmaterial für den WAA von Kakaopopulationen aus Guinea stammt, von wo es 1878 durch einen Händler importiert wurde. Die genetischen Studien von Motamayor 2003 lassen jedoch darauf schließen, dass das Ursprungsmaterial für den WAA letztlich von den oben beschriebenen LAF-Populationen abstammt, die traditionell in Bahia/Brasilien angebaut wurden. Auch Dr. R. Lockwood schließt sich als international anerkannter Experte für westafrikanische Kakaosorten dieser genetischen Ableitung des WAA an (persönliche Mitteilung, 2006).

Catongo (Anhang; Abb. 88)

Catongo ist ein stark homozygoter, selbstkompatibler Klon des LAF-Typs (Lower Amazon Forastero). Er wurde 1939 in der Nähe von Uruçuca, Bahia, Brasilien gefunden (Crouzillat *et al.* 1996).

Catongo ist ein homozygoter Träger des Anthocyan-Inhibitor-Gens, einer spontanen Mutation, die zur Abwesenheit von Anthocyanen in allen Organen des jeweiligen Genotyps führt (Bartley 2005, s. o.). Daher besitzt Catongo weiße Blüten, aus denen nach Selbstbestäubung Früchte mit 100 % weißen Samen hervorgehen. Seine Früchte sind im reifen Zustand gelb, im unreifen grün.

2.2.4.2 Beprobte Genotypen der Upper Amazon Forasteros (UAF)

NA 33 (Anhang; Abb. 94)

Die Population NA wurde nach dem peruanischen Fluss Nanay benannt, in dessen Ebene ihr Ausgangsmaterial 1937 gesammelt wurde. Es handelt sich folglich um Kakao des UAF- Typs (ICGD 2007). Die einzelnen Genotypen, welche von Bäumen aus der Nanay-Region abstammen, zeigen eine große Variabilität bezüglich ihrer Fruchtformen und –farben (Bartley 2005). Die meisten Vertreter der Population besitzen relativ kleine, tiefviolette Samen. Dieses Merkmal besitzt auch NA 33.

Die Früchte von NA 33 sind im reifen Zustand gelb. Zur Kompatibilität gibt es unterschiedliche Angaben (ICGD 2007).

Individuen des Klons NA 33 zeigen eine relativ hohe Resistenz gegen Krankheiten wie etwa *Moniliophthora perniciosa*. Clapperton 1992 und Clapperton *et al.* 1994a und b beschreiben das hohe Aromapotential von Rohkakao, welcher aus NA 33-Samen produziert wurde.

NA 33-Individuen finden sich in vielen internationalen Genbanken, weswegen der Klon für die Vergleichsuntersuchungen der vorliegenden Arbeit von besonderem Wert ist.

SCA 6 (Anhang; Abb. 96)

Als Herkunft der Population SCA (Scavina) wird der Bereich des peruanischen Flusses Ucayali angegeben (ICGD 2007). Die verhältnismäßig kleinen Früchte des Klons SCA 6 sind im reifen Zustand gelb.

SCA 6 produziert sehr kleine, tiefviolette Samen (ICGD 2007). Clapperton 1992 und Clapperton *et al.* 1994b beschreiben seinen Rohkakao als Träger eines gut entwickelten Flavours. Dieses wird von Bartley 2005 als „blumig“ charakterisiert. Der Autor beschreibt die Pulpa von Vertretern der „Scavina“-Population als besonders süß und fruchtig.

Der zu den UAF gehörende Klon besitzt eine hohe Resistenz gegen den Befall durch den Pilz *Moniliophthora perniciosa* (Bartley 2005). Wie alle Genotypen der SCA-Population ist er jedoch selbst-inkompatibel, was sich negativ auf seinen Ertrag auswirkt. Da das Merkmal durch mindestens 2 unabhängige Allele exprimiert wird, vererbt es sich auch an die Nachkommen des Klons. Auch das ebenfalls unerwünschte Merkmal seiner kleinen Samen scheint sich dominant zu vererben (Bartley 2005). Möglicherweise liegt in der geringen Samengröße die Ursache für die im Vergleich zu anderen Kakaosorten sehr kurze Entwicklungsperiode der Scavina-Früchte (etwa 130 Tage). Scavina-Samen weisen laut Bartley 2005 zudem einen höheren Flüssigkeitsgehalt auf als die Samen anderer Populationen und zeigen darum einen höheren Gewichtsverlust durch Trocknung. Trotz dieser Defizite spielt SCA 6 eine wichtige Rolle in vielen Züchtungsprogrammen.

T63/967, T79/501 und T85/799 (Anhang; Abb. 97 - Abb. 99)

Die genetische Basis aller 3 genannten Klone bilden peruanische UAFs (Adu-Ampomah *et al.* 1988 und 1996, N’Goran *et al.* 1994), die als Bestandteil der Sammlungen von F. J. Pound nach Trinidad gelangten und 1944 von dort in Ghana eingeführt wurden (Dr. R. Lockwood, persönliche Mitteilung 2006). Alle 3 Klone sind u. a. mit der oben beschriebenen UAF-Population „Nanay“ verwandt (Dr. R. Lockwood, persönliche Mitteilung 2006).

Die genannten Klone spielen eine wichtige Rolle in den modernen westafrikanischen Züchtungsprogrammen (Prof. Dr. Adu-Ampomah, persönliche Mitteilung 2001). Sie wurden in Ghana gezüchtet (Dr. R. Lockwood, persönliche Mitteilung 2006). Aus diesem Land stammt auch das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Material.

Die Früchte der hier untersuchten Klone besitzen alle eine im reifen Zustand gelbe Fruchtwand und zeigen die typische Amelonado-Form, ohne jedoch mit dem traditionell angebauten West African Amelonados (s. o.) verwandt zu sein.

Laut der ICGD 2007 sind die Klone mit der Bezeichnung T [POS] Träger des Anthocyan-Inhibitor-Gens (siehe „Catongo“). Das Fehlen weißer Samen in den Früchten der selbstkompatiblen Klone lässt darauf schließen, dass dieses Allel – wenn überhaupt- im heterozygoten Zustand vorliegt.

2.2.4.3 Beprobte Klone des UAF-Typs „Nacional“**EET 59, EET 95, EET 390 (Anhang; Abb. 89 -Abb. 91)**

Die Klone der Population "EET" sind nach der ecuadorianischen Kakao-Genbank Estacion Experimental Tropical Pichilingue benannt.

Als genetische Herkunft des Klons EET 59 gibt die ICGD 2007 2 Individuen des Nacional-Typs (s. o.) an, womit es sich um einen reinen Nacional-Klon handelt, der zu den UAFs zählt.

Die Klone EET 95 und EET 390 stammen einerseits von Individuen des Nacional-Typs ab, tragen andererseits aber auch das genetische Material eines Typs, der als „Venezolano Amarillo“ bezeichnet wird (ICGD 2007). Unter diesem Begriff werden verschiedene Kakaopopulationen zusammengefasst, die aus anderen Anbauländern nach Ecuador eingeführt wurden. Laut Lerceteau *et al.* 1997 sowie Bartley 2001 ist ihre genetische Herkunft unklar. Wahrscheinlich handelt es sich um eine große Bandbreite von Populationen, die sich zum größten Teil von Trinitarios und anderen Genotypen aus Trinidad ableiten lassen.

Der Klon EET 390 stammt außerdem auch noch von dem UAF SCA 12 ab (ICGD 2007). Die Zuordnung zu einer der klassischen Gruppen Forastero, Trinitario und Criollo fällt dadurch bei EET 390 und EET 95 besonders schwer. Aufgrund ihrer Abstammung von den Nacional-Kakaos wurden sie jedoch in der vorliegenden Arbeit diesem Typ zugeordnet.

Nach Auskunft von Dr. P. Bucheli (ehemals Forschungsabteilung Nestlé France) besitzt der Klon EET 95 das besondere Flavour des unter der Bezeichnung „Arriba“ gehandelten ecuadorianischen Nacional-Kakaos.

2.2.4.4 Beprobte Varietäten der Criollos

Im Gegensatz zu dem Großteil der Forastero- und Trinitario-Proben handelt es sich bei den in der vorliegenden Studie untersuchten Criollos nicht um Klone internationaler Genbanken, sondern um Individuen, die bestimmten Criollo-Varietäten zugeordnet sind. Laut Auskunft von Alexis Zambrano „INIA Mérida“ handelt es sich um echte, unverfälschte Criollos. Sehr wahrscheinlich entsprechen sie auch den Maßstäben von Motamayor *et al.* 2000, Motamayor *et al.* 2002, Motamayor und Lanaud 2002 für unverfälschte oder „ancient“ Criollos.

Porcelana (Anhang; Abb. 103)

Hierbei handelt es sich um eine ziemlich homogene Varietät, die sich von anderen Criollos charakteristisch abgrenzt. Ihre Früchte sind überwiegend zylindrisch und ähneln der Amelonado-Form. Sie enden in einer kurzen, fünfkantigen Spitze, wie es für Criollos typisch ist. Die Früchte sind rot, grün und mattweiß gefärbt; ihre Schale ist glatt und dünn und nur schwach gefurcht. Die Samen besitzen weiße oder hellrosa Keimblätter. Porcelana hat laut Moreno 2000 die beste Flavour-Qualität aller Kakaos Venezuelas und wird folglich als Edelkacao gehandelt. Er ist jedoch recht anfällig für diverse Krankheiten, die oft zu hohen Ernteverlusten führen.

Guasare (Anhang; Abb. 102 a)

Bei dieser Criollo-Varietät handelt es sich nach Motamayor *et al.* 2000 um einen genetisch reinen, unverfälschten Criollo. Sie stammt von einer kleinen Plantage an den Ufersäumen des gleichnamigen Flusses in den Ausläufern des Perijá-Gebirges im Staat Zulia im äußersten Westen von Venezuela.

Die Bäume zeichnen sich durch kräftigen Wuchs und dichte Kronen aus. Sie beginnen frühzeitig mit der Bildung von Blüten und dem Fruchtansatz. Ihre spitz zulaufenden Früchte besitzen eine runzelige, dünne, grüne Fruchtwand mit ausgeprägten Furchen. Die Früchte enthalten zwischen 25 und 30 Samen. Deren Keimblätter sind durchgehend weiß. Guasare spielt in den Zuchtprogrammen Venezuelas zur genetischen Verbesserung der Criollos eine wichtige Rolle, da er im Vergleich zu „Porcelana“ anpassungsfähiger ist. Er wird daher in letzter Zeit auch in anderen Regionen des Landes angesiedelt (Moreno 2000).

Criollo Mérida (Anhang; Abb. 101)

In Venezuelas Bundesstaaten Mérida und Táchira, beide am Fuße der Anden gelegen, wurden Individuen dieser Criollo-Population bereits in präkolumbischer Zeit kultiviert.

Sie ist weniger homogen als die Populationen „Porcelana“ und „Guasare“. Die langgestreckten Früchte von Criollo Mérida enden in unterschiedlich geformten, oft gekrümmten Spitzen. Die Fruchtwände sind unterschiedlich dick, jedoch nie besonders hart. Die Farbe der Früchte zeigt alle Farbnuancen von weinrot bis grün, wobei die dominierende Fruchtfarbe regional variiert. Die runden Samen sind mittelgroß bis groß und weiß bzw. schwach gefärbt. „Criollo Mérida“ wird als Edelkakao gehandelt, ist jedoch stark vom Aussterben bedroht (Moreno 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden Individuen zweier verschiedener Varietäten in San Juan de Lagunillas und in Zea untersucht (siehe 2.4.2).

Die Criollo-Varietät „Zea“ wird alternativ auch „Benavides“ genannt, nach dem Namen der Familie, auf deren Grundbesitz sie entdeckt wurde. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Proben eines 100 Jahre alten Individuums untersucht, der als nationale Referenzpflanze für den Typ „Zea“ dient.

Pentagona (Anhang; Abb. 102 b und c)

Neben Criollo und Forastero wurde auch die Population „Pentagona“ zeitweilig als ein eigenständiger Typ eingestuft, später aber wieder den Criollos zugeordnet (Cuatrecasas 1964).

Der Name „Pentagona“ leitet sich von den 5 ausgeprägten Rippen ab, welche Früchte dieses Typs besitzen und die das Ergebnis einer Fusion jeweils zweier benachbarter Rippen darstellen. Pentagona-Früchte besitzen daher eine innerhalb der Art einzigartige, fünfkantige Form.

Die Samen ähneln der Form nach den übrigen Criollos, kommen jedoch in den unterschiedlichsten Farbschattierungen bis zum Dunkelviolett vor. Die Fruchtwand ist dünn und sehr runzlig. Sie erinnert an Reptilienhaut, was der Kakao-Population in Zentralamerika die Bezeichnung „Lagarto“ (span. „Eidechse“) eingebracht hat. Motamayor *et al.* 2002 sehen die dünne Fruchtwand als Indiz dafür an, dass es sich bei Pentagona um eine früh domestizierte Kakao-Kulturform handelt. Durch dieses Merkmal wird das Verhältnis von Samengewicht zum Fruchtgewicht erhöht und das Öffnen der Früchte zur Entnahme der Samen wird erleichtert.

Die Farbe der Früchte ist rot oder zeigt Schattierungen mit einem geringeren Anteil an Grüntönen. Rohkakao des Typs „Pentagona“ wird als Edelkakao gehandelt (Moreno 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden Pentagona-Populationen untersucht, deren ursprüngliche Herkunft am Fuße der Anden in den venezuelanischen Staaten Táchira und Mérida liegt. Das Material stammt von 2 Varietäten, die aufgrund ihrer Fruchtwandfärbung als „Pentagona verde“ sowie „Pentagona rojo“ bezeichnet werden.

2.2.4.5 Untersuchte Trinitario-Varietäten

ICS 95 (Imperial College Selections, Anhang; Abb. 92)

Die ICS-Klone wurden im Rahmen eines groß angelegten Züchtungsprogramms ab 1930 auf Trinidad und Tobago zusammengestellt. Auswahlkriterien waren dabei u. a. die beobachtete Resistenz gegen Krankheiten wie *Moniliophthora perniciosa*. Bis heute spielen die ICS-Klone in den für die internationale Kakaowirtschaft betriebenen Zuchtprogrammen von Trinidad und Tobago eine wichtige Rolle.

ICS 95 gehört zu den Klonen, die eine hohe Resistenz gegen *Moniliophthora perniciosa* aufweisen. Clapperton 1992 bescheinigt ihm ein gut entwickeltes Flavour bei geringer Adstringens. In einer späteren Veröffentlichung des gleichen Autors werden seine Flavour-Eigenschaften allerdings als „variabel“ eingestuft Clapperton *et al.* 1994b).

ICS 95 wird international auf vielen Genbanken kultiviert, wodurch es möglich war, für die vorliegende Arbeit Proben aus verschiedenen Herkunftsgebieten zu vergleichen.

BR 25, KKM 22, PBC 123, UIT 1

Die hier vorgestellten Klone wurden in Malaysia gezüchtet. Sie erzielen unter den in Sabah existierenden Umweltbedingungen besonders hohe Erträge (persönliche Mitteilung von Mitarbeitern der ARS Quoin Hill, 2000).

BR (Balung River, Anhang; Abb. 87)

Die BR-Klone entstammen dem Auswahlprogramm der Forschungsstation am Balung River bei Tawau auf Borneo in Malaysia. Ihre genetische Herkunft ist unbekannt und konnte auch durch kürzlich durchgeführte molekulargenetische Untersuchungen nicht geklärt werden (Dr. R. Lockwood, persönliche Mitteilung 2006). Dr. R. Lockwood nimmt an, dass es sich um ein Überbleibsel aus der frühen Kultivierung von Kakao in Sabah handelt - und somit vermutlich um Trinitarios. Auch nach Clapperton *et al.* 1994b sowie Pang Thau Yin 2004 handelt es sich um reine Trinitarios. Der Klon wurde daher innerhalb der vorliegenden Arbeit diesem Typ zugeordnet.

KKM (Klon Koko Mardi (Malaysian Agricultural Development and Research Institute, Anhang; Abb. 93)

Als Eltern des Klons KKM 22 gibt die ICGD 2007 die Klone UAWA 18 (ein malaysischer Klon ungeklärter Herkunft) und T.S. 15/43.352 an. Unter letzterer Bezeichnung wird in der ICGD 2007 jedoch kein Klon geführt. Nach persönlicher Mitteilung von Mitarbeitern der ARS Quoin Hill, 2000 handelt es sich um einen Trinitario, und er wird daher in der vorliegenden Arbeit - unter Vorbehalt - als Trinitario eingruppiert.

PBC (Prang Besar Clone, Anhang; Abb. 95):

Wie bereits der Name verrät, stammen alle PBC-Klone von der Prang Besar Station im Staat Selangor auf der malaysischen Halbinsel. Auch ihre genetische Herkunft ist unklar. Nach Clapperton *et al.* 1994b handelt es sich vermutlich um Trinitarios, weswegen der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Klon diesem Typ zugeordnet wurde.

Der Klon PBC 123 zeichnet sich durch seine hohe Resistenz gegen die Pilzkrankheit „Vascular Streak Dieback“ (VSD) (*Oncobasidium theobromae*) aus, welche neben dem Cocoa Pod Borer (*Conopomorpha cramerella*) zu den höchsten Ernteverlusten im kommerziellen Kakaoanbau Malaysias führt (Lamin und Sa'edi 1994). Pfropfungen alter Kakaobestände mit PBC 123 gehörten zum Zeitpunkt der Probensammlung im Jahr 2000 zu den wichtigsten Maßnahmen zur Steigerung des Ertrages auf den Kakaoplantagen bei Tawau.

UIT (Unidentified Introduced Trinitario, Anhang; Abb. 100)

Schon der Name des Klons UIT 1 verrät seine ungeklärte Herkunft (s. o.). Die ICGD 2007 gibt an, dass es sich bei allen UIT-Genotypen um Kreuzungen von ICS-Klonen aus Trinidad handelt (s. o.) und beruft sich dafür auf eine persönliche Mitteilung von B. G. D. Bartley. Nach Clapperton *et al.* 1994a weist UIT 1 große morphologische Ähnlichkeiten zu den Früchten von Criollos aus Nicaragua auf, die wiederum in genetischer Beziehung zu den ICS-Klonen stehen. Demnach handelt es sich bei diesem Klon um einen „echten“ Trinitario.

2.3 Die Auswirkung von Standortfaktoren auf den Polyphenolgehalt

In dem Gehalt und in der Zusammensetzung der phenolischen Komponenten einer pflanzlichen Spezies gibt es standortspezifische Unterschiede. Von Faustino *et al.* 2003, Häkkinen 2000, Häkkinen und Törrönen 2000, Goldberg *et al.* 1998 sowie von McDonald *et al.* 1998 werden Zusammenhänge zwischen der geographischen Herkunft und dem Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen beschrieben, ohne dabei einen Schwerpunkt auf spezifische Merkmale der jeweiligen Standorte zu legen. Häufiger wird die Bedeutung einzelner abiotischer und biotischer Faktoren für den Polyphenolgehalt einer Pflanze untersucht. Im Folgenden werden jene Standortfaktoren aufgeführt, welche in diesem Zusammenhang am wichtigsten sind:

1. Licht

Bei steigender Lichtintensität werden in Blättern verstärkt phenolische Komponenten gebildet (Rousseaux *et al.* 2004, Schmitz-Hoerner und Weissenböck 2003, Kolb *et al.* 2001, Mole *et al.* 1988).

2. Temperatur

Einen möglichen Einfluss der Temperatur auf die Bildung pflanzlicher Polyphenole diskutieren u. a. Toor *et al.* 2006, Yao *et al.* 2005, Nacif de Abreu *et al.* 2005, sowie Zhou und Yu (2004). Demnach wirken sich Temperaturveränderungen offenbar unterschiedlich auf den Gehalt verschiedener phenolischer Substanzen aus. So ging in einigen der beschriebenen Versuchspflanzen nach einer Temperaturveränderung der Gehalt einiger phenolischer Inhaltsstoffe zurück, während gleichzeitig der Gehalt anderer phenolischer Substanzen zunahm.

3. Feuchtigkeit

Bei Wasserstress weisen Cohen *et al.* 1994 und Nacif de Abreu *et al.* 2005 in den von ihnen untersuchten Pflanzen eine Akkumulation phenolischer Inhaltsstoffe nach.

4. Nährstoffgehalt des Substrats

Durch Erhöhung der Nährstoffversorgung eines pflanzlichen Gewebes kommt es in den Untersuchungen von Lux-Endrich *et al.* 2000, Mondy *et al.* 1967 sowie Estiarte *et al.* 1994 zu einer Abnahme des Gehaltes an phenolischen Inhaltsstoffen. Wilkens *et al.* 1996 finden den höchsten Polyphenolgehalt in durchschnittlich versorgten Pflanzen.

5. CO₂-Gehalt in der Luft

Die Erhöhung des zur Verfügung stehenden CO₂-Gehalts führt in den von Peltonen *et al.* 2005 und Davey *et al.* 2004 untersuchten Pflanzenarten zu einer Anreicherung phenolischer Inhaltsstoffe.

6. Herbivoren und mechanische Verletzung

Als direkte Reaktion auf den Angriff durch Fraßfeinde oder auf sonstige mechanische Verletzung werden phenolische Inhaltsstoffe *de novo* synthetisiert (Tebayashi *et al.* 2000, Leitner *et al.* 2005).

7. Pathogene

Auch zur aktiven Pathogenabwehr findet eine Neubildung von Polyphenolen in den befallenen Gewebeabschnitten der Pflanze statt (Shein *et al.* 2001, Nicholson und Hammerschmidt 1992).

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Modelle entwickelt, welche Vorhersagen für die Verteilung der zur Verfügung stehenden Ressourcen auf den pflanzlichen Primär- bzw. Sekundärstoffwechsel, sowie für deren Beeinflussung durch die Umwelt ermöglichen sollen. Darunter ist die von Bryant *et al.* 1983 entwickelte „Carbon/Nutrient Balance“-Hypothese (CNB) wahrscheinlich am ältesten und am bekanntesten. Gemäß der CNB fixieren Pflanzen bei Nährstoff-Unterversorgung mehr Kohlenstoff als sie für ihr Wachstum verwenden können (Stickstoff als limitierender Faktor). Der überschüssige Kohlenstoff wird für die Biosynthese kohlenstoffhaltiger Sekundärstoffe verwendet. Demnach produziert eine Pflanze auf nährstoffarmen Böden u. a. mehr phenolische Verbindungen als bei optimaler Nährstoffversorgung.

In der Praxis werden die Vorhersagen der „Carbon/Nutrient Balance“-Hypothese nicht immer bestätigt, sodass Kritiker dafür plädieren, sie zu verwerfen (Hamilton *et al.* 2001, Koricheva 2002).

Die „Growth-Differentiation Balance Hypothesis“ (GDB) wurde von Herms *et al.* 1992 entwickelt. Sie setzt einen Fokus auf die Abwehrmechanismen einer Pflanze gegen Fraßfeinde und Pathogene bzw. auf die Standortfaktoren, durch welche diese beeinflusst werden. Ihr zufolge kommt es z. B. durch die Düngung von moderat mit Nährstoffen unterversorgten Pflanzen zu einem Rückgang ihrer Gehalte an phenolischen Inhaltsstoffen und zu einer Steigerung ihres Wachstums. Im Gegensatz dazu führt jedoch die Düngung von stark unterversorgten Pflanzen zu einer Erhöhung ihrer Gehalte an sekundären Inhaltsstoffen, sofern sich dadurch auch die Photosyntheserate erhöht.

Ein Nachteil der GDB ist, dass sich ihre Gültigkeit schwer überprüfen lässt (Stamp 2004).

Das von Jones und Hartley 1999 entwickelte „Protein Competition Model“ (PCM) dient der Vorhersage der Verteilung des Gesamt-Polyphenolgehaltes und seiner Konzentration in Blättern höherer Landpflanzen. Es geht von einer Konkurrenz des Protein- und Polyphenol-Stoffwechsels um die Ausgangssubstanz Phenylalanin aus. Beeinflusst wird die Allokation des zur Verfügung stehenden Phenylalanins von der spezifischen Entwicklungsphase, in welcher sich die Pflanze befindet, aber auch durch die in den Punkten 1-7 oben aufgelisteten Umweltfaktoren.

Neben den hier kurz umrissenen Modellen wurden in der pflanzenökologischen Forschung noch weitere Hypothesen entwickelt, welche die Produktion und Akkumulation sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe in Abhängigkeit von externen Faktoren nachvollziehbar und vorhersagbar machen sollen. Zwangsläufig bergen alle diese Modelle das Problem, dass sie entweder nicht alle Details der komplexen Interaktion einer Pflanze mit ihrer Umwelt berücksichtigen oder dass sie selber zu komplex sind, um noch überprüfbar zu sein.

Für die Herkunftsgebiete der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kakaoproben wurden möglichst viele Standortfaktoren ermittelt, welche nach den hier vorgestellten Modellen einen Einfluss auf die Regulierung des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels nehmen könnten. Diese Daten werden im folgenden Kapitel zusammen mit weiteren Hintergrundinformationen zu den einzelnen Herkunftsgebieten aufgeführt. Aufgrund der großen Vielfalt potentiell bedeutsamer Standortfaktoren sowie der Tatsache, dass diese für die hier untersuchten Proben nur lückenhaft bekannt sind, kann die vorliegende Arbeit dabei nicht den Anspruch einer ökophysiologischen Vergleichsstudie erfüllen. Dennoch wurde eine potentielle Relevanz der einzelnen bekannten Standortfaktoren für die ermittelten qualitativen und quantitativen Polyphenolgehalte der untersuchten Proben jeweils überprüft.

2.4 Die Herkunft der untersuchten Proben

Die im Rahmen der vorliegenden Studie untersuchten Kakaoproben wurden im Zeitraum zwischen Oktober 2000 und Oktober 2004 aus den Herkunftsländern Ecuador, Ghana, Malaysia, England, Trinidad und Venezuela bezogen.

Neben einer kurzen Darstellung der wichtigsten Daten zur Geschichte und Ökonomie des Kakaoanbaus in den einzelnen Ländern liefert dieses Kapitel eine Aufstellung wichtiger Standortfaktoren, die zum Vergleich der Anbaubedingungen der einzelnen Proben genutzt wurden. Hierfür wurden Daten zu Klima und Bodenbeschaffenheit sowie zu agronomischen Merkmalen wie Düngung, Beschattung und Bewässerung recherchiert.

Die genannten Daten konnten nicht von allen Standorten in gleicher Ausführlichkeit und Verlässlichkeit ermittelt werden. Soweit vorhanden werden sie, Land für Land, im Folgenden aufgeführt.

2.4.1 Ecuador



Abb. 27: Ecuador mit Herkunftsgebiet der Kakaoproben bei Quevedo (rot markiert)

Nach Bartley 2005 liegt im Grenzgebiet von Ecuador eines der Ursprungszentren der Diversität der Art *T. cacao* L. Es handelt sich um ein Gebiet am östlichen Fuß der Anden, in welchem zahlreiche Flüsse entspringen (Abb. 26, roter Bereich).

In der westlich der Anden gelegenen Küstenzone Ecuadors wurde bereits im siebzehnten Jahrhundert mit dem kommerziellen Anbau von Kakao begonnen. Bis zum Ende des 19. Jahrhunderts wurden ausschließlich Individuen angebaut, die von einer einzigen Varietät mit geringer genetischer Variabilität abstammten. Kakaosorten mit diesem Hintergrund zeichnen sich durch ein charakteristisches, blumiges Flavour aus.

Ab dem neunzehnten Jahrhundert gelangten u. a. aus Venezuela und Trinidad neue Varietäten nach Ecuador. Von diesem Zeitpunkt an wurden die klassischen Kakaosorten Ecuadors unter der Bezeichnung „Nacional“ gehandelt (Bartley 2005). In Kapitel 2.2.3.2 wird diese Varietät, welche aufgrund ihrer Herkunft den UAFs zugeordnet werden kann, genauer beschrieben.

Allgemein wird davon ausgegangen, dass der Nacional-Typ im genannten Gebiet schon viele Jahrhunderte vor der Ankunft der Europäer existierte. Über seine Bedeutung für die dort ansässigen Indianer-Hochkulturen der Valdivias (3500-1600 v. Chr.), Machalillas (1600-1200 v. Chr.) und Chorreras (1200-500 v. Chr.), sowie der nachfolgenden, regionalen Indianerkulturen ist wenig bekannt. Nach Wolters 1999 gibt es jedoch vereinzelte archäologische Funde und Aufzeichnungen aus der frühen Kolonialzeit, welche auf die indigene Nutzung des Kakaobaums in der Küstenzone West-Ecuadors hinweisen.

Auf geschätzten 263.000 ha wurde in der Saison 1997/1998 in Ecuador Kakao angebaut (The Federation of Cocoa Commerce Ltd. 2007). Mit ca. 115.000 t Rohkakao in der Saison 2005/2006 ist Ecuador nach Brasilien der zweitgrößte Kakaoproduzent Südamerikas. Damit kam ein Weltmarktanteil von 3,2 % an der Rohkakaoproduktion aus Ecuador (ICCO 2007a). Durch den hohen Anteil von Nacional-Kakao an der Gesamt-Rohkakaoproduktion ist Ecuador der größte Produzent von Edelkakao weltweit.

Eine auch in heutiger Zeit noch übliche Handelsbezeichnung für Edelkakao aus Ecuador ist „Arriba“ (span. „oberhalb von“). Traditionell wird sie verwendet für Kakao des Typs Nacional aus dem Gebiet nördlich (also oberhalb) der Küstenstadt Guayaquil. Das blumige Flavour der Nacional-Varietät wird auch als Arriba-Flavour bezeichnet.

In den letzten Jahrzehnten stagnierte die durchschnittlich produzierte Rohkakaomenge in Ecuador um den oben genannten Wert, wobei sie in den El Niño-Jahren 1982 und 1997 deutlich darunter lag. Weitere Problemfaktoren der ecuadorianischen Kakaowirtschaft stellen die Pilzkrankheiten *Moniliophthora perniciosa* und *Moniliophthora roreri* dar. Zudem gibt es Mängel in der Auswahl geeigneter Kakaosorten und in der Kooperation zwischen Forschungsinstitutionen und Kakao-Farmern.

Das gestiegene Interesse der Schokoladenindustrie an den Arriba-Edelkakaos gab den Anstoß für mehrere nationale und internationale Projekte zur Stärkung der ecuadorianischen Kakaowirtschaft. Das derzeit größte begann im September 2003 unter der Leitung der USDA (United States Department of Agriculture). Es hat zum Ziel, die jährliche Rohkakaoproduktion bis 2008 auf mindestens 140.000 t zu steigern (USDA 2007).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Kakaoproben stammen von einer ehemals zu Nestlé gehörenden Farm, auf der sich eine Genbank kommerziell verwendeter Kakaoklone befindet, welche vor etwa 10 Jahren auf der Farm angelegt wurde. Die

Plantage liegt in der Umgebung von Quevedo und somit im klassischen Anbaugebiet des „Arriba“-Kakaos (Abb. 27). Die Stadt mit etwa 150.000 Einwohnern ist ein wichtiges kommerzielles Zentrum der zum Hinterland der Pazifikküste gehörenden Provinz Los Ríos. Etwa 90 % des Gebietes werden landwirtschaftlich genutzt, u. a. für den Anbau von Kakao.

Die in Tab. 6 aufgeführten Daten zur beprobten Pflanzung und zu dem dort herrschenden Klima stammen von ihrem jetzigen Besitzer Milton Alvarez, einem ehemaligen Mitarbeiter von Nestlé. Auf der Plantage gibt es keine Schattenbäume. Gekoppelt mit einer starken Bodendüngung werden auf diese Weise hohe Erträge erzielt.

Kontaktpersonen für die Probenbeschaffung und Datenerhebung aus Ecuador:

Peter Bucheli, ehem. Centre de Recherche Nestlé, 101, Avenue Gustave Eiffel, Notre-Dame D'Oé, liP. 9716, 37097 Tours Cedex 2, France; jetzt Nestlé R&D Center Shanghai Ltd., No. 13 Qiao Nan, Cao An Road, Jia Ding District, Shanghai 201812, People's Republic of China,

Milton Alvarez, Nestlé Agronomia, Via Interoceanica, Castilla postal 17-11-6053, Quito-Cumbaya, Ecuador.

2.4.2 Venezuela

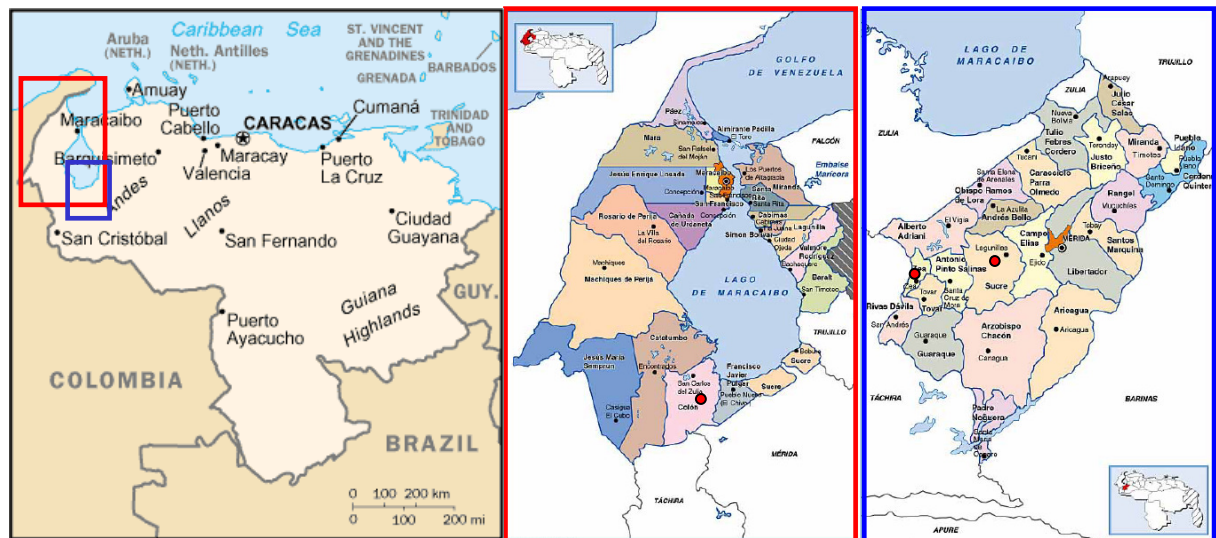


Abb. 28: Venezuela mit Detailansichten der 3 Proben-Herkunftsgebiete (rot markiert); **roter Rahmen:** Bundesstaat Zulia mit der Gemeinde Colón; **blauer Rahmen:** Bundesstaat Mérida mit den Gemeinden Zea und San Juan de Lagunillas

Schon lange vor der Ankunft der spanischen Eroberer wurde Kakao in Venezuela kultiviert (Hernández 1968). Bereits um 1600 produzierte das Land für den Export nach Europa und wurde um 1700 zum weltweit größten Kakaoproduzenten (Capriles de Reyes 2000). Bei den angebauten Sorten handelte es sich um traditionellen, echten Criollo (siehe 2.2.3.1) mit hoher Flavour-Qualität.

Erst durch den Aufbau der venezolanischen Ölindustrie in den 40er Jahren des vorigen Jahrhunderts kam es zu einem Einbruch in der nationalen Kakaowirtschaft. Die Einkreuzung minderwertigerer Kakaosorten und die Festlegung von Fixpreisen für Rohkakao sowie die Ausbreitung diverser durch Pilze verursachte Krankheiten (*Moniliophthora perniciosa*, *Ceratocystis fimbriata*, *Moniliophthora roreri*) führten zu einem Rückgang von Rohkakaoqualität und -produktion (Capriles de Reyes 2000).

Trotz diverser Anstrengungen seitens der Regierung und der betroffenen Landbevölkerung wie zum Beispiel der Vereinigung der Kakao-Plantagenbesitzer, der Gründung von Pflanzenschutzeinrichtungen und Kakao-Zuchtstationen hat die Kakaowirtschaft Venezuelas ihre frühere Bedeutung bis heute nicht wiedererlangt.

Die Kakao-Plantagenwirtschaft Venezuelas sichert heute das Einkommen von 25.000 Familien und umfasst eine Anbaufläche von 70.000 ha. Der durchschnittliche Ertrag ist mit 240 kg Rohkakao ha⁻¹ sehr niedrig, sodass insgesamt nur etwa 16.000 Tonnen Rohkakao pro Jahr produziert werden. Die hochwertigen Criollo-Sorten wurden weitestgehend durch qualitativ minderwertigere, aber vitalere Forastero- und Trinitario-Sorten verdrängt. Nur im bergigen Westen des Landes werden Criollos noch vereinzelt kultiviert. Der Anteil Venezuelas am weltweit produzierten Edelkakao liegt bei ungefähr 10 % (Capriles de Reyes 2000).

Da in den letzten Jahren das Interesse der Kakaoindustrie an der Verarbeitung von Edelkakaosorten gestiegen ist, gibt es auch in Venezuela Projekte zum Erhalt und zur Re-Etablierung der alten, genetisch unverfälschten Criollo-Sorten. Unter anderem werden dafür Genbanken und Sorten-Zuchtstationen angelegt. 3 dieser Einrichtungen lieferten das für die vorliegende Studie untersuchte Material und werden im Folgenden genauer beschrieben. Die verwendeten Daten basieren, sofern nicht anders angegeben, auf Material und persönlichen Angaben von Alexis Zambrano (INIA-Mérida, s. u.).

2.4.2.1 Versuchsfeld bei der Ortschaft Zea

Dieses Versuchsfeld ist zugleich der Fundort der darauf angebauten Varietät der „Criollo Mérida“-Population auf einer kleinbäuerlich bewirtschafteten Plantage. Eines der Individuen ist bereits etwa 100 Jahre alt und dient als nationale Referenzpflanze (siehe 2.2.4.4).

Das Gelände liegt im bergigen Abschnitt des Bundesstaates Mérida (Abb. 28) in Zea, einer kleinen Gemeinde mit etwa 10.000 Einwohnern. Es gehört zum Schwemmland eines Flusstales.

Der gut drainierte, dunkelbraune Boden enthält ab einer Tiefe von 25 cm größere Steine und Granitfragmente, die zusammen mit dem ohnehin vorhandenen Kies einen Anteil von über 30 % ausmachen. Die Tiefe des Bodens ist somit gering, was seine landwirtschaftliche Nutzbarkeit einschränkt.

Die Beflanzung und Bewirtschaftung des Versuchsgeländes entspricht dem Mischkultursystem einer kleinbäuerlichen Subsistenzwirtschaft. Die Pflanzdichte der

Kakaobäume ist gering. Neben Criollo-Kakao und seinen Hybriden werden auch Maracuja (*Passiflora edulis* Sims. var. *flavicarpa*, *P. quadrangularis*), Kaffee (*Coffea arabica* L.), Bananen (*Musa paradisiaca* L. var. *sapientum* u. a.), Avocado (*Persea americana* Mill.), Orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) und Maniok (*Manihot esculenta* Crantz) angebaut. Dauerhaften Schatten für die Kakaobäume liefert neben den erwähnten Nutzpflanzen *Erythrina poeppigiana* (Walp). Cook, eine Leguminose mit dem lokalen Namen „Bucare Ceibo“, die zu den Korallenbäumen gehört. Vertreter dieser Gattung sind beliebte Schattenbäume für Kaffee- und Kakaoplantagen und werden auch auf der Genbank in Trinidad eingesetzt (siehe 2.4.6).

Das Auftreten diverser Pilzkrankheiten („Bitter Rot“, hervorgerufen durch *Glomerella cingulata* [Stoneman] Spauld. u. H. Schrenk, außerdem *Ceratocistis fimbriata* Ell. u. Halst.) wurde beobachtet. Ameisen und Termiten besiedeln das Gelände. Sämtliche Kakaobäume sind von parasitär lebenden Epiphyten der Gattung *Phthirusa* (*Lorantaceae*) bewachsen.

Zur Bewässerung des Geländes reichen die natürlichen Niederschläge aus.

2.4.2.2 Versuchsstationen San Juan de Lagunillas und Chama

Die beiden im Folgenden vorgestellten Versuchsstationen besitzen strukturell identische Pflanzsysteme. Die Kakaobäume sind in Abständen von 3 m × 3 m gepflanzt, was hochgerechnet einen Bestand von 1111 Kakaobäumen pro ha ergibt (siehe Tab. 4).

Die jungen Pflanzsysteme stehen zunächst im Schatten von Bananenstauden, welche zumeist entfernt werden, sobald die für permanenten Schatten angepflanzten Korallenbäume (*E. poeppigiana*, s. o.) eine ausreichende Höhe erreicht haben. An einigen Standorten bleiben die Bananenstauden als zusätzliche Schattenspende erhalten.

Der Pflanzabstand zwischen den Bananenstauden beträgt 3 m × 3 m, während *Erythrina* in einem Pflanzabstand von 15 m × 15 m gepflanzt wird (siehe Tab. 4).

Auch die Düngung erfolgt, trotz unterschiedlicher Bodentypen, auf beiden Versuchsgeländen gleich (siehe Tab. 6).

Tab. 4: Pflanzschema der Criollo-Genbanken in Chama und in San Juan de Lagunillas

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.	T.c.

*: temporärer Schatten, *: permanenter Schatten, T. c.: Kakaobaum

Träger der Genbank in Chama/ Zulia sind CORPOZULIA (Corporación del Zulia) und FONAIAP (Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias)-Zulia. Die Genbank wurde 1984 gegründet und dient vor allen Dingen der Konservierung von Porcelana-Populationen (siehe 2.2.4.4), untergliedert in Varietäten mit grünen, roten und „weißen“ Früchten.

Das Versuchsgelände befindet sich in der Gemeinde Colón des venezolanischen Bundesstaats Zulia im Südwesten des Sees Maracaibo.

Die Plantage 3233 m² groß und liegt in einer Flussebene, die gelegentlich überschwemmt wird. Die Böden enthalten Schlamm- und Kiesablagerungen. Die Schwemmstoffe stammen aus der Sierra Nevada, deren Gestein z. T. vulkanischen Ursprungs ist und sich aus Glimmer, Gneis, Magnesiumsilikat, Granit, Marmor und Quarz zusammensetzt. Klassifiziert werden die sandigen, lehmigen und kiesigen Böden als Tropopsamments, Tropaquepts, Tropofluvents und Troporthents. Durch die niedrigen Konzentrationen von Magnesium, Schwefel (überwiegend in Form von Sulfat), und Eisen wird eine zusätzliche Düngung erforderlich. Stickstoff liegt in Form von Nitrat und Ammonium in jeweils niedrigen Konzentrationen vor. Die Gesamt-Stickstoffmenge soll jedoch ausreichend für das Gedeihen der Plantage sein

Die natürliche Vegetation des Anbaugbiets besteht aus tropischem Regenwald, der heute jedoch zugunsten landwirtschaftlich genutzter Flächen (Anbau von Kakao, Zitrusfrüchten, Breiapfel etc.) zu einem großen Teil abgeholzt wurde.

Die höchste Strahlungsintensität wird von Juli bis Oktober gemessen. Die mit durchschnittlich 4,7 km h⁻¹ recht hohen Windgeschwindigkeiten beeinträchtigen die Etablierung von windempfindlichen Pflanzen wie etwa Bananenstauden.

Träger für das Versuchsgelände bei San Juan de Lagunillas in Mérida sind FONAIAP-Mérida (s. o.) sowie Plan Coordinado Gobernación de Mérida. Hier etablierte das INIA (Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas del estado Mérida) vor mehr als 10 Jahren eine Genbank für Criollo-Kakao. Die 66 angebauten Criollo-Klone dienen Forschungszwecken ebenso wie der Bereitstellung genetischen Materials für andere Institutionen. Bei einem Teil der Pflanzung handelt es sich um eine Varietät der Criollo-Population Guasare (siehe 2.2.4.4) mit 500 Individuen, die im Alter von 3 bis 4 Jahren hierher verpflanzt wurden und sich generativ vermehren.

Das Versuchsgelände liegt im Bereich des unteren Laufes des Flusses Chama in den venezuelanischen Anden. Es trägt den Namen des nächsten Dorfes San Juan de Lagunillas in der Gemeinde Sucre im Bundesstaat Mérida. Es herrscht ein semiarides Klima, da sich die vom See Maracaibo aufsteigenden feuchten Luftmassen bereits vor Erreichen des Flusstales an Berghängen abregnen. Auch in der für gewöhnlich regenreicheren Zeit von Juli bis Dezember müssen die Plantagen daher zusätzlich bewässert werden.

Tektonische Verwerfungen mit Gefällen von teilweise über 30 % prägen die Region um die Ortschaft San Juan de Lagunillas. Auch das Kakao-Versuchsgelände wurde in Hanglage errichtet. Dadurch weist das Gelände eine leichte Erosionsanfälligkeit auf.

Der Boden des Versuchsgeländes ist ein typischer Cambortid mit toniger Textur. Auch durch seinen Anteil an organischem Material besitzt er eine hohe Feuchtigkeitsrückhaltekapazität, die bei den geringen Niederschlägen in der Region von Vorteil ist. Außerdem besitzt der Boden eine moderate bis hohe Kationenaustauschkapazität. Trotz ständiger Bewässerung gibt es keine Anzeichen für eine Bodenversalzung oder für eine Störung der mikrobiellen Aktivität im Boden.

Die zusätzliche Düngung des Bodens ist erforderlich aufgrund des niedrigen Gehalts an Sulfat und an den Spurenelementen Calcium, Magnesium, Eisen und Mangan.

Kontaktpersonen für die Probenbeschaffung und Datenerhebung aus Venezuela:

Alexis Zambrano und Dr. Gladys Ramos, INIA Mérida (Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas del estado Mérida)

2.4.3 Ghana



Abb. 29: Ghana mit Herkunftsgebiet der Kakaoproben bei New Tafo (rot markiert)

Die ersten westafrikanischen Kakaoplantagen wurden um 1822 auf São Tomé und Príncipe angelegt (Bartley 2005). Das hierfür verwendete Kakaomaterial stammte aus dem Amazonasgebiet. Es handelte sich somit um klassische Forastero-Populationen.

Über die ersten Versuche, Kakao in Ghana zu etablieren, gibt es unterschiedliche Angaben. Mit großer Wahrscheinlichkeit wurde die Nutzpflanze nicht vor 1850 in Ghana eingeführt, wobei das Samenmaterial wahrscheinlich von São Tomé und Príncipe stammte (Bartley 2005).

Ab 1900 erreichten neue Kakaopflanzen mit unterschiedlicher genetischer und geographischer Herkunft das Land. Darunter waren sowohl Forasteros als auch Criollos, die von Trinidad und aus den „Royal Botanic Gardens“ in England stammten. Im Laufe der folgenden Jahre setzte sich eine selbstkompatible Amelonado-Varietät durch, welche unter der Bezeichnung West African Amelonado (WAA) bekannt wurde (siehe 2.2.4.1).

Über 70 % der internationalen Kakaoernte kommt heute aus der Region Westafrika, wobei Ghana einen Anteil von 20,6 % liefert. Es ist damit der zweitgrößte Kakaoproduzent nach der Elfenbeinküste, und Kakao ist das wichtigste Exportprodukt des Landes. Die jährliche Kakaoproduktion des Landes lag in der Saison 2005/2006 bei 741.000 Tonnen (ICCO 2007a).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben stammen von der Genbank des CRIG (Cocoa Research Institute Ghana) bei New Tafo (Abb. 29).

Die kleine Stadt aus der Provinz „Eastern“ hat ca. 20.000 Einwohner und liegt auf 220 m ü. NN im Einflussbereich des etwa 116 km langen Flusses Densu.

Die natürliche Vegetation besteht aus feuchtem, sich teilweise saisonal entlaubendem Wald, der allerdings zum größten Teil beeinflusst ist durch menschliche Aktivitäten wie Land- und Holzwirtschaft sowie dem Abbau von Bodenschätzen (GhanaDistricts.com 2007).

Die in Tab. 6 zusammengefassten Daten zu Klima und Anbaubedingungen auf der Genbank des CRIG basieren auf persönlichen Mitteilungen von Stephen Yaw Opoku (CRIG, s. u.) und Dr. Rob Lockwood (s. u.) sowie auf Angaben aus Anim-Kwapong und Frimpong 2005.

Zu den auf ihren Genbanken vorhandenen Böden konnte das CRIG keine Daten zur Verfügung stellen, da entsprechende Untersuchungen bis zur Fertigstellung der vorliegenden Studie nicht abgeschlossen waren. Es sollen jedoch Unterschiede zwischen den einzelnen Parzellen bestehen. Die im Folgenden aufgeführten Angaben zu Boden und Topographie stammen von einer durch Adu 1990 erstellten Bodenkarte des Gebiets. Demnach haben sich die Böden um New Tafo über Granit und ähnlichem Felsgestein entwickelt. Es handelt sich um gut entwickelte, dränierte rote Tonerden mit fein sandiger Struktur, die aus grob gekörntem Diorit entstanden sind. Dieses magmatische Gestein ähnelt dem Granit, enthält aber weniger Quarz.

Nach Adu 1990 gehören die Böden um New Tafo zum besten Kulturland der Region (Klasse 2 in der von ihm verwendeten Klassifizierung von 2 (good) bis 5 (poor)), obwohl die Körnung des Bodens lokal sehr grob ist, sodass er z. T. sogar steinig und hart ist. In den niedrigeren Hanglagen finden sich jedoch tiefe Böden mit geringem Kiesanteil.

Obwohl die Böden saisonabhängig an der Oberfläche austrocknen können, haben sie eine ziemlich hohe Feuchtigkeitsretentionskapazität. Sie können leicht von Wurzeln durchdrungen werden. Die Böden eignen sich dadurch für eine große Bandbreite von land- und forstwirtschaftlichen Kulturen.

Begünstigt durch die Wellentopografie des Landes besitzen die Böden eine mäßige bis starke Erosionsanfälligkeit. Sie eignen sich darum nach Adu 1990 kaum für eine intensive Kultivierung mit mechanischen Geräten, sondern hauptsächlich für einen manuellen Anbau.

Kontaktpersonen für die Probenbeschaffung und Datenerhebung aus Ghana:

Prof. Dr. Yah Y. Adu-Ampomah, Ghana Cocoa Board, P.O. Box 933 Accra, Ghana

Stephen Yaw Opoku, Cocoa Research Institute of Ghana (CRIG), PO Box 8, New Tafo, Ghana

Dr. Rob Lockwood, 30 St Martin's Drive, Eynsford, Dartford, Kent DA4 0EZ, UK

2.4.4 Malaysia



Abb. 30: Malaysia mit Herkunftsgebiet der Kakaoprobe bei Tawau (rot markiert)

Bereits um 1670 wurde Kakao in Südostasien eingeführt, wo er zunächst auf den Philippinen kultiviert wurde. Es handelte sich dabei um Populationen, die von mittelamerikanischen Criollos abstammten (Bartley 2005).

Nach Bartley 2005 wurde Kakao wahrscheinlich schon vor 1777 auf der malaysischen Halbinsel eingeführt, gewann aber erst in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts eine Bedeutung als Handelsgut. In den späten 40er Jahren wurde eine Bestandsaufnahme der Kakaovorkommen auf der Halbinsel durchgeführt. Sie ergab, dass fast alle der dort verbreiteten Populationen zum Criollo-Typ zählten. Nach offizieller Darstellung kamen Teile dieses Kakaomaterials aus Ceylon, jedoch zeigt das Vorkommen weißer Mutanten, dass ein Teil der Bäume von Populationen aus Java stammt.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben stammen aus dem Gebiet um die Stadt Tawau im malaysischen Staat Sabah auf der Insel Borneo (Abb. 30). Den hier vorhandenen vulkanischen Böden bescheinigte Prof. Dr. E. E. Cheeseman in einer 1948 durchgeführten Studie eine besondere Eignung für die Kultivierung von Kakao (Gustafsson 2002).

1950 wurden 5.000 Sämlinge der Population West African Amelonado von Ghana nach Sabah importiert, wo sie in Tuaran und auf dem Gelände bei Quoin Hill/ Tawau kultiviert wurden (persönliche Mitteilung von Mitarbeitern der Quoin Hill Research Station, 2000). 1956 wurde in der Stadt Tawau an der Ostküste eine Kakao-Forschungsstation eingerichtet und eine erste Kakaopflanzung zu kommerziellen Zwecken angelegt.

Aufgrund von Anpassungsschwierigkeiten des afrikanischen Kakaos wurden bald lokale Züchtungsprogramme gestartet, wobei auch neue UAF-Klone mit viel versprechenden Resistenzeigenschaften verwendet wurden, welche von der Genbank aus Reading (siehe 2.4.5) stammten. Ziel war die Produktion eines Massenkakaos von ähnlicher Qualität wie jener aus Westafrika (persönliche Mitteilung von Mitarbeitern der Quoin Hill Research Station, 2000).

In den späten 70er Jahren kam es zu einem Aufschwung des Kakaoanbaus in Sabah, der einerseits von Fördermaßnahmen der malaysischen Regierung, andererseits von den in dieser Zeit sehr hohen Weltmarktpreisen für Rohkakao getragen wurde (Gustafsson 2002). Zu ihrem Höhepunkt im Jahr 1989 lag die Kakaoanbaufläche in Sabah bei 205.260 ha (Malaysian Cocoa Board 2004).

In den 90er Jahren kam es zu einem Niedergang des Kakaoanbaus in Sabah und im Rest von Malaysia. Dieser wurde einerseits ausgelöst durch den Verfall des Rohkakao-Weltmarktpreises, andererseits durch steigende Produktionskosten. Letztere wurden zu einem erheblichen Teil verursacht durch das Auftreten des Parasiten „Cocoa Pod Borer“ *Conopomorpha cramerella* Snellen (*Lepidoptera, Gracillariidae*), der sich in den 80er Jahren auf Sabah zu etablieren begann (Gustafsson 2002). Die Raupen der winzigen Motte ernähren sich von der Pulpa und der Plazenta. Dadurch kommt es zu einer vorzeitigen und ungleichmäßigen Reifung und der Bildung kallöser Strukturen in der Pulpa, durch welche die Samen in Klumpen zusammenkleben. Wenn die Plazenta betroffen ist, verkümmern die betroffenen Samen. In Malaysia ist der Cocoa Pod Borer der wichtigste limitierende Faktor der lokalen Kakaoproduktion (Lambert und Porter 2007).

Neben dem Cocoa Pod Borer führt auch die Pilzkrankheit Vascular Streak Dieback (*Oncobasidium Theobromae*) auf Borneo zu erheblichen Ernteverlusten, sodass sich der Kakaoanbau im Gebiet kaum noch lohnt. Als Konsequenz daraus wurde 1996 die Cocoa Research Station bei Tawau in eine „Agricultural Research Station“ umgewandelt, die neben Zucht- und Forschungsprogrammen für diverse andere tropische Kulturpflanzen einen Hauptschwerpunkt auf den Anbau von Ölpalmen (*Elaeis guineensis* Jacq.) setzt.

Zum Zeitpunkt der Probenahme im Oktober 2000 lag die Gesamt-Kakaoanbaufläche von Sabah bei nur noch 51810 ha und ist seither noch einmal deutlich zurückgegangen auf geschätzte 21.600 ha in 2005 (Malaysian Cocoa Board 2004). Das Anbauggebiet zeigte einen starken Befall mit „Cocoa Pod Borer“, wovon auch die gesammelten Kakaoproben betroffen waren.

Entsprechend ihrer nunmehr untergeordneten, wirtschaftlichen Bedeutung befanden sich Genbanken bei Tawau und Tuaran in Sabah zum Zeitpunkt der Probennahme im Jahr 2000 in einem ungepflegten Zustand. Die meisten Individuen international verfügbarer Klone waren abgestorben. Daher wurden hauptsächlich die Früchte verschiedener Klone aus den nationalen Zuchtprogrammen gesammelt, die unter den gegebenen Bedingungen offenbar besser gediehen (siehe Tab. 7).

Alle malaysischen Kakaoproben stammen von der Kakao-Genbank des Malaysian Cocoa Boards, Quoin Hill Research Station, bei Tawau. Die 600 m hohe Erhebung Quoin Hill ist Teil eines Gebietes, der auf der Bodenkarte „Tawau. The Soils of Sabah“ (The Director of National Mapping, Malaysia 1974) als „zergliedertes Plateau mit flacher oder sanft gewellter Oberfläche“ charakterisiert wird. Die Grundlage des Bodens bildet basisches magmatisches Gestein.

Als Schattenbaum dient unter anderem *Gliricidia sepium* („mother of cocoa“, „mataraton“), ein mittelgroßer Baum aus der Familie der *Leguminosae*, dessen ursprüngliche Heimat Zentralamerika ist. Bei Etablierung einer neuen Plantage werden zunächst 32 Schattenbäume pro Hektar gepflanzt. Nach einem Jahr wird die Zahl um die Hälfte reduziert, nach 3 bis 4 Jahren werden noch einmal 50 % entfernt, sodass am Ende 8 Schattenbäume pro Hektar übrig bleiben.

Alle weiteren in Tab. 6 aufgeführten Angaben zur Genbank beruhen auf persönlichen Mitteilungen von Mitarbeitern der Forschungsstation.

Die Daten zum Klima der östlichen Küstengebiete Sabahs wurden vom Malaysian Meteorological Service geliefert. Allgemein zeichnet es sich das ganze Jahr über durch hohe Niederschlagsmengen aus, wobei der größte Anteil während der Monsunzeit von Dezember bis März fällt. Im Januar kommt es zu einem Maximum an Niederschlägen, während der April der trockenste Monat ist.

Kontaktperson für die Probenbeschaffung und Datenerhebung aus Malaysia:

Dr. Lee Ming Tong, Malaysian Cocoa Board, Beg Berkunci 211, 88999, Kota Kinabalu, Sabah MALAYSIA

Dr. Rob Lockwood, 30 St Martin's Drive, Eynsford, Dartford, Kent DA4 0EZ, UK

2.4.5 Reading bei London, Großbritannien



Abb. 31: Großbritannien mit Standort der beprobten Gewächshauskulturen bei Reading (rot markiert), sowie Ansicht einer solchen Anlage (rechts)

Die „School of Plant Sciences“ der Universität von Reading hat sich seit den frühen 80er Jahren mit ihrer Kakao-Forschungsabteilung einen internationalen Ruf erworben. Auf den

Gebieten Molekularbiologie, Physiologie, Pathologie und *in vitro*-Kulturtechnik an Kakao wird hier Pionierarbeit geleistet. 1985 übernahm die Fakultät die Verantwortung für die Kakao-Quarantäne von den "Royal Botanic Gardens" bei Kew.

Die "School of Plant Sciences" betreibt die größte ausschließlich für Kakao genutzte Gewächshausanlage Europas. Insgesamt verfügt sie über 1.000 m² Gewächshausfläche und umfasst 7 separate Einheiten. In den langgestreckten als „tunnels“ bezeichneten Gewächshauskammern (Abb. 31) stehen etwa 350 verschiedene Klone zur Verfügung; 100 weitere Klone befinden sich in einem gesonderten Quarantänebereich.

Die klimatischen Bedingungen in den Gewächshäusern werden elektronisch gesteuert. Sinkt die Temperatur unter 22 °C, wird ein Heizsystem aktiviert. Ab Temperaturen von 30 °C schalten sich Ventilatoren ein, jedoch steigen an heißen Sommertagen die Temperaturen gelegentlich über diesen Wert. Die Belichtung erfolgt ausschließlich durch die natürliche Sonneneinstrahlung, die etwa 80 % des außerhalb der Gewächshäuser erreichten Wertes entspricht. Die relative Luftfeuchtigkeit in den Gewächshauskammern schwankt stark von Tag zu Tag und liegt zwischen mindestens 25 % und höchstens 85 %. Die Kakaobäume werden in einem Hydrokultursystem gehalten und stehen in einem Gemisch aus Sand, Kies und Vermiculit (1:2:2). Sie werden 7mal täglich für 5 min mit einer modifizierten Long-Ashton-Nährlösung berieselt (Dr. Andrew Daymond, persönliche Mitteilung 2006).

Die Gewächshausanlage der Universität Reading liefert Kakaomaterial für nationale und internationale Forschungs- und Zuchtprojekte und gewährleistet dabei als einzige der großen Kakao-Genbanken die Lieferung von Material ohne Schädlinge und Krankheiten. Die Klonsammlung wird ständig ergänzt durch neues Klonmaterial, wobei dieses in erster Linie aufgrund von Resistenzeigenschaften ausgewählt wird.

Eine besondere Bedeutung für die Identifizierung von Kakaoklonen und ihre weltweite Lokalisierung auf den internationalen Genbanken nimmt die von der Universität von Reading veröffentlichte „International Cocoa Germplasm Database“ (ICGD 2007) ein, die auch für die Durchführung der vorliegenden Studie genutzt wurde (siehe 3.1).

Kontaktpersonen für die Probenbeschaffung:

Prof. Dr. Paul Hadley, Caroline Ford, Dr. Andrew Daymond

The International Cocoa Germplasm Database, School of Plant Sciences, The University of Reading, P.O. Box 221, Whiteknights, Reading. RG6 6AS, UK

2.4.6 Trinidad



Abb. 32: Trinidad und Tobago mit Herkunftsgebiet der Kakaoproben bei Port of Spain (rot markiert)



Abb. 33: Pflanzung der International Cocoa Genebank der UWI auf Trinidad und Tobago

Der 5.128 km² große karibische Zwei-Insel-Staat Trinidad und Tobago liegt nordöstlich von Venezuela auf 11° N und 61° W zwischen der karibischen See und dem Nordatlantik (Abb. 32).

Im Jahr 1525 wurde Kakao von den Spaniern nach Trinidad gebracht. Möglicherweise handelte es sich dabei um Criollo-Varietäten aus Venezuela (Bartley 2005).

Nachdem sich Anfang des 18. Jahrhunderts der kommerzielle Anbau von Kakao auf der Insel zu entwickeln begann, kam es 1727 durch eine Katastrophe unbekannter Art (ein

Wirbelsturm oder eine Pflanzenkrankheit) zu einer erheblichen Reduktion der Kakaobestände und brachte die Kakaoproduktion über Jahre hinweg zum Erliegen. Um 1757 wurde Saatgut einer Forastero-Varietät nach Trinidad eingeführt. Im Laufe der folgenden Jahrzehnte entstand eine große Vielfalt verschiedener Kakao-Varietäten durch Hybridisierung der alten Criollo-Bestände mit den neu eingeführten, widerstands- und anpassungsfähigeren sowie ertragreicheren Populationen.

Im Zusammenhang mit dem Beginn der Schokoladenproduktion durch die Firma Cadbury erlebte die Kakaowirtschaft von Trinidad und Tobago in den Jahren 1866-1920 einen starken Aufschwung. Bis zum Jahr 1917 wuchs die Kakao-Anbaufläche der britischen Kolonie auf 90.000 ha (Bekele 2007).

Krankheiten, schlechte Weltmarktpreise und ineffiziente Produktionssysteme führten in der Folge zu einem Rückgang der Kakaoproduktion auf Trinidad und Tobago.

Heute stellt Kakao nach Zucker das wichtigste landwirtschaftliche Erzeugnis Trinidads dar (FAO 1996). Allerdings werden nur noch etwa 0,4 % des Bruttonationalproduktes auf dem Agrarsektor erwirtschaftet. (U. S. Department of State 2007).

Auf etwa 16.355 ha des Landes wird Kakao angebaut. Da in diesem Wert jedoch Mischkulturen mit Bananen und Zitrusfrüchten eingeschlossen sind, beträgt die tatsächlich für den Kakaoanbau genutzte Fläche nur schätzungsweise 8.000-10.000 ha. Dabei handelt es sich überwiegend um Edelkakao von Trinitario-Sorten, der sorgfältig prozessiert wird und auf dem Weltmarkt vergleichsweise hohe Preise erzielt.

Die durchschnittliche Ernte pro Hektar liegt bei gut 90 kg Rohkakao, könnte aber mit Hilfe optimierter Anbaumethoden und leistungsfähigerer Sorten erheblich gesteigert werden (The Government of Trinidad and Tobago/ Ministry of Agriculture, Land and Marine Resources 2007).

Die Kakaoproduktion auf dem Inselstaat sank- allen staatlichen Fördermaßnahmen zum Trotz- in den 90er Jahren um 55 % auf heute weniger als 2.000 t/Jahr. Eine wichtige Ursache dafür war die wichtige Kakaokrankheit Black Pod Disease, welche durch *Phytophthora spec.* hervorgerufen wird (Bryce 2005). Von allen auf Trinidad verbreiteten Pflanzenkrankheiten verursacht die Black Pod Disease die höchsten ökonomischen Einbußen (FAO 1996).

Trotz dieser problematischen Aspekte des Kakaoanbaus zeigt eine kürzlich erstellte Studie, dass die Kultivierung dieser Nutzpflanze auf Trinidad und Tobago auch zukünftig wirtschaftlich und gegenüber anderen Agrarprodukten konkurrenzfähig sein wird, besonders wenn das vorhandene Optimierungspotential genutzt wird (The Government of Trinidad and Tobago/ Ministry of Agriculture, Land and Marine Resources 2007).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben aus Trinidad stammen von der Internationalen Kakao-Genbank der CRU (Cocoa Research Unit), einer Abteilung der Universität der karibischen „West Indies“ in der Nähe der Hauptstadt Port of Spain (Abb. 33).

Mit über 2.500 gepflanzten Bäumen handelt es sich um die weltweit größte Sammlung genetischen Materials von Kakao neben jener von Costa Rica.

Die Genbank wurde 1982 auf einer ehemaligen Kakaopflanzung bei Centeno etabliert. Sie enthält das Material verschiedener früherer Sammlungen anderer Standorte. Darunter befinden sich ausgewählte Individuen aus nationalen Beständen sowie Sammlungen aus dem Gebiet der Kakao-Mannigfaltigkeitszentren.

Die Genbank ist 33 ha groß, wobei die mit Kakaoklonen bepflanzte Fläche etwa 20 ha ausmacht. An seiner Nordseite wird das Gelände durch den Fluss Caroni begrenzt. Ein komplexes Be- und Entwässerungssystem regelt die Durchfeuchtung des Bodens, sodass die Kakaobäume auch während der Trockenzeit von Januar bis Juni nicht unter Trockenstress geraten. Der Boden gehört zur Cunupia Serie, einer feinen, sandigen Tonerde aus der Klasse der „Gleyic Cambisols“, die von Bodenwasser beeinflusst ist. Nach Stanfield *et al.* 1993 handelt es sich um einen Boden, der nur mit starken Einschränkungen landwirtschaftlich genutzt werden kann. Er neigt zu Nässestau während der Regenzeit und starker Trockenheit während der Trockenzeit. Sein Nährstoffgehalt ist nur durchschnittlich.

Das Klonmaterial wird auf die Stümpfe der ursprünglichen Plantagenbäume gepfropft, wobei ein Klon durch bis zu 16 Individuen repräsentiert wird. Die jungen Bäume wachsen zunächst im Schatten von Bananenstauden heran, die in Abständen von 4 m gepflanzt werden. Später spendet der Korallenbaum *Erythrina sp.* dauerhaften Schatten. Die Leguminose, welche trivial auch als „bois immortel“ oder „mother of cocoa“ bezeichnet wird, produziert farbenprächtige Blüten und – ähnlich wie *Glyricidia* (siehe 2.4.4) - giftige Samen. Die Pflanzabstände für *Erythrina sp.* betragen laut Iwaro *et al.* 2003 6 m. Hochgerechnet ergibt dies eine Zahl von 278 Schattenbäumen pro Hektar. Obwohl ihre tatsächliche Anzahl schon aufgrund des Flächenanteils für Bewässerungs- und Wegesysteme deutlich darunter liegt, ist der Bestand von Schattenbäumen auf der Genbank im Vergleich sehr hoch (siehe Tab. 6).

Die Pflanzabstände zwischen den Kakaobäumen betragen 1,8 m (Iwaro *et al.* 2003). Diese Zahl entspricht rein rechnerisch ca. 3.090 Kakaobäumen/ ha, doch die tatsächliche Zahl liegt auch hier deutlich darunter. Um den Aufwand bei der Unkrautvernichtung zu minimieren, wird eine geschlossene Kronendecke in der Pflanzung angestrebt. Die ältesten Kakaobäume erreichen eine Höhe von bis 20 m (Prof. Dr. D. Butler, persönliche Mitteilung 2001).

Ähnlich wie im Rest des Landes führt auch auf der Genbank der CRU die „Black Pod Disease“ *Phytophthora megakarya* zu den höchsten Ernteverlusten.

Die Kakaobäume der Genbank werden nur gedüngt, wenn ihre Früchte oder anderes Material für spezifische Forschungsprojekte benötigt werden. Dabei werden dem Boden um den jeweiligen Baum 450 g Standarddünger zugefügt (siehe Tab. 6), und es erfolgt eine Fungizidbehandlung mit Kupferlösung sowie die Beseitigung von Früchten, die einen Befall mit Black Pod Disease aufweisen. Im vorliegenden Fall haben die Klone

Amelonado, ICS 95 und SCA 6 vor der Probennahme eine entsprechende Behandlung erfahren (siehe Tabelle 6).

Ein Hauptziel der Kakao-Genbank von Trinidad ist die Selektion und der Erhalt agronomisch wünschenswerter Eigenschaften wie die Resistenz gegen wichtige Krankheiten.

Im Jahr der Probennahme 2001 kam es zu einer erheblichen Verzögerung des Einsetzens der Regenzeit, sodass in diesem Jahr im Bereich der Genbank nur insgesamt 1484,1 mm Niederschlag/ m² a⁻¹ fielen (siehe Tab. 6). Durchschnittlich fallen in der Region 2392 mm Niederschlag/ m² a⁻¹. Die Dürre im Jahr 2001 war die größte seit 30 Jahren und schlug sich auch deutlich in der Rohkakao-Produktion des Landes nieder (Tab. 5).

Tab. 5: Gesamt-Produktion von Rohkakao auf Trinidad und Tobago 1998-2002

Jahr	Rohkakao-Produktion [t]
1998	1270
1999	1160
2000	1593
2001	649
2002	1721

Quelle: The Government of Trinidad and Tobago/ Ministry of Agriculture, Land and Marine Resources 2007

Auf der Genbank der CRU wurde mittels des vorhandenen Drainagesystems die ausreichende Bewässerung des Geländes sichergestellt, jedoch waren die Kakaobäume in diesem Zeitraum sicher auch Trockenstress ausgesetzt.

Kontaktpersonen für die Probenbeschaffung

Prof. Dr. David Butler, Dr. Darin Sukha

CRU (Cocoa Research Unit) The University of the West Indies, St. Augustine Campus, St. Augustine, Trinidad W.I.

Herkunft	Ecuador Quevedo/ Nestlé Farm 1° 01' S, 79° 28' W	Venezuela/Mérida Zea 8° 22' 883'' N, 71° 46' 983'' W	Venezuela/Zulia Chama 8° 43' 27'' N, 71° 44' 33,3'' W	Venezuela/Mérida S. Juan de Lagunillas 8° 31' 00'' N, 71° 21' 00'' W	Ghana, New Tafo CRIG 6° 06' N, 0° 23' O	Malaysia/Sabah, Tawau MCB Quoin Hill 4° 16' N, 117° 54' O	GB/Reading 51° 26' 12'' N 0° 56' 33'' W	Trinidad & Tobago, CRU (UWI) 10° 35' N, 61° 18' W
Höhe über NN [m]	80	830	40	1050	200-300	220-230	80	15
Regenzeit	Dez. - Mai	Jul - Dez., Maximum Aug. - Sept.	Juni - Nov.	Jul - Dez., Maximum Aug. - Sept.	1. Mai - Juni 2. Sept. - Okt.	Dez. - März Maximum Januar	irrelevant	Juni - Okt.
NS/a [mm] (Jahr)	1886 (00) - 2607 (01)	1100-1355	1300-1800	ca. 550	1250 - 1750	2037 (00)	irrelevant	1484 (00)
Avf [°C] (Jahr)	24,8 (00) - 25,6 (01)	21,9	27	22	26 (Aug.)-30 (März)	27,3 (00)	ca. 22-30	26
rel. LF [%] (Jahr)	87	ca. 80	82	62	70-80	82,8 (00)	25-85	79
Pflanzdichte der Kakaobäume	hoch	gering (Mischkulturssystem)	3 m × 3 m, 1111/ha	3 m × 3 m, 1111/ha	2,5 m × 2,5 m triangular 1739/ha	max. 2664/ha (ca. 1,9 m × 1,9 m)	Töpfe 40-50 l	1,8 m × 1,8 m ca. 3000/ha
Schattenbäume	keine	Bananen, Avocado, Orangen, <i>Erythrina sp.</i> hohe Pflanzdichte	<i>Erythrina sp.</i> 1,5 m × 15 m, ca. 44/ha	<i>Erythrina sp.</i> 15 × 15 m, ca. 44/ha	Resturwald + <i>Glyricida sp.</i> ca. 20/ha	<i>Glyricida sepium</i> , 8/ha nach Etablierung	keine	<i>Erythrina sp.</i> , 200/ha (6 m × 6 m)
künstliche Bewässerung	bei Bedarf	nein	k. A.	immer	k. A.	k. A.	immer	bei Bedarf
Topographie	flach	1-2 % Gefälle	flach	5-12 % Gefälle	5 - 12 % Gefälle	Gefälle, % unbekannt	flach	flach
Bodentyp	sandiger Lehmboden	55 % Sand, >20% Kies, 22,5 % Schlamm locker, gut drainiert, geringe Tiefe	sandig, lehmig u. kiesig Tropopsammens, Tropoqupts, Tropofluvents u. Troporthents	Cambord 36,44 % Ton 21-38% Schlamm 20-39% Sand	Feuchtkiets- retentionskapazität recht hoch, z. T. grobe Körnung	xanthische und orthische Ferralsolen	Sand, Kies u. Verniculit (1,2,2) (Hydrokultur)	Gleyic Cambisols, feine, sandige Tonerde, gel. Stammasse
Nährstoffgehalt [mg kg ⁻¹]	NH ₄ ⁺ 21, PO ₄ ⁻³ 24 0,28 meq/100g K	P 2,5, Ca 1,65, Mg 0,98 Na u. K: Spuren	PO ₄ , K, Ca Mr: eher hoch Mg: eher mittel Fe, SO ₄ , NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ niedrig	N 26, PO ₄ ⁻³ 75, K 81- 160, S 50 - 100 Sp-Elemente niedrig.	PO ₄ ⁻³ niedrig	„hoch“	s. o.	„niedrig“
KAK	k. A.	2,6 cmol/kg	hoch	moderat - hoch	-	-	hoch	-
pH	6	5,3	4,5 - 6,5	7-8	-	>5	5,6	-
org. Bestandteile	4,02 %	ca. 1 %	mittel bis hoch	Mittel - hoch	-	-	-	-
Düngung	200 kg N, 80 kg P ₂ O ₅ + 120 kg K ₂ O/ha a	>150 g Standard- Dünger Baum/a, org. Material	2 Applikationen a, insges. je 88 kg N, P ₂ O ₅ + K ₂ O/ha a, 500 g Pflanze	siehe Venezuela/Chama	keine Düngung	4 Applikationen a 100 kg N, 100 kg PO ₄ ⁻³ + 120 kg K ₂ O/ha a	modifizierte Long Ashton Lösung, 7/d, je 5 min	450 g 12,12,17,2 N/P/K/Mg = 54 g N; 54 g P ₂ O ₅ ; 76,5 g K ₂ O; 9 g MgO

Tab. 6: Zusammenfassung der wichtigsten Standortfaktoren der beprobten Plantagen

2.5 Die Verarbeitung frischer Kakaosamen zu Rohkakao mittels Fermentation und Trocknung

Der Begriff „Fermentation“ (lat. fermentum, „Sauerteig“) dient als Sammelbezeichnung für jegliche Art der Umsetzung von biologischen Materialien mit Hilfe von Bakterien-, Pilz- oder Zellkulturen, oder aber durch Zusatz von Enzymen (Fermenten). Wurde der Begriff ursprünglich nur für anaerob ablaufende biologische Reaktionen verwendet, schließt er heute auch aerobe Vorgänge wie z. B. die Essigsäuregärung mit ein.

