Biochemische Indikatoren für Keimung und Fermentation in Samen von Kakao (*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

Lina Stoll

aus Hamburg

Hamburg, 2010

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. R. LIEBEREI
Weiterer Gutachte der Dissertation:
Herr Professor Dr. B. BISPING
Tag der Disputation: 07. Mai 2010

Hamburg, den 20. April 2010



Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Departments Biologie

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 7
2 Hintergrund 10
2.1 Der Kakaobaum (Theobroma cacao L.). 10
2.1.1 Systematik und Varietäten 10
2.1.2 Verbreitung 11
2.1.3 Allgemeine Biologie des Kakaobaums 12
2.1.4 Keimung 14
2.1.5 Klima und Boden 15
2.1.6 Zucht und Vermehrung 15
2.1.7 Anbau, Düngung und Pflege 16
2.1.8 Krankheitserreger und Schädlinge 17
2.1.9 Ernte und Erträge 17
2.1.10 German Cocoa in Kamerun 18
2.2 Aufarbeitung und Verwertung von Kakao 19
2.2.1 Nacherntebehandlungen: Fermentation, Trocknung und Röstung 19
2.2.1.1 Fermentation 19
2.2.1.2 Trocknung, Transport und Lagerung 21
2.2.1.3 Röstung 22
2.2.2 Verwendung 22
2.2.3 Qualitätsmerkmale und Heterogenität des Rohkakaos 23
2.2.4 Wirtschaftliche Bedeutung 24
2.3 Inhaltsstoffe von Kakaosamen 25
2.3.1 γ-Aminobuttersäure (GABA) 25
2.3.2 Phenolische Substanzen 26
2.3.4 Polyphenoloxidase (PPO) 27
2.3.3 Methylxanthine (Theobromin und Coffein) 27
3 Material und Methoden 31
3.1 Beschreibung des verwendeten Pflanzenmaterials 31
3.1.1 Material der an der Universität Hamburg durchgeführten Keimungs- und fermentationsähnlichen Inkubationsversuche 31
3.1.2 Material der in Kamerun durchgeführten Keimungs- und Inkubationsversuche 32
3.1.2.1 Genotypen 32
3.1.2.2 German Cocoa 33
3.1.3 Probenmaterial für die Bestimmung des Wassergehaltes und die Wasseraufnahme 34

3.1.3.1 Früchte aus Trinidad 34
3.1.3.2 Früchte aus Kamerun 34
3.1.4 Probenlisten 35
3.1.5 Abbildungen der verwendeten Früchte 38
3.2 Fermentationsähnliche Inkubationsversuche 41
3.2.1 In Hamburg durchgeführte Inkubationsversuche 41
3.2.2 In Yaounde durchgeführte Inkubationsversuche 42
3.2.3 Abbildungen zur Durchführung der Inkubations- und Keimungsversuche: 43
3.3 Keimungsversuche 43
3.3.1 In Hamburg durchgeführte Keimungsversuche 44
3.3.2 In Yaounde durchgeführte Keimungsversuche 44
3.4 Wassergehalt und Wasseraufnahme 45
3.4.1 Bestimmung des Wassergehaltes von Kakaosamen 45
3.4.2 Bestimmung der Wasseraufnahme während der Keimung 45
3.5 Bestimmung des pH-Wertes 45
3.6 Entfetten und Herstellen von Acetontrockenpulver aus Kakaosamen 45
3.6.1 Entfetten der Proben 46
3.6.2 Herstellung von Acetontrockenpulver 46
3.7 Bestimmung der freien Aminosäuren mit Hilfe der HPLC 46
3.8 Bestimmung der Oligopeptide 49
3.9 Bestimmung des Proteingehaltes 50
3.9.1 Proteinbestimmung nach der Methode von BRADFORD 50
3.9.2 Charakterisierung einzelner Proteine mit Hilfe der Diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970) 51
3.10 Bestimmung der Polyphenol- und Anthocyangehalte 54
3.11 Bestimmung der Zuckergehalte 55
3.12 Bestimmung des Theobromin- und Coffeingehaltes 56
3.13 Bestimmung der Polyamine 57
3.14 Aktivität der Polyphenoloxidasen 59
3.15 Bestimmung der Proteaseaktivitäten 61
3.15.1 Extraktion und Aktivitätstest der Aspartylendoprotease 61
3.15.2 Extraktion und Aktivitätstest der Carboxypeptidase 62
3.15.3 Photometrische Vermessung der Proteaseaktivitäten 64
4 Ergebnisse 65
4.1 Keimungsverläufe 65
4.1.1 Entwicklung der Samen während der frühen Keimung 65

4.1.2 Wasseraufnahme, Wassergehalt und pH-Wert von Kakaosamen 70
4.1.2.1 Wasseraufnahme 70
4.1.2.2 Wassergehalt 74
4.1.2.3 pH-Wert 75
4.1.2.4 Zusammenfassung 75
4.1.3 Gehalt der Samen an Proteinen, Oligopeptiden und freien Aminosäuren im Verlauf der Keimung 76
4.1.3.1 Proteine 76
4.1.3.2 Oligopeptide 80
4.1.3.3 Freie Aminosäuren 85
4.1.3.4 γ-Aminobuttersäure 93
4.1.3.5 Zusammenfassung 96
4.1.4 Veränderung der Konzentration an phenolischen Substanzen in Kakaosamen im Verlauf der Keimung 98
4.1.4.1 Epicatechin 98
4.1.4.2 Catechin 100
4.1.4.3 Anthocyane 103
4.1.4.4 Zusammenfassung 107
4.1.5 Veränderung der Zuckergehalte im Verlauf der Keimung 108
4.1.5.1 Saccharose 108
4.1.5.2 Fructose 110
4.1.5.3 Glucose 112
4.1.5.4 Zusammenfassung 114
4.1.6 Veränderung des Gehaltes an Methylxanthinen (Theobromin und Coffein) im Verlauf der Keimung 115
4.1.6.1 Theobromin 115
4.1.6.2 Coffein 117
4.1.6.3 Zusammenfassung 119
4.1.7 Veränderung des Gehaltes an Polyaminen im Verlauf der Keimung 120
4.1.7.1 Putrescin 120
4.1.7.2 Spermidin 122
4.1.7.3 Spermin 124
4.1.7.4 Cadaverin 127
4.1.7.5 Zusammenfassung 127
4.1.8 Polyphenoloxidaseaktivität während der Keimung 128
4.1.8.1 Polyphenoloxidaseaktivität in Kakaosamen 128
4.1.8.2 Polyphenoloxidaseaktivität in der Sämlingsachse 133
4.1.8.3 Polyphenoloxidaseaktivität in unterschiedlichen Geweben von Kakaosamen 135

4.1.8.4 Zusammenfassung ... 137
4.1.9 Aktivität der Proteasen während der Keimung ... 139
4.1.9.1 Aspartylendoproteaseaktivität ... 139
4.1.9.2 Carboxypeptidaseaktivität ... 141
4.1.9.3 Zusammenfassung ... 143
4.2 Reaktionen der Samen im Verlauf fermentationsähnlicher Inkubationen ... 144
4.2.1 Wassergehalt, Gewicht und Schnitttest der inkubierten und getrockneten Samen ... 144
4.2.1.1 Wassergehalt in unterschiedlich lang inkubierten und an der Sonne getrockneten Samen ... 144
4.2.1.2 Frisch- und Trockengewicht unterschiedlicher für die Inkubationen verwendeter Samen ... 146
4.2.1.3 Schnitttest von unterschiedliche lang inkubierten und getrockneten Samen ... 147
4.2.2 Wasseraufnahme und pH-Wert von Kakaosamen im Verlauf der Inkubation ... 150
4.2.2.1 Wasseraufnahme ... 150
4.2.2.2 pH-Wert ... 150
4.2.2.3 Zusammenfassung ... 153
4.2.3 Gehalt der Samen an Proteinen, Oligopeptiden und freien Aminosäuren im Verlauf der Inkubation ... 155
4.2.3.1 Proteine ... 155
4.2.3.2 Oligopeptide ... 158
4.2.3.3 Freie Aminosäuren ... 163
4.2.3.4 γ-Aminobuttersäure ... 175
4.2.3.5 Zusammenfassung ... 181
4.2.4 Veränderung der Konzentration an phenolischen Substanzen in Kakaosamen im Verlauf einer fermentationsähnlichen Inkubation ... 183
4.2.4.1 Epicatechin ... 183
4.2.4.2 Catechin ... 187
4.2.4.3 Anthocyane ... 190
4.2.4.4 Inkubationsmedien im Verlauf der Inkubation ... 193
4.2.4.5 Zusammenfassung ... 194
4.2.5 Veränderung der Zuckergehalte im Verlauf der Inkubation ... 195
4.2.5.1 Saccharose ... 195
4.2.5.2 Fructose ... 197
4.2.5.3 Glucose ... 199
4.2.5.4 Zusammenfassung ... 201
4.2.6 Veränderung des Gehaltes an Methylxanthinen (Theobromin und Coffein) im Verlauf der Inkubation ... 202
4.2.6.1 Theobromin ... 202
4.2.6.2 Coffein ... 204

4.2.6.3 Zusammenfassung 207
4.2.7 Veränderung des Gehaltes an Polyaminen im Verlauf der Inkubation 208
4.2.7.1 Putrescin 208
4.2.7.2 Spermidin 210
4.2.7.3 Spermin 212
4.2.7.4 Cadaverin 214
4.2.7.5 Zusammenfassung 214
4.2.8 Polyphenoloxidaseaktivität während der Inkubation 215
4.2.8.1 Polyphenoloxidaseaktivität in Kakaosamen 215
4.2.8.2 Zusammenfassung 217
4.2.9 Aktivität der Proteasen im Verlauf der Inkubation 219
4.2.9.1 Aspartylendoproteaseaktivität 219
4.2.9.2 Carboxypeptidaseaktivität 220
4.2.9.3 Zusammenfassung 222
4.3 Charakteristische Unterschiede zwischen Keimung und Inkubation 223
4.3.1 Vorbemerkung 223
4.3.2 Wasseraufnahme und pH-Wert in Kakaosamen während der frühen Keimung und der Inkubation 223
4.3.2.1 Wasseraufnahme 223
4.3.2.2 pH-Wert 224
4.3.3 Gehalt an Proteinen, Oligopeptiden und freien Aminosäuren im Verlauf der frühen Keimung und der Inkubation 225
4.3.3.1 Proteine 225
4.3.3.2 Oligopeptide 227
4.3.3.3 Freie Aminosäuren 228
4.3.3.4 γ-Aminobuttersäure 231
4.3.4 Phenolische Substanzen 233
4.3.5 Zuckergehalt 235
4.3.6 Methylxanthine (Theobromin und Coffein) 237
4.3.7 Polyamine 238
4.3.8 Polyphenoloxidase 239
4.3.9 Proteasen 240
4.3.10 Tabellarische Übersicht des Vergleichs von Keimung und Inkubation 242
5 Diskussion 243
5.1 Keimung und fermentationsähnliche Inkubationen von Kakaosamen 243
5.1.1 Wassergehalt, Wasseraufnahme und Keimung 243
5.1.2 Ansäuerung 246

5.2 Proteinabbau 248
5.2.1 Abbau der Speicherproteine 248
5.2.2 Protaseaktivität 252
5.2.3 Oligopeptide 254
5.2.4 Freie Aminosäuren 255
5.2.5 γ-Aminobuttersäure 258
5.3 Polyphenole und Polyphenoloxidaseaktivität 262
5.3.1 Polyphenole 262
5.3.2 Polyphenoloxidase 265
5.3.3 German Cocoa 267
5.4 Zucker 268
5.5 Methylxanthine (Theobromin und Coffein) 270
5.6 Polyamine 271
6 Zusammenfassung 274
7 Verzeichnisse 277
7.1 Literaturverzeichnis 277
7.2 Abbildungsverzeichnis 287
7.3 Tabellenverzeichnis 296
7.4 Abkürzungsverzeichnis 298
8 Danksagung 300
9 Anhang 301

1 Einleitung

Die tropische Nutzpflanze *Theobroma cacao* L. speichert in ihren rekalcitranten Samen Fette (ca. 50 %), Proteine (10-16 %) und Kohlenhydrate (7-11 %, BELITZ *et al.*, 2007; FRANKE, 1994; LIEBEREI und REISDORFF, 2007). Zusätzlich liegt ein außerordentlich hoher Gehalt an phenolischen Verbindungen (12-18 %, KIM und KEENEY, 1984) vor. Während der Keimung werden die Reserveproteine offensichtlich schon sehr früh abgebaut. Bereits im ungekeimten, reifen Samen ist eine hohe proteolytische Aktivität zu finden. Untersuchungen von BIEHL *et al*. (1982) zeigen, dass die im Kakao vorhandene Endoprotease und die Exoprotease in der Lage sind, die Speicherproteine in vitro abzubauen. Während der Keimung findet ein signifikanter Abbau der während der Sämlingsentwicklung in den Proteinvakuolen der Speichergewebe eingelagerten Speicherproteine statt.

Dieselben Prozesse, die während der frühen Keimung zum Abbau der Speicherstoffe, speziell der Proteine, führen, lassen auch die Vorstufen für das Kakaoaroma (Precursors) während der Fermentation entstehen.

Zur Bildung des kakaotypischen Aromas ist die Fermentation der Samen von erheblicher Bedeutung. Die Ziele der Fermentation sind die Entfernung der Pulpa, die Konservierung der Samen durch Gerbung und Trocknung, die Reduktion von Bitterstoffen und vor allem die Bildung der Vorstufen des kakaotypischen Aromas. Die Optimierung der Fermentation ist für die Qualität des Rohkakaos von maßgeblicher Bedeutung, da schlecht fermentierte Samen während der Röstung nur wenig oder kein Aroma entwickeln.

Da der Fermentationsprozess je nach der genetischen Herkunft des Kakaobaumes, nach Land- und Klimabedingungen, der Nährstoffverfügbarkeit während des Wachstums und der Fruchtreife, den Bedingungen bei der Ernte und den verwendeten Fermentations- und Trocknungsmethoden sehr unterschiedlich verläuft, variiert die Qualität des Rohkakaos sehr stark. Die Kakaosamen können daher sehr verschieden weit fermentiert sein. Die heute an die Kakaoaufarbeitung gestellten qualitativen Anforderungen beinhalten z.B. eine weitgehende Erhaltung der gesundheitsförderlichen Polyphenole, die bei den Standardaufarbeitungsbedingungen bislang stets starken Oxidationsschritten unterworfen waren.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Beurteilung des Keimungsprozesses und der Entwicklungen während der frühen Fermentation in den Samen der tropischen Nutzpflanze Kakao unter Berücksichtigung einer Gruppe biochemischer und enzymatischer Indikatoren. Die physiologischen Veränderungen, die im Verlauf der Keimung auftreten, wurden mit den physiologischen Veränderungen, die im Verlauf einer unter fermentationsähnlichen Bedingungen durchgeführten Inkubation auftreten, verglichen. Anhand dieser biochemischen und enzymatischen Indikatoren wurde ein Merkmalskomplex erstellt, der die natürliche Keimlingsentwicklung und den Ablauf in der frühen Fermentationsphase erfasst. Dieser Merkmalskomplex kann zum Verständnis der gemeinsamen bzw. unterschiedlichen Abläufe von Keimung und Fermentation beigetragen.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Analysen zur Bestimmung der biochemischen und enzymatischen Indikatoren durchgeführt:

- Die Beurteilung der proteolytischen Aktivität erfolgte anhand des Abbaus der Speicherproteine während der Keimung und der Fermentation. Durch die gezielte Aktivität der Proteasen werden zuerst die Speicherproteine des Samens im Bereich der hydrophoben

Aminosäuren hydrolytisch gespalten, so dass Oligopeptide mit hydrophoben Enden entstehen (BIEHL und VOIGT, 1995). Anschließend werden die hydrophoben Aminosäuren von den Enden der Oligopeptide abgespalten. Anhand der Analyse der freien Aminosäuren, der Oligopeptide und des Proteingehaltes lässt sich der Abbau der Speicherproteine beschreiben. Zur genaueren Untersuchung des Proteinabbaus im Verlauf der Inkubation und der Keimung erfolgte die Messung der Aktivität der beiden an der Proteolyse beteiligten Enzyme, der Aspartylendoprotease und der Carboxypeptidase.

- In unfermentierten Kakaosamen werden Polyphenole in den Vakuolen der Polyphenolspeicherzellen im Mesophyll der Kotyledonen und vakuolär gespeichert. Polyphenolspeicherzellen stellen 10 bis 12 % des Mesophylls der Kotyledonen dar (BIEHL, 1973). Während der Fermentation werden nach der Zerstörung der subzellulären Kompartimentierung die Polyphenole frei. In unfermentierten Samen stellen Polyphenole 12-18 % des Trockengewichtes dar (KIM und KEENEY, 1984). Der Epicatechinanteil beträgt etwa 35 % des Polyphenolgesamtgehaltes in frischen Kakaosamen. Epicatechin und Catechin verursachen einen adstringierenden und sich früh während der Fermentation entwickelnden bitteren Geschmack. Während der Trocknung wird die Adstringenz durch enzymatisch induzierte Oxidation der Flavonoide und die folgende Polymerisation reduziert (ZIEGLEDER und BIEHL, 1988). In der vorliegenden Arbeit wurde die Veränderung der phenolischen Inhaltsstoffe, die sowohl während des Keimungsprozesses als auch während der Fermentation auftritt, erfasst, da phenolische Inhaltsstoffe als chemisch reaktive Komponenten offensichtlich einem geregelten Metabolismus unterliegen, zu dem bislang wenig bekannt ist.

- Die enzymatische Oxidation der Polyphenole erfolgt durch die Polyphenoloxidasen (PPO). Hierbei handelt es sich um kupferhaltige Enzyme des Sekundärstoffwechsels, die die Oxidation von Polyphenolen zu Chinonen unter Reduktion von molekularem Sauerstoff katalysieren. In intakten Zellen werden die Polyphenole getrennt von der PPO in den Vakuolen der Polyphenolspeicherzellen gelagert. Die PPO kann somit erst nach der Aufhebung der Zellkompartimentierung mit den Polyphenolen reagieren. Die Oxidation phenolischer Substanzen durch die PPO dient in pflanzlichen Geweben der Abwehr von Schädlingen, dem Wundverschluss und der Verschlechterung der Nahrungsnutzung für Herbivore. Während der Fermentation der Kakaosamen besteht die wichtigste Funktion der PPO in der Reduktion des bitteren Geschmacks und der Adstringenz durch die Oxidation der Polyphenole. Die PPO ist an den kakaotypischen Bräunungsreaktionen beteiligt. Daher wurde die Aktivität der PPO als ein Indikator für die fortschreitende Keimung und die Fermentation untersucht.

- Kakaosamen sind auch durch einen hohen Gehalt an den Methylxanthinen (Theobromin und Coffein) gekennzeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit sich der Gehalt an den Methylxanthinen Theobromin und Coffein während der Keimung und im Verlauf der Fermentation verändert.

- Bei der γ-Aminobuttersäure handelt es sich um eine nichtproteinogene Aminosäure, welche unter anderem während der Keimung gebildet wird. In frischen, unfermentierten Kakaosamen ist der γ-Aminobuttersäuregehalt sehr gering. Da es sowohl während der Keimung als auch während der frühen Fermentation zu einem Anstieg der γ-Aminobuttersäure kommt, wurde diese als wichtiger Indikator für die Keimung und die Fermentation untersucht.

- Bei Polyaminen handelt es sich um biogene Amine, welche durch Decarboxylierung von Aminosäuren entstehen. Bislang konnte ihnen noch keine eindeutige Funktion zugewiesen werden. Es gibt jedoch zahlreiche Indizien dafür, dass sie an Prozessen wie Zellteilung und Differenzierung beteiligt sind. Daher wurde untersucht, ob der Polyamingehalt als Indikator für die Entwicklung während der frühen Keimung, bzw. während der fortschreitenden Fermentation dienen kann.

Neben den grundsätzlichen Informationen zum Keimungsstoffwechsel der Kakaosamen können die durch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse potentiell der Bestimmung und Beeinflussung des Fermentationsgrades von Kakaosamen dienen.

Tabelle 1: Gegenüberstellung von Keimung und Inkubation/ Fermentation

Keimung	Inkubation/ Fermentation
• endogene Steuerung • Beginn beim Auslegen der Samen • Stoffaustausch mit der Umwelt • Zeitlicher Ablauf: - Wasseraufnahme - Zellwachstum - Mobilisierung der Reservestoffe • Einflüsse: - Keimungsinhibitor in der Pulpa verhindert Keimung in der Frucht - Klima - Feuchtigkeit	• exogene Einflüsse • zu Inkubationsbeginn liegen Keimungsbedingungen vor • Frage: ab wann ist die Keimphase durch exogene Einflüsse beendet? • Zeitlicher Ablauf: - Absterben der Samen durch einen Temperaturanstieg und eindringende Essigsäure - Aufhebung der Zellkompartimentierung - Abbau der Reservestoffe • Einflüsse: - verwendeter Genotyp - Land und Klimabedingungen - Nährstoffverfügbarkeit beim Fruchtwachstum - Reifegrad der Früchte bei der Ernte - Dauer der Fermentation - Fermentations- und Trocknungsmethoden • Ziele der Fermentation: - Entfernung der Pulpa - Konservierung der Samen - Reduktion der Adstringenz und Bitterstoffe - Bildung von Nebenaromen (aus der Pulpa) - Bildung der Aromavorstufen

2 Hintergrund

2.1 Der Kakaobaum (Theobroma cacao L).

2.1.1 Systematik und Varietäten

Der Kakaobaum *Theobroma cacao* L. wird heute der Familie der Malvaceae zugeordnet. Die Gattung *Theobroma* läßt sich nach CUATRECASAS (1964) in 22 Arten unterteilen, welche ursprünglich alle aus dem tropischen Mittel- und Südamerika stammen (FRANKE, 1994). Von ihnen werden in Zentralamerika *Theobroma bicolor* Humb. et Bonpl. („Pataste“) und *Theobroma angustifolium* Moç. et Sessé ex DC. („Cacao de mono“) und in Brasilien *Theobroma grandiflorum* (Spreng.) K. Schum. („Cupuassu“) angebaut (REHM und ESPIG, 1991). Eine wirtschaftliche Bedeutung hat bisher allerdings nur *Theobroma cacao* L.

Traditionell wurde Kakao nach CUATRECASAS (1964) in zwei Subspezies unterteilt: *T. cacao* L. ssp. *cacao* Cuatr. und *T. cacao* L. ssp. *sphaerocarpum* (Chevalier) Cuatr. Zur Subspezies *cacao* wurden alle Criollos und zur Subspezies *sphaerocarpum* alle übrigen Genotypen gezählt.

Nach neueren molekularbiologischen Untersuchungen lassen sich dies Einteilungen aber nicht halten (MOTAMAYOR *et al.*, 2000). Heute erfolgt die Einteilung nach morphogenetischen, geographischen Großgruppen in Criollo- und Forastero-Kakao.

Criollo-Kakao:

Criollo-Kakaos werden derzeit noch in dem Gebiet von Zentralamerika bis Kolumbien angebaut. Sie weisen bei Reife eine rote oder gelbe Färbung der Früchte und eine raue, höckerige, mit 10 Längsfurchen durchteilte Oberfläche sowie eine relativ dünne und weiche Fruchtschale auf. Eine Criollo-Frucht enthält etwa 20 bis 40 Samen. Diese sind relativ groß und durch eine abgerundete Form gekennzeichnet. Die Kotyledonen besitzen eine weiße oder hellviolette Färbung, welche während der Fermentation hellbraun wird. Criollo-Kakaos besitzen ein sehr starkes Aroma, allerdings ist der Ernteertrag relativ gering.

Der Criollo-Kakao wird in zwei Gruppen unterteilt: mittel- und südamerikanischer Criollo-Kakao. Es wird vermutet, dass der südamerikanische Criollo-Kakao aus dem mittelamerikanischen Criollo-Kakao entstanden ist (WOOD und LASS, 1989).

Forastero-Kakao:

Forastero-Kakaos stammen aus der oberen und unteren Amazonasregion (Upper Amazon Forastero (UAF) und Lower Amazon Forastero (LAF), „Amelonados“). Sie haben weniger stark gefurchte Früchte als die Criollo-Kakaos. Teilweise weisen sie sogar eine fast glatte Oberfläche und eine fast runde Form auf. Die Fruchtschale ist fest und hart. Eine Forastero-Frucht enthält etwa 30 bis 60 eher kleine und flache Samen. Die Früchte sind meist gelb bis grüngelb gefärbt und besitzen dunkelrote bis violette Kotyledonen, welche sich im Verlauf der Fermentation braun färben. Forastero-Kakaos sind relativ resistent gegenüber Schädlingen und Krankheiten und werden daher weitaus häufiger als Criollo-Kakaos angebaut. Bei etwa 80 % der angebauten

Kakaobäume handelt es sich um Forastero-Kakaos, hierbei handelt es sich vor allem um Amelonados (REHM und ESPIG, 1991). Forastero-Kakaos haben zudem einen sehr hohen Ernteertrag. Das Aroma ist aber, verglichen mit Criollo-Kakaos, eher gering.

Die Gruppe des Forastero-Kakaos enthält kultivierte, halbwilde und wilde Populationen, von denen die Amelonados die größte Population darstellen. Desweiteren werden der Comum-Kakao, der West African Amelonado (WAA) und der Nacional-Kakao zu den Forastero-Kakaos gezählt (WOOD und LASS, 1989). Der in Ecuador beheimatete Nacional-Kakao ist vermutlich aus einer kleinen Gruppe des Upper Amazon Forasteros entstanden. Er wird jedoch häufig aufgrund seines besonders fruchtigen Aromas („Arriba“) den Criollo-Kakaos zugeordnet.

Trinitario-Kakao:

Trinitario-Kakaos stammen aus der Mündungsregion des Orinocos und aus Trinidad. Sie werden den Forastero-Kakaos zugeordnet, sind aber aus Kreuzungen von Forastero-Kakaos und Criollo-Kakaos entstanden. Trinitario-Kakaos sind in Bezug auf ihre morphologischen und physiologischen Eigenschaften sehr unterschiedlich. Ihre Fruchtschale ist meist fest und die Färbung ihrer Kotyledonen kann sehr stark variieren. Sie enthalten jedoch selten weiße Kotyledonen (WOOD und LASS, 1989).

2.1.2 Verbreitung

Das Ursprungsgebiet des Kakaobaumes liegt wahrscheinlich in den Wäldern des oberen Amazonas und Orinokos. Er wurde ursprünglich von den Mayas, vor allem in Mittelamerika, domestiziert. Das Wort Kakao stammt aus der Sprache der Maya und wird von dem Wort Cacahuatl (Kakaowasser) abgeleitet (LIEBEREI und REISDORFF, 2007). Die Mayas züchteten aus der Wildform den Criollo-Kakao, welcher einen besonders hohen Gehalt an Coffein (2 %) enthält (LIEBEREI und REISDORFF, 2007). Im Gegensatz dazu sammelten die Indianer im Amazonasgebiet vor allem die Früchte wildwachsender Bäume, von denen sie hauptsächlich das Fruchtfleisch verwerteten. Daher enthalten die Samen des Forastero-Kakaos deutlich weniger aromagebende Substanzen als die Samen des Criollo-Kakaos.

Bei den Mayas in Mittelamerika besaß Kakao große Bedeutung. Fermentierte Kakaosamen wurden von ihnen bei spirituellen Ritualen und teilweise bis 1840 als Währung verwendet.

Durch die Spanier kam Kakao nach Europa, wo er ab dem 17. Jahrhundert vermehrt konsumiert wurde. Mit steigendem Kakaokonsum wurden weltweit immer mehr Kakaopflanzungen angelegt. Nach Mittel- und Südamerika wurde Kakao zunächst auf den Karibischen Inseln, in Indonesien, auf Neuguinea, auf den Philippinen, in Sri Lanka und ab dem 19. Jahrhundert auch in Afrika angebaut.

Bis in die Mitte des 18. Jahrhunderts dominierte auf dem Weltmarkt der Anbau von Criollo-Kakaos. Dies änderte sich allerdings in den folgenden 70 Jahren. Heute wird überwiegend Forastero-Kakao angebaut (WOOD und LASS, 1989).

Heute wird der Kakaobaum weltweit in den feuchten Tropen angebaut. Seine Hauptanbaugebiete liegen zwischen dem 8° nördlicher und südlicher Breite (FRANKE 1994). Sein nördlichstes

Anbaugebiet liegt in Hainan (China, etwa 20°N) und sein südlichstes bei Sao Paulo in Brasilien (etwa 24°S). Der Kakaobaum wächst im schattigen Unterholz im humiden tropischen Regenwald.

2.1.3 Allgemeine Biologie des Kakaobaums

Theobroma cacao ist ein kleiner, in den feuchten Tropen wachsender Baum. Wildwachsend wird er bis zu 20 m hoch, in Kultur dagegen nur 4 bis 8 m (FRANKE, 1994).

Der Kakaobaum ist im Boden mit einer 1 bis 2 m langen Pfahlwurzel verankert. Seitenwurzeln werden überwiegend in den oberen 30 cm der Pfahlwurzel gebildet. Sie sind 5 bis 6 m lang und dringen bis in die aus Mulch und Blättern bestehenden oberen Bodenschichten vor (FRANKE, 1994).

Nach der Keimung wächst der Stamm in den ersten 14 bis 18 Monaten orthotrop bis auf eine Höhe von 1 bis 1,5 m heran, bevor sich die Terminalknospe in drei bis fünf Meristeme teilt, aus denen drei bis fünf plagiotrope Seitentriebe, welche fan-branches genannt werden, hervorgehen. Bei dieser Vergabelungsform spricht man von einer Jorquette. Das weitere Höhenwachstum erfolgt durch orthotrope Triebe, welche Chupons genannt werden, von denen einer direkt unterhalb der Jorquette aus einer axillaren Seitenknospe entsteht, so dass wieder ein orthtropes Sprossstück gebildet wird. Bei wildwachsenden, ungeschnittenen Bäumen werden auf diese Art drei bis vier stockwerkartig angeordnete Verzweigungen gebildet. In Plantagen werden die orthotrop wachsenden Sprosse entfernt, so dass nur eine Verzweigungsetage ausgebildet wird und die Bäume niedrig bleiben (LIEBEREI und REISDORFF, 2007).

Aufrecht wachsende Triebe weisen eine spiralige, Seitentriebe eine in der Horizontalebene liegende, zweizeilig wechselständige Blattstellung auf. Die gestielten Blätter des Kakaobaumes sind immergrün und etwa 15 bis 50 cm lang und 5 bis 15 cm breit. Sie haben eine breite bis ovale Form und sind zugespitzt. Junge Blätter weisen eine rötlich-gelbe Färbung auf und sind noch nicht zu einer vollen Photosyntheseleistung fähig. Sie benötigen daher Assimilate der ausgewachsenen, grünen Blätter. Zwischen einer hohen Blattmasse und der damit verbundenen hohen Photosyntheserate und einem hohen Ernteertrag besteht eine direkte Verbindung (BALASIMHA *et al.*, 1985). Je Trieb werden pro Jahr etwa drei bis sechs Blätter gebildet. Diese Wachstumszyklen erfolgen ebenso wie das Blühen periodisch und sind eng mit der Verfügbarkeit von Wasser und Nährstoffen sowie mit der Temperatur verbunden. Bei Trockenheit und in kühlen Perioden ist das Blühen reduziert oder unterbleibt völlig (ALVIM, 1984).

Die etwa 1 cm großen Blüten werden büschelweise das ganze Jahr über gebildet. Sie entstehen entweder stammbürtig (Cauliflorie) oder seltener an den Zweigen (Ramiflorie) aus den in den Blattachseln angeordneten Nebenknospen an 2 bis 3 Jahre altem Holz. Die kurzstieligen Blüten bestehen aus fünf rosa oder weißlich gefärbten Kelchblättern, fünf weiß bis gelblichen, kapuzenförmig gestalteten Kronblättern und zehn am Grunde der Blüten zu einer Röhre verwachsenen Staubblättern. Fünf dieser Staubblätter sind steril (Staminodien) und diese ragen aus den Blüten heraus. Die anderen fünf Staubblätter sind fertil (Stamina) und in den kapuzenförmigen Hohlräumen der Blütenblätter versteckt. Der Fruchtknoten ist oberständig und aus fünf Karpellen synkarp verwachsen. Er weist in jedem seiner Fruchtfächer auf einer zentralen Plazenta zwei Reihen von Samenanlagen auf. Insgesamt können etwa 20 bis 60 Samen gebildet werden. Da die Staubblätter von den Kronblättern umhüllt sind, ist eine Selbstbefruchtung nicht

möglich. Die Befruchtung erfolgt durch kleine Insekten, besonders durch Mücken der Gattung Forcipomyia, aber auch durch Ameisen und andere kleine Insekten (FRANKE, 1994). Da die natürliche Befruchtungsrate niedrig ist, kann durch Handbestäubung ein höherer Fruchtansatz erreicht werden. Die Blüten öffnen sich während der Nacht, so dass sie am nächsten Morgen bestäubt werden können. Die höchste natürliche Befruchtungsrate kann zwischen 6 und 10 Uhr beobachtet werden (YOUNG, 1986). Starkes Fruchtwachstum verhindert eine weitere Blüten- und Fruchtbildung, so dass die Ernte selbst unter optimalen klimatischen Bedingungen nicht über das ganze Jahr erfolgt, sondern sich auf eine bis zwei Perioden im Jahr konzentriert (REHM und ESPIG, 1991).

Viele Kakaogenotypen weisen eine Selbststerilität auf. Selbststerile Bäume sind obligate Fremdbefruchter, sie benötigen einen geeigneten Pollenspender zur Befruchtung. Bei den meisten selbststerilen Pflanzen beruht die Selbststerilität auf der Verhinderung der Ausbildung des Pollenschlauches (WOOD und LASS, 1989). Beim Kakao dagegen beruht die Selbstinkompatibilität auf der Abstoßung des männlichen Gameten durch die weibliche Eizelle, wenn beide dasselbe Inkompatibilitätsallel aufweisen, so dass keine Fusion des Gameten mit der Eizelle stattfindet (COPE, 1962). Selbststerile Kakaobäume sind vor allem bei den Trinitario-Kakaos zu finden. Diese können häufig nur durch selbstfruchtbare Genotypen befruchtet werden. Die aus dem oberen Amazonsgebiet (Upper Amazon) stammenden Genotypen sind ebenfalls selbststeril, sie können sich aber, im Gegensatz zu den Trinitario-Kakaos, gegenseitig befruchten. Selbstbefruchtbare Genotypen sind Forastero-Kakaos des unteren Amazonas (Amelonados), Criollo-Kakaos und einige Trinitaro-Kakaos (WOOD und LASS, 1989).

Zunächst entwickelt sich nach der Befruchtung das Endosperm, welches von dem später wachsenden Embryo konsumiert wird. 40 bis 50 Tage nach der Befruchtung setzt die Entwicklung der Eizelle ein. Innerhalb der ersten 100 Tage nach der Befruchtung stellen viele Früchte das Wachstum ein. Sie verfärben sich zunächst gelb und dann schwarz, schrumpfen ein, fallen aber nicht ab. Diese Fruchtausdünnung wird neben Pilzerkrankungen und Insektenschäden vor allem durch physiologische Vorgänge, z.B. der Nährstoffkonkurenz mit älteren Früchten oder dem Mangel an Wuchsstoffen (Cherellewelke) (SEESCHAAF, 1971), verursacht. Die Fruchtbildungskapazität ist somit sowohl von der Wasserversorgung und dem Nährstoff-, besonders dem Kohlenhydratniveau, als auch von dem Verhältnis von Fruchtansatz zu Cherellewelke und der Konkurrenz zwischen Fruchtentwicklung und den endogenen Wachstumsregulatoren abhängig.

Bei den Früchten handelt es sich um 15 bis 30 cm lange, elliptisch-eiförmige, kurzgestielte Trockenbeeren. Je nach Genotyp variieren sie sehr erheblich in ihrer Größe, ihrer Farbe und ihrer Form. Ihre Färbung ist je nach Reifestadium und Varietät grün, gelb, rot, purpur oder braun. Die feste, faserige Fruchtschale wird aus dem Exokarp unter Beteiligung des Mesokarps gebildet. Das saftige, weiße Fruchtfleisch, die Pulpa, geht aus dem Endokarp und den inneren Teilen des Mesokarps hervor. Gegen Ende der Reife nimmt der Gehalt an Zucker und Säuren in der Pulpa zu und der Gehalt an Pektin nimmt ab (HUMPHRIERS, 1943). Unreife Früchte sind durch die Scheidewände des ursprünglich septierten Fruchtknotens im Inneren fünffächrig. Während der Reifung verschleimen die Scheidewände jedoch vollständig, so dass die in Pulpa eingebetteten Samen in einer einzigen Fruchthöhle liegen. Die Früchte enthalten meist zwischen 20 und 40 um eine Zentralspindel angeordnete, 1,5 bis 2,5 cm lange, zumeist lilafarbige Samen. Diese bestehen

aus zwei stark ineinander gefalteten Keimblättern (Kotyledonen) und der Embryoachse. Umgeben werden sie von einer mit dem Endokarpteil der Pulpa verwachsenen Testa. Fünf bis sieben Monate nach der Blüte sind die Samen reif. Bei Kakaosamen handelt es sich um recalcitrante Samen, d.h. Samen, die ohne Samenruhe keimen. In unbeschädigten Früchten wird die Keimung jedoch durch Keimungsinhibitoren, welche in der Pulpa zu finden sind, verhindert (HOLDEN, 1959).

Das ganze Jahr über sind Früchte in allen Reifestadien am Baum zu finden. Da zumeist zweimal im Jahr eine stärkere Blütenbildung auftritt, kommt es im Allgemeinen zu einer Haupt- und einer Nebenernte. Reife Früchte bleiben am Baum hängen und lassen sich oft nicht einmal optisch von unreifen Früchten unterscheiden.

Die wesentlichen Inhaltsstoffe der getrockneten Kakaosamen sind 40 bis 65 % Fett (Kakaobutter), 13 bis 16 % Rohproteine, 0,9 bis 2,3 % Theobromin und 0,05 bis 0,36 % Coffein (FRANKE, 1994).

Die Speicherfette sind in Lipidvakuolen und die Speicherproteine in Aleuronvakuolen der Mesophyllzellen lokalisiert (BIEHL, 1973). Die Proteine der reifen Kakaosamen setzen sich zu 90 % aus Globulinen und Albuminen zusammen (VOIGT *et al*., 1993), wobei das Albumin 25-30 % des Gesamtproteins ausmacht. Desweiteren befinden sich Idioblasten im Mesophyll, in deren Vakuolen Polyphenole (Catechine, Anthocyane und Procyanidine) gespeichert werden. Diese Polyphenolspeicherzellen stellen 10 bis 12 % des Mesophylls der Kotyledonen dar (BIEHL, 2007). Den Polyphenolen konnte in manchen Fällen eine gesundheitsförderliche Wirkung nachgewiesen werden.

Die anregende Wirkung des Kakaos beruht auf Theobromin, einem dem Coffein nahe verwandten Alkaloid, und Coffein (LIEBEREI und REISDORFF, 2007). Auch die Samenschale des Kakaos, welche für Teeaufgüsse genutzt wird, enthält Theobromin (0,8 %).

Außerdem enthält Kakao hohe Mengen der Aminosäure Phenylalanin, von der sich β-Phenylethylamin (1-5 mg/kg Rohkakao) ableitet, welches euphorisierend wirken soll (LIEBEREI und REISDORFF, 2007).

2.1.4 Keimung

Da es sich bei Kakaosamen um rekalcitrante Samen handelt, sollten sie möglichst schnell nach der Ernte zum Keimen gebracht werden. In reif geernteten, ungeöffneten Früchten bleiben Kakaosamen drei bis vier Wochen keimfähig (WOOD und LASS, 1989). Die Pulpa enthält einen Keimungsinhibitor, so dass die Keimung in der Frucht verhindert wird. In Früchten, welche nach der Reife weiter am Baum verbleiben, trocknet die Pulpa aus und die Samen beginnen schon in der Frucht zu keimen. Kakaosamen keimen epigäisch.

In der ersten Phase der Keimung wächst die Keimwurzel (Radicula) und das Hypokotyl hebt die Keimblätter (Kotyledonen) etwa 3 cm über die Erde.

In der zweiten Phase der Entwicklung öffnen sich die Kotyledonen, die Plumula wird freigelegt und es bilden sich die ersten vier Blätter, welche nur sehr kurze Internodien haben und daher auf derselben Ebene liegen.

Das folgende Wachstum erfolgt in Intervallen von ungefähr sechs Wochen mit spiralig angeordneten Blättern, welche in jeder Achsel eine Knospe haben. Das vertikale Wachstum setzt sich bis zum Erreichen von etwa 1 bis 2 m Höhe fort. An diesem Punkt beginnt die dritte Wachstumsphase, in welcher das vertikale Wachstum aufhört und am terminalen Ende des Sprosses fünf Knospen mit sehr kurzen Internodien simultan horizontal zu wachsen beginnen (NIEMENAK *et al.*, 2009).

2.1.5 Klima und Boden

Gute Standortverhältnisse findet der Kakaobaum vor allem im Bereich des immergrünen und halbimmergrünen tropischen Regenwaldes bis zu einer Höhenlage von 300 m (FRANKE, 1994). Darüber gibt es nur vereinzelte Anbaugebiete. Die Hauptanbaugebiete liegen hierbei bis zum 8. Breitengrad beiderseits des Äquators. Ein Anbau bis zum 20. nördlichen (Kuba, China) und 20. südlichen Breitengrad ist möglich.

Da der Kakaobaum empfindlich gegenüber Trockenheit und Kälte ist, wächst er am besten in Gebieten, in welchen die Niederschlagsmengen höchstens 3 Monate lang unter jeweils 100 mm liegen und die Temperaturen mindestens 18 bis 20°C und höchstens 30 bis 32°C betragen. Temperaturen unter 10°C führen zu Schäden. Optimale Niederschlagsbedingungen liegen bei möglichst gleichmäßig verteilten Niederschlägen von 1500 bis 2500 mm pro Jahr. Längere Trockenperioden, trockene Luft und Wind verursachen vorzeitigen Blattfall und Windbruch (FRANKE, 1994).

Der Kakaobaum stellt hohe Ansprüche an den Boden. Dieser sollte eine gute Wasser- und Luftführung aufweisen, nährstoffreich sein und ausreichend organische Substanz enthalten. Die Ausbildung der Pfahlwurzel darf nicht durch Störschichten behindert werden.

2.1.6 Zucht und Vermehrung

Ziele der Zucht sind gegen Krankheiten resistente Pflanzen mit früh auftretenden Blütenansätzen und hohen Erträgen und einer Anpassung an die lokalen Klima- und Wachstumsbedingungen. Viele für diese Zuchtziele verwendete Gene stammen von Forastero-Kakaos aus der oberen Amazonasregion (Upper Amazon). Der Nachteil einiger Forasterogenotypen ist, dass sie selbststeril sind. Diese Selbststerilität muss entweder durch vegetative Vermehrung bzw. durch Rückkreuzung eliminiert werden, oder aber ein gemischter Anbau mit selbstfruchtbaren Genotypen ist notwendig. Andererseits ist diese Selbststerilität hilfreich zur Produktion von neuen Hybridsorten mit geeigneten Partnern (REHM und ESPIG, 1991).

Bei der Vermehrung des Kakaobaumes ist die Gewinnung von einheitlichem Pflanzenmaterial, welches zu guten Wuchs- und Ertragseigenschaften führt, von großer Bedeutung, da der Kakaobaum ausgesprochen heterozygot ist. Die Vermehrung erfolgt sowohl auf generativem Weg über Samen, als auch auf vegetativem Weg über Stecklingsvermehrung oder Veredelung, wobei die Vermehrung über Samen die kostengünstigere ist.

Die Gewinnung von einheitlichem Samenmaterial kann zum einen über den gemeinsamen Anbau von zwei selbststerilen, vegetativ vermehrten Klonen erfolgen (im Verhältnis 1:1) oder über die

Anpflanzung nur eines selbststerilen Klons und eines weiteren Klons als Pollenspender (im Verhältnis 5:1). Bei dem zweiten Verfahren kann das Saatgut nur aus den Früchten des selbststerilen Klons gewonnen werden (FRANKE, 1994). Die Samen sollten spätestens zehn Tage nach der Ernte ausgesät werden, da die Keimfähigkeit in der reifen Frucht höchstens drei Wochen erhalten bleibt. Durch die Lagerung der Samen in pulverisierter Holzkohle mit 30 %iger Feuchtigkeit und gutem Luftzutritt kann die Keimfähigkeit mehrere Wochen erhalten bleiben. Grundsätzlich sind jedoch zu starke Austrocknung und Pilzbefall die größten Gefahren bei der Lagerung von Kakaosaatgut.

Die Steckingsvermehrung kann aus orthotropen und aus plagiotropen Trieben erfolgen. Allerdings bildet jede Triebform nur gleichartige Triebe. Aufrechte Triebe führen zu einstämmigen Bäumen und die Seitenzweige führen zu buschartigen Wuchsformen. Die buschartige Wuchsform erleichtert die Erntearbeit und führt zu höheren Erträgen. Bei der Stecklingsvermehrung durch plagiotrope Triebe ist jedoch durch einen starken Schnitt die Entwicklung von orthotropen Trieben möglich (FRANKE, 1994). Zur Herstellung von Stecklingen werden frisch gewachsene, voll entwickelte Triebe, deren Blätter gerade hart geworden sind, von ausgewählten Mutterbäumen verwendet. Von diesen Mutterpflanzen können im zweiten und dritten Jahr 20 bis 30 und im vierten bis fünften Jahr 40 bis 50 Stecklinge gewonnen werden. Danach verringert sich die Anzahl der Stecklinge. Die Schwierigkeit der Stecklingsvermehrung liegt häufig in der Bewurzelung, die bei den einzelnen Sorten sehr unterschiedlich sein kann.

Veredelungen (Okulationen) können sowohl bei alten als auch bei jungen Bäumen erfolgen. Junge Bäume werden häufig nach einem Jahr veredelt, wenn ihr Durchmesser 1 bis 3 cm beträgt. Die Veredelung findet bei diesen jungen Pflanzen zumeist durch Pfropfen auf das Hypokotyl statt, da sich am Hypokotyl keine Knospenanlagen befinden und die Unterlage daher nicht austreiben kann.

2.1.7 Anbau, Düngung und Pflege

Beim Kakaobaum handelt es sich um einen Baum der unteren bis mittleren Baumkronenschicht des Regenwaldes. Er kommt mit geringen Lichtmengen aus und wird deswegen meist im Halbschatten großer Bäume oder unter eigens dafür angepflanzten Pflanzen wie Bananenstauden, Kokospalmen und Papayas kultiviert. Aber auch Manihot, Mais und strauchartige Leguminosen eignen sich für die frühe Beschattung des jungen Kakaobaumes. Aufgrund des raschen Wachstums dieser Pflanzen ist eine schnelle Beschattung möglich. Die Beschattungspflanzen können jedoch auch zu einer Konkurrenz um Wasser und Nährstoffe mit den jungen Kakaobäumen führen. Das optimale Maß der Beschattung hängt von der durchschnittlichen jährlichen Bewölkung, der Höhenlage, den Niederschlägen, der Luftfeuchtigkeit und dem Intensitätsgrad des Anbaus ab. Die Ertragsleistung ist bei geringerer Beschattung höher, da die generative Phase bei weniger Beschattung gefördert wird (FRANKE, 1994). Gleichzeitig sind die Kakaobäume aber stärker den äußeren Einflüssen wie Wasserstress, Nährstoffmangel und Wind ausgesetzt, wodurch es zu einer schnelleren Erschöpfung kommt.

Der Anbauabstand von Kakaobäumen hängt vom Boden, den Klimaverhältnissen und von den Varietäten ab. Wichtig ist, dass genügend Raum für die Entwicklung des Wurzelsystems und der Baumkrone vorhanden ist. Der Kronendurchmesser kann zwischen 2,5 und 6 m betragen. In

ausgewachsenen Beständen sollte das Kronendach geschlossen sein. Günstig sind rund 1100 bis 1900 Bäume je Hektar (FRANKE, 1994). Dies entspricht einem Pflanzabstand von 3,0 m x 3,0 m bis 2,3 m x 2,3 m. In Monokulturen ist die Pflanzdichte oft deutlich höher.

Je nach Anbaugebiet ist eine Düngung mit Mineraldünger zur Ertragssteigerung erforderlich. Vor allem in nicht beschatteten Kulturen ist eine Düngung notwendig, da die Kakaobäume sonst häufig vorzeitig absterben. Gedüngte und nichtgedüngte Plantagen unterscheiden sich teilweise sehr stark in ihren Erträgen.

Als Pflegemaßnahme ist die Unkrautbekämpfung in Kakaoplantagen, vor allem in der Zeit vor dem Schließen des Blätterdachs, von maßgeblicher Bedeutung für die späteren Erträge.

Zur Regulierung der Wuchsformen der Kakaobäume werden in vielen Plantagen Schnittmaßnahmen durchgeführt. Diese dienen vor allem der Erleichterung der Ernte.

2.1.8 Krankheitserreger und Schädlinge

Durch Schaderreger und Unkräuter gehen weltweit vermutlich bis zu 40 % der potentiellen Ernte verloren. In Westafrika dominieren Schäden durch die Sproßschwellkrankheit (Swollen Shoot Syntom), in Zentral- und Südmerika durch die Hexenbesenkrankheit (Witches' broom disease), die durch den hochspezialisierten Pilz *Moniliophthora perniciosa* verursacht wird und in Asien durch die javanische Kakaomotte (Cocoa Pod Borer, *Conopomorpha cramerella*).

Ist eine Plantage mit der Sproßschwellkrankheit befallen, die durch das Sproßschwellvirus (cocoa swollen shoot virus, CSSV) ausgelöst wird, müssen die betroffenden Bäume sofort gerodet werden. Das Virus bewirkt eine Aufhellung der Blattadern und eine Mosaikscheckung der Blätter sowie Schwellungen an den Ästen, Zweigen und Wurzeln der infizierten Pflanzen. Diese Erkrankung führt zunächst zu starken Ernteverlusten und später zum Absterben der Bäume.

Pilzerkrankungen lassen sich durch Auslichten und die damit verbundene bessere Durchlüftung der Plantagen und durch das Entfernen der befallenen Pflanzenteile bekämpfen.

Bei der durch einen Pilz ausgelösten Phytophthora-Braunfäule (Black pod disease) handelt es sich um ein weltweit auftretendes Problem im Kakaoanbau. Hervorgerufen wird diese Braunfäule durch unterschiedliche *Phytophthora*-Spezies. Der Befall ist anhand von braunen, sich ausbreitenden Flecken auf den Früchten zu erkennen. Einige *Phytophthora*-Spezies können zusätzlich noch einen Rindenkrebs auslösen und die Knospen- und Blütenpolster zerstören (FRANKE, 1994).

Weitere Schädlinge sind die Kakaowanzen (Arten der Gattung *Sahlbergella*), welche an noch grünen Kakaotrieben und Früchten saugen. Auch dies kann zu erheblichen Ertragsverlusten führen.

2.1.9 Ernte und Erträge

Kakaofrüchte benötigen abhängig vom Klima 5 bis 8 Monate von der Blüte bis zur Reife. Reife Früchte lassen sich ansatzweise anhand ihrer Färbung erkennen. Wichtig ist, dass die Früchte nicht zu früh geerntet werden, da die Pulpa in unreifen Früchten noch nicht ausreichend Zucker

für eine gute Fermentation enthält. Auch zu spät sollten die Früchte nicht geerntet werden, da die Pulpa in überreifen Früchten austrocknet und die Samen zu keimen beginnen. Die Früchte werden mit scharfen Messern geerntet, wobei darauf zu achten ist, dass das Blütenpolster nicht beschädigt wird. Etwa 20 Früchte ergeben 1 kg Rohkakao.

Etwa im dritten Jahr nach der Pflanzung beginnen Kakaobäume, die ersten Erträge zu bringen. Volle Erträge werden je nach verwendeten Genotypen etwa 5 bis 12 Jahre nach der Pflanzung erreicht. Bei traditionellem Anbau stehen die Bäume durchschnittlich 30 Jahre (FRANKE, 1994), wobei am Ende nur noch geringe Erträge erreicht werden. Die Schwierigkeit von Neupflanzungen ist die einnahmelose Zeit, die der Farmer z.B. durch Zwischenkulturen überbrücken muss.

Der Ertrag einer Plantage hängt von unterschiedlichen Faktoren, wie dem Alter der Bäume, der Varietät, dem Pflanzabstand der Bäume und der Düngung ab. Da im traditionellen Anbau relativ wenig Aufwand für die Pflege der Plantagen betrieben wird, sondern der Hauptaufwand in die Ernte und die Aufarbeitung des Kakaos geht, sind die Erträge auf diesen Farmen eher gering.

Die flächenbezogenen Kakaoerträge schwanken sehr stark. Im Weltmittel lag der Hektar-Ertrag im Jahr 2005 bei 560 kg (LIEBEREI und REISDORFF, 2007).

Kleinbauern erwirtschaften zum Teil nur 200 kg/ha Kakao (DAND, 1993), wohingegen in gut geführten Plantagen bei der Verwendung von Hochleistungsklonen wesentlich höhere Erträge bis über 2500 kg/ha Kakao erreicht werden können.

Ertragssteigerungen im traditionellen Kakaoanbau sollen erreicht werden durch die Einführung von ertragreicheren und krankheitsresistenteren Sorten, moderne Anbaumethoden, betriebsübergreifende Schädlings- und Krankheitsbekämpfung, den Einsatz von Düngemitteln und die Aufbereitung (Fermentation und Trocknung) in Gemeinschaftsanlagen, wodurch auch die Qualität des Rohkakaos steigen soll.

2.1.10 German Cocoa in Kamerun

In Kamerun wird Kakao verstärkt seit den 1960er Jahren angebaut. Heute werden etwa 400.000 Hektar Kakao angebaut, welche von 200.000 Bauern betrieben werden (EFOMBAGN *et al.*, 2006). Zumeist handelt es sich dabei um sehr kleine Familienfarmen. Im Durchschnitt sind die Kakaoplantagen etwa 6,5 ha groß und pro Hektar werden im Durchschnitt 1.200 Bäume angepflanzt (PAULIN *et al.*, 2003). Die Erträge belaufen sich hierbei auf etwa 120.000 Tonnen Kakao jährlich. Bei einem Großteil der Plantagen handelt es sich um sehr alte Plantagen. 40 % der Kakaoplantagen in Südkamerun wurden vor 1960 gepflanzt. Ihre meist nur noch sehr geringen Erträge variieren zwischen 150 bis 300 kg Rohkakao pro Hektar.

Es wird vermutet, dass es sich bei einem Großteil der in Kamerun angepflanzten Kakaobäume (ca. 80 %, PAULIN *et al.*, 2003) um traditionelle Varietäten handelt, den sogenannten German Cocoa. Bei diesem handelt es sich um natürliche Hybridisierungen zwischen Trinitario- und Amelonado-Genotypen. Dies waren die ersten Populationen, die ursprünglich von Deutschen nach Kamerun gebracht wurden. Man geht davon aus, dass es sich um Varietäten einer relativ geringen Anzahl von Hybriden handelt (EFOMBAGN *et al.*, 2006). Viele Bauern bevorzugen bei Neupflanzungen diesen German Cocoa aufgrund seiner gleichmäßig verlaufenden Ernte, seiner Langlebigkeit und seiner geringeren Anfälligkeit gegenüber Braunfäulen (*Phytophthora megakarya*, PAULIN *et al.*,

2003). Die neu gezüchteten Kakaosorten und Hybride weisen zwar einen wesentlich höheren Ertrag auf als die lokalen German Cocoa-Bäume, die Bauern kritisieren jedoch deren höhere Anfälligkeit gegenüber Braunfäule und deren kürzere Lebensdauer. Aus diesem Grund verläuft der Austausch der traditionellen Varietäten gegen Neuzüchtungen in Kamerun langsam.

German Cocoa-Samen zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Anthocyanen aus, wodurch sie im Verlauf der Fermentation ausgesprochen rot erscheinen. Sie werden daher auch als „roter Kakao“ bezeichnet.

2.2 Aufarbeitung und Verwertung von Kakao

2.2.1 Nacherntebehandlungen: Fermentation, Trocknung und Röstung

2.2.1.1 Fermentation

Nach der Ernte werden die Kakaosamen zusammen mit der sie umgebenden Pulpa aus den Früchten entnommen und in einem Nachernteverfahren einer Fermentation unterzogen. Die Fermentation dient der Entfernung der Pulpa, der Verminderung der im frischen Samen enthaltenen Bitterstoffe und vor allem der Bildung von Vorstufen des kakaotypischen Aromas. Außerdem werden die leicht verderblichen Kakaosamen durch die Fermentation lager- und transportfähig gemacht.

Die Fermentation verläuft je nach verwendetem Genotyp, den Klimabedingungen und der Fermentationsmethode sehr unterschiedlich, so dass die Qualität des Rohkakaos stark variieren kann.

Die Methoden der Fermentation variieren von Land zu Land. Zumeist wird entweder eine Haufen- oder eine Kastenfermentation durchgeführt. Kastenfermentationen werden vor allem auf Trinidad, in vielen lateinamerikanischen Ländern und in Indonesien durchgeführt, Haufenfermentationen vor allem in westafrikanischen Ländern. Kastenfermentationen werden hauptsächlich von größeren Farmen, Haufenfermentationen überwiegend von Kleinbauern durchgeführt. Sowohl bei der Kasten- als auch bei der Haufenfermentationen werden zumeist Bananenblätter zum Abdecken verwendet, um die bei der Fermentation entstehende Wärme zu halten.

Die Fermentation findet je nach verwendetem Material und Land über einen Zeitraum von 2 bis 6 Tagen statt. Besonders kurz werden Criollo- und Nacional-Kakaos fermentiert (2 bis 3 Tage). Forastero- und Trinitario-Kakaos dagegen werden länger fermentiert (3 bis 7 Tage).

Die Fermentation beginnt mit der mikrobiellen Umsetzung der Pulpa (BIEHL und ADOMAKO, 1983). Durch ihren hohen Gehalt an Pektin, Citronensäure und Zuckern liegen ideale Bedingungen für den mikrobiellen Abbau vor. Die Pulpa ist zunächst steril, wird aber schnell durch Fruchtfliegen mit Mikroorganismen, wie Hefen und Milchsäurebakterien kontaminiert.

Die erste Phase der Fermentation verläuft anaerob. In dieser Phase findet vor allem ein Abbau der Pulpa durch Hefen statt. Es konnten 16 Hefearten in Kakaofermentationen nachgewiesen werden (WOOD und LASS, 1989). Die Hefe wandelt einen Großteil des in der Pulpa enthaltenden Zuckers in Ethanol und Kohlendioxid um und metabolisiert die Citronensäure der Pulpa. Durch die Abnahme des Citronensäuregehaltes steigt der pH-Wert der Fermentationsmasse bei

gleichzeitigem Anstieg der Temperatur an. Dieses Milieu ist optimal für Milchsäurebakterien, welche Glucose in Milchsäure umwandeln.

Kurz nach Beginn des Fermentationsprozesses werden die Zellen der Pulpa durch enzymatischen Abbau mittels pflanzeneigener und mikrobieller Enzyme zerstört. Die Pulpa wird flüssig und fließt ab. Dieser Prozess ist meist 24 bis 36 Stunden nach Fermentationsbeginn abgeschlossen.

Die zweite Phase der Fermentation verläuft aerob. Nach dem Abbau der Pulpa kann Sauerstoff in die Fermentationsmasse eindiffundieren. Dieser wird fast vollständig zur Oxidation des Ethanols zu Essigsäure durch Essigsäurebakterien verbraucht. Durch diese chemische Reaktion entsteht Wärme; die Temperatur in den luftzugänglichen Schichten steigt nach den ersten 48 Stunden auf 40 bis 45°C an. Anschließend werden schnell, vor allem nach dem Umrühren der Fermentationsmasse, Temperaturen um 50°C erreicht. Zum Ende der Fermentation hin nimmt die Temperatur wieder leicht ab (BIEHL und ADOMAKO, 1983).

In der ersten Phase der Fermentation durchlaufen die Samen eine keimungsähnliche Phase, in welcher keimungstypische Veränderungen wie die Zunahme des γ-Aminobuttersäuregehaltes zu beobachten sind.

Das Eindringen von Essigsäure in die Samen und der Anstieg der Temperatur in der zweiten Phase – meist am zweiten Tag der Fermentation - führen zum Absterben der Samen. Nach 5-tägiger Fermentation kann ein Gehalt von etwa 15 mg Essigsäure und 1 bis 2 mg Milchsäure pro Samen nachgewiesen werden (COCOA ATLAS, 2002).

Durch das Eindringen der Essigsäure und den Temperaturanstieg werden die Biomembranen in den Zellen zerstört, die Kompartimentierungen aufgehoben und das Gewebe wird auf einen pH-Wert von 4,0 – 4,5 angesäuert (BIEHL, 1973). Die Fette und Öle, welche in Lipidtröpfchen gespeichert werden, fusionieren zu einer großen lipophilen Phase. Durch die Auflösung der Idioblasten schwemmen die darin gespeicherten phenolischen Substanzen, darunter die Anthocyane, aus. Dies führt zu der violetten Färbung der zuvor schiefrigen Kotyledonen. Zum Ende der Fermentation hin, nach dem Abbau der Pulpa, steigt der pH-Wert in den Samen wieder an auf optimal 5,0 bis 5,3 (BIEHL und ADOMAKO, 1983).

In dem saurem pH-Bereich liegt das Optimum der sameneigenen Proteasen. Dadurch kommt es zu einem verstärkten Proteinabbau während der Fermentation. Kakaosamen enthalten zwei Proteasen: die Aspartylendoprotease und die Carboxypeptidase.

Die Aspartylendoprotease hat ein pH-Optimum von 3,4 und ist bei einer Temperatur von 50 – 55°C noch relativ stabil. Sie spaltet die Speicherproteine des Samens hydrolytisch im Bereich der hydrophoben Aminosäuren, so dass Oligopeptide mit hydrophoben Enden entstehen (BIEHL *et a.*, 1995).

Anschließend spaltet die Carboxypeptidase, welche ein pH-Optimum von 5,8 hat, die Aminosäuren von den hydrophoben Oligopeptiden ab. Die Carboxypeptidase spaltet keine Proteine, sondern benötigt proteolytisch gebildete Peptide als Substrat.

Zum Ende der Fermentation hin kommt es zur Oxidation der Polyphenole. Bei diesem durch die Polyphenoloxidase katalysierten Prozess entstehen durch Vergerbung der Proteine polymere Bräunungsprodukte. Durch diesen Prozess wird ein Großteil der Polyphenole in unlösliche Verbindungen überführt.

Der Verlauf der Fermentation wird durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst. Ein wichtiger Faktor ist der Reifegrad der Früchte bei der Ernte. Vor allem Kleinbauern ernten ihre Früchte in relativ großen zeitlichen Abständen, um genug Material für einen Fermentationsansatz zu bekommen. Dies führt dazu, dass sowohl überreife als auch unreife Früchte zur Fermentation verwendet werden. In unreifen Früchten ist die Pulpa noch nicht vollständig entwickelt und in überreifen Früchten trocknet die Pulpa aus und die Samen beginnen schon in der Frucht zu keimen. In beiden Fällen verläuft die Fermentation nicht optimal, so dass die Qualität des Kakaos negativ beeinflusst wird.

Ein weiterer Faktor, welcher den Verlauf der Fermentation beeinflusst, ist die Menge der Pulpa, welche pro Samen vorhanden ist (WOOD und LASS, 1989). Dieser Faktor wird sowohl durch den verwendeten Genotypen als auch durch die klimatischen Verhältnisse am Anbauort bedingt. Ein hoher Pulpagehalt beschränkt den Gasaustausch und kann durch den höheren Zuckergehalt zu einem höheren Gehalt an Essigsäure führen (CARR *et al.*, 1981). Desweiteren wird die Fermentation durch die Jahreszeit, die Zeit zwischen Ernte und Fruchtöffnung, die Dauer der Fermentation und die Häufigkeit des Umschichtens der Fermentationsmasse beeinflusst. Auch die zur Fermentation verwendete Kakaomenge spielt eine wichtige Rolle. Sie sollte nicht unter 70 kg liegen (ROHAN, 1958), etwa 90 kg gelten als Richtwert. Ist die Fermentationsmenge klein, so muss sie gut gegen einen Wärmeverlust geschützt werden.

Das Stadium der Fermentation ist an der Färbung der Kakaosamen zu erkennen. Hierfür werden diese in der Längsrichtung durchgeschnitten. Gut fermentierte Kakaosamen weisen eine ausgeprägte Struktur und eine braune Farbe auf. Nichtfermentierte Samen haben dagegen eine wachsartige, harte Konsistenz und eine schiefrige Färbung. Unterfermentierte Samen erscheinen violett (COCOA ATLAS, 2002). Unfermentierte und wenig fermentierte Kakaosamen führen zu einer minderen Aromaqualität des Kakaos.

Die Optimierung der Fermentation ist für die Qualität des Rohkakaos von maßgeblicher Bedeutung, da schlecht fermentierte Samen während der Röstung kein oder nur wenig Aroma entwickeln.

2.2.1.2 Trocknung, Transport und Lagerung

Die Konservierung der Samen erfolgt durch Trocknung auf einen Wassergehalt von 5 bis 8 %.

Die Trocknung ist wichtig für die Entwicklung des Kakaoaromas und für die Qualität des Rohkakaos. Verläuft die Trocknung sehr langsam, besteht die Gefahr der Schimmelbildung. Verläuft die Trocknung zu schnell, besteht die Gefahr, dass die notwendigen oxidativen Veränderungen nicht abgeschlossen werden können und übermäßig hohe Säuregehalte in den Samen verbleiben. Es hat sich herausgestellt, dass Sonnentrocknung zu einem geringeren Gehalt an Säuren in den Samen führt als andere Arten der Trocknung (WOOD und LASS, 1989). Dies lässt sich durch die oft wesentlich höheren Temperaturen erklären, die bei anderen Trocknungsarten verwendet werden. Zu hohe Temperaturen während der Trocknung führen neben einem erhöhten Säuregehalt auch zu einer stärkeren Adstringenz der Samen. Die Trocknungstemperatur sollte daher 65 bis 70°C nicht überschreiten (JACQUET *et al.*, 1980).

Die fermentierten Kakaosamen werden während der Trockenzeit zumeist im Freien in der Sonne auf Bastmatten oder Plastikplanen getrocknet. In manchen Gegenden gibt es spezielle

Trocknungstische, über die bei Bedarf, zum Beispiel bei Regen oder bei zu starker Sonneneinstrahlung, ein fahrbares Dach geschoben werden kann. Die Trocknung darf nicht zu schnell erfolgen, da sonst der allmähliche Abschluss der Fermentation unterbrochen wird, so dass die enzymatische Oxidation nicht abgeschlossen werden kann. Die Trocknungsdauer beträgt ungefähr 7 Tage.

Während der Regenzeit findet die Trocknung häufig in Heißluftöfen statt. Dies kann allerdings durch den Rauch zu einem unerwünschten Beigeschmack führen.

Da die Lagerung von getrocknetem Rohkakao in tropischen Ländern wegen der Gefahr von Schimmelbildung und Schädlingsbefall schwierig ist, schließt sich zumeist nach der Trocknung ein schneller Transport in das Verbraucherland an. Der Transport erfolgt zumeist per Schiff in Säcken oder Containern, wobei auf die Regulation der Feuchtigkeit geachtet werden muss, um Schimmelbildung zu vermeiden. Dasselbe gilt für die anschließende Lagerung im Verbraucherland. Zumeist werden Jute- oder Sisalsäcken zur Lagerung verwendet, welche in der Lage sind, die Feuchtigkeit zu regulieren.

2.2.1.3 Röstung

Aus den Proteolyseprodukten (freie Aminosäuren, Oligopeptide) der Fermentation und den reduzierenden Zuckern entsteht beim Rösten im wasserarmen Zustand über Maillardreaktionen das kakaotypische Aroma. Der Röstprozess dauert 10 bis 45 Minuten bei 70 bis 140°C und findet im Verbraucherland statt. Während des Röstens löst sich die Samenschale, die sich dann gut von dem weiterzuverarbeitenden Material trennen lässt. Wegen des hohen Fettgehaltes (40 bis 65 %) entsteht beim Vermahlen der gerösteten und geschälten Kakaosamen ein zähflüssiger Brei. Das Vermahlen findet bei einer Temperatur von etwa 50°C statt. Die so gewonnene Kakaomasse wird zur Herstellung unterschiedlicher Produkte verwendet.

2.2.2 Verwendung

Die Kakaosamen werden zur weiteren Verarbeitung in Edel- und Konsumkakao und nach geographischer Herkunft eingeteilt. Sie liefern den Rohstoff zur Herstellung von Schokolade, Kakaopulver und Kakaobutter.

Zur Schokoladenherstellung werden der Kakaomasse Zucker, gegebenenfalls Trockenmilchpulver, Kakaobutter und Gewürze zugegeben. Diese Schokoladenmasse wird durch vielfaches Rühren und Walzen (Conchieren) homogenisiert, dann geformt und verpackt. Wichtig ist beim Kakao die einzigartige Zusammensetzung der Fette, die dazu führt, dass Schokolade bei 30°C noch fest ist und bei 35°C schmilzt (LIEBEREI und REISDORFF, 2007).

Für die Herstellung von Kakaopulver muss der Fettgehalt der Kakaomasse zunächst durch Pressen vermindert werden, da sich das Pulver sonst nicht trocknen lässt. Kakaopulver enthält nur 10 bis 24 % Kakaobutter. Durch ein Alkaliverfahren nach van Houten wird die Suspensionsfähigkeit des Kakaopulvers erhöht.

Bei der Kakaobutter handelt es sich um ein wertvolles Nebenprodukt, welches unter anderem in der pharmazeutischen Industrie verwendet wird.

Neben den Samen wird vor allem in Brasilien auch die Pulpa verwertet. Aus ihr werden zum Beispiel Fruchtmus und Süßigkeiten hergestellt. Die Fruchtschalen des Kakaos werden häufig auf den Plantagen kompostiert und als Dünger verwendet. Die Samenschalen werden teilweise als Tierfuttermittel, zur Extraktion von Theobromin und Coffein oder auch als Zusatz für Teeaufgüsse verwendet.

2.2.3 Qualitätsmerkmale und Heterogenität des Rohkakaos

Eine gute Fermentation und anschließende Trocknung sind ausschlaggebend für die Qualität des Rohkakaos, da schlecht fermentierte Samen während der Röstung kein oder nur wenig Aroma entwickeln. Wichtig ist hierbei der Gehalt an den Proteolyseprodukten (freie Aminosäuren, Oligopeptide) und den reduzierenden Zuckern, da aus ihnen das kakaotypische Aroma entsteht.

Zur Herstellung von Schokolade wird ein Rohprodukt mit konstant gutem Kakaoaroma benötigt. Das Kakaoaroma wird durch die Varietät des Kakaobaumes und die Aufarbeitungsmethode beeinflusst.

Es wird zwischen „Fine“ und „Bulk“ Kakao unterschieden. Diese Unterteilung hängt von dem Genotypen des Kakaobaumes ab. „Fine“ Kakaos werden von Criollo- oder Trinitario-Kakaos erzeugt. Criollo-Kakaos haben einen milden, nussigen Geschmack, Trinitario-Kakaos zeichnet ein volles Schokoladenaroma mit einer fruchtigen Note aus. „Fine“ Kakao wird unter anderem in Indonesien, Papua Neuginea, Samoa, Sri Lanka und Trinidad hergestellt. Ein weiterer „Fine“ Kakao ist der Nacional-Kakao aus Ecuador. Bei nur etwa 5 % der Weltproduktion an Kakao handelt es sich um diesen sogenannten „Fine“ Kakao (ICCO, 2007).

„Bulk“ Kakao ist die Bezeichnung für den übrigen Kakao. Er wird von Forastero-Kakaos wie Amelonados und weiteren Hybriden erzeugt. Ghana-Kakao galt lange als der beste „Bulk“ Kakao. Er hat eine konstant gute Qualität und eignet sich gut zur Herstellung von Milchschokolade. Dies ist das Ergebnis kontinuierlicher Inspektionsarbeit in Ghana, welche sicherstellt, dass die einzelnen Bauern gut fermentierten Kakao herstellen (WOOD und LASS, 1989).

Negativ wird das Kakaoaroma z.B. durch Schimmelbefall des Rohkakaos, durch Kontamination mit Rauch während der Trocknung, durch einen hohen Gehalt unterfermentierter Samen und durch einen hohen Säuregehalt beeinflusst.

Schimmelbefall kann zudem auch zu einem Anstieg des Gehaltes an freien Fettsäuren in der Kakaobutter führen (bis auf 20 %), welcher normalerweise sehr gering ist (weniger als 1 %) (OYENIRAN, 1979). Auch ein Pilzbefall der Frucht vor der Ernte, wie z.B. durch *Phytophthora*-Arten, kann zu einem höheren Gehalt an freien Fettsäuren führen.

Ein weiterer wichtiger Faktor zur Bestimmung der Qualität von Rohkakao ist die Reinheit des Kakaos. Die Hauptverunreinigung erfolgt durch den Gebrauch von Pestiziden. Aber auch Mikroorganismen, Insekten und andere Schadtiere, Schwermetalle und mineralische Öle können die Reinheit des Kakaos beeinträchtigen.

Physikalische Faktoren zur Bestimmung der Qualität von Rohkakao sind die Größe und Uniformität der Samen (zur besseren Verarbeitung), der Anteil an Testa und flachen Samen im Rohkakao und der Fettgehalt sowie die Härte des Fettes und der Anteil an freien Fettsäuren im

Fett. Desweiteren kann es von Bedeutung sein, ob es sich bei der Ernte des Kakaos um eine Haupt- oder Nebenernte handelt. Anhand der Größe der Samen lässt sich auch die Homogenetät der Ware bestimmen. Bei Untermischungen z.B. minderwertiger Ware variiert die durchschnittliche Samengröße stärker als bei unvermischter Ware (FOWLER, 1995). Auch der Wassergehalt ist wichtig, da ein niedriger Wassergehalt die Lagerfähigkeit verbessert.

Das Stadium der Fermentation kann anhand der Färbung der Kakaosamen beurteilt werden. Hierfür wird der sogenannte „Schnitt-Test“ durchgeführt. Bei diesem werden die Samen in der Längsrichtung durchgeschnitten und anhand ihrer Färbung den jeweiligen Fermentationsstadien zugeordnet. Unterfermentierte, schiefrig farbige Samen weisen ein sehr geringes Kakaoaroma auf und sind bitter und adstringierend.

Nach international gültigem Qualitätsstandard (ICS, International Cocoa Standard) wird Kakao unterschiedlichen Graduierungen zugeteilt. Rohkakao des Grades I darf bis zu 3 % schimmlige, bis zu 3 % schiefrige und bis zu 3 % beschädigte Samen (z.B. durch Insektenfraß beschädigte, gekeimte, flache oder anderweitig beschädigte Samen) enthalten. Rohkakao des Grades II darf bis zu 4 % schimmlige, bis zu 8 % schiefrige und bis zu 6 % beschädigte Samen enthalten (WOOD und LASS, 1989). Neben diesen Standards existieren in unterschiedlichen Ländern noch weitere Standards zur Bestimmung der Qualität von Rohkakao. Häufig werden auch Geruchs- und Geschmackstests hinzugezogen.

2.2.4 Wirtschaftliche Bedeutung

In den letzten zwei Jahrhunderten fand ein enormer Anstieg in der Kakaoproduktion statt. Wurden 1840 weltweit noch nur 14.000 Tonnen Kakao produziert, so wurden 2005 weltweit 3,9 Mio. Tonnen Rohkakao produziert (LIEBEREI und REISDORFF, 2007). Auch die Anteile der einzelnen Erzeugerländer bzw. der Erdteile an der Weltkakaoproduktion haben sich erheblich verändert. Wurde Kakao zu Beginn des 20. Jahrhunderts noch fast ausschließlich in Südamerika angebaut, so liegen die Haupterzeugerländer heute in Afrika und Asien.

Bis in die 70er Jahre des vorigen Jahrhunderts wurden noch über zwei Drittel des Kakaos in Afrika angebaut. Dies hat sich durch den starken Rückgang der Kakaoproduktion in Nigeria und Ghana geändert; 1997/98 wurden noch etwa 67 % des weltweit erzeugten Kakaos in Afrika angebaut (DAND, 1993). Die Hauptkakaolieferanten in Afrika sind die Elfenbeinküste mit 42 %, Ghana mit 14 %, Nigeria mit 6 % und Kamerun mit 5 % der weltweiten Kakaoproduktion.

In Indonesien und Malaysia werden 11 % bzw. 4 % des weltweit angebauten Kakaos produziert.

Brasilien gehört zu den ältesten Kakaoanbauländern. Ursprünglich wurden im Amazonasbecken die Früchte wildwachsender Bäume geerntet. Heute konzentriert sich der Kakaoanbau auf den Bundesstaat Bahia. Im Vergleich zu den afrikanischen Ländern verlief die Steigerung der Produktion in Brasilien relativ langsam. Brasilien liefert etwa 6 % des weltweit angebauten Kakaos (DAND, 1993). Ecuador liefert etwa halb soviel Kakao wie Brasilien; der Kakao ist aber wegen seiner guten Qualität auf dem Weltmarkt sehr gefragt.

Der Import von Kakao konzentriert sich weltweit auf wenige Länder (vor allem die USA, Deutschland und die Niederlande). Durch Überproduktion und Spekulation mit Kakao ist der Kakaomarkt instabil geworden (FRANKE, 1994).

Die aktuelle Zunahme des weltweiten Kakaoverbrauchs beruht vor allem auf der Ausdehnung des Kakaokonsums in Ländern, in denen bisher kein oder nur sehr wenig Kakao verzehrt wurde (z.B. China und Japan).

Weltweit werden nur wenige Kakaoanbauflächen von Großbetrieben geführt. Es dominieren familiäre Kleinbetriebe. In der Elfenbeinküste werden von 900.000 ha nur etwa 18.000 ha von Großbetrieben geführt (FRANKE, 1994). Dies liegt unter anderem an dem hohen Handarbeitsaufwand, den Schwierigkeiten bei der Einstellung und Ernährung von Arbeitskräften, den langen Wartezeiten von der Pflanzung bis zum Vollertrag und an den großen Preisschwankungen für Kakao auf dem Weltmarkt.

2.3 Inhaltsstoffe von Kakaosamen

Durchschnittlich enthalten fermentierte, getrocknete Kakaosamen etwa 53 % Fett, 12 % Proteine, 9 % Zellulose, 7,5 % Kohlenhydrate, 6 % phenolische Substanzen, 5 % Wasser, 2,6 % Mineralstoffe und Salze, 1,5 % organische Säuren, 2,1 % Theobromin, 1 % Zucker und 0,2 % Coffein (BELITZ *et al.*, 2007; FRANKE, 1994; LIEBEREI und REISDORFF, 2007). Weitere Inhaltsstoffe sind unter anderem freie Aminosäuren, Phenylethylamin und Anandamid.

2.3.1 γ-Aminobuttersäure (GABA)

Bei γ-Aminobuttersäure (GABA: γ-amino butyric acid) handelt es sich um eine nichtproteinogene Aminosäure, welche in Stresssituationen gebildet wird. GABA ist eine γ-Aminosäure, da sich die Aminogruppe am dritten Kohlenstoffatom nach dem Carboxy-Kohlenstoffatom befindet. Bei α-Aminosäuren (proteinogene Aminosäuren) befindet sich die Aminogruppe am ersten Kohlenstoffatom. Nach Untersuchungen von ROTZOLL *et al.* (2005) an Morcheln hat GABA einen bitteren Geschmack und kann für den bitteren Geschmack bei diesen Pilzen verantwortlich sein.

Die Bildung von GABA wird unter anderem durch Wasserstress, Ansäuerung des Cytosols, mechanische Schäden, Hitze, unter anaeroben Bedingungen und durch Phytohormone induziert, und zwar durch einen Anstieg des H^+- und des Ca^{2+}-Gehaltes im Cytosol (BOWN und SHELP, 1997).

GABA wird durch die Decarboxylierung von Glutaminsäure gebildet. Diese Reaktion wird von einem im Cytosol lokalisierten Enzym, der Glutamatdecarboxylase katalysiert. Die Glutamatdecarboxylase hat ihr pH-Optimum bei 5,8 (STREETER und THOMPSON, 1972; SHELP *et al.*, 1999). Der Abbau von γ-Aminobuttersäure erfolgt in den Mitochondrien durch reversible Transaminierung, bei der die Aminogruppe der γ-Aminobuttersäure auf Pyruvat übertragen wird, so dass Alanin entsteht (GABA + Pyruvat → Succinatsemialdehyd + Alanin).

BYTOF *et al.* (2005) haben einen durch Stresssituationen simulierten Anstieg des GABA-Gehaltes während der Fermentation und der Keimung von Kaffeesamen beobachtet. Auch in der ersten, keimungsähnlichen Phase der Fermentation von Kakaosamen wurde ein Anstieg des GABA-Gehaltes nachgewiesen (STOLL *et al.*, 2006).

Beim Menschen handelt es sich bei GABA um den wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter des zentralen Nervensystems. GABA hyperpolarisiert die neurale Membran durch Stimulation des Cl^--Einflusses durch die GABA-gesteuerten Cl^- Kanäle (BOWN und SHELP, 1997).

2.3.2 Phenolische Substanzen

Polyphenolische Substanzen kommen in allen Pflanzen vor. Sie stellen eine große und vielfältige Gruppe unter den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen mit mehr als 20.000 Verbindungen dar. Das gemeinsame Strukturmerkmal der phenolischen Substanzen ist, dass sie mindestens einen aromatischen C6-Ring besitzen, welcher mit einer oder mehreren OH-Gruppen ausgestattet ist.

Im Mesophyll der Kotyledonen der Kakaosamen lassen sich zwei Typen von Parenchymzellen unterscheiden. Die meisten (über 90 %) dieser Zellen sind klein und enthalten Protoplasma, Stärkekörner, Aleuronkörner und Fetttröpfchen. Zwischen diesen Zellen liegen die deutlich größeren Idioblasten, in welchen die phenolischen Substanzen gespeichert werden. Die phenolischen Substanzen befinden sich hierbei in den Zentralvakuolen der Idioblasten. Frische Samen enthalten 12 bis 18 % ihres Trockengewichtes an phenolischen Substanzen (KIM und KEENEY, 1984).

Die im Kakao enthaltenen phenolischen Substanzen gehören zur Gruppe der Flavonoide. Alle Flavanoide besitzen ein Flavan-Grundgerüst, welches zwei aromatische Ringe enthält (C_6-C_3-C_6-Struktur).

Die in den Kakaosamen enthaltenen Anthocyanidine, bei denen die π-Elektronensysteme der beiden aromatischen Ringe über den ungesättigten Heterozyklus miteinander konjugiert sind, absorbieren sichtbares Licht und erscheinen daher zartrosa bis tiefviolett. Die Anthocyanidine liegen im Kakaosamen als glycosylierte Anthocyane vor. Die Anthocyane stellen etwa 4 % des Gesamtphenolgehaltes (BELITZ *et al.*, 2007). Im Kakao kommen hauptsächlich die Anthocyane Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid vor.

Neben den Anthocyanen enthalten Kakaosamen noch weitere phenolische Substanzen, bei denen es sich unter anderem um monomere Flavan-3-ole handelt. Hierbei dominiert das (-)-Epicatechin, welches etwa 35 % des Polyphenolgesamtgehaltes ausmacht (KIM und KEENEY, 1984). Daneben kommt in Kakaosamen das (+)-Catechin vor, bei dem es sich um das diastereoisomere Gegenstück zum (-)-Epicatechin handelt. Epicatechin und Catechin kommen nicht ausschließlich als Monomere, sondern auch als Oligomere (Procyanidine) vor. Von besonderer Bedeutung sind die Flavan-3-ole und die Procyanidine aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung und den damit verbundenen gesundheitsfördernden Eigenschaften. Für Epicatechin konnte bewiesen werden, dass es nach der Aufnahme durch die Nahrung im Darm resorbiert werden kann (SCHRÖDER, 2002). Für die Oligomere des Epicatechins konnte dies noch nicht abschließend geklärt werden.

Die biologische Funktion von Flavan-3-olen und den Procyanidinen in der Kakaopflanze ist vermutlich ein Schutz gegen Herbivore, da sie im Falle einer Verletzung der Gewebe frei werden und in einer durch die Polyphenoloxidase katalysierten Reaktion zusammen mit den Proteinen kondensieren, so dass sie unlösliche Komplexe bilden, die Proteinverfügbarkeit der verzehrten Gewebe herabsetzen und zu einer Inaktivierung der Verdauungsenzyme führen. Eine weitere Funktion ist die Abwehr von Pilzbefall.

2.3.4 Polyphenoloxidase (PPO)

Die Polyphenoloxidasen (PPO) sind für Bräunungsrektionen in pflanzlichen Geweben verantwortliche Enzyme. Bei den PPOs handelt es sich um ubiquitäre, kupferhaltige Enzyme des Sekundärstoffwechsels. Sie katalysieren die Oxidation von Mono- und Diphenolen zu Chinonen unter Reduktion von molekularem Sauerstoff. Diese hoch reaktiven Chinone können untereinander oder mit den Amino- und Sulfhydrylgruppen von Proteinen und Enzymen reagieren. Es kommt zu Polymerisations- und Kondensationsreaktionen zwischen Proteinen und Phenolen, wobei braune Pigmente entstehen (GONZÁLEZ *et al.*, 1999).

In pflanzlichen Geweben sind die PPOs vor allem in der Thylakoidmembran der Chloroplasten lokalisiert (SULLIVAN *et al.*, 2004). In intakten Geweben werden die PPOs getrennt von den phenolischen Substanzen gespeichert. Bei Verletzung der Gewebe und dem damit verbundenen Verlust der Zellkompartimentierung können die PPOs mit den Polyphenolen reagieren.

Das pH-Optimum der PPO liegt mit 4-Methylcatechol als Substrat bei pH-Werten von 5,5 und 7,0 (HANSEN *et al.*, 1998). Im Kakaosamen können drei PPOs nachgewiesen werden (FRITZ *et al*., 1986).

2.3.3 Methylxanthine (Theobromin und Coffein)

Bei den im Kakao vorkommenden Xanthinen Theobromin und Coffein handelt es sich um Methylxanthine (Theobromin: 3,7-Dimethylxanthin; Coffein 1,3,7-Trimethylxanthin). Die Methylxanthine werden in den unfermentierten Kakaosamen in den Polyphenolspeicherzellen gelagert.

Theobromin kommt vor allem im Kakao, aber auch in Vertretern der Gattung der Kolabäume vor. Es hat eine ähnliche, aber deutlich schwächere Wirkung auf den menschlichen Organismus wie Coffein. Theobromin wirkt mild, dauerhaft anregend und stimmungsaufhellend. Theobromin kommt im Kakaosamen schwach an Tannin gebunden vor, wird während der Essigsäuregärung im Verlauf der Fermentation freigesetzt und wandert teilweise während der Trocknung an die Oberfläche der Kotyledonen, wo sich weiße Flecken (white spots) bilden (BENIZE *et al.*, 1972).

Coffein kommt vor allem im Kaffee, aber auch in über 60 anderen Pflanzen vor, wie z.B. im Teestrauch, in der Kolanuss und im Kakao. Beim Menschen wirkt es unter anderem anregend auf das Zentralnervensystem, erhöht die Herz- und Pulstätigkeit und den Blutdruck, hemmt die Rückresorption von Wasser aus dem Primärharn und verringert die Blutfließgeschwindigkeit im Gehirn und Darmbereich.

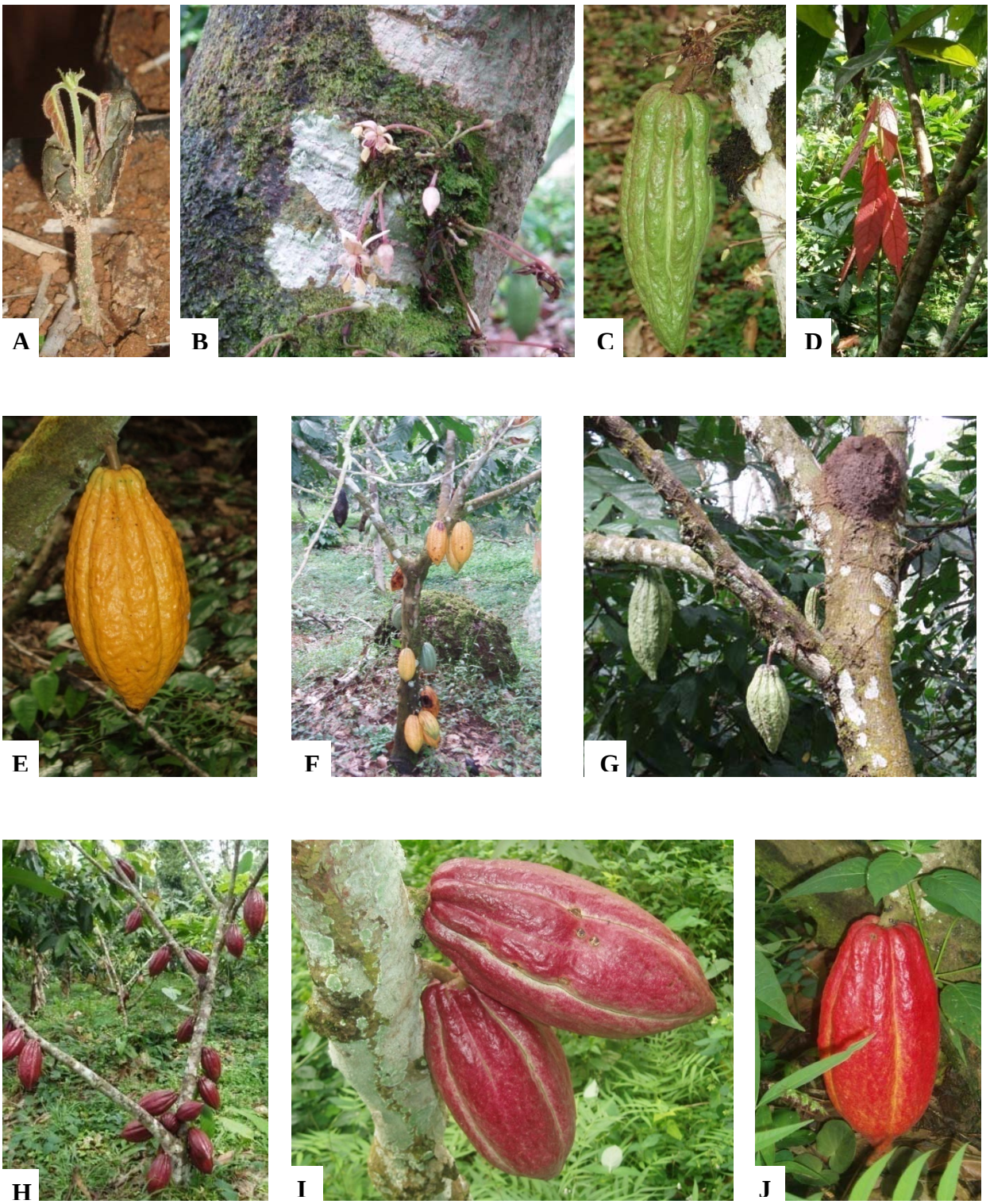


Abbildung 1: Früchte, Blüten und Kakaobäume.
A: Kakaokeimling, **B**: Blüten, **C**: junge Frucht, **D**: junger Trieb, **E-G**: Früchte und Kakaobäume des Genotypen T 79/501, **H-J**: Früchte des Genotypen SNK 13, **I**: unreif, **J**: reif



Abbildung 2: Kakaoplantage von SODECAO bei Akonolinga in Kamerun.
A-B: Kakaoaufzuchtauf, **C**: junge Kakaoplantage, **D**: alte Kakaoplantage, **E-G**: Kakaofrüchte, **E**: ICS 40, **F**: SNK 13, **G**: T 79/501, **H**: Trocknung fermentierter Kakaosamen

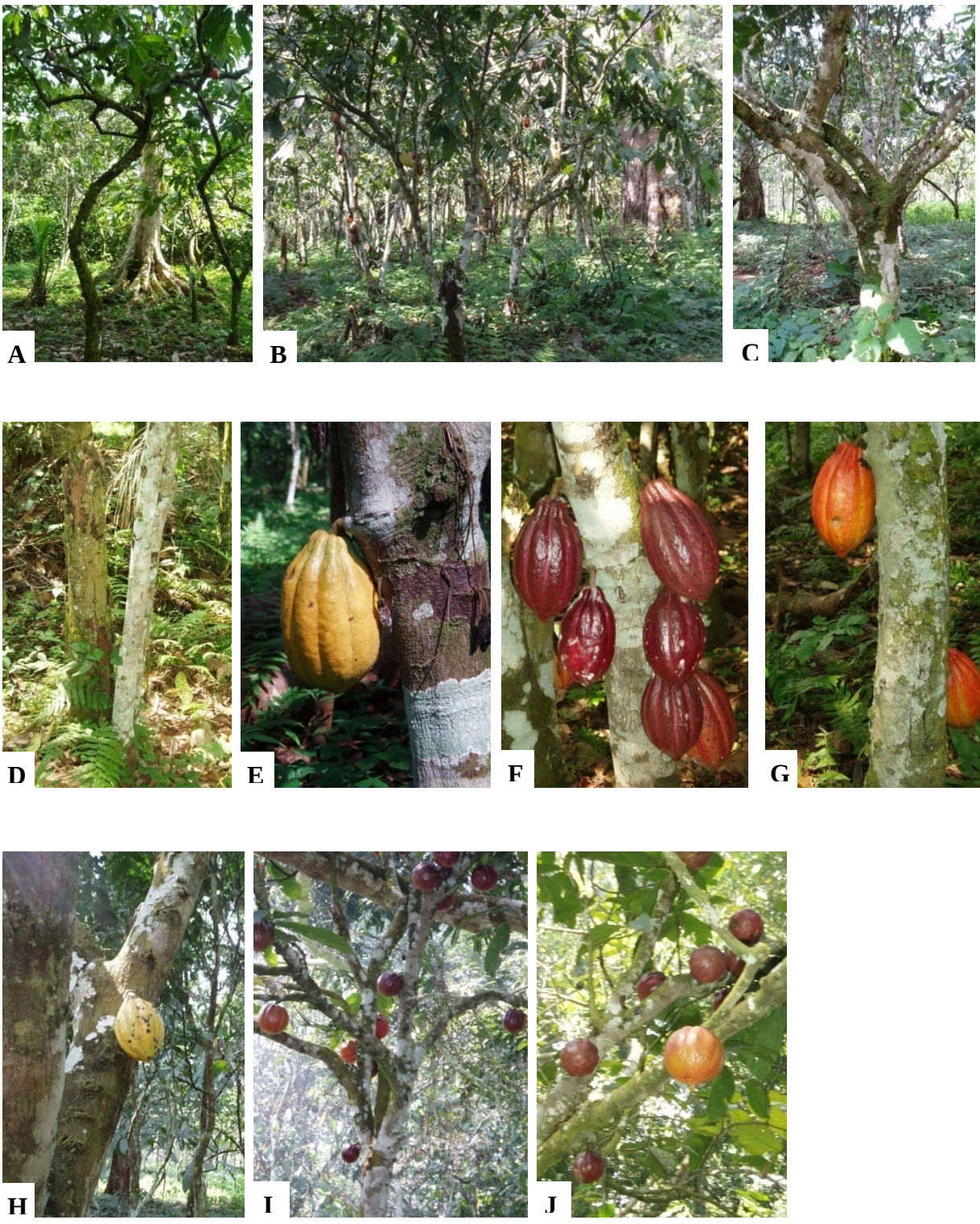


Abbildung 3: German Kakao-Plantage in Ngat.
A-H: German Cocoa-Bäume und Früchte, **I-J**: Catongo-Früchte

3 Material und Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von der Firma Merck in p.a. Qualität verwendet, Wasser besaß mindestens die Qualität vom destilliertem Wasser.

3.1 Beschreibung des verwendeten Pflanzenmaterials

3.1.1 Material der an der Universität Hamburg durchgeführten Keimungs- und fermentationsähnlichen Inkubationsversuche

Für die Inkubations- und Keimungsversuche wurde Pflanzenmaterial von unterschiedlichen Genotypen aus Trinidad und Kamerun verwendet.

Die aus Trinidad stammenden Früchte wurden direkt nach der Ernte nach Hamburg geschickt und waren etwa 4 bis 6 Tage mit der Post unterwegs. Die aus Kamerun stammenden Früchte wurden zum Teil direkt vor Ort sowie in Hamburg verarbeitet. Die in Hamburg verarbeiteten Früchte aus Kamerun wurden per Post verschickt und waren etwa eine Woche unterwegs, bevor sie verarbeitet wurden.

Bei den aus Trinidad stammenden Früchten handelte es sich um Früchte der Genotyp-Gruppe WAA (West African Amelonado). Diese waren oval, fast rundlich, kaum gefurcht und wiesen eine gelbe Farbe auf. Die meisten dieser Früchte waren nicht oder nur sehr gering durch Schädlingsbefall gezeichnet.

- Die erste Lieferung (April 2006) aus Trinidad bestand aus 3 Früchten, von denen zwei für Inkubations- und eine für Keimungsversuche verwendet wurden.

  In der folgenden Arbeit werden diese Untersuchungsproben als Tri5-I, Tri6-I und Tri1-K bezeichnet (I steht hierbei für Inkubation und K für Keimung).

- Die zweite Lieferung (Mai 2006) aus Trinidad bestand aus 8 Früchten. Von diesen wurden 4 Früchte für Inkubationsversuche und 4 Früchte für Keimungsversuche verwendet.

  (Tri1-I, Tri2-I, Tri3-I, Tri4-I, Tri2-K, Tri3-K, Tri4-K und Tri5-K.)

- Die dritte Lieferung (Oktober 2006) bestand aus 4 Früchten des Genotyps Sca 6 (Scavina) aus Yaounde, Kamerun von der IRAD-Plantage. Diese wurden für unterschiedlich lang andauernde Keimungsversuche verwendet. Die daraus gewonnenen Proben wurden zuerst eingefroren und später ausschließlich zur Bestimmung der PPO-Aktivität verwendet.

  Diese Proben werden in der folgenden Arbeit als Sca 6-K1, Sca 6-K2, Sca 6-K3 und Sca 6-K4 bezeichnet.

- Die vierte Lieferung (Dezember 2006) bestand aus 2 Früchten der Genotypen SNK 64 (Selection N'Koemvone) und ICS 84 (Imperial College Selection) von der IRAD-Plantage aus Yaounde, Kamerun. Mit den Samen dieser Früchte wurden über einen Zeitraum von 10 Tagen Keimungsversuche durchgeführt, welche alle 2 Tage beprobt wurden. Zusätzlich wurde eine Probe zum „Tag 0" genommen. Direkt nach der Probennahme wurde die PPO-Aktivität der

Samen bestimmt. Die hierfür nicht verwendeten Samen wurden eingefroren und für weitere Analysen verwendet.

Diese Proben werden in der folgenden Arbeit als SNK 64-K und ICS 84-K bezeichnet.

3.1.2 Material der in Kamerun durchgeführten Keimungs- und Inkubationsversuche

3.1.2.1 Genotypen

In Kamerun wurden Inkubations- und Keimungsversuche in den Laborräumen der „Ecole normal“ in Yaounde durchgeführt.

Es wurden Früchte von 3 unterschiedlichen Genotypen verwendet: SNK 13 (Selection N'Koemvone), ICS 40 (Imperial College Selection) und T 79/501 (Trinidad). Diese wurden auf der SODECAO-Plantage, in der Nähe von Akonolinga, geerntet (Erntedatum: 14.11.2007). Die Ernte und Auswahl der Früchte erfolgte durch die Arbeiter auf der Plantage. Es wurden etwa 30 bis 40 reife Früchte jedes Genotyps geerntet. Von diesen wurden jeweils Früchte verwendet, welche nach optischer Beurteilung einen ähnlichen Reifegrad aufwiesen.

- Die Früchte des Genotypen ICS 40 waren verhältnismäßig groß, stark gefurcht und hatten eine gelbe Farbe, wobei sie im Bereich der beiden Enden zumeist grün waren. Diese Früchte enthielten sehr große Samen, von denen einige weiß oder hellrosa waren. Diese wurden für die im Ergebnisteil beschriebenen Analysen jedoch nicht verwendet.
- Die Früchte des Genotypen SNK 13 waren deutlich kleiner, rundlicher und weniger stark gefurcht. Sie hatten eine rote, in den Bereichen der Furchen eine gelbe Färbung.
- Die Früchte des Genotypen T 79/501 waren sehr klein, oval, fast rundlich und sehr schwach gefurcht. Ihre Färbung war gelb bis gelb-orange.

Die Schalen der Früchte dieser drei Klone wiesen fast keine Spuren von Schädlingsbefall auf. Ihre Schalen glänzten und waren sehr farbintensiv. Sie konnten relativ gut über eine längere Zeit gelagert werden, ohne sich äußerlich zu verändern.

Von jedem Genotyp wurden zwei Inkubations- und zwei Keimungsversuchsreihen durchgeführt. Hierbei wurden die erste Inkubationsreihe von dem betreffenden Genotyp am zweiten Tag nach der Ernte und die zweite Versuchsreihe am fünften Tag nach der Ernte begonnen. Die für die zweite Versuchsreihe verwendeten Früchte wurden also drei Tage länger nach der Ernte gelagert als die für die erste Versuchsreihe verwendeten Früchte. Die Lagerung erfolgte in den Laborräumen der „Ecole normal“ bei Raumtemperatur (im Durchschnitt etwa 25°C).

Diese Proben werden in der folgenden Arbeit als SNK 13-K1/ -K2/ bzw. -F1/ F2, ICS 40-K1/ -K2/ bzw. -F1/ F2 und T 79/501-K1/ -K2/ bzw. -F1/ F2 bezeichnet. (K1 und K2 stehen hierbei für die erste und die etwas später durchgeführte zweite Keimungsversuchsreihe der Samen der Früchte des betreffenden Genotypen und F1 und F2 für die fermentationsähnlichen Inkubationen.)

3.1.2.2 German Cocoa

In Kamerun wurden unterschiedliche Keimungs- und Inkubationsversuche mit German Cocoa-Früchten durchgeführt. Die Früchte des German Cocoas waren relativ klein und wiesen unterschiedliche Färbungen auf. Sie hatten meist eine ovale Form und waren nur mäßig stark gefurcht. Die Schalen der Früchte waren durchgehend relativ stark von Schädlingsbefall gekennzeichnet. Dieser Befall war bei den meisten Früchten jedoch nur rein äußerlich. Die Schalen der German Cocoa-Früchte waren zumeist eher glanzlos und von schwarzen Flecken übersät. Die für die Versuche verwendeten German Cocoa-Früchte stammten von unterschiedlichen Plantagen aus verschiedenen Regionen um Yaounde:

- Mbangassina, nördlich von Yaounde, eine trockenere Region, 8 Früchte (geerntet vermutlich am 11.11.2007 von einem Studenten der Ecole normal). Von diesen Früchten wurden ein Inkubations- und ein Keimungsversuch durchgeführt. Diese German Cocoa-Früchte wurden vermutlich etwa 5 Tage nach der Ernte verarbeitet. Sie sahen von außen bräunlich, ausgetrocknet und teilweise etwas überlagert aus und waren durch einen starken Schädlingsbefall gezeichnet. Da sie von innen aber noch unversehrt aussahen, wurden sie für einen Keimungs- und einen Inkubationsversuch verwendet.

  Diese Proben werden in der folgenden Arbeit als GcM-K und GcM-F bezeichnet. (K steht hierbei für Keimung und F für fermentationsähnliche Inkubationen.)

- Awae, 16 Früchte (geerntet am 23.11.2007). Da einige dieser Früchte im Vergleich zu den anderen Früchten zum Teil noch etwas unreifer wirkten, wurden sie in „unreifere“ und „reifere“ Früchte eingeteilt. Diese Einteilung erfolgte aber nur anhand der optischen Beurteilung der äußeren Fruchtschale. Die Pulpa der als „unreifer“ bezeichneten Früchte war schon ähnlich locker wie die der als „reifer“ bezeichneten Früchte. Die Früchte dieses German Cocoas waren gelb, die etwas unreiferen waren noch etwas grünlich. Es ist aber zu beachten, dass diese Einteilung bei Kakaofrüchten schwierig ist. Generell gilt für reife Früchte, dass die Keimwuzeln der Samen noch nicht hervorgetreten sind, die Testa geschlossen und die Pulpa noch nicht flüssig ist.

  Es wurde jeweils ein Inkubations- und ein Keimungsversuch mit „unreiferen“ (als GcA-K3 bzw. -F3 bezeichnet) und jeweils einer mit „reiferen“ Früchten (GcA-K4 bzw. –F4) durchgeführt.

- Ngat, ca. 15 km von Awae entfernt (geerntet am 24.11.2007). Bei der German Cocoa Plantage in Ngat handelte es sich um eine sehr alte Plantage, deren Bäume mindestens 50 Jahre alt waren. Die roten und gelben Früchte dieser Plantage waren etwas weniger stark als die der anderen German Cocoa Plantagen durch Schädlingsbefall gezeichnet. Es wurden jeweils 2 parallele Inkubations- und ein Keimungsversuche durchgeführt.

  Diese Proben werden in der folgenden Arbeit als GcR-K1/ -K2/ bzw. -F1/ -F2 und GcG-K1/ -K2/ bzw. -F1/ -F2 bezeichnet. (K1 und K2 stehen hierbei für die erste und die zweite parallel durchgeführte Keimung der Samen und F1 und F2 für fermentationsähnlichen Inkubationen. Mit GcR sind die Proben aus den roten Früchten und mit GcG die aus den gelben Früchten bezeichnet.)

- Ngat (geerntet am 24.11.2007). Neben den German Cocoa-Früchten wurden 4 Catongo-Früchte geerntet. Diese waren rund mit einer schwachen Furchung, welche nur im Bereich des oberen Endes auftrat. Ihre Färbung war rot bis rot-orange. Mit den Samen dieser Früchte wurde ein Inkubations- und ein Keimungsversuch durchgeführt.

  Diese Proben werden in der folgenden Arbeit als C1-K und C1-F bezeichnet.

- Awae, 4 Früchte (geerntet am 8.12.2007). Diese Früchte wurden kurz vor der Abreise geerntet und für in Hamburg durchgeführte Keimungs- und Inkubationsversuche verwendet. Insgesamt wurden von diesen Früchten zwei Keimungs- und zwei Inkubationsversuche durchgeführt. Für jeden Versuchsansatz wurden hierfür die Samen einer Frucht verwendet.

  Diese Proben werden in der folgenden Arbeit als GcA-K5/ -K6/ bzw.-F5/ -F6 bezeichnet.

3.1.3 Probenmaterial für die Bestimmung des Wassergehaltes und die Wasseraufnahme

3.1.3.1 Früchte aus Trinidad

- Für den Wasseraufnahmeversuch und die Bestimmung des Wassergehaltes der Kakaosamen wurden die Samen von 2 Früchten der Genotyp-Gruppe WAA aus Trinidad verwendet (Januar 2008).

  Diese Proben werden in der folgenden Arbeit als WAA 1 und WAA 2 bezeichnet.

3.1.3.2 Früchte aus Kamerun

Für einen weiteren Wasseraufnahmeversuch und eine weitere Bestimmung des Wassergehaltes der Kakaosamen wurden die Samen von unterschiedlichen Früchten aus Kamerun verwendet:

- German Cocoa-Früchte aus Yaounde (geerntet am 3.6.2008). Die gelben Schalen dieser German Cocoa-Früchte waren sehr stark durch Schädlingsbefall gezeichnet.

  Diese Proben werden in der folgenden Arbeit als GcY1, GcY2, GcY3 und GcY4 bezeichnet.

- Unreife German Cocoa-Früchte aus der Region Lelié, aus dem Ort Lekiassi, ca. 30 km westlich von Yaounde (geerntet am 31.5.2008). Diese Früchte waren noch grün und hatten bei ihrer Ankunft in Hamburg transportbedingte braune Flecken auf den Schalen. Die Pulpa war noch sehr fest und ließ sich kaum von den Samen lösen. Auch die Samen waren noch nicht vollständig entwickelt.

  Diese Proben werden in der folgenden Arbeit als GcL bezeichnet.

- Jeweils eine Frucht der Genotypen ICS 84, SNK 10 (sehr unreif) und Sca 6 (unreif) aus Yaounde von der IRAD-Plantage (geerntet Ende Mai 2008). Die Pulpa der Samen der Frucht SNK 10 war noch extrem fest, so dass sie zum Trennen der Samen mit einem Messer geschnitten werden musste.

  Diese Proben werden in der folgenden Arbeit als ICS 84, SNK 10 und Sca 6 bezeichnet.

3.1.4 Probenlisten

Tabelle 2 Probenliste der zur Inkubation verwendeten Proben:

Proben-bezeichnung	Genotyp	Herkunft	Erntedatum	Dauer von der Ernte bis zur Verarbeitung	Verarbeitungsort	Trocknungsdauer an der Sonne	Bemerkung
C1-F	Catongo	Ngat, Kamerun	November 2007	2 Tage	Yaounde, Kamerun	2,5 Wochen	
GcA-F3	German cacao	Awae, Kamerun	November 2007	7 Tage	Yaounde, Kamerun	1,5 Wochen	"reifere" Früchte
GcA-F4	German cacao	Awae, Kamerun	November 2007	7 Tage	Yaounde, Kamerun	1,5 Wochen	"unreifere" Früchte
GcA-F5	German cacao	Awae, Kamerun	Dezember 2007	9 Tage	Universität Hamburg	-	
GcA-F6	German cacao	Awae, Kamerun	Dezember 2007	9 Tage	Universität Hamburg	-	
GcG-F1	German cacao	Ngat, Kamerun	November 2007	2 Tage	Yaounde, Kamerun	2,5 Wochen	
GcG-F2	German cacao	Ngat, Kamerun	November 2007	2 Tage	Yaounde, Kamerun	2,5 Wochen	
GcM-F	German cacao	Mbangassina, Kamerun	November 2007	ca. 5 Tage	Yaounde, Kamerun	3 Wochen	
GcR-F1	German cacao	Ngat, Kamerun	November 2007	2 Tage	Yaounde, Kamerun	2,5 Wochen	
GcR-F2	German cacao	Ngat, Kamerun	November 2007	2 Tage	Yaounde, Kamerun	2,5 Wochen	
ICS 40-F1	ICS 40	Akonolinga, Kamerun	November 2007	2 Tage	Yaounde, Kamerun	3 Wochen	
ICS 40-F2	ICS 40	Akonolinga, Kamerun	November 2007	5 Tage	Yaounde, Kamerun	2,5 Wochen	
SNK 13-F1	SNK 13	Akonolinga, Kamerun	November 2007	2 Tage	Yaounde, Kamerun	3 Wochen	
SNK 13-F2	SNK 13	Akonolinga, Kamerun	November 2007	5 Tage	Yaounde, Kamerun	2,5 Wochen	
T 79/501-F1	T 79/501	Akonolinga, Kamerun	November 2007	2 Tage	Yaounde, Kamerun	3 Wochen	
T 79/501-F2	T 79/501	Akonolinga, Kamerun	November 2007	5 Tage	Yaounde, Kamerun	2,5 Wochen	
Tri1-I	WAA	Trinidad	Mai 2006	ca. 4 - 6 Tage	Universität Hamburg	-	
Tri2-I	WAA	Trinidad	Mai 2006	ca. 4 - 6 Tage	Universität Hamburg	-	
Tri3-I	WAA	Trinidad	Mai 2006	ca. 4 - 6 Tage	Universität Hamburg	-	
Tri4-I	WAA	Trinidad	Mai 2006	ca. 4 - 6 Tage	Universität Hamburg	-	
Tri5-I	WAA	Trinidad	April 2006	ca. 4 - 6 Tage	Universität Hamburg	-	
Tri6-I	WAA	Trinidad	April 2006	ca. 4 - 6 Tage	Universität Hamburg	-	

Tabelle 3: Probenliste der zur Keimung verwendeten Proben:

Proben-bezeichnung	Genotyp	Herkunft	Erntedatum	Dauer von der Ernte bis zur Verarbeitung	Verarbeitungsort	Trocknungsdauer an der Sonne	Bemerkung
C1-K	Catongo	Ngat, Kamerun	November 2007	4 Tage	Yaounde, Kamerun	-	
GcA-K3	German cacao	Awae, Kamerun	November 2007	5 Tage	Yaounde, Kamerun	-	"reifere" Früchte
GcA-K4	German cacao	Awae, Kamerun	November 2007	6 Tage	Yaounde, Kamerun	-	"unreifere" Früchte
GcA-K5	German cacao	Awae, Kamerun	Dezember 2007	9 Tage	Universität Hamburg	-	
GcA-K6	German cacao	Awae, Kamerun	Dezember 2007	9 Tage	Universität Hamburg	-	
GcG-K1	German cacao	Ngat, Kamerun	November 2007	3 Tage	Yaounde, Kamerun	-	
GcG-K2	German cacao	Ngat, Kamerun	November 2007	3 Tage	Yaounde, Kamerun	-	
GcM-K	German cacao	Mbangassina, Kamerun	November 2007	5 Tage	Yaounde, Kamerun	-	
GcR-K1	German cacao	Ngat, Kamerun	November 2007	2 Tage	Yaounde, Kamerun	-	
GcR-K2	German cacao	Ngat, Kamerun	November 2007	4 Tage	Yaounde, Kamerun	-	
ICS 40-K1	ICS 40	Akonolinga, Kamerun	November 2007	3 Tage	Yaounde, Kamerun	-	
ICS 40-K2	ICS 40	Akonolinga, Kamerun	November 2007	4 Tage	Yaounde, Kamerun	-	
ICS 84-K	ICS 84	Yaounde, Kamerun	Dezember 2006	ca. 7 Tage	Universität Hamburg	-	
Sca 6-K1	Sca 6	Yaounde, Kamerun	Oktober 2006	ca. 7 Tage	Universität Hamburg	-	zur PPO-Bestimmung
Sca 6-K2	Sca 6	Yaounde, Kamerun	Oktober 2006	ca. 7 Tage	Universität Hamburg	-	zur PPO-Bestimmung
Sca 6-K3	Sca 6	Yaounde, Kamerun	Oktober 2006	ca. 7 Tage	Universität Hamburg	-	zur PPO-Bestimmung
Sca 6-K4	Sca 6	Yaounde, Kamerun	Oktober 2006	ca. 7 Tage	Universität Hamburg	-	zur PPO-Bestimmung
SNK 13-K1	SNK 13	Akonolinga, Kamerun	November 2007	3 Tage	Yaounde, Kamerun	-	
SNK 13-K2	SNK 13	Akonolinga, Kamerun	November 2007	3 Tage	Yaounde, Kamerun	-	
SNK 64-K	SNK 64	Yaounde, Kamerun	Dezember 2006	ca. 7 Tage	Universität Hamburg	-	
T 79/501-K1	T 79/501	Akonolinga, Kamerun	November 2007	4 Tage	Yaounde, Kamerun	-	
T 79/501-K2	T 79/501	Akonolinga, Kamerun	November 2007	4 Tage	Yaounde, Kamerun	-	
Tri1-K	WAA	Trinidad	April 2006	ca. 4 - 6 Tage	Universität Hamburg	-	
Tri2-K	WAA	Trinidad	Mai 2006	ca. 4 - 6 Tage	Universität Hamburg	-	
Tri3-K	WAA	Trinidad	Mai 2006	ca. 4 - 6 Tage	Universität Hamburg	-	
Tri4-K	WAA	Trinidad	Mai 2006	ca. 4 - 6 Tage	Universität Hamburg	-	
Tri5-K	WAA	Trinidad	Mai 2006	ca. 4 - 6 Tage	Universität Hamburg	-	Pathogenbefall

Tabelle 4: Probenliste der zur Wasseraufnahme- und Wassergehaltsbestimmung verwendeten Proben:

Proben-bezeichnung	Genotyp	Herkunft	Erntedatum	Dauer von der Ernte bis zur Verarbeitung	Verarbeitungsort	Trocknungsdauer an der Sonne	Bemerkung
GcL	German cacao	Lekiassi, Kamerun	Ende Mai 2008	6 Tage	Universität Hamburg	-	sehr unreife Frucht
GcY1	German cacao	Yaounde, Kamerun	Juni 2008	3 Tage	Universität Hamburg	-	
GcY2	German cacao	Yaounde, Kamerun	Juni 2008	3 Tage	Universität Hamburg	-	
GcY3	German cacao	Yaounde, Kamerun	Juni 2008	3 Tage	Universität Hamburg	-	
GcY4	German cacao	Yaounde, Kamerun	Juni 2008	3 Tage	Universität Hamburg	-	
ICS 84	ICS 84	Yaounde, Kamerun	Ende Mai 2008	ca. 6 Tage	Universität Hamburg	-	
Sca 6	Sca 6	Yaounde, Kamerun	Ende Mai 2008	ca. 6 Tage	Universität Hamburg	-	unreif
SNK 10	SNK 10	Yaounde, Kamerun	Ende Mai 2008	ca. 6 Tage	Universität Hamburg	-	sehr unreife Frucht
WAA 1	WAA	Trinidad	Januar 2008	ca. 4 - 6 Tage	Universität Hamburg	-	
WAA 2	WAA	Trinidad	Januar 2008	ca. 4 - 6 Tage	Universität Hamburg	-	

3.1.5 Abbildungen der verwendeten Früchte



Abbildung 4: Früchte des Klons SNK 13 aus Kamerun von der Plantage SODECAO bei Akonolinga



Abbildung 5: Früchte des Klons ICS 40 aus Kamerun von der Plantage SODECAO bei Akonolinga



Abbildung 6: Früchte des Klons T 79/501 aus Kamerun von der Plantage SODECAO bei Akonolinga



Abbildung 7: Früchte unterschiedlicher Klone aus Kamerun.
a) SNK 64, b) ICS 84, c) ICS 84, d) SNK 10 (sehr unreif), e) SCA 6 (unreif)




Abbildung 8: German Cocoa Früchte aus Mbangassina (GcM), Kamerun




Abbildung 9: Gelbe German Cocoa Früchte aus Ngat (GcG), Kamerun




Abbildung 10: Rote German Cocoa Früchte aus Ngat (GcR), Kamerun




Abbildung 11: German Cocoa Früchte aus Awae (GcA), Kamerun.
Diese wurden für die durchgeführten Inkubationsversuche in „unreifere“ und „reifere“ Früchte eingeteilt. Auf dem linken Bild sind die „unreiferen“ und auf dem rechten die „reiferen“ abgebildet.



Abbildung 12: German cacao Früchte aus Yaounde (GcY, links) und sehr unreife German Cocoa Früchte aus Lekiassi, Kamerun (GcL, rechts)



Abbildung 13: Catongo Früchte aus Ngat, Kamerun



Abbildung 14: Früchte der Genotypen-Gruppe WAA aus Trinidad

3.2 Fermentationsähnliche Inkubationsversuche

Während der Fermentation finden in den Kotyledonen des Kakaos biochemische Veränderungen statt. Diese biochemischen Veränderungen können auch künstlich in Inkubationsversuchen durch Essigsäure bei bestimmten Temperaturen und unter anaeroben Bedingungen herbeigeführt werden (BIEHL und PASSERN, 1982).

Es wurden mehrere fermentationsähnliche Inkubationsversuche durchgeführt.

3.2.1 In Hamburg durchgeführte Inkubationsversuche

Mit unterschiedlichen Früchten wurden Inkubationsversuche durchgeführt. Die Inkubationen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Früchte wurden steril geöffnet. Hierfür wurden sie zunächst mit Sterillium abgerieben und dann in Ethanol getaucht und kurz abgeflammt. Für die Inkubation wurden die Samen unter sterilen Bedingungen aus den Früchten entnommen, und die anhaftende Pulpa mit sterilen Tüchern abgerieben, so dass die Samen soweit wie möglich von der Pulpa befreit waren. Die Samen wurden vollständig mit Testa bzw. halbiert inkubiert.

Die Inkubationen erfolgten in 250 ml Duranflaschen. Um eine Begasung mit Stickstoff in der ersten anaeroben Phase der Inkubation, bzw. einen Lufteintritt in der zweiten aeroben Phase der Inkubation zu ermöglichen, wurden Deckel mit Schlauchzugängen verwendet. So konnte durch ein Rohr, welches in dem Inkubationsmedium endete, Stickstoff über einen Sterilluftfilter (Fa. Sartorius) in das Gefäß einströmen. Durch einen zweiten Schlauch, welcher über dem Inkubationsmedium endete und an dessen Ausgang ebenfalls ein Sterilluftfilter angebracht war, konnte die Luft wieder entweichen, bzw. in der zweiten Phase der Inkubation eintreten. Dieses Begasungs- und anschließende Belüftungssystem diente der Simulation von fermentationsähnlichen Bedingungen.

Für jeden Inkubationsansatz wurden 6 bis 10 Kakaosamen in 200 ml Inkubationsmedium inkubiert. Die Inkubationsmedien enthielten 200 mmol/l Essigsäure (1,14 %ig) und wurden mit 1 mol/l NaOH auf einen pH-Wert von 4,5 bzw. 5,5 eingestellt und vor Gebrauch sterilisiert. Die ersten 72 Stunden erfolgte die Inkubation bei einem pH-Wert von 4,5. Anschließend wurden die Inkubationsmedien ausgetauscht und die Inkubation erfolgte bei einem pH-Wert von 5,5. Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Medien durch eine 5-minütige Ultraschallbehandlung entgast, um nahezu anaerobe Bedingungen zu gewährleisten. Zusätzlich erfolgte während der ersten 48 Stunden der Inkubation eine Verdrängung des Sauerstoffes durch die Begasung der Inkubationsmedien mit Stickstoff.

Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 3 bis 5 Tagen in einem Wasserbad (Fa. Köttermann) unter leichtem Schwenken. Die Temperatur betrug zu Beginn der Inkubation 30°C. Sie wurde nach 24 Stunden auf 40°C und nach 48 Stunden auf 50°C erhöht.

Die Probenentnahmen erfolgten nach 0, 24, 48, 72 und 96 Stunden.

Nach der Probennahme wurde die Testa entfernt und die Kotyledonen wurden in einer Gefriertrocknungsanlage (Alpha 1-6, Fa. Christ) bei –20°C unter Vakuum in einer Woche getrocknet und bis zur Weiterverarbeitung bei –20°C gelagert.

Von jeder Probe wurden einige Samen zur PPO-Aktivitätsbestimmung nicht gefriergetrocknet, sondern direkt bei –20°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

3.2.2 In Yaounde durchgeführte Inkubationsversuche

Die in Kamerun an der Universität von Yaounde durchgeführten Inkubationsversuche verliefen, abgesehen von einigen kleinen Unterschieden, ähnlich wie die in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Inkubationsversuche.

Die Öffnung für die zur Inkubation verwendeten Früchte erfolgte nicht steril. Die Samen wurden mit Pulpa und Testa inkubiert.

Die Inkubationen erfolgten in mit Bindfaden zugebundenen Gefrierbeuteln in einem temperierbaren Wasserbad.

Die Probenentnahme erfolgte alle 24 Stunden, daher wurden die Samen für jede Probe einer Probenreihe (Tag 0 - 4) in einen separaten Beutel gefüllt, so dass die Gefrierbeutel nur zur Beprobung geöffnet werden mussten, um unnötige Kontaminationen mit Keimen zu vermeiden.

Für jeden Inkubationsversuch wurden die Samen von jeweils 5 Früchten verwendet. Das Samenmaterial dieser 5 Früchte wurde gleichmäßig vermischt auf die Probenbeutel einer Probenreihe verteilt. Jeder Probenbeutel wurde mit 230 ml Inkubationsmedium befüllt und ohne Lufteinschluß zugebunden, um möglichst anaerobe Bedingungen zu gewährleisten. Nach 48 Stunden wurden die Beutel geöffnet und anschließend mit Lufteinschluß wieder verschlossen und gut geschüttelt, um einen möglichst hohen Sauerstoffgehalt in den Inkubationsmedien zu erhalten. Dieser Vorgang wurde bis zum Ende der Inkubation mehrmals wiederholt.

Das Inkubationsmedium enthielt eine Essigsäurekonzentration von 200 mmol/l (1,14 %ig) und wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 4,5 eingestellt.

Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 96 Stunden in einem Wasserbad. In den ersten 24 Stunden der Inkubation betrug die Temperatur ca. 30°C, nach 24 Stunden wurde sie auf ca. 35°C, nach 48 Stunden auf ca. 40°C und nach 72 Stunden auf ca. 50°C erhöht. Da sich die Temperatur in dem verwendeten Wasserbad nur sehr schwer einstellen ließ, sind zeitweise Abweichungen von den angegebenen Temperaturen von bis zu ± 5°C im Verlauf der Inkubation aufgetreten.

Die Probenentnahmen erfolgten nach 0, 24, 48, 72 und 96 Stunden.

Nach der Probenentnahme wurden die Samen an der Sonne getrocknet und nach ca. 2 bis 3-wöchiger Trocknung in Plastiktüten für den Transport nach Hamburg eingeschweißt. Die Trocknung hat verhältnismäßig lange gedauert, da es in Yaounde häufig bewölkt gewesen ist oder gar geregnet hat.

3.2.3 Abbildungen zur Durchführung der Inkubations- und Keimungsversuche:



Abbildung 15: Versuchsaufbau der in Hamburg durchgeführten Inkubationen.
A) beheizbares Wasserbad mit Inkubationsgefäßen; B) Inkubationsgefäß: C) Inkubationsgefäße Mit Inkubationsmedium und Samen.

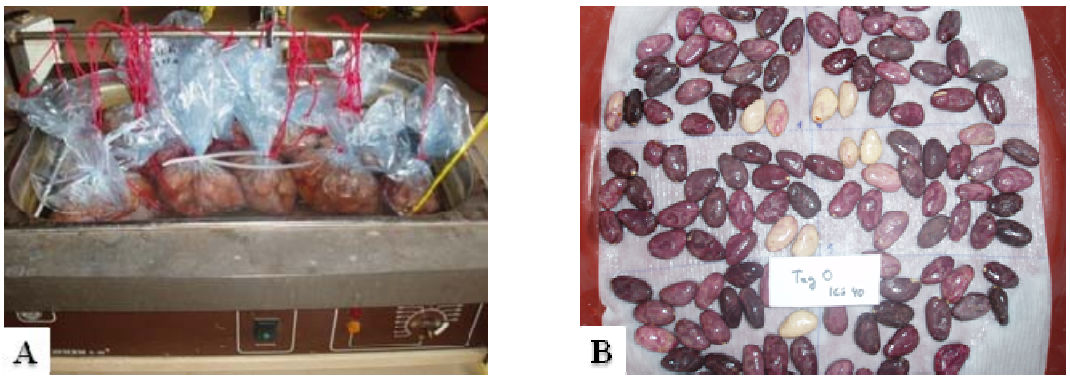


Abbildung 16: Versuchsaufbau der in Yaounde, Kamerun durchgeführten Inkubationen und Keimungsversuche.
A) Inkubationsversuche: die Inkubationen erfolgten in mit Bindfäden zugebundenen Gefrierbeuteln in einem temperierbaren Wasserbad.
B) Keimungsversuche: die Keimungen fanden in großen, mit feuchtem Filterpapier ausgelegten Plastikwannen statt. Bei dem Abgebildeten Keimungsversuch handelt es sich um Samen des Genotypen ICS 40, welche sehr unterschiedliche Färbungen aufwiesen.

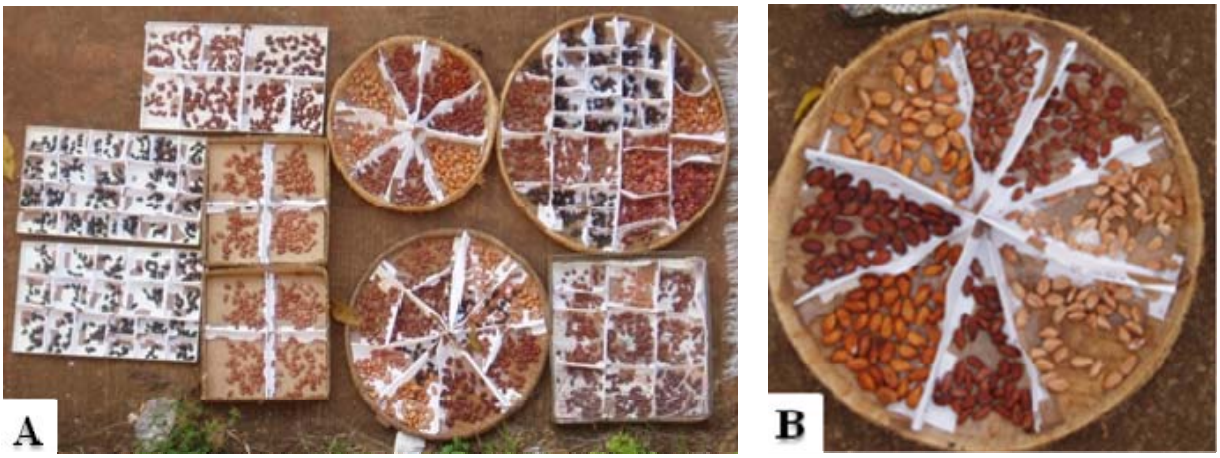


Abbildung 17: A und B) Trocknung der inkubierten und gekeimten Kakaosamen in Yaounde, Kamerun
B) Unterschiedlich lang inkubierte Kakaosamen

3.3 Keimungsversuche

3.3.1 In Hamburg durchgeführte Keimungsversuche

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Keimungsversuche erfolgten über einen Zeitraum von 4 bis 10 Tagen unter sterilen Bedingungen in einer Klimakammer bei 25°C.

Die zur Keimung verwendeten Samen wurden von der Testa befreit und in sterilen Petrischalen auf mehreren Schichten feuchtem Filterpapier zur Keimung ausgelegt. Die Kakaosamen wurden gleichmäßig feucht gehalten.

Für jeden Ansatz wurden die Samen einer Frucht über mehrere Tage zu Keimung ausgelegt. Die Probennahme erfolgte täglich, bzw. bei einigen Proben alle 2 bis 3 Tage. Außerdem wurden von jeder Frucht ungekeimte Samen zur Untersuchung genommen.

Nach der Probennahme wurden die Kotyledonen in einer Gefriertrocknungsanlage bei –20°C unter Vakuum in einer Woche getrocknet und bis zur Weiterverarbeitung bei –20°C gelagert.

Von jeder Probe wurden einige Samen zur PPO-Aktivitätsbestimmung nicht gefriergetrocknet, sondern direkt bei –20°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

3.3.2 In Yaounde durchgeführte Keimungsversuche

Die in Kamerun an der Universität von Yaounde durchgeführten Keimungsversuche erfolgten, im Gegensatz zu den in Hamburg durchgeführten Keimungsversuchen, nicht unter sterilen Bedingungen.

Die zu Keimung verwendeten Kakaosamen wurden von der Testa befreit und in großen Plastikschalen, welche mit feuchtem Filterpapier ausgelegt waren, ausgelegt. Die Samen wurden hierbei gleichmäßig feucht gehalten.

Die zur Keimung verwendeten Plastikwannen wurden in einem Raum mit ständig geöffneten Fenstern aufgestellt. Die Temperatur betrug tagsüber meist zwischen 24°C und 26°C. Nachts war es um etwa 1°C bis 2°C kühler.

Die Keimungsversuche erfolgten über einen Zeitraum von 6 Tagen. Die Probennahme erfolgte täglich. Außerdem wurden von jeder Frucht ungekeimte Samen zur Untersuchung genommen.

Nach der Probenentnahme wurde ein Teil der Samen an der Sonne getrocknet und nach ca. 2- bis 3-wöchiger Trocknung in Tüten für den Transport nach Hamburg eingeschweißt. Der andere Teil der Samen wurde direkt in Tüten eingeschweißt und bei –20°C eingefroren. Allerdings wurden die Samen nicht sofort vor Ort eingefroren, da sich die verwendete Gefriertruhe ca. 30 Minuten von der Universität entfernt befand. Die Proben wurden daher in einem warmen Auto zur Gefriertruhe transportiert.

Die eingefrorenen Samen wurden in einer Kühlbox, welche mit Eis und Salz bestückt war, nach Hamburg transportiert. Bei der Ankunft im Biozentrum Klein Flottbek in Hamburg betrug die Temperatur in der Kühlbox –8,9°C.

3.4 Wassergehalt und Wasseraufnahme

3.4.1 Bestimmung des Wassergehaltes von Kakaosamen

Zur Bestimmung des Wassergehaltes wurden frische, ungekeimte Kakaosamen von ihrer Testa befreit, gewogen und anschließend in einer Gefriertrocknungsanlage bei –20°C unter Vakuum für eine Woche getrocknet.

Nach der Gefriertrocknung wurden die Samen erneut gewogen und der Wassergehalt wurde anhand der Gewichtsdifferenz ermittelt.

3.4.2 Bestimmung der Wasseraufnahme während der Keimung

Die Bestimmung der Wasseraufnahme während der Keimung wurde zum einen an Samen mit Testa und zum anderen an Samen, von denen die Testa entfernt worden war, durchgeführt. Von den Samen mit Testa wurde zu Beginn des Versuchs die Pulpa so weit wie möglich abgerieben.

Alle zur Bestimmung der Wasseraufnahme verwendeten Samen wurden zu Beginn des Versuchs gewogen. Anschließend wurden sie in mit feuchtem Filterpapier ausgelegten Petrischalen zur Keimung ausgelegt. Die Keimung erfolgte in der Klimakammer bei 25°C.

Die Samen wurden über den gesamten Versuchsverlauf alle 24 Stunden gewogen, wobei sie vor dem Wiegen mit Papiertüchern gut getrocknet wurden. Die Wasseraufnahme wurde durch die Ermittlung der Gewichtszunahme bestimmt.

3.5 Bestimmung des pH-Wertes

Zur pH-Wertbestimmung wurde etwa 1 g Probe bzw. ein von der Testa befreiter Samen genommen, in einem Mörser fein zerrieben und mit 10 ml siedendem destilliertem Wasser verrührt. Das Gemisch wurde 3 min gerührt und danach durch einen Faltenfilter (595 ½, Fa. Schleicher & Schuell) filtriert.

In dem Filtrat wurde der pH-Wert mit Hilfe einer pH-Elektrode (pH-Meter 654, Fa. Metrohm) bestimmt.

3.6 Entfetten und Herstellen von Acetontrockenpulver aus Kakaosamen

Wegen des hohen Gehalts an Fett und phenolischen Substanzen in den Kotyledonen des Kakaos ist eine spezielle Vorbehandlung des Probenmaterials für nachfolgende chemische Untersuchungen notwendig. Nur nach dem Abtrennen des Fettes lassen sich Reaktionen im wässrigen Medium sachgerecht durchführen. Eine ausreichende Entfernung der Polyphenole ist notwendig, um Vergerbungsreaktionen der Proteine weitgehend zu verhindern.

3.6.1 Entfetten der Proben

Zur Entfettung wurde von Testa und Radikula befreites, gefriergetrocknetes und grob zerkleinertes Samenmaterial verwendet.

Etwa 2 g des zu entfettenden Materials wurden mit 10 ml n-Hexan in einen Behälter der Kugelmühlen (Typ MM200, Fa. Retsch) gegeben und durch 10-minütiges Schütteln bei einer Frequenz von 20/s zerkleinert. Das Homogenat wurde mit etwa 75 ml Petrolether (Kp. 40 - 60°C) quantitativ aus dem Mahlgefäß gespült und filtriert. Der Filterrückstand wurde in einem Vakuumtrockenschrank (Fa. Heraeus) getrocknet und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei –20°C aufbewahrt.

3.6.2 Herstellung von Acetontrockenpulver

Um die Polyphenole aus dem fettfreien Kotyledonenpulver zu entfernen, erfolgte eine Polyphenolextraktion mittels Aceton (nach KIRCHHOFF *et al.*, 1989a).

Die Acetonlösungen enthielten je 5 mmol/l Natriumascorbat als Antioxidationsmittel und wurden vor der Verwendung auf –20°C gekühlt.

Zur Polyphenolextraktion wurde etwa 1 g der entfetteten Proben mit 15 ml 80 %iger wässriger Acetonlösung versetzt und 15 min im Eisbad im Kühlraum geschüttelt. Anschließend wurden die Proben 15 min bei –4°C mit 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und der Rückstand noch ein weiteres Mal mit 80 %iger und zweimal mit 70 %iger wässriger Acetonlösung extrahiert.

Zur Entwässerung des Rückstands wurde nach der Polyphenolextraktion einmal mit 25 ml Aceton extrahiert. Das Aceton wurde dekantiert und die Proben wurden im Vakuumtrockenschrank bei Raumtemperatur vom restlichen Aceton befreit. Das fertige Acetontrockenpulver wurde bis zur Weiterverarbeitung bei –20°C gelagert.

3.7 Bestimmung der freien Aminosäuren mit Hilfe der HPLC

Die chromatographische Trennung der Aminosäuren erfolgte nach einer leicht veränderten Methode von KIRCHHOFF *et al.* (1989a) über eine RP-HPLC (Reversed Phase High Performance Liguid Chromatography). Hierbei handelt es sich um ein säulenchromatographisches Flüssig-Trennverfahren. Bei diesem wird eine unpolare stationäre mit einer polaren mobilen Phase kombiniert. Die Säulenpackung, die stationäre Phase, besteht aus porösen mit C18-Alkylresten modifizierten Kieselgelen. Das zu trennende Substanzgemisch wird in der mobilen Phase, dem Laufmittel, gelöst und auf die Säule aufgetragen. Die Trennung beruht auf der unterschiedlichen Adsorption der zu analysierenden Substanzen an der Säulenmatrix, so dass die Analyten zu unterschiedlichen Retentionszeiten eluieren.

3.7.1 Probenaufbereitung

0,1 g entfettetes Kakaopulver wurden in ein Zentrifugenglas gefüllt und mit 0,3 g Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP, Fa. Fluka) und 25 ml 4°C kaltem deionisiertem Wasser, welches mit Trifluoressigsäurelösung auf einen pH-Wert von 2,0 voreingestellt worden war, versetzt. Anschließend wurde unter Rühren der pH-Wert mit 50 %iger wäßriger Trifluoressigsäurelösung auf 2,5 eingestellt. Zur Extraktion der Aminosäuren wurde dieser Ansatz eine Stunde mit Hilfe eines Magnetrührers in einem Eisbad gerührt.

Nach der Extraktion wurde die Probe 10 min bei 5.000 U/min zentrifugiert (Labofuge, Fa. Heraeus Christ) und der daraus resultierende klare Überstand wurde durch einen 0,45 µm Filter (Multoclear, 25 mm PTFE, Fa. CS-Chromatographie Service) filtriert.

Zur Analyse der Aminosäuren wurden 30 µl des Filtrats in einem HPLC-Probenvial eine Stunde bei –20°C und 0,05 mbar gefriergetrocknet.

3.7.2 Reagenzien

Boratpuffer: 200 mmol/l Borsäurelösung (12,38 g Borsäure auf 1 l H_2O (gradient grade)) wurde mit Kaliumhydroxid-Lösung auf einen pH-Wert von 9,5 eingestellt, 5 min aufgekocht und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

OPA- Reagenz: 100 mg o-Phthaldialdehyd (Fa. Fluka) wurden in 2,5 ml Methanol (gradient grade) gelöst. Hierzu wurden 100 µl 2-Mercaptoethanol und 22,4 ml Boratpuffer (pH 9,5) addiert. Das OPA-Reagenz wurde 24 Stunden vor Gebrauch hergestellt und bei 4°C gelagert.

Laufmittel A: 1,6 Liter 50 mmol/l Natriumacetatlösung wurden mit 10 %iger Essigsäure auf einen pH-Wert von 6,2 eingestellt

50 ml Methanol (Lichrosolv® gradient grade)

20 ml Tetrahydrofuran (Lichrosolv® gradient grade)

Laufmittel B: 200 ml 50 mmol/l Natriumacetatlösung wurden mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 6,2 eingestellt

800 ml Methanol (Lichrosolv® gradient grade)

3.7.3 Derivatisierung der Proben

Zur HPLC-Vermessung wurden 800 µl Boratpuffer zu den gefriergetrockneten Proben gegeben. Vor dem jeweiligen Start der Vermessung der Proben durch die HPLC wurden jeweils 400 µl OPA-Reagenz zur Derivatisierung dazugegeben. Die Derivatisierung endete exakt nach 2 min mit der Injektion von 20 µl dieser Mischung auf die Säule.

3.7.4 HPLC-Vermessung

Die Auftrennung und Detektion der freien Aminosäuren erfolgte an einem mit einer Millenium³² Version 3.20 Chromatography Manager Software (Fa. Waters) ausgerüsteten HPLC-System. Dieses war mit einem Intelligent Autosampler (AS-4000 Fa. Merck Hitachi), einer Pumpe (HPLC-Pump 64 mit analytischem Pumpenkopf, Fa. Knauer), einem Gradientenmischer (Dynamic Mixing Chamber, Fa. Knauer), einem Vacuum Degasser (Fa. Knauer) zur Entgasung des Laufmittels und einem Fluorescence Spektrometer (F-1050, Fa. Merck Hitachi) ausgestattet. Durch einen Digitalwandler (bus SAT/IN Module, Fa. Waters) wurden die am Fluorescence Spektrometer gemessenen Werte zur Übertragung auf die Millenium³² Chromatography Manager Software umgewandelt.

Die Vermessung der freien Aminosäuren am Fluorescence Spektrometer erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 334 nm und einer Emissionwellenlänge von 425 nm.

Die Trennung erfolgte an einer LiChroCART 250-4 Trennsäule (5µm Partikelgröße, Länge 250 mm; Fa. Merck)), der eine Lichrospher 100 RP-18 Vorsäule vorgeschaltet war. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1,3 ml/min, die Säulentemperatur 30°C.

Die Vermessung der Aminosäuren erfolgte gegen Standardlösungen, die die zu bestimmenden Aminosäuren in Boratpuffer gelöst enthielten und genau wie die Proben 2 min mit jeweils 400 µl OPA-Reagenz derivatisiert wurden.

Tabelle 5: Laufmittel-Gradientenparameter für die HPLC-Vermessung der Aminosäuren: angegeben sind die Zeit und die Anteile der Laufmittel A und B im Gemisch

Zeit	Laufmittelzusammensetzung	
[min]	% A	% B
0	100	0
2	95	5
12	85	15
20	60	40
25	50	50
40	0	100
50	0	100
55	100	0
75	100	0

3.7.5 Quantifizierung der freien Aminosäuren

Die Quantifizierung der freien Aminosäuren erfolgte durch den Vergleich der Peakflächen der Probenchromatogramme mit denen der Standardchromatogramme unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungen. Die Standardlösungen enthielten Konzentrationen von 125 – 1000 ng Aminosäuren /ml.

Die in den Ergebnissen angegebenen Gehalte an freien Aminosäuren beziehen sich auf fettfreies Trockenmaterial.

3.8 Bestimmung der Oligopeptide

Die Vermessung der Oligopeptide erfolgte über ein RP-HPLC-System. Bei diesem wird ein Substanzgemisch über eine unpolare stationäre und eine polare mobile Phase getrennt, so dass zuerst die polaren und später sie unpolaren Substanzen eluiert und detektiert werden. Zum Nachweis der Oligopeptide und zur Absicherung der Ergebnisse wurde eine Hydrolyse der Extrakte mit konzentrierter Salzsäure durchgeführt. Bei der Hydrolyse werden die Peptidbindungen der Oligopeptide hydrolysiert und es entstehen freie Aminosäuren. Bei allen nach der Hydrolyse noch auftretenden Substanzpeaks im Chromatogramm handelt es sich nicht um Oligopeptide.

3.8.1 Oligopeptidextraktion

0,35 g Acetontrockenpulver wurden mit 40 ml 70 %igem wässrigem Methanol versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur zur Extraktion der Oligopeptide mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt. Anschließend wurde das Gemisch unter Vakuum filtriert (Filter: Sartolon Polyamid, Porengröße 0,45 µm, Fa. Sartorius), um die unlöslichen Acetontrockenpulverreste zu entfernen. Das Filtrat wurde zur Entfernung des Methanols am Rotationsverdampfer unter Unterdruck bei 40°C eingeengt und danach 30 min bei 4°C und mit 17.000 g zentrifugiert (RC5C Fa. Sorvall Instruments). Der daraus resultierende Überstand wurde bei –20°C gefriergetrocknet und in 1 ml 0,1 %iger Trifluoressigsäure gelöst (AMIN *et al*., 2002, VOIGT *et al*., 1993).

Anschließend wurden die Proben 15 min bei 13.000 g zentrifugiert (Zentrifuge: Biofuge fresco, Fa. Heraeus Instruments). Von dem resultierenden Überstand wurden 60 µl zur Bestimmung der Oligopeptide auf die HPLC- Säule injiziert.

Des Weiteren wurden 30 µl der Probe gefriergetrocknet und zur Aminosäurebestimmung verwendet (siehe Kap. 3.6.3).

3.8.2 HPLC-Vermessung

Das für die Auftrennung und Detektion verwendete HPLC-System bestand aus der Millenium[32] Version 3.20 Chromatography Manager Software (Fa. Waters), einem Autosampler (AS-2000, Fa. Merck Hitachi), einer Pumpe (Smartline Pump 1000, Fa. Knauer), einem dynamischen Mixer (Dynamic Mixing Chamber, Fa. Knauer) und einem Vacuum Degasser (Fa. Knauer) zur Entgasung des Laufmittels. Die Trennung erfolgte über eine Octadecylsilyl-C18-Säule (ODS, 5 µm Partikelgröße, Länge 250 mm, Innendurchmesser 4,6 mm, Fa. Restek). Detektiert wurde über einen Photo-Dioden-Array-Detektor, PDA-Detektor (Fa. Waters 996).

Laufmittel A:	0,1 %ige Trifluoressigsäure
Laufmittel B:	800 ml Acetonitril (gradient grade, Fa. Roth) mit 0,1 % Trifluoressigsäure und 200 ml Laufmittel A

Die Proben wurden 7 min isokratisch mit Laufmittels A und anschließend mit einem linearen Gradienten (0-50 % Laufmittel B) eluiert. Nach 60 min war ein Laufmittelgemisch von jeweils 50 % Laufmittel A und B erreicht. Die eluierten Oligopeptide wurden bei 210 nm vermessen. Die Säulentemperatur betrug 30°C und die Fließgeschwindigkeit 1,0 ml/min.

3.8.3 Hydrolyse der Oligopeptide

Da bei einer Wellenlänge von 210 nm nicht nur Oligopeptide detektiert werden, wurde eine Hydrolyse zum Nachweis und zur Absicherung der Oligopeptidpeaks durchgeführt. Bei allen nach der Hydrolyse noch auftretenden Substanzpeaks handelte es sich nicht um Oligopeptide. Bei der Hydrolyse werden durch die Zugabe von konz. Salzsäure die Peptidbindungen der Oligopeptide hydrolysiert, so dass freie Aminosäuren entstehen.

Zur sauren Hydrolyse wurden 0,4 ml der Oligopeptide enthaltenden Lösungen mit 0,4 ml rauchender Salzsäure (37 %), welche 2,5 % Thioglycolsäure enthielt, versetzt und 24 Stunden bei 110°C hydrolysiert (KIRCHHOFF *et al.*, 1989a).

Nach der Hydrolyse wurden die Proben durch Zugabe von Natronlauge neutralisiert, quantitativ mit Methanol in Rundkolben überführt und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde in 1 ml 0,1 %iger Trifluoressigsäure aufgenommen, 15 min bei 13.000 g zentrifugiert und anschließend genau wie die Oligopeptide mit Hilfe der HPLC vermessen.

Ein Teil des Hydrolysates wurde mit 0,1 %iger Trifluoressigsäure verdünnt, gefriergetrocknet und zur Aminosäurebestimmung verwendet (siehe Kap. 3.6.3).

3.9 Bestimmung des Proteingehaltes

3.9.1 Proteinbestimmung nach der Methode von BRADFORD

Die Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) beruht auf dem Prinzip, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 nach der Bindung an Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von $\lambda = 465$ nm zu $\lambda = 595$ nm aufweist. Die Absorption bei $\lambda = 595$ wird photometrisch gemessen. Die Verbindung zwischen dem Farbstoff und dem Protein bleibt zwischen 2 min und ca. einer Stunde stabil. Diese Methode wurde wegen ihrer Empfindlichkeit gewählt. Der Nachweisbereich liegt zwischen 0,01 und 1 mg Protein/ml.

Bradford-Stammlösung:	100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250
	50 ml Ethanol (95 %)
	100 ml 85 %ige Phosphorsäure (w/v)
	auf 200 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt

Zum Gebrauch wurde diese Stammlösung fünffach mit deionisiertem Wasser verdünnt.

Zur Proteinbestimmung wurden 2,5 mg Acetontrockenpulver in 1 ml 1 mol/l NaOH suspendiert und 10 min bei 13.000 g zentrifugiert. Von dem Überstand wurde eine zehnfache Verdünnung mit 1 mol/l NaOH hergestellt, von welcher 50 µl mit 2 ml der fünffach verdünnten BRADFORD-Lösung versetzt wurden.

Nach 15 min wurde die Extinktion der Proben bei 595 nm am Photometer vermessen.

Zur Berechnung des Proteingehaltes wurde eine Eichreihe mit Rinderserumalbumin (Fraktion V) vermessen.

3.9.2 Charakterisierung einzelner Proteine mit Hilfe der Diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970)

Die SDS-PAGE nach LAEMMLI (1970) dient dazu, verschiedene Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, sowie Information über deren Reinheit zu erhalten. Das anionische Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) bindet an die Proteine, wodurch der Protein-SDS-Komplex eine negative Nettoladung bekommt, welche proportional zum Molekulargewicht des Proteins ist. Außerdem unterbindet SDS alle nicht-kovalenten Bindungen. Das in dem Probenpuffer enthaltene 2-Mercaptoethanol dient der Reduzierung der Disulfidbrücken der Proteine.

Es wurden diskontinuierliche 10 – 20 %ige Gradientengele gegossen, mit jeweils einem 4,5 %igem Sammelgel an der Startseite.

Für die Auftrennung der Proteine aus den in Kamerun erstellten Proben wurden 4 – 20 %ige Fertig-Gradientengele (Fa. Bio Rad) verwendet.

3.9.2.1 Verwendete Puffer:

Sammelgelpuffer (pH 6,8):
- 37,85 g (0,625 mol/l) Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Fa. Serva)
- 2,92 g (20 mmol/l) EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure-dihydrat, Dinatriumsalz)
- 1 % SDS (Dodecylsulfat, Fa. Serva)
- auf 500 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt.

Trenngelpuffer (pH 8,8):
- 90,85 g (1,5 mol/l) Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
- 1,16 g (8 mmol/l) EDTA
- 0,4 % SDS
- auf 500 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt.

Laufgelpuffer: 3 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

14 g Glycin

auf 500 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt.

Zum Gebrauch wurde dieser Puffer zehnfach mit deionisierten Wasser verdünnt und es wurde 1 % SDS, bezogen auf die Endkonzentration, hinzugefügt.

SDS-Probenpuffer

(nach LAEMMLI 1970): 0,75 g (0,025 mol/l) Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (mit HCl auf pH 6,8 eingestellt)

5 g (2 %) SDS

12,5 ml (5 %) Mercaptoethanol

31,5 g (10 %) Glycerin

0,0025 g (0,001 %) Bromphenolblau

auf 250 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt.

3.9.2.2 Weitere verwendete Reagenzien und Lösungen:

Färbelösung: 1,25 g Coomassie Brilliant Blue R 250

454 ml Methanol

46 ml Eisessig

Die Färbelösung wurde vor Gebrauch fünffach mit deionisiertem Wasser verdünnt

Entfärbelösung: 100 ml Eisessig

300 ml Ethanol

mit deionisiertem Wasser auf 1 l auffüllen

Low Molecular Weight Marker (Fa. Amersham Pharmacia Biotech):

Phosphorylase b (94 kDa)

Albumin (67 kDa)

Ovalbumin (43 kDa)

Carbonic anhydrase (30 kDa)

Trypsin inhibitor (20,1 kDa)

A-Lactalbumin (14,4 kDa)

3.9.2.3 Zusammensetzung und Gießen der Gele:

4,5 %iges Sammelgel:	0,56 ml 40 %ige Polyacrylamid-Lösung (Fa. Biorad)
	0,50 ml Sammelgelpuffer (pH 6,8)
	3,82 ml deionisiertes Wasser
	5 µl TEMED (Tetramethyl-ethylendiamin)
	50 µl 10 %ige APS-Lösung (Ammoniumperoxodisulfat)
10 %iges Trenngel:	2,50 ml 40 %ige Polyacrylamid-Lösung
	2,5 ml Trenngelpuffer (pH 8,8)
	4,89 ml deionisiertes Wasser
	10 µl TEMED
	100 µl 10 %ige APS-Lösung
20 %iges Trenngel:	5 ml 40 %ige Polyacrylamid-Lösung
	2 ,50 ml Trenngelpuffer (pH 8,8)
	2,39 ml deionisiertes Wasser
	10 µl TEMED
	100 µl 10 %ige APS-Lösung

Die Lösungen für das 10 %ige und das 20 %ige Trenngel wurden in die beiden Kammern eines Gradientengelmischers (Fa. H. Hölzel) gegeben und über diesen durch die Tätigkeit einer Pumpe (Peristaltic Pump P-3, Fa. Phamacia) zu Gelen mit zunehmender Polyamidkonzentration gegossen. Die fertigen Gradientengele wurden mit Isopropanol überschichtet. Nach etwa 20 min waren die Gele ausgehärtet, das Isopropanol wurde wieder entfernt und es wurde ein 4,5 %iges Sammelgel, in welches ein Kamm für die Bildung der Geltaschen eingesetzt wurde, auf das Gradiententrenngel gegossen. Nach der Aushärtung des Sammelgels wurde das Gel in die mit Ladepuffer gefüllte Elektrophorese-Kammer eingesetzt und mit den Proben beladen.

3.9.2.4 Vorbereitung der Proben für die Gelelektrophorese:

10 mg Acetontrockenpulver wurden mit 1,5 ml Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C denaturiert. Die nicht durch SDS gelösten Substanzen wurden durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 13.000 g (Zentrifuge: Biofuge fresco, Fa. Heraeus Instruments) entfernt.

Jeweils 7,5 µl der Probenlösung und 2,5 µl des als Standard dienenden Low Molecular Weight Markers wurden in die Geltaschen gefüllt.

Im Sammelgel liefen die Proteine bei einer angelegten Spannung von 150 V, anschließend wurde die Spannung auf 200 Volt erhöht. Die Laufzeit betrug zwischen 50 und 70 min.

3.9.2.5 Färbung der Polyacrylamidgele mit Coomassie Brilliant Blue R 250:

Die Gele wurden direkt nach der elektrophoretischen Trennung in die Färbelösung gebracht und über Nacht unter leichtem Schwenken gefärbt. Durch den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R 250 lassen sich Proteine unspezifisch anfärben und werden als blaue Banden sichtbar. Die überschüssige Farbe wurde durch mehrfache Behandlung mit der Entfärbelösung ausgewaschen, bis sich die blauen Banden der Proteine deutlich vor dem hellen Hintergrund abhoben.

3.10 Bestimmung der Polyphenol- und Anthocyangehalte

3.10.1 Extraktion der Polyphenole und Anthocyane

Zu 50 mg entfettetem Kakaopulver wurden 3 ml Methanol gegeben. Die Extraktion erfolgte durch 30 sekündige Behandlung durch einen Ultraturrax (T25, Fa. Janke & Kunkel). Anschließend wurde die Probe 15 min in ein Eisbad gestellt und danach 10 min bei 5.000 U/min zentrifugiert. Der klare methanolische Überstand wurde in einen 50 ml Spitzkolben dekantiert.

Dieser Extraktionsvorgang wurde dreimal mit nur zweiminütiger Eisbehandlung und 20 bzw. 15 Sekunden dauernder Extraktion am Ultrarurrax wiederholt.

Die vereinigten Methanolextrakte wurden am Rotationsverdampfer bei 40°C und 100 mbar bis zur Trockene eingeengt und anschließend in 1,5 ml Methanol (gradient grade) aufgenommen. Nach anschließender Filtration durch einen 0,45 µm Einmalfiter (Multoclear 25 mm PTFE, Fa. CS-Chromatographie Service) wurde die Probe gegen eine Eichreihe mit Hilfe der HPLC vermessen.

Bei der Bestimmung der Epimeren Epicatechin- und des Catechingehaltes ist zu beachten, dass diese phenolischen Substanzen unter stark sauren und stark alkalischen pH-Bedingungen nicht stabil sind und sich ineinander umwandeln können (ZHU *et al.*, 2002). In dem pH-Bereich, in dem die Extraktion und die Vermessung des Epicatechins und des Catechins erfolgten, ist eine Epimerisierung jedoch unwahrscheinlich.

3.10.2 HPLC-Vermessung der Polyphenole und Anthocyane

Das für die Auftrennung und Detektion verwendete HPLC-System bestand aus einer Millenium[32] Version 3.20 Chromatography Manager Software (Fa. Waters), einem Autosampler (AS-2000, Fa. Merck Hitachi), einer Pumpe (Smartline Pump 1000, Fa. Knauer), einem Gradientenmischer (Dynamic Mixing Chamber, Fa. Knauer) und einem Vacuum Degasser (Fa. Knauer) zur Entgasung des Laufmittels. Detektiert wurde über einen Photo-Dioden-Array-Detektor (PDA-Detektor 996, Fa. Waters).

Die photometrische Detektion erfolgte innerhalb eines Wellenlängenbereiches von 225 nm bis 540 nm. Quantifiziert wurden die Polyphenole bei einer Wellenlänge von 280 nm und die Anthocyane bei einer Wellenlänge von 540 nm.

Die Trennung erfolgte über eine Lichrospher 100 RP-18 endcapped Trennsäule (LiChroCART, 5 µm Partikelgröße, Länge 250 mm, Innendurchmesser 4 mm), der eine Lichrospher 100 RP-18 endcapped Vorsäule vorgeschaltet war, bei einer Säulentemperatur von 26°C.

Zur Identifizierung der Peaks wurden Catechin, Epicatechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanodin-3-arabinosid als Referenzsubstanzen verwendet.

Es wurden jeweils 20 µl der Probe injiziert.

Laufmittel A: 2 %ige Essigsäure

Laufmittel B: Acetonitril/ deionisiertes Wasser/ Eisessig (v/v/v 400 : 90 : 10)

Die Probenelution erfolgte mit abnehmender Polarität des Laufmittels nach dem in der folgenden Tabelle 6 angegebenen Laufmittelprofil.

Tabelle 6: Laufmittelzusammensetzung, Zeit und Fließgeschwindigkeit für die Vermessung der Polyphenole und Anthocyane.

Zeit	Fließ-geschwindig-keit	Laufmittel-zusammensetzung	
[min]	[ml]	% A	% B
0	1,2	90	10
8	1,2	90	10
38	1,1	77	23
50	1,0	60	40
70	1,0	10	90
73	1,0	10	90
78	1,2	90	10
93	1,2	90	10

3.11 Bestimmung der Zuckergehalte

3.11.1 Aufarbeitung der Proben

Zu 100 mg entfettetem Kakaopulver wurde 1 ml vorgewärmtes deionisiertes Wasser gegeben. Dieses Gemisch wurde gevortext, bis sich das Kakaopulver komplett suspendiert hat und 15 min bei 99°C in einem Thermomixer (Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf) erhitzt. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 13.000 U/min zentrifugiert (Zentrifuge: Biofuge fresco, Fa. Heraeus Instruments). Der daraus resultierende Überstand wurde in einem Verhältnis von 1:4 mit Acetonitril verdünnt und durch 0,45 µm Filter (Multoclear, 25 mm PTFE, Fa. CS-Chromatographie Service) filtriert.

3.11.2 HPLC-Vermessung der Zucker

Die Auftrennung und Detektion der Zucker erfolgte über eine HPLC, welche mit einer Millenium³² Version 3.20 Chromatography Manager Software (Fa. Waters) ausgerüstet war. Diese war mit einem Autosampler (717 plus Fa. Waters), einer Pumpe (HPLC-Pump 64 mit analytischem Pumpenkopf, Fa. Knauer), einem Vacuum Degasser (Fa. Knauer) zur Entgasung des Laufmittels und einem Refraktometer (Differential Refraktometer R 401, Fa. Waters) zur Detektion der Zucker ausgestattet. Durch einen Digitalwandler (bus SAT/IN Module, Fa. Waters) wurden die am Refraktometer gemessenen Werte zur Übertragung auf die Millenium³² Chromatography Manager Software umgewandelt.

Die Trennung erfolgte über eine Hypersil APS Säule (5 µm Partikelgröße, Länge 125 mm, Innendurchmesser 4 mm, Fa. Schambeck), der eine Hypersil APS Vorsäule (5 µm Partikelgröße Länge 10 mm, Innendurchmesser 4 mm, Fa. Schambeck) vorgeschaltet war. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1,0 ml/min, die Säulentemperatur 30°C.

Die Proben wurden 13 min isokratisch mit einem Gemisch aus Acetonitril und deionisiertem Wasser (88:12) als Laufmittel aufgetrennt und anschließend refraktometrisch detektiert.

Zur Quantifizierung der Peaks wurden verschieden konzentrierte Standardlösungen, welche Glucose, Fructose und Saccharose als Referenzsubstanzen enthielten, verwendet.

Es wurden jeweils 50 µl der Probe injiziert.

3.12 Bestimmung des Theobromin- und Coffeingehaltes

3.12.1 Aufarbeitung der Proben

0,05 g entfettetes Kakaopulver wurden in einem 100 ml Meßkolben mit 80 ml kochendem destilliertem Wasser versetzt und unter gelegentlichem Schwenken 30 min. in ein siedendes Wasserbad gestellt. Anschließend wurden die Proben auf 20°C temperiert, durch Zugabe von 100 µl Carrez I-Lösung (150 g/l Kaliumhexacyanofferrat (II)-Trihydrat = $K_4[Fe(CN)6] \times 3H_2O$) und 100 µl Carrez II-Lösung (300 g/l Zinksulfatheptahydrat = $ZnSO_4 \times 7H_2O$) geklärt, mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt, gut durchmischt und durch Faltenfilter (595 ½, Fa. Schleicher & Schuell) filtriert.

3.12.2 HPLC-Vermessung des Theobromin- und Coffeingehaltes

Das für die Auftrennung und Detektion des Theobromin- und Coffeingehaltes verwendete HPLC-System war mit einer Millenium³² Version 3.20 Chromatography Manager Software (Fa. Waters), einem Autosampler (717 plus Fa. Waters), einer Pumpe (HPLC-Pump 64 mit analytischem Pumpenkopf, Fa. Knauer), einem Vacuum Degasser (Fa. Knauer) zur Entgasung des Laufmittels und einem UV-Detektor (UV-VIS Detektor L7420, Fa. Merck Hitachi) ausgestattet. Durch einen Digitalwandler (bus SAT/IN Module, Fa. Waters) wurden die am UV-Detektor gemessenen Werte zur Übertragung auf die Millenium³² Chromatography Manager Software umgewandelt.

Die Trennung erfolgte über eine LiChrospher® 60RP select B Säule (5 µm Partikelgröße, Länge 250 mm, Innendurchmesser 4 mm), der eine LiChrospher® 60RP select B Vorsäule (5 µm

Partikelgröße) vorgeschaltet war. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1,2 ml/min, die Säulentemperatur 30°C.

Die Proben wurden isokratisch mit einem Gemisch aus Acetonitril, Methanol und 0,02 mol/l KH_2PO_4-Puffer, pH 4 (v+v+v, 7:3:90) aufgetrennt und anschließend über den UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 274 nm detektiert.

Zur Identifizierung der Peaks wurden verschieden konzentrierte Standardlösungen, welche Theobromin und Coffein als Referenzsubstanzen enthielten, verwendet.

Es wurden jeweils 20 µl der Probe injiziert.

3.13 Bestimmung der Polyamine

Die Extraktion und chromatographische Trennung der Polyamine erfolgte nach einer veränderten Methode von LEWIS (2003).

3.13.1 Extraktion der Polyamine

0,1 g fettfreies Material wurden in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 1 ml eisgekühlter 5 %iger Perchlorsäure 1 min gevortext, danach 20 min auf Eis stehen gelassen, nochmals 1 min gevortext und weitere 20 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurden die Proben 20 min bei 13.000 U/min und 4°C zentrifugiert (Zentrifuge: Biofuge fresco, Fa. Heraeus Instruments).

3.13.2 Dansylierung der Proben

Zur Dansylierung wurden 200 µl des nach der Zentrifugation der extrahierten Proben entstandenen Überstandes in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 200 µl gesättigter Natriumcarbonatlösung versetzt. Nach der Zugabe von 400 µl Dansylchloridlösung (10 mg/ml Aceton, Fa Fluka) und einem 10 sekündigem Vortexen wurden die Proben zur Dansylierung 1 Stunde bei 60°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 100 µl einer Prolinlösung (100 mg/ml destilliertes Wasser) zur Bindung des überschüssigen Dansylchlorides zugefügt, und die Proben wurden nach 15 sekündigen Vortexen erneut 30 min bei 60°C im Dunkeln inkubiert.

Nach der zweiten Inkubation wurden 500 µl Toluol zur Extraktion der dansylierten Polyamine hinzugefügt. Die Extraktion erfolgte durch 30 sekündiges Vortexen. Es wurden 600 µl der oberen organischen Phase abgenommen und in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt.

Die im Toluol gelösten Dansylderivate wurden entweder durch eine ca. 20 minütige Begasung mit Stickstoff oder durch eine 2-tägige Lagerung im Trockenschrank bei 35°C getrocknet.

Nach dem Trocknen wurden die Polyamine in 500 µl Acetonitril aufgenommen, 30 Sekunden gevortext, kurz im Ultraschallbad behandelt und zur Vermessung über die HPLC in mit Teflondeckeln verschlossenen HPLC-Vials überführt.

3.13.3 HPLC-Vermessung der Polyamine

Das für die Auftrennung und Detektion verwendete HPLC-System bestand aus einer Millenium³² Version 3.20 Chromatography Manager Software (Fa. Waters), einem Autosampler (AS-2000, Fa. Merck Hitachi), einer Pumpe (Smartline Pump 1000, Fa. Knauer), einem Gradientenmischer (Dynamic Mixing Chamber, Fa. Knauer), einem Vacuum Degasser (Fa. Knauer) zur Entgasung des Laufmittels und einem Temperatur Control Modul (Fa. Waters) mit dazugehörigem Säulenofen. Detektiert wurde über ein Fluorescence Spektrometer (F-1050, Fa. Merck Hitachi). Durch einen Digitalwandler (bus SAT/IN Module, Fa. Waters) wurden die am Fluorescence Spektrometer gemessenen Werte zur Übertragung auf die Millenium³² Chromatography Manager Software umgewandelt.

Die Vermessung der Polyamine am Fluorescence Spektrometer erfolgte bei einer Anregung von 337 nm und einer Emission von 492 nm.

Die Trennung erfolgte über eine LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm Partikelgröße, Länge 250 mm, Innendurchmesser 4 mm) Trennsäule, der eine LiChrospher® 100 RP-18 Vorsäule vorgeschaltet war, bei einer Säulentemperatur von 50°C. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min.

Es wurden jeweils 25 µl der Probe injiziert.

Laufmittel A: Wasser (gradient grade)

Laufmittel B: Acetonitril

Die Probenelution erfolgte nach dem in Tabelle 7 angegebenen Laufmittelprofil.

Tabelle 7: Laufmittelprofil für die Vermessung der Polyamine.

Zeit	Laufmittelzusammensetzung	
[min]	% A	% B
0	40	60
30	10	90
35	0	100
40	100	0
45	40	60
50	40	60

3.13.4 Quantifizierung der Polyamine

Zur Identifizierung der Peaks wurden Spermin (Fluka), Spermidin (Fluka), Putrescin (1,4-Diaminobutan, Fluka) und Cadaverin (Fluka) als Referenzsubstanzen verwendet.

Von diesen Referenzsubstanzen wurden 1 mmol/l Lösungen in 0,2 mol/l Perchlorsäure hergestellt. Von diesen Polyaminlösungen wurden jeweils 200 µl zur Dansylierung verwendet. Die Dansylierung der Standards erfolgte auf dieselbe Weise wie die der Proben.

3.14 Aktivität der Polyphenoloxidasen

Bei der Polyphenoloxidase (PPO) handelt es sich um ein kupferhaltiges Enzym, welches die Oxidation von o-Diphenolen zu o-Dichinonen unter Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser katalysiert. Die PPO ist in lebenden Zellen als membranassoziiertes Protein in der Thylakoidmembran der Plastiden lokalisiert. Bei Zellzerstörung wird die PPO aktiv und reagiert mit gleichzeitig aus der Vakuole freigesetzten phenolischen Substanzen in Gegenwart von Sauerstoff.

Da die PPO bei der Oxidation von o-Diphenolen zu Chinonen Sauerstoff verbraucht, läßt sich die Enzymaktivität über den Sauerstoffverbrauch mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode (Fa. Yellow Springs Instruments) bestimmen. Die Messung mit der Sauerstoffelektrode beruht auf dem Clarke-Prinzip. Dabei diffundiert der Sauerstoff aus der Meßlösung durch eine Teflonmembran in den Elektrodenraum, der von einer zentralen Kathode, einer ringförmigen Anode und KCl-Lösung gebildet wird. An der Kathode wird der Sauerstoff durch die angelegte Gleichspannung unter Elektronenverbrauch reduziert. Dadurch wird ein Stromfluss ausgelöst, dessen Stärke proportional zum Sauerstoffpartialdruck ist. Die Messwerte wurden mit einem Flachbettschreiber aufgezeichnet.

Die Kalibrierung des Systems erfolgte bei 25°C mit 3 ml luftgesättigtem Phosphatpuffer nach SÖRENSEN. Nach MEYER (1975) sind unter diesen Bedingungen in 3 ml Phosphatpuffer 0,67 µmol Sauerstoff gelöst.

Als Standardsubstrat für die Sauerstoffverbrauchsmessung diente 4-Methylcatechol (Fa. Fluka). Da 4-Methylcatechol bei einem pH-Wert von 6,4 auch chemisch durch Sauerstoff oxidiert wird, musste vor jeder Messreihe die sogenannte Autoxidation von 4-Methylcatechol bestimmt und anschließend von den Messwerten abgezogen werden.

Die Messungen fanden bei 25°C statt, d.h. der mit Luft begaste SÖRENSEN-Puffer und das 4-Methylcatechol wurden auf 25°C temperiert. Die Enzymreaktion wurde stets nach zweiminütigem Rühren der Enzymsuspension im Puffer durch Zugabe der Substratlösung gestartet und der Sauerstoffverbrauch über einen Zeitraum von etwa 6 min mit einem Flachbettschreiber dokumentiert.

3.14.1 Verwendete Puffer- und andere Lösungen:

SÖRENSEN-Puffer, 67 mmol/l, pH 6,4:

KH_2PO_4-Lösung: 9,078 g/l (c = 67 mmol/l)

Na_2HPO_4-Lösung: 9,511 g/l (c = 67 mmol/l)

Durch Mischen von 738 ml der KH_2PO_4-Lösung und 262 ml der Na_2HPO_4-Lösung entsteht der SÖRENSEN-Puffer.

Cyanidhaltiger SÖRENSEN-Puffer, pH 6,4

82,5 mg KCN (c = 5 mmol/l im fertigen Puffer)

48,0 mg 85 %ige H_3PO_4 (c = 1,7 mmol/l im fertigen Puffer)

250 ml SÖRENSEN-Puffer (pH 6,4)

Standardsubstratlösung: 56 mg 4-Methylcatechol auf 2 ml deionisiertes Wasser

3.14.2 Aufbereitung der Proben für die PPO-Aktivitätsbestimmung:

Die Kotyledonen eines Kakaosamens wurden gewogen und zusammen mit 0,1 g Polyvinyl-polypyrrolidon (PVPP) nach Zugabe von 10 ml eisgekühltem cyanidhaltigen SÖRENSEN-Puffer mittels eines Ultraturraxes (T25, Fa. Janke & Kunkel) zerkleinert. Anschließend folgte eine dreißigminütige Zentrifugation der Suspension bei 14.000 g (RC5C Fa. Sorvall Instruments). Es wurde sowohl die PPO-Aktivität im Sediment als auch die im Überstand gemessen.

Zur Vermessung der PPO-Aktivität im Sediment wurden jeweils 50 bis 100 mg von diesem genommen und in 1 ml SÖRENSEN-Puffer suspendiert. Je nach Höhe der PPO-Aktivität wurde diese Suspension mit SÖRENSEN-Puffer weiterverdünnt und zur Messung der Enzymaktivität verwendet.

Zur Vermessung der PPO-Aktivität im Überstand wurde der cyanidhaltige Überstand über PD-10 Säulen (Sephadex™ G-25M, Fa. Amersham Biosciences) vom Cyanid gereinigt. Hierfür wurden die PD-10 Säulen zunächst mit 25 ml SÖRENSEN-Puffer equilibriert. Anschließend wurden 2,5 ml der Probelösung auf die Säule gegeben, welche mit 3,5 ml SÖRENSEN-Puffer wieder eluiert wurden. Die so erhaltene von Cyanid gereinigte Probe wurde, je nach Höhe der PPO-Aktivität, weiterverdünnt und zur Messung der Enzymaktivität verwendet.

Ansatz zur Messung der Autoxidation:

2,9 ml luftgesättigter SÖRENSEN-Puffer (pH 6,4)

100 µl 4-Methylcatechol-Lösung

Reaktionsansatz zur Messung der Enzymaktivität:

2,7 ml SÖRENSEN-Puffer (pH 6,4)

200 µl Enzymsuspension

100 µl 4-Methylcatechol-Lösung

3.14.3 Auswertung der Messergebnisse:

Die Bestimmung der PPO-Aktivität erfolgte durch eine graphische Auswertung der aufgezeichneten Schreiberspuren. Die Steigung der Kurve wurde an dem Punkt, der 45 Sekunden nach der Substratzugabe entspricht, durch das Anlegen einer Tangente an die Kurve ermittelt. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da einerseits zu Beginn der Messung Störungen durch das Zupipettieren auftreten, aber andererseits der Substratumsatz zum Reaktionsstart am größten ist, da die Enzymaktivität durch Gerbung des Enzyms mit dem Substrat schnell nachlässt. Nach 45 Sekunden hat sich ein Gleichgewicht zwischen der Sauerstoffdiffusion zur und in der Elektrode und dem Sauerstoffverbrauch durch die Substratoxidation eingestellt. Die Steigung wurde in Prozent Sauerstoffverbrauch pro Zeiteinheit ermittelt. Hiervon wurde die Autoxidationsrate abgezogen. Nach MEYER (1975) entspricht ein Sauerstoffverbrauch von 1 % pro Stunde 6,7 nmol pro Stunde.

3.15 Bestimmung der Proteaseaktivitäten

3.15.1 Extraktion und Aktivitätstest der Aspartylendoprotease

3.15.1.1 Extraktion der Aspartylendoprotesae

Zu 20 mg fettfreiem Kakaopulver wurden 20 mg Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP, Fa. Fluka) und 1 ml Boratpuffer gegeben. Der Ansatz wurde kurz gevortext und 1 Stunde bei 4°C in einem Thermomixer (Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf) bei 12.000 U/min inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Proben 10 min bei 13.000 U/min und 4°C zentrifugiert (Zentrifuge: Biofuge fresco, Fa. Heraeus Instruments). Der daraus resultierende Überstand wurde für die Aktivitätstests auf Aspartylendoprotease verwendet.

3.15.1.2 Aktivitätstest der Aspartylendoprotease

Von jeder Probe wurde neben dem Aktivitätstest noch eine Kontrolle durchgeführt, bei der die Aktivität der Aspartylendoprotease durch Pepstatin A gehemmt wurde.

Reaktionsansätze:

- Messung der Enzymaktivität: 100 µl Enzymextrakt + 100 µl destilliertes Wasser
- Kontrolle: 100 µl Enzymextrakt + 100 µl Pepstatin A-Lösung

Diese Reaktionsansätze wurden 10 min bei 35°C im Thermomixer bei 12.000 U/min inkubiert. Anschließend wurden 800 µl der BSA-Lösung als Substrat dazugegeben und es folgte eine weitere Inkubation für 2 Stunden bei 42°C im Thermomixer bei 12.000 U/min.

Aschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 200 µl eisgekühlter Trichloressigsäure (250 g/l) abgebrochen. Die Proben wurden für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

3.15.1.3 Verwendete Puffer und Lösungen

Boratpuffer pH 9: 50 mmol/l Natriumtetraborat-Lösung, mit 10 mol/l NaOH auf pH 9 eingestellt.

Phosphat-Citrat-Puffer (nach McIlvaine) pH 3,0:

Lösung A: 100 mmol/l Citronensäure-Lösung

Lösung B: 200 mmol/l di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung

Lösung A wurde mit Lösung B auf pH-Wert 3,0 eingestellt.

BSA-Lösung: 6,25 mg Rinderserumalbumin (BSA Fraktion V) in 1 ml McIlvaine Puffer pH 3,0

Pepstatin A-Stammlösung (zur Inhibierung der Proteaseaktivität):

1 mg Pepstatin A (Fa. Serva) in 1 ml Methanol

Vor Gebrauch wurde diese Pepstatin A-Stammlösung 1:20 mit McIlvaine Puffer pH 3,0 verdünnt.

3.15.2 Extraktion und Aktivitätstest der Carboxypeptidase

3.15.2.1 Extraktion der Carboxypeptidase

Zu 20 mg fettfreiem Kakaopulver wurden 20 mg Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP, Fa. Fluka) und 1 ml Extraktionspuffer gegeben. Das Ganze wurde kurz gevortext und 1 Stunde bei 4°C in einem Thermomixer (Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf) bei 12.000 U/min inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Proben 10 min bei 13.000 U/min und 4°C zentrifugiert (Zentrifuge: Biofuge fresco, Fa. Heraeus Instruments). Der daraus resultierende Überstand wurde für die Aktivitätstests der Carboxypeptidase verwendet.

3.15.2.2 Aktivitätstest der Carboxypeptidase

Von jeder Probe wurde neben dem Aktivitätstest noch eine Kontrolle durchgeführt, bei der die Aktivität der Carboxypeptidase durch eine PMSF-Lösung (Phenylmethansulfonsäurefluorid) gehemmt wurde.

Reaktionsansätze:

- Messung der Enzymaktivität: 100 µl Enzymextrakt
  + 860 µl McIlvaine-Puffer pH 5,6
  + 40 µl Substratstammlösung

- Kontrolle: 100 µl Enzymextrakt
+ 25 µl PMSF-Stammlösung
+ 835 µl McIlvaine-Puffer pH 5,6
+ 40 µl Substratstammlösung

Diese Reaktionsansätze wurden 2 Stunden bei 42°C im Thermomixer bei 12.000 U/min inkubiert.

Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 200 µl eisgekühlter Trichloressigsäurelösung (250 g/l) abgebrochen. Die Proben wurden 10 min auf Eis gestellt und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

3.15.2.3 Verwendete Puffer und Lösungen

Phosphat-Citrat-Puffer pH 6,8:

Lösung A: 10 mmol/l Citronensäure-Lösung

Lösung B: 20 mmol/l di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung

Lösung A wurde mit Lösung B auf pH-Wert 6,8 eingestellt.

Extraktionspuffer für die Carboxypeptidase:

0,5 mol/l Natriumchlorid-Lösung

0,5 % Triton X-100

7,29 µmol/l Pepstatin A

mit Phosphat-Citrat-Puffer pH 6,8 auf 100 ml aufgefüllt

Phosphat-Citrat-Puffer (nach McIlvaine) pH 5,6:

Lösung A: 100 mmol/l Citronensäure-Lösung

Lösung B: 200 mmol/l di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung

Lösung A wurde mit Lösung B auf pH-Wert 5,6 eingestellt.

Substratstammlösung: 125 µmol Z-Dipeptide (Z-Phe-Ala-OH, Fa. Bachem) in 1 ml Methanol (dies entspricht einer Konzentration von 5 mmol/l im Reaktionsansatz)

PMSF-Stammlösung: 10 mg PMSF (Phenylmethansulfonsäurefluorid, Fa. Sigma) in 1 ml Methanol (dies entspricht einer Konzentration von 1,44 mmol/l im Reaktionsansatz)

3.15.3 Photometrische Vermessung der Proteaseaktivitäten

Die photometrische Vermessung der Proteaseaktivität erfolgte durch den TNBS-Nachweis (Trinitro-benzolsulfonsäure) der α-Aminogruppen, welche durch die Proteaseaktivität während der durchgeführten Aktivitätstests an den Substraten entstanden sind.

3.15.3.1 TNBS-Reaktionsansätze und photometrische Bestimmung der Proteaseaktivitäten

Die in den Aktivitätstests hergestellten und bei -20°C eingefrorenen Proben wurden aufgetaut und 20 min bei 13.000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Der hieraus resultierende Überstand wurde für die TNBS-Reaktionsansätze verwendet.

TNBS-Reaktionsansätze:

150 µl der Probe

600 µl Natriumboratpuffer

100 µl TNBS-Lösung

Die Reaktionsansätze wurden 60 min bei 30°C im Wasserbad (Fa. Köttermann) unter leichtem Schütteln inkubiert.

Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1,6 ml 1 mol/l Salzsäure abgebrochen.

Die photometrische Vermessung erfolgte gegen einen Reagenzienblindwert bei einer Wellenlänge von 340 nm.

Zur Ermittlung der Proteaseaktivitäten wurde parallel eine Kalibrierreihe mit verschieden konzentrierten Leucin-Lösungen vermessen.

Die Leucin-Lösungen wurden genau wie die Proben in Reaktionsansätzen mit TNBS behandelt. Hierfür wurden von den Leucin-Lösungen 150 µl mit 600 µl Natriumboratpuffer und 100 µl TNBS-Lösung 30 min bei 30°C im Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte der Reaktionsstop durch die Zugabe von 1,6 ml 1 mol/l Salzsäure und die photometrische Vermessung bei einer Wellenlänge λ = 340 nm.

3.15.3.2 Verwendete Puffer und Lösungen

Natriumboratpuffer pH 9,75: 4 % Natriumborat-Lösung, mit 10 mol/l NaOH auf pH 9,75 eingestellt

TNBS-Lösung: 0,3 % TNBS-Lösung (Trinitro-benzolsulfonsäure, Fa. Fluka)

Leucin-Stammlösung: 10 mmol/l Leucin-Lösung (Fa. Sigma)

Aus dieser Stammlösung wurden Leucin-Lösungen mit Konzentrationen von 2,5 mmol/l, 1,25 mmol/l, 0,625 mmol/l, 0,312 mmol/l, 0,156 mmol/l und 0,078 mmol/l hergestellt.

4 Ergebnisse

Im Zuge dieser Arbeit wurde der Verlauf der frühen Keimung von Kakaosamen mit der fermentationsähnlichen Inkubation verglichen. Die Untersuchung des Keimungs- und des Inkubationsverlaufes erfolgte durch die Analyse der Proben auf unterschiedliche Parameter, so dass durch den Vergleich der Keimung mit der Fermentation anhand dieser Parameter Indikatoren für die frühe Keimung bzw. Fermentation erstellt werden sollten. Als mögliche Parameter wurden der Abbau der Speicherproteine, der damit verbundene Anstieg der freien Aminosäuren und der Oligopeptide sowie die für den Abbau der Proteine verantwortliche proteolytische Aktivität der Proteasen untersucht. Des Weiteren erfolgte eine Analyse der Polyphenole, welche in frischen Kakaosamen 12-18 % des Trockengewichtes ausmachen, und der für die enzymatische Oxidation der Polyphenole verantwortlichen Polyphenoloxidasen (PPO). Zusätzlich wurde der Gehalt an γ-Aminobuttersäure, an für die spätere Aromabildung wichtigen Zuckern, an Purinen und an Polyaminen untersucht.

Der Ergebnisteil dieser Arbeit ist in drei Teile unterteilt. In dem ersten Teil werden die untersuchten Parameter im Verlauf der frühen Keimung und im zweiten Teil im Verlauf der Inkubation behandelt. Im dritten Teil werden die Ergebnisse aus den beiden ersten Teilen gegenübergestellt und miteinander verglichen, so dass Parameter herausgearbeitet werden, die die frühe Keimung bzw. Inkubation kennzeichnen.

Die Ergebnisse sind in Form von Grafiken dargestellt, deren genaue Zahlengrundlage im Anhang zu finden ist.

Wenn in Tabellen bei 2 oder 3 Parallelansätzen die Standardabweichung neben dem Mittelwert als Maß für die Streuung der Einzelwerte angegeben ist, so dient dies einzig dem Zweck, Tabellen leichter lesbar zu gestalten, weniger, um statistische Sicherheit darzulegen.

4.1 Keimungsverläufe

Zur Untersuchung der Keimungsverläufe wurden Keimungsversuche mit Samen aus Früchten unterschiedlicher Genotypen in Hamburg und in Yaounde, Kamerun durchgeführt. Die Samen wurden ohne Testa zur Keimung ausgelegt. Die in Hamburg durchgeführten Keimungsversuche fanden bei konstanter Temperatur in einer Klimakammer statt. In Yaounde fanden sie bei Raumtemperatur statt, welche je nach Tageszeit und Wetter unterschiedlich war.

4.1.1 Entwicklung der Samen während der frühen Keimung

Schon nach dem ersten Tag der Keimung wurde die Radikula hervorgeschoben (Abbildung 20 bis Abbildung 26). Nach sechstägiger Keimung war die Sämlingsachse bei den meisten Samen bereits über einen Zentimeter lang. Bei den in der Klimakammer durchgeführten Keimungsversuchen verlief die Entwicklung der Sämlingsachsen gleichmäßiger und schneller als bei den in Yaounde bei Raumtemperatur durchgeführten Keimungsreihen.

Die verhältnismäßig großen Samen des Genotypen ICS 40 (siehe Kapitel 4.2.1.2) keimten langsamer als die kleineren Samen der anderen untersuchten Genotypen. Das schnellste Wachstum der Sämlingsachsen wiesen die kleinsten Samen des Genotypen T 79/501 auf.

Neben den unterschiedlichen Genotypen wurden Samen von verschiedenen German Cocoa-Früchten zur Keimung ausgelegt. Diese verhältnismäßig kleinen Samen keimten relativ schnell. Zudem wiesen einige Sämlingsachsen dieser Samen im oberen Teil eine rote Färbung auf, welche schon in den ersten Tagen der Keimung zu beobachten war. Besonders auffallend war diese rote Färbung bei den Samen aus den roten German Cocoa-Früchten (GcR-K1, Abbildung 23). Auch die Sämlingsachsen der Samen der Catongofrüchte waren rot gefärbt. Die Samen des Catongos keimten sehr langsam, obwohl sie verhältnismäßig klein waren (Abbildung 26).



Abbildung 18: Entwicklung der Keimwurzel von Samen der Genotypengruppe WAA während der Keimung über einen Zeitraum von 12 Tagen.
a) bis e) Tag 0-4, f) Tag 6, g) Tag 8, h) Tag 10, i) Tag 12

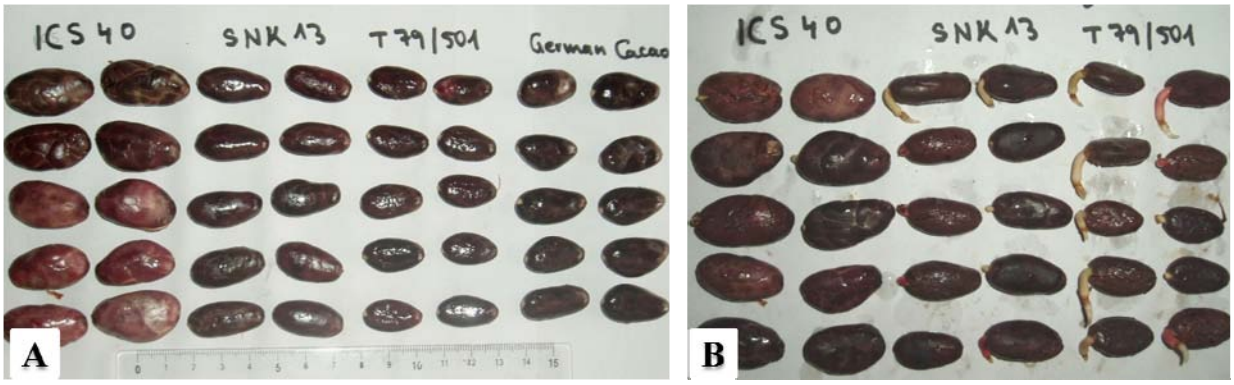


Abbildung 19: Vergleich der Entwicklung von Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung.
A) vor der Keimung, B) nach 6-tägiger Keimung



Abbildung 20: Keimung von Kakaosamen des Genotyps SNK 13.
a) bis f) Tag 1 bis 6 der Keimung

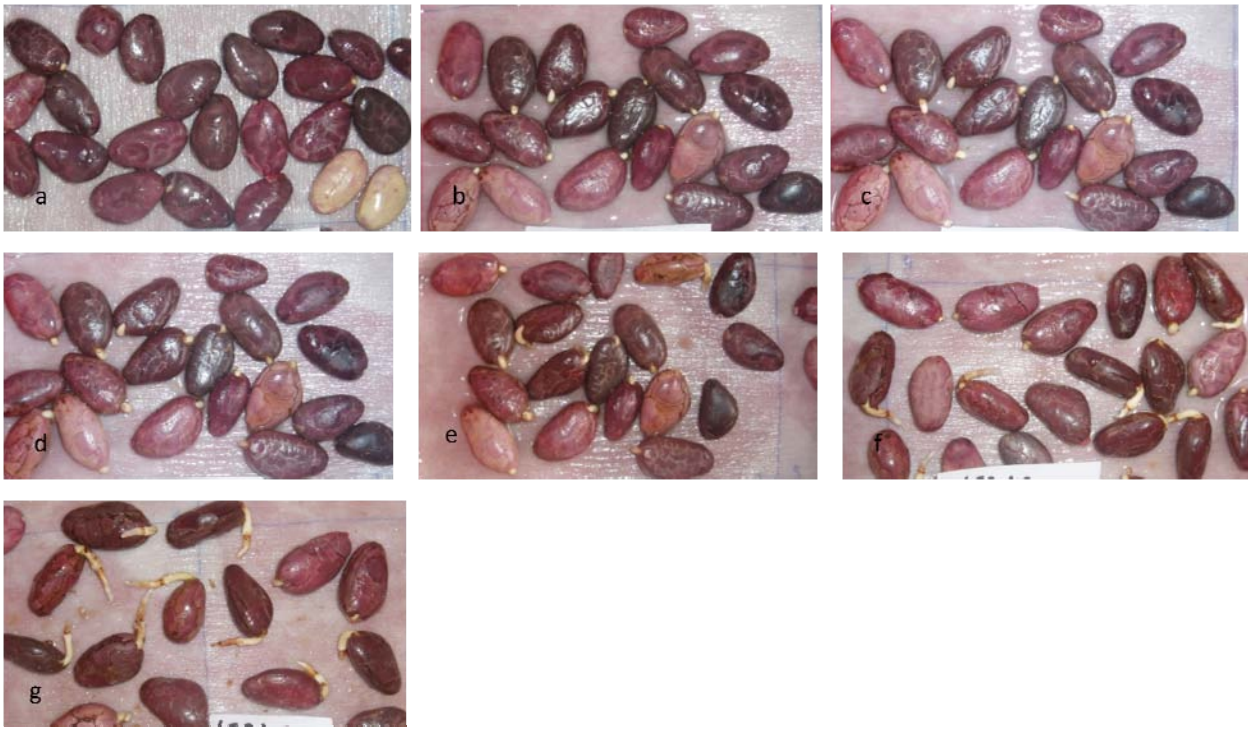


Abbildung 21: Keimung von Kakaosamen des Genotyps ICS 40.
a) bis g) Tag 0 bis 6 der Keimung
Die Samen des Genotypen ICS 40 wiesen sehr unterschiedliche Färbungen auf. Für die folgenden Analysen wurden nur die violetten Samen verwendet.

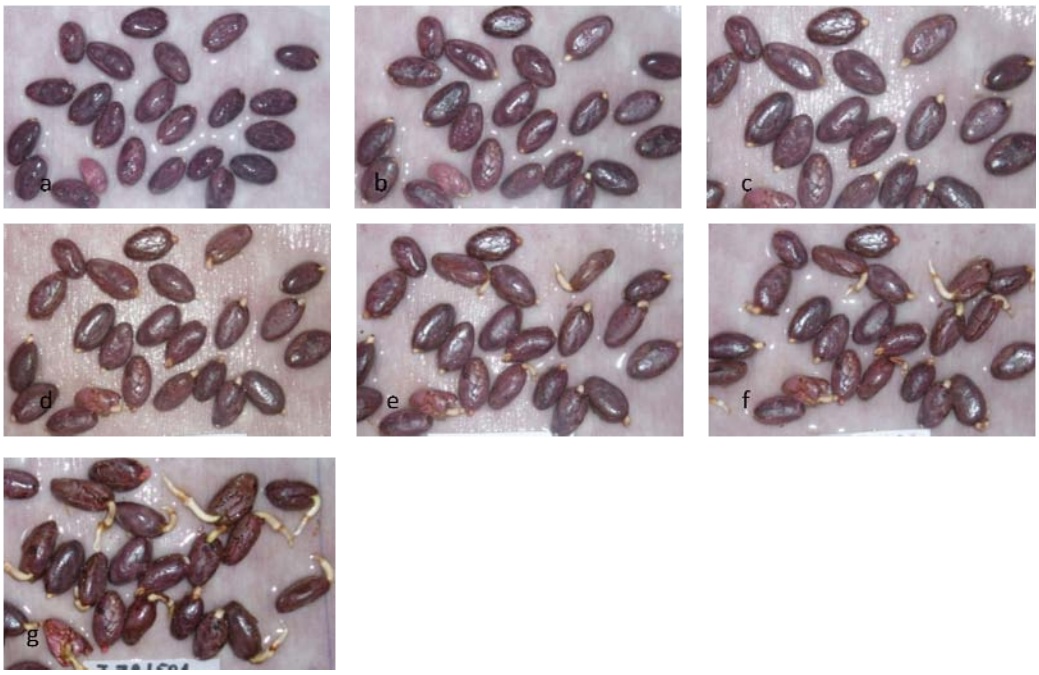


Abbildung 22: Keimung von Kakaosamen des Genotyps T 79/501.
a) bis g) Tag 0 bis 6 der Keimung



Abbildung 23: Keimung von Kakaosamen des German Cocoas (GcR-K1).
a) bis g) Tag 0 bis 6 der Keimung
Die Keimwuzeln dieser German Cocoa-Samen wiesen ab dem ersten Tag der Keimung eine intensive Rotfärbung im oberen Teil der Sämlingsachse auf.

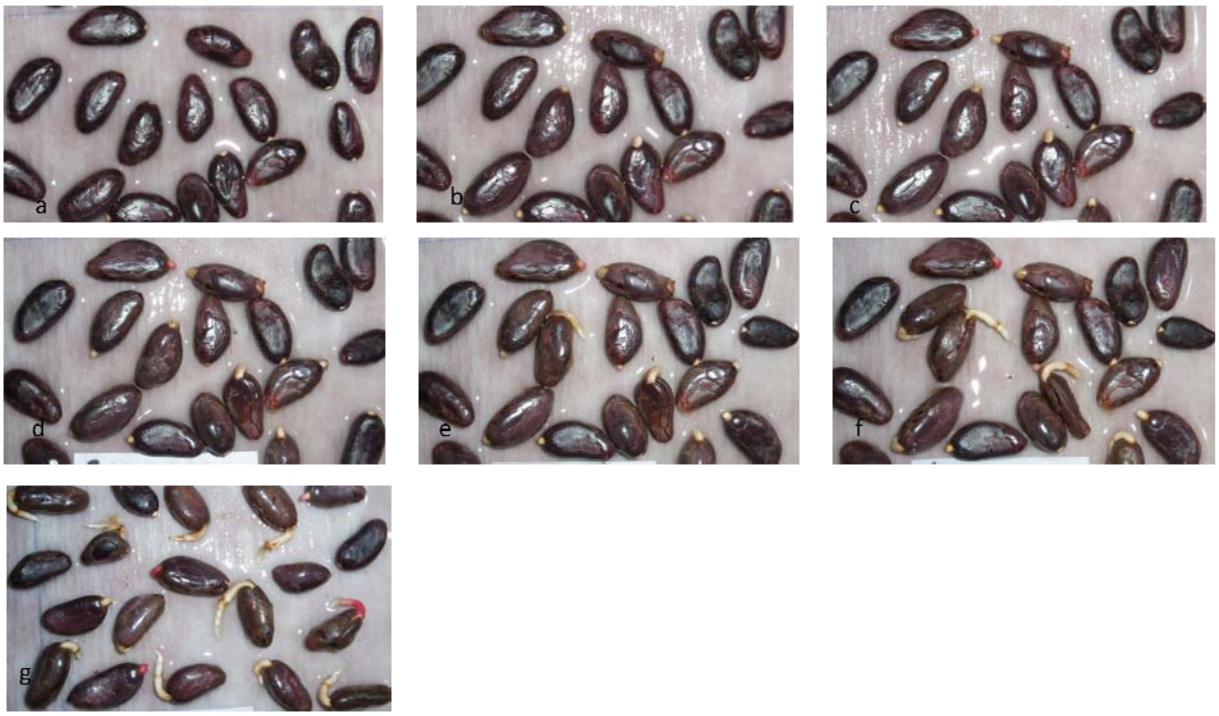


Abbildung 24: Keimung von Kakaosamen des German Cocoas (GcG-K1).
a) bis g) Tag 0 bis 6 der Keimung
Zum Teil wiesen die Keimwuzeln dieser German Cocoa-Samen eine Rotfärbung im oberen Teil der Sämlingsachse auf.



Abbildung 25: Keimung von Kakaosamen des German Cocoas (GcA-K3).
a) bis g) Tag 0 bis 6 der Keimung
Zum Teil wiesen die Keimwuzeln dieser German Cocoa-Samen eine Rotfärbung im oberen Teil der Sämlingsachse auf.

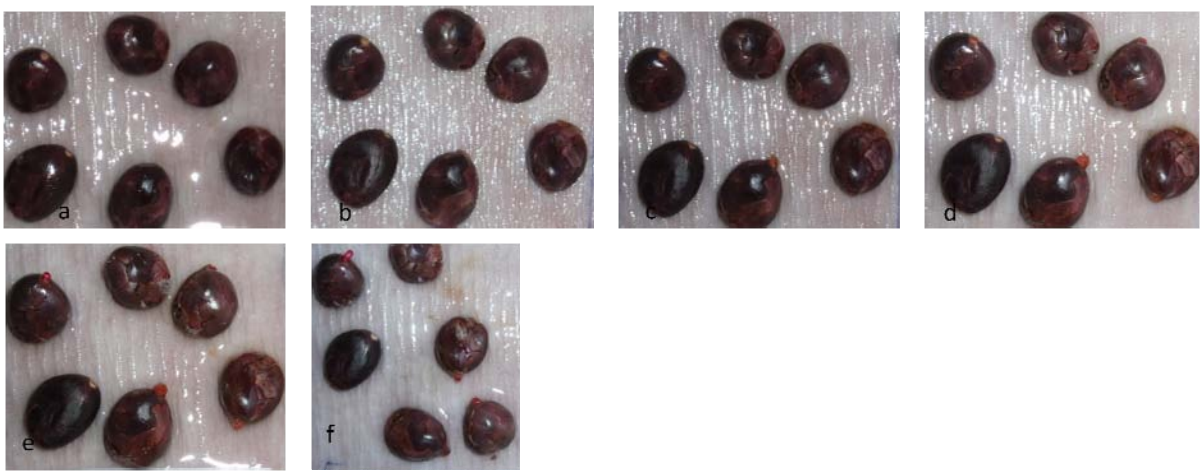


Abbildung 26: Keimung von Samen des Catongos.
a) bis f) Tag 0 bis 5 der Keimung

4.1.2 Wasseraufnahme, Wassergehalt und pH-Wert von Kakaosamen

4.1.2.1 Wasseraufnahme

Zur Untersuchung der Wasseraufnahme der Kotyledonen während der ersten Tage der Keimung wurden Kakaosamen -von jeder Probe fünf Samen mit und fünf Samen ohne Testa- zur Keimung ausgelegt. Es wurde nur die Wasseraufnahme der Kotyledonen, nicht die der Pulpa oder der quellfähigen Schleime untersucht. Vor Beginn der Keimung wurde die Pulpa weitgehend entfernt und vor jedem Wiegen wurden die Samen gründlich mit einem Papiertuch getrocknet.

Bei den Samen ohne Testa fand sofort nach Beginn der Keimung eine Wasseraufnahme statt, welche anhand der Gewichtszunahme ermittelt wurde. Die höchste Wasseraufnahme erfolgte innerhalb der ersten 24 Stunden (Abbildung 27 bis Abbildung 29).

Bei den mit Testa ausgelegten Samen erfolgte eine verzögerte Wasseraufnahme. Zu Beginn der Keimung nahm das Gewicht der Samen zunächst ab. Dies kann zum Teil an einem Abbau der eventuell vorhandenen Restpulpa liegen. Erst ab dem dritten Tag war eine mit einer Wasseraufnahme verbundene Gewichtszunahme der Samen zu erkennen. Dies zeigt, dass die Testa eine Barriere darstellt, welche die frühe Wasseraufnahme in den Samen verzögert.

In der ersten Phase der Keimung kommt es zu einem Wachstum der Keimwurzel. Dieses ist vor allem mit einer Streckung der Zellen, weniger mit einer Zunahme der Biomasse oder mit Zellteilungen verbunden.

Da für die in den folgenden Abbildungen gezeigten Verläufe Mittelwerte der Gewichtszunahmen von jeweils 5 Einzelsamen angegeben sind, welche unterschiedliche Anfangsgewichte und dementsprechend unterschiedliche Verläufe der Gewichtszunahme aufwiesen, erklärt sich die relativ hohe Standardabweichung.

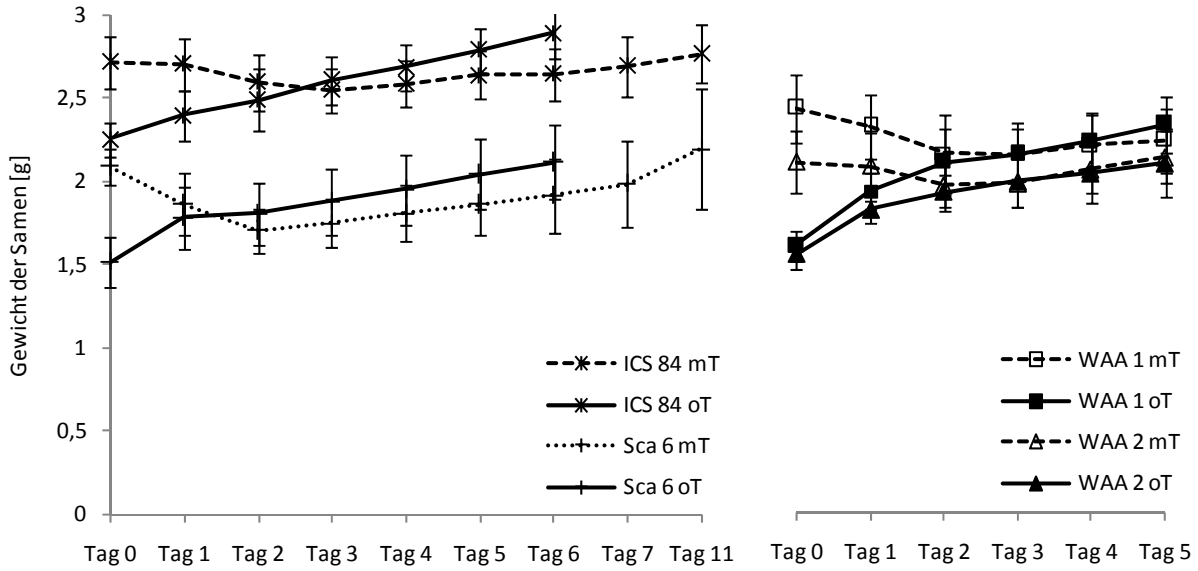


Abbildung 27: Gewicht der Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung.
Die Samen wurden mit (mT) bzw. ohne Testa (oT) bei 25°C zum Keimen ausgelegt. Die Samen des Genotyps Sca 6 waren noch unreif. Angegeben sind die Mittelwerte der Gewichte von jeweils 5 Einzelsamen mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

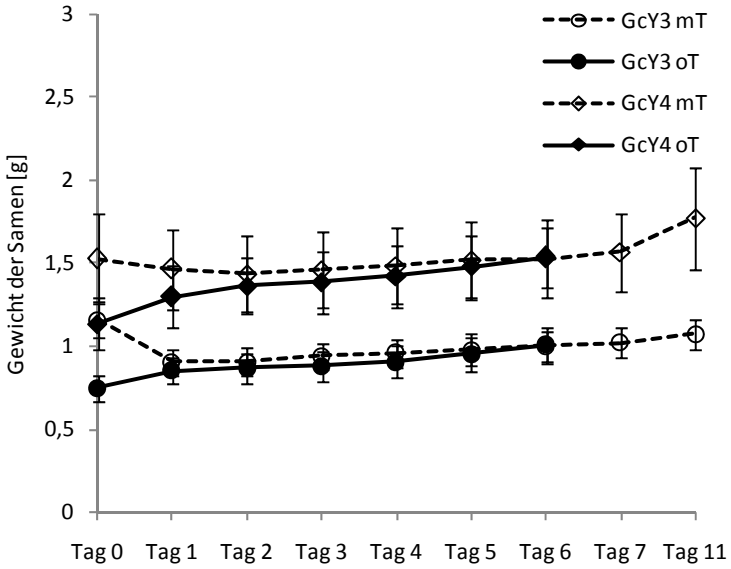


Abbildung 28: Gewicht der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte im Verlauf der Keimung.
Die Samen wurden mit (mT) bzw. ohne Testa (oT) bei 25°C zum Keimen ausgelegt. Angegeben sind die Mittelwerte aus den Verläufen der Gewichtszunahme von jeweils 5 Einzelsamen mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

In Abbildung 29 wird der unterschiedliche Verlauf der Gewichtszunahme der mit und ohne Testa gekeimten Samen verdeutlicht.

Die prozentuale Gewichtszunahme der ohne Testa gekeimten Samen war in den ersten 24 Stunden am höchsten, so dass das Gewicht der Samen nach eintägiger Keimung etwa 6 bis 20 % höher war als zu Beginn der Keimung. In den folgenden Tagen verlief die Gewichtszunahme etwas geringer.

Nach fünftägiger Keimung war das Gewicht der Samen um 24 bis 45 % höher als zu Beginn der Keimung.

Bei den mit Testa gekeimten Samen nahm das Gewicht in den ersten ein bis zwei Tagen der Keimung ab. Dies kann zum einen daran liegen, dass die Restpulpa abgebaut wurde und zum anderen daran, dass sie durch das Trocknen mit dem Papiertuch, welches zum Entfernen des Wassers vor dem Wiegen erfolgte, entfernt wurde. Nach zweitägiger Keimung lag das Gewicht um 5 bis 22 % unter dem Ausgangsgewicht dieser Samen. Erst ab dem dritten Tag nach Keimungsbeginn stieg das Gewicht wieder an. Diese Gewichtszunahme verlief jedoch sehr gering. Je nach Probe war erst nach fünf- bis elftägiger Keimung eine reale Gewichtszunahme gegenüber dem Anfangsgewicht der Samen zu verzeichnen. Am größten war die anfängliche Gewichtsabnahme bei den Samen der Probe GcY3 mT. Nach 24 Stunden betrug sie hier 22 %. In den Samen dieser Probe lag das Gewicht auch nach elftägiger Keimung noch unter dem Anfangsgewicht.

Dadurch, dass die Samen vor jedem Wiegen gut getrocknet wurden, wurde ausgeschlossen, dass es sich bei der Gewichtszunahme um die Quellung der Restpulpa oder um die Quellung von anderen Geweben außer den Kotyledonen und der Radikula handelte.

Für die folgenden Analysen wurden Keimungsversuche mit Samen ohne Testa durchgeführt. Durch die beschleunigte Wasseraufnahme in diesen testalosen Samen liefen die physiologischen Prozesse, die während der frühen Keimungsphase stattfinden, vermutlich schneller ab als in Samen, die mit Testa keimen.

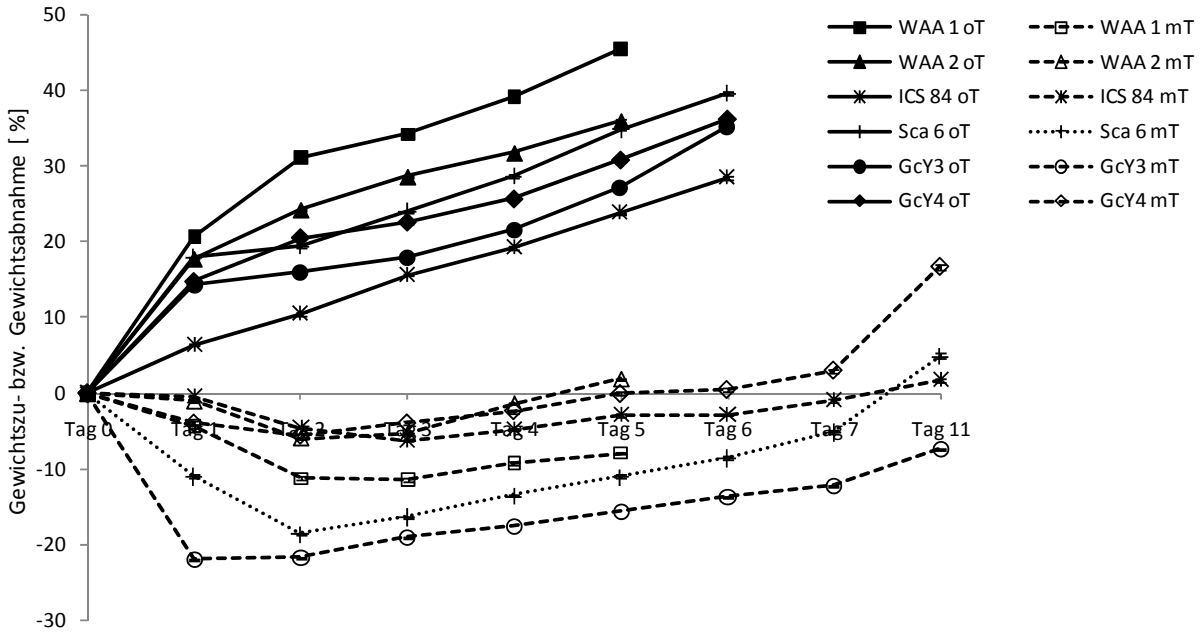


Abbildung 29: Gewichtszu- und Gewichtsabnahme [%] der Kakaosamen im Verlauf der Keimung.
Die Samen wurden mit (mT) bzw. ohne Testa (oT) bei 25°C zum Keimen ausgelegt. Es wurde täglich die Gewichtsveränderung von jeweils 5 Samen gemessen. Dabei wichen die prozentualen Gewichtsveränderungen der Parallelmessungen nur sehr wenig voneinander ab. Die Standardabweichungen waren im Bereich von 3 bis 16 %. Wegen der Übersichtlichkeit der Darstellung wurde auf diese graphische Angabe verzichtet.

Mit und ohne Testa gekeimte Samen nach sechstägiger Keimung

Die Sämlingsachsen der ohne Testa gekeimten Samen entwickelten sich schneller als die der mit Testa gekeimten Samen (Abbildung 30 bis Abbildung 33). Dieses Ergebnis stimmt mit der über den gesamten Versuchszeitraum festgestellten Wasseraufnahme überein. Offensichtlich stellt die Testa eine Barriere für die Wasseraufnahme dar und führt zu einer verzögerten Entwicklung der Samen.



Abbildung 30: Mit und ohne Testa gekeimte German Cocoa Samen (GcY3) nach 6-tägiger Keimung



Abbildung 31: Mit und ohne Testa gekeimte German Cocoa Samen (GcY4) nach 6-tägiger Keimung



Abbildung 32: Mit und ohne Testa gekeimte Samen des Genotyps ICS 84 nach 6-tägiger Keimung

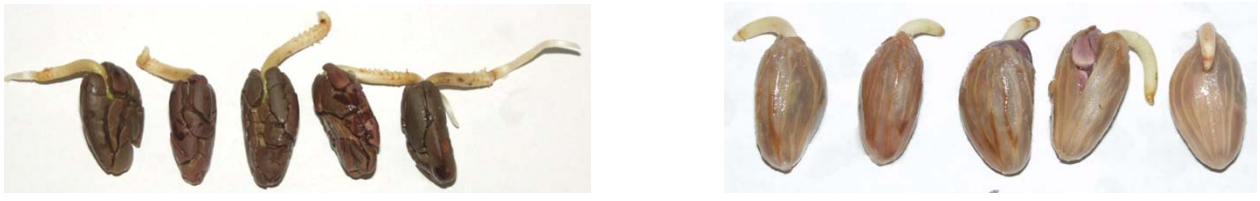


Abbildung 33: Mit und ohne Testa gekeimte Samen des Genotyps SCA 6 nach 6-tägiger Keimung

4.1.2.2 Wassergehalt

Der in den Kakaosamen ermittelte Wassergehalt lag in den reifen Samen zwischen 27 und 40 %. Unreifere Samen (Sca 6, SNK 10 und GcL) wiesen mit 43 bis 55 % einen wesentlich höheren Wassergehalt auf.

Bei Kakaosamen handelt es sich um rekalcitrante Samen, welche im reifen Zustand schon vor der Keimung einen relativ hohen Wassergehalt haben. Die Wasseraufnahme während der frühen Keimung verlief gering, da es sich bei dieser um eine physikalische Quellung handelt und Kakaosamen nur geringfügig entquollen sind.

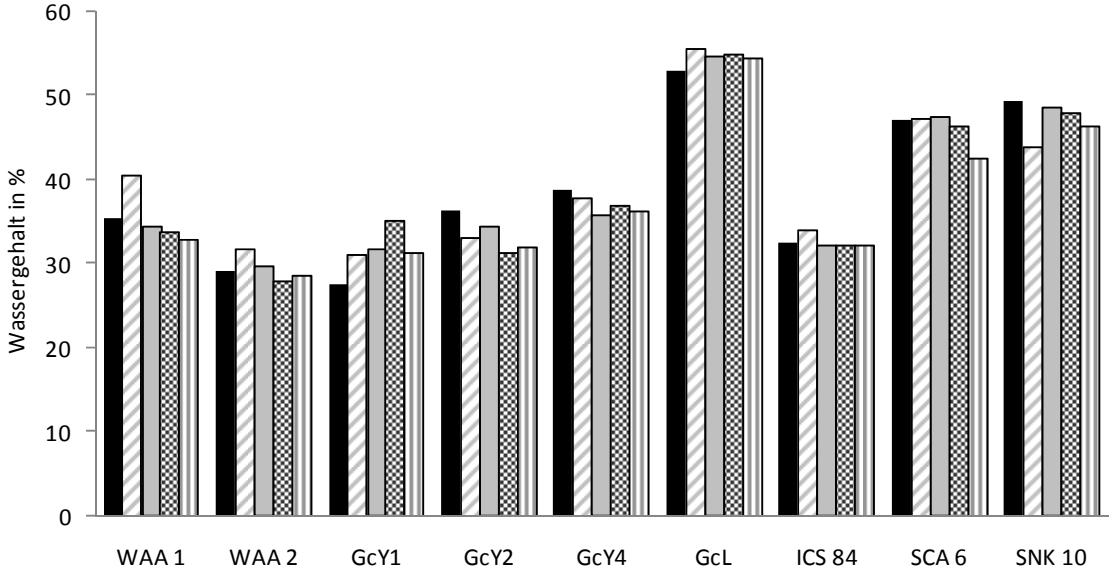


Abbildung 34: Wassergehalt [%] in Samen unterschiedlicher Kakao-Varietäten.
Von jeder untersuchten Probe wurden je 5 Samen (als unterschiedliche Grautöne dargestellt) vor und nach der Gefriertrocknung gewogen (ohne Testa) und der Wassergehalt anhand der Gewichtsabnahme ermittelt. Die Samen der Genotypen Sca 6, SNK 10 und GcL waren noch unreif.

4.1.2.3 pH-Wert

In den zur Keimung ausgelegten Samen blieb der pH-Wert im Untersuchungszeitraum von 96 bzw. 144 Stunden konstant. In den reifen, frisch aus den Früchten entnommenen Samen lag der pH-Wert bei 6,2, bzw. 6,5. Nach 96-stündiger Keimung lag er bei 6,3. Auch nach 144-stündiger Keimung konnte keine wesentliche Veränderung des pH-Wertes festgestellt werden, er lag bei 6,2.

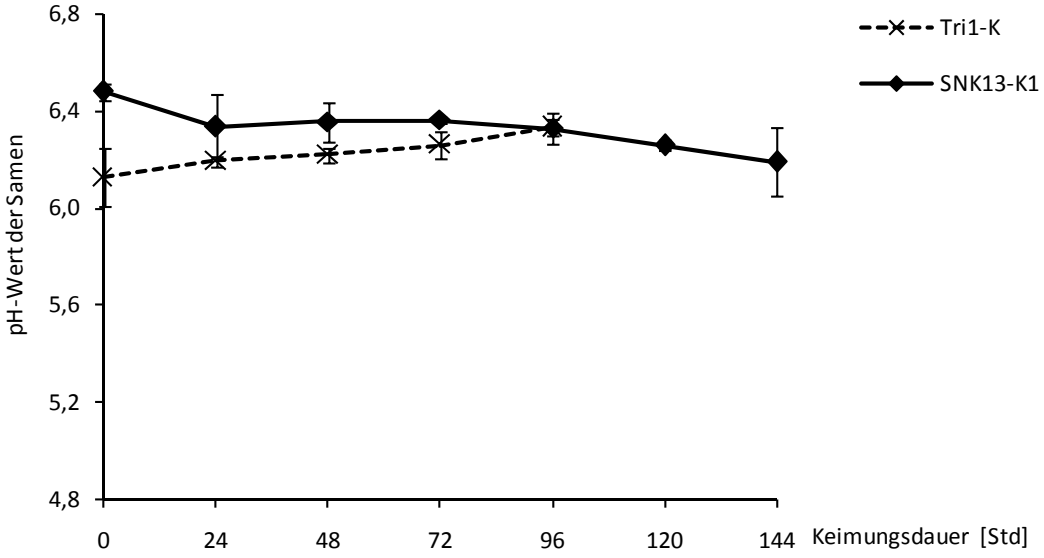


Abbildung 35: pH-Werte der Kakaosamen im Verlauf der Keimung.
Die pH-Werte von je 2 Samen wurden gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.1.2.4 Zusammenfassung

In unreiferen Kakaosamen wurde ein höherer Wassergehalt als in reifen Samen festgestellt. Reife Kakaosamen enthielten einen Wassergehalt von 27 bis etwa 40 %. Während der Keimung stieg der Wassergehalt in den Kotyledonen an. In den ohne Testa gekeimten Samen war die Wasseraufnahme in den ersten 24 Stunden der Keimung am höchsten. Sie lag in diesem Zeitraum zwischen 6 bis 20 %. In den mit Testa zur Keimung ausgelegten Samen nahm das Gewicht der Samen zu Beginn der Keimung zunächst ab. Erst ab dem dritten Tag der Keimung war eine mit einer Wasseraufnahme verbundene Gewichtszunahme der Samen zu erkennen. Die Wasseraufnahme der Kotyledonen wurde durch die Testa verzögert.

Die Entwicklung der Sämlingsachsen verlief bei den mit Testa gekeimten Samen langsamer als bei den ohne Testa gekeimten Samen.

Im Verlauf der frühen Keimung wurde keine Veränderung des pH-Wertes in den Kotyledonen der Kakaosamen festgestellt. Er lag durchgehend in einem Bereich von pH 6,2 bis 6,5.

4.1.3 Gehalt der Samen an Proteinen, Oligopeptiden und freien Aminosäuren im Verlauf der Keimung

4.1.3.1 Proteine

Reife Kakaosamen enthalten einen Proteinanteil von 10 bis 16 % des Trockengewichtes (ZIEGLEDER und BIEHL, 1988). Hierbei bilden die Reserveproteine, welche in den Proteinvakuolen der Mesophyllzellen der Kotyledonen vorliegen, einen Großteil der Gesamtproteine und stellen die Hauptsubstanz für die Proteolyse dar.

Sowohl im Verlauf der frühen Keimung als auch während einer fermentationsähnlichen Inkubation (siehe Kapitel 4.2) wurde der Proteingehalt bestimmt. Es soll verglichen werden, inwieweit sich der Proteingehalt und die Proteinzusammensetzung im Verlauf von Keimung und Inkubation unterscheiden.

Proteingehalt nach der Methode von BRADFORD

Proteingehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad

Die Bestimmung des Proteingehaltes in den Kotyledonen der Kakaosamen erfolgte nach der Methode von BRADFORD (1976).

In den ersten 10 Tagen der Keimung hat sich der Gesamtgehalt der Proteine kaum verändert. Zu Beginn der Keimung lagen die Proteingehalte in den Samen der unterschiedlichen Proben zwischen 312 und 373 mg/g Acetontrockenpulver. In einigen Keimungsreihen wurde eine geringfügige Abnahme des Proteingehaltes festgestellt. Dies deutet auf einen beginnenden proteolytischen Abbau der Reserveproteine hin.

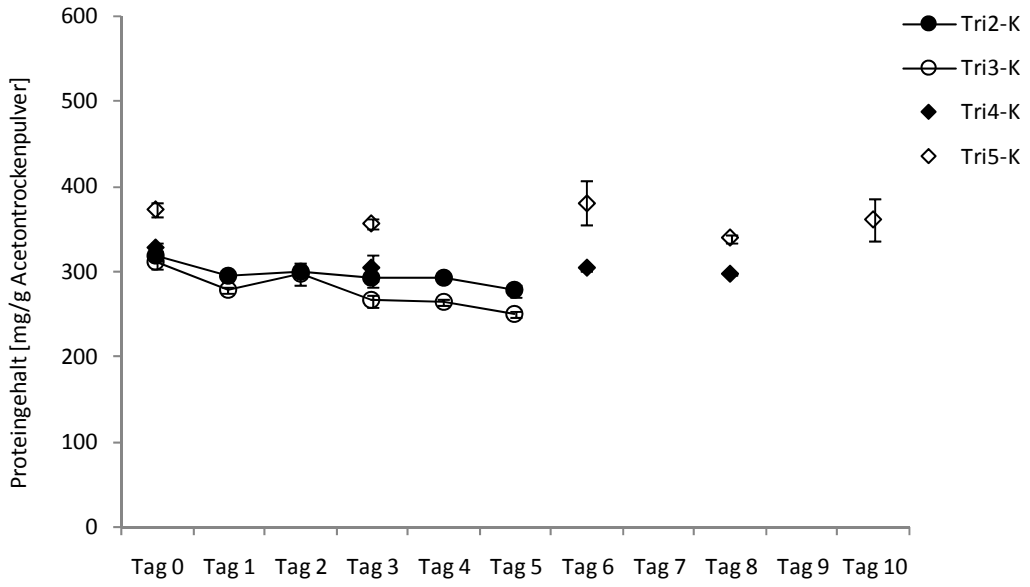


Abbildung 36: Proteingehalt im Acetontrockenpulver der Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten der Genotypengruppe WAA im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Proteingehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

In den Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501 hat sich der Proteingehalt im Verlauf von 6 Tagen Keimung nicht verändert.

Zu Beginn der Keimungsversuche lagen die Gesamtgehalte der Samen-Proteine zwischen 406 und 489 mg/g Acetontrockenpulver. Damit waren die Proteingehalte der Samen dieser Genotypen höher als die Proteingehalte in den Samen der aus Trinidad stammenden Früchte der Genotypengruppe WAA (s.o.).

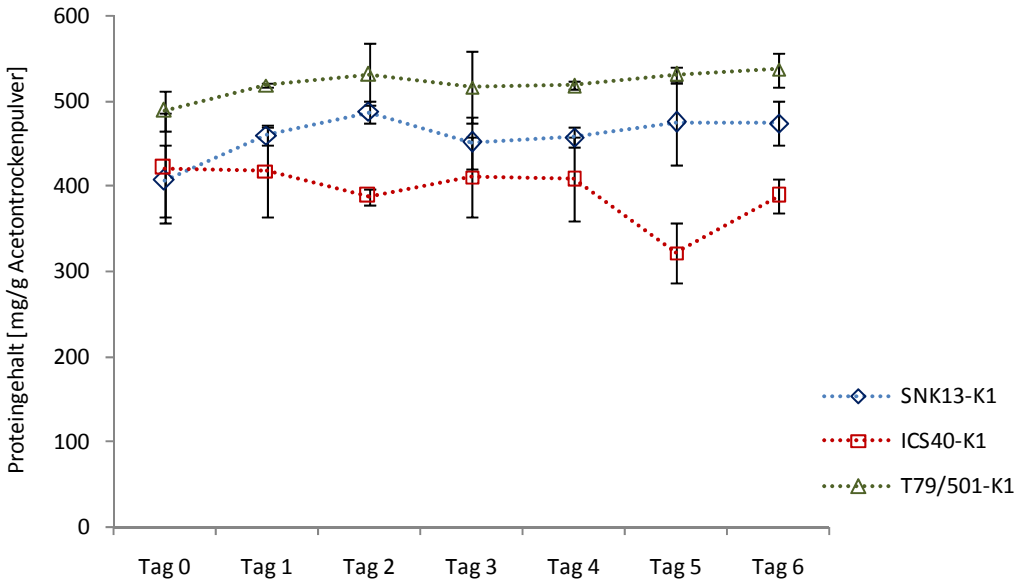


Abbildung 37: Proteingehalt im Acetontrockenpulver der Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Proteingehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

Die Samen des German Cocoas enthielten zwischen 344 und 433 mg/g Acetontrockenpulver an Proteinen. Im Verlauf einer sechstägigen Keimung wurde keine Veränderung des Gesamtgehaltes der Proteine festgestellt.

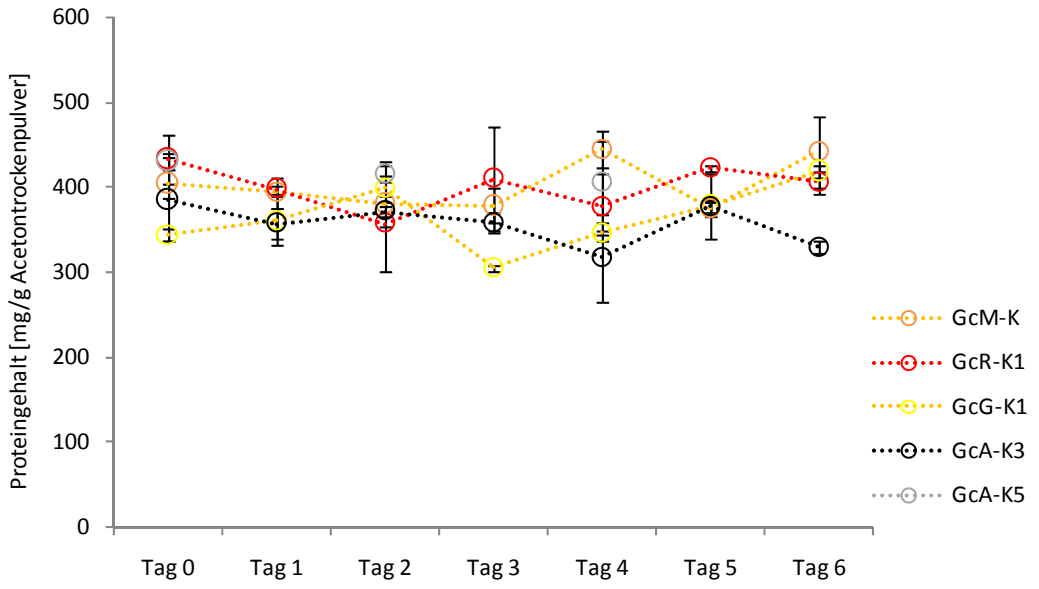


Abbildung 38: Proteingehalt im Acetontrockenpulver der Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Charakterisierung einzelner Proteine mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970)

Proteinfraktionen der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad

Die in den Kotyledonen des Kakaos enthaltenen Proteine wurden mit Hilfe einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Brilliant Blue R 250 gefärbt.

Durch die Auftrennung der Proteine mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden Proteine mit unterschiedlich großen Molekulargewichten nachgewiesen. Als Reserveproteine kommt in den Kotyledonen der Kakaosamen ein 7S-Globulin vom Vicilintyp (43 % des Gesamtproteins) vor, welches ein Molekulargewicht von 139 kDa besitzt und aus einer 45,7 kDa-Untereinheit und einer 31 + 16 kDa-Untereinheit aufgebaut ist (VOIGT und BIEHL, 1993). Neben dem Speicherprotein machen Albumine 52 % des Gesamtproteins aus, wobei es sich bei dem am stärksten vorkommenden Albumin um ein Albumin vom Typ Kunitz Trypsininhibitor mit einem Molekulargewicht von 19 kDa handelt.

Während der Keimung hat ab dem 6. bis 8. Tag ein Proteinabbau stattgefunden. Die Albumine wurden hierbei weniger stark abgebaut als die Globuline. Vor allem die Globulinbande bei 45,7 kDa wurde abgebaut. Die Globulinbande bei 31 kDa hat sich dagegen auch während einer zehntägigen Keimung kaum verändert.

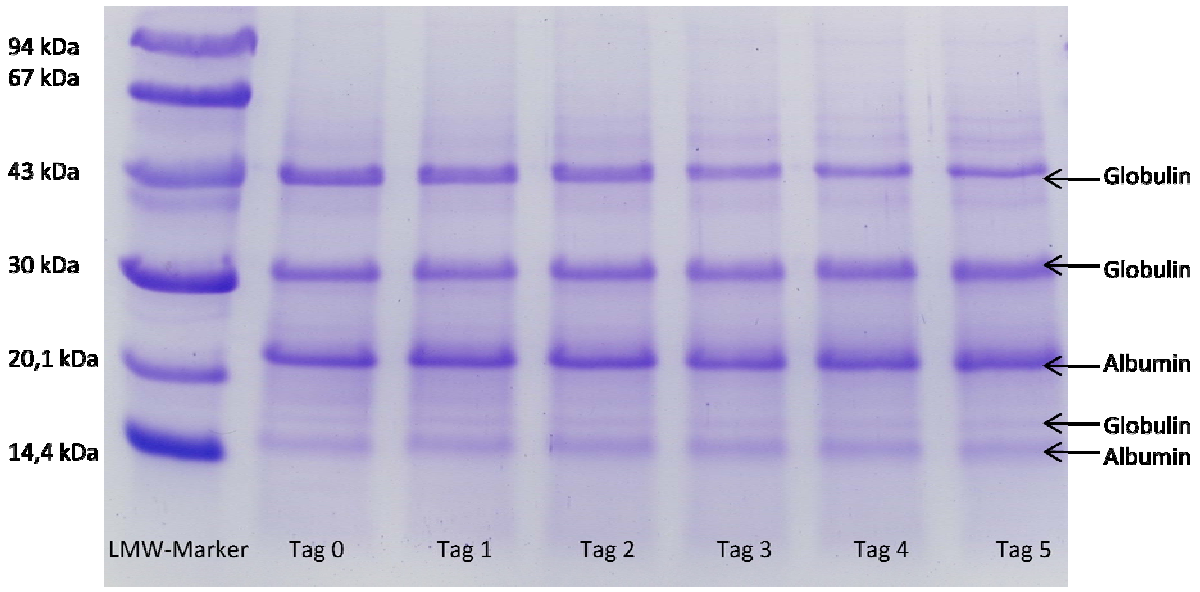


Abbildung 39: Veränderung der Speicherproteinfraktionen in den Samen (Tri2-K) während einer 5-tägigen Keimung (DISC-SDS-PAGE).
Zur Auftrennung der Proteine wurde Acetontrockenpulver verwendet. Es wurden je 10 µl Probelösung aufgetragen, welche 0,04 mg Acetontrockenpulver in Puffer gelöst enthielten. Die Färbung der Proteine erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R 250 Färbelösung.

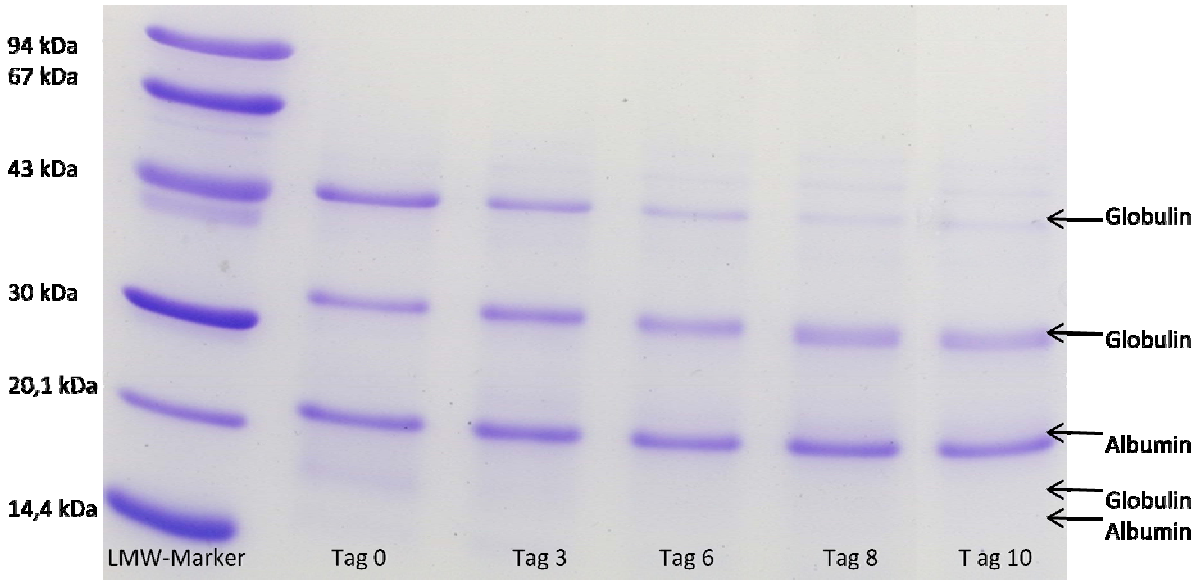


Abbildung 40 Veränderung der Speicherproteinfraktionen in den Samen (Tri4-K) während einer 10-tägigen Keimung (DISC-SDS-PAGE).
Zur Auftrennung der Proteine wurde Acetontrockenpulver verwendet. Es wurden je 10 µl Probelösung aufgetragen, welche 0,04 mg Acetontrockenpulver in SDS-Puffer gelöst enthielten. Die Färbung der Proteine erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R 250 Färbelösung.

4.1.3.2 Oligopeptide

Oligopeptide sind aus bis zu zehn Aminosäuren in peptidischer Bindung zusammengesetzt. Sie entstehen im Kakaosamen beim Abbau der Speicherproteine durch die sameneigenen Proteasen.

Von den Samen des Genotypen SNK 13 und einer German Cocoa-Keimungsreihe sind die Oligopeptidspektren dargestellt, die den Verlauf der Oligopeptide während der Keimung wiedergeben. Weitere Oligopeptidspektren befinden sich im Anhang.

Oligopeptidspektren

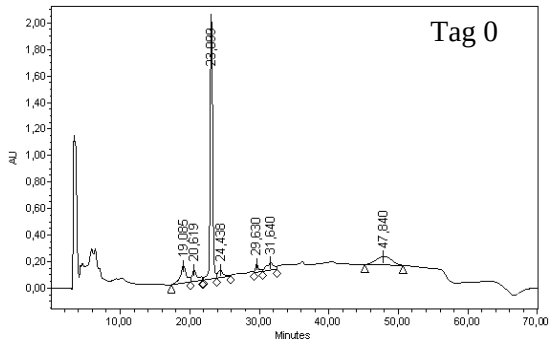
Oligopeptidspektren der Samen des Genotypen SNK 13

Im Verlauf der ersten sechs Tage der Keimung wurden keine Oligopeptide gebildet. Die Samen enthielten nur sehr geringe Peptidmengen. Über diesen Zeitraum der Keimung erfolgte somit noch kein über die Zunahme des Oligopeptidgehaltes feststellbarer proteolytischer Abbau der Speicherproteine. Dieses Ergebnis wurde auch anhand des gleichbleibenden Proteingehaltes im Kapitel 4.1.3.1 beschrieben.

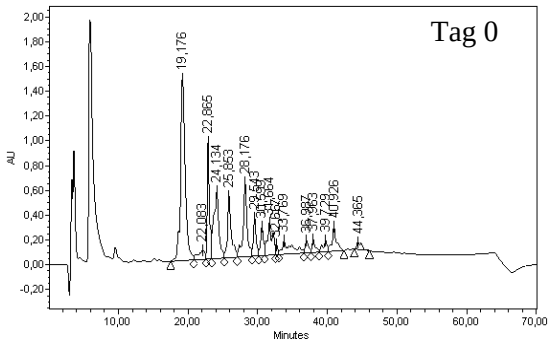
Bei dem Peak, der in allen HPLC-Chromatogrammen nach einer Retentionszeit von 22 bis 23 min auftrat, handelte es sich vermutlich nicht um ein Oligopeptid, da dieser Peak auch nach der Hydrolyse der Proben noch zu finden war.

Oligopeptidspektren nach der Hydrolyse

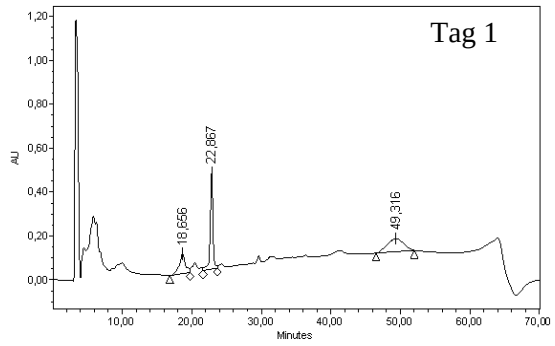
a



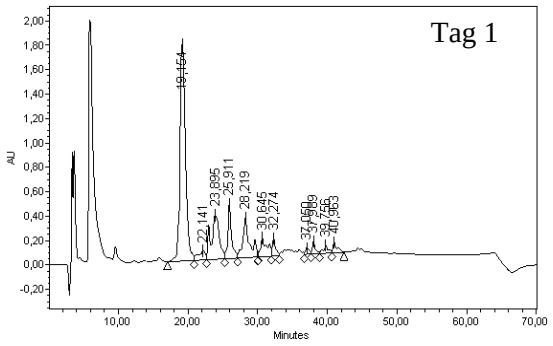
h



b



i



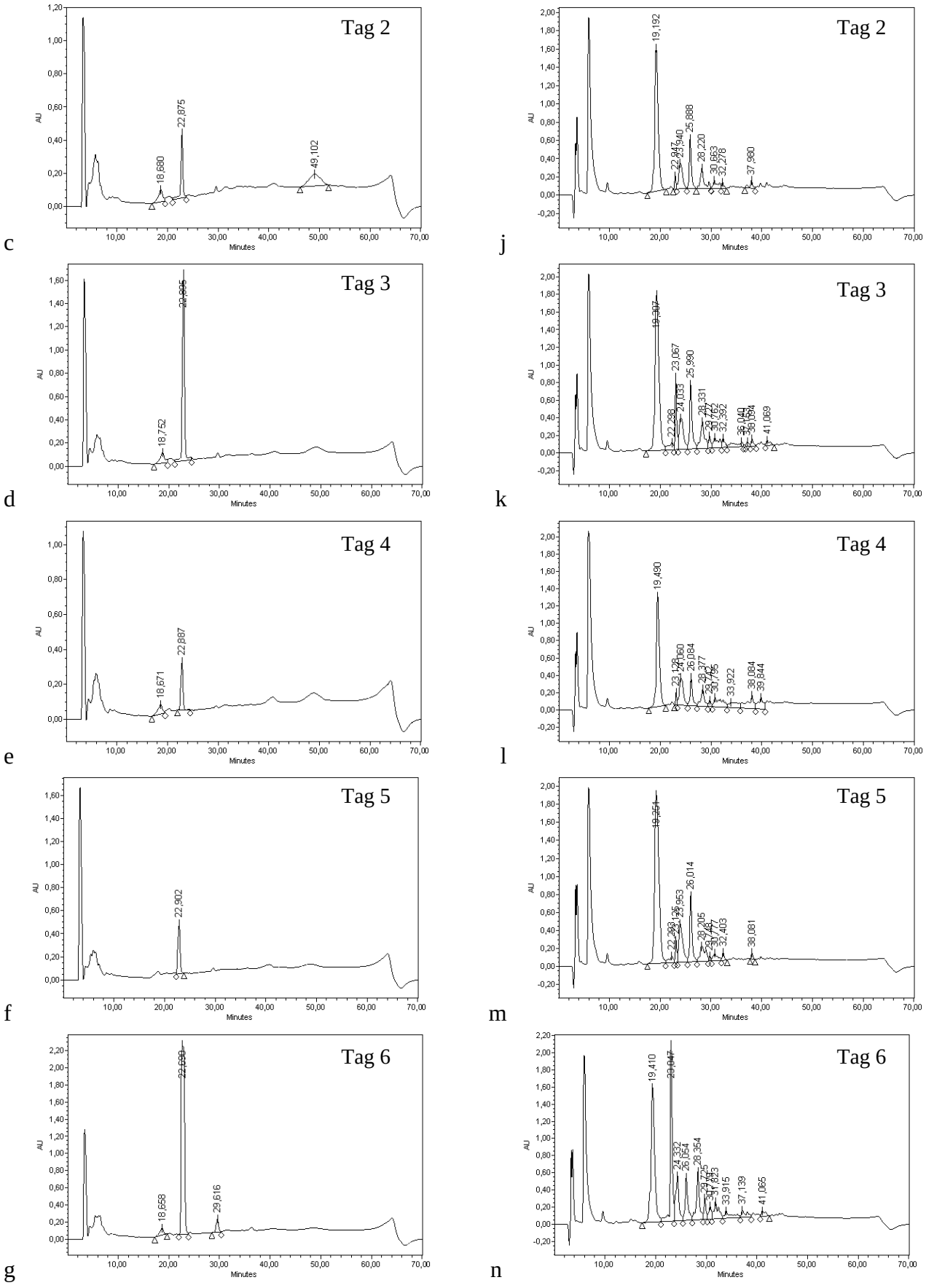


Abbildung 41 a - n: Oligopeptidspektren der Samen des Genotypen SNK 13 (SNK 13-K1).
a) - g) Tag 0 bis Tag 6 der Keimung; h) - n) nach der Hydrolyse.