Die unmittelbar nach der Ernte durchgeführte Fermentation frischer Kakaosamen und deren anschließende Trocknung dienen vordergründig der Haltbarmachung von Kakaosamen bis zu ihrer industriellen Weiterverarbeitung. Beide Verfahren zusammen bilden jedoch vor allen Dingen die Grundlage für den Ablauf jener Prozesse im Kakaosamen, welche die Voraussetzung für die Entstehung des charakteristischen Kakaoaromas darstellen. Erst durch eine optimal durchgeführte Fermentation und Trocknung kann sich das genetisch determinierte Flavourpotential des frischen Kakaosamens vollständig entfalten.

Vor dem Beginn der Kakaofermentation werden die Samen aus den Früchten entnommen und - je nach Anbaugebiet - entweder in Kisten oder Körbe verbracht oder einfach zu großen Haufen aufgeschüttet, welche in der Regel mit Jutesäcken und/oder Bananenblättern abgedeckt werden (Abb. 34 a-c). Ein gelegentliches Umwälzen der fermentierenden Kakaosamen fördert dabei deren gleichmäßige Versorgung mit Sauerstoff und Wärme (Wollgast und Anklam 2000b).

Je nach Reifegrad der Kakaosamen und vor allen Dingen auch in Abhängigkeit vom Kakaotyp variiert die benötigte Fermentationszeit bis zur optimalen Ausprägung der Vorstufen des Kakaoaromas. Während der Prozess der Fermentation für die meisten Kakaosorten nach 5-6 Tagen abgebrochen werden kann, haben die Samen des Criollo-Typs und auch der Nacional-Population schon nach etwa 3 Tagen ihr volles Aromapotentail erreicht (Rohsius 2007).

Der Abbruch der Kakaofermentation erfolgt durch die Trocknung der Samen. Zu diesem Zweck werden die Samen in der Regel in einer dünnen Schicht auf einer ebenen, trockenen Unterlage ausgebreitet und dem Sonnenlicht ausgesetzt (Abb. 34 e). Oft werden hierbei spezielle Trockenhäuser genutzt, deren auf Schienen fixierte Dachkonstruktionen bei Regen über die trocknenden Kakaosamen geschoben werden können (Abb. 34 d).

Neben der Sonnentrocknung werden die fermentierten Kakaosamen verbreitet auch in Öfen getrocknet. Gerade in regenreichen Perioden verhindert dies den Befall durch Schimmelpilze aufgrund einer zu langsamen Trocknung. In Anlagen mit offenem Feuer besteht jedoch die Gefahr, dass die Samen den Rauchgeruch als Off-Flavour annehmen. Auch können die oft sehr hohen Temperaturen der Ofentrocknung qualitätsrelevante biochemische Prozesse im Kakaosamen verringern bzw. verhindern (siehe 2.5.1).

Die Trocknung von Kakaosamen kann, je nach angewendeten Verfahren und Witterungsbedingungen, mehrere Tage dauern. Sie wird abgebrochen, sobald der Wassergehalt des Rohkakaos auf 5-7 % zurückgegangen ist (Wollgast und Anklam 2000b). Wassergehalte über 8 % erhöhen die Gefahr eines Befalls mit Schimmelpilzen (Kim und Keeney 1984).

Der fertig getrocknete Rohkakao wird anschließend von Fremdkörpern etc. gereinigt und zur Lagerung sowie zum Weitertransport oftmals in Sisalsäcke überführt (Abb. 34 f).



Abb. 34: Kakaofermentation und -trocknung auf Trinidad
a) Fermentationskisten; **b)** Abdeckung der in den Kisten fermentierenden Kakaosamen mit Bananenblättern und darüber gelegten Jutesäcken; **c)** Kakaosamen kurz nach dem Beginn der Fermentation; **d)** Trockenhäuser mit verschiebbaren Dächern; **e)** in der Sonne trocknende Kakaosamen; **f)** fertiger Rohkakao

2.5.1 Biochemische Prozesse während der Fermentation und der Trocknung sowie deren Auswirkung auf die phenolischen Inhaltsstoffe

Das Kakaoaroma, welches sich durch die Röstung der nach Fermentation und Trocknung als „Rohkakao“ bezeichneten Samen entwickelt, setzt sich aus einer großen Vielfalt unterschiedlicher Komponenten zusammen, deren Entstehung und optimale Mengenverhältnisse bis heute noch nicht abschließend erforscht sind. Von diesen sameninternen Komponenten werden im Folgenden vornehmlich die phenolischen Ausgangssubstanzen und deren Veränderungen im Verlauf der Fermentation und der Trocknung betrachtet.

In den ersten 2 Tagen der Kakaofermentation kommt es zu einem anaeroben Abbau der Fruchtpulpa hauptsächlich durch Hefepilze, welche die darin enthaltenen Zucker in Ethanol umwandeln, wobei auch die in der Pulpa enthaltene Zitronensäure teilweise metabolisiert wird. Zudem setzen einige Hefestämme Pektinasen frei, welche letztlich zu einem Kollabieren der Pulpazellen und dem Abfließen ihres Inhaltes führen (Schwan *et al.* 1995). Dadurch entstehen Lücken zwischen den fermentierenden Kakaosamen, in welche Luft eindringt. Diese Veränderungen im Fermentationsmedium fördern die Etablierung von Milch- und vor allen Dingen Essigsäurebakterien. Letztere stellen etwa ab den dritten Tag die dominierenden Populationen und bauen in erster Linie den zuvor durch die Hefen produzierten Ethanol zu Essigsäure ab. Dies führt zu einem Anstieg der Temperatur im Fermentationsmedium auf einen Wert von etwa 50°C.

Neben den hohen Temperaturen führt das Eindringen von Essigsäure zu einem Absterben der Kakaosamen (Schwan *et al.* 1995). Dabei kommt es zu einer Auflösung der zellulären Feinstruktur des Keimblattgewebes (Biehl *et al.* 1977, Biehl 1973, Brito *et al.* 2001) sowie zu einem Anschwellen des Volumens des Kakaosamens durch Flüssigkeitsaufnahme (Hoskin und Dimick 1994, Forsyth und Quesnel 1963).

Im Zuge der Dekompartimentierung des Keimblattgewebes um den 3. Fermentationstag herum treten die phenolischen Komponenten aus ihren Speicherzellen aus (Biehl *et al.* 1977, Biehl 1973, Brito *et al.* 2001). Zeitgleich nimmt die Konzentration der im Samengewebe nachweisbaren phenolischen Substanzen drastisch ab (Kim und Keeney 1984, Bonvehi und Coll 1997). Diese Verluste stabilisieren sich nach 5-6 Fermentationstagen (Bonvehi und Coll 1997).

Nach Kim und Keeney 1984 gehen bis zu diesem Zeitpunkt 80-95 % des mengenmäßig dominierenden Monomers (-)-Epicatechin verloren. Kealey *et al.* 1998 findet hingegen einen deutlich geringeren Rückgang der monomeren Procyanidine, deren hauptsächlichster Bestandteil das (-)-Epicatechin ist, auf knapp 40 % des Ausgangsmaterials. Derselbe Autor stellt einen Rückgang der Procyanidine auf etwa 36 % während der Fermentation fest.

Rohsius 2007 dokumentiert nach 5 Tagen einer fermentationsähnlichen Inkubation und anschließender Luft-Trocknung von Kakaosamen einen Rückgang des (-)-Epicatechin-Gehaltes auf ca. 11 % des Ausgangsgehaltes. Unterschiede im prozentualen Abbau

phenolischer Inhaltsstoffe während der Fermentation wurden auch von Lambert *et al.* 2003 gefunden, welche dies als Resultat genotypspezifischer Variation deuten.

Der Verlust der phenolischen Inhaltsstoffe im Verlauf der Fermentation wird einerseits hervorgerufen durch das Auswaschen dieser Substanzen aus dem Samengewebe (Forsyth 1952b, Forsyth & Quesnel 1963); andererseits sind die Polyphenole nach ihrem Austritt aus den Vakuolen an einer Vielzahl biochemischer Reaktionen beteiligt.

So kommt es zu einer Hydrolyse der Anthocyane zu Anthocyanidinen durch sameninterne Glycosidasen. Dadurch geht die von den Anthocyanen verursachte, violette Färbung des Keimblattgewebes allmählich verloren. Nach 4 Tagen Fermentation können gewöhnlich nur noch etwa 7 % des ursprünglichen Anthocyangehaltes nachgewiesen werden (Wollgast und Anklam 2000b). Der Anthocyangehalt wird auch als Index für den Fermentationsgrad einer Kakaoprobe verwendet (Pettipher 1986, Wollgast und Anklam 2000b, Hansen *et al.* 1998).

Die freien Anthocyanidine sowie die mengenmäßig dominierenden Flavan-3-ole werden während der Fermentation zu Chinonen oxidiert. Diese hochreaktiven Moleküle komplexieren anschließend mit Aminosäuren und Proteinen oder polymerisieren mit anderen Flavonoiden zu hochmolekularen und weitgehend unlöslichen Tanninen. (Hansen *et al.* 1998, Bonvehi und Coll 1997, Wollgast und Anklam 2000b). Die Bindung der niedermolekularen phenolischen Kakao-inhaltsstoffe führt zu einer Abnahme von Adstringens und bitterem Geschmack, da diese in erster Linie durch die löslichen Komponenten aus der Gruppe der Flavan-3-ole hervorgerufen werden (Hansen *et al.* 1998).

Über Wasserstoffbrückenbindungen komplexieren die hochpolymeren Tannine mit den Kakao-Speicherproteinen. Daraus resultieren braune, wasserunlösliche Pigmente, welche dem Rohkakao seine charakteristische Farbe verleihen (Hansen *et al.* 1998, Porter *et al.* 1991). Diese braunen Pigmente werden laut Forsyth und Quesnel 1963 ab dem 4. Tag der Fermentation gebildet, wenn erstmals Sauerstoff durch die Testa dringt. Bis dahin verlaufen demnach alle Reaktionen in den Keimblättern unter anaeroben Bedingungen.

Die Oxidation, Polymerisierung und Komplexbildung der phenolischen Inhaltsstoffe setzt sich auch während der Trocknung fort (Bonvehi und Coll 1997, Hansen *et al.* 1998, Hoskin und Dimick 1994). Folglich ist in den luftgetrockneten Kakaoproben, deren Trocknung in der Regel über einen längeren Zeitraum erfolgt (s. o.), der Gehalt an Polyphenolen zumeist niedriger als in ofengetrockneten Proben (Almeida *et al.* 1998).

Bis heute sind die Mechanismen, welche für den Abbau und die Komplexbildung der phenolischen Inhaltsstoffe des Kakaosamens während der Fermentation und der Trocknung verantwortlich sind, nicht vollständig erforscht. So ist auch die Bedeutung der enzymatisch katalysierten Oxidation der Polyphenole im Verlauf der Fermentation und Trocknung umstritten.

Allgemein gehen die meisten Autoren von einem Zusammenspiel enzymatischer sowie nicht-enzymatischer Oxidationsprozesse aus (u. a. Hansen *et al.* 1998, Bonvehi und Coll 1997). Bei den beiden in diesem Zusammenhang relevanten Enzymgruppen handelt es sich um die sameninternen Polyphenoloxidasen (PPO) sowie um die Peroxidasen.

Die PPO aus Kakao benötigen als Substrat *o*-Diphenole und weisen eine hohe Hitzestabilität auf. Bezüglich ihres pH-Optimums finden sich Angaben von 6,8 bzw. 5,4 (Hansen *et al.* 1998).

Hansen *et al.* 1998 weisen einen drastischen Rückgang der sameninternen PPO-Aktivität bereits zu Beginn der Kakao-Fermentation nach. Schon nach einem Fermentationstag finden die Autoren nur noch 50 % Restaktivität, nach dem 2. Tag sind nur noch 6 % der ursprünglichen Aktivität vorhanden. Einen ähnlich starken Rückgang in der PPO-Aktivität finden auch Villeneuve *et al.* 1985 mit 15 % am 3. bzw. 5 % am 5. Fermentationstag.

Während der Trocknung geht die Aktivität der Kakao-PPO nochmals zurück auf einen Wert von 2 % der ursprünglichen Aktivität (Hansen *et al.* 1998).

Trotz des raschen Abbaus der PPO-Aktivität im Verlauf der Fermentation gehen Hansen *et al.* 1998 von einer tragenden Bedeutung dieses Enzyms für die Oxidationsreaktionen der phenolischen Inhaltsstoffe aus, während Villeneuve *et al.* 1985 aus den von ihnen erbrachten, vergleichbaren Ergebnissen schließen, dass die Bedeutung der PPO für diese Prozesse zu vernachlässigen sei.

Zu einem ähnlichen Schluss kommen Villeneuve *et al.* 1985 auch bezüglich der Peroxidasen, welche als Gruppen genotypspezifischer Isoenzyme im Kakaosamen enthalten sind. Diese Enzymgruppe benötigt im Gegensatz zu den PPO keinen Sauerstoff, sondern H₂O₂ als Co-Substrat. Ihre Aktivität wird nach Villeneuve *et al.* 1985 bereits innerhalb der ersten beiden Fermentationstage auf ein kaum detektierbares Niveau abgebaut.

Zu einem abweichenden Ergebnis bezüglich der Entwicklung der Peroxidase-Aktivität im Kakaosamen im Verlauf der Fermentation kommen Sakharov und Ardila 1999. Demnach steigt die Peroxidase-Aktivität im Verlauf der Fermentation sogar und ist auch nach abgeschlossener Trocknung noch nachweisbar. Folglich schließen Sakharov und Ardila 1999 eine Beteiligung von Peroxidasen an der Oxidation der phenolischen Inhaltsstoffe im Kakaosamen im Verlauf ihrer Fermentation und Trocknung nicht aus.

3 Material und Methoden

3.1 Die untersuchten Kakaoproben

Für die vorliegende Arbeit wurden vor allen Dingen reife, unfermentierte Kakaosamen untersucht. Daneben wurden jedoch auch einige Proben verschiedener definierter Reifegrade sowie fermentiertes Material analysiert. Die Kapitel 2.2 und 2.4 liefern ausführliche Informationen zur genetischen wie zur geographischen Herkunft aller verwendeten Kakaoproben. Im Anhang befinden sich Bilder der beprobten Kakaofrüchte und z. T. auch ihrer Bäume.

3.1.1 Reife Samen definierter Klone und Anbauggebiete

Die Zusammenstellung der Proben reifer Kakaosamen erfolgte anhand folgender Auswahlkriterien:

- Grundsätzlich sollte nur Material von genetisch definierten Klonen oder Varietäten verwendet werden.
- Die genetische Variabilität der Kakao-Klone und -Varietäten sollte möglichst groß sein. Dafür erfolgte eine Auswahl von Proben aus allen 3 großen Kakao-Gruppen der Forasteros, Trinitarios und Criollos. Zusätzlich wurden Literaturdaten (soweit vorhanden) über Merkmale wie Samenfarbe, Flavour und Resistenz verwendet.
- Die ausgewählten Klone sollten in möglichst vielen der beprobten Anbauggebiete zur Verfügung stehen, um im direkten Vergleich genetisch ähnlichen Materials den Einfluss der Anbaubedingungen untersuchen zu können.
- Der Klon bzw. die von ihm ableitbaren Sorten sollten möglichst von wirtschaftlich relevanter Bedeutung sein.

Als wichtige Auswahlhilfe diente die ICGD (ICGD 2007) der Universität von Reading (siehe 2.4.5).

In Tab. 7 sind sämtliche Kakaoproben, die innerhalb des Projektes vergleichend untersucht wurden, sortiert nach Klonzugehörigkeit/Name der Varietät und Provenienz dargestellt. Die Tabelle ordnet die Proben außerdem in die Typen Criollo und Trinitario, sowie in die Forastero-Typen LAF, UAF und Nacional ein.

Die Lieferung der meisten Kakaoproben erfolgte in Form frischer, reifer Früchte, die sich auf den Versuchsfeldern der beprobten Herkünfte in der Regel spontan entwickelt hatten. Die Früchte aus Ghana stammen von Blüten, die mit Amelonado-Pollen handbestäubt wurden.

Die für die Analytik ausgewählten Kakaofrüchte wurden unmittelbar nach ihrer Ernte in den Herkunftsländern kälteisoliert verpackt und per Expressdienst nach Hamburg geschickt. Zwischen Ernte und Weiterverarbeitung der Proben vergingen auf diese Art und Weise maximal 7 Tage. Die Anzahl der auf diese Weise untersuchten Früchte pro Klon und Herkunft wird in Tab. 7 aufgeführt.

Da es verboten ist, keimfähige Kakaosamen aus Venezuela zu exportieren, erhielten wir aus diesem Land Samenmaterial, welches im Herkunftsgebiet entweder luftgetrocknet (für die chemische Analytik) oder in 4 % Formol eingelegt worden war (für mikroskopische Studien). Dabei stammten die in Formol eingelegten Samen und die Proben für die chemische Analytik beider Herkünfte nicht von denselben Früchten. Die Anzahl der insgesamt verwendeten Früchte war zudem nur für die Formolpräparate bekannt.

Laut Elwers 2002 sind die Verluste an quantitativ nachweisbaren, phenolischen Komponenten in Kakaosamen, die bei Temperaturen um 35 °C getrocknet wurden, offenbar sehr gering und liegen im Falle von (-)-Epicatechin bei etwa 10 %. Bezüglich des Gesamt-Polyphenolgehaltes ist überhaupt kein Rückgang nachweisbar. Lediglich die Anthocyangehalte gehen laut den Ergebnissen von Elwers 2002 um etwa die Hälfte der Ausgangswerte zurück - jedoch spielen diese in Criollo-Samen ohnehin keine Rolle (siehe 2.2.3.1).

Auch die Probenlieferungen aus Ecuador erfolgten nicht in Form frischer Früchte, sondern einerseits als gefriergetrocknetes, gemahlenes Pulver, andererseits in Form von in 4 % Formol eingelegten Samen. Auch hier stammten die auf unterschiedliche Weise vorbehandelten Kakaosamen nicht aus denselben Früchten, wohl aber von denselben Klonen desselben Versuchsfeldes.

Da die Anzahl der Früchte je Klon bzw. Varietät bei den Proben aus Venezuela und Ecuador unbekannt ist, sind diese Proben in Tab. 7 mit einem „x“ gekennzeichnet.

Tab. 7: Die untersuchten Proben reifer Kakaosamen

Klon/ Sorte	Typ	Herkunft						r	f
		Ecuador ¹	Ghana ²	Malaysia ³	England ⁴	Trinidad ⁵	Venezuela ⁶		
Amelonado	LAF		2			3			
BR 25	T			3					
Catongo	LAF		2			3			
Criollo „San Juan“	C						x	*	
Criollo „Zea“	C						x	*	
EET 59	N				1	2			
EET 95	N	x	2			5		*	
EET 390	N			3					
Guasare	C						x	*	
ICS 95	T	x	2			2		*	
KKM 22	T			3					
NA 33	UAF		2	3	2	1			
PBC 123	T			3					
Pentagona rojo	C						x	*	
Pentagona verde	C						x	*	
Porcelana	C						x	*	
SCA 6	UAF		2		5	3			
T63/967	UAF		2						
T79/501	UAF		2						
T85/799	UAF		2						
UIT1	T			3					

1 ehem. Plantage von Nestlé, Quevedo in Los Rios

2 Genbank der CRIG (Cocoa research Institute Ghana) bei New Tafo

3 Genbank des MCB (Malaysian Cocoa Board), Quoin Hill bei Tawau

4 Genbank der School of Plant Science, University of Reading

5 Genbank der CRU (Cocoa Research Unit), University of the West Indies.

6 Genbanken bzw. Versuchsfelder in Zéa/ Mérida, San Juan de Lagunillas/ Mérida und Chama/ Zúlia

r: zusätzlich zu reifen Samen auch verschiedene Reifestadien

f: zusätzlich zu reifen Samen auch verschiedene Fermentationsstadien

C: Criollo; LAF: Lower Amazon Forastero; N: Nacional; T: Trinitario; UAF: Upper Amazon Forastero

Die genetische Übereinstimmung identisch gekennzeichnete Kakaoproben aus verschiedenen Anbaugebieten wurde durch einen Vergleich von Fruchtformen und -farben überprüft. Dieses Verfahren hat sich über Jahrzehnte bewährt und ist nach Aussage von Prof. Dr. D. Butler (persönliche Mitteilung 2001) sehr zuverlässig. In der Regel wurden zwischen den gesammelten, identisch gekennzeichneten Kakaoproben

große Ähnlichkeiten in Fruchtform, -größe und -farbe festgestellt (siehe Fotos der Proben im Anhang). Molekulargenetische Kriterien wurden nicht berücksichtigt, da zum Zeitpunkt der Probensammlung noch keine Ergebnisse aus dem in Kapitel 2.2.3 vorgestellten Projekt zur Erstellung eines genetischen Fingerabdrucks aller ca. 20.000 gekennzeichneten Klone und Varietäten vorlagen.

Sämtliche im Verlauf der vorliegenden Arbeit gesammelten Kakaoproben wurden mit den in den Kapiteln 3.6 bis 3.11 beschriebenen chemischen Analyseverfahren auf ihren Polyphenolgehalt untersucht. Die für die mikroskopische Analytik ausgewählten Proben werden im Kapitel 3.14 aufgeführt.

3.1.2 Definierte Reifestadien

Aus Ecuador erhielten wir definierte Reifestadien von Samen der Kakao-Klone ICS 95 und EET 95. Das entsprechende Material stammte von Früchten, die sich auf dem Versuchsfeld bei Quevedo aus handbestäubten Blüten entwickelt hatten. Der Zeitpunkt ab Bestäubung diente als Bezugspunkt für das jeweilige Alter der Stadien in Tagen.

Die Proben wurden im Zeitraum von Ende 2000 bis Anfang 2001 geerntet und anschließend zur Analyse nach Hamburg geschickt.

Für die mikroskopische Untersuchung erhielten wir in 4 % Formol eingelegte Samen von folgenden Stadien:

EET 95: 80, 100, 120, 140 und 154 Tage nach der Bestäubung.

ICS 95: 80, 100, 120 und 170 Tage nach der Bestäubung.

Im Falle des Klons ICS 95 erfolgte zusätzlich noch eine Lieferung von 140 Tage alten Proben, die jedoch während des Transportes beschädigt wurde und somit nicht auswertbar war.

Für die chemische Analytik erhielten wir gefriergetrocknetes und anschließend gemahlene Material von folgenden Stadien:

EET 95: 104, 125, 146 und 160 Tage nach der Bestäubung.

ICS 95: 125, 146 und 175 Tage nach der Bestäubung.

Das jeweils letzte Stadium der verschiedenen Probenserien entsprach hierbei dem durch die Probenehmer in Ecuador bestimmten Zeitpunkt der Frucht- und Samenreife. Wie aus den oben aufgeführten Werten ersichtlich wird, benötigen Früchte des Klons ICS 95 mehr Zeit bis zur Reife als jene von EET 95.

Soweit Materialien ähnlicher Stadien der jeweiligen Klone zur Verfügung standen, wurden die mikroskopischen Untersuchungsergebnisse direkt mit den Daten der chemischen Analytik verglichen.

3.1.3 Fermentiertes Material

Aus Venezuela erhielten wir zu allen unfermentierten, sonnengetrockneten Proben jeweils sonnengetrocknete Samen derselben Charge, welche 24, 48 oder 72 h lang fermentiert wurden (Fermentationsprotokoll siehe 3.4).

Von den 24, 48 oder 72 h lang fermentierten Kakaosamen wurden jeweils 3 Samen auf ihren spezifischen Polyphenolgehalt qualitativ untersucht.

3.2 Erfassung der Standortfaktoren

Die Bedeutung der Standortfaktoren für den Polyphenolgehalt einer Pflanze wird im Kapitel 2.3 erläutert.

Für eine eigene Analyse der Standortfaktoren auf den beprobten Kakao-Versuchsfeldern waren die Aufenthalte in den Herkunftsgebieten zur Zusammenstellung der Kakaoproben zu kurz. Für ihre Aufstellung wurden die Angaben der jeweiligen lokalen Kontaktpersonen verwendet, die in Kapitel 2.4 im Anschluss an die jeweiligen Standortbeschreibungen aufgeführt sind. Wo noch Lücken oder Unklarheiten bestanden, wurden fehlende Daten per Internet- und Literatur-Recherche ergänzt. Alle für einen direkten Standortvergleich geeigneten Daten wurden tabellarisch zusammengestellt (Tab. 6).

Eine lückenlose Erfassung aller potentiell relevanten Standortfaktoren der gesammelten Kakaoproben war mit den hier erläuterten Verfahren nicht möglich und hätte auch den Rahmen der vorliegenden Arbeit gesprengt. Tatsächlich wurden für den Vergleich der Standorte nur solche Daten berücksichtigt, die sich für eine tabellarische Gegenüberstellung eigneten und mit Hilfe derer sich die einzelnen Standorte klar voneinander abgrenzen ließen. So wurde nach Erfassung der standortspezifischen Daten zu Bodentyp und Düngung letztendlich nur verglichen, ob die untersuchten Kakaoproben von potentiell mit Nährstoffen unterversorgten Bäumen stammten oder nicht. Eine Diskussion der erzielten Untersuchungsergebnisse anhand der in 2.3 vorgestellten, ökologischen Modelle zur Anreicherung sekundärer Inhaltsstoffe in Pflanzen konnte angesichts der unvollständigen Erfassung der Standorte ebenfalls nur sehr eingeschränkt erfolgen.

3.3 Dokumentation und Konservierung der frischen Kakaoproben

Unmittelbar nach der Lieferung wurden die Früchte fotografiert und gewogen, sowie besondere Merkmale wie Verbräunungen oder Fraßspuren schriftlich festgehalten.

Die Früchte wurden anschließend geöffnet. Die intakten Samen wurden gezählt und gewogen. Pro Frucht wurden 3 Samen für die mikroskopische Präparation fixiert und einer zum Keimen ausgelegt (Kontrolle für den Zustand der Samen). Der Rest der Samen wurde nach Entfernung der Testa und nach Bestimmung der Keimblattfarbe in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend im Gefriertrockner (Christ Alpha I-6, Martin Christ GmbH, Osterode) mit Temperaturregulator (Christ HED 10, Martin Christ GmbH, Osterode) und Vakuumpumpe (Duo 5, Pfeiffer Vacuum, Asslar) lyophilisiert. Nach Abschluss der Gefriertrocknung wurden die Kakaosamen zumeist in einer Plastiktüte zerkleinert, um ein einheitliches Material für die Probennahme zu erhalten.

3.4 Fermentation der untersuchten Criollo-Proben

Die hier beschriebene Fermentation von Criollo-Samen wurde an der INIA Mérida in Venezuela durchgeführt (siehe 2.4.2).

Die Zeitdauer des Fermentationsprozesses betrug 3 Tage. Die Samen wurden dafür aus den Früchten entnommen und in Fermentationskisten mit den Maßen 60 cm × 60 cm × 60 cm überführt. Die Masse aus Kakaosamen und anhaftender Pulpa wurde anschließend mit Blättern von Bananenstauden abgedeckt, auf welche noch eine Lage Säcke aus Sisalgewebe gelegt wurde, um Temperaturverluste zu vermeiden.

Während der Fermentation wurden alle 60 min der pH-Wert sowie die Temperatur des Fermentationsgemisches an der Oberfläche und in Tiefen von 20 cm und 40 cm gemessen. Nach 24 h bzw. nach 48 h Fermentationszeit wurde die Abdeckung entfernt und die jeweils im unteren Drittel des Fermentationsansatzes befindlichen Kakaosamen ganz nach oben geschichtet. Anschließend wurde die Abdeckung wieder auf die fermentierenden Samen gelegt.

Nach 72 h wurde der Fermentationsprozess beendet und die Kakaosamen zum Trocknen in einer dünnen Schicht auf einem Trockenhof ausgebreitet. Dabei wurde mit der Trocknung in den frühen Morgenstunden (ab 8:00 Uhr) begonnen und die Samen wurden jede h in einheitlicher Weise umgeschichtet. An den ersten beiden Tagen werden die Kakaosamen jeweils 2 h der Sonne ausgesetzt, am 3. und 4. Tag für 3 bzw. 4 h. Ab dem 5. Tag wurden die Samen über den ganzen Tag hinweg in der Sonne getrocknet.

Die Zeitdauer der Trocknung war abhängig von den während des Prozesses herrschenden Wetterbedingungen. Sie wurde beendet, sobald der Wassergehalt der Kakaosamen auf 7 % bis 8 % abgesunken war.

Im Anschluss an die Trocknung wurden die Kakaosamen in Sisalsäcke überführt, in denen sie bis zur weiteren Untersuchung gelagert wurden.

3.5 Chemikalien

Sofern im Text nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Firma Merck in p. a.-Qualität verwendet.

3.6 Entfettung der Kakaoproben für die chemische Analytik

Je nach Weiterverarbeitung wurden zwischen 1 g und 2,5 g gefriergetrockneter, entfetteter Kakaoprobe zusammen mit 10 ml n-Hexan und 5 Stahlkugeln in ein 25 ml -Mahlgefäß einer Schwingmühle (MM 200, Retsch, Haan) gegeben und innerhalb von 10 min auf eine Partikelgröße von ca. 1 µm zerkleinert. Durch das Hexan wurde den Proben schon während des Mahlvorgangs das meiste Fett entzogen. Die pulverisierte Kakaoprobe wurde anschließend bis auf einen Rest von ≤ 5 % entfettet, indem sie mit je 2 × 50 ml Petrolether in einer Fritte gespült wurde. Das gewonnene Pulver wurde im Vakuumtrockenschrank bei Raumtemperatur und einem Luftdruck von 100 mbar getrocknet.

3.7 Gewinnung eines Rohextrakts der phenolischen Inhaltsstoffe

Zur Extraktion von phenolischen Inhaltsstoffen aus frischem Samenmaterial von *T. cacao* L. wurden jeweils 0,5 g gefriergetrockneter, kalt entfetteter Probe in ein 100 ml fassendes Zentrifugenglas eingewogen und auf Eis gestellt. Unter ständigem Rühren wurde jede Probe 3mal mit einem Aceton/H₂O-Gemisch (einmal 80+20, 2mal 60+40 v/v) extrahiert.

Nach jeder Extraktion wurde das Gemisch 10 min lang bei 5.000 U min⁻¹ zentrifugiert (Laborfuge GL, Heraeus Christ, Osterode). Vor der dritten Zentrifugation wurde die Probe für 2 min ins Ultraschallbad (Sonorex Super RK 510 H, Bandelin, Berlin) gestellt.

Die polyphenolhaltigen Überstände wurden nach jeder Zentrifugation abdekantiert und in einem 250 ml-Rundkolben gesammelt, der zur Vermeidung von Oxidationsreaktionen 2,5 ml Eisessig enthielt. Das Aceton wurde am Rotationsverdampfer (LABO Rota SE 320, Resona Technics, Gossau) bei 40° C und 80 mbar vollständig entfernt. Der Rückstand wurde mit *aqua dest.* in einen 100 ml-Messkolben überführt.

3.8 Die quantitative Analyse der phenolischen Inhaltsstoffe

Die Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes erfolgte mit Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz. Dafür wurde 1 ml des nach 3.6 gewonnenen Roh-Polyphenolextraktes mit 2,5%iger Essigsäure auf 1/10 (v/v) verdünnt. Jeweils 1 ml der verdünnten Probenlösung wurde in einen 10 ml-Messkolben gegeben und mit 0,5 ml Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz versetzt. Unmittelbar nach Zugabe von 2 ml 20 %iger Na₂CO₃-Lösung wurde der Ansatz umgeschüttelt und der Messkolben anschließend mit *aqua dest.* aufgefüllt. Danach wurden die Proben 10 min lang bei 70 °C im Wasserbad temperiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben bei $\lambda = 730$ nm gegen den Reagenzienblindwert gemessen. Der Polyphenolgehalt wurde in Epicatechin-Äquivalenten angegeben (Referenzsubstanz).

3.9 Die phenolischen Standardsubstanzen für die qualitative Analytik

Die Entwicklung der für die vorliegende Arbeit verwendeten Verfahren zur Analyse der phenolischen Inhaltsstoffe frischer Kakaosamen erfolgte auf Basis einer optimalen Auftrennung und Wiederfindung der in Jardine 1999 aufgeführten phenolischen Einzelsubstanzen. Dafür wurden diese als Referenzsubstanzen käuflich erworben oder durch Spenden entsprechender Institutionen bereitgestellt.

Die tabellarische Zusammenstellung phenolischer Komponenten in Kakao aus Jardine 1999 basiert hauptsächlich auf dem Review von Ziegler und Biehl 1988, der eine umfassende Übersicht über die bis dahin veröffentlichten Beschreibungen phenolischer Kakao-Inhaltsstoffe liefert. Diese Tabelle phenolischer Komponenten dient bis heute als Basis vieler Publikationen. Jardine 1999 ergänzt sie lediglich durch die beiden von Sanbongi *et al.* 1998 gefundenen Zimtsäureamide Clovamid und Deoxyclovamid.

Tab. 8 listet die phenolischen Inhaltsstoffe aus Jardine 1999 auf und enthält Angaben über die Firmen, von denen sie für die vorliegende Studie erworben wurden. Abgesehen von Clovamid wurden die Substanzen kommerziell erworben. Das Clovamid, welches während der Durchführung der hier beschriebenen Analytik nicht kommerziell gehandelt wurde, erhielten wir als Spende von Dr. Hans-Georg Rast, Dr. Thomas Henkel und Dr. Andreas Beckmann (Bayer HealthCare AG, Wuppertal).

Die Substanzen (-)-Galocatechin, Deoxyclovamid, Neochlorogensäure und Quercetin-3-glucosid, sowie alle Substanzen aus der Gruppe der Proanthocyanidine (Oligomere und Polymere von Catechinen) wurden für die Probenentwicklung und die folgende Probenanalytik nicht verwendet, da sich ihre Beschaffung zunächst als unmöglich und später als nicht mehr notwendig erwies. Eine ausführlichere Beschreibung der aufgeführten Standardsubstanzen erfolgte bereits in Kapitel 2.1.

Tab. 8: Liste der verwendeten Standardsubstanzen

Phenolische Substanz	Gruppenzugehörigkeit	Firma
Aesculetin	Hydroxycumarin	Aldrich
Catechin	Flavonoide, Flavan-3-ole	Fluka
Chlorogensäure	Hydroxyzimtsäureester	Aldrich
Clovamid	Hydroxyzimtsäureamid, HCAA	Bayer HealthCare AG
3- α -L-Arabinosidyl-cyanidin	Flavonoid, Anthocyan	Polyphenols AS
3- β -D-Galactosidyl-cyanidin	Flavonoid, Anthocyan	Polyphenols AS
<i>p</i> -Hydroxyzimtsäure, <i>p</i> -Cumar(in)-säure, 4-Cumar(in)säure	Hydroxyzimtsäure	Merck
Deoxyclovamid	Hydroxyzimtsäureamid, HCAA	nicht verfügbar
3,4-Dihydroxyzimtsäure, Kaffeesäure	Hydroxyzimtsäure	Merck
Epicatechin	Flavonoid, Flavan-3-ol	Sigma
Epigallocatechin	Flavonoid, Flavan-3-ol	Sigma
Ferulasäure	Hydroxyzimtsäure	Merck
Galocatechin	Flavonoid, Flavan-3-ol	nicht verfügbar
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure	Hydroxybenzoesäure	Merck
<i>o</i> -Hydroxy-phenyllessigsäure	Phenyllessigsäure	Merck
<i>p</i> -Hydroxy-phenyllessigsäure	Phenyllessigsäure	Merck
Neochlorogensäure	Hydroxyzimtsäure, Ester	nicht verfügbar
Phenyllessigsäure	Phenyllessigsäure	Merck
Phloretinsäure	ähnlich: Hydroxyzimtsäure	Merck
Phloroglucinol, Benzene-1,3,5-triol	(einfaches) Phenol	Aldrich
Proanthocyanidine	Flavonoid	Nicht verfügbar
Protocatechusäure	Hydroxybenzoesäure	Aldrich
Quercetin	Flavonoid, Flavonol	Sigma
Quercetin-3-galactosid	Flavonoid, Flavonolglycosid	Fluka
Quercetin-3-glucosid	Flavonoid, Flavonolglycosid	nicht verfügbar
Syringasäure	Hydroxybenzoesäure	Merck
Vanillinsäure	Hydroxybenzoesäure	Aldrich

Zur Identifizierung und Quantifizierung der phenolischen Inhaltsstoffe in den Kakaoproben wurden die oben aufgeführten phenolischen Substanzen als externe und während der Etablierungsphase auch als interne Standards verwendet. Die dafür verwendete RP-HPLC-Analytik wird in 3.11 ausführlich beschrieben.

3.10 Die Aufreinigung der Polyphenole für die RP-HPLC-Analytik

In den Kapiteln 3.10.1 und 3.10.2 werden die beiden Verfahren zur Extraktion und Aufreinigung der Anthocyane sowie der übrigen Polyphenole aus dem nach Kapitel 3.7 gewonnenen Rohextrakt beschrieben, die zum Beginn der analytischen Arbeit angewendet wurden. Später wurden diese beiden Aufreinigungsverfahren durch die in Kapitel 3.10.3 beschriebene optimierte Methode ersetzt, mit der alle phenolischen Inhaltsstoffe gleichzeitig aufgereinigt werden konnten. Der zeitliche und materielle Aufwand für die Probenvorbereitung wurde dabei deutlich reduziert und die separate Verarbeitung wesentlich kleinerer Probenvolumina ermöglicht. Die anschließende HPLC-Analytik (siehe 3.11) sowie die damit erreichte Auftrennung der Peaks und die Wiederfindungsraten der Einzelsubstanzen blieben dabei unverändert.

3.10.1 Extraktion der phenolischen Substanzen mit Ethylacetat

Mit dieser Methode wurden zunächst alle Kakao-Polyphenole bis auf die Anthocyane extrahiert. Letztere lösen sich in Ethylacetat kaum.

30 ml des nach 3.7 gewonnenen Rohextraktes wurden in einem Scheidetrichter mit 30 ml Ethylacetat (Carl Roth GmbH und Co., Deutschland) ausgeschüttelt, in dem sich bis auf die Anthocyane alle gesuchten phenolischen Substanzen lösen. Der Nachweis erfolgte über Wiederfindungstests mit den Phenolstandards. Nach 5facher Wiederholung wurden die vereinigten Ethylacetatfraktionen mit Natriumsulfat getrocknet und anschließend am Rotationsverdampfer (LABO Rota SE 320 Resma Technics) bis fast zur Trockne eingengt. Die restliche Essigsäure wurde mit N₂ ausgeblasen. Der Rückstand wurde in 1 ml Methanol gelöst und mit 4 ml 2 %iger Essigsäure verdünnt. Der so auf ein definiertes Volumen gebrachte Extrakt wurde direkt für die HPLC-Analytik verwendet.

3.10.2 Aufreinigen der Anthocyane mit SEP-PAK Vac 6cc

30 ml des Rohextrakts (siehe 3.7) wurden zunächst 5 min bei 12.000 g zentrifugiert (Laborfuge GL, Heraeus Christ). Anschließend wurden 20 ml des Überstandes am Rotationsverdampfer auf 10 ml eingengt und auf eine mit Methanol und 2 %iger Essigsäure äquilibrierte SEP-PAK Vac 6cc 1.000 mg Kartusche (Waters) aufgetragen. Nach dem Spülen mit 10 ml 2 %iger Essigsäure wurden die an der Festphase der Kartusche haftenden Polyphenole in 10 ml Methanol gelöst. Der Extrakt wurde am Rotationsverdampfer (LABO Rota SE 320 Resma Technics) bis zur Trockne eingengt und in 2 ml eines Gemisches aus Methanol (20 %), *aqua dest.* (78 %) und Essigsäure (2 %) v/v/v aufgenommen. Durch einen 0,45 µm Spritzenfilter (PTFE Multoclear®, Fa.

CS-Chromatographie Service) wurde die Probe in ein HPLC-Vial gedrückt, luftdicht verschlossen und bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren.

3.10.3 Optimierte Extraktion und Aufreinigung aller phenolischen Inhaltsstoffe („methanolische Mikroextraktion“)

50 mg des entfetteten Kakaopulvers wurden in ein Zentrifugenglas (16 mm × 100 mm) eingewogen und zusammen mit 3 ml Methanol p. a. für 20-30 s am ULTRA-TURRAX® T25-Rührer extrahiert. Der ULTRA-TURRAX® wurde anschließend mit 2 ml Methanol abgespült und die Lösungen vereinigt. Das Glas wurde 15 Minuten lang im Eisbad gekühlt, anschließend wurde die Probe bei 5000 U min⁻¹ 10 min zentrifugiert (Laborfuge GL, Heraeus Christ). Der klare methanolische Überstand wurde in einen 50 ml Spitzkolben dekantiert.

Dieser Extraktionsvorgang wurde für jede Probe noch 3mal wiederholt, mit dann jeweils nur 2minütiger Kühlphase im Eisbad.

Die vereinigten Methanolextrakte wurden am Rotationsverdampfer (LABO Rota SE 320 Resma Technics) bei 40 °C und 100 mbar bis zur Trockne eingengt und in 1,5 ml Methanol (Lichrosolv®) gelöst. Abschließend wurde die Probe durch einen 0,45 µm Spritzenfilter (PTFE Multoclear®, Fa. CS-Chromatographie Service) in ein HPLC-Vial überführt, luftdicht verschlossen und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C eingefroren.

3.11 HPLC-PDA-Analytik

Zur chromatografischen Trennung und Charakterisierung der phenolischen Substanzen wurde ein RP-HPLC-Verfahren mit Detektion per Photodioden Array Detector (PDA) entwickelt.

Die einzelnen Parameter des verwendeten Verfahrens werden im Folgenden aufgelistet:

Laufmittel A: Essigsäure , $\sigma = 2 \%$

Laufmittel B: Acetonitril/ H₂O Lichrosolv®/ Eisessig 400+90+10 (v/v/v)

Gradient:

Zeit [min]	Flussrate [ml min ⁻¹]	A [%]	B [%]
0	1,2	90	10
8	1,2	90	10
38	1,1	77	23
50	1	60	40
70	1	10	90
73	1	10	90
78	1,2	90	10
93	1,2	90	10

Pumpen:	HPLC PUMP 64 (Knauer)
Probengeber:	AS-4000 (Merck)
On-Line Degasser:	Knauer
Gradientensteuerung:	HPLC Programmer 50 (Knauer)
Säulentemperatur:	26 °C
Trennsäule:	Waters Novapac C18 (30 cm, Ø 3,9 cm, endcapped)
Detektion:	PDA 996 (Waters Millipore)
Injektionsvolumen:	20 µl

Die Detektion der phenolischen Inhaltsstoffe erfolgte in einem Spektrum von $\lambda = 230$ bis 540 nm, wobei die Peaks der Anthocyane bei 530 nm, jene der Flavonole bei 371,6 nm und jene der restlichen Polyphenole bei 280 nm quantifiziert wurden. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der externen Standardsubstanzen Protocatechusäure, (+)-Catechin, (-)-Epicatechin sowie 3- α -L-Arabinosidyl-cyanidin und 3- β -D-Galaktosidyl-cyanidin. Als Programm zur Visualisierung und Auswertung der Ergebnisse wurde Millennium 3.2 (Waters) verwendet.

3.12 Saure Hydrolyse

Dieses Verfahren wurde zur Ergänzung der qualitativen Analyse der phenolischen Kakao-Inhaltsstoffe mittels RP-HPLC-PDA (siehe 3.11) durchgeführt.

Mit Hilfe der sauren Hydrolyse werden Ester in ihre Untereinheiten aufgespalten. Im Falle von Polyphenolen führt dies u. a. zur Lösung von Esterbindungen, zur Auftrennung von Oligomeren in Monomere und zur Abspaltung von Zuckerresten. Komplexere Monomere können ebenfalls gespalten werden.

Die saure Hydrolyse unterstützt die Identifizierung phenolischer Inhaltsstoffe, für welche keine Referenzsubstanzen vorhanden sind. Sie liefert auch Hinweise darauf, bei welchen der gefundenen phenolischen Einzelsubstanzen es sich möglicherweise um Artefakte handelt.

Für die vorliegende Arbeit wurden jeweils 30 ml des Roh-Polyphenolextrakts mit konzentrierter Salzsäure auf 0,1 mol l⁻¹ bzw. 1 mol l⁻¹ angesäuert und für etwa 1 h bei 90 °C im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurden die Extrakte nach dem in Kapitel 3.10.1 beschriebenen Verfahren aufgereinigt und per RP-HPLC analysiert.

3.13 Identifizierung und Quantifizierung des Hydroxyzimtsäureamids (+)-N-(E)-Caffeoyl-L-aspartat

Die entsprechende Fraktion „A“ aus etwa 20 bis 30 RP-HPLC Analyseläufen (siehe 3.11) wurde gesammelt und am Rotationsverdampfer bei 40° C und 80 mbar bis zur Trockne eingengt. Der am Kolbenrand abgesetzte Substanzfilm wurde in 3 ml Methanol p. a. gelöst und in ein 3 ml fassendes Vial überführt. Nach Verdampfen des Lösungsmittels in

einem Trockentemperiersystem (Mobiltherm I, Labor Technik Barkey) unter N₂-Schutzatmosphäre wurde das Vial luftdicht verschlossen und bis zur weiteren Analytik bei -30 °C gelagert.

Die Fraktion wurde 2002 von Herrn Dr. Schubert (ThermoFinnigan Egelsbach) per HPLC-MS-Technik am LCQ Deca XP (ThermoFinnigan) in einer 3D-Ionenfalle untersucht. Als Vergleichssubstanz diente Chlorogensäure.

Durch Herrn Dr. Stark (Institut für Lebensmittelchemie, Universität Münster) wurde eine weitere Analyse der Fraktion „A“ durchgeführt. Das verwendete HPLC-PDA-Verfahren wird beschrieben in Stark und Hofmann 2005 und setzt sich demnach aus folgenden Parametern und Komponenten zusammen:

Laufmittel A: Methanol p. a.

Laufmittel B: Ameisensäure 0,1 % in H₂O Lichrosolv®; pH 2,5

Gradient:

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	20	80
10	20	80
40	60	40
40,5	100	0
50,5	100	0

HPLC-Gerät:	Jasco (Groß-Umstadt, Deutschland)
Trennsäulen:	„stainless steel“-Säulen (250 mm × 4,6 mm ID)
stationäre Phase:	ODS-Hypersil, 5 µm, RP-18 (ThermoHypersil)
Fließgeschwindigkeit:	0,8 ml/min.
Pumpensystem:	PU 1580
In-Line Degasser:	DG-1580-53
Niederdruckgradientensystem:	LG-1580-02
Detektion:	DAD Typ MD 1515

Die Identifizierung der Substanz erfolgte durch den Vergleich ihres Spektrums und der Retentionszeit mit jenen eines am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Münster zur Verfügung stehenden Standards.

Da die entsprechende Reinsubstanz am eigenen Institut nicht zur Verfügung stand, erfolgte die Quantifizierung des oben genannten Amids anhand des Chlorogensäurestandards (siehe Tab. 8). Nach Auskunft von Prof. Dr. T. Hofmann (persönliche Mitteilung 2006) ist dies zulässig aufgrund der sehr ähnlichen

Absorptionseigenschaften beider Substanzen, deren Kaffeesäurereste an derselben Stelle gebunden sind (siehe 2.1.2.2). Gleichen Molmengen von Chlorogensäure und Kaffeesäure-aspartat können daher gleiche Peakflächen zugeordnet werden.

3.14 Lichtmikroskopische Analytik des reifen und reifenden Keimblattgewebes von Kakaosamen

3.14.1 Die Auswahl des Kakaomaterials

Die mikroskopische Analytik beschränkt sich auf die Klone EET 95, Catongo, NA 33 sowie auf die Criollos *Pentagona rojo*, *Pentagona Verde*, *Porcelana Blanco*, *Guasare* sowie auf *Criollo Mérida* aus San Juan de Lagunillas (siehe 3.1.1). Diese Auswahl wurde getroffen, da die zeitintensive lichtmikroskopische Präparation und Auswertung eine Analyse aller zur Verfügung stehender Proben unmöglich machte.

Der Klon EET 95 dient als Vertreter des Nacional-Typs (siehe 3.1.1). Von diesem Klon waren besonders viele Einzelproben gleicher Herkunft vorhanden (siehe Tab. 7), sodass an ihm die Variabilität struktureller Details innerhalb eines Genotyps bei identischen Standortbedingungen erfasst werden konnte.

Der Klon Catongo dient als Vertreter LAF-Typs. Als homozygoter Träger des Anthocyan-Inhibitor-Gens produziert der Klon zudem nach Selbstbestäubung Samen mit weißen Keimblättern. Im Rahmen der Untersuchung wurden sowohl gefärbte als auch ungefärbte Samen untersucht und miteinander verglichen.

Der Klon NA33 ist ein verbreiteter Vertreter des UAF-Typs. Von diesem Klon waren Proben besonders vieler verschiedener Herkunftsgebiete vorhanden (siehe Tab. 7), sodass an seinen Proben die Variabilität struktureller Details innerhalb eines Genotyps bei unterschiedlichen Standortbedingungen erfasst werden konnte.

Gleich mehrere verschiedene Genotypen des Criollo-Typs wurden untersucht (s. o.). Dadurch konnte unter anderem die Variabilität struktureller Details innerhalb eines Kakao-Typs genauer erkannt werden.

Histologische und cytologische Details der Keimblattentwicklung der Polyphenolzellen wurde an sämtlichen der in 3.1.2 aufgeführten Reifestadien der Klone ICS 95 und EET 95 untersucht.

Je nach der genotypspezifischen Form der Früchte können die Samen innerhalb ein und derselben Frucht unterschiedlich groß und schwer sein. Kakaosamen aus mittleren Fruchtabschnitten sind in der Regel am größten und wurden für die lichtmikroskopische Präparation verwendet.

Pro Frucht wurden mindestens 3 Samen ausgewählt. Von jedem dieser Samen wurden jeweils 3 verschiedene Schnittpräparate angefertigt, sodass je Frucht insgesamt 9 Einzelproben hergestellt wurden. Dafür wurde Keimblattgewebe aus den zentralen Abschnitten der Samen verwendet.

Tab. 9 fasst die Anzahl der insgesamt pro Klon/Varietät und Typ produzierten Präparate zusammen.

Tab. 9: Übersicht über die mikroskopischen Präparate

Typ	Anzahl der beprobten Früchte	Anzahl der beprobten Samen	Anzahl der Präparate
Criollo	10	29	87
LAF	5	15	47
Nacional	5	15	45
UAF	6	16	48

3.14.2 Einbettung von Keimblattgewebe in LR White Medium Grade TM

Das für mindestens 24 h in 4 % Formol in Leitungswasser fixierte Kotyledonargewebe wurde mit einer Rasierklinge in etwa 1 mm³ große Blöcke geschnitten.

Die Gewebeabschnitte wurden zunächst in einer Ethanolreihe vollständig entwässert. Dafür wurden die Präparate in Eppendorff-Gefäße überführt und bei Raumtemperatur 2mal für je 0,5 h in 70 % Ethanol und 2mal für je 0,5 h in 100 % Ethanol p. a. inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeblöcke in 100 % LR White Medium Grade TM (London Resin Company) überführt. Dieses wurde nach einer h gegen frisches Medium ausgetauscht, in welchem die Präparate über Nacht im Kühlschrank inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden die mit dem noch flüssigen Kunstharz imprägnierten Gewebeblöcke einzeln in 0,36 cm³ fassende Gelatinekapseln (Pohl-Boskamp) überführt. Diese wurden mit LR White Medium Grade TM aufgefüllt und zum Aushärten für 24 h bei 60 °C im Trockenschrank inkubiert. Vor der Weiterverarbeitung wurden die Kapseln mit den in auspolymerisiertem Kunstharz eingebetteten Kakaoproben noch einige Tage bei Raumtemperatur gelagert.

3.14.3 Erstellen von Semidünnschnitten

Die ausgehärteten, kapselförmigen Kunstharzpräparate wurden mit einer Rasierklinge unter dem Binokular „getrimmt“ (= angespitzt) und anschließend in ein Ultramikrotom (Leica, Ultracut S) eingespannt. Mit Hilfe von frisch angefertigten Glasmessern wurden 2 bis 2,5 µm dicke Schnitte hergestellt, welche mit einer Drahtöse auf einen mit *aqua dest.* beträufelten Glasobjektträger übertragen wurden. Der Objektträger wurde für einige h bei 50 °C auf eine Heizplatte gelegt, um die auf dem Tropfen schwimmenden Semidünnschnitte zu glätten und anschließend fest auf der Glasoberfläche antrocknen zu lassen.

3.14.4 Färbung und Eindeckung der Schnittpräparate

Die Färbung der Semidünnschnitte durch das Kakao-Keimblattgewebe erfolgte mit Toluidinblau O-Färbung (modifiziert nach Gutmann 1995). Dafür wurden die auf den Objektträgern fixierten Semidünnschnitte mit Natriumhypochloritlösung (ca. 13% Cl, Fluka) vorbehandelt. Die Lösung ätzt den Schnitt leicht an, sodass die Farbpigmente anschließend besser anhaften. Nach etwa 10-30 Sekunden wurde der Objektträger mit *aqua dest.* gespült und mit einer Lösung aus 0,05 % (w/v) Toluidinblau O in *aqua dest.* beträufelt. Die Färbelösung wurde nach einer Einwirkdauer von wenigen min mit *aqua dest.* abgespült und der Objektträger mit den Präparaten auf einer Heizplatte bei 50 °C getrocknet.

Die Schnittpräparate wurden anschließend in Roti®-Histokitt (Carl Roth GmbH und Co., Deutschland) eingeschlossen und mit einem Deckgläschen versehen. Sie wurden bis zum Aushärten des Einschlussmittels für einige Tage im Lösungsmittelschrank gelagert.

Phenolische Inhaltsstoffe erhalten in den auf diese Weise behandelten Semidünnschnitten eine grünlich-schwarze Färbung, Proteine und nicht-lignifizierte Zellwände werden blau gefärbt, während Lipide ungefärbt bleiben.

3.14.5 Lichtmikroskopische Analyse der Semidünnschnitte

Ein Lichtmikroskop vom Typ Olympus BH-2 wurde verwendet. Die Untersuchung der nach den oben beschriebenen Verfahren angefertigten Semidünnschnitte erfolgte überwiegend mit normaler Hellfeldmikroskopie bei 100facher sowie 200facher Vergrößerung. Eine auf den Fototafel des Mikroskops fixierte Kamera (ColorView, Soft Imaging System GmbH) wurde zur Erstellung digitaler Aufnahmen verwendet.

Bei der histologischen Analyse der angefertigten Präparate wurde ein Schwerpunkt auf das Speicherparenchym des Keimblattgewebes gelegt, dessen struktureller Aufbau für jedes Einzelpräparat erfasst wurde. Daneben wurden auch die Epidermis mit ihren Trichomen, sowie die in das Parenchym eingelagerten Leitbündelelemente untersucht.

Im Rahmen der cytologischen Analytik wurden die Flächen der Parenchymzellen in den jeweils erstellten, lichtmikroskopischen Aufnahmen des Keimblattgewebes vermessen. Hierfür wurde bei 200facher Vergrößerung von jedem Einzelpräparat (s. o.) zunächst jeweils ein Abschnitt des Speicherparenchyms fotografiert, der sich durch möglichst viele intakte Zellen auszeichnete und möglichst keine LBE und Kambialstränge enthielt. Am Bildschirm wurden pro Aufnahme jeweils 5 Speicher- und Polyphenolzellen mit Hilfe des Mauszeigers „blind“ und somit zufällig ausgewählt. Deren Zellflächen wurden anschließend mit Hilfe des Programms *analySIS®* (Soft Imaging System GmbH) berechnet.

Pro Kakaosamen wurden auf diese Weise die Flächen von insgesamt 15 Speicherzellen (SZ) und 15 Polyphenolzellen (PZ) aus 3 verschiedenen Präparaten erfasst.

Die mit Hilfe des oben genannten Bildanalyse-Programms ermittelten Flächen von PZ und SZ der daraufhin untersuchten Semidünnschnittpräparate liefern nach ihrer statistischen Auswertung einen Richtwert für die Größe der jeweiligen Zelltypen.

3.14.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte mit Hilfe von STATISTICA (Version 6, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

Neben der Erstellung von Korrelationsmatrizen erfolgte die statistische Auswertung mittels einfaktorieller ANOVA und Scheffé post-hoc- Test mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse aus der Analyse des Gesamt-Polyphenolgehaltes reifer, unfermentierter Kakaosamen

In der Anhangs-Tab. 26 sind die probenspezifischen Einzelwerte für den mit Hilfe von Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz (siehe 3.8) bestimmten Gesamt-Polyphenolgehalt, berechnet als (-)-Epicatechin-Äquivalent und bezogen auf die entfettete Trockenmasse [% Epicat/ ff TM] angegeben. Der Polyphenolgehalt schwankt demnach zwischen 6,93 % (Probe T15) und 17,96 % (Probe G8).

Per ANOVA mit anschließendem Scheffé-Test konnte mit $F = 7,10$ und $p < 0,005$ eine signifikante Abhängigkeit des Gesamt-Polyphenolgehaltes von der Herkunft der Proben ermittelt werden (siehe Abb. 35). Somit unterscheiden sich Proben der Herkunftsgebiete „Malaysia“ und „Reading“ signifikant von jenen aus Ghana (Tab. 10).

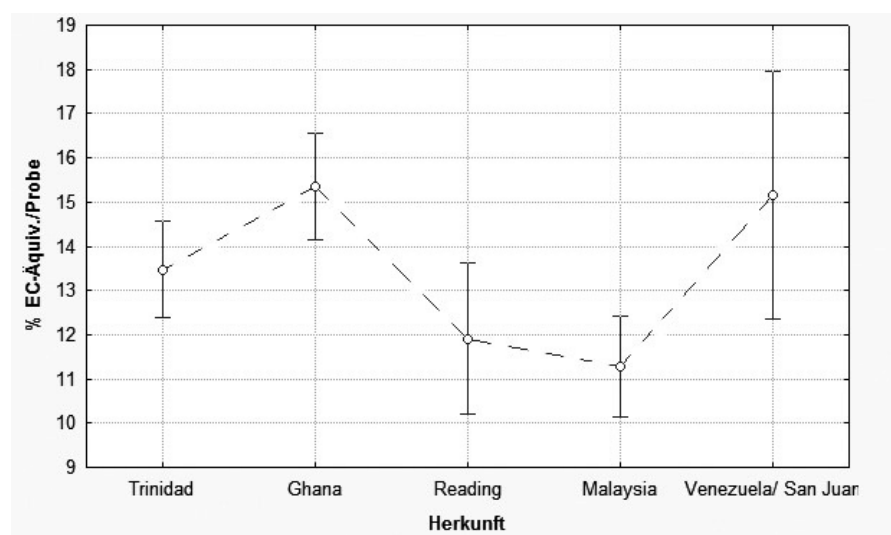


Abb. 35: ANOVA der Abhängigkeit des Polyphenolgehaltes von der Herkunft
Aktueller Effekt: $F = 7,10$; $p < 0,005$; Typ VI Dekomposition (Effektive Hypothese)
Die vertikalen Balken kennzeichnen 95%ige Konfidenzintervalle.

Tab. 10: Scheffé-Test der Abhängigkeit des Polyphenolgehaltes von der Herkunft
Homogene Gruppen; $\alpha = 0,05$; Fehler: MQ(Zwischen) = 5,89, FG = 60

Herkunft	% EC-Äquiv./Probe Mittel	1.	2.
Malaysia	11,27551	****	
Reading	11,90476	****	
Trinidad	13,47694	****	****
Venez./ SJ	15,14400	****	****
Ghana	15,35370		****

Die Abhängigkeit des ermittelten Gesamt-Polyphenolgehaltes von der Herkunft der Kakaoproben wird offenbar maßgeblich durch den Standortfaktor „Düngung“ (siehe Tab. 6) hervorgerufen. Dieser hat laut den hier durchgeführten Untersuchungen mit $F = 27,67$ und $p < 0,005$ einen hochsignifikanten Einfluss auf den Gesamt-Polyphenolgehalt (siehe Abb. 36).

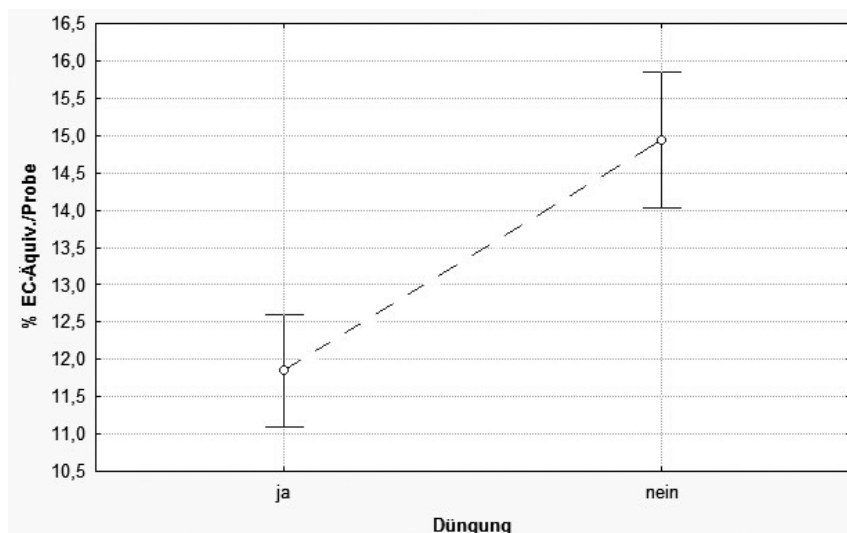


Abb. 36: ANOVA der Abhängigkeit des Polyphenolgehaltes von der Standort-Düngung
 Aktueller Effekt: $F = 27,67$; $p < 0,005$; Typ VI Dekomposition (Effektive Hypothese)
 Die vertikalen Balken kennzeichnen 95%ige Konfidenzintervalle.

Für keinen anderen der ermittelten Standortfaktoren (siehe Tab. 6) konnte ein statistisch signifikanter Einfluss auf den Gesamt-Polyphenolgehalt der Kakaoproben festgestellt werden. Auch Kakaovarietät und -typ, sowie die in Tab. 2 und Tab. 3 dargestellten, durch Literaturdaten bekannten Werte zur Krankheitsresistenz (hoch/niedrig) und Kompatibilität (ja/nein) besitzen keinen statistisch signifikanten Einfluss auf den Gesamt-Polyphenolgehalt. Ferner ist dieser weder mit einer der in Tab. 25 (Anhang) aufgelisteten Angaben zu Gewicht und Anzahl der Samen noch mit dem Fruchtgewicht eindeutig positiv oder negativ korreliert.

Zur Korrelation des Gesamt-Polyphenolgehaltes mit den einzelnen, per RP-HPLC-PDA in Kakaosamen identifizierten und quantifizierten phenolischen Einzelsubstanzen siehe Kapitel 4.2.

4.2 Ergebnisse der RP-HPLC-Analytik reifer, unfermentierter Kakaosamen

4.2.1 Die Charakterisierung und Auftrennung der phenolischen Standards

Das in 3.11 beschriebene RP-HPLC-Verfahren wurde für die Auftrennung der in Tab. 8 aufgelisteten Standardsubstanzen entwickelt. Während der Etablierung des HPLC-

Verfahrens wurde ein Gemisch der meisten dieser Standardsubstanzen hergestellt und der Gradient so lange modifiziert, bis eine vollständige Auftrennung fast aller Peaks erzielt wurde. Dieser Multistandard enthielt zusätzlich die Purinalkaloide Theobromin und Coffein, welche durch das verwendete Aufreinigungsverfahren (siehe 3.10) nur zu einem geringen Teil aus den untersuchten Kakaoextrakten entfernt werden. Er diente nach Etablierung der Methodik zur Kontrolle des Systems vor der Probenanalyse. Abb. 37 zeigt ein typisches Chromatogramm des Multistandards bei 280 nm.

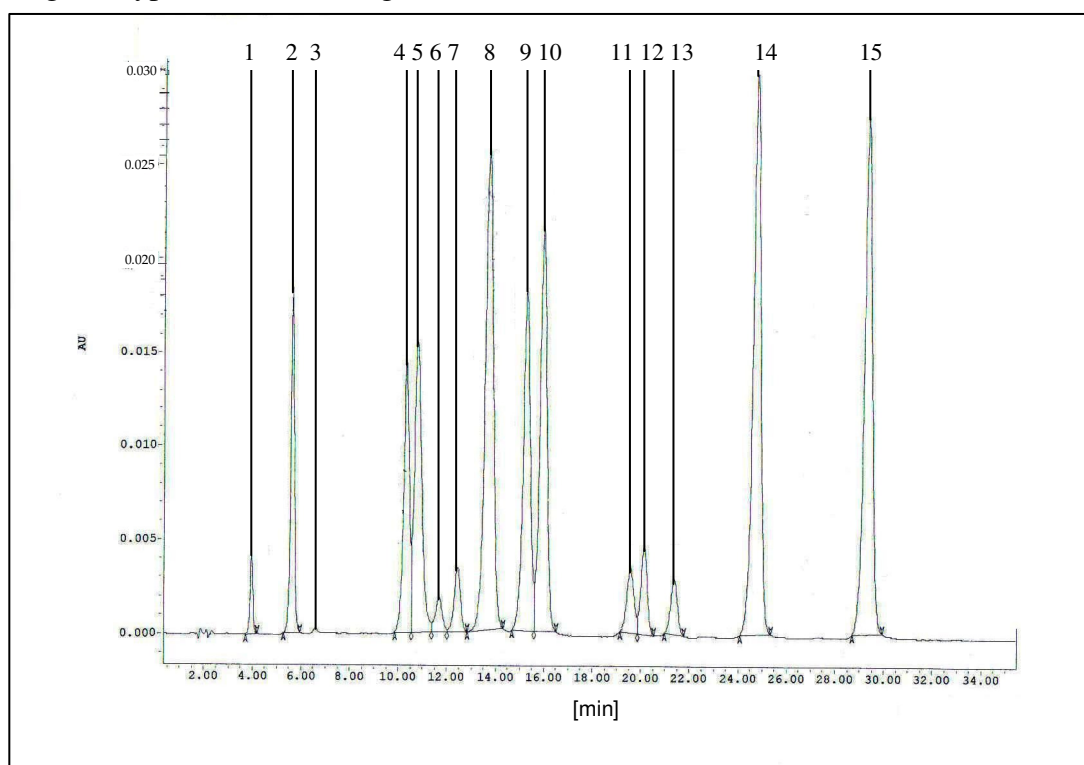


Abb. 37: Chromatogramm des verwendeten „Multi-Standards“ bei 280 nm
1: Theobromin; **2:** Protocatechusäure; **3:** Epigallocatechin; **4:** (+)-Catechin; **5:** *p*-Hydroxybenzoesäure; Chlorogensäure; **6:** *p*-Hydroxyphenylelessigsäure;
7: Coffein/Aesculetin; **8:** Vanillinsäure; **9:** Kaffeesäure; **10:** Syringasäure;
11: (-)-Epicatechin; **12:** *o*-Hydroxyphenylelessigsäure; **13:** Phloretinsäure;
14: *p*-Cumarsäure; **15:** Ferulasäure

In Tab. 11 werden die durchschnittlichen Retentionszeiten sowie die Absorptionsmaxima aller untersuchten phenolischen Standardsubstanzen unter den Bedingungen des verwendeten HPLC-Verfahrens aufgeführt.

Tab. 11: Absorptionsmaxima und Retentionszeiten der phenolischen Standardsubstanzen

Phenolische Substanz	Lambda-Max [nm]	Retentionszeit [min]
Aesculetin	297,7/ 345,5	11,15
Catechin	278,7	8,4
Chlorogensäure	326,3	8,8
Clovamid	321,6	23,08
3- α -L-Arabinosidyl-cyanidin	517,1	24,73
3- β -D-Galactosidyl-cyanidin	517,1	19,95
<i>p</i> -Hydroxyzimtsäure, <i>p</i> -Cumarsäure	309,6	21,9
3,4-Dihydroxyzimtsäure, Kaffeesäure	234,9/ 322,7	12,55
Epicatechin	278,7	16
Epigallocatechin	278,7	5,6
Ferulasäure	322,7	26,7
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure	255	8,8
<i>o</i> -Hydroxy-phenylelessigsäure	234,9/ 322,7	16,59
<i>p</i> -Hydroxy-phenylelessigsäure	275,1	10,25
Phenylelessigsäure	-	ca. 23
Phloretinsäure, Dihydro- <i>p</i> -Cumarsäure	276,3	18,3
Phloroglucinol	-	ca. 24
Protocatechusäure	259,7/ 294,1	5
Quercetin	371,6	52
Quercetin-3-galactosid	256,1/ 353,9	34,03
Quercetin-3-glucosid	256,1/ 353,7	34,30
Syringasäure	275,1	13,95
Vanillinsäure	260,9/ 292,9	11,8

Die kombinierten Daten zu Peakspektren und Retentionszeiten wurden in der Folge zur Identifizierung der einzelnen Peaks in den Polyphenolextrakten der untersuchten Kakaoproben verwendet.

4.2.2 Die Identifizierung der phenolischen Einzelsubstanzen unfermentierter, reifer Kakaoproben

Die Peakverteilung bei $\lambda = 280$ nm ist bei allen untersuchten Polyphenolextrakten reifer, unfermentierter Kakaosamen sehr ähnlich. Abb. 38 zeigt das Chromatogramm der Probe R 2 (siehe Tab. 7), welches repräsentativ für alle untersuchten Kakaoproben ist.

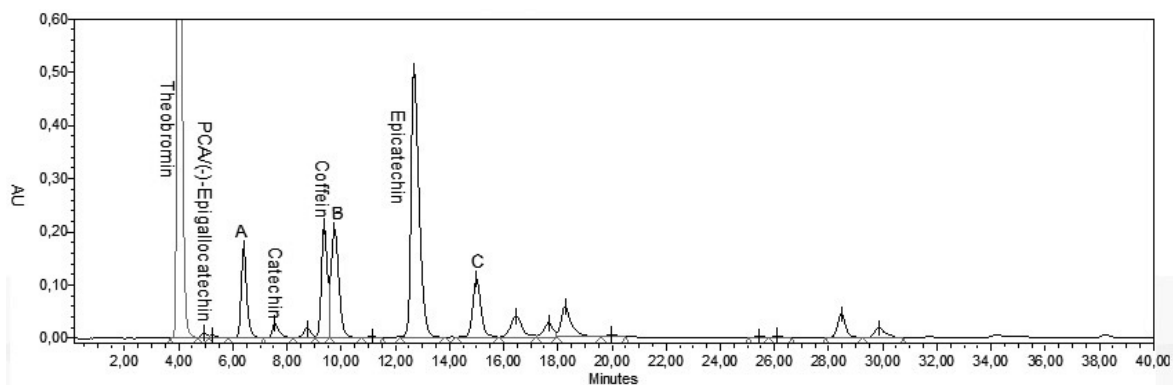


Abb. 38: Chromatogramm der Kakaoprobe R 2 bei $\lambda = 280$ nm
A-C: nicht durch Standards identifizierbare Peaks; **PCA:** Protocatechusäure

Wie Abb. 38 verdeutlicht, besitzen die Proben-Chromatogramme bei 280 nm etwa 12-15 signifikante Einzelpeaks. Außer phenolischen Inhaltsstoffen befinden sich darunter auch die in Kakaosamen vorkommenden Purinalkaloide Coffein und Theobromin. Diese stören jedoch die Analytik kaum, da sie keinen der Polyphenol-Standardpeaks überlagern. Bei einigen Probenläufen kam es jedoch zu einer Überschneidung von Coffein mit dem nicht vollständig identifizierten Peak „B“ (Abb. 38, s. u.).

Durch den Vergleich des Spektrums, der Retentionszeit und der Fläche mit den Standardsubstanzen konnten 3 der bei 280 nm sichtbaren Peaks phenolischen Ursprungs eindeutig identifiziert und anhand ihrer Peakflächen auch quantifiziert werden. Dabei handelt es sich einerseits um die monomeren Polyphenole (-)-Epicatechin, (+)-Catechin (Abb. 19); andererseits um Protocatechusäure (siehe 2.1.1.2). Letztgenannte Substanz wurde jedoch nur in etwa einem Viertel der untersuchten Kakaoproben nachgewiesen (siehe Tab. 26).

Auch die Spektren jener Peaks, welche keiner der verwendeten Standardsubstanzen entsprachen, wurden untersucht. Mit Ausnahme von „A“ (Abb. 38) weisen alle dieser Peaks das gleiche Spektrum mit demselben Maximum bei 278,7 nm auf, welches für alle Flavan-3-ol-Standards charakteristisch ist (siehe Tab. 11) und somit auch die Substanzen (-)-Epicatechin und (+)-Catechin auszeichnet. Folglich handelt es sich bei diesen Substanzen offenbar ebenfalls um Catechinderivate, höchstwahrscheinlich in erster Linie um die in 2.1.4.5 beschriebenen Oligomere von (-)-Epicatechin. 2 dieser Peaks wurden mit „B“ und „C“ gekennzeichnet, und ihre Flächen wurden im Rahmen der laufenden Analytik mit erfasst (Abb. 38). Da Peak „B“ jedoch in vielen Proben mit dem Coffein-Peak zusammenfiel, wurde letztendlich nur die Fläche von „C“ ausgewertet.

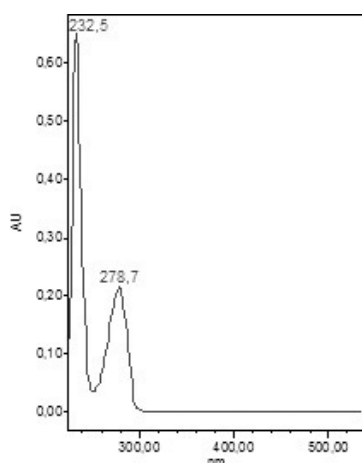


Abb. 39: Absorptionsspektrum von (-)-Epicatechin, (+)-Catechin, den Peaks „B“ und „C“ sowie aller weiteren in Abb. 38 dargestellten, unidentifizierten Peaks (außer „A“)

Im Bereich der Retentionszeit von Protocatechusäure (nach ca. 5-6 Minuten, siehe Tab. 11) tritt in vielen Kakaoproben ein schwach ausgeprägter Peak auf, der ebenfalls ein Maximum bei 278,7 nm besitzt. Möglicherweise handelt es sich hierbei um Spuren des Flavan-3-ols (-)-Epigallocatechin, deren authentische Referenzsubstanz in etwa dieselbe Retentionszeit wie Protocatechusäure aufweist (siehe Tab. 11). Diese Substanz ist jedoch in zu geringen Mengen in den Proben vorhanden, als dass sie mit Hilfe der verwendeten Methoden anhand ihrer Peakfläche sinnvoll quantifiziert werden konnte.

Zur Identifizierung und Auswertung des zunächst mit „A“ gekennzeichneten Peaks siehe Kapitel 4.2.4.

Bei 371,6 nm wurden die untersuchten Polyphenolextrakte frischer Kakaoproben auf ihren Gehalt an Flavonolen überprüft (siehe Abb. 40). Während das Flavonol Quercetin in keiner der untersuchten Kakaoproben gefunden wurde, enthalten alle Proben Spuren zweier Substanzen, die in ihrer Retentionszeit und in ihrem Spektrum den als Standards vorhandenen Quercetin-Glycosiden Quercetin-3-galactosid sowie Quercetin-3-glucosid entsprechen (siehe Tab. 11). Eine Quantifizierung dieser Substanzen erwies sich jedoch aufgrund der äußerst geringen Peakflächen als nicht durchführbar. Zusätzlich wurde bei einer Retentionszeit von ca. 39 min ein weiterer Peak mit ähnlichem Absorptionsspektrum detektiert, der keiner der vorhandenen Standardsubstanzen entspricht (siehe Abb. 40).

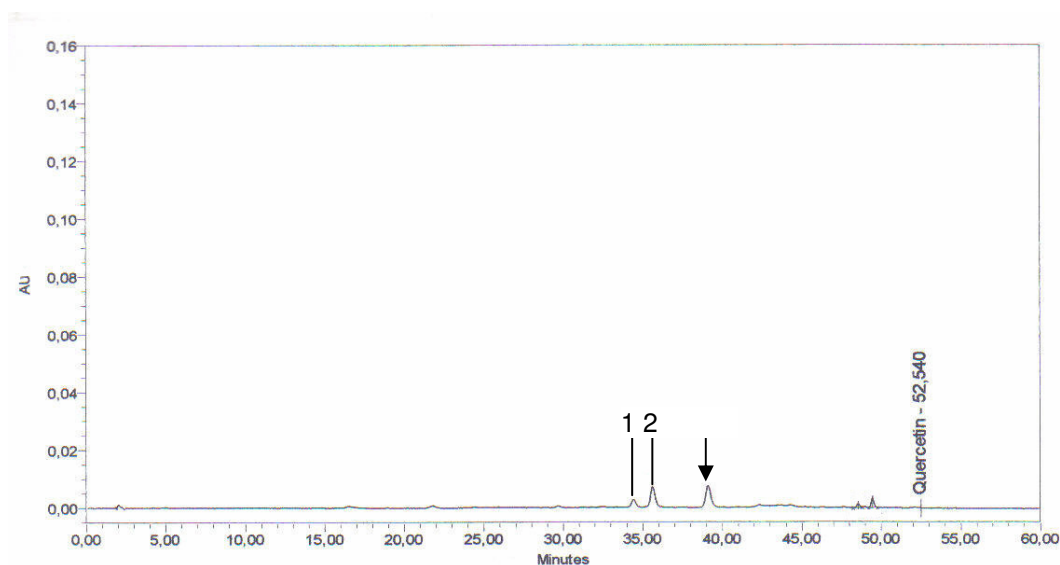


Abb. 40: Chromatogramm der Kakaoprobe G 8 bei 371,6 nm mit Retentionszeit von Quercetin
1: Quercetin-3-galactosid; **2:** Quercetin-3-glucosid;
Pfeil: unbekannte Substanz mit ähnlichem Absorptionsspektrum

Die in den Kakaosextrakten enthaltenen Anthocyane wurden bei $\lambda = 520$ nm identifiziert und quantifiziert. Abgesehen von einigen Proben des Klons Catongo sowie (fast) allen Criollo-Proben enthalten alle untersuchten, reifen und unfermentierten Kakaoproben die beiden Anthocyane 3- α -L-Arabinosidyl-cyanidin und 3- β -D-Galactosidyl-cyanidin (Abb. 41). Daneben wurden in den bei 520 nm aufgezeichneten Chromatogrammen noch 2 weitere, deutlich kleinere Peaks beobachtet (Abb. 41, Pfeile), für die jedoch keine Referenzsubstanzen zur Verfügung standen.

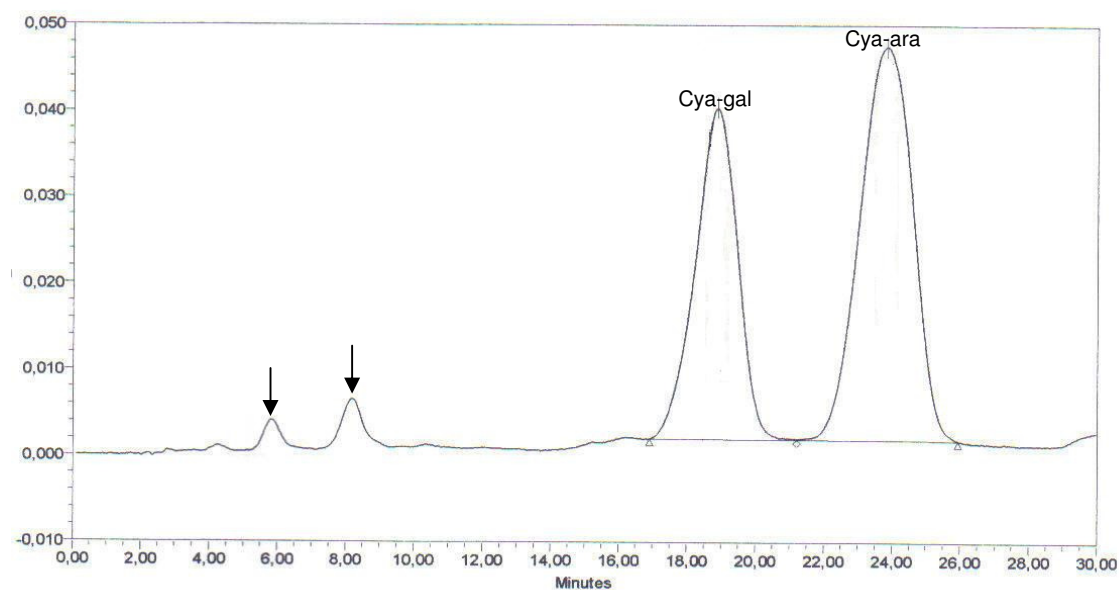


Abb. 41: Chromatogramm der Kakaoprobe G 11 bei 520 nm
Cya-gal: 3- β -D-Galactosidyl-cyanidin; **Cya-ara:** 3- α -L-Arabinosidyl-cyanidin;
Pfeile: unidentifizierte Peaks mit ähnlichem Spektrum

4.2.2.1 Zusammenfassung der qualitativen Polyphenol-Analytik reifer, unfermentierter Kakaosamen per RP-HPLC-PDA

Durch die in 3.11 beschriebene RP-HPLC-PDA Analytik wurden in den untersuchten Polyphenolextrakten aus Kakaosamen folgende Substanzen identifiziert:

- (-)-Epicatechin
- (+)-Catechin
- (-)-Epigallocatechin (Spuren)
- Protocatechusäure (nur in ¼ der untersuchten Proben)
- Quercetin-3-galactosid (Spuren)
- Quercetin-3-glucosid (Spuren)
- 3- β -D-Galactosidyl-cyanidin
- 3- α -L-Arabinosidyl-cyanidin.

Zusätzlich ermöglichte das verwendete RP-HPLC-System die Isolierung einer zunächst mit „A“ gekennzeichneten Substanz, bei welcher es sich um Kaffeesäure-aspartat handelt. Die Identifizierung und Quantifizierung dieses HCAA wird im Kapitel 4.2.4 beschrieben. Außer den phenolischen Substanzen, welche mit Hilfe der oben genannten Methoden oder, im Falle von Kaffeesäure-aspartat, mit zusätzlichen Verfahren identifiziert wurden (siehe 3.13), zeigen die Chromatogramme weitere Peaks phenolischen Ursprungs, deren Absorptionsspektrum sie als Vertreter aus der Gruppe der Catechine bzw. der Procyanidine kennzeichnet. Die Fläche eines dieser Peaks (Substanz „C“) wurde quantitativ ausgewertet und bei den phenolischen Einzelsubstanzen (siehe 4.2.3.4) beschrieben.

4.2.3 Die quantitative Auswertung der phenolischen Inhaltsstoffe

Aus der Gruppe der im vorangehenden Abschnitt aufgeführten und identifizierten phenolischen Einzelsubstanzen in reifen, unfermentierten Kakaosamen wurden von (-)-Epicatechin, (+)-Catechin, 3- β -D-Galaktosidyl-cyanidin, 3- α -L-Arabinosidyl-cyanidin sowie von Protocatechusäure auch die probenspezifischen Gehalte quantitativ ermittelt. Zusätzlich wurde auch die Peakfläche der nicht vollständig identifizierten Substanz „C“ aus der Gruppe der Catechin-Verbindungen erfasst.

Die Werte aus der HPLC-Analytik beziehen sich in den meisten Fällen auf Mischproben des größten Teils der Samen der jeweils untersuchten Kakaofrüchte. Ausschließlich im Falle der Proben aus Venezuela handelt es sich um Messwerte für einzelne Samen. Tab. 26 listet die Werte für die einzelnen untersuchten phenolischen Inhaltsstoffe in mg kg⁻¹ ff TM sowie (im Falle von „C“) in der Peakfläche „Area“ auf.

Per ANOVA mit anschließendem Scheffé-Test wurde eine mögliche Abhängigkeit der Gehalte an den jeweiligen phenolischen Inhaltsstoffen von den verschiedenen

untersuchten genetischen wie proben- und standortsspezifischen Faktoren untersucht. Dabei erfolgte die statistische Untersuchung der Abhängigkeit von den einzelnen Faktoren jeweils ohne die Werte folgender Proben:

1. Ausschluss der Klone T63/967, T79/501 sowie T85/799 aus der Untersuchung der Abhängigkeit von der Kakao-Varietät, da von diesen nur jeweils 2 Proben vorhanden waren.
2. Ausschluss aller Proben aus Venezuela/Chama und /Zea, sowie der Proben aus Ecuador aus der Untersuchung eines möglichen Einflusses der Herkunft, da von diesen Provenienzen jeweils nur maximal 3 Proben untersucht wurden.

4.2.3.3 Der Gehalt an (-)-Epicatechin

Die Werte für (-)-Epicatechin streuen innerhalb der untersuchten Proben breit zwischen dem niedrigsten gemessenen Wert von 11061 mg kg⁻¹ ff TM (T13) und dem höchstem von 45116 mg kg⁻¹ ff TM (T16) (siehe Tab. 26).

Mit dem Gesamt-Polyphenolgehalt der Kakaosamen ist der Gehalt an (-)-Epicatechin tendenziell positiv korreliert (siehe Abb. 42).

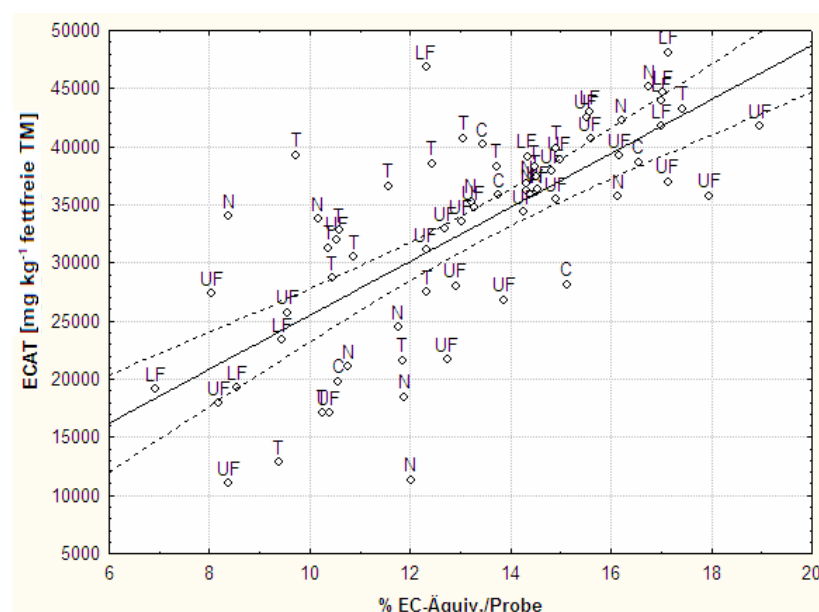


Abb. 42: Korrelation zwischen dem Gesamt-Polyphenolgehalt und dem Gehalt an (-)-Epicatechin
 $x = 2304,4745 + 2320,1501 * x$
 Die Regressionsbänder geben das 95%ige Prognoseintervall an.
 C: Criollo; LF: Lower Amazon Forastero; N: Nacional; T: Trinitario; UF: Upper Amazon Forastero

Per ANOVA konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Kakao-Varietäten bezüglich ihres Gehaltes an (-)-Epicatechin nachgewiesen werden ($F = 1,73$; $p = 0,07$).

Auch von dem jeweiligen Kakaotyp ist der Gehalt an (-)-Epicatechin nicht signifikant abhängig ($F = 0,68$; $p = 0,61$).

Für die durch Literaturangaben bekannten, in Tab. 2 und Tab. 3 aufgeführten, genetisch bedingten Eigenschaften Krankheitsresistenz (hoch/niedrig) sowie Selbst-Kompatibilität (ja/nein) konnte ebenfalls kein statistisch signifikanter Einfluss auf den Gehalt des in den untersuchten Kakaoproben gefundenen (-)-Epicatechins nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zur genetischen Herkunft wurde mit $F = 3,78$ und $p = 0,01$ ein statistisch leicht signifikanter Einfluss der geographischen Herkunft auf den Gehalt an (-)-Epicatechin der untersuchten Kakaoproben festgestellt (Abb. 43).

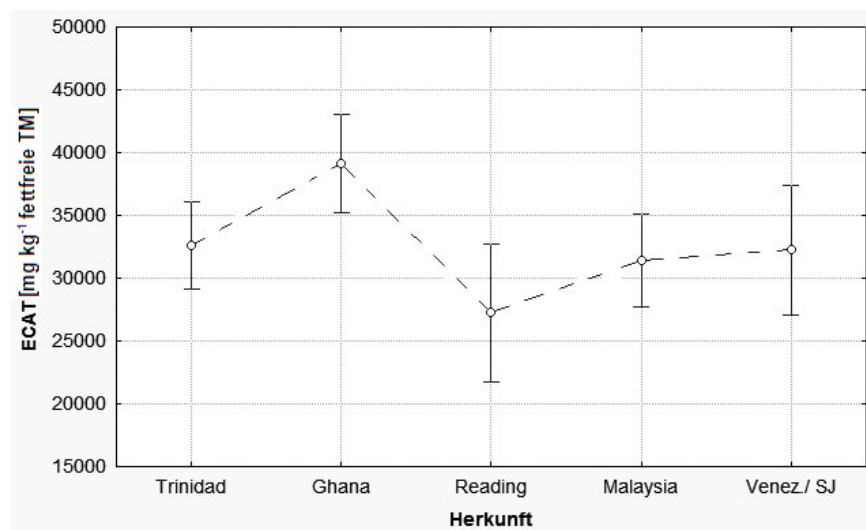


Abb. 43: ANOVA der Abhängigkeit des Gehaltes an (-)-Epicatechin von der Herkunft. Aktueller Effekt: $F = 3,78$; $p = 0,01$; Typ VI Dekomposition (Effektive Hypothese) Die vertikalen Balken kennzeichnen 95%ige Konfidenzintervalle.

Per Scheffé *post hoc*-Test ließen sich die Proben der Herkunftsgebiete „Reading“ und „Ghana“ anhand ihrer (-)-Epicatechingehalte statistisch signifikant voneinander differenzieren (siehe Tab. 12).

Tab. 12: Scheffé-Test der Abhängigkeit des (-)-Epicatechin-Gehaltes von der Herkunft. Homogene Gruppen; $\alpha = 0,05$; Fehler: MQ(Zwischen) = 6037E4; FG = 66

Herkunft	ECAT [mg kg ⁻¹ ff TM] Mittel	1.	2.
Reading	27280	****	
Malaysia	31412	****	****
Venez./ SJ	32279	****	****
Trinidad	32651	****	****
Ghana	39130		****

Mit $F = 15,49$ und $p < 0,005$ erwies sich der Einfluss der Düngung (ja/ nein) auf den Gehalt an (-)-Epicatechin der untersuchten Kakaoproben als deutlich höher signifikant als die Herkunft. Proben von Kakaobäumen, welche von gedüngten Standorten stammten,

wiesen einen niedrigeren Gehalt an (-)-Epicatechin auf als jene ungedüngter Standorte (siehe Abb. 44).

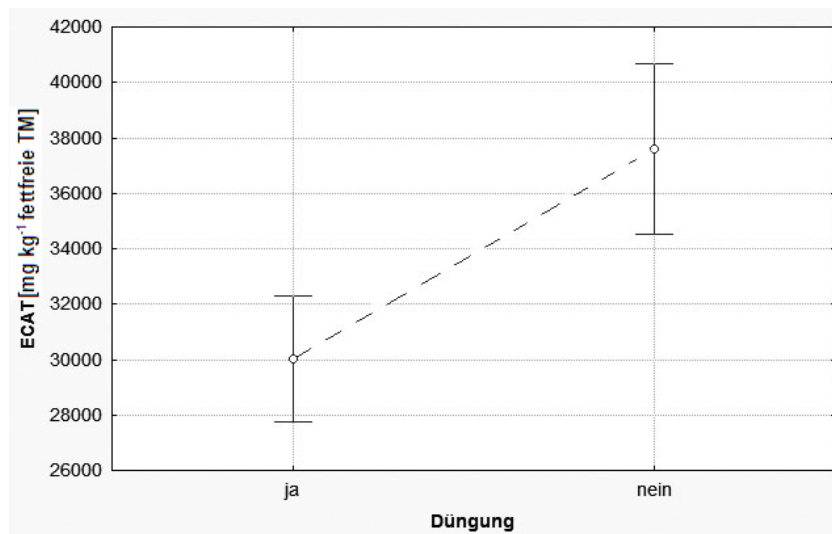


Abb. 44: ANOVA der Abhängigkeit des Gehaltes an (-)-Epicatechin von der Standort-Düngung
 Aktueller Effekt: $F = 15,49$; $p < 0,005$; Typ VI Dekomposition (Effektive Hypothese)
 Die vertikalen Balken kennzeichnen 95%ige Konfidenzintervalle.

Alle weiteren, in Tab. 6 aufgeführten Standortfaktoren der jeweiligen Proben hatten für sich betrachtet keinen statistisch signifikanten Einfluss auf den Gehalt an (-)-Epicatechin der untersuchten Kakaoproben. Weiterhin konnte keines der in Tab. 25 aufgelisteten probenspezifischen Merkmale (Frucht- und Samengewichte sowie Zustand bei Lieferung) in einem statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem Gehalt an (-)-Epicatechin in den reifen, unfermentierten Kakaosamen gebracht werden.

4.2.3.4 Die Auswertung der Peakflächen des mutmaßlichen Procyanidins „C“

Der Gehalt an der Substanz „C“ der untersuchten, reifen Kakaosamen ist leicht positiv korreliert mit jenem an (-)-Epicatechin und auch mit dem in Epicatechin-Äquivalenten angegebenen Gesamt-Polyphenolgehalt (Abb. 45 und 46).

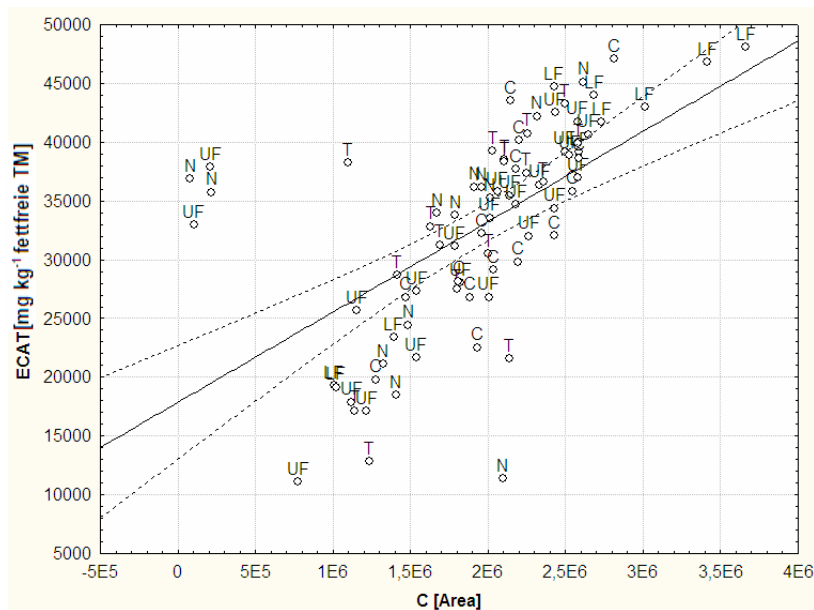


Abb. 45: Korrelation zwischen dem Gehalt an (-)-Epicatechin und „C“
 $y = 17860,7979 + 0,0077 * x$
 Die Regressionsbänder geben das 95%ige Prognoseintervall an.

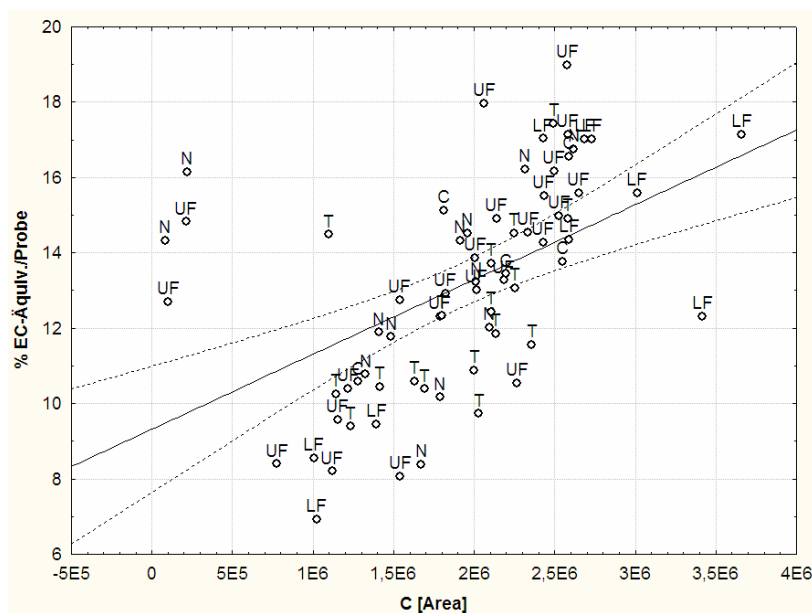


Abb. 46: Korrelation zwischen dem Gesamt-Polyphenolgehalt und „C“
 $y = 9,3171 + 1,9852E - 6 * x$
 Die Regressionsbänder geben das 95%ige Prognoseintervall an.

Anders als der Gehalt an (-)-Epicatechin sowie der Gesamt-Polyphenolgehalt ist der Anteil an „C“ in den untersuchten Proben jedoch nicht statistisch signifikant gekoppelt an die Herkunft ($F = 1,71$; $p = 0,16$) und an die Düngung des Standortes ($F = 1,85$; $p = 0,18$). Dennoch konnte auch hier festgestellt werden, dass Proben ungedüngter Standorte tendenziell höhere Gehalte an „C“ aufwiesen als solche gedüngter Standorte (Abb. 47).

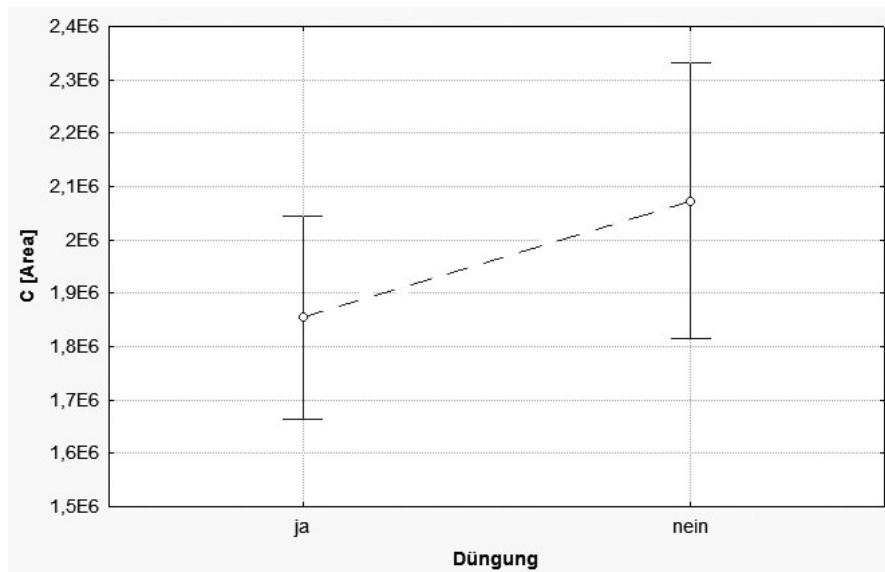


Abb. 47: ANOVA der Abhängigkeit des Gehaltes an „C“ von der Standort-Düngung
 Aktueller Effekt: $F = 1,85$; $p = 0,18$; Typ VI Dekomposition (Effektive Hypothese)
 Die vertikalen Balken kennzeichnen 95%ige Konfidenzintervalle.

Per ANOVA mit anschließendem Scheffé-Test konnten auch keine anderen, statistisch signifikanten Zusammenhänge mit den einzelnen Faktoren von Standort, genetischen und probenspezifischen Merkmalen ermittelt werden.

4.2.3.5 Ergebnisse aus der quantitativen Bestimmung der Anthocyane

Die Gehalte der beiden untersuchten Anthocyane 3- α -L-Arabinosidyl-cyanidin und 3- β -D-Galactosidyl-cyanidin in den Proben frischer, unfermentierter Kakaosamen sind von den untersuchten phenolischen Inhaltsstoffen am stärksten positiv miteinander korreliert (Abb. 48).

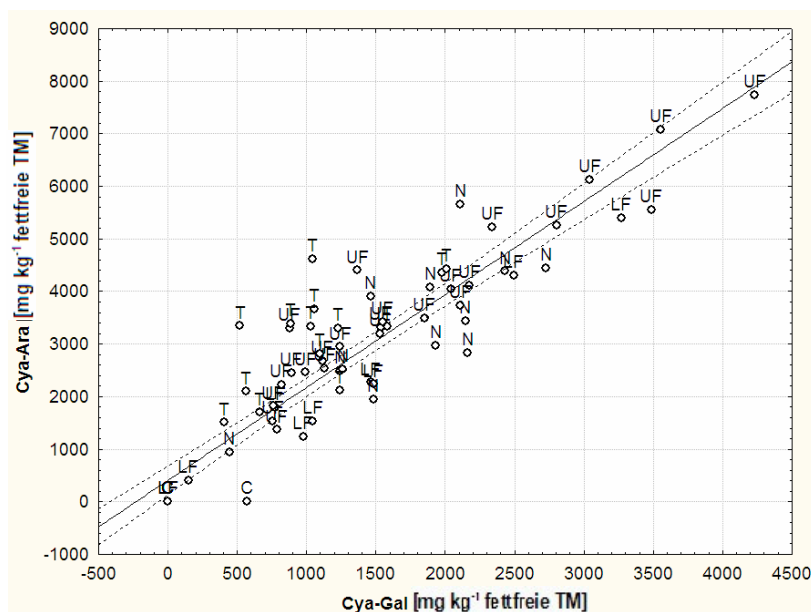


Abb. 48: Korrelation zwischen 3- α -L-Arabinosidyl-cyanidin und 3- β -D-Galactosidyl-cyanidin
 $y = 405,0283 + 1,7687 \cdot x$
 Die Regressionsbänder geben das 95%ige Prognoseintervall an.

Mit den Gehalten an (-)-Epicatechin, sowie „C“ (s. o.) sowie mit dem Gesamt-Polyphenolgehalt der Kakaosamen sind die Anthocyangehalte nur schwach positiv korreliert. Dieses Ergebnis ändert sich auch nicht, wenn solche Proben ausgeschlossen werden, bei denen das Fehlen von Anthocyanen genetisch bedingt ist (s. u.). Korrelationen mit den anderen untersuchten phenolischen Inhaltsstoffen (+)-Catechin, Protocatechusäure, sowie Kaffeesäure-aspartat bestehen nicht.

Im Rahmen der Untersuchung per ANOVA mit anschließendem Scheffé-Test konnte ein signifikanter Einfluss der Varietät auf den Gehalt an Anthocyanen festgestellt werden ($F = 6,58$; $p < 0,005$ für 3- α -L-Arabinosidyl-cyanidin, $F = 5,04$; $p < 0,005$ für 3- β -D-Galactosidyl-cyanidin). Noch deutlicher zeigt sich der genetisch bedingte Einfluss auf den Anthocyangehalt beim Vergleich der einzelnen Kakaotypen ($F = 20,82$; $p < 0,005$ für 3- α -L-Arabinosidyl-cyanidin, $F = 13,89$, $p < 0,005$ für 3- β -D-Galactosidyl-cyanidin; Abb. 49 und 50 sowie Tabellen 13 und 14).

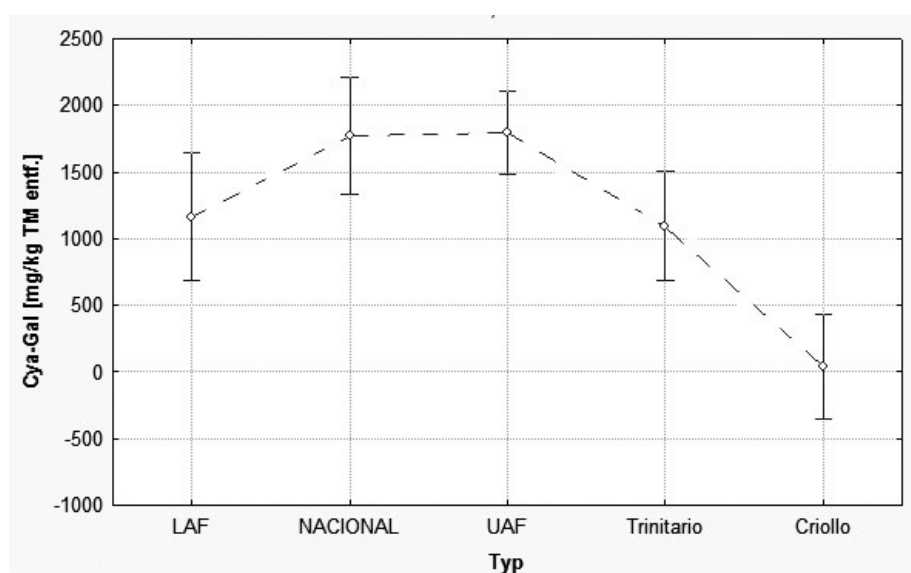


Abb. 49: ANOVA der Abhängigkeit des Gehaltes an 3- β -D-Galactosidyl-cyanidin vom Kakaotyp
Aktueller Effekt: $F = 13,89$; $p < 0,005$; Typ VI Dekomposition (Effektive Hypothese)
Die vertikalen Balken kennzeichnen 95%ige Konfidenzintervalle.

Tab. 13: Scheffé-Test der Abhängigkeit des Gehaltes an 3- β -D-Galactosidyl-cyanidin vom Kakaotyp
Homogene Gruppen; $\alpha = 0,05$; Fehler: MQ(Zwischen) = 5355E2; FG = 67

Typ	Cya-Gal [mg kg ⁻¹ ff TM] Mittel	1.	2.
Criollo	37,93	****	
Trinitario	1094		****
LAF	1644		****
Nacional	1775		****
UAF	1791		****

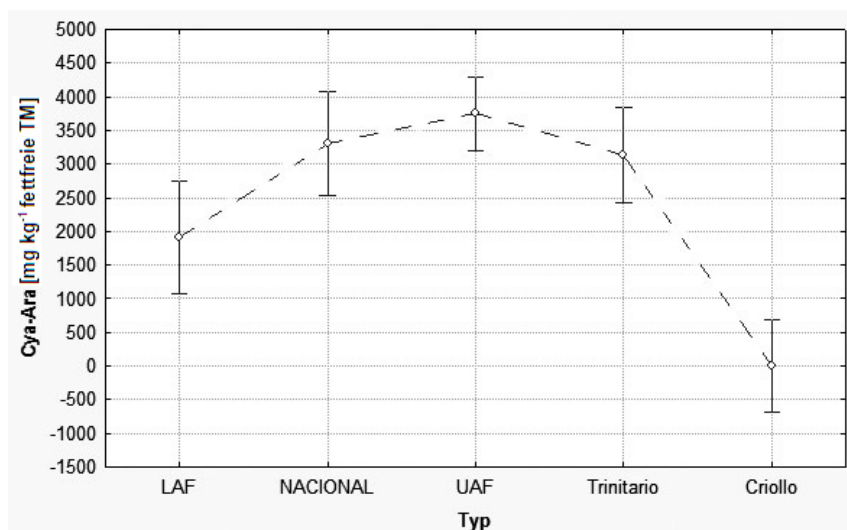


Abb. 50: ANOVA der Abhängigkeit des Gehaltes an 3- α -L-Arabinosidyl-cyanidin vom Kakaotyp
 Aktueller Effekt: $F = 20,82$; $p < 0,005$; Typ VI Dekomposition (Effektive Hypothese)
 Die vertikalen Balken kennzeichnen 95%ige Konfidenzintervalle.

Tab. 14: Scheffé-Test der Abhängigkeit des Gehaltes an 3- α -L-Arabinosidyl-cyanidin vom Kakaotyp
 Homogene Gruppen; $\alpha = 0,05$; Fehler: MQ(Zwischen) = 6037E4; FG = 66

Typ	Cya-Ara [mg kg ⁻¹ ff TM] Mittel	1.	2.	3.
Criollo	0,00	****		
LAF	1916		****	
Trinitario	3141		****	****
Nacional	3303		****	****
UAF	3751			****

Werden die Varietät „Catongo“ als homozygoter Träger des Anthocyan-Inhibitorgens (siehe 2.2.4.1) und der ebenfalls anthocyanfreie Typ „Criollo“ aus dem Probenvergleich ausgeschlossen, können bezüglich des Anthocyan Gehaltes per ANOVA mit anschließendem Scheffé-Test keine signifikanten, typabhängigen Unterschiede zwischen den restlichen untersuchten Kakaoproben festgestellt werden.

Aus der Untersuchung standortspezifischer Faktoren wurden die anthocyanfreien Proben der Varietät „Catongo“ sowie der Typ „Criollo“ ausgeschlossen.

Per ANOVA mit anschließendem Scheffé-Test wurde auch im Falle des Anthocyan Gehaltes der untersuchten Kakaoproben ein signifikanter Einfluss der Herkunft festgestellt. Dabei liegt die Signifikanz dieses Faktors mit $F=11,43$ und $p < 0,005$ für 3- β -D-Galactosidyl-cyanidin sowie $F = 8,26$ und $p < 0,005$ für 3- α -L-Arabinosidyl-cyanidin sogar noch höher als bei dem Gehalt an (-)-Epicatechin (Abb. 51 und Abb. 52). Dabei konnten für beide untersuchten Kakao-Anthocyane die Herkunft „Ghana“ signifikant von

allen anderen untersuchten Herkunftsgebieten unterschieden werden (Tab. 15 und Tab. 16).

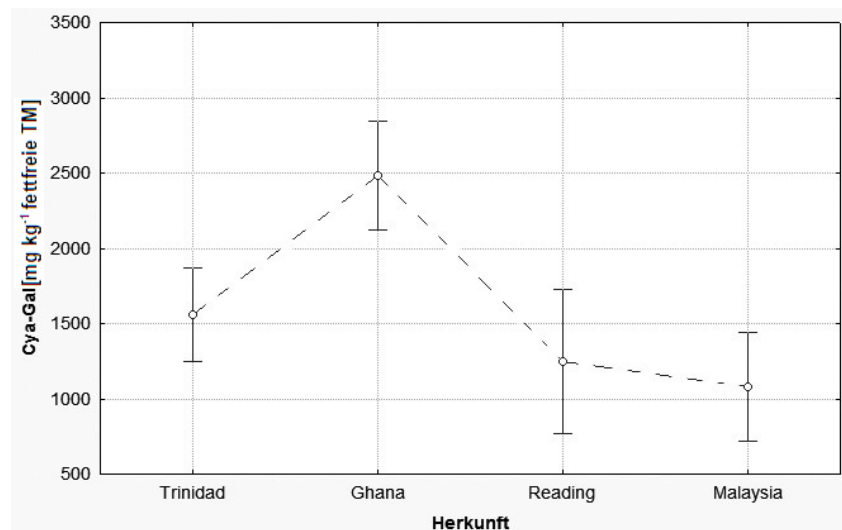


Abb. 51: ANOVA der Abhängigkeit des 3-β-*D*-Galactosidyl-cyanidin-Gehaltes von der Herkunft
Aktueller Effekt: $F = 11,43$; $p < 0,005$; Typ VI Dekomposition (Effektive Hypothese)
Die vertikalen Balken kennzeichnen 95%ige Konfidenzintervalle.

Tab. 15: Scheffé-Test der Abhängigkeit des Gehaltes an 3-β-*D*-Galactosidyl-cyanidin von der Herkunft. Homogene Gruppen; $\alpha = 0,05$; Fehler: MQ(Zwischen) = 1501E3; $FG = 51$

Herkunft	Cya-Gal [mg kg ⁻¹ ff TM] Mittel	1.	2.
Malaysia	1082,47	****	
Reading	1246,16	****	
Trinidad	1558,72	****	
Ghana	2480,80		****

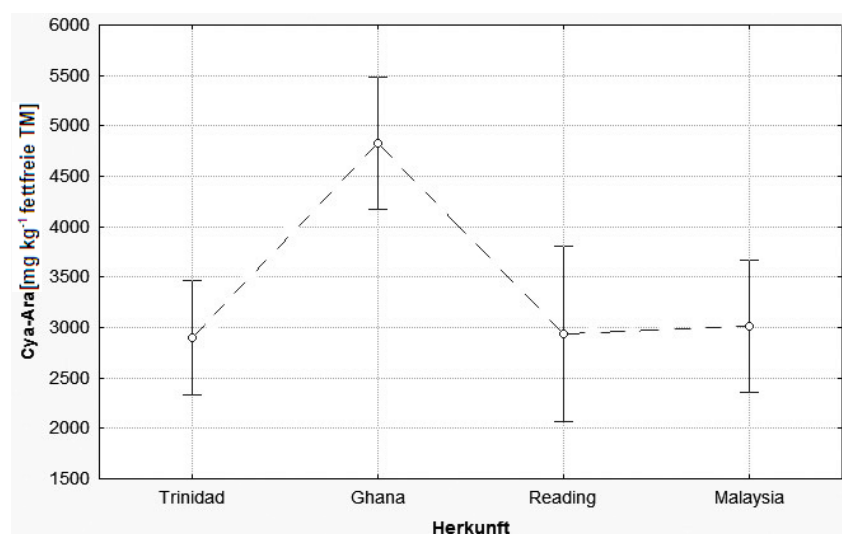


Abb. 52: ANOVA der Abhängigkeit des 3-α-*L*-Arabinosidyl-cyanidin-Gehaltes von der Herkunft
Aktueller Effekt: $F = 8,26$; $p < 0,005$; Typ VI Dekomposition (Effektive Hypothese)
Die vertikalen Balken kennzeichnen 95%ige Konfidenzintervalle.

Tab. 16: Scheffé-Test der Abhängigkeit des 3- α -L-Arabinosidyl-cyanidin-Gehaltes von der Herkunft. Homogene Gruppen; $\alpha = 0,05$; Fehler: MQ(Zwischen) = 1501E3; FG = 51

Herkunft	Cya-Ara [mg kg ⁻¹ ff TM] Mittel	1.	2.
Trinidad	2900,07	****	
Reading	2940,84	****	
Malaysia	3011,08	****	
Ghana	4830,48		****

Innerhalb der untersuchten Proben reifer, unfermentierter Kakaosamen konnte ein hochsignifikanter Einfluss des Faktors „Düngung“ (ja/nein) auf die ermittelten Anthocyangehalte festgestellt werden. Auf ungedüngten Standorten werden somit mehr 3- α -L-Arabinosidyl-cyanidin ($F = 12,40$; $p < 0,005$) sowie 3- β -D-Galactosidyl-cyanidin ($F = 31,14$; $p < 0,005$) in die Kakaosamen eingelagert.

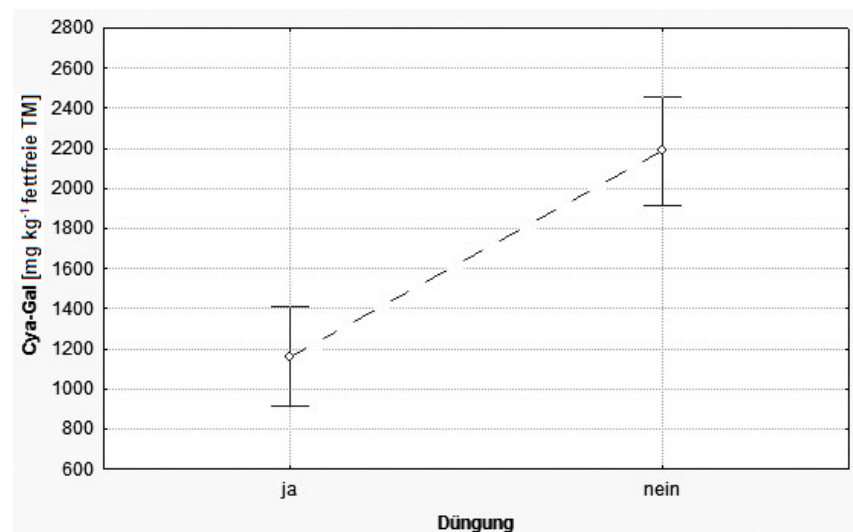


Abb. 53: Einfluss der Düngung auf den Gehalt an 3- β -D-Galactosidyl-cyanidin
Aktueller Effekt: $F = 31,14$; $p < 0,005$; Typ VI Dekomposition (Effektive Hypothese)
Die vertikalen Balken kennzeichnen 95%ige Konfidenzintervalle.

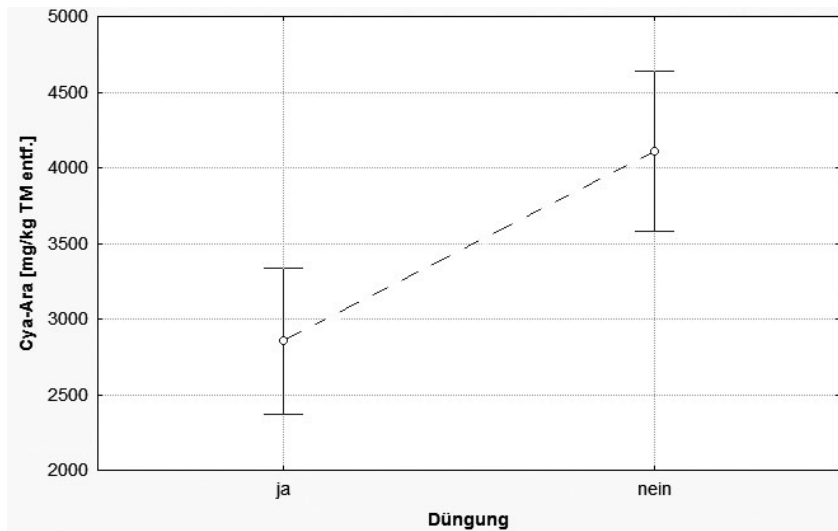


Abb. 54: Einfluss der Düngung auf den Gehalt an 3- α -L-Arabinosidyl-cyanidin
 Aktueller Effekt: $F = 12,40$; $p < 0,005$; Typ VI Dekomposition (Effektive Hypothese)
 Die vertikalen Balken kennzeichnen 95%ige Konfidenzintervalle.

Per ANOVA mit anschließendem Scheffé-Test konnten keine weiteren, statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen den Anthocyangehalten und den Faktoren zu Standort, genetischen und probenspezifischen Merkmalen ermittelt werden.

4.2.3.6 Der Gehalt an (+)-Catechin

Innerhalb der untersuchten Proben reifer, unfermentierter Kakaosamen schwankt der ermittelte Gehalt an (+)-Catechin sehr stark zwischen 0 und maximal 2254 mg kg^{-1} ff TM (Tab. 26). Interessanterweise kommen gerade diese beiden Extremwerte bei Proben des Typs „Criollo“ vor, welche somit gleichzeitig die Samen mit den niedrigsten wie auch mit den höchsten Gehalten an (+)-Catechin stellen. Der Gehalt an (+)-Catechin schwankt jedoch auch innerhalb der anderen untersuchten Kakaotypen und der Varietäten sehr stark. Folglich wurde per ANOVA mit anschließendem Scheffé-Test auch keine signifikante Abhängigkeit des (+)-Catechingehaltes vom Kakaotyp oder von der Varietät gefunden. Gleiches gilt auch für alle standort- und probenspezifischen Faktoren (siehe Tabellen 2, 3 und Tab. 25). Eine Korrelation von (+)-Catechin mit einer der anderen quantitativ untersuchten phenolischen Substanzen konnte in den untersuchten Proben ebenfalls nicht festgestellt werden.

4.2.3.7 Der Gehalt an Protocatechusäure

Auch das Auftreten von Protocatechusäure in den untersuchten Proben reifer, unfermentierter Kakaosamen ist mit keiner der anderen quantitativ untersuchten phenolischen Substanzen bzw. mit dem Gesamt-Polyphenolgehalt positiv oder negativ korreliert. Ferner wurden keine statistisch signifikanten Zusammenhänge mit einem der anderen in den Tabellen 2, 3 und Tab. 25 aufgeführten Faktoren gefunden.

4.2.4 Analyse der HCAA in frischen, reifen Kakaoproben

Eine Übersicht der bisher aus Kakao isolierten Hydroxycimtsäureamide (im Folgenden abgekürzt mit dem für diese Stoffgruppe häufig genutzten Kürzel „HCAA“ (Hydroxycinnamic Acid Amides)) sowie eine ausführliche Beschreibung dieser Gruppe findet sich in Kapitel 2.1.2.5.

4.2.4.1 Untersuchung von Extrakten frischer Kakaosamen auf Clovamid

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte HPLC-PDA-Methode stand von den bisher wissenschaftlich beschriebenen HCAA aus Kakaosamen als einzige Referenzsubstanz das Clovamid (Caffeoyl-*L*-DOPA) zur Verfügung (siehe Tab. 8).

Unter den in 3.11 beschriebenen Bedingungen wird das Clovamid nach einer Retentionszeit von etwa 23 min eluiert (Abb. 55). Es weist ein Absorptionsmaximum von $\lambda = 321,6$ nm auf.

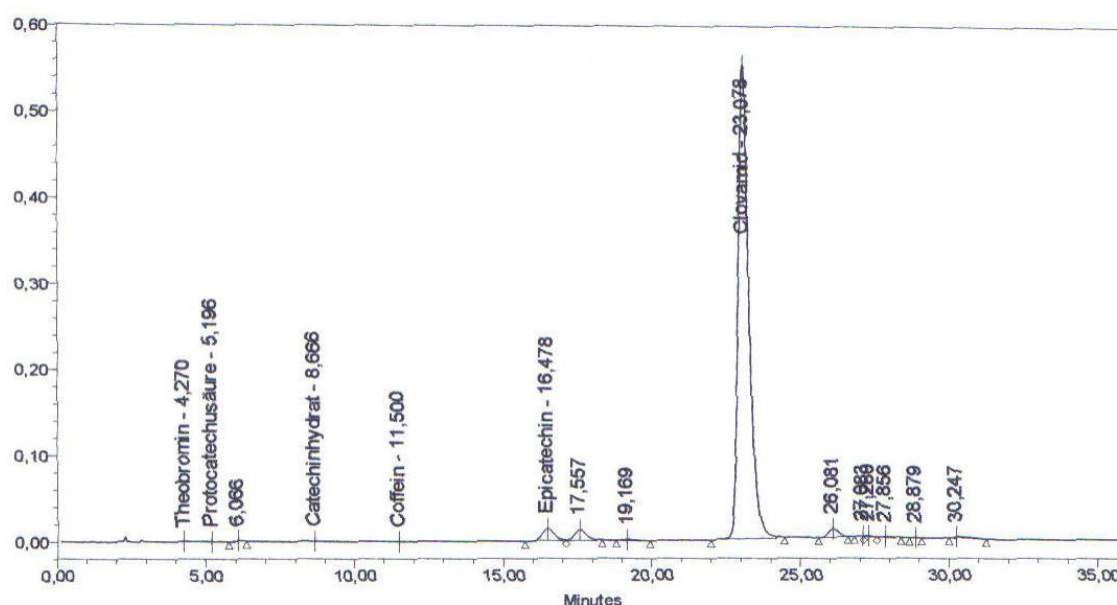


Abb. 55: Chromatogramm der Referenzsubstanz Clovamid (Pfeil) bei 280 nm

In den Chromatogrammen der untersuchten Kakaoproben erscheint nach einer Retentionszeit von etwas mehr als 23 min ebenfalls ein Peak (Abb. 38). Dieser besitzt jedoch ein Absorptionsmaximum von 279,9 nm. Demnach handelt es sich bei dieser Fraktion nicht um Clovamid, sondern wahrscheinlich um ein nicht genauer identifiziertes Catechinderivat (siehe 4.2.2).

Das HCAA Clovamid wurde daher in keiner der für die vorliegende Arbeit untersuchten Kakaoproben nachgewiesen.

4.2.4.2 Die Identifizierung der Fraktion „A“

Mit dem in 3.11 beschriebenen HPLC-Verfahren wurde aus fast allen untersuchten Proben frischer, reifer Kakaosamen eine Fraktion isoliert, die mit keiner der in Tab. 8

aufgelisteten Referenzsubstanzen übereinstimmte und hier mit „A“ gekennzeichnet wird (siehe Abb. 38).

Die Substanz „A“ wies eine Retentionszeit von ca. 6,8 min auf. Ihr Spektrum mit einem Absorptionsmaximum bei etwa 320,4 nm glich jenem der Referenzstandards von Chlorogensäure und Clovamid (Abb. 56).

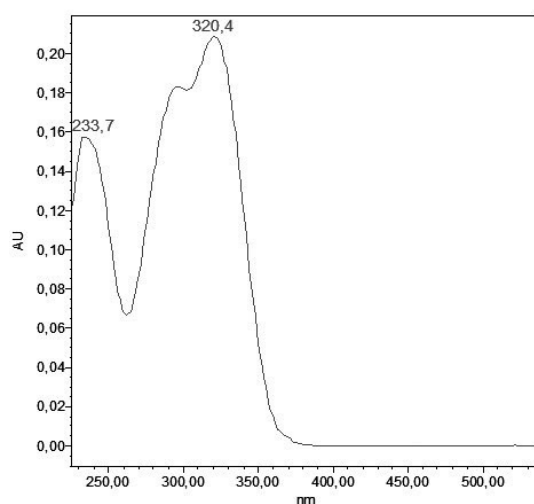


Abb. 56: Spektrum der Substanz „A“ unter den in 3.11 beschriebenen Analysebedingungen

Durch eine von ThermoFinnigan (Egelsbach) durchgeführte HPLC/MS-Analyse (siehe 3.13) wurden folgende Eigenschaften der Fraktion „A“ zusätzlich ermittelt:

1. Die isolierte Substanz weist ein Molekulargewicht von ca. 295 g mol^{-1} auf (Abb. 57, Fragment 294).
2. Vergleichbar mit Chlorogensäure und Clovamid handelt es sich um eine Verbindung mit Kaffeesäure (Abb. 57, Fragment 179).
3. Das von der Kaffeesäure abgespaltene Fragment besitzt ein Molekulargewicht von ca. 133 g mol^{-1} (Abb. 57, Fragment 132). Es besitzt das Spaltungsmuster einer Substanz, die sowohl einen Aminorest (NH_3^+) als auch einen Carboxylrest (COO^-) besitzt (Abb. 58). Es handelt sich demnach offenbar um eine Aminosäure.

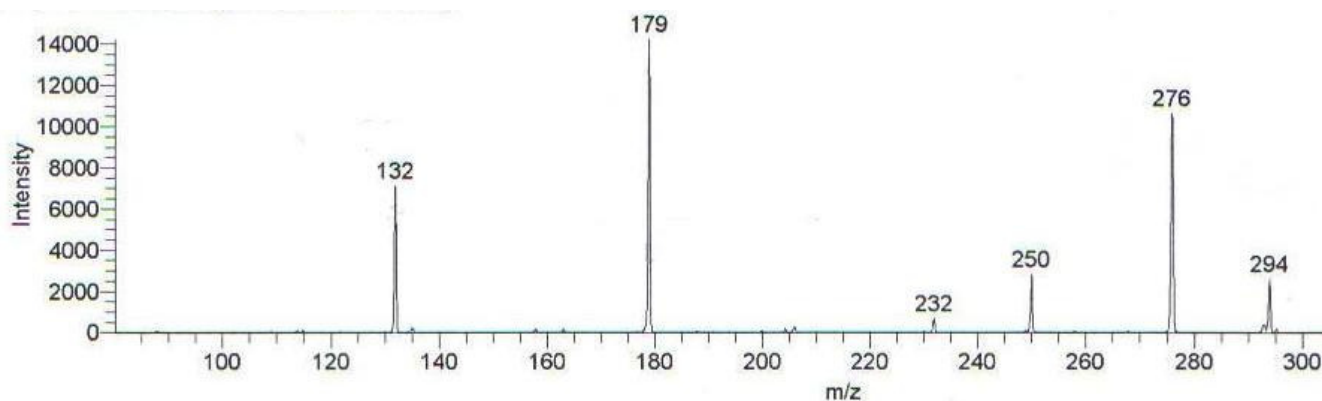


Abb. 57: MS-Spaltungsmuster der Substanz „A“

Fragment 132: von Kaffeesäure abgespaltenes Fragment insgesamt ($\hat{=} 132+1 \text{ g mol}^{-1}$)

Fragment 179: Kaffeesäure ($\hat{=} 179+1 \text{ g mol}^{-1}$)

Fragment 276: Molekül insgesamt – H_2O ($\hat{=} 295-1-18 \text{ g mol}^{-1}$)

Fragment 294: Molekulargewicht des gesamten Fragments ($\hat{=} 295-1 \text{ g mol}^{-1}$)

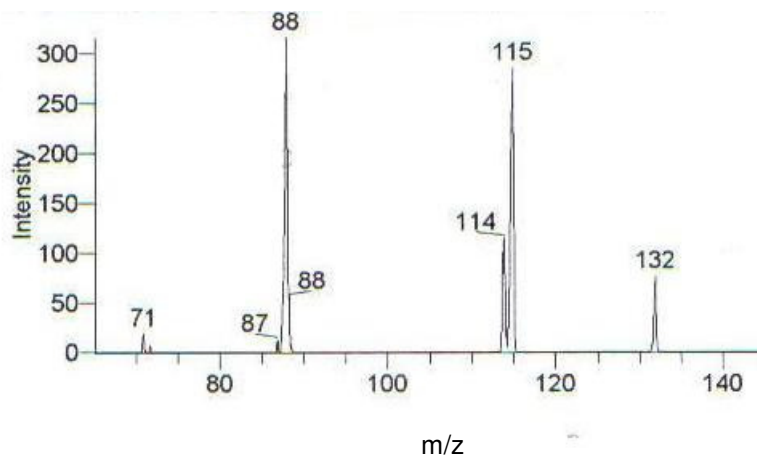


Abb. 58: MS-Spaltungsmuster des von Kaffeesäure abgespaltenen Fragments
Fragment 88: Kopplungsprodukt zweier Carboxylgruppen ($\Delta 44 \text{ g mol}^{-1} \times 2$)
Fragment 115: gesamtes Fragment - NH_3^+ ($\Delta 133-17 \text{ g mol}^{-1}$)
Fragment 132: Fragment insgesamt ($132+1 \text{ g mol}^{-1}$)

Nachdem der Hydroxyzimtsäure-Rest der untersuchten Fraktion „A“ durch die Analytik von ThermoFinnigan eindeutig als Kaffeesäure identifiziert wurde, blieb die Identität des daran gebundenen Moleküls noch ungeklärt. Aufgrund der oben zusammengefassten Eigenschaften dieses Moleküls gab es jedoch deutliche Hinweise darauf, dass es sich bei diesem Fragment um Aspartat bzw. Asparaginsäure (Asp) handelte. Aspartat besitzt alle Eigenschaften, über die laut der Analytik von ThermoFinnigan auch das gesuchte Fragment verfügte: Wie alle Aminosäuren enthält sie eine Amino- sowie eine Carboxylgruppe. Außerdem weist sie als einzige Aminosäure ein Molekulargewicht von $133,10 \text{ g mol}^{-1}$ auf, welches mit jenem des von der Kaffeesäureverbindung abgespaltenen Fragments identisch ist.

Die Vermutung, dass es sich bei der Fraktion „A“ um eine Verbindung zwischen Kaffeesäure und Aspartat handelte, wurde bestätigt nach einem Vergleich von Spektrum und Retentionszeit mit einer am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Münster (Arbeitsgruppe Hofmann) vorhandenen Referenzsubstanz. Die Substanz erwies sich als identisch mit (+)-*N*-(*E*)-Caffeoyl-*L*-aspartat (Kaffeesäure-aspartat; Abb. 59).

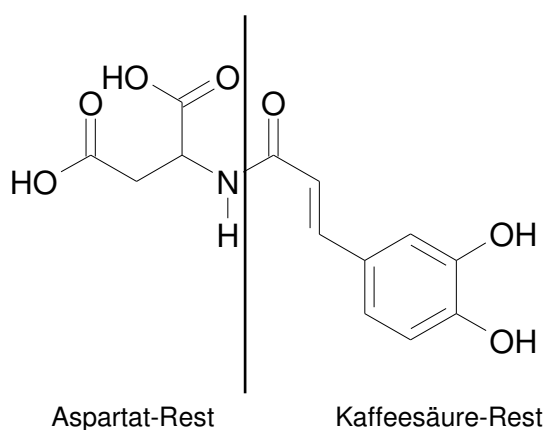
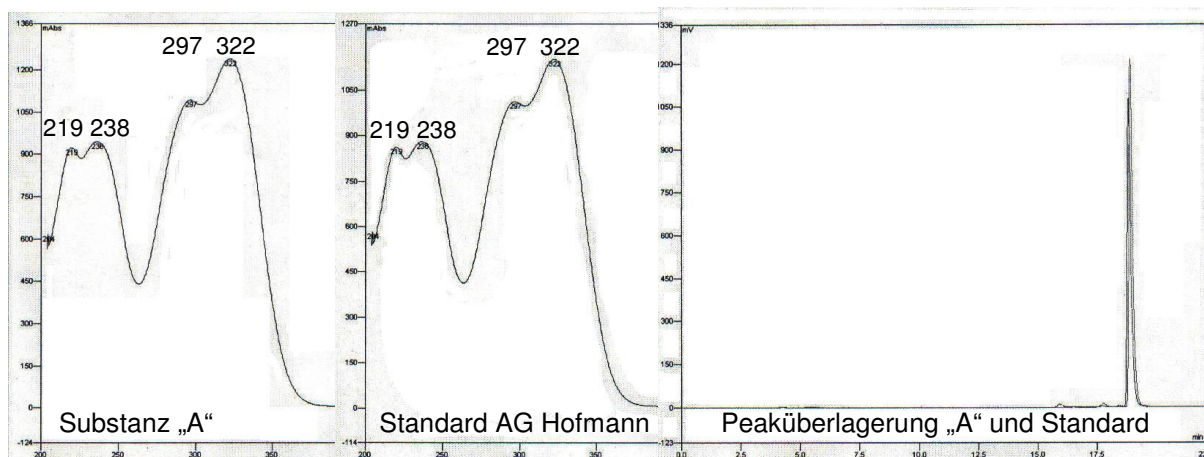


Abb. 59: Spektrum, Retentionszeit und molekulare Struktur von (+)-*N*-(*E*)-Caffeoyl-*L*-aspartat ($C_{13}H_{13}NO_7$, $295,25 \text{ g mol}^{-1}$)

Da Kaffeesäure-aspartat bisher als Referenzsubstanz nicht kommerziell erwerbbar ist, wurde ihr quantitativer Gehalt in den untersuchten Kakaoproben, wie in Kapitel 3.13 beschrieben, auf Basis der Absorptionseigenschaften der Referenzsubstanz Chlorogensäure ermittelt (siehe 3.13).

Auf diese Weise wurden in Proben frischer Kakaosamen Gehalte dieser Substanz zwischen $56,25$ und 6546 mg kg^{-1} entfettete Kakao-Trockenmasse ermittelt (Anhang, Tab. 26).

4.2.4.3 Die statistische Auswertung der Gehalte an Kaffeesäure-aspartat

Der Gehalt an Kaffeesäure-aspartat ist weder positiv noch negativ mit dem Gehalt einer der anderen, in der vorliegenden Arbeit in Kakao quantifizierten phenolischen Substanzen, bzw. mit dem Gesamtgehalt korreliert. Ebenfalls liegen keine Korrelationen mit den ermittelten Standortfaktoren oder den probenspezifischen Parametern vor. Der Gehalt an Kaffeesäure-aspartat ist somit weder abhängig von der Anzahl und dem Gewicht der Samen je Frucht noch von dem Fruchtgewicht (Tab. 17).

Tab. 17: Korrelationsmatrix für Kaffeesäure-aspartat [mg kg^{-1} ff TM]
Keine der Korrelationen ist signifikant für $p < 0,05$

	Kaffeesäure-aspartat [mg kg^{-1} ff TM]
PCA [mg kg^{-1} ff TM]	0,02
CAT [mg kg^{-1} ff TM]	-0,09
ECAT [mg kg^{-1} ff TM]	0,35
CAT +ECAT [mg kg^{-1} ff TM]	0,02
C [Area]	0,24
Cya-Gal [mg kg^{-1} ff TM]	-0,34
Cya-Ara [mg kg^{-1} ff TM]	0,20
EC-Äquiv./Probe [%]	0,22
alle quant PP [mg kg^{-1} ff TM]	0,41
m ü. NN	0,47
Schattenbäume ha^{-1}	0,47
Kakaobäume ha^{-1}	-0,47
Jahresniederschlag [mm/m^2]	0,47
Durchschnittstemperatur [$^{\circ}\text{C}$]	0,47
Relative Luftfeuchtigkeit [%]	-0,47
F Gewicht [g]	-0,34
n intakte Samen	-0,43
TG 100 Samen $^{-1}$ [g]	0,24

Der Gehalt des in den untersuchten Proben frischer Kakaosamen nachgewiesenen Kaffeesäure-aspartats ist signifikant abhängig von dem untersuchten Kakaotyp (F = 10,77; $p < 0,005$). Hierbei unterscheiden sich die Proben des Typs „Criollo“ signifikant von allen anderen untersuchten Kakaoproben (Abb. 60).

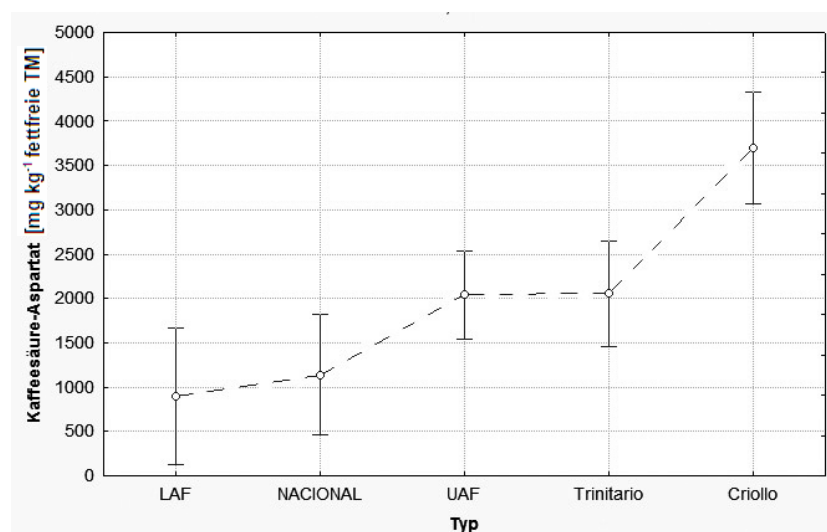


Abb. 60: ANOVA des Kaffeesäure-aspartat-Gehaltes in Abhängigkeit vom Kakao-Typ
Aktueller Effekt: F=12,43; $p < 0,005$; Typ VI Dekomposition (Effektive Hypothese)

Vertikale Balken kennzeichnen 95%ige Konfidenzintervalle.

Aufgrund des signifikanten Unterschiedes der Criollo-Proben von den anderen untersuchten Kakaotypen in ihren Gehalten an Kaffeesäure-aspartat wurden die Proben dieses Typs aus der Untersuchung der Standortfaktoren ausgeschlossen.

Mit $F = 12,42$ und $p < 0,005$ wurde ein signifikanter Einfluss der Herkunft auf den Gehalt an Kaffeesäure-aspartat in den Kakaoproben ermittelt. Dabei unterschieden sich die Gewächshauskulturen von Reading signifikant von allen anderen beprobten Standorten (Abb. 61).

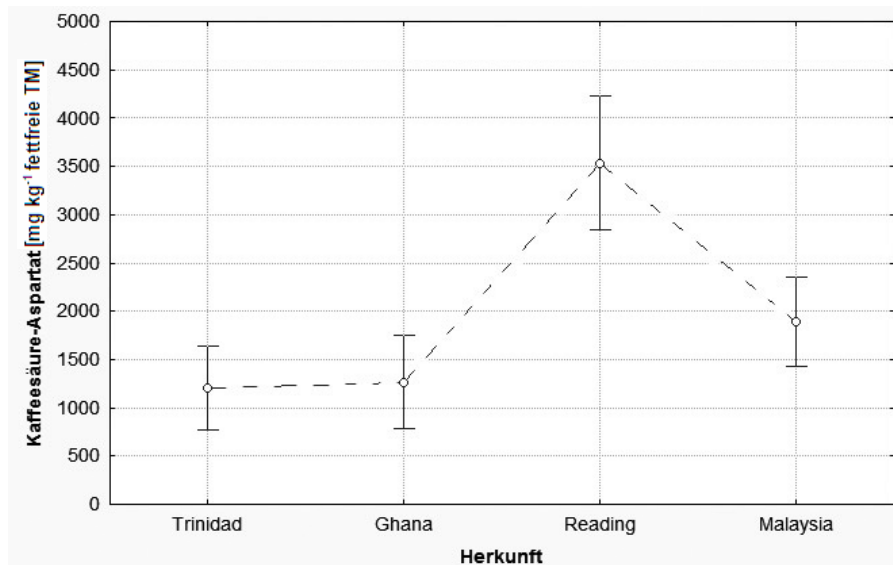


Abb. 61: ANOVA des Kaffeesäure-aspartat-Gehaltes in Abhängigkeit von der Herkunft der Kakaoprobe (alle reifen Proben ohne Criollos und Ecuador)
 Aktueller Effekt: $F = 12,42$; $p < 0,005$; Typ VI Dekomposition (Effektive Hypothese)
 Die vertikalen Balken kennzeichnen 95%ige Konfidenzintervalle.

Aufgrund des sehr signifikanten Unterschiedes zwischen der Reading und den anderen beprobten Herkünften wurden die einzelnen untersuchten Standortfaktoren auf eine mögliche Bedeutung für den HCAA-Gehalt untersucht. So wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Kaffeesäure-aspartat und dem Standortfaktor „Düngung“ ermittelt ($F = 8,66$; $p < 0,005$). Kakaosamen von gedüngten bzw. gut mit Stickstoff versorgten Böden wiesen einen höheren Gehalt an dem HCAA auf (Abb. 62). Auch nach Ausschluss des Standortes Reading aus der statistischen Analyse wurden noch höhere Werte für Kaffeesäure-aspartat in Proben auf gedüngten Standorten gefunden, obwohl diese Unterschiede nicht signifikant waren ($F = 2,99$; $p = 0,09$).

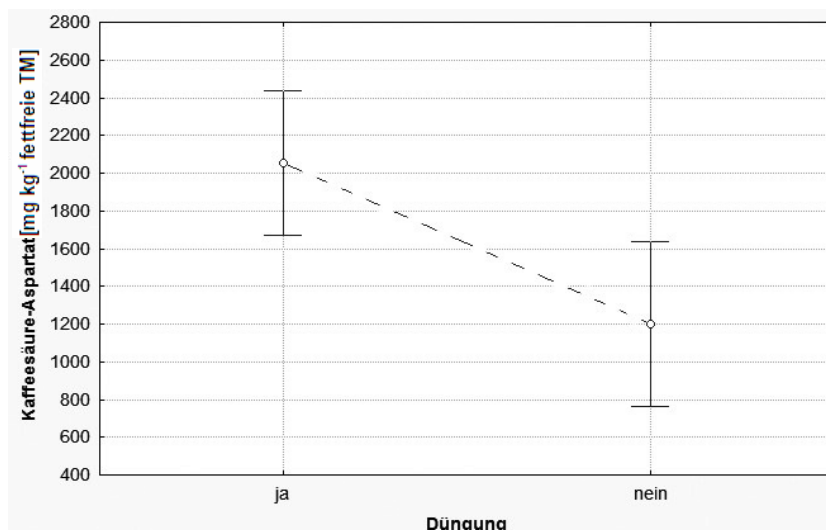


Abb. 62: ANOVA des Kaffeesäure-aspartat-Gehaltes im Kakaosamen in Abhängigkeit von der Standortdüngung (alle reifen Proben ohne Criollos)
 Aktueller Effekt: $F = 8,66$; $p < 0,005$; Typ VI Dekomposition (Effektive Hypothese)
 Die vertikale Balken kennzeichnen 95%ige Konfidenzintervalle.

Für alle weiteren Standortfaktoren, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelt wurden (Jahresniederschlag und -durchschnittstemperatur, relative Luftfeuchtigkeit, Höhe des Standortes über NN, Anzahl der Schattenbäume ha^{-1} sowie Pflanzdichte der Kakaobäume) wurde kein signifikanter Einfluss auf den Gehalt an Kaffeesäure-aspartat nachgewiesen.

4.3 Die Degradation der Polyphenole durch saure Hydrolyse mit 0,1 mol/l bzw. 1 mol/l HCl

In den Chromatogrammen des mittels der in 3.12 beschriebenen sauren Hydrolysen vorbehandelten phenolischen Extrakt aus Kakaosamen treten bei einer Wellenlänge von 280 nm etliche neue Peaks geringer Fläche auf, die keinem der in Tab. 8 aufgeführten Standards entsprechen. Gleichzeitig kommt es zu deutlichen Veränderungen in den Gehalten der im nicht-hydrolysierten Kakaoextrakt vorhandenen phenolischen Inhaltsstoffe.

Das mengenmäßig dominierende (-)-Epicatechin geht nach der Behandlung mit 0,1 mol/l HCl auf 80,54 % des ursprünglichen Gehaltes zurück; nach der Hydrolyse mit 1 mol/l HCl sind nur noch 17,74 % des Ausgangsgehaltes vorhanden (Abb. 63). Gleichzeitig steigt der Catechingehalt deutlich an. Er erreicht bereits gut das 10-fache des ursprünglichen Wertes nach der Behandlung mit 0,1 mol/l HCl; sowie nahezu den 20-fachen Wert nach der Inkubation mit 1 mol/l HCl (Abb. 63).

Besonders stark geht nach der sauren Hydrolyse der Gehalt des mutmaßlichen Procyanidins „C“ zurück. Von dieser phenolischen Substanz sind bereits nach der Behandlung mit 0,1 mol/l HCl nur noch 4,12 % des ursprünglichen Gehaltes vorhanden. Nach der sauren Hydrolyse mit 1 mol/l HCl senkt sich der Gehalt auf 0,27 % des Ausgangswertes ab (Abb. 63).

Auch das Kaffeesäure-aspartat wird durch die saure Hydrolyse degradiert. Bei der Inkubation mit 0,1 mol/l HCl ist sein Gehalt jedoch fast stabil und liegt anschließend noch bei 98,03 % des Gehaltes aus unbehandeltem Kakaoextrakt. Nach der sauren Hydrolyse mit 1 mol/l HCl wurden jedoch nur noch 30,19 % des ursprünglichen Gehaltes gemessen (Abb. 63).

Im Gegensatz dazu steigt der Gehalt an Protocatechusäure nach der sauren Hydrolyse an; und zwar auf 180,71 % des Ausgangsgehaltes nach der Behandlung mit 0,1 mol/l HCl, sowie auf 280,57 % nach der Inkubation mit 1 mol/l HCl (Abb. 63).