Oligopeptidspektren der Samen einer German Cocoa-Frucht

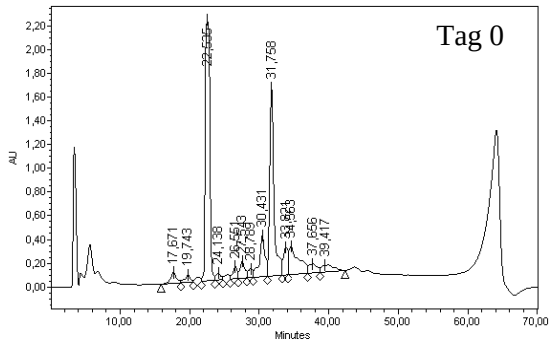
In den Samen des German Cocoas wurde im Verlauf der ersten sechs Tage der Keimung keine Bildung von Oligopeptiden festgestellt. Über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg enthielten die Samen nur sehr geringe Mengen an Oligopeptiden.

Die Chromatogramme enthielten durchgehend einen Peak bei einer Retentionszeit von 22 bis 23 min, bei dem es sich wahrscheinlich aber nicht um ein Oligopeptid handelt.

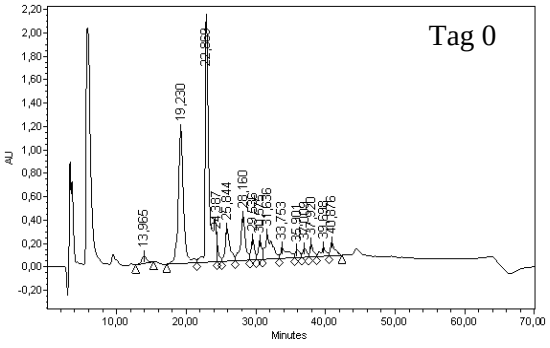
Oligopeptidspektren

nach der Hydrolyse

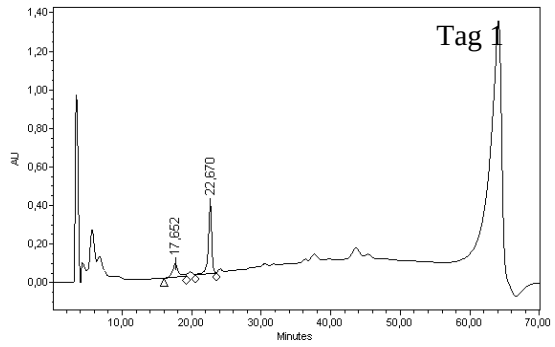
a



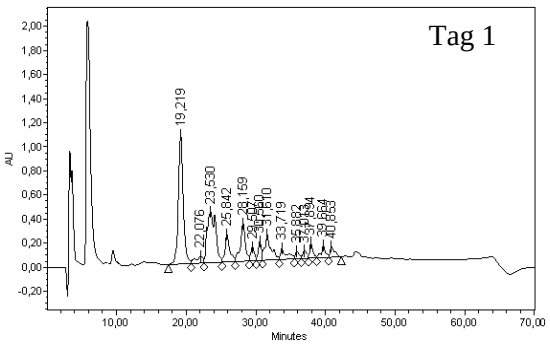
h



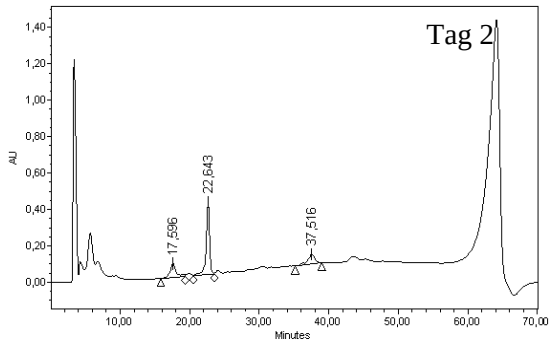
b



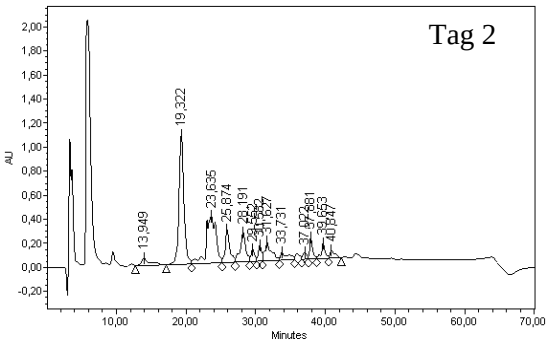
i



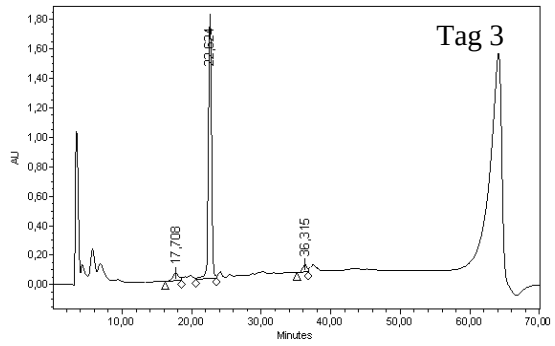
c



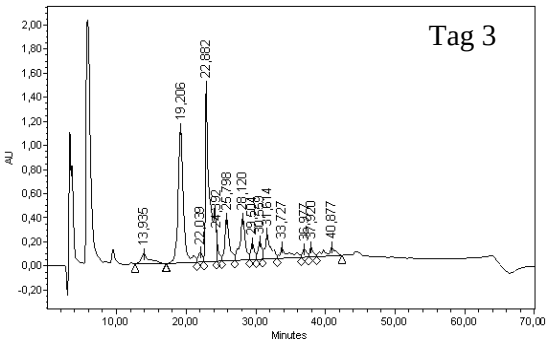
j



d



k



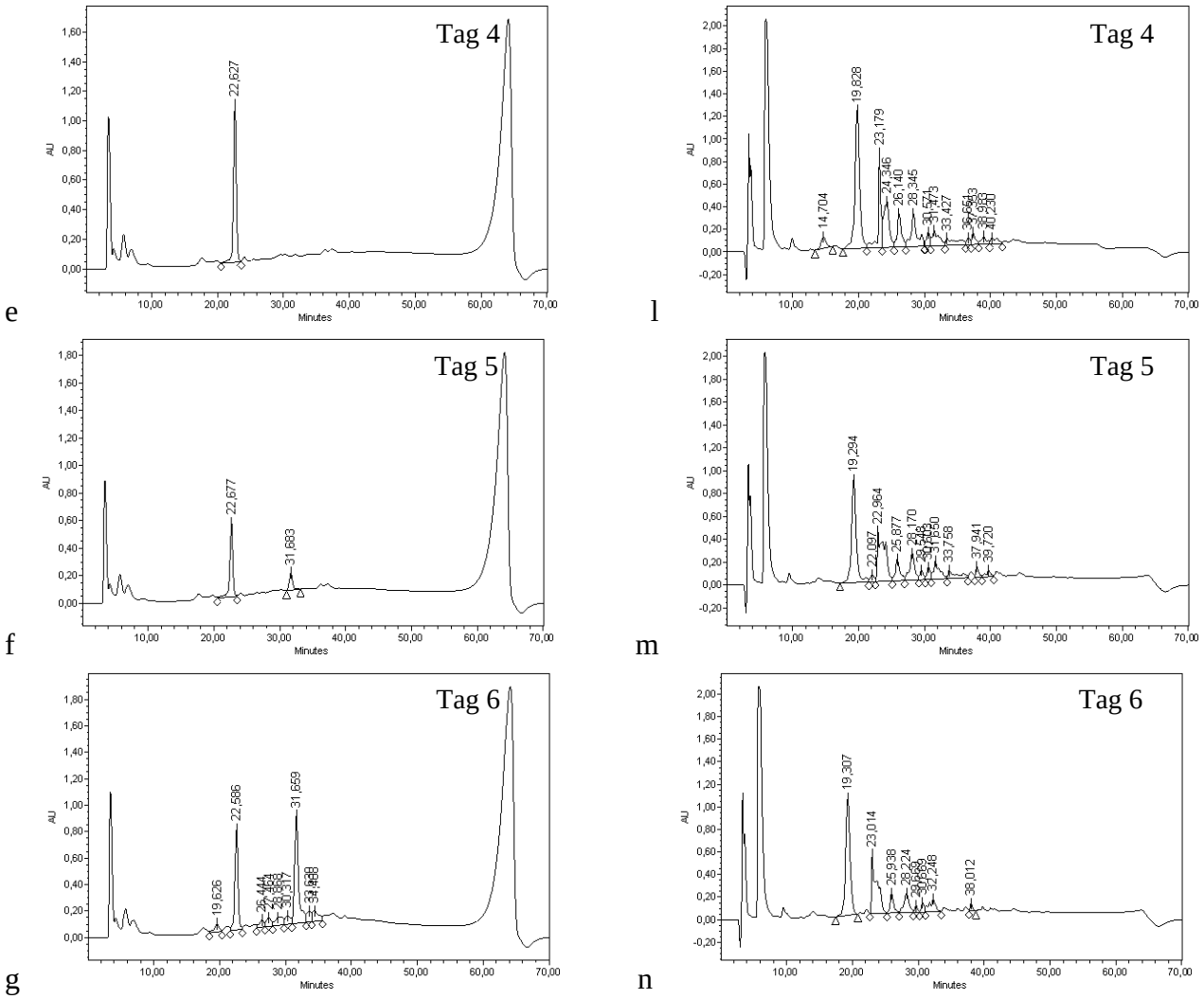


Abbildung 42 a - n: Oligopeptidspektren von German Cocoa-Samen (GcA-K3).
a) - g) Tag 0 bis Tag 6 der Keimung; h) - n) nach der Hydrolyse.

Aminosäurezusammensetzung der Oligopeptide

Von den Oligopeptidproben wurden vor und nach der Hydrolyse die Gehalte an freien Aminosäuren bestimmt, um festzustellen, welche freien Aminosäuren schon vor dem hydrolytischen Abbau in den Oligopeptidextrakten vorhanden waren, so dass durch die Aminosäurebestimmung nach dem hydrolytischen Abbau die Zusammensetzung der Aminosäuren in den Oligopeptiden festgestellt werden konnte.

Der Gesamtgehalt an Aminosäuren in den Hydrolysaten der Oligopeptide in den direkt nach der Entnahme aus der Frucht gefriergetrockneten Samen betrug 11,5 bzw. 18,6 mg/g Acetontrockenpulver. Während der ersten 6 Tage der Keimung blieb der Gehalt in einem ähnlichen Bereich.

In der Zusammensetzung und im Gesamtgehalt der Aminosäuren der Oligopeptide wurde im Verlauf der frühen Keimung keine Veränderung festgestellt. Die Samen enthielten durchgehend etwa 35 bis 40 % hydrophobe und 33 bis 40 % saure Aminosäuren und deren Säureamide. Besonders hoch waren die Gehalte an Asparaginsäure und Glutaminsäure.

Die Aminosäuregehalte nach der Hydrolyse der Oligopeptide sind relativ hoch, obwohl die Samen nur sehr geringe Mengen an Oligopeptiden enthielten. Da die Extraktion der Oligopeptide durch Methanol erfolgte und Proteine in Methanol ausfallen, kann es sich nicht um die Aminosäuren hydrolysierter Proteine handeln. Vermutlich handelt es sich um die Hydrolysate sehr kleiner Peptide (Di- und Tripeptide), welche bei einer Wellenlänge von 210 nm kein Signal geben und daher durch die verwendete Analysemethode nicht erfasst wurden.

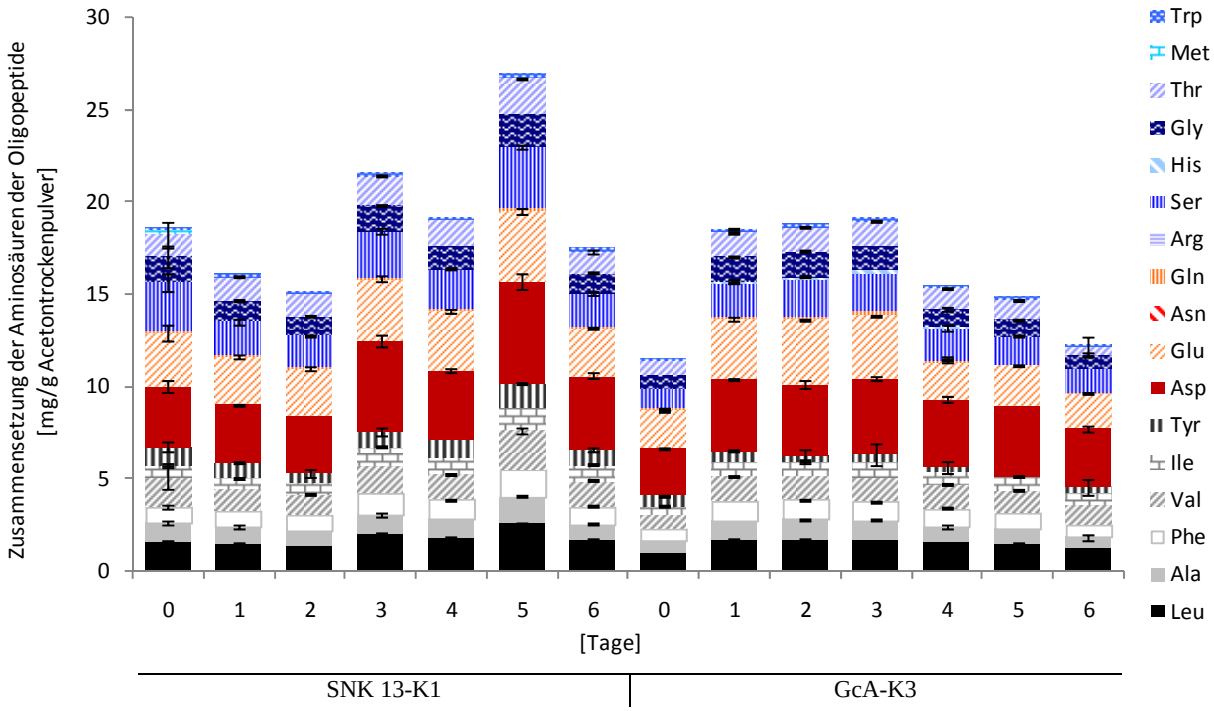


Abbildung 43: Gehalte der einzelnen Aminosäuren der Oligopeptide der Samen des Genotypen SNK 13 und der Samen eines German Cocoas (GcA-K3) im Verlauf der Keimung.
Hydrophobe Aminosäuren sind in schwarz/grau, saure in rot und andere in blau dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.1.3.3 Freie Aminosäuren

In reifen, unfermentierten Kakaosamen ist der Gehalt an freien Aminosäuren gering. Aminosäuren werden in den Kotyledonen der Kakaosamen durch die hydrolytische Spaltung der Reserveproteine frei. Die Spaltung erfolgt durch die sameneigenen Proteasen, welche ihr Optimum im sauren pH-Bereich haben.

Die Analyse der freien Aminosäuren erfolgte über die HPLC. Folgende Aminosäuren wurden hierbei bestimmt: Alanin (Ala), Arginin (Arg), Asparagin (Asn), Asparaginsäure (Asp), Glutamin (Gln), Glutaminsäure (Glu), Glycin (Gly), Histidin (His), Isoleucin (Ile), Leucin (Leu), Lysin (Lys), Methionin (Met), Serin (Ser), Phenylalanin (Phe), Threonin (Thr), Tryptophan (Trp), Tyrosin (Tyr) und Valin (Val). Aufgrund von nicht aufgelösten Peaks bei der HPLC konnten die Aminosäuren Arginin, Glutamin, Lysin und Methionin nicht in allen Proben eindeutig identifiziert werden. Dies bedeutet aber nicht, dass sie in den Proben nicht enthalten sind.

Da grundsätzlich bei den Keimungsversuchen niedrigere Aminosäurekonzentrationen herauskamen, wurden für die Ergebnisse der Keimungsversuche andere Skalierungen als bei den fermentationsähnlichen Inkubationsversuchen verwendet.

Freie Aminosäuren in den Samen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad und Kamerun

Ungekeimte Kakaosamen enthielten je nach Probe zwischen 5,5 und 11,5 mg/g ffTM an freien Aminosäuren. Während der Keimung veränderte sich der Gesamtgehalt an freien Aminosäuren nur geringfügig (siehe Abbildung 44 und Abbildung 46a/b). In den Samen einiger Proben stieg der Gehalt an freien Aminosäuren, vor allem zum Ende des Untersuchungszeitraumes, etwas an.

In Abbildung 45 sind die freien Aminosäuren in hydrophobe, saure und deren Säureamide sowie die übrigen Aminosäuren eingeteilt dargestellt (nach KIRCHHOFF 1989). Die frischen Samen wiesen einen hohen Anteil an sauren Aminosäuren und deren Säureamiden von 68 bis 77 % und ein geringen Anteil an hydrophoben Aminosäuren von 16 bis 21 % auf. In den ersten Tagen der Keimung hat sich diese Zusammensetzung kaum verändert. Ab dem sechsten Tag der Keimung stieg der Anteil an hydrophoben Aminosäuren etwas an und der der sauren Aminosäuren und deren Säureamiden verringerte sich.

Den höchsten Anteil am Gesamtgehalt der freien Aminosäuren bildeten die sauren Aminosäuren Asparagin, Asparaginsäure und Glutaminsäure (Abbildung 46a/b).

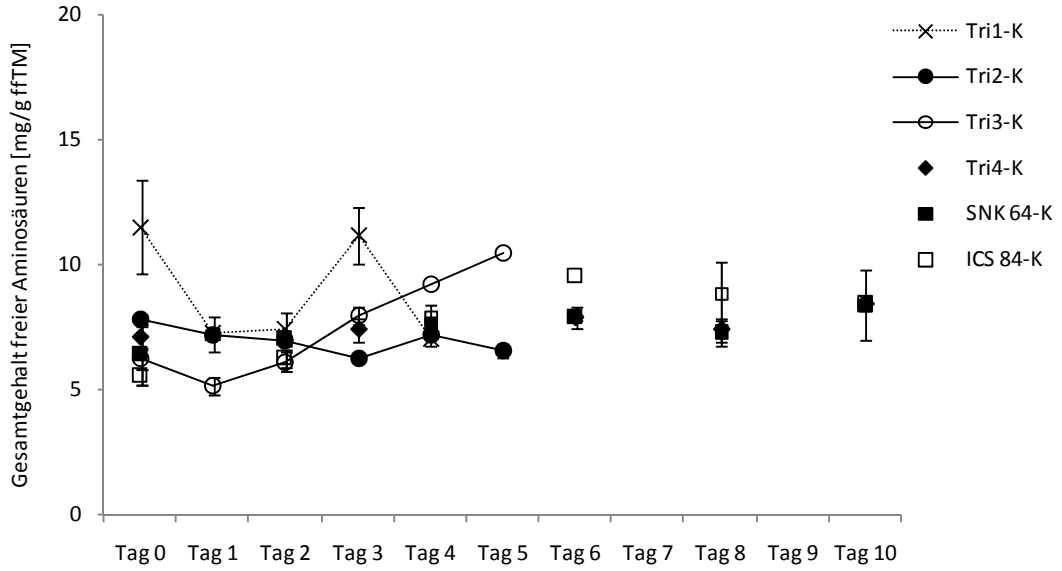


Abbildung 44: Gesamtgehalt an freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K – Tri4-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

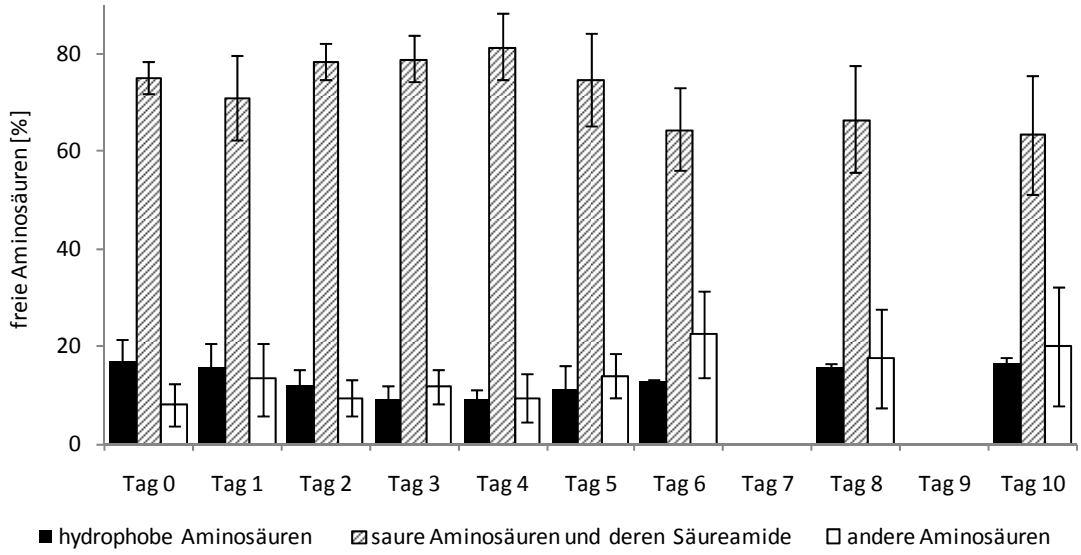


Abbildung 45: Mittelwert des prozentualen Gehaltes an hydrophoben und sauren freien Aminosäuren und deren Säureamiden sowie an den anderen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K – Tri4-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

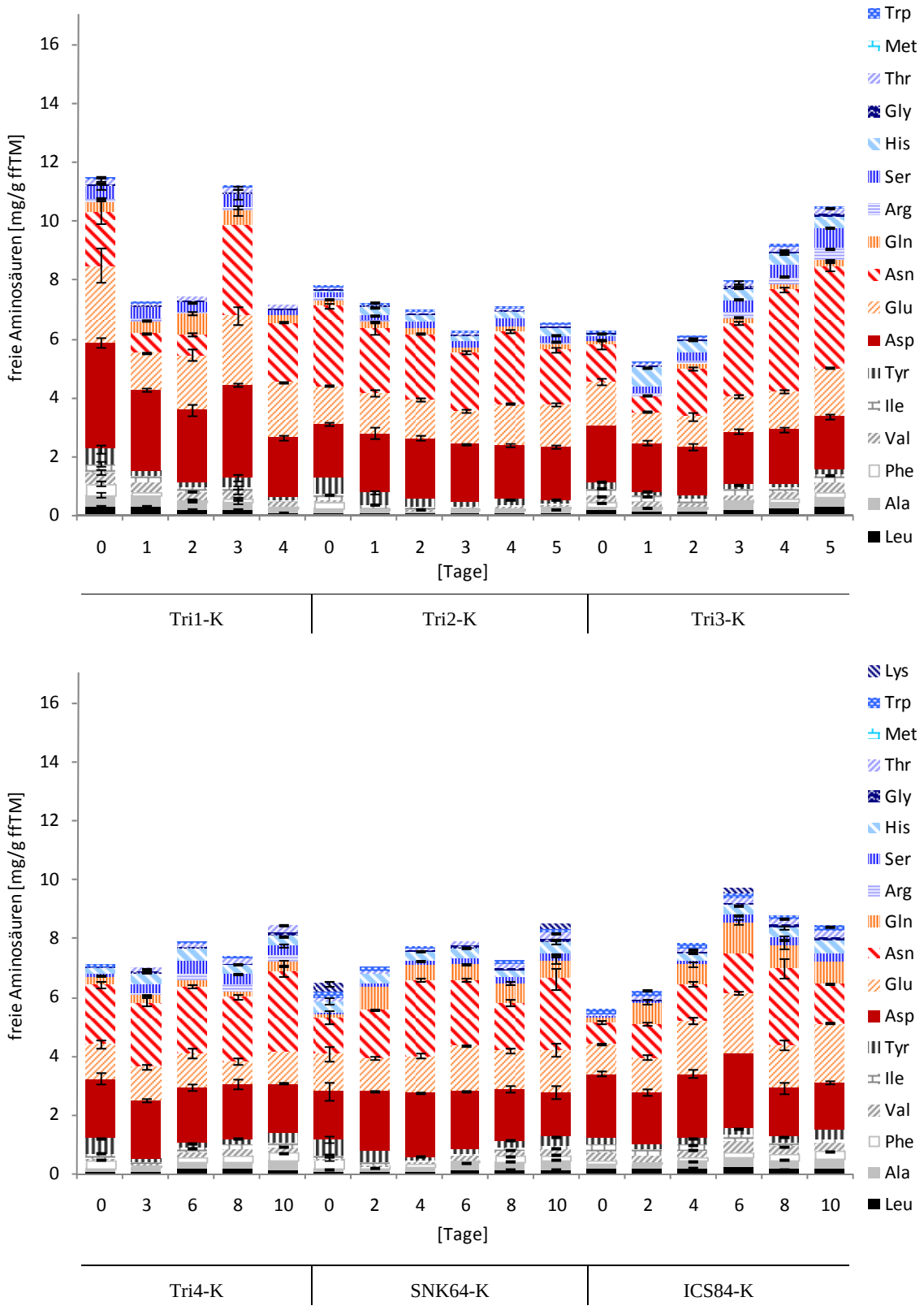


Abbildung 46a/b: Gehalte der einzelnen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K – Tri4-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung
Hydrophobe Aminosäuren sind in schwarz/grau, saure in rot und andere in blau dargestellt.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Freie Aminosäuren in den Samen von unterschiedlichen, definierten Genotypen

Die Samen der Genotypen SNK 13 und T 79/501 wiesen zu Beginn der Keimung einen Gesamtgehalt an freien Aminosäuren zwischen 3,7 und 5,4 mg/g ffTM auf. Die Samen des Genotypen ICS 40 enthielten einen höheren Gehalt an freien Aminosäuren von 14,0 bis 16,7 mg/g ffTM. Im Verlauf der Keimung veränderte sich der Gehalt an freien Aminosäuren nur geringfügig. In den Samen der Genotypen SNK 13 und T 17/505 stieg der Aminosäuregehalt leicht an, wohingegen er in den Samen des Genotypen ICS 40 etwas abnahm. Hierbei sank vor allem der Gehalt an Asparaginsäure. Dies kann daran liegen, dass während der Keimung eine Neusynthese von Proteinen unter Verbrauch von freien Aminosäuren erfolgt.

Die Samen des Genotypen ICS 40 enthielten etwa 6 % hydrophobe und 92 % saure Aminosäuren und deren Säureamide. Die Samen der Genotypen SNK 13 und T 79/501 enthielten dagegen einen höheren Anteil an hydrophoben Aminosäuren von 23 bis 31 % und nur 62 bis 72 % saure Aminosäuren und deren Säureamide (siehe Abbildung 48).

Die Samen des Genotypen ICS 40 wiesen einen besonders hohen Gehalt an Asparaginsäure auf (Abbildung 49 und Abbildung 50). Dieser lag in den ungekeimten Samen zwischen 11 und 14 mg/g ffTM, so dass die Asparaginsäure 83 bis 84 % am Gesamtgehalt der freien Aminosäuren darstellte. Bisher liegen in der Literatur wenig vergleichende Daten vor, welche diesen Befund beschreiben. Hier wurden aber reproduzierbar hohe Gehalte an Asparaginsäure gefunden. Wegen des hohen Gehaltes an Asparaginsäure war auch der Gesamtgehalt an freien Aminosäuren in den Samen des Genotypen ICS 40 im Vergleich zu den Samen der anderen Genotypen höher.

In den ersten Tagen der Keimung veränderte sich die Zusammensetzung von hydrophoben und sauren Aminosäuren nicht. Erst ab dem sechsten Tag stieg der Anteil an hydrophoben Aminosäuren etwas an und der der sauren Aminosäuren und deren Säureamiden nahm etwas ab.

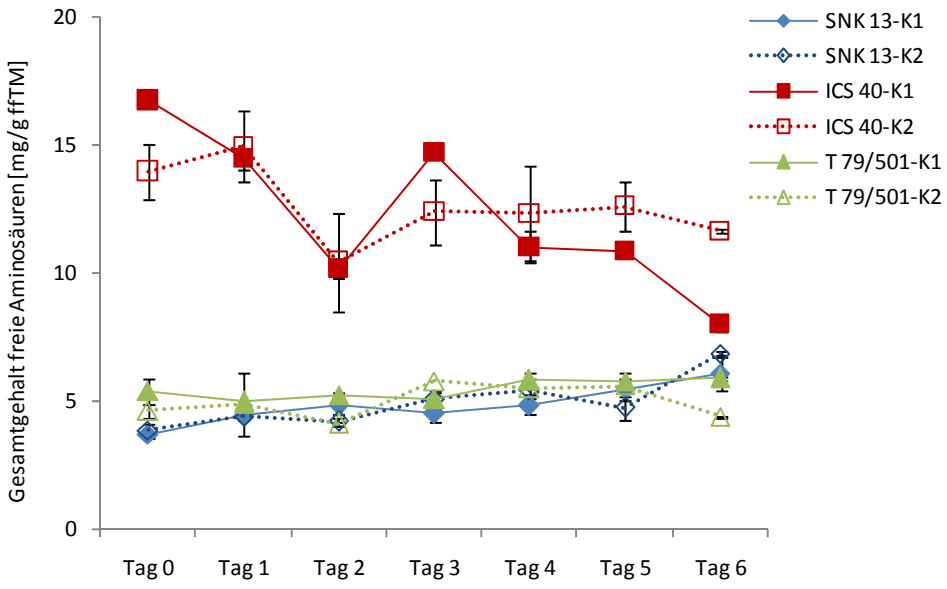


Abbildung 47: Gesamtgehalt an freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

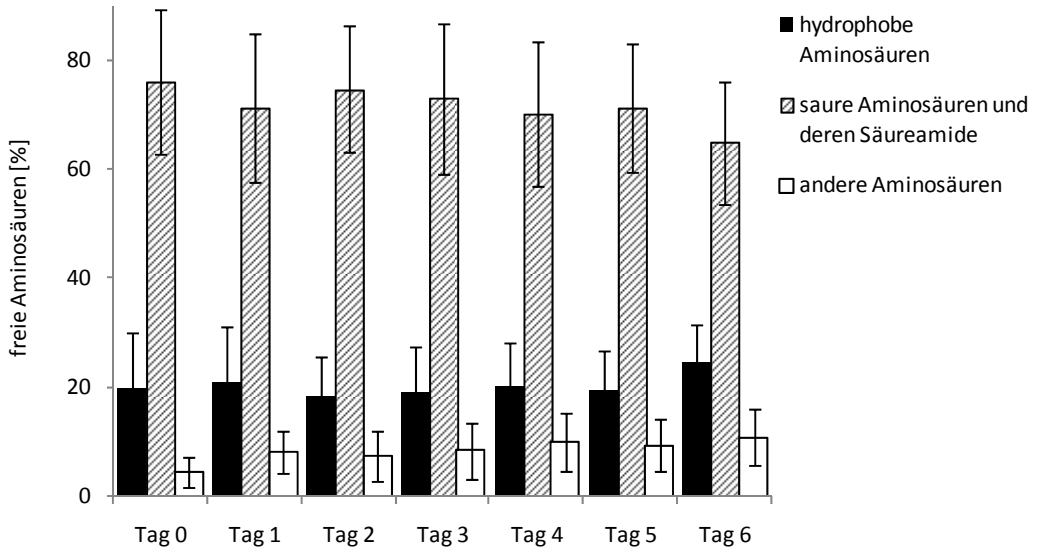


Abbildung 48: Mittelwert des prozentualen Gehaltes an hydrophoben und sauren freien Aminosäuren und deren Säureamiden sowie an den anderen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

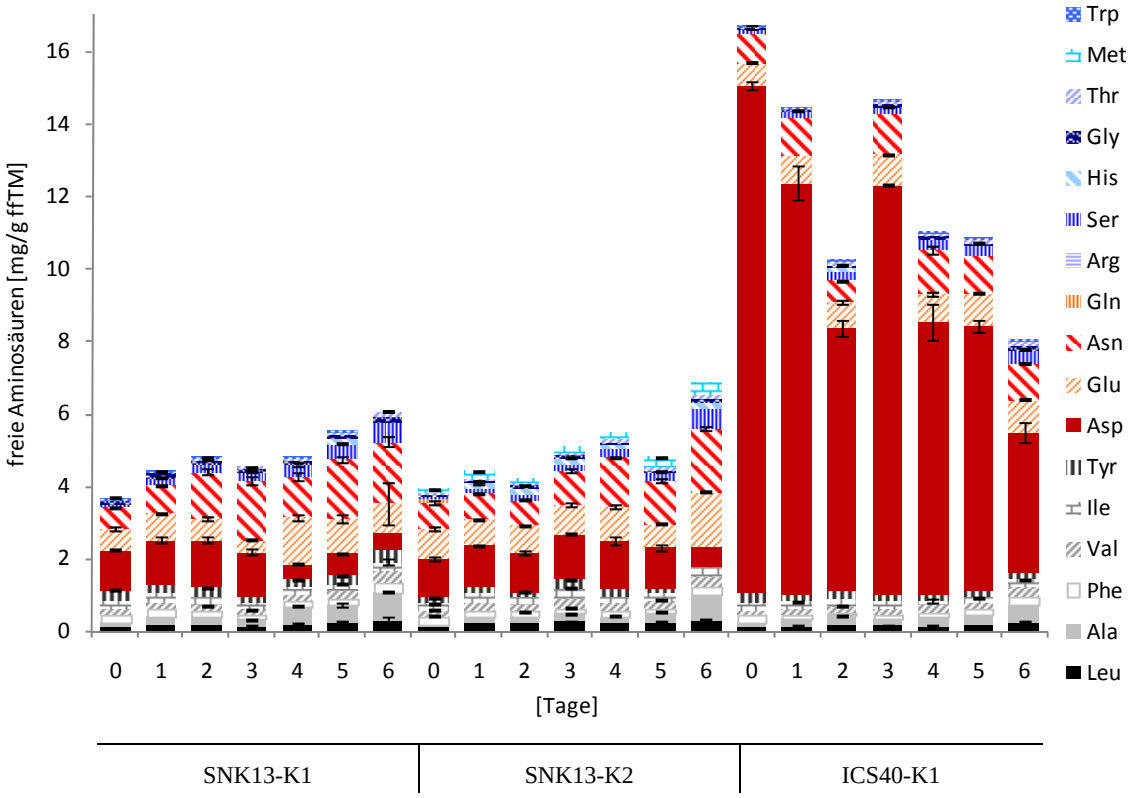


Abbildung 49: Gehalte der einzelnen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung
Hydrophobe Aminosäuren sind in schwarz/grau, saure in rot und andere in blau dargestellt.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

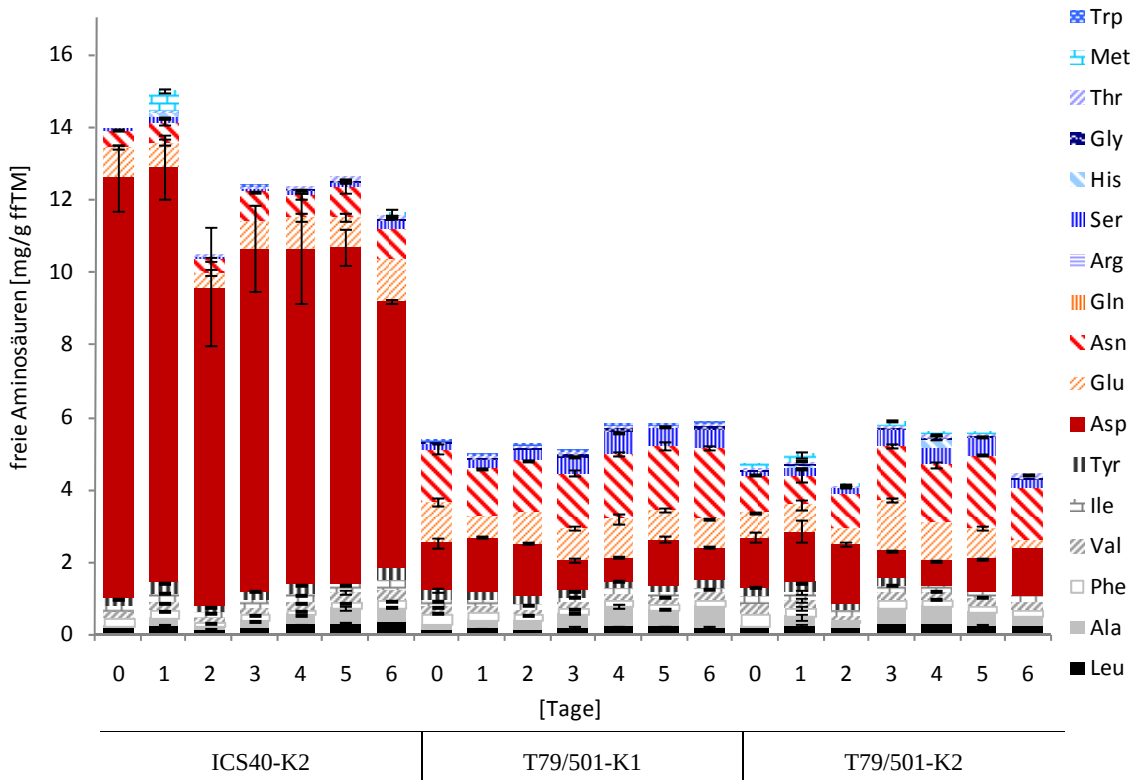


Abbildung 50: Gehalte der einzelnen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung
Hydrophobe Aminosäuren sind in schwarz/grau, saure in rot und andere in blau dargestellt.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Freie Aminosäuren in den Samen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten

Ungekeimte Samen des German Cocoas enthielten zwischen 3,1 und 6,6 mg/g ffTM freie Aminosäuren. Dieser Gehalt hat sich im Verlauf der Keimung kaum verändert. In den Samen einiger Proben fand eine geringe Zunahme des Gehaltes an freien Aminosäuren statt.

Die Samen des German Cocoas enthielten, bezogen auf den Gesamtgehalt, zwischen 19 und 33 % an hydrophoben und 63 bis 75 % an sauren Aminosäuren und deren Säureamiden.

Die Samen des German Cocoas wiesen sehr hohe Gehalte an Asparagin und Asparaginsäure, aber auch an Glutaminsäure auf (Abbildung 53a/b).

In den ersten Tagen der Keimung veränderte sich die Zusammensetzung von hydrophoben und sauren Aminosäuren nicht. Erst ab dem fünften bis sechsten Tag stieg der Anteil an hydrophoben Aminosäuren etwas an und der der sauren Aminosäuren und deren Säureamiden nahm etwas ab.

Die ebenfalls auf ihren Aminosäuregehalt untersuchten Samen des Catongos unterschieden sich im Gesamtgehalt und der Zusammensetzung der freien Aminosäuren nicht von den Samen des German Cocoas (siehe Abbildung 53b und Abbildung 54).

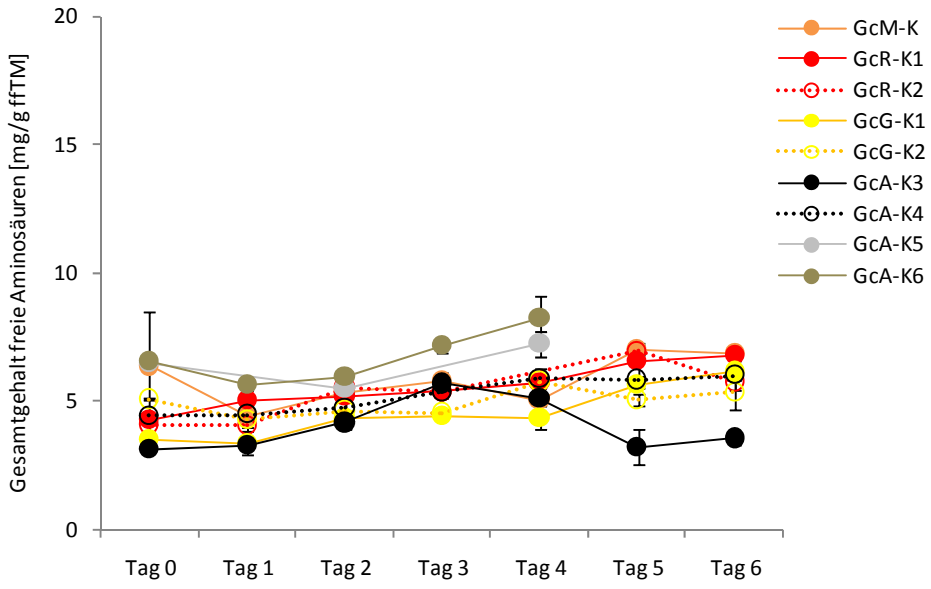


Abbildung 51: Gesamtgehalt an freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

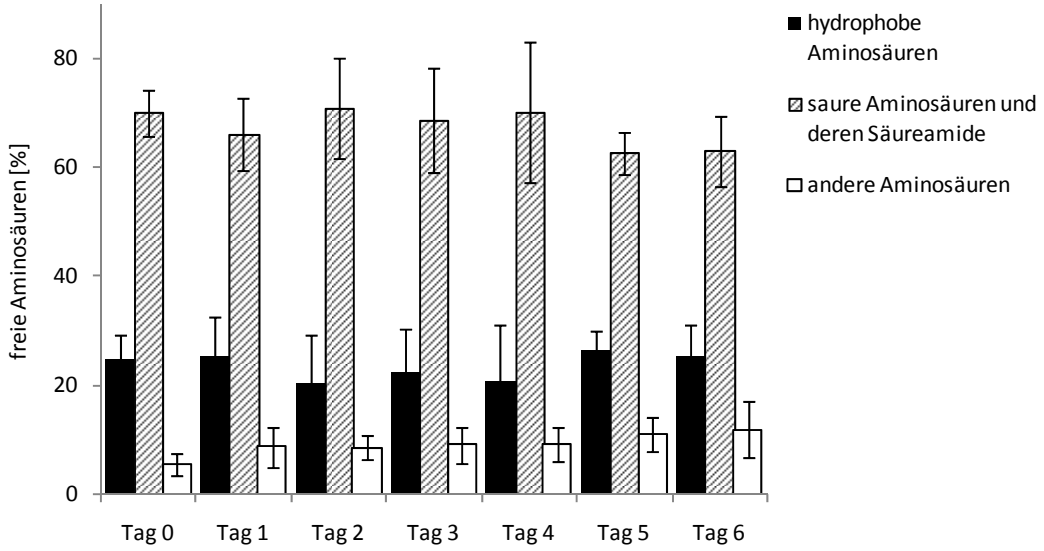


Abbildung 52: Mittelwert des prozentualen Gehaltes an hydrophoben und sauren freien Aminosäuren und deren Säureamiden sowie an den anderen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

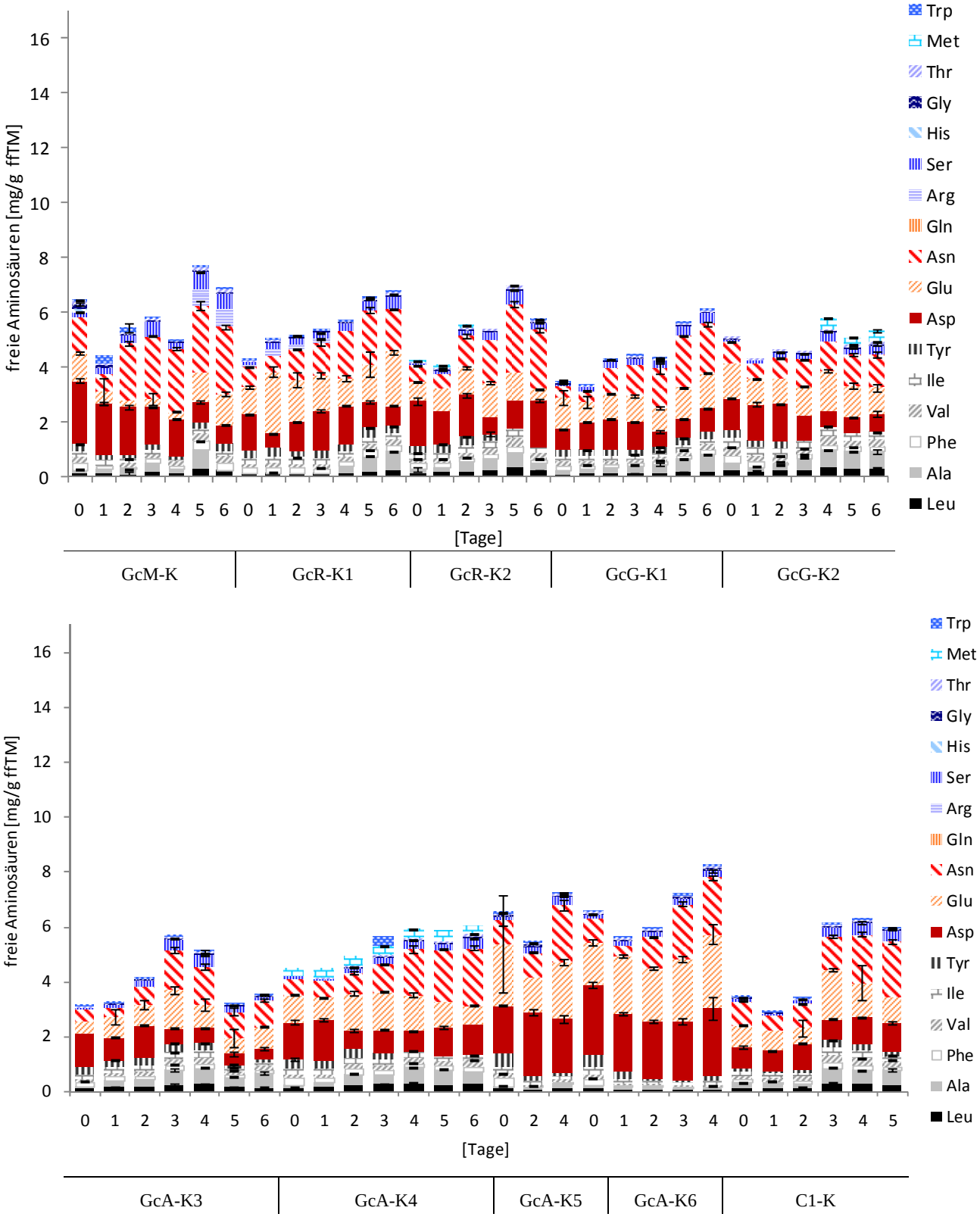


Abbildung 53a/b: Gehalte der einzelnen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung.
Hydrophobe Aminosäuren sind in schwarz/grau, saure in rot und andere in blau dargestellt.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

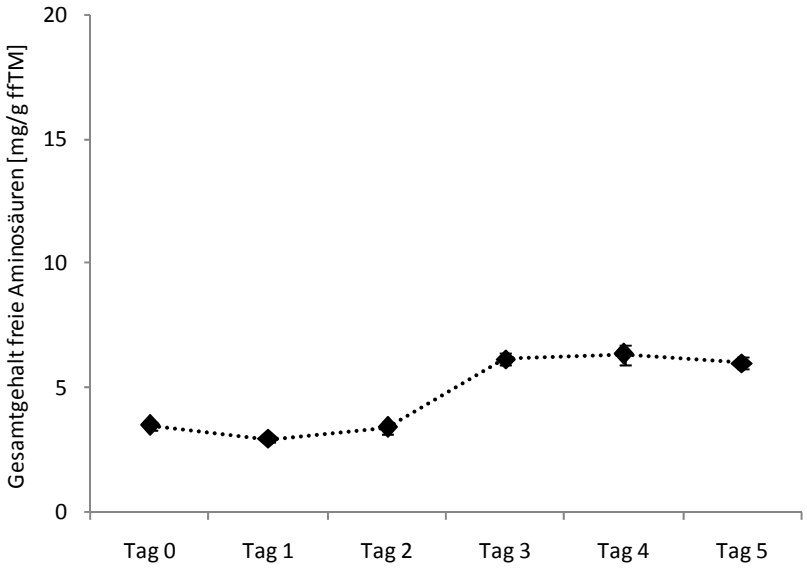


Abbildung 54: Gesamtgehalt der freien Aminosäuren der entfetteten Samen aus Catongo-Früchten im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.1.3.4 γ-Aminobuttersäure

γ-Aminobuttersäure ist eine nichtproteinogene Aminosäure, deren Bildung unter unterschiedlichen Stressbedingungen sowie zu Beginn der Keimung induziert wird (BOWN und SHELP, 1997). Sie wird durch die Decarboxylierung von Glutaminsäure gebildet.

γ-Aminobuttersäuregehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad und Kamerun

Zu Beginn der Keimungsversuche lagen die γ-Aminobuttersäuregehalte in den Samen der Genotypengruppe WAA (Tri1-K bis Tri5-K) zwischen 0,28 und 0,51 mg/g ffTM. Die Samen der Genotypen SNK 64 und ICS 84 wiesen etwas niedrigere γ-Aminobuttersäuregehalte von 0,08 und 0,17 mg/g ffTM auf.

Über den gesamten untersuchten Verlauf der Keimung wurde ein zumeist langsamer, aber stetiger Anstieg des γ-Aminobuttersäuregehaltes in den Samen festgestellt.

Nach viertägiger Keimung enthielten die Samen zwischen 0,42 und 0,89 mg/g ffTM. Nur in den Samen einer Keimungsreihe (Tri1-K) wurde am vierten Tag ein etwas geringerer γ-Aminobuttersäuregehalt festgestellt. Nach zehntägiger Keimung enthielten die Samen zwischen 0,8 und 1,4 mg/g ffTM γ-Aminobuttersäure.

In den Samen der Keimungsreihe Tri5-K wurde ein weitaus höherer Anstieg des γ-Aminobuttersäuregehaltes als in den anderen Samen festgestellt. Die Samen dieser Probe wiesen zu Beginn der Keimung einen verhältnismäßig geringen γ-Aminobuttersäuregehalt von etwa 0,28 mg/g ffTM auf. Dieser stieg in den ersten 4 Tagen der Keimung auf 2,08 mg/g ffTM an. Nach zehntägiger Keimung wurde ein γ-Aminobuttersäuregehalt von 4,8 mg/g ffTM erreicht. Während der Keimung der Samen dieser Probe kam es zu einem leichten Pilzbefall. Dieser kann zu der verstärkten Bildung von γ-Aminobuttersäure geführt haben.

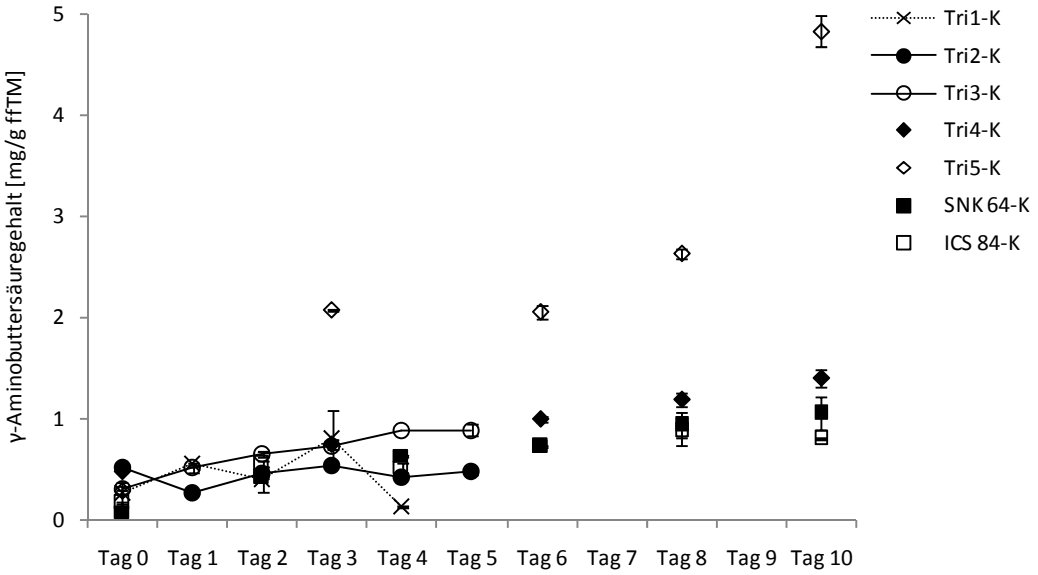


Abbildung 55: γ-Aminobuttersäuregehalt in entfetteten Kakaosamen aus unterschiedlichen Früchten von Trinidad (Tri1-K – Tri5-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

γ-Aminobuttersäuregehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

Die Samen der unterschiedlichen Genotypen enthielten zu Beginn der Keimungsversuche zwischen 0,17 und 0,55 mg/g ffTM γ-Aminobuttersäure. Auch in diesen Samen stieg der γ-Aminobuttersäuregehalt im Verlauf der Keimung an.

Nach sechstägiger Keimung enthielten die Samen zwischen 1,07 und 1,72 mg/g ffTM γ-Aminobuttersäure. Dies entspricht dem Drei- bis Sechsfachen des Ausgangsgehaltes.

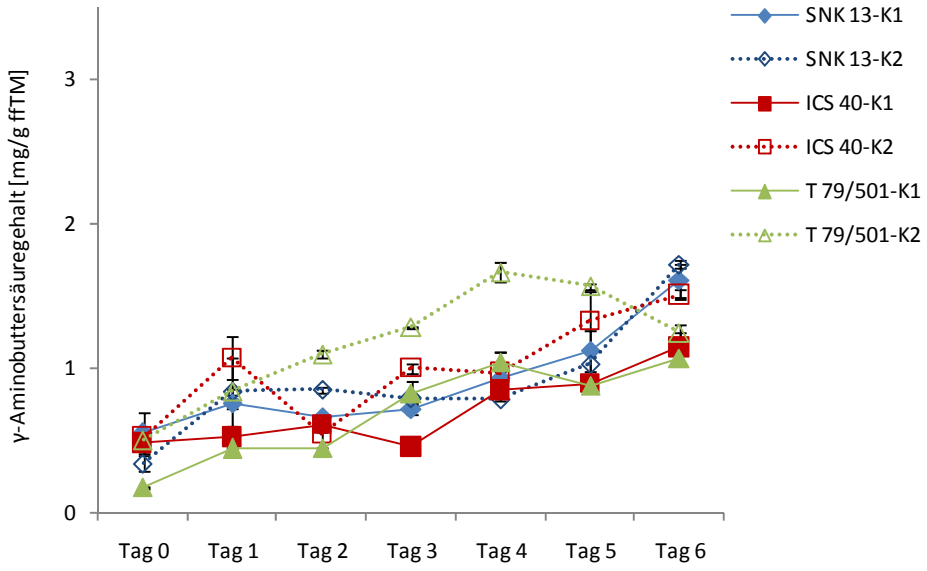


Abbildung 56: γ-Aminobuttersäuregehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

γ-Aminobuttersäuregehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

Zu Beginn der Keimung enthielten die Samen des German Cocoas nur sehr geringe γ-Aminobuttersäuregehalte. In einigen ungekeimten Samen (GcA-K5 und GcA-K6) konnte keine γ-Aminobuttersäure nachgewiesen werden. In den Samen der übrigen Proben lagen die γ-Aminobuttersäuregehalte zwischen 0,18 und 0,48 mg/g ffTM. Nur in den Samen der Probe GcG-I2 war der γ-Aminobuttersäuregehalt mit 1,06 mg/g ffTM etwas höher.

Im Verlauf der Keimung stiegen die γ-Aminobuttersäuregehalte in den German Cocoa-Samen etwas langsamer an als in den Samen der anderen untersuchten Proben.

Nach sechstägiger Keimung enthielten die Samen zwischen 0,28 und 1,55 mg/g ffTM γ-Aminobuttersäure.

Auch in den Samen des Catongos stieg der γ-Aminobuttersäuregehalt während der Keimung an. Zu Beginn der Keimung enthielten diese Samen etwa 0,25 mg/g ffTM γ-Aminobuttersäure. Nach fünftägiger Keimung stieg der γ-Aminobuttersäuregehalt auf 0,71 mg/g ffTM an.

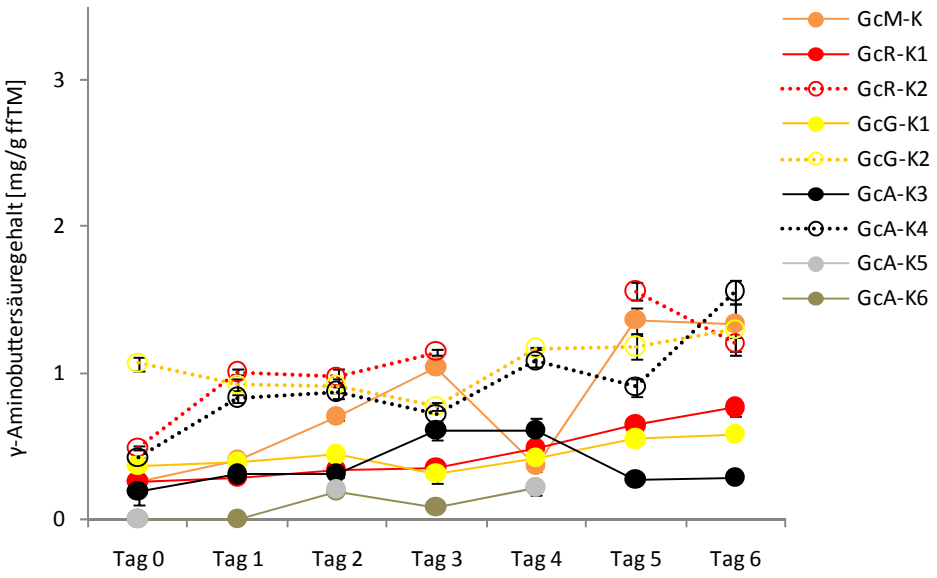


Abbildung 57: γ-Aminobuttersäuregehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

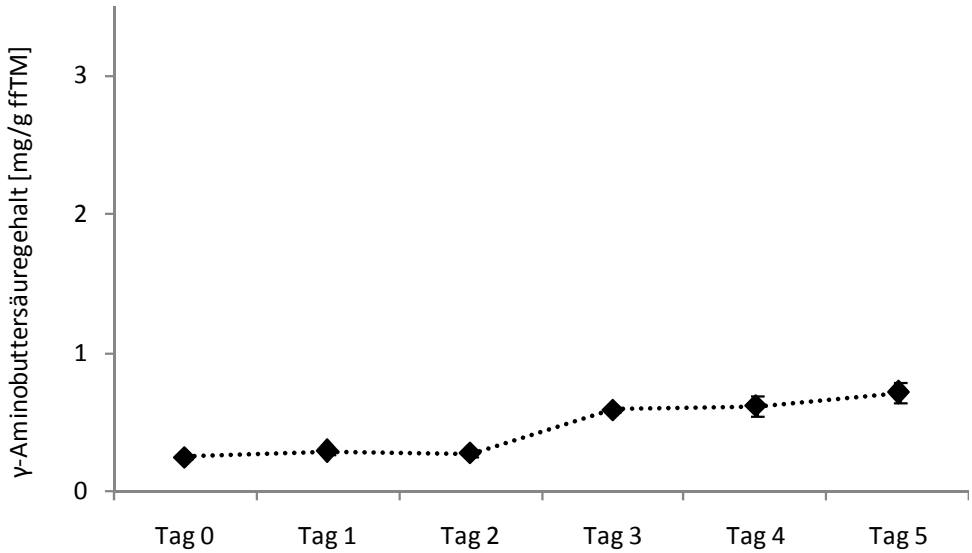


Abbildung 58: γ-Aminobuttersäuregehalt der entfetteten Samen von Catongo-Früchten im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.1.3.5 Zusammenfassung

Proteine

Während der frühen Keimung wurde in den Samen der meisten Proben keine Veränderung des Gesamtgehaltes der Proteine festgestellt. Nur in den Samen weniger Proben nahm der Proteingehalt etwas ab.

Die Auftrennung der Proteine durch eine Gelelektrophorese ließ erkennen, dass ab dem 6. bis 8. Tag der Keimung ein Proteinabbau einsetzte. Die Albumine wurden hierbei weniger stark abgebaut als die Globuline. Vor allem das 45,7 kDa Globulin wurde stark abgebaut. Das 31 kDa Globulin veränderte sich dagegen auch während einer zehntägigen Keimung kaum.

Oligopeptide

Einige Samen wiesen sehr geringe Mengen an Oligopeptiden auf. Während einer sechstägigen Keimung wurde keine Veränderung des Oligopeptidgehaltes festgestellt.

Auch die Zusammensetzung der Aminosäuren veränderte sich nicht. Die Samen enthielten 35 bis 40 % hydrophobe und 33 bis 40 % saure Aminosäuren und deren Säureamide, wobei die Gehalte an Asparaginsäure und Glutaminsäure am Gesamtgehalt der Aminosäuren der Oligopeptide besonders hoch waren.

Freie Aminosäuren

In den ersten Tagen der Keimung wurden kaum Veränderungen des Gesamtgehaltes der freien Aminosäuren und deren Zusammensetzung festgestellt. In den Samen einiger Proben stieg der Aminosäuregehalt vor allem ab dem 5. bis 10. Tag der Keimung etwas an. Die ungekeimten Samen enthielten je nach Probe zwischen 3,1 und 11,5 mg/g ffTM an freien Aminosäuren. Nur in

den Samen des Genotypen ICS 40 wurde ein höherer Gehalt an freien Aminosäuren von 14,0 bis 16,7 mg/g ffTM gefunden.

Die Samen enthielten zwischen 62 und 77 % saure Aminosäuren und deren Säureamide, wobei die Gehalte an Asparagin, Asparaginsäure und Glutaminsäure besonders hoch waren. Die Samen des Genotypen ICS 40 enthielten sogar 92 % saure Aminosäuren und deren Säureamide. Der Anteil an hydrophoben Aminosäuren lag zwischen 16 und 33 %. Die Samen des Genotypen ICS 40 enthielten nur 6 % hydrophobe Aminosäuren.

Nach KIRCHHOFF *et al.* (1989b) enthalten frische, nicht getrocknete Samen 19 % hydrophobe und 74 % saure Aminosäuren und deren Säureamide.

Ab dem 5. bis 6. Tag der Keimung stieg der Anteil an hydrophoben Aminosäuren am Gesamtgehalt der freien Aminosäuren etwas an und der der sauren Aminosäuren und deren Säureamiden verringerte sich.

γ-Aminobuttersäure

Ungekeimte Samen enthielten 0,08 bis 0,55 mg/g ffTM γ-Aminobuttersäure. In den Samen von zwei German Cocoa-Früchten wurde keine γ-Aminobuttersäure nachgewiesen.

Da es sich bei den Kakaosamen um rekalcitrante Samen handelt, kann die Keimung bei Überreife schon in der Frucht erfolgen, so dass der γ-Aminobuttersäuregehalt in frischen Samen, je nach deren physiologischer Reife, unterschiedlich sein kann.

Im Verlauf der Keimung stieg der γ-Aminobuttersäuregehalt in den Samen an, so dass er nach sechstägiger Keimung durchschnittlich 3- bis 5-mal höher war als in den ungekeimten Samen. Die Zunahme des γ-Aminobuttersäuregehaltes verlief je nach Keimungsreihe unterschiedlich stark. Dies hing vermutlich unter anderem mit den unterschiedlichen Reifegraden der für die Untersuchungen verwendeten Früchte zum Zeitpunkt der Ernte und der unterschiedlichen Dauer von der Ernte bis zur Verarbeitung zusammen. Hier könnte auch ein Zusammenhang mit dem hohen Asparaginsäuregehalt in den Samen des Genotypen ICS 40 bestehen. Allerdings wiesen die Samen dieses Genotypen ähnliche γ-Aminobuttersäuregehalte wie die anderen untersuchten Samen auf.

Die genauen Ursachen für die unterschiedlich starke Bildung von γ-Aminobuttersäure wurden hier nicht erfasst.

4.1.4 Veränderung der Konzentration an phenolischen Substanzen in Kakaosamen im Verlauf der Keimung

Frische Samen enthalten 12 bis 18 % des Trockengewichtes an phenolischen Substanzen (KIM und KEENEY, 1984), wobei Epicatechin etwa 35 % des Polyphenolgesamtgehaltes darstellt.

Die Untersuchungen der phenolischen Substanzen im Verlauf der frühen Keimung von Kakaosamen sollten zeigen, ob eine Veränderung ihrer Verfügbarkeit stattfindet. Hierfür wurden die Gehalte an Epicatechin, Catechin und der Anthocyane in den Kotyledonen bestimmt.

4.1.4.1 Epicatechin

Epicatechingehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad und Kamerun

Die frischen Samen enthielten zu Beginn der Keimungsversuche zwischen 25 und 52 mg/g ffTM Epicatechin. Die Samen der Genotypen SNK 64 und ICS 84 aus Kamerun wiesen höhere Epicatechingehalte von 44 und 52 mg/g ffTM auf als die Samen der aus Trinidad stammenden Früchte (25 und 40 mg/g ffTM; Tri1-K bis Tri5-K). Nach KIM und KEENEY (1984) enthalten frische Samen je nach Herkunft 22 bis 43mg/g ffTM Epicatechin.

Im Verlauf der Keimung stieg der Epicatechingehalt in den Samen einiger Proben etwas an, so dass nach einer zehntägigen Keimung durchschnittlich etwa 111 % (± 11) des Anfangsgehaltes nachgewiesen wurden. Allerdings verlief die Zunahme nur sehr gering und konnte nicht in allen Samen nachgewiesen werden (Abbildung 59).

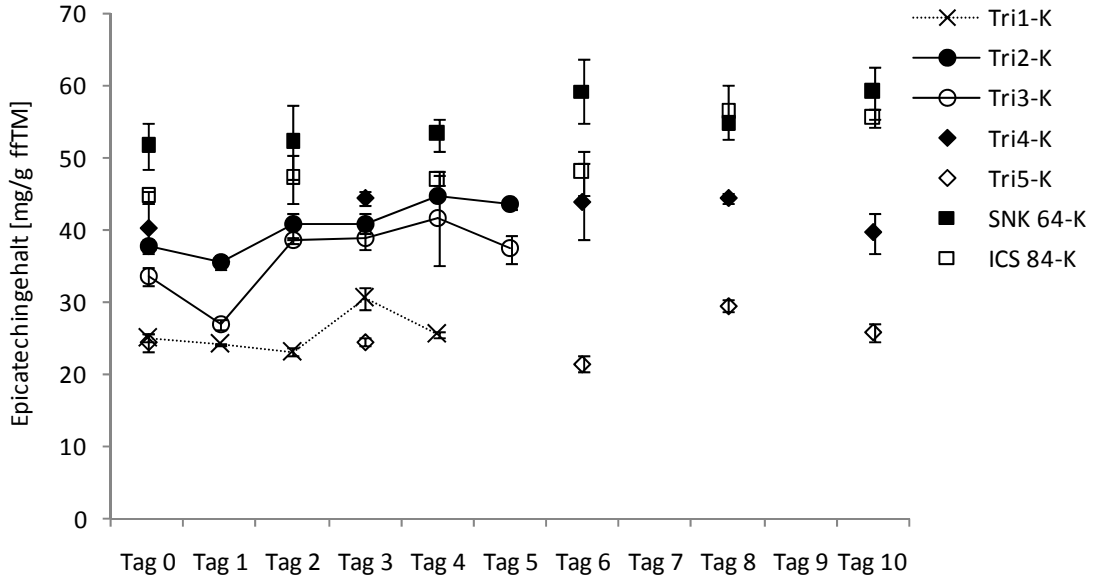


Abbildung 59: Epicatechingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K – Tri5-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Epicatechingehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

Die frischen Samen enthielten zwischen 24 und 50 mg/g ffTM Epicatechin. Die vergleichsweise kleinen Samen des Genotypen T 79/501 wiesen etwas niedrigere Epicatechingehalte von 24 bis 26 mg/g ffTM auf als die größeren Samen der anderen beiden Genotypen, welche 30 bis 50 mg/g ffTM Epicatechin enthielten.

In den Samen der meisten Proben konnte keine Veränderung des Epicatechingehaltes während der Keimung festgestellt werden.

In einigen Samen ist der Epicatechingehalt im Verlauf der frühen Keimung leicht gesunken, vor allem in den Samen des Genotypen ICS 40. In diesen lag er zu Beginn der Keimung zwischen 37 bis 50 mg/g ffTM. Nach sechstägiger Keimung war er auf 26 mg/g ffTM gesunken.

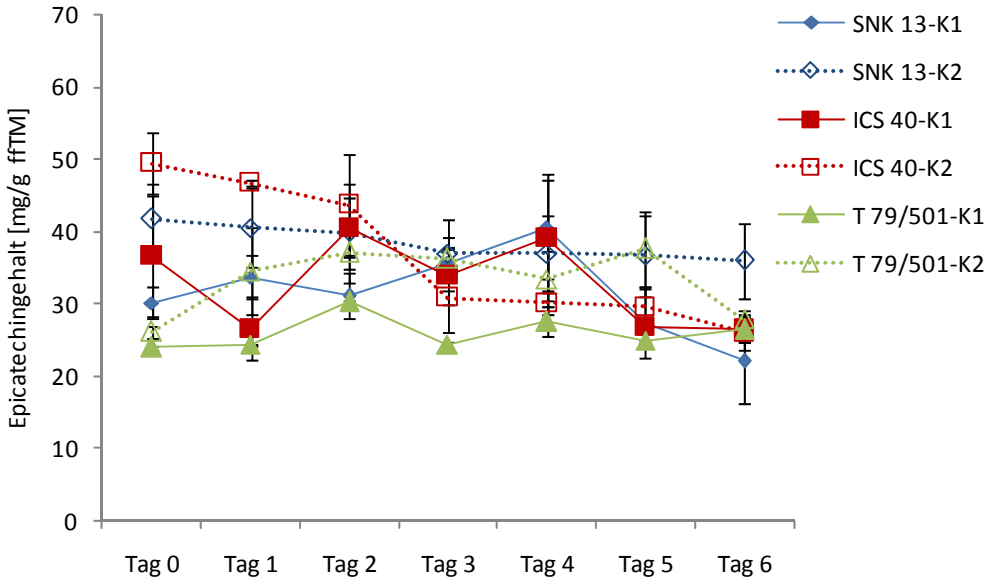


Abbildung 60: Epicatechingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Epicatechingehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

Die Epicatechingehalte der frischen German Cocoa-Samen lagen in einem Bereich von 29 bis 61 mg/g ffTM, wobei die meisten Samen zwischen 41 und 46 mg/g ffTM Epicatechin enthielten. Nur die Samen des German Cocoas aus der Region von Mbangassina in Kamerun (GcM), welche trockener ist als die Regionen, aus denen die anderen German Cocoa-Früchte stammten, wiesen einen niedrigeren Epicatechingehalt von etwa 25 mg/g ffTM auf.

Die frischen Samen des Catongo enthielten einen vergleichsweise niedrigen Epicatechingehalt von 24 mg/g ffTM.

Im Verlauf der frühen Keimung hat sich der Epicatechingehalt kaum verändert.

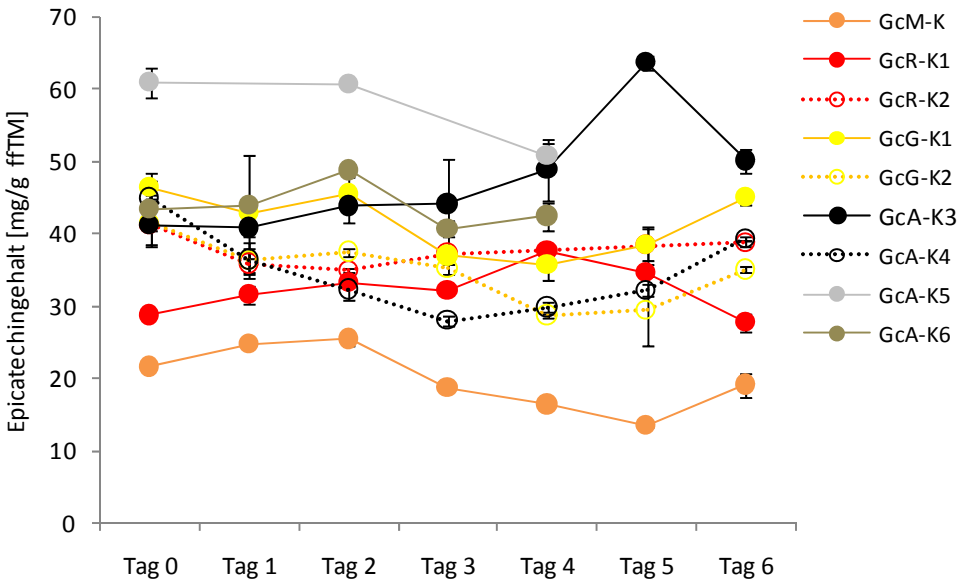


Abbildung 61: Epicatechingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

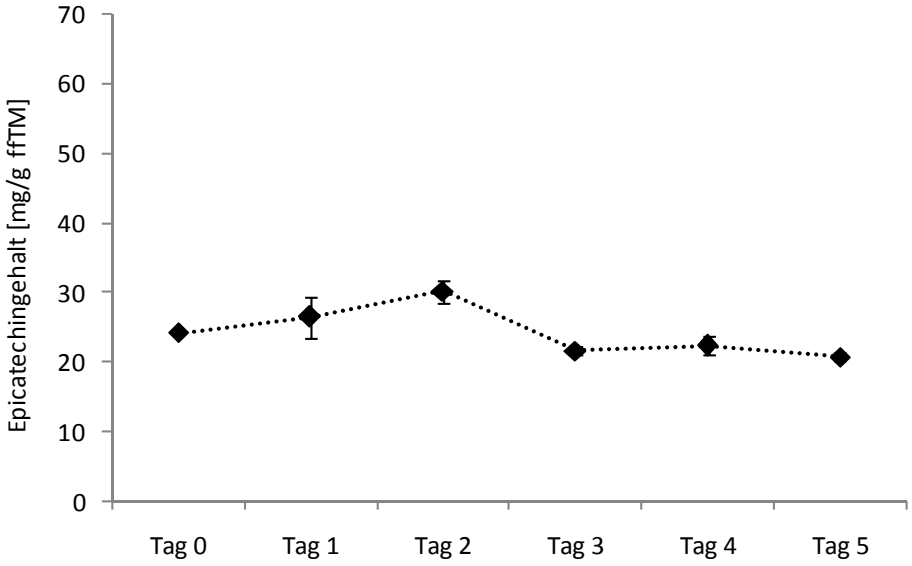


Abbildung 62: Epicatechingehalt der entfetteten Samen von Catongo-Früchten im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.1.4.2 Catechin

Catechingehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad und Kamerun

Die frischen Samen der Genotypgruppe WAA (Tri1-K bis Tri5-K) enthielten zwischen 0,5 und 0,8 mg/g ffTM Catechin. Die frischen Samen der Genotypen SNK 64 und ICS 84 wiesen zu Beginn der Keimung höhere Catechingehalte von 1,6 und 1,9 mg/g ffTM auf.

Abgesehen von leichten Schwankungen hat sich der Catechingehalt im Verlauf der Keimungsversuche nur wenig verändert.

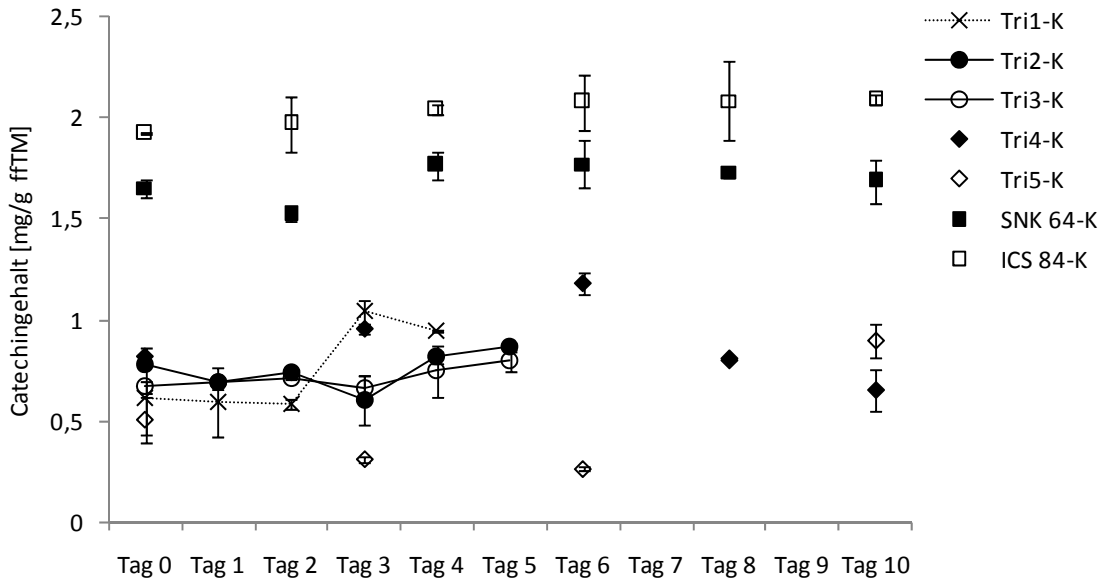


Abbildung 63: Catechingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K – Tri5-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Catechingehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

Die frischen Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501 enthielten zwischen 0,4 und 1,1 mg/g ffTM Catechin. Die verhältnismäßig kleinen Samen des Genotypen T 79/501 (Samengewicht durchschnittlich 1,1 g) wiesen den geringsten Catechingehalt von 0,3 und 0,7 mg/g ffTM auf. Die etwas größeren Samen des Genotypen SNK 13 (1,9 g) enthielten mit 0,9 bis 1,2 mg/g ffTM den höchsten Epicatechingehalt. Die extrem großen Samen des Genotypen ICS 40 (3,3 g) enthielten 0,6 bis 0,9 mg/g ffTM Catechin.

Die teilweise auftretenden Schwankungen können auf der Diversität der Einzelsamen beruhen.

Im Verlauf einer sechstägigen Keimung hat sich der Catechingehalt in den Samen nur wenig verändert. In einigen Samen nahm er etwas ab.

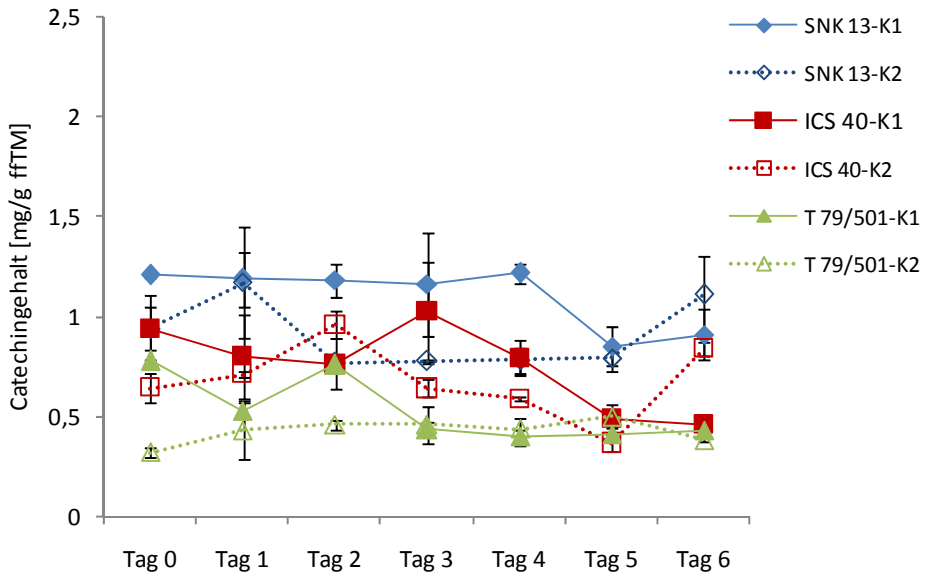


Abbildung 64: Catechingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Catechingehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

Die frischen Samen des German Cocoas enthielten zwischen 0,4 und 1,1 mg/g ffTM Catechin. Im Verlauf einer sechstägigen Keimung hat sich der Catechingehalt in den Samen nicht verändert.

In den Samen des Catongo nahm der Catechingehalt ab, so dass am fünften Tag der Keimung nur noch etwa 60 % des Anfangsgehaltes an Catechin nachgewiesen wurde.

Die frischen Samen des Catongos enthielten, im Vergleich mit dem Catechingehalt der anderen Samen (außer SNK 64 und ICS 84), einen relativ hohen Catechingehalt von etwa 1,3 mg/g ffTM.

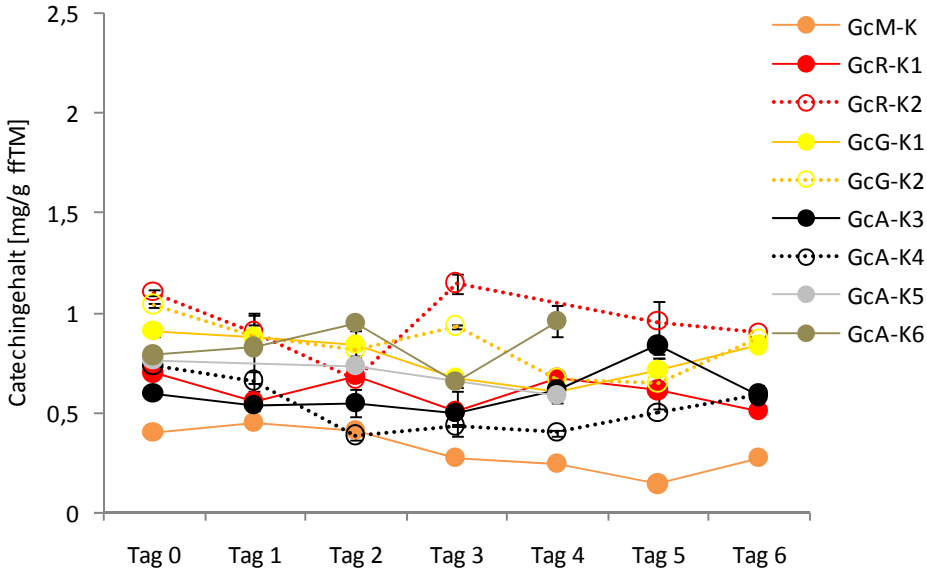


Abbildung 65: Catechingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

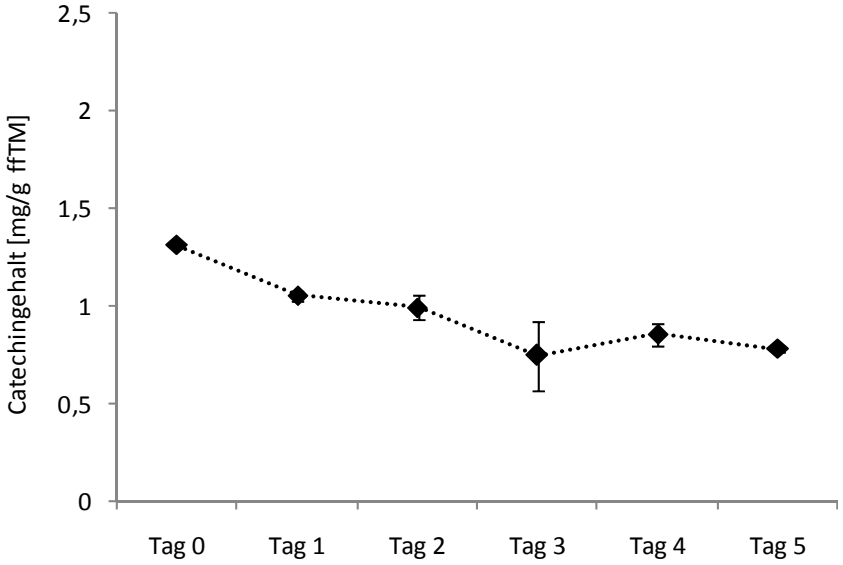


Abbildung 66: Catechingehalt der entfetteten Samen von Catongo-Früchten im Verlauf der Keimung. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.1.4.3 Anthocyane

Bei etwa 4,5 % der phenolischen Substanzen in frischen Kakaosamen handelt es sich um Anthocyane, welche für die charakteristische violette Färbung der Kotyledonen verantwortlich sind (BAIGRIE, 1994).

Da die Samen sehr unterschiedliche Anthocyangehalte aufwiesen, wurden in den Abbildungen zur übersichtlicheren Darstellung unterschiedliche Skalierungen verwendet.

Cyanidin-3-galactosid- und Cyanidin-3-arabinosidgehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Kamerun

Die frischen Samen der Genotypen SNK 64 und ICS 84 enthielten etwa 1,0 und 1,9 mg/g ffTM Cyanidin-3-galactosid und 4,6 und 2,1 mg/g ffTM Cyanidin-3-arabinosid. Die Samen des Genotypen SNK 64 enthielten einen niedrigeren Cyanidin-3-galactosid- und einen höheren Cyanidin-3-arabinosidgehalt als die Samen des Genotypen ICS 84.

Im Verlauf einer zehntägigen Keimung veränderten sich die Anthocyangehalte nur wenig. Die während der Keimung auftretenden Schwankungen des Gehaltes können auf der Diversität der Einzelsamen einer Frucht beruhen.

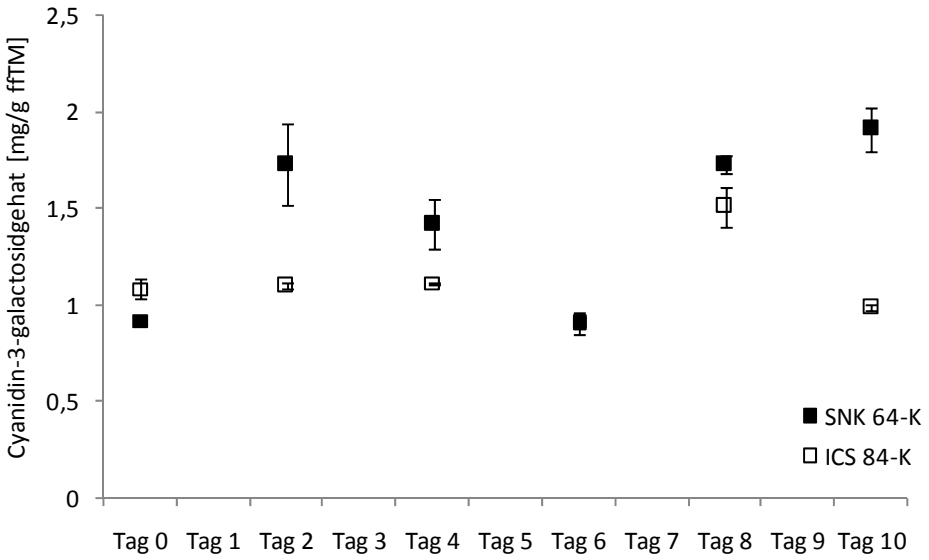


Abbildung 67: Cyanidin-3-galactosidgehalt in entfetteten Kakaosamen von zwei unterschiedlichen Früchten aus Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

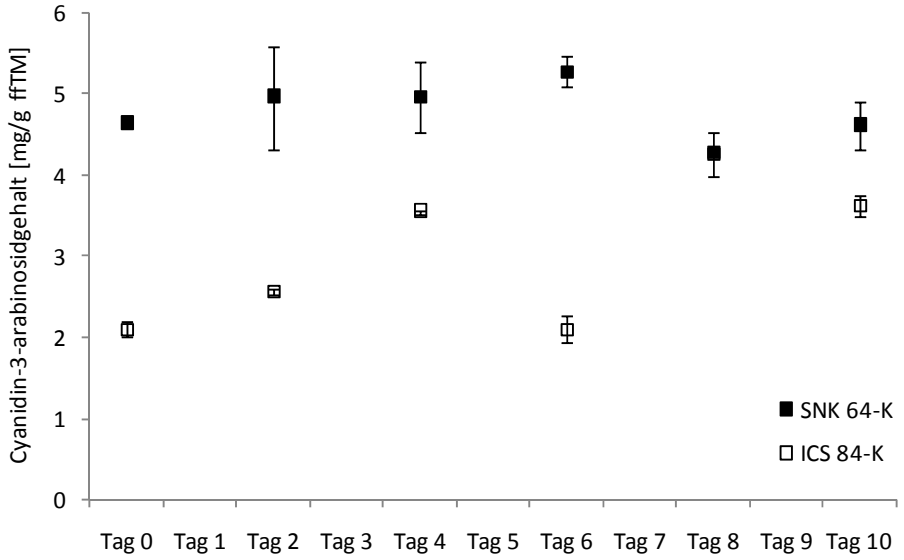


Abbildung 68: Cyanidin-3-arabinosidgehalt in entfetteten Kakaosamen von zwei unterschiedlichen Früchten aus Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Cyanidin-3-galactosid- und Cyanidin-3-arabinosidgehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

Die frischen Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501 enthielten zwischen 1,2 und 3,6 mg/g ffTM Cyanidin-3-galactosid und zwischen 2,4 und 8,8 mg/g ffTM Cyanidin-3-arabinosid. Die Unterschiede der Anthocyangehalte in den Samen der jeweiligen parallelen Keimungsreihen mit Samen aus unterschiedlichen Früchten desselben Genotypen können auf der Diversität des Genpools und dem Erntezeitpunkt begründet sein.

Im Verlauf einer sechstägigen Keimung haben sich die Anthocyangehalte nicht verändert.

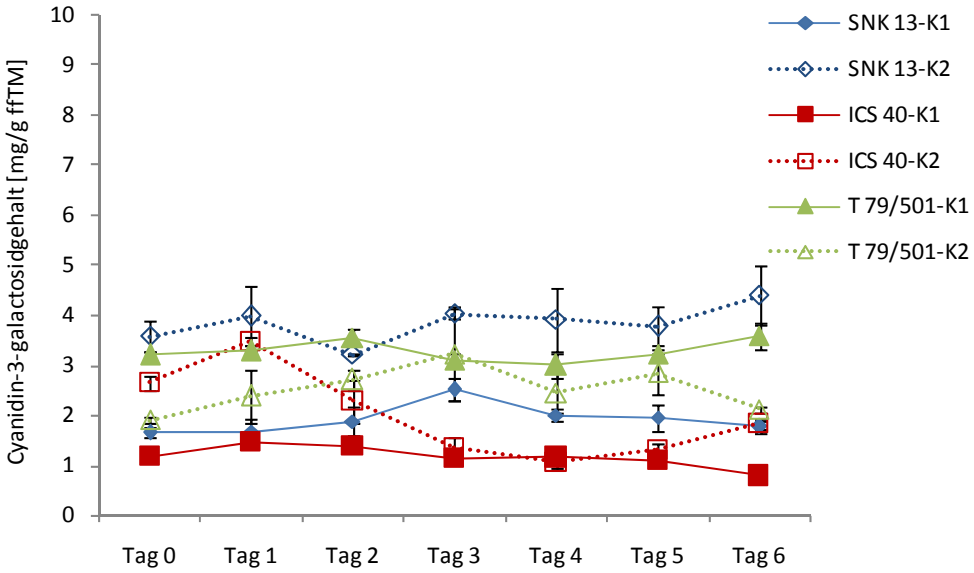


Abbildung 69: Cyanidin-3-galactosidgehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

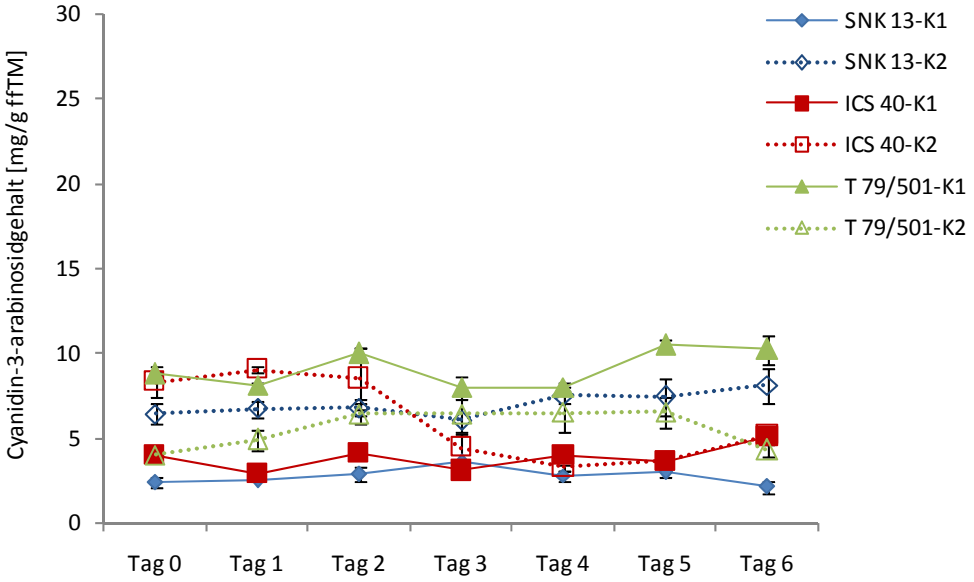


Abbildung 70: Cyanidin-3-arabinosidgehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Cyanidin-3-galactosid- und Cyanidin-3-arabinosidgehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

Die Samen des German Cocoas enthielten sehr hohe Anthocyangehalte.

Die frischen Samen enthielten zwischen 1,3 und 6,2 mg/g ffTM Cyanidin-3-galactosid und zwischen 7,3 und 16,9 mg/g ffTM Cyanidin-3-arabinosid. Vor allem die Cyanidin-3-

arabinosidgehalte des German Cocoas waren höher als die der anderen untersuchten Kakaovarietäten.

Im Verlauf von sechstägigen Keimungsversuchen veränderten sich die Anthocyangehalte nur wenig. Die teilweise auftretenden Schwankungen beruhen vermutlich auf der genetischen Diversität der Samen.

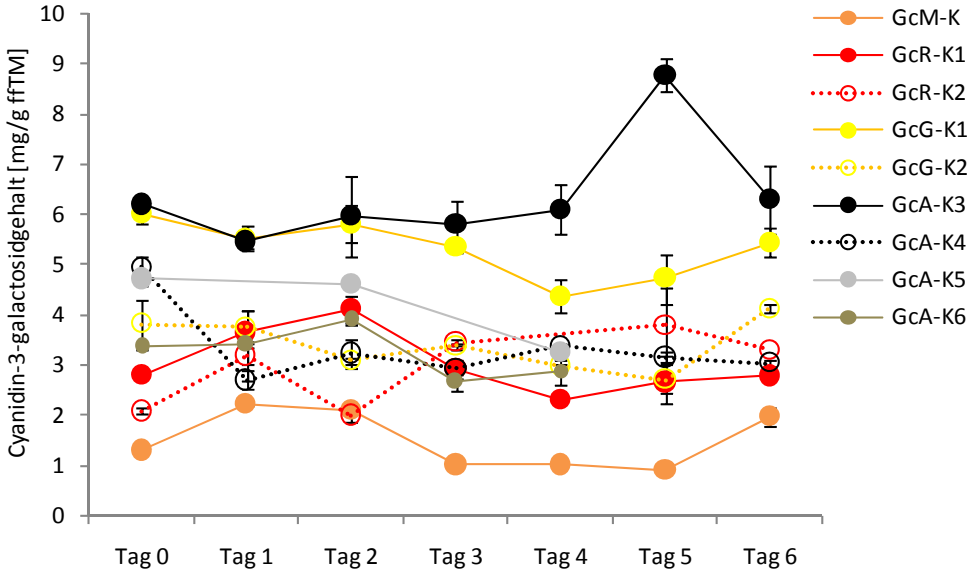


Abbildung 71: Cyanidin-3-galactosidgehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

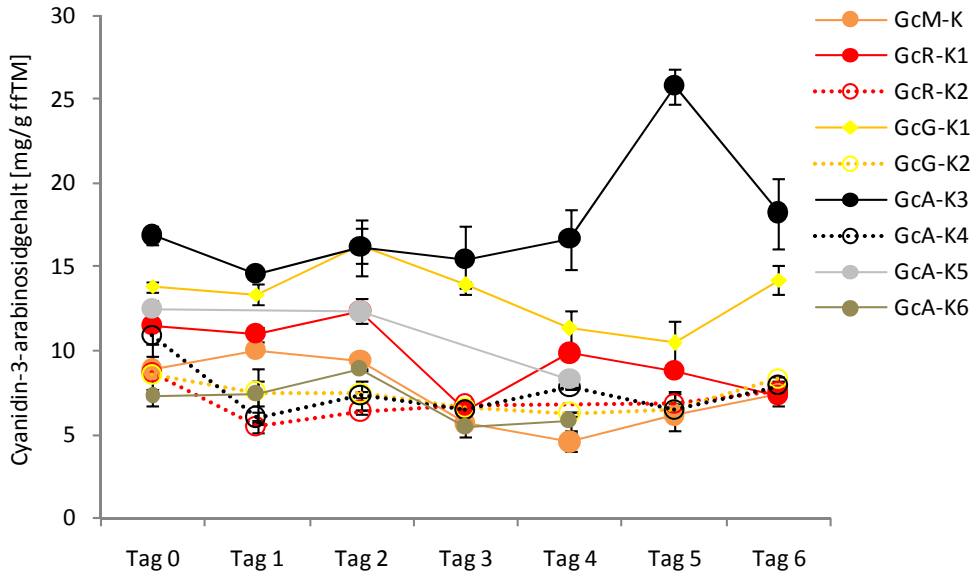


Abbildung 72: Cyanidin-3-arabinosidgehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Die frischen Samen der Catongo-Früchte enthielten relativ hohen Anthocyangehalte von etwa 2,5 mg/g ffTM Cyanidin-3-galactosid und 5,3 mg/g ffTM Cyanidin-3-arabinosid.

Catongosamen enthalten normalerweise aufgrund eines Anthocyan-Inhibitorgens keine Anthocyane (Bartley, 2005). Da der Catongobaum, von welchem die verwendeten Früchte stammten, am Rand einer German Cocoa-Plantage wuchs, ist anzunehmen, dass die Befruchtung durch Pollen des German Cocoas erfolgte, welche einen besonders hohen Anthocyangehalt aufwiesen. Die Samen des Catongos waren daher zumeist auch violett gefärbt.

Im Verlauf der Keimung wurde eine geringe Abnahme der Anthocyangehalte festgestellt.

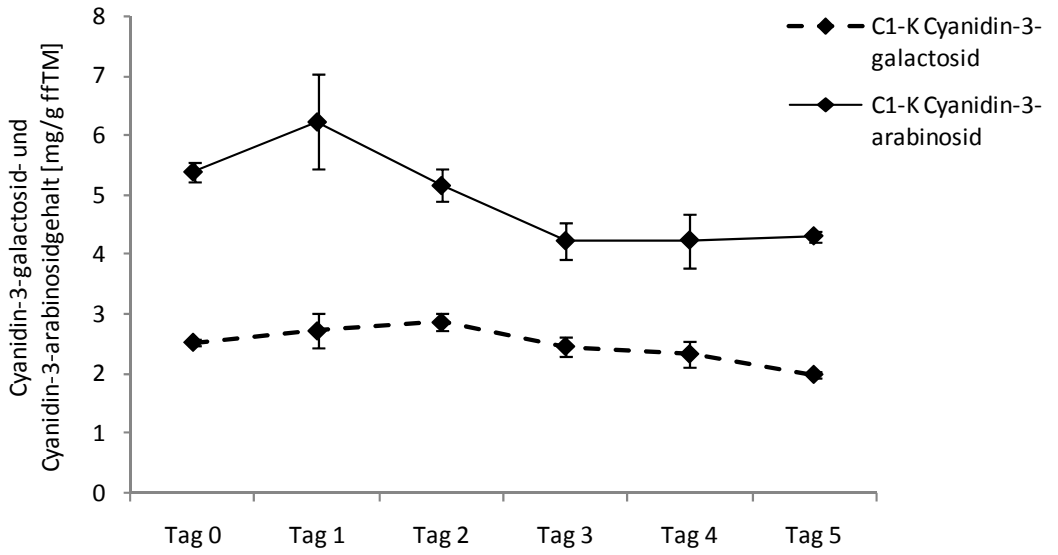


Abbildung 73: Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosidgehalt der entfetteten Samen von Catongo-Früchten im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.1.4.4 Zusammenfassung

Die Epicatechin-, Catechin- und Anthocyangehalte der unterschiedlichen untersuchten Samen haben sich im Verlauf der Keimungsversuche nur geringfügig verändert.

Die frischen Samen enthielten je nach Probe zwischen 24 und 52 mg/g ffTM Epicatechin und zwischen 0,3 und 1,2 mg/g ffTM Catechin. Die Samen des German Cocoas enthielten besonders hohe Gehalte an phenolischen Substanzen, vor allem Anthocyane (siehe Tabelle 15).

4.1.5 Veränderung der Zuckergehalte im Verlauf der Keimung

Kotyledonen frischer Kakaosamen enthalten 5 - 9 % ihres Trockengewichtes an Kohlenhydraten, davon sind 2 – 4 % freie Zucker (ZIEGLEDER und BIEHL, 1988). Neben den vorwiegend vorhandenen Zuckern Saccharose, Fructose und Glucose kommen noch andere Zucker wie Galactose, Raffinose, Sorbose, Xylose und Arabinose und Zuckeralkohole wie Inositol und Mannitol (REINECCIUS *et al.*, 1972) vor, deren Anteil am Gesamtgehalt der freien Zucker jedoch relativ gering ist. In unfermentierten Samen stellt Saccharose etwa 90 % des freien Gesamtzuckers dar. Fructose und Glucose stellen zusammen nur einen geringen Anteil von etwa 6 % (ZIEGLEDER und BIEHL, 1988).

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Zucker Fructose, Glucose und Saccharose untersucht werden.

4.1.5.1 Saccharose

Saccharosegehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad und Kamerun

Die frischen Samen enthielten zwischen 36 und 42 mg/g ffTM Saccharose. Zu Beginn der Keimung nahm der Saccharosegehalt zunächst ab, so dass die Samen nach viertägiger Keimung nur noch 29 bis 31 mg/g ffTM Saccharose enthielten. Die niedrigsten Saccharosegehalte wurden nach sechstägiger Keimung gemessen. Die Samen des Genotypen ICS 84 enthielten nach sechstägiger Keimung 25 mg/g ffTM und die des Genotypen SNK 64 30 mg/g ffTM Saccharose. Dies entspricht etwa 66 bzw. 83 % des Anfangsgehaltes an Saccharose.

Im weiteren Verlauf der Keimung stieg der Gehalt wieder an, so dass die Samen nach zehntägiger Keimung 33 und 39 mg/g ffTM Saccharose enthielten. In den Samen des Genotypen ICS 84 hatte der Saccharosegehalt zu diesen Zeitpunkt wieder 87 % und in den Samen des Genotypen SNK 64 109 % des Ausgangsgehaltes erreicht. Es hat vermutlich ein Abbau der Reservestärke stattgefunden.

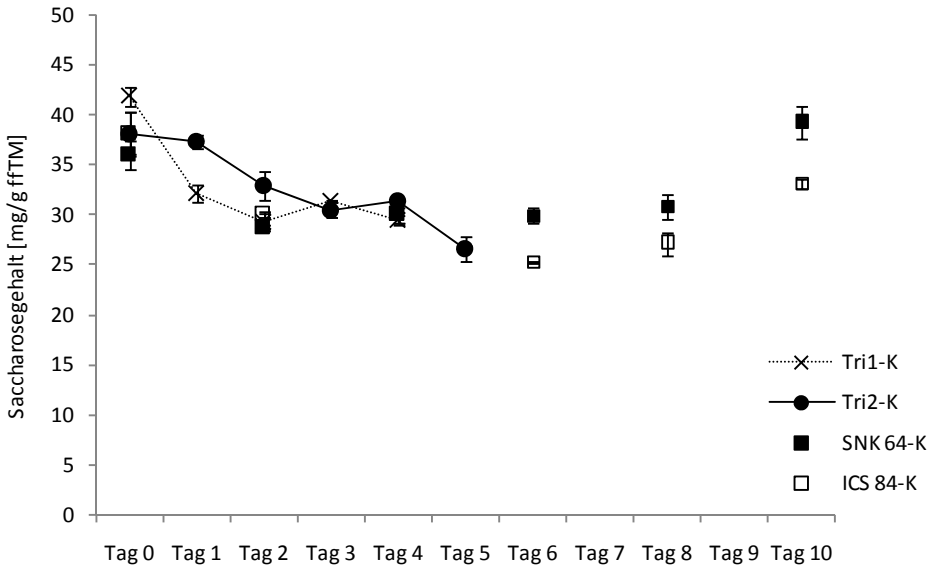


Abbildung 74: Saccharosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K und Tri2-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Saccharosegehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

Die Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501 wiesen zu Beginn der Keimungsversuche 33 bis 47 mg/g ffTM Saccharose auf. Während der Keimung nahm der Gehalt ab, so dass die Samen nach sechstägiger Keimung 25 bis 34 mg/g ffTM Saccharose enthielten.

Am stärksten nahm der Saccharosegehalt in den extrem großen Samen des Genotypen ICS 40 ab, welche einen hohen Wassergehalt aufwiesen (siehe Kapitel 4.2.1.2). In diesen Samen ging der Saccharosegehalt innerhalb einer sechtägigen Keimung von ursprünglichen 47 mg/g ffTM auf 25 mg/g ffTM zurück. Dies entspricht einer Abnahme auf 53 % des Anfangsgehaltes.

In den Samen der Genotypen SNK 13 und T 79/501 fiel die Abnahme geringer aus, so dass sie nach sechstägiger Keimung noch 94 und 85 % des Anfangsgehaltes an Saccharose enthielten.

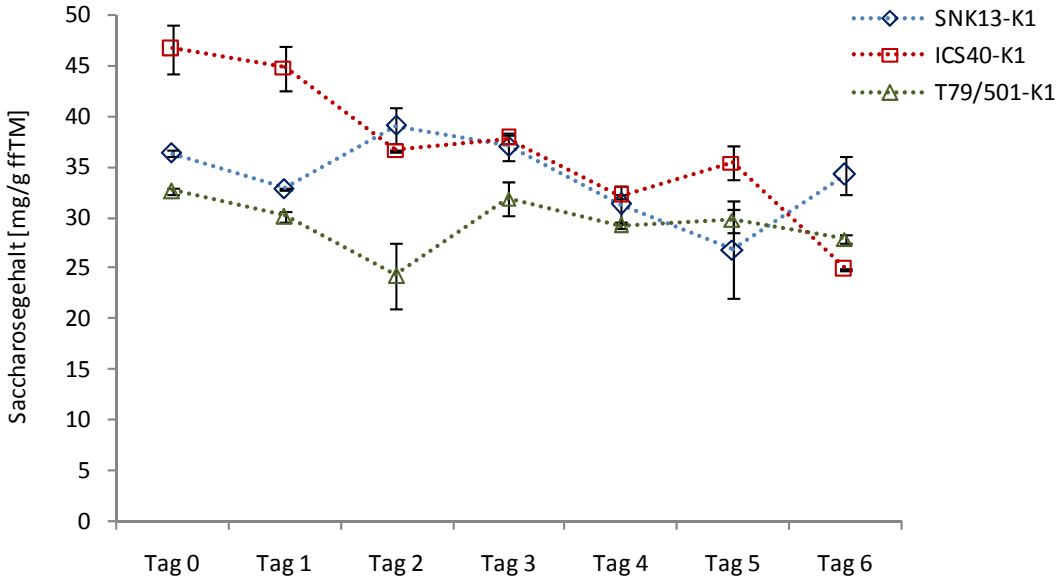


Abbildung 75: Saccharosegehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Saccharosegehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

In den Samen des German Cocoas lagen die Saccharosegehalte zu Beginn der Keimungsversuche zwischen 29 und 37 mg/g ffTM. Im untersuchten Keimungszeitraum nahm der Saccharosegehalt etwas ab.

Nach sechstägiger Keimung enthielten die Samen 27 bis 30 mg/g ffTM Saccharose. Dies entspricht einer Abnahme auf 80 bis 85 % des Anfangsgehaltes. Nur in den Samen der Keimungsreihe GcG-K1 wurde keine Abnahme des Saccharosegehaltes festgestellt.

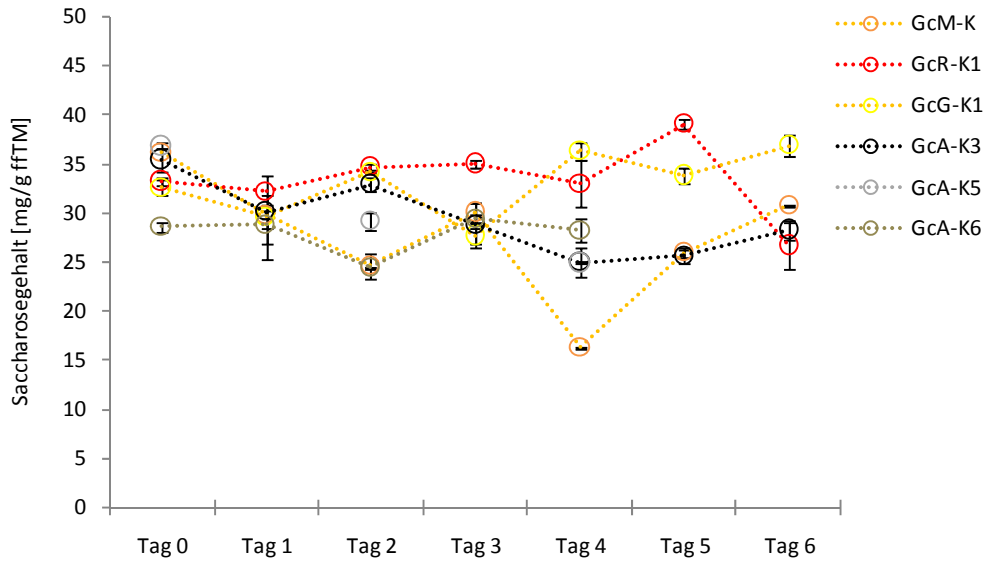


Abbildung 76: Saccharosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.1.5.2 Fructose

Fructosegehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad und Kamerun

In den frischen Samen wurde keine Fructose nachgewiesen. In den Samen der Keimungsreihen Tri1-K und Tri2-K, welche über einen Zeitraum von 4 bis 5 Tagen zur Keimung ausgelegt worden waren, war über den gesamten Untersuchungszeitraum keine Fructose nachweisbar.

In den Samen der Genotypen ICS 84 und SNK 64 stieg der Fructosegehalt ab dem vierten bzw. sechsten Tag der Keimung an, parallel zur Abnahme des Saccharosegehaltes.

Nach zehntägiger Keimung enthielten die Samen 4,5 und 4,8 mg/g ffTM Fructose.

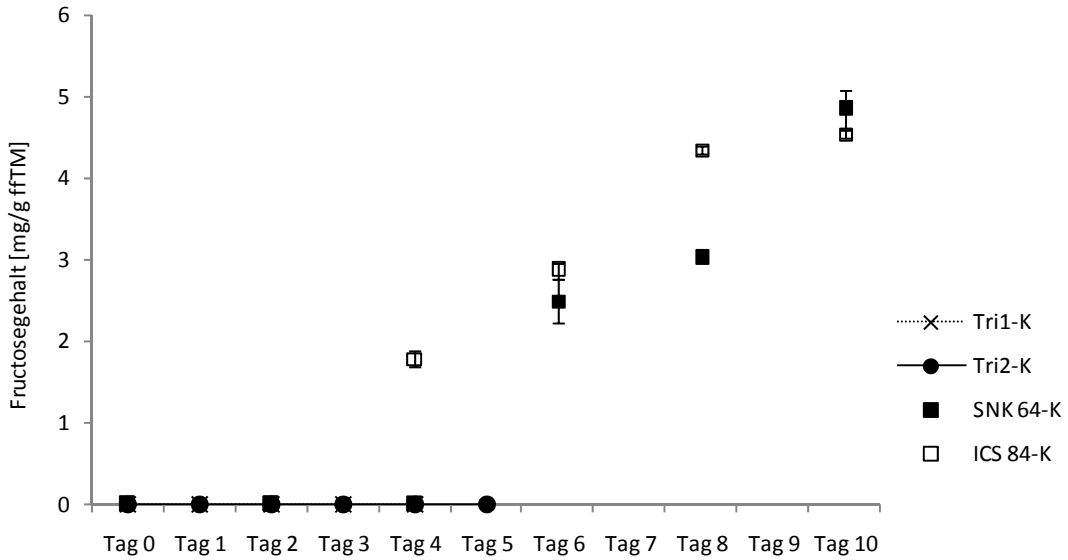


Abbildung 77: Fructosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K und Tri2-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Fructosegehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

Die frischen Samen der Genotypen ICS 40, T 79/501 und SNK 13 enthielten keine Fructose. Im Verlauf der frühen Keimung stieg der Gehalt ab dem vierten bzw. fünften Tag an, so dass die Samen am sechsten Tag 1,3 bis 2,5 mg/g ffTM Fructose enthielten.

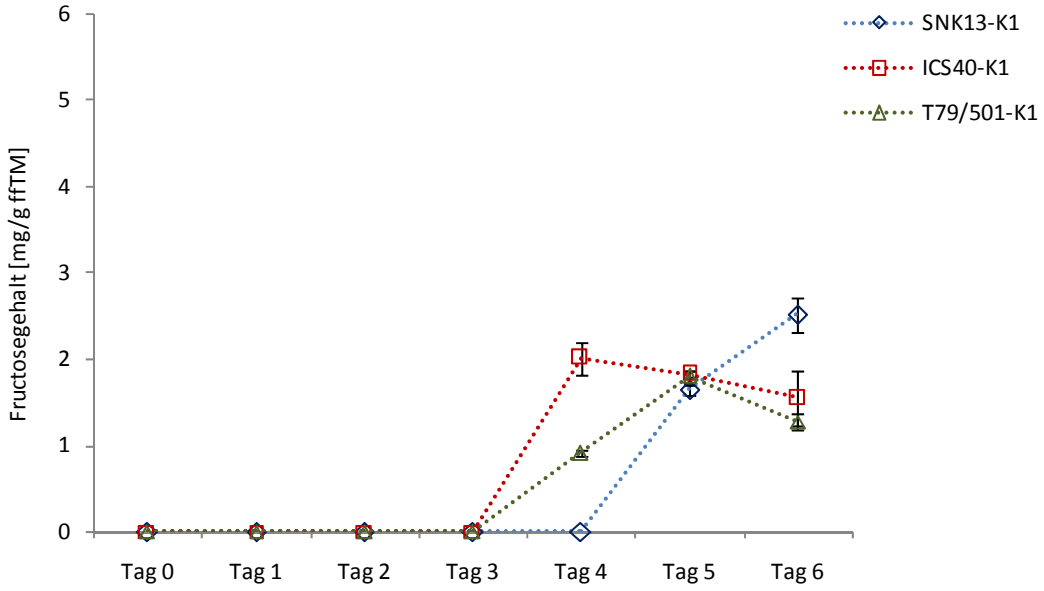


Abbildung 78: Fructosegehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Fructosegehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

In den frischen Samen des German Cocoas war keine Fructose nachweisbar. Im Verlauf der frühen Keimung wurde ab dem vierten bis sechsten Tag ein Anstieg des Fructosegehaltes festgestellt. Nach sechstägiger Keimung enthielten die Samen 1,5 bis 2,5 mg/g ffTM Fructose. Nur in den Samen der Keimungsreihe GcG-K1 wurde nach sechstägiger Keimung keine Fructose nachgewiesen. In diesen Samen wurde auch keine Abnahme des Saccharosegehaltes festgestellt (siehe Kapitel 4.1.5.1).

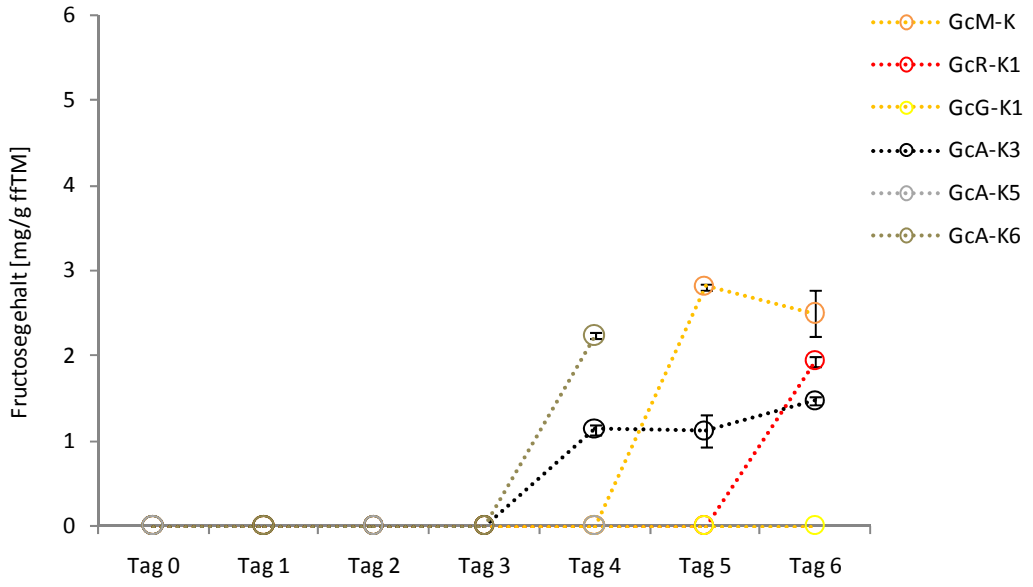


Abbildung 79: Fructosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.1.5.3 Glucose

Glucosegehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad und Kamerun

Parallel zur Abnahme des Saccharosegehaltes stieg der Glucosegehalt an.

Zu Beginn der Keimung war in den frischen Samen keine Glucose nachweisbar. Die Samen der Keimungsreihen Tri1-K und Tri2-K wiesen über den gesamten Untersuchungszeitraum von vier bis fünf Tagen keine Glucose auf.

In den Samen der Genotypen ICS 84 und SNK 64 stieg der Gehalt ab dem vierten bzw. sechsten Tag der Keimung an, so dass sie nach zehntägiger Keimung 5,5 und 5,9 mg/g ffTM Glucose enthielten.

Die Bildung von Glucose und Fructose während der Keimung verläuft parallel. Es handelt sich bei diesen Zuckern um die Abbauprodukte der Saccharose.

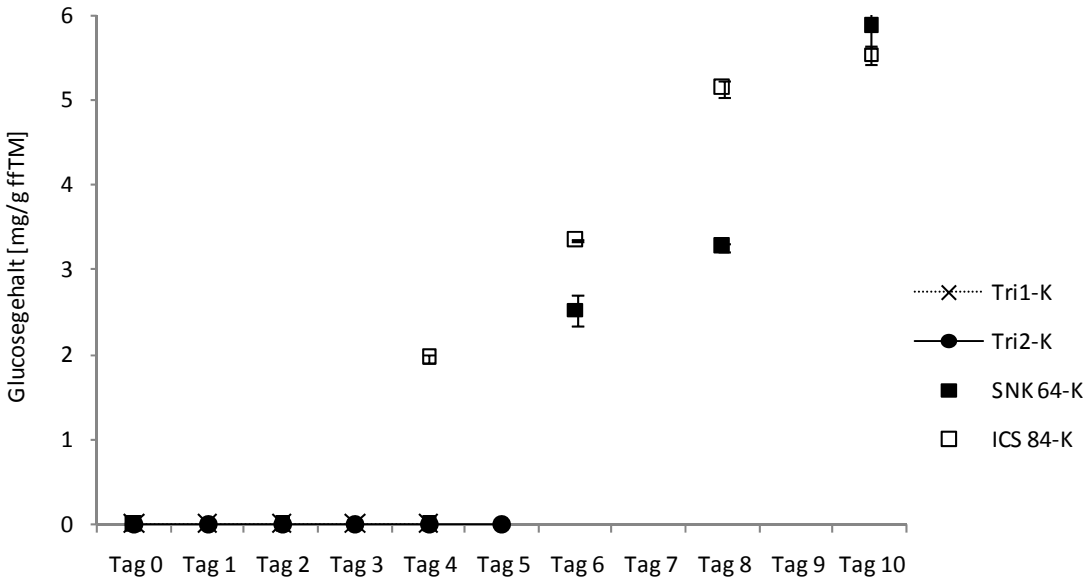


Abbildung 80: Glucosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K und Tri2-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Glucosegehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

Die frischen und ungekeimten Samen der Genotypen ICS 40, T 79/501 und SNK 13 enthielten keine Glucose. Ab dem fünften bzw. sechsten Tag der Keimung war Glucose, jeweils erst einen Tag später als Fructose (siehe Kapitel 4.1.5.2), in den Samen nachweisbar. Nach sechstägiger Keimung enthielten die Samen 1,5 bis 2,9 mg/g ffTM Glucose.

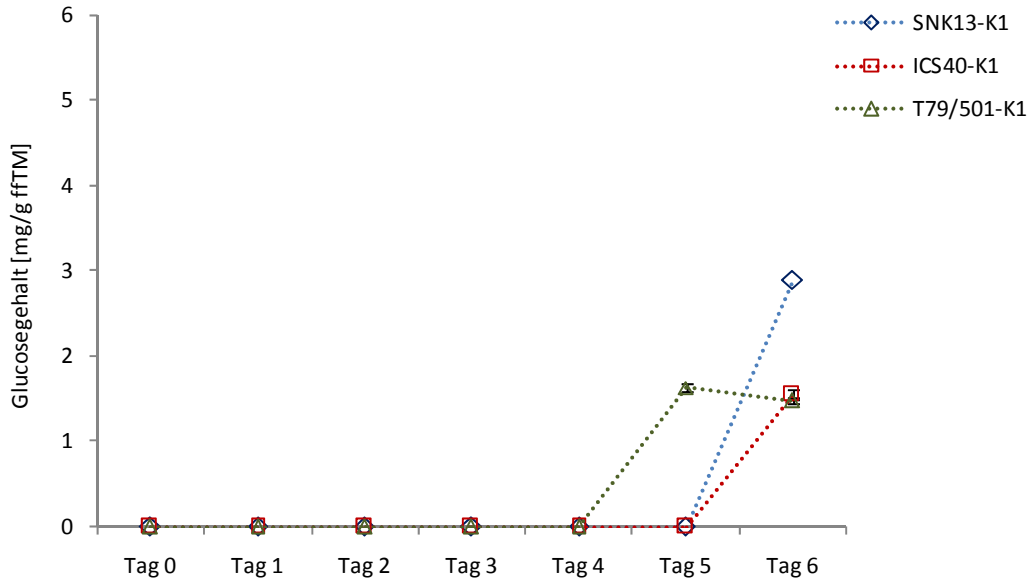


Abbildung 81: Glucosegehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Glucosegehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

In den frischen und ungekeimten Samen des German Cocoas war keine Fructose nachweisbar. Im Verlauf der frühen Keimung wurde ab dem vierten bis sechsten Tag ein Anstieg des Glucosegehaltes nachgewiesen, so dass die Samen am sechsten Tag 1,5 bis 2,6 mg/g ffTM Glucose enthielten. Nur in den Samen der Keimungsreihe GcG-K1 wurde auch nach sechstägiger Keimung keine Glucose nachgewiesen. In diesen Samen war auch keine Abnahme des Saccharosegehaltes und keine Zunahme des Fructosegehaltes nachweisbar (siehe Kapitel 4.1.5.1 und 4.1.5.2).

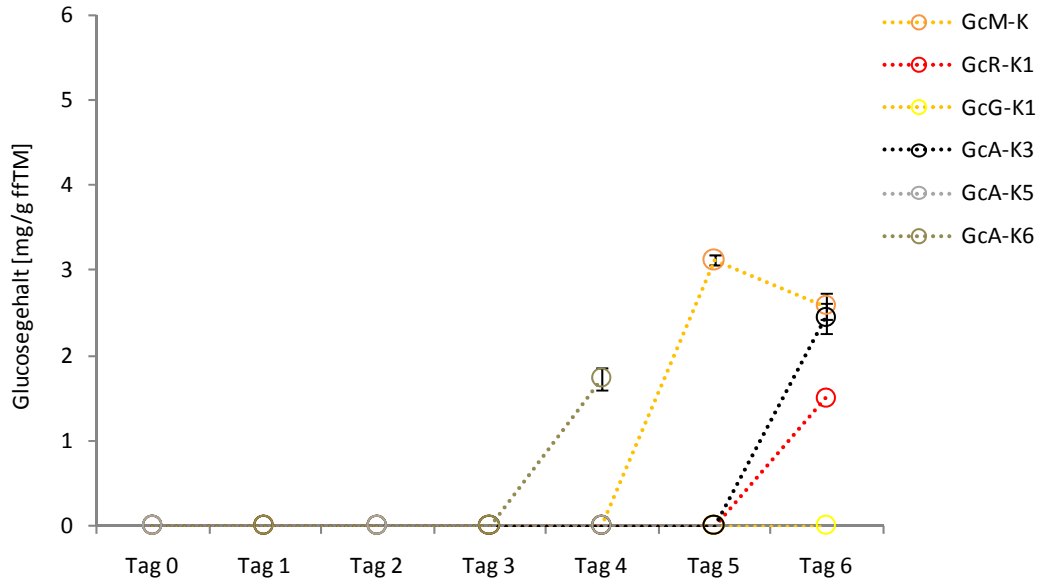


Abbildung 82: Glucosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.1.5.4 Zusammenfassung

Im Verlauf der frühen Keimung nahm der Saccharosegehalt in den ersten sechs Tagen ab. Parallel zu dieser Abnahme stiegen die Gehalte an Fructose und Glucose an.

Die frischen, ungekeimten Samen enthielten zwischen 29 und 47 mg/g ffTM Saccharose. Nach sechstägiger Keimung nahm der Saccharosegehalt auf 25 bis 34 mg/g ffTM ab. Die entspricht einer Abnahme auf 53 bis 94 % des Anfangsgehaltes. Im weiteren Verlauf der Keimung stieg der Saccharosegehalt wieder an, so dass die Samen nach zehntägiger Keimung 33 bis 39 mg/g ffTM Saccharose enthielten.

In den frischen, ungekeimten Samen wurden weder Fructose noch Glucose nachgewiesen. Erst nach vier- bis sechstägiger Keimung stiegen die Gehalte an, so dass die Samen nach sechstägiger Keimung 1,3 bis 2,8 mg/g ffTM Fructose und 1,5 bis 3,3 mg/g ffTM Glucose enthielten.

Während der Keimung wurde Saccharose in Fructose und Glucose gespalten, so dass Glucose- und Fructose gebildet wurden. Nach sechstägiger Keimung enthielten die Samen in etwa genau soviel Glucose wie Fructose.

4.1.6 Veränderung des Gehaltes an Methylxanthinen (Theobromin und Coffein) im Verlauf der Keimung

Kakaosamen sind durch einen außergewöhnlich hohen Gehalt an Theobromin gekennzeichnet. Sie enthalten ca. 2,1 % Theobromin und ca. 0,2 % Coffein. Methylxanthine können dem Fraßschutz und der Abwehr von Pathogenen, wie z.B. Pilzinfektionen (PUNYASIRI *et al.*, 2005) dienen.

4.1.6.1 Theobromin

Theobromingehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad

Die frischen Kakaosamen enthielten zwischen 21 und 34 mg/g ffTM Theobromin. Im Verlauf des untersuchten Keimungszeitraumes hat sich der Theobromingehalt nicht verändert.

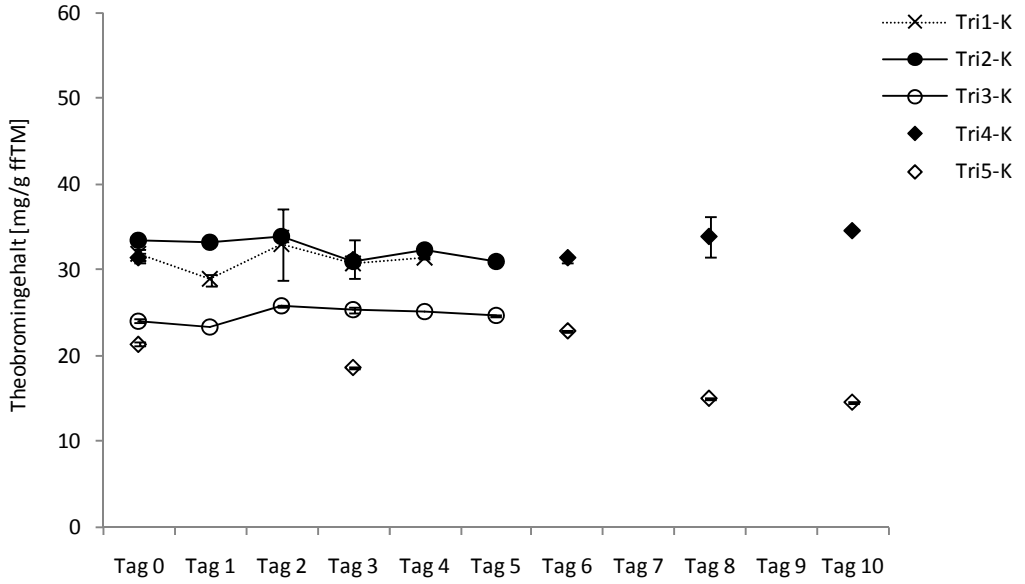


Abbildung 83: Theobromingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Theobromingehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

Die ungekeimten Samen enthielten unterschiedlich hohe Theobromingehalte. In den Samen des Genotypen T 79/501 wurde der niedrigste Theobromingehalt von 26 mg/g ffTM nachgewiesen. Die Samen der Genotypen SNK 13 und ICS 40 enthielten 41 und 49 mg/g ffTM Theobromin.

Die teilweise auftretenden relativ hohen Schwankungen des Theobromingehaltes können durch die schwierige vollständige Extrahierbarkeit (MATISSEK, 1997) und durch ein heterogenes Ausgangsmaterial bedingt sein.

Im Verlauf der frühen Keimung wurde keine Veränderung der Theobromingehalte festgestellt.

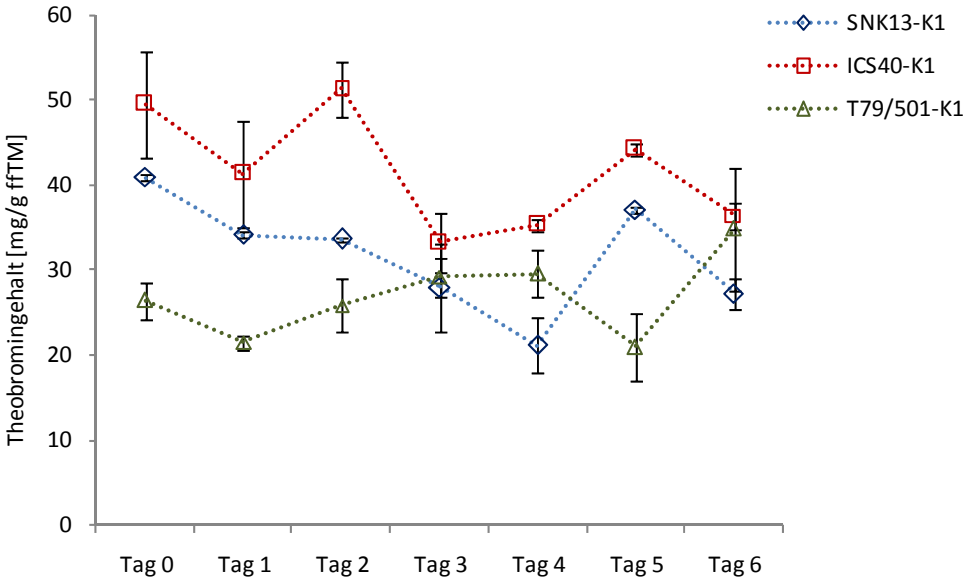


Abbildung 84: Theobromingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Theobromingehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

Die Samen des German Cocoas enthielten vor dem Auslegen zur Keimung 23 bis 42 mg/g ffTM Theobromin. Dieser Gehalt hat sich über den gesamten Untersuchungszeitraum kaum verändert.

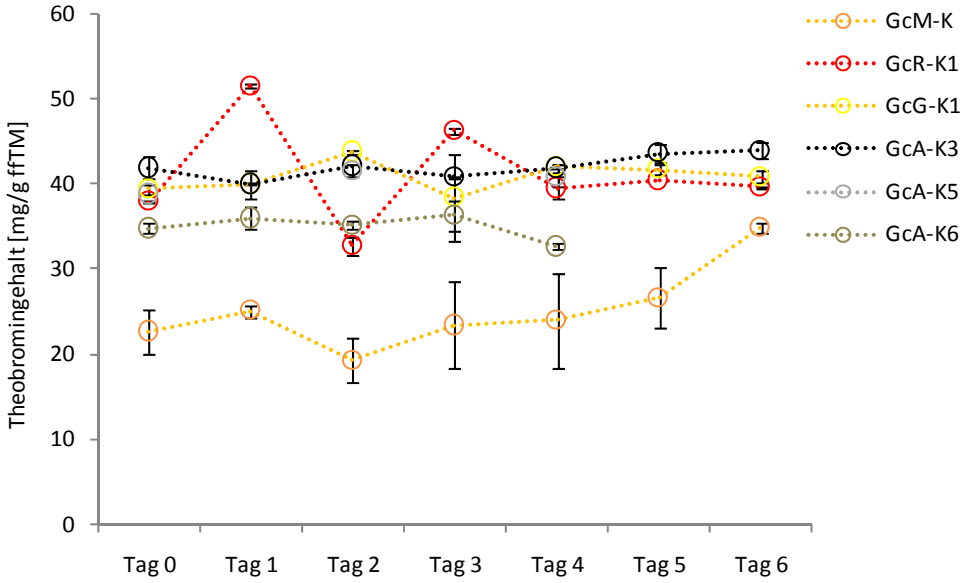


Abbildung 85: Theobromingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.1.6.2 Coffein

In den untersuchten Kakaosamen wurden nur sehr geringe Mengen an Coffein nachgewiesen. In einigen Proben lag der Coffeingehalt unter der Nachweisbarkeitsgrenze durch die HPLC. Dies bedeutet aber nicht, dass in diesen Samen kein Coffein vorhanden war, es lag vermutlich nur für die verwendete Methode unter dem Schwellenwert.

Coffeingehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad

Die Samen der unterschiedlichen Früchte der Genotypengruppe WAA wiesen große Unterschiede in ihrem Coffeingehalt auf. In den Samen der Probe Tri5-K war kein Coffein nachweisbar. In den Samen der Probe Tri3-K wurde nur am fünften Tag der Keimung ein geringer Coffeingehalt von 0,5 mg/g ffTM nachgewiesen. Die Samen der übrigen untersuchten Proben enthielten zwischen 1,2 und 5,9 mg/g ffTM Coffein.

Im Verlauf der Keimung wurde keine Veränderung des Coffeingehaltes festgestellt.

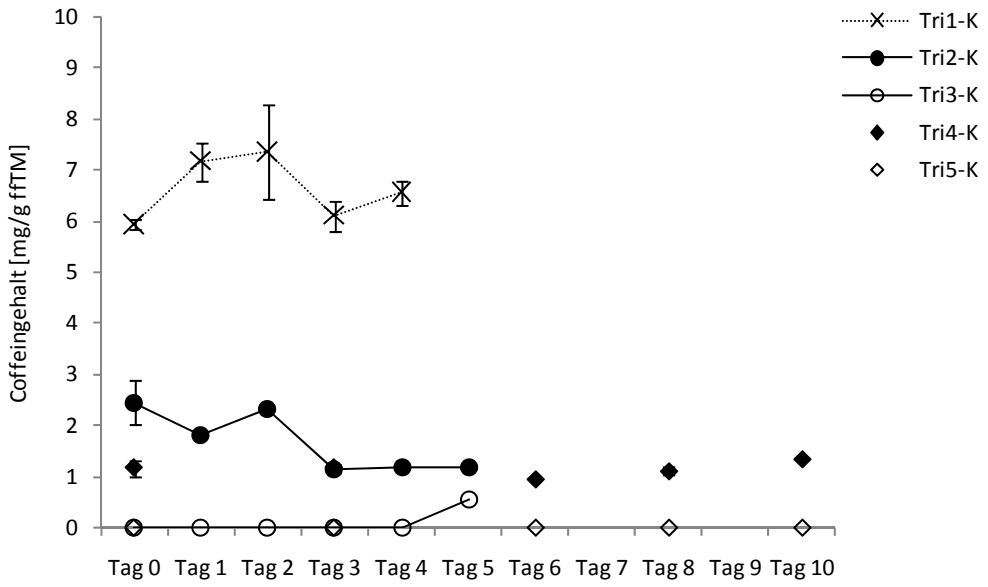


Abbildung 86: Coffeingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Coffeingehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

Die Samen der untersuchten Genotypen wiesen unterschiedlich hohe Coffeingehalte auf. Die Samen des Genotypen T 79/501 enthielten den niedrigsten Coffeingehalt von 1,7 mg/g ffTM. In den Samen der Genotypen ICS 40 und SNK 13 wurden 4,0 und 5,6 mg/g ffTM Coffein nachgewiesen.

In den Samen des Genotypen T 79/501 veränderte sich der Coffeingehalt im Verlauf der Keimung nicht. In den Samen der Genotypen SNK 13 und ICS 40 unterlag der Coffeingehalt im Verlauf der Keimungsverläufe starken Schwankungen (siehe auch Kapitel 4.1.6.1).

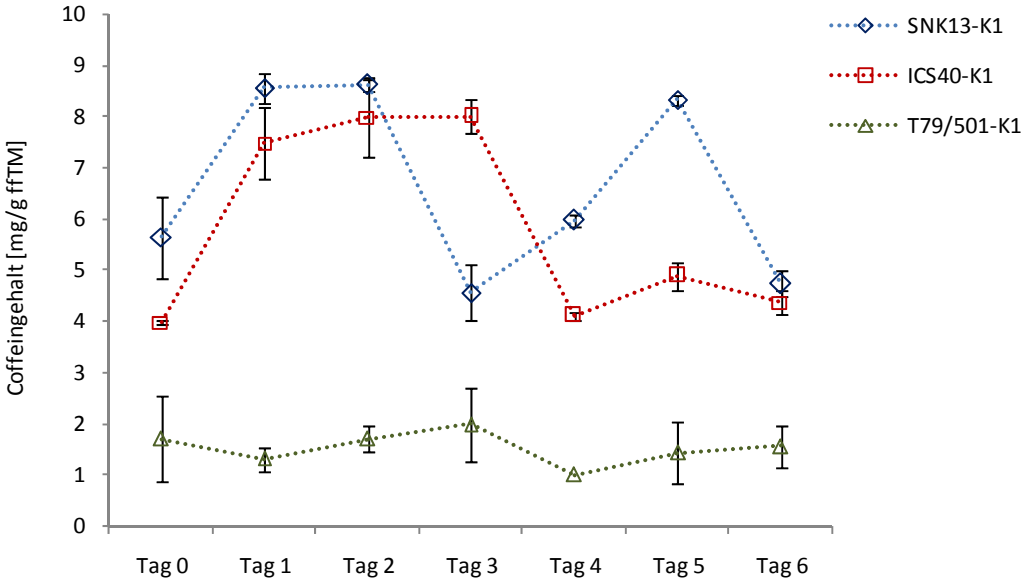


Abbildung 87: Coffeingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Coffeingehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

Die Samen des German Cocoas wiesen vergleichsweise niedrige Coffeingehalte auf. In den frischen Samen der Keimungsreihe GcM war Coffein nicht nachweisbar. Ab dem dritten Tag wurde in diesen Samen ein Coffeingehalt von etwa 1,8 mg/g ffTM festgestellt. Die ungekeimten Samen der anderen Proben enthielten 1,5 bis 1,8 mg/g ffTM Coffein. Im Verlauf einer sechstägigen Keimung wurde keine Veränderung des Coffeingehaltes festgestellt.

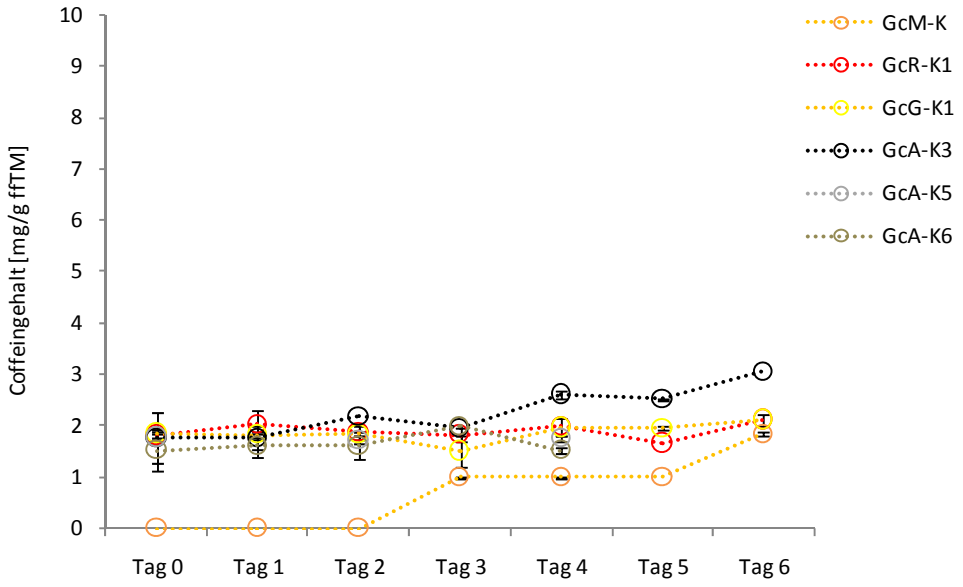


Abbildung 88: Coffeingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.1.6.3 Zusammenfassung

Die ungekeimten Samen enthielten sehr unterschiedlich hohe Theobromin- und Coffeingehalte von 21 bis 49 mg/g ffTM Theobromin und 1,2 bis 5,9 mg/g ffTM Coffein. In einigen Samen lag der Coffeingehalt unter der Nachweisgrenze. Die Samen des German Cocoas enthielten vergleichsweise niedrige Coffeingehalte.

Während der ersten vier bis zehn Tage der Keimung wurde keine Veränderung des Theobromin- und des Coffeingehaltes festgestellt.

4.1.7 Veränderung des Gehaltes an Polyaminen im Verlauf der Keimung

Bei Polyaminen handelt es sich um biogene Amine, welche wahrscheinlich an Prozessen wie Zellteilung und Differenzierung beteiligt sind (SAWHNEY *et al.*, 1985). Daher wurden die Polyamingehalte der Kakaosamen während der frühen Keimung untersucht, um festzustellen, inwieweit sie sich verändern. Hierfür wurden die Gehalte an Putrescin, Spermidin, Spermin und Cadaverin in den Kotyledonen bestimmt.

Die Polyamine können im aktiven Stoffwechselprozess Schwankungen unterliegen. Zudem ist nicht sicher, inwieweit die ermittelten Ergebnisse reproduzierbar sind. Unter diesen Bedingungen stellt die Analyse der Polyamine der Kakaosamen einen Einstieg dar, der in weiteren Arbeiten ausgebaut werden muss.

4.1.7.1 Putrescin

Putrescingehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad und Kamerun

Im Verlauf der Keimung wurde eine Zunahme des Putrescingehaltes festgestellt.

Zu Beginn der Keimung lag der Putrescingehalt der Kakaosamen je nach Probe in einem Bereich von 0 bis 0,007 mg/g ffTM.

Nach einer viertägigen Keimung waren die Putrescingehalte auf 0,004 bis 0,032 mg/g ffTM angestiegen. Im weiteren Verlauf der Keimung erreichten sie Konzentrationen von 0,008 bis 0,045 mg/g ffTM.

Der höchste Anstieg wurde in den Samen der Frucht Tri4-K nachgewiesen. Lag der Putrescingehalt in den Samen dieser Frucht zu Beginn der Keimung bei etwa 0,001 mg/g ffTM, so stieg er im Verlauf einer zehntägigen Keimung auf 0,045 mg/g ffTM an.

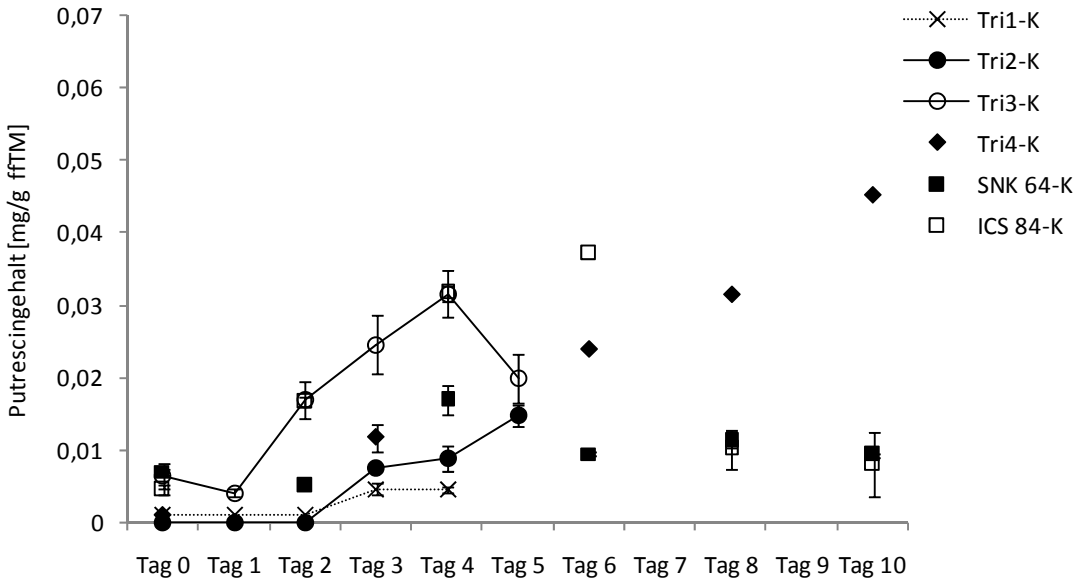


Abbildung 89: Putrescingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K – Tri4-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Putrescingehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

Zu Beginn der Keimung enthielten die Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501 0,004 bis 0,014 mg/g ffTM Putrescin.

Während der Keimung wurde nur in den Samen des Genotypen SNK 13 ein Anstieg des Putrescingehaltes festgestellt. In diesen Samen stieg der Putrescingehalt von 0,004 mg/g ffTM zu Beginn der Keimung auf 0,015 mg/g ffTM nach 6-tägiger Keimung an.

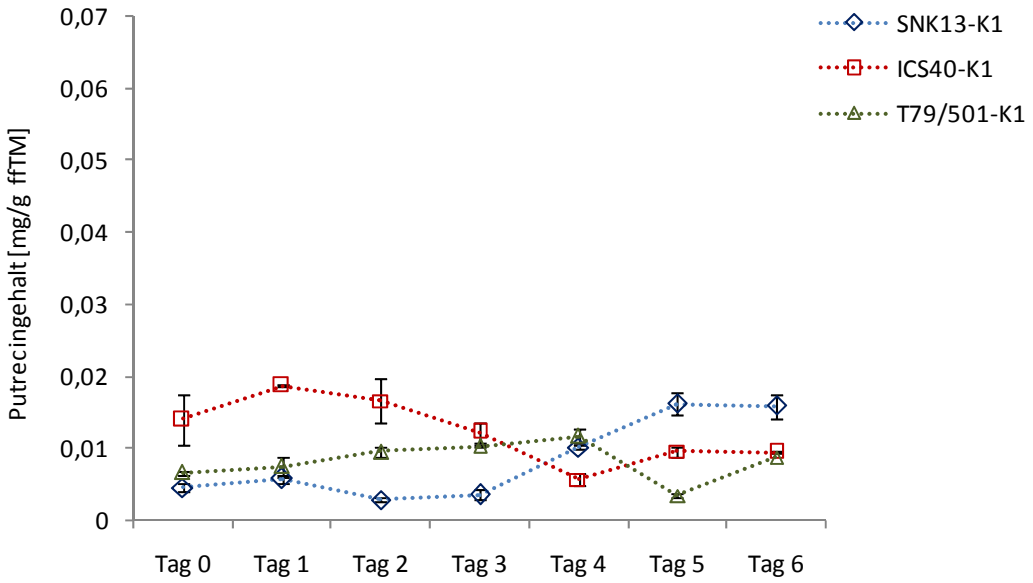


Abbildung 90: Putrescingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Putrescingehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

Die frischen Samen des German Cocoas enthielten 0,001 bis 0,015 mg/g ffTM Putrescin.

Im Verlauf der Keimung stieg der Gehalt in den Samen an, so dass diese nach sechstägiger Keimung 0,022 bis 0,042 Putrescin enthielten. In den Samen einer Keimungsreihe wurden am sechsten Tag sogar 0,061 mg/g ffTM Putescin nachgewiesen.

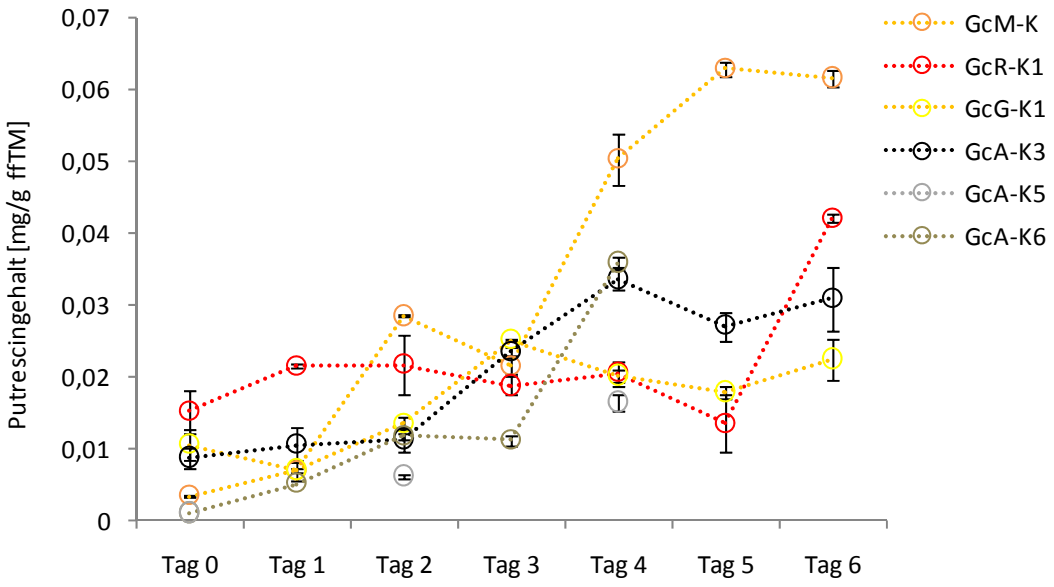


Abbildung 91 Putrescingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.1.7.2 Spermidin

Spermidingehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad und Kamerun

Die frischen Samen enthielten sehr unterschiedlich hohe Spermidingehalte von 0,019 bis 0,092 mg/g ffTM.

Zu Beginn der Keimung nahm der Gehalt in den Samen der meisten Keimungsreihen zunächst ab, so dass die Samen am vierten Tag 0,014 bis 0,064 mg/g ffTM Spermidin enthielten. Nur in den Samen der Keimungsreihe ICS84-K ist der Spermidingehalt in den ersten vier Tagen der Keimung von ursprünglich 0,019 mg/g ffTM auf 0,056 mg/g ffTM angestiegen.

Nach zehntägiger Keimung ist der Spermidingehalt in den Samen der Keimungsreihen SNK64-K und ICS84-K auf 0,010 und 0,006 mg/g ffTM gesunken. In den Samen der Keimungsreihe Tri4-K stieg er dagegen ab dem sechsten Tag an. Am zehnten Tag wurde in diesen Samen ein Anstieg von 0,070 zu Beginn der Keimung auf 0,110 mg/g ffTM nachgewiesen. Dies entspricht 160 % des Anfangsgehaltes.

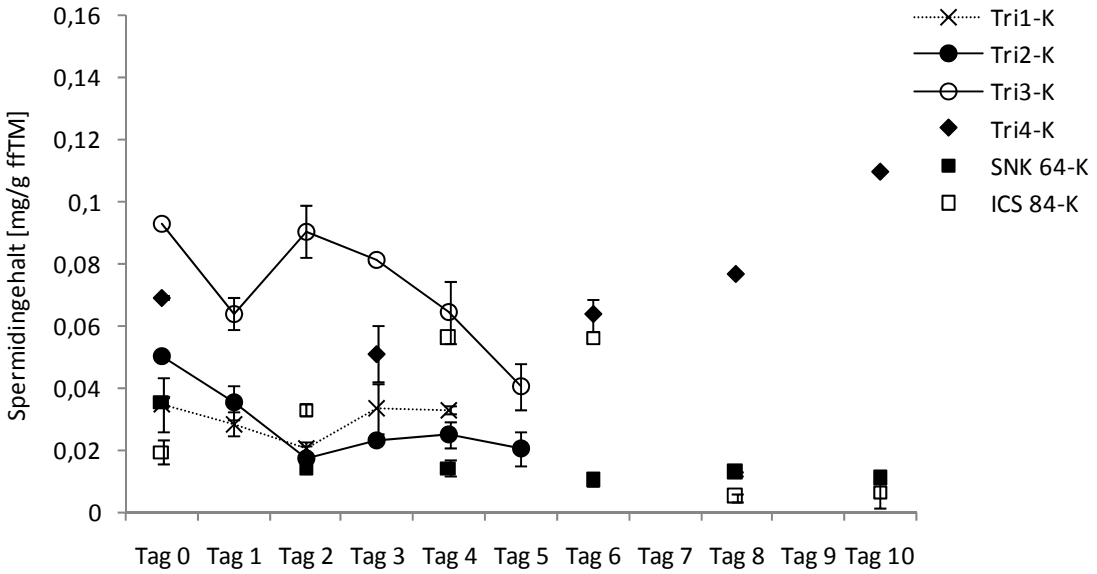


Abbildung 92: Spermidingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K – Tri4-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Spermidingehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

Die frischen Samen des Genotypen SNK 13 enthielten 0,020 mg/g ffTM Spermidin. Im Verlauf der ersten sechs Tage der Keimung stieg dieser Gehalt auf 0,059 mg/g ffTM an.

In den Samen des Genotypen T 79/501, welche zu Beginn 0,031 mg/g ffTM Spermidin enthielten, veränderten sich der Gehalt im Verlauf der Keimung kaum.

In den Samen des Genotypen ICS 40 nahm der Spermidingehalt im Verlauf der Keimung von 0,074 auf 0,030 mg/g ffTM ab.

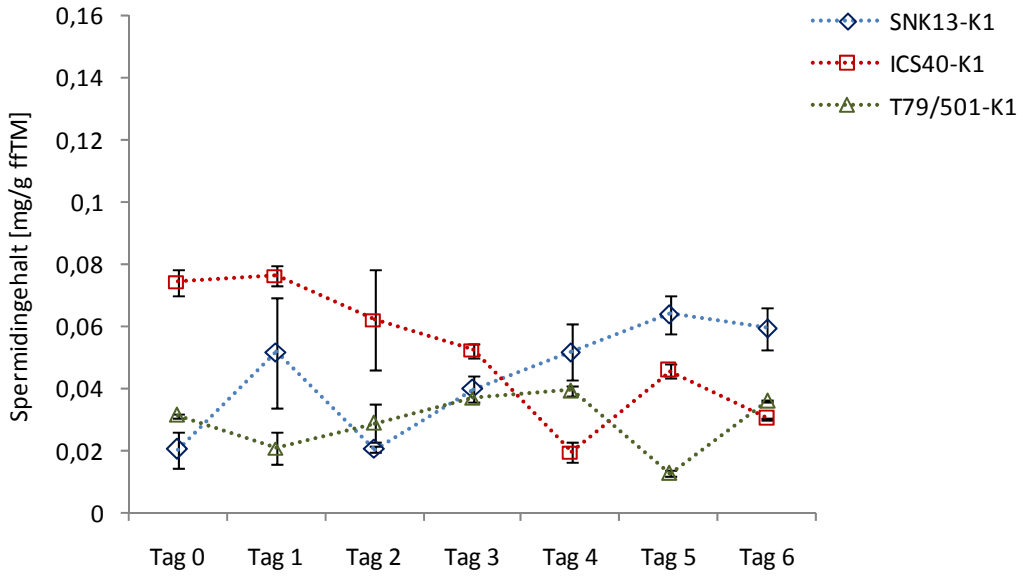


Abbildung 93: Spermidingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Spermidingehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

Die ungekeimten Samen des German Cocoas enthielten sehr unterschiedlich hohe Spermidingehalte von 0,015 bis 0,150 mg/g ffTM.

In den Samen der meisten Keimungsreihen nahm der Spermidingehalt im Verlauf einer sechstägigen Keimung etwas ab. In einigen Samen veränderte er sich dagegen im Untersuchungszeitraum, abgesehen von Schwankungen, nur wenig. In den Samen der Keimungsreihe GcM wurde eine Zunahme des Spermidingehaltes nachgewiesen.

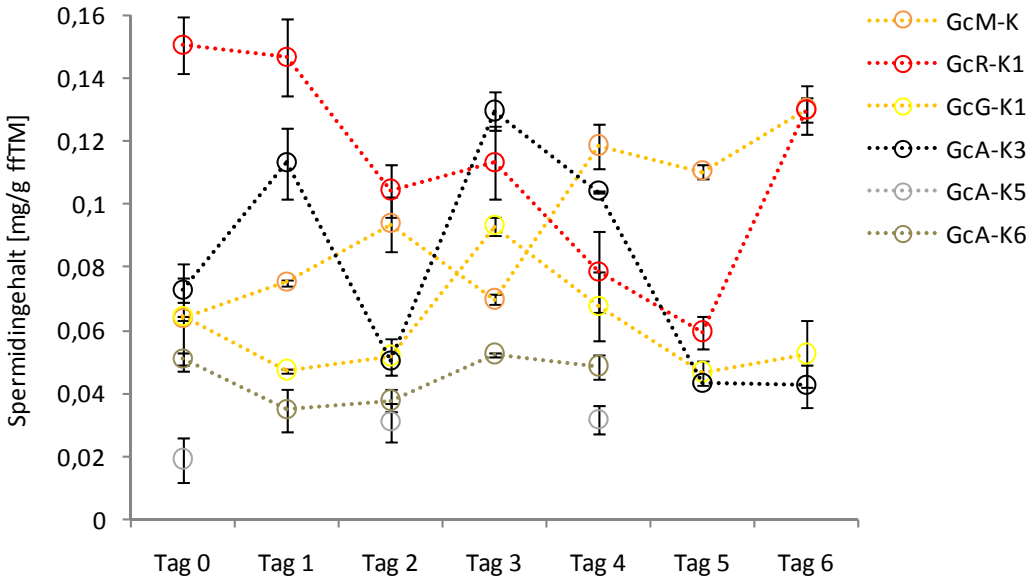


Abbildung 94: Spermidingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.1.7.3 Spermin

Spermingehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad und Kamerun

Zu Beginn der Keimung lagen die Spermingehalte in einem Bereich von 0,008 bis 0,050 mg/g ffTM.

Im anschließenden Verlauf der Keimung sanken die Spermingehalte, so dass sie am vierten Tag zwischen 0,001 und 0,027 mg/g ffTM lagen. In den Samen der Keimungsreihen SNK64-K und ICS84-K war Spermin ab den sechsten bis achten Tag der Keimung kaum noch nachweisbar.

In den Samen der Inkubationsreihe Tri4-K stieg der Spermingehalt, nachdem er in den ersten Tagen der Keimung gesunken war, ab dem achten Tag wieder an, so dass er am zehnten Tag dem Ausgangsgehalt entsprach.

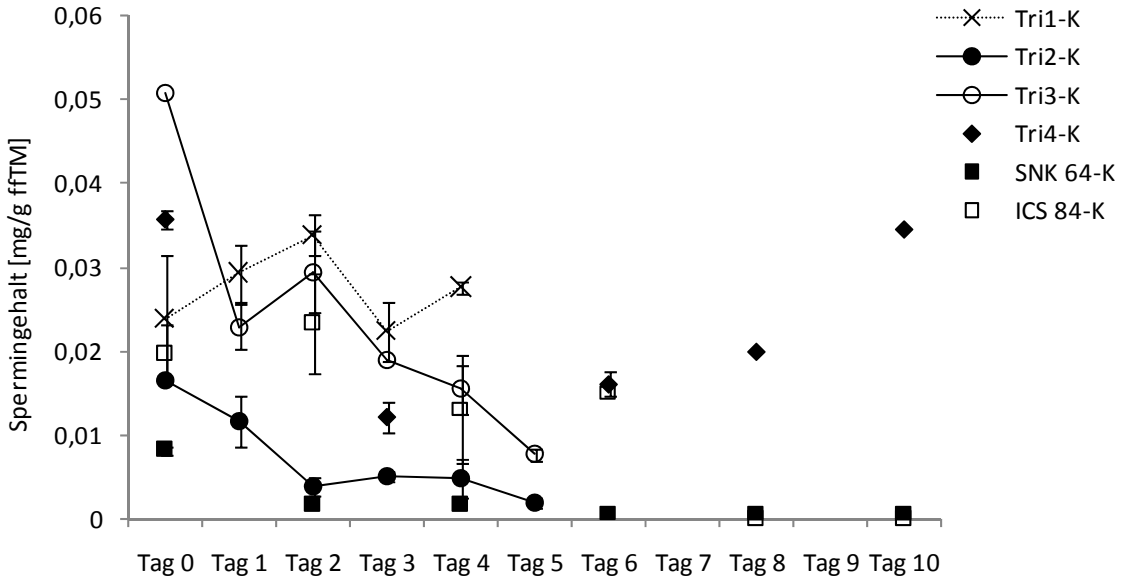


Abbildung 95: Spermingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K – Tri4-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Spermingehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

Der Verlauf des Spermingehaltes in den Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501 verhielt sich ähnlich wie der des Spermidingehaltes.

In den Samen des Genotypen SNK 13 stieg der Spermingehalt während der Keimung von 0,005 mg/g ffTM auf 0,014 mg/g ffTM an.

Die Samen des Genotypen T 79/501 wiesen dagegen während der Keimung kaum eine Veränderung des Spermingehaltes auf. Diese Samen enthielten zu Beginn der Keimung 0,008 mg/g ffTM und nach sechstägiger Keimung 0,005 mg/g ffTM Spermin.

In den Samen des Genotypen ICS40 nahm der Spermingehalt während der ersten sechs Tage der Keimung von 0,019 auf 0,005 mg/g ffTM ab.

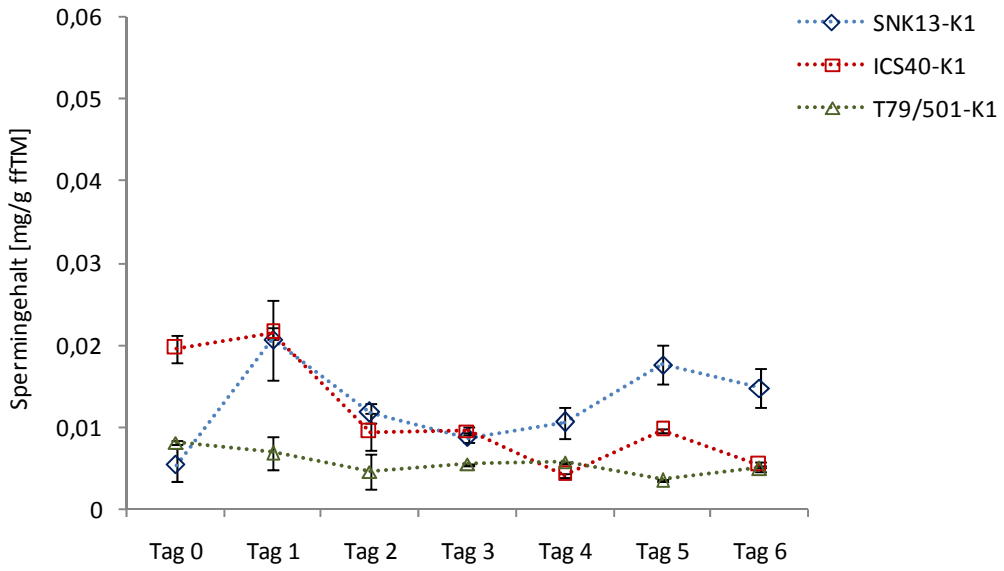


Abbildung 96: Spermingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Spermingehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

Die ungekeimten Samen des German Cocoas enthielten zwischen 0,001 und 0,023 mg/g ffTM Spermin.

In den Samen der meisten Keimungsreihen nahm der Spermingehalt im Verlauf der Keimung etwas ab. In einigen Samen veränderte er sich dagegen kaum. In den Samen der Keimungsreihe GcM stieg er während der Keimung etwas an.

Der Vergleich der Spermin- und Spermidingehalte der Samen zeigt, dass die Zu- bzw. Abnahmen ihrer Gehalte während der Keimung ähnlich verlaufen.

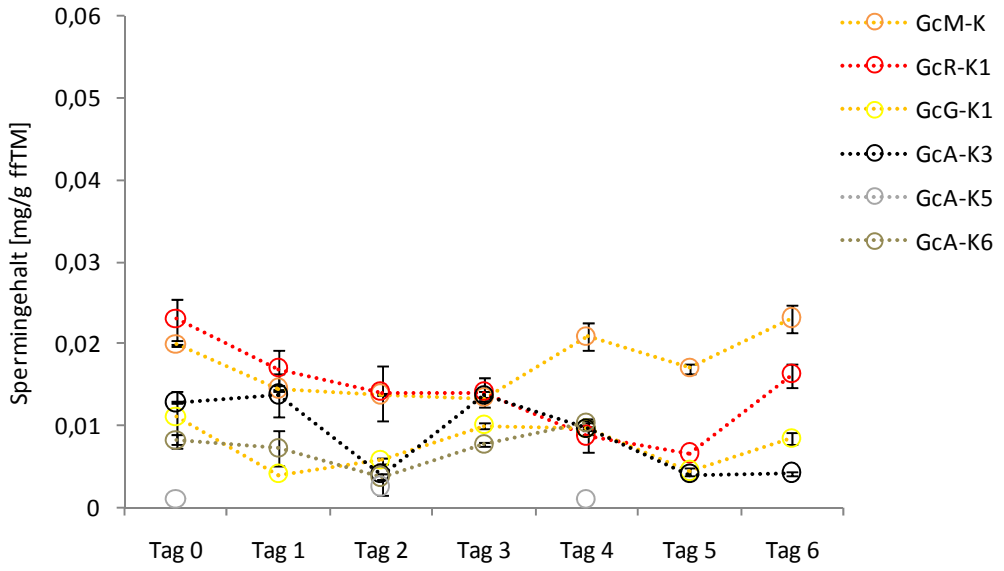


Abbildung 97: Spermingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.1.7.4 Cadaverin

In den Samen der meisten Proben wurde kein Cadaverin nachgewiesen. In einigen Samen traten sehr geringe Spuren von Cadaverin auf, die in einem Bereich von 0,001 bis 0,007 mg/g ffTM lagen.

Nur in den Samen der Frucht SNK64-K wurden über den gesamten Verlauf der Keimung sehr geringe Mengen an Cadaverin nachgewiesen. Der Cadaveringehalt dieser Samen lag über den gesamten Untersuchungszeitraum der Keimung bei etwa 0,005 mg/g ffTM. In den Samen des Genotypen ICS 40 wurden am sechsten Tag der Keimung etwa 0,005 mg/g ffTM Cadaverin nachgewiesen.

4.1.7.5 Zusammenfassung

In den meisten Samen stieg der Putrescingehalt ab dem zweiten Tag der Keimung an, so dass er am sechsten Tag der Keimung bei 135 bis 353 % des Ausgangsgehaltes lag. In einigen Samen stieg er sogar stärker an. Nach dem sechsten bis zehnten Tag der Keimung nahm er in den meisten Samen wieder etwas ab.

Der Spermidingehalt nahm in den meisten Samen in den ersten Tagen der Keimung ab. In einigen Samen stieg er ab dem sechsten Tag der Keimung wieder an.

Die Spermingehalte der Samen verhielten sich zumeist ähnlich wie die Spermidingehalte und nahmen parallel zu diesen während der Keimung ab bzw. zu.

Die meisten der untersuchten Samen enthielten kein Cadaverin. In einigen Samen wurden sehr geringe Spuren an Cadaverin nachgewiesen.

4.1.8 Polyphenoloxidaseaktivität während der Keimung

4.1.8.1 Polyphenoloxidaseaktivität in Kakaosamen

Bei der Polyphenoloxidase (PPO) handelt es sich um ein Enzym, welches Polyphenole unter Sauerstoffverbrauch zu Chinonen oxidiert.

Die Funktion der PPO wird in der Abwehr von Schädlingen, dem Wundverschluss und in einer Minderung des Nutzungswertes der Pflanzenteile für Herbivore gesehen, da durch Reaktion der Chinone mit Proteinen deren Verdaubarkeit gesenkt wird.

PPO-Aktivitäten der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Kamerun

Zur Bestimmung der PPO-Aktivität während der Keimung wurden Samen aus Kakaofrüchten unterschiedlicher Genotypen über einen Zeitraum bis zu 10 Tagen zur Keimung ausgelegt. Von diesen wurden an jedem Probenahmetag zwei bis drei Einzelsamen zur Bestimmung der PPO-Aktivität verwendet. Die zur Messung verwendeten Samen wurden zerkleinert, in cyanidhaltigem SÖRENSEN-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Die PPO-Aktivität wurde sowohl in dem daraus resultierenden Sediment als auch im Überstand nach Entfernung des Cyanids gemessen.

In allen Samen war die Aktivität der PPO in den untersuchten Sedimenten höher als in den Überständen.

In den Sedimenten der ungekeimten Samen des Genotypen Sca 6 lag die PPO-Aktivität zwischen 0,33 und 0,67 µkat/g Frischgewicht, in denen der Samen des Genotypen SNK 64 zwischen 0,34 und 0,40 µkat/g Frischgewicht und in denen der Samen des Genotypen ICS 84 zwischen 0,60 und 0,70 µkat/g Frischgewicht.

In den Sedimenten der meisten Samen wurde eine leichte Zunahme der PPO-Aktivität während der Keimung festgestellt.

In den Überständen der meisten Samen nahm die PPO-Aktivität etwas ab. In den Überständen unterlag die PPO-Aktivität jedoch zumeist Schwankungen, so dass keine eindeutige Zu- bzw. Abnahme erkennbar war.

Die einzelnen Samen aus einer Frucht wiesen teilweise sehr unterschiedlich hohe PPO-Aktivitäten auf, so dass die auftretenden Schwankungen vermutlich auch auf der Diversität der PPO-Aktivität der Einzelsamen beruhen.

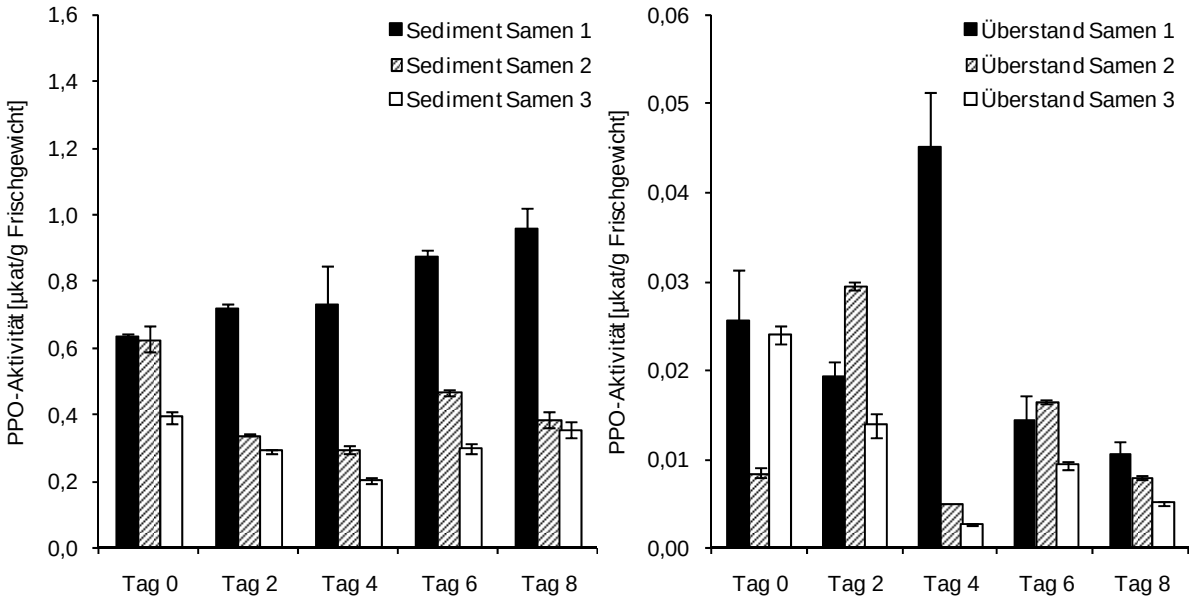


Abbildung 98: PPO-Aktivität einzelner Kakaosamen (Sca 6) während der Keimung.
Die zur Messung verwendeten Samen wurden zerkleinert, in cyanidhaltigem SÖRENSEN-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Die PPO-Aktivität wurde sowohl in dem daraus resultierenden Sediment als auch im Überstand gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

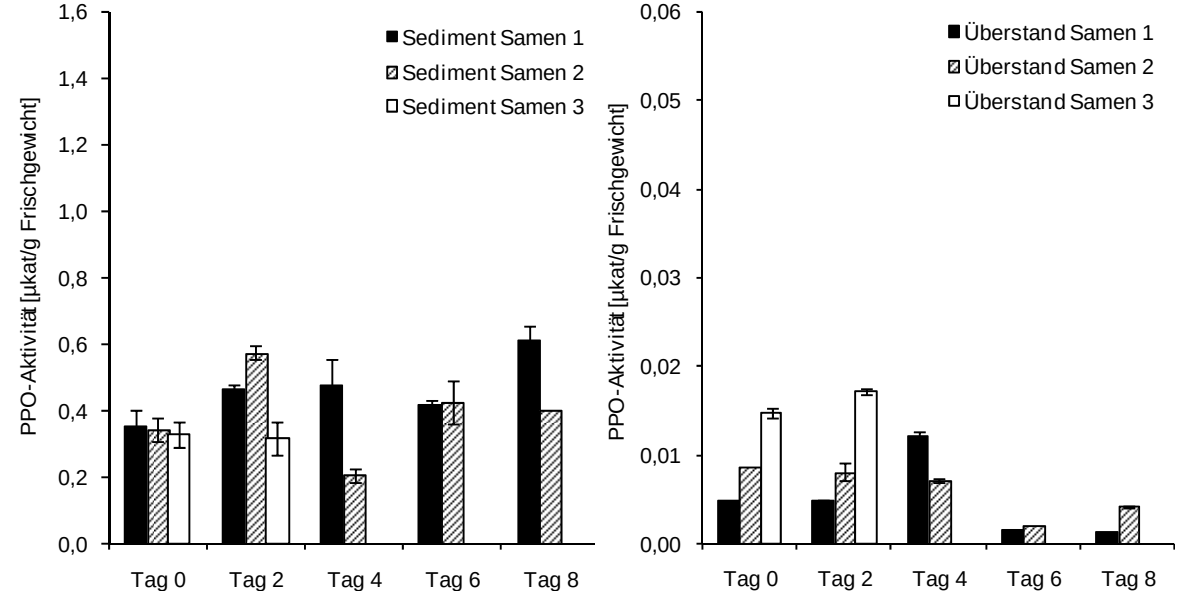


Abbildung 99: PPO-Aktivität einzelner Kakaosamen (Sca 6) während der Keimung.
Die zur Messung verwendeten Samen wurden zerkleinert, in cyanidhaltigem SÖRENSEN-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Die PPO-Aktivität wurde sowohl in dem daraus resultierenden Sediment als auch im Überstand gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

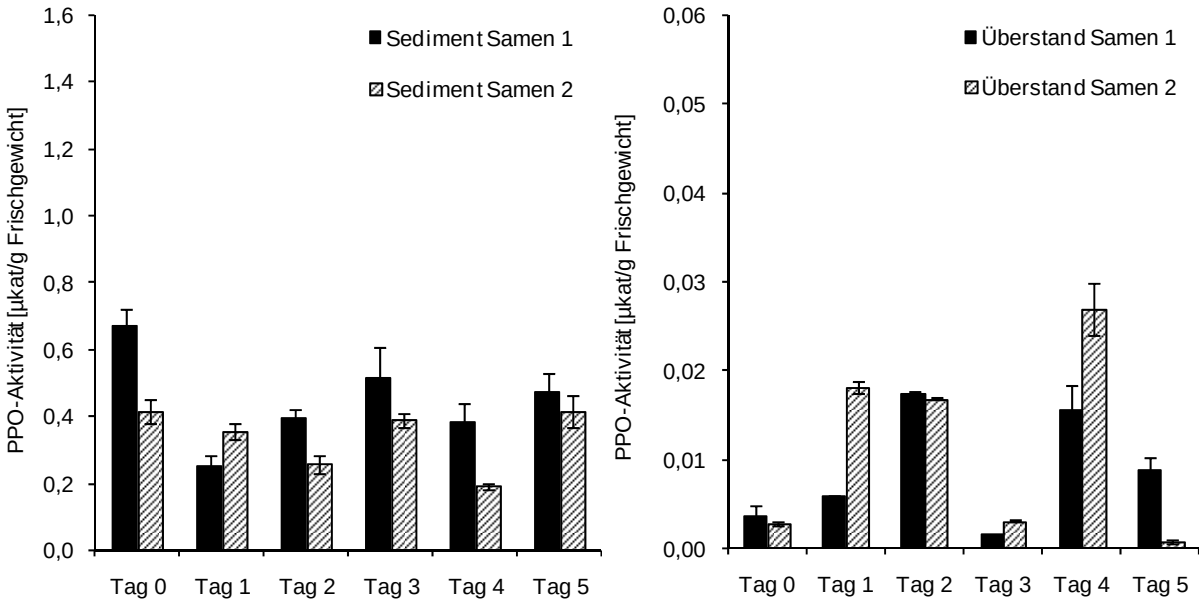


Abbildung 100: PPO-Aktivität einzelner Kakaosamen (Sca 6) während der Keimung.
Die zur Messung verwendeten Samen wurden zerkleinert, in cyanidhaltigem SÖRENSEN-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Die PPO-Aktivität wurde sowohl in dem daraus resultierenden Sediment als auch im Überstand gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

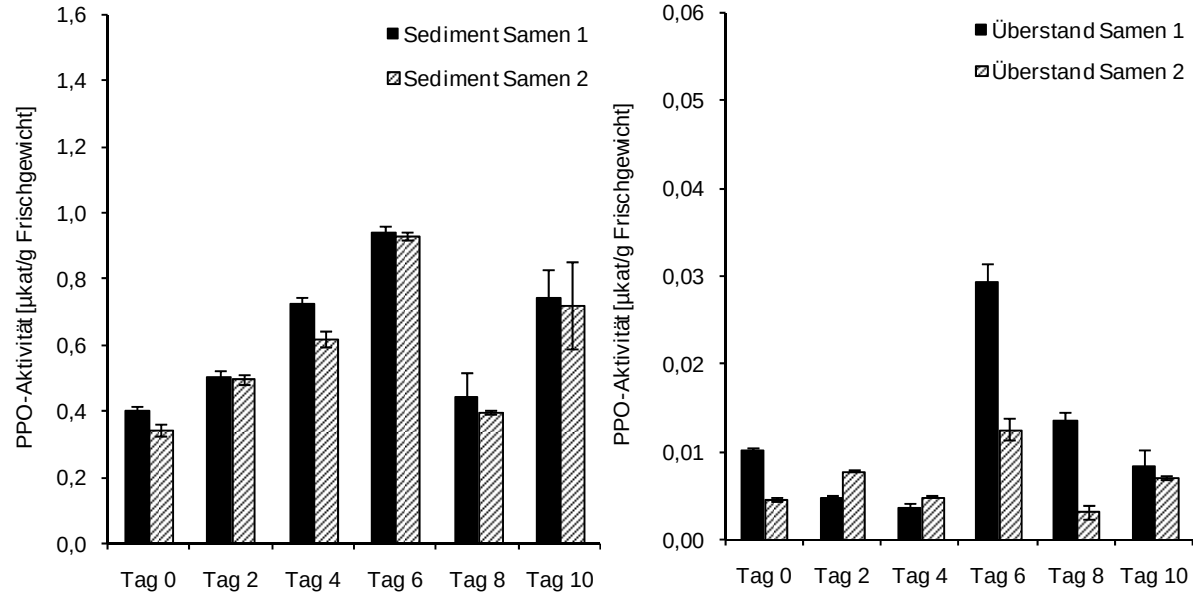


Abbildung 101: PPO-Aktivität einzelner Kakaosamen (SNK 64) während der Keimung.
Die zur Messung verwendeten Samen wurden zerkleinert, in cyanidhaltigem SÖRENSEN-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Die PPO-Aktivität wurde sowohl in dem daraus resultierenden Sediment als auch im Überstand gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

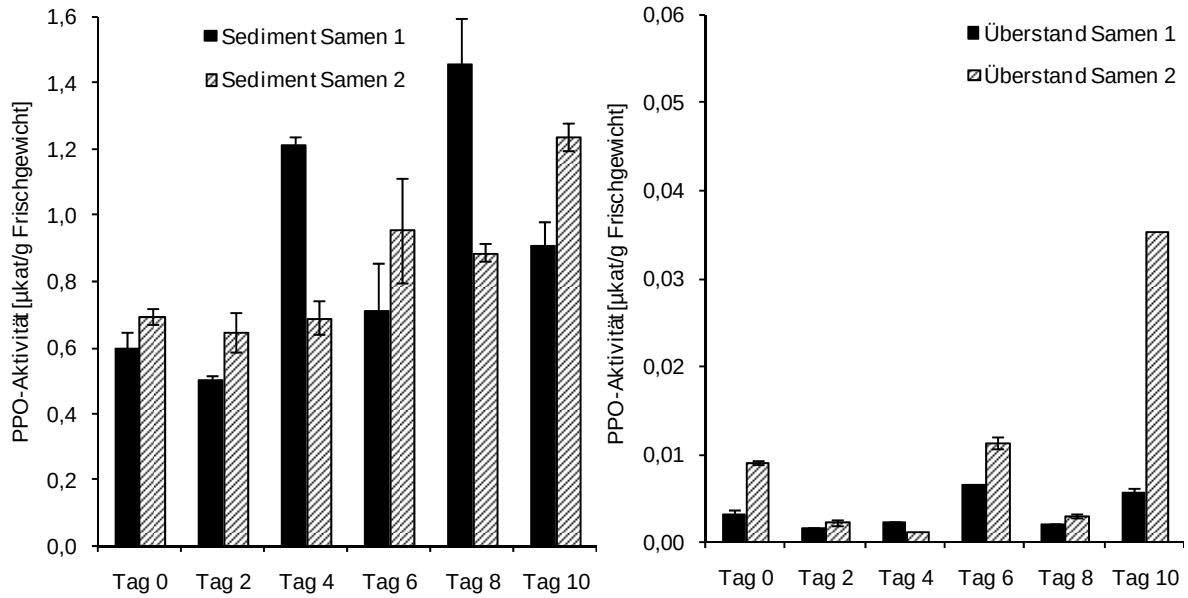


Abbildung 102 PPO-Aktivität einzelner Kakaosamen (ICS 84) während der Keimung.
Die zur Messung verwendeten Samen wurden zerkleinert, in cyanidhaltigem SÖRENSEN-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Die PPO-Aktivität wurde sowohl in dem daraus resultierenden Sediment als auch im Überstand gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

PPO-Aktivitäten der Samen von German Cocoa-Früchten

Die Sedimente aus den Proben der ungekeimten German Cocoa-Samen wiesen eine etwa zehnmal höhere PPO-Aktivität auf als die Sedimente der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Genotypen. Die PPO-Aktivität in den ungekeimten German Cocoa-Samen lag zwischen 5,7 und 6,8 µkat/g Frischgewicht.

Der aus den PPO-Aktivitäten aller ungekeimten German Cocoa-Samen errechnete Mittelwert betrug 6,2 µkat/g Frischgewicht (± 0,7 µkat/g Frischgewicht; n=6 Samen aus 3 Früchten). Im Vergleich dazu betrug der Mittelwert der PPO-Aktivität der Samen der anderen untersuchten Genotypen 0,5 µkat/g Frischgewicht (± 0,1 µkat/g Frischgewicht; n=12 Samen aus 5 Früchten). Die PPO-Aktivität der German Cocoa-Samen war etwa um ein zwölffaches höher als in den anderen untersuchten Samen.

In den Überständen dieser Samen war die PPO-Aktivität etwa genauso hoch wie in denen der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Genotypen.

Über den untersuchten Zeitraum der Keimung veränderte sich die PPO-Aktivität sowohl im Sediment als auch im Überstand der Samen nur geringfügig.

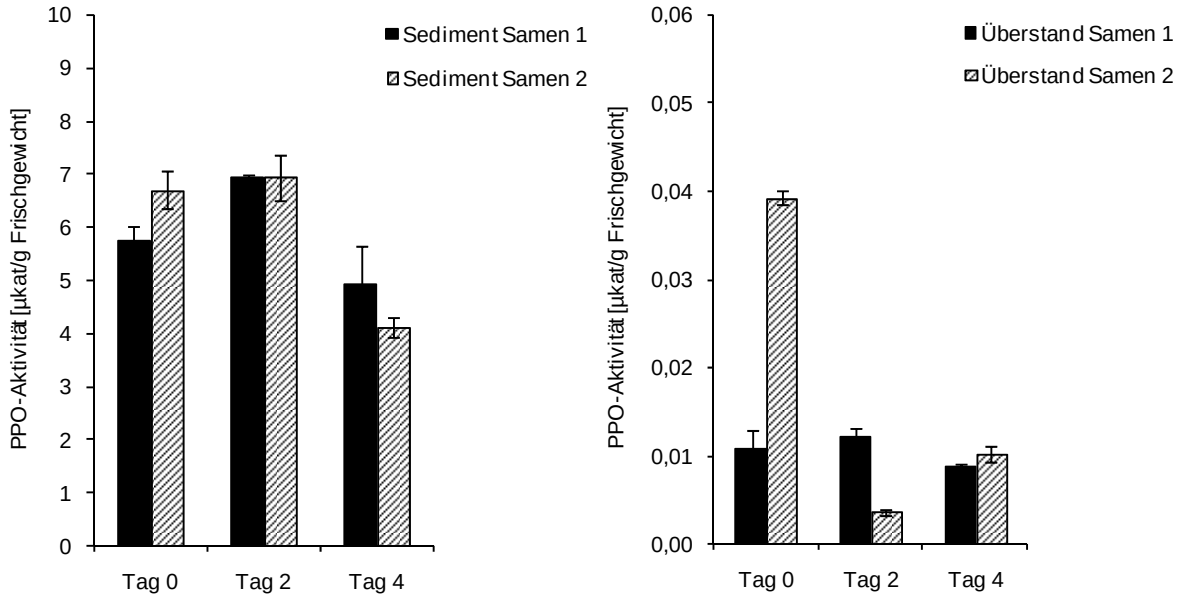


Abbildung 103: PPO-Aktivität einzelner Kakaosamen einer German Cocoa-Frucht (GcA-K5) während der Keimung.
Die zur Messung verwendeten Samen wurden zerkleinert, in cyanidhaltigem SÖRENSEN-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Die PPO-Aktivität wurde sowohl in dem daraus resultierenden Sediment als auch im Überstand gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

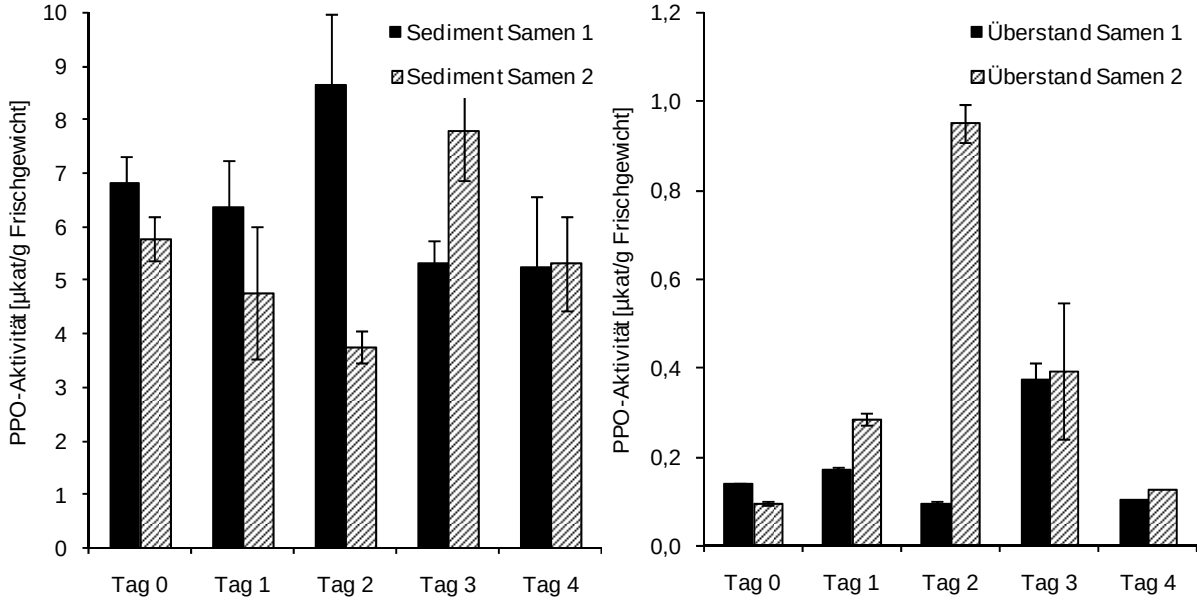


Abbildung 104: PPO-Aktivität einzelner Kakaosamen einer German Cocoa-Frucht (GcA-K6) während der Keimung.
Die zur Messung verwendeten Samen wurden zerkleinert, in cyanidhaltigem SÖRENSEN-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Die PPO-Aktivität wurde sowohl in dem daraus resultierenden Sediment als auch im Überstand gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.1.8.2 Polyphenoloxidaseaktivität in der Sämlingsachse

In den Sedimenten aus den Proben der Sämlingsachsen wurde eine höhere PPO-Aktivität als in den Sedimenten der Samen festgestellt. Die Sedimente der Sämlingsachsen ungekeimter Samen des Genotypen Sca 6 wiesen eine PPO-Aktivität zwischen 2,1 und 6,2 µkat/g Frischgewicht auf, die der ungekeimten Samen des Genotypen SNK 64 zwischen 2,7 und 5,7 µkat/g Frischgewicht und die der ungekeimten Samen des Genotypen ICS 84 zwischen 2,3 und 5,7 µkat/g Frischgewicht.

Während der Keimung nahm die PPO-Aktivität in den Sedimenten der Sämlingsachsen ab. Auch in den meisten Überständen wurde, von unterschiedlichen PPO-Aktivitäten in den Sämlingsachsen einzelner Samen abgesehen, eine Abnahme der PPO-Aktivität im Verlauf der Keimung festgestellt.

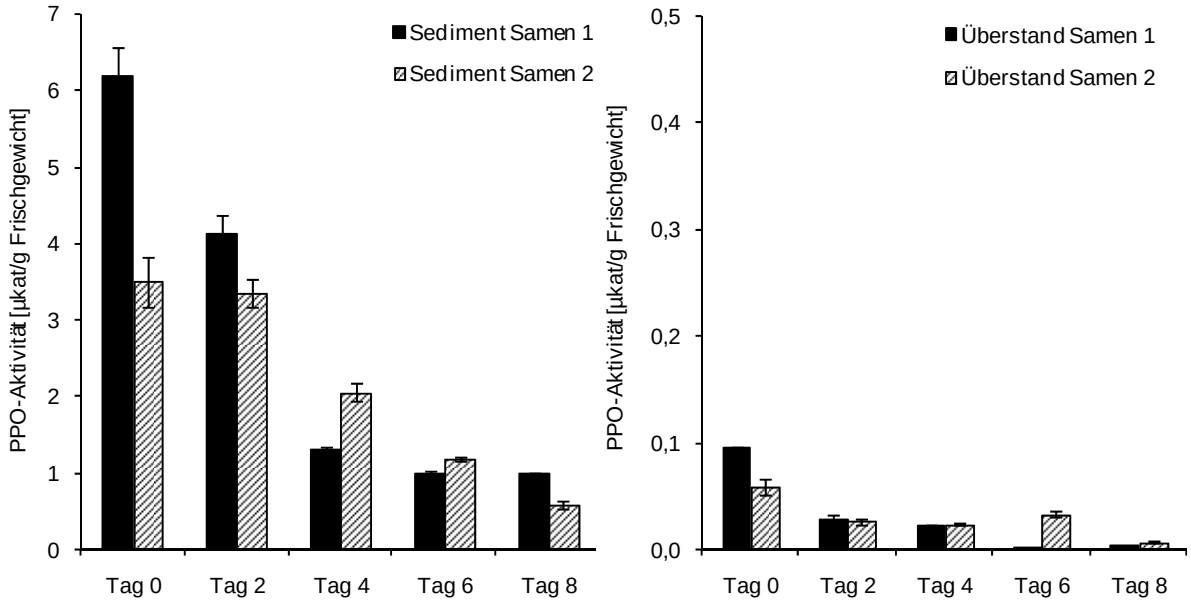


Abbildung 105: PPO-Aktivität in der Sämlingsachse einzelner Kakaosamen (Sca 6) während der Keimung. Die zur Messung verwendeten Sämlingsachsen wurden zerkleinert, in cyanidhaltigem SÖRENSEN-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Die PPO-Aktivität wurde sowohl in dem daraus resultierenden Sediment als auch im Überstand gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

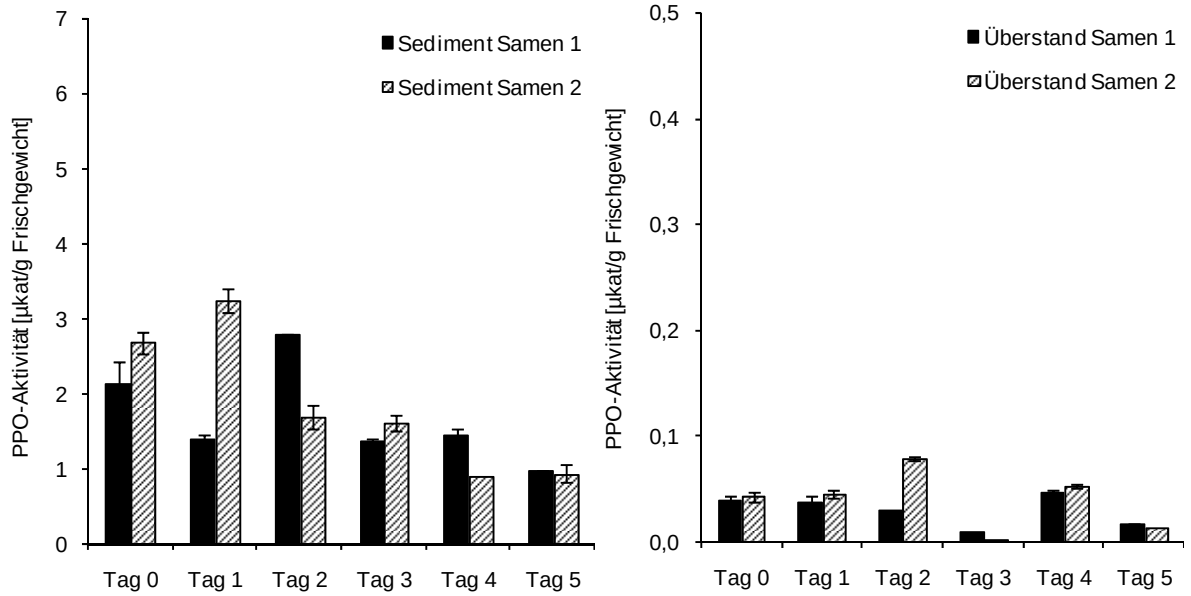


Abbildung 106: PPO-Aktivität in der Sämlingsachse einzelner Kakaosamen (Sca 6) während der Keimung. Die zur Messung verwendeten Sämlingsachsen wurden zerkleinert, in cyanidhaltigem SÖRENSEN-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Die PPO-Aktivität wurde sowohl in dem daraus resultierenden Sediment als auch im Überstand gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

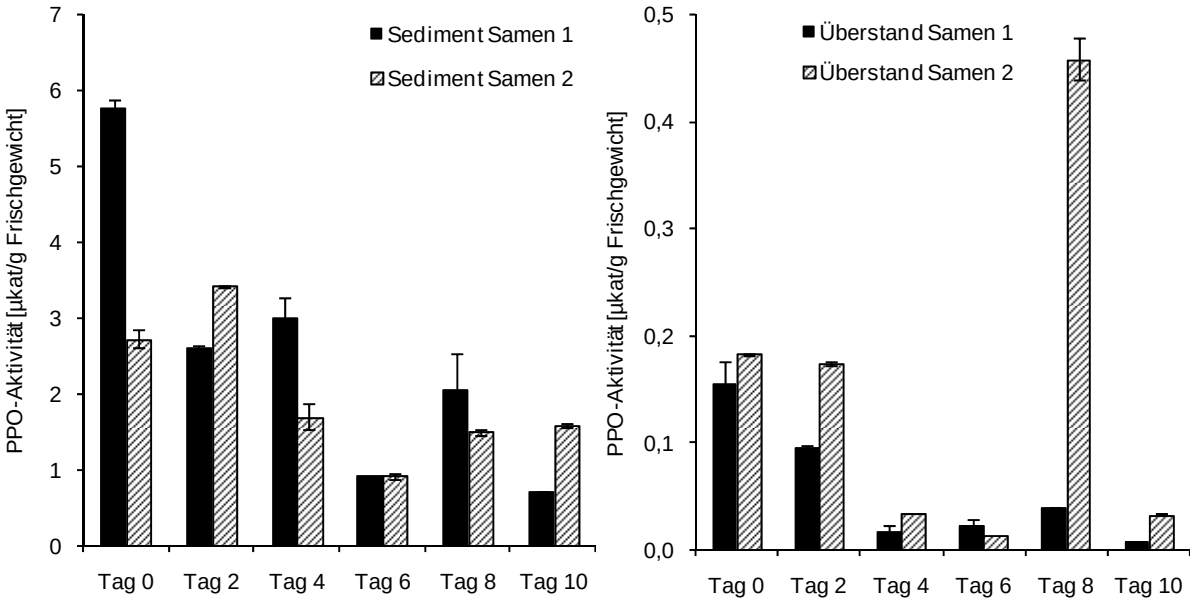


Abbildung 107: PPO-Aktivität in der Sämlingsachse einzelner Kakaosamen (SNK 64) während der Keimung. Die zur Messung verwendeten Sämlingsachsen wurden zerkleinert, in cyanidhaltigem SÖRENSEN-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Die PPO-Aktivität wurde sowohl in dem daraus resultierenden Sediment als auch im Überstand gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

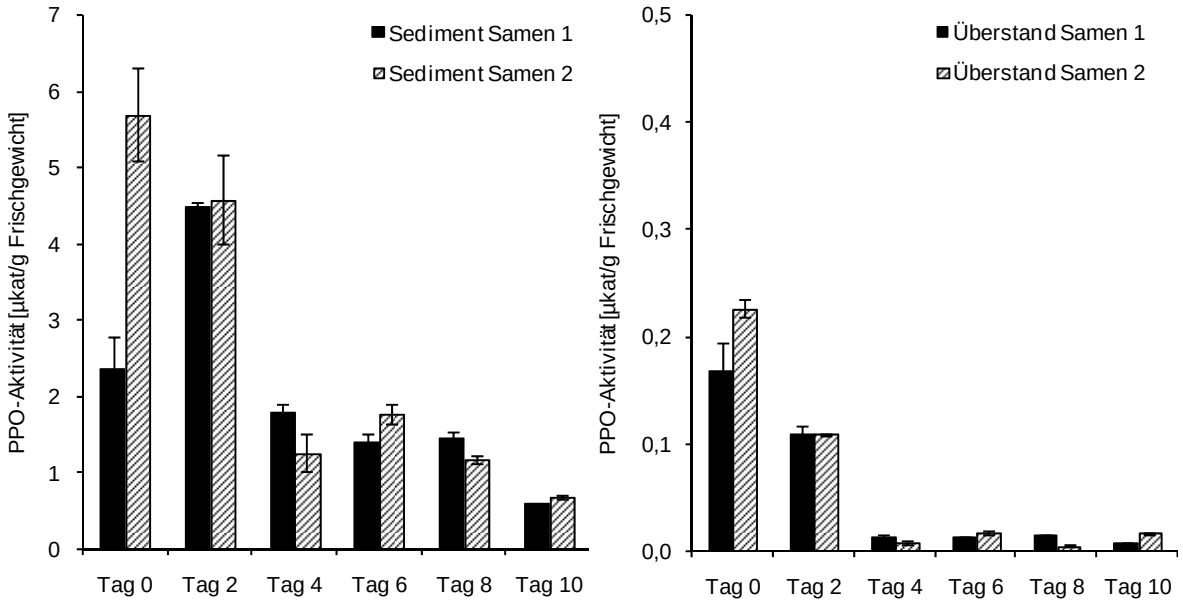


Abbildung 108: PPO-Aktivität in der Sämlingsachse einzelner Kakaosamen (ICS 84) während der Keimung. Die zur Messung verwendeten Sämlingsachsen wurden zerkleinert, in cyanidhaltigem SÖRENSEN-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Die PPO-Aktivität wurde sowohl in dem daraus resultierenden Sediment als auch im Überstand gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.1.8.3 Polyphenoloxidaseaktivität in unterschiedlichen Geweben von Kakaosamen

Die Analyse der PPO-Aktivität in unterschiedlichen Bereichen der einzelnen, ungekeimten Kakaosamen hat gezeigt, dass eine Ungleichverteilung der PPO-Aktivität vorliegt. In peripheren Geweben war die PPO-Aktivität am höchsten.

Die untersuchten Samen wiesen sehr unterschiedlich hohe PPO-Aktivitäten auf. In allen Samen wurde jedoch in der Epidermis eine höhere PPO-Aktivität als im Mesophyll nachgewiesen und zwar sowohl im Sediment als auch im Überstand.

In den Sedimenten der Epidermis lag die Aktivität der PPO je nach Samen bei 0,59 bis 1,12 µkat/g Frischgewicht. Die Sedimente des Mesophylls derselben Samen wiesen dagegen eine PPO-Aktivität von etwa 0,43 bis 0,64 µkat/g Frischgewicht auf.

In einem der untersuchten Samen war die PPO-Aktivität im Überstand sowohl der Epidermis als auch des Mesophylls höher als im Sediment.

Durch eine Inkubation der PPO mit SDS (Na-Dodecylsulfat) wurde nur eine minimale Aktivierung der PPO erreicht (Abbildung 110). Diese war im Sediment höher als im Überstand. Durch die Zugabe von 0,1 % SDS wurde eine Zunahme von 14 bis 15 % der Aktivität in der Epidermis und von 2 bis 11 % im Mesophyll erreicht. In einigen Proben wurde durch die Zugabe von 0,5 %igem SDS eine noch höhere Aktivierung der PPO erreicht. Es konnte jedoch kein eindeutiger Unterschied zwischen der Aktivierbarkeit der PPO im Mesophyll und in der Epidermis festgestellt werden.

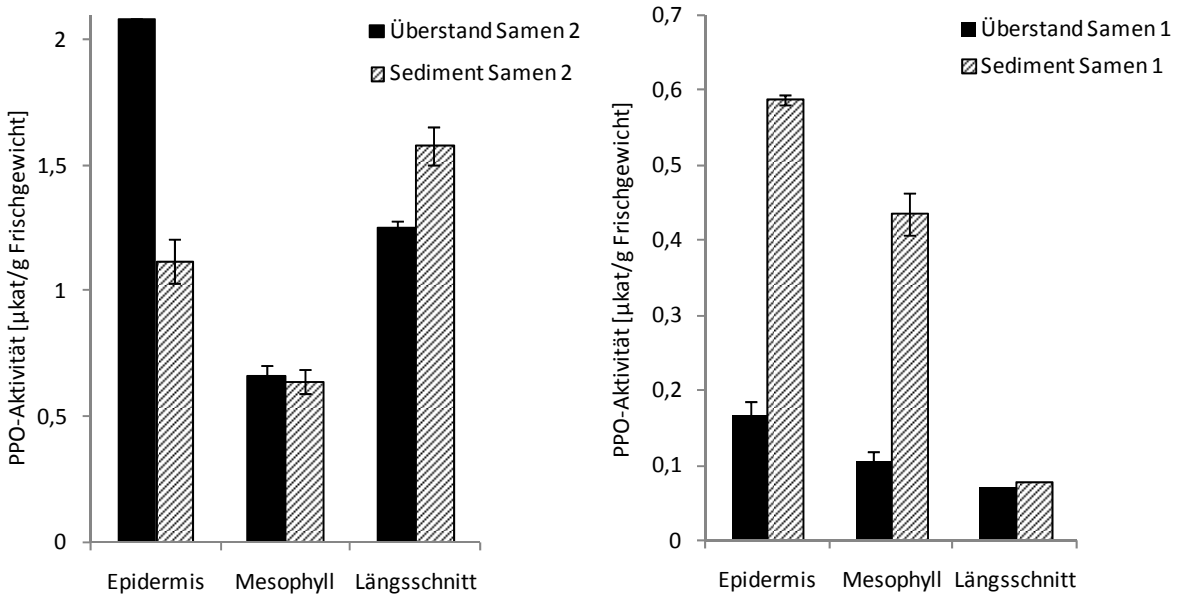


Abbildung 109: PPO-Aktivität in unterschiedlichen Geweben von Kakaosamen.
Von zwei Samen wurden jeweils Epidermis, Mesophyll und ein Längsschnitt zur Aktivitätsbestimmung genommen.
Die zur Messung verwendeten Samen wurden zerkleinert, in cyanidhaltigem SÖRENSEN-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Die PPO-Aktivität wurde sowohl in dem daraus resultierenden Sediment als auch im Überstand gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

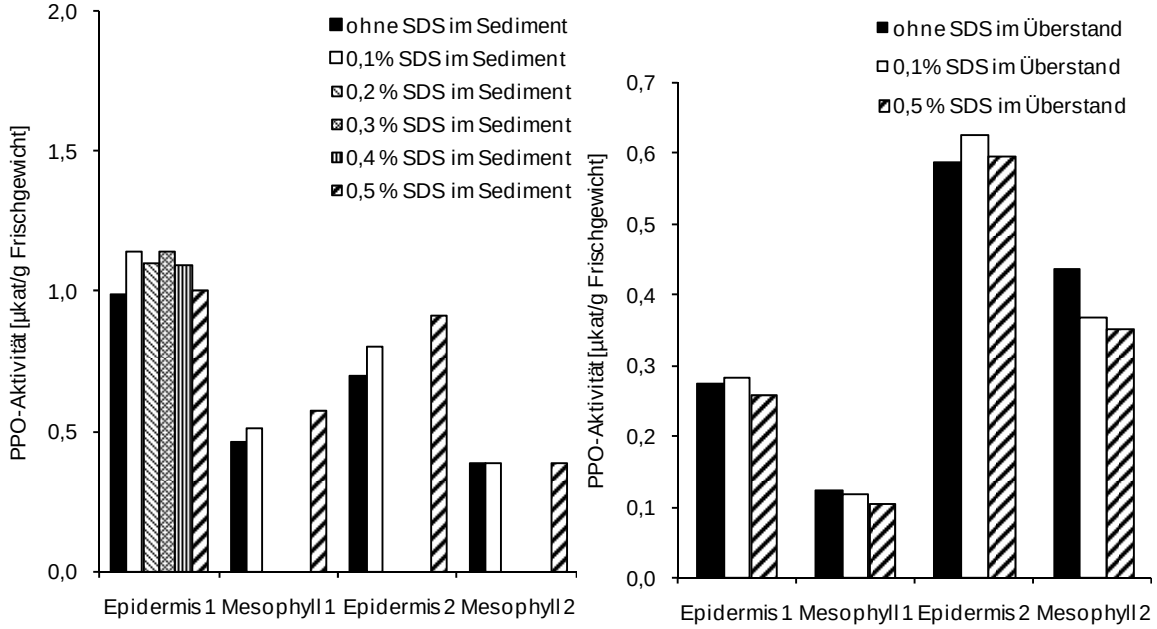


Abbildung 110: PPO-Aktivität in verschiedenen Geweben von Kakaosamen nach der Zugabe unterschiedlicher SDS-Konzentrationen.
Hierfür wurden von zwei Samen jeweils Epidermis und Mesophyll zur Aktivitätsbestimmung genommen.
Die zur Messung verwendeten Samen wurden zerkleinert, in cyanidhaltigem SÖRENSEN-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Die PPO-Aktivität wurde sowohl in dem daraus resultierenden Sediment als auch im Überstand gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Zur Untersuchung der Unterschiede der PPO-Aktivität in der Samenspitze, im Radikula-Ende der Samen und im inneren Bereich („Mitte“) der Samen wurden von vier Samen jeweils zwei Proben von der Samenspitze, zwei von dem Radikula-Ende und eine aus dem inneren Bereich genommen. In allen untersuchten Samen war die PPO-Aktivität in der Samenspitze höher, als an dem Radikula-Ende. Die Proben aus dem inneren Bereich der Samen wiesen die höchste PPO-Aktivität auf. Dies liegt vermutlich daran, dass sich in diesem Bereich viele Leitbündel befinden, um die vermehrt Polyphenolspeicherzellen angeordnet sind.

Zwar wiesen die einzelnen Samen sehr unterschiedlich hohe PPO-Aktivitäten auf, die Verteilung der PPO-Aktivität in den einzelnen Bereichen der Samen war aber in allen untersuchten Samen gleich.

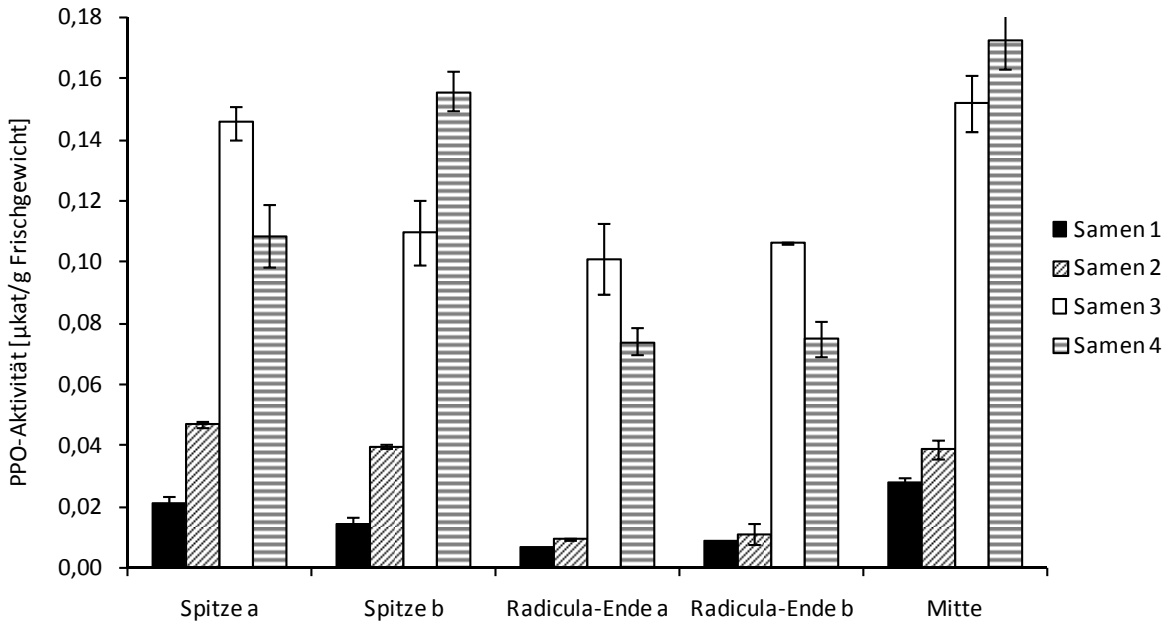


Abbildung 111: PPO-Aktivität in unterschiedlichen Bereichen von Kakaosamen.
Zur Aktivitätsbestimmung wurden von vier Samen jeweils zwei Proben (a, b) von der Samenspitze, zwei von dem Radikula-Ende und eine aus dem inneren Bereich („Mitte“) genommen. Die Samen 1 und 2 stammten aus einer, die Samen 3 und 4 aus einer anderen Frucht.
Die zur Messung verwendeten Samen wurden zerkleinert, in cyanidhaltigem SÖRENSEN-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Die PPO-Aktivität wurde in dem daraus resultierenden Sediment gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.1.8.4 Zusammenfassung

Die zur Messung der PPO-Aktivität verwendeten Samen wurden zerkleinert, in cyanidhaltigem SÖRENSEN-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Die PPO-Aktivität wurde sowohl in dem daraus resultierenden Sediment, als auch im Überstand gemessen.

In allen Samen wurde in den Sedimenten eine höhere PPO-Aktivität als im Überstand gemessen.

In den Sedimenten der Samen des German Cocoas war die PPO-Aktivität etwa zehnmal höher als in den entsprechenden Sedimenten der anderen untersuchten Genotypen.

Im Verlauf der Keimung stieg die PPO-Aktivität in den Samen der meisten Proben etwas an.

Die Sedimente der Sämlingsachsen wiesen eine höhere PPO-Aktivität als die der Samen auf. Während der Keimung nahm die PPO-Aktivität in den Sedimenten der Sämlingsachsen ab. Auch in den meisten aus der Aufarbeitung der Sämlingsachsen resultierenden Überständen wurde eine Abnahme der PPO-Aktivität im Verlauf der Keimung festgestellt.

In den unterschiedlichen Bereichen der einzelnen, ungekeimten Kakaosamen lag eine Ungleichverteilung der PPO vor. In der Epidermis wurde eine höhere PPO-Aktivität als im Mesophyll gemessen. Zudem wiesen die Samen an der Samenspitze eine höhere PPO-Aktivität als am Radikula-Ende auf.

4.1.9 Aktivität der Proteasen während der Keimung

4.1.9.1 Aspartylendoproteaseaktivität

Die Aspartylendoprotease ist für die Spaltung der Speicherproteine verantwortlich. Sie spaltet diese mit hoher Spezifität im Bereich der hydrophoben Aminosäuren, so dass Oligopeptide mit hydrophoben Enden entstehen (VOIGT und BIEHL, 1995).

Von jeder Probe wurden von der entfetteten Trockenmasse zwei parallele Aktivitätsbestimmungen durchgeführt, die als zwei unterschiedliche Messpunkte mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben sind. Bei den angegebenen Aktivitäten handelt es sich um die potentiell vorhandenen Aktivitäten. Diese lassen allerdings keine Rückschlüsse auf die tatsächliche Spaltaktivität der Proteasen zu.

Aspartylendoproteaseaktivitäten der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad und Kamerun

Zu Beginn der Keimungsversuche lag die Aktivität der Aspartylendoprotease zwischen 0,20 und 0,40 µkat/g ffTM.

Im anschließenden Verlauf der Keimung veränderte sich die Aktivität der Aspartylendoprotease nicht.

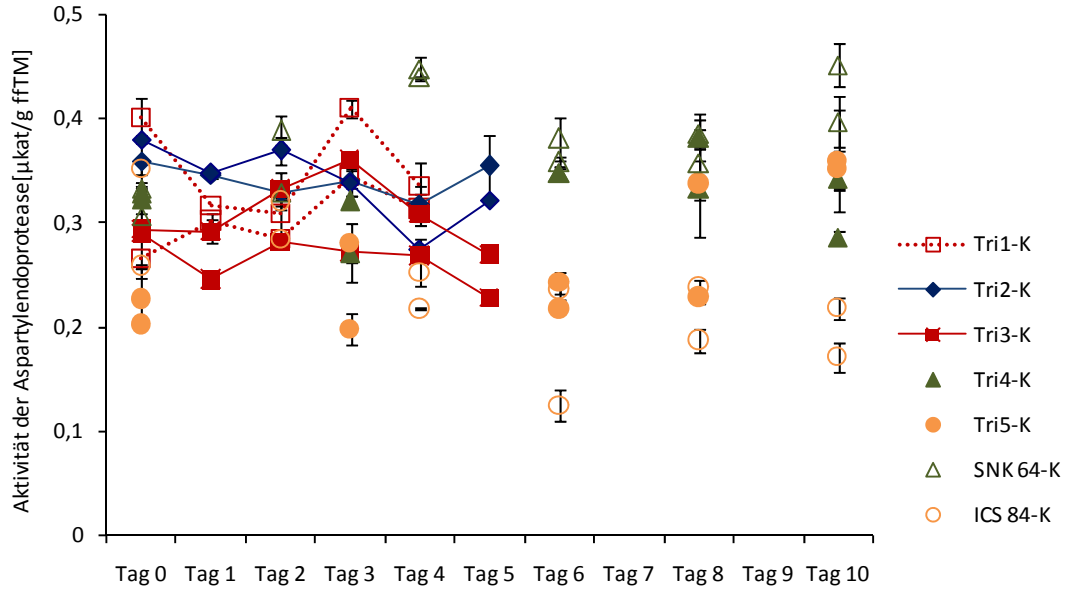


Abbildung 112: Aspartylendoproteaseaktivität in den entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Früchte aus Trinidad (Tri1-K – Tri5-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung. Von jeder Probe wurden zwei Messungen durchgeführt. Von diesen sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen angegeben.

Aspartylendoproteaseaktivitäten von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

In den frischen Samen lag die Aktivität der Aspartylendoprotease zwischen 0,14 und 0,33 µkat/g ffTM. Die Samen des Genotypen ICS 40 enthielten die geringste Aktivität, die Samen des Genotypen SNK 13 die höchste.

Im Verlauf der Keimung veränderte sich die Aspartylendoproteaseaktivität nur geringfügig.

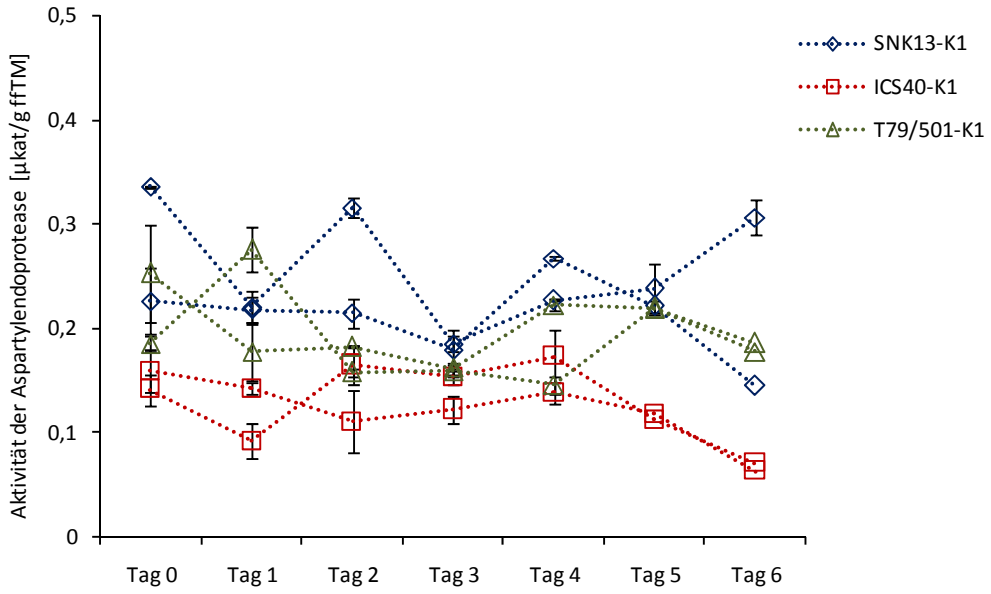


Abbildung 113: Aspartylendoproteaseaktivität in den entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Aspartylendoproteaseaktivitäten der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

In den frischen Samen des German Cocoas lag die Aktivität der Aspartylendoprotease in einem Bereich von 0,11 bis 0,25 µkat/g ffTM.

Im Verlauf der Keimung nahm sie in einigen Keimungsreihen etwas ab. In den Samen der meisten Proben hat sich die Aktivität während eines sechstägigen Keimungsverlaufs jedoch nicht verändert.

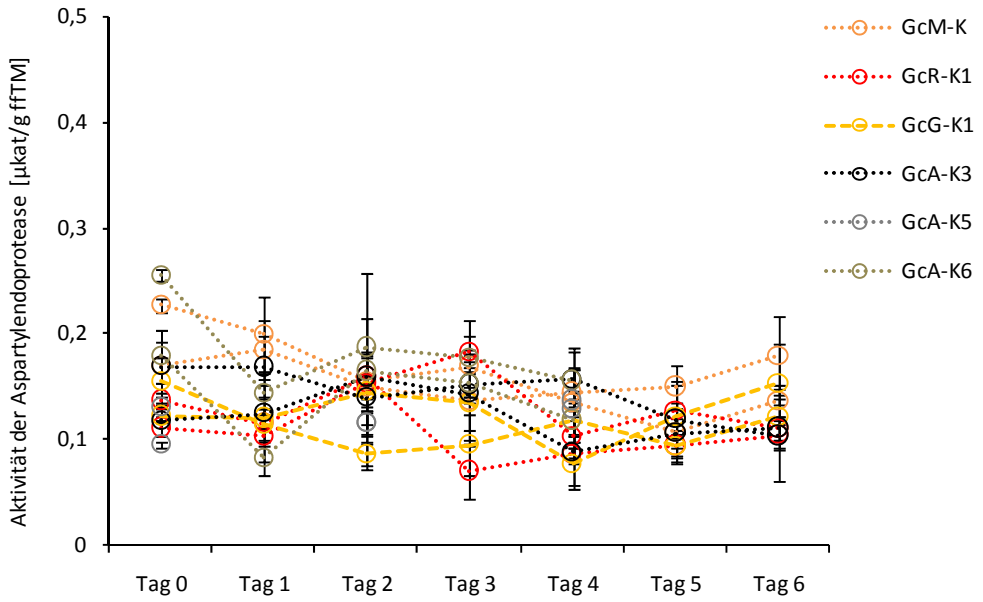


Abbildung 114: Aspartylendoproteaseaktivität in den entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.1.9.2 Carboxypeptidaseaktivität

Die Carboxypeptidase spaltet keine Proteine, sondern benötigt im Kakaosamen die proteolytisch gebildeten Peptide als Substrat.

Carboxypeptidaseaktivitäten der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad und Kamerun

Zu Beginn der Keimungsversuche lag die Aktivität der Carboxypeptidase in den Samen zwischen 0,19 und 0,69 µkat/g ffTM.

Im Verlauf der Keimung stieg die Carboxypeptidaseaktivität ab dem zweiten bis dritten Tag an, so dass sie nach viertägiger Keimung in einem Bereich von 0,4 bis 1,14 µkat/g ffTM lag. Dies entspricht einer Steigerung auf 182 bis 316 % der Anfangsaktivität (Mittelwert: 253 % ± 49 %).

Im weiteren Verlauf der Keimung stieg sie weiter an, so dass am zehnten Tag eine Carboxypeptidaseaktivität von 1,05 bis 1,60 µkat/g ffTM gemessen wurde. Es wurde somit eine Steigerung auf 231 bis 467 % der Anfangsaktivität erreicht (Mittelwert: 332 % ± 76 %).

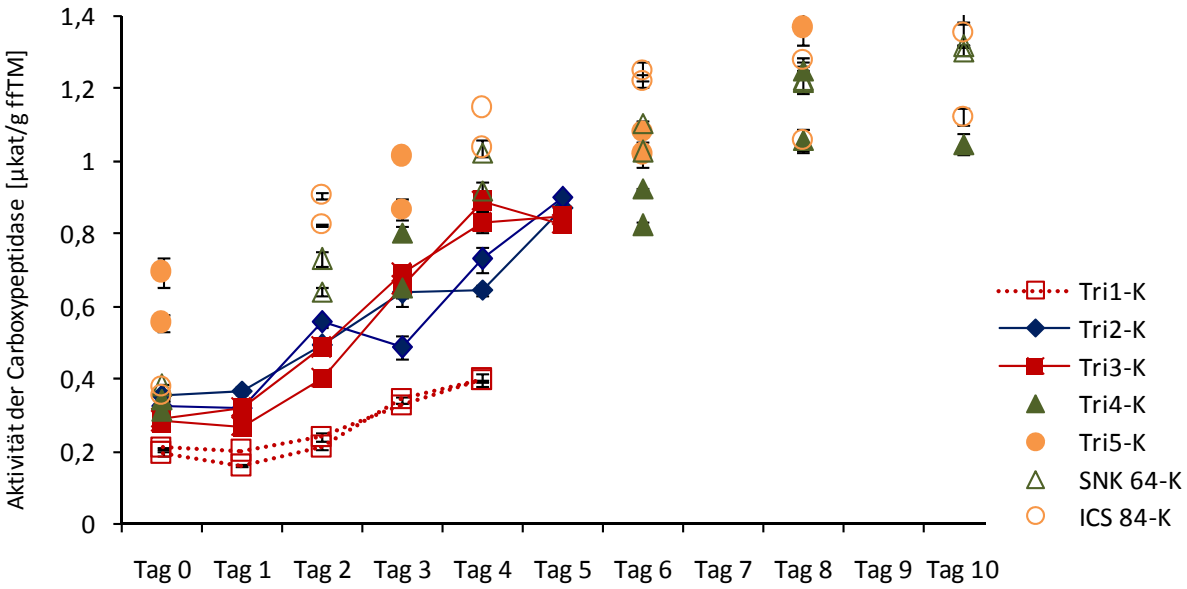


Abbildung 115: Carboxypeptidaseaktivität in den entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K – Tri5-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Carboxypeptidaseaktivitäten von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

Zu Beginn der Keimungsversuche lag die Aktivität der Carboxypeptidase in den Samen in einem Bereich von 0,24 bis 0,40 µkat/g ffTM.

Im Verlauf der Keimung stieg die Carboxypeptidaseaktivität ab dem zweiten bis dritten Tag an, so dass sie am sechsten Tag zwischen 0,53 und 0,84 µkat/g ffTM lag. Dies entspricht einer Steigerung auf 186 bis 266 % der Anfangsaktivität (Mittelwert: 226 % ± 29).

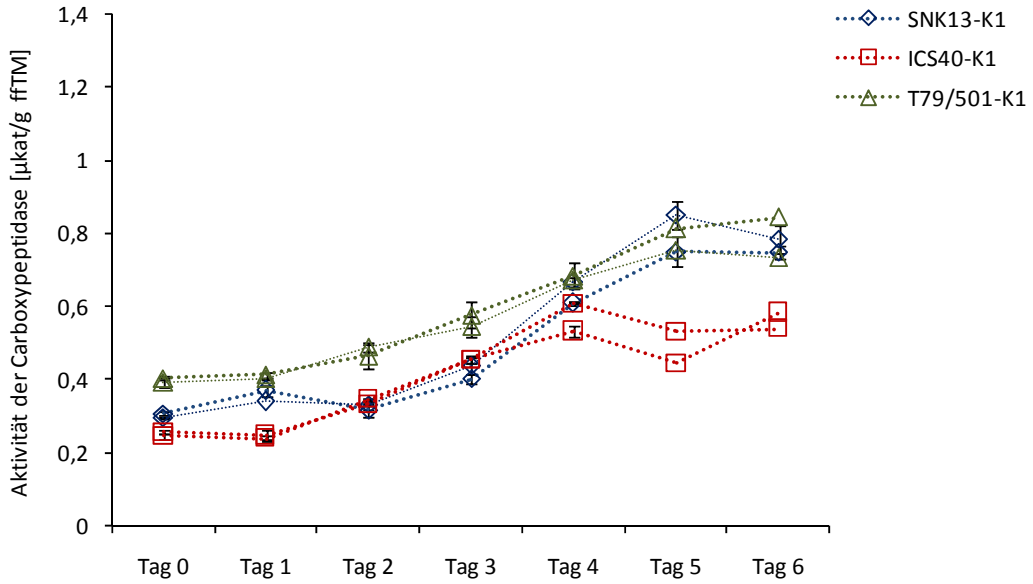


Abbildung 116: Carboxypeptidaseaktivität in den entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Carboxypeptidaseaktivitäten der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

Zu Beginn der Keimungsversuche lag die Aktivität der Carboxypeptidase in den Samen zwischen 0,22 und 0,43 µkat/g ffTM.

In den ersten sechs Tagen der Keimung stieg die Aktivität der Carboxypeptidase auf 0,53 bis 0,95 µkat/g ffTM an. Dies entspricht einer Steigerung auf 200 bis 280 % der Anfangsaktivität (Mittelwert: 236 % ± 26).

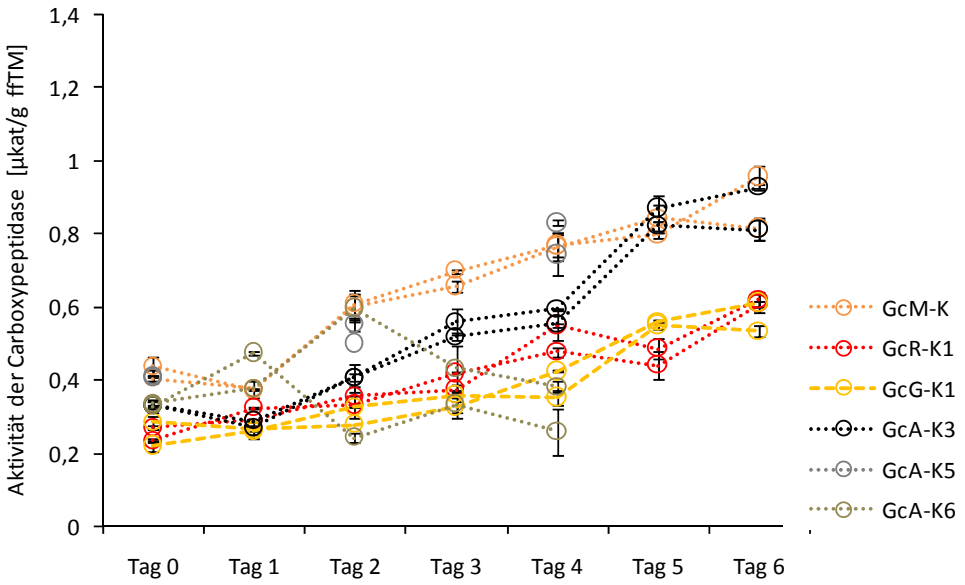


Abbildung 117: Carboxypeptidaseaktivität in den entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.1.9.3 Zusammenfassung

Die Aktivität der Aspartylendoprotease veränderte sich im Verlauf der ersten Tage der Keimung nicht. In einigen Proben nahm sie etwas ab. Diese Abnahme war jedoch nicht eindeutig, so dass sie auch auf den in allen Proben auftretenden Schwankungen beruhen kann.

Die Aktivität der Carboxypeptidase stieg dagegen ab dem zweiten bis dritten Tag an, so dass nach einer sechstägigen Keimung 186 bis 280 % der Anfangsaktivität erreicht wurden.

4.2 Reaktionen der Samen im Verlauf fermentationsähnlicher Inkubationen

In Kapitel 4.1 wurde der Verlauf der frühen Keimungsphase anhand mehrerer Parameter beschrieben. In diesem Kapitel sollen zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer fermentationsähnlichen Inkubation genommene Proben anhand derselben Parameter beschrieben werden.

Während der Fermentation kommt es im Inneren eines größeren Fermentationsansatzes zu einem Temperaturanstieg auf über 45°C und durch mikrobiellen Abbau der Pulpa gebildete Essigsäure tritt in das Sameninnere ein. Dies führt zu einer Ansäuerung des Gewebes, zur Zerstörung der Membranen, so dass die Kompartimentierung in den Zellen aufgehoben wird, und letztendlich zum Absterben des Samens. Da die sameneigenen Proteasen im sauren pH-Bereich ihr Optimum haben, wird zusätzlich eine proteolytische Aktivität in den Proteinspeichervakuolen ausgelöst.

Diese fermentationsbedingten biochemischen Veränderungen des inneren Milieus der Samen können auch künstlich in Inkubationsversuchen durch Einwirkung von Essigsäure bei bestimmten Temperaturen und unter anaeroben Bedingungen herbeigeführt werden (BIEHL *et al.*, 1982b).

Zur Untersuchung des Verlaufs der fermentationsähnlichen Inkubationen wurden Inkubationen mit Samen aus Früchten von unterschiedlichen Genotypen in Hamburg und in Yaounde, Kamerun, durchgeführt.

Die Inkubationen erfolgten bei einer Essigsäurekonzentration von 200 mmol/l. Der pH-Wert betrug bei den in Hamburg durchgeführten Inkubationsversuchen in den ersten 72 Stunden 4,5 und wurde für den weiteren Verlauf der Inkubation auf 5,5 erhöht. Bei den in Yaounde durchgeführten Inkubationen lag der pH-Wert während der gesamten Inkubation bei 4,5.

Bei den in Hamburg erfolgten Inkubationsversuchen lag die Temperatur in den ersten 24 Stunden bei 30°C, wurde dann auf 40°C und nach 48 Stunden auf 50°C erhöht. Die Temperatur der in Yaounde erfolgten Inkubationsversuche lag zu Beginn bei ca. 30°C, wurde nach 24 Stunden auf ca. 35°C, nach 48 Stunden auf ca. 40°C und nach 72 Stunden auf ca. 50°C erhöht.

Die in Hamburg inkubierten Samen wurden direkt nach der Inkubation von der Testa befreit und in einer Gefriertrocknungsanlage getrocknet. Die in Yaounde inkubierten Samen wurden zunächst mit Testa über einen Zeitraum von 1,5 bis 3 Wochen an der Sonne getrocknet und anschließend nach Hamburg transportiert. In Hamburg wurden sie geschält und ohne Testa in der Gefriertrocknungsanlage vollständig getrocknet.

4.2.1 Wassergehalt, Gewicht und Schnitttest der inkubierten und getrockneten Samen

4.2.1.1 Wassergehalt in unterschiedlich lang inkubierten und an der Sonne getrockneten Samen

Für die Untersuchung des Wassergehaltes von unterschiedlich lang inkubierten und mit der Testa an der vollen Sonne getrockneten Samen wurden diese nach der Entfernung der Testa gefriergetrocknet. Der Wassergehalt wurde anhand der Gewichtsabnahme nach der Gefriertrocknung bestimmt.

Die sonnengetrockneten Samen hatten nur sehr geringe Wassergehalte. Dies kann an der verhältnismäßig langen Trocknung von 1,5 bis 3 Wochen an der vollen Sonne liegen. Zumeist enthält Rohkakao etwa 7 % Wasser. Allerdings wird dieser Wassergehalt von Samen mit Testa ermittelt. Für die vorliegenden Wassergehaltsbestimmungen wurde der Wassergehalt der Kotyledonen bestimmt.

Die frischen, nicht inkubiert getrockneten Samen enthielten einen höheren Wassergehalt als die nach der Inkubation getrockneten Samen. Die frischen, an der Sonne getrockneten Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501 wiesen einen Wassergehalt zwischen 0,80 und 1,08 % auf. In den kleineren frischen Samen der unterschiedlichen German Cocoa Proben konnte ein höherer Wassergehalt von 1,41 bis 1,85 % nach der Sonnentrocknung festgestellt werden. Nur in der German Cocoa Probe GcM war der Wassergehalt mit 1,04 % etwas niedriger. Die frischen Samen des German Cocoas konnten während der Trocknung einen höheren Wassergehalt zurückhalten als die Samen der anderen untersuchten Genotypen.

Wurden die Samen inkubiert, enthielten sie nach der Trocknung einen geringeren Wassergehalt als die frischen Samen. Ab dem zweiten Tag der Inkubation nahm der in den getrockneten Samen gefundene Wassergehalt ab. In den 4 Tage lang inkubierten Samen war nach der Trocknung an der Sonne nur noch ein Wassergehalt von 0,38 bis 0,70 % vorhanden. Der geringere Wassergehalt in den nach der Inkubation getrockneten Samen ist ein Hinweis darauf, dass mit dem Verlust der Zellkompartimentierung, der im Zuge der Inkubation auftritt, die Fähigkeit der Samen, Wasser während der Trocknung zurückzuhalten, abnimmt.

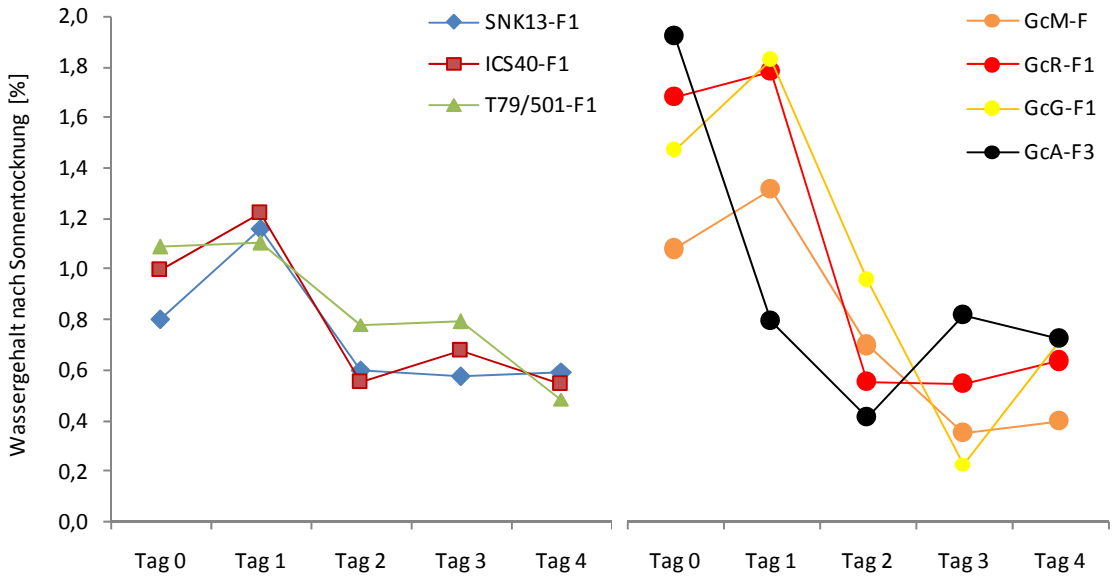


Abbildung 118: Wassergehalt in unterschiedlich lang inkubierten Kakaosamen ohne Testa nach der Trocknung an der Sonne.
Angegeben sind die Mittelwerte von je 8 bis 10 Einzelsamen.

4.2.1.2 Frisch- und Trockengewicht unterschiedlicher für die Inkubationen verwendeter Samen

Die für die in Kamerun durchgeführten Inkubationen verwendeten Kakaosamen unterschieden sich in ihrer Größe und somit auch in ihrem Frischgewicht. Für jede Inkubationsreihe wurden die Samen von je 5 Früchten gemischt und auf die 5 im Laufe der Inkubation genommenen Proben aufgeteilt (Tag 0 bis Tag 4). Die einzelnen Früchte enthielten unabhängig von ihrer Größe in etwa gleich viele Samen. Die Inkubationen fanden immer mit den gleichen Mengen an Inkubationsmedium statt, auch wenn sich die Früchte und deren Samen hinsichtlich ihrer Größe stark unterschieden. Den kleineren Samen stand somit mehr Inkubationsmedium zur Verfügung als den größeren.

Die Samen des Genotypen ICS 40 waren mit einem durchschnittlichen Frischgewicht von 3,34 g am schwersten. Die Samen des Genotypen SNK 13 wogen mit 1,88 g in etwa halb so viel. Die Samen des Genotypen T 79/501 waren mit einem durchschnittlichen Gewicht von 1,12 g am leichtesten. Von den Samen des German Cocoas wurde nur von einer Probe das Frischgewicht mit durchschnittlich 1,70 g bestimmt.

Die einzelnen frischen Samen enthielten sehr unterschiedlich hohe Anteile an Wasser. Der höchste Wassergehalt wurde in den frischen Samen des German Cocoas festgestellt. Diese enthielten 37,9 % Wasser. In den verhältnismäßig großen Samen des Genotypen ICS 40 lag der Wasseranteil bei 33,5 %. Den niedrigsten Wassergehalt enthielten die Samen der Genotypen SNK 13 und T 79/501 mit 27,3 % und 22,3 %. Die sehr kleinen Samen des Genotypen T 79/501 enthielten den geringsten Gehalt an Wasser.

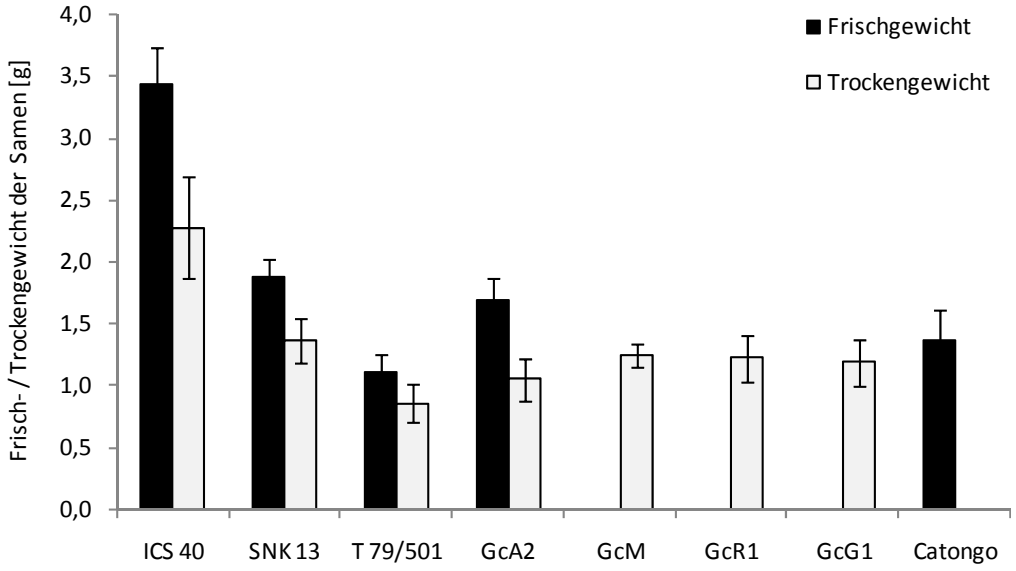


Abbildung 119: Frisch- und Trockengewichte unterschiedlicher Kakaosamen.
Angegeben sind die Mittelwerte von je 8 bis 12 Einzelsamen mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.2.1.3 Schnitttest von unterschiedliche lang inkubierten und getrockneten Samen

Für den Schnitttest wurden von den inkubierten und an der Sonne getrockneten Samen von Tag 0 bis Tag 4 je vier Samen im Längsschnitt halbiert.