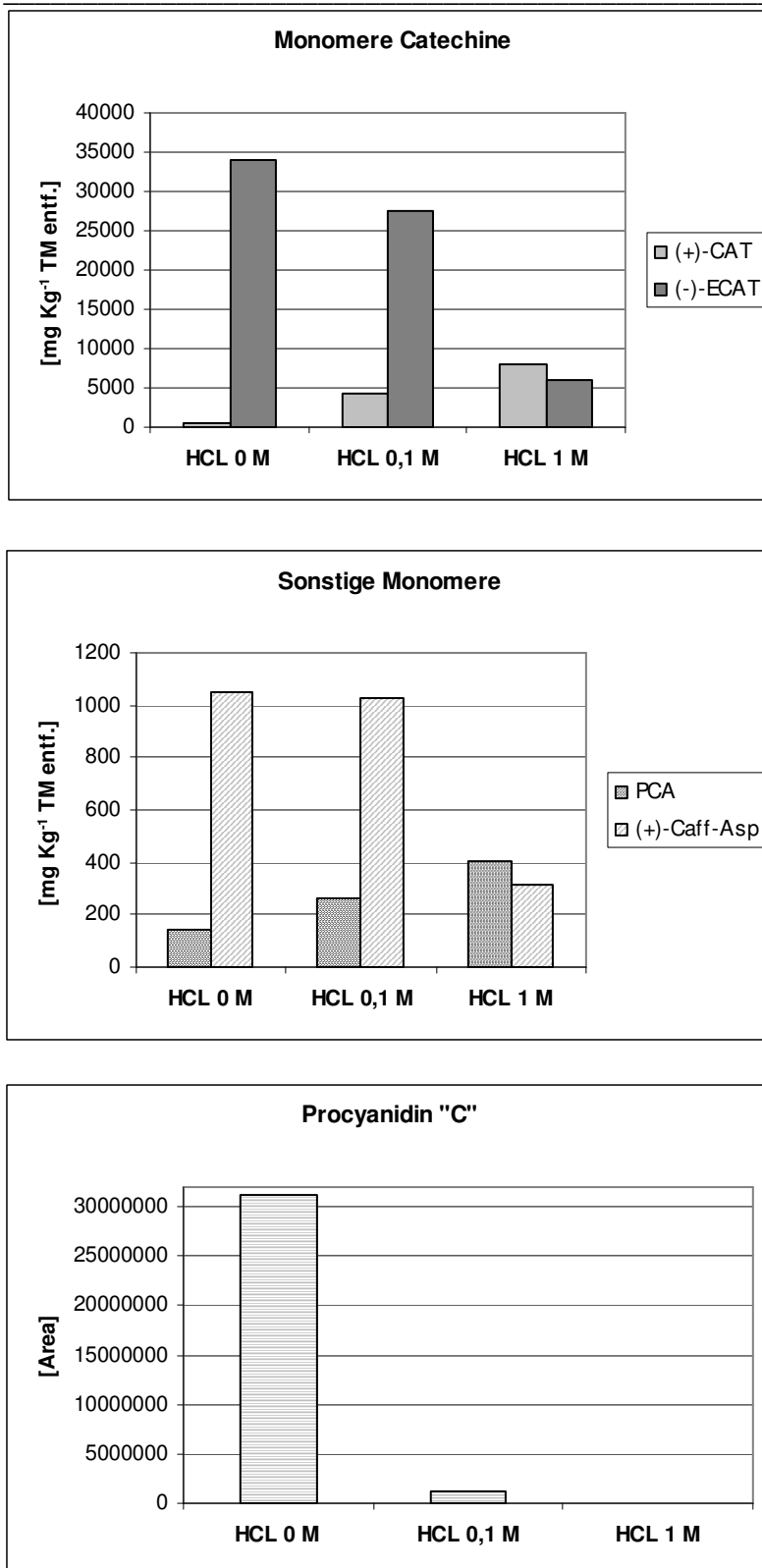


Abb. 63: Veränderung der Gehalte einzelner phenolischer Kakao-Inhaltsstoffe nach saurer Hydrolyse

4.4 Ergebnisse aus der Analyse der Reifestadien

In den Chromatogrammen der untersuchten Proben definierten Reifestadien der Klone ICS 95 und bei EET 95 traten neben den auch in reifen Samen detektierten Substanzen

keine weiteren, in der Retentionszeit und/oder im Spektrum abweichenden Peaks phenolischer Inhaltsstoffe auf.

Abb. 64 zeigt die Entwicklung des Gesamtphenolgehaltes sowie der einzelnen phenolischen Inhaltsstoffe in Abhängigkeit vom Entwicklungszeitpunkt (angegeben in Tagen nach der Bestäubung). Demnach steigen die Werte für den Gesamt-Polyphenolgehalt sowie für die einzelnen phenolischen Inhaltsstoffe beim Klon EET 95 zwischen den Stadium von 104 Tagen nach der Bestäubung und jenem von 146 Tagen nach der Bestäubung deutlich an, um 160 Tage nach der Bestäubung wieder erheblich unter diesen Maximalwerten zu liegen. So besitzen die untersuchten Stadien von EET 95 104 Tage nach der Bestäubung mit 4,56 % /ff TM schon etwa 1/3 des Gesamt-Polyphenolgehaltes des Stadiums 146 Tage nach der Bestäubung (gut 13,1 %). Im Falle von (-)-Epicatechin wurde 104 Tage nach der Bestäubung ein Gehalt von 7509,24 mg kg⁻¹ ff TM gemessen. 125 Tage nach der Bestäubung liegt der Wert mit 6122,12 mg kg⁻¹ ff TM sogar etwas darunter und steigt dann innerhalb von 20 Tagen auf 28839,18 mg kg⁻¹ ff TM. Die letzte Probe vom Zeitpunkt von 160 Tagen nach der Bestäubung enthält dann wieder einen geringeren Wert von 18449,31 mg kg⁻¹ ff TM.

Im Falle des Klons ICS 95 ist das älteste Reifestadium (175 Tagen nach der Bestäubung) auch jenes mit dem höchsten ermittelten Gesamt-Polyphenolgehalt sowie jenem der ermittelten phenolischen Einzelsubstanzen (Abb. 64). Auffällig ist im Falle der Proben dieses Klons, dass 125 Tage nach der Bestäubung noch keine phenolischen Monomere per HPLC/MS nachgewiesen werden konnten, sehr wohl aber bereits ein geringer Gesamt-Polyphenolgehalt von 1,71 %.

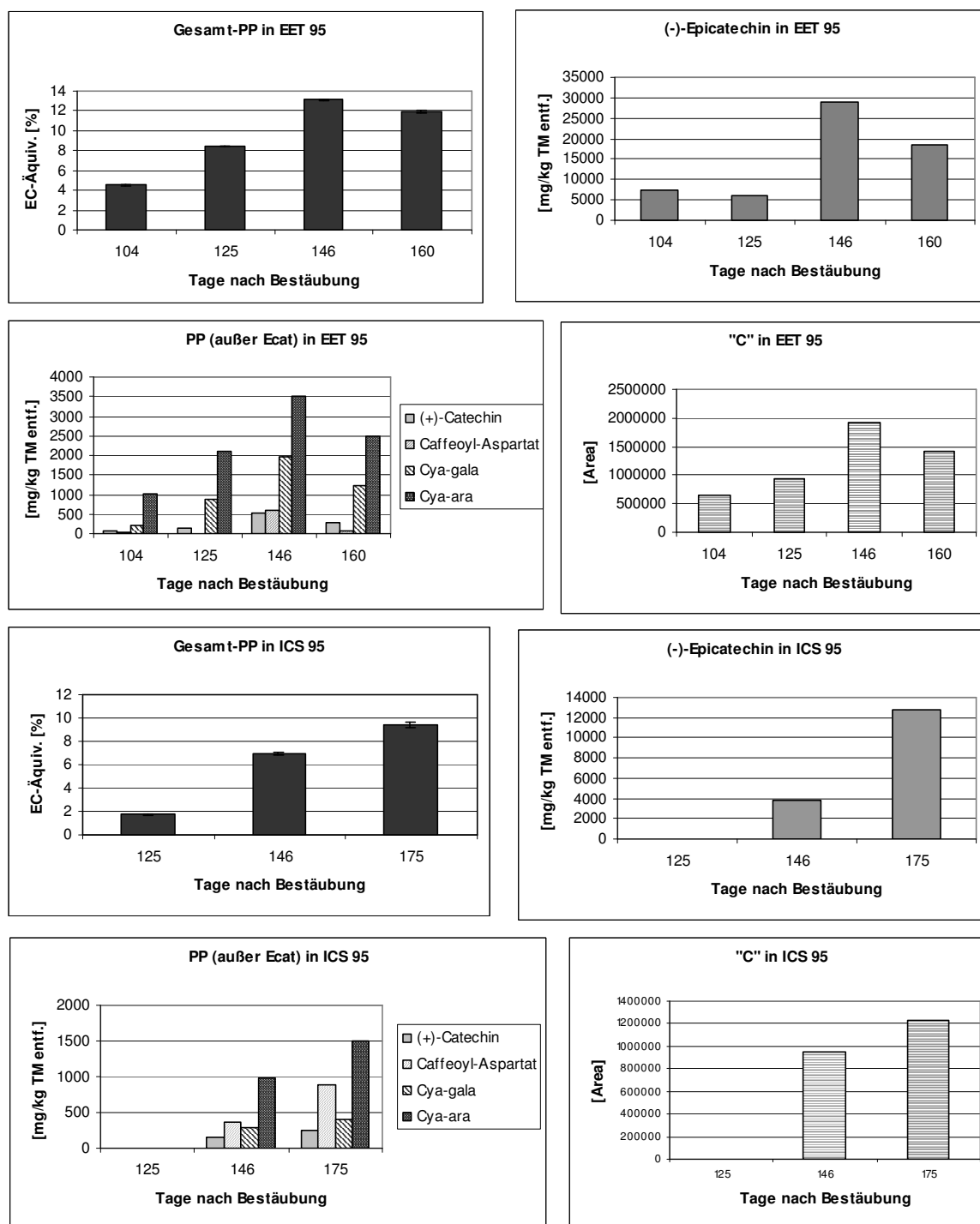


Abb. 64: Veränderungen der Werte für den Gesamt-Polyphenolgehalt und der quantifizierten phenolischen Einzelsubstanzen im Verlauf der Samenreifung

In Abb. 65 wird die Akkumulation der phenolischen Inhaltsstoffe in den reifenden Kakaosamen in Prozent der jeweils maximal gemessenen Werte dargestellt. Deutlich wird hierbei, dass der mit 100 % angesetzte, jeweilige Maximalwert aller untersuchten Inhaltsstoffe bei beiden untersuchten Klonen zum gleichen Stadium gehört. Es gibt deutlich unterschiedliche Entwicklungen in der Anreicherung der einzelnen phenolischen Inhaltsstoffe, doch die Schwankungen in der spezifischen Entwicklung sind auch zwischen den beiden untersuchten Klonen sehr stark.

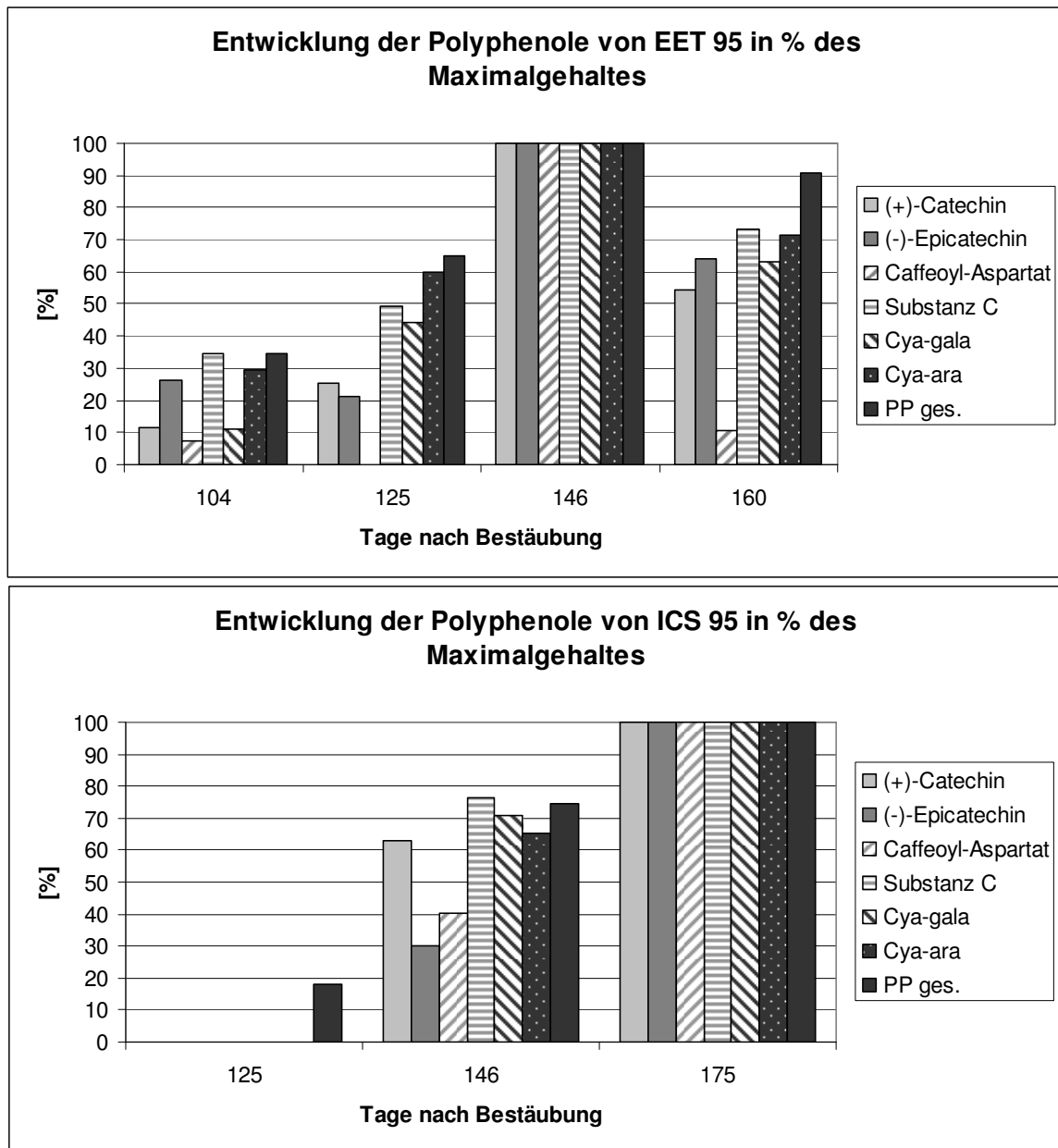


Abb. 65: Entwicklung der Akkumulation der phenolischen Inhaltsstoffe während der Reifung in Prozent des jeweils höchsten gemessenen Wertes

4.5 *Qualitative und quantitative Analyse der phenolischen Inhaltsstoffe von Criollo-Kakaosamen unterschiedlicher Fermentationsstadien*

4.5.1 **Vorbemerkung zu den untersuchten Proben**

Die im Rahmen der Untersuchung verwendeten Proben von Criollo-Kakaosamen unterschiedlicher Fermentationsstadien (siehe 3.1.3) wurden nach ihrer Entnahme aus dem Fermentationsansatz in der Sonne getrocknet. Laut Elwers 2002 senkt in unfermentierten Kakaosamen eine Trocknung an der Luft bei Temperaturen um die 35°C den anschließend nachweisbaren Gehalt an phenolischen Substanzen im Vergleich zu gefriergetrockneten Kakaoprobe nicht wesentlich ab. Dies kann damit begründet werden, dass die PZ frischer Kakaosamen während einer aeroben Trocknung bei moderaten Temperaturen weitgehend intakt bleiben. Im Falle von fermentierten Samenproben ist jedoch das Keimblattgewebe zumindest teilweise bereits abgestorben, was mit einer Zerstörung der cytologischen Strukturen der Keimblattgewebezellen einhergeht (siehe 2.5). Daher kommt es hier während der ersten Phase einer Trocknung bei Temperaturen oberhalb des Gefrierpunktes und unter Sauerstoffzufuhr unvermeidbar zu Oxidationsreaktionen und anschließender Komplexbildung der aus den PZ ausgetretenen phenolischen Inhaltsstoffe.

Bestätigt wird die Veränderung des Gehaltes an Epicatechin und anderen phenolischen Inhaltsstoffen eines Fermentationsstadiums im Verlauf einer anschließenden, aeroben Trocknung durch die Untersuchungen von Rohsius 2007. Die Autorin führte Vergleichsuntersuchungen luftgetrockneter und gefriergetrockneter Stadien einer Inkubation von Kakaosamen unter fermentationsähnlichen Bedingungen durch. In den luftgetrockneten Stadien mit vorheriger Inkubation von 48 h liegt die phenolische Substanz (-)Epicatechin mit etwa 51 % des Ursprungsgehaltes unter dem Wert der gefriergetrockneten Proben (Rückgang auf ca. 65 % des Ursprungswertes). Auch Almeida *et al.* 1998 finden eine stärkere Minderung des Polyphenolgehalts in Rohkakao bei Verlängerung der aeroben Trocknungsphase.

Bei den im Rahmen der vorliegenden Studie untersuchten Fermentationsstadien ist folglich unklar, welcher Anteil im Gewebe nachweisbarer, phenolischer Inhaltsstoffe tatsächlich während der Fermentation und welcher erst während der anschließenden Trocknung verloren gegangen ist.

Bezüglich der in Kapitel 2.5 vorgestellten Literaturergebnisse zur Veränderung der Polyphenolgehalte in fermentierenden Kakaosamen fehlen zumeist Angaben darüber, mit welchem Verfahren die untersuchten Fermentationsstadien nach der Entnahme aus dem Fermentationsansatz getrocknet wurden. Da flüssiger Stickstoff und Gefrietrocknungsanlagen im Umfeld von Kakaoplantagen selten zur Verfügung stehen, basieren die meisten dieser Literaturergebnisse wahrscheinlich auch auf luftgetrockneten Proben und sind somit durchaus mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vergleichbar.

Der besondere Wert der hier untersuchten Fermentationsstadien liegt darin, dass es sich dabei um Proben des Criollo-Typs handelt, von dem es bisher noch keine Veröffentlichungen zu dem Abbau phenolischer Inhaltsstoffe während der Fermentation gibt. Während in bisherigen Publikationen hauptsächlich die Veränderung phenolischer Inhaltsstoffe aus der Gruppe der Flavonoide untersucht wurde, wird in der vorliegenden Arbeit auch das Kaffeesäure-aspartat als wichtigster Vertreter aus der Gruppe der HCAA in Kakaosamen untersucht.

In Tab. 28 (Anhang) sind die vollständigen Daten aller innerhalb der Fermentationsversuche analysierten Kakaosamen verzeichnet.

4.5.2 Die Auswertung der Einzelproben

Abb. 66 zeigt den Abbau der 3 quantitativ erfassten phenolischen Substanzen (-)-Epicatechin, (+)-Catechin und Kaffeesäure-aspartat während der jeweiligen Fermentationen der verschiedenen untersuchten Criollo-Varietäten Guasare, Porcelana sowie Criollo Mérida aus Zea bzw. San Juan de Lagunillas. Da es sich um Criollo-Proben handelt, wurden in keiner der untersuchten Proben Anthocyane nachgewiesen.

Insgesamt kommt es in allen untersuchten Proben im Verlauf der 72 h währenden Fermentation zu einem signifikanten Abbau aller untersuchten phenolischen Inhaltsstoffe. Gleichzeitig werden z. T. erhebliche Unterschiede zwischen den Polyphenolgehalten der jeweils untersuchten Einzelsamen deutlich. Diese Unterschiede sind im Schnitt größer zwischen den 24, 48 oder 72 h lang fermentierten Samen als zwischen den unfermentierten Samen ein und desselben Fermentationsansatzes.

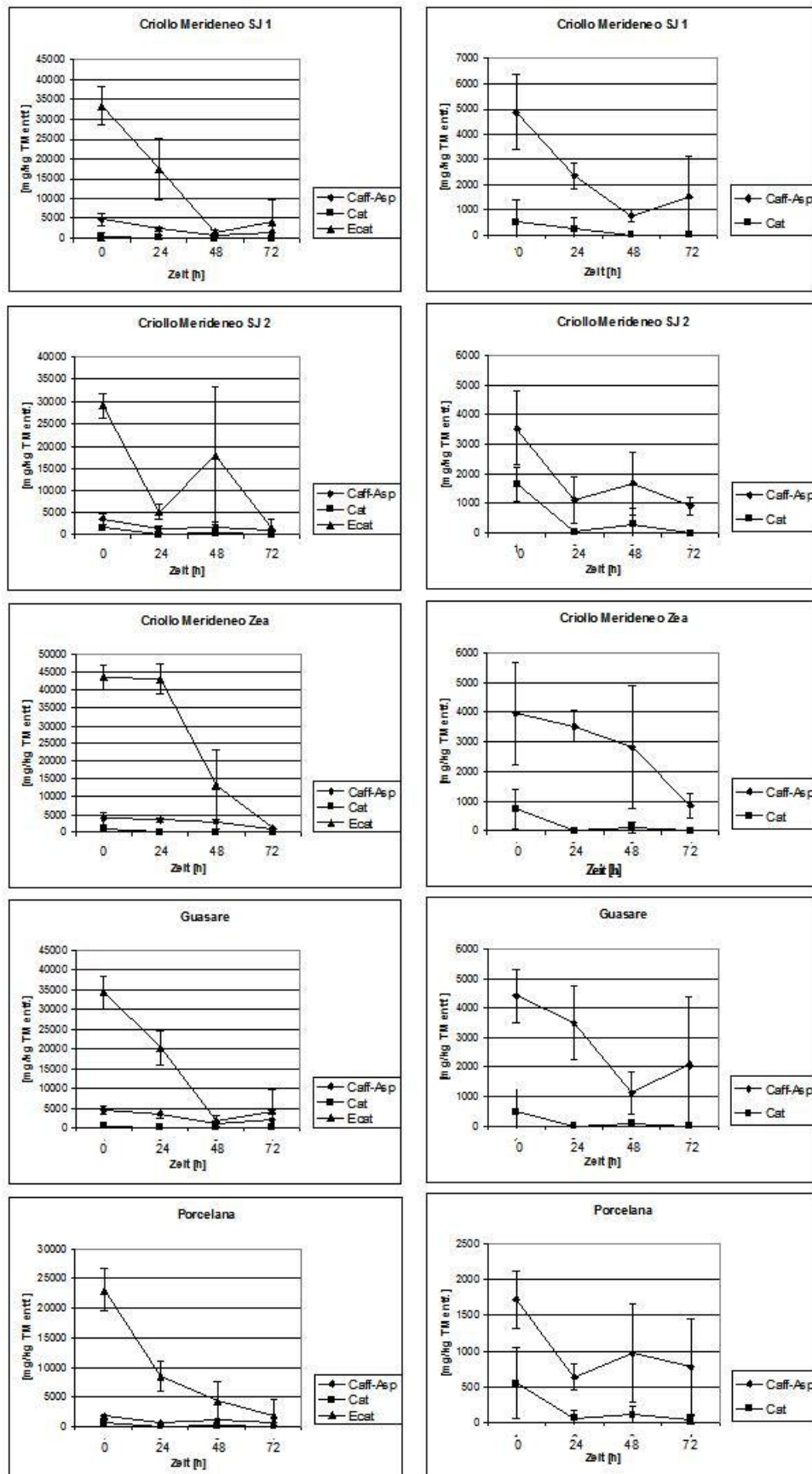


Abb. 66: Probenspezifische Abnahme phenolischer Inhaltsstoffe während der Fermentation
Diagramme einer Zeile: Abbau von Epicatechin (ECAT), Catechin (CAT) und Kaffeesäure-aspartat (Caff-Asp) bzw. nur von Catechin (CAT) und Kaffeesäure-aspartat (Caff-Asp) (Detailvergrößerung)

Zwischen den Polyphenolgehalten einzelner Samen desselben Stadiums und derselben Varietät wurden starke Schwankungen festgestellt (Abb. 66). Auch ähnelt sich der Verlauf der beiden verschiedenen Fermentationen derselben Varietät derselben Herkunft (Criollo Mérida aus San Juan de Lagunillas, Fermentationsansatz 1 und 2) nicht stärker als jener der übrigen untersuchten Kakaofermentationen. Daher konnten keine Varietäts-spezifischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Fermentationsansätzen ermittelt werden. Im Folgenden wurden daher die durchschnittlichen Werte aller untersuchten Fermentationsproben ausgewertet.

4.5.3 Die Veränderung der durchschnittlichen Polyphenolgehalte im Verlauf der Fermentation und der anschließenden Trocknung

Während der Fermentation sinken die Gehalte der quantitativ erfassten phenolischen Inhaltsstoffe aller untersuchten Criollo-Proben ab. Mit fortschreitender Fermentation werden somit fast durchgehend niedrigere Durchschnittsgehalte an den einzelnen phenolischen Inhaltsstoffen ermittelt. Dabei gibt es große Unterschiede zwischen den Polyphenolgehalten der untersuchten Einzelproben (Abb. 67). Die Unterschiede sind jedoch nicht größer als zwischen den Samen ein und desselben Fermentationsansatzes und/oder derselben Varietät (siehe Abb. 66).

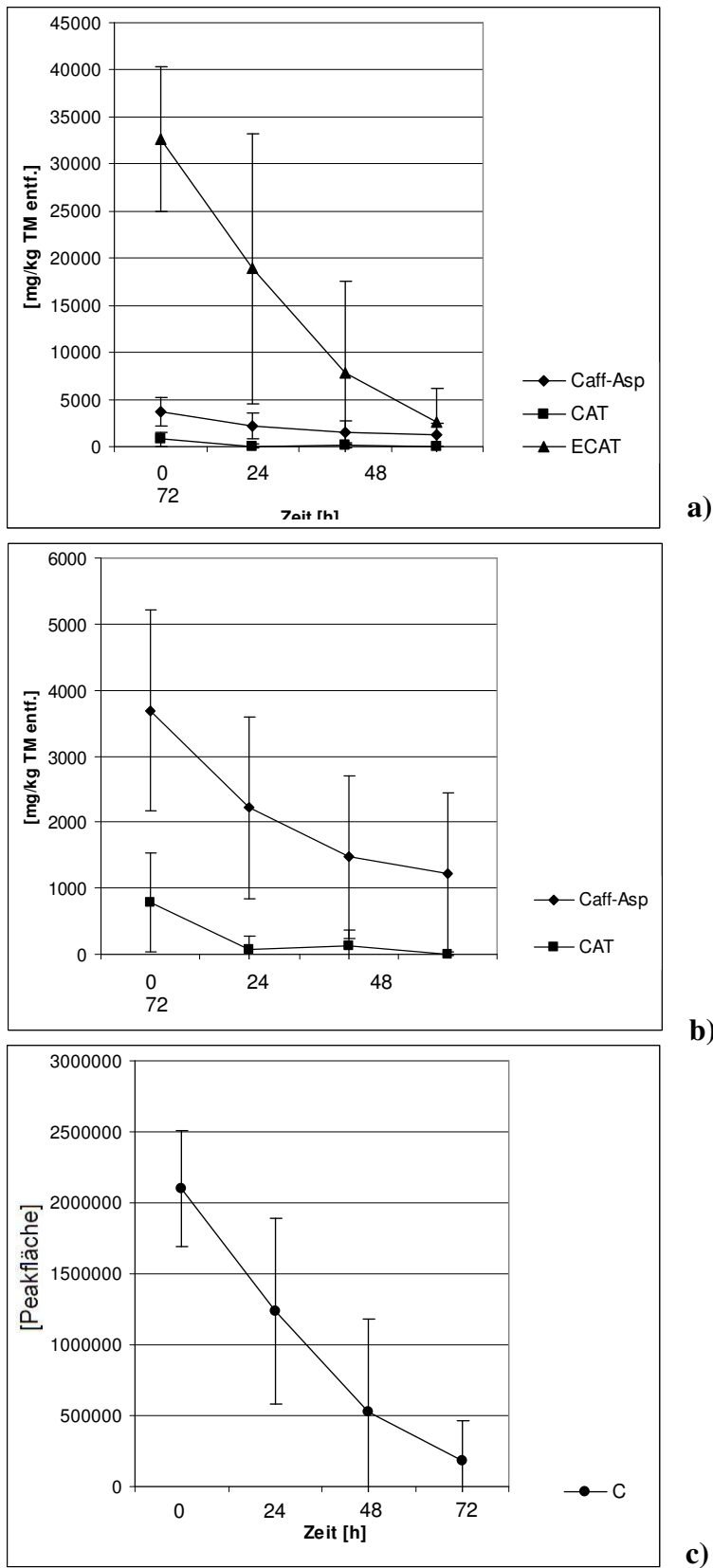


Abb. 67: Durchschnittlicher Abbau phenolischer Inhaltsstoffe in den untersuchten Criollo-Fermentationen

- a)** Abbau von Epicatechin (ECAT), Catechin (CAT) und Kaffeesäure-aspartat (Caff-Asp)
b) Abbau von Catechin (CAT) und Kaffeesäure-aspartat (Caff-Asp) (Detail aus a))
c) Abbau des mutmaßlichen Procyanidins „Substanz C“ (Auswertung der Peakflächen)

Abb. 68 zeigt den Gehalt der quantifizierten phenolischen Inhaltsstoffe und des mutmaßlichen Procyanidins „C“ (siehe 4.2.2) der einzelnen Fermentationsstadien in Prozent des Ausgangswertes unfermentierter Proben (0 h fermentiert).

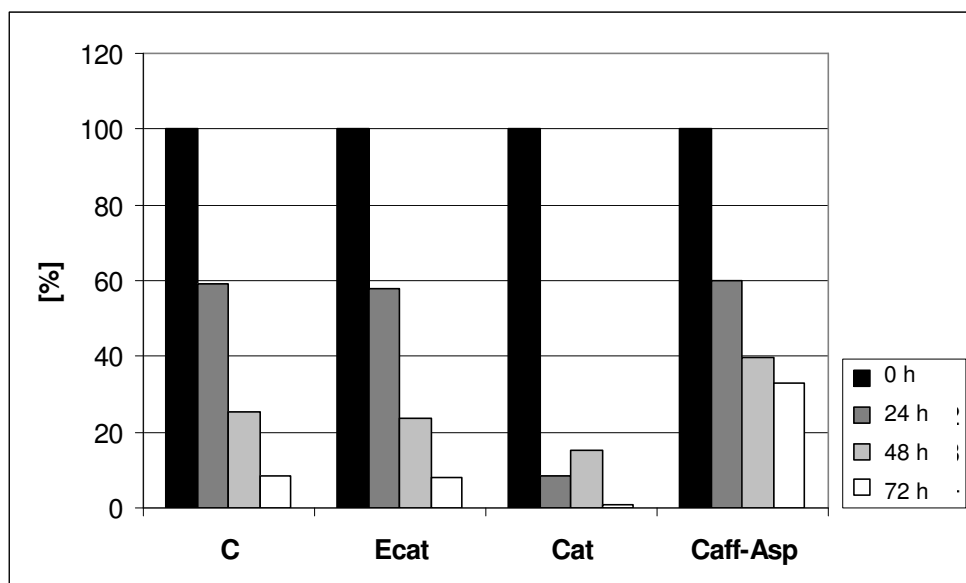


Abb. 68: Durchschnittlicher Restgehalt phenolischer Inhaltsstoffe in Prozent des Ursprungsgehaltes nach 0, 24, 48 und 72 h Fermentationszeit

Der Abbau von (-)-Epicatechin und „C“ verläuft in den untersuchten Proben im Schnitt sehr ähnlich. Von den Substanzen sind in 24 h lang fermentierten und anschließend getrockneten Proben noch 59 % („C“) bzw. 58 % ((-)-Epicatechin) des Gehaltes unfermentierter Samen vorhanden. Nach 48 h Fermentation und nachfolgender Trocknung sind die Gehalte von „C“ und (-)-Epicatechin auf 25 % bzw. 24 % des ursprünglichen Gehaltes zurückgegangen. Im 72 h lang fermentierten, fertigen Rohkakao finden sich durchschnittliche Restgehalte von 8,6 % („C“) bzw. 8 % ((-)-Epicatechin) des Ausgangsgehaltes in den Kakaoproben. Folglich gehen in den untersuchten Fermentationen von Criollo-Samen durchschnittlich 91 % bis 92 % des (-)-Epicatechins und des nicht vollständig identifizierten Catechinderivates „C“ verloren.

Auch der (+)-Catechingehalt der untersuchten Proben nimmt mit fortschreitender Fermentation ab. Die Minderung dieser Substanz nimmt jedoch nicht denselben Verlauf wie jene des (-)-Epicatechins sowie des mutmaßlichen Procyanidins „C“. Tatsächlich liegt der durchschnittliche Gehalt an Catechin nach 48 h Fermentation mit 15 % des Ausgangsgehaltes sogar höher als der Messwert nach 24 h (8,6 %) (siehe Abb. 68). Insgesamt kommt es jedoch zu einem sehr starken Abbau des Catechins während der Fermentation, sodass der gemessene Restgehalt mit knapp 1 % deutlich unter jenen der anderen untersuchten phenolischen Substanzen liegt.

Von dem HCAA Kaffeesäure-aspartat wurde nach 24 h Fermentation mit anschließender Trocknung mit durchschnittlich 60,03 % des Gehaltes unfermentierter Samen ein ähnlicher Rückgang gemessen wie für das in den Kakaosamen enthaltene (-)-Epicatechin

sowie das mutmaßliche Procyanidin „C“ (s. o.). In den 48 h lang fermentierten Proben finden sich noch 39 % des Ausgangsgehaltes an dieser Substanz; in mit 72 h voll fermentierten Proben sind nach der Trocknung noch 33,05 % des Gehaltes an Kaffeesäure-aspartat frischer Criollo-Kakaosamen vorhanden. Damit ist von allen untersuchten phenolischen Inhaltsstoffen der Abbau von Kaffeesäure-aspartat am geringsten.

In den untersuchten, voll fermentierten Rohkakaoproben von Criollo-Samen finden sich somit im Durchschnitt

- 1220 mg Kaffeesäure-aspartat kg^{-1} ff TM,
- 7,2 mg (+)-Catechin kg^{-1} ff TM,
- 2615 mg (-)-Epicatechin kg^{-1} ff TM.

Während der ermittelte Restgehalt an (+)-Catechin somit im Vergleich zu den anderen Substanzen sehr gering ist, liegt der durchschnittliche Gehalt des Kaffeesäure-aspartats in den untersuchten Rohkakaoproben bei knapp der Hälfte des durchschnittlichen Gehaltes an (-)-Epicatechin. Der Unterschied zwischen diesen beiden Substanzen hat sich somit im Vergleich zu den unfermentierten Criollo-Kakaoproben, in welchen das (-)-Epicatechin noch fast die zehnfache Menge des Kaffeesäure-aspartats aufweist, stark verringert.

Innerhalb der untersuchten Einzelproben finden sich vereinzelt sogar solche, in welchen der Gehalt an Kaffeesäure-aspartat über jenem des (-)-Epicatechins liegt (siehe Tab. 28).

4.6 Histologische und cytologische Aspekte der Speicherung von Polyphenolen in Keimblättern von *T. cacao* L.

In den bisher veröffentlichten Studien zum histologischen Aufbau des Keimblattgewebes von *T. cacao* L. wird die Verteilung der darin eingelagerten phenolischen Inhaltsstoffe gar nicht oder nur am Rande erwähnt. Untersuchungen zum mikroskopischen Vergleich verschiedener Kakaotypen wurden bisher ebenfalls noch nicht durchgeführt. Derartige Studien sind jedoch für die Deutung der sameninternen Prozesse während der Fermentation durchaus wichtig.

Das vorliegende Kapitel widmet sich nicht nur den oben genannten Themenbereichen sondern umfasst auch cytologische Studien einzelner Reifestadien von *T. cacao* L., welche bisher noch nicht analysiert wurden.

4.6.1 Vorbemerkungen zur Qualität der untersuchten Präparate

Die in 3.3 beschriebene Präparationstechnik wurde bereits im Vorfeld entwickelt (Müller 1998) und hat sich als ein zuverlässiges Verfahren für eine artefaktarme Präparation von Kakaosamen für die lichtmikroskopische Analytik bewährt. In vielen der für die vorliegende Arbeit angefertigten Semidünnschnitte zeigten sich jedoch Mängel im Erhaltungsgrad der cytologischen Feinstruktur. Sehr häufig sind davon die Vakuolen der Polyphenolzellen betroffen. Diese großen, zentralen Vakuolen sind in vielen der untersuchten Präparate gestaucht oder ganz aus den Präparaten herausgefallen. Dieses Artefakt wird durch den Prozess des Schneidens am Mikrotom hervorgerufen und kann auch in optimal präpariertem Keimblattgewebe kaum vermieden werden. Da die Polyphenolzellen jedoch auch mit gestauchten oder herausgefallenen Vakuolen noch sehr gut als solche zu identifizieren sind, spielte ihr Erhaltungsgrad für die Auswertung kaum eine Rolle.

In anderen Präparaten sind fast alle cytologischen Strukturen durch Artefaktbildung zerstört. Davon sind z. B. viele Präparate des Criollo-Typs betroffen. Da diese bereits fixiert aus Venezuela verschickt wurden (siehe 3.1.1), sind die Ursachen hierfür nicht bekannt. Denkbar sind eine falsche Konzentration des Fixiermediums oder Verzögerungen bei der Überführung der Samen in eben dieses Medium. Hierfür spricht, dass die fixierten Samen deutliche Spuren von Verbräunung aufweisen, welche nach der Fixierung in diesem Maße nicht auftreten sollten (siehe Abb. 78). Vielleicht wurden die Präparate auch durch zu niedrige Temperaturen während des Fluges geschädigt.

Auch einige Samen anderer Herkunftsgebiete, die als Frischmaterial in den Früchten verschickt wurden und deren Fixierung erst in Hamburg erfolgte, zeigten eine deutliche Artefaktbildung. Dies betrifft nahezu ausschließlich die Proben aus Trinidad. Möglicherweise ist gerade diese Probensendung während ihrer Überführung nach Deutschland sehr niedrigen Temperaturen ausgesetzt gewesen, was eventuell zu einem Absterben des Samengewebes geführt hat. Ein Indiz für diese These stellt die sehr geringe Keimungsrate dar, welche bei Samen aus dieser Lieferung festgestellt wurde.

Neben eindeutig beschädigtem Keimblattgewebe wies das Speicherparenchym einiger Semidünnschnitte auch Abschnitte auf, in denen die präparierten Speicherzellen eine von bisherigen Beschreibungen abweichende cytologische Struktur besaßen. Da aufgrund der oben beschriebenen Unklarheiten zum Erhaltungsgrad der Proben nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sich dabei um Artefakte handelt, werden diese im Folgenden weder ausführlich dokumentiert noch diskutiert.

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Untersuchung der Zellgrößen, des histologischen Aufbaus sowie der Struktur der Leitbündelelemente konnte auch stark geschädigtes Material verwendet werden, da die Zellgrößen und -wände von der oben beschriebenen Artefaktbildung nicht betroffen waren.

Die in diesem Kapitel dargestellten Abbildungen zeigen überwiegend Gewebe, das weitgehend frei von Artefakten ist.

4.6.2 Ergebnisse aus der mikroskopischen Analyse der Reifestadien

Die mikroskopische Untersuchungen der Entwicklung von Keimblattgewebe von *T. cacao* L. bis zur Reife wurde anhand von definierten Stadien von Samen der Klone ICS 95 und EET 95 ab einem Alter von 80 Tagen nach der Bestäubung durchgeführt (siehe 3.1.2). Abb. 69 a zeigt einen 80 Tage alten Embryo des Klons EET 95. Neben der noch fast kugelförmigen Embryonalachse sind eines der beiden Keimblätter und seine Äderung deutlich zu erkennen. Während der Embryo erst eine Gesamtlänge von knapp 2 mm aufweist, hat die Samenhülle zu diesem Zeitpunkt bereits eine Länge von ca. 1,75 cm erreicht. Der von den Integumenten umhüllte Raum wird zum größten Teil von Endosperm gefüllt, welches im Zentrum des Samens flüssig ist und in den Randbereichen gallertartige Zellverbände bildet.

Der in Abb. 69 a dargestellte Embryo ist im Vergleich zu jenen anderer Samen des gleichen Klons und Reifestadiums besonders weit entwickelt. In den Proben von ICS 95 wurden für diesen Zeitpunkt der Entwicklung noch gar keine makroskopisch sichtbaren Embryonen gefunden. Die Samen dieses Klons sind 80 Tage nach der Bestäubung mit weniger als 1 cm Länge auch noch deutlich kleiner als jene von EET 95.

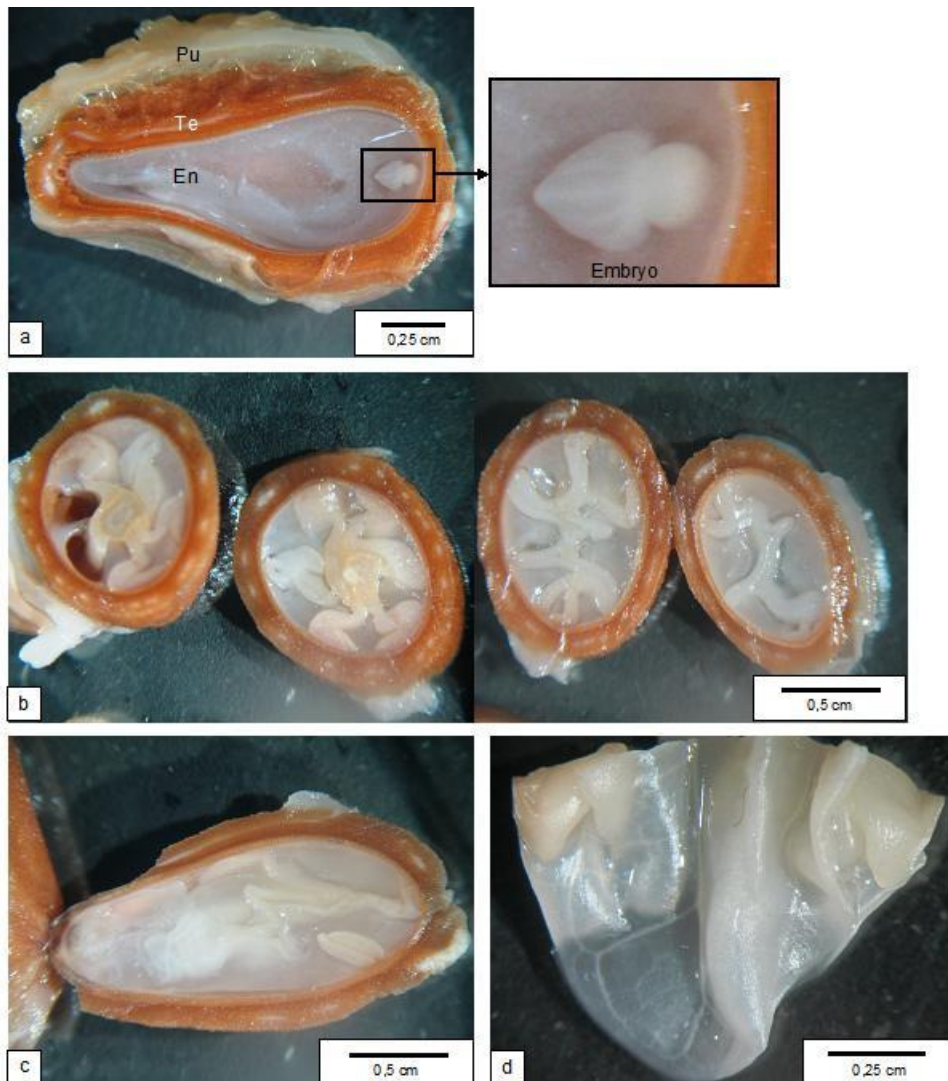


Abb. 69: Reifestadien von Kakaosamen der Klone EET 95 sowie ICS 95
a) EET 95, Samen längs, 80 Tage nach der Bestäubung. **Pu:** Pulpa, **Te:** Testa, **En:** Endosperm; **b)** EET 95, Samen quer, 100 Tage nach der Bestäubung; **c)** EET 95, Samen längs, 100 Tage nach der Bestäubung; **d)** ICS 95, oberes Keimblattgewebe, 100 Tage nach der Bestäubung

Abb. 69 b zeigt einen in mehrere Scheiben quer geschnittenen Samen des Klons EET 95, welcher 100 Tage der Bestäubung aus der Frucht entnommen wurde. Die beiden linken Samenscheiben zeigen auch die zentral gelegene, quer geschnittene Embryonalachse. In allen 4 Schnittpräparaten sind die sich entwickelnden, stellenweise eng aneinander liegenden und noch vollkommen farblosen Speicherkotyledonen zu sehen. Sie haben bereits begonnen sich zu falten. Abb. 69 c zeigt einen Samen desselben Klons und Reifestadiums im Längsschnitt. Das Endosperm ist in den untersuchten Proben nicht mehr flüssig, sondern umgibt den wachsenden Embryo als gallertartige Masse (Abb. 69 b und c).

Embryonen des Klons ICS 95 waren 100 Tage nach der Bestäubung unterschiedlich weit entwickelt. Während einige Proben makroskopisch nicht von den in Samen von EET 95 gefundenen Embryonen unterscheidbar waren, fanden sich auch solche, in welchen die

Embryonen inklusive ihrer Keimblätter erst eine Länge von wenigen mm erreicht hatten und in welchen noch flüssiges Endosperm vorhanden war (ohne Abb.). Abb. 69 d zeigt den freipräparierten Teil Keimblattes des Klons ICS 95 eines 100 Tage alten Reifestadiums. Das Gewebe ist weitgehend farblos und von einer deutlich sichtbaren Äderung durchzogen, genau wie bei Keimblättern von EET 95 gleichen Stadiums.

Die 120 Tage alten Proben sowohl des Klons EET 95 als auch des Klons ICS 95 waren in Größe, Form und Färbung makroskopisch nicht von den vollständig ausgereiften Samen der beiden Klone unterscheidbar und entsprechen somit den in Abb. 69 zusammengestellten Bildern.

Bei den 80 Tage alten Proben beider untersuchten Kakaoklone waren die Embryonen noch zu klein, um lichtmikroskopische Semidünnschnittpräparate ihrer Keimblätter anzufertigen. Somit beginnt die histologische und cytologische Untersuchung erst mit dem 100 Tage alten Stadium.

Abb. 70 a zeigt eine Aufnahme von Keimblattgewebe des Klons EET 95 im genannten Stadium, Abb. 70 b zeigt dasselbe Stadium bei ICS 95. Beide Aufnahmen sind repräsentativ für das optische Erscheinungsbild des Keimblattgewebes dieses Entwicklungsstadiums nach der in 3.14 beschriebenen, lichtmikroskopischen Präparation. In Abb. 70 a links sowie in b oben abgebildet ist jeweils ein Teil der Keimblattepidermis. Diese erscheint in beiden Präparaten weitgehend farblos und ist hauptsächlich von großen Zellvakuolen mit kontrastlosem Inhalt ausgefüllt. Beim Vergleich von Abb. 70 a und b fallen die unterschiedlichen Zelldurchmesser der Epidermen auf. Dieses Phänomen wird auch bei den Epidermen reifer Kotyledonen und auch innerhalb desselben Klons gefunden. Die kleinen, stark kontrastierten, granulären Einschlüssen in einigen Epidermiszellen ähneln stark den stärkehaltigen Plastiden der SZ des Keimblattparenchyms.

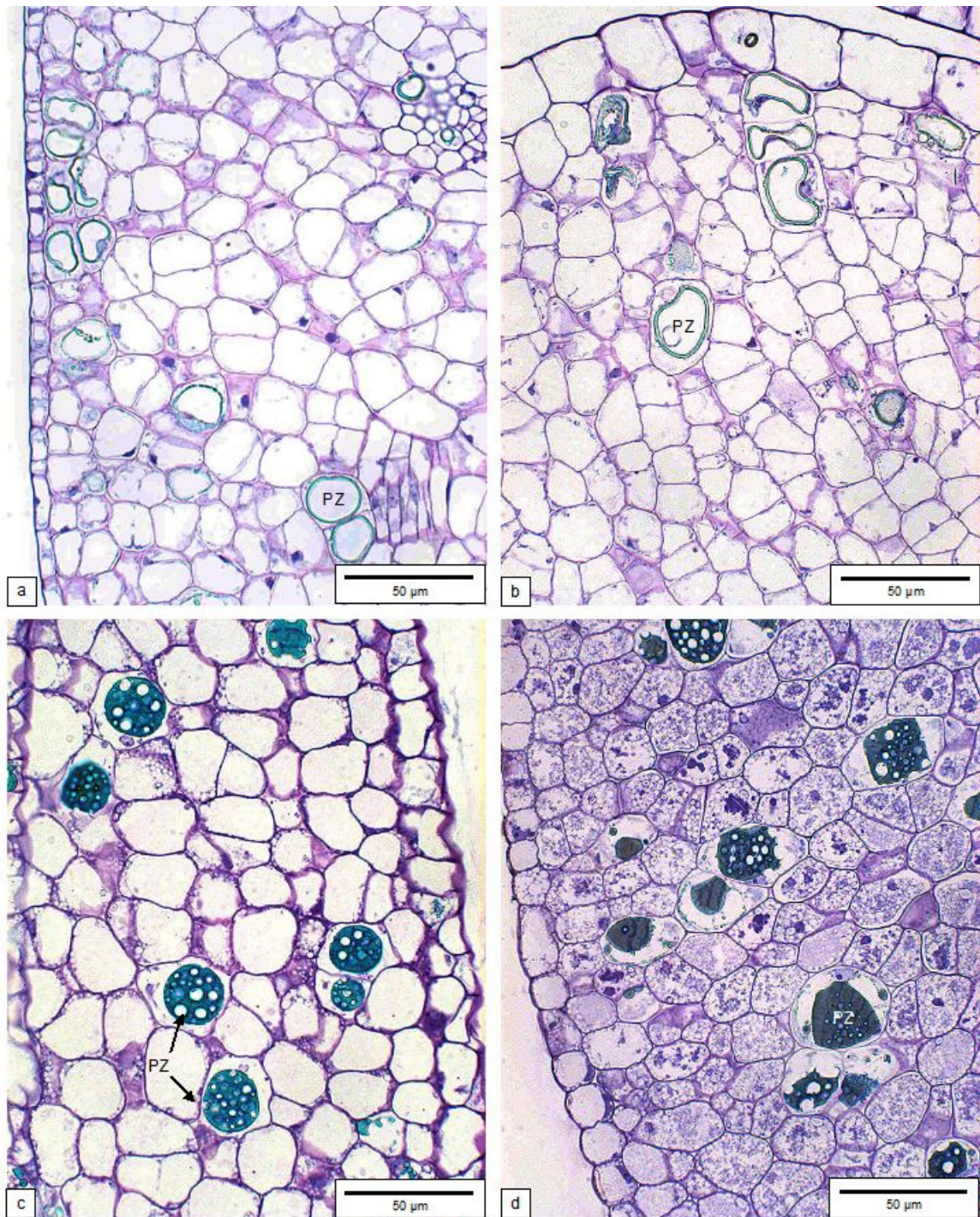


Abb. 70: Reifestadien von Keimblattgewebe der Klone EET 95 sowie ICS 95, 100-120 Tage nach der Bestäubung
a) EET 95, 100 Tage nach der Bestäubung; **b)** ICS 95, 100 Tage nach der Bestäubung;
c) EET 95, 120 Tage nach der Bestäubung; **d)** ICS 95, 120 Tage nach der Bestäubung

Das unterhalb der Keimblattepidermis beginnende, sich entwickelnde Speichergewebe wird 100 Tage nach der Bestäubung dominiert von Zellen, deren Inhalt unter den verwendeten Präparationsbedingungen fast vollständig ungefärbt bleibt, und die somit nahezu leer erscheinen. Ähnlich wie die Epidermiszellen finden sich auch hier große Zellvakuolen sowie vereinzelt stärkehaltige Plastiden. Bei diesen Zellen handelt es sich

um die zukünftigen Speicherzellen (im Folgenden mit SZ abgekürzt), in welche im Verlauf der Reifung Fett, Proteine und Stärke eingelagert werden.

In beiden Klonen des Stadiums von 100 Tagen nach der Bestäubung (Abb. 70 a und b) finden sich im Keimblattgewebe neben diesen weitgehend farblosen SZ auch solche Zellen, die einen ringförmigen, grünlich gefärbten Einschluss enthalten. Bei diesen Zellen handelt es sich um frühe Stadien der späteren Polyphenolzellen (im Folgenden abgekürzt mit PZ). Grün gefärbt sind die phenolischen Substanzen, die sich zunächst im Bereich des Tonoplasten konzentrieren, wodurch ihre Anordnung im Schnittbild ringförmig erscheint. PZ mit sich füllenden Vakuolen finden sich 100 Tage nach der Bestäubung auch in den Leitbündelelementen (im Folgenden abgekürzt mit LBE) der jungen Keimblätter (Abb. 70 a, rechts oben im Bild).

Während die Cytologie des Keimblattgewebes von Abb. 70 a und b in der gegebenen Darstellung weitgehend identisch erscheint, gibt es einen Unterschied auf histologischer Ebene. Das in Abb. 70 a dargestellte Parenchymgewebe ist offenbar durch eine eher ungeordnet ablaufende Zellteilung entstanden. Der Verlauf der neu gebildeten Zellwände steht in keinem bestimmten Winkel zur Anordnung der Nachbarzellen und der Epidermis. In Abb. 70 b deutet sich hingegen die Ausbildung reihenförmiger Zellstrukturen an; die neuen Zellwände werden dabei parallel zur Epidermis gebildet und die Zellreihen schieben sich offenbar von außen (kleine, ungestreckte Zellen) nach innen (größte und somit älteste Zellen der Reihenstrukturen) vor.

Abb. 70 c und d zeigen Ausschnitte aus jeweils 120 Tage (nach der Bestäubung) altem Keimblattparenchym von EET 95 und ICS 95. Obwohl die Samen zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung makroskopisch nicht von vollständig ausgereiften Kakaosamen zu unterscheiden sind (siehe oben), gibt es auf cytologischer Ebene noch große Unterschiede. Diese betreffen vor allen Dingen die SZ, deren Inhalt besonders in Abb. 70 c noch sehr schwach kontrastiert ist. Obwohl der Samen zu diesem Zeitpunkt bereits seine endgültige Größe erreicht hat, ist die Einlagerung der Speicherstoffe in die SZ somit noch nicht beendet. So dominieren in Abb. 70 c weiterhin große, kontrastlos gefüllte Vakuolen den Inhalt der SZ. Neben den bereits in Abb. 70 a und b erkennbaren Stärkekörnern finden sich in einigen Zellen von Abb. 70 c auch schon einige Lipidvakuolen. Das darin eingelagerte Fett wird durch die verwendete Toluidinblau O-Färbung (siehe 3.14.4) nicht angefärbt und liegt in den Zellen in unkontrastierten Globuli von ca. 2-3 μm Durchmesser vor. Tiefblau kontrastierte Speicherproteine sind in dem in Abb. 70 c dargestellten Gewebe noch gar nicht sichtbar. Im Gegensatz dazu sind die Zellen des in Abb. 70 d abgebildeten Speicherparenchyms des Klons ICS 95 etwas weiter entwickelt; ihre Lipidvakuolen sind zahlreicher und blau gefärbte Bereiche zeigen die Einlagerung von Speicherproteinen in die Zentralvakuolen an.

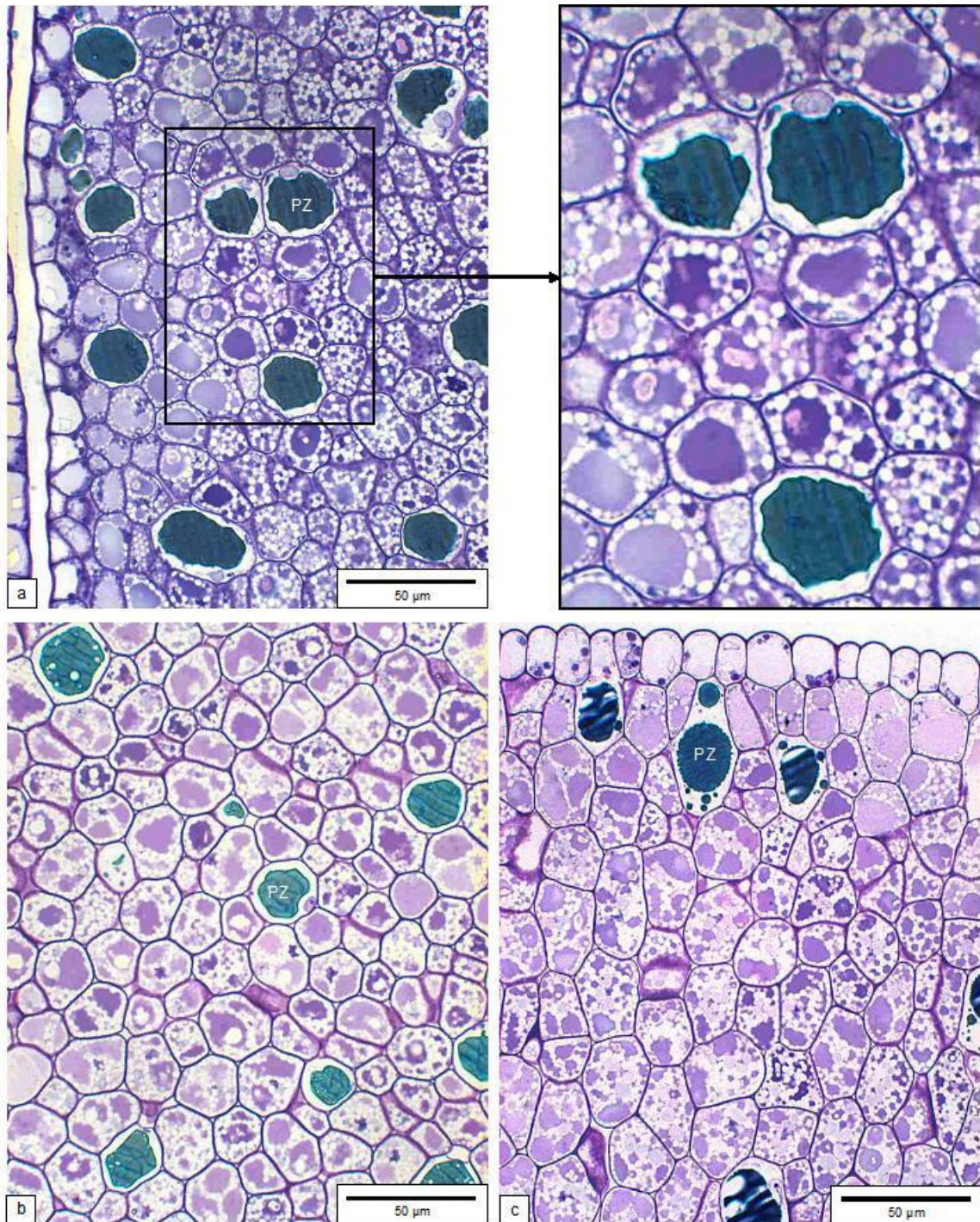


Abb. 71: Reifestadien von Keimblattgewebe der Klone EET 95 sowie ICS 95, 140-175 Tage nach der Bestäubung
a) EET 95, 140 Tage nach der Bestäubung, mit Ausschnittsvergrößerung; **b)** EET 95, 165 Tage nach der Bestäubung; **c)** ICS 95, 175 Tage nach der Bestäubung

Sowohl in Abb. 70 c als auch in Abb. 70 d sind die Vakuolen der im Speichergewebe verteilten PZ bereits zu einem großen Teil mit phenolischen Substanzen gefüllt. Neben den grünlich gefärbten Polyphenolen enthalten die Vakuolen der PZ noch kreisförmige, kontrastlose Strukturen, die auch in reifen Keimblattparenchym gelegentlich zu finden sind (siehe Abb. 71 b, Abb. 79 c). Besonders in Abb. 70 c wird deutlich, dass 120 Tage

nach der Bestäubung die Einlagerung phenolischer Substanzen in das Gewebe wesentlich weiter fortgeschritten ist als die Einlagerung der Speicherstoffe Fett und Protein.

4.6.3 Die cytologischen Merkmale des reifen Keimblattparenchyms von *T. cacao* L.

Abb. 71 a zeigt einen Ausschnitt aus dem Keimblattgewebe des Klons EET 95 140 Tage nach der Bestäubung. Obwohl die Mitarbeiter aus Ecuador (siehe 2.4.1), welche die Proben zur Verfügung stellten, von einem etwas späteren Zeitpunkt für die Reife von Samen des Klons EET 95 ausgehen, wiesen sämtliche mikroskopischen Präparate dieses Stadiums alle cytologischen Merkmale eines vollständig ausgereiften Speicherparenchyms auf. Abb. 71 b zeigt zum Vergleich reifes Keimblattparenchymgewebe eines Samens von EET 165 Tage nach der Bestäubung, welches sich cytologisch nicht merklich von dem jüngeren Stadium unterscheidet. Allenfalls die Proteinvakuolen sind im Schnitt ein wenig größer und weniger stark kontrastiert, was möglicherweise ein Zeichen beginnender Keimung darstellt. Abb. 71 c zeigt das Keimblattparenchym eines 175 Tage alten Samens des Klons ICS 95. Auch dieses weist bei der gegebenen Präparation keine cytologischen Unterschiede zu Abb. 71 a auf.

Wie bereits in 2.2.1.2 aufgeführt, enthalten die gewöhnlichen Speicherzellen des Keimblattgewebes Fett, Speicherproteine und Stärke in separaten Kompartimenten. Der größte Teil des Inhalts der meisten SZ wird von den mit der verwendeten Methodik farblos erscheinenden Lipidvakuolen eingenommen, die jeweils einen Durchmesser von 2-3 μm besitzen. Die blau gefärbte, aus der Zentralvakuole hervorgegangene Proteinvakuole wird von dicht gepackten Lipidvakuolen in eine Zwangsform gepresst. Einzelne dieser Proteinvakuolen enthalten Einschlüsse von möglicherweise kristalliner Natur (Abb. 71 a, hellviolett gefärbt).

In vielen der untersuchten Semidünnschnittpräparate weisen die ersten Reihen der unmittelbar unterhalb der Epidermis gelegenen Parenchymzellen eine von den tiefer gelegenen Speicherzellen abweichende Struktur auf: Die Proteinvakuolen sind größer, aber schwächer kontrastiert, der Anteil an Lipidvakuolen ist insgesamt geringer (siehe Abb. 71 a). Eine ähnliche cytologische Struktur findet sich auch in solchen Speicherzellen, die in enger Nachbarschaft zu den Leitbündelelementen angesiedelt sind (Abb. 80 e).

Die Vakuolen der im Speicherparenchym verteilten, reifen PZ sind fast vollständig von den dunkelgrün kontrastierten phenolischen Inhaltsstoffen ausgefüllt. Vereinzelt sind darin auch runde, kontrastlose Bereiche zu finden, die jenen der reifenden Polyphenolvakuolen 120 Tage alter Samen von ICS 95 und EET 95 ähneln (Abb. 71 b, Abb. 79 c).

Vereinzelt finden sich im reifen Keimblattparenchym auch PZ, die zusätzlich zu der großen Zentralvakuole noch eine oder mehrere kleine Vakuolen enthalten, die ebenfalls von phenolischen Substanzen ausgefüllt sind (siehe Abb. 71 c).

Neben phenolischen Inhaltsstoffen lagern die PZ auch noch Stärke und Fett in Kompartimente ein, die mit jenen der SZ identisch sind (Abb. 71 a). Der Anteil an Lipidvakuolen ist dabei jedoch deutlich geringer als jener in den SZ.

4.6.3.1 Die typspezifischen Flächen der Polyphenol- und Speicherzellen

Abb. 72 vermittelt einen Überblick über die durchschnittlichen Zellflächen des Speichergewebes der einzelnen untersuchten Kakaoproben. Deutlich wird hierbei, dass die Flächen der PZ im Durchschnitt erheblich größer sind als jene der SZ. Dabei ist die Schwankungsbreite zwischen den Einzelwerten der PZ grundsätzlich etwas höher als bei den SZ.

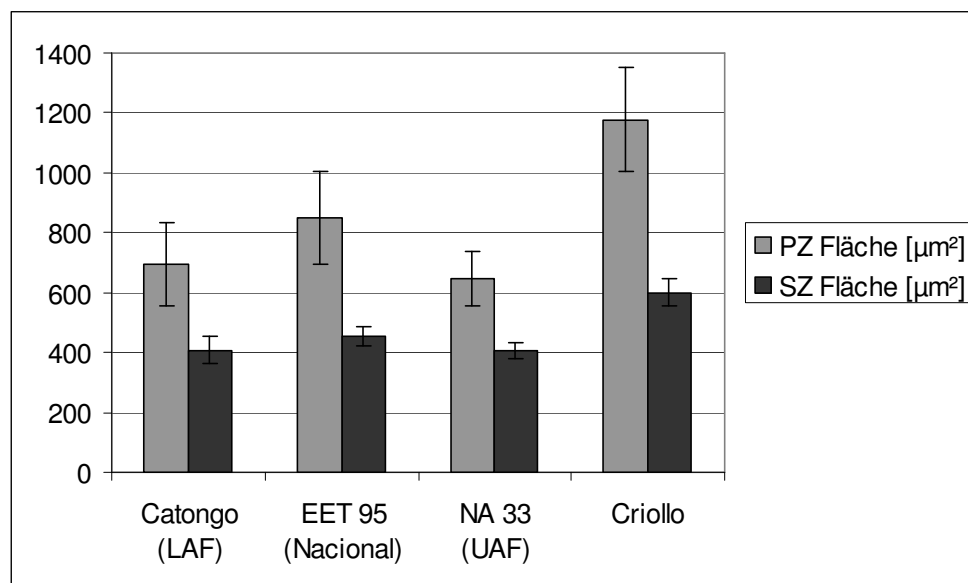


Abb. 72: Mittelwerte der Flächen von PZ und SZ des Keimblattgewebes der Kakao-Typen LAF, Nacional, UAF und Criollo

Auffällig ist, dass die Standardabweichungen von den durchschnittlichen Zellflächen sich zwischen den aufgeführten Kakaotypen nicht wesentlich unterscheiden. So ist diese beim Typ Criollo, dessen Wert sich aus den Einzelmessungen von mehreren verschiedenen Criollo-Varietäten zusammensetzt, sogar ein wenig geringer als jene des Nacional-Typs, dessen Proben von nur einem Klon einer einzigen Herkunft stammen (siehe Anhang; Tab. 27). Auch die Schwankungen innerhalb des UAF-Typs sind etwas kleiner, obwohl das Material hier zwar von demselben Klon, jedoch aus 5 verschiedenen Anbaugebieten stammt. Die Bedeutung der Herkunft sowie des spezifischen Genotyps scheinen demnach für die jeweiligen Größen der Zellflächen keine signifikante Rolle zu spielen.

Deutlich wird hingegen, dass die Zellflächen der Criollo-Proben im Durchschnitt erheblich größer sind als jene der anderen untersuchten Kakaotypen

Abb. 73 zeigt einen typspezifischen Mittelwertsvergleich der Flächen der untersuchten PZ (a) und SZ (b), welche mit Hilfe des in 3.14.5 beschriebenen Verfahrens berechnet wurden. Deutlich setzt sich in beiden Fällen der Typ „Criollo“ von den 3 anderen

untersuchten Kakaotypen (Nacional, LAF und UAF) ab. Die durchschnittlichen Flächen der PZ schwanken innerhalb einer Messprobe wesentlich stärker als jene der SZ.

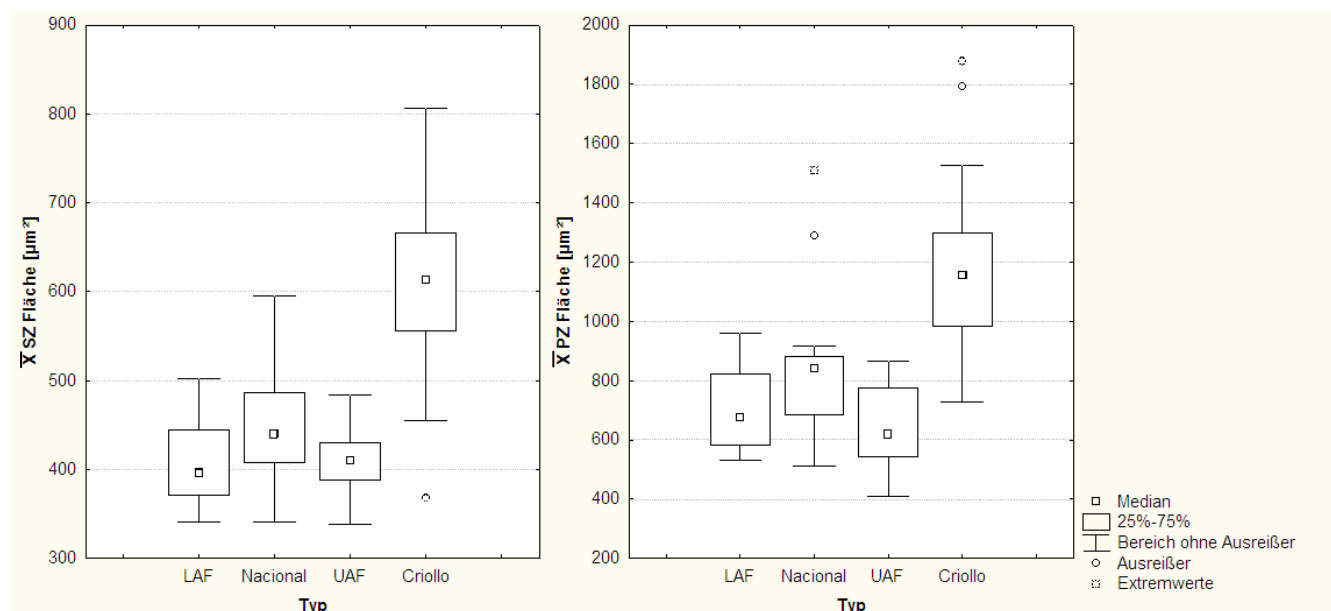


Abb. 73: Mittelwertvergleich der typspezifischen Flächen der PZ und SZ des Keimblattgewebes von *T. cacao* L.

Eine zur statistischen Absicherung dieses Ergebnisses durchgeführte ANOVA mit anschließendem Scheffé-Test ergab einen signifikanten Unterschied des Typs Criollo von den anderen Kakaotypen bezüglich der Fläche und somit der Größe seiner PZ und auch seiner SZ, während zwischen Typen „UAF“, „LAF“ und „Nacional“ keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen wurden (Tabellen 18 bis 21).

Tab. 18: Univariate Signifikanztests für \bar{X} PZ Fläche [μm^2] Sigtabeschränkte Parametrisierung, Typ VI Dekomposition (Effektive Hypothese)

	SQ	Freiheitsgrad	MQ	F	p
Konstante	48653232	1	48653232	966,43	< 0,005
Typ	3780766	3	1260255	25,03	< 0,005
Fehler	3473694	69	50343		

Tab. 19: Scheffé Test; Var.: \bar{X} PZ Fläche [μm^2] Homogene Gruppen; $\alpha = 0,05$; Fehler: MQ(Zwischen) = 50343; FG = 69

Typ	PZ Fläche [μm^2], Mittel	1.	2.
UAF	645,49	****	
LAF	694,58	****	
Nacional	848,73	****	
Criollo	1177,19		****

Tab. 20: Univariate Signifikanztests für \bar{X} SZ Fläche [μm^2]
Sigmabeschränkte Parametrisierung; Typ VI Dekomposition (Effektive Hypothese)

	SQ	Freiheitsgrad	MQ	F	p
Konstante	15037892	1	15037892	2808,14	< 0,005
Typ	560327	3	186776	34,88	< 0,005
Fehler	369503	69	5355		

Tab. 21: Scheffé Test; Var.: \bar{X} SZ Fläche [μm^2]
Homogene Gruppen, $\alpha = 0,05$; Fehler: MQ(Zwischen) = 45304; FG = 69

Typ	SZ Fläche [μm^2], Mittel	1.	2.
UAF	407,89	****	
LAF	408,37	****	
Nacional	453,99	****	
Criollo	601,08		****

Die typspezifischen Unterschiede in der Größe der Flächen der beiden verschiedenen Zelltypen werden auch durch das Streudiagramm dieser Zellflächen in Abb. 74 verdeutlicht. Die Criollo-Proben befinden sich hier fast vollständig im oberen Bereich des Diagramms. Zudem belegt das Diagramm eine signifikant positive Korrelation zwischen den Flächen der SZ und jenen der PZ.

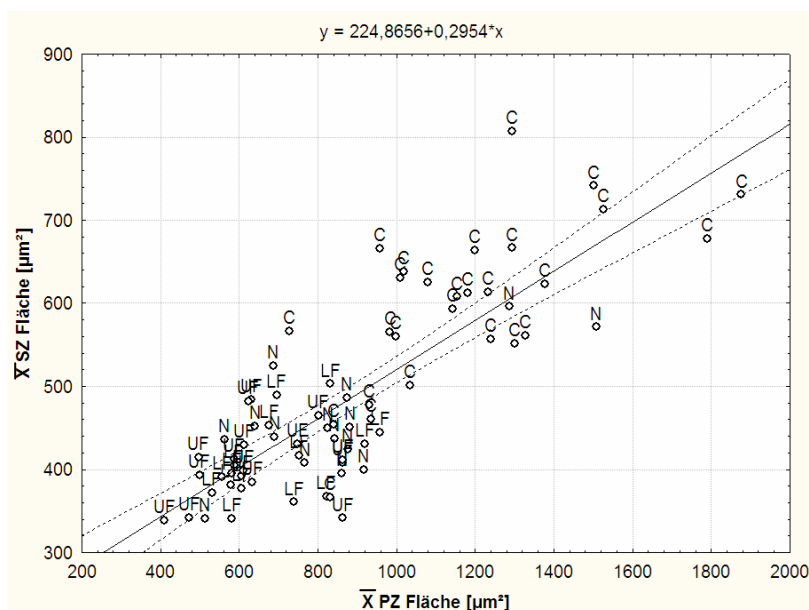


Abb. 74: Streudiagramm der samenspezifischen PZ- sowie der SZ-Flächen mit Zuordnung der Einzelwerte zu den Kakaotypen Criollo (C), UAF (UF), LAF (LF) und Nacional (N)

In den untersuchten Proben der einzelnen Kakaotypen kommen die statistisch erfassten SZ auf Zellflächen von 37,9 % bis 83,5 % der Flächen der PZ (Anhang; Tab. 27). Innerhalb dieser relativ großen Spannweite wurden per Mittelwertvergleich typspezifische Unterschiede festgestellt (Abb. 75).

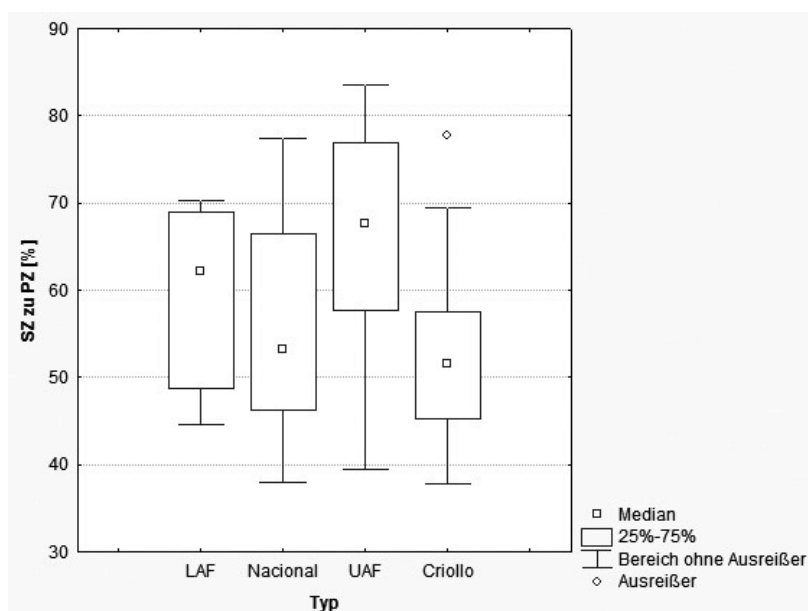


Abb. 75: Mittelwertvergleich der typspezifischen, prozentualen Flächenverhältnisse der SZ zu den jeweiligen PZ

Per ANOVA mit anschließenden Scheffé-Test wurde mit $F = 5,44$ und $p < 0,005$ ein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Flächenverhältnissen (SZ zu PZ) der Typen Criollo und UAF nachgewiesen (Tabellen 22 und 23).

Tab. 22: Univariate Signifikanztests für Flächenverhältnis SZ zu PZ [%]
Sigmabeschränkte Parametrisierung; Typ VI Dekomposition (Effektive Hypothese)

	SQ	Freiheitsgrad	MQ	F	p
Konstante	236196,6	1	236196,6	2005,088	< 0,005
Typ	1924,0	3	641,3	5,444	< 0,005
Fehler	8128,1	69	117,8		

Tab. 23: Scheffé Test; Var.: prozentuales Flächenverhältnis SP zu PP.
Homogene Gruppen; $\alpha = 0,05$; Fehler: MQ(Zwischen) = 117,80; FG = 69

Typ	Flächenverhältnis SZ zu PZ [%]; Mittel	1.	2.
Criollo	52,37	****	
Nacional	56,20	****	****
LAF	60,24	****	****
UAF	65,72		****

Die untersuchten UAF-Proben weisen demnach einen signifikant kleineren Unterschied zwischen den Zellflächen ihrer PZ und SZ auf als jene vom Criollo-Typ.

Mit dem ebenfalls typabhängigen Trockengewicht der Kakaosamen sind die Flächen der SZ bzw. der PZ leicht positiv korreliert (siehe Abb. 76 und 77). So besitzen die untersuchten Samen des UAF-Typs im Durchschnitt die kleinsten Samen und stellen auch die Proben mit dem kleinsten Zellflächen. Gleichzeitig zeichnen sich viele der untersuchten Criollo-Samen nicht nur durch große Zellflächen, sondern auch durch ein hohes Samengewicht aus. Nicht alle Proben mit hohem Samen-Trockengewicht besitzen jedoch auch große Zellflächen. Dies belegen z. B. die Proben des Nacional-Typs, unter welchen sich die Samen mit dem höchsten Trockengewicht, aber nicht jene mit den größten Zellflächen befinden. Zudem besitzen die Criollo-Samen der Varietät „Porcelana blanco“ von allen untersuchten Proben das niedrigste Trockengewicht (siehe Abb. 76 und 77; eingekreist) und zeichnen sich dennoch durch signifikant größere Speicher- und Polyphenolzellen als die untersuchten Proben von NA 33 und Catongo aus. Demnach besitzt die Größe der Kakaosamen höchstens einen untergeordneten Einfluss auf die Größe der Zellen des Speicherparenchyms.

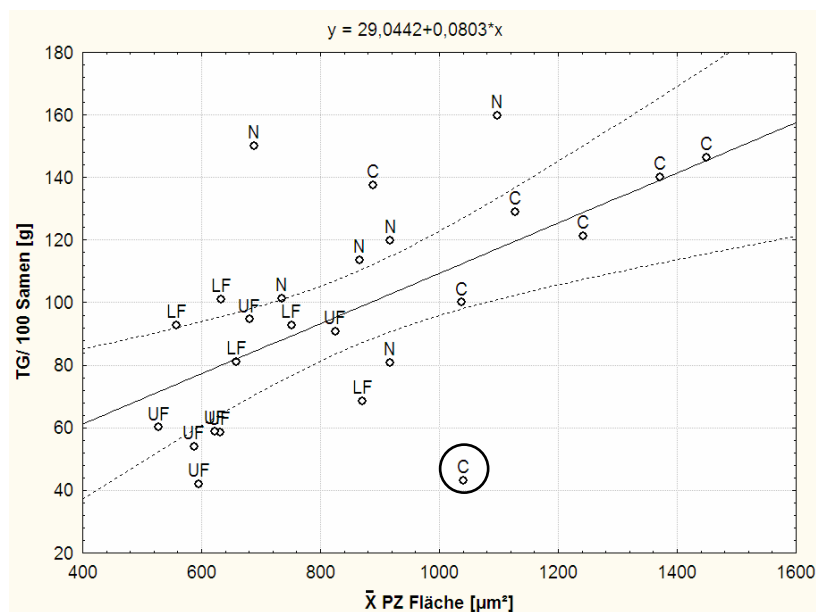


Abb. 76: Streudiagramm der fruchtspezifischen PZ-Flächen und der jeweiligen 100-Bohngewichte mit Zuordnung der Einzelwerte zu den Kakaotypen Criollo (C), UAF (UF), LAF (LF) und Nacional (N). **Schwarz umkreister Wert:** Porcelana

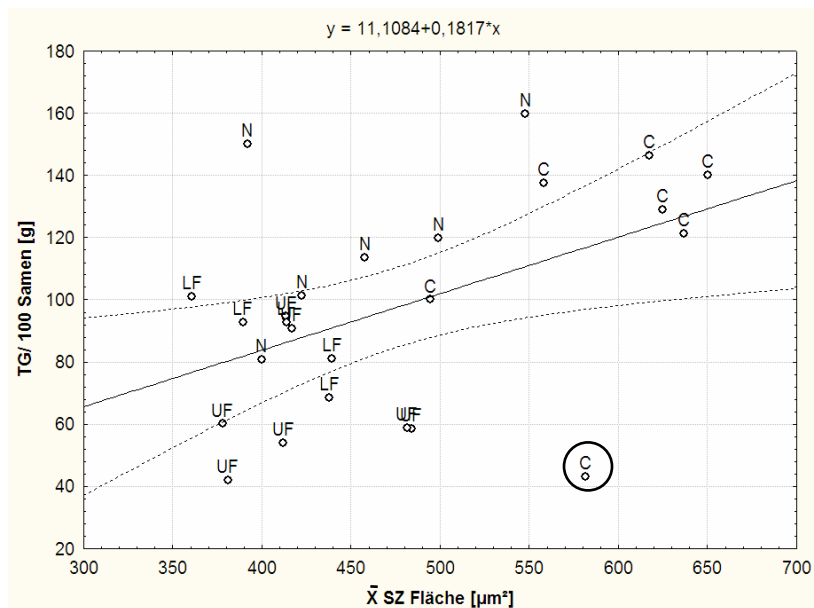


Abb. 77: Streudiagramm der fruchtspezifischen SZ-Flächen und der jeweiligen 100-Bohngewichte mit Zuordnung der Einzelwerte zu den Kakaotypen Criollo (C), UAF (UF), LAF (LF) und Nacional (N). **Schwarz umkreister Wert:** Porcelana

Ein Abgleich der ermittelten Zellflächen mit weiteren, in den Tabellen 2 und 3 zusammengefassten Eigenschaften des jeweiligen Genotyps sowie der spezifischen, untersuchten Probe (Anhang, Tab. 25) erwies sich als nicht sinnvoll, da diese Daten nicht von allen untersuchten mikroskopischen Proben bekannt waren.

Aufgrund zu geringer Datenmengen wurde auch von einem Vergleich der Zellflächen hinsichtlich der bekannten Daten zu den Standortfaktoren (Tab. 6) verzichtet.

4.6.4 Der histologische Aufbau des reifen Keimblattgewebes von *T. cacao* L.

Abb. 78 zeigt die Längsschnitte durch das Keimblattgewebe zweier fixierter Kakaosamen. Auf Bild a ist ein ursprünglich weiß gefärbter Criollo-Samen der Population „Criollo Mérida“ zu sehen, b zeigt einen hellvioletten Samen des Klons EET 95 des „Nacional“-Typs. Besonders in dem zuletzt genannten Präparat sind die Polyphenolzellen bereits bei dieser vergleichsweise geringen Vergrößerung gut als violett gefärbte, gleichmäßig verteilte Einsprengsel im Keimblattgewebe zu erkennen. Gut erkennbar ist in beiden abgebildeten Längsschnitten die starke Faltung des Kotyledonargewebes.

Das Gewebe beider Samen weist in Folge von Oxidations- und Vergerbungsreaktionen deutliche Verbräunungen auf. Im Falle des Criollo-Samens (Abb. 78 a) sind davon besonders die Epidermis der Kotyledonen sowie die Bereiche um die in das Keimblattgewebe eingelagerten Leitbündelelemente betroffen. Bei dem Samen des Klons EET 95 beschränkt sich die Verbräunung hauptsächlich auf die Embryonalachse.

Abb. 78 c zeigt einen zentralen Querschnitt durch das Keimblattgewebe eines fixierten Samens von EET 95. Erneut weist das Präparat vornehmlich in den Bereichen der Epidermis und der Leitbündelelemente Verbräunungen auf. Auch im Querschnitt wird die starke Faltung der beiden Keimblätter deutlich.

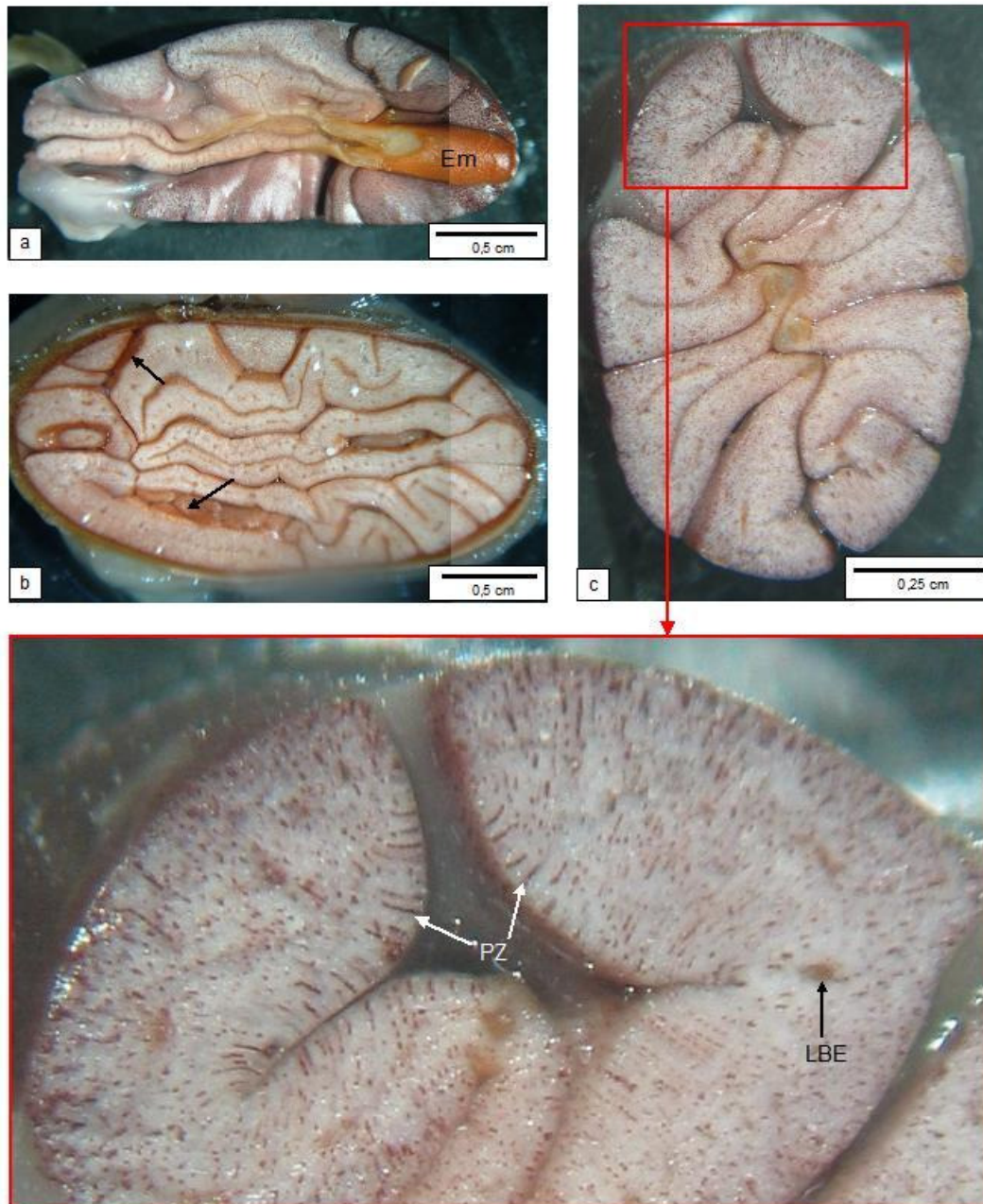


Abb. 78: Keimblattgewebe von *T. cacao* L., längs (a, b) und quer (c) geschnitten
E: Embryonalachse, **PZ:** Polyphenolzellen, **LBE:** Leitbündelelement

Ebenfalls sind die Polyphenolzellen im Speichergewebe erkennbar. Neben einer durch diese Idioblasten hervorgerufenen, gleichmäßigen Sprengelung des Parenchyms weist der abgebildete Samen-Querschnitt auch reihenförmig angeordnete Polyphenolzellen auf. Diese sind vornehmlich auf der adaxialen Seite unmittelbar unterhalb der Keimblattepidermis positioniert. Im in Abb. 78 c dargestellten Ausschnitt, welcher die äußeren Randbereiche der Kotyledonen zeigt, sind auch auf der abaxialen Seite Reihen von Polyphenolzellen zu erkennen, die jedoch weniger stark ausgeprägt sind.

Abbildung 80 a zeigt die mikroskopische Aufnahme von einem Vibratomschnitt durch einen solchen Randbereich des Keimblattgewebes von *T. cacao* L. Besonders im unteren,

rechten Abschnitt können die oben beschriebenen, charakteristischen Reihenbildungen von Polyphenolzellen beobachtet werden. Diese beginnen unmittelbar unterhalb der Epidermis und bestehen aus bis zu 10 Einzelzellen (ohne Abbildung). Abb. 79 d zeigt, dass auch die umgebenden Speicherzellen in parallel verlaufenden Reihen angeordnet sind. Im gesamten Parenchym unterhalb der mehr oder weniger zentral eingelagerten Leitbündelelemente (LBE) herrscht diese aus gleichmäßigen Zellreihen aufgebaute Struktur des Keimblattgewebes vor. Auf der anderen Seite der Leitbündelelemente weist das Keimblattparenchym keine derartige Reihenstruktur auf. Im oberen Abschnitt des Bildausschnitts ist eine reihenförmige Anordnung von Speicher- und Polyphenolzellen zwar noch erkennbar; im Abschnitt rechts unten fehlt sie jedoch ganz. Die Polyphenolzellen sind gleichmäßig im Parenchymgewebe verteilt; teils einzeln, meist jedoch in Clustern, welche im Flächenschnitt aus durchschnittlich 3, teilweise auch bis zu 7 Polyphenolzellen bestehen.

Abb. 79 b zeigt das Foto eines Semidünnschnittes durch das Speichergewebe eines Kakao-Keimblattes, dessen Zellinhalte durch Artefaktbildung (s.o.) nicht erhalten geblieben sind (s. o.). Deutlich wird jedoch das Fehlen jeglicher reihenförmiger Anordnung von Parenchymzellen im gesamten fotografierten Ausschnitt, der mehrere Keimblattfalten und LBE aufweist (siehe Beschriftungen).

In Abb. 79 e und f werden Ausschnitte mit unstrukturiert angeordneten Parenchymzellen dem Ausschnitt mit einer typischen Reihenstruktur gegenübergestellt.

Die Auswertung aller untersuchten Semidünnschnittpräparate ergab, dass reihenförmige Strukturen von Parenchymzellen immer unmittelbar unter der Keimblattepidermis beginnen und sich von dort aus maximal bis zu den zentral in das Parenchym eingelagerten LBE erstrecken.

Aus geordneten Zellreihen aufgebautes Parenchymgewebe wurde nur in 53 der insgesamt 219 untersuchten Semidünnschnitte gefunden, was einen Anteil von 24 % entspricht (siehe Anhang; Tab. 27). Eine unstrukturierte Anordnung der Parenchymzellen überwiegt demnach bei weitem.

In 43 % der Präparate mit aus Zellreihen aufgebautes Parenchymgewebe konnte dieses anhand der Ausrichtung der Leitbündelelemente der adaxialen Keimblatt-Seite zugeordnet werden, welche der Blatt-Oberseite entspricht. Bei den übrigen 57 % der Präparate konnte die Ausrichtung der Reihenstrukturen aufgrund fehlender Leitbündelelemente nicht ermittelt werden. In keinem der Präparate mit streng reihenförmig angeordnetem Parenchymgewebe konnte dieses eindeutig der abaxialen Seite zugeordnet werden. Lose strukturiertes Speichergewebe fand sich hingegen sowohl auf eindeutig abaxialer (= „der Achse abgewandter“) wie auf adaxialer Seite.

Unabhängig vom strukturellen Aufbau des Parenchyms wurden darin weder größere Interzellularen noch mazeriertes Gewebe beobachtet.

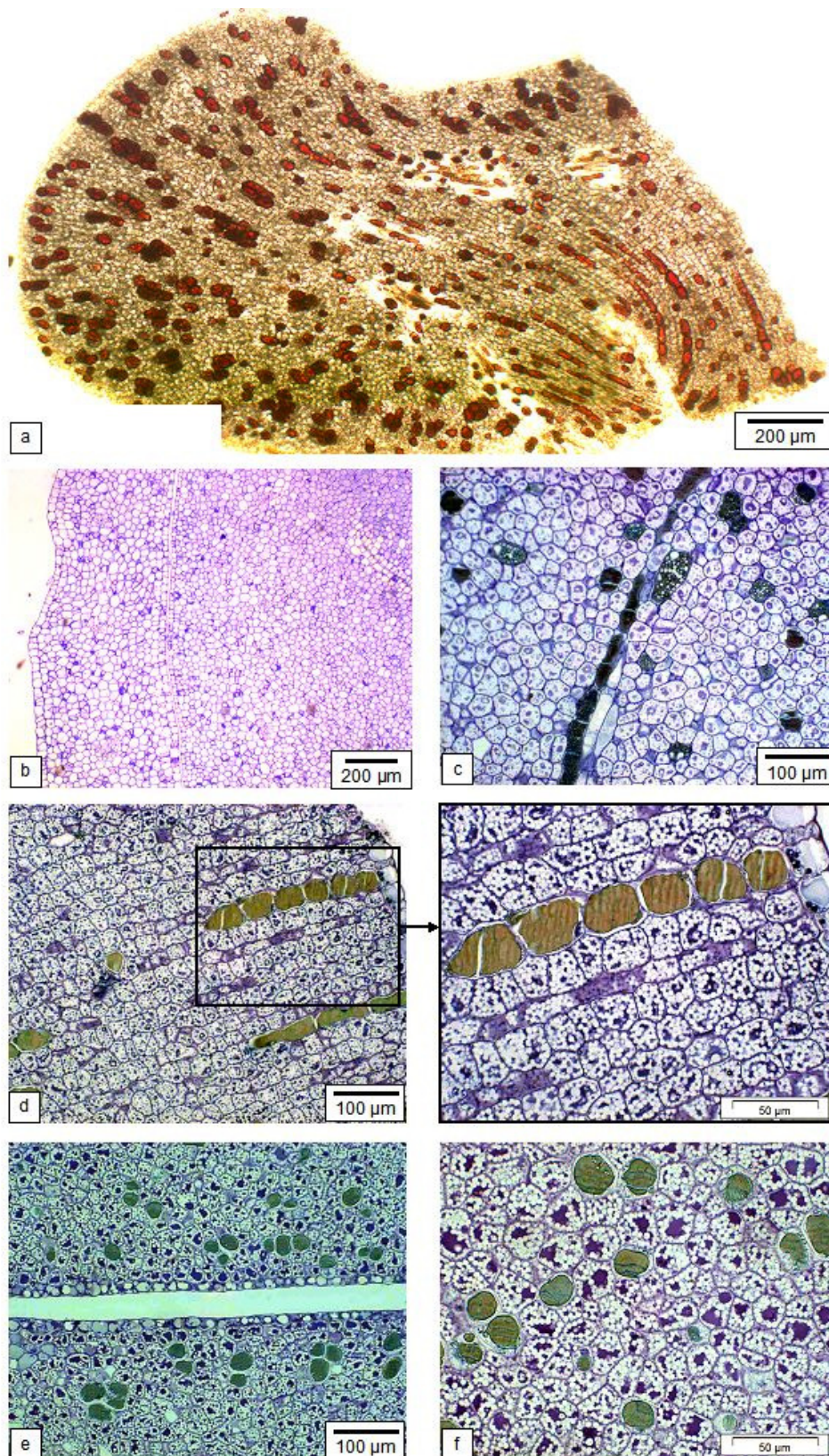


Abb. 79: Keimblattparenchym von *T. cacao* L.
a: Vibratomschnitt, ungefärbt; **b-f:** Semidünnschnitte, gefärbt mit Toluidinblau O
a: äußerer Randbereich, z. T. mit Zellreihen; **b:** Parenchym ohne Zellreihen;
c: Parenchym mit PP-Zellreihe aus dem Randbereich eines LBE, **d, e:** PP-Zellreihen
 adaxial, **e, f:** Cluster von PZ unterhalb der Epidermis (**e**) und in tieferen Lagen des
 Parenchyms (**f**)

4.6.4.1 Die Struktur der Leitbündelelemente

Die Keimblätter von *T. cacao* L. besitzen ein Netz aus Blattadern, die sich in Haupt- und Nebenadern differenzieren (Verzweigungen siehe Abb. 80 f und g). Haupt- und Nebenadern unterscheiden sich dabei durch unterschiedliche Durchmesser voneinander (Abb. 80 d und e). Die gut ausdifferenzierten Transportgefäße liegen ziemlich zentral in das Speicherparenchym der Kotyledonen eingelagert (Abb. 80 b und c).

Die Struktur der Leitbündelelemente entspricht dem für Dikotyledonen typischen, offen kollateralen Typ mit adaxialem Xylem, abaxialem Phloem sowie einer dazwischen liegenden Schicht dünnwandiger Kambiumzellen (Abb. 80 d). Die Zellen der Bündelscheide sind nicht lignifiziert. Das Xylem besitzt lignifizierte, schraubenförmige Wandverdickungen (Schraubengefäße, Abb. 80 f). Die Feinstruktur der stark prosenchymatischen Siebelemente des Phloems konnte mit der hier verwendeten, lichtmikroskopischen Technik nicht genauer beschrieben werden (Abb. 80 d und g). Vereinzelt wurden die für diese Strukturen typischen Geleitzellen gefunden.

Die in direkter Nachbarschaft zu den LBE gelegenen Speicherparenchymzellen besitzen oftmals eine ähnliche cytologische Struktur, die auch in Zellreihen unmittelbar unterhalb der Keimblattepidermis beobachtet wurde (siehe 4.6.3). Sie haben im Vergleich zu den anderen SZ vergrößerte, aber schwächer kontrastierte Proteinvakuolen und einen flächenmäßig geringeren Anteil an Lipidvakuolen (Abb. 80 e).

Vor allen Dingen im Parenchym des Phloems, aber auch des Xylems sowie in der Bündelscheide finden sich gehäuft Polyphenolzellen, die oft lange Reihen bilden (Abb. 80 c, Abb. 80 d, e und g). Ähnlich wie die gewöhnlichen Parenchymzellen dieser Bereiche besitzen auch die hier vorkommenden Polyphenolzellen meist eine stark prosenchymatische Form.

Nach dem Anschneiden frischen Keimblattgewebes von *T. cacao* L. kommt es speziell im Bereich der Leitbündelelemente zu einer schnellen, starken Verbräunung des Gewebes (siehe Abb. 78 c).

4.6.4.2 Epidermis und Trichome

Die Epidermiszellen der Keimblätter von *T. cacao* L. werden zum größten Teil von einer Vakuole ausgefüllt, deren Inhalt nach der in 3.14.4 beschriebenen Toluidinblau O-Färbung völlig kontrastlos erscheint. Im randständigen Cytoplasma finden sich dunkel gefärbte Granula, bei denen es sich offenbar um Stärkekörner handelt. Auch einige Lipidvakuolen sind erkennbar; daneben Bereiche, deren Kontrastierung jener der Proteinvakuolen in den Speicherparenchymzellen entspricht (Abb. 80 b und c). In dem in Abb. 80 a dargestellten Flächenschnitt der Keimblattepidermis sowie der darunter liegenden Zellschicht sind zudem vereinzelt auch Nuklei und Nukleoli in den Epidermiszellen zu erkennen. In keiner der im Flächenschnitt dargestellten, gewöhnlichen Epidermiszellen konnten Einlagerungen phenolischer Substanzen in den Vakuolen gefunden werden.

Im oberen Abschnitt von Abb. 80 b wurde die erste Zellschicht des Speichergewebes unterhalb der Epidermis angeschnitten (dunkler kontrastierte Zellen). Diese zeichnet sich durch die bereits zuvor beschriebene, von den tiefer gelegenen Speicherparenchymzellen abweichende Struktur aus (geschwollene Proteinvakuolen, geringer Fettanteil).

Die in den für die vorliegende Arbeit erstellten Präparaten vorgefundenen Trichome der Keimblattepidermis von *T. cacao* L. entsprechen der in 2.2.1.2 zusammengefassten Beschreibung früherer Arbeiten (Abb. 80 a-c). In dem Trichom auf Abb. 80 c sind dessen Polyphenolvakuolen besonders gut erhalten geblieben. Deren Inhalt wird durch das in 3.14.4 beschriebene Verfahren in gleicher Weise kontrastiert wie jener der in das Keimblattparenchym eingelagerten Polyphenolzellen. Von diesen unterscheiden sich die Trichomzellen dadurch, dass ihre Polyphenolvakuolen meist weniger Platz in der Zelle einnehmen. Bisweilen scheinen die Trichomzellen zudem mehrere kleine Polyphenolvakuolen anstelle einer großen Zentralvakuole zu besitzen (Abb. 80 c).

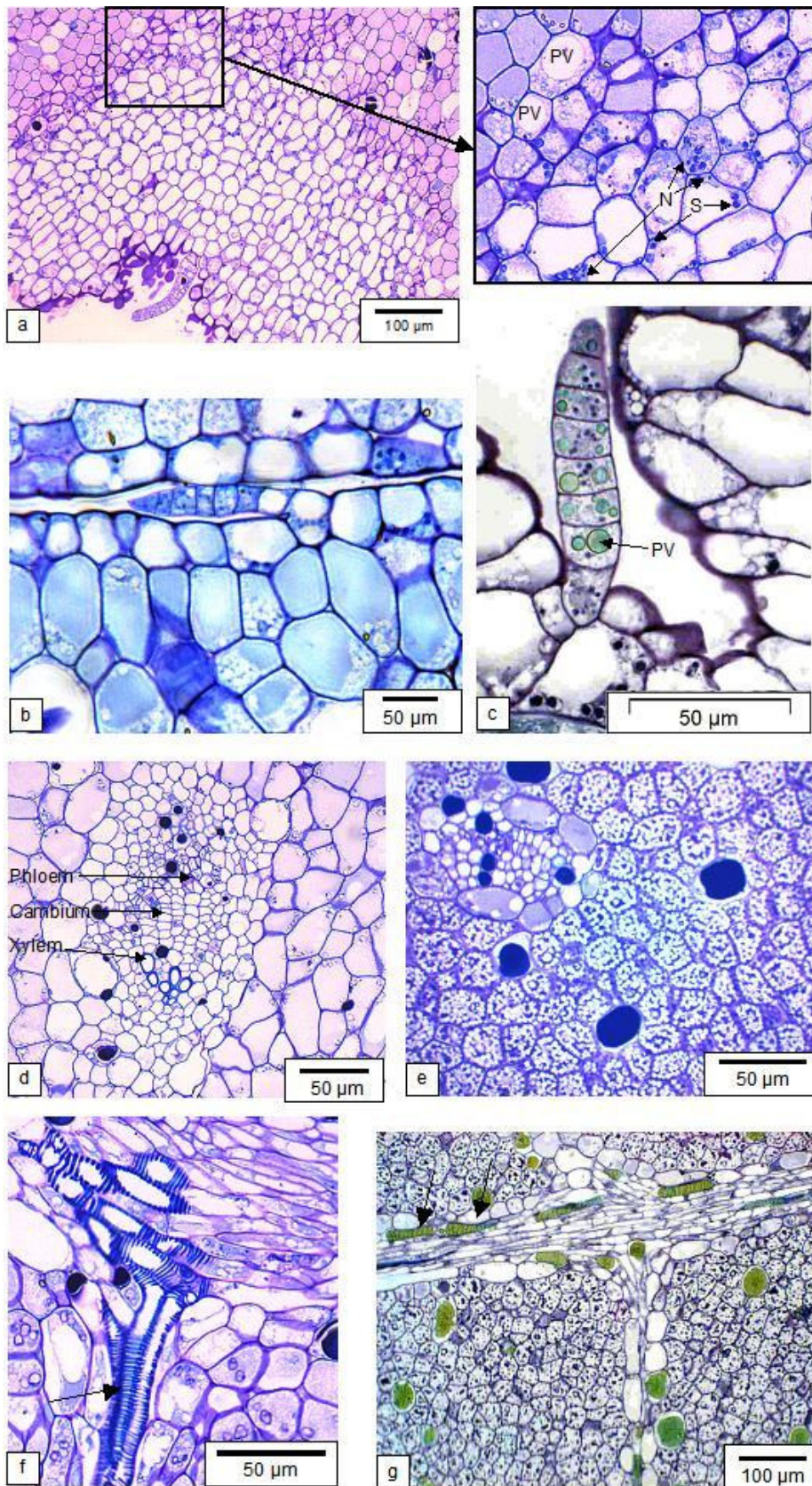


Abb. 80: Epidermis und Leitbündelelemente des Keimblattgewebes von *T. cacao* L. Semidünnschnittpräparate, gefärbt mit Toluidinblau O
a: Flächenschnitt durch die Epidermis; **b, c:** Epidermis längs mit Trichom; **d, e:** LBE quer; **f, g:** LBE längs. **N:** Nukleus mit Nukleolus; **PV:** Polyphenolvakuole; **S:** stärkehaltiger Plastid

5 Diskussion

5.1 *Zur biochemischen Untersuchung der phenolischen Inhaltsstoffe reifer, unfermentierter Kakaosamen*

5.1.1 Die qualitative Analytik einfacher phenolischer Verbindungen

Wie in 3.9 beschrieben, wurde die in der vorliegenden Arbeit verwendete RP-HPLC-PDA-Methode auf Basis der Auftrennung einer Gruppe phenolischer Substanzen entwickelt, die in einem Übersichtsartikel von Ziegleder und Biehl 1988 als phenolische Kakao-inhaltsstoffe aufgelistet wurden (Tab. 8). Die darin aufgeführten Substanzen bzw. Substanzgruppen (im Fall der Procyanidine) wurden in unterschiedlichen Literaturquellen ab 1954 bis zum Erscheinen des genannten Übersichtsartikels beschrieben. Viele davon wurden jeweils nur von einem Autor gefunden. Da es sich zumeist um Untersuchungsergebnisse aus den 50er und 60er Jahren handelt, wurden die beschriebenen Substanzen überwiegend mit heute veralteten Verfahren, wie etwa der Papierchromatographie, identifiziert.

Auf Ziegleder und Biehl 1988 berufen sich neben Jardine 1999 bis heute viele weitere Autoren, welche die phenolischen Inhaltsstoffe der Samen von *T. cacao* L. beschreiben. Dabei werden die früh veröffentlichten Nachweise phenolischer Substanzen in der Regel durch neu aus Kakaosamen isolierte phenolische Kakao-Inhaltsstoffe ergänzt. Bisher gab es jedoch keine Veröffentlichung, in welcher die gesammelten Ergebnisse früherer Arbeiten und einzelner Autoren einmal systematisch überprüft wurden. Dies wurde nun erstmals durch die vorliegende Arbeit geleistet.

Obwohl das verwendete HPLC-PDA-Verfahren der Papierchromatographie aus den 50er Jahren überlegen ist und Wiederfindungsraten von 90 % - 100 % der entsprechenden Standardsubstanzen erzielte, wurden nur knapp 1/3 der von Jardine 1999 aufgeführten phenolischen Substanzen in den analysierten Kakaoproben nachgewiesen (siehe 4.2.2).

Da ein methodisch bedingter Verlust von phenolischen Inhaltsstoffen während der Probenaufbereitung weitgehend ausgeschlossen werden kann, stellt sich die Frage, warum so viele der in der Literatur beschriebenen monomeren Polyphenole nicht gefunden wurden.

Als eine mögliche Erklärung bietet sich an, dass die von Ziegleder und Biehl 1988 zusammengetragenen und später von Jardine 1999 geringfügig erweiterten Untersuchungsergebnisse auf Genotypen basieren, die im Spektrum ihrer phenolischen Inhaltsstoffe von den im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierten Kakaoproben abweichen. Da bei der Auswahl dieser Proben auf eine möglichst große Variabilität geachtet wurde, ist dies jedoch höchst unwahrscheinlich.

So verbleiben nur 2 mögliche Erklärungen für die im Vergleich zu den eigenen Ergebnissen größere Vielfalt phenolischer Substanzen in unfermentierten, reifen Samen von *T. cacao* L:

1. Bei einigen der aufgeführten phenolischen Substanzen handelt es sich um methodisch bedingte Artefakte.
2. Die damaligen Ergebnisse wurden z. T. falsch interpretiert.

Bereits die Originalliteratur, auf welcher die von Ziegler und Biehl 1988 veröffentlichte Liste phenolischer Substanzen basiert, enthält Hinweise darauf, dass es sich bei vielen der gefundenen Substanzen wahrscheinlich um Artefakte handelt.

Hintergründe zu den einzelnen Substanzen werden im Folgenden genauer beschrieben.

5.1.1.1 Protocatechusäure und Phloroglucinol als mutmaßliche Abbauprodukte von (+)-Catechin

Ziegler und Biehl 1988 listen Protocatechusäure und Phloroglucinol als 2 der phenolischen Inhaltsstoffe frischer Kakaosamen auf (Tab. 8). Während Phloroglucinol in der durchgeführten Untersuchung nicht nachgewiesen wurde, waren in etwa einem Viertel der frischen Kakaoproben mehr oder weniger geringe Mengen von Protocatechusäure vorhanden. Nach den in 3.12 beschriebenen sauren Hydrolysen wurden im Vergleich zum Ausgangsextrakt gesteigerte Mengen von Protocatechusäure gefunden. All dies legt nahe, dass es sich bei der isolierten Protocatechusäure möglicherweise um ein Abbauprodukt handelt, welches im intakten Samengewebe gar nicht gebildet bzw. angereichert wird.

Tatsächlich deuten auch Kenyhercz und Kissinger 1978 Protocatechusäure als ein Abbauprodukt in Kakaosamen, welches zusammen mit Phloroglucinol aus Catechin gebildet wird (Abb. 81). Die Autoren finden ebenfalls deutlich größere Mengen von Protocatechusäure in fermentierten als in frischen Kakaoproben.

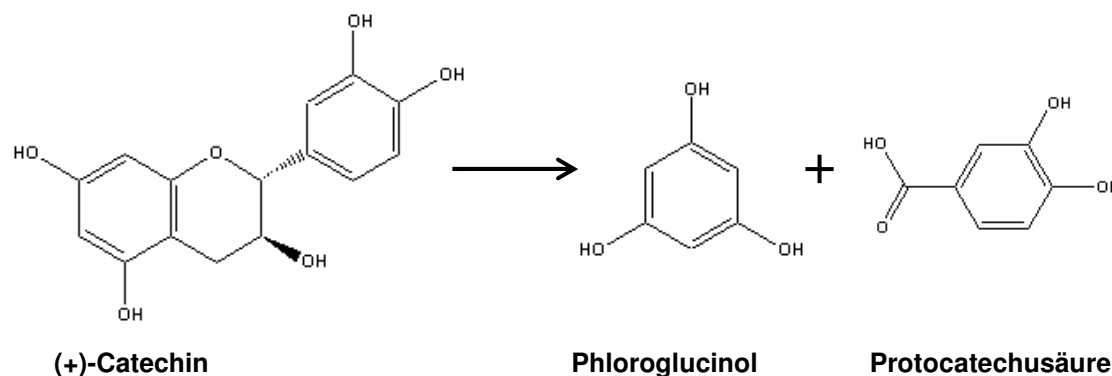


Abb. 81: Der Abbau von Catechin zu Phloroglucinol und Protocatechusäure nach Kenyhercz und Kissinger 1978

Die zumeist gar nicht oder nur in Spuren vorhandene Protocatechusäure weist somit auf die Qualität der eingesetzten Proben und ihrer Aufbereitung hin, die möglichst frei von Artefakten sein sollten. Das lichtempfindliche Phloroglucin wurde in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden. Möglicherweise ist es nach der in Abb. 81 dargestellten Reaktion mit sich und anderen phenolischen Substanzen kondensiert.

5.1.1.2 Aesculetin als mögliches Artefakt von Kaffeesäure-Derivaten

Ausschließlich Quesnel 1965 findet das zu den Cumarinen zählende Aesculetin (Abb. 12), jedoch nur in Spuren und ausschließlich in fermentierten Kakaosamen. Der Autor vermutet daher, dass es sich bei dieser Substanz um ein Oxidationsprodukt von Kaffeesäure (Abb. 12) handelt, das erst während der Chromatographie entstanden ist.

Das Auftreten von Aesculetin in intakten Kakao-Polyphenolzellen ist schon deswegen unwahrscheinlich, da es sich bei den Cumarinen um eine Stoffgruppe handelt, die meistens erst nach dem Absterben der Zellen durch Welkprozesse oder durch Gewebeverletzung entsteht. Dabei geht der Bildung von Cumarinen die enzymatische Deglycosylierung einer Zimtsäure voraus (Strasburger *et al.* 1998), bei der es sich im Falle von Aesculetin um Aesculin handelt. Der Bildung der Vorläufersubstanz Aesculin liegt wiederum Kaffeesäure zugrunde.

In Kakao wurden bisher noch nie Kaffeesäureglycoside nachgewiesen. Die strukturelle Verwandtschaft der Substanz Aesculetin mit Kaffeesäure macht es wahrscheinlich, dass dieses Cumarin sich als Artefakt der in Kakaosamen vorhandenen Kaffeesäure-Derivate (wie etwa dem Kaffeesäure-aspartat) gebildet hat. Eine nicht-enzymatische Umwandlung von Kaffeesäure in Aesculetin während der Papierchromatographie wurde bereits von Butler und Siegelmann 1959 beschrieben.

5.1.1.3 Weitere mögliche Artefakte aus der Gruppe der Phenolsäuren und Phenylelessigsäuren

Als weitere phenolische Inhaltsstoffe wurden in Kakaoextrakten die Substanzen *p*-Hydroxybenzoesäure, *o*-Hydroxy-phenylelessigsäure, *p*-Hydroxy-phenylelessigsäure, Phenylelessigsäure, Syringasäure sowie Vanillinsäure gefunden (siehe 2.1.1.2 und 2.1.1.3). Der Nachweis dieser Substanzen in Kakao erfolgte erstmals durch Quesnel 1965; die Inhaltsstoffe *o*-Hydroxy-phenylelessigsäure und Vanillinsäure werden außerdem auch von Kenyhercz und Kissinger 1978 beschrieben. Auffällig ist, dass Quesnel 1965 alle von ihm detektierten phenolischen Säuren in fermentierten Kakaoproben in größeren Mengen findet als in solchen, die nicht fermentiert sind. Einige kommen laut den Untersuchungen des Autors sogar ausschließlich in fermentierten Kakao vor. Das Auftreten einzelner aromatischer Säuren und ihrer Derivate wird daher bereits vom Autor als mögliches Artefakt diskutiert.

Nach Rios *et al.* 2003 erhöht sich der Gehalt einfacher Phenolsäuren im menschlichen Urin nach dem Konsum von Kakao. Die Autoren finden dabei unter anderem 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, *m*-Hydroxyphenylelessigsäure, Vanillinsäure und *m*-Hydroxybenzoesäure. Somit handelt es sich um Substanzen, welche mit den in Ziegleder und Biehl 1988 gelisteten Inhaltsstoffen identisch oder zumindest strukturell eng verwandt sind. Rios *et al.* 2003 deuten die von ihnen gefundenen Substanzen als Abbauprodukte der kakaoeigenen, monomeren und polymeren Flavonoide, welche durch Mikroorganismen im Gastro-Intestinaltrakt produziert wurden.

Aus den hier aufgeführten Literaturangaben lässt sich schließen, dass es sich bei den oben aufgeführten, angeblichen phenolischen Inhaltsstoffen frischer Kakaosamen sehr wahrscheinlich ebenfalls um Artefakte handelt, die sich im Verlauf der analytischen Aufarbeitung aus den in Kakao enthaltenen monomeren Flavan-3-olen und den Procyanidinen gebildet haben.

5.1.1.4 Zum Vorkommen freier und mit Chinasäure veresterter Hydroxyzimtsäuren in Extrakten frischer Kakaosamen

Wie in Kapitel 2.1.2.1 dargestellt, handelt es sich bei den in der Literatur beschriebenen, freien Hydroxyzimtsäuren in Kakaosamen um Kaffeesäure, Cumarsäure und Ferulasäure. Als strukturell eng verwandte Substanz wurde durch Quesnel 1965 außerdem Phloretinsäure aus Kakaosamen isoliert (siehe Abb. 11).

Keine der hier aufgeführten Substanzen wurde durch die verwendete RP-HPLC-PDA-Methode in Extrakten reifer, unfermentierter Kakaosamen nachgewiesen, obwohl anhand von entsprechenden Referenzstandards nach ihnen gesucht wurde (siehe 3.9). Freie Hydroxyzimtsäuren wurden auch durch keine der zahlreichen Veröffentlichungen über die phenolischen Kakaoinhaltsstoffe der letzten Jahre erneut in Kakaoextrakten nachgewiesen. Hingegen wurden sie als Bestandteile von HCAA gekoppelt an verschiedene Aminosäuren isoliert (Stark und Hofmann 2005, Stark *et al.* 2006b, Tomas-Barberán *et al.* 2007). Rios *et al.* 2003 beschreibt Phloretinsäure und Ferulasäure als mikrobielle Abbauprodukte kakaoeigener Procyanidine. Interessanterweise halten es bereits Kenyhercz und Kissinger 1978 für wahrscheinlich, dass es sich bei der von ihnen identifizierten freien Kaffeesäure um ein Abbauprodukt handelt.

Erneut scheint es sich demnach bei den in früheren Literaturdaten beschriebenen, freien Hydroxyzimtsäuren um Artefakte zu handeln.

Zu diskutieren ist abschließend die Frage, warum durch die in dieser Arbeit angewendeten analytischen Methoden keine Chlorogensäure aus Kakaosamen isoliert wurde.

Verbindungen zwischen Kaffee- und Chinasäure wurden bereits durch Rohan und Connell 1964 sowie durch Jalal und Collin 1977 in Kakaoextrakten identifiziert. Nach Quesnel 1965 finden sich in Kakaoextrakten jedoch nur zu diesem Zeitpunkt unidentifizierte Moleküle mit Eigenschaften, die jenen von Chlorogensäure ähnlich sind; keineswegs handele es sich bei diesen jedoch tatsächlich um Chlorogensäure. Dies lässt vermuten, dass es sich dabei auch um Vertreter aus der Gruppe der Zimtsäureamide handeln könnte, welche erstmals von Sanbongi *et al.* 1998 in Kakaoextrakt beschrieben wurden (siehe 2.1.2.5).

Unter den Veröffentlichungen jüngerer Datums bestätigt ausschließlich Wollgast 2005 das Vorhandensein von Chlorogensäure in Kakaoextrakten. Der Autor identifiziert dabei Spuren dieser Substanz in Kakao-Liquor anhand eines Vergleichs von Retentionszeit und CID-MS-MS Spektrum mit einem Referenzstandard. Tomas-Barberán *et al.* 2007 finden

hingegen mit vergleichbarer Methodik keine Chlorogensäure in Kakaosextrakten, obwohl auch diese Autoren die Substanz mit Hilfe einer authentischen Referenzsubstanz zu isolieren und zu identifizieren versuchten. Die Autoren untersuchten dabei Extrakte aus unfermentiertem Samenmaterial, in welchem der Gehalt von Chlorogensäure im Vergleich zu dem von Wollgast 2005 untersuchten, fermentierten Kakao-Extrakt eigentlich deutlich höher sein müsste. Zur Verifizierung des Vorhandenseins von Chlorogensäure in Kakaosamen ist daher ein erneuter Nachweis dieser Substanz erforderlich; gerade vor dem Hintergrund der vielen neu isolierten Zimtsäureamide mit z. T. ähnlichem Molekulargewicht. In jedem Fall scheint Chlorogensäure - wenn überhaupt - nur in geringsten Mengen in Kakaosamen vorzukommen, was hinlänglich erklärt, warum sie durch die Untersuchungen innerhalb der vorliegenden Arbeit nicht gefunden wurde.

5.1.2 Zur qualitativen Analytik der Flavonoide

5.1.2.1 Zur Gruppe der Flavan-3-ole

Im Ergebnisteil 4.2.2 wird dargestellt, dass es sich bei den meisten der im Rahmen der vorliegenden Arbeit isolierten Peaks phenolischer Inhaltsstoffe ihrem Spektrum nach um mono-, oligo- oder polymere Flavan-3-ole handelt. Anhand eines Vergleichs mit den zur Verfügung stehenden Referenzstandards konnten aus dieser Gruppe die Monomeren (-)-Epicatechin, (+)-Catechin sowie möglicherweise Spuren von (-)-Epigallocatechin identifiziert werden. Bei den ersten beiden der genannten Substanzen handelt es sich gleichzeitig um die beiden in den größten Mengen vorkommenden monomeren Catechine in Samen von *T. cacao* L., wobei (-)-Epicatechin außerdem das quantitativ wichtigste phenolische Monomer von Kakaosamen überhaupt ist (siehe 2.1.4.1). Neben diesen anhand von Referenz-Standards identifizierten Flavan-3-olen wurde auch die Fläche eines weiteren Peaks dieser Gruppe ausgewertet (Substanz „C“, siehe 4.2.3.4). Der Peak besitzt eine vergleichsweise große Fläche und ist positiv mit dem Gehalt an (-)-Epicatechin der jeweiligen Kakaoproben korreliert. Dies macht es wahrscheinlich, dass es sich bei der Substanz „C“ um eines der prominenten Kakao-Procyanidine B2, C1 oder B5 handelt, welche jeweils aus (-)-Epicatechin-Bausteinen aufgebaut sind. Eine Verifizierung der Identität des Peaks „C“ mit Hilfe von (inzwischen im freien Handel erhältlichen) Referenzstandards wäre für weiterführende Arbeiten durchaus wünschenswert. Da innerhalb der vorliegenden Arbeit jedoch hauptsächlich die monomeren phenolischen Inhaltsstoffe thematisiert wurden, reicht an dieser Stelle der Hinweis, dass es sich bei „C“ mit aller Wahrscheinlichkeit nicht um (+)-Gallocatechin handelt, da diese Substanz, wenn überhaupt, offenbar nur in geringen Spuren in Kakaosamen vorhanden ist (siehe 2.1.4.1).

5.1.2.2 Zur Substanz Quercetin und ihrer Glycoside

Nach den in den vorliegenden Arbeiten gesammelten Ergebnissen enthalten reife, unfermentierte Kakaosamen offenbar kein freies Quercetin. Dies bestärkt die in Abschnitt

2.1.4.3 aufgestellte Hypothese, dass freies Quercetin in Kakaoextrakten grundsätzlich das Produkt einer Deglycolisierung im Verlauf der Weiterverarbeitung frischen Kakaomaterials ist.

Bei dem dritten, im Chromatogramm bei 371,6 nm auftretenden Peak handelt es sich vermutlich um eines der neben Quercetin-3-galactosid und Quercetin-3-glucosid in der Literatur beschriebenen Quercetin-Glycoside von Kakao; wie etwa dem von mehreren Autoren isolierten Quercetin-3-*o*-arabinosid (siehe 2.1.4.3).

5.1.2.3 Zur Gruppe der Anthocyane

Neben den hinlänglich bekannten Kakao-Anthocyanen 3- α -*L*-Arabinosidyl-cyanidin und 3- β -*D*-Galactosidyl-cyanidin wiesen die Chromatogramme der untersuchten Kakaoproben bei 520 nm noch 2 weitere, deutlich kleinere Peaks auf (Abb. 41). Bei diesen Substanzen könnte es sich um das von Cakirer 2003 beschriebene Rutinosid sowie um das Pentosid handeln (siehe 2.1.4.2).

5.1.3 Zusammenfassung der qualitativen Analytik phenolischer Monomere in reifen, unfermentierten Kakaosamen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Vorhandensein der in Ziegleder und Biehl 1988 bzw. in Jardine 1999 tabellarisch aufgeführten phenolischen Monomere anhand einer großen Bandbreite verschiedener Kakao-Polyphenolextrakte überprüft. Obwohl ein entsprechend entwickelter HPLC-Gradient eine optimale Auftrennung gewährleistete und authentische Standardsubstanzen für ihre Identifikation zur Verfügung standen, wurden viele dieser Substanzen nicht gefunden. In den Kapiteln 5.1.1 und 5.1.2 wird erläutert, dass viele der in der Literatur aufgeführten, angeblichen phenolischen Kakao-Inhaltsstoffe mit großer Wahrscheinlichkeit in reifen, unfermentierten Kakaosamen gar nicht oder nur in geringsten Mengen vorkommen. Somit werden in der entsprechenden Literatur viele Substanzen beschrieben, bei denen es sich wahrscheinlich um Artefakte handelt, welche z. B. im Verlauf der Probenaufbereitung entstanden sind. Zusätzlich wurden einige dieser phenolischen Substanzen möglicherweise falsch identifiziert. Manche davon sind außerdem offenbar nur in Spuren vorhanden, welche unterhalb der Nachweisgrenze des in der vorliegenden Arbeit verwendeten RP-HPLC-Verfahrens lagen.

Tab. 24 fasst die einzelnen Erläuterungen zu den jeweiligen phenolischen Inhaltsstoffen zusammen.

Das Vorhandensein der meisten phenolischen Monomere in Kakaosamen, welche in Jardine 1999 aufgeführt, jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht gefunden werden, ist äußerst fraglich. Daher sollten sie aus den bis heute immer wieder veröffentlichten Auflistungen phenolischer Kakao-Inhaltsstoffe gestrichen oder nochmals mit Hilfe modernster Verfahren verifiziert werden.

Tab. 24: monomere phenolische Substanzen und ihr Vorkommen in frischen Kakaosamen

Phenolische Substanz	bestätigtes Vorkommen in Kakaosamen	Erklärung für die Beschreibung der Substanz in früheren Arbeiten
Aesculetin	nein	mögliches Abbauprodukt von Kakao-HCAA (Butler und Siegelmann 1959)
(+)-Catechin	ja	
Chlorogensäure	nein	mögliche Fehlidentifikation eines HCAA (Quesnel 1965, Stark <i>et al.</i> 2005 u.a.)
3- α -L-Arab.-cyanidin	ja	
3- β -D-Gal.-cyanidin	ja	
<i>p</i> -Cumarsäure	nein	mögliches Abbauprodukt von Kakao-Flavonoiden oder HCAA (Stark <i>et al.</i> 2005 u.a.)
Kaffeesäure	nein	mögliches Abbauprodukt von Kakao – Flavonoiden oder HCAA (Stark <i>et al.</i> 2005 u.a.)
(-)-Epicatechin	ja	
(-)-Epigallocatechin	ja (Spuren)	
Ferulasäure	nein	mögliches Abbauprodukt von Kakao-Flavonoiden oder HCAA (Rios <i>et al.</i> 2003)
(+)-Galocatechin	nein	möglicherweise in Spuren unterhalb der Nachweisgrenze vorhanden
HCAA (Hydroxycimtsäureamide)	ja	Identifiziert wurde Kaffeesäure-aspartat, weitere HCAA werden beschrieben in Stark <i>et al.</i> 2005, Stark <i>et al.</i> 2006b, Stark und Hofmann 2005
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure	nein	mögliches Abbauprodukt von Kakao – Flavonoiden (Rios <i>et al.</i> 2003)
<i>o</i> -Hydroxy-phenylelessigsäure	nein	mögliches Abbauprodukt von Kakao – Flavonoiden (Rios <i>et al.</i> 2003)
<i>p</i> -Hydroxy-phenylelessigsäure	nein	mögliches Abbauprodukt von Kakao – Flavonoiden (Rios <i>et al.</i> 2003)
Neochlorogensäure	nein	mögliche Fehlidentifikation eines HCAA (Quesnel 1965, Stark <i>et al.</i> 2005 u.a.)
Phenylelessigsäure	nein	mögliches Abbauprodukt von Kakao – Flavonoiden (Rios <i>et al.</i> 2003)
Phloretinsäure	nein	mögliches Abbauprodukt von Kakao-Flavonoiden oder HCAA (Rios <i>et al.</i> 2003)
Phloroglucinol	nein	mögliches Abbauprodukt von Catechin (Kenyhercz und Kissinger 1978)
Protocatechusäure	nein	mögliches Abbauprodukt von Catechin (Kenyhercz und Kissinger 1978)
Quercetin	nein	mögliches Produkt einer Deglycosylierung kakaoeigener Quercetin-Glycoside (Wollgast 2005)
Quercetin-3-galactosid	ja (Spuren)	
Quercetin-3-glucosid	ja (Spuren)	
Syringasäure	nein	mögliches Abbauprodukt von Kakao – Flavonoiden (Rios <i>et al.</i> 2003)
Vanillinsäure	nein	mögliches Abbauprodukt von Kakao – Flavonoiden (Rios <i>et al.</i> 2003)

5.1.4 Zur quantitativen Analyse der Flavonoide

Bezüglich des Gesamt-Polyphenolgehaltes und der Flavan-3-ole der untersuchten Kakaoproben belegen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass zwischen den untersuchten Kakaotypen Criollo, UAF, LAF, Nacional sowie Trinitario keine signifikanten Unterschiede bestehen (siehe 4.1 und 4.2.3).

Dieses Resultat ist vergleichbar mit den Ergebnissen von Griffiths 1960, der abgesehen von einem geringeren Gehalt an Anthocyanen keine Unterschiede im Polyphenolgehalt zwischen Forasteros und Criollos nachweist. Auch Graziani de Fariñas *et al.* 2003 dokumentieren keine signifikanten Unterschiede zwischen Forasteros, Criollos und Trinitarios in ihren jeweiligen Tanningehalten.

Das in der vorliegenden Arbeit erzielte Ergebnis steht jedoch im Widerspruch zu Lange und Fincke 1970, wonach Criollos nur 2/3 des Polyphenolgehaltes der Forasteros besitzen. Auch Efraim 2004, zit. nach Efraim *et al.* 2006 kommt zu einem abweichenden Ergebnis. Demnach enthalten Kakaosamen der Forastero-Gruppe zwischen 30 % und 60 % mehr phenolische Inhaltsstoffe als jene des Criollo-Typs.

Gerade bei der Untersuchung deutlich kleinerer Probenvolumina als jene der vorliegenden Arbeit können die probenspezifisch oft recht hohen Schwankungen im Gesamt-Polyphenolgehalt schnell als typ- und gruppenspezifische Unterschiede missinterpretiert werden. Das feine Aroma des Criollo-Rohkakaos, welches sich nach Wolters 1999 auch durch geringere Bitterkeit auszeichnet, verleitet außerdem zusammen mit der hellen Farbe der Criollo-Keimblätter leicht dazu, insgesamt niedrigere Polyphenolgehalte in den frischen Criollo-Samen zu vermuten. Vor diesem Hintergrund verwundert es nicht, dass auch aktuelle Veröffentlichungen wie die oben zitierten zu dem Schluss kommen, dass frische Criollo-Samen insgesamt niedrigere Mengen an phenolischen Substanzen enthalten.

Die hier vorliegende Studie zeigt jedoch, dass das milde Aroma des Criollo-Rohkakaos offensichtlich eine andere Ursache hat als einen geringeren Polyphenolgehalt in frischen Criollo-Samen.

Auch das Gewicht der Kakaofrüchte und das Trockengewicht der Samen besitzen, den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zufolge, keinen signifikanten Einfluss auf ihren Gehalt phenolischer Komponenten. Nach Clement *et al.* 2003 und Glendinning 1963 ist die Größe der Kakaosamen stark abhängig von deren genetischer Herkunft. Die Größe und das Gewicht der Früchte können hingegen auch am selben Baum sehr unterschiedlich sein und hängen u. a. von deren Position am Baum ab (Lachenaud 1995, Glendinning 1963). Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit kein varietäts- bzw. typabhängiger Gehalt phenolischer Substanzen von Kakaosamen festgestellt werden konnte, verwundert es nicht, dass auch keine Koppelung an die genetisch determinierte Größe der Samen vorliegt. Dass die Position der Frucht am Baum offenbar keinen Einfluss auf den Polyphenolgehalt ihrer Samen besitzt, deckt sich mit dem Resultat, dass

die Intensität der Sonneneinstrahlung den Polyphenolgehalt der Samen ebenfalls nicht signifikant verändert (s. u.).

Die durch Ndoumou *et al.* 1995 beschriebenen, höheren Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in Samen von Kakaoklonen mit größerer Krankheitsresistenz konnten durch die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse nicht bestätigt werden. Auch hatte der z. T. gravierende Befall einiger Kakaoproben aus Malaysia mit Cocoa Pod Borer (*Conopomorpha cramerella*, siehe Tab. 25) keine signifikante Erhöhung der Polyphenolgehalte der jeweiligen Samen zur Folge. Dies könnte allerdings auch dadurch erklärt werden, dass der genannte Schädling hauptsächlich die Pulpa und die Fruchtwände zerstört. Die Schädigung der Kakaosamen erfolgt in erster Linie dadurch, dass sie in den befallenen Früchten unterversorgt werden und verkümmern. Möglicherweise reichen die Ressourcen, welche den reifenden Kakaosamen über den geschädigten Funiculus erreichen, gar nicht für gesteigerte Akkumulation phenolischer Inhaltsstoffe aus. Diese würde ohnehin nur bei direkter Schädigung des Keimblattgewebes selber ihre Repellent-Wirkung entfalten. Inwieweit es zu einer Erhöhung der Polyphenolgehalte bei direkter Schädigung des Keimblattgewebes kommt, wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Der Polyphenolgehalt in Kakaosamen scheint im Zusammenhang mit der varietätsspezifisch unterschiedlichen Resistenz gegen Krankheiten jedoch eine untergeordnete Rolle zu spielen, da dieser in den krankheitsanfälligen Criollos nicht niedriger war als in den anderen untersuchten Kakaotypen. Weiterführende Untersuchungen zu diesem Thema sind in jedem Fall erforderlich.

Auch das bekannte Merkmal zur Selbst-Kompatibilität (ja/nein) der Klone ist nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht gekoppelt an den Gesamt-Polyphenolgehalt, bzw. an den Gehalt der einzelnen untersuchten phenolischen Monomere. Klone, welche das ertragssteigernde Merkmal der Selbst-Kompatibilität besitzen unterscheiden sich demnach in ihrem Polyphenolgehalt nicht signifikant von selbst-inkompatiblen Varietäten.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden ein signifikant höherer Gesamt-Polyphenolgehalt sowie signifikant höhere Gehalte an (-)-Epicatechin und an Anthocyanen in solchen Kakaosamen gemessen, die von Bäumen ungedüngter Standorte stammen. Damit wurde erstmals ein Hinweis dafür erbracht, dass die Menge der phenolischen Inhaltsstoffe in reifen, unfermentierten Kakaosamen auch von der Nährstoffversorgung der Mutterpflanze abhängig ist. Ein erhöhter Polyphenolgehalt bei suboptimaler Nährstoffversorgung ist ein weit verbreitetes Phänomen im Pflanzenreich. Verschiedene ökophysiologische Modelle, wie etwa die von Bryant *et al.* 1983 entwickelte "Carbon/Nutrient Balance Hypothesis" (CNB) oder die "Growth-

Differentiation Balance Hypothesis” (GDB) von Herms *et al.* 1992, bieten Erklärungsmöglichkeiten dafür an (siehe 2.3).

Für keinen anderen der ermittelten Standortfaktoren (siehe Tab. 6) konnte ein signifikanter Einfluss auf den Gesamt-Polyphenolgehalt bzw. auf den Gehalt einzelner phenolischer Inhaltsstoffe nachgewiesen werden. Somit hatte etwa die Anzahl von Schattenbäumen bzw. die Pflanzdichte oder auch die Anbauhöhe der Kakaobäume offenbar keine signifikante Bedeutung. Hieraus muss geschlossen werden, dass die Intensität, mit welcher ein Kakaobaum der UV-Strahlung ausgesetzt ist, nur den Polyphenolgehalt exponierter Blätter und anderer Pflanzenteile erhöht und diesbezüglich keine systemischen Auswirkungen hat (siehe 2.3). Für klimatische Faktoren wie etwa der Jahresniederschlag, die Durchschnittstemperatur, sowie die relative Luftfeuchtigkeit konnte ebenfalls kein signifikanter Einfluss auf den Gehalt phenolischer Inhaltsstoffe nachgewiesen werden. Dies mag u. a. daran liegen, dass auch diese Einflussgrößen den Polyphenolgehalt einer Pflanze allenfalls lokal verändern. Andererseits sind die vorliegenden Daten für eine umfassende Beurteilung wohl auch zu ungenau, da das jeweilige Mikroklima der gesammelten Proben und ihrer Mutterpflanzen nicht bekannt war.

5.1.5 Zur Qualität und Quantität von HCAA in Kakaosamen

Neben dem in der vorliegenden Arbeit isolierten und quantifizierten Kaffeesäure-aspartat (siehe 4.2.4.2) werden in der aktuellen Literatur weitere HCAA beschrieben. Die umfangreichste Dokumentation dieser Substanzen in Kakao liefern Stark *et al.* 2005, Stark *et al.* 2006b, sowie Stark und Hofmann 2005, welche insgesamt 13 verschiedene HCAA in Kakaoextrakten auflisten (siehe 2.1.2.5).

Eine solch umfassende qualitative Dokumentation der Kakao-HCAA konnte nicht das Ziel der für die vorliegende Arbeit durchgeführten HPLC-PDA-Analytik sein. Diese ist in ihrer Durchführung von der Wiederfindung bereits bekannter Substanzen abhängig und wurde auf Basis einer optimalen Trennung der in Tab. 8 aufgeführten Referenzsubstanzen entwickelt. Der gut isolierte Peak des Kaffeesäure-aspartats war daher ein zusätzliches Ergebnis, das mit der in 3.13 beschriebenen ergänzenden Methode analytisch ausgewertet wurde.

Dafür, dass die Peaks der anderen 12 von den oben genannten Autoren gefundenen HCAA nicht ebenfalls in den untersuchten Chromatogrammen gefunden wurden, sind folgende Gründe denkbar:

1. 6 der 13 von Stark *et al.* 2006b beschriebenen Substanzen liegen im Bereich von $5,55 \text{ mg kg}^{-1}$ Proben- Trockenmasse oder - teilweise erheblich - darunter (Abb. 13). Damit sind sie mit Hilfe des hier verwendeten Verfahrens kaum noch oder gar nicht mehr detektierbar, zumal ihre Retentionszeit unbekannt ist.
2. Möglicherweise liegen die Retentionszeiten einiger der in Abb. 13 aufgeführten Substanzen bereits außerhalb des ausgewerteten Zeitabschnittes.

3. Eventuell wurden einige der in Stark *et al.* 2006b beschriebenen HCAA durch die Peaks quantitativ stärker vertretener Substanzen überlagert.

Offen bleibt die Frage, warum das in Kakaoextrakt bereits von Sanbongi *et al.* 1998, Alemanno *et al.* 2003, Wollgast 2005, Stark *et al.* 2005, Stark *et al.* 2006b sowie Stark und Hofmann 2005 nachgewiesene Clovamid (siehe Abb. 13) in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kakaoproben nicht gefunden wurde (siehe 4.2.4). Stark *et al.* 2006b quantifizieren die Substanz in der von ihnen untersuchten, gerösteten Kakaoprobe mit $58.58 \pm 1,12 \text{ mg kg}^{-1}$ Proben-Trockenmasse. Damit liegt Clovamid zumindest in dieser Probe bei etwa 1/8 der für das Kaffeesäure-aspartat gefundenen Menge ($428,43 \pm 10,11 \text{ mg kg}^{-1}$).

Unwahrscheinlich ist, dass das Clovamid sowie die anderen laut den oben genannten Autoren im Kakaoextrakt vorhandenen HCAA während der hier verwendeten Probenaufbereitung vollständig verloren gingen. Dazu ähnelt das in 3.10.3 beschriebene Verfahren zu sehr jenem aus Stark *et al.* 2006b. Die Detektion des Amids Kaffeesäure-aspartat spricht ebenfalls gegen diese Möglichkeit. Mit dem verwendeten Aufreinigungsverfahren wurden zudem optimale Wiederfindungsraten zumindest der Hydroxyzimtsäure-Anteile der in Kakao gefundenen HCAA erzielt.

Ferner kann ausgeschlossen werden, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kakaoproben sich in der qualitativen Zusammensetzung ihrer HCAA grundlegend von den in anderen Veröffentlichungen analysierten Kakaoproben unterscheiden, da sie das Spektrum der weltweit angebauten Kakaosorten recht umfassend widerspiegeln. Daher zeichnen sich andere Kakaoproben mit großer Wahrscheinlichkeit nicht durch eine vollkommen abweichende Qualität ihrer HCAA aus.

Vielleicht liegt der Clovamidgehalt in den für die vorliegende Arbeit untersuchten Kakaoproben noch niedriger als bei Stark *et al.* 2006b oder das Clovamid besitzt so geringe Absorptionseigenschaften, dass der oben genannte Wert bereits unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten HPLC-PDA-Verfahrens liegt.

5.1.5.1 Die genetische und standortspezifische Variabilität des Gehaltes an Kaffeesäure-aspartat

In 4.2.4.3 wurde die signifikante Abgrenzung des Kakao-Typs „Criollo“ von allen anderen untersuchten Kakaoproben bezüglich seines Gehalts an Kaffeesäure-aspartat beschrieben. Somit unterscheiden sich die untersuchten Criollo-Proben, neben dem in 4.2.3.5 dokumentierten, weitgehenden Fehlen der Anthocyane, noch bezüglich einer weiteren phenolischen Substanz von den untersuchten Proben der Typen Nacional, Forastero und Trinitario.

Interessanterweise finden auch Correia *et al.* 1995 signifikante Unterschiede zwischen den sortenspezifischen Gehalten an HCA-Aminosäureverbindungen. Bei ihren Untersuchungen von Samen der Gattung *Coffea* L. können sie auf Basis dieser Substanzen Proben von *C. robusta* L. aus Angola von allen anderen untersuchten Proben

derselben Art abgrenzen. Eine Unterscheidung einzelner *C. robusta*-Sorten aufgrund ihrer phenolischen Inhaltsstoffe gelingt in den bisher durchgeführten Untersuchungen nur anhand ihrer HCAA-Gehalte und nicht mit Hilfe der anderen phenolischen Substanzen, die sie enthalten (Clifford und Knight 2004).

Die Ähnlichkeit zwischen den in Correia *et al.* 1995 veröffentlichten Ergebnissen und den eigenen Resultaten legt nahe, dass der Gehalt an Kaffeesäure-aspartat in Kakaosamen auch genetisch determiniert ist. Dabei gibt es keine Hinweise darauf, dass die höheren Gehalte an Kaffeesäure-aspartat in einem direkten physiologischen Zusammenhang zu niedrigeren Anthocyangehalten in Kakaosamen stehen, deren genetische Determination bereits in früheren Arbeiten nachgewiesen wurde (Bartley 2005). Deutlich wird dies am Beispiel der untersuchten Proben des LAF-Klons Catongo. 3 der 5 untersuchten Früchte dieses Klons zeichnen sich durch bis auf wenige Ausnahmen vollständig anthocyanfreie Samen aus. Gleichzeitig enthalten diese Samen jedoch deutlich weniger Kaffeesäure-aspartat als die Samen sämtlicher untersuchter Criollo-Proben (siehe Anhang; Tab. 26). Auch gibt es keine auffälligen Unterschiede im Gehalt dieses HCAA zwischen den anthocyanfreien und den anthocyanhaltigen Proben von Catongo (siehe Anhang; Tab. 26).

Neben dem oben diskutierten genetischen Einfluss scheint sich auch die Stickstoffversorgung der beprobten Kakaopflanzen auf deren Gehalt an Kaffeesäure-aspartat auszuwirken. Wie in 4.2.4.3 dargestellt zeigen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Samen von Kakaobäumen auf gedüngten Standorten einen signifikant höheren Gehalt an Kaffeesäure-aspartat. Erhöhte Konzentrationen von Amiden in der Pflanze sind ein typisches Resultat der Stickstoffdüngung. Sie werden z. B. von Pahlsson 1992 in Blättern von *Fagus sylvatica* L., sowie von Li 2004b in vegetativen Abschnitten verschiedener Nutzpflanzen beschrieben. Tsai *et al.* 1980 weisen nach Stickstoffdüngung erhöhte Konzentrationen stickstoffhaltiger Verbindungen in Maissamen nach.

Inwieweit auch die Produktion von HCAA durch Stickstoffdüngung gesteigert wird, wurde bisher offenbar noch nicht eingehend untersucht.

Entsprechende Feld- und Gewächshausversuche könnten klären, ob sich der Gehalt an HCAA in Samen von *T. cacao* L. tatsächlich in Abhängigkeit von der Stickstoffversorgung erhöht, wie es die hier vorgestellten Ergebnisse nahe legen. Sollte dies der Fall sein, dann könnte durch Stickstoffdüngung der Gehalt dieser Stoffgruppe in Kakaosamen gezielt gesteigert werden.

Die in 2.1.2.5 beschriebene gesundheitsfördernde Wirkung von mit der Nahrung aufgenommenen HCAA macht die Gruppe für die auf dem Functional-Food-Markt etablierten, gesundheitsfördernden Kakaoprodukte interessant. In diesem Zusammenhang ist es von herausragender Bedeutung, das antioxidative Potential und die Radikalfänger-Wirkung der quantitativ am stärksten in Kakaosamen vertretenden Substanz Kaffeesäure-

aspartat zu ermitteln. Die *o*-Dihydroxygruppe am Kaffeesäure-Rest spricht für eine entsprechende Aktivität des Moleküls. Sie könnte jedoch unter den bereits von Sopheak und Lewis 2002 sowie den von Sanbongi *et al.* 1998 ermittelten Werten für Clovamid liegen, welches 2 *o*-Dihydroxygruppen aufweist. Laut Spasova *et al.* 2006 ist die Bedeutung solcher molekularen Strukturen für das antioxidative Potential der HCAA jedoch noch nicht vollständig entschlüsselt.

Im Zusammenhang mit der physiologischen Wirksamkeit der Kakao-HCAA im menschlichen Organismus ist auch ihre hohe Stabilität von Bedeutung. So geht z. B. die antioxidative Aktivität der HCAA *in vitro* erst deutlich später zurück als bei ähnlich wirksamen Verbindungen (Sopheak und Lewis 2002).

Die von Park 2005a untersuchten Clovamide sind allerdings bereits nach 1 h nicht mehr im Blutplasma nachweisbar. Sie wurden somit schneller abgebaut als die von Serafini *et al.* 2003 daraufhin untersuchten Catechinderivate aus Kakao, die bis zu 4 h nach dem Schokoladenkonsum im Plasma nachgewiesen wurden. Letztgenannte Autoren führten ihre Studien jedoch an menschlichen Probanden durch, während Park 2005a Mäuse für seine Untersuchungen verwendete. Es ist somit wahrscheinlich, dass die ermittelten unterschiedlichen Abbaugeschwindigkeiten in erster Linie auf Unterschiede im Stoffwechsel zwischen den beiden untersuchten Organismen zurückzuführen sind.

5.1.5.2 Zusammenfassung und Ausblick der HCAA-Analytik von Kakaosamen

Die signifikante Abhängigkeit des Gehalts an Kaffeesäure-aspartat im Keimblattgewebe frischer Kakaosamen vom Kakaotyp und von der Nährstoffversorgung der Mutterpflanze ist zuvor noch nicht in der Literatur beschrieben worden. Sortenabhängige Unterschiede im Gehalt von HCAA wurden allerdings bereits bei *Coffea robusta* L. gefunden (Correia *et al.* 1995).

Die im Vergleich zu den Catechinen hohe Stabilität von Kaffeesäure-aspartat sowie anderer in Kakaosamen eingelagerter HCAA wird auch durch Wollgast 2005 sowie durch die Arbeiten der Arbeitsgruppe Hofmann (Universität Münster) bestätigt. Als Folge dieser Stabilität bleiben die typ- und standortspezifischen, quantitativen Unterschiede des Kaffeesäure-aspartats auch nach der Prozessierung in den Kakaoproben erhalten. So liegt der Gehalt an dieser Substanz zwar auch in reifen Kakaosamen, die besonders viel davon enthalten, deutlich unter jenem des in Kakaosamen dominierenden phenolischen Monomers (-)-Epicatechin. Nach Abschluss der Fermentation liegt er bei diesen Proben jedoch z. T. quantitativ im selben Bereich wie der (-)-Epicatechin-Gehalt. Dies macht das Kaffeesäure-aspartat zusammen mit den anderen in Kakaosamen enthaltenen HCAA interessant für die Herstellung von Kakaoprodukten mit bestimmten aroma- bzw. gesundheitsrelevanten Eigenschaften.