Die aufgeschnittenen Kotyledonen der reifen, nicht inkubierten Samen waren schiefrig gefärbt.

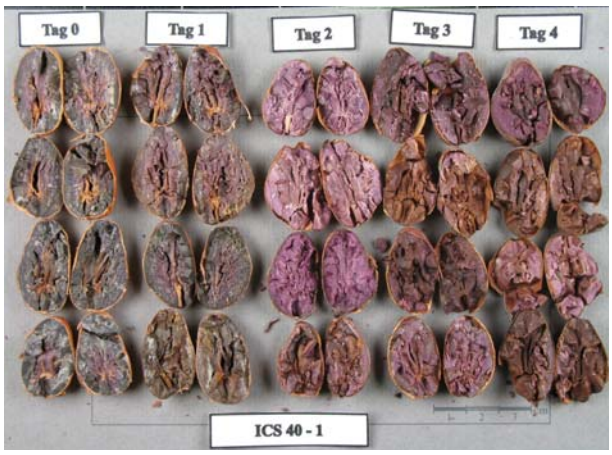
Ab dem zweiten Tag der Inkubation trat eine violette Färbung in den Kotyledonen auf. An einigen der aufgeschnittenen Kotyledonen war zu erkennen, dass die violette Färbung, die durch das Eintreten der Essigsäure in den Samen entstand, zuerst im Bereich der Radikula auftrat und sich von dort aus, zunächst über den inneren Bereich der Samen, verbreitete. Da die Essigsäure nur im Bereich der Radikula Kontakt zur Testa hatte, ist anzunehmen, dass sie in diesem Bereich zuerst in die Samen eindrang.

In den Kotyledonen der Samen der Genotypen SNK 13 und ICS 40 wurde schon nach einer eintägigen Inkubation eine Verfärbung der Kotyledonen festgestellt.

In den meisten Samen trat ab dem 3. oder 4. Tag der Inkubation eine Braunfärbung der Kotyledonen auf. In einigen Samen waren die Kotyledonen auch nach viertägiger Inkubation noch weitgehend violett.



Abbildung 120 a und b: Samen im Längsschnitt vor und nach 1- bis 4-tägiger Inkubation; Genotyp SNK 13, Inkubationsversuch 1 und 2



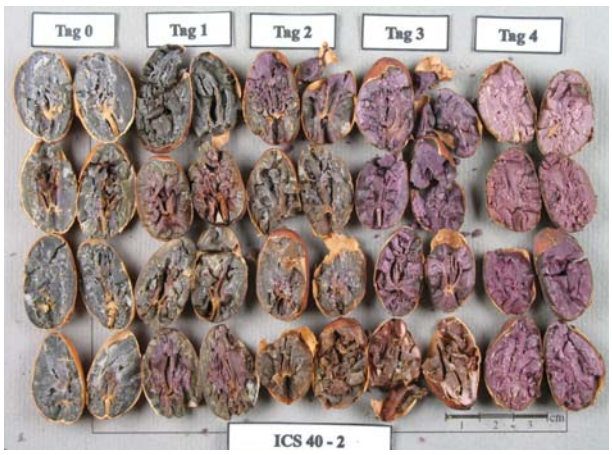


Abbildung 121 a und b: Samen im Längsschnitt vor und nach 1- bis 4-tägiger Inkubation; Genotyp ICS 40, Inkubationsversuch 1 und 2

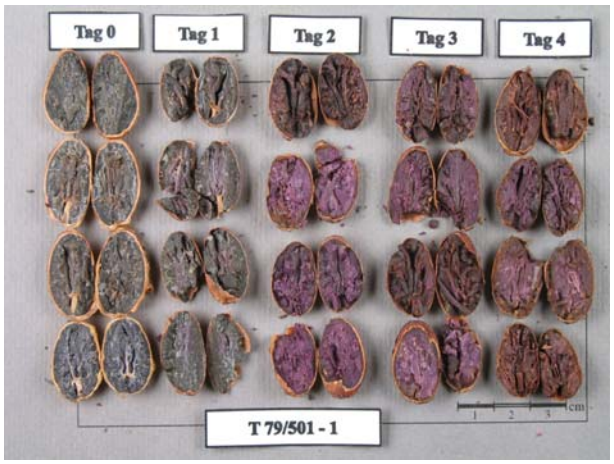




Abbildung 122 a und b: Samen im Längsschnitt vor und nach 1- bis 4-tägiger Inkubation; Genotyp T 79/501, Inkubationsversuch 1 und 2



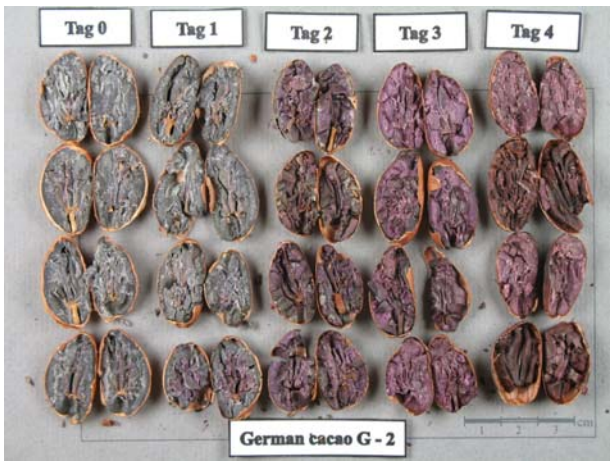


Abbildung 123 a und b: Samen im Längsschnitt vor und nach 1- bis 4-tägiger Inkubation; German Cocoa gelb, Inkubationsversuch 1 und 2

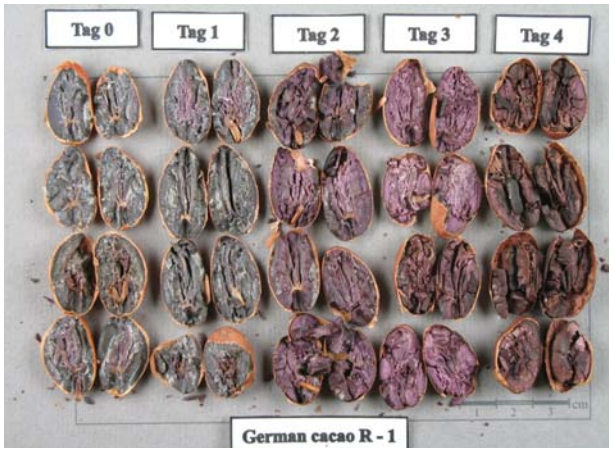
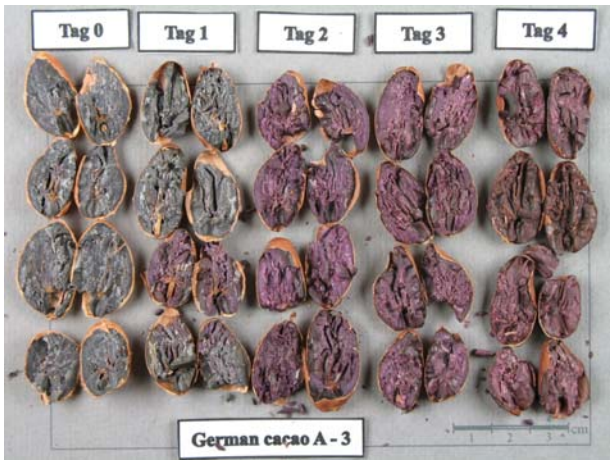




Abbildung 124 a und b: Samen im Längsschnitt vor und nach 1- bis 4-tägiger Inkubation; German Cocoa rot, Inkubationsversuch 1 und 2



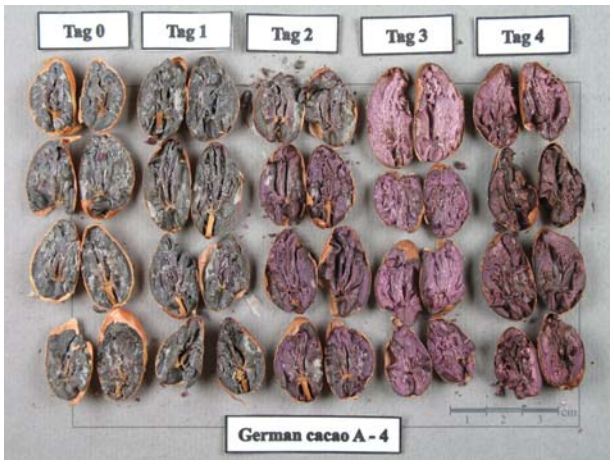


Abbildung 125 a und b: Samen im Längsschnitt vor und nach 1- bis 4-tägiger Inkubation; German Cocoa aus Awae, Inkubationsversuch 3 und 4



Abbildung 126: Samen im Längsschnitt vor und nach 1- bis 4-tägiger Inkubation; German Cocoa aus Mbangassina

4.2.2 Wasseraufnahme und pH-Wert von Kakaosamen im Verlauf der Inkubation

4.2.2.1 Wasseraufnahme

Während der Inkubation von vollständigen Samen mit Testa und Pulpa erfolgte in den ersten 24 bis 48 Stunden eine Aufnahme von Inkubationsmedium, welche als Gewichtszunahme der von Testa und Pulpa befreiten Kotyledonen gemessen wurde. Nach 24 Stunden wurde eine durch die Aufnahme von Inkubationsmedium bedingte Gewichtszunahme von 2 bis 9 % festgestellt.

Mit dem Erhöhen der Temperatur nach 48-stündiger Inkubation auf 50°C und dem damit verbundenen Verlust der Zellkompartimentierung kam es zu einer Abnahme des Gewichts, wobei nach 72 bzw. 96 Stunden Inkubation das Gewicht der Kotyledonen unter dem Anfangsgewicht lag. Nur in einer der untersuchten Inkubationsreihen lag das Gewicht selbst nach 96 Stunden noch über dem Anfangsgewicht. Die Samen dieser Probe wiesen im Vergleich zu denen der anderen Proben die höchste Wasseraufnahme im Verlauf der ersten 48 Stunden der Inkubation auf, so dass sich vielleicht daraus erklären lässt, warum das Gewicht der Kotyledonen auch nach 96-stündiger Inkubation noch über dem Ausgangsgewicht lag. Allerdings fand auch in diesen Kotyledonen eine Abnahme des Gewichts nach 48 Stunden Inkubation statt.

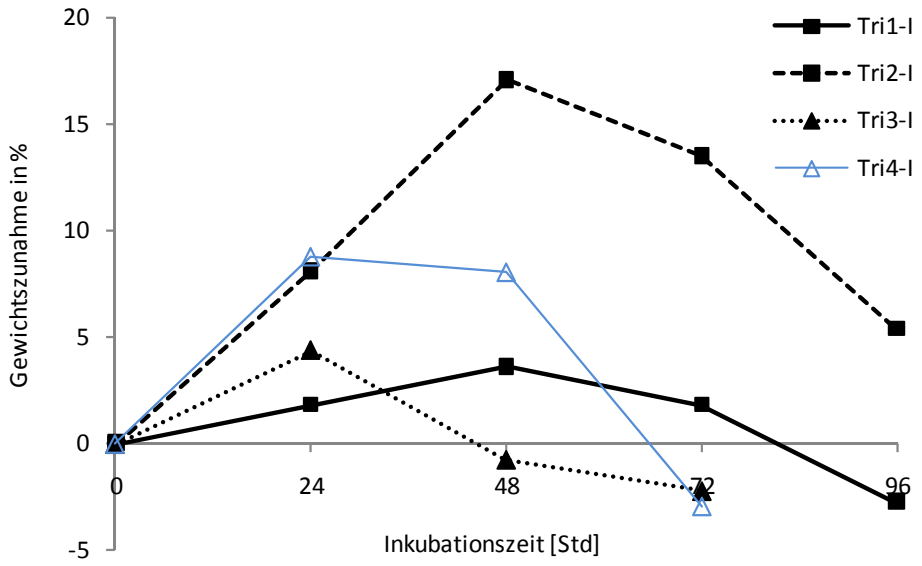


Abbildung 127: Gewichtszu- und Gewichtsabnahme [%] der Kotyledonen im Verlauf der Inkubation. Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. Bei der Inkubation Tri4-I (blaue Linie) wurde die Testa der Samen durch Anritzen verletzt. Angegeben sind die Mittelwerte (n = 8 bis 10). Da bei den Parallelmessungen sehr ähnliche Gewichte gemessen wurden, sind keine Standardabweichungen (alle kleiner als 1 %) dargestellt.

4.2.2.2 pH-Wert

pH-Werte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad

Die für die folgenden Untersuchungen verwendeten Samen wurden direkt nach der Inkubation gefriergetrocknet.

In den frischen, nicht inkubierten Samen lag der pH-Wert zwischen 6,0 und 6,2. Im Verlauf der Inkubation fand eine Abnahme des pH-Wertes statt. Nach 72-stündiger Inkubation lag der pH-

Wert der Samen nur noch zwischen 4,8 und 5,2. Nach dem Erhöhen des pH-Wertes der Inkubationsmedien nach 72 Stunden von 4,5 auf 5,5 stieg erwartungsgemäß auch der pH-Wert der Samen wieder etwas an. Zudem nahm im Verlauf der Inkubation der Gehalt an freien Aminosäuren in den Kotyledonen zu (siehe Kapitel 4.2.3.3). Aminosäuren stellen eine Pufferwirkung auf die Ansäuerung dar, so dass die Verlangsamung der Abnahme des pH-Wertes im Verlauf der Inkubation vermutlich mit dieser zusammenhängt.

Bei Inkubationen mit Samen mit angeritzter Testa (Tri4-I und Tri6-I) wurde kein eindeutiger Unterschied in der Abnahme des pH-Wertes im Vergleich zu denen mit Samen mit intakter Testa festgestellt. Bei zwei Inkubationsreihen (Tri5-I und Tri6-I) nahm der pH-Wert in den ersten 24 Stunden etwas schneller ab als in den anderen Inkubationsreihen. Allerdings war nur die Testa der Samen der Inkubationsreihe Tri6-I angeritzt. Nach 48 Stunden lagen die pH-Werte aller Inkubationsreihen in einem ähnlichen Bereich. Durch das Anritzen der Testa wurde die Abnahme des pH-Wertes nicht beschleunigt.

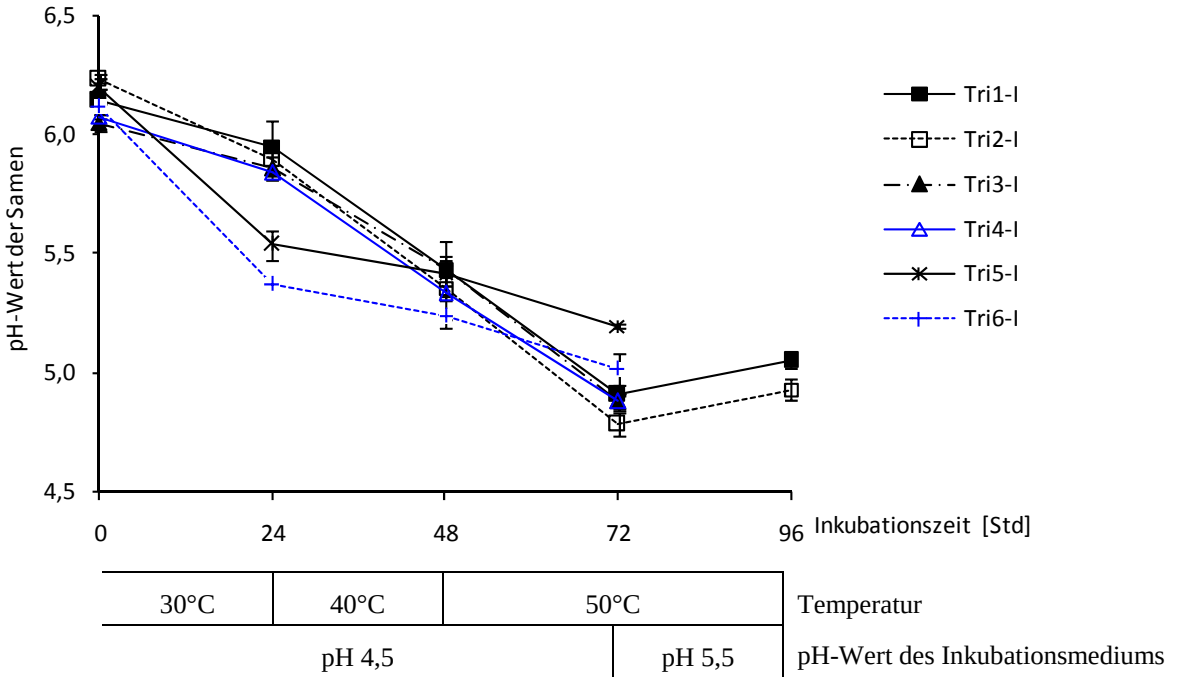


Abbildung 128: pH-Werte der Kakaosamen im Verlauf der Inkubationsversuche.
Die pH-Werte wurden von je 2 Samen gemessen. Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. In den Inkubationen Tri4-I und Tri6-I (blaue Linien) wurde die Testa der Samen durch Anritzen verletzt. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

pH-Werte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

In den frischen, nicht inkubierten Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501 lagen die pH-Werte bei 6,5, 6,6 und 6,7. Im Verlauf von 48 Stunden Inkubation nahmen sie ab. Nach 72-stündiger Inkubation wurden pH-Werte von 5,6, 5,4 und 5,5 erreicht. Nach 96-stündiger Inkubation stiegen die pH-Werte, obwohl durchgehend Inkubationsmedien mit einem pH-Wert von 4,5 verwendet wurden, wieder auf 5,5 bis 5,7 an.

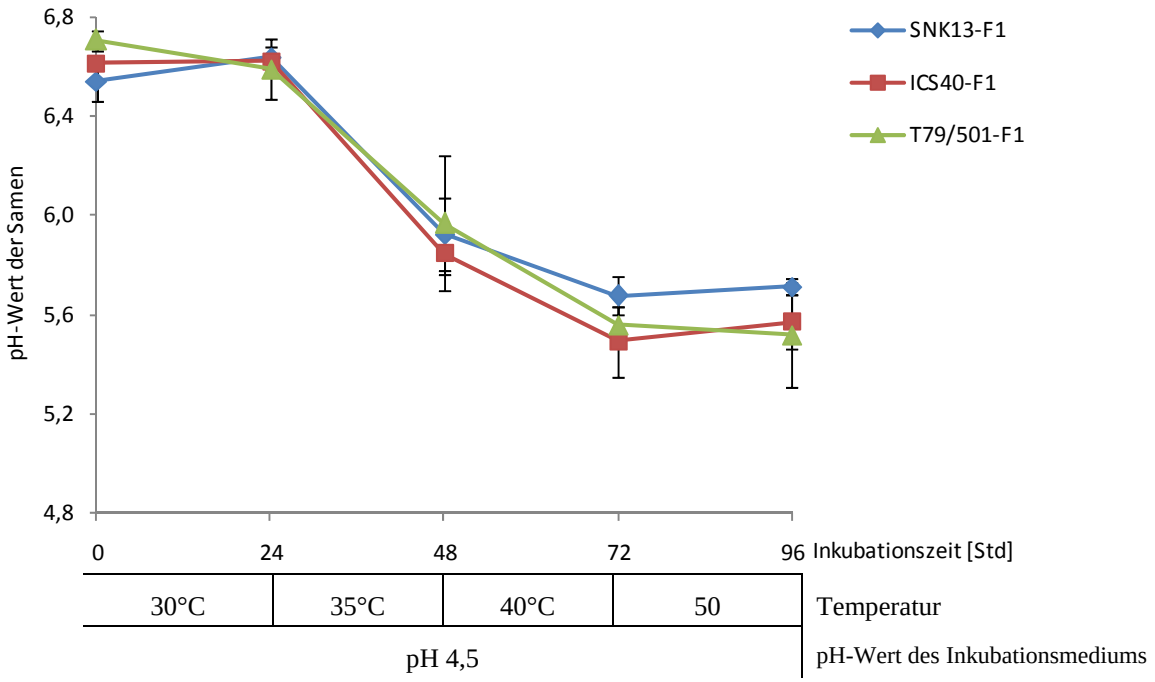


Abbildung 129: pH-Werte der Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubationsversuche. Die pH-Werte wurden von je 3 Samen gemessen. Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet. Angegeben sind die Mittelwerte (n=3) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

pH-Werte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

Die für die folgenden Untersuchungen verwendeten Samen wurden nach der Inkubation an der Sonne getrocknet, bevor sie gefriergetrocknet wurden. Die Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6 wurden direkt nach der Inkubation gefriergetrocknet.

Die frischen, nicht inkubierten Samen der verschiedenen German Cocoa-Früchte wiesen sehr unterschiedliche pH-Werte zwischen 6,1 und 6,7 auf.

Im Laufe der Inkubationen nahmen die pH-Werte ab. Nach 72-stündiger Inkubation wurde kein Anstieg der pH-Werte festgestellt. Nur in den Samen aus der Probe GcM-F stieg der pH-Wert zum Ende der Inkubation wieder leicht an. Die Samen dieser Probe wiesen nach 96-stündiger Inkubation einen pH-Wert von 5,8 auf. Dieser pH-Wert war, verglichen mit den pH-Werten der anderen German Cocoa-Samen, sehr hoch.

Die übrigen German Cocoa-Samen hatten nach 96-stündiger Inkubation einen pH-Wert in einem Bereich von 4,9 bis 5,2. Dabei wurde in Abhängigkeit von der Trocknungsmethode ein niedrigerer pH-Wert in den direkt nach der Inkubation gefriergetrockneten Samen (GcA-F5 und GcA-F6) gefunden als in den nach der Inkubation an der Sonne getrockneten Samen.

Der pH-Wert der Samen des Catongo betrug vor der Inkubation 6,1. Dieser stieg, im Gegensatz zu den pH-Werten der German Cocoa-Samen, zu Beginn der Inkubation zunächst an. Erst nach 48-stündiger Inkubation war in diesen Samen eine Abnahme des pH-Wertes feststellbar. Nach 96-stündiger Inkubation wurde ein pH-Wert von 5,5 erreicht.

Der Vergleich der pH-Werte der Samen aus allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Inkubationsreihen (siehe Abbildung 128, Abbildung 129 und Abbildung 130) hat gezeigt, dass die pH-Werte der Samen nach einer Sonnentrocknung höher waren als wenn die Samen direkt nach der Inkubation eingefroren wurden.

Der durchschnittliche pH-Wert der frischen, direkt nach der Entnahme aus der Frucht gefriergetrockneten Samen lag bei 6,2 (± 0,1). Wenn die Samen nach der Entnahme aus der Frucht zunächst an der Sonne getrocknet wurden, lag der durchschnittliche pH-Wert mit 6,6 (± 0,2) höher. Nach 4-tägiger Inkubation sank der pH-Wert in den ungetrockneten Samen auf 5,0 (± 0,1) und in den getrockneten Samen auf durchschnittlich 5,4 (± 0,3).

Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Restmengen der Essigsäure in der Sonnentrocknung offensichtlich aus den Samen austraten oder durch andere Reaktionen abgepuffert wurden.

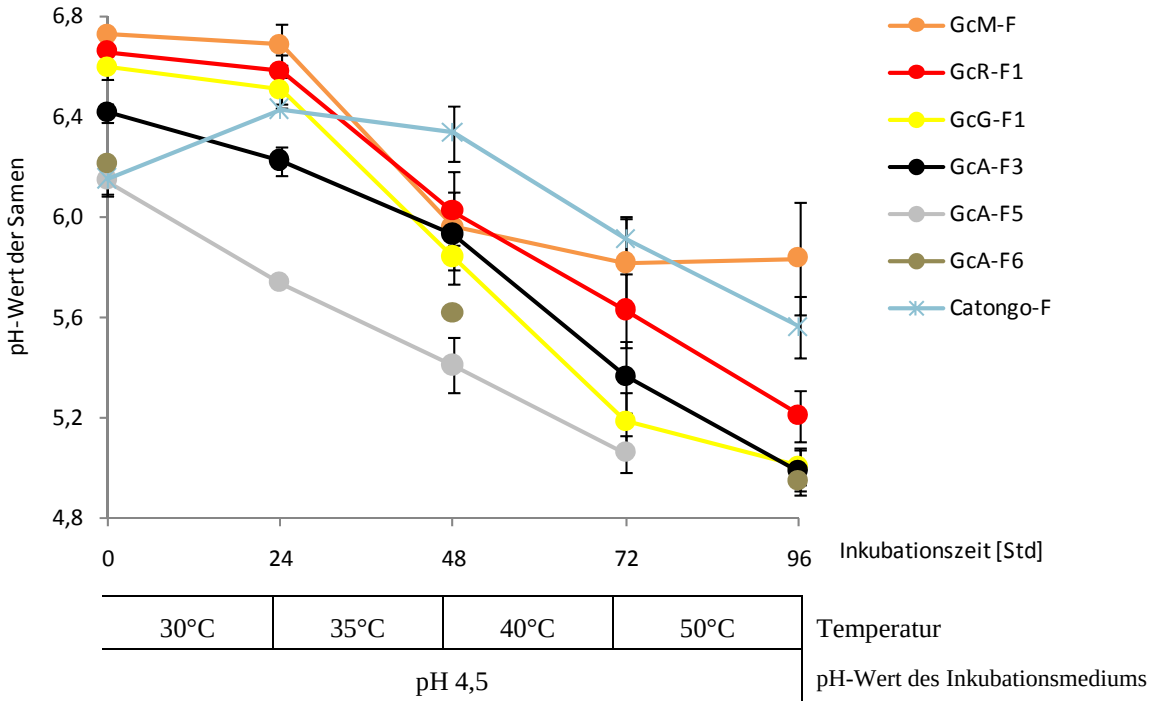


Abbildung 130: pH-Werte der Kakaosamen von German Cocoa im Verlauf der Inkubationsversuche. Die pH-Werte wurden von je 3 Samen gemessen. Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet (außer den Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6). Angegeben sind die Mittelwerte (n=3) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.2.2.3 Zusammenfassung

In den frischen, nicht inkubierten Samen lagen die pH-Werte je nach Probe zwischen 6,0 und 6,7. Im Verlauf der Inkubation fand in allen Samen eine Abnahme der pH-Werte statt. Nach 72-stündiger Inkubation lagen die pH-Werte nur noch in einem Bereich von 4,8 bis 5,6. Anschließend wurde in den meisten Samen ein leichter Anstieg des pH-Wertes festgestellt. Nur in den Samen des German Cocoas stiegen die pH-Werte, bis auf eine Probe, zum Ende der Inkubationen nicht wieder an.

Zudem wurde gezeigt, dass der pH-Wert der Samen durch eine Trocknung an der Sonne anstieg.

Während der Inkubation erfolgte zunächst eine Wasseraufnahme, welche in Form einer Gewichtszunahme gemessen wurde. Nach 24 Stunden betrug die Gewichtszunahme zwischen 2 und 9 %. Spätestens mit dem Verlust der Zellkompartimentierung nach dem Erhöhen der Temperatur auf 50°C verloren die Samen wieder an Gewicht.

4.2.3 Gehalt der Samen an Proteinen, Oligopeptiden und freien Aminosäuren im Verlauf der Inkubation

4.2.3.1 Proteine

Im Verlauf der Fermentation kommt es durch das Eindringen der Essigsäure und die Aufnahme von Wasser in die Samen (BIEHL *et al.*, 1982b) zu einem Anschwellen der Proteinvakuolen, wodurch die biochemischen Prozesse, welche zum Abbau der Reserveproteine und somit zu den Aromavorstufen führen, stimuliert werden.

Die Proteolyse findet in den Samen nach der Ansäuerung durch Essigsäure, welche im Verlauf der Fermentation durch den Abbau der Zucker der Pulpa gebildet wird, und nach der Zerstörung der Zellkompartimente statt. Anaerobe und saure Bedingungen verhindern zu diesem Zeitpunkt die Vergerbung der Proteine und die Enzyminaktivierung. Die Ansäuerung ist für die Prozessierung wichtig, da die beiden an der Spaltung der Proteine beteiligten sameneigenen Proteasen ihr Optimum im sauren pH-Bereich haben (BIEHL und PASSERN, 1982).

Proteingehalt nach der Methode von BRADFORD

Proteingehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad

Die Bestimmung des Gesamtgehaltes der Proteine in den Kotyledonen der Kakaosamen erfolgte nach der Methode von BRADFORD (1976).

Im Verlauf der Inkubation nahm der Proteingehalt ab. In den ersten zwei Tagen der Inkubation war die Veränderung des Proteingehaltes sehr gering. Erst nach dem Erhöhen der Temperatur von 40°C auf 50°C nahm der Proteingehalt deutlich ab. Da die Aspartylendoprotease, welche für die Spaltung der Proteine verantwortlich ist, ihr Optimum bei einem pH-Wert von 3,4 hat und bei 50 bis 55°C noch relativ stabil ist, kam es erst nach der Ansäuerung der Kotyledonen durch die eindringende Essigsäure zu einem Abbau der Proteine (BIEHL *et al.*, 1993).

Die frischen Kakaosamen der beiden untersuchten Proben enthielten 282 und 325 mg Proteine /g Acetontrockenpulver. Die höchste Abnahme des Gesamtgehaltes der Proteine erfolgte vom zweiten auf den dritten Tag der Inkubation. Am dritten Tag enthielten die Samen durchschnittlich nur noch 65 % (± 1,6 %) ihres Anfangsgehaltes an Proteinen.

Nach viertägiger Inkubation betrug der Proteingehalt 158 und 213 mg/g Acetontrockenpulver. Dies entspricht 61 % (± 6,5 %) des Anfangsgehaltes.

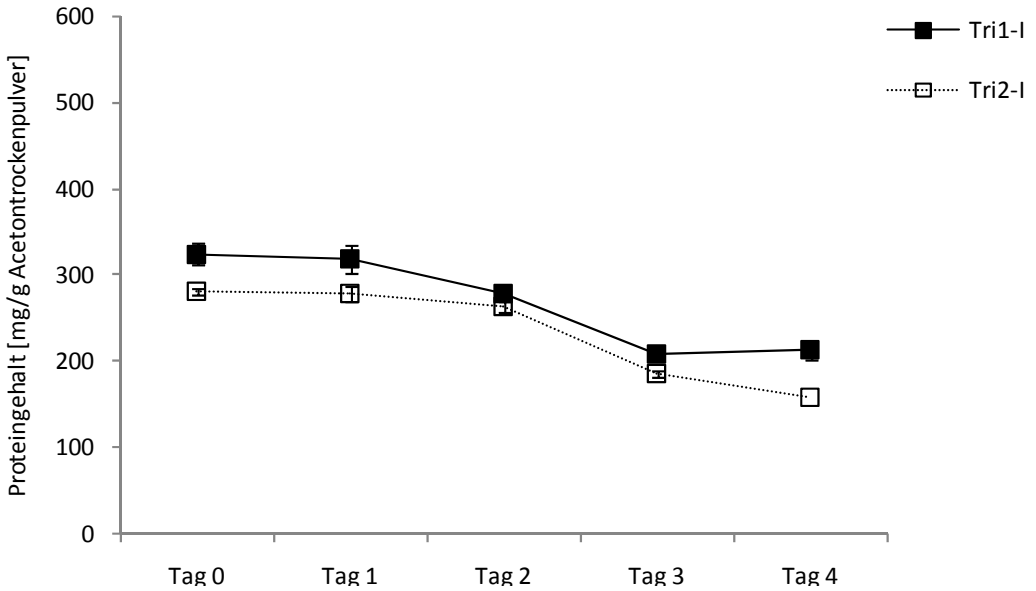


Abbildung 131: Proteingehalt im Acetontrockenpulver der Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Proteingehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

Die für diesen Inkubationsversuch verwendeten Samen wurden nach der Inkubation an der Sonne getrocknet, bevor sie gefriergetrocknet wurden. Die Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6 wurden direkt gefriergetrocknet.

Zu Beginn der Inkubation enthielten die Samen zwischen 350 und 424 mg Proteine /g Acetontrockenpulver. Im Verlauf der Inkubation nahm der Gesamtgehalt der Proteine ab, so dass die Samen am dritten Tag durchschnittlich nur noch 85 % (± 16 %) ihres Anfangsgehaltes an Proteinen enthielten.

Nach viertägiger Inkubation betrug der Proteingehalt je nach Probe 214 bis 325 mg/g Acetontrockenpulver. Dies entspricht 71 % (± 13 %) des Anfangsgehaltes.

Da die Proteingehalte der Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6, welche direkt nach der Probennahme gefriergetrocknet wurden, sich im Verlauf der Inkubation nicht wesentlich von den Proteingehalten der nach der Probennahme getrockneten Samen unterschieden, scheinen Oxidationsreaktionen der Proteine mit Polyphenolen während der Trocknung nur geringfügig stattgefunden zu haben.

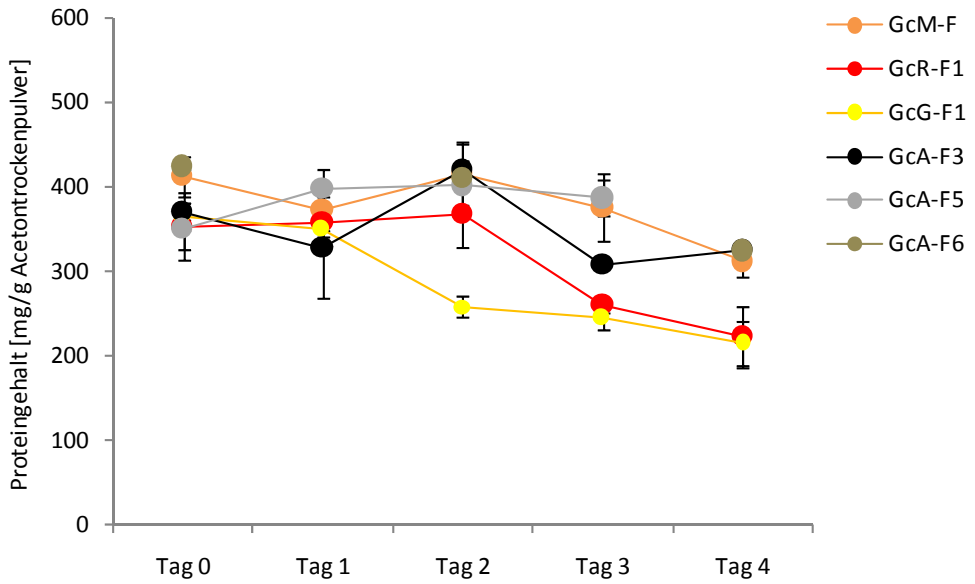


Abbildung 132: Proteingehalt im Acetontrockenpulver der Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet (außer den Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6). Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Charakterisierung einzelner Proteine mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970)

Proteinfraktionen der Samen einer Kakaofrucht aus Trinidad

Die Proteine wurden mit Hilfe einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Brilliant Blue R 250 gefärbt.

Während der Inkubation fand ein Proteinabbau statt.

Die Globulinbanden wurden ab dem dritten Tag der Inkubation abgebaut, so dass sie nach viertägiger Inkubation in den Gelbildern fast nicht mehr zu erkennen waren.

Auch die beiden Albumine bei 19 und 13 kDa wurden während der Inkubation ab dem dritten Tag abgebaut. Allerdings wurden die Albumine weniger stark abgebaut als die Globuline.

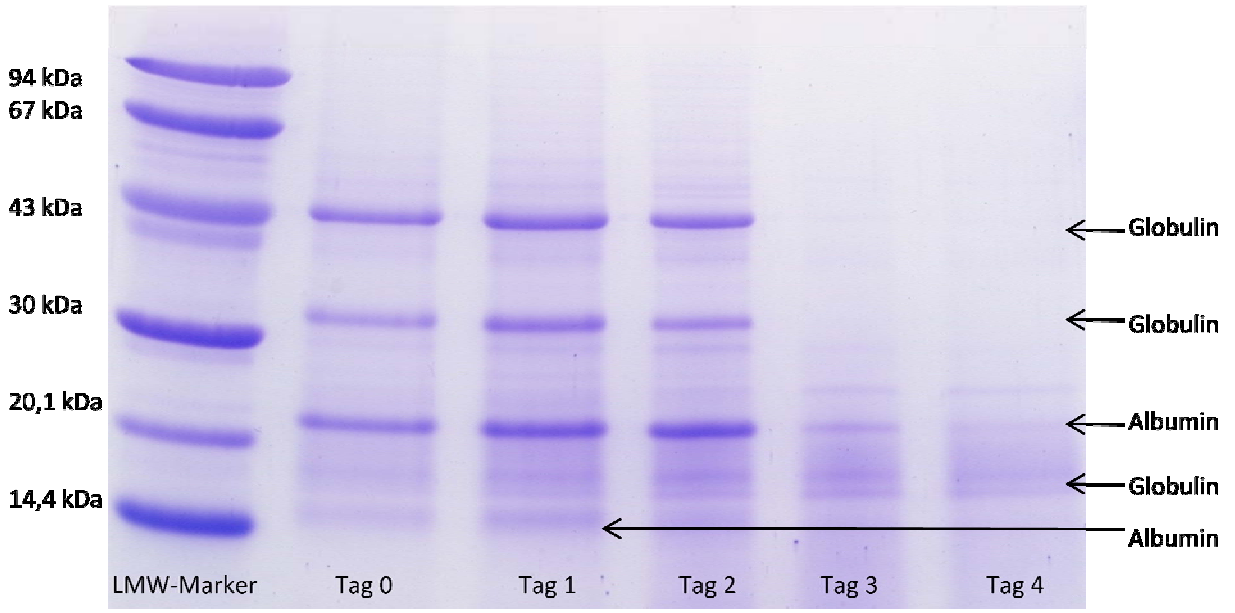


Abbildung 133 Veränderung der Speicherproteinfraktionen in den Samen (Tri1-I) während einer 4-tägigen Inkubation (DISC-SDS-PAGE).
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. Zur Auftrennung der Proteine wurde Acetontrockenpulver verwendet. Es wurden je 10 µl Probelösung aufgetragen, welche 0,04 mg Acetontrockenpulver in SDS-Puffer gelöst enthielten. Die Färbung der Proteine erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R 250 Färbelösung.

4.2.3.2 Oligopeptide

Oligopeptide werden durch die Hydrolyse des Speicherglobulins, katalysiert durch die Aspartylendoprotease, gebildet. Durch die hydrolytische Aktivität der Aspartylendoprotease werden die Proteine im Verlauf der Fermentation in hydrophobe Oligopeptide gespalten. Anschließend spaltet die Carboxypeptidase die hydrophoben Aminosäuren von den carboxyterminalen Enden der Oligopeptide ab, so dass hydrophile Oligopeptide entstehen (VOIGT und BIEHL, 1995).

Für die Qualität des Rohkakaos ist die Bildung von hydrophilen Oligopeptiden von maßgeblicher Bedeutung. Nur in Gegenwart von Oligopeptiden entsteht beim Rösten das typische Kakaoaroma (MOHR *et al.*, 1976; VOIGT *et al.*, 1994).

Von den Samen des Genotypen SNK 13 und einer German Cocoa-Inkubationsreihe sind die Oligopeptidspektren dargestellt, die den Verlauf der Oligopeptide während der Inkubation wiedergeben. Weitere Oligopeptidspektren befinden sich im Anhang.

Oligopeptidspektren

Oligopeptidspektren der Samen des Genotypen SNK 13 und einer German Cocoa-Frucht

Die für die Analyse des Oligopeptidgehaltes im Verlauf der Inkubation verwendeten Samen der Inkubationsreihen SNK 13 und GcA-F3 wurden nach der Inkubation an der Sonne getrocknet.

Ein Vergleich der Peaks in den HPLC-Chromatogrammen vor und nach dem hydrolytischen Abbau der Oligopeptide zeigte, dass es sich bei den meisten Substanzen um Oligopeptide handelte, da sie nach dem hydrolytischen Abbau nicht mehr vorhanden waren. Die meisten Oligopeptide wurden nach einer Retentionszeit von 20 bis 50 min detektiert.

Die frischen, getrockneten Samen enthielten einen geringen Gehalt an Oligopeptiden. Dieser war höher als in den frischen, direkt gefriergetrockneten Samen (siehe Kapitel 4.1.3.2). Dies liegt vermutlich daran, dass während des Trocknungsprozesses die Zellkompartimentierung zerstört wurde, so dass in der ersten Phase der Trocknung ein proteolytischer Abbau der Proteine stattfand.

Ab dem zweiten Tag der Inkubation nahm der Oligopeptidgehalt der Samen des Genotypen SNK 13 parallel mit der Abnahme des pH-Wertes und dem Abbau der Speicherproteine stark zu. Der höchste Oligopeptidgehalt wurde am zweiten Tag der Inkubation festgestellt. Am dritten und vierten Tag war der Gehalt wieder etwas geringer.

Auch in den Samen des German Cocoas stieg der Oligopeptidgehalt im Verlauf der Inkubation an. Schon nach dem ersten Tag der Inkubation war ein leichter Anstieg des Oligopeptidgehaltes nachweisbar. Im Verlauf der weiteren Inkubation stieg der Oligopeptidgehalt sehr stark an, so dass die Samen nach einer viertägigen Inkubation sehr hohe Oligopeptidgehalte enthielten.

Der Anstieg des Oligopeptidegehaltes lässt einen Abbau der Proteine in dieser Phase der Inkubation erkennen. Dieser Proteinabbau erfolgte erst nach der verstärkten Ansäuerung der Kotyledonen durch das Eindringen von Essigsäure im Verlauf der Inkubation. Da die proteinabbauenden Enzyme ihr Optimum im sauren pH-Bereich haben, wird ihre Spaltaktivität durch die Ansäuerung der Kotyledonen erhöht.

Die Endkonzentration der Oligopeptide fermentierter Samen ist um etwa 55 % höher als die Oligopeptidkonzentration vor der Fermentation (HASHIM *et al.*, 1998).

Bei der Substanz, welche in allen Proben nach einer Retentionszeit von 22 bis 23 min auftrat, handelte es sich vermutlich nicht um ein Oligopeptid, da diese Substanz auch in den Chromatogrammen nach dem hydrolytischen Abbau der Oligopeptide noch vorhanden war. In allen Hydrolysaten wurde bei einer Retentionszeit von etwa 18 bis 19 min eine Substanz festgestellt, die in den Oligopeptidspektren vor dem hydrolytischen Abbau nicht vorhanden war. Es handelte sich hierbei wahrscheinlich um eine Substanz, die erst durch den hydrolytischen Abbau gebildet wurde.

Oligopeptidspektren nach der Hydrolyse

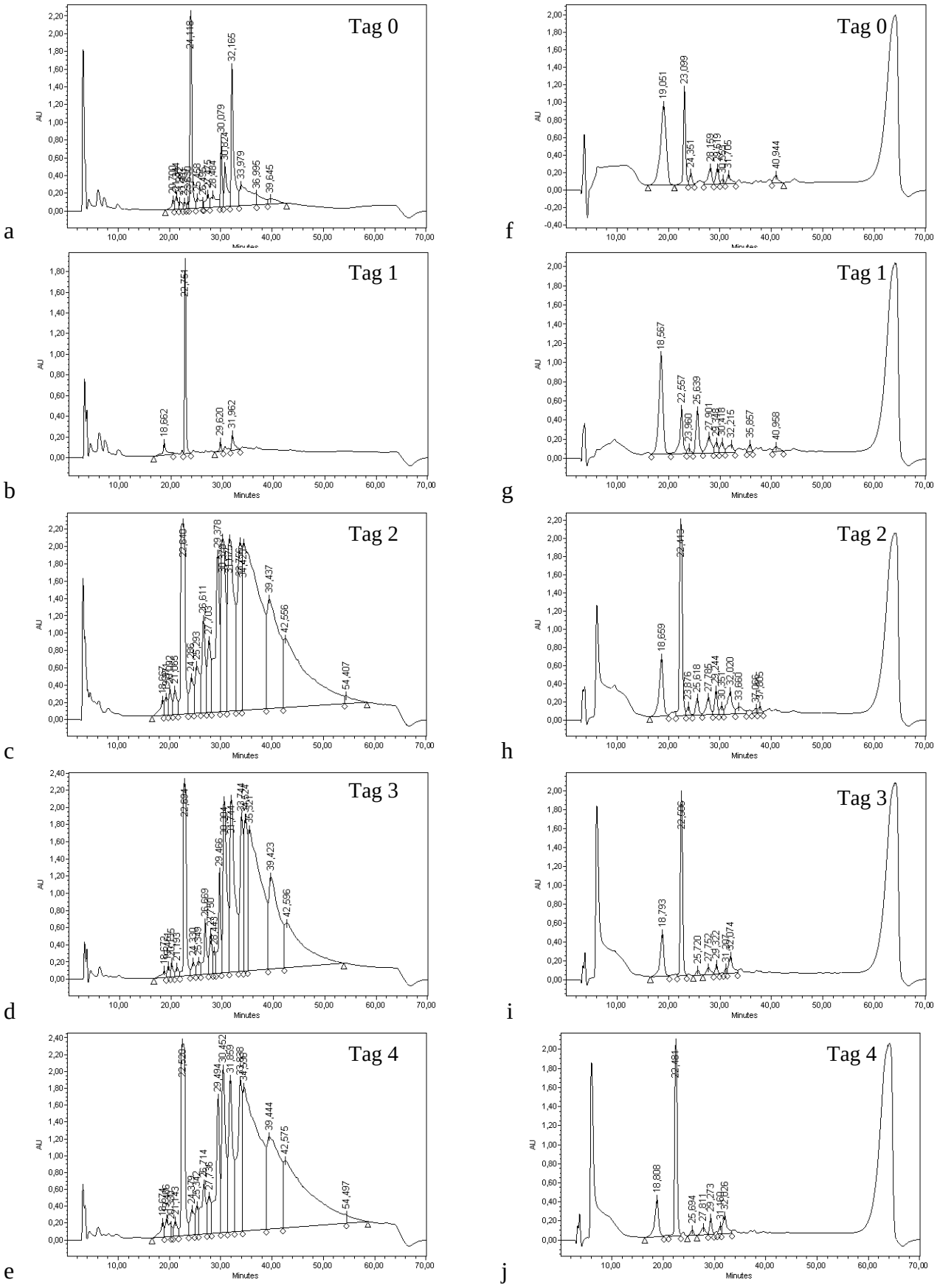
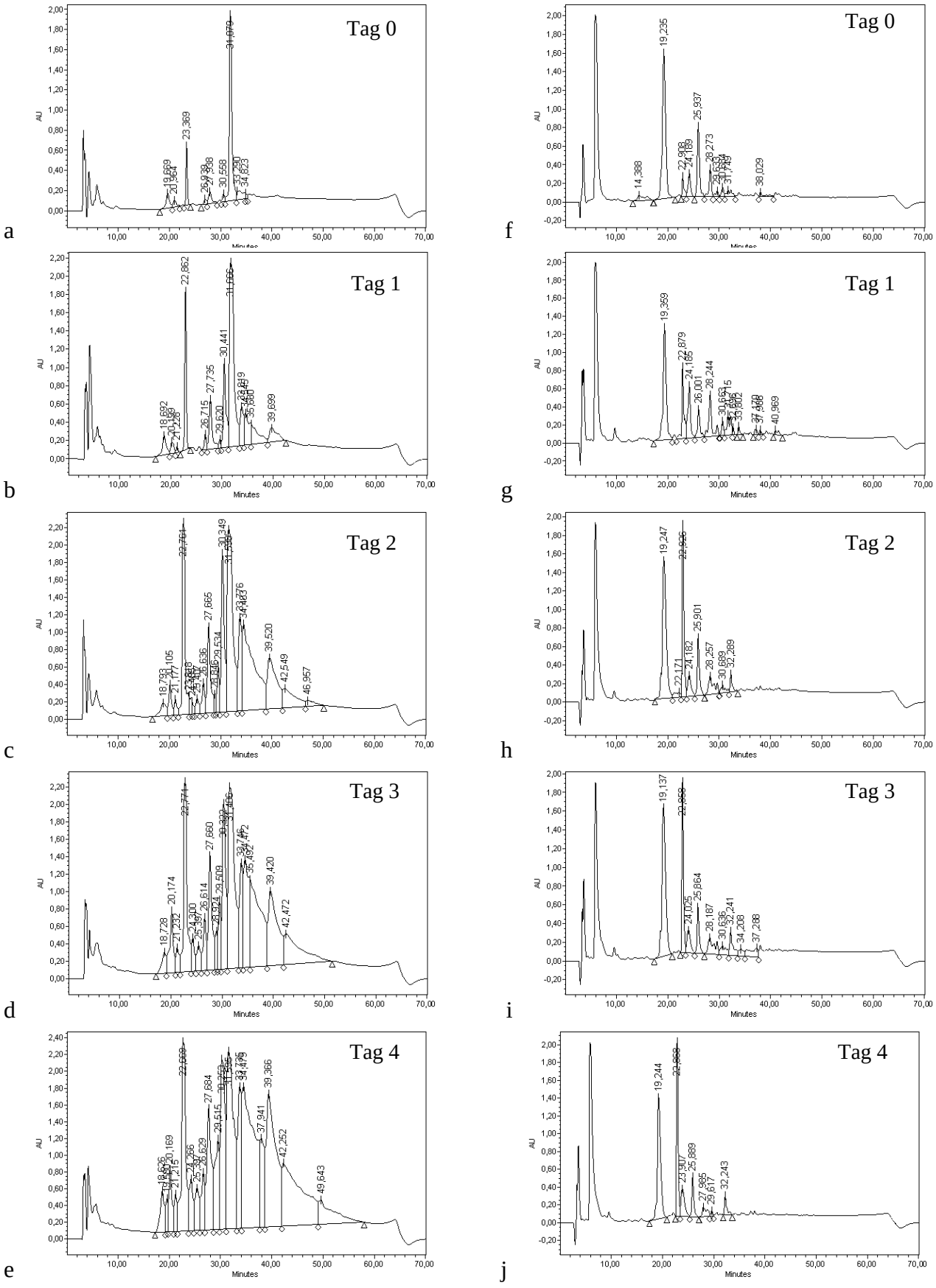


Abbildung 134 a - j: Oligopeptidspektren der Samen des Genotypen SNK 13 (SNK 13-F1).
a) - e) Tag 0 bis Tag 4 der Inkubation; f) - j) nach der Hydrolyse.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet.

Oligopeptidspektren nach der Hydrolyse



a f b g c h d i e j

Abbildung 135 a - j: Oligopeptidspektren von German Cocoa-Samen (GcA-F3).
a) - e) Tag 0 bis Tag 4 der Inkubation; f) - j) nach der Hydrolyse.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet.

Aminosäurenzusammensetzung der Oligopeptide

Aminosäurezusammensetzung der Oligopeptide der Samen des Genotypen SNK 13 und der Samen einer German Cocoa-Frucht

Die Hydrolysate der frischen, nach der Entnahme aus der Frucht an der Sonne getrockneten Samen enthielten im Gegensatz zu direkt nach der Entnahme aus der Frucht gefriergetrockneten Samen (siehe Abbildung 43) nur sehr geringe Gehalte an Aminosäuren. Dies liegt vermutlich an Vergerbungsreaktionen, die während der Trocknung der Samen erfolgen.

Der Gesamtgehalt an Aminosäuren in den Hydrolysaten der Oligopeptide in den direkt nach der Entnahme aus der Frucht getrockneten Samen betrug 1,4 bzw. 5,6 mg/g Acteontrockenpulver. Im Verlauf der Inkubation stieg der Oligopeptidgehalt an, so dass die Hydrolysate der Oligopeptide der Samen nach drei- bzw. viertägiger Inkubation und anschließender Trocknung Gesamtgehalte an Aminosäuren von 14,8 bis 15,6 mg/g Acetontrockenpulver erreichten.

Zu Beginn der Inkubation lag der Anteil der hydrophoben Aminosäuren zwischen 35 und 41 % des Gesamtgehaltes der Aminosäuren, und der Anteil der sauren Aminosäuren und deren Säureamiden lag zwischen 38 und 45 %. Die Oligopeptide setzten sich demnach zu gleichen Anteilen aus hydrophoben und sauren Aminosäuren und deren Säureamiden zusammen. Im Verlauf der Inkubation hat sich dieses Verhältnis von hydrophoben zu sauren Aminosäuren und deren Säureamiden verändert. Nach viertägiger Inkubation lag der Gehalt der hydrophoben Aminosäuren nur noch zwischen ca. 27 und 34 %. Der Gehalt an sauren Aminosäuren und deren Säureamiden stieg dagegen auf über 50 % an. Vor allem der Anteil der beiden sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure nahm im Verlauf der Inkubation in den Oligopeptiden zu.

Oligopeptide entstehen während der Inkubation durch die hydrolytische Spaltung der Speicherproteine des Kakaosamens durch die spezifische Tätigkeit der Aspartylendoprotease. Diese spaltet die Proteine in den Bereichen der hydrophoben Aminosäuren, so dass Oligopeptide mit hydrophoben Enden entstehen. Anschließend spaltet eine Carboxypeptidase die hydrophoben Aminosäuren von den Oligopeptiden ab. Durch diese Vorgänge lässt sich die Abnahme des Gehaltes der hydrophoben Aminosäuren am Gesamtgehalt der Aminosäuren der Oligopeptide im Verlauf der Inkubation und die Zunahme des prozentualen Anteils der sauren Aminosäuren und deren Säureamiden erklären. Die hydrophoben Aminosäuren werden demnach im Verlauf der Inkubation durch die spezifische Aktivität der Proteasen freigesetzt, so dass hydrophile Oligopeptide mit einem hohen Anteil an sauren Aminosäuren und deren Säureamiden und einem geringen Anteil an hydrophoben Aminosäuren entstehen.

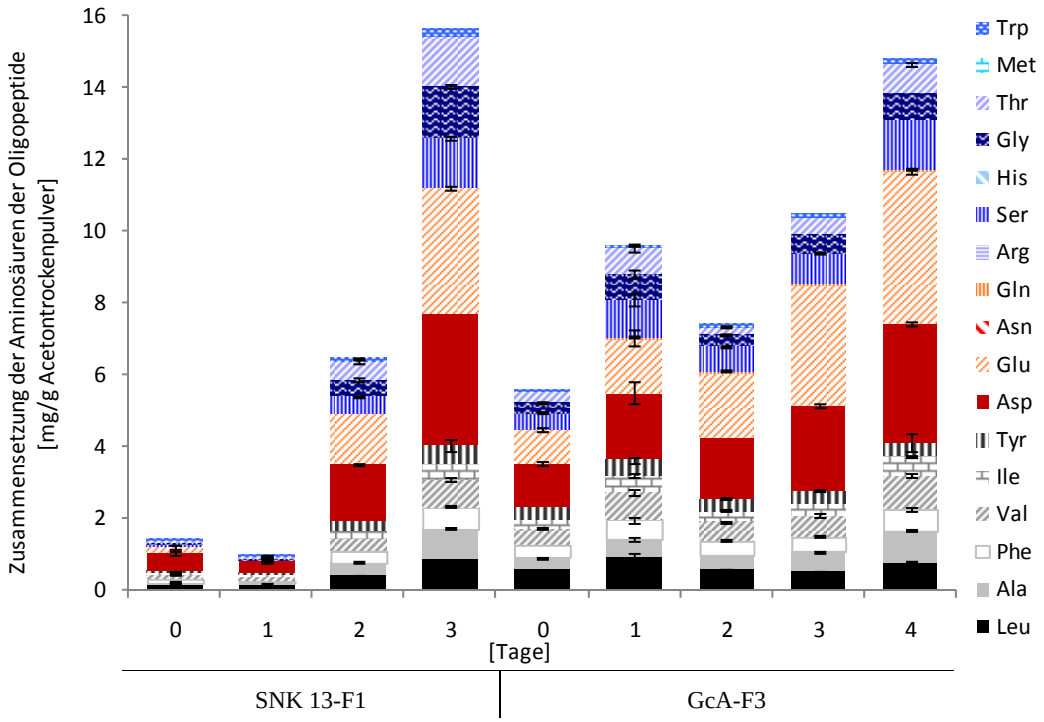


Abbildung 136: Gehalte der einzelnen Aminosäuren der Oligopeptide der Samen des Genotypen SNK 13 und der Samen einer German Cocoa-Frucht im Verlauf der Inkubation.
Hydrophobe Aminosäuren sind in schwarz/grau, saure in rot und andere in blau dargestellt.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.2.3.3 Freie Aminosäuren

Reife, unfermentierte Kakaosamen enthalten nur einen geringen Gehalt an freien Aminosäuren. Erst im Verlauf der Inkubation steigt der Gehalt durch die proteolytische Aktivität der sameneigenen Proteasen an, so dass hydrophobe Aminosäuren durch die spezifische Aktivität der Carboxypeptidase freigesetzt werden (BYTOF *et al.*, 1995). Dadurch entstehen hydrophile Oligopeptide und hydrophobe Aminosäuren. Die hydrophoben Aminosäuren Leucin, Alanin, Phenylalanin und Tyrosin sind von besonderer Bedeutung, da es sich bei ihnen um Schlüsselkomponenten für die Bildung des Kakaoaromas handelt (VOIGT *et al.*, 1994; HASHIM *et al.*, 1998).

Während der Inkubation nahm, wie in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben, der pH-Wert der Kotyledonen ab. In diesem sauren pH-Bereich haben die sameneigenen Proteasen, welche für den Abbau der Speicherproteine verantwortlich sind, ihr Optimum.

Freie Aminosäuren in den Samen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad

Die frischen Kakaosamen enthielten zwischen 5 und 9 mg/g ffTM freie Aminosäuren. Ab dem 2. Tag der Inkubation stieg der Gehalt an, so dass die Samen nach dreitägiger Inkubation 14 bis 19 mg/g ffTM freie Aminosäuren enthielten. Der höchste Anstieg wurde nach zweitägiger Inkubation festgestellt. Zu diesem Zeitpunkt war der pH-Wert in den Kotyledonen durch die eindringende Essigsäure auf 5,5 gesunken (siehe Kapitel 4.2.2.2).

In den Samen einiger Proben nahm der Aminosäuregehalt am Ende der Inkubation wieder etwas ab. Da die Inkubationen jedoch nur über einen Zeitraum von drei bis vier Tagen stattfanden, war eine Abnahme des Aminosäuregehaltes durch eine Vergerbung durch die freiwerdenden Polyphenole oder durch einen Austritt aus den Samen zumeist nicht feststellbar (KIRCHHOFF *et al.*, 1989a). Am Ende der Inkubation war der Aminosäuregehalt in den Samen um ein zwei- bis vierfaches höher als in den frischen Samen.

Im Verlauf der Inkubation nahm der Gehalt an sauren Aminosäuren und deren Säureamiden von einem Ausgangsgehalt zwischen 3,6 und 7,1 mg/g ffTM auf 2,5 bis 4,4 mg/g ffTM ab. Der Gehalt an hydrophoben Aminosäuren stieg dagegen im Verlauf der Inkubation von 0,8 bis 1,4 mg/g ffTM auf 7,2 bis 11,8 mg/g ffTM an. Die Zunahme der hydrophoben Aminosäuren ist durch die Spezifität der sameneigenen Proteasen zu erklären, durch deren Tätigkeit vor allem hydrophobe Aminosäuren freigesetzt werden (BYTOF *et al.*, 1995).

Die Zunahme der hydrophoben Aminosäuren im Verlauf der Inkubation führte zu einer Veränderung der Anteile von sauren und hydrophoben Aminosäuren am Gesamtgehalt der freien Aminosäuren. In den frischen Samen lag der Anteil an sauren Aminosäuren und deren Säureamiden je nach Probe zwischen 74 und 79 % des Gesamtgehaltes der freien Aminosäuren und war somit etwa drei- bis viermal höher als der Anteil an hydrophoben Aminosäuren von 15 bis 19 %. Nach der Inkubation war der Anteil an hydrophoben Aminosäuren dagegen mit 58 bis 63 % am Gesamtgehalt der freien Aminosäuren etwa drei- bis viermal höher als der Anteil an sauren Aminosäuren und deren Säureamiden mit 16 bis 22 %.

Die frischen, nicht inkubierten Samen enthielten hohe Gehalte an Asparagin, Asparaginsäure und Glutaminsäure, bei welchen es sich um saure Aminosäuren und deren Säureamide handelt (Abbildung 139a/b). Im Verlauf der Inkubation nahm vor allem der Gehalt an Asparaginsäure, aber auch der an Glutaminsäure ab.

Die Gehalt der hydrophoben Aminosäuren Leucin, Alanin, Phenylalanin und Tyrosin hat im Verlauf der Inkubation stark zugenommen.

Tabelle 8: Gehalte einzelner hydrophober Aminosäuren in den Samen der Genotypengruppe WAA vor und nach der Inkubation [mg/g ffTM].

	Frische Samen	Inkubierte Samen
Leucin	0,05 – 0,11	1,52 – 3,37
Alanin	0,09 – 0,26	0,78 - 1,48
Phenylalanin	0,18 – 0,26	1,75 - 3,37
Tyrosin	0,16 – 0,62	1,07 – 1,65

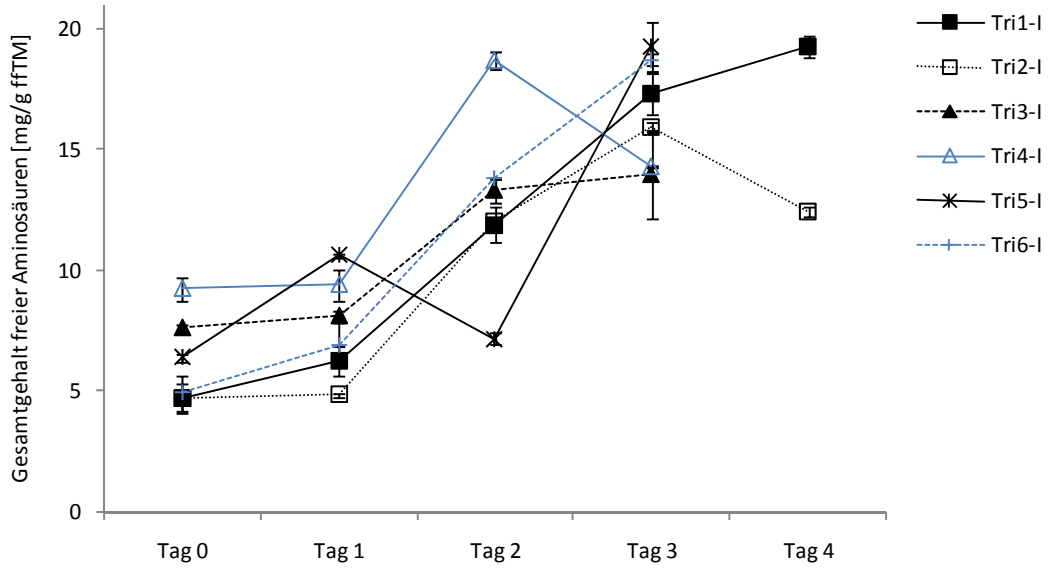


Abbildung 137 Gesamtgehalt an freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. In den Inkubationen Tri4-I und Tri6-I (blaue Linien) wurde die Testa der Samen durch Anritzen verletzt. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

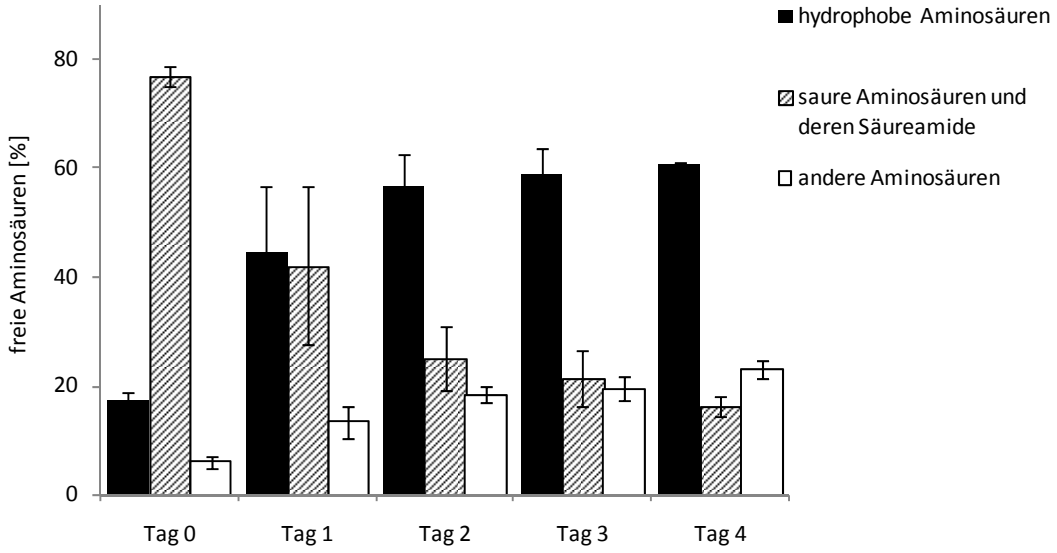


Abbildung 138: Mittelwert des prozentualen Gehaltes an hydrophoben und sauren freien Aminosäuren Säureamiden sowie an den anderen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

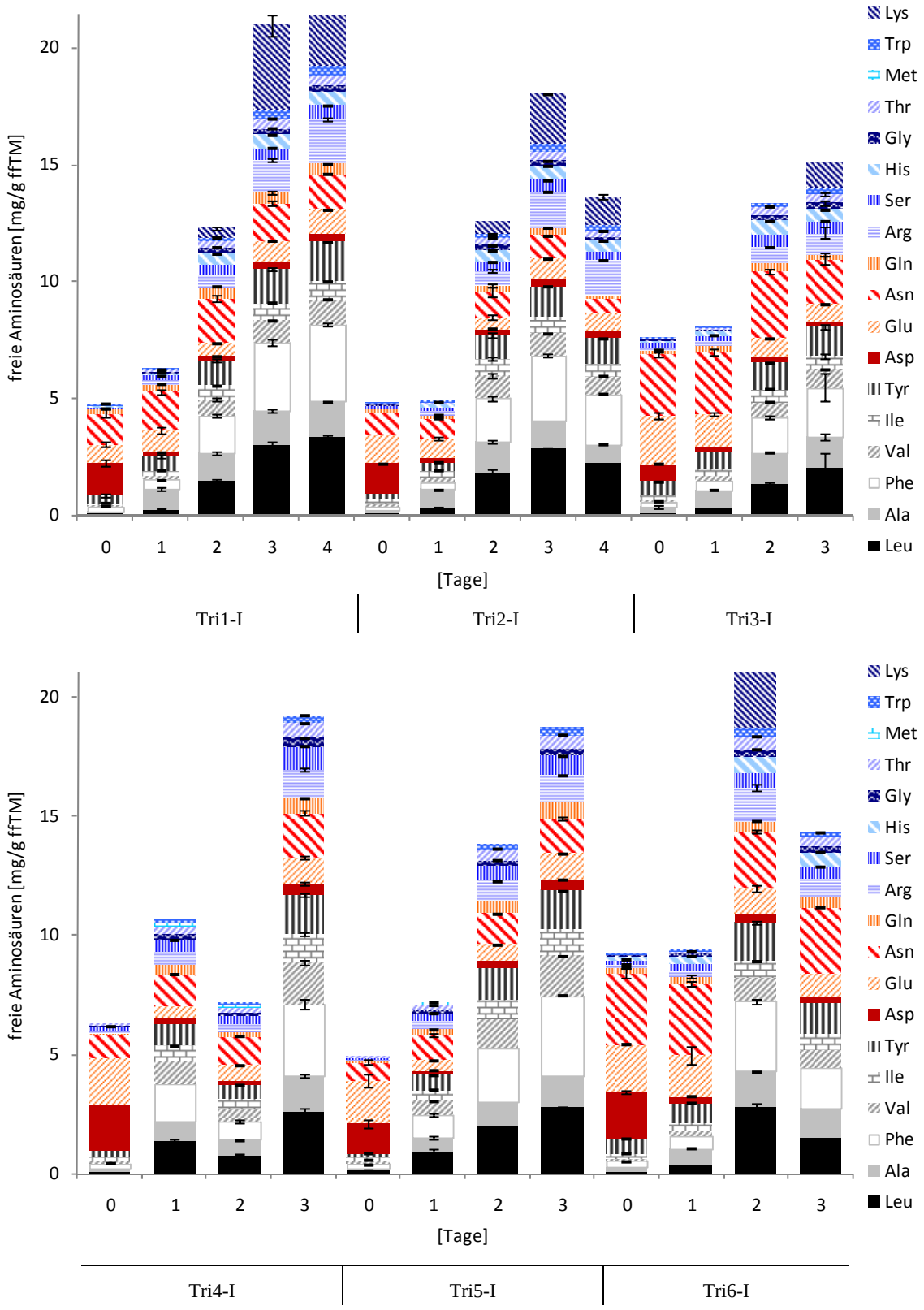


Abbildung 139a/b: Gehalt der einzelnen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation.
Hydrophobe Aminosäuren sind in schwarz/grau, saure in rot und andere in blau dargestellt.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. In den Inkubationen Tri4-I und Tri6-I wurde die Testa der Samen durch Anritzen verletzt. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Im Verlauf der Inkubation stieg der Aminosäuregehalt in den Inkubationsmedien an (Abbildung 140). In den Inkubationsmedien der Samen mit angeritzter Testa stieg der Aminosäuregehalt parallel zum Anstieg des Gehaltes an freien Aminosäuren in den Samen an. Durch eine intakte Testa wurde der Austritt der freien Aminosäuren verzögert.

Die Inkubationsmedien, in denen Samen mit intakter Testa inkubiert wurden, wiesen nach dreitägiger Inkubation, nach dem Erhöhen der Inkubationstemperatur auf 50°C, die höchste Zunahme an freien Aminosäuren auf. In dem Medium, in dem Samen mit angeritzter Testa inkubiert wurden, erfolgte schon nach zweitägiger Inkubation ein Anstieg der freien Aminosäuren auf 4,1 mg/g Samen. Die Medien mit Samen mit intakter Testa enthielten zu diesem Zeitpunkt 1,0 bis 1,5 mg/g Samen an freien Aminosäuren. Nach dreitägiger Inkubation stieg der Gehalt an freien Aminosäuren in den Medien mit Samen mit intakter Testa auf 5,4 bis 9,8 mg/g Samen und in den Medien der Samen mit angeritzter Testa auf 16,2 mg/g Samen an.

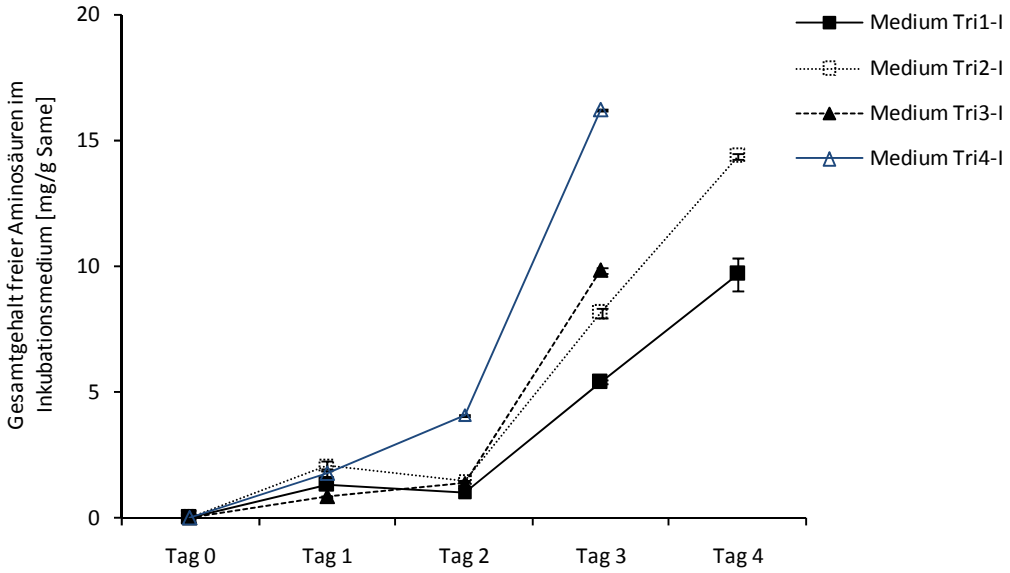


Abbildung 140: Aminosäuregehalte in Inkubationsmedien im Verlauf der Inkubationen. Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. Bei der Inkubation Tri4-I (blaue Linie) wurde die Testa der Samen durch Anritzen verletzt. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Freie Aminosäuren in den Samen von unterschiedlichen, definierten Genotypen

Die für die folgenden Untersuchungen verwendeten Samen wurden nach der Inkubation zunächst an der Sonne getrocknet, bevor sie gefriergetrocknet wurden. Durch die Trocknung veränderte sich die Zusammensetzung der freien Aminosäuren. Dies ist am Vergleich des Gehaltes an freien Aminosäuren der frischen, getrockneten Samen dieser Genotypen mit den frischen, ungetrockneten Samen dieser Genotypen (siehe Kapitel 4.1.3.1) erkennbar.

In den nach der Probennahme an der Sonne getrockneten Samen war der Alaningehalt etwa 4- bis 7-mal und der Threoningehalt etwa 3-mal höher als in den direkt nach der Probennahme eingefrorenen und gefriergetrockneten Samen. Dagegen war der Asparaginsäuregehalt in den direkt nach der Probennahme eingefrorenen und gefriergetrockneten Samen der Genotypen SNK 13 und T 79/501 etwa 6- bis 9-mal und in den des Genotypen ICS 40 sogar über 80-mal

höher als in den an der Sonne getrockneten Samen. Bei den getrockneten Samen des Genotypen ICS 40 wurde daher ein geringerer Gesamtgehalt an freien Aminosäuren gefunden als bei den direkt nach der Probennahme gefriergetrockneten Samen, welche einen Anteil von 84 % an Asparaginsäure am Gesamtgehalt der freien Aminosäuren aufwiesen.

In den nach der Inkubation an der Sonne getrockneten Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501 lag der Asparaginsäuregehalt zwischen 0,15 und 0,17 mg/g ffTM. Die direkt nach der Probennahme eingefrorenen Samen der Genotypen SNK 13 und T 79/501 enthielten 1,10 bis 1,38 mg/g ffTM und die Samen des Genotypen ICS 40 11,62 bis 14,02 mg/g ffTM Asparaginsäure (siehe Kapitel 4.1.3.1). Da in den Samen zu Beginn der Trocknung vor dem Absterben noch Stoffwechselprozesse ablaufen, wird Asparaginsäure offensichtlich unter Wasserstress schnell abgebaut und vermutlich durch Desaminierung unter anderem zu Oxalessigsäure umgewandelt, welche im Citratcyklus abgebaut wird.

Die frischen Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501 enthielten zwischen 4,7 und 5,0 mg/g ffTM freie Aminosäuren. Im Verlauf der Inkubation stieg der Gehalt an, so dass die Samen nach viertägiger Inkubation zwischen 14,1 und 20,2 mg/g ffTM freie Aminosäuren enthielten.

Zu Beginn der Inkubation enthielten die getrockneten Samen 29 bis 37 % hydrophobe und 39 bis 55 % saure Aminosäuren und deren Säureamide. Nach viertägiger Inkubation hat sich dieses Verhältnis durch die spezifische Aktivität der sameneigenen Proteasen verändert, so dass die Samen nur noch 14 bis 16 % saure Aminosäuren und deren Säureamide und 48 bis 50 % hydrophobe Aminosäuren enthielten (Abbildung 142).

Die frischen, aber getrockneten Samen enthielten einen hohen Gehalt an Glutaminsäure. Die Gehalte an Asparagin und Asparaginsäure waren gering (Abbildung 143).

Der Gehalt an hydrophoben Aminosäuren, der vor der Inkubation sehr gering war, nahm im Verlauf der Inkubation zu. Besonders stark stiegen die Leucin- und Phenylalaningehalte an.

Tabelle 9: Gehalte einzelner hydrophober Aminosäuren in den Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501 vor und nach der Inkubation [mg/g ffTM].

	Frische Samen	Inkubierte Samen
Leucin	0,17 – 0,20	2,01 – 3,45
Alanin	0,46 – 0,53	0,91 – 1,50
Phenylalanin	0,25 – 0,27	1,74 - 2,78
Tyrosin	0,11 – 0,43	0,99 – 1,13

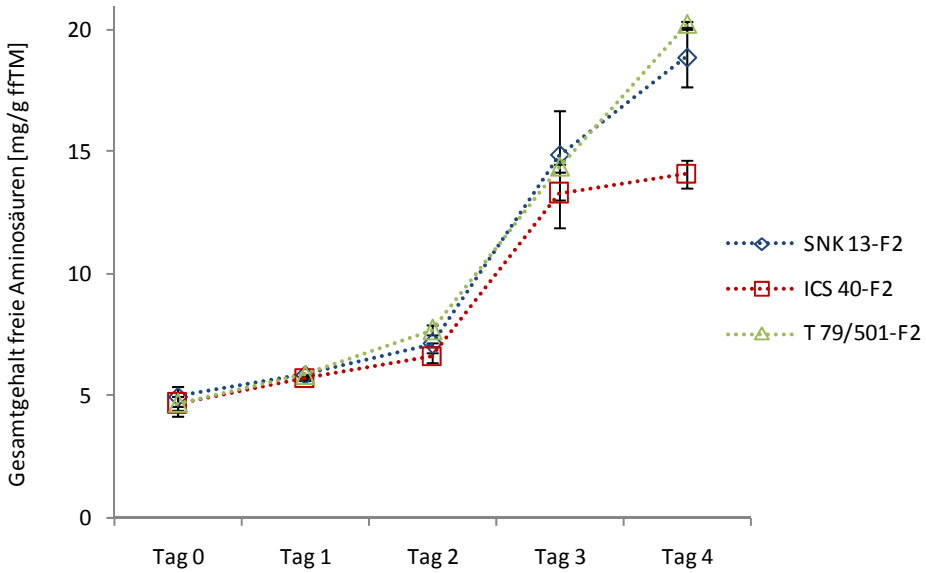


Abbildung 141: Gesamtgehalt an freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

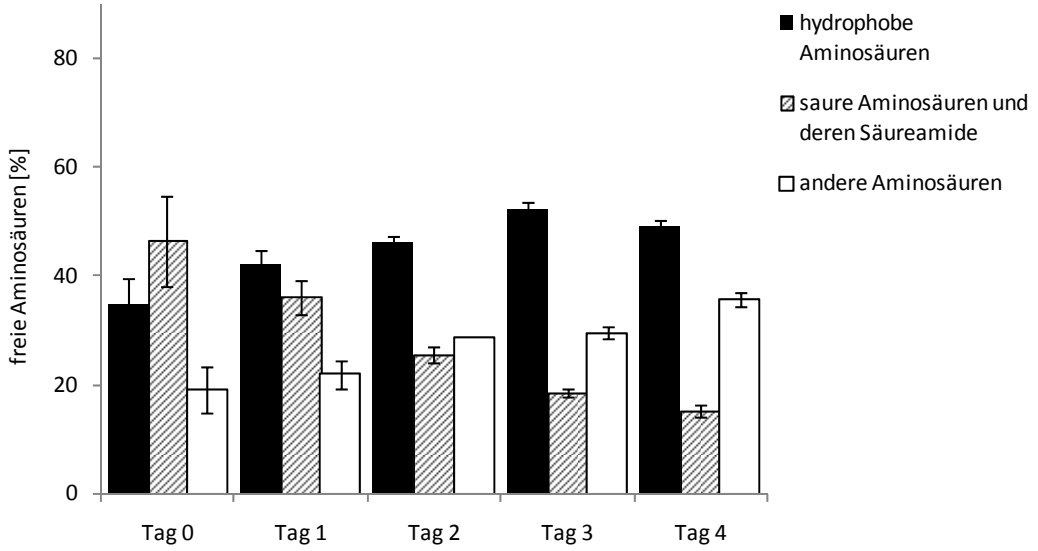


Abbildung 142: Mittelwert des prozentualen Gehaltes an hydrophoben und sauren freien Aminosäuren und deren Säureamiden sowie an den anderen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

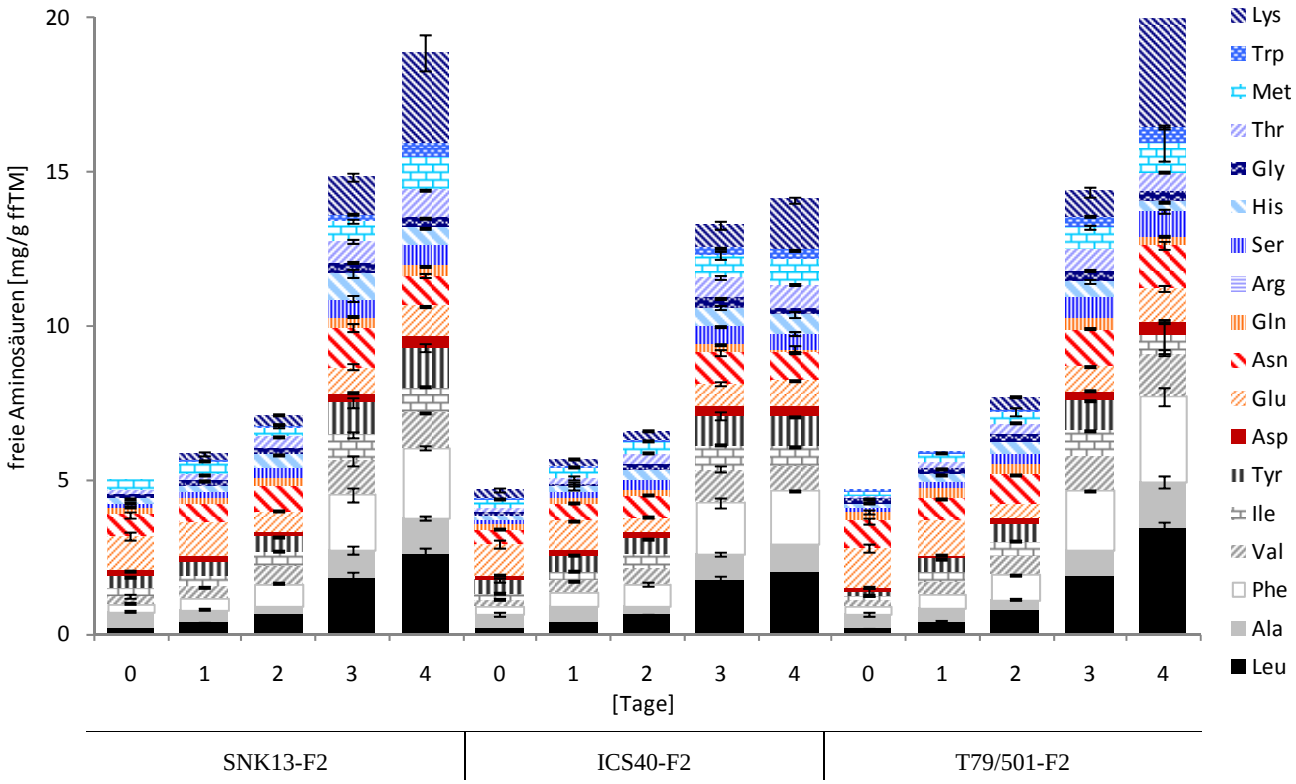


Abbildung 143: Gehalt der einzelnen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation
Hydrophobe Aminosäuren sind in schwarz/grau, saure in rot und andere in blau dargestellt. Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Freie Aminosäuren in den Samen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten

Die frischen Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6 wiesen höhere Asparaginsäuregehalte von 0,76 und 1,65 mg/g ffTM auf als die nach der Inkubation sonnengetrockneten Samen des German Cocoas, welche zwischen 0,11 und 1,18 mg/g ffTM Asparaginsäure enthielten (Abbildung 147a/b und Kapitel 4.1.3.1).

Im Verlauf der Inkubation stieg der Gehalt an freien Aminosäuren in den Samen des German Cocoas von 3,7 bis 5,8 mg/g ffTM zu Beginn der Inkubation auf 13,6 bis 20,8 mg/g ffTM nach viertägiger Inkubation an. Die Zunahme der freien Aminosäuren erfolgte ab dem zweiten Tag der Inkubation parallel mit der Abnahme des pH-Wertes der Kotyledonen.

Die frischen, aber an der Sonne getrockneten Samen enthielten einen Anteil von 36 bis 48 % an hydrophoben und 41 bis 49 % an sauren Aminosäuren und deren Säureamiden am Gesamtgehalt der freien Aminosäuren (Abbildung 145). In den frischen, direkt nach der Inkubation gefriergetrockneten Samen lag der Anteil der hydrophoben Aminosäuren zwischen 20 und 26 % und der der sauren Aminosäuren und deren Säureamiden zwischen 69 und 74 % (GcA-F5, GcA-F6, Abbildung 146).

Nach viertägiger Inkubation enthielten sowohl die nach der Inkubation getrockneten, als auch die direkt gefriergetrockneten Samen einen Anteil von 50 bis 61 % an hydrophoben und 13 bis 16 % an sauren Aminosäuren und deren Säureamiden.

Im Verlauf der Inkubation stiegen vor allem die Gehalte der hydrophoben Aminosäuren Leucin und Phenylalanin stark an (Abbildung 147a/b).

Tabelle 10: Gehalte einzelner hydrophober Aminosäuren in den Samen des German Cocoas vor und nach der Inkubation [mg/g ffTM].

	Frische Samen	Inkubierte Samen
Leucin	0,07 – 0,20	1,82 – 3,56
Alanin	0,06 – 0,82	0,92 – 1,56
Phenylalanin	0,14 – 0,32	1,81 - 3,05
Tyrosin	0,19 – 0,59	1,14 – 1,35

Die frischen, getrockneten Samen des Catongo enthielten einen vergleichsweise hohen Gehalt an freien Aminosäuren von 8,6 mg/g ffTM, der im Verlauf einer viertägigen Inkubation auf 18,3 mg/g ffTM anstieg (siehe Abbildung 148).

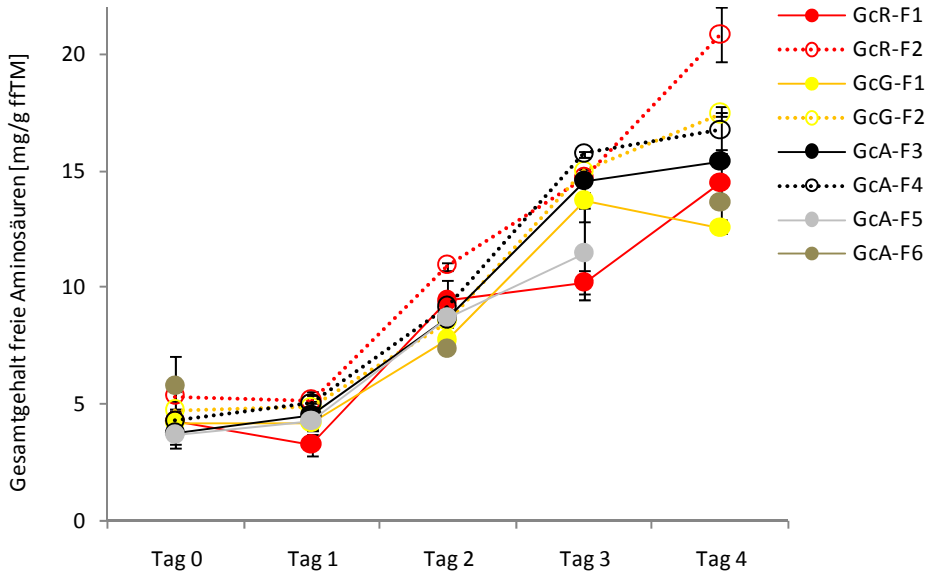


Abbildung 144: Gesamtgehalt an freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet (außer den Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6). Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

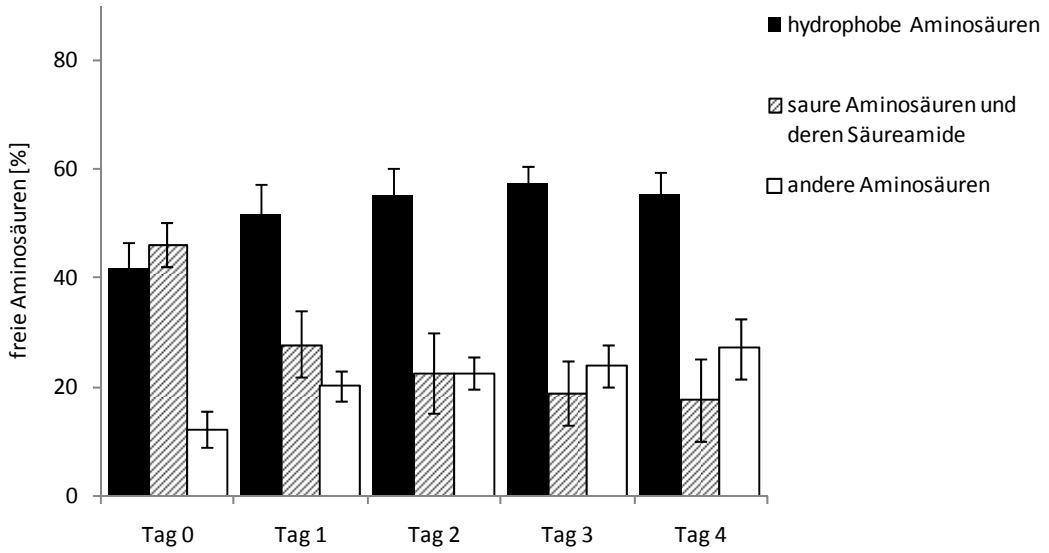


Abbildung 145: Mittelwert des prozentualen Gehaltes an hydrophoben und sauren freien Aminosäuren und deren Säureamiden sowie an den anderen freien Aminosäuren in sonnengetrockneten und entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

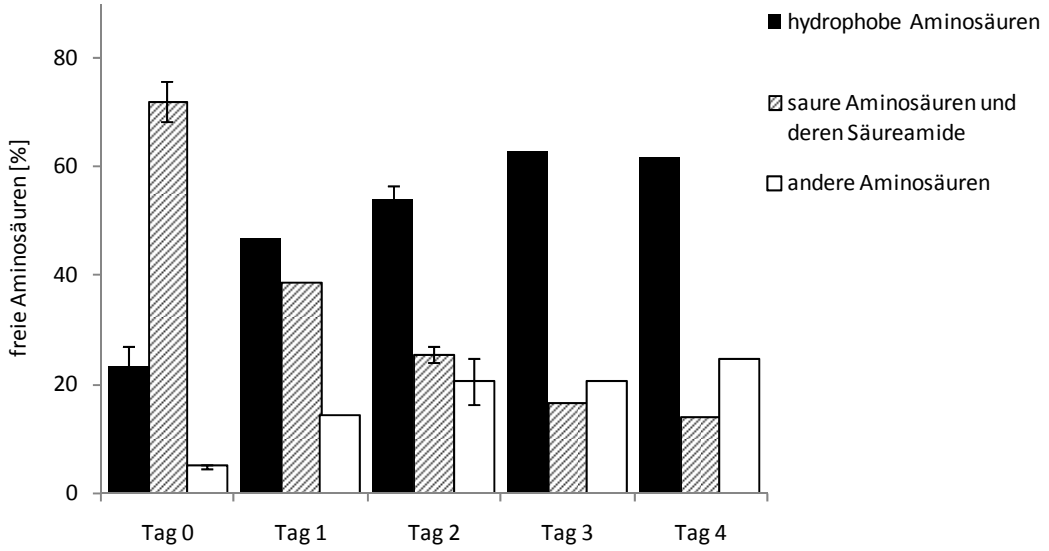


Abbildung 146: Mittelwert des prozentualen Gehaltes an hydrophoben und sauren freien Aminosäuren und deren Säureamiden sowie an den anderen freien Aminosäuren in direkt gefriergetrockneten und entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

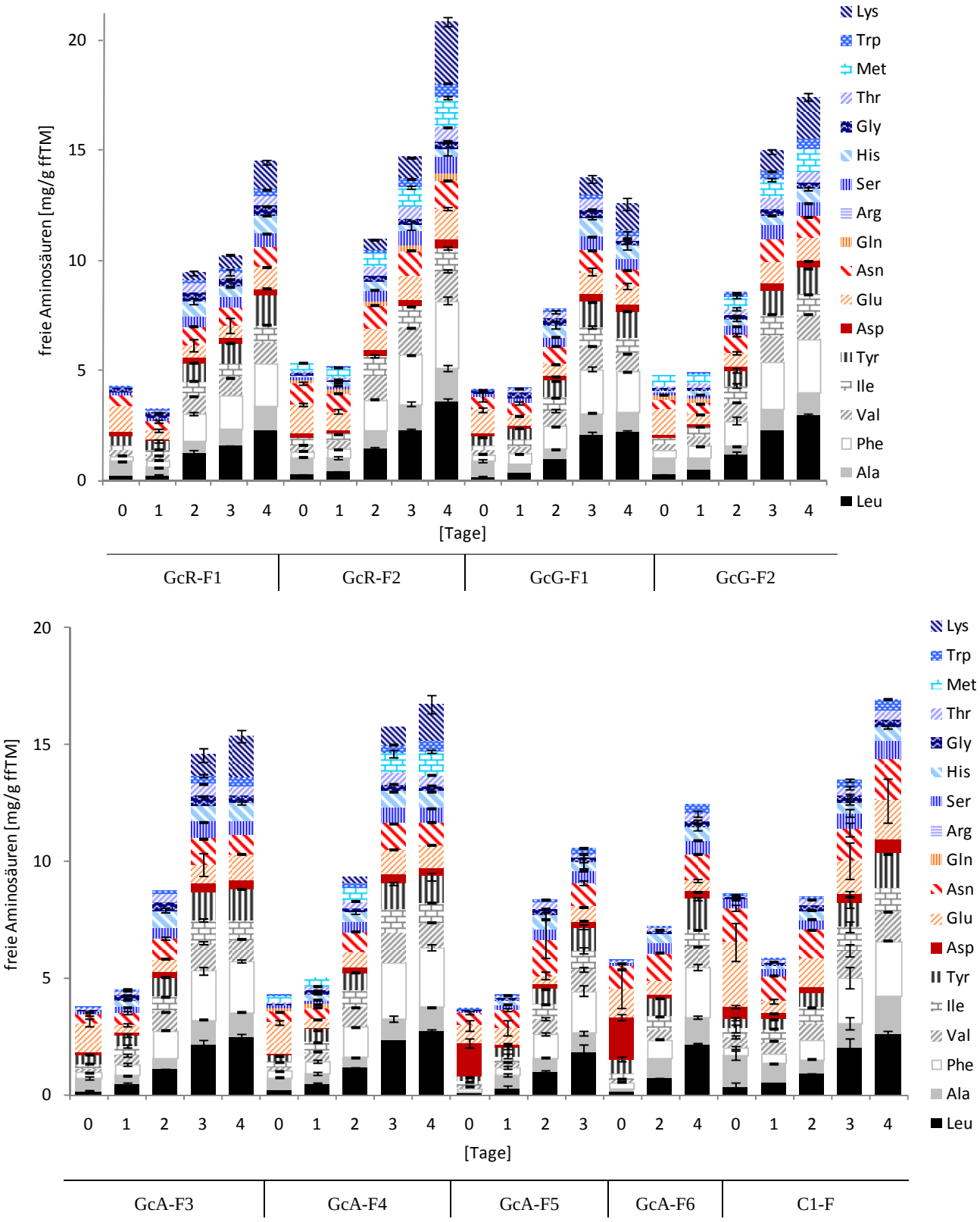


Abbildung 147a/b: Gehalt der einzelnen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation
Hydrophobe Aminosäuren sind in schwarz/grau, saure in rot und andere in blau dargestellt. Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet (außer den Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6). Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

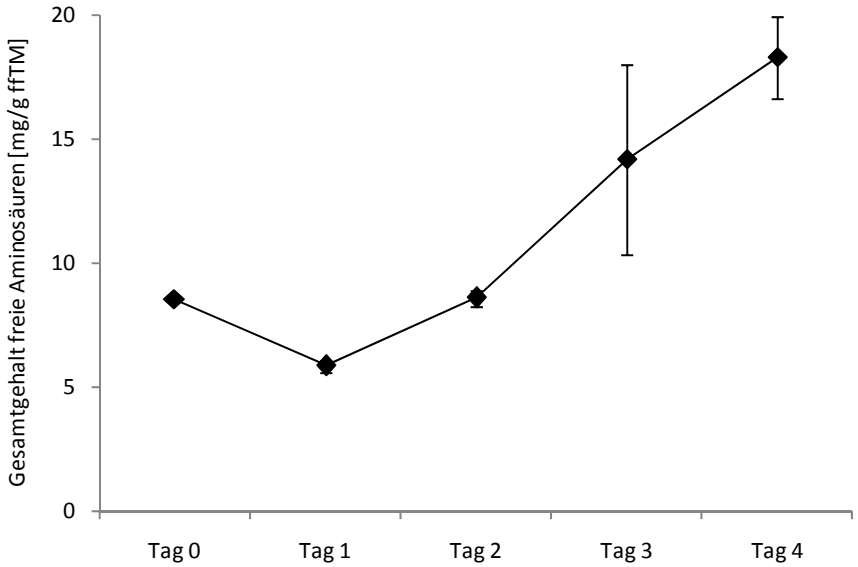


Abbildung 148: Gesamtgehalt an freien Aminosäuren in entfetteten Samen von Catongo-Früchten im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.2.3.4 γ-Aminobuttersäure

Die Bildung von γ-Aminobuttersäure wird unter anderem durch einen Anstieg des H^+-Gehaltes im Cytosol der Zellen stimuliert (BOWN und SHELP, 1997). Die Reaktion wird von dem im Cytosol lokalisierten Enzym Glutamatdecarboxylase katalysiert, welches sein pH-Optimum bei 5,8 hat (STREETER und THOMPSON, 1972b).

γ-Aminobuttersäuregehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad

In den ersten zwei Tagen der Inkubation, an denen die Inkubation bei 30°C bzw. 40°C stattfand, stieg der γ-Aminobuttersäuregehalt, parallel zur Abnahme des pH-Wertes in den Kotyledonen an, wobei der Anstieg in den ersten 24 Stunden am höchsten war. Der γ-Aminobuttersäuregehalt war nach 24-stündiger Inkubation etwa 2- bis 6-mal so hoch wie vor der Inkubation. In den Samen einer Inkubationsreihe (Tri5-I) wurde sogar ein Anstieg des γ-Aminobuttersäuregehaltes um das 22-fache festgestellt.

Durch den Anstieg des Gehaltes an freien Aminosäuren in den Kotyledonen, welche eine Pufferwirkung auf die Ansäuerung haben, verlangsamte sich die Abnahme des pH-Wertes im Verlauf der Inkubation. Parallel dazu wurde ab dem zweiten Tag der Inkubation eine Verlangsamung der γ-Aminobuttersäurebildung festgestellt, welche mit der Pufferwirkung der freien Aminosäuren zusammenhängen kann.

Mit dem Erhöhen der Temperatur nach 48 Stunden auf 50°C und dem damit verbundenen Absterben der Samen nahm der γ-Aminobuttersäuregehalt wieder etwas ab.

Die frischen Samen enthielten 0,12 bis 0,54 mg/g ffTM γ-Aminobuttersäure. Innerhalb der ersten 2 Tage der Inkubation stiegen die Gehalte auf 1,74 bis 2,73 mg/g ffTM an. Diese Zunahme des γ-Aminobuttersäuregehaltes kann mit der zunehmenden Ansäuerung der Samen zusammenhängen.

Ab dem zweiten Tag der Inkubation nahm der γ-Aminobuttersäuregehalt in den Samen der meisten Inkubationsreihen wieder ab, so dass die Samen am vierten Tag 0,48 bis 1,21 mg/g ffTM γ-Aminobuttersäure enthielten.

Die Abnahme beruht auch auf dem Austritt der γ-Aminobuttersäure aus den Samen in das Inkubationsmedium (Abbildung 150). Dieser wurde erst nach dem zweiten Tag der Inkubation, mit dem Absterben der Samen und der damit verbundenen Aufhebung der Zellkompartimentierung, festgestellt. Bei den mit angeritzter Testa inkubierten Samen war zu diesem Zeitpunkt bereits erheblich mehr Substanz in das Medium übergetreten.

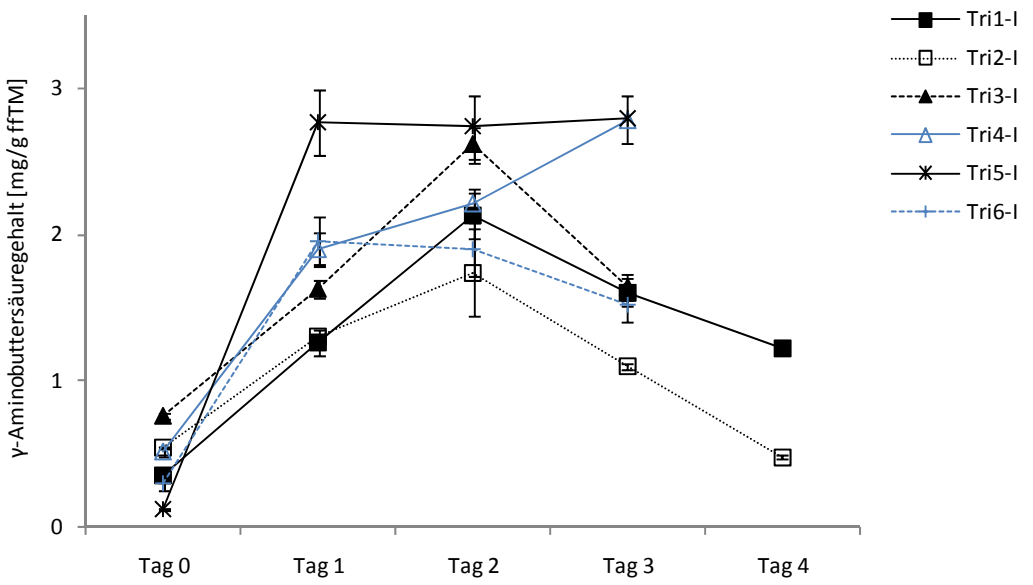


Abbildung 149: γ-Aminobuttersäuregehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. In den Inkubationen Tri4-I und Tri6-I (blaue Linien) wurde die Testa der Samen durch Anritzen verletzt. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

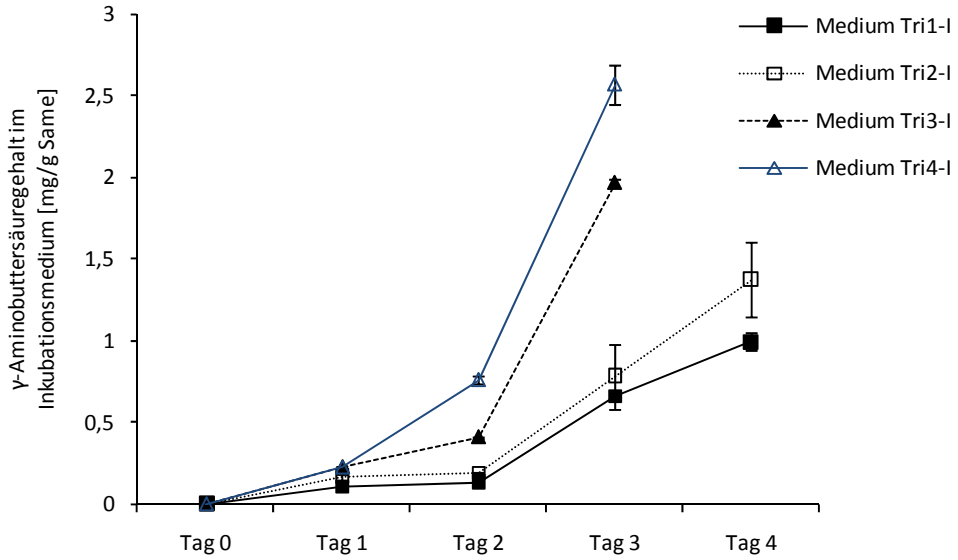


Abbildung 150: Zunahme des γ-Aminobuttersäuregehaltes in einigen Inkubationsmedien im Verlauf der Inkubationen.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. Bei der Inkubation Tri4-I (blaue Linie) wurde die Testa der Samen durch Anritzen verletzt.

γ-Aminobuttersäuregehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

Die für die folgenden Untersuchungen verwendeten Samen wurden nach der Inkubation an der Sonne getrocknet, bevor sie gefriergetrocknet wurden.

Die frischen, aber getrockneten Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501 enthielten höhere γ-Aminobuttersäuregehalte von 0,68 bis 1,70 mg/g ffTM als die Samen derselben Genotypen, welche direkt nach der Entnahme aus der Frucht gefriergetrockneten wurden. Diese enthielten 0,17 und 0,55 mg/g ffTM γ-Aminobuttersäure (siehe Kapitel 4.1.3.4). Dies zeigt, dass die Trocknung zu einem Anstieg der γ-Aminobuttersäure geführt hat.

Zudem wurde ein Anstieg des γ-Aminobuttersäuregehaltes in den Samen während der Lagerung in geernteten, aber geschlossenen Früchten festgestellt. Am zweiten Tag nach der Ernte aus den Früchten entnommene und getrocknete Samen enthielten 0,68 bis 0,85 mg/g ffTM γ-Aminobuttersäure; am fünften Tag waren es 1,06 bis 1,70 mg/g ffTM γ-Aminobuttersäure (Tabelle 11).

In Abbildung 151 sind die Verläufe des γ-Aminobuttersäuregehaltes während der Inkubation von Samen, welche 5 Tagen nach der Ernte aus den Früchten entnommenen wurden, dargestellt.

Tabelle 11: γ-Aminobuttersäuregehalt in frischen, getrockneten Kakaosamen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501, welche 2 bzw. 5 Tage nach der Ernte aus den Früchten der unterschiedlichen Genotypen entnommen wurden.

	2 Tage nach der Ernte	5 Tage nach der Ernte
	[mg/g ffTM]	
SNK 13	0,85	1,42
ICS 40	0,68	1,70
T 79/501	0,71	1,06

Vermutlich durch den durch die Trocknung bedingten erhöhten Ausgangsgehalt scheint der anschließende Anstieg der γ-Aminobuttersäure langsamer zu verlaufen als in den nicht getrockneten Samen.

Nach zweitägiger Inkubation und Trocknung enthielten die Samen etwa genauso viel γ-Aminobuttersäure (1,86 bis 2,57 mg/g ffTM) wie die nicht getrockneten Samen (1,74 bis 2,73 mg/g ffTM, s. o.).

In den Samen dieser Inkubationsreihen stieg der γ-Aminobuttersäuregehalt bis zum dritten Tag der Inkubation auf 2,36 bis 2,66 mg/g ffTM an und war damit etwa doppelt so hoch wie zu Beginn der Inkubation. Erst mit dem Erhöhen der Inkubationstemperatur auf 50°C nach 72 Stunden nahm der Gehalt wieder ab, so dass die Samen 1,66 bis 2,51 mg/g ffTM γ-Aminobuttersäure enthielten. Die Abnahme erfolgte vermutlich erst später als in den oben beschriebenen Inkubationsversuchen, da die Inkubationstemperatur erst nach 72 Stunden auf 50°C erhöht wurde. Die Abnahme des γ-Aminobuttersäuregehaltes scheint daher mit dem

Temperaturanstieg auf 50°C und dem damit verbundenen Absterben der Samen in Zusammenhang zu stehen. Zudem wurde erst nach diesem Zeitpunkt ein Anstieg des γ-Aminobuttersäuregehaltes in den Inkubationsmedien nachgewiesen (Abbildung 150).

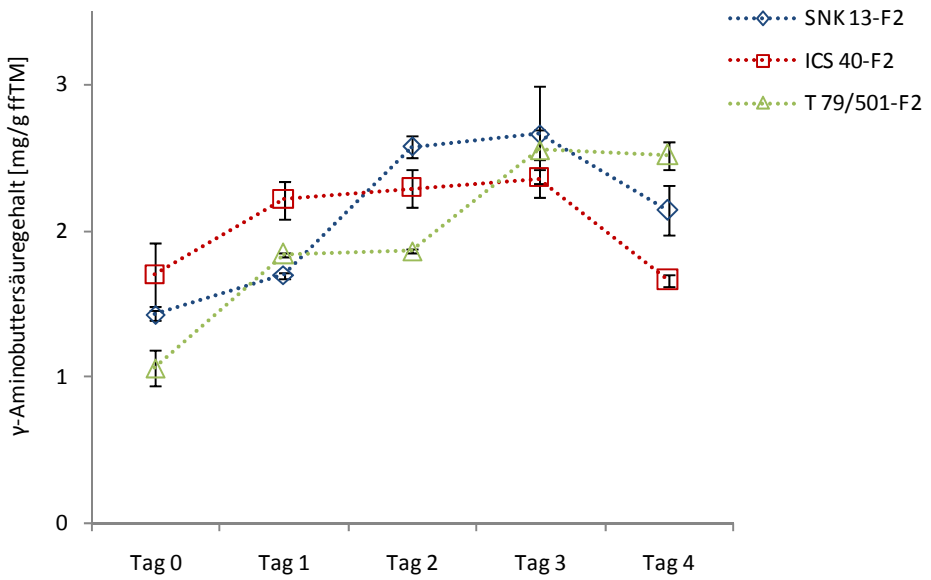


Abbildung 151: γ-Aminobuttersäuregehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

γ-Aminobuttersäuregehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

Die frischen German Cocoa-Samen, welche für die Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6 verwendet wurden, enthielten nur Spuren an γ-Aminobuttersäure.

Die frischen, getrockneten Samen enthielten dagegen 0,50 bis 1,03 mg/g ffTM γ-Aminobuttersäure (die frischen, aber ungetrockneten Samen derselben Proben enthielten 0,18 bis 0,48 mg/g ffTM γ-Aminobuttersäure, siehe Kapitel 4.1.3.4).

Parallel zur Abnahme des pH-Wertes stieg der γ-Aminobuttersäuregehalt in den ersten zwei Tagen der Inkubation auf 1,52 bis 3,07 mg/g ffTM an, wobei die nach der Inkubation getrockneten Samen höhere Gehalte aufwiesen (1,81 bis 3,07 mg/g ffTM) als die ungetrockneten Samen (1,52 bis 1,67 mg/g ffTM). Dies zeigt, dass die Glutamatdecarboxylase, die für die Synthese der γ-Aminobuttersäure verantwortlich ist, während der Trocknung vermutlich noch aktiv war. Der höchste Anstieg wurde in den ersten 24 Stunden der Inkubation festgestellt.

Die nach der Inkubation getrockneten Samen enthielten nach 2 Tagen etwa 3- bis 4-mal höhere γ-Aminobuttersäuregehalte als vor der Inkubation. In den ungetrockneten Samen der Inkubationsreihe GcA-F5 wurde sogar ein Anstieg um das 18-fache des Ausgangsgehaltes gemessen.

Der Anstieg des γ-Aminobuttersäuregehaltes erfolgte in den Samen des German Cocoas schneller als in den Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501, obwohl die Abnahme der pH-Werte in den Kotyledonen ähnlich verlief.

Nach dem zweiten Tag der Inkubation nahm der γ-Aminobuttersäuregehalt wieder ab, obwohl die Inkubationstemperatur erst am dritten Tag auf 50°C erhöht wurde.

Am vierten Tag waren die γ-Aminobuttersäuregehalte auf 1,25 bis 2,09 mg/g ffTM gesunken. Zu diesem Zeitpunkt wurde kein Unterschied der Gehalte zwischen den nach der Inkubation an der Sonne getrockneten und den ungetrockneten Samen festgestellt. Dies zeigt, dass die Glutamatdecarboxylase nach dem Absterben der Samen während der Trocknung nicht mehr aktiv war.

Die Früchte, die für die Inkubationsreihen GcA-F3 und GcA-F4 verwendet wurden, stammten von den Bäumen derselben Plantage und wurden zeitgleich geerntet. Sie wurden nach optischen Merkmalen in „unreifere“ (GcA-F3) und „reifere“ (GcA-F4) Früchte eingeteilt (siehe Kapitel 3.1.2.2). Die sonnengetrockneten Samen der „reiferen“ Früchte enthielten einen etwas höheren Anfangsgehalt an γ-Aminobuttersäure (0,75 mg/g ffTM) als die getockneten Samen der „unreiferen“ Früchte (0,50 mg/g FFTM). In den „reiferen“ Samen verlief der Anstieg des γ-Aminobuttersäuregehaltes im Verlauf der Inkubation steiler und höher als in den „unreiferen“ Samen (Abbildung 152). Die γ-Aminobuttersäuregehalte sowohl von frischen Samen als auch der Anstieg im Verlauf der Inkubation können daher mit dem Reifegrad der Früchte zum Zeitpunkt der Ernte zusammenhängen.

In den übrigen parallel angesetzten Inkubationsreihen (GcR-F1/GcR-F2 und GcG-F1/GcG-F2) erfolgte keine Einteilung der Früchte nach Reifegraden.

Die frischen, getrockneten Samen des Catongos enthielten etwa 1,46 mg/g ffTM γ-Aminobuttersäure. Ungetrocknete Samen des Catongos enthielten dagegen nur 0,25 mg/g ffTM γ-Aminobuttersäure (siehe Kapitel 4.1.3.4).

Über den gesamten Verlauf der Inkubation stieg der γ-Aminobuttersäuregehalt an, so dass die Samen nach viertägiger Inkubation etwa 2,32 mg/g ffTM γ-Aminobuttersäure enthielten. Auch nach dem Erhöhen der Inkubationstemperatur auf 50°C war keine Abnahme des γ-Aminobuttersäuregehaltes feststellbar.

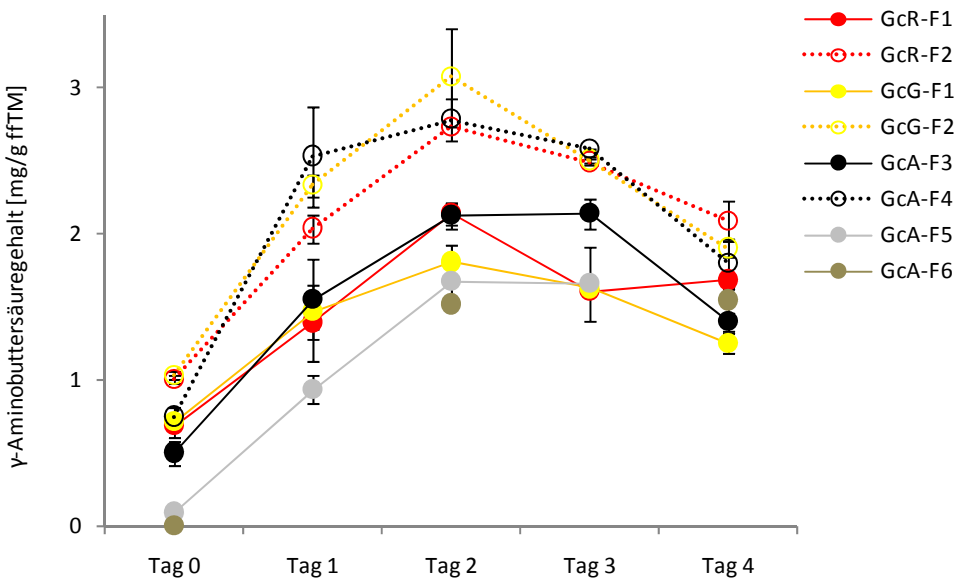


Abbildung 152: γ-Aminobuttersäuregehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet (außer den Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6). Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

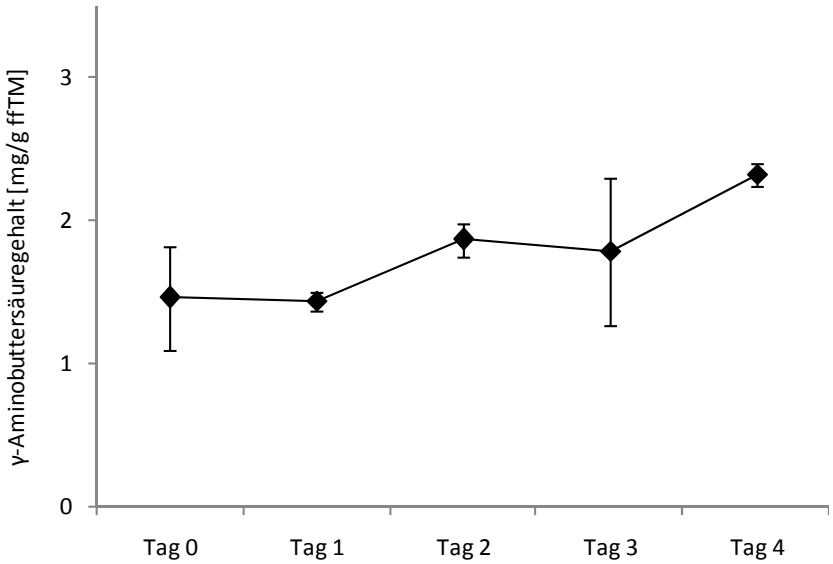


Abbildung 153: γ-Aminobuttersäuregehalt der entfetteten Samen von Catongo-Früchten im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.2.3.5 Zusammenfassung

Proteine

Parallel zur Abnahme des pH-Wertes wurde ab dem dritten Tag der Inkubation eine Abnahme des Gesamtgehaltes der Proteine festgestellt.

Vor allem nach dem Erhöhen der Temperatur auf 50°C nahm der Proteingehalt ab. Der Proteinabbau war auch an der Zunahme der Oligopeptide in den Samen erkennbar, bei denen es sich neben den freien Aminosäuren um die Abbauprodukte der Proteine handelt.

Auch die Auftrennung der Proteine mit Hilfe einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970) ließ einen Proteinabbau erkennen.

Die Globuline bei ca. 45,7, 31 und 16 kDa wurden ab dem dritten Tag der Inkubation abgebaut und waren nach dem vierten Tag kaum noch nachweisbar.

Auch die beiden Albumine bei ca. 19 und 13 kDa wurden ab dem dritten Tag der Inkubation abgebaut, jedoch weniger stark als die Globuline.

Oligopeptide

Frische, aber getrocknete Kakaosamen enthielten sehr wenig Oligopeptide. Erst im Verlauf der Inkubation stieg der Gehalt an Oligopeptiden nach dem ersten bis zweiten Tag stark an, so dass nach viertägiger Inkubation sehr hohe Gehalte an Oligopeptiden nachgewiesen wurden.

Im Verlauf der Inkubation wurde eine Zunahme des prozentualen Anteils der sauren Aminosäuren am Gesamtgehalt der Aminosäuren der Oligopeptide festgestellt. Der Anteil der sauren Aminosäuren und deren Säureamiden am Gesamtgehalt der Aminosäuren stieg von anfänglichen 38 bis 45 % auf einen Anteil von über 50 % an. Dies lässt auf die Tätigkeit der Carboxypeptidase schließen, welche die hydrophoben Aminosäuren von den Enden der Oligopeptide abspaltet, so dass Oligopeptide mit einem hohen Anteil an sauren Aminosäuren entstehen. Asparaginsäure und Glutaminsäure stellten den höchsten Anteil der Aminosäuren der Oligopeptide dar.

Freie Aminosäuren

Parallel zur Abnahme des Anteils an hydrophoben Aminosäuren in den Hydrolysaten der Oligopeptide stieg der Gehalt an freien hydrophoben Aminosäuren in den Samen an. Dieser Anstieg erfolgte parallel zu der Abnahme des pH-Wertes in den Kotyledonen, so dass zunehmend saure Bedingungen in den Kotyledonen vorlagen, in welchen die sameneigenen Proteasen ihr Aktivitätsoptimum haben (BIEHL und VOIGT, 1995).

Zu Beginn der Inkubation enthielten die Samen zwischen 3,7 und 9,2 mg/g ffTM an freien Aminosäuren. Der höchste Anstieg wurde am 2. und 3. Tag der Inkubation festgestellt. Nach drei- bis viertägiger Inkubation enthielten die Samen 13,6 bis 20,8 mg/g ffTM an freien Aminosäuren. In den Samen einiger Inkubationsreihen nahm der Aminosäuregehalt zum Ende der Inkubation wieder etwas ab.

In den untersuchten Inkubationsmedien stieg der Gehalt an freien Aminosäuren nach dem Erhöhen der Inkubationstemperatur auf 50°C stark an.

In den frischen, ungetrockneten Samen lag der Anteil der freien hydrophoben Aminosäuren am Gesamtgehalt zwischen 15 und 26 % und der der sauren Aminosäuren und deren Säureamiden zwischen 69 und 79 %. Die frischen, getrockneten Samen enthielten 29 bis 48 % hydrophobe und 39 bis 55 % saure Aminosäuren und deren Säureamide. Vor allem der Gehalt an Asparaginsäure war in den frischen, getrockneten Samen geringer als in den frischen, ungetrockneten Samen.

Im Verlauf der Inkubation nahm der Anteil der hydrophoben Aminosäuren am Gesamtgehalt der freien Aminosäuren zu, so dass die inkubierten Samen 48 bis 63 % hydrophobe und 13 bis 22 % saure Aminosäuren und deren Säureamide enthielten. In den inkubierten Samen wurde keine durch die Trocknung bedingte Veränderung der Zusammensetzung der freien Aminosäuren festgestellt.

Vor allem die Gehalte an Leucin- und Phenylalanin stiegen im Verlauf der Inkubation stark an, so dass mehr als das Zehnfache ihrer Ausgangsgehalte erreicht wurde.

γ-Aminobuttersäure

Frische, aber an der Sonne getrocknete Samen enthielten höhere γ-Aminobuttersäuregehalte (0,50 bis 1,70 mg/g ffTM) als direkt nach der Inkubation gefriergetrocknete Samen (0 bis 0,54 mg/g ffTM). γ-Aminobuttersäure wurde daher auch während des Trocknungsvorganges gebildet.