Zukünftige Arbeiten sollten klären, ob neben den Gehalten von Kaffeesäure-aspartat auch jene der anderen in Kakaosamen enthaltenen HCAA in Abhängigkeit von genetischen und standortspezifischen Faktoren variieren.

In weiterführenden Arbeiten sollte zudem analysiert werden, in welchen Gewebeabschnitten die in Kakaosamen gefundenen HCAA lokalisiert sind. Die im Übersichtsartikel von Facchini *et al.* (2002) aufgelisteten Veröffentlichungen deuten darauf hin, dass diese Substanzen möglicherweise nicht zusammen mit den Catechinen und den Anthocyanen in den Polyphenolzellen gelagert werden.

In diesem Zusammenhang sind auch die Ergebnisse von Alemanno *et al.* 2003 bezüglich der Lokalisation von HCAA und anderen phenolischen Substanzen in Kallusgewebe und Blüten von *T. cacao* L. zu nennen. Die Autoren lokalisieren die HCAA überwiegend in den epidermalen Strukturen der von ihnen analysierten Blütenabschnitte, während sie einen großen Teil der Flavonoide im Parenchym finden. Die in der Publikation enthaltenen Fotos von Blüten- und Kallusgewebe deuten auf eine Präsenz der HCAA in den Zellwänden bzw. in den daran angrenzenden Zellabschnitten hin, während die Flavonoide eher im Zelllumen eingelagert zu sein scheinen.

Da es bisher noch keine Daten zur Lokalisation von HCAA im Samengewebe von *T. cacao* L. gibt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die vergleichsweise geringen Verluste an diesen Substanzen während der Kakaoaufbereitung (siehe 4.5.3) auch in einer von den übrigen phenolischen Substanzen abweichenden Lagerung im Samengewebe begründet liegen.

Nach der Methodik von Alemanno *et al.* 2003 wurden für die vorliegende Arbeit mit Neu's Reagenz (1 %ige methanolische 2-Aminoethyl-diphenyl-borinat-Lösung, Neu 1956) Färbeversuche von HCAA in Keimblattgewebe von *T. cacao* L. durchgeführt (Daten nicht veröffentlicht). Dieses Verfahren scheint jedoch für das Auffinden von HCAA in diesem Gewebe ungeeignet zu sein, da bereits vor der Färbung des Präparats eine bläuliche Eigenfluoreszenz der Zellwände vorlag, die sich nach der Färbung in ihrer Intensität nicht signifikant veränderte.

Die Lokalisierung der HCAA im Parenchym von Kakao könnte z. B. mit immunocytochemischen Verfahren (wie zu vergleichbaren Zwecken von Niester-Nyveld 1997 verwendet) oder auch per Mikrospektrofluorometrie (ähnlich wie bei Sen *et al.* 1994) erfolgen.

5.2. *Zur Degradation der Kakao-Polyphenole während der sauren Hydrolyse*

5.2.1 Die Veränderungen im Gehalt der monomeren Flavan-3-ole

Nach den beiden in 3.12 beschriebenen sauren Hydrolysen eines Roh-Polyphenolextraktes frischer Kakaosamen kommt es zu deutlichen Veränderungen in der Zusammensetzung der phenolischen Inhaltsstoffe, welche bei Verwendung von 1 mol/l HCl-Lösung stärker ausgeprägt sind als mit 0,1 mol/l HCl-Lösung (siehe 4.3).

Quantitativ am bedeutsamsten ist unter den beobachteten Veränderungen die Verringerung des Epicatechingehaltes bei gleichzeitiger Erhöhung des Catechingehaltes (Abb. 63).

Nach Haslam 1998 kommt es in heißen, wässrigen Lösungen an der C-2-Position von Flavan-3-olen besonders leicht zu einer Epimerisation (d. h. einer Umwandlung in das entsprechende Stereoisomer). Die beobachtete Zunahme von Catechin im Verlauf der sauren Hydrolyse kann daher als eine Neubildung von (-)-Catechin aus (-)-Epicatechin gedeutet werden. Durch das verwendete RP-HPLC-Verfahren werden die Peaks der Substanzen (+)-Catechin und (-)-Catechin nicht voneinander getrennt. Daher kommt es bei der Neubildung von (-)-Catechin zu einem Flächenzuwachs des auch im unbehandelten Polyphenolextrakt detektierten Catechin-Peaks.

Umgekehrt kommt es während der sauren Hydrolyse vermutlich auch zu einer Umwandlung von (+)-Catechin in das entsprechende Epimer (+)-Epicatechin. Da jedoch im unbehandelten Kakao-Phenolextrakt insgesamt erheblich mehr (-)-Epicatechin als (+)-Catechin vorhanden ist, kommt es durch den Abbau von (-)-Epicatechin dennoch zu einer deutlichen Abnahme des Gesamt-Epicatechingehaltes im Verlauf der sauren Hydrolyse.

Die gegenseitige Umwandlung von (-)-Epicatechin in (-)-Catechin und umgekehrt wird von Freudenberg *et al.* 1922 folgendermaßen dargestellt (Abb. 82):

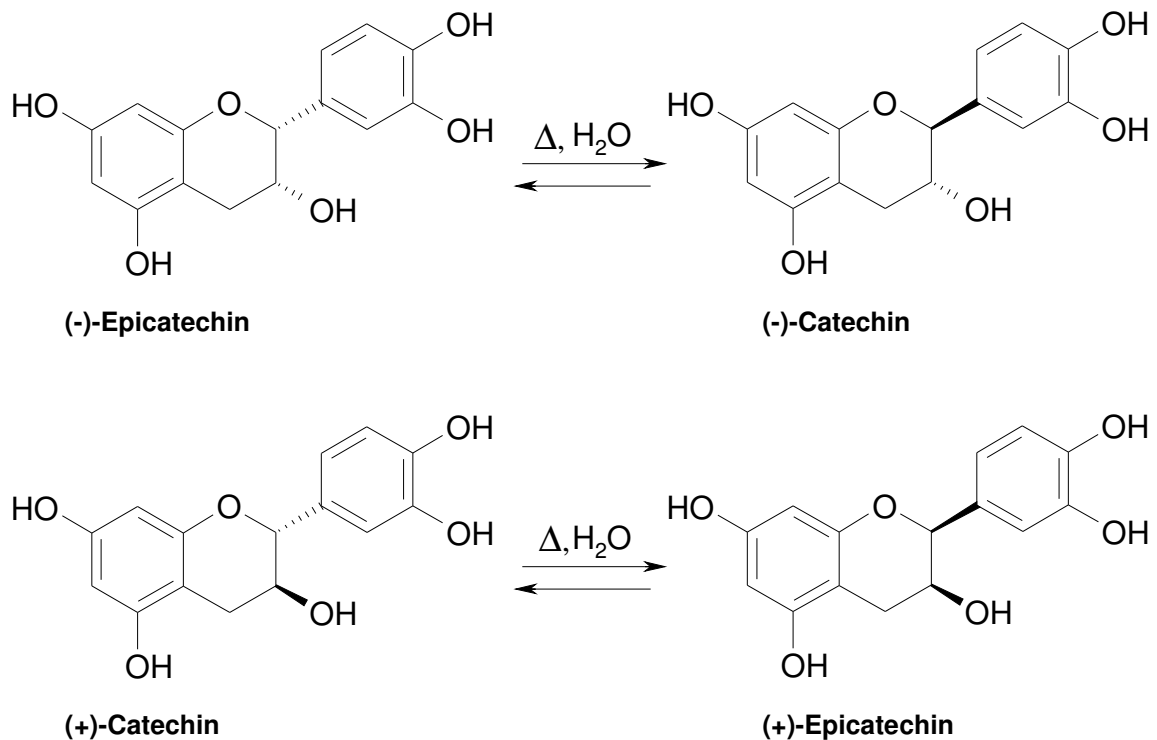


Abb. 82: Epimerisation von Flavan-3-olen an der Position C-2 im wässrigen Medium (nach Freudenberg *et al.* 1922)

In jüngster Zeit wurden einige Studien veröffentlicht, welche sich mit der Entstehung von (-)-Catechin im Verlauf der Prozessierung von Kakaosamen auseinandersetzen (Gotti *et al.* 2006, Cooper *et al.* 2007, Kofink *et al.* 2007, siehe 5.4.3).

5.2.2 Begründung der schnellen Degradierung der Substanz „C“ mit deren möglicher struktureller Identität

Auffällig ist, dass von den untersuchten Peaks phenolischer Substanzen der Gehalt der nicht eindeutig identifizierten Substanz „C“ nach der sauren Hydrolyse im Vergleich zu den anderen untersuchten phenolischen Substanzen besonders stark abnimmt (Abb. 63). Dies liefert neben dem Spektrum dieser Substanz, welches jenem der Catechine ähnelt (Tab. 11), einen weiteren Hinweis darauf, dass es sich bei dieser Fraktion um ein oligomeres Procyanidin handelt. Der besonders starke Rückgang der Substanz „C“ im Verlauf der Hydrolyse basiert demzufolge mit großer Wahrscheinlichkeit auch auf einer Spaltung des mutmaßlichen Oligomers in seine monomeren Catechinbausteine, welche sich unter den Bedingungen einer sauren Hydrolyse besonders schnell vollzieht (Porter *et al.* 1986).

5.2.3 Protocatechusäure als mögliches Artefakt des Catechinabbaus

Nach den von uns durchgeführten sauren Hydrolysen wurden im Vergleich zum Ausgangsextrakt gesteigerte Mengen von Protocatechusäure gefunden (Abb. 63). Es liegt somit nahe davon auszugehen, dass Protocatechusäure ein Abbauprodukt ist, das im frischen, intakten Samengewebe gar nicht gebildet bzw. angereichert wird.

Tatsächlich findet sich eine entsprechende Deutung auch bei Kenyhercz und Kissinger 1978, welche deutlich größere Mengen von Protocatechusäure in fermentierten als in frischen Kakaoproben finden. Die Autoren stellen Protocatechusäure als ein Abbauprodukt dar, welches zusammen mit Phloroglucinol aus Catechinen gebildet wird (Abb. 83).

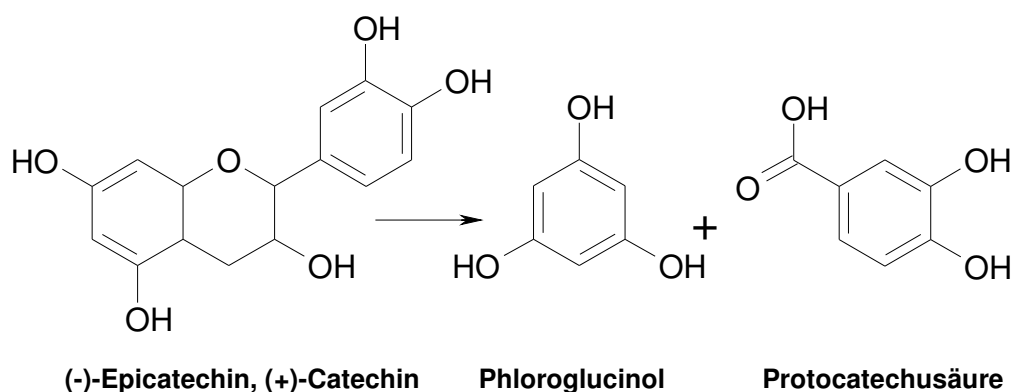


Abb. 83: Der Abbau von Catechin zu Protocatechusäure nach Kenyhercz und Kissinger 1978

Die allenfalls in Spuren detektierte Protocatechusäure weist somit auf die hohe Qualität der eingesetzten Probenaufbereitung hin, die eine möglichst artefaktfreie Extraktion und Aufreinigung der phenolischen Inhaltsstoffe aus den frischen Kakaosamen zum Ziel hatte.

5.2.4 Zum Abbau von Kaffeesäure-aspartat durch saure Hydrolyse

Auf das im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus Kakaosamen isolierte HCAA Kaffeesäure-aspartat wirkt sich die mit HCl in 2 verschiedenen Molaritäten durchgeführte saure Hydrolyse unterschiedlich aus. Während nach der Behandlung mit 0,1 mol/l HCl nur eine geringfügige Abnahme des Gesamtgehaltes an dieser Substanz erfolgt ist, werden durch die Erhitzung mit 1 mol/l HCl fast 70 % des ursprünglichen Gehaltes an Kaffeesäure-aspartat degradiert. Im Vergleich zu den Abbau von (-)-Epicatechin und dem Procyanidin „C“ unter gleichen Bedingungen kann jedoch der Rückgang des HCAA nach der Hydrolyse mit 1 mol/l HCl noch als moderat bezeichnet werden (s. o.). Die hier durchgeführte Arbeit liefert somit einen weiteren Beleg der hohen Stabilität dieser Substanzgruppe gegenüber der Einwirkung von Säure und vor allen Dingen auch Hitze, welche bereits durch Wollgast 2005 beschrieben wird.

Interessanterweise konnte auch nach dem deutlichen Abbau von Kaffeesäure-aspartat nach der Inkubation mit 1 mol/l HCl keine freie Kaffeesäure im resultierenden Polyphenolextrakt nachgewiesen werden. Möglicherweise kommt es im Verlauf der

sauren Hydrolyse nicht zu einer Abspaltung des Aspartat-Restes sondern zu einem Abbau des Gesamtmoleküls unbekannter Art.

5.2.5 In früheren Arbeiten beschriebene, weitere phenolische Substanzen entstehen nicht durch saure Hydrolyse

Außer Protocatechusäure erschienen nach der Hydrolyse keine weiteren phenolischen Monomere im Peakspektrum der Probe, welche von früheren Autoren beschrieben, aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Extrakten frischer Kakaosamen nicht gefunden wurden (siehe 5.1). Sofern diese Substanzen von den jeweiligen Autoren korrekt identifiziert wurden, scheint ihre Entstehung auf andere oder zusätzliche Ursachen zurückzuführen zu sein als auf Erhitzung und/oder die Ansäuerung der Kakaoproben.

5.3 Biochemische Charakteristika der Reifestadien von Kakaosamen

Die in 4.4 vorgestellte Untersuchung der Entwicklung phenolischer Inhaltsstoffe während der Samenreifung von *T. cacao* L. ist nicht umfassend genug, um detaillierte Aussagen über die spezifische Entwicklung der phenolischen Einzelsubstanzen zuzulassen. Dafür sind die gemessenen Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Klonen EET 95 und ICS 95 zu groß. Im Folgenden werden einige Aspekte beschrieben, die sich dennoch aus den vorliegenden Ergebnissen ableiten lassen.

Der Polyphenolgehalt der Kakaosamen beider Klone steigt im Verlauf der Reifung mehr oder weniger kontinuierlich an. Dieses Ergebnis entspricht jenem früherer Arbeiten, wie etwa von Ndoumou *et al.* 1995.

Alle der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten phenolischen Inhaltsstoffe von Kakao liegen im selben Reifestadium in maximaler Menge vor. Demnach dient keiner der untersuchten phenolischen Inhaltsstoffe als Vorstufe einer der anderen isolierten Substanzen; es kommt also bis zum Erreichen der Reife nicht zu einer (teilweisen) Umwandlung einer der detektierten Substanzen in eine der anderen. Auch konnten im unreifen Material keine zusätzlichen Peaks anderer phenolischer Inhaltsstoffe nachgewiesen werden: Somit kommt es offenbar während der Akkumulation der phenolischen Inhaltsstoffe von Kakaosamen nicht zur Anreicherung signifikanter Mengen von Vorstufen dieser Substanzen. Die weitgehend leeren Polyphenolzellen noch vollkommen farbloser, unreifer Keimblätter von *T. cacao* L. sprechen ebenfalls dafür, dass darin noch keine phenolischen Inhaltsstoffe vorliegen, auch keine Vorstufen der Substanzen aus reifen Samen (Abb. 70). Dieser Befund steht im Gegensatz zu der Darstellung von Quesnel 1968. Der Autor geht davon aus, dass vor dem Auftreten der

Anthocyane bereits an Zuckerbausteine gekoppelte Vorstufen der phenolischen Inhaltsstoffe reifer Kakaosamen im unreifen Keimblattgewebe eingelagert sind.

Der Vergleich der Reifestadien der beiden untersuchten Kakaoklone EET 95 und ICS 95 zeigt, dass die Früchte von EET 95 deutlich schneller reifen als jene von ICS 95. Samen des Klons ICS 95 besitzen nach 100 Tagen fast noch kein festes Speichergewebe, sondern bestehen hauptsächlich aus flüssigem Endosperm (Abb. 69). Sie konnten daher in diesem Stadium noch gar nicht analysiert werden - ganz im Gegensatz zu den Samen von EET 95, deren Embryos nach 100 Tagen bereits wesentlich weiter entwickelt sind. Ein derartiger Unterschied in der Reifung der beiden Kakaoklone entspricht auch den Beobachtungen von Dr. P. Bucheli (ehemals Forschungsabteilung Nestlé France, persönliche Mitteilung 2001).

Während die reifen Samen von ICS 95 ca. 170 Tage nach der Bestäubung geerntet wurden, sind die ältesten Proben von EET 95 ca. 160 Tage gereift. Die 170 Tage alten Proben von ICS 95 wiesen die höchsten Gehalte an phenolischen Inhaltsstoffen innerhalb dieses Klons auf, welches mit den im mikroskopischen Bild darstellbaren, vollständig gefüllten Polyphenolzellen dieses Stadiums übereinstimmt (Abb. 71). Auffällig ist, dass der Polyphenolgehalt in den Reifestadien von EET 95 bereits 146 Tage nach der Bestäubung am höchsten ist. Bekräftigt wird dieses Ergebnis der chemischen Analyse durch das mikroskopische Bild des Speichergewebes von nach 140 Tagen geernteten Samen des Klons EET 95, welches den Eindruck reifer, vollständig entwickelter Samen vermittelt (Abb. 71). Nach 160 Tagen ist der Gehalt der phenolischen Inhaltsstoffe der Samen dieses Klons bereits deutlich gesunken (Abb. 64). Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass die Samen zu diesem Zeitpunkt bereits überreif waren. Eine Bekräftigung dieser Deutung liefert auch das mikroskopische Bild. Die Proteinvakuolen der umgebenden Speicherzellen scheinen leicht angeschwollen zu sein, was auf die Aufnahme von Flüssigkeit und auf eine beginnende Keimung hinweist. Einige der dargestellten Polyphenolvakuolen weisen zudem blasenförmige Löcher in der Kontrastierung auf, die stark an den Zustand im 120 Tage alten Kakaosamen erinnern. Die Inhaltsstoffe der Polyphenolvakuolen scheinen sich nach Erreichen der Reife demnach allmählich wieder zu reduzieren. Der Abbau phenolischer Inhaltsstoffe während der Lagerung reifer Kakaosamen ist bereits von Clapperton *et al.* 1994a und b beschrieben worden.

Beim 125 Tage alten Reifestadium von ICS 95 fällt auf, dass zu diesem Zeitpunkt per RP-HPLC noch keine phenolischen Monomere nachgewiesen werden konnten, sehr wohl

aber bereits ein geringer Gesamt-Polyphenolgehalt von 1,71 % (Abb. 64). Möglicherweise ist dies auf eine Verfälschung des Ergebnisses durch andere reduzierende Pflanzeninhaltsstoffe nicht-phenolischen Ursprungs zurückzuführen. Derartige Substanzen reagieren nach Rack 2005 ebenfalls mit dem Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz.

5.4 *Zur Veränderung der Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe im Verlauf der Fermentation von Criollo-Samen*

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden Fermentationsstadien von Criollo-Proben untersucht, während in der Literatur bisher ausschließlich Untersuchungsergebnisse von Fermentationen anderer Kakao-Varietäten dokumentiert sind. Neben einer Deutung des im Rahmen der vorliegenden Arbeit dokumentierten Abbaus der phenolischen Inhaltsstoffe in Criollo-Kakao während der Fermentation wurde dieser daher auch mit den Literaturdaten über andere Kakaotypen verglichen. Tatsächlich finden bereits Figueira *et al.* 1997 Unterschiede zwischen der maßgeblich durch den Gehalt an Catechinen verursachten Adstringenz einzelner Rohkakaoproben. Diese offenbar genotypspezifischen Unterschiede im Catechingehalt der Rohkakaoproben könnten durch Abweichungen in der Abbaugeschwindigkeit dieser Substanzen während der Fermentation verursacht worden sein.

5.4.1 Unterschiede im Polyphenolgehalt zwischen Samen derselben Charge und desselben Fermentationsstadiums

Bereits vor Beginn der Fermentation bestehen nach den in 4.5 vorgestellten Ergebnissen samenspezifische Unterschiede im Gehalt phenolischer Inhaltsstoffe innerhalb ein und derselben Charge. Mit fortschreitender Fermentation vergrößern sich diese Unterschiede noch. Dies lässt sich mit den abweichenden Fermentationsbedingungen erklären, die auch innerhalb ein und desselben Fermentationsansatzes bestehen und die nachweislich zu einem unterschiedlich starken Abbau der phenolischen Inhaltsstoffe führen (Rohsius 2007). Bei der Auswahl von jeweils 3 Kakaosamen aus den unterschiedlich lange fermentierten Einzelchargen (siehe 3.1.3) wurde deren spezifischer Fermentationsgrad nicht berücksichtigt. Dieser ist bei anthocyanfreien Criollo-Samen, wie sie in der vorliegenden Studie verwendet wurden, auch nicht so einfach festzustellen wie bei Kakaoproben, die Anthocyane enthalten. Bei letzteren kann der Fermentationsgrad recht zuverlässig anhand ihrer Violettfärbung durch noch nicht oxidierte Anthocyane eingestuft werden (Pettipher 1986).

5.4.2 Zum Abbau von (-)-Epicatechin während der Fermentation

In den hier vorgestellten Ergebnissen von Criollo-Kakaosamen ist der Abbau des quantitativ am stärksten vertretenen phenolischen Monomers (-)-Epicatechin auf durchschnittlich 8 % Restgehalt innerhalb von 3 Tagen deutlich stärker als der durchschnittliche Abbau dieser Substanz, der in anderen Studien und bei anderen

Kakaotypen gemessen wurde (siehe 2.5). Zwar stellen Kim und Keeney 1984 bei einem der von ihnen untersuchten Fermentationsansätze sogar einen Rückgang des (-)-Epicatechins auf 5 % des ursprünglichen Gehaltes fest, jedoch wird dieser niedrige Wert erst nach 7, und nicht schon nach 3 Fermentationstagen erreicht. Zum Zeitpunkt von 3 Tagen nach Fermentationsbeginn liegt der von Kim und Keeney 1984 in demselben Fermentationsansatz gemessene (-)-Epicatechingehalt noch bei 35 % des ursprünglichen Wertes. Auch in den von Rohsius 2007 unter fermentationsähnlichen Bedingungen inkubierten und anschließend aerob getrockneten Kakaosamen sind nach 3 Inkubationstagen noch über 30 % des ursprünglichen (-)-Epicatechin-Gehaltes vorhanden. Trotz der mit 3 Tagen im Vergleich zu den meisten anderen Kakaosorten erheblich kürzeren Fermentationszeit (siehe 3.4) enthalten die in der vorliegenden Arbeit untersuchten, voll fermentierten Criollo-Kakaoproben mit durchschnittlich 2615 mg kg^{-1} ff TM erheblich niedrigere Mengen an (-)-Epicatechin als im Schnitt in Rohkakao gefunden werden. So enthalten die von Rohsius 2007 untersuchten Rohkakaoproben verschiedener Provenienzen durchschnittlich $7330 \text{ mg (-)-Epicatechin kg}^{-1}$ ff TM, während Kim und Keeney 1984 in den von ihnen untersuchten Proben durchschnittlich 6985 mg kg^{-1} (-)-Epicatechin ff TM finden.

Dieser deutlich niedrigere Gehalt an (-)-Epicatechin in Rohkakao aus authentischen Criollo-Samen im Vergleich zum den durchschnittlich in Rohkakao ermittelten Werten ist somit vermutlich die Ursache für das nach Wolters 1999 besonders milde und wenig bittere Flavour von Criollo-Rohkakao. Dabei unterscheiden sich nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit die (-)-Epicatechingehalte frischer Kakaosamen aller untersuchten genetischen Herkünfte nicht signifikant voneinander (siehe 4.2.3.3). Der geringe (-)-Epicatechingehalt von Rohkakao aus Criollo-Samen ist somit ausschließlich das Ergebnis eines offenbar genetisch determinierten, im Vergleich zu anderen Kakaosorten stärkeren Verlustes an dieser Substanz im Verlauf der Fermentation und der anschließenden Trocknung.

Als Ursache dafür, dass in Criollo-Samen die Catechingehalte im Verlauf der Fermentation so rasch abgebaut werden, kommen mehrere Faktoren in Frage. Denkbar ist, dass die Samenschale des Criollo-Typs besonders durchlässig ist für eindringende Essigsäure bzw. austretende phenolische Substanzen. Ein Einfluss der Testa auf die Veränderungen des Polyphenolgehaltes im Verlauf einer fermentationsähnlichen Inkubation von Kakaosamen wurde bereits durch Rohsius 2007 nachgewiesen, und auch Lambert und Aitken 2000 diskutieren die Bedeutung der Testa im Zusammenhang mit der Rohkakao-Qualität. Möglicherweise findet sich in den Criollo-Samen auch eine besonders starke Aktivität oxidierender Enzyme wie etwa der PPO, oder aber spezifische Eigenschaften der Pulpa verbessern die Versorgung mit Sauerstoff während der Fermentation. Die nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit signifikant größeren Parenchymzellen des Criollo-Keimblattgewebes könnten den raschen Verlust an

phenolischen Substanzen im Verlauf der Fermentation ebenfalls begünstigen (siehe 4.6.3.1).

Inwieweit die oben genannten Faktoren tatsächlich Auslöser des schnellen Abbaus phenolischer Inhaltsstoffe im Verlauf der Prozessierung der Samen von Criollo-Varietäten sind, sollte durch weiterführende Arbeiten geklärt werden.

Der Befund, dass prozessiertes Samenmaterial des Criollo-Typs grundsätzlich niedrigere Gehalte an monomeren Catechinen enthält als jenes mit anderem genetischen Hintergrund, entspricht nicht den Ergebnissen von Counet *et al.* 2004, welche in Kakaomasse aus Criollo-Samen verschiedener Herkunftsgebiete ganz unterschiedliche Konzentrationen dieser Substanzen finden. Vermutlich wiesen die hier untersuchten Proben jedoch keinen genetisch authentischen Criollo-Hintergrund auf. Die Autoren verwendeten Handelsware, welche fast nie auf reinem Criollo-Material basiert.

5.4.3 Zum Abbau von (+)-Catechin während der Fermentation

In der vorliegenden Arbeit wurde ein massiver Abbau des in frischen Kakaosamen gefundenen Flavan-3-ols (+)-Catechin auf durchschnittlich knapp 1 % des ursprünglichen Gehaltes festgestellt (siehe Abb. 68). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Befunden von Porter *et al.* 1991, die während der Fermentation einen Anstieg der Gehalte an Catechin und des assoziierten Procyanidins B1 (Epicatechin-(4 β →8)-Catechin) feststellen. Porter *et al.* 1991 vermuten, dass diese Substanzen während der Fermentation aus der Testa in den Samen hineindiffundieren. Die im Rahmen der vorliegenden Studie ermittelten Untersuchungsergebnisse zur Hydrolyse von Kakao-Polyphenolen (siehe 4.3) machen es jedoch wahrscheinlicher, dass sich in den von Porter *et al.* 1991 gefundenen Substanzen um (-)-Catechin und sein Derivat handelt, welche sich unter dem Einfluss von Säure und erhöhten Temperaturen aus (-)-Epicatechin neu gebildet haben. Nach Gotti *et al.* 2006 und Cooper *et al.* 2007 ist (-)-Catechin in Schokolade sogar in weitaus größeren Mengen vorhanden als (+)-Catechin. Auch Kofink *et al.* 2007 dokumentieren die Neubildung von (-)-Catechin während der Kakaofermentation durch Epimerisation von (-)-Epicatechin.

Innerhalb der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analytik der Fermentationsstadien von Criollo-Kakao steigen die gefundenen Catechingehalte ebenfalls zwischenzeitlich an; was mit der Neubildung freier (-)-Catechin-Monomere aus (-)-Epicatechin erklärt werden kann. Anschließende Oxidationsreaktionen (siehe 2.5) scheinen jedoch insgesamt die Erhöhung des Catechingehaltes im Vergleich zum Ausgangswert zu verhindern.

Die Neubildung von (-)-Catechin aus (-)-Epicatechin während der Fermentation ist somit vermutlich die Ursache dafür, dass hier keine positive Korrelation zwischen der Abnahme von (-)-Epicatechin und jener von (+)-Catechin festgestellt wurde.

5.4.4 Zum Abbau von Kaffeesäure-aspartat während der Fermentation

Selbst innerhalb der untersuchten Criollo-Proben, welche im Vergleich zu anderen Provenienzen besonders reich an Kaffeesäure-aspartat sind (siehe 4.2.4.3), liegt der Gehalt an dieser Substanz in unfermentierten Proben bei höchstens 20 % des (-)-Epicatechins. Dies entspricht auch den Ergebnissen von Tomas-Barberán *et al.* 2007, der beide Substanzen in einem Pulver aus frischen, entfetteten Kakaosamen mit besonders hohem Polyphenolgehalt quantifiziert hat. Der vom Autor gemessene Wert für Kaffeesäure-aspartat liegt hier bei etwa 16 % des (-)-Epicatechingehaltes.

Wie in Abb. 68 dargestellt, wird Kaffeesäure-aspartat während der hier untersuchten Fermentation von Criollo-Kakaosamen deutlich weniger stark abgebaut als die in frischen Kakaosamen dominierenden Catechin-Verbindungen. Selbst in den voll fermentierten Criollo-Proben liegt der Restgehalt an dieser Substanz im Schnitt noch bei etwa einem Drittel des Ausgangswertes. Dieser Befund entspricht tendenziell den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Hofmann (Universität Münster, Institut für Lebensmittelchemie). Diese findet allerdings überhaupt keine signifikanten Verluste an HCAA in Kakaosamen während der gesamten Prozessierung (persönliche Mitteilung, 2006).

Auch Wollgast 2005 findet einen im Vergleich zu allen anderen Kakao-Polyphenolen niedrigeren Abbau der von ihm untersuchten, ebenfalls zu den HCAA zählenden Clovamide während der Verarbeitung von Rohkakao zu Schokolade.

Die hohe Stabilität von HCAA gegenüber chemischen und physikalischen Einwirkungen wird auch durch Correia *et al.* 1995 bestätigt, welche die relativ geringen Verluste dieser Substanzen nach der Röstung von Kaffeebohnen dokumentieren.

Stark *et al.* 2006b finden in geröstetem Kakaopulver einen Gehalt an Kaffeesäure-aspartat von $428,43 \pm 10,11 \text{ mg kg}^{-1}$ Trockenmasse. Dies liegt unter den in der vorliegenden Arbeit gemessenen Werten für voll fermentierte Criollo-Samen, welche sich jedoch auch durch einen besonders hohen Ausgangswert an Kaffeesäure-aspartat auszeichnen (Abb. 67).

Der Abbau der HCAA während der Fermentation und der Trocknung ist im Vergleich zu den Catechin-Verbindungen so gering, dass ihr Gehalt bei den untersuchten Criollo-Samen mit hohen HCCA-Ausgangswerten nach Abschluss der Fermentation quantitativ fast im gleichen Bereich wie der in diesen Proben gemessene (-)-Epicatechingehalt liegt. In einigen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten, voll fermentierten Criollo-Proben sind die Gehalte an Kaffeesäure-aspartat sogar höher als jene von (-)-Epicatechin (Abb. 66).

Durch seine größere Resistenz gegenüber den Einwirkungen der Kakao-Prozessierung ist die HCAA-Menge im fertigen Kakaoprodukt wesentlich stärker durch den Gehalt im Ausgangsmaterial determiniert als der stark vom Fermentations- und Trocknungsverfahren abhängige Anteil an Catechinen. Die Auswahl von Kakaosorten mit hohem Gehalt an HCAA könnte somit eine geeignete Maßnahme sein, um trotz gleich

bleibender Prozessierungsbedingungen einen Rohkakao mit höherem Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen zu produzieren. Neben der Existenz von Sorten, deren Samen reich an HCAA sind, deuten die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse darauf hin, dass auch durch eine Verbesserung der Stickstoffversorgung ein höherer Gehalt an Kaffeesäure-aspartat in frischen Kakaosamen erreicht werden kann.

Die Arbeiten von Stark und Hofmann 2005, Sopheak und Lewis 2002 sowie Sanbongi *et al.* 1998 belegen, dass Vertreter aus der Gruppe der HCAA ähnliche aroma- und gesundheitsrelevante Eigenschaften besitzen wie jene aus der Gruppe der Catechine. Während letztere in Kakao bereits in zahlreichen Studien ausgiebig untersucht wurde, gibt es bisher nur wenige Arbeiten, welche die HCAA von Kakao beschreiben. Weiterführende Studien, die sich mit dem antioxidativen Potential und dem Flavour von Rohkakao auseinandersetzen, sollten zukünftig die Rolle der HCAA in diesem Zusammenhang stärker berücksichtigen.

5.5 Zur Histologie und Histogenese des Keimblattgewebes

Biehl 1973, Jaenicke 1973 sowie Müller 1998 dienen als Grundlage für die in 4.6 aufgeführte Interpretation der lichtmikroskopisch sichtbaren, cytologischen Merkmale des Keimblattgewebes von *T. cacao* L.. Selbstverständlich ermöglicht das hier verwendete LM-Verfahren keine Analytik ultrastruktureller Details, wie sie besonders ausführlich von Jaenicke 1973 durchgeführt wurde. Gegenüber den TEM-Arbeiten dieses Autors besitzt es jedoch den Vorteil, dass es neben der cytologischen auch eine histologische Analyse ermöglicht, da wesentlich größere Zellverbände untersucht werden können. Dadurch können bestimmte cytologische Besonderheiten auch anhand ihrer Häufigkeit und Verteilung im Gewebe interpretiert werden. Zudem können pro Einzelpräparat eine wesentlich größere Anzahl von Zellen analysiert werden.

5.5.1 Die Cytologie des reifenden Keimblattgewebes und seine Bedeutung für die Bestimmung des Zeitpunktes der Reife

Die in 4.6.3 aufgeführte Deutung der cytologischen Merkmale, welche nach der in 3.14 beschriebenen lichtmikroskopischen Präparation im reifenden Keimblattgewebe von *T. cacao* L. zu beobachten sind, wurde weitgehend übernommen von den Untersuchungsergebnissen aus Jaenicke 1973.

Die in 4.6.2 anhand der einzelnen Stadien beschriebene Reihenfolge der Einlagerung von Speicherstoffen in das Keimblattgewebe entspricht den Beobachtungen von Jones und Rost 1989 für *Oryza sativa* L.. Auch in Embryonen dieser Art ist zuerst Stärke, anschließend Fett und zuletzt Speicherprotein in den Speicherzellen nachweisbar.

Die Einlagerung der Speichersubstanzen in das Keimblattgewebe von *Oryza sativa* L. erfolgt in akropetaler Richtung (Jones und Rost 1989). Ob sie auch in reifenden Embryonen von *T. cacao* L. diesen Verlauf nimmt, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mikroskopisch untersucht. Dafür hätten die hier analysierten Keimblattgewebeproben aus den mittleren Bereichen der Samen jeweils mit Proben von Keimblattgewebe aus den unteren und oberen Abschnitten der Kotyledonen verglichen werden müssen. Ein in Rohsius 2007 veröffentlichtes Foto zeigt jedoch deutlich, dass die Einlagerung der Anthocyane in das Keimblattparenchym von *T. cacao* L. einen akropetalen Verlauf nimmt (Abb. 84). Der abgebildete Kakaoembryo befindet sich in einem Entwicklungsstadium, das sich offenbar zwischen den in der vorliegenden Arbeit untersuchten, 100 Tage sowie 120 Tage alten Proben befindet (siehe Abb. 69). Er zeigt eine beginnende Violettfärbung im basalen Bereich der Kotyledonen, während die oberen Abschnitte noch vollkommen weiß sind. Dieser Farbverlauf wird ganz offensichtlich durch das akropetale Fortschreiten der Einlagerung von Anthocyanen in das Keimblattparenchym hervorgerufen.



Abb. 84: Akropetale Akkumulation von Anthocyanen in den Keimblättern eines reifenden Kakaoembryos (Foto: Rohsius 2007)

Für die von Jaenicke 1973 untersuchten, unreifen Embryonen von *T. cacao* L. macht der Autor Altersangaben zwischen 54 und 102 Tagen. Bei der Bestimmung des Reifestadiums orientierte er sich an definiertem Material der gleichen Herkunft. Die Bestimmung des jeweiligen Alters erfolgte somit nicht so exakt wie im Falle der vorliegenden Arbeit, bei welcher der genaue Zeitpunkt der Bestäubung des untersuchten Materials bekannt war. Trotz dieser kleinen Ungenauigkeit bezüglich des Alters der von Jaenicke 1973 untersuchten Reifestadien machen es die dort veröffentlichten Angaben sehr unwahrscheinlich, dass sich darunter auch Proben eines Stadiums von etwa 120 Tagen nach der Bestäubung befanden. Wie die in Abb. 70 dokumentierten cytologischen Merkmale belegen, besitzt jedoch gerade dieses in seinem Reifeprozess bereits recht weit fortgeschrittene Stadium einige Besonderheiten, die für die Rohkakao-Produktion von erheblicher Relevanz sein könnten.

So haben zu dem genannten Zeitpunkt von 120 Tagen nach der Bestäubung nicht nur die Samen, sondern auch die Embryonen beider untersuchter Klone (EET 95 und ICS 95) ihre endgültige Größe erreicht. Auch die Färbung ihrer Keimblätter ist kaum von der Färbung der vollständig ausgereiften Embryonen dieser Klone zu unterscheiden.

Die erst 120 Tage lang gereiften Samen beider Klone stimmen daher, sobald sie der Frucht entnommen wurden, makroskopisch mit voll ausgereiften Kakaosamen überein. Auf cytologischer Ebene entsprechen sie diesen jedoch nicht, da nach den in der vorliegenden Arbeit gesammelten Ergebnissen die Einlagerung von Fett und Speicherproteinen in das Parenchymgewebe noch nicht abgeschlossen ist. Im Gegensatz dazu enthält das 120 Tage alte Keimblattparenchym der untersuchten Klone bereits einen großen Anteil der Anthocyane, welche in den PZ der reifen Kakaosamen enthalten sind (siehe 4.4). Anders als die anderen Speicherstoffe bestimmen die Anthocyane maßgeblich die Färbung des Keimblattgewebes, sodass einem 120 Tage alten Kakaosamens nicht anzusehen ist, dass er erheblich weniger Fett und Speicherprotein enthält als ein vollständig ausgereifter Samen.

Gerade bei der oft unsachgemäßen Ernte und Weiterverarbeitung für die Produktion von Massenkakao ist es somit sehr wahrscheinlich, dass neben reifen Kakaosamen ein nicht unerheblicher Prozentsatz der prozessierten Samen aus unreifen Früchten stammt. Der

daraus hergestellte Rohkakao kann aufgrund seines niedrigen Gehaltes an wertvollem Kakaofett sowie an den für die Aromaentwicklung relevanten Speicherproteinen nur von minderwertiger Qualität sein. Die These, dass sich ein akzeptables Kakaoaroma nur aus vollreifen Samen gewinnen lässt, wird auch getragen durch Hoskin und Dimick 1994. Der Reifegrad eines aus der Frucht entnommenen Kakaosamens lässt sich demzufolge nach Abschluss der Einlagerung der Anthocyane nur anhand cytologischer Merkmale des Keimblattparenchyms sicher bestimmen. Vor diesem Hintergrund überrascht es nicht, dass die Probenspender aus Ecuador (siehe 2.4.1) sich bei der Bestimmung des genauen Zeitpunktes der Reife im Falle des Klons EET 95 offenbar verschätzt haben. Dieser scheint bereits 140 Tage nach der Bestäubung erreicht zu sein (siehe 4.6.2). Das älteste zur Verfügung gestellte Stadium ist jedoch bereits 154 Tage alt und weist einige cytologische Merkmale auf, die auf eine beginnende Keimung hindeuten (siehe 4.6.2). Diese Vermutung wird auch von den Ergebnissen der biochemischen Analytik getragen, welche einen Rückgang des Polyphenolgehaltes des ältesten untersuchten Stadiums im Verhältnis zu jenem davor belegen (siehe 4.4). Ein solcher Rückgang des Gehaltes an phenolischen Inhaltsstoffen im Verlauf der Lagerung reifer Kakaosamen wird auch von Clapperton *et al.* 1994a und b beschrieben. Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Verwendung unreifer Samen wirkt sich eine solche lagerungsbedingte Abnahme der phenolischen Inhaltsstoffe, je nach Verwendungszweck des daraus hergestellten Rohkakaos, sogar günstig auf dessen Qualität aus, da sich sein Flavourpotential dadurch offenbar erhöht (Arikiah *et al.* 1994).

5.5.2 Deutung der kontrastlosen Flächen in den Vakuolen der PZ im Keimblattgewebe von *T. cacao* L.

Die Vakuolen der PZ sind sowohl in der TEM-Präparation von Jaenicke 1973 als auch in dem hier verwendeten LM-Verfahren überwiegend stark kontrastiert, ein Umstand, der in beiden Fällen auf ihren Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen zurückgeht.

Neben den stark gefärbten phenolischen Inhaltsstoffen finden sich in den Polyphenolvakuolen sowohl nach der TEM- wie auch nach der LM-Präparation kreisförmige Strukturen, die ungefärbt bleiben (siehe Abb. 71 b und Abb. 79 c). Jaenicke 1973 interpretiert diese als Einlagerungen von Purinalkaloiden in die Polyphenolvakuolen. Er beruft sich dabei auf eine sehr kurze Publikation von Brown 1954, nach dessen Angaben sich die Purinalkaloide von Kakaosamen in den Polyphenolzellen befinden. Zudem entspricht laut Jaenicke 1973 das für Kakaosamen bekannte Mengenverhältnis zwischen den phenolischen Kakao-inhaltsstoffen und den Purinalkaloiden mit dem Mengenverhältnis zwischen gefärbten und ungefärbten Anteilen der untersuchten Polyphenolvakuolen überein.

Von einer Speicherung der Purinalkaloide zusammen mit phenolischen Inhaltsstoffen in denselben Vakuolen gehen auch Mösli Waldhauser und Baumann 1996 aus, welche diese Substanzen in Zellkulturen von *Coffea arabica* L. untersucht haben. Allerdings nehmen

diese Autoren an, dass es innerhalb der Vakuolen zu einer Komplexbildung zwischen Purinalkaloiden und phenolischen Substanzen kommt und diese somit nicht in separaten Agglomerationen in den Vakuolen detektierbar sein dürften.

Neben den oben erwähnten Arbeiten gibt es kaum weitere Veröffentlichungen, die sich mit der Histo-Lokalisation von Purinalkaloiden befassen. Insgesamt gibt es offenbar noch keinen abschließenden Beweis dafür, dass die Purinalkaloide von *T. cacao* L. tatsächlich in den Pigmentzellen gespeichert werden. Um diesen zu erbringen wäre es erforderlich, die von Brown 1954 beschriebene Trennung der Pigmentzellen von den übrigen Parenchymzellen zu wiederholen und den daraus gewonnenen Extrakt mittels moderner Analyseverfahren zu untersuchen.

Sollten die Purinalkaloide tatsächlich in den Vakuolen der PZ des Speichergewebes von *T. cacao* L. lokalisiert sein, so ist es aus Sicht der Autorin äußerst unwahrscheinlich, dass es sich bei ihnen um die in 4.6.2 beschriebenen, kontrastlosen Einschlüsse in den Vakuolen handelt. Diese scheinen vielmehr auf eine unvollständige Befüllung der Vakuolen mit phenolischen Inhaltsstoffen hinzudeuten. Hierfür sprechen folgende Tatsachen:

1. Kreisförmige, kontrastlose Flächen finden sich gehäuft in den Polyphenolvakuolen der 120 Tage alten Reifestadien von *T. cacao* L., während sie in 140 Tage alten, reifen Proben desselben Klons vollständig fehlen (Abb. 70 und Abb. 71) Die biochemische Analyse beider Stadien zeigt deutlich eine Zunahme der Menge an phenolischen Inhaltsstoffen zwischen dem Stadium von 120 Tagen und jenem von 140 Tagen nach der Bestäubung.
2. Kakaosamen, die den Zustand der Reife gerade erreicht haben, besitzen kaum oder gar keine farblosen Einschlüsse in ihren Polyphenolvakuolen (siehe Abb. 71), obwohl sie selbstverständlich auch Purinalkaloide enthalten.
3. Kakaosamen, die nach Erreichen des Zustands der Reife bereits einige Zeit gelagert wurden, weisen bei mikroskopischer Untersuchung erneut kontrastlose Flächen in ihren Polyphenolvakuolen auf (siehe Abb. 71). Gleichzeitig wurde noch nie ein Anstieg von Purinalkaloiden während der Lagerung von Kakaosamen nachgewiesen, sehr wohl aber ein Abbau ihrer phenolischen Inhaltsstoffe (siehe Clapperton *et al.* 1994a und b).

Anhand des Vorkommens und der Anzahl kreisförmiger, kontrastloser Flächen in den ansonsten stark gefärbten Polyphenolzellen des Kakao-Keimblattgewebes kann daher offenbar bestimmt werden, wie lange der untersuchte Kakaosamen über den Zeitpunkt der Reife hinaus gelagert wurde und in welchem Maße sich seither die in ihm gespeicherten phenolischen Substanzen abgebaut haben. Über seinen Gehalt an Purinalkaloiden lässt sich anhand dieses Merkmals jedoch keine Aussage treffen.

5.5.3 Cytologische Besonderheiten der SZ in peripheren und LBE-nahen Bereichen des Keimblattgewebes

Die oftmals abweichende cytologische Struktur der Speicherparenchymzellen in der Umgebung von LBE und in der Nähe der Epidermen, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurde (siehe Abb. 80), findet sich in ähnlicher Form auch in TEM-Schnitten von *T. cacao* L.-Keimblattgewebe in Biehl *et al.* 1982. Sie geht möglicherweise auf Flüssigkeitsaufnahme und einen beginnenden Abbau von Speichersubstanzen im Zusammenhang mit der Samenkeimung zurück. Nach Smith und Flinn 1967 beginnt dabei der Abbau von Speicherstoffen auch in den Keimblättern der Erbse (*Pisum arvense* L.) in den peripheren Bereichen des Parenchymgewebes.

5.5.4 Mögliche Ursachen und Konsequenzen der größeren Keimblatt-Parenchymzellen des Criollo-Typs

In der vorliegenden Arbeit wurden die Samen von Vertretern einer großen Bandbreite verschiedener Criollo-Varietäten aus Venezuela untersucht. Alle diese Proben besaßen Keimblatt-Parenchymzellen, deren gemessene Flächen im Durchschnitt größer waren als jene von Proben der anderen untersuchten Kakaotypen UAF, LAF und Nacional. Zwischen diesen 3 Kakaotypen wurden keine signifikanten Unterschiede in der Größe ihrer jeweiligen Zellflächen festgestellt. Ebenso wenig wirkte sich die Herkunft der Proben auf die Größe der gemessenen Zellflächen aus (siehe 4.6.3.1).

Die geringe genetische Variabilität des Criollo-Typs (siehe 2.2.3.1) legt nahe, dass es sich bei den übereinstimmend großen Zellflächen der hier untersuchten Proben um ein Merkmal handelt, das in allen Criollo-Sorten auftritt.

Die in 4.6.3.1 beschriebene größere Varianz der Flächen der mikroskopisch ausgewerteten Polyphenolzellen kann mit der von den SP-Zellen abweichenden Form dieses Zelltyps erklärt werden. Während die gewöhnlichen SP-Zellen eine annähernd isodiametrische Form besitzen, ist die Form der Polyphenolzellen fast immer prosenchymatisch (siehe 2.2.1.2). Dabei übertrifft ihre Länge die Breite der Zellen bisweilen um ein Vielfaches. Somit sind ihre Zellflächen wesentlich stärker von dem zufälligen Anschnittswinkel der Polyphenolzellen im Präparat abhängig als jene der gewöhnlichen Speicherzellen.

Die Mechanismen, welche die endgültige Größe einer Zelle determinieren, sind bis heute noch nicht vollständig erforscht. Zu den Faktoren, von welchen eine positive Korrelation mit der Zellgröße nachgewiesen wurde, gehört der Ploidiegrad einer Zelle. So kann in *Pelargonium zonale* die Ploidiestufe der Zellen anhand der Zellgröße indirekt abgeschätzt werden (Li 2004a). Auch Kondorosi *et al.* 2000 tragen in ihrem Übersichtsartikel entsprechende Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Zellgröße und deren Ploidiegrad zusammen.

Polyploidie ist innerhalb der Angiospermen und speziell auch deren kultivierten Formen ein weit verbreitetes Phänomen. Auch für *T. cacao* L. gibt es Berichte über induzierte tetraploide Genotypen (Martinson 1975 und 1986). Etliche weitere Studien, darunter Dublin 1974, Lanaud 1987 sowie Sounigo *et al.* 2003 beschreiben daneben auch haploide Individuen von *T. cacao* L..

Glicenstein und Fritz 1989 beschreiben *T. cacao* L. jedoch als eine rein diploide Art ($2n = 2x = 20$); ein Ergebnis, welches in allen aktuellen Studien zitiert und indirekt auch durch Couch *et al.* 1993 verifiziert wird. Während von letztgenannter Arbeit nicht bekannt ist, von welchen Genotypen das für die Studie verwendete Probenmaterial stammt, verwendeten Glicenstein und Fritz 1989 einerseits Kreuzungen mit Trinitarios, andererseits den UAF NA 33. Criollos befinden sich nicht unter dem untersuchten Material.

Aus den hier aufgeführten Literaturdaten lässt sich schließen, dass es sich bei *T. cacao* L., von vereinzelt Ausnahmen abgesehen, in der Tat um eine diploide Art handelt. Tatsächlich wurde jedoch der Ploidiegrad des Typs Criollo bisher noch in keiner Studie untersucht. Die Möglichkeit, dass es sich bei den Criollos um polyploide Genotypen handelt, erscheint zunächst durchaus schlüssig, zumal Defizite in Ertrag und Wüchsigkeit, welche auch die Criollos auszeichnen, zu den möglichen Folgen von Polyploidie zählen (Strasburger *et al.* 1998).

Ein starkes Argument gegen die Hypothese, dass Criollos einen erhöhten Ploidiegrad besitzen, liefert die Tatsache, dass es sich bei den aus Kreuzungen zwischen Criollos und Forasteros hervorgegangenen Trinitarios offenbar um diploide Individuen handelt (Glicenstein und Fritz 1989). Die Folgegeneration einer Kreuzung zwischen diploiden und polyploiden ($n < 2x$) Individuen besteht jedoch in der Regel ebenfalls aus polyploiden Genotypen; so etwa aus überwiegend triploiden ($n = 3x$) Genotypen nach $2x \times 4x$ -Kreuzungen (Burton und Husband 2001, Van Huylenbroeck *et al.* 2005).

Eine Überprüfung des Ploidiegrades von Criollo-Individuen, z. B. per Flow Cytometry (FCM) könnte abschließend klären, ob die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefundenen, größeren Flächen der Keimblattzellen auf einen erhöhten Ploidiegrad des Criollo-Typs zurückzuführen sind oder ob diese eine andere, genetisch bedingte Ursache haben.

Von technischer Bedeutung ist die Frage, ob sich größere Flächen der Keimblatt-Parenchymzellen auf die sameninternen Prozesse während der Verarbeitung zu Rohkakao auswirken. Denkbar ist, dass ein Gewebe mit größeren Zellen schneller von den während der Fermentation in den Samen eindringenden Flüssigkeiten (wie z. B. Essigsäure) durchtränkt wird, da hierbei weniger Zellwandbarrieren überwunden werden müssen. Dadurch könnten sich die Prozesse der Zell-Dekompartimentierung und der daraus

resultierenden chemischen Reaktionen, die letztlich zur Bildung der aromarelevanten Substanzen führen, beschleunigen.

Auch das Herauswaschen von Sameninhaltsstoffen wie etwa den Polyphenolen während der Fermentation bzw. das Austreten von Essigsäure während der anschließenden Trocknung könnte durch ein Keimblattgewebe mit größeren Zellen begünstigt werden. Ein Indiz für den möglichen Zusammenhang zwischen großen Zellflächen und dem schnelleren Ablauf der oben genannten Fermentationsprozesse ist die Tatsache, dass die Fermentation von Criollo-Samen bereits nach 3 Tagen abgeschlossen ist (siehe 3.4). Auch Lambert *et al.* 2003 finden signifikante, genotypspezifische Unterschiede in den Verlusten an Procyanidinen während der Fermentation und der Trocknung, welche durch größeren Speichergewebezellen verursacht sein könnten.

Weitere Studien sind erforderlich, um das in der vorliegenden Arbeit gefundene Phänomen signifikant größerer Polyphenol- und Speicherzellen in Criollo abschließend abzusichern. In diesem Zusammenhang ist auch die Untersuchung einer größeren Bandbreite von Proben der anderen Kakaotypen wünschenswert, hier vor allen Dingen auch Proben des bisher noch nicht analysierten Trinitario-Typs.

5.5.5 Zur möglichen Histogenese der strukturellen Anordnung von SZ und PZ im Keimblattgewebe

Das Keimblattparenchym von *T. cacao* L. weist nach den in 4.6.4 vorgestellten Ergebnissen eine lokal unterschiedliche, histologische Struktur auf: In über 75 % der daraufhin untersuchten Präparate ist das Gewebe ausschließlich aus Zellen aufgebaut, deren räumliche Anordnung eher zufällig zu sein scheint. Die enthaltenen Polyphenolzellen sind gleichmäßig im Gewebe verteilt und treten entweder einzeln oder in Clustern auf, welche im Flächenschnitt aus durchschnittlich 3, vereinzelt bis zu 7 Idioblasten bestehen. In 24 % der untersuchten Präparate finden sich Bereiche, in denen sowohl Speicher- als auch Polyphenolzellen streng reihenförmig angeordnet sind. Sowohl die Untersuchungen am Binokular als auch die mikroskopische Analytik weisen darauf hin, dass die beobachteten reihenförmigen Anordnungen der Polyphenolzellen (abgesehen von jenen in direkter Nachbarschaft der Leitbündelelemente) immer unmittelbar unterhalb der Keimblattepidermis und nahezu ausschließlich auf der adaxialen Seite der Keimblätter auftreten. Ferner wurden sie unter dem Binokular nur in horizontal zur Embryonalachse geschnittenem Keimblattgewebe gefunden.

Die histogenetische Entstehung der hier beschriebenen reihenförmigen Zellstrukturen in adaxialen Randbereichen des Speichergewebes konnte anhand der untersuchten Reifestadien nicht vollständig nachvollzogen werden, da hierfür wichtige Entwicklungsabschnitte fehlten. Zur Deutung der Entstehung dieser Zellreihen wurden somit zusätzlich Literaturdaten zur Histogenese von Keimblättern verwendet. Allerdings gibt es offenbar nur sehr wenige Untersuchungen zu diesem Thema. Nach Noll 1935

sowie Steffen 1952 entspricht die Entwicklung der Kotyledonen jener von Laubblättern. Von Guttenberg 1960 schließt sich dieser Deutung nicht vorbehaltlos an, da die Keimblätter nach seiner Auffassung nicht aus der Achse hervorgehen und somit nicht mit den Laubblättern homolog sind. Unabhängig von dieser offenbar bis heute nicht vollständig geklärten Frage bilden sich die verschiedenen Gewebetypen der Keimblätter durch meristematische Zonen, welche durchaus mit jenem der Laubblätter vergleichbar sind. So wird die Epidermis der Kotyledonen durch ein oberes (adaxiales) sowie ein unteres (abaxiales) Dermatogen gebildet. Für die Differenzierung des darunter liegenden Gewebes ist das Subdermatogen verantwortlich. Dieses Randmeristem bildet eine adaxiale und eine abaxiale Zellplatte aus. Aus erstgenannter geht in vielen Laubblättern das Palisadenparenchym, aus letzterer das Prokambium und das Schwammparenchym hervor (von Guttenberg 1960).

Aus diesen hier kurz zusammengefassten Literaturdaten lässt sich schließen, dass das adaxiale, subdermatogene Randmeristem für die Bildung von Zellreihen im Keimblattgewebe von *T. cacao* L. verantwortlich ist. Dieses bildet während des Dickenwachstums offensichtlich kontinuierlich Parenchymzellen, die sich von außen ins Innere der Keimblätter schieben. Auf diese Weise lassen sich auch die Strukturen des wachsenden Keimblattgewebes in Abb. 70 b deuten.

Auf abaxialer Seite wächst das Parenchymgewebe offenbar nicht mit gleicher Regelmäßigkeit, sodass hier - abgesehen von den äußeren Randbereichen der Keimblätter - keine reihenförmigen Strukturen entstehen. Als ein solches eher ungeordnetes Wachstum des Parenchymgewebes lässt sich die histologische Struktur in Abb. 70 a interpretieren.

Fraglich bleibt, ob das gesamte Parenchymgewebe auf adaxialer Seite ein ursprünglich reihenförmig geordnetes Dickenwachstum aufweist, obwohl die beschriebenen Zellreihen nicht im gesamten adaxialen Gewebe der reifen Keimblätter zu finden sind. Möglicherweise bleiben die Zellreihen nur dort erhalten, wo bis zuletzt ein Wachstum des Parenchyms stattgefunden hat, während sie in älteren Gewebeabschnitten durch mechanische Einwirkungen beim Zusammendrücken und Falten des Gewebes verloren gehen.

Der Grund dafür, dass die hier beschriebenen Zellreihen nur in quer geschnittenem Samengewebe beobachtet werden konnten (siehe Abb. 78), liegt vermutlich darin, dass diese meist nicht im 90°-Winkel zur Keimblattepidermis verlaufen. Ihre reihenförmige Struktur zeigt sich somit offenbar nur im mehr oder weniger horizontal zur Embryonalachse geschnittenen Gewebe.

Nach der hier vorgestellten Theorie wird aus Zellreihen aufgebautes Parenchymgewebe in Semidünnschnittpräparaten durch das Keimblattgewebe von *T. cacao* L. nur unter folgenden Bedingungen gefunden

1. Das präparierte Gewebe ist adaxial oder gehört zu den äußeren abaxialen Randabschnitten der Keimblätter.

2. Das Gewebe wurde horizontal zur Embryonalachse geschnitten.
3. Das untersuchte Keimblattparenchym gehört zu einem Abschnitt, dessen Wachstum erst unmittelbar vor der Reife beendet wurde.

In Hinblick auf die Häufigkeit von Reihenstrukturen oder Clustern im Keimblattparenchym wurden keine klon- bzw. typspezifischen Unterschiede gefunden. Die jeweilige Anordnung der Polyphenolzellen im Keimblattgewebe führt auch zu keiner Veränderung des prozentualen Anteils dieser Idioblasten am Parenchymgewebe.

5.5.6 Zur Verteilung der Polyphenolzellen im Keimblattgewebe

In früheren Arbeiten wird eine größere Dichte von Polyphenolzellen in den unter der Epidermis liegenden Bereichen des Keimblattparenchyms beschrieben (Müller 1998 u. a.). Diese Vermutung kann durch die für die vorliegende Arbeit erstellten Präparationen weder eindeutig bestätigt noch widerlegt werden. Da viele der erstellten Semidünnschnitte keinem bestimmten Abschnitt des Speichergewebes zugeordnet werden können, war eine systematische Auswertung der erstellten Präparate unter diesem Gesichtspunkt nicht sinnvoll. Tatsächlich lassen einige der Schnittpräparate, deren ursprüngliche Position im Speichergewebe anhand des Vorhandenseins von Epidermen und/oder LBE bestimmbar ist, den Schluss zu, dass Polyphenolzellen im epidermisnahen Parenchymgewebe in etwas größerer Dichte auftreten als in den zentralen Bereichen (siehe Abb. 79 d). Diese mögliche Häufung von PZ unmittelbar unterhalb der Epidermis ist jedoch - falls vorhanden - nicht sehr ausgeprägt. Die möglicherweise etwas geringere Dichte von PZ des zentralen Keimblattparenchyms dürfte dabei vollkommen ausgeglichen werden durch das höhere Aufkommen von PZ im Bereich der in diesem Gewebeabschnitt vorkommenden LBE. Somit dürften weder die jeweilige strukturelle Anordnung der Polyphenolzellen noch deren Verteilung im Gewebe für lokal unterschiedliche physiologische Prozesse während der Kakaofermentation verantwortlich sein.

Ökophysiologisch gesehen dient die gleichmäßige Verteilung phenolischer Substanzen im Speichergewebe von *T. cacao* L. mit großer Wahrscheinlichkeit der Verhinderung von Fraß der Samen durch ihre Verbreiter (Affen und Nagetiere). Letztere verwerfen die nährstoffreichen, aber durch ihren Polyphenolgehalt sehr bitteren Samen zugunsten der süß-aromatischen Fruchtpulpa.

5.5.7 Zum Vorkommen phenolischer Inhaltsstoffe und ihrer oxidierenden Enzyme in der Epidermis und in ihren Trichomen

Neben den in 4.6.4.2 dokumentierten Ergebnissen gibt es bisher nur wenige Arbeiten, welche sich der cytologischen Struktur der Epidermis von *T. cacao* L. widmen. In Jaenicke 1973 werden die prozentualen Anteile der in den Epidermiszellen vorkommenden Reservestoffe aufgelistet. Demnach finden sich in ihnen durchschnittlich 10 % Lipidvakuolen, 39 % Proteinvakuolen und 5 % Plastiden mit Stärke. Ein mögliches

Vorhandensein phenolischer Inhaltsstoffe in den Epidermiszellen erwähnt der Autor nicht. Er beschreibt auch nicht die auf der Epidermis von *T. cacao* L. wachsenden Trichome. In der ansonsten mit umfangreichem Bildmaterial ausgestatteten Arbeit findet sich zudem kein einziges Foto einer Keimblatt-Epidermiszelle. Daraus muss geschlossen werden, dass der Autor sich in seinen elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Kakao-Embryonen nur flüchtig der Epidermis gewidmet hat. Sie bietet somit keine umfassende Grundlage für die Beurteilung des Vorhandenseins phenolischer Inhaltsstoffe in gewöhnlichen Keimblatt-Epidermiszellen von *T. cacao* L..

Die Untersuchung der Epidermis der Speicherkeimblätter von *T. cacao* L. war auch kein Schwerpunkt der elektronenmikroskopischen (TEM) Untersuchungen von Müller 1998. Auch hier findet sich nur eine kurze Beschreibung der Zellform. Ein wenig ausführlicher werden die auf der Epidermis wachsenden Trichome beschrieben.

Auf einer bisher unveröffentlichten TEM-Aufnahme, welche im Rahmen der Arbeit von Müller 1998 erstellt wurde, ist eine typische Epidermiszelle des Keimblattgewebes von *T. cacao* L. abgebildet (Abb. 85). Anschnitte der beiden angrenzenden Epidermiszellen sind ebenfalls abgebildet. Abgesehen von den teilweise herausgebrochenen Lipidvakuolen sind die subzellulären Details recht gut erhalten geblieben.

Den größten Raum nimmt eine zentral gelegene Vakuole ein, deren schwach kontrastierter Inhalt offenbar frei ist von phenolischen Inhaltsstoffen. Das durch die Zentralvakuole an den Rand gedrängte Zytoplasma enthält kleine granuläre Einschlüsse, die aufgrund ihrer Struktur als Stärkekörner (stärkehaltige Plastiden) identifizierbar sind. Daneben enthält die Epidermiszelle globuläre Einschlüsse, die sich aus dem Präparat herausgelöst haben. Demnach handelt es sich dabei um Lipidvakuolen, die bei der in Müller 1998 beschriebenen TEM-Präparation nicht immer optimal erhalten bleiben. Schließlich sind in den fotografierten Epidermiszellen noch Vakuolen mit Durchmessern zwischen 2 und 5 μm erkennbar, die aufgrund ihrer Kontrastierung als Proteinvakuolen (Aleuron) identifizierbar sind.

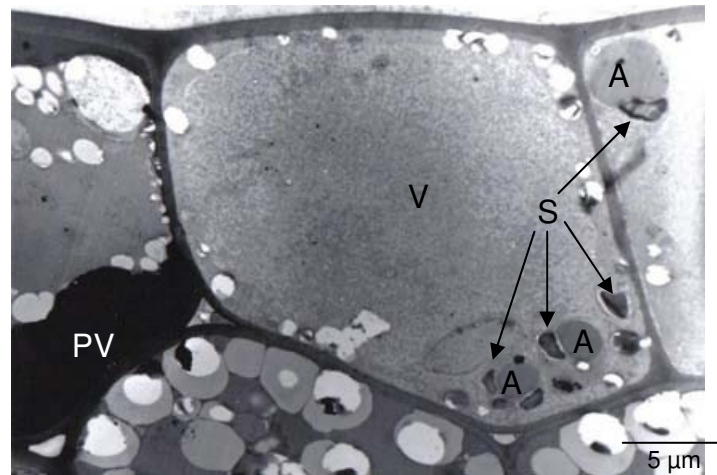


Abb. 85: TEM-Aufnahme einer Epidermiszelle des Keimblattgewebes von *T. cacao* L.
A: Aleuron; **S:** stärkehaltige Plastiden; **PV:** mutmaßliche Polyphenolvakuole;
V: Vakuole

Die Ultrastruktur der auf der TEM-Aufnahme in Abb. 85 dargestellten Epidermiszelle bestätigt die in 4.6.4.2 dokumentierte lichtmikroskopische Analytik zur Cytologie der Epidermiszellen der Keimblätter von *T. cacao* L. Sie liefert außerdem einen Hinweis auf das gelegentliche Auftreten von Polyphenolzellen in der Keimblattepidermis, da die links angrenzende Epidermiszelle einen dunkel kontrastierten Einschluss enthält, bei dem es sich möglicherweise um eine Polyphenolvakuole handelt (Abb. 85).

Selbst unter der Voraussetzung, dass in der Epidermis von Kakao-Keimblättern gelegentlich Polyphenolzellen auftreten, erklären die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht, warum es in diesem Bereich zu einer besonders schnellen und starken Verbräunungsreaktion kommt (siehe Abb. 78). Schließlich enthält die Epidermis in jedem Fall wesentlich weniger Polyphenolzellen als das Keimblattmesophyll. Auch in der direkt an die Keimblattepidermis angrenzenden Schicht des Speichergewebes treten Polyphenolzellen nicht gehäuft auf - einmal abgesehen von den in 4.6.4 beschriebenen Reihenstrukturen.

Eine mögliche Erklärung für die schnelle Verbräunung der Keimblattepidermis könnte eine dort lokalisierte, hohe Aktivität oxidativ wirksamer Enzyme (Polyphenol-Oxidasen, Peroxidasen) sein. In Kombination mit den phenolischen Inhaltsstoffen in Mesophyll und Trichomen des Keimblattes könnten diese in Kakaosamen bereits vielfach nachgewiesenen Enzyme der Abwehr von Herbivoren dienen. Ähnliche Verteidigungsmechanismen wurden bereits in vielen anderen Pflanzen gefunden, wie etwa in *Nicotiana*-Arten (Patterson *et al.* 1974), in *Medicago sativa* (Ranger und Hower 2001), in *Fragaria × ananassa* (Steinite und Ievinsh 2003) sowie in diversen Arten der Gattungen *Solanum* und *Lycopersicon* (Yu *et al.* 1992). Von Lina Stoll (Universität Hamburg, Fachbereich Biologie) wurde bereits eine um ein Vielfaches erhöhte Aktivität von Polyphenoloxidasen in den epidermisnahen Bereichen des Keimblattgewebes von *T. cacao* L. nachgewiesen (persönliche Mitteilung, 2007). Eine

Verifizierung dieser Hypothese, z. B. mittels immunocytochemischer Verfahren, steht jedoch noch aus.

Das Vorhandensein phenolischer Inhaltsstoffe in den Trichomen der Epidermis von *T. cacao* L. wurde auch von Alemanno *et al.* 2003 dokumentiert. In der genannten Publikation wird das Foto eines Trichoms auf dem Sepal einer Blüte von *T. cacao* L. gezeigt, dessen teils gelbliche, teils bläulich-weiße Fluoreszenz nach Inkubation mit Neu's Reagenz (siehe 5.1.5.2) von den Autoren auf das Vorhandensein von Flavonoiden bzw. Hydroxyzimtsäuren zurückgeführt wird. In den strukturell sehr ähnlich aufgebauten Trichomen auf der Keimblattepidermis von Kakaosamen wurden bereits durch Müller 1998 Polyphenolzellen nachgewiesen, deren lichtmikroskopisch sichtbare cytologische Struktur den in das Keimblattparenchym eingelagerten Idioblasten in etwa entspricht. Durch die vorliegende Arbeit wurden diese Ergebnisse nochmals bestätigt (Abb. 80). Inwieweit die Trichome der Keimblattepidermis von *T. cacao* L. jedoch z. B. auch HCAA enthalten, konnte aufgrund der bläulich-weißen Eigenfluoreszenz der Zellwände im gesamten untersuchten Samengewebe nicht ermittelt werden.

5.5.8 Biologische Funktion der phenolischen Inhaltsstoffe im Bereich der Leitbündelelemente des Kakao-Keimblattgewebes

Die rasche Verbräunungsreaktion frischen Keimblattgewebes von *T. cacao* L. im Bereich der Leitbündelelemente kann hinreichend mit dem gehäuften Auftreten von Polyphenolzellen in diesen Gewebeabschnitten erklärt werden.

Die Agglomeration von Polyphenol- und Tanninzellen im Bereich der Leitbündelelemente wurde bereits in vielen verschiedenen Pflanzenarten beschrieben; so etwa in *Picea abies* L. (Nagy *et al.* 1998), in *Gossypium* L. (Daayf *et al.* 1997), in *Prunus avium* L. (Gutmann und Feucht 1991), in *Aloe hereroensis* ENGLER (Chausser-Volfson *et al.* 2002), in *Pinus radiata* D. Don. (Barnett 1974) sowie in *Nelumbo nucifera* Gaertn. (Esau 1975). Auch in gewöhnlichen Laubblättern unterschiedlichen Alters von *T. cacao* L. finden sich Polyphenolzellen in enger Nachbarschaft zu allen Leitbündelelementen (Elwers, unveröffentlichtes Material).

Gutmann und Feucht 1991 schlagen eine Funktion der Polyphenolzellen im Bereich der Leitbündelelemente als Speichersubstanzen, sowie zur Abwehr saugender Insekten vor. Daayf *et al.* 1997 weisen eine im Vergleich zu anfälligen Individuen stärkere Akkumulation phenolischer Substanzen im Bereich der Leitbündelelemente von Wurzeln resistenter Baumwollpflanzen nach, die mit dem Pilz *Verticillium dahliae* infiziert wurden. Nagy *et al.* 1998 finden ähnliche Reaktionen im Gewebe von Leitbündelelementen der norwegischen Fichte (*Picea abies* L.) nach einer Infektion mit dem Pilz *Ceratocystis polonica*. (Siem.) C. Moreau.

Von einer mit den hier aufgeführten Beispielen vergleichbaren Bedeutung der Polyphenolzellen im Bereich der Leitbündelelemente zur Verteidigung speziell gegen Pilzbefall kann auch in Samen von *T. cacao* L. ausgegangen werden.

Für die Invasion von Milch- und Essigsäure in das Keimblattparenchym während der Fermentation sind die Leitbündelelemente im Keimblattgewebe von *T. cacao* L. offenbar von untergeordneter Bedeutung. Sobald die Barriere der Testa überwunden ist, dringen diese Substanzen über die Epidermis des ruminierten Embryos großflächig ein. Dies entspricht auch den Ergebnissen von Rohsius 2007.

5.5.9 Weiterführende Untersuchungen zur Lokalisation von Substanzen aus der Gruppe der HCAA in Kakaosamen

Die hier diskutierten Ergebnisse zur cytologischen Struktur der Keimblätter liefern keinen Hinweis auf eine mögliche Lokalisation der kakaoeigenen HCCAs außerhalb der Polyphenolzellen. Auch die bereits in Müller 1998 veröffentlichten TEM-Aufnahmen liefern keine weiterführenden Indizien. Nach Nielson und Griffith 1978 bilden alle phenolischen Substanzen, die eine *o*-Dihydroxygruppe besitzen, starke Komplexe mit Osmiumtetroxid. Somit müsste auch das im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Kaffeesäure-aspartat in der von Müller 1998 wie auch in der von Jaenicke 1973 durchgeführten Präparation stark kontrastiert werden. Sollte diese Substanz, wie in 5.1.5.2 diskutiert, außerhalb der Polyphenolzellen lokalisiert sein, so scheint sie hier keine auffälligen Agglomerate zu bilden. Eine Adhäsion an die Zellwände ist denkbar, könnte jedoch nur mit weiterführenden Verfahren, wie in 5.1.5.2 vorgeschlagen, nachgewiesen werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden der Gesamt-Polyphenolgehalt sowie die einzelnen monomeren phenolischen Inhaltsstoffe von Kakaosamen an einem breit gefächerten Sortiment reifer, unfermentierter Kakaoproben von 6 verschiedenen Standorten untersucht. Der Hauptschwerpunkt bestand dabei in dem Auffinden genetisch bedingter und/oder standortspezifischer Unterschiede in Gehalt, Zusammensetzung und Verteilung phenolischer Inhaltsstoffe in reifen Kakaosamen.

Daneben wurden auch Kakaoproben verschiedener Reife- und Fermentationsstadien analysiert.

Neben der biochemischen Analyse per Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz und RP-HPLC-PDA kamen dabei auch lichtmikroskopische Verfahren zum Einsatz.

Hinsichtlich des Gesamt-Polyphenolgehaltes und der quantitativ dominierenden phenolischen Substanzen aus der Gruppe der Flavan-3-ole ((-)-Epicatechin u. a.) wurden keine genetisch bedingten Unterschiede zwischen den untersuchten, reifen Kakaoproben gefunden.

Bezüglich der Anthocyangehalte wurden die bereits aus anderen Studien bekannten Unterschiede zwischen dem Kakaotyp Criollo (weitgehendes Fehlen dieser Substanzen in den Keimblättern) und den anderen existierenden Kakaotypen (Forastero und Trinitario) bestätigt. Auch die aus Selbstbestäubung hervorgegangenen Samen des LAF-Klons Catongo zeichnen sich durch die Abwesenheit von Anthocyanen aus. Zwischen den anderen untersuchten Kakaoproben wurden keine statistisch signifikanten, genetisch determinierten Unterschiede im Anthocyangehalt gefunden.