Während der Inkubation stieg der γ-Aminobuttersäuregehalt, parallel zur Abnahme des pH-Wertes der Kotyledonen, bis zum Erhöhen der Inkubationstemperatur auf 50°C an, wobei der Anstieg in den Samen der meisten Inkubationsreihen in den ersten 24 Stunden am höchsten war. Nach zweitägiger Inkubation war der γ-Aminobuttersäuregehalt etwa 2- bis 6-mal so hoch wie vor der Inkubation. In einigen Samen war er sogar noch höher. Die γ-Aminobuttersäuregehalte in den nach zweitägiger Inkubation getrockneten und direkt gefriergetrockneten Samen lagen in einem Bereich von 1,52 bis 3,07 mg/g ffTM, wobei die getrockneten Samen zum Teil etwas höhere γ-Aminobuttersäuregehalte enthielten. Dies zeigt, dass die Glutamatdecarboxylase nach zweitägiger Inkubation vermutlich noch aktiv war.

Die Synthese von γ-Aminobuttersäure wird vermutlich u. a. durch saure Bedingungen induziert (BOWN und SHELP, 1997), so dass ihr Anstieg im Verlauf der Inkubation mit der Ansäuerung der Kotyledonen durch das Eindringen von Essigsäure zusammenhängen kann.

Mit dem Absterben der Samen nach dem Erhöhen der Inkubationstemperatur auf 50°C kam die γ-Aminobuttersäurebildung zum Erliegen und nahm zum Ende der Inkubation wieder ab. Parallel zu dieser Abnahme stieg der γ-Aminobuttersäuregehalt in den Inkubationsmedien nach dem Erhöhen der Temperatur auf 50°C und der damit verbundenen Aufhebung der Zellkompartimentierung an.

4.2.4 Veränderung der Konzentration an phenolischen Substanzen in Kakaosamen im Verlauf einer fermentationsähnlichen Inkubation

In unfermentierten Samen werden die Polyphenole in den Vakuolen der Polyphenolspeicherzellen im Mesophyll der Kotyledonen gespeichert (BIEHL, 1973). Während der Fermentation werden sie nach der Aufhebung der Zellkompartimentierung frei.

Epicatechin und Catechin verursachen einen adstringierenden, bitteren Geschmack. Während der Fermentation und der Trocknung wird diese Adstringenz durch enzymatisch induzierte Oxidation der Flavonoide und die folgende Polymerisation vermindert (ZIEGLEDER und BIEHL, 1988).

4.2.4.1 Epicatechin

Epicatechingehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad

Die frischen, unfermentierten Kakaosamen enthielten 33 bis 39 mg/g ffTM Epicatechin. Nur die Samen einer Inkubationsreihe (Tri1-I) enthielten einen höheren Epicatechingehalt von 57 mg/g ffTM.

Im Verlauf der Inkubation nahmen die Epicatechingehalte ab, so dass die Samen nach drei- bis viertägiger Inkubation nur noch 13 und 22 mg/g ffTM Epicatechin enthielten. Dies entspricht 39 bis 45 % des Ausgangsgehaltes an Epicatechin. Die durchschnittliche Abnahme lag bei 42 % (± 4).

Die Abnahme wurde durch den Austritt des Epicatechins aus den Kotyledonen nach der Zerstörung der Zellstrukturen (siehe Abbildung 155) und durch Vergerbungsreaktionen in der zweiten Phase der Inkubation nach dem Sauerstoffeintritt bedingt.

Samen, welche mit angeritzter Testa inkubiert wurden, wiesen keine Unterschiede in der Abnahme des Epicatechingehaltes auf im Vergleich zu Samen, welche mit intakter Testa inkubiert wurden. Dies liegt vermutlich vor allem daran, dass viele der phenolischen Substanzen nach der Freisetzung aus den Speichervakuolen sehr schnell an Strukturen der Samen gebunden und auch in nicht sauren Bereichen der Gewebe oxidiert werden.

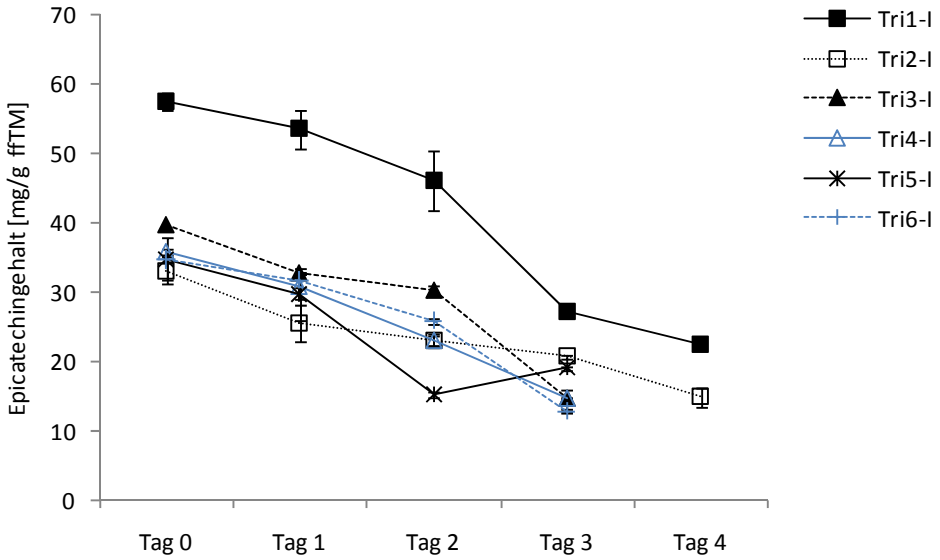


Abbildung 154: Epicatechingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. In den Inkubationen Tri4-I und Tri6-I (blaue Linien) wurde die Testa der Samen durch Anritzen verletzt. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Während der Inkubation trat ein Teil der phenolischen Substanzen aus den Kotyledonen in das umgebende Medium aus (Abbildung 155). Auffällig ist die schnelle Freisetzung nach dem Erhöhen der Temperatur auf 50°C und dem damit verbundenen Absterben der Samen und der Aufhebung der Zellkompartimentierung.

Die Abnahme des Polyphenolgehaltes in den Kotyledonen war jedoch höher als der Anstieg des Polyphenolgehaltes in den Inkubationsmedien. Neben dem Austritt der phenolischen Substanzen aus den Kotyledonen fanden Vergerbungsreaktionen statt, durch welche die Hauptabnahme des Polyphenolgehaltes erfolgte.

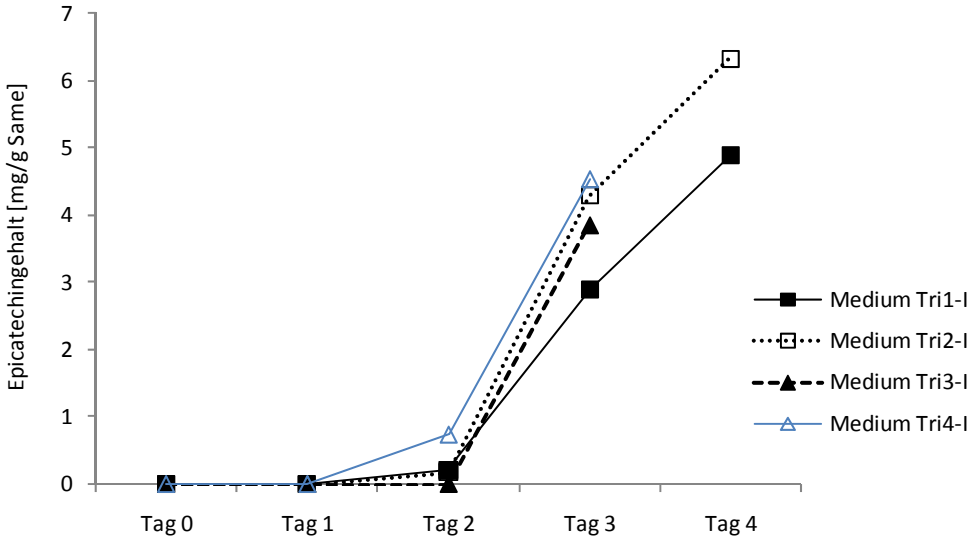


Abbildung 155: Epicatechingehalte in Inkubationsmedien im Verlauf der Inkubationen.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. Bei der Inkubation Tri4-I (blaue Linie) wurde die Testa der Samen durch Anritzen verletzt.

Epicatechingehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

Die für die folgenden Untersuchungen verwendeten Samen wurden nach der Inkubation an der Sonne getrocknet. Die frischen, aber getrockneten Samen enthielten ähnliche Epicatechingehalte wie die frischen ungetrockneten Samen aus Früchten derselben Genotypen (siehe Kapitel 4.1.4.1). In frischen Samen dieser Genotypen wurde keine durch die Trocknung bedingte Abnahme des Epicatechingehaltes festgestellt.

Die frischen, unfermentierten Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501 enthielten 33 bis 49 mg/g ffTM Epicatechin, wobei die Samen des Genotypen SNK 13 mit 33 bis 34 mg/g ffTM den niedrigsten Gehalt aufwiesen.

Im Verlauf der Inkubation nahm der Epicatechingehalt ab, so dass die Samen nach einer viertägigen Inkubation zwischen 7 und 19 mg/g ffTM Epicatechin enthielten. Dies entspricht 21 bis 54 % des Ausgangsgehaltes an Epicatechin. Die durchschnittliche Abnahme lag bei 35 % (± 13).

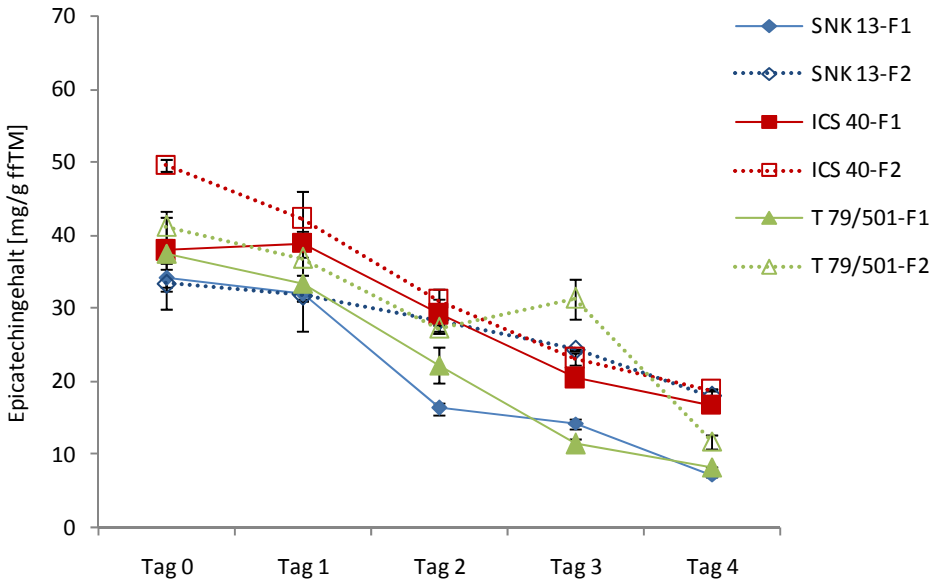


Abbildung 156: Epicatechingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Epicatechingehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

Die frischen, aber getrockneten Samen des German Cocoas enthielten zwischen 27 und 43 mg/g ffTM Epicatechin. In den frischen, ungetrockneten Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6 wurden höhere Epicatechingehalte von 59 und 62 mg/g ffTM nachgewiesen.

Im Verlauf der Inkubation nahm der Epicatechingehalt ab, so dass die Samen nach viertägiger Inkubation nur noch 5 bis 22 mg/g ffTM Epicatechin enthielten. Dies entspricht 17 bis 58 % des Ausgangsgehaltes an Epicatechin. In den Samen der meisten Inkubationsreihen nahm der Epicatechingehalt auf 22 bis 27 % des Anfangsgehaltes ab. Die durchschnittliche Abnahme in den getrockneten Samen lag bei 24 % (± 4). Da die Abnahme des Epicatechingehaltes in den getrockneten Samen höher war als in den ungetrockneten Samen (in der Inkubationsreihe GcA-F6 lag sie bei 37 % und in den Inkubationsreihen Tri1-I bis Tri6-I bei durchschnittlich 42 %, s.o.), besteht die Möglichkeit einer inkubationsbedingten veränderten Ausgangslage, bei der die phenolischen Substanzen während der Sonnentrocknung stärker in Mittleidenschaft gezogen werden.

Die frischen, aber getrockneten Samen des Catongos enthielten 28 mg/g ffTM Epicatechin. Im Gegensatz zu den Samen des German Cocoas, in welchen ab dem ersten Tag der Inkubation eine Abnahme des Epicatechins stattfand, nahm es in den Samen des Catongos erst ab dem dritten Tag der Inkubation ab. Nach viertägiger Inkubation enthielten die Samen nur noch 9 mg/g ffTM Epicatechin. Dies entspricht 32 % des Ausgangsgehaltes.

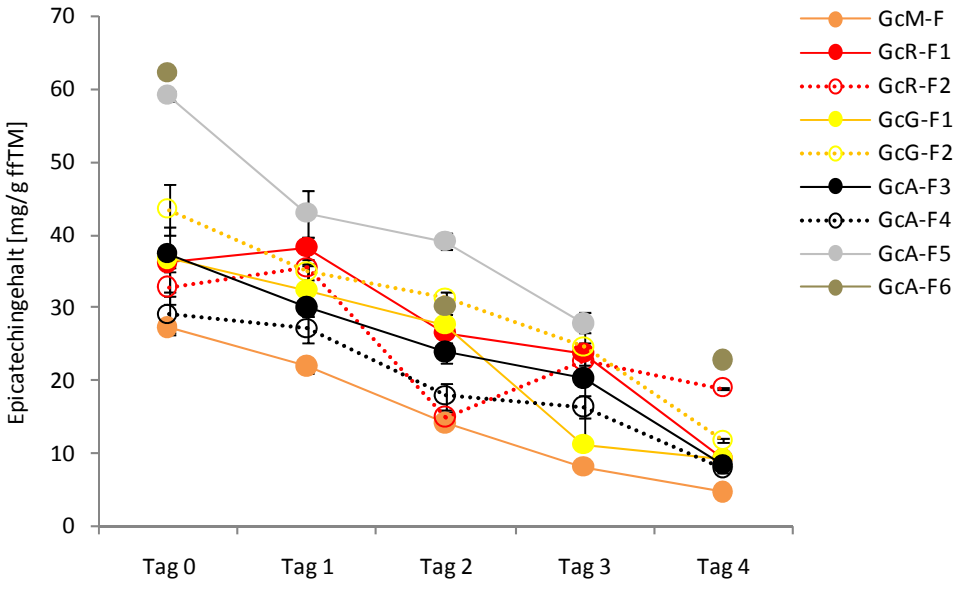


Abbildung 157: Epicatechingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf von Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet (außer den Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6). Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

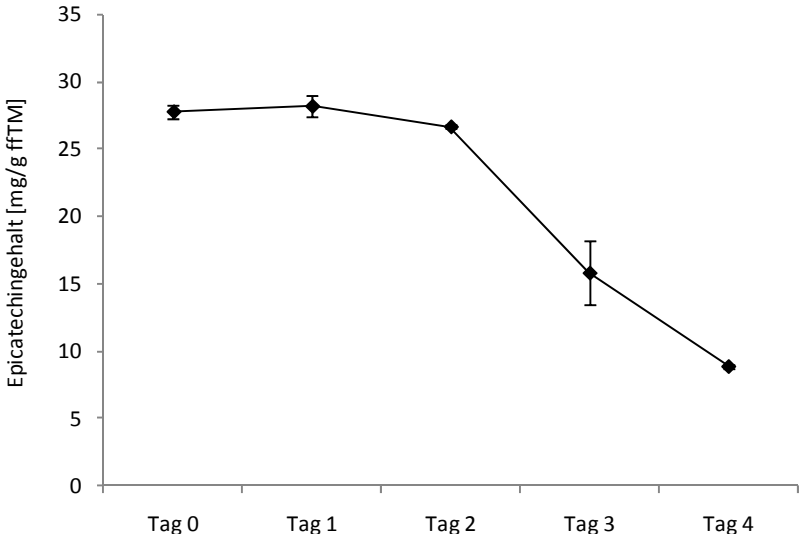


Abbildung 158: Epicatechingehalt der entfetteten Samen von Catongo-Früchten im Verlauf der Inkubation. Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.2.4.2 Catechin

Catechingehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad

Die frischen, unfermentierten Samen enthielten 0,4 bis 0,8 mg/g ffTM Catechin. Nach viertägiger Inkubation nahmen die Catechingehalte auf 0,3 bis 0,5 mg/g ffTM ab. Dies entspricht 46 bis 64 % des Ausgangsgehaltes an Catechin.

Samen, welche mit angeritzter Testa inkubiert wurden, wiesen keine Unterschiede in der Abnahme des Catechingehaltes auf im Vergleich zu den Samen, welche mit intakter Testa inkubiert wurden.

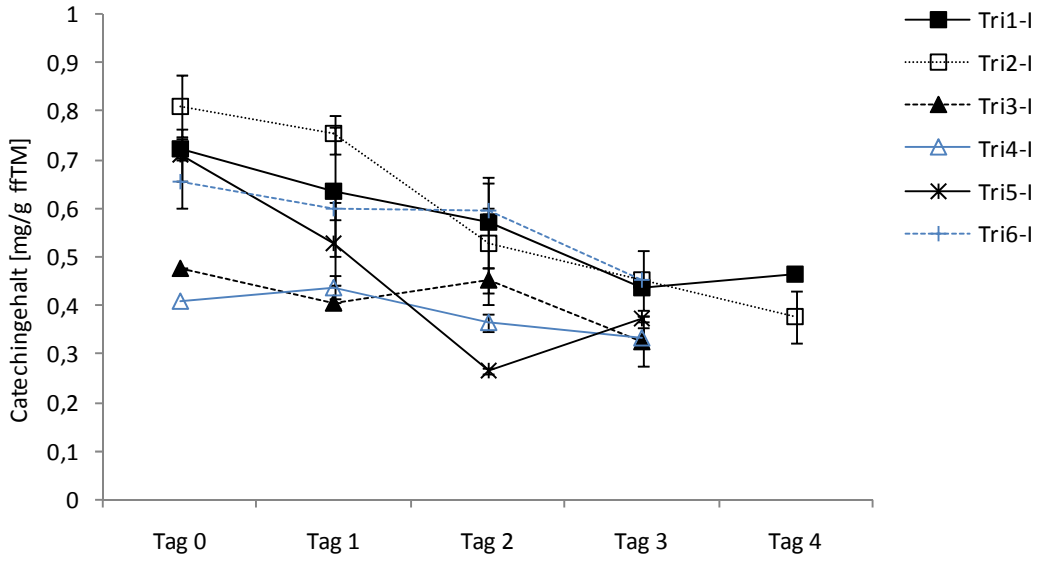


Abbildung 159: Catechingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. In den Inkubationen Tri4-I und Tri6-I (blaue Linien) wurde die Testa der Samen durch Anritzen verletzt. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Catechingehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

Die für die folgenden Untersuchungen verwendeten Samen wurden nach der Inkubation an der Sonne getrocknet. Die frischen, aber getrockneten Samen enthielten ähnliche Catechingehalte wie die frischen ungetrockneten Samen aus Früchten derselben Genotypen (siehe Kapitel 4.1.4.1).

In den frischen, getrockneten Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501 lagen die Catechingehalte in einem Bereich von 0,5 bis 1,2 mg/g ffTM. Die Samen des Genotypen SNK 13, welche den geringsten Epicatechingehalt enthielten, wiesen den höchsten Catechingehalt von 0,9 bis 1,2 mg/g ffTM auf.

Im Verlauf der Inkubation nahmen die Catechingehalte ab, so dass die Samen am vierten Tag nur noch 0,1 bis 0,6 mg/g ffTM Catechin enthielten. Dies entspricht einer Abnahme des Catechingehaltes auf 8 bis 73 % des Ausgangsgehaltes.

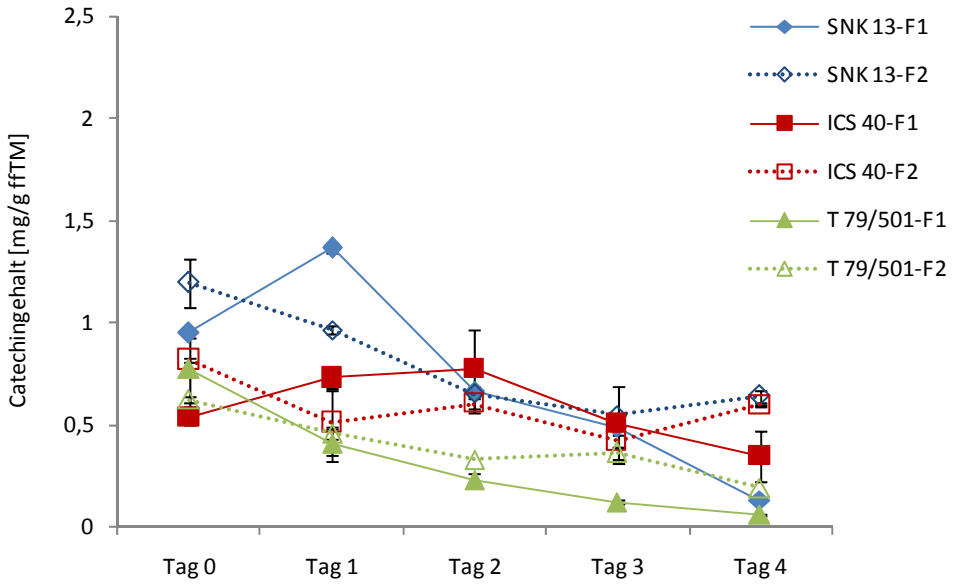


Abbildung 160: Catechingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Catechingehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

Die frischen, getrockneten Samen des German Cocoas enthielten zwischen 0,4 und 0,8 mg/g ffTM Catechin. In den frischen, ungetrockneten Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6 wurden höhere Catechingehalte von 1,3 und 1,9 mg/g ffTM nachgewiesen.

Nach viertägiger Inkubation sank der Catechingehalt auf 0,07 bis 0,6 mg/g ffTM. Dies entspricht einer Abnahme des Catechingehaltes auf 19 bis 68 % des Ausgangsgehaltes. In den Samen der meisten Inkubationsreihen nahm der Gehalt auf 26 bis 41 % des Anfangsgehaltes ab.

In den frischen, aber getrockneten Samen des Catongos lag der Catechingehalt bei 1,2 mg/g ffTM. Nach viertägiger Inkubation nahm er auf 0,4 mg/g ffTM ab und betrug nur noch 35 % des Ausgangsgehaltes.

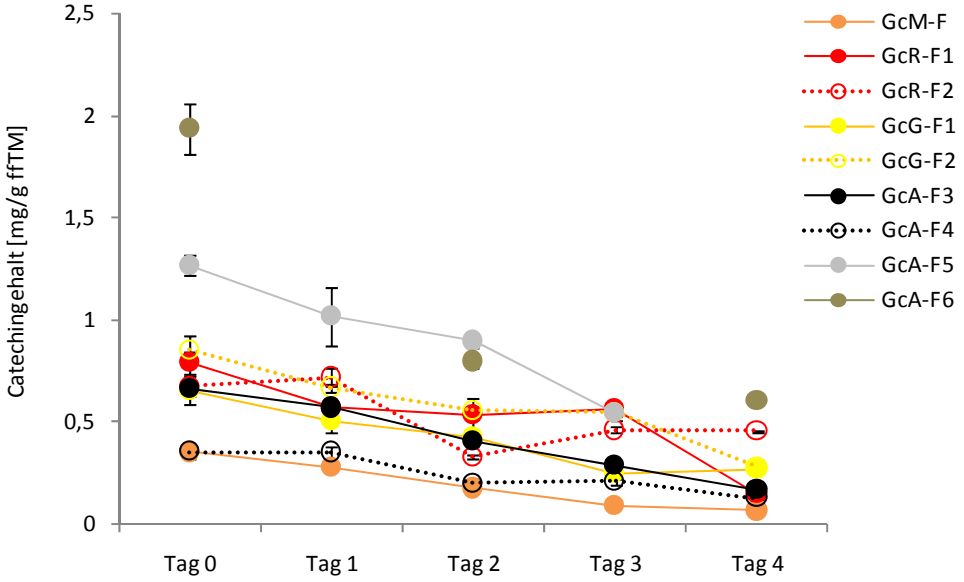


Abbildung 161: Catechingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet (außer den Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6). Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

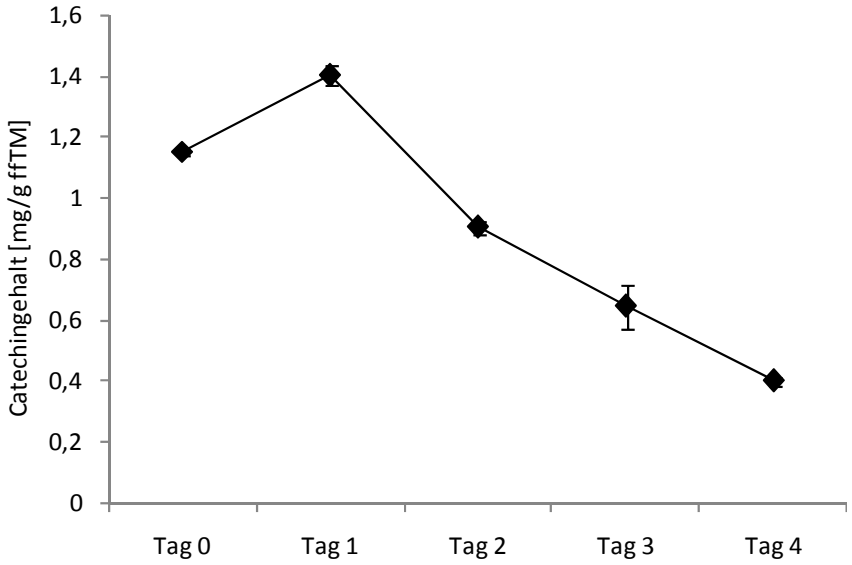


Abbildung 162: Catechingehalt der entfetteten Samen von Catongo-Früchten im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.2.4.3 Anthocyane

Die charakteristische violette Färbung, die das violette Fermentationsstadium kennzeichnet (siehe Kapitel 4.2.1.3), wird durch zwei im Kakao vorkommende Anthocyane verursacht, die nach der Zerstörung der Zellkompartimentierung aus ihren Speicherzellen austreten. Diese vergerben im weiteren Verlauf der Fermentation und liegen strukturgebundenen vor, so dass sie nicht weiter extrahierbar sind.

Cyanidin-3-galactosid- und Cyanidin-3-arabinosidgehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

Die frischen, aber getrockneten Samen enthielten ähnliche Anthocyangehalte wie die frischen ungetrockneten Samen aus Früchten derselben Genotypen (siehe Kapitel 4.1.4.1).

Die frischen, getrockneten Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501 enthielten 0,9 bis 4,2 mg/g ffTM Cyanidin-3-galactosid und 3,0 bis 10,7 mg/g ffTM Cyanidin-3-arabinosid.

Ab dem zweiten Tag der Inkubation nahmen die Anthocyangehalte stark ab, so dass nach drei- bis viertägiger Inkubation kein Cyanidin-3-galactosid und in den meisten Samen auch kein Cyanidin-3-arabinosid mehr nachweisbar waren.

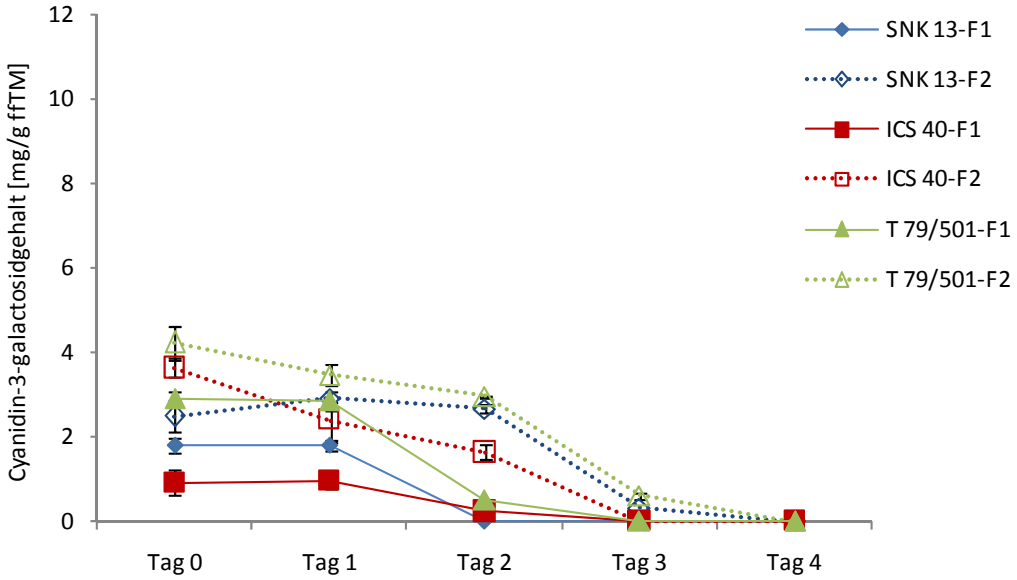


Abbildung 163: Cyanidin-3-galactosidgehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

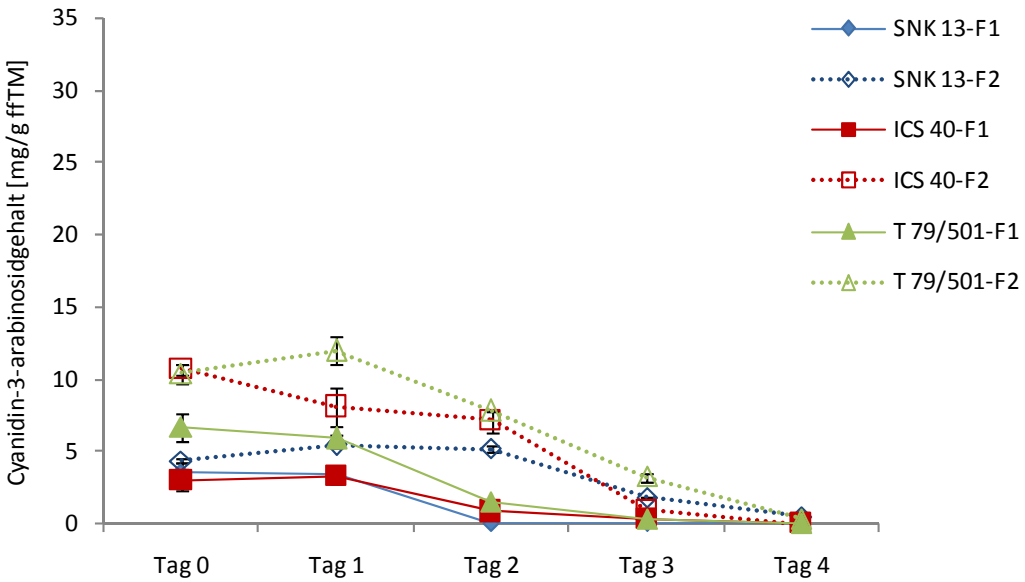


Abbildung 164: Cyanidin-3-arabinosidgehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Cyanidin-3-galactosid- und Cyanidin-3-arabinosidgehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

Die Samen des German Cocoas enthielten sehr hohe Anthocyangehalte. Die frischen, aber getrockneten Samen enthielten 1,6 bis 6,4 mg/g ffTM Cyanidin-3-galactosid und 2,7 bis 16,5 mg/g ffTM Cyanidin-3-arabinosid. Die frischen, ungetrockneten Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6 enthielten höhere Anthocyangehalte von 10 und 11 mg/g ffTM Cyanidin-3-galactosid und 28 und 29 mg/g ffTM Cyanidin-3-arabinosid.

Ab dem zweiten Tag der Inkubation nahmen die Anthocyangehalte stark ab, so dass nach drei- bis viertägiger Inkubation kein Cyanidin-3-galactosid und in den meisten Samen auch kein Cyanidin-3-arabinosid mehr nachgewiesen wurden. Einige Samen enthielten am 4. Tag noch geringe Gehalte an Cyanidin-3-arabinosid von bis zu 0,8 mg/g ffTM.

Die frischen, getrockneten Samen des Catongos enthielten 2,5 mg/g ffTM Cyanidin-3-galactosid und 3,9 mg/g ffTM Cyanidin-3-arabinosid. Nach dreitägiger Inkubation war kein Cyanidin-3-galactosid und nach viertägiger Inkubation kein Cyanidin-3-arabinosidsid mehr nachweisbar.

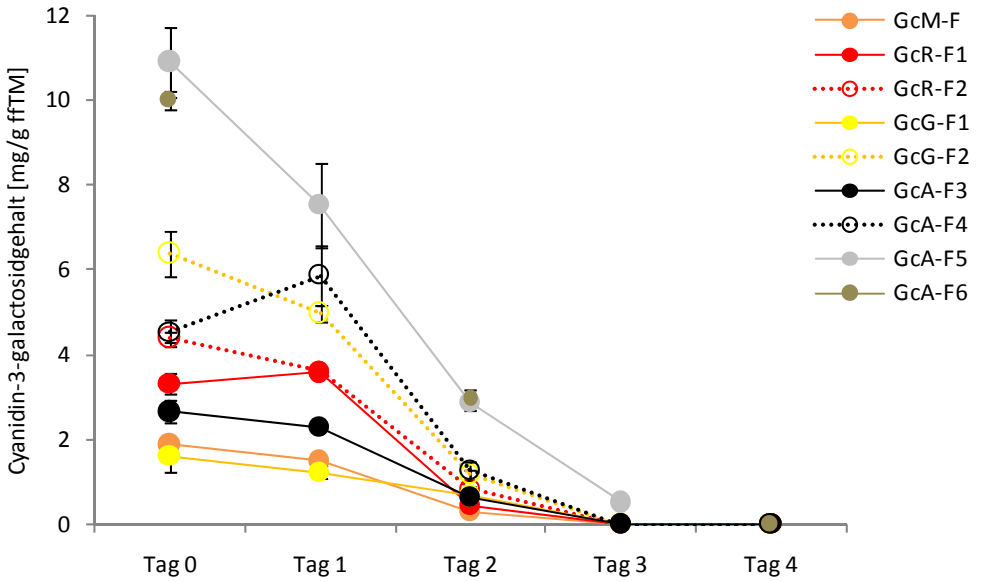


Abbildung 165: Cyanidin-3-galactosidgehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet (außer den Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6). Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

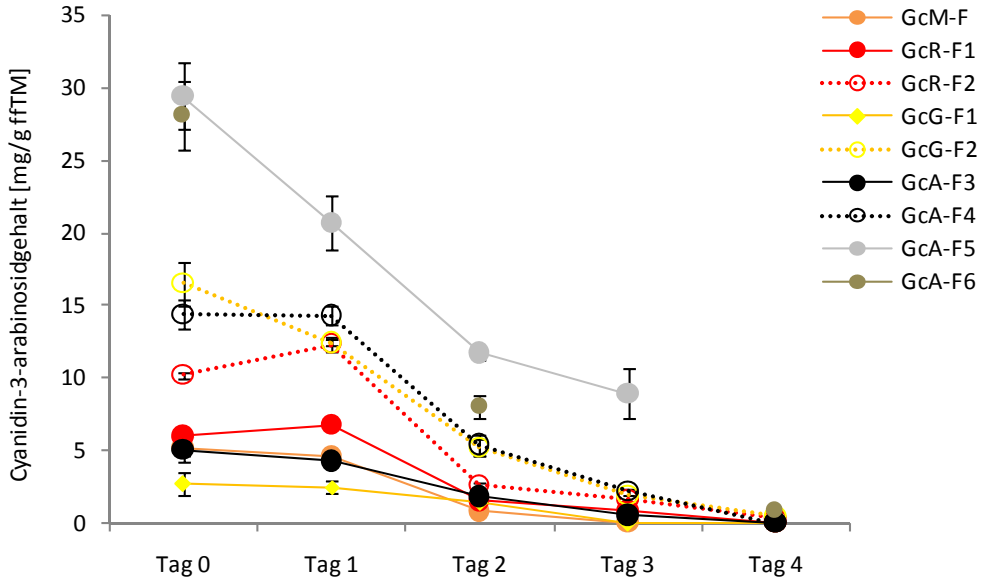


Abbildung 166: Cyanidin-3-arabinosidsidgehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet (außer den Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6). Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

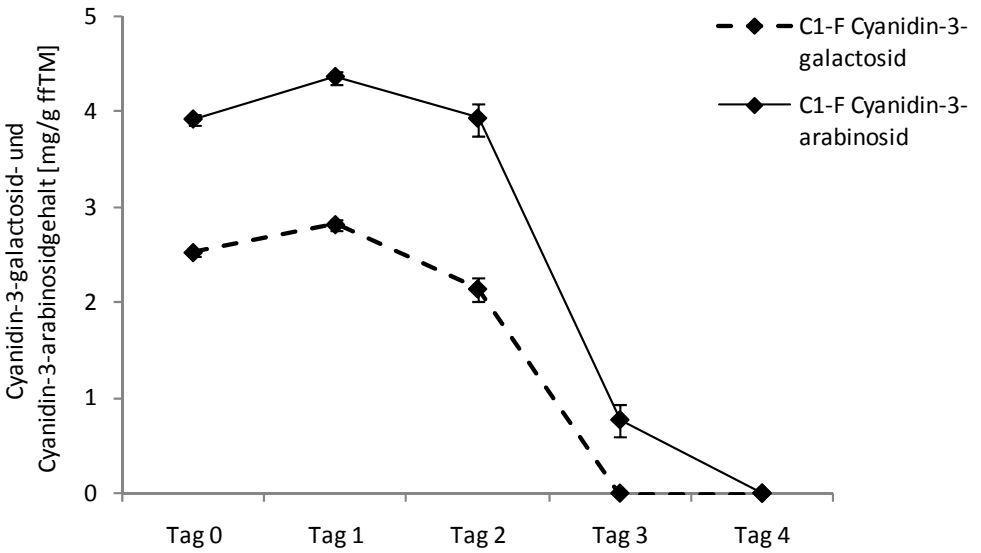


Abbildung 167: Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosidgehalt der entfetteten Samen von Catongo-Früchten im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.2.4.4 Inkubationsmedien im Verlauf der Inkubation

Im Verlauf der Inkubation färbten sich die Inkubationsmedien durch das Austreten der phenolischen Substanzen aus den Samen zunehmend orange bis bräunlich. Die Inkubationsmedien der Samen des German Cocoas wiesen eine stärkere Rotfärbung auf als die Inkubationsmedien der Samen der anderen Früchte. Zudem blieben die Inkubationsmedien der Samen des German Cocoas bis zum Ende der Inkubationen rötlicher als die der anderen Samen, welche zum Ende der Inkubation eine bräunliche Verfärbung annahmen.

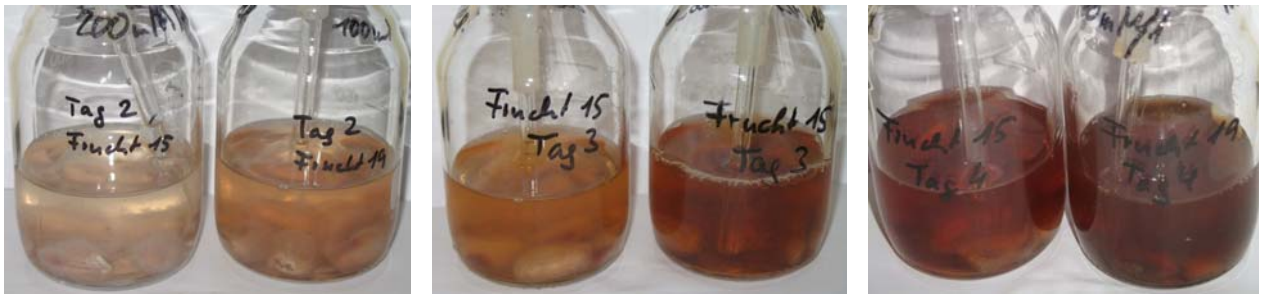


Abbildung 168: Inkubationsmedien nach 2-, 3- und 4-tägiger Inkubation von Samen aus zwei unterschiedlichen Früchten der Genotypengruppe WAA.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1.



Abbildung 169: Inkubationsmedien nach 3-tägiger Inkubation von Samen der Genotypen ICS 40 (links im Bild), SNK 13 (rechts) und eines German Cocoas (in der Mitte). Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2.

4.2.4.5 Zusammenfassung

Im Verlauf der Inkubation nahmen die Epicatechin-, Catechin- und Anthocyangehalte ab.

Die frischen, unfermentierten Samen enthielten 27 bis 49 mg/g ffTM Epicatechin und 0,4 bis 1,9 mg/g ffTM Catechin. Nach viertägiger Inkubation sanken die Epicatechingehalte auf 17 bis 58 % des Ausgangsgehaltes und die Catechingehalte auf 7 bis 72 % des Ausgangsgehaltes.

In frischen Samen wurde zumeist keine Abnahme der phenolischen Substanzen während einer Sonnentrocknung festgestellt. Inkubierte und anschließend getrocknete Samen enthielten dagegen durchschnittlich geringere Gehalte als nicht getrocknete inkubierte Samen. Ungetrocknete inkubierte Samen enthielten durchschnittlich 20 mg/g ffTM (± 4) Epicatechin und 0,5 mg/g ffTM (± 0,1) Catechin. Getrocknete inkubierte Samen enthielten dagegen durchschnittlich nur 12 mg/g ffTM (± 5) Epicatechin und 0,3 mg/g ffTM (± 0,2) Catechin.

Anthocyane, welche in frischen Samen etwa 4,5 % der Gesamtphenole darstellen (BAIGRIE, 1994), waren nach drei- bis viertägiger Inkubation zumeist nicht mehr nachweisbar. Nur in einigen Samen waren nach viertägiger Inkubation noch geringe Restmengen an Cyanidin-3-arabinosid vorhanden.

Die frischen Samen des German Cocoas enthielten sehr hohe Anthocyangehalte von 1,6 bis 6,4 mg/g ffTM Cyanidin-3-galactosid und 2,7 bis 16,5 mg/g ffTM Cyanidin-3-arabinosid. In den Samen der anderen untersuchten Varietäten wurden 0,9 bis 4,2 mg/g ffTM Cyanidin-3-galactosid und 3,0 bis 10,7 mg/g ffTM Cyanidin-3-arabinosid nachgewiesen (siehe Tabelle 15).

Vor allem nach dem Erhöhen der Temperatur auf 50°C und der damit verbundenen Zerstörung der Zellstrukturen fand eine Zunahme der phenolischen Substanzen in den Inkubationsmedien statt. Diese Zunahme war jedoch geringer als die Abnahme der phenolischen Substanzen in den Samen. Daraus folgt, dass die Abnahme vor allem auf Vergerbungsreaktionen in der zweiten Phase der Inkubation nach dem Sauerstoffeintritt beruhte.

4.2.5 Veränderung der Zuckergehalte im Verlauf der Inkubation

Für den Verlauf der Fermentation ist die Bildung von reduzierenden Zuckern wichtig, da aus ihnen und freien Aminosäuren über Maillardreaktionen beim Rösten das kakaotypische Aroma entsteht (MOHR *et al*., 1971).

4.2.5.1 Saccharose

Saccharosegehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad

Zu Beginn der Inkubationen enthielten die Samen zwischen 34 und 41 mg/g ffTM Saccharose.

Im Verlauf der Inkubation nahm der Gehalt stark ab, so dass in den Samen von vier der sechs untersuchten Inkubationsreihen nach dreitägiger Inkubation keine Saccharose mehr nachweisbar war.

In den Samen der Inkubationsreihe Tri6-I, welche mit angeritzter Testa inkubiert wuden, nahm der Saccharosegehalt schon ab dem ersten Tag ab. In den anderen Samen wurde erst ab dem zweiten Tag der Inkubation eine Abnahme des Saccharosegehaltes festgestellt. In den Samen der Inkubationsreihe Tri4-I, welche ebenfalls mit angeritzter Testa inkubiert wurden, konnte keine beschleunigte Abnahme des Saccharosegehaltes festgestellt werden.

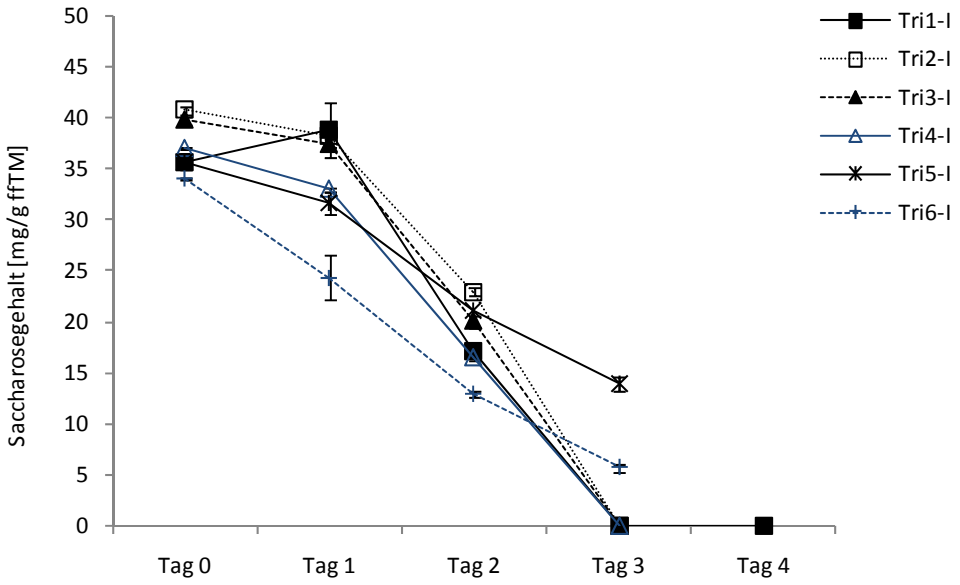


Abbildung 170: Saccharosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. In den Inkubationen Tri4-I und Tri6-I (blaue Linien) wurde die Testa der Samen durch Anritzen verletzt. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Saccharosegehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

Die für die folgenden Untersuchungen verwendeten Samen wurden nach der Inkubation zunächst an der Sonne getrocknet, bevor sie gefriergetrocknet wurden. In den frischen, aber getrockneten Samen wurde keine durch die Trocknung bedingte Abnahme des Saccharosegehaltes festgestellt.

Zu Beginn der Inkubationen enthielten die Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501 zwischen 28 und 36 mg/g ffTM Saccharose.

Im Verlauf einer viertägigen Inkubation nahm der Saccharosegehalt ab. Allerdings enthielten die Samen auch nach viertägiger Inkubation noch 8 bis 12 mg/g ffTM Saccharose. Dies entspricht 29 bis 42 % des Anfangsgehaltes.

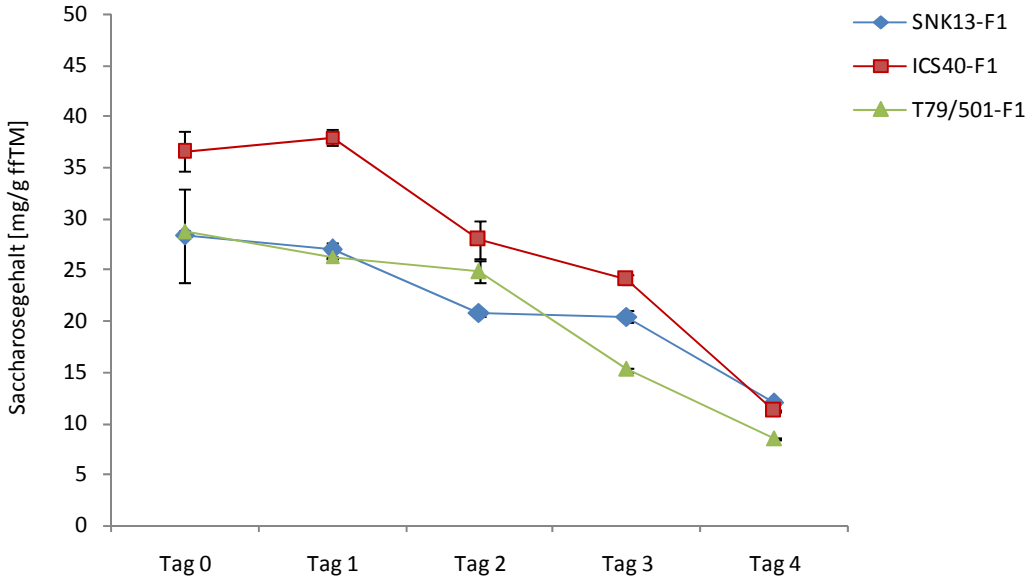


Abbildung 171: Saccharosegehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Saccharosegehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

In den Samen des German Cocoas lag der Saccharosegehalt zu Beginn der Inkubation zwischen 26 und 40 mg/g ffTM. Nach viertägiger Inkubation sank er auf 4 bis 6 mg/g ffTM. Dies entspricht 13 bis 16 % des Anfangsgehaltes.

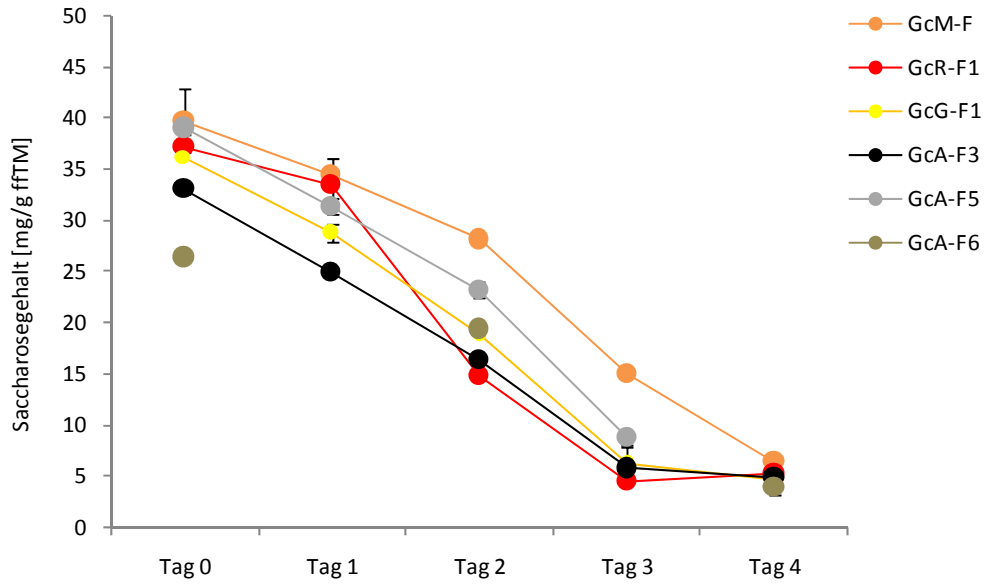


Abbildung 172: Saccharosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet (außer den Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6). Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.2.5.2 Fructose

Fructosegehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad

In den frischen Samen wurde keine Fructose nachgewiesen. Ab dem zweiten Tag der Inkubation stieg der Fructosegehalt an, so dass die Samen am dritten Tag 3,5 bis 9,5 mg/g ffTM Fructose enthielten. Die Zunahme des Fructosegehaltes fand parallel zur Abnahme des Saccharosegehaltes statt. In den Samen der Inkubationsreihe Tri6-I, welche mit angeritzter Testa inkubiert wurden, konnte schon nach dem ersten Tag der Inkubation Fructose nachgewiesen werden. In diesen Samen wurde auch ein beschleunigter Saccharoseabbau festgestellt (siehe Kapitel 4.2.5.1).

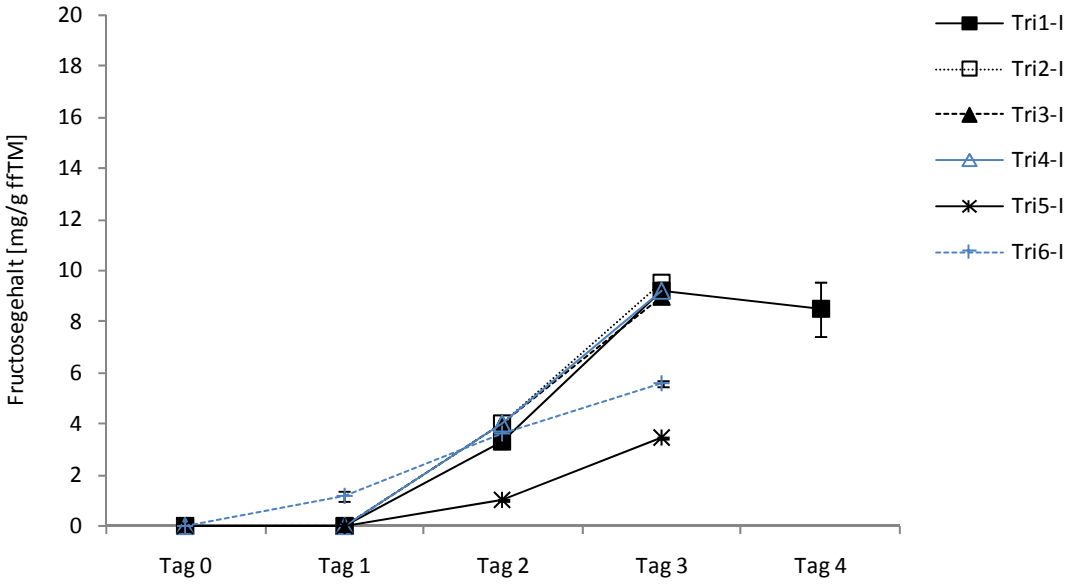


Abbildung 173: Fructosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. In den Inkubationen Tri4-I und Tri6-I (blaue Linien) wurde die Testa der Samen durch Anritzen verletzt. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Fructosegehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

In den frischen, getrockneten Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501 wurde keine Fructose nachgewiesen. Ab dem zweiten Tag stieg der Gehalt an, so dass die Samen nach viertägiger Inkubation 8,4 bis 15,3 mg/g ffTM Fructose enthielten.

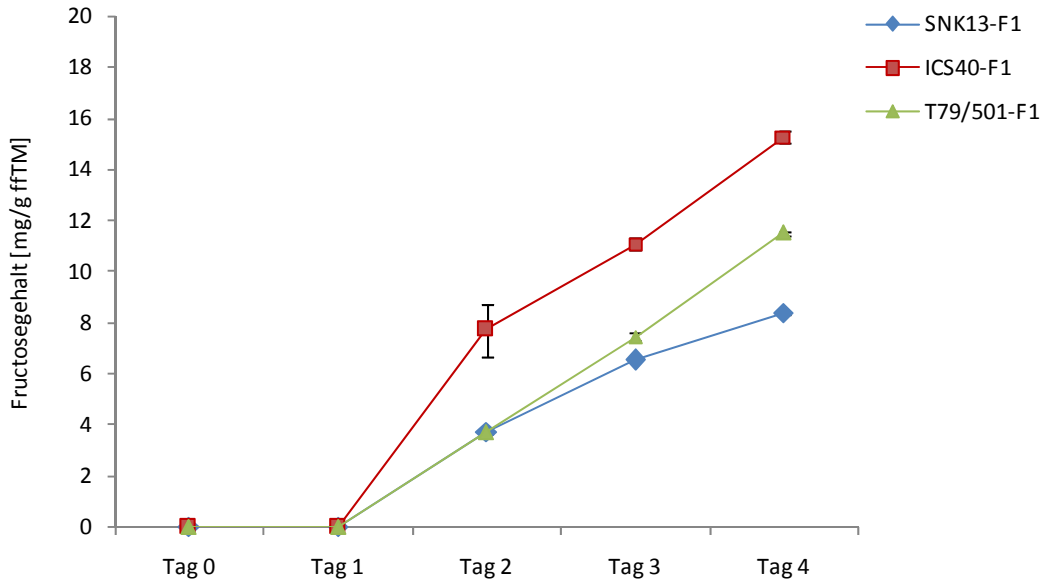


Abbildung 174: Fructosegehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Fructosegehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

In den Samen des German Cocoas wurde zu Beginn der Inkubation keine Fructose nachgewiesen.

Nach zweitägiger Inkubation stieg der Fructosegehalt auf 2,4 bis 5,4 mg/g ffTM an. Nur in den Samen der Inkubationsreihe GcA-F6 wurde am zweiten Tag der Inkubation keine Fructose nachgewiesen. Nach viertägiger Inkubation enthielten die Samen zwischen 8,0 bis 18,0 mg/g ffTM Fructose.

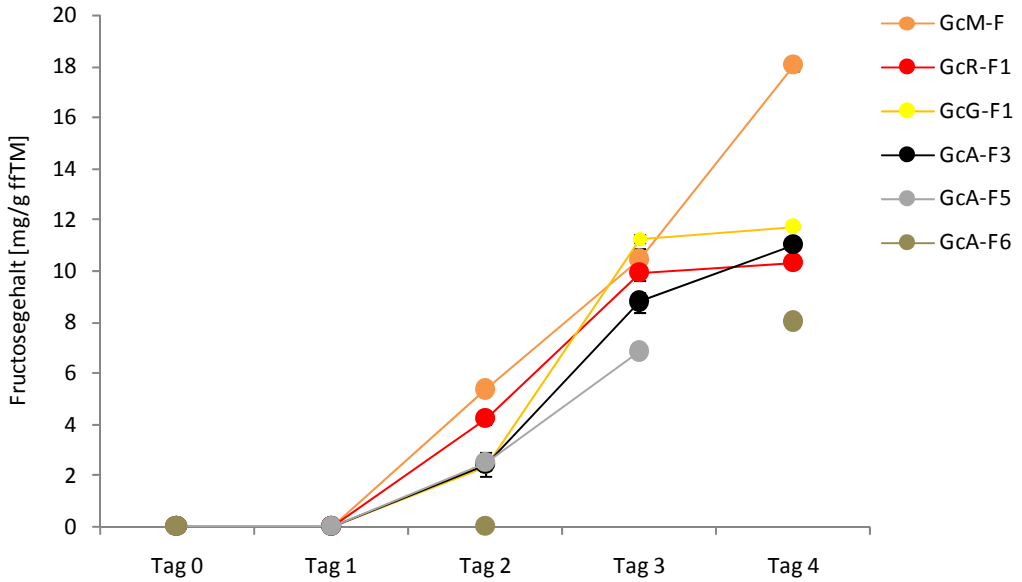


Abbildung 175: Fructosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet (außer den Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6). Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.2.5.3 Glucose

Glucosegehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad

In den frischen Samen war keine Glucose nachweisbar. Ab dem zweiten Tag der Inkubation stieg der Glucosegehalt an. Nach dreitägiger Inkubation enthielten die Samen 4,7 bis 10,6 mg/g ffTM Glucose, wobei die Glucosegehalte der meisten Samen in einem Bereich von 10,3 bis 10,6 mg/g ffTM lagen.

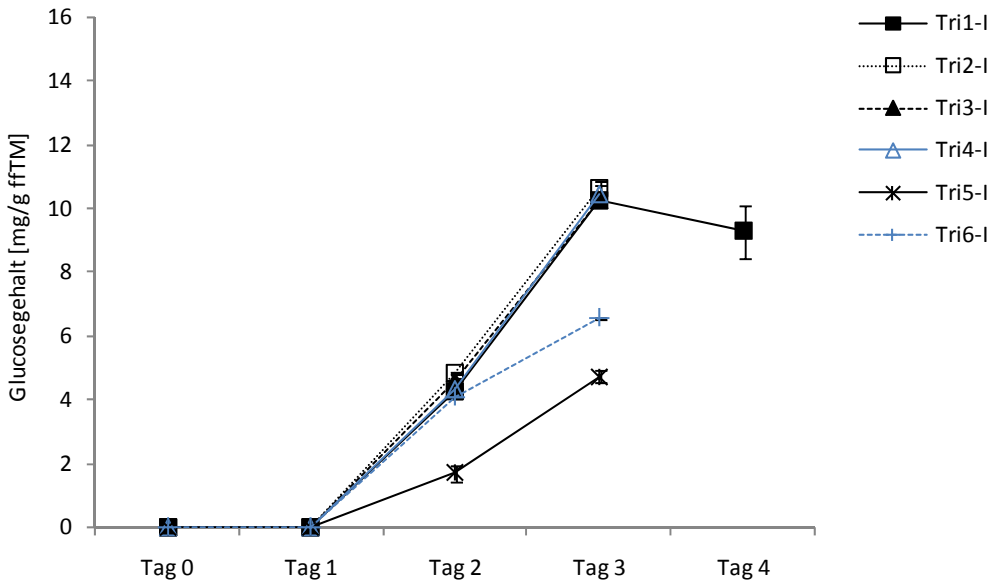


Abbildung 176: Glucosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. In den Inkubationen Tri4-I und Tri6-I (blaue Linien) wurde die Testa der Samen durch Anritzen verletzt. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Glucosegehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

Zu Beginn der Inkubation wurde in den Samen keine Glucose nachgewiesen.

Nach zweitägiger Inkubation stieg der Glucosegehalt an, so dass die Samen am vierten Tag 7,1 bis 12,3 mg/g ffTM Glucose enthielten.

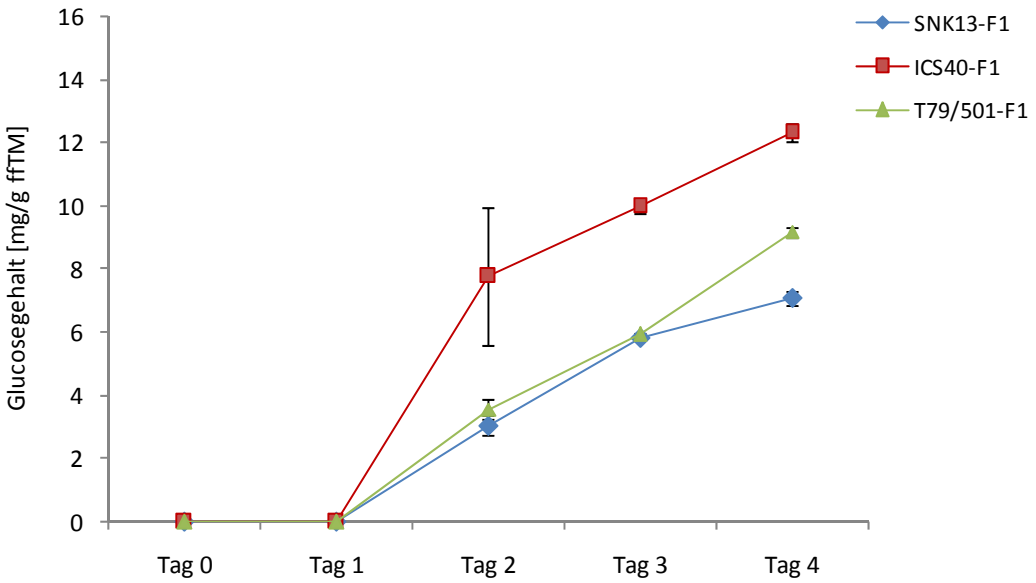


Abbildung 177: Glucosegehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Glucosegehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

In den Samen des German Cocoas wurde zu Beginn der Inkubation keine Glucose nachgewiesen.

Nach zwei- bis dreitägiger Inkubation stieg der Gehalt an, so dass die Samen nach viertägiger Inkubation 6,6 bis 14,0 mg/g ffTM Glucose enthielten.

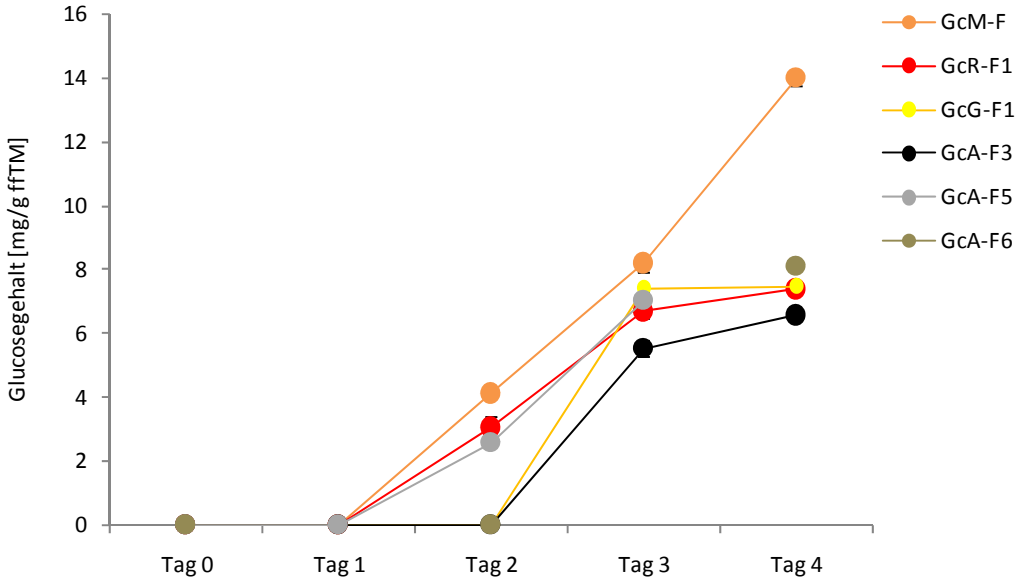


Abbildung 178: Glucosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet (außer den Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6). Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.2.5.4 Zusammenfassung

Die frischen, ungekeimten Samen enthielten zwischen 26 und 41 mg/g ffTM Saccharose.

Während der Inkubation nahm der Saccharosegehalt stark ab. In einigen Samen wurde bereits nach dreitägiger Inkubation keine Saccharose mehr nachgewiesen. In den Samen der anderen Inkubationsreihen sank der Saccharosegehalt auf 13 bis 42 % des Anfangsgehaltes.

In den frischen Samen war weder Fructose noch Glucose nachweisbar. Da es sich bei Fructose und Glucose um Produkte der hydrolytischen Spaltung der Saccharose handelt, stieg der Gehalt dieser Zucker parallel zu dem Abbau der Saccharose an. In den meisten Samen wurde ab dem zweiten Tag der Inkubation ein Anstieg des Fructose- und des Glucosegehaltes festgestellt.

Nach drei- bis viertägiger Inkubation enthielten die Samen zwischen 3,5 und 18,0 mg/g ffTM Fructose und zwischen 6,6 und 12,3 mg/g ffTM Glucose. Die meisten inkubierten Samen enthielten etwas höhere Gehalte an Fructose als an Glucose. Dies kann an dem bevorzugten Abbau der Glucose liegen (DE BRITO *et al.*, 2000).

4.2.6 Veränderung des Gehaltes an Methylxanthinen (Theobromin und Coffein) im Verlauf der Inkubation

Die Methylxanthine sind verantwortlich für die anregende Wirkung des Kakaos. Kakaosamen enthalten einen außergewöhnlich hohen Gehalt an Theobromin. In frischen Samen kommt Theobromin zum größten Teil an Gerbstoffe oder Chlorogensäure gebunden vor und wird erst durch die Fermentation und Röstprozesse freigesetzt. Neben Theobromin enthalten Kakaosamen Coffein.

Samen, welche nach der Inkubation an der Sonne getrocknet wurden, wiesen im Vergleich zu ungetrockneten Samen derselben Genotypen keine Unterschiede in ihrem Theobromin- und Coffeingehalt auf.

4.2.6.1 Theobromin

Theobromingehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad

In den frischen Samen der Genotypengruppe WAA lagen die Theobromingehalte zwischen 27 und 36 mg/g ffTM.

Im Verlauf der Inkubation nahm der Gehalt ab dem dritten Tag nach dem Erhöhen der Temperatur auf 50°C etwas ab, so dass die Samen nach viertägiger Inkubation nur noch 14 und 21 mg/g ffTM Theobromin enthielten. Dies entspricht einer Abnahme auf 52 bzw. 65 % des Anfangsgehaltes.

Die Abnahme des Theobromingehaltes ist vermutlich auf einen Austritt aus den Kotyledonen in die Samenschale zurückzuführen (KNAPP und WADSWORTH, 1924).

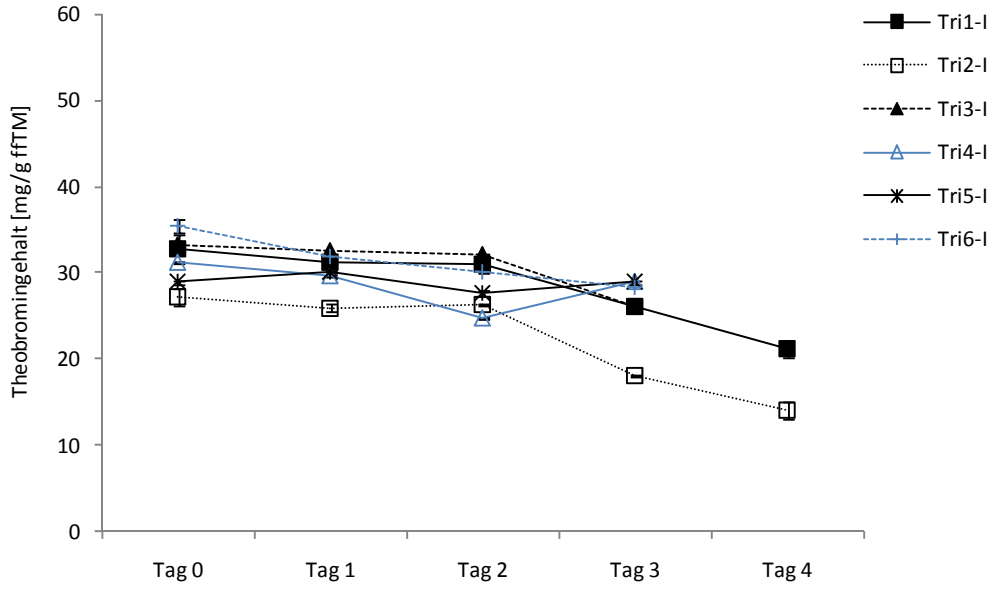


Abbildung 179: Theobromingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. In den Inkubationen Tri4-I und Tri6-I (blaue Linien) wurde die Testa der Samen durch Anritzen verletzt. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Theobromingehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

Zu Beginn der Inkubation wiesen die getrockneten Samen der drei untersuchten Genotypen sehr unterschiedliche Theobromingehalte auf. In den Samen des Genotypen T 79/501 lag der Theobromingehalt vor der Inkubation bei 20 mg/g ffTM, in den Samen des Genotypen ICS 40 bei 23 mg/g ffTM und in den Samen des Genotypen SNK 13 bei 55 mg/g ffTM.

Im Verlauf der Inkubation nahm der Theobromingehalt etwas ab. Da die Gehalte im Verlauf der Inkubation teilweise relativ starken Schwankungen unterlagen, kann keine eindeutige Aussage über das Verhalten des Theobromins Verlauf der Inkubation gemacht werden (siehe auch Kapitel 4.1.6.1).

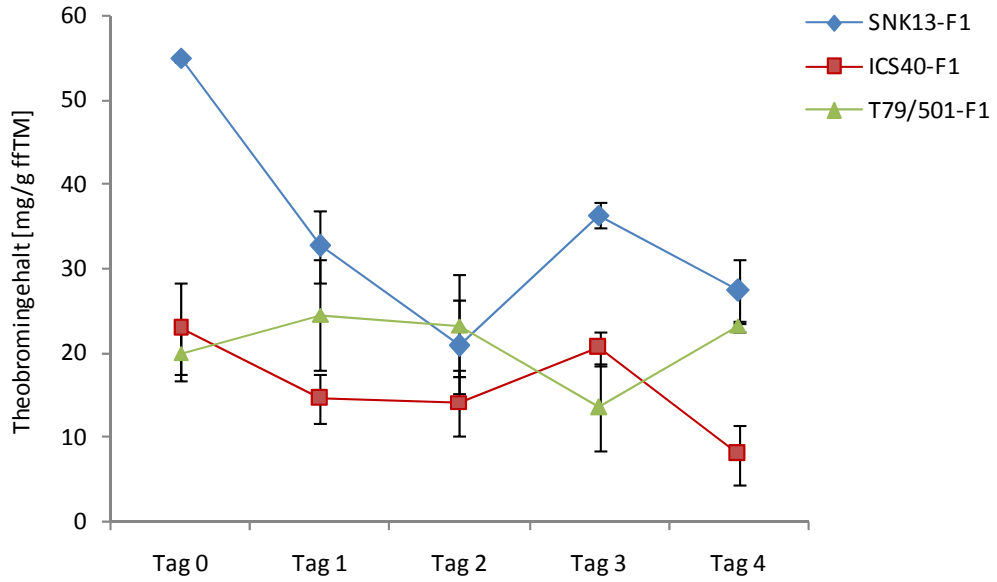


Abbildung 180: Theobromingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Theobromingehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

Die frischen Samen des German Cocoas enthielten 23 bis 38 mg/g ffTM Theobromin.

Im Verlauf der Inkubation wurde Aufgrund der Schwankungen des Theobromingehaltes keine signifikante Veränderung des Theobromingehaltes festgestellt (siehe auch Kapitel 4.1.6.1). Nur in den Samen der Inkubationsreihe GcM-F nahm der Theobromingehalt ab.

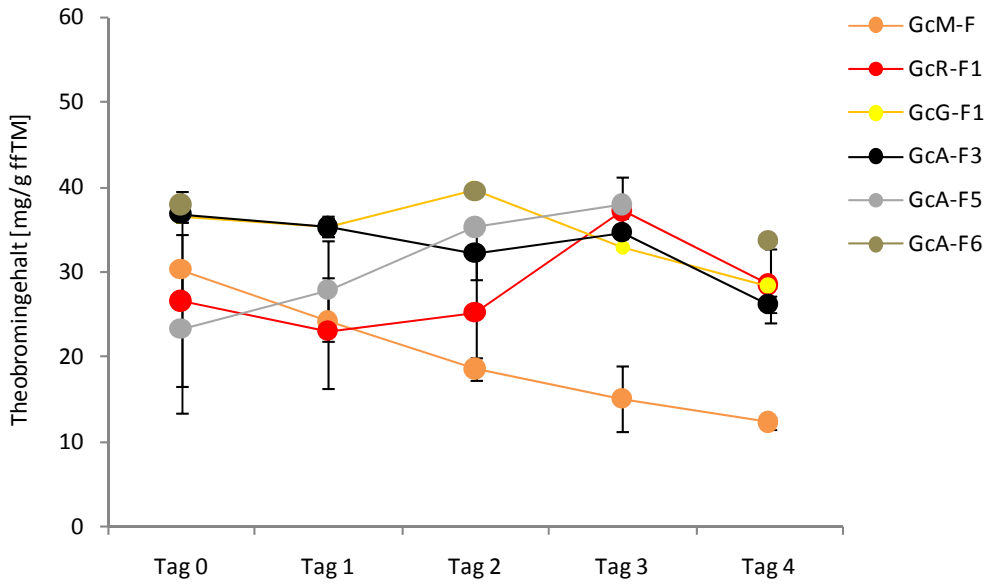


Abbildung 181: Theobromingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet (außer den Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6). Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.2.6.2 Coffein

In den untersuchten Kakaosamen wurden nur sehr geringe Mengen an Coffein nachgewiesen. In einigen Proben lag der Coffeingehalt unter der Nachweisbarkeitsgrenze durch die HPLC. Dies bedeutet aber nicht, dass in diesen Samen kein Coffein vorhanden war, es lag vermutlich nur für die verwendete Methode unter dem Schwellenwert.

Coffeingehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad

Die Samen der Genotypengruppe WAA wiesen sehr unterschiedliche Coffeingehalte auf. In den Samen der Frucht Tri2-I wurde kein Coffein nachgewiesen. Die Samen der Früchte Tri1-I, Tri3-I und Tri4-I enthielten zwischen 0,8 und 1,2 mg/g ffTM Coffein und die Samen der Früchte Tri5-I und Tri6-I enthielten 4,8 und 5,4 mg/g ffTM Coffein.

Im Verlauf der Inkubation nahm der Coffeingehalt etwas ab, so dass die Samen nach dem dritten Tag zumeist zwischen 63 und 78 % des Anfangsgehaltes enthielten.

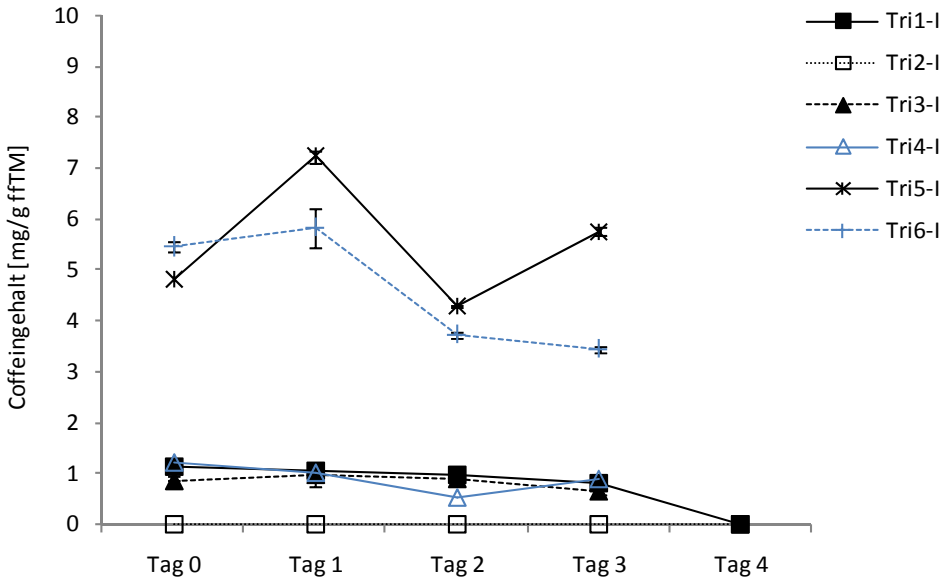


Abbildung 182: Coffeingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. In den Inkubationen Tri4-I und Tri6-I (blaue Linien) wurde die Testa der Samen durch Anritzen verletzt. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Coffeingehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

Die frischen, getrockneten Samen des Genotypen T 79/501 wiesen im Vergleich zu den Samen der Genotypen SNK 13 und ICS 40 einen geringen Gehalt an Coffein von etwa 1 mg/g ffTM auf. Der Coffeingehalt in den Samen dieses Genotyps veränderte sich im Verlauf der Inkubation nur geringfügig.

Die frischen, getrockneten Samen der Genotypen SNK 13 und ICS 40 enthielten 4,1 und 4,8 mg/g ffTM Coffein. Im Verlauf der Inkubation nahm der Gehalt in diesen Samen ab, so dass am vierten Tag nur noch 1,3 und 1,1 mg/g ffTM Coffein nachgewiesen wurden. Dies entspricht 31 bzw. 23 % des Anfangsgehaltes.

Die Abnahme des Coffeingehaltes ist vermutlich auf die Bildung unlöslicher Komplexe mit den phenolischen Substanzen zurückzuführen.

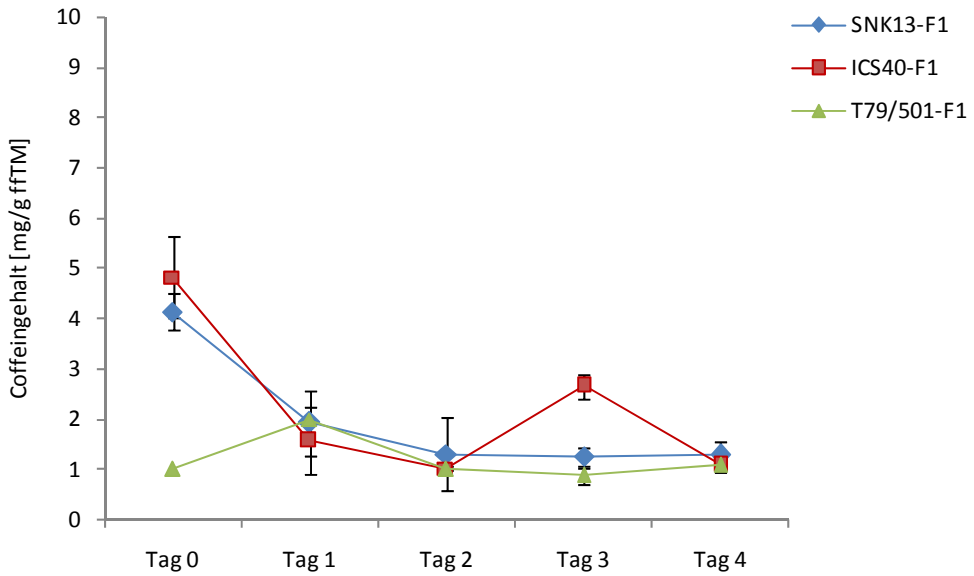


Abbildung 183: Coffeingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Coffeingehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

Die frischen Samen enthielten 0 bis 2,1 mg/g ffTM Coffein.

Im Verlauf der Inkubation war, abgesehen von Schwankungen, die vermutlich auf der Heterogenität des Ausgangsmaterials beruhen, keine Veränderung des Coffeingehaltes nachweisbar.

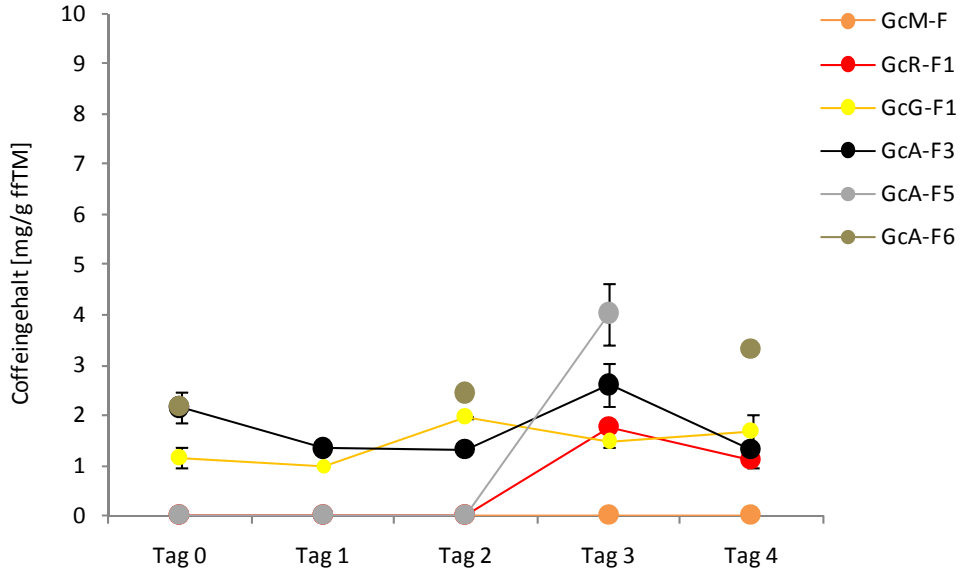


Abbildung 184: Coffeingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet (außer den Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6). Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.2.6.3 Zusammenfassung

Die Samen der verschiedenen Kakaovarietäten wiesen unterschiedlich hohe Theobromin- und Coffeingehalte auf. In den frischen Samen lag der Theobromingehalt zwischen 20 und 55 mg/g ffTM und der Coffeingehalt zwischen 0,8 und 5,4 mg/g ffTM. In einigen Samen lag der Coffeingehalt unter der Nachweisbarkeitsgrenze.

In den Samen der meisten Inkubationsreihen wurde im Verlauf der Inkubation, vor allem nach dem Erhöhen der Temperatur auf 50°C, eine Abnahme des Theobromingehaltes festgestellt.

In einigen Samen nahm auch der Coffeingehalt im Verlauf der Inkubation ab. Diese Abnahme verlief jedoch sehr gering und konnte daher nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die Abnahme des Coffeingehaltes der Samen war höher, wenn die Abnahme des Theobromingehaltes hoch war.

4.2.7 Veränderung des Gehaltes an Polyaminen im Verlauf der Inkubation

4.2.7.1 Putrescin

Putrescingehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad

Zu Beginn der Inkubation wurden in den Samen von drei der sechs untersuchten Inkubationsreihen geringe Gehalte an Putrescin nachgewiesen. Diese nahmen im Verlauf der Inkubation ab, so dass ab dem dritten Tag kaum noch Putrescin nachweisbar war.

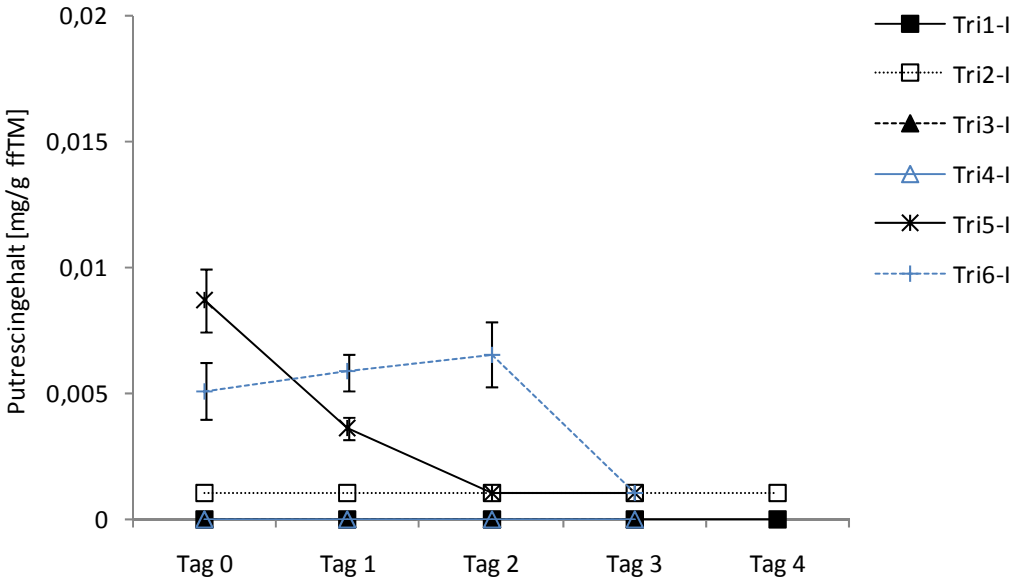


Abbildung 185: Putrescingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. In den Inkubationen Tri4-I und Tri6-I (blaue Linien) wurde die Testa der Samen durch Anritzen verletzt. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Putrescingehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

In den getrockneten Samen des Genotypen SNK 13 wurden über den Verlauf der Inkubation geringe Putrescingehalte von etwa 0,003 bis maximal 0,007 mg/g ffTM festgestellt.

Die frischen, getrockneten Samen der Genotypen ICS 40 und T 79/501 enthielten etwas höhere Putrescingehalte von etwa 0,01 bis 0,019 mg/g ffTM.

Im Verlauf der Inkubation veränderten sich die Putrescingehalte nur geringfügig.

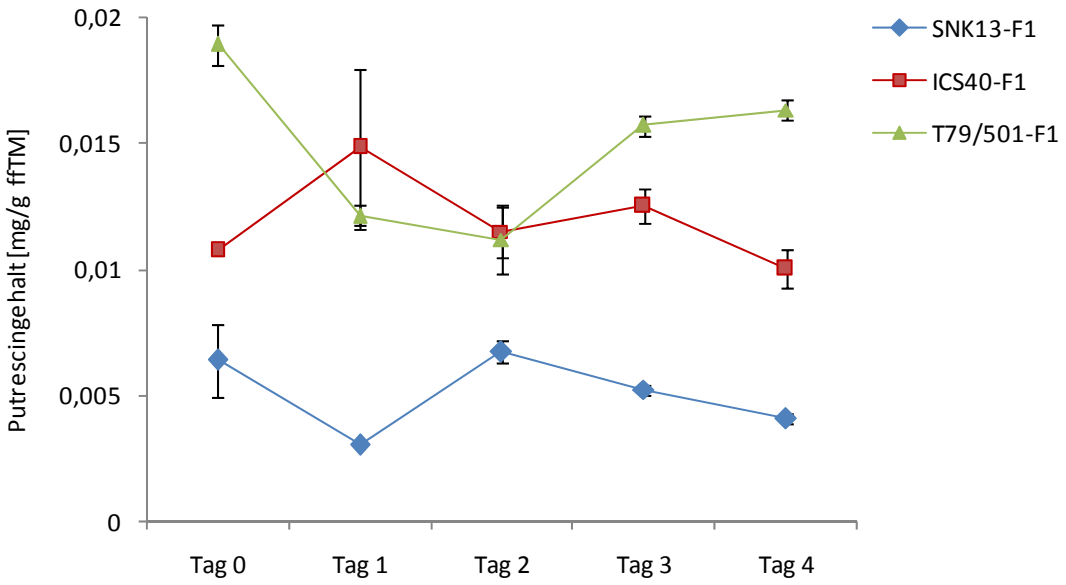


Abbildung 186: Putrescingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Putrescingehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

Die Samen der unterschiedlichen German Cocoa-Inkubationsreihen enthielten im Verlauf der Inkubation 0,001 bis maximal 0,010 mg/g ffTM Putrescin. Im Verlauf der Inkubation war keine signifikante Veränderung des Putrescingehaltes feststellbar.

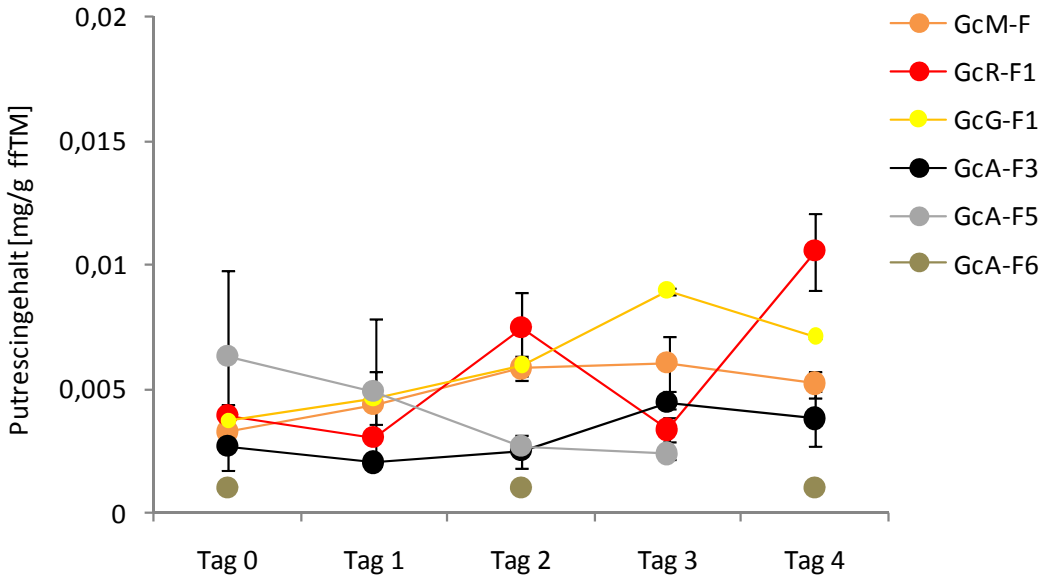


Abbildung 187: Putrescingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet (außer den Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6). Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.2.7.2 Spermidin

Spermidingehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad

In den frischen Samen wurden Spermidingehalte von etwa 0,01 bis maximal 0,08 mg/g ffTM nachgewiesen.

Im Verlauf der Inkubation wurden nur geringe Veränderungen der Spermingehalte festgestellt.

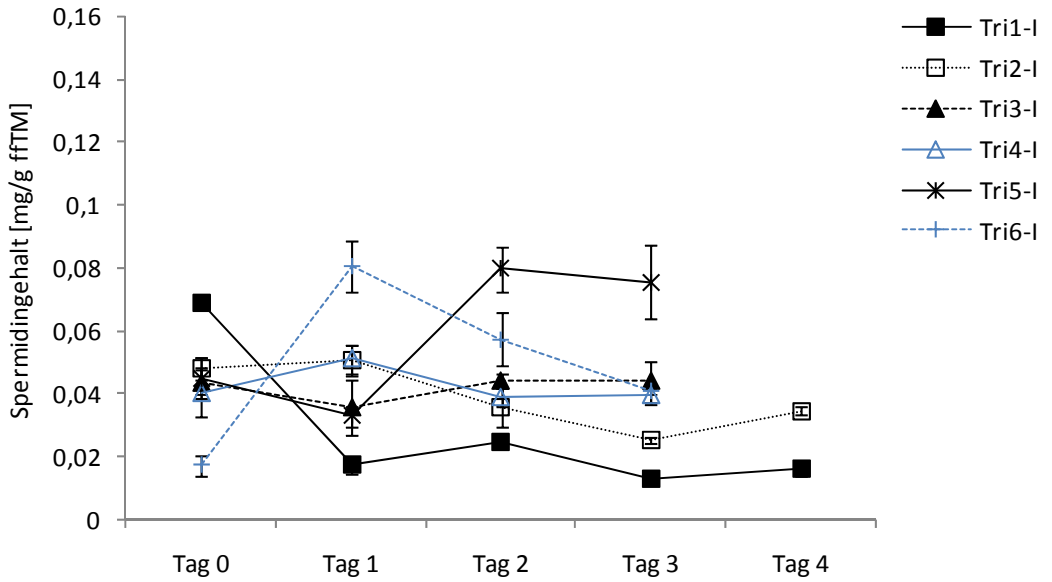


Abbildung 188: Spermidingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. In den Inkubationen Tri4-I und Tri6-I (blaue Linien) wurde die Testa der Samen durch Anritzen verletzt. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Spermidingehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

Die frischen, getrockneten Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501 enthielten Spermidingehalte im Bereich von etwa 0,02 bis 0,09 mg/g ffTM.

Diese veränderten sich im Verlauf der Inkubation nur geringfügig.

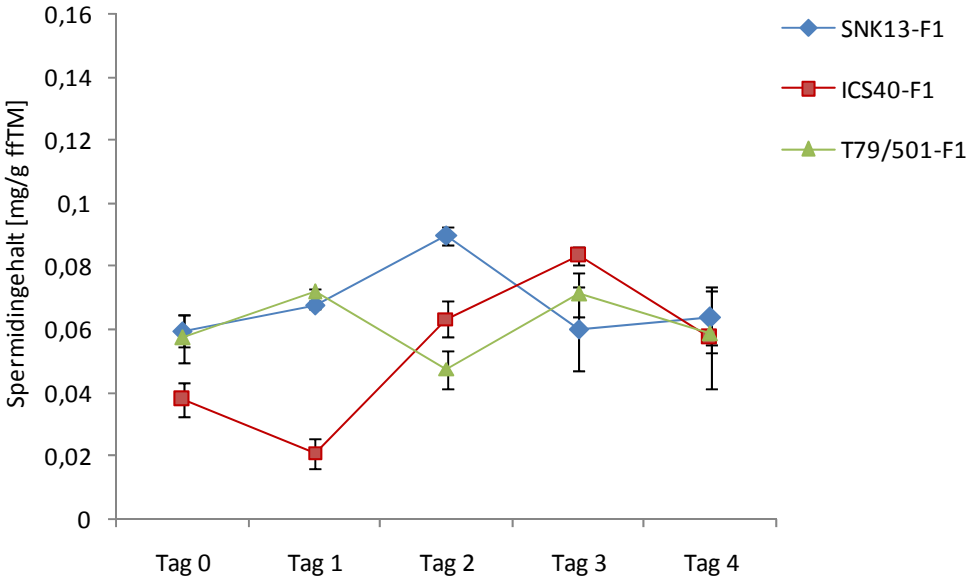


Abbildung 189 Spermidingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Spermidingehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

Die frischen Samen des German Cocoas enthielten im Verlauf der Inkubation Spermidingehalte von etwa 0,02 bis maximal 0,10 mg/g ffTM.

Abgesehen von geringen Schwankungen der Gehalte in den einzelnen Proben im Verlauf der Inkubation war keine Veränderung der Spermidingehalte feststellbar. Nur in den Samen der Inkubationsreihe GcM wurde eine geringe Abnahme des Spermidingehaltes von 0,10 mg/g ffTM zu Beginn der Inkubation auf 0,04 mg/g ffTM nach viertägiger Inkubation festgestellt.

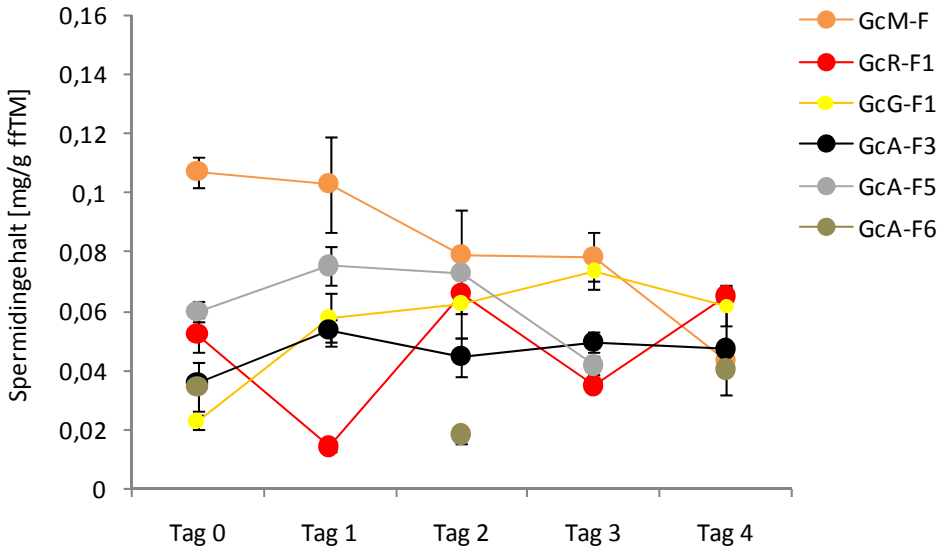


Abbildung 190: Spermidingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet (außer den Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6). Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.2.7.3 Spermin

Spermingehalte der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad

In den frischen Samen wurden Spermingehalte von etwa 0,005 bis maximal 0,053 mg/g ffTM nachgewiesen.

Abgesehen von Schwankungen der Gehalte in den einzelnen Proben einer Inkubationsreihe veränderten sich diese nur geringfügig.

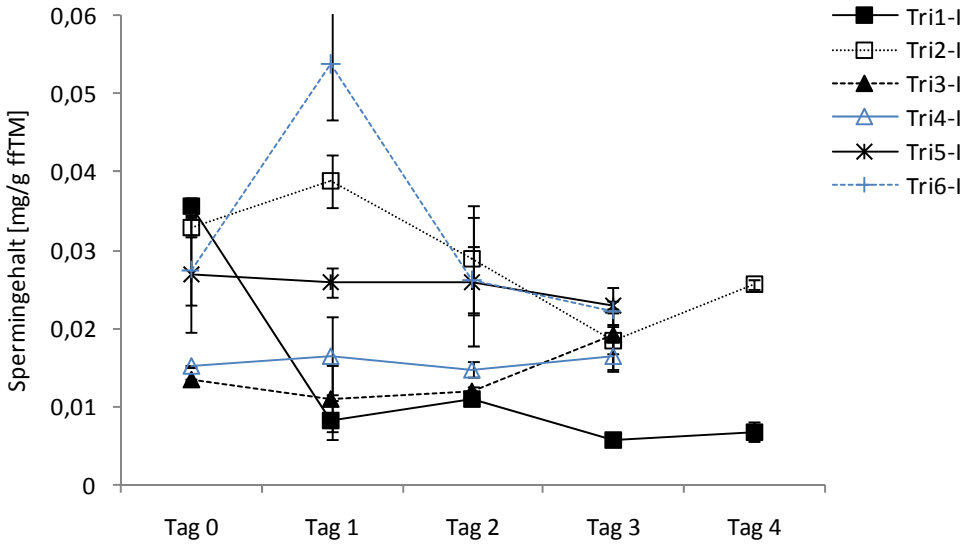


Abbildung 191: Spermingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. In den Inkubationen Tri4-I und Tri6-I (blaue Linien) wurde die Testa der Samen durch Anritzen verletzt. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Spermingehalte von Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501

Die frischen, getrockneten Samen enthielten Spermingehalte im Bereich von etwa 0,004 bis 0,025 mg/g ffTM. Diese veränderten sich im Verlauf der Inkubation nur wenig.

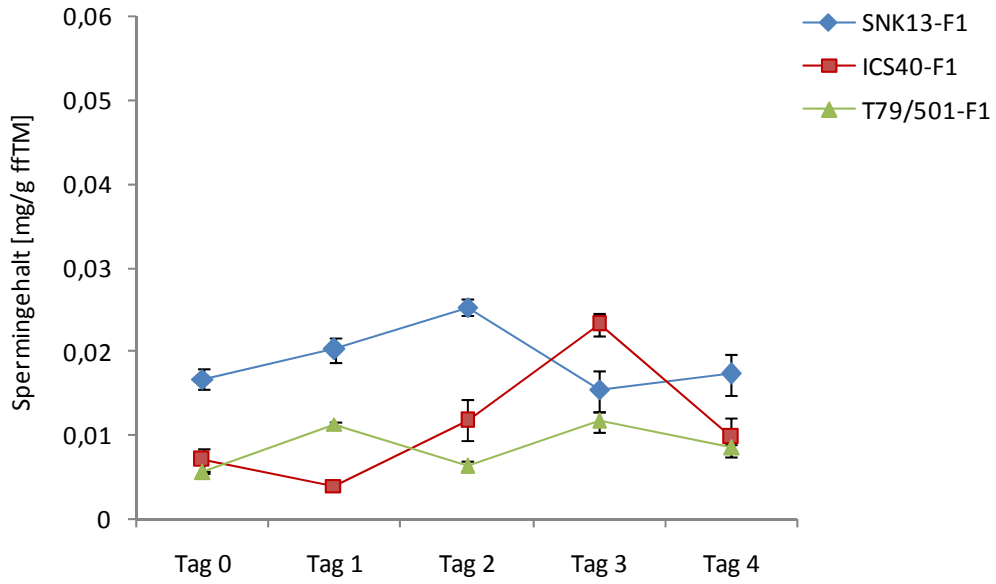


Abbildung 192: Spermingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Spermingehalte der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

Die Samen des German Cocoas enthielten im Verlauf der Inkubation Spermingehalte von etwa 0,003 bis maximal 0,031 mg/g ffTM.

Im Verlauf der Inkubation war kaum eine Veränderung der Spermingehalte feststellbar. Nur in den Samen der Inkubationsreihe GcM fand parallel zur Abnahme des Spermidingehaltes eine geringe Abnahme des Spermingehaltes von 0,031 mg/g ffTM zu Beginn der Inkubation auf 0,013 mg/g ffTM nach viertägiger Inkubation statt.

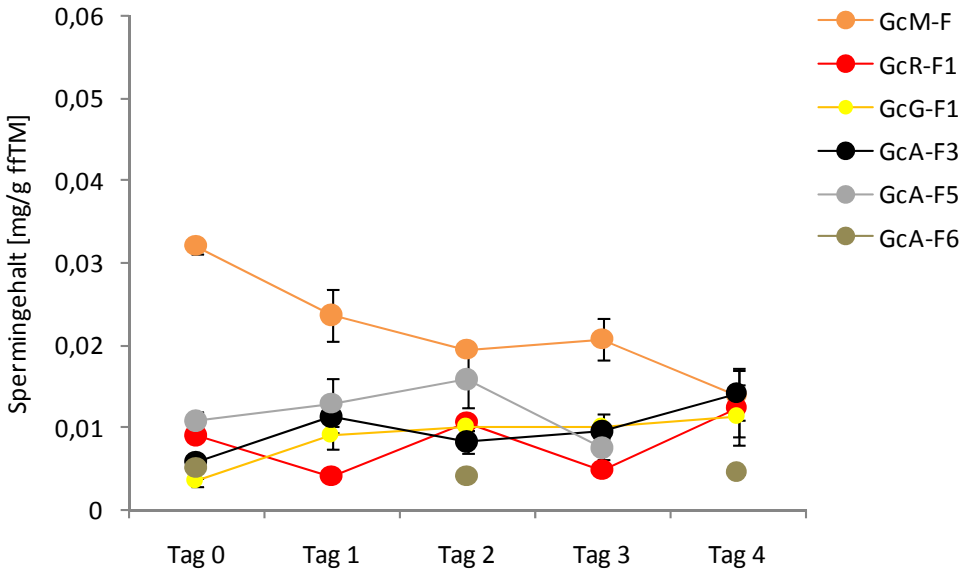


Abbildung 193: Spermingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet (außer den Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6). Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.2.7.4 Cadaverin

In den meisten Samen wurde kein Cadaverin nachgewiesen. Einige Samen enthielten sehr geringe Spuren an Cadaverin, die in einem Bereich von 0,001 bis 0,004 mg/g ffTM lagen.

4.2.7.5 Zusammenfassung

In den Samen der untersuchten Inkubationsreihen wurden nur sehr geringe Gehalte an Polyaminen festgestellt.

Der Putrescin-, Spermidin- und der Spermingehalt blieben im Verlauf der Inkubation weitgehend unverändert. In einigen Samen wurde eine geringe Abnahme des Putrescingehaltes festgestellt.

Cadaverin war nur in wenigen Samen in Spuren nachweisbar.

4.2.8 Polyphenoloxidaseaktivität während der Inkubation

4.2.8.1 Polyphenoloxidaseaktivität in Kakaosamen

In Kakaosamen werden die Polyphenole getrennt von der PPO in den Vakuolen der Polyphenolspeicherzellen gespeichert. Die PPO kann erst nach dem Verlust der Zellkompartimentierung mit den Polyphenolen reagieren.

Während der Fermentation besteht die wichtigste Funktion der PPO für die Lebensmitteltechnologie in der Verminderung des bitteren Geschmacks und der Adstringenz durch die Oxidation der Polyphenole, speziell der Anthocyanidine. Die PPO ist an den kakaotypischen Bräunungsreaktionen beteiligt.

PPO-Aktivitäten der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad

Zur Bestimmung der PPO-Aktivität während der Inkubation wurden Kakaosamen über einen Zeitraum bis zu 4 Tagen unter fermentationsähnlichen Bedingungen inkubiert. Von diesen wurden pro Probenahmetag zwei Einzelsamen zur Bestimmung der PPO-Aktivität verwendet. Die zur Messung verwendeten Samen wurden zerkleinert, in cyanidhaltigem SÖRENSEN-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Die PPO-Aktivität wurde sowohl in dem daraus resultierenden Sediment als auch nach der Entfernung des Cyanids im Überstand gemessen.

Im Verlauf der Inkubation nahm die PPO-Aktivität in allen Samen sowohl im untersuchten Sediment als auch im Überstand ab. Zu Beginn der Inkubation lag die PPO-Aktivität je nach Samen zwischen 0,15 und 0,52 µkat/g Frischgewicht. Bereits nach zweitägiger Inkubation wurden nur noch PPO-Aktivitäten von 0,027 bis 0,065 µkat/g Frischgewicht gemessen. Diese am zweiten Tag der Inkubation noch vorhandene Restaktivität, welche etwa 12 % der Anfangsaktivität betrug, blieb bis zum vierten Tag der Inkubation weitgehend unverändert.

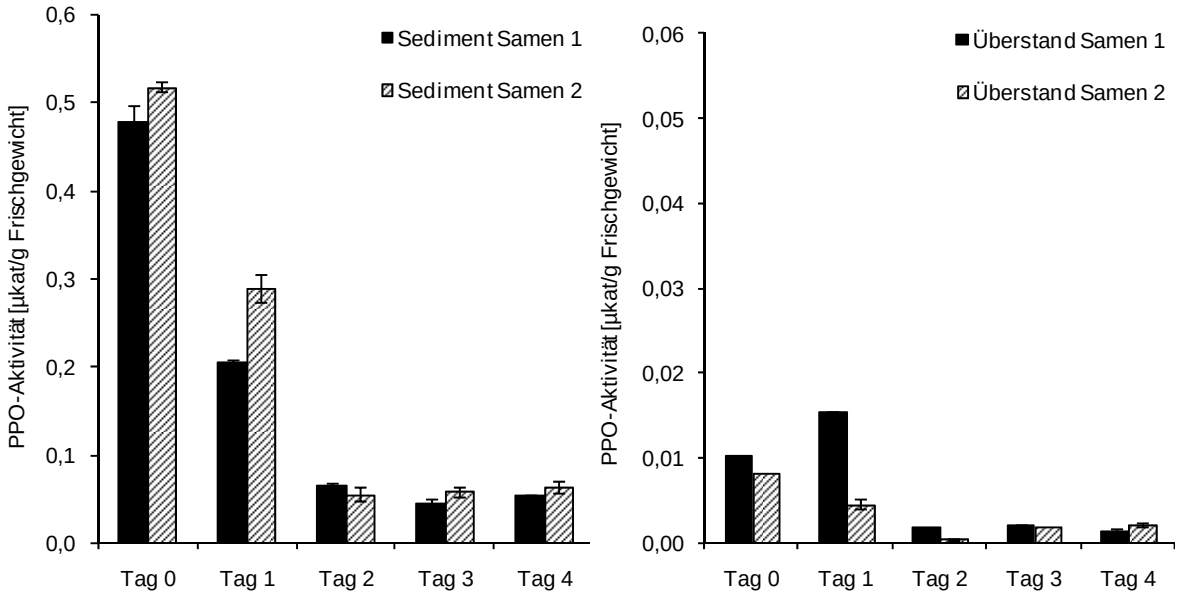


Abbildung 194: PPO-Aktivität einzelner Kakaosamen (Tri1-I) während der Keimung.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. Die zur Messung verwendeten Samen wurden zerkleinert, in cyanidhaltigem SÖRENSEN-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Die PPO-Aktivität wurde sowohl in dem daraus resultierenden Sediment als auch im Überstand gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

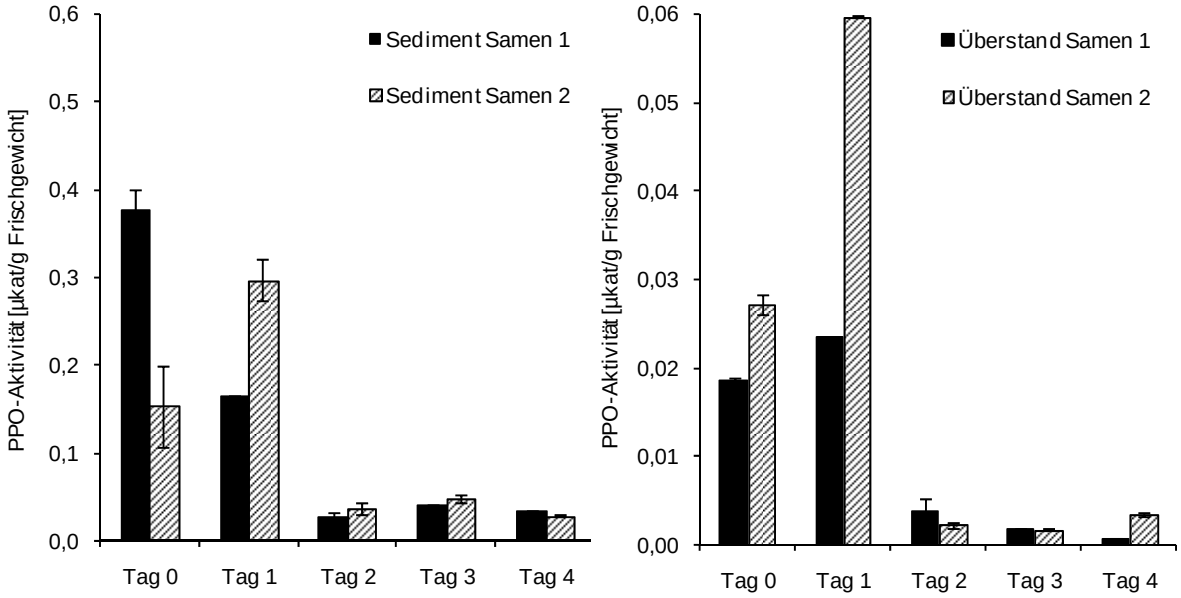


Abbildung 195: PPO-Aktivität einzelner Kakaosamen (Tri2-I) während der Keimung.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. Die zur Messung verwendeten Samen wurden zerkleinert, in cyanidhaltigem SÖRENSEN-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Die PPO-Aktivität wurde sowohl in dem daraus resultierenden Sediment als auch im Überstand gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

PPO-Aktivität der Samen von German Cocoa-Früchte

In den Samen des German Cocoas wurde zu Beginn der Inkubation eine sehr hohe PPO-Aktivität von 5,2 bis 6,8 µkat/g Frischgewicht gemessen. Die Samen der für die Untersuchung der PPO-Aktivität verwendeten German Cocoa-Frucht (GcA-F5) enthielten zudem extrem hohe Polyphenolgehalte (siehe Kapitel 4.2.4).

Nach zweitägiger Inkubation nahm die PPO-Aktivität um etwa die Hälfte auf 2,7 bis 3,3 µkat/g Frischgewicht ab. Wie im vorherigen Abschnitt beschriebenen, wurde in den Samen der anderen untersuchten Kakaovarietäten schon nach zweitägiger Inkubation die niedrigste PPO-Aktivität erreicht. In den Samen des German Cocoas nahm die Aktivität der PPO dagegen noch weiter ab, so dass nach dreitägiger Inkubation eine Restaktivität der PPO von 0,7 bis 0,8 µkat/g Frischgewicht gemessen wurde. Diese Restaktivität entspricht etwa 12 % der Anfangsaktivität.

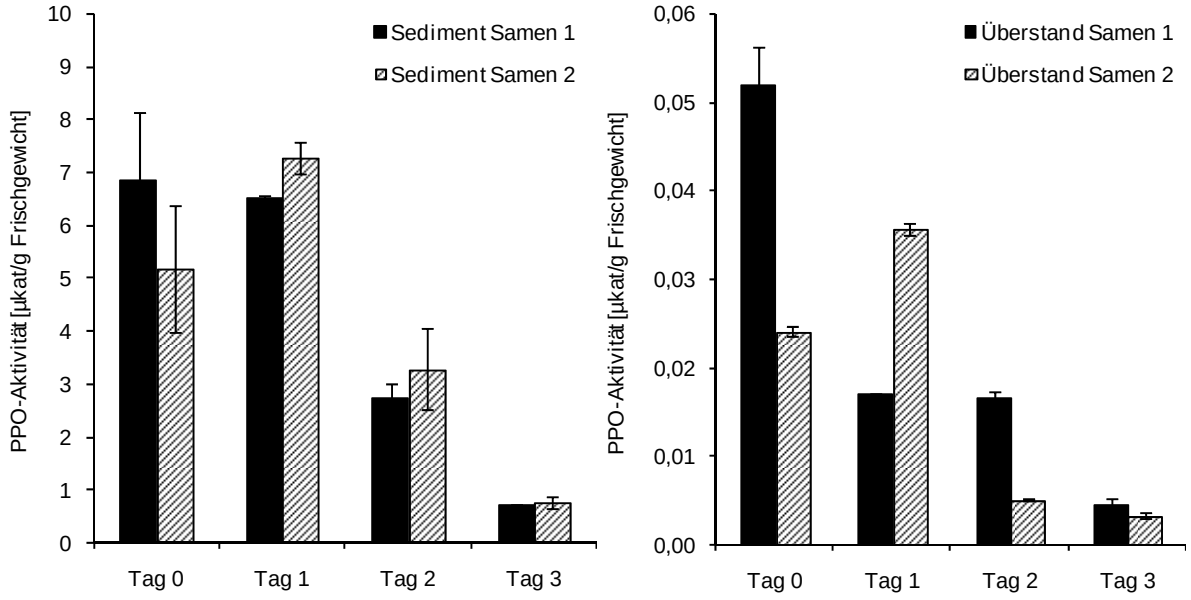


Abbildung 196: PPO-Aktivität einzelner Kakaosamen einer German Cocoa-Frucht (GcA-F5) während der Keimung.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. Die zur Messung verwendeten Samen wurden zerkleinert, in cyanidhaltigem SÖRENSEN-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Die PPO-Aktivität wurde sowohl in dem daraus resultierenden Sediment als auch im Überstand gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.2.8.2 Zusammenfassung

Im Verlauf der Inkubation wurde in allen untersuchten Samen sowohl im untersuchten Sediment als auch im Überstand eine Abnahme der PPO-Aktivität festgestellt.

In den aus Trinidad stammenden Samen war nach zweitägiger Inkubation nur noch eine geringe Restaktivität der PPO von etwa 12 % der Anfangsaktivität vorhanden. Diese blieb bis zum vierten Tag der Inkubation weitgehend unverändert.

Die Samen des German Cocoas wiesen zu Beginn der Inkubation eine etwa zehnmal höhere PPO-Aktivität auf als die anderen untersuchten Samen. Die Aktivität der PPO nahm im Verlauf der Inkubation langsamer ab als in den anderen Samen. Nach zweitägiger Inkubation war fast noch

die Hälfte der ursprünglichen PPO-Aktivität vorhanden. Erst nach dreitägiger Inkubation wurde die PPO-Aktivität stark verringert, so dass nur noch etwa 12 % der Anfangsaktivität vorhanden war.

4.2.9 Aktivität der Proteasen im Verlauf der Inkubation

Bei den gemessenen Aktivitäten der Proteasen handelt es sich um die potentiell in den Samen vorhandene Aktivität. Die Kinetik der Proteinspaltung hängt von unterschiedlichen Faktoren ab. Vor allem die Kinetik der Carboxypeptidase wird auch durch die Spaltprodukte der Aspartylendoprotease bestimmt.

4.2.9.1 Aspartylendoproteaseaktivität

Die Aspartylendoprotease hat ein pH-Optimum von 3,4 und ist bei Temperaturen von 50 bis 55°C, wie sie im Verlauf der Fermentation vorliegen, noch relativ stabil (BIEHL *et al.*, 1993).

Von jeder Probe wurden zwei parallele Aktivitätsbestimmungen durchgeführt, die als zwei unterschiedliche Messpunkte angegeben sind.

Aspartylendoproteaseaktivitäten der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad und der Dominikanischen Republik

Zu Beginn der Inkubationen lag die Aktivität der Aspartylendoprotease der Samen je nach Probe in einem Bereich von 0,13 bis 0,34 µkat/g ffTM.

In den ersten zwei Tagen der Inkubationen stieg die Aktivität in den Samen der meisten Inkubationsreihen zunächst auf durchschnittlich 130 % (± 31) der Anfangsaktivität an. Nach dem Erhöhen der Inkubationstemperatur auf 50°C sank die Aktivität zum vierten Tag der Inkubation auf 0,04 bis 0,20 µkat/g ffTM, so dass sie in einem Bereich von 16 bis 92 % der Anfangsaktivität lag (Mittelwert: 64 % ± 35). Da die Aspartylendoprotease bei Temperaturen um 50°C noch relativ stabil ist, war ihre Aktivität auch nach dem Erhöhen der Temperatur noch relativ hoch.

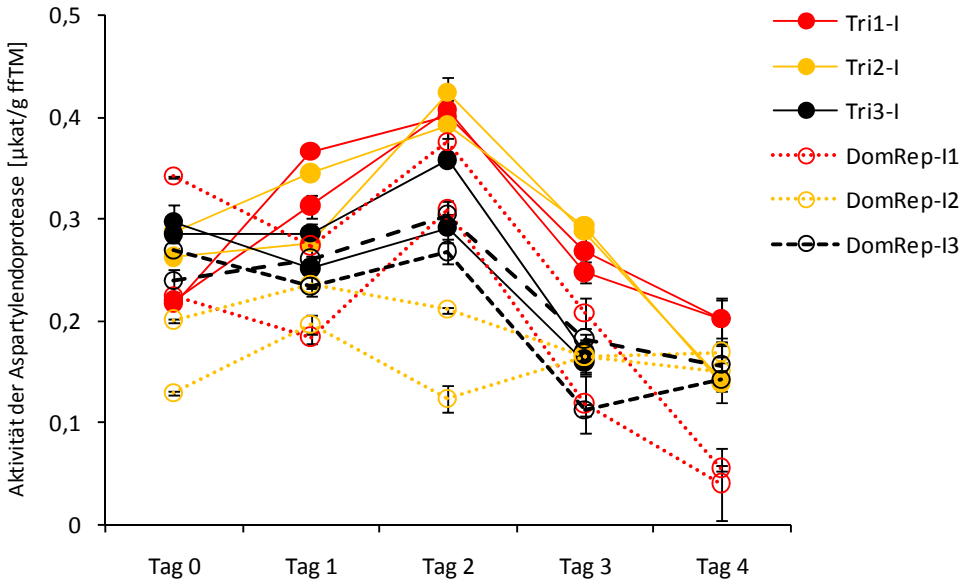


Abbildung 197: Aspartylendoproteaseaktivität in den entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad und der Dominikanischen Republik im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Aspartylendoproteaseaktivitäten der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

In den frischen Samen des German Cocoas lag die Aktivität der Aspartylendoprotease zwischen 0,09 und 0,32 µkat/g ffTM.

Zu Beginn der Inkubation stieg die Aktivität der Aspartylendoprotease in den Samen einiger Inkubationsreihen zunächst etwas an, bevor sie wieder abnahm. Am vierten Tag der Inkubation war die Aktivität auf 0,005 bis 0,11 µkat/g ffTM gesunken. Dies entspricht 3 bis 45 % der Anfangsaktivität der Aspartylendoprotease (Mittelwert: 27 % ± 18).

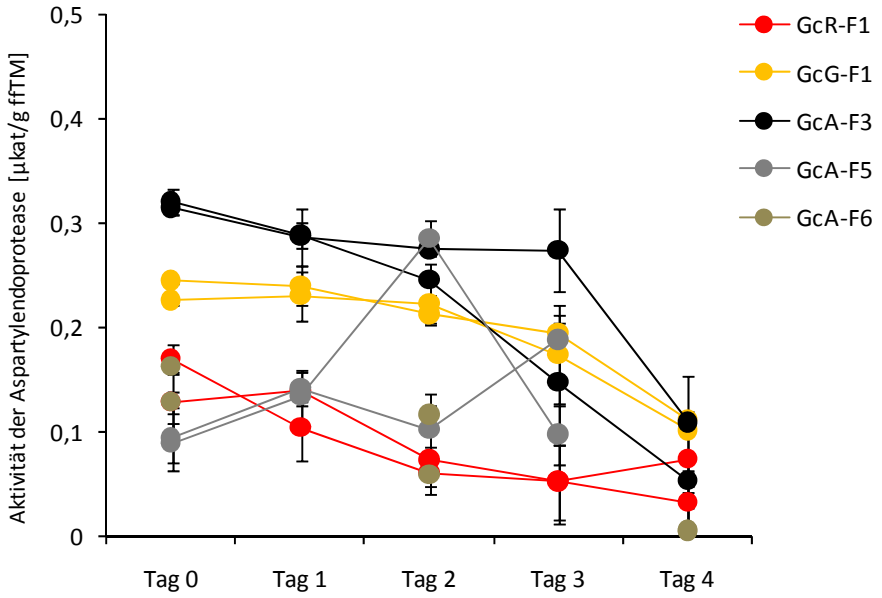


Abbildung 198 Aspartylendoproteaseaktivität in den entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet (außer den Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6). Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.2.9.2 Carboxypeptidaseaktivität

Die Carboxypeptidase spaltet von den durch die Tätigkeit der Aspartylendoprotease gebildeten hydophoben Oligopeptiden die endständigen Aminosäuren ab. Sie hat ein pH-Optimum von 5,8.

Carboxypeptidaseaktivitäten der Samen unterschiedlicher Kakaofrüchte aus Trinidad

Zu Beginn der Inkubationen lag die Aktivität der Carboxypeptidase in den Samen je nach Probe zwischen 0,11 und 0,36 µkat/g ffTM.

In den Samen einiger Inkubationsreihen stieg die Aktivität der Carboxypeptidaseaktivität zunächst etwas an, bevor sie im weiteren Verlauf nach dem Erhöhen der Temperatur auf 50°C am zweiten Tag der Inkubation wieder abnahm. Ab dem dritten Tag war die Aktivität der Carboxypeptidase stark vermindert. Am vierten Tag lag sie in einem Bereich von 0,0004 bis 0,04 µkat/g ffTM und betrug somit nur noch 0,2 bis 41 % der Anfangsaktivität (Mittelwert: 11 % ± 14).

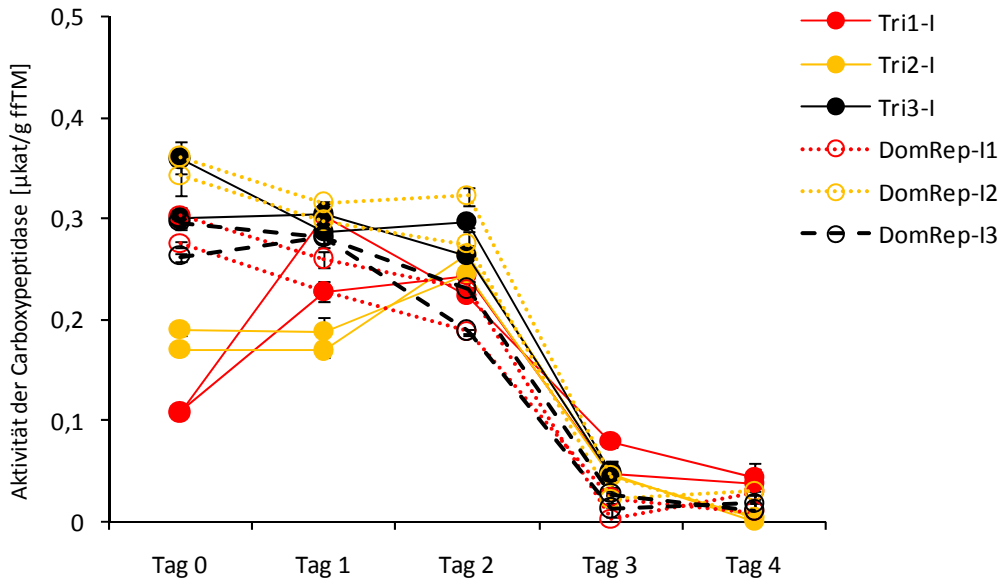


Abbildung 199: Carboxypeptidaseaktivität in den entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad und der Dominikanischen Republik im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.1. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Carboxypeptidaseaktivitäten der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte

Zu Beginn der Inkubationen lag die Aktivität der Carboxypeptidase in den frischen Samen des German Cocoas zwischen 0,29 und 0,42 µkat/g ffTM.

Im Verlauf der Inkubationen nahm die Carboxypeptidaseaktivität ab, so dass sie am vierten Tag in den Samen einiger Proben kaum noch nachweisbar war. Am vierten Tag wurde eine geringe Restaktivität von 0,03 bis 7,3 % der Anfangsaktivität festgestellt (Mittelwert: 3 % ± 2).

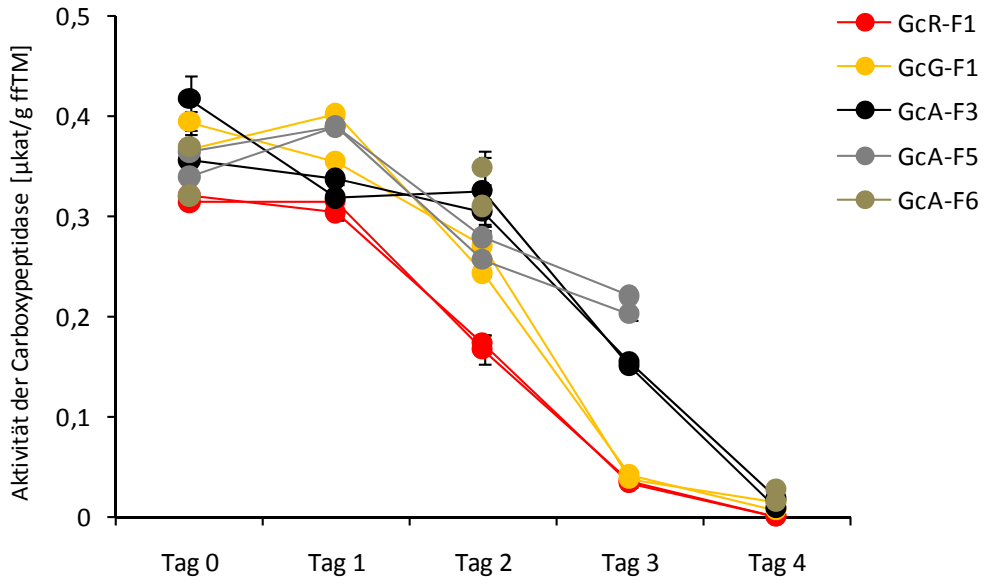


Abbildung 200: Carboxypeptidaseaktivität in den entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation.
Inkubationsbedingungen siehe Kapitel 3.2.2. Nach der Inkubation wurden die Samen getrocknet (außer den Samen der Inkubationsreihen GcA-F5 und GcA-F6). Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

4.2.9.3 Zusammenfassung

Bis zum zweiten Tag der Inkubation stieg die potentiell vorhandene Aktivität der Aspartylendoprotease in den Samen der meisten Inkubationsreihen zunächst an, bevor sie nach dem Erhöhen der Temperatur wieder abnahm. Da die Aspartylendoprotease bei 50°C noch relativ stabil ist (BIEHL *et al.*, 1993), war ihre Aktivität nach dem Erhöhen der Temperatur in den meisten Inkubationsreihen noch relativ hoch. Am vierten Tag waren noch bis zu 92 % der Anfangsaktivität nachweisbar.

Die Aktivität der Carboxypeptidase nahm im Verlauf der Inkubation ab. In den Samen einiger Inkubationsreihen wurde zunächst ein leichter Anstieg der Aktivität festgestellt. Nach dem Erhöhen der Temperatur auf 50°C wurde die Aktivität der Carboxypeptidase stark verringert, so dass sie in den Samen einiger Inkubationsreihen kaum noch nachweisbar war. Die Carboxypeptidase ist demnach bei hohen Temperaturen weniger stabil als die Aspartylendoprotease.

4.3 Charakteristische Unterschiede zwischen Keimung und Inkubation

4.3.1 Vorbemerkung

In den Kapiteln 4.1 und 4.2 wurden der Verlauf der frühen Keimungsphase und der Verlauf der Inkubation anhand mehrerer Parameter beschrieben.

In diesem Kapitel werden der Keimungs- und der Inkubationsverlauf miteinander vergleichend anhand der untersuchten Parameter dargestellt, um die unterschiedlichen Prozesse zu erfassen, welche zum einen zur Entwicklung eines Keimlings und zum anderen zur Bildung der Vorstufen für das kakaotypische Aroma in dem Samen führen.

Die unterschiedlichen Verläufe sind graphisch anhand jeweils eines exemplarischen Verlaufes von Keimung und Inkubation einander gegenüber gestellt.

4.3.2 Wasseraufnahme und pH-Wert in Kakaosamen während der frühen Keimung und der Inkubation

4.3.2.1 Wasseraufnahme

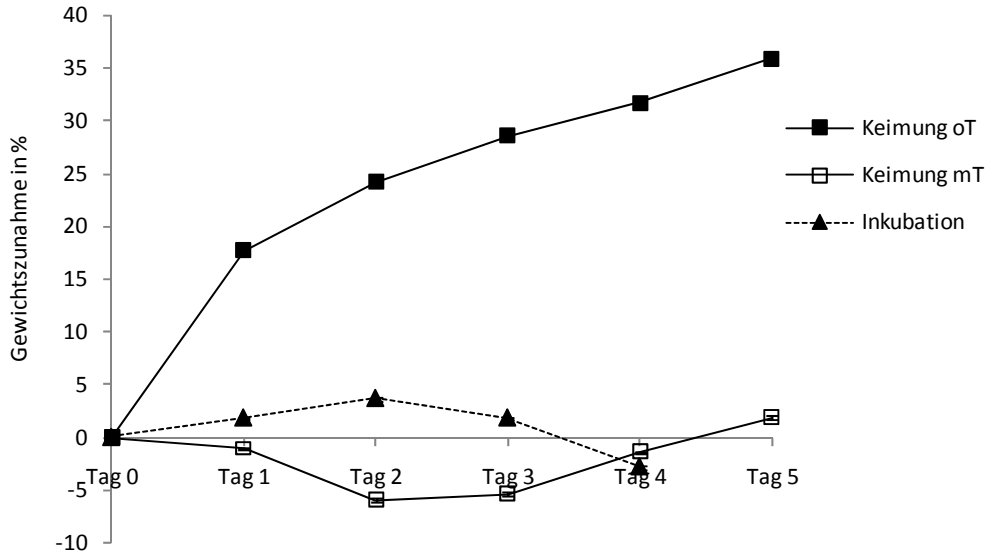


Abbildung 201: Prozentuale Gewichtszu- und Gewichtsabnahme von Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation.
Die Keimung erfolgte mit Testa (mT) bzw. ohne Testa (oT). Angegeben sind die Mittelwerte (n = 5 bis 8). Da bei den Parallelmessungen sehr ähnliche Gewichte gemessen wurden, sind keine Standardabweichungen dargestellt.

Sowohl während der Keimung als auch im Verlauf der Inkubationsversuche wurde eine Zunahme des Wassergehaltes, welche als Gewichtszunahme der Kotyledonen gemessen wurde, festgestellt. Die Wasseraufnahme war sowohl während der Keimung von testalosen Samen als auch im Verlauf der Inkubationsversuche in den ersten 24 Stunden am höchsten.

In den ohne Testa gekeimten Kotyledonen betrug die Wasseraufnahme in den ersten 24 Stunden 6 bis 20 % des Ausgangsgewichtes. In den ersten 24 Stunden der Inkubationsversuche wurde eine Wasseraufnahme von 2 bis 9 % festgestellt. In den ersten 24 Stunden der Keimung wurde

durchschnittlich mehr Wasser aufgenommen als in den ersten 24 Stunden der Inkubation. Dies kann unter anderem auch daran liegen, dass die Keimung mit testalosen Kotyledonen und die Inkubationsversuche mit Samen mit Testa erfolgte. Während einer Keimung von Samen mit Testa wurde die Wasseraufnahme der Kotyledonen maßgeblich verzögert.

Dass sowohl während der frühen Keimung als auch in der ersten Phase der Inkubation eine Wasseraufnahme erfolgte, läßt sich damit erklären, dass der Beginn der Inkubation ähnlich verläuft wie die frühe Keimung. Die physiologischen Prozesse, welche den Beginn der Keimung signalisieren, werden auch in der ersten Phase der Inkubation durchlaufen. Erst durch das Absterben der Samen mit dem Erhöhen der Temperatur und dem Eindringen der Essigsäure in die Samen unterscheiden sich die während der Inkubation ablaufenden Prozesse von denen während der frühen Keimung.

In den reifen Kakaosamen wurde ein Wassergehalt zwischen 27 und 40 % ermittelt. Da es sich bei Kakaosamen um rekalcitrante Samen handelt, enthalten sie im reifen Zustand einen relativ hohen Wassergehalt. Die Wasseraufnahme während der frühen Keimung durch Hydratisierung von getrockneten Strukturen, wie sie bei den Samen vieler anderer Pflanzen, z.B.. Leguminosen statt findet (RUGE, 1966), verläuft daher eher gering. Die Wasseraufnahme erfolgt vor allem durch die Quellung der Proteine, welche anhand des Anschwellens der Proteinvakuolen beobachtet werden kann (BEWLEY und BLACK, 1966; BIEHL *et al.*, 1977).

Im weiteren Verlauf der Inkubation wurde nach dem Erhöhen der Inkubationstemperatur auf 50°C eine Abnahme der Samengewichte festgestellt. Nach 72- bzw. 96-stündiger Inkubation lag das Gewicht der Samen sogar unter dem Anfangsgewicht. Dies hängt mit dem Austreten von Sameninhaltsstoffen nach der Aufhebung der Zellkompartimentierung zusammen.

4.3.2.2 pH-Wert

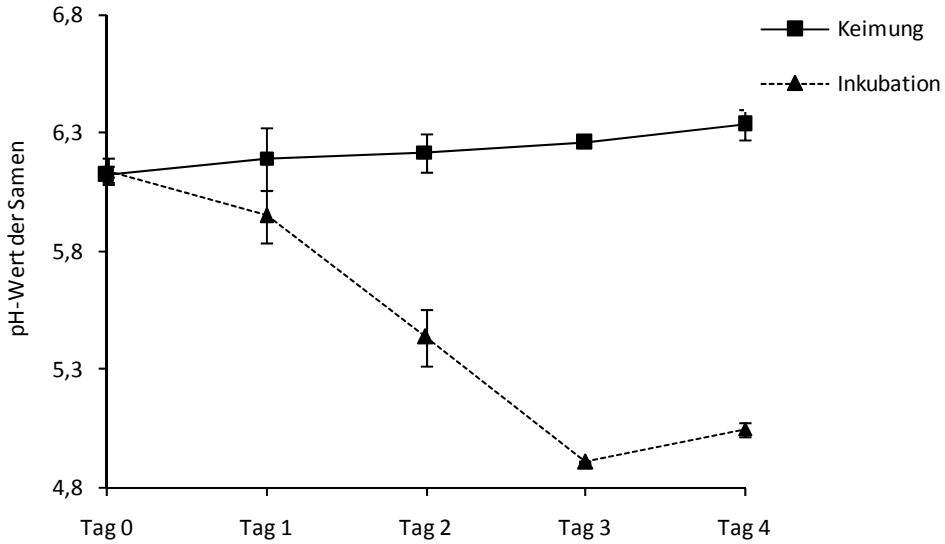


Abbildung 202: pH-Werte der Samen im Verlauf von Keimung und Inkubation.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

In frischen, ungekeimten und nicht inkubierten Samen lag der pH-Wert in einem Bereich von 6,0 bis 6,7.

Während der frühen Keimung blieb der pH-Wert konstant. Im Gegensatz dazu kam es im Verlauf der Inkubation zu einer Aufnahme von Essigsäure aus dem Inkubationsmedium, so dass der pH-Wert in den ersten drei Tagen stark abnahm. Vor allem am zweiten und dritten Tag verlief die Abnahm des pH-Wertes besonders steil.

Nach 72 Stunden Inkubation lag der pH-Wert in einem Bereich von 4,8 bis 5,6. Anschließend stieg der pH-Wert in den Samen der meisten Proben wieder etwas an.

Für den weiteren Verlauf der Inkubation ist die Ansäuerung von großer Bedeutung, da die Proteasen, welche für die Spaltung der Proteine in Oligopeptide und Aminosäuren verantwortlich sind, ihr Optimum im sauren pH-Bereich haben.

Die Ansäuerung der Kotyledonen des Kakaos kann als ein Merkmal für den unterschiedlichen Verlauf von Inkubation und früher Keimung dienen. Durch die Ansäuerung wird deutlich, dass die physikalischen Prozesse in den Samen ab dem zweiten Tag der Inkubation durch die eindringende Essigsäure anders verlaufen werden als während der Keimung.

4.3.3 Gehalt an Proteinen, Oligopeptiden und freien Aminosäuren im Verlauf der frühen Keimung und der Inkubation

4.3.3.1 Proteine

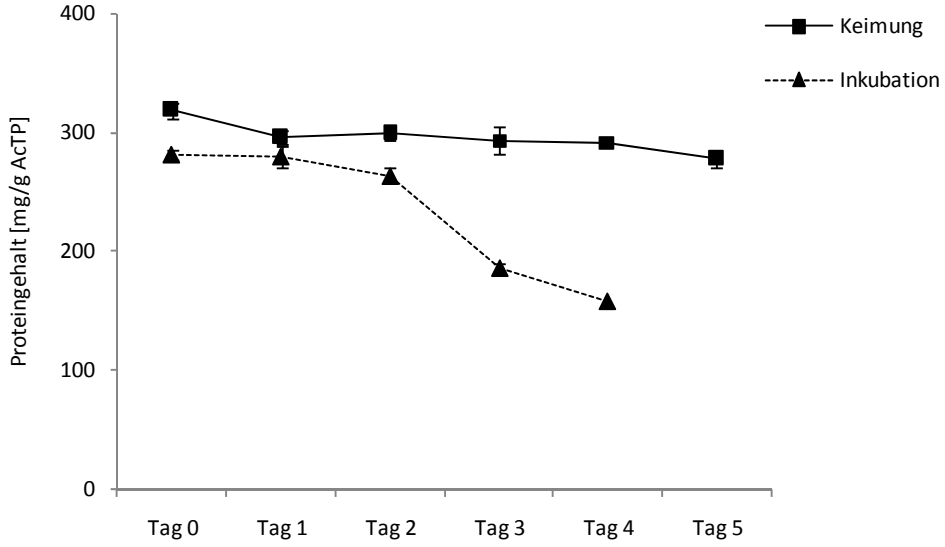


Abbildung 203: Proteingesamtgehalt im Acetontrockenpulver von Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Reife Kakaosamen enthalten einen Proteinanteil von 10 bis 16 % des Trockengewichtes (ZIEGLEDER und BIEHL, 1988). Die Reserveproteine, welche in den Proteinvakuolen der Mesophyllzellen der Kotyledonen vorliegen, bilden einen Großteil der Gesamtproteine und stellen die Hauptsubstanz für die Proteolyse dar.

Während der ersten Tage der Keimung veränderte sich der Proteingehalt der Samen nicht (siehe Abbildung 203). Erst ab dem 6. bis 8. Tag begann der Proteinabbau. Während der Inkubation wurde dagegen schon ab dem dritten Tag eine Abnahme des Proteingehaltes festgestellt.

Da die sameneigenen Proteasen ihr pH-Optimum im sauren pH-Bereich haben (BIEHL und VOIGT, 1982), wurde während der Inkubation eine proteolytische Aktivität durch die Ansäuerung der Kotyledonen mit Essigsäure ausgelöst.

Vor allem nach dem Erhöhen der Inkubationstemperatur auf 50°C fand ein Proteinabbau statt. Beim Erreichen einer Temperatur von etwa 50°C fusionieren die Lipidvakuolen und bilden eine geschlossene lipophile Phase, welche die hydrophilen Plasmaanteile als disperse Phase einschließt (BIEHL, 1973). Diese hydrophilen Einschlüsse stellen die Reaktionsräume für den Proteinabbau dar. Durch diese strukturellen Veränderungen in den Kotyledonen wird der Proteinabbau während der Inkubation begünstigt. Zudem ist die Aspartylendoprotease, welche für die Spaltung der Proteine im Bereich der hydrophoben Aminosäuren verantwortlich ist, bei einer Temperatur von 50 bis 55°C noch relativ stabil (BIEHL *et al.*, 1993).

Der Abbau der Proteine lässt sich auch an der Zunahme der Oligopeptide und der freien Aminosäuren erkennen, bei welchen es sich um die Abbauprodukte der Proteine handelt.

Anhand der Auftrennung der Proteine mit Hilfe einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970) war zu erkennen, dass sowohl während der Inkubation als auch während der frühen Keimung ein Proteinabbau stattgefunden hat. Während der frühen Keimung wurde der Proteinabbau jedoch erst nach sechs- bis achttägiger Keimung erkennbar.

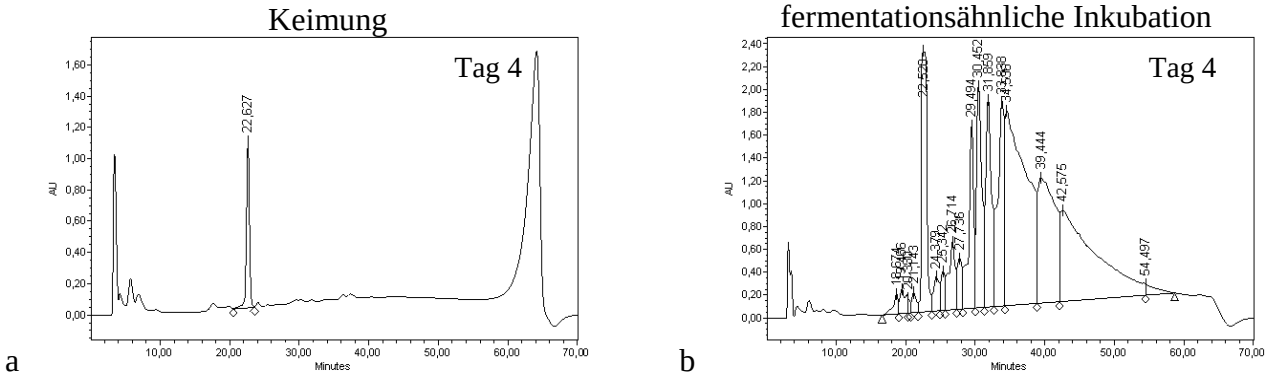
Die Albumine wurden langsamer als die Globuline abgebaut. Die Globuline wurden im Verlauf einer viertägigen Inkubation fast vollständig abgebaut. Im Gegensatz dazu wurden die Globuline während der Keimung weniger stark abgebaut. Das Globulin bei 31 kDa erfuhr auch während einer zehntägigen Keimung kaum einen Abbau. Während der Keimung wurde vor allem das Globulin bei 43 kDa abgebaut.

Im Verlauf der Inkubation fand auch ein Abbau der beiden Albumine bei 19 und 13 kDa statt, besonders des Albumins bei 19 kDa. Während der Keimung war kein Abbau der Albumine zu erkennen.

Der Abbau der Speicherproteine verlief während der frühen Keimung langsamer als im Verlauf der Inkubation. Ein schneller Proteinabbau erfolgte nur nach dem Ansäuern der Kotyledonen durch das Eindringen von Essigsäure.

Anhand des Proteinabbaus lassen sich die Verläufe der frühen Keimung und der fermentationsähnlichen Inkubation unterscheiden. Der langsamere und später einsetzende Proteinabbau während der frühen Keimung unterscheidet sich von dem sehr schnellen Proteinabbau während der Inkubation und kann daher als ein Indikator für die fortschreitende Entwicklung der Keimung angesehen werden.

4.3.3.2 Oligopeptide



a b

Abbildung 204: Oligopeptidspektren von Samen am 4. Tag der a) Keimung und b) Inkubation

Frische Kakaosamen enthielten einen sehr geringen Oligopeptidgehalt.

Im Verlauf der fermentationsähnlichen Inkubation stieg der Gehalt an Oligopeptiden bereits nach dem 1. bis 2. Tag, parallel zur Abnahme des pH-Wertes in den Kotyledonen, durch die Aktivität der Aspartylendoprotease an, so dass die Samen nach dem 4. Tag hohe Gehalte an Oligopeptiden aufwiesen. Fermentierte Kakaosamen enthalten eine um etwa 55 % höhere Oligopeptidkonzentration als unfermentierte Kakaosamen (HASHIM *et al.*, 1998).

Im Verlauf einer sechstägigen Keimung wurde dagegen keine Zunahme des Oligopeptidgehaltes festgestellt.

In frischen Kakaosamen setzten sich die Oligopeptide aus etwa gleich vielen hydrophoben Aminosäuren (35 bis 41 %) und sauren Aminosäuren und deren Säureamiden (33 bis 45 %) zusammen. Während der frühen Keimung wurde keine Veränderung dieser Zusammensetzung festgestellt. Dagegen stieg der Anteil an sauren Aminosäuren und deren Säureamiden am Gesamtgehalt der Aminosäuren der Oligopeptide im Verlauf der Inkubation an, so dass die Oligopeptide nach einer viertägigen Inkubation zu über 50 % aus sauren Aminosäuren und deren Säureamiden bestanden. Besonders hoch waren hierbei die Anteile an Asparaginsäure und Glutaminsäure. Dieses Ergebnis weist auf die Spaltungscharakteristik der Carboxypeptidase hin, welche die hydrophoben Aminosäuren von den Oligopeptiden abgespaltet.

Die Analyse des Oligopeptidgehaltes und der freien Aminosäuren kann als Unterscheidungsmerkmal für den Verlauf von Keimung und fermentationsähnlicher Inkubation dienen. Gekeimte und inkubierte Samen lassen sich anhand ihres Oligopeptidgehaltes und der Zusammensetzung der Aminosäuren der Oligopeptide unterscheiden.

Für die Qualität des Rohkakaos ist die Bildung von hydrophilen Oligopeptiden von maßgeblicher Bedeutung, da sie zusammen mit den Aminosäuren wichtige Aromavorstufen darstellt. Nur in Gegenwart von Oligopeptiden entsteht beim Rösten das typische Kakaoaroma (MOHR *et al.*, 1976; VOIGT *et al.*, 1994).

4.3.3.3 Freie Aminosäuren

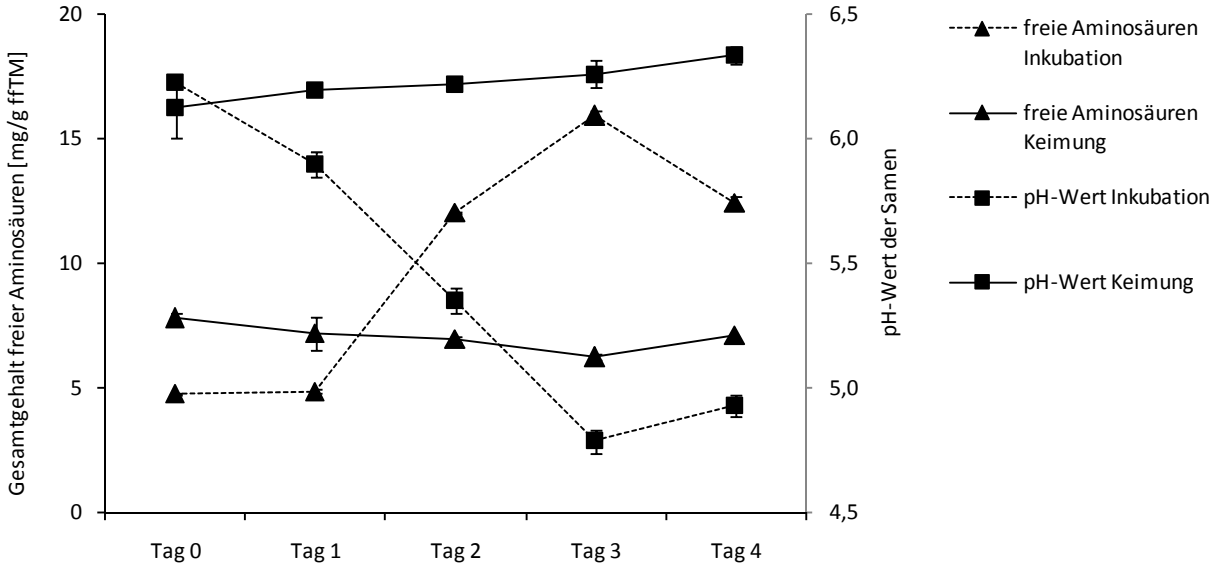


Abbildung 205: Gesamtgehalt an freien Aminosäuren und pH-Werte von Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Die Veränderung des Gehaltes an freien Aminosäuren ist ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal von Keimung und fermentationsähnlicher Inkubation. Während der ersten Tage der Keimung veränderte sich der Aminosäuregehalt in den Kakaosamen nur wenig, wohingegen er im Verlauf der Inkubation stark zugenommen hat (Tabelle 12).

Nach dem vierten Tag der Inkubation war der Gehalt an freien Aminosäuren in den inkubierten Samen auf 350 % (± 62) des Anfangsgehaltes angestiegen. Während der Keimung veränderte er sich in den ersten vier Tagen dagegen kaum. Zu Beginn der Keimung nahm der Aminosäuregehalt zunächst in den Samen einiger Proben etwas ab. Dies liegt vermutlich daran, dass die Aminosäuren in Stoffwechselprozessen wie der Synthese von Proteinen verbraucht werden. Erst ab dem fünften bis zehnten Tag stieg der Gehalt an freien Aminosäuren an, so dass die Samen nach zehntägiger Keimung 133 % (± 14) des Anfangsgehaltes enthielten.

Tabelle 12: Zunahme des Gehaltes an freien Aminosäuren [%] bezogen auf den Anfangsgehalt in entfetteten Kakaosamen während der Keimung und der fermentationsähnlicher Inkubation.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=4 bis 22) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

	Tag 1	**Tag 2**	**Tag 3**	**Tag 4**	**Tag 5**	**Tag 6**	**Tag 10**
	[%]						
Keimung	85 ± 34	91 ± 36	115 ± 25	105 ± 44	122 ± 32	123 ± 38	133 ± 14
Inkubation	114 ± 19	195 ± 48	301 ± 65	350 ± 62			

Aminosäuren werden während der Fermentation durch die enzymatische Proteolyse vor allem der Speicherproteine gebildet. Die an diesem Vorgang beteiligten sameneigenen Proteasen haben ihr Optimum im sauren pH-Bereich.

Während der fermentationsähnlichen Inkubation nahm der pH-Wert durch das Eindringen der Essigsäure in den Samen ab. Parallel zu dieser Abnahme stieg der Gehalt an freien Aminosäuren an (Abbildung 205). Während der ersten Tage der Keimung blieb der pH-Wert der Samen dagegen weitgehend konstant.

Durch die spezifische Aktivität der sameneigenen Proteasen werden hauptsächlich hydrophobe Aminosäuren frei (BIEHL und VOIGT, 1995). In den frischen Samen lag der durchschnittliche Anteil an hydrophoben Aminosäuren zwischen 7 und 27 % des Gesamtgehaltes

Tabelle 13). Die frischen, aber an der Sonne getrockneten Samen enthielten einen höheren Anteil an hydrophoben Aminosäuren von 36 bis 44 %. Der Anteil an sauren Aminosäuren und deren Säureamiden am Gesamtgehalt der freien Aminosäuren in frischen Samen lag in einem Bereich von 66 bis 79 %. Besonders hoch waren die Gehalte an Asparagin, Asparaginsäure und Glutaminsäure.

Der Verlauf der Inkubation ist durch einen starken Anstieg der Gehalte an hydrophoben Aminosäuren gekennzeichnet. Vor allem die Gehalte an Leucin und Phenylalanin nahmen um mehr als das Zehnfache des Anfangsgehaltes zu, so dass der Anteil an hydrophoben Aminosäuren nach dem vierten Tag der Inkubation auf 48 bis 62 % angestiegen waren.

Während der ersten Tage der Keimung blieb das Verhältnis von hydrophoben Aminosäuren zu sauren Aminosäuren und deren Säureamiden weitgehend konstant. In den Samen einiger Proben nahm der Anteil an hydrophoben Aminosäuren vor allem ab dem fünften bis sechsten Tag etwas zu, und der Anteil der sauren Aminosäuren und deren Säureamiden nahm ab. Die Prozesse, die im Verlauf der Inkubation zur Aktivität der sameneigenen Proteasen und zu einem schnellen Anstieg des Gehaltes an freien Aminosäuren führen, finden während der Keimung in einer langsameren Form statt.

Aufgrund des spezifischen, schnellen Abbaus der Speicherproteine während der Inkubation und der damit verbundenen Zunahme des Gesamtgehaltes der freien Aminosäuren sowie der Veränderung der Zusammensetzung von hydrophoben und sauren Aminosäuren und deren Säureamiden, ist eine Unterscheidung von Keimung und Inkubation möglich, so dass diese Merkmale als Indikatoren für die Keimung bzw. die Inkubation verwendet werden können.

Tabelle 13: Zusammensetzung der freien Aminosäuren in frischen, frisch getrockneten, inkubierten, inkubiert getrockneten oder gekeimten Kakaosamen unterschiedlicher Herkunft.
Angegeben sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

		Tag 0	Tag 4 Keimung	Tag 6 Keimung	Tag 4 Inkubation	Tag 0	Tag 4 Keimung	Tag 6 Keimung	Tag 4 Inkubation
		Hydrophobe Aminosäuren [%]				Saure Aminosäuren [%]			
WAA	ungetrocknet	17 ± 3,6	9 ± 2,1	13 ± 0,2	61 ± 0,1	77 ± 1,9	81 ± 6,7	65 ± 8,6	16 ± 1,8
SNK 13	ungetrocknet	27 ± 5,2	25 ± 5,9	31 ± 7,8		66 ± 6,1	63 ± 5,9	52 ± 4,5	
SNK 13	getrocknet	44 ± 8,7			49 ± 0	43 ± 3,7			14 ± 0
ICS 40	ungetrocknet	7 ± 0,5	10 ± 1,3	18 ± 2,9		92 ± 0,2	87 ± 0,7	76 ± 5,8	
ICS 40	getrocknet	36 ± 2,4			50 ± 0	49 ± 12			15 ± 0
T 79/501	ungetrocknet	25 ± 3,1	25 ± 0,4	25 ± 1,2		70 ± 4,0	61 ± 0,1	65 ± 4,6	
T 79/501	getrocknet	38 ± 13			48 ± 0	48 ± 10			16 ± 0
German Cocoa	ungetrocknet	24 ± 4,4	25 ± 6,0	25 ± 6,0	62 ± 0	70 ± 4,1	63 ± 6,5	63 ± 6,5	14 ± 0
German Cocoa	getrocknet	42 ± 5,0			55 ± 4,3	46 ± 3,9			18 ± 7,6

4.3.3.4 γ-Aminobuttersäure

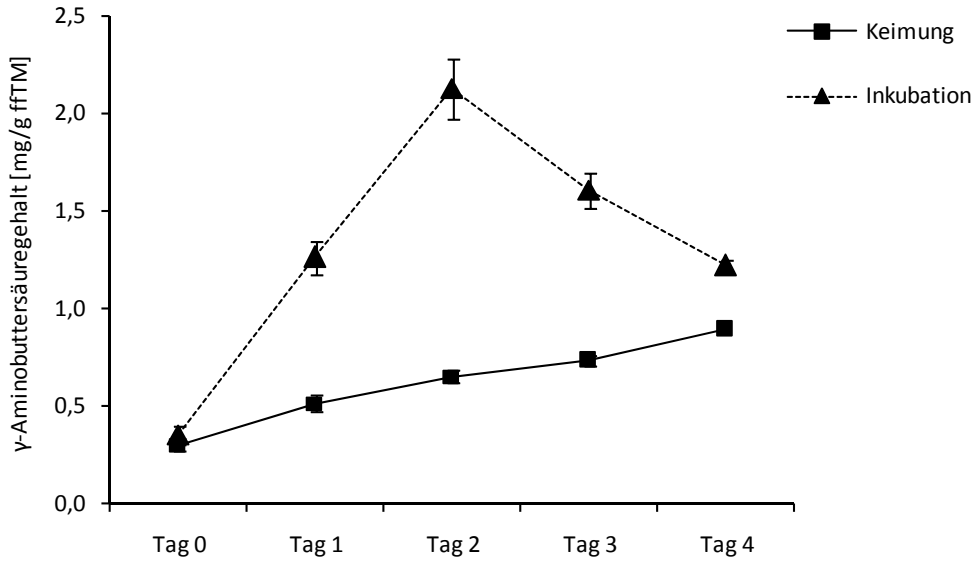


Abbildung 206: γ-Aminobuttersäuregehalt in entfetteten Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Frische Samen enthielten einen geringen γ-Aminobuttersäuregehalt von 0 bis 0,55 mg/g ffTM. Frische, aber getrocknete Samen enthielten einen durch die Trocknung bedingten höheren γ-Aminobuttersäuregehalt (0,8 bis 1,7 mg/g ffTM, siehe Tabelle 14). Da es sich bei den Kakaosamen um rekalcitrante Samen handelt, kann bei Überreife die Keimung schon in der

Frucht erfolgen, so dass die Samen unterschiedliche Stadien der physiologischen Reife und somit unterschiedliche γ-Aminobuttersäuregehalte aufweisen können. Die γ-Aminobuttersäure kann demzufolge vermutlich auch als ein Indikator für die Reife von Kakaofrüchten verwendet werden.

Sowohl während der Keimung als auch in der ersten Phase der Inkubation stieg der γ-Aminobuttersäuregehalt an. Allerdings verlief der Anstieg des γ-Aminobuttersäuregehaltes während der Keimung wesentlich langsamer als im Verlauf der Inkubation.

Während der γ-Aminobuttersäuregehalt über den gesamten untersuchten Zeitraum der Keimung anstieg, nahm er in den Samen im Verlauf der Inkubation, vor allem nach dem Erhöhen der Inkubationstemperatur auf 50°C und dem damit verbundenen Absterben der Samen, wieder ab, unter anderem durch den Austritt der γ-Aminobuttersäure aus den Samen.

Da die Veränderungen des γ-Aminobuttersäuregehaltes während der ersten Tage der Keimung und der Inkubation unterschiedlich verlaufen, kann γ-Aminobuttersäure als ein Unterscheidungsmerkmal zwischen der Entwicklung der Samen während der Keimung und den während der Inkubation ablaufenden Prozessen angesehen werden.

Tabelle 14: γ-Aminobuttersäuregehalt in frischen, frisch getrockneten, inkubierten, inkubiert getrockneten oder gekeimten Kakaosamen unterschiedlicher Herkunft.
Angegeben sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

		Tag 0	**Tag 2 Inkubation**	**Tag 4 Keimung**
		[mg/g ffTM]		
WAA	ungetrocknet	0,4 ± 0,2	2,2 ± 0,4	0,6 ± 0,3
SNK 13	ungetrocknet	0,4 ± 0,1		0,9 ± 0,1
SNK 13	getrocknet	1,4 ± 0,0	2,6 ± 0,0	
ICS 40	ungetrocknet	0,5 ± 0,5		0,9 ± 0,1
ICS 40	getrocknet	1,7 ± 0,0	2,3 ± 0,0	
T 79/501	ungetrocknet	0,3 ± 0,2		1,4 ± 0,4
T 79/501	getrocknet	1,1 ± 0,0	1,9 ± 0,0	
German Cocoa	ungetrocknet	0,3 ± 0,3	1,6 ± 0,1	0,6 ± 0,4
German Cocoa	getrocknet	0,8 ± 0,2	2,4 ± 0,5	

4.3.4 Phenolische Substanzen

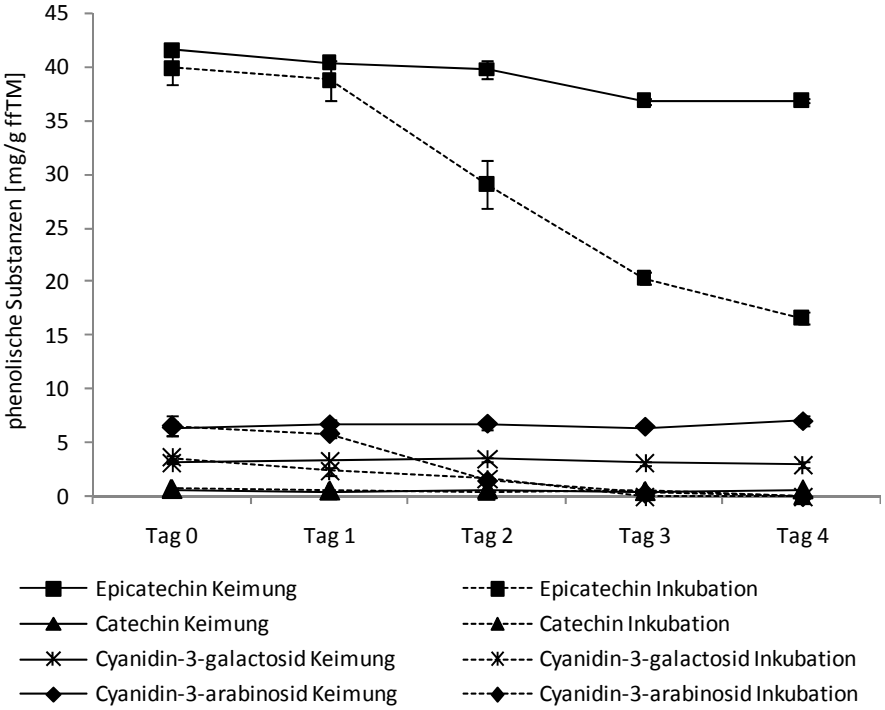


Abbildung 207: Phenolische Substanzen in entfetteten Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

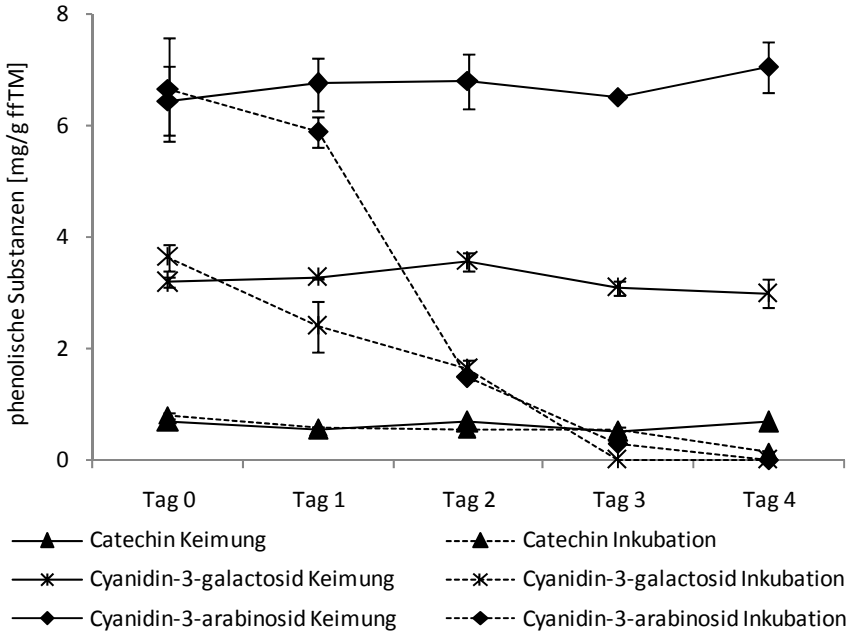


Abbildung 208: Phenolische Substanzen in entfetteten Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Die Samen der untersuchten Kakaovarietäten enthielten sehr unterschiedliche Gehalte an phenolischen Substanzen. Besonders hoch waren die Anthocyangehalte in den Samen des German Cocoas (Tabelle 15).

Im Verlauf der Inkubation nahmen die Gehalte der phenolischen Substanzen in den Kotyledonen der Kakaosamen ab, so dass die inkubierten Samen nur noch 33 % (± 12) des Ausgangsgehaltes an Epicatechin und 39 % (± 20) an Catechin enthielten. Anthocyane waren in den inkubierten Samen zumeist nicht mehr nachweisbar.

Die Abnahme der phenolischen Substanzen erfolgte vor allem ab dem zweiten Tag der Inkubation. In frischen Kakaosamen werden die phenolischen Substanzen in den Vakuolen der Polyphenolspeicherzellen im Mesophyll der Kotyledonen gespeichert. (BIEHL, 1973). Nach der Aufhebung der subzellulären Kompartimentierung während der Inkubation wurden sie frei. Ein Teil der phenolischen Substanzen trat im Verlauf der Inkubation in das umgebende Medium aus. Der größere Teil wurde jedoch mit dem Eindringen von Sauerstoff am Ende der Inkubation durch Vergerbungsreaktionen mit den reaktiven Gruppen von Aminosäuren, Peptiden oder Proteinen an diese gebunden, so dass er nicht mehr extrahierbar und daher nicht mehr nachweisbar war.

Im Verlauf der frühen Keimung veränderten sich die Gehalte der phenolischen Substanzen dagegen nur wenig.

Bei den phenolischen Substanzen handelt es sich um ein eindeutiges Unterscheidungsmerkmal für den Verlauf von Keimung und Inkubation.

Die Anthocyane, welche für die charakteristische Färbung, vor allem des violetten Fermentationsstadiums verantwortlich sind, können zudem als optisches Unterscheidungsmerkmal für den Verlauf von Fermentation und Keimung dienen. In den inkubierten Samen der meisten Proben wurden nach 3- bis 4-tägiger Inkubation keine Anthocyane mehr nachgewiesen. Der Anthocyangehalt kann daher als Indikator für die Fermentation dienen. In gut fermentiertem Rohkakao sollte der Anthocyangehalt sehr gering sein. Im Gegensatz dazu veränderte sich der Anthocyangehalt in den Samen im Verlauf der frühen Keimung nur geringfügig.

Tabelle 15: Durchschnittliche Gehalte an phenolischen Substanzen in frischen Kakaosamen unterschiedlicher Herkunft.
Angegeben sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

	Epicatechin	**Catechin**	**Cyanidin-3-galactosid**	**Cyanidin-3-arabinosid**
	[mg/g ffTM]			
WAA	36 ± 9	0,6 ± 0,1		
SNK 13	36 ± 8	1,1 ± 0,2	2,6 ± 1,4	4,4 ± 2,8
ICS 40	43 ± 9	0,8 ± 0,2	1,9 ± 1,0	6,2 ± 3,0
T 79/501	25 ± 2	0,5 ± 0,3	2,5 ± 0,9	6,4 ± 3,4
SNK 64	52 ± 3	1,7 ± 0,0	0,9 ± 0,0	4,6 ± 0,0
ICS 84	45 ± 1	1,9 ± 0,0	1,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1
German Cocoa	45 ± 13	0,9 ± 0,4	5,1 ± 3,1	14,2 ± 7,7
Catongo	24 ± 0	1,3 ± 0,0	2,5 ± 0,1	5,4 ± 0,2

4.3.5 Zuckergehalt

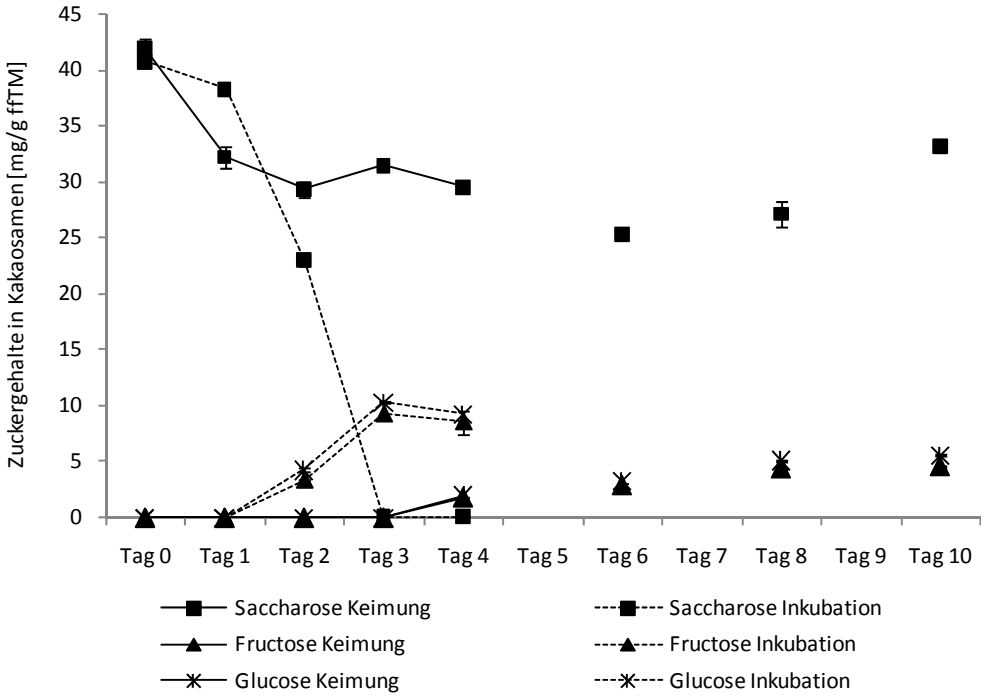


Abbildung 209: Zuckergehalte in entfetteten Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

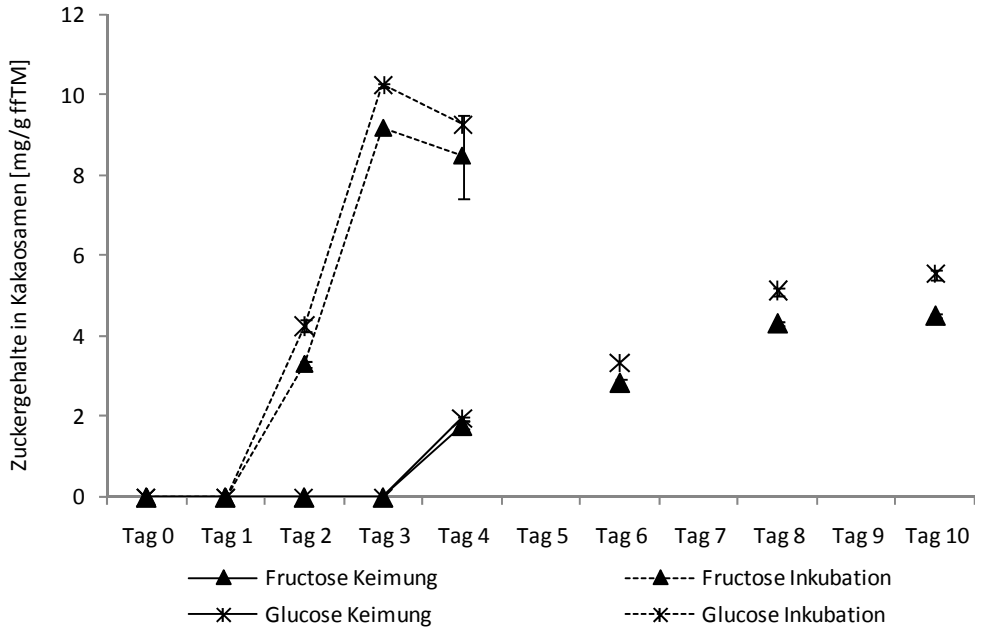


Abbildung 210: Zuckergehalte in entfetteten Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Sowohl während der Inkubation als auch während der Keimung nahm der Saccharosegehalt in den Kakaosamen ab. Im Verlauf der Inkubation verlief diese Abnahme schneller als im Verlauf der Keimung. Während der Keimung nahm der Saccharosegehalt in den ersten sechs Tagen ab. Anschließend stieg er wieder an, vermutlich durch den Abbau von Reservestärke.

Die frischen Samen enthielten zwischen 26 und 47 mg/g ffTM Saccharose. Nach sechstägiger Keimung betrug der Saccharosegehalt noch 53 bis 94 % des Anfangsgehaltes. Im Verlauf der Inkubation nahm der Gehalt stärker ab, so dass die inkubierten Samen nur noch 13 bis 42 % des Anfangsgehaltes an Saccharose enthielten. In einigen Samen war bereits nach dreitägiger Inkubation keine Saccharose mehr nachweisbar.

Da Fructose und Glucose durch die Hydrolyse der Saccharose entstehen, stiegen ihre Gehalte im Verlauf der Inkubation und der Keimung an.

In frischen Samen wurde weder Fructose noch Glucose nachgewiesen. Ab dem vierten bis sechsten Tag der Keimung wurden diese reduzierenden Zucker in den Samen nachgewiesen. Nach sechstägiger Keimung enthielten die Samen 1,3 bis 2,8 mg/g ffTM Fructose und 1,5 bis 3,3 mg/g ffTM Glucose.

Im Verlauf der Inkubation stiegen die Gehalte der reduzierenden Zucker ab dem zweiten Tag an, so dass die Samen am dritten bis vierten Tag 3,5 bis 18,0 mg/g ffTM Fructose und 6,6 bis 12,3 mg/g ffTM Glucose enthielten.

Nach ZIEGLEDER und BIEHL (1988) ist in gut fermentierten Samen keine Saccharose mehr nachweisbar (weniger als 0,1 % des Trockengewichtes). Die Fructose- und Glucosegehalte steigen dagegen auf etwa 0,6 % des Trockengewichtes der Kotyledonen an.

Inkubierte und gekeimte Samen lassen sich anhand ihres Zuckergehaltes unterscheiden, da der Saccharoseabbau im Verlauf der Inkubation wesentlich schneller erfolgt als im Verlauf der Keimung. Gekeimte Samen sind durch einen höheren Saccharoseanteil als inkubierte Samen gekennzeichnet. Der starke Abbau der Saccharose ist ein Merkmal des Inkubationsverlaufes. Zudem ist der Gehalt an Fructose und Glucose in inkubierten Samen höher als in gekeimten Samen.

Die Bildung von Fructose und Glucose während der Inkubation kann als ein für das Kakaoaroma relevanter Unterschied von Fermentation und Keimung betrachtet werden. Zwar stiegen die Gehalte dieser Zucker auch während der Keimung an, jedoch geringer und zu einem späteren Zeitpunkt als während der Inkubation.

4.3.6 Methylxanthine (Theobromin und Coffein)

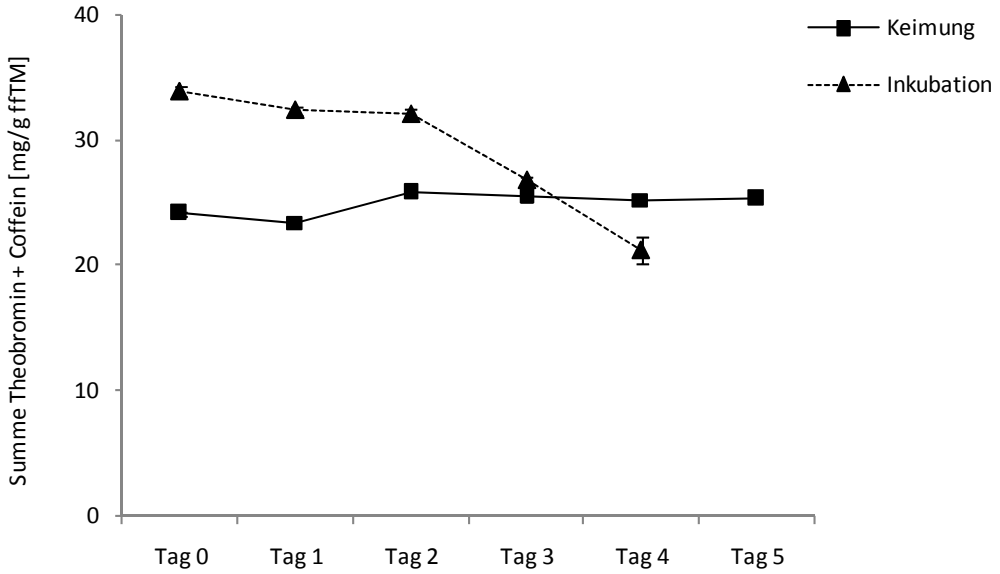


Abbildung 211: Summe Theobromin + Coffein in entfetteten Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation.
Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Kakaosamen enthalten einen außergewöhnlich hohen Gehalt an Theobromin. Im Verlauf der Inkubation wurde vor allem nach dem Erhöhen der Temperatur auf 50°C eine Abnahme des Theobromin- und zumeist auch des Coffeingehaltes nachgewiesen. Im Verlauf der Keimung haben sich die Gehalte an Theobromin und Coffein dagegen nicht verändert hat.

Da die Abnahme des Theobromingehaltes im Verlauf der Inkubation nicht in allen Proben feststellbar war, kann Theobromin nur bedingt als biochemischer Indikator für den Verlauf der Inkubation und der Keimung dienen.

Eine Abnahme des Coffeingehaltes war nur einigen Inkubationsreihen feststellbar, so dass durch die Untersuchung des Coffeingehaltes keine Aussagen über den Verlauf von Keimung oder Inkubation möglich sind.

Die Samen der untersuchten Kakaovarietäten wiesen sehr unterschiedliche Theobromin- und Coffeingehalte auf (Tabelle 16).

Das Verhältnis Theobromin/Coffein stieg im Verlauf der Inkubation in den Samen der meisten Proben etwas an. Zu Beginn der Inkubation betrug der aus den untersuchten Proben errechnete Mittelwert des Verhältnisses Theobromin/Coffein 19,2 (± 11). Nach dreitägiger Inkubation stieg es auf 20,6 (± 12) an. Da die Samen der einzelnen Proben sehr unterschiedliche Gehalte an Methylxanthinen aufwiesen, welche teilweise im Verlauf von Inkubation und Keimung Schwankungen aufgrund des heterogenen Ausgangsmaterials unterlagen, sind die ermittelten Standardabweichungen verhältnismäßig hoch.

Die durchschnittliche Summe aus Theobromin und Coffeingehalt nahm im Verlauf der Inkubation von 34 mg/g ffTM (± 9) auf 23 mg/g ffTM (± 9) ab.

Während der Keimung haben sich das Verhältnis Theobromin/Coffein und die Summe aus Theobromin und Coffein kaum verändert.

Tabelle 16: Theobromin- und Coffeingehalte frischer Kakaosamen unterschiedlicher Herkunft. Angegeben sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Varietät	**Theobromin** [mg/g ffTM]	**Coffein** [mg/g ffTM]	**Theobromin/ Coffein**	**Σ Theobromin + Coffein** [mg/g ffTM]
WAA	30 ± 4	2,1 ± 2,2	19 ± 13	32 ± 6
SNK 13	48 ± 10	4,9 ± 1,1	10 ± 4	53 ± 9
ICS 40	36 ± 19	4,4 ± 0,6	9 ± 5	41 ± 18
T 79/501	23 ± 4	1,3 ± 0,5	18 ± 3	24 ± 5
German Cocoa	34 ± 7	1,2 ± 0,9	22 ± 5	35 ± 7

4.3.7 Polyamine

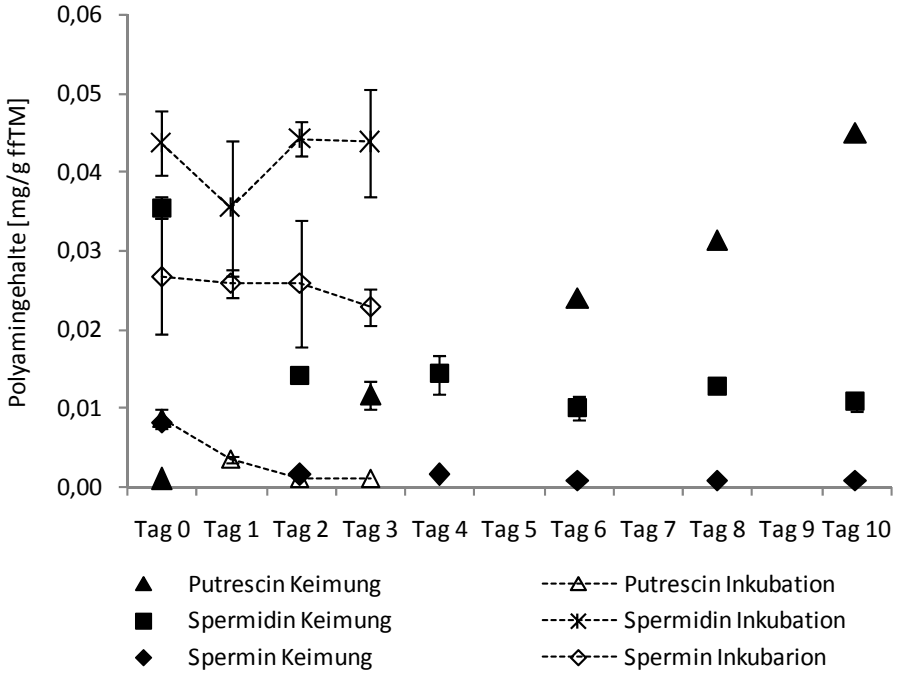


Abbildung 212: Polyamingehalte in entfetteten Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Während der ersten Tage der Keimung nahm der Putrescingehalt zunächst ab, bevor er ab dem vierten bis sechsten Tag wieder anstieg.

Die Spermidin- und Spermingehalte nahmen während der Keimung in den Samen der meisten Proben ab. In einigen Keimungsreihen stiegen sie zum Ende des untersuchten Keimungszeitraumes wieder an.

Während der fermentationsähnlichen Inkubationen blieben die Gehalte an Putrescin, Spermidin und der Spermin weitgehend unverändert.

Die untersuchten Polyamine verhalten sich während Keimung und Inkubation unterschiedlich. Da sie während der Keimung vermutlich an den Zellteilungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt sind (SAWHNEY *et al.*, 1985), stiegen die Putrescingehalte im Verlauf der Keimung an, wohingegen die Spermidin- und Spermingehalte zumeist abnahmen. Während der Inkubation veränderten sich die Polyamingehalte dagegen nicht.

4.3.8 Polyphenoloxidase

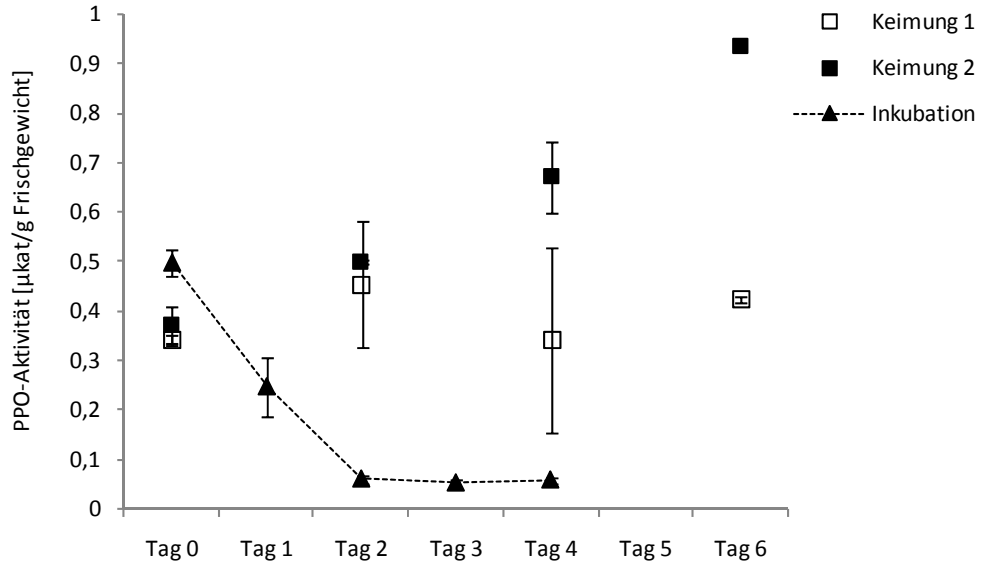


Abbildung 213: PPO-Aktivität (im Sediment) in Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation. Angegeben sind die Mittelwerte (2 bis 3 Einzelsamen aus derselben Frucht) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Bei der PPO handelt es sich um ein Enzym, welches für den Verlauf der Fermentation wichtig ist, da es durch die Oxidation der Polyphenole für die Verminderung des bitteren Geschmacks und der Adstringenz verantwortlich ist. Außerdem ist die PPO an den kakaotypischen Bräunungsreaktionen maßgeblich beteiligt.

Während der Keimung stieg die PPO-Aktivität in den meisten Samen etwas an oder sie blieb unverändert. Im Verlauf der Inkubation nahm die PPO-Aktivität dagegen ab. Diese Abnahme war in den ersten zwei Tagen der Inkubation am stärksten. Ab dem zweiten Tag veränderte sich die PPO-Aktivtät bis zu Ende des Untersuchungszeitraumes nur noch wenig.

In den Samen des German Cocoas war die PPO-Aktivität etwa zehnmal höher als die Samen der anderen untersuchten Genotypen (Tabelle 17). Diese Aktivität nahm während der Inkubation langsamer ab als in den anderen Samen.

Die Aktivität der PPO verhält sich während der frühen Keimung und der fermentationsähnlichen Inkubation unterschiedlich, so dass sich die Verläufe anhand der PPO-Aktivität unterscheiden

lassen. Im Verlauf der Inkubation nimmt die Aktivität schnell ab, wohingegen sie während der Keimung zumeist etwas ansteigt.

Tabelle 17: Mittelwerte der PPO-Aktivität (im Sediment) in Kotyledonen des German Cocoas und der anderen untersuchten Varietäten im Verlauf von Keimung und Inkubation. Angegeben sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

	PPO-Aktivität [µkat/g Frischgewicht]				
		Keimung	Inkubation	Keimung	Inkubation
	Tag 0	Tag 2		Tag 4	
Mittelwert aller untersuchten Varietäten außer German Cocoa	0,46 ± 0,1	0,46 ± 0,1	0,05 ± 0,02	0,52 ± 0,3	0,04 ± 0,01
Mittelwert German Cocoa	6,17 ± 0,7	6,56 ± 2,0	3,00 ± 0,4	4,90 ± 0,5	

4.3.9 Proteasen

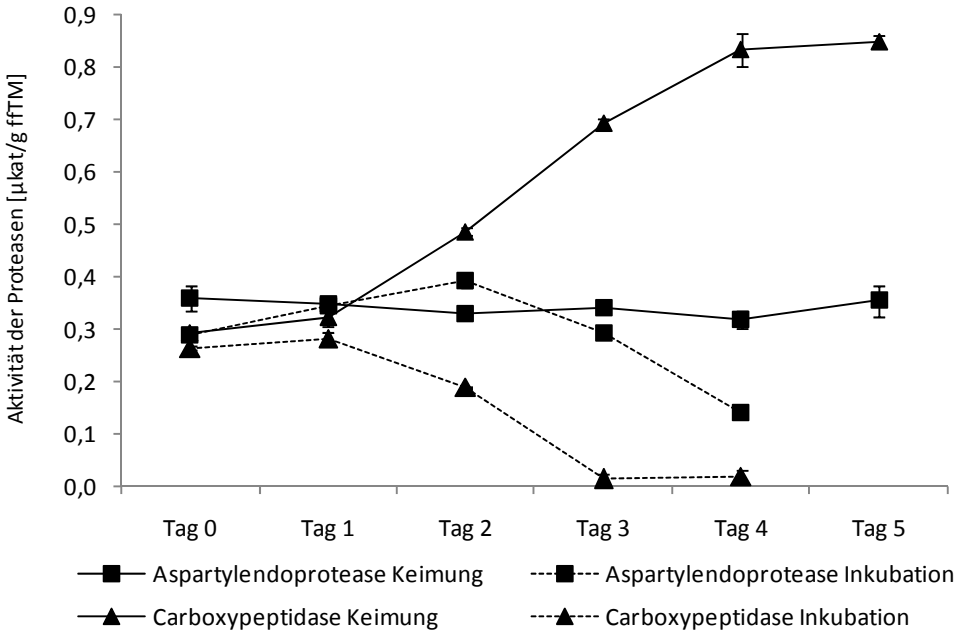


Abbildung 214: Aktivität der Proteasen in entfetteten Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2) mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Im Verlauf der Keimungsversuche hat sich die potentiell vorhandene Aktivität der Aspartylendoprotease nicht verändert. Während der Inkubation stieg die Aktivität der Aspartylendoprotease dagegen in den ersten beiden Tagen an, bevor sie nach dem Erhöhen der Temperatur auf 50°C abnahm, so dass sie am vierten Tag bei durchschnittlich 48 % (± 34) der Anfangsaktivität lag.

Die Aktivität der Carboxypeptidase stieg während der Keimung an, wohingegen sie im Verlauf der Inkubation abnahm, so dass sie nach drei- bis viertägiger Inkubation, nach dem Erhöhen der Temperatur auf 50°C, in vielen Proben kaum noch nachweisbar war. Am vierten Tag der Inkubation war die Aktivität der Carboxypeptidase auf durchschnittlich 7 % (± 11) der Anfangsaktivität gesunken. Am vierten Tag der Keimung war die Aktivität dagegen auf durchschnittlich 206 % (± 55) der Anfangsaktivität angestiegen. Über den gesamten untersuchten Zeitraum der Keimung stieg die Aktivität weiter an, so dass sie am zehnten Tag bei durchschnittlich 333 % (± 76) der Anfangsaktivität lag.

Keimung und Inkubation lassen sich anhand der Verläufe der potentiell vorhandene Aktivitäten der Proteasen unterscheiden. Während der Inkubation nehmen die Aktivitäten vor allem nach dem Erhöhen der Temperatur auf 50°C ab, wohingegen sie sich im Verlauf der Keimung nicht verändern bzw. ansteigen.

4.3.10 Tabellarische Übersicht des Vergleichs von Keimung und Inkubation

Tabelle 18: Gegenüberstellung der in den Samen ablaufenden biochemischen und enzymatischen Prozesse während der Keimung und der fermentationsähnlichen Inkubation

	Keimung	**Inkubation**
Wasseraufnahme	stark	schwach bis zu einer Temperatur von 50°C
pH-Wert	unverändert	nimmt ab
Proteinabbau	schwach ab Tag 6 - 8	stark ab Tag 3
Oligopeptide	kein Anstieg	starker Anstieg ab Tag 1 - 2
Gesamtgehalt freie Aminosäuren	schwacher Anstieg ab Tag 5 - 10	starker Anstieg ab Tag 2
hydrophobe : saure Aminosäuren	geringe Veränderung	starke Zunahme der hydrophoben Aminosäuren
γ-Aminobuttersäure	langsamer Anstieg	schneller Anstieg bis zu einer Temperatur von 50°C
Epicatechin	unverändert	nimmt ab ab Tag 2
Catechin	unverändert	nimmt ab ab Tag 2
Cyanidin-3-Galactosid	unverändert	in inkubierten Samen nicht mehr nachweisbar
Cyanidin-3-Arabinosid	unverändert	in inkubierten Samen nicht mehr nachweisbar
Saccharose	nimmt leicht ab bis Tag 6	nimmt stark ab nach Inkubation kaum noch nachweisbar
Fructose	steigt leicht an ab Tag 4	steigt stark an ab Tag 2
Glucose	steigt leicht an ab Tag 4	steigt stark an ab Tag 2
Theobromin und Coffein	unverändert	nehmen etwas ab ab Tag 2
Putrescin	steigt an ab Tag 4 - 6	unverändert
PPO-Aktivität	steigt leicht an	nimmt stark ab
Apsartylendoprotease	unverändert	nimmt ab ab einer Temperatur von 50°C
Carboxypeptidase	steigt an	nimmt stark ab ab einer Temperatur von 50°C

5 Diskussion

Die während der Fermentation und der Keimung verursachten Veränderungen können anhand von unterschiedlichen Parametern nachgewiesen und verglichen werden.

Hierfür wurden Kakaosamen einer fermentationsähnlichen Inkubation (nach BIEHL *et al*., 1982b) unterzogen bzw. zur Keimung ausgelegt und anschießend anhand ihrer unterschiedlichen biochemischen und enzymatischen Eigenschaften charakterisiert.

5.1 Keimung und fermentationsähnliche Inkubationen von Kakaosamen

5.1.1 Wassergehalt, Wasseraufnahme und Keimung

Reife Kakaoembryonen bestehen aus einer etwa 7 mm langen embryonalen Achse, welche aus Epikotyl, Hypokotyl und Wurzelmeristem aufgebaut ist sowie aus zwei Kotyledonen, welche das Endosperm enthalten (DUNCAN und TODD, 1972). Vor der Keimung stellen die Kotyledonen etwa 99 % des Gesamttrockengewichtes dar (GOODALL, 1949). Drei bis vier Tage nach der Aussaat beginnt die Verlagerung der Reservestoffe aus den Kotyledonen in die Keimwurzel, so dass in dieser der Trockengewichtsanteil pro Tag etwa um 1,3 % ansteigt. Vier Wochen nach der Keimung haben die Kotyledonen ihr Gewicht auf etwa 30 % des Anfangsgewichtes verringert.

Die erste Voraussetzung für die Keimung ist die Wiederaufnahme von Wasser, vor allem bei lufttrockenen Samen, welche ein entquollenes kolloidales System darstellen. Bei der Wasseraufnahme handelt es sich zunächst nicht um einen vitalen Prozess, sondern um einen physikalischen, anfangs noch reversiblen Quellvorgang. Erst wenn soviel Wasser von den Samen aufgenommen wurde, dass kolloidchemisch ungebundenes Wasser zur Verfügung steht, können die vitalen Lebensprozesse, d.h. auch die Keimung und somit die Wachstumsphase eingeleitet werden (RUGE, 1966).

Bei Kakaosamen handelt es sich um rekalzitrante Samen, für die im reifen Zustand ein noch relativ hoher Wassergehalt von 27 bis etwa 40 % ermittelt wurde. Unreifere Samen enthielten einen wesentlich höheren Wassergehalt zwischen 43 und 55 %.

Nach BIEHL *et al.* (1982c) enthalten reife Kakaosamen bis zu 170 % ihres fettfreien Trockengewichtes an Wasser. Ihr negatives Matrixpotential kann während der Keimung vor dem Aufbrechen der Speicherprodukte bis zu 270 % ihres fettfreien Trockengewichtes an Wasser innerhalb von 40 Stunden aufnehmen. Nach GOODALL (1949) besitzen ungekeimte Kakaosamen einen Wassergehalt von etwa 40 % des Trockengewichtes, welcher im Keimling in den ersten drei Wochen nach der Aussaat auf über 400 % ansteigt. Erst mit dem anschließenden Erhärten der Blätter nimmt der Wasseranteil wieder ab.

Bei rekalzitranten Samen muss auch im reifen Zustand ein hoher Wassergehalt erhalten bleiben, da es sonst zu Austrocknungsschäden kommt. Der kritische Punkt des Wasserverlustes, bei dem es zu Schäden der Kotyledonen und zum Verlust der Keimfähigkeit kommt, liegt bei einer schnell erfolgenden Trocknung bei 0,24 g Wasser pro Gramm Trockengewicht (LI und SUN, 1999). Dies entspricht einem Wassergehalt von 19,4 % im Frischgewicht. Bei der embryonalen Achse, welche im reifen Zustand einen Wassergehalt von 73,7 % im Frischgewicht enthält, liegt der kritische

Punkt des Wasserverlustes bei 1,0 g Wasser pro Gramm Trockengewicht. Dies entspricht einem Wassergehalt von 50 % des Frischgewichts (LI und SUN, 1999).

Die Wasseraufnahme zu Beginn der Keimung beruht auf dem negativen Matrixpotential der Proteine, bekannt vor allem bei der Keimung von getrockneten Samen (BEWLEY und BLACK, 1978). Kakaosamen werden dagegen während der Reife nicht stark dehydriert. Sie besitzen mehr als eine Gewichtseinheit Wasser pro Einheit fettfreies Trockenmaterial vor der Keimung (BIEHL *et al.*, 1982c). Jedoch sind die in den Vakuolen gespeicherten Reserveproteine nur gering hydriert, so dass sie in der Lage sind, Wasser aufzunehmen. Es erfolgt daher auch bei den rekalzitranten Kakaosamen als erster Schritt der Keimung eine Quellung der Proteinstrukturen.

Nach zehntägiger Keimung ohne Testa bei 25 und 30°C kommt es zu einer Vergrößerung der Proteinvakuolen (BIEHL *et al.*, 1977). Zu diesem Zeitpunkt, wenn das Wachstum der Radikula mit der Mobilisierung der Reservestoffe der Kotyledonen verbunden ist, haben ICS 1-Samen 90 % und Amelonados 34 % ihres Ausgangsgewichtes an Wasser zugenommen (BIEHL *et al.*, 1982c). Auch bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Keimungsversuchen wurde eine Zunahme des Wassergehaltes in den Kotyledonen festgestellt. In den ersten 24 Stunden der Keimung ohne Testa nahm der Wassergehalt zwischen 6 und 20 % zu. Bei den mit Testa, aber weitgehend ohne Pulpa gekeimten Samen nahm das Gewicht zu Beginn der Keimung zunächst ab. Dies kann unter anderem auch an einem Abbau der vorhandenen Restpulpa gelegen haben. Erst ab dem dritten Tag der Keimung war eine mit einer Wasseraufnahme verbundene Gewichtszunahme der Samen feststellbar. Die Wasseraufnahme der Kotyledonen wurde durch die Testa verzögert. Daraus resultierte auch eine verzögerte Entwicklung der Keimwurzel gegenüber den ohne Testa gekeimten Samen.

Auch BIEHL *et al.* (1982c) wiesen einen Einfluss der Testa auf die Wasseraufnahme nach. Bei 30°C und 40°C (Zitronensäure 35 mmol/l, pH 5,5) betrug die Wasseraufnahme von Kakaosamen ohne Testa nach 40 Stunden 23 %, mit Testa nur 14 %.

Nach ANDERSSON *et al.* (2006) stellen die Pulpa und die äußere Epidermis der Testa mit Kutikula und hypodermalem Schleim eine Diffusionsbarriere für wässrige Lösungen dar. Die Pulpa besitzt eine hohe Wasseraufnahmekapazität. Durch vakuolär vorliegende Zucker der Pulpa wird das Wasser osmotisch gebunden. Wässrige Lösungen dringen vor allem über das Hilum ein, welches frei von Pulpa und hypodermalem Schleim ist. Aufgrund dieser strukturellen Eigenschaften der Kakaosamen wird die Wasseraufnahme der Kotyledonen bei einer Keimung von Samen durch die Testa verzögert.

Desweiteren konnte ein Einfluss der Größe der Samen auf die Geschwindigkeit der Entwicklung der Keimwurzel festgestellt werden. Die verhältnismäßig großen Samen des Genotypen ICS 40 mit einem durchschnittlichen Frischgewicht von 3,34 g keimten langsamer als die kleineren Samen der anderen untersuchten Genotypen. Am schnellsten keimten die kleinsten Samen des Genotypen T 79/501 mit einem durchschnittlichen Frischgewicht von 1,12 g. Die Samen des Genotypen SNK 13 mit einem durchschnittlichen Frischgewicht von 1,88 g keimten etwas langsamer als die des Genotypen T 79/501. Dies kann an der langsamen Diffusion von Wasser in die Samen hinein liegen. Für Essigsäure konnte gezeigt werden, dass ihre Diffusion im Samen sehr langsam verläuft. Nach 15-stündiger Inkubation bei 40°C hatte die Essigsäure ca. 30 Zellschichten (0,6-0,75 mm, ca. 6 % der Kotyledonengewebe) penetriert (BIEHL *et al.*, 1982b).

Untersuchungen zum Wassergehalt von frischen und unterschiedlich lang inkubierten und anschließend an der Sonne getrockneten Samen haben gezeigt, dass frische, nicht inkubierte Samen nach einer Sonnentrocknung einen höheren Wassergehalt enthielten als inkubierte Samen. Ab dem zweiten Tag der Inkubation hat sich der Wassergehalt der getrockneten Samen verringert. Die verminderte Fähigkeit von inkubierten Samen, Wasser während der Trocknung zurückzuhalten, liegt vermutlich zum einen am Verlust der Kompartimentierungen in der hydrophilen Phase der Zellen (BIEHL, 1973) und zum anderen kann das Wasser nicht mehr durch die Proteine gebunden werden, da diese durch Vergerbungsreaktionen nicht mehr frei und quellbar vorliegen (BIEHL *et al.*, 1982c).

Während einer fermentationsähnlichen Inkubation erfolgte in den ersten 24 bis 48 Stunden eine Wasseraufnahme, welche über die Gewichtszunahme gemessen wurde. Nach 24 Stunden lag diese zwischen 2 und 9 %. Mit dem Verlust der Zellkompartimentierung nach dem Erhöhen der Temperatur auf 50°C nahm das Gewicht der Samen wieder ab, so dass es nach 72 bzw. 96 Stunden Inkubation unter dem Anfangsgewicht lag. Zu Beginn der Inkubation, bevor es durch den Temperaturanstieg und das Eindringen der Essigsäure zum Absterben der Samen und zur Auflösung der Zellkompartimentierung kommt, nehmen die Samen Wasser auf und die Proteinvakuolen schwellen an. Während einer anaeroben Inkubation mit Zitronensäure (35 mM, pH 5,5) bei 40°C erfolgt eine Wasseraufnahme von 17 bis 21 % in 40 Stunden (BIEHL *et al.*, 1982c). Diese Wasseraufnahme entspricht der Wasseraufnahme während der Keimung bei 25 bis 30°C. Allerdings ist diese Wasseraufnahme in Gegenwart von Essigsäure deutlich geringer als in der Abwesenheit von Essigsäure (BIEHL *et al.*, 1982c).

Nach dem Absterben der Samen fand nur eine stark verringerte Wasseraufnahme statt. Es kam zudem zu einem Trockengewichtsverlust durch ein Austreten von wasserlöslichen Stoffen aus den Samen. Auch BIEHL *et al.* (1982c) beschreiben diesen Trockengewichtsverlust. Dieser liegt bei einer Inkubationstemperatur von 50°C (35 mmol/l Citronensäure, pH 5,5) zwischen 4 und 9 % des Frischgewichtes, bei 30°C und 40°C dagegen nur bei 0 bis 4 %. Eine hohe Wasseraufnahme kann nur in Zellen mit intakten Membranen erfolgen, da nur intakte, in Proteinspeichervakuolen lokalisierte Proteine, Wasser binden. Bei Temperaturen um 50°C kommt es daher nicht mehr zum Anschwellen der Proteinvakuolen (BIEHL *et al.*, 1977). Dies liegt vermutlich zum einen an den Vergerbungsreaktionen, welche nach der Aufhebung der Zellkompartimentierung stattfinden und zum anderen an der Fusion der Lipidkörper, wodurch die durch Diffusion stattfindende Wasseraufnahme zu den Proteinen eingeschränkt wird. Zudem sind die Reserveproteine bei sauren pH-Werten, wie sie durch die Aufnahme von Essigsäure in den Kotyledonen vorliegen, kaum noch löslich.

Bei Inkubationen bei 50°C konnte kein Unterschied in der Wasseraufnahme von mit oder ohne Testa inkubierten Samen festgestellt werden (BIEHL *et al.*, 1982c). Demnach verliert die Testa mit dem Absterben der Samen und der Aufhebung der Kompartimentierungen ihre Barrierefunktion.

Während kommerziellen Fermentationen werden in den ersten drei Tagen etwa 3 bis 5 % Wasser aufgenommen (ROELOFSEN, 1958).

Es kam sowohl während der frühen Keimung als auch im Verlauf von fermentationsähnlichen Inkubationsversuchen zu einer Zunahme des Wassergehaltes, welche in beiden Fällen in den ersten 24 Stunden am höchsten war. Die Temperatur zu Beginn der Inkubation lag mit 30°C in einem für die Keimung optimalen Bereich. Bei 40°C in Abwesenheit von Essigsäure haben BIEHL *et al.* (1977) eine Keimung der Samen beobachtet, welche mit einem Anschwellen der Proteinvakuolen und einem Wachstum der Radikula (BIEHL *et al.*, 1982c) einherging. Diese Keimungsphase dauerte bis zu den postmortal eintretenden strukturellen Veränderungen an.

Essigsäure dringt vor allem nach dem Erreichen von Temperaturen über 40°C in den Samen ein (BIEHL, 1968). Vor dem Anstieg der Temperatur und dem Eindringen der Essigsäure in die Samen liegen demnach keimungsähnliche Bedingungen vor, so dass es zu Beginn der Fermentation bzw. Inkubation zu einer beginnenden Keimung der Samen kommen kann.

Allerdings findet nach BIEHL *et al.* (1982c) bei Inkubationen in der Gegenwart von Essigsäure und während der ersten zwei Tage der Fermentation keine Keimung statt, da die chemischen Veränderungen während des 2. bis 30. Tages der Keimung deutlich anders sind als während der Fermentation. Zudem enthält die Pulpa einen Keimungsinhibitor (HOLDEN, 1959), welcher bei kommerzieller Fermentation erst nach dem Absterben der Samen verloren geht.

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass in den ersten zwei Tagen der Inkubation, bis zum Absterben der Samen, keimungsähnliche Bedingungen vorliegen, welche zu einer beginnenden Keimung führen. Da die Essigsäurekonzentration in den Samen nur langsam ansteigt, liegen zunächst Bedingungen vor, unter denen eine Keimung eingeleitet werden kann. Vermutlich sind die Prozesse, die zu Beginn einer Keimung induziert werden, wichtig für den Verlauf der Inkubation.

5.1.2 Ansäuerung

In reifen, unfermentierten Samen wird das Fett in zahlreichen Vakuolen gespeichert, welche verstreut in das Cytoplasma der Mesophyllzellen eingebettet sind (BIEHL, 1973). Das Cytoplasma bildet eine geschlossene hydrophile Phase und enthält Zellkern, Mitochondrien, Amyloplasten und Aleuronvakuolen. Während der Fermentation fusionieren die Lipidvakuolen und bilden eine geschlossene lipophile Phase, welche die hydrophilen Plasmaanteile als disperse Phase einschließt. Nach der Fermentation enthält die hydrophile Phase keine Kompartimentierungen mehr, welche im lebenden Samen die Reaktionspartner voneinander trennen. Auch die Inhalte der Vakuolen der Polyphenolspeicherzellen sind nach der Fermentation ausgetreten. Nur die in den Amyloplasten gelagerten Stärkekörner bleiben erhalten und werden von der Lipidphase umschlossen. Die Zellen sind entlang der Mittellamelle voneinander gelöst (BIEHL, 1973). Die Ursache für diese Veränderungen ist der Anstieg der Temperatur und das Eindringen von Essigsäure in die Samen im Verlauf der Fermentation.

In reifen Kakaosamen wurden pH-Werte zwischen 6,0 und 6,7 ermittelt. Im Verlauf einer fermentationsähnlichen Inkubation nahmen die pH-Werte ab. Nach 72-stündiger Inkubation lagen sie zwischen 4,8 und 5,6. Anschließend stiegen die pH-Werte in den meisten Proben wieder etwas an. BIEHL (1973) hat für reife Kakaosamen einen pH-Wert von 6,5 angegeben, welcher im Bereich der in dieser Arbeit ermittelten pH-Werte liegt. Im Verlauf einer üblichen Fermentation sinkt der

pH-Wert auf etwa 4,0 bis 4,5 (BIEHL, 1973). Die pH-Werte der Samen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Inkubationen lagen etwas über diesem Wert.

Im Verlauf der frühen Keimung wurde keine Veränderung des pH-Wertes in den Kotyledonen der Kakaosamen festgestellt.

Die Pulpa von Kakaosamen enthält einen hohen Gehalt an Pektin, Zucker (10 %) und Citronensäure, durch welche der pH-Wert der Pulpa sehr niedrig ist (pH 3,5) (BIEHL und ADOMAKO, 1983). Zu Beginn der Fermentation, im Zuge der Hefe- und Milchsäure-Gärungen, wird die Pulpa abgebaut. Anschließend entsteht in Gegenwart von Sauerstoff in einem exogenen Prozess die Essigsäure durch Essigsäurebakterien. Durch diese Vorgänge steigt die Temperatur in der Fermentationsmasse an und es kommt zum Absterben der Samen sowohl durch den Temperaturanstieg als auch durch eindringende Essigsäure.

Während der Fermentation werden 70 bis 170 mmol/l Essigsäure gebildet, jedoch nur, wenn anaerobe Bedingungen dominieren (BIEHL *et al.*, 1977). Dies bedeutet, dass bis zu 30 mg Essigsäure pro Samen produziert werden, von denen mehr als 50 % in den Samen eindringen (BIEHL und VOIGT, 1995b).

Zum Ende der Fermentation, wenn durch die Sauerstoffgegenwart die Säuren abgebaut werden, steigt der pH-Wert der Fermentationsmasse wieder auf einen Wert von 6,0 bis 7,0 an (BIEHL, 1961). Dieser Anstieg verläuft umso schneller, je höher die Temperatur und je besser die Sauerstoffversorgung ist. Mit dem Anstieg des pH-Wertes in der Pulpa steigt auch der pH-Wert in den Kotyledonen wieder an. Optimal ist hierbei ein pH-Wert von 5,0 und 5,3, da in diesem Bereich das Optimum der Carboxypeptidase liegt, welche für den Abbau der Peptide zu Aminosäuren verantwortlich ist (BIEHL und ADOMAKO, 1983). Auch in den Inkubationsversuchen wurde nach 96-stündiger Inkubation ein Anstieg des pH-Wertes festgestellt.

Das Eindringen von Essigsäure in die Samen während der Fermentation ist wichtig für die Enzymreaktionen, welche die Qualität des Rohkakaos beeinflussen. Durch undissoziierte Essigsäure wird zudem die Separation der Lipide von den hydrophilen Bestandteilen der Zelle hervorgerufen, wodurch ein Austausch von wasserlöslichen Substanzen gefördert wird (BIEHL *et al.*, 1982b). Dieser Effekt der Essigsäure ist bei 40°C höher als bei 50°C, wahrscheinlich, weil Essigsäure in Wasser besser löslich ist als in Fetten.

Im Gegensatz zur Fermentation findet während der Keimung keine Ansäuerung der Samen statt, so dass zu erwarten ist, dass die durch die Essigsäure induzierten strukturellen Veränderungen und enzymatischen Prozesse in den Samen während der Keimung anders verlaufen als während der Fermentation. Da die Ansäuerung der Samen zu Beginn der Inkubation aber langsam verläuft, ist anzunehmen, dass die Prozesse, die in den Samen ablaufen, zunächst ähnlich sind wie die Prozesse, die den Beginn der Keimung signalisieren. Erst durch die verstärkte Ansäuerung und den Temperaturanstieg kommt es zu einer Veränderung der keimungsähnlichen Prozesse, die vermutlich zu Beginn der Inkubation eingeleitet werden, so dass Keimung und Inkubation unterschiedlich verlaufen.

Die Untersuchungen der Schnittteste von unterschiedlichen inkubierten Samen zeigten, dass die Kotyledonen vor der Inkubation eine schiefrige Färbung aufwiesen. Ab dem zweiten Tag der Inkubation wurde eine violette Verfärbung der Kotyledonen festgestellt, welche zuerst im Bereich

der Radikula auftrat und sich von dort aus über die Kotyledonen verbreitete. In den meisten Samen trat am dritten oder vierten Tag der Inkubation eine Braunfärbung der Kotyledonen auf.

Da die sich ausbreitende violette Verfärbung nur im Bereich der Radikula Kontakt mit der Testa hatte, ist anzunehmen, dass die Essigsäure im Bereich der Radikula in die Samen eingedrungen ist und sich von dort aus weiter über den Samen verbreitet hat. Ähnliches gilt für die sich ausbreitende Braunfärbung der Samen.

Nach ANDERSSON *et al.* (2006) dringt die Essigsäure zunächst vor allem in der Region des Hilums in die Samen ein. Zwar ist auch die Samenschale permeabel für wässrige Lösungen, aber neben der Testa stellt zusätzlich die an die Testa anhaftende Pulpa eine Diffusionsverzögerung für die Essigsäure dar.

Dass die Testa als Barriere wirkt, bestärkt die Vermutung, dass die Essigsäure nur langsam in die Samen eindringt und daher zu Beginn der Inkubation keimungsähnliche Prozesse eingeleitet werden. Zudem breitet sich die Essigsäure nur langsam und nur vom Bereich der Radikula ausgehend über die Samen aus, so dass die Ansäuerung des Samengewebes unterschiedlich schnell erfolgt. Die keimungsähnlichen Prozesse können daher vermutlich in den von der Radikula entfernt liegenden Geweben weiter ablaufen als in denen in der Region nahe der Radikula, in der die Ansäuerung zuerst erfolgt.

5.2 Proteinabbau

5.2.1 Abbau der Speicherproteine

Das Mesophyll der Kotyledonen von Kakaosamen besteht überwiegend aus fettreichen Speicherparenchymzellen, welche neben Fetten Proteine und Stärke enthalten (BIEHL, 1973). Im Cytoplasma dieser Zellen befinden sich viele voneinander isolierte Lipidvakuolen, die der hydrophile Protoplast als geschlossenes Netzwerk umschließt. Der Protoplast enthält neben Plastiden (Amyloplasten), welche hauptsächlich aus einem zentralen Stärkekorn bestehen, Aleuronvakuolen, in denen die Proteine gespeichert werden. Durchschnittlich enthalten die Speicherzellen des Parenchyms reifer Kakaokotyledonen 59 % Lipide, 21 % Proteinvakuolen, 8 % Stärke und 12 % Grundplasma (BIEHL *et al.*, 1982d).

Reife Kakaosamen enthalten 10 bis 16 % Proteine im Trockengewicht und einen geringen Gehalt an freien Aminosäuren. Die Speicherproteine machen hierbei etwa 40 % der Gesamtproteine aus (ZIEGLEDER und BIEHL, 1988).

Die Akkumulation der Speicherproteine in den Kotyledonen während der Entwicklung der Samen beginnt 90 bis 160 Tage nach der Bestäubung (BIEHL *et al.*, 1982d). In einem SDS-Gelelektrophoresegel wiesen BIEHL *et al.* (1982d) zehn Protein- und elf Peptidbanden nach, wobei die Proteinbanden bei 44, 26, 19 und 12,6 kDa dominant waren.

Beim Speicherprotein des Kakaos handelt es sich um ein 7S-Globulin vom Vicilintyp. Dieses ist ein Trimer mit einer molekularen Masse von 139 kDa, welches sich aus einer 45,7 und einer 31+16 kDa-Untereinheit zusammensetzt und in einfach glycosylierter Form in Proteinvakuolen gespeichert wird (VOIGT und BIEHL, 1993; BIEHL und VOIGT, 1995). Nach molekularen Berechnungen setzt sich dieses Hauptspeicherprotein aus einem 31 und einem 47 kDa großen

Polypeptid zusammen, welches aus einer aus 566 Aminosäuren langen und 67 kDa großen Vorstufe hervorgeht (SPENCER und HODGE, 1992). Diese Vorstufe ist zu 57 % identisch mit den Sequenzen des Vicilinglobulins aus Baumwollsamen (SPENCER und HODGE, 1992; McHENRY und FRITZ, 1992; O'CONNOR *et al.*, 1996).

Neben dem Speicherprotein konnten VOIGT und BIEHL (1993) ein dominantes Albumin vom Typ des Kunitz-Typsininhibitors mit einem Molekulargewicht von 19 kDa nachweisen, das einen Anteil von etwa 52 % des Gesamtproteins der Samen darstellt. Sein aus molekularen Berechnungen ermitteltes Molekulargewicht liegt bei 21 kDa (SPENCER und HODGE, 1991; TAI *et al.*, 1991). Seine Proteinsequenz besitzt Homologien mit den Sequenzen anderer Kunitz-Protease- und α-Amylaseinhibitoren, vor allem mit Proteaseinhibitoren der Sojabohne (TAI *et al.*, 1991, DODO und FURTEK, 1992). Die Funktion dieses Proteins besteht wahrscheinlich in der Verhinderung des vorzeitigen Abbaus der Reserveproteine des Samens durch verdauende Enzyme und eindringende Schädlinge (SPENCER und HODGE, 1991). Wegen seines großen Anteils am Gesamtprotein reifer Kakaosamen wird eine zusätzliche Funktion als Speicherprotein vermutet.

In der vorliegenden Arbeit wurde in den ersten Tagen der Keimung keine Abnahme des Gesamtgehaltes der Proteine festgestellt. Die Auftrennung der Proteine in SDS-Gelelektrophoresegelen hat gezeigt, dass erst ab dem sechsten bis achten Tag der Keimung ein Proteinabbau einsetzte. Dieser betraf vor allem die 45,7 kDa große Untereinheit des 7S-Globulins. Die 31 kDa große Untereinheit des 7S-Globulins wurde dagegen auch nach zehntägiger Keimung kaum abgebaut. Der Gehalt des 19 kDa Albumins hat sich im untersuchten Keimungszeitraum nicht verändert. VOIGT *et al.* (1995b) haben ab dem siebten Tag der Keimung einen Abbau des 7S-Globulins beschrieben. Das Albumin wurde auch nach zweiwöchiger Keimung nur sehr gering abgebaut (BIEHL *et al.*, 1982d). Das 7S-Globulins wird demnach bevorzugt abgebaut. BIEHL *et al.* (1982d) beschreiben ab dem 10. bis 13. Tag der Keimung eine Vergrößerung und Fusion der Proteinvakuolen in den Kotyledonen zu einer zentralen Vakuole. Durch die Aufnahme von Wasser in die Proteinvakuolen kommt es zu optimalen Bedingungen für den Abbau der Proteine. Dies führt vermutlich zu einer ab diesem Zeitpunkt verstärkten Mobilisierung der Speicherproteine, so dass diese dem Stoffwechsel des heranwachsenden Sämlings zur Verfügung stehen.

Die erste Phase der Keimung ist durch eine Wasseraufnahme der quellbaren Strukturen der Samen gekennzeichnet. Die zweite Phase geht mit der Mobilisierung der Reservestoffe einher. Sie ist unter anderem anhand des Abbaus der Speicherproteine, welcher ab dem sechsten Tag der Keimung beobachtet wird, zu erkennen.

Während der Fermentation liegen bis zum Absterben der Samen durch den Temperaturanstieg und die eindringende Essigsäure keimungsähnliche Bedingungen vor. Dies ist unter anderem daraus abzuleiten, dass der Proteinabbau während einer fermentationsähnlichen Inkubation erst ab dem dritten Tag, nach dem Erhöhen der Inkubationstemperatur auf 50°C erfolgt. Nach dem vierten Tag der Inkubation hat ein fast vollständiger Abbau der 7S-Globuline stattgefunden. Auch dem 19 kDa großen Albumin widerfährt ein Abbau, dieser verläuft jedoch langsamer als der Abbau der 7S-Globuline. Auch BIEHL *et al.* (1982d) beschreiben einen bevorzugten Abbau der 7S-

Globulinuntereinheiten von 45,7 und 31 kDa, obwohl diese im Gegensatz zum 19 kDa Albumin bei einem sauren pH-Wert um 4,5 kaum löslich sind. Desweiteren konnten BIEHL *et al.* (1982d) nachweisen, dass es sich bei der Abnahme des Proteingehaltes nicht um einen drastischen Proteinverlust der Samen handelt, da nur sehr geringe Mengen an Proteinen austreten.

Der Proteingesamtgehalt in den Kotyledonen hat im Verlauf der viertägigen Inkubation durchschnittlich um 26 bis 39 % abgenommen. Dieser Proteinabbau betrifft vor allem die Speicherglobuline. Dies macht deutlich, dass die Speicherglobuline, welche etwa 40 % der Gesamtproteine darstellen (ZIEGLEDER und BIEHL, 1988), zu einem großen Teil abgebaut wurden. AMIN *et al.*, (1998) haben nach sechstägiger Fermentation eine Degradation des 7S-Globulins um 88,8 % und des Albumins um 47,4 % beschrieben.

Nach BIEHL und ADOMAKO (1983) werden maximal 20 % des Proteins zu freien Aminosäuren und etwa genauso viel zu Peptiden abgebaut. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Abnahme des Proteingehaltes lag nur geringfügig unter diesem Wert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Inkubationen nur über einen Zeitraum von vier Tagen durchgeführt wurden und Standardfermentationen zumeist über einen längeren Zeitraum erfolgen. Die restlichen Proteine werden im Verlauf der Fermentation bzw. der Trocknung durch die aus den Polyphenolspeicherzellen austretenden Catechine und Leucocyanidine irreversibel vergerbt (Chinongerbung). Dies führt zu starken Bräunungen der Samen.

Nach VOIGT *et al.*, (1995c) kommt es bei Temperaturen unter 45°C zu einer Induktion der Keimung der Samen, welche durch eine Wasseraufnahme und die damit verbundene Vergrößerung der Proteinvakuole der Mesophyllzellen gekennzeichnet ist. Temperaturen um 50°C führen innerhalb von ein bis drei Stunden zum Absterben der Samen, so dass keine keimungsähnlichen Prozesse ablaufen können (BIEHL und PASSERN, 1982).

Durch einen langsamen Temperaturanstieg und eine Anfangstemperatur unter 45°C werden die folgende postmortale Proteolyse und das gebildete Aromapotential gefördert (BIEHL und PASSERN, 1982). Die Prozesse, welche zu Beginn der Keimung ablaufen, sind daher auch für die erste Phase der Fermentation und die folgende Entwicklung des kakaotypischen Aromapotentials von großer Bedeutung. Eine keimungsähnliche Phase zu Beginn der Fermentation mit einer niedrigen Temperatur und einer geringen Ansäuerung, bei welcher die Samen vital bleiben, fördert die anschließende Proteolyse und damit die Bildung der Aromavorstufen.

Dass es sich bei der ersten Phase der Fermentation um einen keimungsähnlichen Ablauf handelt, wird durch die Untersuchungen von FORSYTH *et al.* (1958) bestärkt, welche zeigen, dass nach 20-stündiger Fermentation noch 100 % der Samen keimfähig sind. Nach 44-stündiger Fermentation waren dagegen nur noch 10 % keimfähig und nach 68-stündiger Fermentation konnte keine Keimfähigkeit mehr festgestellt werden. In der ersten Phase der Fermentation laufen in den Samen demnach noch keine irreversiblen Prozesse ab, welche den weiteren Verlauf in eine bestimmte Richtung, nämlich Fermentation oder Keimung, festlegen. Erst mit dem Absterben der Samen während der Fermentation erfolgen eindeutig andere Prozesse als während der Keimung, die den weiteren Verlauf der Fermentation irreversibel festlegen.

Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen Keimung und Fermentation liegt in den typischen strukturellen Veränderungen bei Eintritt in die postmortale Phase der Fermentation (BIEHL, 1973). Durch die Aufhebung der Kompartimentierungen und die Fusion der Liposomen

entstehen hydrophile Reaktionsräume, in denen, nach einer Ansäuerung durch Essigsäure, die Hydrolyse der Speicherproteine stattfindet. In Untersuchungen mit fettfreien Gewebshomogenaten wurde gezeigt, dass alle Proteine, nicht nur die Speicherproteine, abgebaut werden. Zudem werden die an der Proteolyse beteiligten Enzyme vermutlich zum Teil durch die postmortale Fusion der Liposomen abgeschirmt, so dass durch die frei werdenden Polyphenole und die damit verbundenden Vergerbungsreakionen die Enzymaktivitäten zwar vermindert, nicht aber komplett unterbunden werden (BIEHL und ADOMAKO, 1983).

In den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sowohl während der Fermentation als auch während der Keimung ein bevorzugter Abbau des 7S-Globulins stattfindet. Für die Bildung des kakaotypischen Aromapotentials ist dieser bevorzugte Abbau des 7S-Globulins von maßgeblicher Bedeutung. VOIGT *et al.* (1994b) zeigten, dass kakaotypisches Aroma *in vitro* durch den proteolytischen Abbau des 7S-Globulins der Kakaosamen gebildet wird, aber nicht nach der Proteolyse des Albumins. Der Abbau des 7S-Globulins und des Albumins durch die Aspartylendopotease führt zu unterschiedlichen Spektren an hydrophoben Oligopeptiden. Die anschließende Behandlung der Globulin- und Albuminpeptide durch die Carboxypeptidase führt zu unterschiedlich zusammengesetzten freien Aminosäurespektren. Beim Abbau der Globulinpeptide werden vor allem die hydrophoben Aminosäuren Leucin, Phenylalanin, Alanin, Valin und Tyrosin frei. Aus den Albuminpeptiden gehen dagegen vor allem Asparaginsäure und Glutaminsäure hervor.

Die Bedeutung des 7S-Globulins für die Aromaqualität wird zusätzlich durch Untersuchungen von VOIGT *et al.* (1994c) bestätigt, der gezeigt hat, dass weder der proteolytische Abbau des Vicilin 7S-Globulins aus Kokosnüssen noch des Legumin 12S-Globulins aus Haselnüssen oder Sonnenblumensamen mit der Aspartylendoprotease aus Kakaosamen zu einem kakaotypischen Aroma führen. Die Zusammensetzung der Reserveproteine ist eine Besonderheit des Kakaos und wichtig für die Bildung des Aromas während der Fermentation.

Während der Fermentation wird der proteolytische Abbau unter anderem durch die eindringende Essigsäure in die Kotyledonen induziert, da die beteiligten Proteasen ihr Optimum im sauren pH-Bereich haben. Während der Keimung kommt es erst ab dem siebten Tag zu einem Abbau der Speicherproteine. HE *et al.* (2007) haben bei der Sojabohne beschrieben, dass die für den Abbau der Speicherproteine verantwortliche Protease sowohl im keimenden Samen als auch während der Samenentwicklung in den Proteinspeichervakuolen der Parenchymzellen der Kotyledonen lokalisiert ist. Da auch diese Protease ihr Aktivitätsoptimum im sauren pH-Bereich hat, wird ihre Aktivität vor der Keimung durch einen nicht sauren pH-Wert in den Vakuolen verhindert. Erst 48 Stunden nach dem Beginn der Wasseraufnahme sinkt der pH-Wert in den Vakuolen, so dass die Aktivierung der Protease erfolgt. Auch in den Kotyledonen des Kakaos sind die Proteasen in den Proteinspeichervakuolen lokalisiert. Vermutlich werden sie durch eine in den Vakuolen im Verlauf der Keimung erfolgende Ansäurerung aktiviert.

Anhand des Abbaus der Speicherproteine lassen sich Keimung und fermentationsähnliche Inkubation unterscheiden. Während der Inkubation ist ab dem dritten Tag ein schneller Abbau der Speicherproteine feststellbar. Während der Keimung setzt dagegen erst ab dem sechsten bis achten Tag ein Abbau der Speicherproteine ein, der zudem wesentlich langsamer verläuft. Da der Abbau der Speicherproteine im Verlauf der Inkubation erst nach der Ansäuerung der Kotyledonen und

dem Temperaturanstieg erfolgt, ist anzunehmen, dass die enzymatischen Spaltungsaktivitäten, welche gegenüber der Keimung zu einem beschleunigten Abbau der Speicherproteine führen, erst ab diesem Zeitpunkt verstärkt eingeleitet werden. Bis zu diesem Zeitpunkt liegen keimungsähnliche Bedingungen vor. Diese können eine wichtige Rolle für den Beginn der während der Inkubation ablaufenden Prozesse spielen.

5.2.2 Protaseaktivität

Der Abbau der Speicherroteine erfolgt durch zwei Proteasen: eine Endoprotease und eine Exopeptidase (BIEHL *et al.*, 1993).

Reife Kakaosamen enthalten zwei Endoproteasen, wobei nur die Aspartylendoprotease mit einem pH-Optimum von 3,5 für die Bildung des kakaotypischen Aromas von Bedeutung ist (VOIGT und BIEHL, 1995). Diese ist in der Lage, das 7S-Globulin und das Albumin hydrolytisch im Bereich der hydrophoben Aminosäuren zu spalten, so dass Oligopeptide mit hydrophoben Aminosäuren am carboxyterminalen Ende entstehen.

Die Carboxypeptidase hat ein pH-Optimum von 5,8. Sie benötigt hydrolytisch gebildete Oligopeptide als Substrat und spaltet vom carboxyterminalen Ende bevorzugt hydrophobe Aminosäuren ab (BYTOF *et al.*, 1995). Saure Aminosäuren werden wesentlich langsamer frei. Peptide mit Arginin, Lysin oder Prolin am carboxyterminalen Ende sind dagegen resistent gegen einen Abbau. Die Spaltungsrate wird auch durch die zweite Aminosäure nach der carboxyterminalen Aminosäure beeinflusst. Ist diese hydrophob, erfolgt der Abbau bevorzugt.

Verglichen mit den Aspartylendoproteasen anderer Samen ist die Aktivität der Aspartylendoprotease in ungekeimten Kakaosamen sehr hoch (BIEHL und VOIGT, 1995). Nach BIEHL *et al.* (1982d) erfolgt die Akkumulation des 7S-Globulins und der Aspartylendoprotease zeitgleich in den letzten 40 Tagen der Samenentwicklung. Der maximale Proteingehalt und die maximale Proteaseaktivität werden 20 Tage vor Reife erreicht.

Während einer sechstägigen Keimung blieb die Aktivität der Aspartylendoprotease in den Kotyledonen durchgehend konstant. Auch VOIGT *et al.* (1995b) beschreiben für die ersten sieben Tage der Keimung eine konstant bleibende Aktivität der Aspartylendoprotease. Nach VOIGT und BIEHL (1995) nimmt ihre Aktivität erst nach dem kompletten Abbau der Speicherproteine ab.

Die Aktivität der Carboxypeptidase stieg dagegen ab dem zweiten bis dritten Tag der Keimung an, so dass sie nach einer sechstägigen Keimung durchschnittlich 206 % und nach einer zehntägigen Keimung sogar 333 % der Ausgangsaktivität betrug.

Während einer fermentationsähnlichen Inkubation wurde in einigen Samen bis zum zweiten Tag eine Zunahme der Aspartylendoproteaseaktivität auf durchschnittlich 130 % der Anfangsaktivität festgestellt. Zum Ende der Inkubation nahm sie ab, so dass sie am vierten Tag bei durchschnittlich 48 % (± 34) der Ausgangsaktivität lag. Aufgrund ihrer Hitzestabilität bei Temperaturen von 50 bis 55°C (BIEHL *et al.*, 1993) ist ihre Aktivität auch nach dem Erhöhen der Inkubationstemperatur auf 50°C noch relativ hoch. Das Aktivitätsoptimum liegt bei Temperaturen zwischen 42 und 47°C (GUILLOTEAU *et al.*, 2005). Die Aspartylendoprotease besitzt die Fähigkeit, die Reserveproteine in den ungekeimten Samen anzugreifen (VOIGT und BIEHL, 1995). Diese Fähigkeit ist bei

orthodoxen Samen unbekannt. Kakaosamen besitzen also eine Besonderheit in Bezug auf ihre Endoprotease, welche für den Proteinabbau während der Fermentation wichtig ist.

Nach AMIN *et al.* (1998) besteht eine hohe Korrelation zwischen der Temperatur während der Fermentation und der Aktivität der Aspartylendoprotease. Nach dreitägiger Boxfermentation stieg die Aktivität auf etwa 116 % der Anfangsaktivität an. Zu diesem Zeitpunkt wurden die höchste Temperatur von 48°C und der niedrigste pH-Wert von 4,8 erreicht. Nach sechstägiger Fermentation war keine Aktivität mehr vorhanden.

Die Aktivität der Carboxpeptidase stieg im Verlauf einer fermentationsähnlichen Inkubation zunächst in einigen Proben etwas an. Nach dem Erhöhen der Temperatur auf 50°C nahm sie schnell ab, so dass sie am vierten Tag je nach Inkubationsreihe zwischen 0,03 und 41 % der Ausgangsaktivität lag. BYTOF *et al.* (1995) beschreiben nach 20-stündiger Autolyse von Acetontrockenpulver des Kakaos bei 45°C (pH 5,5) keine Abnahme der Carboxypeptidaseaktivität. Erst nach 70 Stunden sank die Aktivität auf etwa 50 %. Nach sechstägiger Fermentation konnten AMIN *et al.* (1998) keine Aktivität mehr nachweisen.

Die Carboxypeptidase kann im Gegensatz zur Aspartylendoprotease durch kakaofremde Carboxypeptidasen ersetzt werden (VOIGT, 1994d; BYTOF *et al.*, 1995). Dieses Ergebnis hebt die Besonderheit der Aspartylendoprotease des Kakaos hervor.

Nach ZIEGLEDER und BIEHL (1988) ist die Proteolyse vor allem in den ersten 24 Stunden nach der Zerstörung der Kompartimente durch den Temperaturanstieg und die Ansäuerung durch Essigsäure am höchsten. Anaerobe und saure Bedingungen verhindern zu diesem Zeitpunkt die Vergerbung der Proteine und somit die Enzyminaktivierung. Dieser Tatbestand wurde auch in den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Untersuchungen bestätigt. Vor dem Erhöhen der Temperatur auf 50°C konnte kein Abbau der Proteine festgestellt werden, danach erfolgte am zweiten Tage der Inkubation die stärkste Abnahme des Proteingehaltes. Bis zum dritten Tag wurden durchschnittlich 17 bis 35 % des Proteingesamtgehaltes in den Kotyledonen abgebaut, bis zum vierten Tag 26 bis 39 %. Dies zeigt, dass der Hauptabbau der Proteine in den ersten 24 Stunden nach der Temperaturerhöhung erfolgte. Anschließend wird die proteolytische Aktivität durch Vergerbungsreaktionen mit den nach der Zerstörung der Zellstrukturen frei werdenden Polyphenolen in Gegenwart von Sauerstoff vermindert, allerdings nicht vollständig unterbunden (FORSYTH *et al.*, 1958; BIEHL, 1966). Auch zwei bis drei Tage nach dem Absterben der Samen ist noch eine Proteaseaktivität nachweisbar (FORSYTH *et al.*, 1958).

Bis zum Absterben der Samen ist die Aktivität der Proteasen während der Keimung und einer fermentationsähnlichen Inkubation ähnlich. Erst nach dem Absterben der Samen verlaufen die Vorgänge eindeutig unterschiedlich. Während der Inkubation kommt es zu einer Abnahme der Aktivitäten beider Proteasen, wohingegen die Aktivität der Aspartylendoprotease im Verlauf des untersuchten Keimungszeitraumes konstant bleibt und die Aktivität der Carboxypeptidase stark ansteigt.

5.2.3 Oligopeptide

Oligopeptide entstehen durch die hydrolytische Spaltung der Speicherproteine. Sie sind daher ein wichtiger Indikator für die Keimung und die Fermentation, da sie auf die proteolytische Aktivität rückschließen lassen. Zudem wiesen MOHR *et al.* (1971) eine Beteiligung der Oligopeptide an der Bildung des Kakaoaromas nach, und VOIGT *et al.* (1994) zeigten, dass beim Rösten in Abwesenheit von Oligopeptiden kein kakaotypisches Aroma entsteht. MOHR *et al.* (1976) isolierten 18 Oligopeptide, welche essentiell für das Kakaoaroma sind.

Reife, ungekeimte Kakaosamen enthalten nur einen sehr geringen Gehalt an Oligopeptiden. Im Verlauf einer sechstägigen Keimung war keine Zunahme des Oligopeptidgehaltes zu erkennen. Dagegen stieg der Oligopeptidgehalt während einer fermentationsähnlichen Inkubation schon nach dem ersten bis zweiten Tag sehr schnell an und nahm bis zum Ende des Untersuchungszeitraums stark zu.

HASHIM *et al.* (1998) beschreiben ab dem zweiten Tag der Fermentation einen Anstieg des Peptidstickstoffes im Kakaosamen. Nach sechstägiger Fermentation enthalten die Samen um etwa 55 % höhere Gehalte im Vergleich zu unfermentierten Samen.

Nach BIEHL *et al.* (1982d) übersteigt der freie α-Aminostickstoff während einer Inkubation 10 bis 15 % des gesamten Stickstoffes nicht, obwohl 30 bis 50 % der Reserveproteine abgebaut werden. Dies bedeutet, dass nur ein kleiner Teil des zu Peptiden abgebauten Proteins weiter zu Aminosäuren abgebaut wird.

Oligopeptide entstehen durch hydrolytische Spaltung, welche durch die Aspartylendoprotease katalysiert wird. Die Aspartylendoprotease degradiert das Vicilin-Globulin in Peptide, welche kleiner als 10 kDa sind. Zum Teil handelt es sich auch um kleine Di- und Tripeptide (GUILLOTEAU *et al.*, 2005)

Für die Bildung der Oligopeptide spielt der pH-Wert in den Kotyledonen eine wichtige Rolle. Im Verlauf von Inkubationen mit einem pH-Wert von $\leq 4{,}5$ entstehen relativ viele hydrophobe, und mit einem pH-Wert von $\geq 5{,}0$ relativ viele hydrophile Oligopeptide (VOIGT *et al.*, 1994; BIEHL und VOIGT, 1995). Bei einem pH-Wert $\geq 5{,}0$ wird nur das Vicilin-Speicherglobulin zu hydrophilen Oligopeptiden und zu freien Aminosäuren mit einem hohem Anteil an wenigen hydrophoben Aminosäuren abgebaut (VOIGT *et al.*, 1995c). Bei einem pH-Wert unter 5,0 werden die gesamten Speicherproteine abgebaut und es entsteht eine andere Zusammensetzung an Oligopeptiden und freien Aminosäuren, jedoch kein kakaotypisches Aromapotential. Dies liegt daran, dass für die Bildung des kakaotypischen Aromas ein Zusammenwirken der Aspartylendoprotease und der Carboxypeptidase erforderlich ist. Die Aspartylendoprotease hat ihr pH-Optimum bei 3,5, so dass ihre Aktivität bei niedrigen pH-Werten höher ist. Die Carboxypeptidase, welche die hydrophoben Aminosäuren von den Oligopeptiden abspaltet, hat ihr pH-Optimum dagegen bei 5,8. Bei niedrigen pH-Werten entstehen somit vor allem hydrophobe Oligopeptide und wenig freie Aminosäuren (VOIGT *et al.*, 1994).

Die Oligopeptidspektren der unterschiedlichen untersuchten Genotypen wiesen alle dasselbe Muster auf. Dies wird auch von AMIN *et al.* (2002) beschrieben, die nach der Autolyse von Acetontrockenpulver der Kotyledonen unterschiedlicher Genotypen gleiche Muster hydrophober Oligopeptide erhielten. Die Spaltungscharakteristik der Aspartylendoprotease ist demnach bei allen Genotypen gleich, ebenso wie die Zusammensetzung des 7S-Globulins. Unterschiede des

Aromas beruhen nicht auf genetischen Differenzen des Speicherglobulins und müssen daher anderen Ursprungs sein (AMIN *et al.*, 2002b).

Im Verlauf der fermentationsähnlichen Inkubation stieg der Anteil von sauren Aminosäuren und deren Säureamiden am Gesamtgehalt der Aminosäuren der Oligopeptide auf über 50 % an. Besonders hoch waren die Anteile an Asparaginsäure und Glutaminsäure. Dies hängt mit der bevorzugten Freisetzung von hydrophoben Aminosäuren durch die Carboxypeptidase zusammen. Saure Aminosäuren werden wesentlich langsamer frei (BYTOF *et al.*, 1995). Daher steigt der relative Anteil an sauren Aminosäuren in den Oligopeptiden an. Im Verlauf der frühen Keimung hat sich die Zusammensetzung der Aminosäuren der Oligopeptide nicht verändert.

Keimung und fermentationsähnliche Inkubation lassen sich anhand des Oligopeptidgehaltes der Samen unterscheiden. Während der Inkubation werden die Speicherproteine sehr schnell zu Oligopeptiden abgebaut, wohingegen während der Keimung keine schnelle Zunahme des Oligopeptidgehaltes stattfindet. Der Proteinabbau während der Keimung setzt erst zu einem späteren Zeitpunkt und langsamer als im Verlauf der Inkubation ein (siehe 5.2.1). Die Prozesse, welche während der Inkubation zu einem beschleunigten Abbau der Proteine führen, sind anhand der Zunahme des Oligopeptidgehaltes in den Samen erkennbar.

5.2.4 Freie Aminosäuren

Freie Aminosäuren entstehen durch den Abbau der proteolytisch gebildeten Oligopeptide. Diese Reaktion wird durch die Carboxypeptidase in den Kotyledonen des Kakaos katalysiert.

Reife Samen enthalten nur einen geringen Gehalt an freien Aminosäuren. Er lag in den meisten Proben zwischen 3,1 und 9,2 mg/g ffTM. Samen, die nach der Probennahme zunächst an der Sonne getrocknet wurden, enthielten im Durchschnitt einen etwas geringeren Gehalt an freien Aminosäuren von 4,3 mg/g ffTM (± 5,5) als Samen, die direkt nach der Probennahme gefriergetrocknet wurden (5,5 mg/g ffTM (± 1,5)).

In der Literatur sind für unfermentierte, reife Kakaosamen Gehalte zwischen 2,4 und 8,0 mg/g ffTM angegeben (HASHIM *et al.*, 1998, KIRCHHOFF *et al.*, 1989a,b).

Auch in der Zusammensetzung der freien Aminosäuren in den reifen Samen wurde ein Unterschied zwischen zunächst an der Sonne getrockneten und direkt gefriergetrockneten Samen festgestellt. Die reifen, direkt gefriergetrockneten Samen enthielten zwischen 17 und 25 % hydrophobe und zwischen 70 und 77 % saure Aminosäuren und deren Säureamide. Besonders hoch waren hierbei die Gehalte an Asparagin, Asparaginsäure und Glutaminsäure. Sonnengetrocknete Samen enthielten zwischen 35 und 42 % hydrophobe und 46 % saure Aminosäuren und deren Säureamide. Der Unterschied beruht vor allem auf dem geringeren Gehalt an Asparaginsäure nach der Trocknung, welcher in ungetrockneten Samen extrem hoch war.