Bezüglich des zu den HCAA gerechneten Kaffeesäure-aspartats wurde ein signifikanter Unterschied zwischen dem Typ Criollo und den anderen untersuchten Kakaotypen festgestellt. Hierbei zeichneten sich die Samen der Criollo-Proben durch signifikant höhere Gehalte an dieser Substanz aus.

Zwischen den verschiedenen beprobten Herkunftsgebieten wurden teils signifikante Unterschiede im Gesamtpolyphenolgehalt, sowie in den Gehalten der einzelnen phenolischen Inhaltsstoffe festgestellt. Hierbei wurde vornehmlich für den Standortfaktor „Düngung“ und somit für die Nährstoffversorgung der Mutterpflanze ein signifikanter Einfluss auf den Gehalt einzelner dieser phenolischen Substanzen nachgewiesen. So wurden in Kakaosamen, welche von Bäumen ungedüngter Standorte stammten, signifikant höhere Gesamt-Polyphenolgehalte und höhere Gehalte an den phenolischen Einzelsubstanzen (-)-Epicatechin und den Anthocyanen 3- α -L-Arabinosidyl-cyanidin sowie 3- β -D-Galactosidyl-cyanidin gefunden. Gleichzeitig enthielten Kakaosamen ungedüngter Standorte jedoch signifikant niedrigere Mengen an Kaffeesäure-aspartat als jene gedüngter Standorte.

Aus den hier zusammengefassten Ergebnissen der biochemischen Analytik phenolischer Inhaltsstoffe reifer, unfermentierter Samen von *T. cacao* L geht hervor, dass es sowohl genetische als auch standortspezifische Einflüsse auf den Gehalt und die Zusammensetzung phenolischer Inhaltsstoffe in Kakaosamen gibt.

Bezogen auf die unterschiedlichen Kakaotypen unterscheidet sich somit vornehmlich der Criollo-Kakao signifikant von allen restlichen untersuchten Kakaoproben. Neben der bereits hinlänglich aus früheren Studien bekannten Abwesenheit von Anthocyanen in Samen dieses Kakaotyps wurde durch die vorliegende Arbeit erstmals ihr signifikant höherer Gehalt an Kaffeesäure-aspartat nachgewiesen. Abweichend von anderen Studien wurden jedoch keine niedrigeren Gesamt-Polyphenolgehaltes bzw. niedrigere Gehalte an den in allen untersuchten Kakaoproben mengenmäßig dominierenden Catechinen gefunden.

Der hier erbrachte Nachweis einer Beeinflussung des Polyphenolgehaltes durch die Standortdüngung wurde für Kakaosamen noch in keiner anderen Studie beschrieben. Dabei wurde die Veränderung des Polyphenolgehaltes einer Pflanze in Abhängigkeit von ihrer Nährstoffversorgung bereits durch viele Beispiele aus dem Pflanzenreich belegt. Verschiedene ökophysiologische Modellrechnungen liefern Erklärungsansätze für dieses Phänomen (siehe 2.3).

Die innerhalb der vorliegenden, sehr breit angelegten Studie gefundenen, genetischen und standortspezifischen Einflüsse auf den Polyphenolgehalt frischer, reifer Kakaosamen sollten durch gezielte Versuchsreihen in weiterführenden Untersuchungen abgesichert werden. Eine dadurch erbrachte Verifizierung und Verfeinerung der vorliegenden Ergebnisse könnten von großem Wert für eine gezielte Beeinflussung des Polyphenolgehaltes reifer Kakaosamen sein. Letztere könnte bei der Produktion von Rohkakaos mit gesteigertem (oder auch besonders niedrigem) Gehalt phenolischer Inhaltsstoffe zum Einsatz kommen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein mikroskopischer Vergleich des Keimblattgewebes genetisch unterschiedlicher Kakaoproben durchgeführt. Dabei wurden vornehmlich die Polyphenolzellen (PZ), in welche der größte Teil der phenolischen Inhaltsstoffe eingelagert ist, anhand von Semidünnschnitten durch das Keimblattgewebe lichtmikroskopisch untersucht. Demnach gibt es hinsichtlich der Verteilung der PZ im Keimblattgewebe von *T. cacao* L keine signifikanten, genetisch determinierten Unterschiede. Auch sind die Polyphenolzellen innerhalb des Keimblattparenchyms offenbar insgesamt recht gleichmäßig verteilt. Zumeist liegen sie hier in Clustern vor, die im Flächenschnitt aus 3 bis 7 Einzelzellen bestehen. Unterhalb der adaxialen Keimblattepidermis kommt es daneben auch zur Ausbildung von Reihen von bis zu 10 Einzelzellen. Im Bereich der Leitbündelelemente treten gehäuft stark prosenchymatische PZ auf, die hier ebenfalls lange Reihen bilden.

Im Gegensatz zu der in Keimblättern der Art *T. cacao* L offenbar recht einheitlichen Verteilung der PZ wurden typspezifische Unterschiede bezüglich der Flächen der Keimblatt-Parenchymzellen gefunden. Demnach besitzen die Keimblätter der untersuchten Proben vom Typ „Criollo“ signifikant größere Polyphenol- und Speicherzellen (SZ) als jene der anderen untersuchten Kakaoproben. Der Unterschied in der Größe der Parenchymzellen ist dabei in den untersuchten Proben weitgehend unabhängig von der Größe der Samen, sodass auch kleine Criollo-Samen ein vergleichsweise großzelliges Keimblattparenchym besitzen.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde nicht untersucht, warum es in den untersuchten Criollo-Samen zur Ausbildung größerer Parenchymzellen kommt. Eine Abweichung im Ploidiegrad, welche innerhalb des Pflanzenreichs häufig zur Ausbildung größerer Zellen führt, ist eher unwahrscheinlich, da die vom Criollo-Typ abstammenden Trinitario-Kakaos nach den Ergebnissen früherer Studien offenbar nicht polyploid sind.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen den vergleichsweise kurzen Fermentationszeiten von Criollo-Kakao (s. u.) und den größeren Zellen seines Keimblattparenchyms ist nicht auszuschließen und könnte das Thema weiterführender Untersuchungen sein.

Die biochemischen und mikroskopischen Untersuchungen des reifenden Keimblattgewebes von *T. cacao* L. zeigen eine positive Korrelation zwischen dem Füllungsgrad der Polyphenolvakuolen und den biochemisch ermittelten Gehalten an phenolischen Inhaltsstoffen derselben Reifestadien. Dabei gibt es erhebliche, genetisch bedingte Unterschiede in der Zeitdauer bis zum Erreichen der Samenreife. Letztere sind bereits aus den Arbeiten anderer Autoren bekannt.

Die mikroskopischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass die Akkumulation phenolischer Inhaltsstoffe im Keimblattgewebe bereits weitgehend abgeschlossen ist, bevor die umgebenden, gewöhnlichen Speicherzellen vollständig mit Fett und Speicherproteinen gefüllt sind. Daher können Kakaosamen bezüglich dieser Inhaltsstoffe noch unreif sein, obwohl ihre Keimblätter bereits durch Anthocyane violett gefärbt sind und sie sich makroskopisch daher nicht von reifen Kakaosamen unterscheiden. Dies begünstigt eine Verwendung unreifer Kakaosamen zur Herstellung von Rohkakao, wodurch es zu Defiziten in der Flavour-Entwicklung kommen muss.

Erstmals wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Veränderungen im Gehalt phenolischer Inhaltsstoffe im Rahmen der Fermentation von Samen des Typs Criollo untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass es in Criollo-Samen im Verlauf der Fermentation zu einem deutlich schnelleren Abbau der einzelnen phenolischen Inhaltsstoffe kommt als dies bei Samen anderer Kakaotypen der Fall ist. So verlieren Criollo-Samen während ihrer nach nur 3 Tagen abgeschlossenen Fermentation über 90 % des ursprünglichen Gehaltes an dem wichtigsten phenolischen Monomer (-)-Epicatechin. Ein derart hoher Verlust tritt laut entsprechender Studien in Samen anderer Kakaotypen

erst nach einer deutlich längeren Fermentationszeit auf oder wird gar nicht erreicht. Auch die Gehalte der anderen in Criollo-Samen quantifizierten phenolischen Substanzen nehmen im Verlauf der untersuchten Fermentationen rasch ab. Am widerstandsfähigsten gegenüber dem Abbau während der Fermentation zeigt sich das Kaffeesäure-aspartat, von welchem nach Abschluss der Fermentation im Schnitt noch 39 % des ursprünglichen Gehaltes vorhanden sind.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das vielfach beschriebene, milde Flavour von Criollo-Rohkakao u. a. durch den raschen Verlust an phenolischen Inhaltsstoffen im Verlauf der Fermentation verursacht wird. Während der Gesamt-Polyphenolgehalt und der Gehalt des wichtigsten Monomers (-)-Epicatechin in reifen, unfermentierten Criollo-Samen jenem anderer Kakaotypen entspricht, liegen diese im fertigen Rohkakao, trotz kürzerer Fermentationszeiten, in deutlich geringeren Mengen vor.

Die Ursache für den raschen Verlust phenolischer Inhaltsstoffe im Verlauf der Fermentation von Criollo-Samen sollte in weiterführenden Arbeiten untersucht werden. Interessant wäre es hierbei zu klären, inwieweit die oben beschriebenen, signifikant größeren Zellen des Keimblattparenchyms von Criollo-Kakao in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen. Es ist denkbar, dass die während der Fermentation in den Samen eindringenden Substanzen das großzellige Criollo-Gewebe schneller durchdringen und dadurch die biochemischen Prozesse der Kakaofermentation rascher ablaufen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass es auch nach mehreren Jahrzehnten intensiver Erforschung der phenolischen Inhaltsstoffe von Kakaosamen noch immer viele offene Fragen auf diesem Gebiet gibt. Insbesondere wird deutlich, dass der auf rein (lebensmittel-)chemische Aspekte beschränkte Ansatz der meisten Veröffentlichungen wichtige Teilaspekte des Themas ausblendet. Vielfach kommen heute modernste Analyseverfahren zum Einsatz, welche das Auffinden und Quantifizieren auch solcher phenolischen Substanzen ermöglicht, die nur in Spuren vorhandenen sind. Der Wert solcher Ergebnisse bleibt jedoch gering, wenn ihr ökophysiologischer Hintergrund unverstanden bleibt. Auch immer neue Untersuchungen zum Abbau der Polyphenole im Verlauf der Kakaofermentation sind wenig sinnvoll, wenn dabei die strukturellen Aspekte dieses Vorganges ausgeschlossen werden.

Zukünftige Arbeiten zum Thema Kakaqualität sollten stets berücksichtigen, dass Kakaosamen biologische Produkte sind, die sowohl strukturell als auch chemisch durch genetische Disposition, Anbaubedingungen und Reifegrad geprägt werden. Erst eine umfassende Kenntnis dieser Zusammenhänge gewährleistet auch die vollständige Entschlüsselung der Vorgänge während der Kakao-Prozessierung. Diese könnte für eine gezieltere Beeinflussung der Flavour-Qualität genutzt werden. Zudem könnte auf Grundlage solcher Studien erstmals eine Aufstellung jener Parameter erfolgen, welche einen Edelkakao bereits vor der Prozessierung von einem Massenkakao unterscheiden.

7 Verzeichnisse

7.1 Abkürzungsverzeichnis

\triangleq	entspricht
=	ist gleich
\pm	plus minus
(+)	„rechtsdrehend“, Definition des Drehsinns bei optisch aktiven Verbindungen
(-)	„linksdrehend“, Definition des Drehsinns bei optisch aktiven Verbindungen
\geq	größer oder gleich
%	Anteil in Prozent
4CL	4-Cumarat-CoA-Ligase
a	Jahr
A	Aleuron
Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of Variance; Varianzanalyse
<i>aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
ARS	Agricultural Research Station
Asp	Asparagin
AvT	Durchschnittstemperatur
BR	Balung River
bzw.	beziehungsweise
C	Criollo
C	Kohlenstoff
°C	Temperatur-Einheit Grad Celsius
C, Cr, Crio	Criollo
C4H	Cinnamat-4-Hydroxylase;
ca.	zirka
CAT	(+)-Catechin
CID	Collision Induced Dissociation
CNB	Carbon/Nutrient Balance Hypothese
Caff-Asp	Kaffeesäure-aspartat
CoA	Coenzym A
CORPOZULIA	Corporación del Zulia
CPB	Cocoa Pod Borer
CRIG	Cocoa Research Institute of Ghana
CRU	Cocoa Research Unit
Cya-Ara	3- α -L-Arabinosidyl-cyanidin
Cya-Gal	3- β -D-Galactosidyl-cyanidin
D	Stereodeskriptor „rechts“ für die Konfiguration der Hydroxygruppe in der Fischer-Projektion am vorletzten C-Atom eines Zuckers
d. h.	das heißt
dest.	destilliert
DOPA	Dopamin
Dr.	Doktor
(E)-	Symbol für „entgegen“ der E/Z-Nomenklatur zur Definition der absoluten Konfiguration an einer Doppelbindung
E	Ecuador
EC-Äquiv.	(-)-Epicatechin-Äquivalente
ECAT	(-)-Epicatechin
ECAT-Äquiv.	Epicatechin-Äquivalente
EET	Estacion Experimental Tropical Pichilingue
ehem.	ehemals
En	Endosperm
<i>et al.</i>	lat. „und andere“
etc.	et cetera
f	zusätzlich zu reifen Samen auch verschiedene Fermentationsstadien
f	folgende
F	Forastero

F	Testgröße zur Einschätzung der Signifikanz bei \rightarrow ANOVA ($F = MQ_{\text{Effekt}} \times MQ_{\text{Fehler}}^{-1}$)
FAO	Food and Agricultural Organisation
FCM	Flow Cytometrie
FG	Freiheitsgrad
FONAIAP	Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias
G.	Ghana
GDB	Growth-Differentiation Balance Hypothese
h	Stunde
H	Wasserstoff
ha	Hektar
HCAA	Hydroxizimtsäure-Amid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICGD	International Cococa Germplasm Database
ICS	Imperial College Selection
INIA	Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas
k. A.	keine Angaben
KAK	Kationenaustausch-Kapazität
kg	Kilogramm
KKM	Klon Koko Mardi
km	Kilometer
l	Liter
L	Stereodeskriptor „links“ für die Konfiguration des untersten Stereozentrums (Fischer-Projektion)
L.	bei botanischen Pflanzennamen: Linné (Erstbeschreiber)
LAF	Lower Amazon Forastero
lat.	lateinisch
LBE	Leitbündelelement
Ldt.	limited
LF	Lower Amazon Forastero
LM	Lichtmikroskopie
M	Malaysia
m	Meter
m ü NN	Meter über Normal-Null (Höhe des Meeresspiegels)
mbar	Millibar
Me	Methan
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mol	Mol
MQ	Mittlere Quadratsumme (\rightarrow SQ \times Freiheitsgrade, \rightarrow ANOVA)
MS	Massenspektrometrie
NA	Nanay
n	Stichprobengröße
N, Nac.	Nacional
nm	Nanometer
NS	Niederschlag
org.	organisch
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p. a.	zur Analyse
PAL	Phenylalanin-Ammoniumlyase
PBC	Prang Besar Clone
PCA	Protocatechusäure
PCM	Protein Competition Model
PDA	Photodiode Array Detector
Pentag.	Pentagona
pH	pH-Wert; negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PP	Polyphenole
PPO	Polyphenoloxidase

Prof.	Professor
Pu	Pulpa
PZ	Polyphenolzellen
PV	Polyphenolvakuole
quant	quantifiziert
r	zusätzlich zu reifen Samen auch verschiedene Reifestadien
R	Reading/UK
R.	Rojo
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
rel. LF	relative Luftfeuchtigkeit
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RP	reversed phase
rpm	rounds per minute
S	stärkehaltiger Plastid
S	Schleimzellen
S.	Seite(n)
s	Sekunden
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SCA	„Scavina“
sp.	species
span.	spanisch
SQ	Summe der Quadrate
ssp.	subspecies
SSR	Simple Sequence Repeat
STABW	Standardabweichung (Stichprobe)
SZ	Speicherzellen
T	Teil der Klonbezeichnung eines Zuchtprogramms aus Ghana
T	Trinidad
T	Trinitario
t	metrische Tonne
Te	Testa
THT	Tyramin-Hydroxycinnamoyltransferase
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TM	Trockenmasse
Trini	Trinitario
u. a.	unter anderem
UAF, UF	Upper Amazon Forastero
UIT	Unidentified Introduced Trinitario
UK	United Kingdom
USDA	United States Department of Agriculture
UV	Ultraviolett
UWI:	University of the West Indies
v	Volumen
V	Venezuela
V	Verde
V	Vakuole
V/ C	Venezuela/ Chama
V/ SJ	Venezuela/ San Jua de Lagunillas
V/ Z	Venezuela/ Zea
v. Chr.	vor Christus
VSD	Vascular Streak Dieback
WAA	West African Amelonado
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert
z. B.	zum Beispiel
α	Bezeichnung einer glycosidischen Bindung an der C1-Position, Abgrenzung vom Anomer $\rightarrow\beta$
$\alpha = 0,05$	Signifikanzniveau, in diesem Fall 5 % maximal zulässige Irrtumswahrscheinlichkeit
β	Bezeichnung einer glycosidischen Bindung, Abgrenzung vom Anomer $\rightarrow\alpha$
λ	Wellenlänge in \rightarrow nm

o	ortho (Position des Zweitsubstituenten in direkter Nachbarstellung am Phenylring)
σ	Volumenkonzentration (z.B. ml l ⁻¹)
μm	Mikrometer

7.2 *Abbildungsverzeichnis*

Abb. 1:	Obligatorisches Merkmal der Polyphenole: mindestens 2 OH-Gruppen an einem Aromaten (R: \geq 2OH-Gruppen).....	4
Abb. 2:	Die Grundbausteine der phenolischen Inhaltsstoffe.....	5
Abb. 3:	Kondensierung von Acetyl-CoA (nach Waterman und Mole 1994).....	5
Abb. 4:	Synthese von Phloroglucin (nach Waterman und Mole 1994).....	6
Abb. 5:	Synthese der zu den Benzoesäuren gehörenden Orsellinsäure (nach Waterman und Mole 1994).....	6
Abb. 6:	Synthese der zu den Phenylelessigsäuren gehörenden 3,5-dihydroxy-Phenylelessigsäure (nach Li <i>et al.</i> 2001).....	7
Abb. 7:	Der Shikimisäure-Weg.....	9
Abb. 8:	Erste Schritte des Phenylpropanoid-Metabolismus.....	10
Abb. 9:	Biosynthese der Hydroxyzimtsäuren.....	10
Abb. 10:	Chlorogensäuren (C ₁₆ H ₁₈ O ₉), die in Kakaoextrakten identifiziert wurden.....	11
Abb. 11:	Phloretinsäure.....	11
Abb. 12:	Bildung des Cumarins Aesculetin (nach Satô 1967).....	12
Abb. 13:	Molekülstrukturen aller bisher in <i>T. cacao</i> L. nachgewiesenen Zimtsäureamide mit den durch Stark <i>et al.</i> 2006b in gerösteten Kakaopulver gefundenen Mengen [mg kg ⁻¹].....	13
Abb. 14:	Biosynthese von Hydroxyzimtsäure-Tyramin.....	14
Abb. 15:	2-Phenyl-chroman mit dem für die meisten Flavonoide typischen Hydroxylierungs-Grundmuster.....	17
Abb. 16:	Die Bildung der Schlüsselsubstanzen der Flavonoid-Biosynthese.....	18
Abb. 17:	Die Klassen der Flavonoide und ihre metabolische Ableitung voneinander (nach Haslam 1998).....	19
Abb. 18:	Die Biosynthese der Proanthocyanidine (nach Haslam 1998).....	21
Abb. 19:	In Samen von <i>T. cacao</i> L. beschriebene, monomere Flavonoide mit Molekulargewicht in [g mol ⁻¹].....	26
Abb. 20:	<i>T. cacao</i> L.; Wuchsform, Blüten und Früchte.....	33
Abb. 21:	Frucht von <i>T. cacao</i> L., geöffnet.....	33
Abb. 22:	Frühe Embryonalstadien von <i>T. cacao</i> L. nach Cheesman 1927.....	34
Abb. 23:	Semidünnschnitt durch die Testa von <i>T. cacao</i> L. (Präparation siehe 3.14.4).....	35
Abb. 24:	<i>T. cacao</i> L., Embryo und Samen.....	35
Abb. 25:	Sämlinge von <i>T. cacao</i> L., ca. 8 Wochen alt.....	37
Abb. 26:	stark vereinfachtes Schema der präkolumbischen Verbreitung von <i>T. cacao</i> L. in Amerika (nach Bartley 2005 und Parra 2000).....	42
Abb. 27:	Ecuador mit Herkunftsgebiet der Kakaoproben (rot markiert).....	61
Abb. 28:	Venezuela mit Detailansichten der 3 Herkunftsgebiete der Kakaoproben (rot markiert).....	63
Abb. 29:	Ghana mit Herkunftsgebiet der Kakaoproben (rot markiert).....	68
Abb. 30:	Malaysia mit Herkunftsgebiet der Kakaoproben (rot markiert).....	70
Abb. 31:	Großbritannien mit Standort der beprobten Gewächshauskulturen (rot markiert), sowie Ansicht einer solchen Anlage (rechts).....	72
Abb. 32:	Trinidad und Tobago mit Herkunftsgebiet der Kakaoproben (rot markiert).....	74
Abb. 33:	Pflanzung der International Cocoa Genebank der UWI auf Trinidad und Tobago.....	74
Abb. 34:	Kakaofermentation und -trocknung auf Trinidad.....	80
Abb. 35:	ANOVA der Abhängigkeit des Polyphenolgehaltes von der Herkunft.....	100

Abb. 36:	ANOVA der Abhängigkeit des Polyphenolgehaltes von der Standort-Düngung.....	101
Abb. 37:	Chromatogramm des verwendeten „Multi-Standards“ bei 280 nm.....	102
Abb. 38:	Chromatogramm der Kakaoprobe R 2 bei $\lambda = 280$ nm	104
Abb. 39:	Absorptionsspektrum von (-)-Epicatechin, (+)-Catechin, den Peaks „B“ und „C“ sowie aller weiteren in Abb. 39 dargestellten, unidentifizierten Peaks (außer „A“)	105
Abb. 40:	Chromatogramm der Kakaoprobe G 8 bei 371,6 nm mit Retentionszeit von Quercetin.....	106
Abb. 41:	Chromatogramm der Kakaoprobe G 11 bei 520 nm	106
Abb. 42:	Korrelation zwischen dem Gesamt-Polyphenolgehalt und dem Gehalt an (-)-Epicatechin ...	108
Abb. 43:	ANOVA der Abhängigkeit des Gehaltes an (-)-Epicatechin von der Herkunft	109
Abb. 44:	ANOVA der Abhängigkeit des Gehaltes an (-)-Epicatechin von der Standort-Düngung	110
Abb. 45:	Korrelation zwischen dem Gehalt an (-)-Epicatechin und „C“	111
Abb. 46:	Korrelation zwischen dem Gesamt-Polyphenolgehalt und „C“	111
Abb. 47:	ANOVA der Abhängigkeit des Gehaltes an „C“ von der Standort-Düngung.....	112
Abb. 48:	Korrelation zwischen 3- α -L-Arabinosidyl-cyanidin und 3- β -D-Galactosidyl-cyanidin.....	112
Abb. 49:	ANOVA der Abhängigkeit des Gehaltes an 3- β -D-Galactosidyl-cyanidin vom Kakaotyp ...	113
Abb. 50:	ANOVA der Abhängigkeit des Gehaltes an 3- α -L-Arabinosidyl-cyanidin vom Kakaotyp ..	114
Abb. 51:	ANOVA der Abhängigkeit des Gehaltes an 3- β -D-Galactosidyl-cyanidin von der Herkunft	115
Abb. 52:	ANOVA der Abhängigkeit des Gehaltes an 3- α -L-Arabinosidyl-cyanidin von der Herkunft	115
Abb. 53:	Einfluss der Düngung auf den Gehalt an 3- β -D-Galactosidyl-cyanidin	116
Abb. 54:	Einfluss der Düngung auf den Gehalt an 3- α -L-Arabinosidyl-cyanidin.....	117
Abb. 55:	Chromatogramm der Referenzsubstanz Clovamid (Pfeil) bei 280 nm.....	118
Abb. 56:	Spektrum der Substanz „A“ unter den in 3.11 beschriebenen Analysebedingungen	119
Abb. 57:	MS-Spaltungsmuster der Substanz „A“	119
Abb. 58:	MS-Spaltungsmuster des von Kaffeesäure abgespaltenen Fragments	120
Abb. 59:	Spektrum, Retentionszeit und molekulare Struktur von (+)-N-(E)-Caffeoyl-L-aspartat ($C_{13}H_{13}NO_7$, 295,25 g mol ⁻¹).....	121
Abb. 60:	ANOVA des Kaffeesäure-aspartat-Gehaltes in Abhängigkeit vom Kakao-Typ	122
Abb. 61:	ANOVA des Kaffeesäure-aspartat-Gehaltes in Abhängigkeit von der Herkunft der Kakaoprobe (Alle reifen Proben ohne Criollos und Ecuador)	123
Abb. 62:	ANOVA des Kaffeesäure-aspartat-Gehaltes im Kakaosamen in Abhängigkeit von der Standortdüngung (Alle reifen Proben ohne Criollos).....	124
Abb. 63:	Veränderung der Gehalte einzelner phenolischer Kakao-Inhaltsstoffe nach saurer Hydrolyse.....	126
Abb. 64:	Veränderungen der Werte für den Gesamt-Polyphenolgehalt und der quantifizierten phenolischen Einzelsubstanzen im Verlauf der Samenreifung	128
Abb. 65:	Entwicklung der Akkumulation der phenolischen Inhaltsstoffe während der Reifung in Prozent des jeweils höchsten gemessenen Wertes.	129
Abb. 66:	Probenspezifische Abnahme phenolischer Inhaltsstoffe während der Fermentation	132
Abb. 67:	Durchschnittlicher Abbau phenolischer Inhaltsstoffe in den untersuchten Criollo- Fermentationen	134
Abb. 68:	Durchschnittlicher Restgehalt phenolischer Inhaltsstoffe in Prozent des Ursprungsgehaltes nach 0, 24, 48 und 72 h Fermentationszeit.....	135
Abb. 69:	Reifestadien von Kakaosamen der Klone EET 95 sowie ICS 95.....	139
Abb. 70:	Reifestadien von Keimblattgewebe der Klone EET 95 sowie ICS 95, 100-120 Tage nach der Bestäubung.....	141

Abb. 71:	Reifestadien von Keimblattgewebe der Klone EET 95 sowie ICS 95, 140-175 Tage nach der Bestäubung.....	143
Abb. 72:	Durchschnittliche Flächen der PZ und SZ des Keimblattgewebes der Kakao-Typen LAF, Nacional, UAF und Criollo.	145
Abb. 73:	Mittelwertvergleich der typspezifischen Flächen der PZ und SZ des Keimblattgewebes von <i>T. cacao</i> L.	146
Abb. 74:	Streudiagramm der samenspezifischen PZ- sowie der SZ-Flächen mit Zuordnung der Einzelwerte zu den Kakaotypen Criollo (C), UAF (UF), LAF (LF) und Nacional (N).	147
Abb. 75:	Mittelwertvergleich der typspezifischen, prozentualen Flächenverhältnisse der SZ zu den jeweiligen PZ	148
Abb. 76:	Streudiagramm der fruchtspezifischen PZ-Flächen und der jeweiligen 100-Bohnengewichte mit Zuordnung der Einzelwerte zu den Kakaotypen Criollo (C), UAF (UF), LAF (LF) und Nacional (N).....	149
Abb. 77:	Streudiagramm der fruchtspezifischen SZ-Flächen und der jeweiligen 100-Bohnengewichte mit Zuordnung der Einzelwerte zu den Kakaotypen Criollo (C), UAF (UF), LAF (LF) und Nacional (N).....	150
Abb. 78:	Keimblattgewebe von <i>T. cacao</i> L., längs (a, b) und quer (c) geschnitten.	151
Abb. 79:	Keimblattparenchym von <i>T. cacao</i> L.....	153
Abb. 80:	Epidermis und Leitbündelelemente des Keimblattgewebes von <i>T. cacao</i> L.....	156
Abb. 81:	Der Abbau von Catechin zu Phloroglucinol und Protocatechusäure nach Kenyhercz und Kissinger 1978	158
Abb. 82:	Epimerisation von Flavan-3-olen an der Position C-2 im wässrigen Medium (nach Freudenberg <i>et al.</i> 1922)	172
Abb. 83:	Der Abbau von Catechin zu Protocatechusäure nach Kenyhercz und Kissinger 1978	173
Abb. 84:	Akropetale Akkumulation von Anthocyanen in den Keimblättern eines reifenden Kakaoembryos.	182
Abb. 85:	TEM-Aufnahme einer Epidermiszelle des Keimblattgewebes von <i>T. cacao</i> L	191
Abb. 86:	Proben des Klons Amelonado.....	240
Abb. 87:	Proben des Klons BR 25	240
Abb. 88:	Proben des Klons Catongo	241
Abb. 89:	Proben des Klons EET 59	241
Abb. 90:	Proben des Klons EET 95	242
Abb. 91:	Proben des Klons EET 390	242
Abb. 92:	Proben des Klons ICS 95	243
Abb. 93:	Proben des Klons KKM 22	243
Abb. 94:	Proben des Klons NA 33.....	244
Abb. 95:	Proben des Klons PBC 1	244
Abb. 96:	Proben des Klons SCA 6.....	245
Abb. 97:	Proben des Klons T 63/ 967	245
Abb. 98:	Proben des Klons T 79/ 501	246
Abb. 99:	Proben des Klons T 85/ 799.....	246
Abb. 100:	Proben des Klons UIT 1	247
Abb. 101:	Die Varietät Criollo Mérida	248
Abb. 102:	Die Criollo-Varietäten Guasare (a) und Pentagona (b, c)	249
Abb. 103:	Die Criollo-Varietät Porcelana.....	250

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Veröffentlichte Nachweise von Quercetin und seinen Glycosiden in Kakaosamen	24
Tab. 2:	Eigenschaften der untersuchten Forastero-Klone (LAF, UAF und Nacional).....	49
Tab. 3:	Eigenschaften der untersuchten Criollos und Trinitarios.....	50
Tab. 4:	Pflanzschema der Criollo-Genbanken in Chama und in San Juan de Lagunillas	66
Tab. 5:	Gesamt-Produktion von Rohkakao auf Trinidad und Tobago 1998-2002.....	77
Tab. 6:	Zusammenfassung der wichtigsten Standortfaktoren der beprobten Plantagen.....	78
Tab. 7:	Die untersuchten Proben reifer Kakaosamen.....	86
Tab. 8:	Liste der verwendeten Standardsubstanzen	91
Tab. 9:	Übersicht über die mikroskopischen Präparate.....	97
Tab. 10:	Scheffé-Test der Abhängigkeit des Polyphenolgehaltes von der Herkunft	100
Tab. 11:	Absorptionsmaxima und Retentionszeiten der phenolischen Standardsubstanzen.....	103
Tab. 12:	Scheffé-Test der Abhängigkeit des (-)-Epicatechin-Gehaltes von der Herkunft.	109
Tab. 13:	Scheffé-Test der Abhängigkeit des Gehaltes an 3-β-D-Galactosidyl-cyanidin vom Kakaotyp	113
Tab. 14:	Scheffé-Test der Abhängigkeit des Gehaltes an 3-α-L-Arabinosidyl-cyanidin vom Kakaotyp	114
Tab. 15:	Scheffé-Test der Abhängigkeit des Gehaltes an 3-β-D-Galactosidyl-cyanidin von der Herkunft.....	115
Tab. 16:	Scheffé-Test der Abhängigkeit des 3-α-L-Arabinosidyl-cyanidin-Gehaltes von der Herkunft.....	116
Tab. 17:	Korrelationsmatrix für Kaffeesäure-aspartat [mg kg^{-1} ff TM].....	122
Tab. 18:	Univariate Signifikanztests für \bar{X} PZ Fläche [μm^2]	146
Tab. 19:	Scheffé Test; Var.: \bar{X} PZ Fläche [μm^2].....	146
Tab. 20:	Univariate Signifikanztests für \bar{X} SZ Fläche [μm^2]	147
Tab. 21:	Scheffé Test; Var.: \bar{X} SZ Fläche [μm^2].....	147
Tab. 22:	Univariate Signifikanztests für Flächenverhältnis SZ zu PZ [%]	148
Tab. 23:	Scheffé Test; Var.: prozentuales Flächenverhältnis SP zu PP.	148
Tab. 24:	monomere phenolische Substanzen und ihr Vorkommen in frischen Kakaosamen	163
Tab. 25:	Basisdaten der untersuchten Kakaoproben.	232
Tab. 26:	Phenolische Inhaltsstoffe und Gesamt-Polyphenolgehalt in entfettetem Trockenpulver reifer, unfermentierter Kakaosamen.	234
Tab. 27:	Einzelwerte Zellflächen/ Samen und n Präparate mit Zellreihen/ Samen.....	236
Tab. 28:	Einzelwerte der untersuchten Fermentationsstadien des Typs Criollo	238

7.4 Literaturverzeichnis

- Adam, W. B., Hardy, F., Nierenstein, M. (1931): The Catechin of the Cacao Bean. J. Am. Chem. Soc. 53 (2), 727–728.
- Adamson, G. E., Lazarus, S. A., Mitchell, A. E., Prior, R. L., Cao, G., Jacobs, P. H., Kremers, B. G., Hammerstone, J. F., Rucker, R. B., Ritter, K. A., Schmitz, H. H. (1999): HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. J Agric Food Chem. 47 (10), 4184-4188.
- Adu-Ampomah, Y.; Novak, F. J.; Afza, R.; Duren, M. van; Perea-Dallos, M. (1988): Initiation and growth of somatic embryos of cocoa (*Theobroma cacao* L). Café, Cacao, Thé 32(3), 187-200.
- Adu-Ampomah, Y.; Owusu, G. K.; Sackey, S.; Padi, B.; Abdulkarimu, A. (1996): Use of gamma rays to induce mutants resistant to cocoa swollen shoot disease in *Theobroma cacao* L. Plant Breeding 115(1), 74-76.
- Adu, S. V. (1990): Ayensu-Densu Basin. Land Suitability for Agriculture and Forestry. Soils. Karte 7, Ghana Soil Research Institute, Kumasi, Ghana,
http://eusoiils.jrc.it/ESDB_Archive/EuDASM/Africa/maps/afr_ghlsaf.htm,
Stand : 31.10.07.
- Alemanno, L., Ramos, T., Gargadenc, A., Andary, C., Ferriere, N. (2003): Localization and Identification of Phenolic Compounds in *Theobroma cacao* L. Somatic Embryogenesis. Annals of Botany 92(4), 1-11.
- Almeida, M. H. G., Fragoso, R. A., Leitão, M. C. A., Nascimento, A. C. (1998): Cocoa beans quality: influence of drying on phenolic fraction. 2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-2).
http://ecsoc2.hcc.ru/DP_TOP3/dp198/dp198.htm. Stand: 24.07.2007.
- Alverson W. S., Whitlock B. A., Nyffeler R., Bayer, C., Baum, D. A. (1999): Phylogeny of the core *Malvales*: evidence from ndhF sequence data. American Journal of Botany 86, 1474-1486.
- Andebrhan, T., Hammerstone, J. F. Jr., Romanczyk, L. J. Jr., Furtek, D. B. (1995): Sensitivity of *Crinipellis pernicios*a to procyanidins from *Theobroma cacao* L. Physiological and Molecular Plant Pathology 46(5), 339-348.

-
- Andersson, M., Koch, G., Lieberei, R. (2006): Structure and function of the seed coat of *Theobroma cacao* L. and its possible impact on flavour precursor development during fermentation. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 80, 48-62.
- Anim - Kwapong, G. J., Frimpong, E. B. (2005): Vulnerability of agriculture to climate change- impact of climate change on cocoa production. Vulnerability and Adaptation Assessment under the Netherlands Climate Change Studies Assistance Programme Phase 2 (NCCSAP2). Abschlussbericht, Cocoa Research Institute of Ghana, New Tafo, Akim, http://nlcap.net/fileadmin/NCAP/Countries/Ghana/COCOA_DRAFT_FINAL_REPORT.pdf, Stand: 14.10.2007.
- Arikiah, A., Tan, Y. P.; Sharma, M.; Clapperton, J. F. (1994): Experiments to determine influence of primary processing parameters and planting material on the flavour of cocoa beans in Malaysia. *Cocoa Growers' Bulletin* 48, 36-46.
- Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M., Terao, J. (2002): Absorption and urinary excretion of procyanidin B2 [epicatechin-(4-8)-epicatechin] in rats. *Free Radic Biol Med* 33, 142–148.
- Baigrie, B. D. (1994): Cocoa flavour. In: *Understanding natural flavours*. Piggott, J. R., Paterson, A. (Hrsg.), Blackie Academic & Professional, Glasgow, 268-282.
- Bartley, B. G. D. (2001): REFRACTARIO – An Explanation of the Meaning of the Term and its Relationship to the Introductions from Ecuador in 1937. *Ingenic Newsletter* 6, 10-15.
- Bartley, B. G. D. (2005): *The genetic diversity of cacao and its utilization*. CABI, Cambridge (341 S.).
- Barnett, J. R. (1974) Secondary Phloem in *Pinus radiata* D. Don 2. Structure of Parenchyma Cells. *New Zealand Journal of Botany* 12, 261-74.
- Bate-Smith, E. C. (1973a): Tannins of herbaceous *Leguminosae*. *Phytochemistry* 12, 669-705.
- Bate-Smith, E. C. (1973b): Haemanalysis of Tannins. The concept of relative astringency. *Phytochemistry* 12, 907-192.
- Bekele, F. (2007): *The History of Cocoa Production in Trinidad and Tobago*. <http://sta.uwi.edu/cru/fb-hocp-ncnp.pdf>. Stand: 01.10.2007.

-
- Bernards, M. A., Lopez, M. L., Zajicek, J., Lewis, N. G. (1995): Hydroxycinnamic acid - derived polymers constitute the polyaromatic domain of suberin. *J Biol Chem.* 270 (13),7382-7386.
- Biehl, B. (1973): Veränderungen der subzellulären Struktur in Keimblättern von Kakaosamen (*Theobroma cacao* L.). *ZLUF* 153, 137-150.
- Biehl, B., Passern, U., Passern, D. (1977): Subcellular Structures in Fermenting Cocoa Beans. Effect of Aeration and Temperature during Seed and Fragment Incubation. *J. Sci. Food Agric.* 28 (1), 41-52.
- Biehl, B., Passern, D., Sagemann, W. (1982). Effect of Acetic Acid on Subcellular Structures of Cocoa Bean Cotyledons. *J. Sci. Food Agric.* 33, 1101-1109.
- Bitsch, I. (2002): Kakao und Schokolade: gut für die Gesundheit: Neue Erkenntnisse über bioaktive Substanzen. *Gordian* 4, 53-55.
- Blaha, G., Letode, R. (1987): Examen en microscopie électronique de l'aspect externe des cabosses de cacaoyer saines ou infectées par *Phytophthora megakarya*. *Café Cacao Thé* 31, 23-34.
- Bonneau, L., Carre, M., Martin-Tanguy, J. (1994): Polyamines and related enzymes in rice seeds differing in germination Potential. *Plant Growth Regulation* 15, 75 -82.
- Bonvehi J. S., Coll, F. V. (1997): Evaluation of bitterness of astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder. *Food Chem* 60, 365–370.
- Borchers, A., Keen, C., Hannum, S., Gershwin, M. (2000): Cocoa and chocolate: composition, bioavailability, and health implications. *J Medicinal Food* 3(2), 77-105.
- Brito, E. S., Pezoa, Garcia, N. H., Gallão, M. I., Cortelazzo, A. L., Fevereiro, P. S., Braga, M. R. (2001): Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L) during fermentation, drying and roasting. *Journal of Science of Food and Agriculture* 81, 281-288.
- Brown, H. B. (1954): Separation of Pigment Cells of Cacao. *Nature* 173, 492.
- Brownlee, H. E., McEuen, A. R., Hedger, J., Scott, I. M. (1990): Anti-fungal effects of cocoa tannin on the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicioso*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36(1), 39-48.

-
- Brownlee, H. E., Hedger, J., Scott, I. M. (1992): Effects of a range of procyanidins on the cocoa pathogen *Crinipellis pernicioso*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 40(4), 227-232.
- Bryant J. P., Chapin III, F. S., Klein, D. R. (1983): Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos* 40, 357-368.
- Bryce, R. (2005): Trinidad and Tobago, Country overview.
http://www.procicaribe.org/networks/clawrenet/reports/z_tt/tt.htm, Stand: 30.10.2007.
- Bugan, S. (2007): Einfluß der Fermentationsdauer und Röstung auf die Bildung von Aromastoffen und Aromaprecursoren in Konsumkakao. 1. Aufl., Dt. Forschungsanst. für Lebensmittelchemie, Garching (168 S.).
- Burton, T. L., Husband, B. C. 2001: Fecundity and offspring ploidy in matings among diploid, triploid and tetraploid *Chamerion angustifolium* (*Onagraceae*): consequences for tetraploid establishment. *Heredity* 87, 573–582.
- Butler, W. L., Siegelmann, H. W. (1959): Conversion of caffeic acid to esculetin during paper chromatography. *Nature* 183, 1813-1814.
- Cakirer, M. S. (2003): Color as an Indicator of Flavanol Content in the fresh Seeds of *Theobroma cacao* L.. Magisterarbeit, The Pennsylvania State University (91 S.).
- Capriles de Reyes, L. (2000): Reacciones de cultivares de cacao a los principales patógenos presentes en Venezuela. Memorias del Primer Congreso Venezolano del Cacao y su Industria, AGETROP/CIRAD, Montpellier, France, Estacion Experimental de Caucagua, FONAIAP, Venezuela, 110-123.
- Chausser-Volfson, E., Shen, Hu, Gutterman, Y (2002): Anatomical structure and distribution of secondary metabolites as a peripheral defence strategy in *Aloe hereroensis* leaves. *Botanical Journal of the Linnean Society* 138 (1), 107–116.
- Cheesman, E. E. (1927): Fertilization and Embryogeny in *Theobroma cacao*, L.. *Annals of Botany* 41, 107-126.
- Cheesman, E. E. (1944): Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations. *Trop Agricult* 21, 144–159.

- Clapperton, J. F. (1992): Assessment of cocoa flavour and fat content. Proceedings of the International Workshop on Conservation, Characterisation and Utilisation of Cocoa Genetic Resources in the 21st Century, 13-17 Sep., Port-of-Spain, CRU, Trinidad und Tobago, 111-120.
- Clapperton, J. F., Yow, S., Chan, J., Lim, D., Lockwood, R., Romanczyk L., Hammerstone, J. (1994a): The contribution of genotype to cocoa (*Theobroma cacao* L.) flavour. Tropical Agriculture (Trinidad), 303-308.
- Clapperton, J.F., Lockwood, G., Yow, S.T.K., Lim, D. H. K. (1994b): Effects of planting materials on flavour. Cocoa Growers' Bulletin 48, 47-57.
- Clement, D., Risterucci, A. M., Motamayor, J. C., N'Goran, J., Lanaud, C. (2003): Mapping quantitative trait loci for bean traits and ovule number in *Theobroma cacao* L. Genome 46, 103-111.
- Clifford, M. N. (1999): Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. J. Sci. Food Agric. 79, 362-372.
- Clifford, M. N., Knight, S. (2004): The cinnamoyl-amino acid conjugates of green robusta coffee beans. Food Chem. 2004, 87, 457-463.
- Cohen, Y., Treutter, D., Feucht, W. (1994): Water stress induced changes in phenol composition of leaves and phloem of *Prunus avium* L.. Acta Hortic. 381, 494-501.
- Cooper, K. A., Campos-Giménez, E., Alvarez, D. J., Nagy, K., Donovan, J. L., Williamson, G. (2007): Rapid Reversed Phase Ultra-Performance Liquid Chromatography Analysis of the Major Cocoa Polyphenols and Inter-relationships of Their Concentrations in Chocolate. J. Agric. Food Chem. 55 (8), 2841 -2847.
- Couch, J. A., Zintel, H. A., Fritz, P. J. (1993): The genome of the tropical tree *Theobroma cacao* L. Mol. Gen. Genet. 237, 123-128.
- Counet, C., Ouwerx, C., Rosoux, D., Collin, S. (2004): Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. J. Agric. Food Chem. 52, 6243-6249.
- Correia, A. M. N. G., Leitão, M. C. A., Clifford, M. N. (1995): Caffeoyl-tyrosine and Angolans II as characteristic markers for Angolan *robusta* coffees. Food Chemistry 53, 309-313.

-
- Creelman, R. A., Mullet, J. E. (1997): Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 355-381.
- Crouzillat, D., Lerceteau, E., Petiard, V., Morera, J., Rodriguez, H., Walker, D., Phillips, W., Ronning, C., Schnell, R., Osei, J., Fritz, P. (1996): *Theobroma cacao* L. - a genetic linkage map and quantitative trait loci analysis. *Theoretical & Applied Genetics* 93, 205-214.
- Cuatrecasas, J. (1964): Cacao and its Allies: A Taxonomic Revision of the Genus *Theobroma*. *Bulletin of the United States National Museum, Proc. US Natl. Herb.* 35 (6), 377-614.
- Daayf, F., Nicole, M., Boher, B., Pando, A., Geiger, J. P. (1997): Early vascular defense reactions of cotton roots infected with a defoliating mutant strain of *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology* 103 (2), 125-136.
- Davey, M. P., Bryant, D. N., Cummins, I., Ashenden, T. W., Gates, P., Baxter, R., Edwards, R. (2004): Effects of elevated CO₂ on the vasculature and phenolic secondary metabolism of *Plantago maritima*. *Phytochemistry* 65 (15), 2197-2204.
- Ding, E. L., Hutfless, S. M., Ding, X., Girotra, S. (2006): Chocolate and Prevention of Cardiovascular Disease: A Systematic Review. *Nutrition and metabolism* 3 (2), <http://www.nutritionandmetabolism.com/content/pdf/1743-7075-3-2.pdf>, Stand: 31.10.2007.
- Dos Santos, A. V. P., Machado, R. D. (1989): A Scanning Electron Microscope Study of *Theobroma cacao* Somatic Embryogenesis. *Annals of Botany* 64, 293-296.
- Dos Santos, W. C., de L. A. Lima, M., Lima, H. C. (1992): Cupuaçu: Resumos informativos. 1. Aufl., Embrapa-CPAA, Manaus 7-58.
- Dublin, P. (1974): Les haploïdes de *Theobroma cacao* L., diploïdisation et obtention d'individus homozygotes. *Café, Cacao, Thé*, 1974, 18 (2), 83-96.
- Duncan, E. J., Todd, A. W. (1972) :Structure of the Mature Embryo of *Theobroma cacao* L.. *Annals of Botany* 36, 939-945.
- Edwin, J., Masters, W. A. (2005): Genetic Improvement and Cocoa Yields in Ghana. *Expl Agric.* 41, 491-503.

- Efraim, P. (2004): Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de cacau para produção de chocolate. Dissertation, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universität von Campinas, Brasilien (Seitenzahl unbekannt).
- Efraim, P., Tucci, M. L., Pezoa-García, N. H., Haddad, R., Eberlin, M. (2006): Teores de Compostos Fenólicos de Sementes de Cacaueiro de Diferentes Genótipos. *Braz. J. Food Technol.* 9 (4), 229-236.
- Elwers, S. (2002): Phenolische Substanzen und antioxidatives Potential in Kakao – Gehalte und prozessierungsbedingte Veränderungen. Abschlussbericht, Stiftung der deutschen Kakao- und Schokoladenwirtschaft (40 S.).
- Engler, M. B., Engler, M. M., Chen, C. Y., Malloy, M. J., Browne, A., Chiu, E. Y., Kwak, H. K., Milbury, P., Paul, S. M., Blumberg, J., Mietus-Snyder, M. L. (2004): Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. *J Am Coll Nutr.* 23(3), 197-204.
- Engler, M. B., Engler, M. M. (2004): The vasculoprotective effects of flavonoid-rich cocoa and chocolate. *Nutrition Research*, 24(9), 695-706.
- Esau, K. (1975): The Phloem of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Annals of Botany* 39, 901-913.
- Estiarte, M., Filella, I., Serra, J., Peñuelas, J. (1994): Effects of nutrient and water stress on leaf phenolic content of peppers and susceptibility to generalist herbivore *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Oecologia* 99 (3-4), 387-391.
- Facchini, P. J., Hagel, J., Zulak, K. G. (2002): Hydroxycinnamic acid amide metabolism: physiology and biochemistry. *Canadian Journal of Botany* 80(6), 577-589.
- FAO (1996): Trinidad and Tobago: Country Report to the FAO International Technical Conference on Plant Genetic Resource. Leipzig (77 S.),
<http://www.fao.org/AG/AGp/AGPS/Pgrfa/pdf/trinidad.pdf>, Stand: 31.10.2007.
- Farah, A., Donangelo, C. M. (2006): Phenolic compounds in coffee. *Braz. J. Plant Physiol.*, 18(1), 23-36.
- Faustino, R. S., Sobrattee, S., Edel, A. L., Pierce, G. N. (2003): Comparative analysis of the phenolic content of selected Chilean, Canadian and American Merlot red wines. *Molecular and Cellular Biochemistry* 249 (1-2), 11-19.

-
- Figueira, A., Lambert, S., Carpenter, D., Pires, J. L., Cascardo, J. C. M., Romanczyk (1997): The similarity of cocoa flavour of fermented seeds from fingerprinted genotypes of *Theobroma cacao* L. from Brazil and Malaysia. *Tropical Agriculture (Trinidad)* 74(2), 132-139.
- Forsyth, W. G. C. (1952a): Cacao Polyphenolic Substances 1. Fractionation of the Fresh Beans. *Biochem Journal* 51, 511-516.
- Forsyth, W. G. C. (1952b): Cacao Polyphenolic Substances 2. Changes during Fermentation. *Biochem. J.* 51, 511-516.
- Forsyth W. G. C. (1955): Cacao Polyphenolic Substances 3. Separation and Estimation on Paper Chromatograms. *Biochem. J.* 60, 108-111.
- Forsyth W. G. C., Quesnel, V. C. (1957): Cacao Polyphenolic Substances. 4. The anthocyanin pigments. *Biochem J.* 65(1), 177-179.
- Forsyth, W. G. C., Quesnel, V. C. (1963): The mechanism of Cacao Curing. *Adv. Enzymol.* 25, 457-429.
- Freudenberg, K., Böhme, L., Purrmann, L. (1922): Raumisomere Catechine II. *Ber. dtsh. Chem. Ges.* 55, 1734-47.
- GhanaDistricts.com (2007): Eastern Region, Physical Features.
<http://www.ghanadistricts.com/region/?r=4&sa=129>, Stand: 30.10.2007.
- Glendinning, D. R. (1963): The inheritance of bean size, pod size and number of beans per pod in cocoa (*Theobroma cacao* L.), with a note on bean shape. *Euphytica* 12 (3), 311-322.
- Glicenstein, L. J., Fritz, P. J. (1989): Ploidy level in *Theobroma cacao* L. *The Journal of Heredity* 80, 464-467.
- Goldberg, D. M., Karumanchiri, A., Tsang, E., Soleas, G. J. (1998): Catechin and epicatechin concentrations of red wines: regional and cultivar-related differences. *Am J Enol Vitic* 49, 23-34.
- Gotti, R., Furlanetto, S., Pinzauti, S., Cavrini, V. (2006): Analysis of catechins in *Theobroma cacao* beans by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1112, 345-352.

-
- Graziani de Fariñas, L., Ortiz de Bertorelli, L., Parra, P. (2003): Características químicas de la semilla de diferentes tipos de cacao de la localidad de cumboto, Aragua. *Agronomía Tropical* 53(2), 133-144.
- Griffiths, L. A. (1960): A comparative study of the seed polyphenols of the genus *Theobroma*. *Biochem J.*, 74(2), 362-365.
- Gustafsson, F. (2002): Cocoa Satellites - A study of the cocoa smallholder sector in Sabah, Malaysia. Feldstudie, Universität Lund, Schweden (56 S.), <http://www.ekh.lu.se/publ/mfs/5.pdf>, Stand: 31.10.2007.
- Gutmann, M., Feucht, W. (1991): A new method for selective localization of flavan-3-ols in plant tissues involving glycolmethacrylate embedding and microwave irradiation. *Histochemistry* 96, 83-86.
- Gutmann, M. (1995): Improved staining procedures for photographic documentation of phenolic deposits in semithin sections of plant tissue. *J. Microscopy* 179, 277-281.
- Guttenberg, H. von (1960): Grundzüge der Histogenese höherer Pflanzen I. Die Angiospermen. *Handbuch der Pflanzenanatomie, spezieller Teil*, 4 (3), Borntraeger, Berlin (315 S.).
- Häkkinen, S. H. (2000): Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products. Dissertation, Universität von Kuopio, Finnland, (92 S.).
- Häkkinen, S. H., Törrönen, A. R. (2000): Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food research international* 33 (6), 517-524.
- Hamilton, J., Zangerl, A., DeLucia, E., Berenbaum, M. (2001): The carbon-nutrient balance hypothesis: its rise and fall. *Ecol. Lett.* 4, 86-95.
- Hammerstone, J. F., Lazarus, S. A., Mitchell, A. E., Rucker, R., Schmitz, H. H. (1999): Identification of procyanidins in cocoa and chocolate using high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 47, 490-496.
- Hansen, C. E., Olmo, M., Burri, C. (1998): Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *Journal Science Food Agriculture* 77, 273-281.

-
- Haslam, E. (1998): Practical Polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge University Press (422 S.).
- Heiss, C., Kleinbongard, P., Dejam, A., Perré, S., Schroeter, H. (2005): Acute Consumption of Flavanol-Rich Cocoa and the Reversal of Endothelial Dysfunction in Smokers. *J. Am. Coll. Cardiol.* 46, 1276-1283.
- Herms, D. A., Mattson, W. J. (1992): The dilemma of plants: to grow or defend. *Quarterly Review of Biology* 67, 283-335.
- Hernández, A. (1968): El Cacao. *Revista Agronomía* 9, 8-28.
- Heß, D. (1988) : Pflanzenphysiologie. 8. Aufl., UTB Ulmer-Verlag, Stuttgart, (560 S.).
- Holt, R. R., Lazarus, S. A., Sullards, M. C., Zhu, Q. Y., Schramm, D. D., Hammerstone, J. F., Fraga, C. G., Schmitz, H. H., Keen, C. L. (2002): Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am J Clin Nutr.* 76 (4), 798-804.
- Hoskin, J. C., Dimick, P. S. (1994): Chemistry of flavour development in Chocolate. In: Beckett, S.T. (Hrsg.) *Industrial chocolate manufacture and use*, 2. Aufl., Blackie and Son, Ltd., Glasgow, Scotland, 108-121.
- ICCO (2007a): Annual Report of the International Cocoa Organization 2005/2006. London (43 S.).
- ICCO (2007b): Fine and flavour cocoa.
<http://www.internationalcocoaorganisation.net/questions/finecocoa.htm>,
Stand: 30.10.2007.
- ICG, T (2007): The International Cocoa Genebank, Trinidad, Overview.
<http://sta.uwi.edu/cru/icgt/index.asp>, Stand: 30.10.2007.
- ICGD (2007): International Cocoa Germplasm Database, University of Reading, UK,
<http://www.icgd.rdg.ac.uk/>, Stand: 11.10.2007.
- Iwaro, A.D., Bekele, F.L., Butler, D.R. (2003): Evaluation and utilisation of cacao (*Theobroma cacao* L.) germplasm at the International Cocoa Genebank, Trinidad. *Euphytica* 130, 207–221.

-
- Jalal, M. A. F., Collin, H. A. (1977): Polyphenols of Mature Plant, Seedling and Tissue Cultures of *Theobroma cacao*. *Phytochemistry* 16, 1377-1380.
- Jaenicke, J. (1973): Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Embryonen von *Theobroma cacao* L. (Kakao) während der Embryogenese und der Samenkeimung. Dissertation, Technische Universität Hannover (120 S.).
- Jardine, N. J. (1999): Phytochemicals and Phenolics. In Knight, I. (Hrsg.): *Chocolate and Cocoa: Health and Nutrition*. Blackwell Science, 119-142.
- Jones, C. G., Hartley S. E. (1999): A protein competition model of phenolic allocation. *Oikos* 86, 27-44.
- Jones, T. J., Rost, T. L. (1989): Histochemistry and Ultrastructure of Rice (*Oryza sativa*) Zygotic Embryogenesis. *American Journal of Botany*, 76 (4), 504-520.
- Jourdain, C. Tenca, G., Deguercy, A., Troplin, P., Poelman, D. (2006): *In vitro* effects of polyphenols from cocoa and [beta]-sitosterol on the growth of human prostate cancer and normal cells. *European Journal of Cancer Prevention* 15 (4), 353-361.
- Karim, M., McCormick, K., Tissa Kappagoda, C. (2000): Effects of Cocoa Extracts on Endothelium-Dependent Relaxation. *J. Nutr.* 130, 2105-2108.
- Kealey, K. S., Snyder, R. M., Romanczyk, L. J., Geyer, H. M., Myers, M. E., Withcare E. J., Hammerstone, J. F., Schmitz, H. H. (1998): Cocoa Components, Edible Products Having Enhanced Polyphenol Content, Methods of Making Same and Medical Uses. Patent Cooperation Treaty (PCT) WO 98/09533, USA, MARS INCORPORATED.
- Kelm, M. A., Johnson, J. C., Robbins, R. J., Hammerstone, J. F., Schmitz, H. H. (2006): High-performance liquid chromatography separation and purification of cacao (*Theobroma cacao* L.) procyanidins according to degree of polymerization using a diol stationary phase. *J Agric Food Chem.* 54(5), 1571-1576.
- Kenny, T. P., Keen, C. L., Jones, P., Kung, H.-J., Schmitz, H. H., Gershiviv M. E. (2004): Pentameric procyanidins isolated from *Theobroma cacao* seeds selectively downregulate ErbB2 in human aortic endothelial cells. *Experimental biology and medicine* 229 (2), 255-263.

-
- Kenyhercz T. M., Kissinger, P. T. (1978): Determination of Selected Acidic, Neutral, and Basic Natural-Products in Cacao Beans and Processed Cocoa. Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Lloydia* 41(2), 130-139.
- Kim, H., Keeney, P. G. (1984): (-)-Epicatechin Content in Fermented and Unfermented Cocoa Beans. *Journal of Food Science* 49, 1090-1092.
- Kolb, C. A., Käser, M. A., Kopecky, J., Zotz, G., Riederer, M., Pfündel, E. E. (2001): Effects of Natural Intensities of Visible and Ultraviolet Radiation on Epidermal Ultraviolet Screening and Photosynthesis in Grape Leaves. *Plant Physiology* 127, 863-875.
- Kondorosi, E., Roudier, F., Gendreau, E. (2000): Plant cell-size control: growing by ploidy? *Current Opinion in Plant Biology* 3 (6), 488-492.
- Kofink, M., Papagiannopoulos, Galensa, R. (2007): (-)-Catechin in Cocoa and Chocolate: Occurrence and Analysis of an Atypical Flavan-3-ol Enantiomer. *Molecules* 12, 1274-1288.
- Koricheva, J. (2002): The carbon-nutrient balance hypothesis is dead; long live the carbon-nutrient balance hypothesis? *Oikos* 98, 537-539.
- Lachenaud, P. (1995): Variations in the number of beans per pod in *Theobroma cacao L.* in the Ivory Coast. III. Nutritional factors, cropping effects and the role of boron. *Journal of Horticultural Science* 70(1), 7-13.
- Lambert, S. V., Aitken, W. M. (2000): Possible Influence of Cocoa Bean Testa Characteristics on the Flavour of fermented Cocoa Beans. Proceedings of 13th International Cocoa Research Conference, Kota Kinabalu, Sabah.
- Lambert, S. V., Cardoso, R. D., Aitken, M. W. (2003): Cocoa Procyanidins and their Losses during Fermentation and Drying. Proceedings 14th International Cocoa Research Conference, Accra, Ghana, 79.
- Lambert, S.V., Porter, L. (2007): Cocoa Basics: What is Cocoa Pod Borer? *World Cocoa Foundation Newsletter* 29,
http://www.worldcocoafoundation.org/for-the-media/newsletter_Feb2007.html,
Stand: 30.10.2007.

-
- Lamin, K., Sa'edi, M. (1994): Cocoa Breeding Strategies of the Malaysian Cocoa Board. Proceedings of the International Workshop on Cocoa Breeding Strategies, Kuala Lumpur, 59-65.
- Lamuela-Raventós, R. M., Andrés-Lacueva, C., Permanyer, J., Izquierdo-Pulido, M. (2001): More antioxidants in cocoa. *J Nutr* 131, 834-835.
- Lamuela-Raventós, R. M., Romero-Perez, A. I., Andrés-Lacueva, C., Tornero, A. (2005): Review: Health Effects of Cocoa Flavonoids. *Food Science and Technology International* 11, 159-176.
- Lanaud, C. (1987): Doubled Haploids of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) 2. Observations of Monogenic and Polygenic Characters. *Plant Breeding* 99 (3), 196–202.
- Lange, H., Fincke, A. (1970): Kakao und Schokolade. In: Acker, L., Bergner, K.-G., Diemair, W., Heimann, W., Kiermeier, F., Schormüller, J., Souci, S. W. (Hrsg.): *Handbuch der Lebensmittel. Band VI: Alkaloidhaltige Genussmittel, Gewürze, Kochsalz*, Springer, Berlin, Heidelberg, 210-309.
- Liu, L., McClure, J. W. (1995): Effects of UV-B on activities of enzymes of secondary phenolic metabolism in barley primary leaves. *Physiologia Plantarum* 93 (4), 734-739.
- Leco Corporation 2006: Comparison of Flavonoids in Cocoa From Different Origins Using LC-TOFMS. Leco Form No. 203-821-297, 1-7.
- Leitner, M., Boland, W., Mithöfer, A. (2005): Direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, 167(2), 597-606.
- Lerceteau, E., Robert, T., Pétiard, V., Crouzillat, D., (1997): Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* L. accessions using RAPD and RFLP markers. *Theor Appl Genet* 95, 10-19.
- Ley, J. P., Bertram H.-J. (2003): Synthesis of Lipophilic Clovamides and Their Antioxidative Potential against Lipid Peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4596-4602.
- Li, C., Sun, W. Q. (1999). Desiccation sensitivity and activities of free radical-scavenging enzymes in recalcitrant *Theobroma cacao* seeds. *Seed Sci. Res.* 9, 209–217.

Li, M. (2004a): Anatomische, cytologische und histologische Untersuchungen zur somatischen Variation in verschiedenen Teilklonen von *Pelargonium zonale* „Kleiner Liebling“. Dissertation, Humboldt Universität zu Berlin (107 S.).

Li, S. (2004b): Nitrate accumulation in plants and its relation to crop yields. Third International Nitrogen Conference, Abstracts – Concurrent Oral Sessions, 72.

Li, T.-L., Choroba, O. W., Hong, H., Williams, D. H., Spencer J. B. (2001): Biosynthesis of the vancomycin group of antibiotics: characterisation of a type III polyketide synthase in the pathway to (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine. *Chem. Commun.*, 2001, 2156–2157.

Lieberei, R., Reisdorff, C. (2007): *Nutzpflanzenkunde*. Begr. v. Franke, W., 7. Aufl., Thieme, Stuttgart (u. a.), 476 S..

Lux-Endrich, A., Treutter, D., Feucht, W. (2000): Influence of nutrients and carbohydrate supply on the phenol composition of apple shoot cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60 (1), 15-21.

Malaysian Cocoa Board (2004): Cocoa cultivated Area by Region and Sector (ha). <http://www.koko.gov.my/lkm/industry/statistic/cocoacultivated.cfm>, Stand: 31.10.2007.

Mao, T. K., Van de Water, J., Keen, C. L., Schmitz, H. H., Gershwin, M. E. (2003): Cocoa Flavonols and Procyanidins Promote Transforming Growth Factor- β 1 Homeostasis in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Experimental Biology and Medicine* 228, 93-99.

Martinson, V. A. (1975): Cytological studies of diploid and tetraploid *Theobroma cacao*. *Genetica* 45 (3), 341-348.

Martinson, V. A. (1986): Fertility improvement in induced tetraploid *Theobroma cacao*. *The Journal of Heredity* 77 (4), 279-281.

McDonald, M. S., Hughes, M., Burns, J., Lean M. E. J., Matthews, D., Crozier, A. (1998): Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content in red wines of different geographical origins. *J Agric Food Chem* 46, 368–375.

Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, Gopinathan, V., Milner, A. (1993): A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* 84, 407-412.

Mösli Waldhauser, S. S., Baumann, T. W. (1996): Compartmentation of caffeine and related purine alkaloids depends exclusively on the physical chemistry of their vacuolar complex formation with chlorogenic acids. *Phytochemistry* 42 (4), 985-996.

Mole, S., Ross, J. A. M., Waterman, P. G. (1988) Light - induced variation in phenolic levels in foliage of non - forest plants. 1. Chemical changes. *J. Chem. Ecol.* 14, 1-21.

Mondy, N. I., Owens Mobley, E., Bond Gedde-Dahl, S. (1967): Influence of Potassium Fertilization on Enzymatic Activity, Phenolic Content and Discoloration of Potatoes. *Journal of Food Science* 32 (4), 378 – 381.

Motamayor, J. C., Risterucci, A. M., Laurent, V., Moreno, A., Lanaud, C. (2000): The genetic diversity of Criollo cacao and its consequence in quality breeding. *Memorias del Primer Congreso Venezolano del Cacao y su Industria*, AGETROP/CIRAD, Montpellier, France, Estacion Experimental de Caucagua, FONAIAP, Venezuela, 33-52.

Motamayor, J. C., Risterucci, A. M., Lopez, P. A., Ortiz, C. F., Moreno, A., Lanaud, C. (2002): Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* 89, 380–386.

Motamayor, J. C. and Lanaud, C. (2002): Molecular analysis of the origin and domestication of *Theobroma cacao* L.. In: *Managing plant genetic diversity*. - Wallingford : CABI Publishing, , 77-87.

Motamayor, J. C., Risterucci, A. M., Heath, M. and Lanaud, C. (2003): Cacao domestication II: progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar. *Heredity*, 91, 322-330.

Moreno, A. (2000): La Investigación Venezolana en Cacao: Situación Actual. *Memorias del Primer Congreso Venezolano del Cacao y su Industria*, AGETROP/CIRAD, Montpellier, France, Estacion Experimental de Caucagua, FONAIAP, Venezuela, 164-178.

Morris, D. (1882): *Cacao: How to grow and how to cure it*. AW Gardner & Co, Kingston (Jamaica), 1-45.

Mueller, W. S. (1954): Antioxidative Properties of Cacao and Their Effect on Butteroil. *J. Dairy Sci.* 37, 754-759.

-
- Müller, S. (1998): Histologische und cytologische Studien an Samen von *Theobroma*-Arten. Diplomarbeit, Universität Hamburg (103 S.).
- Nacif de Abreu, I., Mazzafera, P. (2005): Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry* 43(3), 241-248.
- Nagy, N. E., Fossdal, C. G., Krokene, P., Krekling, T., Lönneborg, A., Solheim, H. (1998): Induced responses to pathogen infection in Norway spruce phloem: changes in polyphenolic parenchyma cells, chalcone synthase transcript levels and peroxidase activity. *Tree Physiology* 24, 505–515.
- Ndoumou, D. O., Djocgoue, P. F., Nana, L., Debost, M. (1995): Variation and inheritance of peroxidase activity and phenol and saccharide content in cacao in relation to susceptibility to black pod disease. *Biologia Plantarum* 37 (3), 429-436.
- Negrel, J., Pollet, B., Lapierre, C. (1996): Ether-linked ferulic acid amides in natural and wound periderms of potato tuber. *Phytochemistry* 43, 1195-1199.
- Neu, R. (1956): A new reagent for differentiating and determining flavones on paper chromatograms. *Naturwissenschaften* 43, 82.
- Nicholson, R. L., Hammerschmidt, R. (1992): Phenolic Compounds and Their Role in Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30, 369-389.
- Nielson, A. J., Griffith, W. P. (1978): Tissue fixation and staining with osmium tetroxide: the role of phenolic compounds. *J. Histochem. Cytochem.* 28, 138-140.
- Niester-Nyveld, C., Haubrich, A., Kampendonk, H., Gubatz, S., Tenberge, K. B., Rittscher, M., Wilmesmeier, S., Wiermann, R. (1997): Immunocytochemical localization of phenolic compounds in pollen walls using antibodies against p-cumaric acid coupled to bovine serum albumin. *Protoplasma* 197 (3-4), 148-159.
- N'Goran, J. A. K., Laurent, V., Risterucci, A. M., Lanaud, C. (1994): The Genetic Structure of Cocoa Populations (*Theobroma cacao* L.) Assessed with RFLP/cDNA Loki. *Proceedings of the International Workshop on Cocoa Breeding Strategies, Kuala Lumpur*, 116-122.
- Noll, W. (1935): Embryonalentwicklung von *Biophytum dendroides* DC. *Planta* 24 (4), 609-648.

-
- Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Takizawa T, Terao J, Kondo K. (2002): Catechins and Their Oligomers Linked by C4→C8 Bonds Are Major Cacao Polyphenols and Protect Low-Density Lipoprotein from Oxidation *in Vitro*. *Experimental Biology and Medicine* 227, 51-56.
- Pahlsson, A. M. (1992): Influence of nitrogen fertilization on minerals, carbohydrates, amino acids and phenolic compounds in beech (*Fagus sylvatica* L.) leaves. *Tree Physiol.* 10(1), 93-100.
- Pang Thau Yin, J. (2004): Rootstock Effects on Cocoa in Sabah, Malaysia. *Expl Agric.* 40, 445–452.
- Park, J. B. (2005a): Quantitation of Clovamide - Type Phenylpropenoic Acid Amides in Cells and plasma Using High-Performance Liquid Chromatography with a Coulometric Electrochemical Detector. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8135-8140.
- Park, J. B. (2005b): N-Cumaroyldopamine and N-caffeoyldopamine increase cAMP via beta 2-adrenoceptors in myelocytic U937 cells. *The Faseb Journal* 19,497-502.
- Park, J. B., Schoene, N. W. (2006): Clovamide - type phenylpropenoic acid amides, n-cumaroyldopamine and n-caffeoyldeparmine, inhibit platelet-leukocyte interactions via suppressing p-selectin expression. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 317(2), 813-819.
- Parra, P. G. (2000): Origen del cacao en Venezuela. *Memorias del I congreso Venezolano del Cacao y su industria.* Maracay, 257-261.
- Patterson, C. G., Thurston, R., Rodriquez, J. G. (1974): Twospotted spider mite resistance in *Nicotiana* species. *J. Econ. Entomol.* 67: 373–375.
- Peltonen, P. A., Vapaavuori, E., Julkunen-Tiitto, R. (2005): Accumulation of phenolic compounds in birch leaves is changed by elevated carbon dioxide and ozone. *Global Change Biology* 11 (8), 1305–1324.
- Perré, S. (2005): Einfluss von flavanolreichem Kakao auf die Endotheldysfunktion bei Rauchern. Dissertation, Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (77 S.).

-
- Pettipher, G. L. (1986): An improved method for the extraction and quantitation of anthocyanins in cocoa beans and its use as an index of the degree of fermentation. *Journal of the science of food and agriculture* 37(3), 289-296.
- Porter, L. J., Hirstich, L. N., Chan, B. G. (1986): The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 25, 223-230.
- Porter, L. J., Ma, Z., Chan, B. G. (1991): Cacao Procyanidins: Major Flavanoids and Identification of some Minor Metabolites. *Phytochemistry* 30, 1657-1663.
- Quesnel, V. C. (1965): Chloroform-Extractable Aromatic Acids of Cacao. *J. Sci Food Agric* 16, 596-599.
- Quesnel, V. C. (1968): Fractionation and Properties of the Polymeric Leucocyanidin of the Seeds of *Theobroma cacao*. *Phytochemistry* 7, 1583-1592.
- Rack, C. (2005): Suche nach pflanzlichen Thrombininhibitoren - Gerbstoffe und Fettsäuren im Fokus. Dissertation, Philipps-Universität Marburg (149 S.).
- Ramiro, E., Franch, A., Castellote, C., Andres-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M., Castell, M. (2005a): Effect of *Theobroma cacao* flavonoids on immune activation of a lymphoid cell line. *British Journal of Nutrition* 93, 859–866.
- Ramiro, E., Franch, A., Castellote, C., Pérez-Cano, F., Permanyer, J., Izquierdo-Pulido, M., Castell, M. (2005b): Flavonoids from *Theobroma cacao* Down-Regulate Inflammatory Mediators. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8506-8511.
- Ranger, C. M., Hower, A. A. (2001): Role of the glandular trichomes in resistance of perennial alfalfa to the potato leafhopper (*Homoptera: Cicadellidae*). *J. Econ Entomol.* 94, 950-957.
- Rein, D., Paglieroni, T. G., Wun, T., Pearson, D. A., Schmitz, H. H., Gosselin, R., Keen, C. L. (2000): Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am. J. Clinical Nutrition* 72 (1), 30-35.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1997): Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2 (4), 152-159.

-
- Rios, L. Y., Bennett, R. N., Lazarus, S. A., Rémésy, C., Scalbert, A., Williamson, G. (2002): Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am J Clin Nutr* 76, 1106–1110.
- Rios, L. Y., Gonthier, M.-P., Rémésy, C., Mila, I., Lapierre, C., Lazarus, S. A., Williamson, G., Scalbert, A. (2003): Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *Am J Clin Nutr* 77, 912-918.
- Rohan, T. A. (1958): Processing of Raw Cocoa. I. Small-scale Fermentation. *Journal of the Science of Food & Agriculture* 9, 104-111.
- Rohan, T. A., Connell, M. (1964): The precursors of chocolate aroma: a study of the flavonoids and phenolic acids. *Journal of Food Science* 29, 460-463.
- Rohsius, C. (2007): Die Heterogenität der biologischen Ressource Rohkakao (*Theobroma cacao L.*). Dissertation, Universität Hamburg, (232 S.).
- Roth, I. (1977): Fruits of Angiosperms, in Zimmermann, W., Carlsquist, S., Ozenda, P., Wulff, H. D. (Hrsg.): *Encyclopedia of Plant Anatomy*. Band 10 (2), Borntraeger, Berlin., 483-494.
- Rousseaux, M. C., Julkunen-Tiitto, Riita, Searles, P. S., Scopel, A. L., Aphalo, P. J., Ballaré, C. L. (2004): Solar UV-B radiation affects leaf quality and insect herbivory in the southern beech tree *Nothofagus antarctica*. *Oecologia* 138 (4), 505-512.
- Sakharov, I. Y., Ardila, G. B. (1999): Variations of peroxidase activity in cocoa (*Theobroma cacao L.*) beans during their ripening, fermentation and drying. *Food Chemistry* 65, 51-54.
- Sanbongi, C., Suzuki, N., Sakane, T. (1997): Polyphenols in chocolate, which have antioxidant activity, modulate immune functions in humans in vitro. *Cell Immunol* 177, 129 -136.
- Sanbongi, C., Osakabe, N., Natume, M., Takizawa, T., Gomi, S. Osawa, T. (1998): Antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma cacao*. *J. Agric. Food Chem.* 46, 454-457.

Sánchez-Rabaneda, F., Jáuregui, O., Casals, I., Andrés-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M., Lamuela-Raventós, R. M. (2003): Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *J. Mass Spectrom.*, 38, 35-42.

Satô, M. (1967): Metabolism of phenolic substances by chloroplasts-III. Phenolase as an enzyme concerning the formation of esculetin. *Phytochemistry* 6, 1363-1373.

Saunders, J. A., Mischke, S., Leamy, E. A., Hemeida, A. A.(2004): Selection of international molecular standards for DNA fingerprinting of *Theobroma cacao*. *Theor Appl Genet* 110, 41-47.

Scalbert, A. (1991): Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30, 3875-3883.

Schmitz-Hoerner, R., Weissenböck, G. (2003): Contribution of phenolic compounds to the UV-B screening capacity of developing barley primary leaves in relation to DNA damage and repair under elevated UV-B levels. *Phytochemistry* 64 (1), 243-255.

Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C. L., Hollenberg, N. K., Sies, H., Kwik-Urbe, C., Schmitz, H. H., Kelm, M. (2006): (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24 (103), 1024-1029.

Schwan, R. F., Rose, A. H., Board, R.G. (1995): Microbial fermentation of cocoa beans, with emphasis on enzymatic degradation of the pulp. *Journal of Applied Bacteriology* 79 Suppl., 96-107.

Sen, A., Bergvinson, D., Miller, S. S., Atkinson, J., Fulcher, R. G., Amason, J. T. (1994): Distribution and Microchemical Detection of Phenolic Acids, Flavonoids, and Phenolic Acid Amides in Maize Kernels. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1879-1883

Serafini, M., Bugianesi, R., Maiani, G.,Valtuna, S., De Santis, S., Crozier, A. (2003): Plasma antioxidants from chocolate. *Kurzmitteilung, Nature* 424, 1013.

Shein, I. V., Polyakova, G. G., Zrazhevskaya, G. K., Pashenova, N. V., Vetrova, V. P. (2001): Accumulation of Phenolic Compounds in Conifer Callus Cultures in Response to Wood Blue-Stain Fungi. *Russian Journal of Plant Physiology* 48 (2), 216-221.

Sies, H., Schewe, T., Heiss, C., Kelm, M. (2005): Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. *Am J Clin Nutr* 81(suppl), 304–312.

-
- Smith, D. L., Flinn, A. M. (1967): Histology and histochemistry of the cotyledons of *Pisum arvense* L. during germination. *Planta* 74 (1), 72-85.
- Sopheak, S., Lewis, B. A. (2002): Free Radical Scavenging and Antioxidative Activity of Caffeic Acid Amide and Ester Analogues: Structure-Activity Relationship. *J. Agric. Food Chem.* 50 (3), 468 -472.
- Sossou Dangou, J., Hocher, V., Ferrière, N., Fulcheri, C., Morard, P., Alemanno, L. (2002): Histological and biochemical characterization of *Theobroma cacao* L. endosperm during seed development. *Seed Science research* 12, 91-100.
- Sounigo, O., Lachenaud, P., Bastide, P., Cilas, C., N'Goran, J., Lanaud, C. (2003): Assessment of the value of doubled haploids as progenitors in cocoa (*Theobroma cacao* L.) breeding. *J Appl Genet* 44, 339-353.
- Spasova, M., Kortenska-Kancheva, V., Totseva, I., Ivanova, G., Georgiev, L., Milkova, T. (2006): Synthesis of cinnamoyl and hydroxycinnamoyl amino acid conjugates and evaluation of their antioxidant activity. *J. Peptide Sci.* 12, 369–375.
- Stamp, N. (2004): Can the growth-differentiation balance hypothesis be tested rigorously? *Oikos* 107 (2), 439–448.
- Stanfield, D., Singer, N., Smith, S. G., Dennis, J. (1993): Land Tenure and the Management of Land Resources in Trinidad and Tobago, Teil 1: Land Tenure. Land Tenure Center, University of Wisconsin-Madison, 1-272, <http://www.ies.wisc.edu/ltr/rp115.pdf>, Stand: 30.10.2007.
- Stark, T., Bareuther, S., Hofmann, T. (2006a): Molecular definition of the taste of roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*) by means of quantitative studies and sensory experiments. *J Agric Food Chem* 54, 5530-5539.
- Stark, T., Justus, H., Hofmann, T. (2006b): Quantitative Analysis of N-Phenylpropenoyl-L-amino Acids in Roasted Coffee and Cocoa Powder by Means of a Stable Isotope Dilution Assay. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2859-2867
- Stark, T., Bareuther, S., Hofmann, T. (2005): Sensory-Guided Decomposition of Roasted Cocoa Nibs (*Theobroma cacao*) and Structure Determination of Taste-Active Polyphenols *J. Agric. Food Chem.* 53, 5407-5418.

- Stark, T., Hofmann, T. (2005): Isolation, Structure Determination, Synthesis, and Sensory Activity of N-Phenylpropenoyl-L-amino Acids from Cocoa (*Theobroma cacao*) J. Agric. Food Chem. 53, 5419-5428.
- Steffen, K. (1952): Die Embryoentwicklung von *Impatiens glanduligera* Lindl. Flora 139, 394–461.
- Steinite, I., Ievinsh, G. (2003): Possible role of trichomes in resistance of strawberry cultivars against spider mite. Acta Universitatis Latviensis, 662, 59–65
- Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H., Schimper, A. F. W. (1998) : Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. 34. Aufl., Neubearb. von Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F., Bresinsky, A.. Fischer, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm (1007 S.).
- Tebayashi, S., Ishihara, A., Tsuda, M., Iwamura, H. (2000): Induction of clovamide by jasmonic acid in red clover. Phytochemistry 54(4), 387-92.
- The Director of National Mapping, Malaysia. (1974): Tawau. The Soils of Sabah. Blatt NB 50-15. D.O.S. 3180J. (Maßstab 1:250.000), Land Resources Division, Ministry of Overseas Development, U.K.
- The Federation of Cocoa Commerce Ltd. (2007): An Overview of Cocoa Production in Côte d'Ivoire and Ghana. <http://www.cocoaederation.com/education/produce.jsp>, Stand: 30.10.2007.
- The Government of Trinidad and Tobago/ Ministry of Agriculture, Land and Marine Resources (2007): Agriculture in Trinidad and Tobago – Cocoa. <http://www.agriculture.gov.tt/applicationloader.asp?app=articles&id=1024>, Stand: 30.10.07.
- Tomas-Barberán, F. A., Cienfuegos-Jovellanos, E., Marín, A., Muguerza, B., Gil-Izquierdo, A., Cerda, B., Zafrilla, P., Morillas, J., Mulero, J., Ibarra, A., Pasamar, M. A., Ramón, D., Espín, J. C. (2007): A New Process to Develop a Cocoa Powder with Higher Flavonoid Monomer Content and Enhanced Bioavailability in Healthy Humans. J. Agric. Food Chem. 55, 3926-3935.
- Toor, R. K., Savage, G. P., Lister, C. E. (2006): Seasonal variations in the antioxidant composition of greenhouse grown tomatoes. Journal of food composition and analysis 19 (1), 1-10.

Tsai, C. Y., Huber, D. M., Warren, H. L. (1980): A Proposed Role of Zein and Glutelin as N Sinks in Maize. *Plant Physiol.* 66, 330-333.

U. S. Department of State (2007): Background Note: Trinidad and Tobago. <http://www.state.gov/r/pa/ei/bgn/35638.htm>, Stand: 30.10.2007.

USDA (2007): Cocoa Rehabilitation in Ecuador, Project Number: 0500-00008-001-30. http://www.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?ACCN_NO=407775, Stand: 30.10.2007.

Van Huylenbroeck, J., Leus, L., Van Bockstaele, E. (2005): Interploidy crosses in roses: use of triploids. *Acta Horticulturae* 690, 109-112.

Verstraeten, S. V., Oteiza, P., Fraga, C. G. (2004): Membrane effects of Cocoa Procyanidins in Liposomes and Jurkat T Cells. *Biol Res* 37, 293-300.

Verstraeten, S. V., Hammerstone, J. F., Keen, C. L., Fraga, C. G., Oteiza, P. I. (2005): Antioxidant and membrane effects of procyanidin dimers and trimers isolated from peanut and cocoa. *J Agric Food Chem.* 53 (12), 5041-5048.

Villeneuve, F.; Cros, E.; Macheix, J.J. (1985): Effet de la fermentation sur les activités peroxidasiqes et polyphénoloxydasiqes de la fève de cacao. *Cfé Cacao Thé* 29, 113-119.

Waterman, P. G., Mole, S. P. (1994): *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell, Oxford *et al.*

Wilkins, R. T., Spoerke, J. M., Stamp, N. E. (1996): Differential Responses of Growth and Two Soluble Phenolics of Tomato to Resource Availability. *Ecology* 77, 247-258.

Wood, G. A. R. (1991): History of early cocoa introductions. *Cocoa Grower's Bulletin* 44, 7-12.

Wollgast, J., Anklam, E. (2000a): Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? *Food-res-int.* 33 (6), 449-459.

Wollgast, J., Anklam, E. (2000b): Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food-res-int.* 33 (6), 423-447.

- Wollgast, J. (2005): The contents and effects of polyphenols in chocolate: Qualitative and quantitative analyses of polyphenols in chocolate and chocolate raw products as well as evaluation of potential implications of chocolate consumption in human health. Dissertation, Universität Gießen (332 S.),
<http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2005/2239/> Rev. 2006-11-15, Stand: 31.10.2007.
- Wolters, B. (1999): Zur Verbreitungsgeschichte und Ethnobotanik indianischer Kulturpflanzen, insbesondere des Kakaobaums. *Journal of Applied Botany* 73, 128-137.
- Yamagishi, M., Natsume, M., Nagaki, A., Adachi, T., Osakabe, N., Takizawa, T., Kumon, H., Osawa, T. (2000): Antimutagenic activity of cacao: inhibitory effect of cacao Liquor polyphenols on the mutagenic action of heterocyclic amines. *J Agric Food Chem* 48, 5074–5078.
- Yao, L., Caffin, N., D'Arcy, B., Jiang, Y., Shi, J., Singanusong, R., Liu, X., Datta, N., Kakuda, Y., Xu, Y. (2005): Seasonal variations of phenolic compounds in Australia-grown tea (*Camellia sinensis*). *J Agric Food Chem.* 53 (16), 6477-6483.
- Yoshihara, T.; Yoshikawa, H.; Sakamura, S.; Sakuma, T. (1974): Clovamides. L-Dopa conjugated with trans- and cis-caffeic acids in red clover (*Trifolium pratense*). *Agric. Biol. Chem.* 38, 1107-1109.
- Yu, H., Kowalski, S. P., Steffens, J. C. (1992): Comparison of Polyphenol Oxidase Expression in Glandular Trichomes of *Solanum* and *Lycopersicon* Species. *Plant Physiol.* 100, 1885-1890.
- Zhou, K, Yu, L. (2004): Antioxidant properties of bran extracts from Trego wheat grown at different locations. *J Agric Food Chem.* 52(5), 1112-1117.
- Zhu, Q. Y., Holt, R. R., Lazarus, S. A., Ensunsa, J. L., Hammerstone, J. F., Schmitz, H. H., Keen, C. L. (2002): Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. *J Agric Food Chem.* 2002 50 (6), 1700-1705.
- Ziegleder, G., Biehl, B. (1988): Analysis of cocoa flavour components and flavour precursors. In: H.F. Linskens and J.F. Jackson (eds.); *Modern Methods of Plant Analysis, Volume 8, Analysis of Nonalcoholic Beverages* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1988), 321-393.
- Ziegleder, G., Sandmeier, D. (1982): Antioxidative Wirkung von Kakao. *ZSW* 35, 217-222.

8 Danksagung

"In the cookie of life, friends are chocolate chips." *Salman Rushdie*

Viele Menschen haben mich bei der Durchführung dieser Arbeit durch ihren sachkundigen Rat und/oder ihre tatkräftige Hilfe unterstützt. Für mich wird es daher immer „unsere“ Arbeit bleiben. Im Folgenden möchte ich den wichtigsten meiner Helferinnen und Helfer ein paar kurze Sätze widmen, die natürlich in keinem Verhältnis zu ihren Einsatz stehen.

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Reinhard Lieberei für Thema, Mittel und wissenschaftliche Begleitung, insbesondere aber auch für sein Vertrauen, sein Verständnis und seine grenzenlose Geduld.

Herrn Prof. Dr. Dirk Selmar danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Dr. Helmut Kassner danke ich für die sorgfältige Korrektur des schriftlichen Teils, insbesondere der chemischen Formeln, der Maßeinheiten und der Abkürzungen.

Für die jahrelange Anleitung und Mitarbeit in der biochemischen Laborarbeit danke ich Herrn Thomas Tumforde und Herrn Detlef Böhm. Insbesondere danke ich an dieser Stelle auch Herrn Dr. Hans-Artur Putzka, der sich nie zu schade war, mich in die Grundlagen der HPLC-Technik einzuweisen.

Herrn Dr. Hartmut Quader und Frau Irmhild Wachholz danke ich für die vielen Hilfestellungen im Zusammenhang mit der mikroskopischen Analytik.

Frau Dr. Christina Rohsius danke ich herzlich für unsere freundschaftliche Zusammenarbeit über so viele Jahre hinweg; besonders natürlich auch dafür, dass sie mir ihre „wahrscheinlich weltgrößte Literatursammlung zum Thema Kakao“ immer so großzügig zur Verfügung gestellt hat!

Auch dem Rest der Arbeitsgruppe danke ich für ungezählte Ratschläge sowie für die gute Teamarbeit, hier insbesondere Herrn Dr. Christoph Reisdorff.

Für die großzügige Hilfe bei der internationalen Probenbeschaffung und Datenerhebung gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Yah Y. Adu-Ampomah und Herrn Stephen Yaw Opoku (Ghana Cocoa Board), Herrn Prof. a. D. Dr. Böle Biehl (TU Braunschweig), Herrn Dr. Peter Bucheli und Herrn Milton Alvarez (Nestlé Quito, Ecuador und Shanghai, China), Herrn Prof. Dr. David Butler und Herrn Dr. Darin Sukha (CRU Trinidad), Herrn Prof. Dr. Paul Hadley, Herrn Dr. Andrew Daymond sowie Frau Caroline Ford (University

of Reading, UK), Herrn Dr. Rob Lockwood (Dartford, UK), Frau Dr. Gladys Ramos und Herrn Alexis Zambrano (INIA Mérida, Venezuela) sowie Herrn Dr. Lee Ming Tong (MCB Malaysia).

Herrn Dr. Thomas Henkel, Herrn Dr. Hans-Georg Rast und Herrn Dr. Andreas Beckmann (Bayer HealthCare AG, Elberfeld) danke ich für die großzügige Spende der Standardsubstanz Clovamid für die HPLC-Analytik. Für die Mithilfe bei der Identifikation der Substanz Kaffeesäure-aspartat danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Hofmann und Herrn Dr. Timo Stark (Universität Münster), sowie Herrn Dr. Schubert (ThermoFinnigan, Egelsbach).

Meinen Eltern danke ich vor allen Dingen dafür, dass sie, wann immer es nötig war, Kind und Küche übernommen und mir auf diese Weise den Rücken freigehalten haben.

Meinem Mann Carsten danke ich dafür, dass er mich trotz dieser Arbeit geheiratet und mich immer darin unterstützt hat, sie zu beenden. Das Warten hat sich gelohnt!

Die Arbeit stellt u. a. die Ergebnisse des Projektes „Phenolische Substanzen und antioxidatives Potential in Kakao – Gehalte und prozessierungsbedingte Veränderungen“ dar, welches im Zeitraum von März 2000 bis Juli 2002 durch die Stiftung der Deutschen Kakao- und Schokoladenwirtschaft gefördert wurde.

9 Anhang

Tab. 25: Basisdaten der untersuchten Kakaoproben.

C. Mérida: Criollo Mérida; **CPB:** Cocoa Pod Borer; **E:** Ecuador; **G:** Ghana; **K:** Keimungsstadien; **LAF:** Lower Amazon Forastero; **M:** Malaysia; **Nac.:** Nacional; **R:** Reading; **T:** Trinidad; **Trini.:** Trinitario; **UAF:** Upper Amazon Forastero; **V/ C:** Venezuela/ Chama; **V/ SJ:** Venezuela/ San Juan de Lagunillas; **V/ Z:** Venezuela/ Zea

Probe	Varietät	Typ	Herkunft	Frucht [g]	CPB	Pulpa	Samen				
							n	TG/ 100 [g]	rosa [%]	weiß [%]	K
T 1	Amelonado	LAF	T	373,63	nein	trocken	46	79,43	0	0	keine
T 2	Amelonado	LAF	T	276,00	nein	frisch	44	66,48	0	0	keine
T 3	Catongo	LAF	T	531,70	nein	frisch	50	92,83	0	4	keine
T 4	Catongo	LAF	T	578,55	nein	frisch	48	81,07	0	0	keine
T 5	Catongo	LAF	T	359,03	nein	schlecht	41	68,62	0	100	einige
T 6	EET 59	Nac.	T	558,70	nein	frisch	39	123,91	0	0	keine
T 7	EET 59	Nac.	T	357,71	nein	frisch	21	155,29	0	0	keine
T 8	EET 95	Nac.	T	605,88	nein	frisch	47	119,92	0	0	keine
T 9	EET 95	Nac.	T	541,91	nein	frisch	43	113,65	0	0	keine
T 10	EET 95	Nac.	T	510,92	nein	frisch	23	159,89	0	0	keine
T 11	ICS 95	Trini.	T	549,14	nein	frisch	44	93,35	0	0	keine
T 12	ICS 95	Trini.	T	482,96	nein	frisch	38	106,38	0	0	keine
T 13	NA 33	UAF	T	219,97	nein	trocken	20	57,44	0	0	keine
T 15	Amelonado	LAF	T	x	nein	trocken	42	61,84	0	0	keine
T 16	EET 95	Nac.	T	441,74	nein	frisch	45	101,29	0	0	keine
T 17	EET 95	Nac.	T	376,29	nein	frisch	23	150,00	0	0	keine
T 18	EET 95	Nac.	T	375,11	nein	frisch	46	80,81	0	0	keine
T 19	SCA 6	UAF	T	212,87	nein	x	23	84,87	0	0	einige
T 20	SCA 6	UAF	T	171,88	nein	x	16	65,81	0	0	keine
T 21	SCA 6	UAF	T	190,16	nein	x	24	63,05	0	0	keine
R 1	EET 59	Nac.	R	114,00	nein	trocken	4	85,50	0	0	alle
R 2	SCA 6	UAF	R	62,40	nein	frisch	6	50,17	0	0	keine
R 3	SCA 6	UAF	R	116,55	nein	trocken	11	41,09	0	0	einige
R 4	SCA 6	UAF	R	65,90	nein	x	6	46,00	0	0	keine
R 5	SCA 6	UAF	R	45,30	nein	x	4	32,50	25	0	keine
R 6	SCA 6	UAF	R	41,00	nein	x	6	38,67	0	0	keine
R 7	NA 33	UAF	R	254,33	nein	frisch	31	60,11	0	0	alle
R 8	NA 33	UAF	R	146,65	nein	frisch	37	41,97	0	0	keine
M 1	BR 25	Trini.	M	648,5	nein	frisch	30	153,37	0	0	keine
M 2	BR 25	Trini.	M	295,96	nein	frisch	9	100,17	0	0	keine
M 3	BR 25	Trini.	M	520,22	nein	frisch	13	151,90	8	0	keine
M 10	NA 33	UAF	M	373,33	nein	frisch	27	65,92	0	0	keine
M 11	NA 33	UAF	M	428,97	nein	frisch	48	57,62	2	0	keine
M 12	NA 33	UAF	M	350,58	nein	frisch	35	64,34	0	0	keine
M 13	PBC 123	Trini.	M	467,14	ja	frisch	27	99,50	0	0	keine
M 14	PBC 123	Trini.	M	537,89	ja	frisch	36	53,21	6	0	keine
M 15	PBC 123	Trini.	M	449,54	ja	frisch	25	67,82	96	0	keine
M 16	EET 390	Nac.	M	381,37	nein	frisch	32	56,55	16	0	keine
M 17	EET 390	Nac.	M	350,36	nein	schlecht	30	92,81	0	0	keine
M 18	EET 390	Nac.	M	356,15	nein	schlecht	35	71,97	0	0	keine
M 19	KKM 22	Trini.	M	607,11	nein	frisch	32	86,31	0	0	keine
M 20	KKM 22	Trini.	M	398,37	ja	frisch	22	66,95	0	0	keine
M 21	KKM 22	Trini.	M	429,88	nein	schlecht	32	86,41	0	0	keine
M 22	UIT 1	Trini.	M	744,99	ja	x	32	98,03	9	0	alle
M 23	UIT 1	Trini.	M	601,90	ja	x	43	120,93	0	0	keine
M 24	UIT 1	Trini.	M	578,74	ja	x	28	147,80	0	0	keine

Tab. 25; Fortsetzung

Probe	Varietät	Typ	Herkunft	Frucht [g]	CPB	Pulpa	Samen				K
							n	TG/ 100 [g]	rosa [%]	weiß [%]	
E 7	EET 95	Nac.	E	828,00	nein	frisch	47	120,70	0	0	keine
E 6	ICS 95	Trini.	E	779,00	nein	frisch	37	91,80	0	0	keine
G 9	T63/967	UAF	G	609,66	nein	x	48	116,05	0	0	keine
G 10	T63/967	UAF	G	461,20	nein	x	46	88,33	0	0	keine
G 11	T79/501	UAF	G	583,13	nein	x	42	119,24	0	0	keine
G 12	T79/501	UAF	G	429,54	nein	trocken	42	91,84	0	0	keine
G 13	T85/799	UAF	G	781,30	nein	x	59	115,65	0	0	keine
G 14	T85/799	UAF	G	563,89	nein	x	40	104,31	0	0	keine
G 1	Catongo	LAF	G	428,50	nein	frisch	40	101,00	0	100	viele
G 2	Catongo	LAF	G	398,94	nein	schlecht	37	92,79	0	86	viele
G 3	ICS 95	Trini.	G	441,07	nein	trocken	28	140,75	0	0	viele
G 4	ICS 95	Trini.	G	417,02	nein	schlecht	18	141,43	0	0	keine
G 5	NA 33	UAF	G	478,89	nein	frisch	48	90,67	0	0	keine
G 6	NA 33	UAF	G	341,52	nein	frisch	36	94,59	0	0	keine
G 7	SCA 6	UAF	G	296,38	nein	x	35	77,42	0	0	keine
G 8	SCA 6	UAF	G	220,80	nein	x	29	71,72	0	0	keine
G 15	Amelonado	LAF	G	380,16	nein	frisch	43	98,51	0	0	keine
G 16	Amelonado	LAF	G	417,44	nein	frisch	44	98,63	0	0	keine
V 15 a	Porcelana	Criollo	V/ C	x	nein	x	x	x	0	100	keine
V 15 b	Porcelana	Criollo	V/ C	x	nein	x	x	x	0	100	keine
V 15 c	Porcelana	Criollo	V/ C	x	nein	x	x	x	0	100	keine
V 16 a	C. Mérida	Criollo	V/ Z	x	nein	x	x	x	0	100	keine
V 16 b	C. Mérida	Criollo	V/ Z	x	nein	x	x	x	0	100	keine
V 16 c	C. Mérida	Criollo	V/ Z	x	nein	x	x	x	0	100	keine
V 17 a	C. Mérida	Criollo	V/ SJ	x	nein	x	x	x	0	100	keine
V 17 b	C. Mérida	Criollo	V/ SJ	x	nein	x	x	x	0	100	keine
V 17 c	C. Mérida	Criollo	V/ SJ	x	nein	x	x	x	0	100	keine
V 19 a	Guasare	Criollo	V/ SJ	x	nein	x	x	x	0	100	keine
V 19 b	Guasare	Criollo	V/ SJ	x	nein	x	x	x	0	100	keine
V 19 c	Guasare	Criollo	V/ SJ	x	nein	x	x	x	0	100	keine
V 18 a	C. Mérida	Criollo	V/ SJ	x	nein	x	x	x	0	100	keine
V 18 b	C. Mérida	Criollo	V/ SJ	x	nein	x	x	x	0	100	keine
V 18 c	C. Mérida	Criollo	V/ SJ	x	nein	x	x	x	0	100	keine

x: Werte fehlen.

Tab. 26: Phenolische Inhaltsstoffe und Gesamt-Polyphenolgehalt in entfettetem Trockenpulver reifer, unfermentierter Kakaosamen

Probe	Varietät	Typ	Herkunft	[mg kg ⁻¹ ff TM]						[% ff TM ¹] ECAT-Äquiv.	[Area] C
				PCA	CAT	ECAT	Caff-asp.	Cya-Gal	Cya-Ara		
T 1	Amelonado	LAF	T	0,00	340,30	23360	893,60	1462,00	2269,00	9,44	1393000
T 2	Amelonado	LAF	T	0,00	281,10	19270	674,80	1046,00	1525,00	8,55	1007000
T 15	Amelonado	LAF	T	0,00	294,00	19160	454,20	976,40	1240,00	6,93	1022000
G 15	Amelonado	LAF	G	0,00	786,20	43980	820,07	3271,00	5395,00	17,01	2686000
G 16	Amelonado	LAF	G	0,00	597,60	44690	56,25	2496,00	4308,00	17,03	2428000
T 3	Catongo	LAF	T	0,00	325,80	39140	1296,00	1483,00	2233,00	14,34	2591000
T 4	Catongo	LAF	T	0,00	421,30	41740	1128,00	776,10	1795,00	17,02	2733000
T 5	Catongo	LAF	T	0,00	627,80	42990	1034,00	0,00	0,00	15,59	3013000
G 1	Catongo	LAF	G	0,00	389,50	46810	1141,00	0,00	0,00	12,32	3418000
G 2	Catongo	LAF	G	0,00	437,40	48080	1419,00	147,90	400,00	17,15	3663000
T 6	EET 59	Nac.	T	0,00	505,70	36140	1005,00	1933,00	2978,00	14,52	1960000
T 7	EET 59	Nac.	T	0,00	407,90	24440	1065,00	1484,00	1953,00	11,77	1485000
R 1	EET 59	Nac.	R	87,84	1028,00	33770	2816,00	443,80	943,00	10,16	1789000
T 8	EET 95	Nac.	T	0,00	440,70	35270	1646,00	2161,00	2834,00	13,22	2013000
T 9	EET 95	Nac.	T	0,00	492,90	36200	1029,00	2433,00	4384,00	14,33	1913000
T 10	EET 95	Nac.	T	0,00	460,20	35730	921,00	2146,00	3444,00	16,15	219000
T 16	EET 95	Nac.	T	0,00	472,50	45120	1935,00	2112,00	5659,00	16,76	1617000
T 17	EET 95	Nac.	T	0,00	480,00	36850	765,80	1894,00	4078,00	14,33	82000
T 18	EET 95	Nac.	T	0,00	611,40	42210	1307,00	2727,00	4439,00	16,21	2316000
E 7	EET 95	Nac.	E	0,00	288,80	18450	60,68	1244,00	2492,00	11,88	1408000
M 16	EET 390	Nac.	M	828,80	1385,00	33980	701,60	1263,00	2523,00	8,38	1673000
M 17	EET 390	Nac.	M	388,20	415,30	21080	614,90	x	x	10,77	1326000
M 18	EET 390	Nac.	M	929,04	804,10	11340	948,30	1464,00	3908,00	12,01	2095000
T 13	NA 33	UAF	T	0,00	97,24	11060	264,60	787,20	1366,00	8,39	778000
R 7	NA 33	UAF	R	27,98	481,10	33550	5516,00	1243,00	2944,00	13,02	2014000
R 8	NA 33	UAF	R	17,64	605,10	31110	5333,00	1534,00	3316,00	12,32	1787000
M 10	NA 33	UAF	M	109,00	581,80	31990	1206,00	1115,00	2675,00	10,54	2266000
M 11	NA 33	UAF	M	0,00	768,40	27340	1332,00	757,60	1534,00	8,06	1540000
M 12	NA 33	UAF	M	83,35	643,70	25700	3546,00	759,00	1817,00	9,57	1154000
G 5	NA 33	UAF	G	0,00	299,40	34360	1303,00	3556,00	7077,00	14,27	2429000
G 6	NA 33	UAF	G	0,00	246,90	39210	1468,00	4234,00	7737,00	16,16	2496000
T 19	SCA 6	UAF	T	66,91	321,70	42540	2331,00	890,00	2452,00	15,51	2434000
T 20	SCA 6	UAF	T	0,00	453,70	41740	3109,00	877,90	3305,00	18,98	2579000
T 21	SCA 6	UAF	T	0,00	455,00	35470	336,20	2177,00	4115,00	14,91	2140000
R 2	SCA 6	UAF	R	264,80	1194,00	36370	3374,00	1533,00	3196,00	14,55	2334000
R 3	SCA 6	UAF	R	0,00	94,04	21650	2242,00	818,30	2223,00	12,74	1538000
R 4	SCA 6	UAF	R	0,00	126,60	26810	4241,00	1366,00	4398,00	13,87	2007000
R 5	SCA 6	UAF	R	0,00	92,98	17890	2213,00	991,80	2459,00	8,20	1120000
R 6	SCA 6	UAF	R	0,00	86,70	17110	2544,00	2040,00	4047,00	10,39	1219000
G 7	SCA 6	UAF	G	0,00	416,90	36980	2727,00	3042,00	6126,00	17,14	2580000
G 8	SCA 6	UAF	G	0,00	377,60	35750	109,50	1130,00	2538,00	17,96	2063000
G 9	T63/967	UAF	G	0,00	623,80	34710	2222,00	2109,00	3739,00	13,27	2184000
G 10	T63/967	UAF	G	0,00	669,40	28020	1290,00	2802,00	5264,00	12,91	1823000
G 11	T79/501	UAF	G	0,00	253,00	38900	1390,00	2341,00	5230,00	14,98	2527000
G 12	T79/501	UAF	G	0,00	221,40	32950	341,90	1548,00	3420,00	12,70	103000
G 13	T85/799	UAF	G	0,00	380,10	37850	0,00	1850,00	3492,00	14,83	213000
G 14	T85/799	UAF	G	0,00	413,00	40670	539,50	3486,00	5557,00	15,59	2649000
M 1	BR 25	Trini.	M	1210,00	308,50	37380	2038,00	1060,00	3662,00	14,51	2248000
M 2	BR 25	Trini.	M	1472,00	636,80	40740	2222,00	521,20	3343,00	13,06	2254000
M 3	BR 25	Trini.	M	123,00	782,60	39270	1878,00	565,00	2094,00	9,72	2031000
T 11	ICS 95	Trini.	M	0,00	154,50	17150	2818,00	665,00	1694,00	10,25	1143000
T 12	ICS 95	Trini.	M	0,00	367,00	27460	182,40	1585,00	3339,00	12,34	1798000
E 6	ICS 95	Trini.	E	168,70	240,70	12840	889,40	406,20	1505,00	9,38	1235000
G 3	ICS 95	Trini.	G	0,00	507,60	43240	2417,00	887,80	3388,00	17,43	2495000
G 4	ICS 95	Trini.	G	0,00	940,70	39880	3009,00	1978,00	4356,00	14,91	2584000
M 19	KKM 22	Trini.	M	153,90	633,60	36600	3978,00	x	x	11,57	2359000
M 20	KKM 22	Trini.	M	589,50	445,90	21590	2396,00	1030,00	3336,00	11,84	2137000
M 21	KKM 22	Trini.	M	1094,00	673,50	38240	1122,00	2007,00	4424,00	14,48	1096000
M 13	PBC 123	Trini.	M	162,00	639,50	32810	1518,00	1227,00	3302,00	10,59	1630000
M 14	PBC 123	Trini.	M	0,00	785,70	31270	993,80	1098,00	2812,00	10,38	1690000

Tab. 26; Fortsetzung

Probe	Varietät	Typ	Herkunft	[mg kg ⁻¹ ff TM]						[% ffTM ⁻¹] ECAT-Äquiv.	[Area] C
				PCA	CAT	ECAT	Caff-asp.	Cya-Gal	Cya-Ara		
M 15	PBC 123	Trini.	M	88,74	1055,00	28700	1321,60	1244,00	2114,00	10,45	1416000
M 22	UIT 1	Trini.	M	67,46	939,30	30530	2858,00	x	x	10,88	2002000
M 23	UIT 1	Trini.	M	0,00	1139,00	38540	2125,00	x	x	12,44	2107000
M 24	UIT 1	Trini.	M	0,00	675,70	38310	3183,00	1045,00	4612,00	13,71	2106000
V 16 a	Cr. Merideño	Crio.	V/ Z	0,00	849,90	40200	4582,00	0,00	0,00	13,44	2200000
V 16 b	Cr. Merideño	Crio.	V/ Z	0,00	1306,00	47100	5273,00	0,00	0,00		2813000
V 16 c	Cr. Merideño	Crio.	V/ Z	0,00	0,00	43500	1985,00	0,00	0,00		2143000
V 17 a	Cr. Merideño	Crio.	V/ SJ	0,00	1092,00	28170	2109,00	0,00	0,00	15,12	1812000
V 17 b	Cr. Merideño	Crio.	V/ SJ	0,00	2254,00	32250	4396,00	0,00	0,00		1960000
V 17 c	Cr. Merideño	Crio.	V/ SJ	0,00	1605,00	26810	4104,00	0,00	0,00		1472000
V 19 a	Cr. Merideño	Crio.	V/ SJ	0,00	0,00	38650	3858,00	0,00	0,00	16,55	2588000
V 19 b	Cr. Merideño	Crio.	V/ SJ	0,00	1524,00	32080	6546,00	0,00	0,00		2429000
V 19 c	Cr. Merideño	Crio.	V/ SJ	0,00	0,00	29140	4183,00	0,00	0,00		2035000
V 18 a	Guasare	Crio.	V/ SJ	0,00	1419,00	35840	3478,00	569,00	0,00	13,77	2548000
V 18 b	Guasare	Crio.	V/ SJ	0,00	0,00	37700	4448,00	0,00	0,00		2181000
V 18 c	Guasare	Crio.	V/ SJ	0,00	0,00	29820	5258,00	0,00	0,00		2195000
V 15 a	Porcelana	Crio.	V/ C	0,00	694,00	19790	1512,29	0,00	0,00	10,58	1280000
V 15 b	Porcelana	Crio.	V/ C	0,00	961,90	22520	1474,57	0,00	0,00		1934000
V 15 c	Porcelana	Crio.	V/ C	0,00	0,00	26800	2182,71	0,00	0,00		1882000

x: Werte fehlen.

Im Falle der Proben aus Venezuela wurden jeweils 3 Samen (a, b und c) pro Charge getrennt per HPLC analysiert. Der Gesamt-Polyphenolgehalt (% Ecata-Äquiv.) bezieht sich hingegen jeweils auf die gesamte restliche Probe, sodass es davon immer nur einen anstelle von 3 Werten je Charge gibt.

Tab. 27: Einzelwerte Zellflächen/ Samen und n Präparate mit Zellreihen/ Samen
 Letzter Buchstabe der Probenbezeichnung (A, B, C etc.) benennt den jeweils untersuchten Einzelsamen. Von jedem Einzelsamen wurden insgesamt 3 mikroskopische Präparate erstellt. Jeder Flächenwert basiert auf 15 ausgewerteten PZ bzw. SZ

Probe	Varietät	Typ	Herkunft	\bar{X} PZ Fläche [μm^2]	STABW	\bar{X} SZ Fläche [μm^2]	STABW	SZ zu PZ [%]	n Reihen
G 1 A	Catongo	LAF	G	581,60	196,00	340,50	133,00	58,54	1
G 1 B	Catongo	LAF	G	739,50	326,50	360,40	132,50	48,74	0
G 1 C	Catongo	LAF	G	578,40	173,70	381,80	147,30	66,01	0
G 2 A	Catongo	LAF	G	557,20	364,10	391,30	133,30	70,22	0
G 2 B	Catongo	LAF	G	587,20	148,80	405,30	119,10	69,02	2
G 2 C	Catongo	LAF	G	530,60	196,80	371,40	113,60	70,00	3
T 8 A	EET 95	Nac.	T	1287,00	594,90	595,80	175,10	46,31	0
T 8 B	EET 95	Nac.	T	825,90	512,30	449,50	121,50	54,43	0
T 8 C	EET 95	Nac.	T	640,00	193,90	452,10	161,40	70,64	0
T 9 A	EET 95	Nac.	T	874,00	318,50	486,40	181,90	55,68	1
T 9 B	EET 95	Nac.	T	882,00	239,30	450,40	126,10	51,09	0
T 9 C	EET 95	Nac.	T	843,00	346,80	437,00	114,30	51,86	0
T 10 B	EET 95	Nac.	T	1508,00	730,20	571,30	64,53	37,89	0
T 10 C	EET 95	Nac.	T	686,60	256,30	524,60	88,12	76,41	0
T 16 A	EET 95	Nac.	T	766,20	267,50	407,50	151,00	53,19	2
T 16 B	EET 95	Nac.	T	562,70	298,80	436,10	125,50	77,49	1
T 16 C	EET 95	Nac.	T	876,20	381,40	423,70	99,21	48,35	0
T 17 A	EET 95	Nac.	T	512,70	159,20	340,70	109,00	66,46	0
T 17 B	EET 95	Nac.	T	689,60	267,30	439,60	152,10	63,75	0
T 17 C	EET 95	Nac.	T	862,00	275,30	395,40	121,60	45,87	1
T 18 A	EET 95	Nac.	T	917,10	280,70	399,80	110,00	43,59	1
G 5 A	NA 33	UAF	G	748,80	283,90	430,40	115,00	57,48	0
G 5 B	NA 33	UAF	G	863,20	371,20	408,10	139,30	47,27	0
G 5 C	NA 33	UAF	G	864,30	283,60	411,70	153,60	47,64	0
G 6 A	NA 33	UAF	G	606,40	247,00	392,00	177,00	64,65	0
G 6 B	NA 33	UAF	G	633,80	256,90	384,20	133,50	60,63	3
G 6 C	NA 33	UAF	G	802,10	268,70	464,60	99,00	57,92	1
M A	NA 33	UAF	M	631,30	186,80	483,90	150,00	76,66	0
M B	NA 33	UAF	M	587,30	179,00	412,00	161,80	70,15	1
M C	NA 33	UAF	M	623,10	214,10	481,60	166,20	77,27	1
R 7 A	NA 33	UAF	R	611,00	243,30	398,80	91,20	65,27	1
R 7 B	NA 33	UAF	R	499,00	250,70	393,20	115,50	78,81	0
R 7 C	NA 33	UAF	R	473,50	206,40	341,60	156,00	72,14	2
R 8 A	NA 33	UAF	R	863,80	538,10	341,30	95,00	39,52	0
R 8 B	NA 33	UAF	R	613,30	216,20	429,50	121,50	70,04	0
R 8 C	NA 33	UAF	R	497,10	143,80	415,00	111,10	83,47	0
T 13 B	NA 33	UAF	T	410,00	194,60	338,40	146,40	82,56	2
T 3 A	Catongo	LAF	T	920,00	403,40	430,40	141,00	46,81	2
T 3 B	Catongo	LAF	T	753,00	227,90	416,30	141,90	55,28	1
T 3 C	Catongo	LAF	T	581,30	155,50	395,60	126,30	68,06	1
T 4 A	Catongo	LAF	T	676,60	311,70	452,80	143,90	66,93	0
T 4 B	Catongo	LAF	T	606,00	230,70	376,80	87,84	62,17	0
T 4 C	Catongo	LAF	T	695,20	285,70	489,00	151,60	70,34	1
T 5 A	Catongo	LAF	T	958,90	260,00	444,10	139,10	46,31	3
T 5 B	Catongo	LAF	T	831,90	585,70	502,70	252,40	60,43	1
T 5 C	Catongo	LAF	T	821,80	270,20	367,20	116,60	44,68	1

Tab. 27; Fortsetzung

Probe	Varietät	Typ	Herkunft	X PZ Fläche [μm^2]	STABW	X SZ Fläche [μm^2]	STABW	SZ zu PZ [%]	n Reihen
V 2 A	Guasare	Criollo	V	1079,00	653,90	625,00	278,10	57,92	1
V 2 B	Guasare	Criollo	V	1528,00	817,50	712,70	277,80	46,68	2
V 2 C	Guasare	Criollo	V	1377,00	475,00	623,20	227,30	45,25	0
V 2 D	Guasare	Criollo	V	998,00	370,40	560,40	192,30	56,15	0
V 2 E	Guasare	Criollo	V	1877,00	790,00	730,60	227,00	38,92	0
V 1 A	Pentag. V.	Criollo	V	1200,00	351,30	663,80	233,40	55,31	1
V 1 B	Pentag. V.	Criollo	V	1034,00	312,30	500,80	173,50	48,45	1
V 1 C	Pentag. V.	Criollo	V	1294,00	514,60	666,40	191,70	51,49	2
V 1 D	Pentag. V.	Criollo	V	1181,00	242,10	612,70	200,10	51,86	2
V 1 E	Pentag. V.	Criollo	V	1501,00	375,50	741,30	236,60	49,40	0
V 3 C	Pentag. R.	Criollo	V	1328,00	440,70	560,70	187,00	42,23	0
V 3 D	Pentag. R.	Criollo	V	1790,00	473,10	678,10	247,00	37,87	0
V 3 E	Pentag. R.	Criollo	V	1232,00	344,00	613,60	233,20	49,79	2
V 4 A	C. Mérida	Criollo	V	1009,00	273,80	630,90	240,80	62,50	0
V 4 B	C. Mérida	Criollo	V	727,60	566,70	566,70	202,00	77,81	2
V 4 C	C. Mérida	Criollo	V	930,20	100,30	477,10	107,00	51,29	0
V 5 C	C. Mérida	Criollo	V	1155,00	419,00	607,60	271,00	52,60	0
V 5 D	C. Mérida	Criollo	V	1294,00	314,10	806,70	315,20	62,33	1
V 5 E	C. Mérida	Criollo	V	935,30	203,70	460,90	134,10	49,28	2
V 6 C	Porcelana	Criollo	V	983,80	252,20	565,10	207,90	57,44	0
V 6 D	Porcelana	Criollo	V	830,70	168,90	366,90	152,60	44,16	0
V 6 E	Porcelana	Criollo	V	1300,00	331,70	551,20	150,00	42,39	0
V 7 A	Porcelana	Criollo	V	1019,00	272,10	638,00	200,20	62,59	1
V 7 B	Porcelana	Criollo	V	1148,00	391,20	592,80	247,30	51,92	1
V 7 C	Porcelana	Criollo	V	958,40	206,60	666,10	173,40	69,50	0
V 7 D	Porcelana	Criollo	V	1240,00	414,60	556,30	224,70	44,84	0
V 7 E	Porcelana	Criollo	V	839,60	288,40	454,50	178,40	54,14	2

Tab. 28: Einzelwerte der untersuchten Fermentationsstadien des Typs Criollo

Probe	Varietät	Herkunft	Fermentation [h]	[mg kg ⁻¹ ff TM]			[Area]
				Caff-Asp	CAT	ECAT	C
V 19 A	Cr. Mérida	V/ SJ	0	3858,00	0,00	38650,00	2588000
V 19 B	Cr. Mérida	V/ SJ	0	6546,00	1524,00	32080,00	2429000
V 19 C	Cr. Mérida	V/ SJ	0	4183,00	0,00	29140,00	2035000
V 18 A	Guasare	V/ SJ	0	3478,00	1419,00	35840,00	2548000
V 18 B	Guasare	V/ SJ	0	4448,00	0,00	37700,00	2181000
V 18 C	Guasare	V/ SJ	0	5258,00	0,00	29820,00	2195000
V 17 A	Cr. Mérida	V/ SJ	0	2109,00	1092,00	28170,00	1812000
V 17 B	Cr. Mérida	V/ SJ	0	4397,00	2254,00	32250,00	1960000
V 17 C	Cr. Mérida	V/ SJ	0	4104,00	1605,00	26820,00	1472000
V 16 A	Cr. Mérida	V/ Z	0	4582,00	849,90	40190,00	2200000
V 16 B	Cr. Mérida	V/ Z	0	5273,00	1306,00	47100,00	2814000
V 16 C	Cr. Mérida	V/ Z	0	1985,00	0,00	43490,00	2143000
V 15 A	Porcelana	V/ C	0	1512,00	694,20	19790,00	1280000
V 15 B	Porcelana	V/ C	0	1475,00	961,90	22520,00	1934000
V 15 C	Porcelana	V/ C	0	2183,00	0,00	26800,00	1882000
V 19 A	Cr. Mérida	V/ SJ	24	2383,00	766,70	16830,00	1191000
V 19 B	Cr. Mérida	V/ SJ	24	2873,00	0,00	25550,00	1771000
V 19 C	Cr. Mérida	V/ SJ	24	1786,00	0,00	10080,00	833900
V 18 A	Guasare	V/ SJ	24	2763,00	0,00	20030,00	1441000
V 18 B	Guasare	V/ SJ	24	4907,00	0,00	24780,00	2083000
V 18 C	Guasare	V/ SJ	24	2751,00	0,00	16310,00	1322000
V 17 A	Cr. Mérida	V/ SJ	24	766,90	60,99	5358,00	703700
V 17 B	Cr. Mérida	V/ SJ	24	555,40	0,00	3351,00	340570
V 17 C	Cr. Mérida	V/ SJ	24	1987,00	0,00	6697,00	582100
V 16 A	Cr. Mérida	V/ Z	24	3282,00	0,00	45100,00	2039000
V 16 B	Cr. Mérida	V/ Z	24	3135,00	0,00	38430,00	1837000
V 16 C	Cr. Mérida	V/ Z	24	4160,00	0,00	45930,00	2378000
V 15 A	Porcelana	V/ C	24	831,70	0,00	11150,00	807100
V 15 B	Porcelana	V/ C	24	589,00	183,30	7915,00	680800
V 15 C	Porcelana	V/ C	24	479,60	0,00	6291,00	565400
V 19 A	Cr. Mérida	V/ SJ	48	1039,60	0,00	2194,00	211900
V 19 B	Cr. Mérida	V/ SJ	48	563,50	0,00	1140,00	121500
V 19 C	Cr. Mérida	V/ SJ	48	707,40	0,00	1405,00	238700
V 18 A	Guasare	V/ SJ	48	305,80	0,00	461,70	20980
V 18 B	Guasare	V/ SJ	48	1562,00	245,70	3147,00	187000
V 18 C	Guasare	V/ SJ	48	1509,00	0,00	1851,00	163800
V 17 A	Cr. Mérida	V/ SJ	48	2220,00	0,00	20850,00	1692000
V 17 B	Cr. Mérida	V/ SJ	48	2342,00	897,20	31830,00	2083000
V 17 C	Cr. Mérida	V/ SJ	48	433,50	0,00	1049,00	82220
V 16 A	Cr. Mérida	V/ Z	48	430,70	0,00	2054,00	144000
V 16 B	Cr. Mérida	V/ Z	48	4119,00	0,00	20170,00	1146000
V 16 C	Cr. Mérida	V/ Z	48	3906,00	314,20	17470,00	1025000
V 15 A	Porcelana	V/ C	48	320,30	0,00	707,80	34410
V 15 B	Porcelana	V/ C	48	921,80	234,70	6843,00	444400
V 15 C	Porcelana	V/ C	48	1684,10	90,28	5241,00	378700
V 19 A	Cr. Mérida	V/ SJ	72	639,10	0,00	1360,00	90100
V 19 B	Cr. Mérida	V/ SJ	72	546,10	0,00	398,90	0

Tab. 28; Fortsetzung

Probe	Varietät	Herkunft	Fermentation [h]	[mg kg ⁻¹ ff TM]			[Area]
				Caff-Asp	CAT	ECAT	C
V 19 C	Cr. Mérida	V/ SJ	72	3349,00	0,00	10620,00	909200
V 18 A	Guasare	V/ SJ	72	4682,00	0,00	10610,00	766600
V 18 B	Guasare	V/ SJ	72	330,90	0,00	340,60	0
V 18 C	Guasare	V/ SJ	72	1179,00	0,00	1816,00	130300
V 17 A	Cr. Mérida	V/ SJ	72	663,20	0,00	323,40	0
V 17 B	Cr. Mérida	V/ SJ	72	793,80	0,00	687,80	51180
V 17 C	Cr. Mérida	V/ SJ	72	1261,00	0,00	3779,00	324600
V 16 A	Cr. Mérida	V/ Z	72	345,60	0,00	897,90	66980
V 16 B	Cr. Mérida	V/ Z	72	1028,00	0,00	1142,00	32110
V 16 C	Cr. Mérida	V/ Z	72	1139,00	0,00	1390,00	57110
V 15 A	Porcelana	V/ C	72	204,70	0,00	203,40	0
V 15 B	Porcelana	V/ C	72	1517,00	108,00	4965,00	286200
V 15 C	Porcelana	V/ C	72	624,80	0,00	691,40	0

AMELONADO



Ghana

Trinidad

Abb. 86: Proben des Klons Amelonado

BR 25 aus Tawau, Malaysia



A

B

C

Abb. 87: Proben des Klons BR 25

CATONGO



Ghana | Trinidad

Abb. 88: Proben des Klons Catongo

EET 59



Reading | Trinidad

Abb. 89: Proben des Klons EET 59

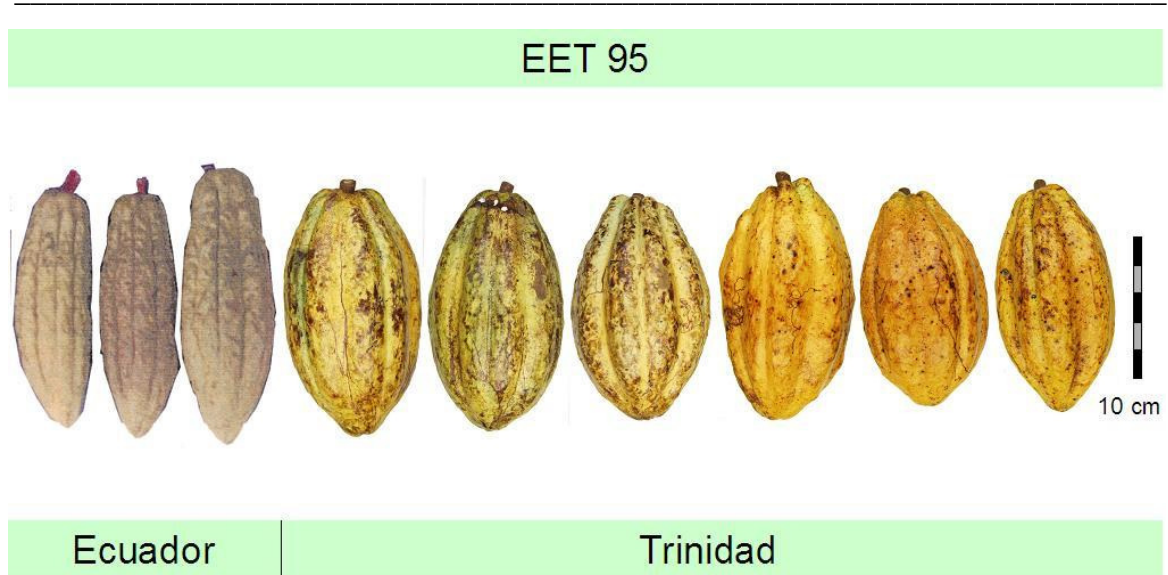


Abb. 90: Proben des Klons EET 95

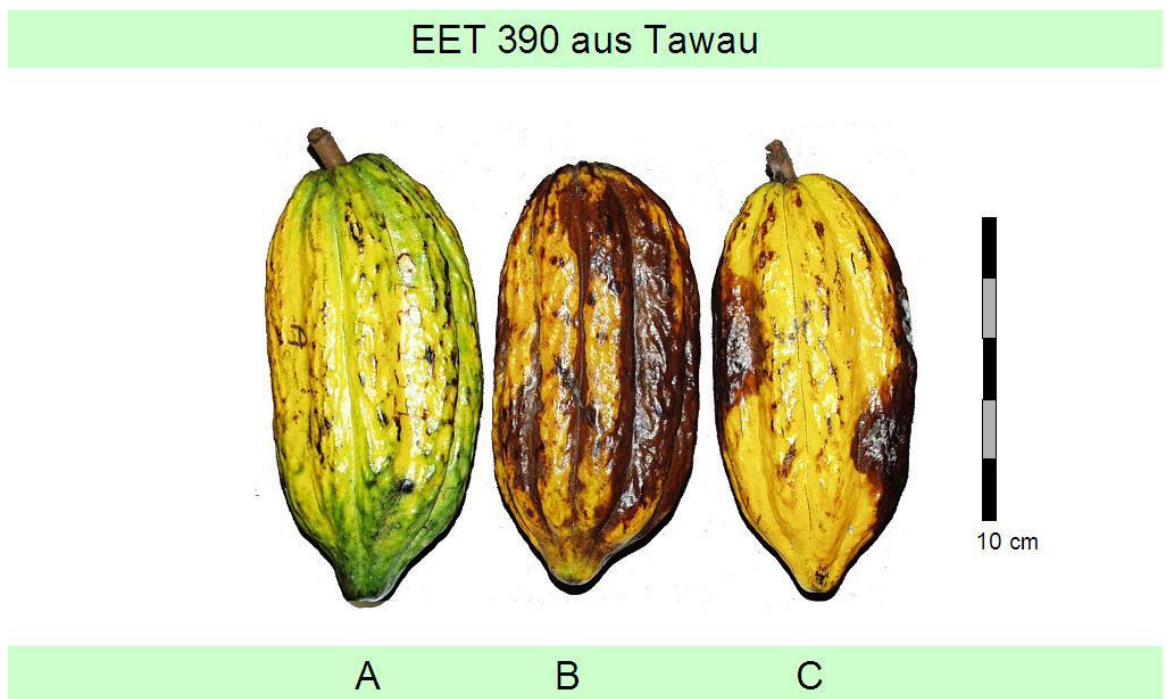


Abb. 91: Proben des Klons EET 390

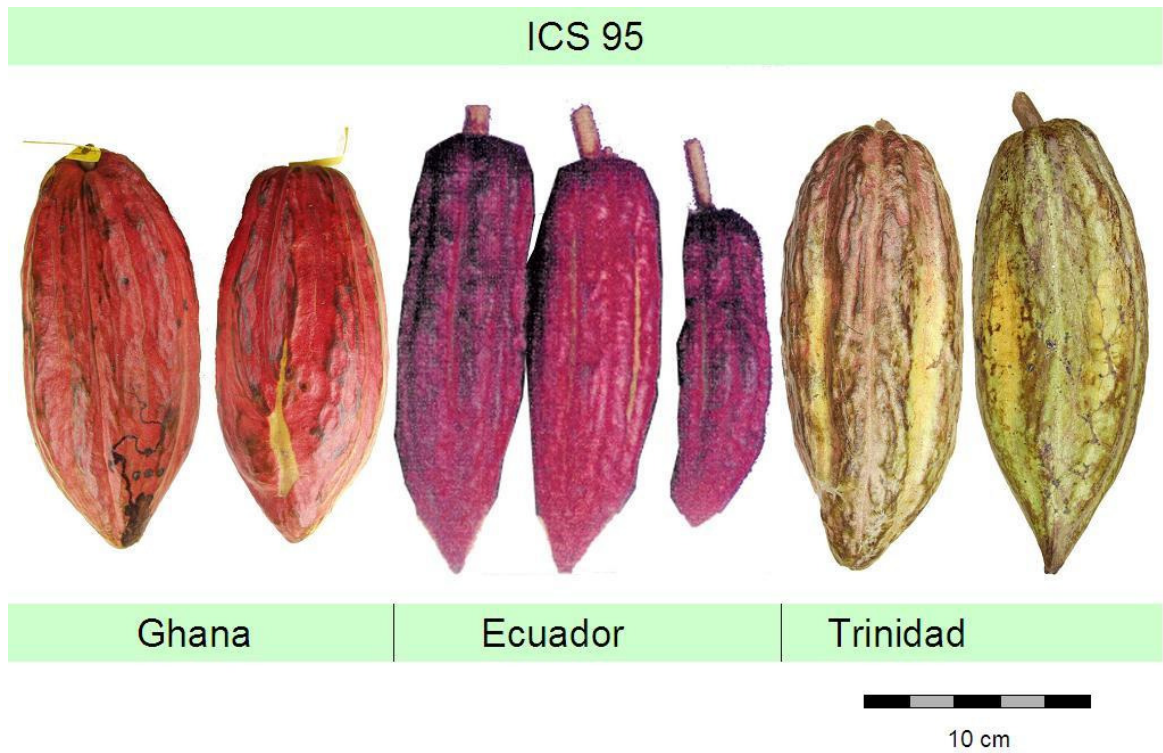


Abb. 92: Proben des Klons ICS 95

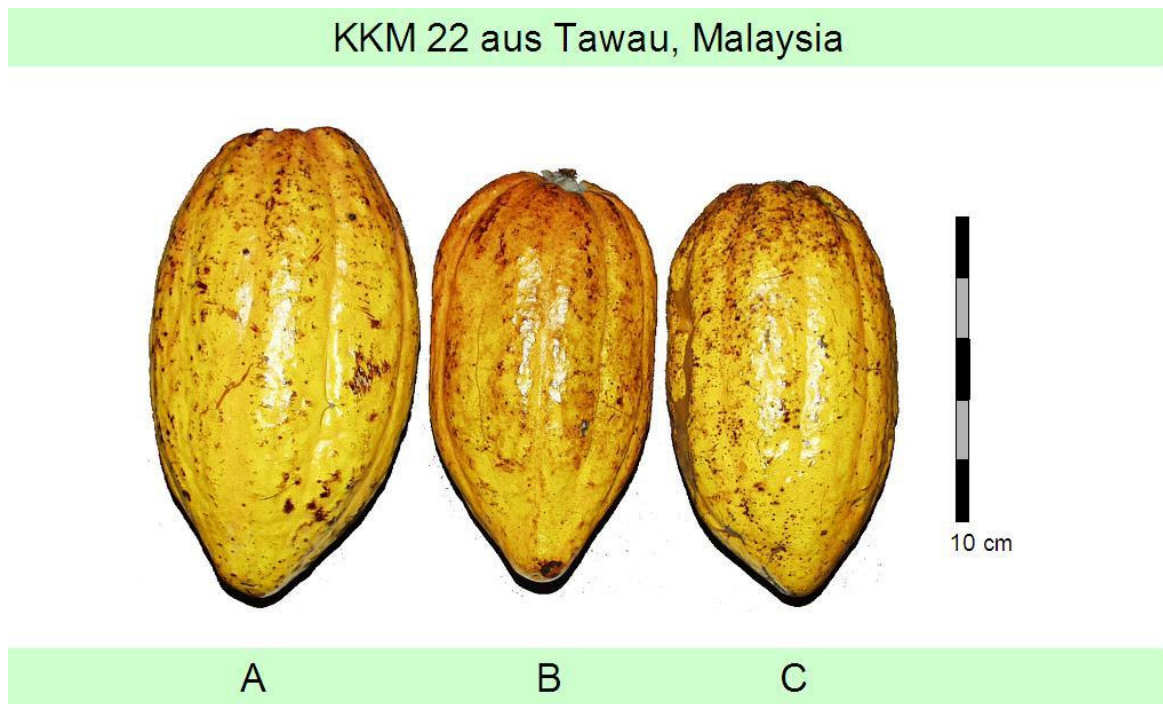


Abb. 93: Proben des Klons KKM 22

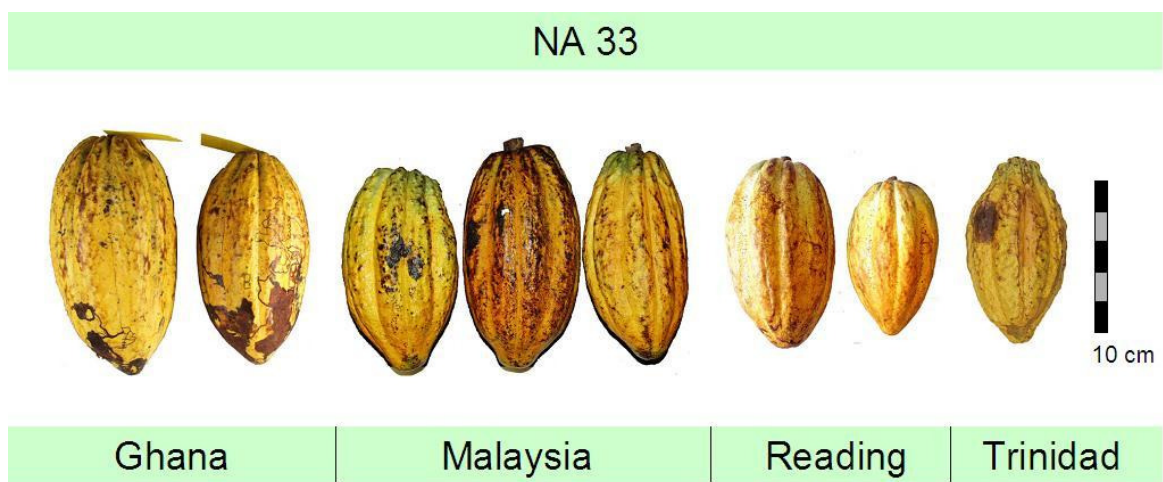


Abb. 94: Proben des Klons NA 33

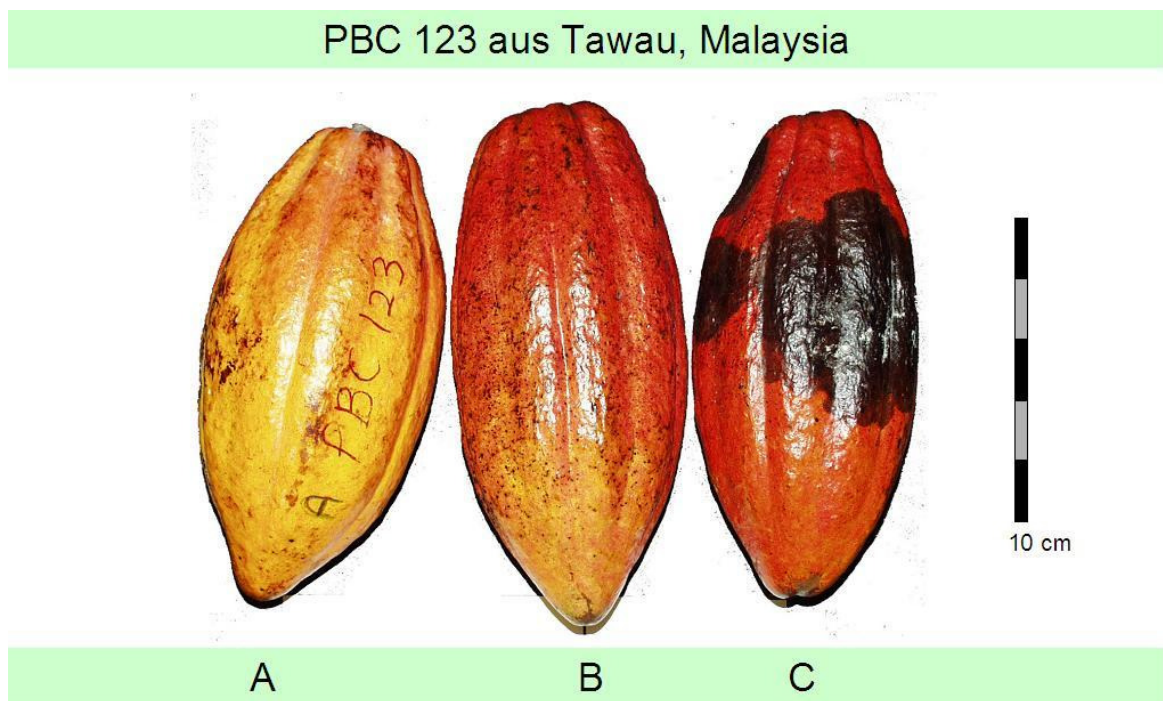


Abb. 95: Proben des Klons PBC 1

SCA 6



Ghana Reading Trinidad

Abb. 96: Proben des Klons SCA 6

T63/967 aus Ghana



A B

Abb. 97: Proben des Klons T 63/ 967

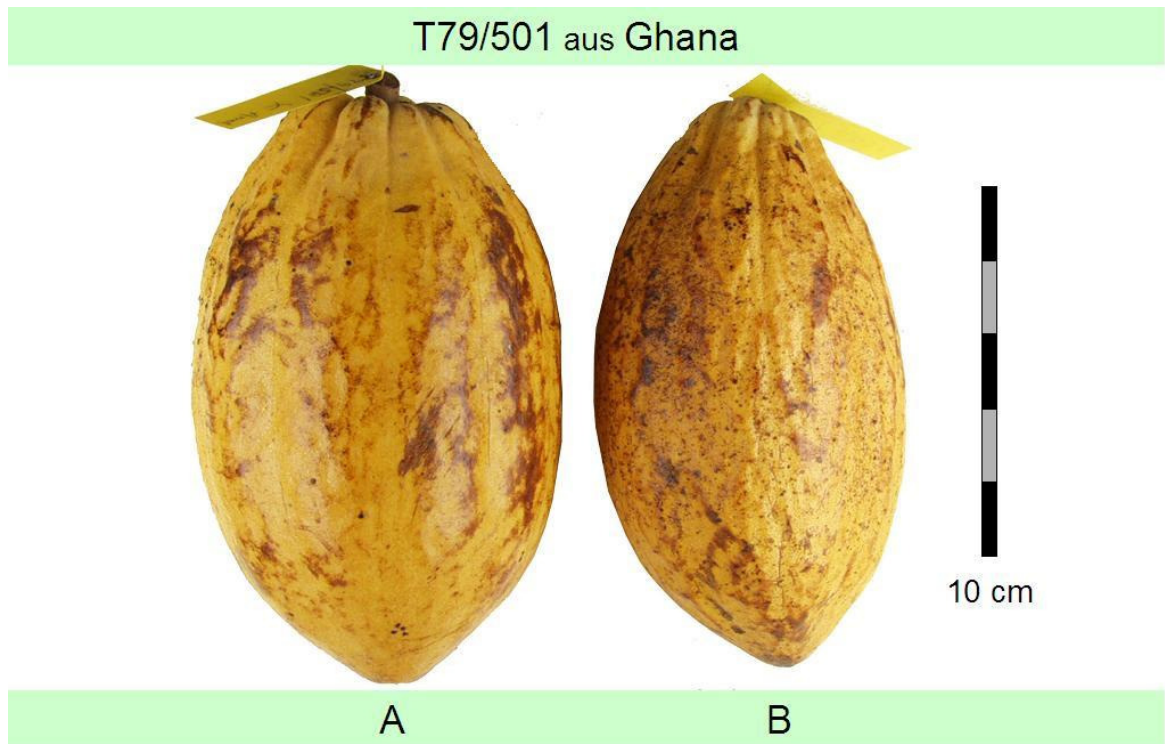


Abb. 98: Proben des Klons T 79/ 501

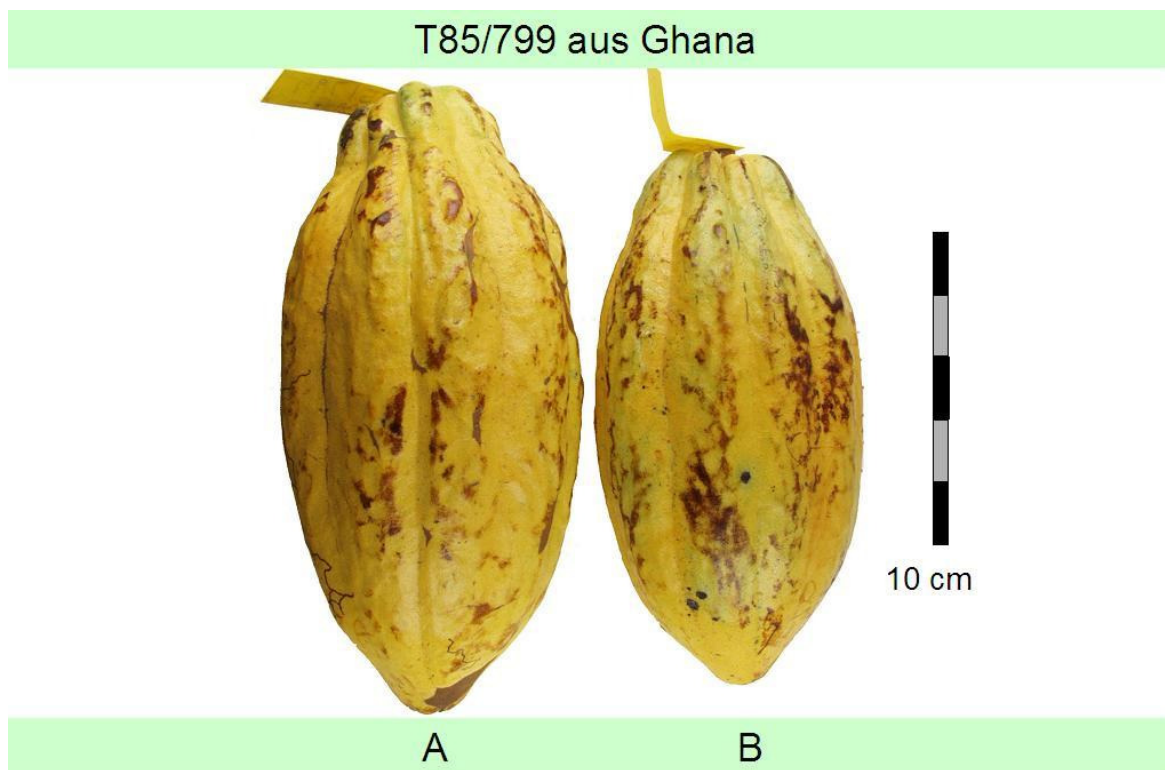


Abb. 99: Proben des Klons T 85/ 799

UIT 1 aus Tawau, Malaysia

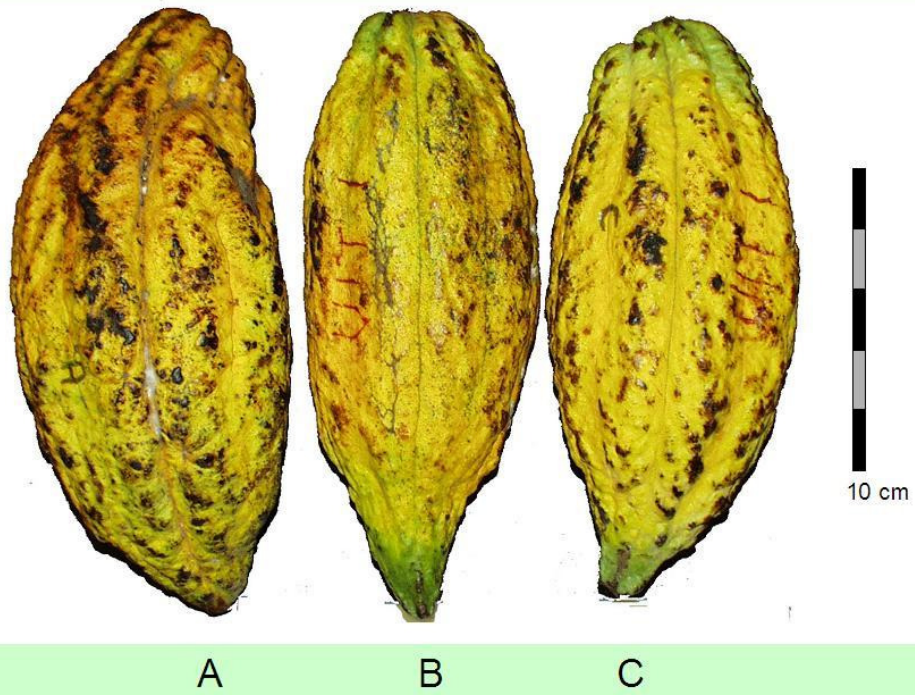


Abb. 100: Proben des Klons UIT 1



Abb. 101: Die Varietät Criollo Mérida
Fotos: Alexis Zambrano, INIA Mérida, Venezuela



Abb. 102: Die Criollo-Varietäten Guasare (a) und Pentagona (b, c)
Fotos: Alexis Zambrano, INIA Mérida, Venezuela



Abb. 103: Die Criollo-Varietät Porcelana
Fotos: Alexis Zambrano, INIA Mérida, Venezuela

Wissenschaftlicher Werdegang

Personalien

Name	Silke Elwers, geb. Müller
3.09.1972	geboren in Hamburg
Familienstand	verheiratet, eine Tochter (*30.08.2002)

Schulbildung

1979 - 1983	Deutsche Schule Lissabon/ Portugal
1983 - 1992	Gymnasium Süderelbe, Hamburg – Abitur

Hochschulbildung

10/1992 - 10/1998	Studium der Biologie an der Universität Hamburg Hauptfach: Angewandte Botanik 1. Nebenfach: Allgemeine Botanik 2. Nebenfach: Portugiesisch/ Linguistik
Diplomarbeit	Histologische und cytologische Studien an Samen von <i>Theobroma</i> -Arten (Betreuer: Prof. Dr. R. Lieberei) Abschluss als Diplom-Biologin (Gesamtbewertung: "sehr gut")

Wissenschaftliche Arbeit nach der Graduierung

10/1998-07/1999	Werkvertragsnehmerin am Institut für Angewandte Botanik, Universität Hamburg <i>Labor- und Schreibearbeiten, Praktikumsbetreuung, Mitarbeit bei der Organisation von Tagungen, Recherche wissenschaftlicher Daten etc..</i>
08/1999-07/2002	Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. Lieberei/ Institut für Angewandte Botanik, Universität Hamburg
01/ 2000-07/2002	<i>Betreuung des Drittmittel-Projektes „Phenolische Substanzen und antioxidatives Potential in Kakao – Gehalte und prozessierungsbedingte Veränderungen“</i>
08/ 2002-04/2008	Doktorandin im Department für Biologie, Universität Hamburg Betreuer: Prof. Dr. R. Lieberei