Nach KIRCHHOFF *et al.* (1989b) enthalten frische, nicht getrocknete Samen 19 % hydrophobe und 74 % saure Aminosäuren und deren Säureamide. Dieses Ergebnis stimmt mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Gehalten an freien Aminosäuren überein.

Im Verlauf des untersuchten Keimungszeitraumes haben sich der Gehalt und die Zusammensetzung der freien Aminosäuren nur geringfügig verändert. Da es zu Beginn der Keimung zu einer Synthese neuer Proteine kommt, bei welcher auf den Stoffwechselpool der freien Aminosäuren zugegriffen wird, nahm der Aminosäuregehalt in den Samen einiger Proben zunächst etwas ab. Die Untersuchungen zum Proteinabbau (siehe Kapitel 5.2.1) zeigten, dass erst ab dem sechsten bis achten Tag der Keimung ein Abbau der Speicherproteine stattfand. Ab diesem Zeitpunkt stieg der Aminosäureggehalt der Samen etwas an.

Ab dem fünften bis sechsten Tag der Keimung wurde zudem ein leichter Anstieg des Anteils von hydrophoben Aminosäuren am Gesamtgehalt der freien Aminosäuren und eine Abnahme des Anteils von sauren Aminosäuren und deren Säureaminden festgestellt.

Im Verlauf der fermentationsähnlichen Inkubation stieg der Gehalt der freien Aminosäuren sehr schnell an, so dass die Samen nach drei- bis viertägiger Inkubation 13,6 bis 20,8 mg/g ffTM freie Aminosäuren enthielten. Der durchschnittliche Gehalt betrug hierbei 16,3 mg/g ffTM (± 3,0). ROHSIUS *et al.* (2006) haben für 108 kommerziell fermentierte und gehandelte Rohkakaoproben einen Gesamtgehalt an freien Aminosäuren je nach Herkunft zwischen 5,0 und 25,2 mg/g ffTM ermittelt. Der unterschiedliche Gesamtgehalt an freien Aminosäuren in fermentierten Samen hängt unter anderem von der Dauer der Fermentation und der Fermentationsart, vor allem aber von der Menge der fermentierten Kakaomasse ab (ROHSIUS *et al.*, 2006). HASHIM *et al.* (1998b) beschreiben eine optimale Fermentationsmasse von 60 kg, bei der durch regelmäßiges Umschichten der Fermentationsmasse ein Maximum an Aromavorstufen gebildet wird.

Auch im Verlauf der fermentationsähnlichen Inkubation entstehen, bedingt durch unterschiedliche pH-Werte, Säurekonzentrationen und Temperaturen, unterschiedlichen Gehalte an freien Aminosäuren (BIEHL und PASSERN, 1982; VOIGT *et al.*, 1994).

Bei den untersuchten unterschiedlichen Genotypen wurden im Verlauf der Inkubation keine Unterschiede in der Zusammensetzung der Aminosäuren festgestellt. Auch OFFEM (1994) fand keine wesentlichen Unterschiede in der Zusammensetzung der Aminosäuren bei gleicher Fermentation und Trocknung in unterschiedlichen Kakaovarietäten. Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung beruhen wohl eher auf Umwelteinflüssen und unterschiedlichen Fermentationsmethoden als auf unterschiedlichen Kakaovarietäten.

Der höchste Anstieg des Gehaltes an freien Aminosäuren wurde am zweiten und dritten Tag der Inkubation festgestellt. Zu diesem Zeitpunkt ist die Aktivität der Carboxypeptidase noch hoch. Erst danach konnte eine Abnahme ihrer Aktivität gemessen werden. Wie schon im Kapitel 5.2.2 beschrieben, haben BYTOF *et al*. (2005) während einer Autolyse bei 45°C nur eine langsame Abnahme der Carboxypeptidaseaktivität festgestellt. Nach dreitägiger Inkubation sank die Aktivität auf etwa 50 % der Anfangsaktivität.

Die Zusammensetzung der freien Aminosäuren in den inkubierten Samen unterschied sich signifikant von der in den frischen Samen. Direkt nach der Inkubation gefriergetrockneter Samen enthielten diese 61 % hydrophobe und 14 bis 16 % saure Aminosäuren und deren Säureamide. Dagegen enthielten Samen, welche nach der Inkubation zunächst an der Sonne getrocknet wurden, 49 bis 55 % hydrophobe und 15 bis 18 % saure Aminosäuren und deren Säureamide. Vor allem der Anteil an hydrophoben Aminosäuren war in den getrockneten Samen etwas geringer.

Nach KIRCHHOFF *et al.* (1989a) enthalten fermentierte Kakaosamen 58 % hydrophobe und 16 % saure freie Aminosäuren. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen ROHSIUS *et al.* (2006) bei der Analyse der Aminosäurezusammensetzungen unterschiedlicher Rohkakaoproben aus dem Handel (60 % hydrophobe, 21 % saure Aminosäuren).

In den Samen einiger Proben konnte eine Abnahme des Gehaltes an freien Aminosäuren und deren Säureamiden im Verlauf der Inkubation beobachtet werden. Diese Abnahme beruht nach KIRCHHOFF *et al.* (1989a) auf der bevorzugten Metabolisierung der freien sauren Aminosäuren während der Fermentation bzw. der Inkubation.

Im Verlauf der fermentationsähnlichen Inkubation trat zudem ein hoher Gehalt an Aminosäuren aus den Samen in das Inkubationsmedium aus. Der Anstieg der freien Aminosäuren in den Inkubationsmedien wurde vor allem nach dem Erhöhen der Inkubationstemperatur auf 50°C am zweiten und dritten Tag der Inkubation festgestellt. Nach BIRCH (1941) gehen bis zu 33 % des Gesamtstickstoffes während der Fermentation aus den Samen verloren. Nach KIRCHHOFF *et al.* (1989a) handelt es sich hierbei vor allem um die hydrophoben Aminosäuren Leucin, Alanin, Phenylalanin, Tyrosin und Valin. Asparaginsäure und Glutaminsäure treten dagegen kaum aus den Samen aus. Das Austreten von Aminosäuren ist daher nicht verantwortlich für die Zusammensetzung der Aminosäuren in den fermentierten Samen.

Hydrolysate der Proteine unfermentierter Kakaosamen enthalten 33 % hydrophobe und 30 % saure Aminosäuren (KIRCHHOFF *et al.*, 1989a). Eine ähnliche Zusammensetzung haben auch die Hydrolysate von Globulinen aus Leguminosen. Hydrolysate der Speicherglobuline des Kakaos (Proteine mit Molekulargewichten von 26 und 44 kDa) enthalten dagegen 41 % hydrophobe und nur 26 % saure Aminosäuren (KIRCHHOFF *et al.*, 1989a). Dies ist eine Erklärung für den hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren, welcher während der Fermentation durch den Abbau der Speicherproteine im Kakaosamen entsteht und für das kakaotypische Aromapotential wichtig ist. Speicherglobuline aus anderen Samen liefern kein kakaotypisches Aromapotential (VOIGT *et al.*, 1994c).

Eine weitere Erklärung für den Anstieg des Gehaltes an hydrophoben Aminosäuren im Verlauf der Inkubation ist die Spezifität der Carboxypeptidase, welche für die Freisetzung der Aminosäuren verantwortlich ist. Diese spaltet bevorzugt hydrophobe Aminosäuren, vor allem Alanin und Leucin (BYTOF *et al.*, 1995) von den carboxyterminalen Enden der Oligopeptide ab. Die Abspaltungsgeschwindigkeit der Aminosäuren wird zudem beschleunigt, wenn es sich bei der zweiten Aminosäure nach der carboxyterminalen ebenfalls um eine hydrophobe Aminosäure handelt, da die OH-Gruppe an der Seitenkette der hydrophoben Aminosäuren die Spaltungsrate erhöht (BYTOF *et al.*, 1995). Außerdem wird die Zusammensetzung der Aminosäuren durch den pH-Wert in den Kotyledonen beeinflusst. Bei niedrigeren pH-Werten ist der Anteil an sauren Aminosäuren höher. Bei einem pH-Wert von $\geq 5{,}0$ werden dagegen vor allem hydrophobe Aminosäuren frei. Eine Autolyse von Acetontrockenpulver bei einem pH-Wert von 5,2 führt zu einem hohen Gehalt an den hydrophoben Aminosäuren Leucin, Alanin, Phenylalanin und Tyrosin (VOIGT *et al.*, 1994). Diese Aminosäuren wurden auch im Verlauf der Inkubation verstärkt freigesetzt. Die höhere Freisetzungsrate von hydrophoben Aminosäuren bei einem pH-Wert $\geq 5{,}0$ liegt daran, dass sich der pH-Wert nahe am Aktivitätsoptimum der Carboxypeptidase bei pH 5,8 befindet (VOIGT *et al.*, 1994).

Anhand des Anstiegs der freien Aminosäurekonzentrationen in den Kotyledonen unterscheidet sich der Verlauf der fermentationsähnlichen Inkubation von dem Verlauf der frühen Keimung. Während der Keimung findet eine gegenüber der Inkubation verzögerte und langsamere Zunahme des Gehaltes an freien Aminosäuren statt.

Zu Beginn verläuft die Inkubation ähnlich wie die Keimung. Erst mit der Ansäuerung der Kotyledonen kommt es zu einem schnellen Anstieg des Gehaltes an freien Aminosäuren.

Im Verlauf der Inkubation findet vor allem ab dem dritten Tag ein starker Abbau der Speicherproteine und ein damit verbundener Anstieg des Gehaltes an Oligopeptiden und freien Aminosäuren statt. Während der Keimung beginnt der Abbau der Speicherproteine erst zu einem späteren Zeitpunkt und verläuft wesentlich langsamer. Zudem werden frei werdende Aminosäuren während der Keimung schnell metabolisiert.

Für die Bildung des kakaotypischen Aromas sind freie hydrophobe Aminosäuren äußerst wichtig, da aus ihnen und reduzierenden Zuckern über Maillardreaktionen während des Röstens das Kakaoaroma entsteht. Nach dem Rösten sind noch etwa 50 % der anfänglichen freien Aminosäuren vorhanden (ROHAN und STEWART, 1967). Für den Verlauf der Fermentation ist daher nicht die Konzentration, sondern die Zusammensetzung der freien Aminosäuren wichtig.

5.2.5 γ-Aminobuttersäure

γ-Aminobuttersäure (GABA) ist eine nicht proteinogene Aminosäure, welche weit verbreitet in Bakterien und Hefen bis hin zu Pflanzen und Vertebraten vorkommt.

Bei Pflanzen spielt GABA eine wichtige Rolle als Antwort auf unterschiedliche Stresssituationen, wie z.B. bei Trocken- und Wasserstress, bei Hitze- oder Kälteschock, bei osmotischem Stress, mechanischer Stimulation und mechanischen Schäden, Ansäuerung des Cytosols, Hypoxie, oxidativem Stress oder Stress durch Phytohormone (BOWN und SHELP, 1997; KINNERSLEY und TURANO, 2000; BOUCHÉ und FROMM, 2004). In Stresssituationen kann GABA in kurzer Zeit in großen Mengen produziert werden. Korrespondierend zur Zunahme des GABA-Gehaltes erfolgt eine Abnahme des Glutaminsäuregehaltes.

Die Synthese von GABA erfolgt durch den „GABA-shunt“ (STREETER und THOMPSON, 1972b; BOWN und SHELP, 1997; BOUCHÉ und FROMM, 2004), bei welchem Glutaminsäure unter H^+-Verbrauch zu GABA decarboxyliert wird ($Glu + H^+ \rightarrow GABA + CO_2$). Diese Reaktion wird durch die im Cytosol lokalisierte Glutamatdecarboxylase katalysiert.

In den Mitochondrien wird GABA durch reversible Transamination, katalysiert durch die GABA-Transaminase, zu Succinatsemialdehyd umgewandelt, wobei die Aminogruppe auf Pyruvat übertragen wird, so dass Alanin entsteht (GABA + Pyruvat → Succinatsemialdehyd + Alanin).

Anschließend wird Succinatsemialdehyd irreversibel durch die Succinatsemialdehyd-decarboxylase zu Succinat oxidiert, welches im Citratcyclus weiter metabolisiert wird ($Succinatsemialdehyd + NAD^+ + H_2O \rightarrow Succinat + NADH$).

Die meisten reifen, frischen Samen enthielten einen GABA-Gehalt zwischen 0,1 und 0,5 mg/g ffTM. Dieser Gehalt war unter anderem abhängig von den unterschiedlichen Reifegraden der

Früchte zum Zeitpunkt der Ernte und der Dauer von der Ernte bis zum Öffnen und Verarbeiten der Früchte.

Während der Keimung stieg der GABA-Gehalt der Samen an. Dieser Anstieg verlief zumeist sehr gleichmäßig, so dass nach sechstägiger Keimung der GABA-Gehalt in den Samen durchschnittlich 3- bis 5-mal höher war als in den ungekeimten Samen.

CHO *et al.* (2004) haben gezeigt, dass der GABA-Gehalt in gekeimtem Weizensamen 10- bis 25-mal höher ist als in ungekeimten Weizen. In Soja- (*Glycine max* L.) und in Lupinensamen (*Lupinus angustifolius* L.) steigt der Gehalt an freien Aminosäuren, insbesondere an GABA, kurz nach dem Beginn der Keimung an (MARTINEZ-VILLALUEMGA, 2006). Sojasamen enthalten am vierten Tag nach Keimungsbeginn etwa viermal höhere und Lupinensamen am neunten Tag etwa dreimal höhere GABA-Gehalte als vor der Keimung.

GABA ist vermutlich involviert in den Stickstoffmetabolismus der heranwachsenden Pflanze und dient als Stickstoffspeicher- und Transportsystem (BOWN und SHELP, 1997). Unter Bedingungen, bei denen die Glutaminsynthese gehemmt, die Proteinsynthese reduziert oder der Proteinabbau verhindert ist, steigt der GABA-Gehalt an. GABA ist daher vermutlich ein temporärer Stickstoffspeicher. Während der Entwicklung der Kotyledonen von Soja wird innerhalb von drei Stunden durch die Synthese von GABA soviel Stickstoff gespeichert, dass er für 49 % des erforderlichen Stickstoffes für Proteinsynthesen in dieser Periode ausreicht (MICALLEF und SHELP, 1989). Die GABA-Akkumulation während der Pflanzenentwicklung dient vermutlich auch der Regulation von Wachstums- und Entwicklungsprozessen. Ein Großteil des Stickstoffes wird durch die Glutaminsäure-Synthase und die Glutamin-Synthetase angesammelt, welche Glutaminsäure und Glutamin synthetisieren. Da es sich bei Glutaminsäure um die Ausgangssubstanz der meisten Aminosäuren handelt, dient GABA, welche durch die Glutamatdecarboxylase aus Glutaminsäure synthetisiert wird, vermutlich zur Regulierung des Glutaminsäuregehaltes (BOUCHÉ und FROMM, 2004). Glutamatdecarboxylase ist in allen pflanzlichen Geweben in unterschiedlichen Gehalten zu finden. Ihr Level wird durch Transkription in den jeweiligen Geweben reguliert (BOWN und SHELP, 1997).

Der „GABA-shunt“ ist außerdem ein wichtiger Schritt für den Metabolismus des Sämlings während der Entwicklung, da er Kohlenstoffgerüste zur Oxidation im Citratzyklus liefert (MARTINEZ-VILLALUEMGA, 2006).

Nach OH und CHOI (2001) stellt GABA in der Apikalregion der Wurzel während der Entwickelung von Sojasämlingen 12,3 % des Gesamtgehaltes an freien Aminosäuren, in den Kotyledonen dagegen nur 4,2 %. Zudem ist in der Apikalregion der Wurzel die Aktivität der Glutamatdecarboxylase höher als in den Kotyledonen und im reifen Gewebe. Der Glutaminsäuregehalt ist dagegen in den Kotyledonen mit einem Anteil von 13 % der freien Aminosäuren höher als in der Apikalregion der Wurzel (nur 0,2 %). Dies zeigt, dass der GABA-Gehalt und die GABA-Syntheseaktivität in jungen Geweben am höchsten sind. GABA hat vermutlich in jungen Geweben neben der Funktion als Stickstoffquelle auch die Funktion der Pathogenabwehr.

Zudem wurde in der Apikalregion der Wurzel und in den Kotyledonen ein höherer Gehalt an Calcium und Calmodulin als in den anderen Teilen des Sämlings gefunden (OH und CHOI, 2001).

Bei der Glutamatdecarboxylase handelt es sich um ein Ca^{2+}-abhängig calmodulinbindendes Protein. Die Glutamatdecarboxylase besitzt eine Calmodulin-Binderegion (BOWN und SHELP, 1997; BOUCHÉ und FROMM, 2004). Ca^{2+} wird unter anderem in Stresssituationen wie anaerobem Stress, Hitze-, Kälte- und Salzstress im Cytosol angereichert.

Untersuchungen von BOWN *et al.* (2002, 2006) zeigten, dass schon geringe mechanische Stimulationen durch ein krabbelndes Insekt bei Tabak- und Sojablättern innerhalb kürzester Zeit zu einer lokalen Akkumulation von GABA führen. Durch die mechanische Stimulierung kommt es zu einem, durch in der Plasmamembran lokalisierte und durch Dehnung aktivierbare Ca^{2+}-Kanäle vermittelten, Ca^{2+}-Anstieg im Cytosol. GABA interagiert bei Insekten mit GABA-regulierten Kanälen in den neuromuskulären Junktions, welche die Muskelkontraktionen koordinieren. Dies führt zu Schäden in der Entwicklung der Insekten, zu Zuckungen, Übererregbarkeit, Lähmung oder Tod. Pflanzen mit erhöhter GABA-Produzierkapazität sind in der Lage, einem Insektenfraß entgegenzuwirken. GABA ist daher ein schnell verfügbarer, lokaler Abwehrfaktor.

Auch während einer fermentationsähnlichen Inkubation fand eine Zunahme des GABA-Gehaltes statt. Diese verlief in den ersten 24 Stunden am steilsten. Nach 24 Stunden war der GABA-Gehalt etwa 2- bis 6-mal höher als vor der Inkubation. In einigen Samen war er sogar noch höher. In den Samen der meisten Proben stieg er bis zum zweiten Tag der Inkubation weiter an, bevor er wieder abnahm. Die Zunahme des GABA-Gehaltes erfolgte parallel zur Abnahme des pH-Wertes in den Kotyledonen. Mit dem Erhöhen der Inkubationstemperatur auf 50°C und dem Absterben der Samen kam die Bildung von GABA zum Erliegen. Zum Ende der Inkubation nahm der GABA-Gehalt wieder ab. Diese Abnahme kann unter anderem durch einen Austritt von GABA aus den Samen, durch Vergerbungsreaktionen und Metabolisierung von GABA verursacht werden.

Da die Glutamatdecarboxylase bei einem pH-Wert von 5,8 ihr Optimum hat (STREETER und THOMPSON, 1972b), führt auch ein mit einer Gewebsansäuerung verbundener H^+-Anstieg im Cytosol zu einer GABA-Akkumulation. Dagegen hat die Glutamatdecarboxylase bei einem pH-Wert von 7,0 nur 10 bis 40 % ihrer maximalen Aktivität (BOWN und SHELP, 1997). Bei der Regulation des GABA-Gehaltes handelt es sich daher neben der Aktivierung der Glutamatdecarboxylase durch einen Ca^{2+}-Anstieg im Cytosol auch um einen durch den pH-Wert regulierten Mechanismus. Bei einem pH-Wert von 5,8 erfolgt keine Aktivierung der Glutamatdecarboxylase durch den Ca^{2+}/ Calmodulin-Komplex. Diese erfolgt erst in einem pH-Bereich von 7,0-7,5.

Da die Bildung von GABA unter H^+-Verbrauch erfolgt, kann der H^+-Anstieg bei einer Ansäuerung im Gewebe durch die Bildung von GABA reduziert werden.

Bei der Zunahme des GABA-Gehaltes handelt es sich daher vermutlich um eine Reaktion auf die zunehmende Ansäuerung der Samen im Verlauf der Inkubation. Der höchste Anstieg des GABA-Gehaltes erfolgte in den meisten Proben in den ersten 24 Stunden. Im weiteren Verlauf der Inkubation stieg der Gehalt an freien Aminosäuren an. Diese wirken aufgrund ihrer zwitterionischen Eigenschaften als Puffer auf die eindringende Essigsäure, so dass das schnelle Absinken des pH-Wertes im Cytosol verlangsamt und die mit der Ansäuerung verbundene Bildung von GABA zunehmend geringer wurde.

CRAWFORD *et al.* (1994) haben bei einer Ansäuerung des Cytosols einen Anstieg des GABA-Gehaltes in Spargel (*Asparagus sprengeri*) und eine darauf folgende Abnahme des H^+-Gehaltes beschrieben. Nach CARROL *et al.* (1994) steigt die Glutamatdecarboxylaseaktivität bei einer Ansäuerung des Cytoplasmas von Karotten (*Daucus carota*) an und nimmt bei einem anschließenden Anstieg des pH-Wertes wieder ab. Dadurch wird eine schnelle Reaktion auf Ansäuerung ermöglicht. In Reissamen (*Oryza sativa*) steigt der GABA-Gehalt während der Wasseraufnahme unter leicht sauren Bedingungen an (SAIKUSA *et al.*, 1994). Auch Verletzungen von Blättern durch pflanzenfressende Insekten führen durch die Zerstörung der Zellkompartimentierung und die damit verbundene Freisetzung der sauren Vakuoleninhalte in das Cytosol zu einer schnellen Akkumulation von GABA (BOWN *et al.*; 2006)

Neben einer Ansäuerung des Cytosols führen auch anaerobe Bedingungen, wie sie in der ersten Phase der Fermentation vorliegen, zu einer verstärkten Synthese von GABA. STREETER und THOMPSON (1972) beschreiben eine Akkumulation von GABA in Radieschenblättern *(Raphanus sativus*) unter anaeroben Bedingungen. In den Wurzeln der semi-aquatischen Pflanze Reis (*Oryza sativa*) findet unter aeroben Bedingungen eine Ca^{2+}-abhängige Akkumulation von GABA statt (DAS und UCHIMIYA, 2002).

In reifen, nach der Probennahme an der Sonne getrockneten Kakaosamen war der GABA-Gehalt höher (0,5 bis 1,7 mg/g ffTM) als in frischen, ungetrockneten Samen (0,1 und 0,5 mg/g ffTM, s.o.). Auch ein durch Trocknung verursachter Stress führt zu einer gesteigerten GABA-Synthese. Dies konnte unter anderem in Kaffeesamen *Coffea arabica* gezeigt werden (MÜLLER, 2005; BYTOF *et al.*, 2005). Da es sich bei GABA um einen Osmolyten handelt, erfolgt bei Wassermangel, aber auch bei erhöhter Salzbelastung eine verstärkte GABA-Produktion. Transportproteine in den Mitochondrien transportieren sowohl GABA als auch Prolin als Osmoregulatoren (BOUCHÉ und FROMM, 2004).

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Dauer von der Ernte der Frucht bis zur Öffnung einen Einfluss auf den GABA-Gehalt hat. Samen, welche am zweiten Tag nach der Ernte aus der Frucht entnommen und anschließend an der Sonne getrocknet wurden, enthielten 0,7 bis 0,8 mg/g ffTM GABA. Samen derselben Genotypen, welche erst nach dem fünften Tag aus den Früchten entnommen und getrocknet wurden, enthielten 1,0 bis 1,7 mg/g ffTM GABA. Da es sich bei den Kakaosamen um rekalzitrante Samen handelt, kann die Keimung bei Sauerstoffzutritt schon in der Frucht erfolgen, so dass der GABA-Gehalt in frischen Samen, je nach deren physiologischer Reife, unterschiedlich sein kann.

Eine weitere Funktion von GABA für die Pflanze ist der Schutz vor oxidativem Stress durch Verhinderung einer Wasserstoffperoxidakkumulation (BOUCHÉ *et al.*, 2003). GABA wird zudem als Signalmolekül in der Pathogenabwehr und anderen Prozessen diskutiert (BOUCHÉ und FROMM, 2004). In der Sonnenblume (*Helianthus annuus*) konnte eine Stimulation der Synthese von Ethylen durch GABA nachgewiesen werden (KATHIRESAN *et al.*, 1997).

Nach ROTZOLL *et al.* (2005, 2006) ist GABA in Morcheln für den bitteren Geschmack verantwortlich. Schon Konzentrationen von 0,02 mmol/l verursachen einen trockenen,

zusammenziehenden, bitteren Geschmack. Zudem soll GABA beim Menschen blutdrucksenkend wirken und gegen Schlaflosigkeit und Depressionen helfen (SAIKUSA *et al.*, 1994; OKADA *et al*., 2000).

Sowohl während der Keimung als auch zu Beginn der Inkubation fand eine Zunahme des GABA-Gehaltes in den Kakaosamen statt. Allerdings verlief der Anstieg des GABA-Gehaltes während der Inkubation schneller und es wurden höhere GABA-Gehalte erreicht. Dies liegt vermutlich an den unterschiedlichen Bedingungen, welche während der Keimung und der Inkubation zu einer GABA-Akkumulation führen. Während der Keimung dient GABA vermutlich vor allem dem Stickstoffmetabolismus als Stickstoffquelle, Stickstoffspeicher und Transportsystem. Während der Inkubation herrschen zu Beginn keimungsähnliche Bedingungen, so dass neben der Ansäuerung und dem anaeroben Stress auch eine keimungsbedingte Zunahme des GABA-Gehaltes diskutiert wird.

5.3 Polyphenole und Polyphenoloxidaseaktivität

5.3.1 Polyphenole

Bei Polyphenolen handelt es sich um Substanzen des Sekundärmetabolismus in Pflanzen, deren Grundstrukturen alle durch aromatische Ringe mit Hydroxygruppen charakterisiert sind.

10 bis 12 % der Mesophyllzellen der Kotyledonen des Kakaos sind Idioblasten, welche in einer zentralen Vakuole Polyphenole und Purinalkaloide speichern (BIEHL, 1973). Bei dem Haupanteil der Polyphenole handelt es sich um die farblosen Catechine und Leucocyanidine und deren Polymere, welche die Astringenz und den bitteren Geschmack des Kakaos verursachen.

Während der Fermentation und der Trocknung werden die Astringenz und der bittere Geschmack durch enzymatische Oxidation der Polyphenole reduziert. Polyphenole sind nicht essentiell für die Bildung des kakaotypischen Aromas, dieses entsteht auch in ihrer Abwesenheit (ZIEGLEDER und BIEHL, 1988).

Die Catechine (Flavan-3-ole) haben einen Anteil von etwa 37 % am Gesamtpolyphenolgehalt. Bei dem hauptsächlich im Kakao vorkommenden Catechin handelt es sich um (-)-Epicatechin (35% des Polyphenolgesamtgehaltes). Daneben kommen (+)-Catechin und Spuren von (+)-Gallocatechin und (-)-Epigallocatechin im Kakao vor (WOLLGAST und ANKLAM, 2000).

Nach KIM und KEENEY (1984) enthalten reife Kakaosamen je nach Herkunft zwischen 22 und 43 mg/g ffTM Epicatechin. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ähnliche Epicatechingehalte ermittelt. Die frischen Samen enthielten zwischen 22 und 57 mg/g ffTM Epicatechin und 0,3 und 1,9 mg/g ffTM Catechin. Hierbei wurden in den untersuchten Genotypen unterschiedlich hohe Gehalte sowohl an Epicatechin als auch an Catechin nachgewiesen. Die relativ kleinen Samen des Genotypen T 79/501 enthielten im Vergleich zu den größeren Samen des Genotypen ICS 40 geringere Gehalte an Epicatechin und Catechin. Auch NIEMENAK *et al.* (2006) beschreiben genotypenabhängige Unterschiede des Polyphenolgehaltes. Zudem konnten sie einen Zusammenhang zwischen der Höhe des Catechingehaltes und der Anzahl der Samen pro Frucht nachweisen. Früchte mit weniger Samen enthielten höhere Catechingehalte im Vergleich zu

Früchten mit mehr Samen. Zudem wird der Polyphenolgehalt durch das Düngen des Bodens und die Erntezeit beeinflusst (ELWERS *et al.*, 2009; CAMU *et al.*, 2008). Samen aus Früchten, welche auf gedüngten Böden wuchsen, enthalten weniger Polyphenole. Dasselbe gilt für Samen, welche aus Nebenernten stammen. Auch in Walnussbäumen (*Juglans regia*) konnte eine Abhängigkeit des Polyphenolgehaltes von der Jahreszeit nachgewiesen werden (SOLAR *et al*., 2006).

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Samen der unterschiedlichen Genotypen stammen jedoch alle von einer großen Plantage und wurden im selben Zeitraum geerntet, so dass düngungspezifische und saisonbedingte Unterschiede der Polyphenolgehalte vermutlich nicht vorlagen.

Neben den Catechinen enthalten die Kotyledonen des Kakaos, bis auf die weißen Samen des Criollo-Kakaos, etwa 4,5 % Anthocyane, welche für die violette Färbung verantwortlich sind (BAIGRIE, 1994). Die beiden Hauptanthocyane sind Cyanidin-3-arabinosid und Cyanidin-3-galactosid (FORSYTH, 1952). Diese Anthocyanidine liegen als Glykoside des Cyanidins vor und sind somit wasserlöslich (BIEHL, 1972).

Frische Samen enthielten zwischen 0,9 und 4,3 mg/g ffTM Cyanidin-3-galactosid und 2,1 und 10,7 mg/g ffTM Cyanidin-3-arabinosid. Die Kotyledonen des German Cocoas enthielten teilweise wesentlich höhere Anthocyangehalte (siehe Kapitel 5.3.3).

Im Verlauf einer sechs- bis zehntägigen Keimung fand keine Abnahme der untersuchten Polyphenolgehalte statt. In den Samen einiger Kotyledonen stiegen die Gehalte an Epicatechin und Catechin zunächst sogar an. Die Anthocyangehalte haben sich im untersuchten Keimungszeitraum nicht verändert. Da es sich bei den Catechinen um wichtige Bestandteile der Pathogenabwehr handelt, ist anzunehmen, dass sie in den sich entwickelnden Kotyledonen zur Abwehr gebildet werden. MAZZAFERA und ROBINSON (2000) haben eine gesteigerte Polyphenoloxidaseaktivität, welche für die Oxidation der Polyphenole verantwortlich ist, in jungen Geweben beim Kaffee (*Coffea arabica*) nachgewiesen.

Im Verlauf einer fermentationsähnlichen Inkubation nahmen die nachweisbaren Gehalte an Epicatechin und den Anthocyanen vor allem am zweiten und dritten Tag sehr stark ab. Der nachweisbare Catechingehalt wurde weniger stark reduziert. Nach viertägiger Inkubation wurden in den Kotyledonen je nach Probe durchschnittlich nur noch 30 bis 42 % des Anfangsgehaltes an Epicatechin nachgewiesen. Die Anthocyangehalte wurden sogar noch stärker reduziert. Nach viertägiger Inkubation enthielten die Kotyledonen nur noch 1,2 bis 2,3 % des ursprünglichen Gehaltes an Cyanidin-3-arabinosid. Cyanidin-3-galactosid war in den inkubierten Kotyledonen nicht mehr nachweisbar. Der Catechingehalt wurde auf durchschnittlich 34 bis 55 % des Anfangsgehaltes reduziert.

In ungetrockneten inkubierten Samen ließen sich höhere Polyphenolegehalte als in nach der Inkubation getrockneten Samen nachweisen. Der Epicatechingehalt ungetrockneter inkubierter Samen lag durchschnittlich bei 20 mg/g ffTM (± 4), der von getrockneten inkubierten Samen bei 12 mg/g ffTM (± 5). Der Catechingehalt ungetrockneter inkubierter Samen lag durchschnittlich bei 0,5 mg/g ffTM (± 0,1), der von getrockneten inkubierten Samen bei 0,3 mg/g ffTM (± 0,2).

Nach KIM und KEENEY (1984) enthalten fermentierte und getrocknete Samen unterschiedlicher Herkunft zwischen 2 und 10 mg/g ffTM Epicatechin. Die in dieser Arbeit ermittelten Werte lagen zumeist über diesem Gehalt. Dies liegt vermutlich daran, dass die Inkubationen über einen

Zeitraum von vier Tagen stattfanden und kommerzielle Inkubationen zumeist sechs bis sieben Tage dauern. CAMU *et al.* (2008) beschreiben während einer sechstägigen Fermentation eine Abnahme des Epicatechingehaltes um mehr als 70 %. Durch eine anschließende Trocknung wird der nachweisbare Epicatechingehalt nochmals um etwa 50 % verringert. Der nachweisbare Catechingehalt wird während kommerzieller Fermentationen um 20 bis 30 % reduziert (FORSYTH, 1952).

Die Abnahme des nachweisbaren Polyphenolgehaltes im Verlauf von Inkubation und Fermentation erfolgt vor allem aufgrund von Polymerisationsreaktionen der Polyphenole, bei denen komplexe Tannine entstehen, welche nicht weiter extrahierbar und daher durch die verwendete Methode nicht mehr nachweisbar sind. Durch die Aufhebung der Zellkompartimentierungen im Verlauf der Fermentation kommt es zum Austreten der Polyphenole aus ihren Speicherzellen (BIEHL, 1973). Nach DE BRITO et al. (2000) kommt es ab dem zweiten Tag der Fermentation zu einer Diffusion der Polyphenole durch die Kotyledonen. Braune, fermentierte und getrocknete Kotyledonen enthalten keine Polyphenolspeicherzellen in ihrer ursprünglichen Form mehr, sie sind weitgehend leer und zusammengedrückt (BIEHL, 1973). In violetten Kotyledonen sind die Polyphenolspeicherzellen weniger stark deformiert und enthalten noch Polyphenolanteile.

Sowohl während der Fermentation als auch während der Trocknung kommt es zu einer Oxidation der Polyphenole. Da alle Flavonoide ortho-ständige Dihydroxygruppen haben, sind sie zu Chinonen oxidierbar, welche wiederum Folgereaktionen, insbesondere Kondensationen eingehen und daher im fermentierten Kakao nicht mehr nachweisbar sind (BIEHL, 1972). Die Verbräunungsreaktionen finden erst in der letzten Phase der Fermentation und vor allem während der Trocknung statt, da die Polyphenoloxidase eine hohe Sauerstoffkonzentration benötigt.

Neben Vergerbungsreaktionen kommt es auch durch einen Austritt der Polyphenole aus den Kotyledonen zu einer Abnahme des Polyphenolgehaltes. Während der Inkubation wurde nach dem Absterben der Samen durch den Temperaturanstieg und die eindringende Essigsäure ein Anstieg der Polyphenole in den Inkubationsmedien festgestellt. Dies wird auch von BIEHL (1972) und KIM und KEENEY (1984) beschrieben.

Durch die Ansäuerung der Kotyledonen und die Freisetzung der Anthocyane aus deren Speichervakuolen in den Idioblasten verändert sich die Farbe der Kotyledonen von schiefrig zu violett. Anthocyane sind bei einem sauren pH rot und binden nach ihrer Freilassung an strukturelle Komponenten, so dass sie nicht weiter extrahierbar sind. Nach Kontakt mit Sauerstoff werden sie braun (ROHSIUS *et al*., 2006b).

Da die Ansäuerung durch Essigsäure nicht durch die Testa erfolgt, sondern nur durch den Bereich der Mikropyle und das Hilum, in dem die Farbumwandlung von schiefrig zu violett zuerst stattfindet (ROHSIUS *et al*., 2006b; ANDERSSON *et al.*; 2006), kommt es im Verlauf der Fermentation zunächst nur langsam zu Bedingungen, welche sich von denen der frühen Keimung unterscheiden. Erst nach dem Absterben der Samen durch den Temperaturanstieg und die Ansäuerung der Kotyledonen und die damit verbundene Aufhebung der Zellkompartimentierung nimmt der Polyphenolgehalt ab. Ab diesem Zeitpunkt lassen sich die Verläufe der frühen

Keimung und der fermentationsähnlichen Inkubation anhand des Polyphenolgehaltes voneinander unterscheiden.

Bei einer gezielten Steuerung der Fermentation (z.B. durch die Dauer, die Essigsäure- und Temperaturentwicklung) kann vermutlich durch eine lang anhaltende Phase keimungsähnlicher Bedingungen ein hoher Polyphenolgehalt in den fermentierten Samen erreicht werden.

Polyphenolen wird in jüngster Zeit aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften besondere Bedeutung beigemessen. Aufgrund ihrer Fähigkeit, freie Radikale zu fangen, werden ihnen gesundheitsfördernde und der Tumorbildung vorbeugende Eigenschaften nachgesagt (WOLLGAST und ANKLAM, 2000; KRIS-ETHERTON und KEEN, 2002; LEE *et al*., 2006). Für monomere Flavonoide wie Catechine konnte nachgewiesen werden, dass sie vom Menschen absorbiert werden können. (HOLLMAN *et al*., 1997). Für komplexe Polyphenole und Tannine ist dies noch nicht geklärt.

5.3.2 Polyphenoloxidase

In intakten Geweben ist die Polyphenoloxidase (PPO) in den Lumen der Thylakoide von Plastiden membranassoziiert lokalisiert (SULLIVAN *et al.*, 2004). Sie kann als sehr schnell aktivierbare, nicht membrangebundene Form oder an die Thylakoidmembran gebunden vorkommen. Da nach der Zentrifugation der zerkleinerten Kotyledonen von Kakaosamen in allen untersuchten Proben die PPO-Aktivität in den Sedimenten höher war als in den Überständen, ist anzunehmen, dass der Hauptanteil der PPO membrangebunden vorliegt.

Während der frühen Keimung stieg die PPO-Aktivität in den Kotyledonen der meisten Proben leicht an, so dass nach zehn Tagen ein durchschnittlicher Anstieg auf 181 % (± 24) der Anfangsaktivität festgestellt wurde. Da die PPO eine Abwehrfunktion in den sich entwickelnden Samen hat, bedeutet die Zunahme ihrer Aktivität während der Keimung einen Schutz für den sich entwickelnden Sämling.

Nach WONG (1989) steigt die Aktivität der PPO in Kakaosamen während der Entwicklung an. Nach MAZZAFERA und ROBINSON (2000) ist die PPO-Aktivität in jungen Geweben beim Kaffee (*Coffea arabica)* höher als in ausgereiften Geweben. Auch im Apfel (*Malus domesticus*) ist die PPO-Aktivität in jungen Geweben besonders hoch (KIM *et al.*, 2001). Vor allem während der Blütenentwicklung, den frühen Stadien der Fruchtbildung und in jungen Blättern werden die Gene von zwei unterschiedlichen PPOs stark exprimiert. Hierbei wird von zwei untersuchten PPOs vor allem eine in jungen Geweben stark exprimiert. Auch im Wiesenklee (*Trifolium pratense*), welcher drei PPOs besitzt, werden die unterschiedlichen PPOs gewebs- und entwicklungsstadienspezifisch exprimiert (SULLIVAN *et al*., 2004). Im Kakao kommen drei PPOs mit gleichen Temperatur- und pH-Optima vor (beim Forastero-Kakao 40°C und pH 5,5; FRITZ *et al*., 1986). Allerdings ist noch nicht bekannt, ob diese PPOs gewebsspezifisch oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte aber eine unterschiedlich hohe PPO-Aktivität in verschiedenen Bereichen ungekeimter Kakaosamen nachgewiesen werden. Besonders hoch war die Aktivität in der Epidermis der Kotyledonen. Diese bedarf als äußerste Schicht der Kotyledonen eines höheren Schutzes als die

darunter liegenden Schichten. An dem Radikula-Ende der ungekeimten Samen war die PPO-Aktivität dagegen geringer. MAKI und MOROHASHI (2006) haben in Tomatensamen am Radikula-Ende (*Lycopersicon esculentum*) nach dem Hervortreten der Radikula eine erhöhte PPO-Aktivität nachgewiesen.

Während einer fermentationsähnlichen Inkubation nahm die PPO-Aktivität stark ab, so dass am ersten Tag noch durchschnittlich 62 % und am zweiten nur noch Tag 12 % der Anfangsaktivität vorhanden waren. Nach HANSEN *et al*. (1998) lassen sich nach dem ersten Tag einer Fermentation noch 50 % und am zweiten Tag nur noch 6 % der Anfangsaktivität der PPO nachweisen.

Nach Forsyth *et al.* (1958) enthalten fermentierte Kakaosamen nur noch 2 % der Anfangsaktivität der PPO. Aufgrund der geringen PPO-Aktivität werden die Polyphenole in fermentierten Samen wesentlich langsamer oxidiert als in frischen Samen. Für die oxidativen Bräunungsreaktionen während der Fermentation und der Trocknung ist daher eine geringe PPO-Aktivität ausreichend. Da die PPO-Aktivität während der Fermentation stark reduziert wird, ist eine nichtenzymatische Oxidation der Polyphenole während der Trocknung möglicherweise von Bedeutung (HOLDEN, 1959).

Keimung und fermentationsähnliche Inkubation lassen sich anhand der PPO-Aktivität unterscheiden, da diese im Verlauf der Keimung ansteigt, wohingegen sie während der Inkubation schnell abnimmt. Da die Abnahme der PPO-Aktivität während der Inkubation zu einem sehr frühen Zeitpunkt beginnt, stellt sie ein frühzeitiges Unterscheidungsmerkmal für Keimung und Inkubation dar. Schon kurz nach Beginn der Inkubation wird durch die Abnahme der PPO-Aktivität der unterschiedliche Verlauf von Keimung und Inkubation deutlich.

Die PPO ließ sich nur geringfügig um maximal 15 % durch eine Inkubation mit SDS (Na-Dodecylsulfat) aktivieren. Auch MAZZAFERA und ROBINSON (2000) erreichten durch SDS nur eine Aktivierung um 10 bis 15 % der PPO in den Blättern und dem Endosperm von Kaffee (*Coffea arabica*).

Durch die Zugabe von SDS wird der noch ungelöste Teil der PPO frei und lässt sich aktivieren. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass aus den Thylakoiden freigesetzte PPO durch gerbungstypische Festlegung über Chinone an Strukturen des Samens gebunden wird und als aktives, aber strukturgebundenes Artefakt in das Sediment gelangt. Diese PPO-Formen sind nicht mehr durch SDS aktivierbar. Nach der Zugabe von SDS lässt sich daher eine höhere PPO-Aktivität nur nachweisen, wenn noch latent membranassoziierte Formen existieren. Durch die Inkubation mit SDS lässt sich die PPO um höchstens 15% aktivieren. Dies liegt vermutlich daran, dass die aktive PPO über Vergerbung z.B. an Membranen gebunden wird und daher nicht mehr messbar ist. Es handelt sich hierbei also um eine sekundäre, während der Aufarbeitung eintretende Fixierung der PPO.

5.3.3 German Cocoa

Beim German Cocoa handelt es sich um Varietäten, welche aus einer relativ geringen Anzahl von Hybriden aus Trinitario- und Amelonado-Genotypen hervorgegangen sind (EFOMBAGN *et al.*, 2006).

Die frischen Samen des German Cocoas enthalten einen ausgesprochen hohen Gehalt an Polyphenolen, vor allem an Anthocyanen. Die frischen Samen enthielten bis zu 62,2 mg/g ffTM Epicatechin, 2,1 bis 10,9 mg/g ffTM Cyanidin-3-galactosid und 5,1 bis 16,9 mg/g ffTM Cyanidin-3-arabinosid. In einigen Samen konnten sogar bis zu 29,4 g/g ffTM Cyanidin-3-arabinosid nachgewiesen werden.

Verglichen mit den anderen untersuchten Kakaovarietäten enthielten die Samen des German Cocoas im Durchschnitt wesentlich höhere Polyphenolgehalte (Tabelle 19).

Tabelle 19: Mittelwerte der Polyphenolgehalte und der PPO-Aktivität in frischen Kotyledonen des German Cocoas und in den anderen untersuchten Varietäten.

	Epicatechin	**Catechin**	**Cyanidin-3-galactosid**	**Cyanidin-3-arabinosid**	**PPO-Aktivität**
	[mg/g ffTM]				[µkat/g Frischgewicht]
Mittelwert aller untersuchten Varietäten außer German Cocoa	37 ± 9	0,8 ± 0,4	2,0 ± 1,0	5,1 ± 2,5	0,5 ± 0,1
Mittelwert German Cocoa	45 ±13	0,9 ± 0,4	5,1 ± 3,1	14,2 ± 3,1	6,2 ± 0,7

Der hohe Anthocyangehalt des German Cocoas war auch während der Keimung an der roten Färbung der Keimwurzeln erkennbar, welche schon in den ersten Tagen der Keimung auftrat.

Während der Inkubation wurde in den Inkubationsmedien des German Cocoas eine stärkere Rotfärbung durch ein Austreten der Anthocyane aus den Kotyledonen festgestellt als in den Inkubationsmedien der anderen untersuchten Varietäten.

In den inkubierten und getrockneten German Cocoa-Samen wurde dagegen kein Unterschied im Polyphenolgehalt im Vergleich zu den Samen der anderen Varietäten festgestellt.

Neben den hohen Polyphenolgehalten wiesen die frischen Samen des German Cocoas eine etwa 12-fach höhere PPO-Aktivität auf als die Samen der anderen untersuchten Varietäten. Auch nahm die PPO-Aktivität im Verlauf einer fermentationsähnlichen Inkubation langsamer ab, so dass erst nach dem dritten Tag eine Verringerung der PPO-Aktivität auf 10,2 % der Anfangsaktivität stattfand.

Vermutlich durch den hohen Polyphenolgehalt und die hohe PPO-Aktivität ist der German Cocoa nur gering anfällig gegenüber Braunfäulen (*Phytophthora megakarya*, PAULIN *et al.*, 2003). Auch

WILLIAMS (1971) beschreibt eine Abwehrfunktion der Polyphenole des Kakaos gegen Braunfäulen. In infizierten und verwundeten Geweben findet ein Anstieg des Polyphenolgehaltes und der PPO-Aktivität statt (WILLIAMS, 1971; MAZZAFERA und ROBINSON, 2000; MAKI und MOROHASHI, 2006).

Nach BECKMANN (2000) kommt es durch die nach der Zerstörung der Zellkompartimente durch Infektionen oder Verletzung ausgelöste schnelle Oxidation der Polyphenole zudem zu einer Lignifizierung und Suberinierung und einem anschließenden Zelltod. Wenn der Auslöser für diesen Stress weiter anhält, wird durch die durch die Zerstörung der Kompartimente ausgelösten Prozesse die Bildung von IAA und Ethylen unterstützt. Durch diese Phytohormone wird eine weitere Kaskade von Abwehrfunktionen in weiter entfernt liegenden Zellen eingeleitet. Die Reaktionen, welche mit der Oxidation der Polyphenole begonnen haben, lösen demnach weitere Abwehrmechanismen aus.

Nach LI und STEFFENS (2002) sind transgene Tomatenpflanzen, welche durch eine Überexprimierung der PPO eine erhöhte PPO-Aktivität enthalten, im Gegensatz zu nicht transgenen Kontrollpflanzen, resistenter gegenüber bakteriellen Pathogenen und verstärkt in der Lage, Bakterienpopulationen in den infizierten Blättern zu reduzieren.

Der vergleichsweise hohe Polyphenolgehalt und die hohe PPO-Aktivität in den Samen des German Cocoas tragen daher vermutlich zu seiner erhöhten Resistenz gegenüber Krankheiten und seiner ausgesprochenen Langlebigkeit bei.

5.4 Zucker

Für den Verlauf der Fermentation ist die Bildung von reduzierenden Zuckern wichtig, da sie an der Entwicklung des Kakaoaromas während des Röstens beteiligt sind (ROHAN und STEWART, 1966; MOHR *et al*., 1971).

Die Kotyledonen reifer Kakaosamen enthalten 2 bis 4 % ihres Trockengewichtes an freien Zuckern (ZIEGLEDER und BIEHL, 1988), wobei Saccharose etwa 90 % des Gesamtzuckers darstellt.

Frische Kotyledonen enthielten 26 bis 47 mg/g ffTM Saccharose. Sowohl im Verlauf der ersten Tage der Keimung als auch während einer fermentationsähnlichen Inkubation fand ein Abbau der Saccharose statt. Während der ersten Tage der Keimung verlief die Abnahme des Saccharosegehaltes gleichmäßig, so dass sich ihr Gehalt nach vier Tagen in den Samen der meisten der untersuchten Keimungsreihen auf 68 bis 90 % des Anfangsgehaltes reduzierte. Zwischen dem sechsten und achten Tag der Keimung stieg der Gehalt wieder an.

Während der Inkubation verlief die Abnahme des Saccharosegehaltes wesentlich schneller, vor allem am zweiten und dritten Tag der Inkubation, so dass am vierten Tag in einigen Samen keine Saccharose mehr nachweisbar war. In den meisten anderen Samen lag der Gehalt zwischen 12 und 16 % des Anfangsgehaltes, in einigen Samen auch etwas darüber.

Durch die Hydrolyse der Saccharose, katalysiert durch die Invertase (LOPEZ *et al.*, 1978), entstehen Fructose und Glucose. Während der Keimung wurden diese reduzierenden Zucker ab dem vierten bis sechsten Tag und während der Inkubation ab dem zweiten Tag nachgewiesen.

Während der Keimung stiegen die Gehalte an Fructose und Glucose erst zu einem etwas späteren Zeitpunkt und langsamer als im Verlauf der Inkubation an. Dies hängt vermutlich mit dem langsameren Abbau der Saccharose und dem schnellen Abbau von Fructose und Glucose während der Keimung zusammen.

Nach ROHAN und STEWART (1967b) erfolgt die maximale Zunahme des Gehaltes an reduzierenden Zuckern am zweiten und dritten Tag der Fermentation. Danach bleibt er konstant, bevor er zum Ende der Fermentation wieder abnimmt. Nach HASHIM *et al*. (1998) steigt der Gehalt an reduzierenden Zuckern während einer sechstägigen Fermentation um ca. 200 % an.

Die Zunahme des Fructose- und Glucosegehaltes ist jedoch geringer als die Abnahme des Saccharosegehaltes, da diese Zucker, vor allem während der Keimung, aber auch während der Inkubation metabolisiert werden.

Nach HASHIM *et al*. (1998) nimmt der Gesamtzuckergehalt im Verlauf einer sechstägigen Fermentation um 75 % ab.

Nach HANSEN *et al.* (1998) hat die für den Abbau der Saccharose in den Kotyledonen verantwortliche Invertase ein pH-Optimum von 4,5. Durch die Abnahme des pH-Wertes der Kotyledonen im Verlauf der Inkubation wird ihre Aktivität daher vermutlich gesteigert, so dass es vor allem ab dem zweiten Tag der Inkubation, wenn der pH-Wert der Kotyledonen abgenommen hat, zu einem verstärkten Abbau der Saccharose kommt. Allerdings ist die Invertaseaktivität nach zweitägiger Fermentation nur noch sehr gering (HANSEN *et al.*, 1998).

Nach REINECCIUS (1972) enthalten fermentierte Samen aufgrund des bevorzugten Metabolismus von Glucose 2- bis 16-mal mehr Fructose als Glucose. Dies konnte in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Inkubationen aber nicht festgestellt werden. Die Samen enthielten zumeist nur einen geringfügig höheren Gehalt an Fructose als an Glucose. Dies lässt sich vermutlich durch die kurze Inkubationsdauer von vier Tagen erklären, in denen der Metabolismus von Glucose noch nicht so ausgeprägt stattgefunden hat. Kommerzielle Fermentationen finden dagegen zumeist über einen Zeitraum von sechs bis sieben Tagen statt.

Gut fermentierte Samen enthalten weniger als 0,1 % des Trockengewichtes an Saccharose (ZIEGLEDER und BIEHL, 1988). Der Fructose- und der Glucosegehalt betragen dagegen etwa 0,34 bis 1,38 % des Trockengewichtes (REINECCIUS, 1972) und stellen somit einen Großteil des Gesamtgehaltes an Zuckern (0,39 bis 3,48 %). Schlecht fermentierte Samen enthalten etwa 1 % des Trockengewichtes Saccharose.

Nach ROHAN und STEWART (1967b) wird der Maximalgehalt an reduzierenden Zuckern während der Fermentation zum selben Zeitpunkt wie der Maximalgehalt an freien Aminosäuren erreicht, so dass zu diesem Zeitpunkt optimale Bedingungen für die Bildung des Kakaoaromas vorliegen.

Nach REINECCIUS *et al*. (1972) sind die Zuckerzusammensetzungen in frischen Samen unabhängig von der geographischen Herkunft, sie werden wahrscheinlich aber durch den Erntezeitpunkt, die Fermentation und die Trocknung beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit lagen die in den frischen Samen ermittelten Saccharosegehalte der unterschiedlichen untersuchten Genotypen alle in einem ähnlichen Bereich, nur die Samen des Genotypen ICS 40 enthielten etwas höhere Gehalte, so dass keine genotypisch spezifischen Zuckergehalte festgestellt wurden. Nach HANSEN *et al.* (1998) weisen die Kotyledonen unterschiedlicher Genotypen zudem keine Unterschiede der

Invertaseaktivität auf, so dass der Saccharoseabbau während Keimung und Fermentation unabhängig von den jeweiligen Genotypen erfolgt.

Sowohl während der Keimung als auch im Verlauf einer fermentationsähnlichen Inkubation erfolgt ein Saccharoseabbau. Bis zum zweiten Tag der Inkubation verläuft der Abbau mit einer ähnlichen Geschwindigkeit wie in den ersten Tagen der Keimung. Dies deutet auf keimungsähnliche Bedingungen zu diesem Zeitpunkt hin. Erst durch die Ansäuerung der Kotyledonen im Verlauf der Inkubation wird die Abbaugeschwindigkeit der Saccharose gesteigert. Ab diesem Zeitpunkt lassen sich die Verläufe von Keimung und Inkubation anhand des Saccharoseabbaus unterscheiden.

5.5 Methylxanthine (Theobromin und Coffein)

STARK *et al.* (2006) haben 84 potentielle Geschmackskomponenten in gerösteten Kakaosamen identifiziert. Der bittere Geschmack wird neben den adstringierenden Flavon-3-olen, Flavonglycosiden und der γ-Aminobuttersäure durch die Methylxanthine Theobromin und Coffein verursacht. Desweiteren sind die Methylxanthine für die anregende und stimmungsaufhellende Wirkung des Kakaos auf den Menschen verantwortlich.

Die frischen Kakaosamen enthielten je nach genetischer Herkunft zwischen 20 und 55 mg/g ffTM Theobromin und 0,8 bis 5,9 mg/g ffTM Coffein. In einigen Samen lag der Coffeingehalt unter der Nachweisbarkeitsgrenze. Nach TIMBE *et al.* (1978) enthalten Kakaosamen einen Gesamtgehalt an Methylxanthinen zwischen 24 und 50 mg/g ffTM, wobei Theobromin 52 bis 99 % ausmacht. Nach ZIEGLEDER und BIEHL (1988) enthalten frische Kakaosamen zwischen 1 und 2 % Theobromin, 0,2 % Coffein, Spuren an Theophyllin, 7-Methylxanthin und Adenin. Das Verhältnis von Theobromin zu Coffein variiert in reifen Samen je nach genetischem Ursprung (CHEVALLEY, 1976; PAVIA und JANICK 1983). Afrikanische Kakaos enthalten dabei weniger Coffein als „Fine"-Kakaos aus Amerika. Von den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Varietäten enthielten die Samen der Genotypen SNK 13 und ICS 40 die höchsten Gehalte an Coffein. Die niedrigsten Gehalte wurden in den Samen des German Cocoas nachgewiesen.

Der Methylxanthingehalt wird nach CAMU *et al*. (2008) zudem durch den Erntezeitpunkt beeinflusst. Kakaosamen aus Nebenernten enthalten geringere Gehalte an Theobromin und Coffein als Kakaosamen aus Haupternten.

Nach ZIEGLEDER und BIEHL (1988) wird Theobromin erst während des letzten Stadiums der Fruchtreife in den Samen angesammelt und nach TIMBE *et al.* (1978) ist die Akkumulation von Methylxanthinen in reifen Samen am höchsten.

PUNYASIRI *et al.* (2005) konnten zudem nachweisen, dass sowohl der Theobromin- als auch der Coffeingehalt während einer Pilzinfektion durch *Exobasidium vexans* in Teeblättern gesteigert wird, da diese Methylxanthine der Pathogenabwehr dienen.

Über den gesamten untersuchten Zeitraum der Keimung haben sich die Theobromin- und Coffeingehalte in den Kakaosamen nicht verändert. Im Verlauf einer fermentationsähnlichen

Inkubation nahmen die Gehalte dagegen ab, so dass die Samen nach dem vierten Tag der Inkubation im Durchschnitt nur noch 60 % (± 20) des Anfangsgehaltes enthielten. Hierbei hat vor allem der Gehalt an Theobromin in den Samen der meisten Proben um 12 bis 65 % abgenommen. Die Abnahme des Coffeingehaltes war wesentlich geringer. Auch CAMU *et al*. (2008) beschreiben einen weitgehend konstant bleibenden Coffeingehalt im Verlauf einer sechstägigen Fermentation.

Nach TIMBE *et al.* (1978) nimmt der Gehalt an Methylxanthinen im Verlauf der Fermentation um etwa 25 % ab. Nach der Zerstörung der Zellkompartimente diffundieren die wasserlöslichen Methylxanthine aus Kotyledonen in die ursprünglich methylxanthinfreien Samenschalen, so dass diese bei gut fermentierten Forastero-Kakaos 0,8 bis 3,0 % Theobromin enthalten (KNAPP und WADSWORTH, 1924). Nach ZIEGLEDER und BIEHL (1988) gibt es keinen Nachweis für chemische Veränderungen der Methylxanthine während der Fermentation.

Die durch das Herausdiffundieren bedingte Abnahme wurde vor allem ab dem dritten bis vierten Tag der Inkubation festgestellt, da Theobromin, welches in intakten Samen schwach an Tannin gebunden vorkommt (BELITZ *et al*., 2007), zu diesem Zeitpunkt vermutlich durch die eindringende Essigsäure gelöst wird. Außerdem kommt es zu diesem Zeitpunkt zum Verlust der Zellkompartimente, so dass die Methylxanthine aus den Vakuolen der Idioblasten, in welchen sie gespeichert werden, austreten. Durch die aus den Kotyledonen austretenden Methylxanthine bilden sich gelegentlich weiße Punkte, sogenannte „white spots“, auf den Oberflächen der Kotyledonen.

Nach KICKARTZ *et al.* (1987) werden die Gehalte an Methylxanthinen in fermentierten Samen aus derselben Kakaovarietät auch durch das Gewicht der einzelnen Samen beeinflusst. So enthalten Samen mit zunehmendem Gewicht höhere Gehalte an Methylxanthinen. Dies kann unter anderem daran liegen, dass kleine Samen im Verhältnis zu großen Samen eine größere Oberfläche haben und daher ein höherer Austritt der Methylxanthine während der Fermentation erfolgt. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Vergleich unterschiedlicher Varietäten konnte kein Zusammenhang zwischen der Abnahme des Gehaltes an Methylxanthinen und der durchschnittlichen Größe der Samen der jeweiligen Varietät festgestellt werden.

Keimung und fermentationsähnliche Inkubation lassen sich anhand der Abnahme vor allem des Theobromingehaltes im Verlauf von Inkubation und Fermentation unterscheiden. Allerdings ist diese Abnahme in einigen Samen sehr gering. Die Methylxanthingehalte und ihre Zusammensetzung hängen zudem sowohl in frischen als auch in fermentierten Samen von dem jeweiligen Genotyp, der geographischen Herkunft, der Fermentationsmethode und dem Samengewicht ab.

5.6 Polyamine

In den letzten Jahren werden natürlich vorkommende Polyamine wie Putrescin, Spermidin und Spermin verstärkt mit zellulären und physiologischen Prozessen als Regulatoren während des Pflanzenwachstuns und der Entwicklung in Verbindung gebracht. Veränderungen des Polyamingehaltes und der Aktivität der an der Polyaminsynthese beteiligten Enzyme konnten in vielen Pflanzen während der Keimung und der frühen Sämlingsentwicklung nachgewiesen

werden. Hohe Polyamingehalte werden daher mit aktivem Wachstum der pflanzlichen Gewebe in Verbindung gebracht, aber auch als Antwort auf unterschiedliche Stresssituationen gesehen.

Nach SAWHNEY *et al.* (1985) sind Putrescin und Spermidin wichtig für Zellteilungs- und Differenzierungsprozesse. In Gegenwart von Inhibitoren der Enzyme, welche für die Polyaminsynthese verantwortlich sind, verlangsamen sich die Zellteilungsrate und das Wachstum pflanzlicher Gewebe. SAVITHRAMMA und SWAMY (1989) wiesen nach, dass die Gehalte an Putrescin, Spermin, Spermidin und Cadaverin während der Samenentwicklung in den Samen von Erdnüssen (*Arachis hypogaea*) ebenso wie die Aktivität der Arginindecarboxylase, welche neben anderen Enzymen für die Synthese von Polyaminen verantwortlich ist, ansteigen. Während der Keimung erfolgt eine Translokation der Polyamine aus den Kotyledonen in die sich entwickelnden embryonalen Achsen und den Sämling (BAGNI, 1970).

Zudem konnten BONNEAU *et al*. (1994) in Reissamen (*Oryza sativa*) mit hohem Keimungspotential einen höheren Polyamingehalt (Putrescin, Spermidin, Spermin, Tyramin) feststellen als in Samen mit einer niedrigen Keimungsfrequenz.

In den untersuchten Kakaosamen stieg der Putrescingehalt im Verlauf einer Keimung in den meisten Samen ab dem zweiten Tag an, so dass er am sechsten Tag 135 bis 353 % des Anfangsgehaltes erreichte. In einigen Samen war der Anstieg sogar noch höher. Die Spermin- und die Spermidingehalte nahmen während einer sechstägigen Keimung in den meisten untersuchten Samen ab. In einigen Samen konnte jedoch ein Anstieg festgestellt werden. Im Verlauf einer fermentationsähnlichen Inkubation wurde keine Veränderung der Polyamingehalte festgestellt.

Nach BENAVIDES *et al.* (1997) steigt der Polyamingehalt, vor allem der Putrescinghalt, in Sonnenblumensämlingen (*Helianthus annuus*) während der Keimung an, so dass er nach dreitägiger Keimung bei 370 % des Anfangsgehaltes liegt. Auch in Reis- und Sojasamen (*Glycine max*) steigt der Polyamingehalt während der Keimung an (BONNEAU *et al*., 1994; GLÓRIA *et al*., 2005).

Nach BAGNI (1970) wird die Neusynthese von Polyaminen in Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) während der Keimung durch Licht begünstigt. Die Aminosäuren, welche die Vorstufen für die Polyamine sind, stammen hierbei aus der Spaltung der Kotyledonenproteine.

Zudem scheint es eine gewebespezifische Verteilung der Polyamine zu geben. Spermin und Spermidin werden in sich entwickelnden Sojasämlingen vor allem in den Kotyledonen, Putrescin und Cadaverin vor allem in der Radikula und dem Hypokotyl akkumuliert (GLÓRIA *et al*., 2005; LIN, 1984). Da Akkumulationen von Cadaverin und Putrescin vor allem in Gewebebereichen mit Streckungswachstum stattfinden, sind sie vermutlich wichtig für die Zelldifferenzierungs- und Verlängerungsprozesse. Der Spermidingehalt nimmt dagegen in diesen Bereichen ab (LIN, 1984).

Neben ihrer Beteiligung an den Keimungsprozessen wurde den Polyaminen auch eine wichtige Funktion in weiteren Entwicklungsprozessen von Pflanzen, wie der Blütenentwicklung, nachgewiesen (ARIBAUD und MARTIN-TANGUY, 1994; TARENGHI und MARTIN-TANGUY, 1995). Nach LAW *et al*. (1991) sind Polyamine auch an Reife- und Überreifeprozessen in Früchten beteiligt.

Zudem wurde gezeigt, dass Polyamine, vor allem Putrescin, in dormanten Samen nach der Aufhebung der Dormanz verstärkt gebildet werden und so den Keimungsprozess einleiten (BÉRANGER-NOVAT *et al*., 1997; SZCZOTKA *et al*., 2003). Dormante Samen des Spindelbaumes

(Pfaffenhütchen, *Euonymus europaeus*) enthalten kein Putrescin. Erst nach der Aufhebung der Dormanz durch eine Behandlung mit Gibberelinsäure kommt es zu einem Anstieg der Arginindecarboxylaseaktivität und einer damit verbundenen Akkumulation von Putrescin. Etwas verzögert setzt anschließend die Synthese von Spermidin ein, welches unter anderem aus Putrescin gebildet wird. Spermidin ist nach SZCZOTKA *et al*. (2003) wichtig für die Proteinsynthese nach der Dormanz zu Beginn der Keimung.

Neben ihrer Funktion während Keimungs- und Differenzierungsprozessen in Pflanzen sind Polyamine wichtig als Antwort auf unterschiedliche Stresssituationen wie Trockenstress (BAE *et al*., 2008; ZEID und SHEDEED, 2006) und Salzstress (ZAPATA *et al*., 2004; BENAVIDES *et al*., 1997). Nach BAE *et al*. (2008) werden die an der Polyaminbiosynthese beteiligten Enzyme in Kakaobäumen nach dem Einsetzen von Trockenstress verstärkt exprimiert, vor allem in reifen Blättern und Blüten, so dass 13 Tage nach Beginn des Trockenstresses erhöhte Gehalte an Putrescin, Spermidin und Spermin in den Blättern festgestellt wurden. Zudem wurde nachgewiesen, dass die an der Polyaminbiosynthese beteiligten Gene auch nach mechanischer Verwundung oder Infektion durch *Phytophtora*, dem Auslöser von Braunfäule, verstärkt exprimiert wurden. Vermutlich steigt durch eine erhöhte Polyaminkonzentration die Stresstoleranz.

Aufgrund ihrer Funktion bei Wachstums- und Differenzierungsprozessen spielen Polyamine während der Keimung eine wichtige Rolle. Im Gegensatz dazu findet im Verlauf einer fermentationsähnlichen Inkubation keine Veränderung im Gehalt der untersuchten Polyamine statt. Dies liegt vermutlich daran, dass die physiologischen Veränderungen, welche in den Kotyledonen durch den Temperaturanstieg und die eindringende Essigsäure erfolgen, zu schnell ablaufen, so dass die Prozesse, welche während der Keimung zu einer Polyaminsynthese führen, nicht eingeleitet werden.

6 Zusammenfassung

Um die Verläufe von Keimung und fermentationsähnlicher Inkubation zu charakterisieren, wurden biochemische und enzymatische Indikatoren in Samen von Kakao (*Theobroma cacao* L.) analysiert.

Frische, inkubierte und gekeimte Kakaosamen unterschiedlicher Varietäten wurden anhand des Protein-, des Oligopeptid-, des Aminosäure-, des Polyphenol-, des Methylxanthin-, des Zucker- und des Polyamingehaltes charakterisiert. Außerdem erfolgten Aktivitätsbestimmungen der Proteasen, die für die spezifische Spaltung der Speicherproteine verantwortlich sind, und der Polyphenoloxidase, dem Enzym, das an den kakaotypischen Bräunungsreaktionen primär beteiligt ist, sowie die Untersuchung der Wasseraufnahme und des pH-Wertes, der bei der Fermentation durch Eindringen von Essigsäure in die Samen abfällt.

Reife Kakaosamen enthielten einen Wassergehalt zwischen 27 und 40 %. Sowohl im Verlauf der frühen Keimung als auch zu Beginn der Inkubation stieg der Wassergehalt in den Samen an, wobei der Anstieg während der Keimung größer war. Bei einer Keimung der Samen mit Testa verzögerte sich die Wasseraufnahme im Vergleich zur Wasseraufnahme bei einer Keimung von Samen ohne Testa. Im weiteren Verlauf der Inkubation nahm der Wassergehalt nach dem Absterben der Samen wieder ab.

Im Verlauf der fermentationsähnlichen Inkubation fand ab dem dritten Tag ein verstärkter Abbau der Speicherproteine statt. Während der Keimung begann erst ab dem sechsten bis achten Tag ein Abbau der Speicherproteine, der zudem wesentlich langsamer erfolgte.

Parallel zum Abbau der Speicherproteine stiegen im Verlauf der Inkubation die Gehalte an Oligopeptiden und freien Aminosäuren an. In den frischen Samen wurden nur sehr geringe Gehalte an Oligopeptiden nachgewiesen. Erst im Verlauf der Inkubation stiegen diese durch die hydrolytische Aktivität der Aspartylendoprotease, die die Proteine im Bereich der hydrophoben Aminosäuren spaltet (VOIGT und BIEHL, 1995), an. In den ersten sechs Tagen der Keimung wurde kein Anstieg des Oligopeptidgehaltes festgestellt.

Parallel zur Abnahme des pH-Wertes stieg der Gehalt an freien Aminosäuren im Verlauf der Inkubation stark an, so dass die Samen nach einer viertägigen Inkubation etwa 350 % des Ausgangsgehaltes an freien Aminosäuren enthielten. Besonders hoch war die Zunahme des Gehaltes an hydrophoben Aminosäuren, welche durch die spezifische Charakteristik der Carboxypeptidase frei werden (BYTOF *et al.*, 1995). Im Verlauf der ersten Tage der Keimung stieg der Gehalt an freien Aminosäuren nur langsam an und die Zusammensetzung von hydrophoben und sauren Aminosäuren blieb weitgehend unverändert. Nach einer Sonnentrocknung frischer Samen wurde eine Abnahme des Gehaltes an sauren Aminosäuren und deren Säureamiden festgestellt.

Neben dem Abbau der Speicherproteine wurde die Aktivität der für den Abbau verantwortlichen Proteasen untersucht. Während der ersten Tage der Keimung veränderte sich die potentiell vorhandene Aktivität der Aspartylendoprotease nicht, die der Carboxypeptidase stieg an. Im Verlauf der Inkubation nahmen die Aktivitäten der Proteasen dagegen nach dem Erhöhen der Temperatur auf 50°C ab.

Die Bestimmung des γ-Aminobuttersäuregehaltes gibt Aufschluss über den Verlauf von Keimung und Inkubation, da ungekeimte Samen nur sehr geringe Mengen an γ-Aminobuttersäure enthalten. Sowohl während der Keimung als auch in der ersten Phase der Inkubation, bis zum Erhöhen der Temperatur auf 50°C, stieg der γ-Aminobuttersäuregehalt in den Samen an. Während der Keimung verlief dieser Anstieg wesentlich langsamer als im Verlauf der Inkubation. In frischen, an der Sonne getrockneten Kakaosamen wurde ein trocknungsbedingt erhöhter γ-Aminobuttersäuregehalt nachgewiesen.

Der Gehalt an phenolischen Substanzen, welche für den adstringierenden bitteren Geschmack des Kakaos verantwortlich sind, veränderten sich während der ersten Tage der Keimung kaum, wohingegen er im Verlauf der Inkubation stark abnahm. Anthocyane, die für die violette Färbung der Kotyledonen verantwortlich sind, waren nach einer viertägigen Inkubation zumeist nicht mehr nachweisbar.

Die Samen des German Cocoas unterschieden sich hinsichtlich ihres Gehaltes an phenolischen Substanzen von den Samen der anderen untersuchten Kakaovarietäten. Sie waren durch einen hohen Gehalt an Anthocyanen und eine etwa zehnmal höhere PPO-Aktivität gekennzeichnet.

Im Verlauf der Inkubation nahm die Aktivität der PPO nach dem Absterben der Samen stark ab, so dass in den inkubierten Samen nur noch eine geringe Restaktivität nachweisbar war. Während der Keimung stieg ihre Aktivität dagegen zumeist an.

Sowohl im Verlauf der Inkubation als auch während der ersten Tage der Keimung nahm der Saccharosegehalt in den Kakaosamen ab. Diese Abnahme verlief während der Inkubation schneller als im Verlauf der Keimung. Während der Keimung stieg der Saccharosegehalt ab dem sechsten Tag wieder an. Parallel zum Abbau der Saccharose stiegen im Verlauf der Inkubation ab dem zweiten und während der Keimung ab dem vierten bis sechsten Tag die Gehalte an Fructose und Glucose an.

Während der Inkubation nahmen der Theobromin- und der Coffeingehalt, vor allem nach dem Erhöhen der Temperatur auf 50°C, ab, wohingegen sie sich im Verlauf der frühen Keimung nicht veränderten.

Die Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin verhielten sich während der frühen Keimung und der fermentationsähnlichen Inkubation unterschiedlich. Während der Keimung sind sie vermutlich an den Zellteilungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt (SAWHNEY *et al.*, 1985). Damit stimmt überein, dass ab dem sechsten Tag der Keimung ein Anstieg des Putrescingehaltes nachweisbar war. Während der Inkubationen blieb der Gehalt an Putrescin unverändert.

Da die Essigsäurekonzentration in den Samen nur langsam ansteigt, liegen in der ersten Phase der Inkubation keimungsähnliche Bedingungen vor, durch welche vermutlich bis zum Absterben der Samen Prozesse induziert werden, die zu einer beginnenden Keimung führen. In dieser Phase der Inkubation verlaufen die in den Samen stattfindenden Prozesse ähnlich wie zu Beginn der Keimung. Diese erste Phase der Inkubation spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle für den Beginn der während der Inkubation ablaufenden Prozesse.

Erst nach dem Absterben der Samen durch die Erhöhung der Temperatur und das Eindringen der Essigsäure in die Samen unterscheiden sich die während der Inkubation ablaufenden Prozesse von denen welche bei der Keimung stattfinden.

Inkubierte Samen sind durch eine fast vollständige Proteolyse des Globulins vom Vicilintyp und einen durch die spezifische Spaltungscharakteristik der Proteasen bedingten hohen Gehalt an freien hydrophoben Aminosäuren und hydrophilen Oligopeptiden, einen geringen Gehalt an phenolischen Substanzen und Saccharose und einen relativ hohen Gehalt an freien reduzierenden Zuckern gekennzeichnet. Diese während der Inkubation ablaufenden Prozesse spielen für die Bildung des Kakaoaromas eine wichtige Rolle.

Auch während der Keimung kommt es zu einem Abbau der Speicherproteine und der Saccharose, jedoch verlaufen diese Abbauprozesse wesentlich langsamer als während der Inkubation. Vor allem das Verhältnis von hydrophoben zu sauren Aminosäuren stellt ein Unterscheidungsmerkmal für Keimung und Inkubation dar. Gekeimte Samen enthalten, ähnlich wie ungekeimte Samen, einen hohen Anteil an sauren Aminosäuren und deren Säureamiden, wohingegen inkubierte Samen einen besonders hohen Gehalt an hydrophoben Aminosäuren aufweisen.

7 Verzeichnisse

7.1 Literaturverzeichnis

Alvim, P. De T. (1984): Flowering of Cocoa. Cocoa Growers' Bull. 35, S. 23-31

Amin, I.; Jinap, S.; Jamilah, B (1998): Proteolytic Activity (Aspartic Endoproteinase and Carboxypeptidase) of Cocoa Bean during Fermentation. Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 76, S. 123-128

Amin, I.; Jinap, S.; Jamilah, B.; Harikrisna, K.; Biehl, B. (2002): Oligopeptide patterns produced from *Theobroma cacao* L. of various genetic origins. Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 82, S. 733-737

Amin, I.; Jinap, S.; Jamilah, B.; Harikrisna, K.; Biehl, B. (2002b): Analysis of vicilin (7S)-class globulin in cocoa cotyledons from various genetic origins. Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 82, S.728-732

Andersson, M.; Koch, G.; Lieberei, R. (2006): Structure and function of the seed coat of *Theobroma cacao* L. and its possible impact on flavor precursor development during fermentation. Journal of Applied Botany and Food Quality, Vol. 80, S. 48-62

Aribaud, M.; Martin-Tanguy, J. (1994): Polyamine metabolism, floral initiation and floral development in Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). Plant Growth Regulation, Vol. 15, S. 23-31

Bae, H.; Kim, S.-H.; Kim, M.; Sicher, R.; Lary, D.; Strem, M.; Natarajan, S.; Bailey, B. (2008): The drought response of *Theobroma cacao* (cacao) and the regulation genes involved in polyamine biosynthesis by drought and other stresses. Plant Physiology and Biochemistry, Vol. 46, S. 174-188

Bagni, N. (1970): Metabolic changes of Polyamines during the Germination of *Phaseolus vulgaris*. New Phytol., Vol. 69, S. 159-164

Baigrie, B. (1994): Cocoa flavour. In: J. R. Patterson (EDS). Understanding national flavours; The university of the West Indies, Trinidad and Tobago, S. 268-282

Balasimha, D.; Subramonian, N.; Subbalah, C. C. (1985): Water relation and photosynthetic efficiency in relation to growtz and yield of cocoa. Annu. Rep. 1983, S. 166–167. Central Plantation Crops Research Institute Kasaragod

Bartley, B. (2005): The Genetic Diversity of Cacao and its Utilization. CABI Publishing, Oxforsshire, Cambridge, S. 283-284

Beckmann, C. (2000): Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defense responses in plants? Physiological and Molecular Plant Pathology, Vol. 57, S. 101-110

Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. (2007): Lebensmittelchemie. 6. überarbeitete Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg, S. 969-1003

Benavides, M.; Aizencang, G.; Tomaro, M. (1997): Polyamines in *Helianthus annuus* L. during Germination under Salt Stress. J Plant Growth Regul, Vol. 16, S. 205-211

Benize, M.; Hahn, D.; Vincent, J.-C. (1972): Le "White Spot" des fèves de cacao. Café Cacao Thé 16, S. 236-242

Béranger-Novat, N.; Monin, J.; Jassey, J.; Martin-Tanguy, J. (1997): Polyamine catabolism in dormant embryos of the spindle tree (*Euonymus europaeus* L.) and in dormancy break obtained after treatment with gibberellic acid. Plant Groth Regulation, Vol. 21, S. 65-70

Bewley, J. D.; Black, M. (1978): Physiology and Biochemistry of Seeds. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Vol. 1

Biehl, B. (1961): Untersuchung zur Kakaofermentation in Bahia. Gordian, Vol. 61 (1443), S. 26-35

Biehl, B. (1966): Proteinhydrolyse während der Kakaofermentation in Abhängigkeit von Wechselwirkungen mit Polyphenolen unter anaeroben und aeroben Bedingungen. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchungen und –Forschung, Vol. 133, S. 145-159

Biehl, B. (1969): Über die Bildung flüchtiger Säuren in der Pulpa und in den Kakaokernen während der Kakaofermentation in Bahia. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und –Forschung, Vol. 139 (2), S. 76-85

Biehl, B. (1972): Enzymologische und cytologische Probleme der Kakaoaufbereitung. Ann. Technol. agric. Vol. 21 (3), S. 435-455

Biehl, B. (1973): Veränderung der subcellulären Struktur in Keimblättern von Kakaosamen (Theobroma cacao L.) während der Fermentation und Trocknung. Z. Lebensm. Unters.-Forschung, Vol. 153, S. 137-150

Biehl, B.; Voigt, J. (1995): Biochemische Prozesse bei der Kakaofermentation bestimmen die Kakaoqualität. Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V., Berichte der 53. Diskussionstagung, 21-22. März 1995 in Braunschweig, Germany. S. 120-140

Biehl, B.; Voigt, J. (1995b): Nacherntebehandlung, Fermentation, Proteolyse und Bildung der Aromavorstufen beim Kakao. Proceedings of the 1st Symposion on useful plants of the Tropics, Sep. 22-24 1995, Institut für Angewandte Botanik, Hamburg. In: Berichte der Angewandten Botanik. 5, S. 124-137

Biehl, B.; Passern, U.; Passern, D. (1977): Subcellular Structures in Fermenting Cocoa Beans. Effect of Aeration and Temperture Durind Seed and Fragment Incubation. Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 28, S. 41-52

Biehl, B.; Passern, D. (1982): Proteolysis during fermentation like incubation of cocoa seeds. Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 33, S. 1280-1290

Biehl, B.; Passern, D.; Sagemann, W. (1982b): Effect of Acetic Acid on Subcellular Structures of Cocoa Bean Cotyledons. Sci. Food Agric., Vol. 33, S. 1101-1109

Biehl, B.; Quesnel, V.; Passern, D.; Sagemann, W. (1982c): Water Uptake by Cocoa seeds During Fermentation-like Incubation. Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 33, S. 1110-1116

Biehl, B.; Wewetzer, C.; Passern, D. (1982d): Vacuolar (Storage) Proteins of Cocoa Seeds and their Degradation during Germination and Fermentation.J. Sci. Food Agric., Vol. 33, S. 1291-1304

Biehl, B.; Adomako, D. (1983): Die Kakaofermentation (Steuerung, Acidation, Proteolyse). Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem., Vol. 37, S. 57-63

Biehl, B.; Heinrichs, H.; Ziegeler-Berghausen, H.; Srivastava, S.; Xiong, Q.; Passern, D.; Senyuk, V. I.; Hammoor, M. (1993): The Proteases of Ungeminated Cocoa Seeds and Their Role in the Fermentation Process. Angew. Bot., Vol. 67, S. 59-65

Birch, H. (1941): Changes in the nitrogenous components of *Forastero cacao* during fermentation. Tenth Ann. Rep. on Cacao Res., Imp. Coll. Trop. Agric, Trinidad, S. 22-33, aus: Kirchhoff, P.-M.; Biehl, B.; Crone, G. (1989a): Peculiarity of the accumulation of free amino acids during cocoa fermentation. Food Chemistry, Vol. 31, S. 295-311

Bonneau, L.; Carre, M.; Martin-Tanguy, J. (1994): Polyamines and related enzymes in rice seeds differing in germination potential. Plant Growth Regulation, Vol. 15, S. 75-82

Bouché, N.; Fait, A.; Bouchez, D.; Møller, S.; Fromm, H. (2003): Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the γ-aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants. Plant Biology, Vol. 100 (11), S.6843-6848

Bouché, N.; Fromm, H. (2004): GABA in plants: just a metabolite? Trends in Plant Science, Vol. 9 (3), S. 110-115

Bown, A.; Shelp, B. (1997): The Metabolism and Funktions of γ-Aminobutyric Acid. Plant Physiology, Vol. 115, S. 1-5

Bown, A.; Hall, D.; MacGregor, K. (2002): Insect Footsteps on Leaves Stimulate the Accumulation of 4-Aminobutyrate and Can Be Visualized through Increased Chlorophyll Fluorescence and Superoxide Production. Plant Physiology, Vol. 129, S. 1430-1434

Bown, A.; MacGregor, K.; Shelp, B. (2006): Gamma-aminobutyrate: defense against invertebrate pests. Trends in Plant Science, Vol. 11 (9), S. 424-427

Bradford, M. (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dry Binding. Anlytical Biochemistry, Vol. 72, S. 248-254

Bytof, G.; Biehl, B.; Heinrichs, H.; Voigt, J. (1995): Specificity and stability of the carboxypeptidase activity in ripe, ungerminated seeds of *Theobroma cacao* L. Food Chemistry, Vol. 54, S. 15-21

Bytof, G.; Knopp, S.-E.; Schieberle, P.; Teutsch, I.; Selmar, D. (2005): Influence of processings on the generation of γ-aminobutyric acid in green coffee beans. Eur. Food Res. Technol., Vol. 220, S. 245-250

Carr, J. G.; Davies, P. A.; Dougan, J. (1981): Cocoa fermentation in Ghana and Malaysia. Proc. 7th Int. Cocoa Res. Conf., Douala, Cameroun, 1979, S. 573-576

Carrol, A.; Fox, G.; Laurice, S.; Phillips, R.; Ratcliffe, R.; Stewart, G. (1994): Ammoniium Assimilation and the Role of γ-Aminobutyric Acid in pH Homeostasis in Carrot Cell Suspensions. Plant Physiol., Vol. 106, S. 513-520

Lieberei, R.; Rohsius, C. (2002): Cocoa Atlas. Herausgeber: Dresen, Funke PR/Kommunikation Produktion GmbH, Leverkusen

Camu, N.; Winter, Tom de; Addo, S.; Takrama, J.; Bernaert, H.; Vuyst, L. de (2008): Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavor of Chocolate. Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 88, S. 2288-2297

Chevalley, J. (1976): Theobromine and caffeine content of cocoa beans from different botanical and geographical origins. aus: Matissek, R. (1997): Evaluation of xanthine derivates in chocolate – nutritional and chemical aspects. Review, Z Lebensm Unters Forsch A, Vol. 205, S. 175-184

Cho, Y.; Park, H.; Cho S.; Lee, S.; Kim, T.; Han, S.; Kim, J.; Jung, I.; Song, K. (2004): Physicochemical and functional properties of germinated wheat. 2004 IFT Annual Meeting, July 12-16, Las Vegas, NV

Cope, F. W. (1962): The mechanism of pollen incompatibility in *Theobroma cacao* L. Heredity, S. 157-182

Crawford, L.; Bown, A.; Breitkreuz, K.; Guinel, F. (1994): The Synthesis of γ-Aminobutyric Acid in Response to Treatments Reducing Cytosolic pH. Plant Physiology, Vol. 104, S. 865-871

Cuatrecasas, J. (1964): Cacao and its allies, a taxonomic revision of the genus *Theobroma.* Bulletin of the United States National Museum, Proc. U. S. Herb. 35, S. 379-614

Dand, R. (1993): The international coco trade. London, UK. Woodhead publishing

Das, A.; Uchimiya, H. (2002): Oxygen stress and adaption of a semi-aquatic plant: rice (*Oryza sativa*). J Plant Res, Vol. 115, S. 315-320

De Brito, E.; Gracia, N.; Gallo, M.; Cortelazzo, A.; Fevereiro, P.; Braga, M. (2000): Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation, drying and roasting. Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 81, S. 281-288

Dodo, H.; Fritz, P.; Furtek, D. (1992): A cocoa 21 kilodalton seed protein has trypsin inhibitor activity. Café Cacao Thé, Vol. 36, S.279-284

Duncan, E. J.; Todd, A. W. (1972): Structure of the Mature Embryo of *Theobroma cacao* L. Ann. Bot., Vol. 36, S. 939-945

Efombagn, M. I. B.; Sounigo, O.; Nyassé, S.; Manzanares-Dauleux, M.; Cilas, C.; Eskes, M. A. B.; Kolesnikova-Allen (2006): Genetic diversity in cocoa germplasm of southern Cameroon revealed by simple sequences repeat (SSRS) markers. African J. of Biotechnologie, Vol. 5 (16), S. 1441-1449

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

Fischer, H.; Ahrens, P.; Hähle, K.; Thiele, H. (1974): Polyamine als Stimulatoren von Genaktivitäten. Eine autoradiographische Studie an Riesenchromosomen von *Chironomus thummi*. Histochemistry, Vol. 38, S. 223-228

Forsyth, W. (1952): Cacao Polyphenolic Substances 2. Changing during Fermentation. Biochem. J., Vol. 51, S. 516-520

Forsyth, W.; Quesnel, V.; Roberts, V. (1958): The Interaction of Polyphenols and Proteins during Cocoa curing. Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 9, S. 181-184

Fowler, M. S. (1995): Quality of cocoa powder producers. Seminar Proceedings, Cocoa Meeting, Montpellier, S. 147-153

Franke, G. (1994): Nutzpflanzen de Tropen und Subtropen. Bd. 3: Spezieller Pflanzenanbau. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

Fritz, P.; Robertson, J.; Wilson, M. (1986), J. Biol. Chem., Vol. 261, S. 194-199. aus: Lopez, A.; Dimick, P. (1991): Enzymes involves in cocoa curing. In Food Enzymology. Elsevier Sience Publisher Ltd London 1, S. 211-236.

Glória, M.; Tavares-Neto, J.; Labanca, R. (2005): Influence of Cultivar and Germination on Bioactive Amines in Soybeans (*Glycine max* L. Merril). J. Agric. Food Chem., Vol. 53, S. 7480-7485

González, E. M.; Ancos, B. de; Cano, M. P. (1999): Partial Characterization of Polyphenol Oxidase in Raspberry Fruits. J. Agric. Food Chem., Vol. 47, S. 4068-4072

Goodall, D. W. (1949): A Quantitativ Study of the Early Development of the Seedling of Cacao (*Theobroma cacao*). Annals of Botany, N. S. Vol. 8 (49), S. 1-21

Guilloteau, M.; Laloi, M.; Michaux, S.; Bucheli, P.; McCarthy, J. (2005): Identification and characterization of the major aspartic proteinase activity in *Theobroma cacao* seeds. Journal of Science of the Food and Agriculture, Vol. 85, S. 549-562

Hashim, P.; Selamat, J.; Muhammad, S.; Ali, A. (1998): Changes in Free Amino Acid, Peptid-N, Sugar and Pyrazine Concentration during Cocoa Fermentation. Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 78, S. 535-542

Hashim, P.; Selamat, J.; Muhammad, S.; Ali, A. (1998b): Effect of Mass and Turning Time on Free Amino Acid, Peptide-N, Sugar and Pyrazine Concentration during Cocoa Fermentation. Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 78, S. 543-550

Hansen, C.; Delolmo, M.; Burri, C. (1998): Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 77 (2), S. 273-281

Hansen, C.; Mañez, A.; Burri, C.; Bousbaine, A. (2000): Comparison of enzyme activities involved in flavor precursor formation in unfermented beans of different cocoa genotypes. Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 80, S. 1193-1198

He, F.; Huang, F.; Wilson, K.; Tan-Wilson, A. (2007): Protein storage vacuole acidification as a control of storage protein mobilization in soybeans. Journal of Experimental Botany, Vol. 10, S. 1-12

Holden, M. (1959): The processing of raw cocoa. III-Enzymic aspects of cocoa fermentation. J. Sci. Food Agric., Vol. 10, S. 691-700

Hollman, P.; Tijburg, L. Yang, C. (1997): Bioavailability of flavonoids from tea. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Vol. 37, S. 719-738. aus: Wollgast, J.; Anklam, E. (2000): Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? Food Research International, Vol. 33, S. 449-459

Humphries, E. C. (1944): Studies on the physiology of *Theobroma cacao* with special reference to cherelle wilt. Eleventh Rep. Cacao Res. 1951-43, Trinidad, S. 23-27

Jacquet, M.; Vincent, J-C.; Halm, J.; Lotodé, R. (1980): Le séchage artificial des fèves de cacao. Café Cacao Thé, Vol. 24, S. 43-56

ICCO (2007): Cocoa Resources in Consuming Countries. International Cocoa Organisation, Market Committee, Tenth meeting, London

Kathiresan, A.; Tung, P.; Chinnappa, C.; Reid, D. (1997): γ-Aminobutyric Acid Stimulates Ethylene Biosynthesis in Sunflower. Plant Physiol., Vol. 115, S. 129-135

Kickartz, E.; Schartmann, B.; Sacher, H. (1987): Der Puringehalt des Rohkakaos in Abhängigkeit vom Kakaobohnengewicht. Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem., Vol 41, S. 130-132

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

Kim, J.; Seo, Y.; Kim, J.; Sung, S.-K.; Song, K.; An, G.; Kim, W. (2001): Two polyphenol oxidases are differently expressed during vegetative end reproductive development and in response to wounding in the Fuji apple. Plant Science, Vol. 161, S. 1145-1152

Kinnersley, A.; Turano, F. (2000): Gamma Aminobutyric Acid (GABA) and Plant Responses to Stress. Critical Reviews in Plant Sciences, Vol. 19 (6), S. 479-509

Kirchhoff, P.-M.; Biehl, B.; Crone, G. (1989a): Peculiarity of the accumulation of free amino acids during cocoa fermentation. Food Chemistry, Vol. 31, S. 295-311

Kirchhoff, P.-M.; Biehl, B.; Ziegleder, G.; Berhasen, H.; Hammoor, M.; Lieberei, R. (1989b): Kinetics of the formation of free Amino acids in cocoa seeds during fermentation. Food Chemistry, Vol. 34, S. 161-179

Knapp, A.; Wadsworth, R. (1924): The Distribution of Theobromine during the Fermentation of Cacao. Journal of the Society of Chemical Industry, Vol 43, S. 124-126

Kris-Etherton, P.; Keen, C. (2002): Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. Current Opinion in Lipidology, Vol. 13, S. 41-49

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, Vol. 227, S. 680-685

Law, D.; Davies, P.; Mutschler, M. (1991): Polyamines-induced prolongation of storage in tomato fruits. Plant Growth Regulation, Vol. 10, S. 283-290

Lee, K.; Kundu, J.; Kim, S.; Chun, K.-S.; Lee, H.; Surh, Y.-J. (2006): Cocoa Polyphenols Inhbit Phorbol Ester-Induced Superoxide Anion Formation in Cultured HL-60 Cells and Expression of Cyclooxygenase-2 and Activation of NF-KB and MAPKs in Mouse Skin In Vivo. American Society for Nutrition, S. 1150-1155

Lewis, J. (2003): Standard Operating Procedure: Analyzing *Arabidopsis thaliana* plants for Polyamines. Rothamsted Research, S. 1-3

Li, L.; Steffens, J. (2002): Overexpression of polyphenoloxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. Planta, Vol. 215, S. 239-247

Li, C.; Sun, W. (1999): Desiccation sensitivity and activities of free radical-scavenging in recalcitrant *Theobroma cacao* seeds. Seed Science Research, Vol. 9, S 209-217

Lieberei, R.; Reisdorff, C. (2007): Nutzpflanzenkunde. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Lin, P. (1984): Polyamine Anabolism in Germinating *Glycine max* (L.) Seeds. Plant Physiol., Vol. 76, S. 372-380

Lopez, A.; Lehrian, D.; Lehrian, L. (1978): Optimum temperature and pH of invertase of the seeds of *Theobroma cacao* L. Rev Theobroma (Brasil) 8, S. 105-112. aus: Ziegleder, G.; Biehl, B. (1988): Analysis of cocoa flavour components and flavour precursors. In: H.F. Linskens and J.F. Jacksons (eds.); Modern methods of plant analysis, Volume 8, Analysis of Nonalcoholic Beverages, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1988, S.321-393

Lopez, A.; Dimick, P. (1991): Enzymes involves in cocoa curing. In Food Enzymology. Elsevier Sience Publisher Ltd London 1, S. 211-236.

Maki, H.; Morohashi, Y. (2006): Development of polyphenol oxidase activity in the micropylar endosperm of tomato seeds. Journal of Plant Physiology, Vol. 163, S. 1-10

Martinez-Villaluemga, C.; Kuo, Y.-H.; Lambein, F.; Frías, J.; Vidal-Valverde, C. (2006): Kinetics of free protein amino acids, free non-protein amino acids and trigonelline in soybean (*Glycine max* L.) and lupin (*Lupinus angustifolius* L.) sprouts.Eur. Food Res. Technol., Vol. 224 (2), S. 177-186

Martini, M.; Figueira, A.; Gonçalves Lenci, C.; Queiroz Tavares, D. de (2008): Polyphenolic cells and their interrelation with cotyledon cells in seven species of *Theobroma* (Sterculiaceae). Revista Brasil. Bot., Vol. 31 (3), S. 425.431

Matissek, R. (1997): Evaluation of xanthine derivates in chocolate – nutritional and chemical aspects. Review, Z Lebensm Unters Forsch A, Vol. 205, S. 175-184

Mazzafera, P.; Robinson, S. (2000): Characterization of polyphenol oxidase in coffee. Phytochemistry, Vol. 55, S. 285-296

McHenry, L.; Fritz, P. (1992): Comparison of the structure and nucleotide sequences of vicilin genes of cocoa and cotton raise questions about vicilin evolution. Plant Molecular Biology, Vol. 18, S. 1173-1176

Meyer, H. (1975): Versuche zum Nachweis von Polyphenoloxidasen (Diphenol: O_2 Oxidoreductasen) in submersen Algen. Hausarbeit, TU-Braunschweig

Micallef, B.; Shelp, B. (1989): Arginine Metabolism in Developing Soybean Cotyledons. I. Relationship to Nitrogen Nutrition. II. Biosynthesis. Plan Physiol., S. 624-634

Mohr, W.; Röhrle, M.; Severin, T. (1971): Über die Bildung des Kakaoaromas aus seinen Vorstufen. Fette Seifen Anstrichmittel, Vol. 73, S. 515-521

Mohr, W.; Landschreiber, E.; Severin, T. (1976): Zur Spezifität des Kakaoaromas. Fette Seifen Anstrichmittel, Vol. 78, S. 88-95

Motamayor, J.; Risterucci, A.; 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, S. 1-17

Müller, A. (2005): Das Vorkommen von γ-Aminobuttersäure in *Coffea arabica.* Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig, S. 36-47

Niemenak, N.; Rohsius, C.; Elwers, S.; Ndoumou, D.; Lieberei, L. (2006): Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolic and anthocyanins contents. Journal of Food Composition and Analysis, Vol. 19, S. 612-619

Niemenak, N.; Cilas, C.; Rohsius, C.; Bleiholder, H.; Meier, U.; Lieberei, R. (2009): Phenological growth stages of cacao plants (*Theobroma* sp.): codification and description according to the BBCH scale. Annals of Applied Biology, Vol. 155, S. 1-12

O'Connor, J.; Revell, D.; Masters, K.; Connerton, I.; Sumner, I. (1996): Expression, Purification, and Initial Characterization of the Recombinant Storage Protein Precursor of *Theobroma cacao*. Protein Expression and Purification, Vol. 7, S. 377-383

Offem, J. (2004): Individual Variation in the Amino Acid and Chemical Composition of Defatted Cocoa Bean Meal of Three Varieties of Cacao (*Theobroma cacao*) from South-eastern Nigeria. Journal of Science of the Food and Agriculture, Vol. 52, S. 129-135

Oh, S.; Choi, W. (2001): Changes in the Levels of γ-Aminobutyric Acid and Glutamate Decarboxylase in Developing Soybean Seedlings. J. Plant Res., Vol. 114, S. 309-313

Okada, T.; Sugishita, T.; Murakami, T.; Murai, H. Saikusa, T.; Horino, T.; Onoda, A.; Kajimoto, o.; Takahashi, R.; Takahashi, T. (2000) Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi, Vol. 47 (8), 596-603

Oyeniran, J. O. (1979): A study of biochemical effects of some mouds of commercial cocoa. Tech. Rep. 2, Rep Nigerian Stored Product Res. Inst. 1976-1977, S 39-45

Paulin, D.; Snoeck, L.; Nyasse, S. (2003): Survey on the Growing Practices and Planting Material used for Cacao Growing in the Central Region of Cameroon. Ingenic Newsletter, Issue No. 8, S. 5-8

Pavia, M.; Janick, J. (1983): Variability of alkaloid production in *Theobroma cacao* L. Rev. Theobroma 13, S. 249-262. aus: Ziegleder, G.; Biehl, B. (1988): Analysis of cocoa flavour components and flavour precursors. In: H.F. Linskens and J.F. Jacksons (eds.); Modern methods of plant analysis, Volume 8, Analysis of Nonalcoholic Beverages, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1988, S.321-393

Punyasiri, P.; Abeysinghe, I.; Kumar, V. (2005): Preformed and induced chemical Resistance of Tea Leaf against *Exobasidium vexans* infection. Journal of Chemical Ecology, Vol. 31, S. 1315-1324

Rehm, S.; Espig, G. (1991): The Cultivated Plants of the Tropics and Subtropics. Verlag Josef Margraf, Weikersheim

Reineccius, G.; Andersen, D.; Kavanagh, T.; Keeney, P. (1972): Identification and Quantification of the Free Sugars in Cocoa Beans. Journal of Agriculture & Food Chemistry, Vol. 20, S. 199-202

Rhodes, D.; Handa, S.; Bressan, A. (1986): Metabolic Changes Associated with Adaptation of Plant Cells to Water Stress. Plant Physiol., Vol. 82, S, 890-903

Roelofsen, A. (1958): Fermentation, drying and storage of cocoa beans. Adv. Food Res., Vol. 8, S. 225-296

Rohan, T. A. (1958): Cocoa preparation and quality: Fermentation. Rep. W. Afr. Cocoa Res. Inst. 1957-1958, S. 60-63

Rohan, T.; Stewart, T. (1966): The Precursors of Chocolate Aroma: Changes in the Sugars During the Roasting of Cocoa Beans. Journal of Food and Science, Vol. 31, S. 206-209

Rohan, T.; Stewart, T. (1967): The precursors of chocolate aroma: production of free amino acids during fermentation of cocoa beans. Journal of Food and Science, Vol. 32, S. 395-398

Rohan, T.; Stewart, T. (1967b): The Precursors of Chocolate Aroma: Production of Reducing Sugars during Fermentation of Cocoa Beans. Journal of Food and Science, Vol. 32, S.399-402

Rohsius, C.; Matissek, R.; Lieberei, R. (2006): Free amino acid amounts in raw cocoas from different origins. Eur. Food Res. Technol., Vol. 222, S. 432-438

Rohsius, C. Andersson, M.; Niemenak, N.; Sukha, D.; Lieberei, R. (2006b): Fermentation Quality and its Dependence on the Testa Structure and Transport Processes. 15th International Cocoa Research Conference, San José, Costa Rica.

Rotzoll, N.; Dunkel, A.; Hofmann, T. (2005): Activity-Guided Identification of (S)-Malic Acid 1-O-D-Glucopyranoside (Morelid) and γ-Aminobutyric Acid as Contributors to Umami Taste and Mouth-Dryind Oral Sensation of Morel Mushrooms (*Morchella deliciosa* Fr.). Agric. Food Chem., Vol. 53, S. 4149-4156

Rotzoll, N.; Dunkel, A.; Hofmann, T. (2006): Quantitative Studies, Taste Reconstitution, and Omission Experiments on the Key Taste Compounds in Morel Mushrooms (Morchells deliciosa Fr.). J. Agric. Food Chem., Vol. 54, S. 2705-2711

Ruge, U. (1966): Angewandte Pflanzenökologie. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, S. 20-21

Saikusa, T.; Horino, T.; Mori, Y. (1994): Distribution of Free Amino Acids in the Rice Kernel and Kernel Fractions and Effect of Water Soaking on the Distribution. J. Agric. Food Chem., Vol. 42, S. 1122-1125

Savithramma, N.; Swamy, P. (1989): Quantitative Changes of Polyamines and Activity of ADC in Developing and Germinating Seeds of Two Groundnut (*Arachis hypogaea*) Genotypes. Annals of Botany, Vol. 64, S. 337-341

Sawhney, R.; Shekhawat, N.; Galston, A. (1985): Polyamine levels as related to growth, differentiation and senescence in protoplast-derived cultures of *Vigna aconitifolia* und *Avena sativa*. Plant Growth Regulation, Vol. 3, S. 329-337

Schröder, P. (2002): Die biologische Bedeutung des Flavonoids Epicatechin im Schutz vor Peroxynitril. Dissertation, Universität Düsseldorf

Seeschaaf, K.-W. (1971): Changes in the amounts of total nitrogen, carbon and reducing sugars in normal young cocoa pods and those affected by physical cherelle wilting. Angew. Bot. Vol. 45, S. 285-297

Shelp, B. J.; Bown, A. W.; McLean, M. D. (1999): Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. Trends Plant Sci., Vol. 4, S. 446-452

Solar, A.; Colarič, M.; Usenik, V.; Stampar, F. (2006): Seasonal variations of selected Flavonoids, phenolic acids and quinines in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). Plant Science, Vol. 170, S. 453-461

Spencer, M.; Hodge, R, (1991): Cloning and sequencing of the cDNA encoding the major albumin of *Theobroma cacao.* Planta, Vol. 183, S. 528-535

Spencer, M.; Hodge, R. (1992): Cloning and sequencing of the cDNA encoding the major storage proteins of *Theobroma cacao.* Planta, Vol 186, S. 567-576

Stark, T.; Bareuther, S.; Hofmann, T. (2006): Molekular Definition of the Taste of Roasted Cocoa Nibs (*Theobroma cacao*) by Means of Quantitative Studies and Sensory Experiments. Journal of Agriculture and Food Chemistry, Vol. 54, S. 5530-5539

Steffens, J.; Harel, E.; Hunt, M. (1994): Polyphenoloxidase. In: Ellis, B.; Kuroki, G.; Stafford, H., Genetic Engineering of Plant Secondary Metabolism, Bd. 11, New York, Plenum Press, S. 275-312

Stoll, L.; Rohsius, C.; Niemenak, N.; Sukha, D.; Lieberei, R. (2006): Formation of the bitter tasting γ-aminobutyric acid (GABA) in the course of fermentation and germination processes. Proceedings of the 15th International Cocoa Conference. Poster Nr. 060

Streeter, J. G.; Thompson, J. F. (1972): Anaerobic Accumulation of γ-Aminobutyric acid and Alanine in Radish Leaves (*Raphanus stivus* L.). Plant Physiol., Vol. 49, S. 572-578

Streeter, J. G.; Thompson, J. F. (1972b): *In Vivo* and *In Vitro* Studies on γ-Aminobutyric Acid Metabolism with the Radish Plant *(Raphanus sativus* L.). Plant Physiol., Vol. 49, S. 579-584

Sullivan, M.; Hatfield, R.; Thoma, S.; Samac, D. (2004): Cloning and Characterization of Red Clover Polyphen Oloxidase cDNAs and Expression of Active Protein in *Escherichia coli* and Transgenic Alfalfa. Plant Physiology, Vol. 136, S. 1-11

Szczotka, Z.; Pawlowski, T.; Krawiarz, K. (2003): Proteins and Polyamines during dormancy breaking of European beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. ACTA Physiologiae Plantarum, Vol. 25 (4), S. 423-435

Tai, H.; McHenry, L.; Fritz, P.; Furtek, D. (1991): Nucleic acid sequence of a 21 kDa cocoa seed protein with homology to the soybean trypsin inhibitor (Kunitz) family of protease inhibitors. Plant Molecular Biology, Vol. 16, S. 913-915

Tarenghi, E.; Martin-Tanguy, J. (1995): Polyamines, floral induction and floral development of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). Plant Growth Regulation, Vol. 17, S. 157-165

Timbe, D.; Sechrist, L.; Keeney, P. (1978): Application of High-Pressure Liquid Chromatography to the Study of Variables Affecting Theobromine and Caffeine Concentrations in Cocoa Beans. Journal of Food and Science, Vol. 43, S. 560-562

Voigt, J.; Biehl, B. (1995): Precursors of the cocoa-specific aroma components are derived from the vicilin-class (7s) globulin of the cocoa seeds by proteolytic processing. Botanica Acta, Vol. 108, S. 283-289

Voigt, J.; Kamaruddin, S.; Heinrichs, H.; Wrann, D.; Senyuk, V.; Biehl, B. (1995b): Developmental Stage-Dependent Variation of the Levels of Globular Storage Protein and Aspartic Endoprotease during

Ripening and Germination of *Theobroma cacao* L. Seeds. Journal of Plant Physiology, Vol. 143 (3), S. 299-307

Voigt, J.; Biehl, B.; Heinrichs, H.; Voigt, G. (1995c): Die Bildung kakaospezifischer Aromavorstufen aus dem Reserveglobulin des Kakaosamens. Proceedings of the 1st Symposium on useful plants of the Tropics. Sep. 22-24 1995, Institut für Angewandte Botanik Hamburg. In: Berichte der Angewandten Botanik 5, S. 138-147

Voigt, J.; Biehl, B.; Heinrichs, H.; Kamaruddin, S.; Gaim Marsoner, G.; Hugi, A. (1994): In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa-seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. Food Chemistry, Vol. 49, S. 173-180

Voigt, J.; Heinrichs, H.; Voigt, G.; Biehl, B. (1994b): Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa seeds. Food Chemistry, Vol 50, S. 177-184

Voigt, J.; Wrann, D.; Heinrichs, H.; Biehl, B. (1994c): The proteolytic formation of essential cocoa-specific aroma precursors depends on particular chemical structures of the vicilin-class globulin of the cocoa seeds lacking in the globular storage proteins of coconuts, hazelnuts and sunflower seeds. Food Chemistry, Vol. 51, S. 197-205

Voigt, J.; Voigt, G.; Heinrichs, H.; Wrann, D.; Biehl, B. (1994d): In vitro studies on the proteolytic formation of the characteristic aroma precursors of fermented cocoa seeds: The significance of endoprotease specifity. Food Chemistry, Vol. 51, S. 7-14

Voigt, J.; Biehl, B.; Wazir, S.K.S. (1993): The major seed proteins of *Theobroma cacao* L.. Food Chemistry Vol. 47, S. 145-151

Williams, J. (1971): The Role of Flavonoids, Phenolic Acids and Purine Alkaloids in *Theobroma cacao* L. Journal of Biological and Applied Chemistry, Vol. 14 (1), S. 10-19

Wollgast, J.; Anklam, E. (2000): Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? Food Research International, Vol. 33, S. 449-459

Wollgast, J.; Anklam, E. (2000): Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. Food Research International, Vol. 33, S. 423-447

Wong, M. (1989), MS thesis. Food Science Department, The Pennsylvania State University, University Park, PA, USA. aus Lopez, A.; Dimick, P. (1991): Enzymes involves in cocoa curing. In Food Enzymology. Elsevier Sience Publisher Ltd London 1, S. 211-236.

Wood, G. A. R.; Lass, R. A. (1989): Cocoa. Longman Scientific & Technical, Harlow, Reprinted

Young, A. M. (1986): Cocoa Pollination. Cocoa Growers' Bull., Vol. 37, S. 5-23

Zapata, P.; Serrano, M.; Pretel, M.; Amorós, A.; Botella, M. (2004): Polyamines and ethylene changes during germination of different plant species under salinity. Plant Science, Vol. 167, S. 781-788

Zeid, I.; Shedeed, Z. (2006): Response of alfalfa to putrescine treatment under drought stress. Biologia Plantrum, Vol. 50 (4), S. 635-640

Zhu, Q. Y.; Holt, R.; Lazarus, S.; Ensunsa, J.; Hammerstone, J.; Schmitz, H.; Keen, C. (2002): Stability of the Flavan-3-ols Epicatechin and Catechin and Related Dimeric Procyanidins Derived from Cocoa. Journal of Agicultural & Food Chemistry, Vol. 50, S. 1700-1705

Ziegleder, G.; Biehl, B. (1988): Analysis of cocoa flavour components and flavour precursors. In: H.F. Linskens and J.F. Jacksons (eds.); Modern methods of plant analysis, Volume 8, Analysis of Nonalcoholic Beverages, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1988, S.321-393

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Früchte, Blüten und Kakaobäume. 28
Abbildung 2: Kakaoplantage von SODECAO bei Akonolinga in Kamerun. 29
Abbildung 3: German Kakao-Plantage in Ngat. 30
Abbildung 4: Früchte des Klons SNK 13 aus Kamerun von der Plantage SODECAO bei Akonolinga 38
Abbildung 5: Früchte des Klons ICS 40 aus Kamerun von der Plantage SODECAO bei Akonolinga 38
Abbildung 6: Früchte des Klons T 79/501 aus Kamerun von der Plantage SODECAO bei Akonolinga 38
Abbildung 7: Früchte unterschiedlicher Klone aus Kamerun. 38
Abbildung 8: German Cocoa Früchte aus Mbangassina (GcM), Kamerun 39
Abbildung 9: Gelbe German Cocoa Früchte aus Ngat (GcG), Kamerun 39
Abbildung 10: Rote German Cocoa Früchte aus Ngat (GcR), Kamerun 39
Abbildung 11: German Cocoa Früchte aus Awae (GcA), Kamerun. 39
Abbildung 12: German cacao Früchte aus Yaounde (GcY, links) und sehr unreife German Cocoa Früchte aus Lekiassi, Kamerun (GcL, rechts) 40
Abbildung 13: Catongo Früchte aus Ngat, Kamerun 40
Abbildung 14: Früchte der Genotypen-Gruppe WAA aus Trinidad 40
Abbildung 15: Versuchsaufbau der in Hamburg durchgeführten Inkubationen. 43
Abbildung 16: Versuchsaufbau der in Yaounde, Kamerun durchgeführten Inkubationen und Keimungsversuche. 43
Abbildung 17: A und B) Trocknung der inkubierten und gekeimten Kakaosamen in Yaounde, Kamerun**Fehler! Textmarke nich**
Abbildung 18: Entwicklung der Keimwurzel von Samen der Genotypengruppe WAA während der Keimung über einen Zeitraum von 12 Tagen. 66
Abbildung 19: Vergleich der Entwicklung von Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung. 66
Abbildung 20: Keimung von Kakaosamen des Genotyps SNK 13. 67
Abbildung 21: Keimung von Kakaosamen des Genotyps ICS 40. 67
Abbildung 22: Keimung von Kakaosamen des Genotyps T 79/501. 68
Abbildung 23: Keimung von Kakaosamen des German Cocoas (GcR-K1). 68
Abbildung 24: Keimung von Kakaosamen des German Cocoas (GcG-K1). 69
Abbildung 25: Keimung von Kakaosamen des German Cocoas (GcA-K3). 69
Abbildung 26: Keimung von Samen des Catongos. 70
Abbildung 27: Gewicht der Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung. 71
Abbildung 28: Gewicht der Samen unterschiedlicher German Cocoa-Früchte im Verlauf der Keimung. 71
Abbildung 29: Gewichtszu- und Gewichtsabnahme [%] der Kakaosamen im Verlauf der Keimung. 72
Abbildung 30: Mit und ohne Testa gekeimte German Cocoa Samen (GcY3) nach 6-tägiger Keimung 73
Abbildung 31: Mit und ohne Testa gekeimte German Cocoa Samen (GcY4) nach 6-tägiger Keimung 73
Abbildung 32: Mit und ohne Testa gekeimte Samen des Genotyps ICS 84 nach 6-tägiger Keimung 73

Abbildung 33: Mit und ohne Testa gekeimte Samen des Genotyps SCA 6 nach 6-tägiger Keimung 73

Abbildung 34: Wassergehalt [%] in Samen unterschiedlicher Kakao-Varietäten..... 74

Abbildung 35: pH-Werte der Kakaosamen im Verlauf der Keimung..... 75

Abbildung 36: Proteingehalt im Acetontrockenpulver der Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten der Genotypengruppe WAA im Verlauf der Keimung. 76

Abbildung 37: Proteingehalt im Acetontrockenpulver der Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung. 77

Abbildung 38: Proteingehalt im Acetontrockenpulver der Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung..... 78

Abbildung 39: Veränderung der Speicherproteinfraktionen in den Samen (Tri2-K) während einer 5-tägigen Keimung (DISC-SDS-PAGE)..... 79

Abbildung 40 Veränderung der Speicherproteinfraktionen in den Samen (Tri4-K) während einer 10-tägigen Keimung (DISC-SDS-PAGE)..... 79

Abbildung 41 a - n: Oligopeptidspektren der Samen des Genotypen SNK 13 (SNK 13-K1)..... 81

Abbildung 42 a - n: Oligopeptidspektren von German Cocoa-Samen (GcA-K3)..... 83

Abbildung 43: Gehalte der einzelnen Aminosäuren der Oligopeptide der Samen des Genotypen SNK 13 und der Samen eines German Cocoas (GcA-K3) im Verlauf der Keimung. 84

Abbildung 44: Gesamtgehalt an freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K – Tri4-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung. 86

Abbildung 45: Mittelwert des prozentualen Gehaltes an hydrophoben und sauren freien Aminosäuren und deren Säureamiden sowie an den anderen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K – Tri4-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung. 86

Abbildung 46a/b: Gehalte der einzelnen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K – Tri4-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung 87

Abbildung 47: Gesamtgehalt an freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung..... 88

Abbildung 48: Mittelwert des prozentualen Gehaltes an hydrophoben und sauren freien Aminosäuren und deren Säureamiden sowie an den anderen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung..... 89

Abbildung 49: Gehalte der einzelnen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung..... 89

Abbildung 50: Gehalte der einzelnen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung..... 90

Abbildung 51: Gesamtgehalt an freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung..... 91

Abbildung 52: Mittelwert des prozentualen Gehaltes an hydrophoben und sauren freien Aminosäuren und deren Säureamiden sowie an den anderen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung. 91

Abbildung 53a/b: Gehalte der einzelnen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung..... 92

Abbildung 54: Gesamtgehalt der freien Aminosäuren der entfetteten Samen aus Catongo-Früchten im Verlauf der Keimung. 93

Abbildung 55: γ-Aminobuttersäuregehalt in entfetteten Kakaosamen aus unterschiedlichen Früchten von Trinidad (Tri1-K – Tri5-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung. 94

Abbildung 56: γ-Aminobuttersäuregehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung. 94

Abbildung 57: γ-Aminobuttersäuregehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung. 95

Abbildung 58: γ-Aminobuttersäuregehalt der entfetteten Samen von Catongo-Früchten im Verlauf der Keimung. 96

Abbildung 59: Epicatechingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K – Tri5-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung. 98

Abbildung 60: Epicatechingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung. 99

Abbildung 61: Epicatechingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung. 100

Abbildung 62: Epicatechingehalt der entfetteten Samen von Catongo-Früchten im Verlauf der Keimung. 100

Abbildung 63: Catechingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K – Tri5-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung. 101

Abbildung 64: Catechingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung. 102

Abbildung 65: Catechingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung. 102

Abbildung 66: Catechingehalt der entfetteten Samen von Catongo-Früchten im Verlauf der Keimung. 103

Abbildung 67: Cyanidin-3-galactosidgehalt in entfetteten Kakaosamen von zwei unterschiedlichen Früchten aus Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung. 104

Abbildung 68: Cyanidin-3-arabinosidgehalt in entfetteten Kakaosamen von zwei unterschiedlichen Früchten aus Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung. 104

Abbildung 69: Cyanidin-3-galactosidgehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung. 105

Abbildung 70: Cyanidin-3-arabinosidgehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung. 105

Abbildung 71: Cyanidin-3-galactosidgehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung. 106

Abbildung 72: Cyanidin-3-arabinosidgehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung. 106

Abbildung 73: Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosidgehalt der entfetteten Samen von Catongo-Früchten im Verlauf der Keimung. 107

Abbildung 74: Saccharosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K und Tri2-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung. 108

Abbildung 75: Saccharosegehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung. 109

Abbildung 76: Saccharosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung. 110

Abbildung 77: Fructosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K und Tri2-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung. 110

Abbildung 78: Fructosegehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung. 111

Abbildung 79: Fructosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung. 112

Abbildung 80: Glucosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K und Tri2-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung. 113

Abbildung 81: Glucosegehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung. 113

Abbildung 82: Glucosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung. 114

Abbildung 83: Theobromingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Keimung. 115

Abbildung 84: Theobromingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung. 116

Abbildung 85: Theobromingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung. 116

Abbildung 86: Coffeingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Keimung. 117

Abbildung 87: Coffeingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung. 118

Abbildung 88: Coffeingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung. 118

Abbildung 89: Putrescingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K – Tri4-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung. 120

Abbildung 90: Putrescingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung. 121

Abbildung 91 Putrescingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung. 122

Abbildung 92: Spermidingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K – Tri4-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung. 123

Abbildung 93: Spermidingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung. 123

Abbildung 94: Spermidingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung. 124

Abbildung 95: Spermingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K – Tri4-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung. 125

Abbildung 96: Spermingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung. 126

Abbildung 97: Spermingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung. 126

Abbildung 98: PPO-Aktivität einzelner Kakaosamen (Sca 6) während der Keimung. 129

Abbildung 99: PPO-Aktivität einzelner Kakaosamen (Sca 6) während der Keimung. 129

Abbildung 100: PPO-Aktivität einzelner Kakaosamen (Sca 6) während der Keimung. 130

Abbildung 101: PPO-Aktivität einzelner Kakaosamen (SNK 64) während der Keimung 130

Abbildung 102 PPO-Aktivität einzelner Kakaosamen (ICS 84) während der Keimung. 131

Abbildung 103: PPO-Aktivität einzelner Kakaosamen einer German Cocoa-Frucht (GcA-K5) während der Keimung. 132

Abbildung 104: PPO-Aktivität einzelner Kakaosamen einer German Cocoa-Frucht (GcA-K6) während der Keimung. 132

Abbildung 105: PPO-Aktivität in der Sämlingsachse einzelner Kakaosamen (Sca 6) während der Keimung. 133

Abbildung 106: PPO-Aktivität in der Sämlingsachse einzelner Kakaosamen (Sca 6) während der Keimung. 134

Abbildung 107: PPO-Aktivität in der Sämlingsachse einzelner Kakaosamen (SNK 64) während der Keimung. 134

Abbildung 108: PPO-Aktivität in der Sämlingsachse einzelner Kakaosamen (ICS 84) während der Keimung. 135

Abbildung 109: PPO-Aktivität in unterschiedlichen Geweben von Kakaosamen. 136

Abbildung 110: PPO-Aktivität in verschiedenen Geweben von Kakaosamen nach der Zugabe unterschiedlicher SDS-Konzentrationen. 136

Abbildung 111: PPO-Aktivität in unterschiedlichen Bereichen von Kakaosamen. 137

Abbildung 112: Aspartylendoproteaseaktivität in den entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Früchte aus Trinidad (Tri1-K – Tri5-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung. 139

Abbildung 113: Aspartylendoproteaseaktivität in den entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung. 140

Abbildung 114: Aspartylendoproteaseaktivität in den entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung. 141

Abbildung 115: Carboxypeptidaseaktivität in den entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad (Tri1-K – Tri5-K) und Kamerun (SNK64-K und ICS84-K) im Verlauf der Keimung. 142

Abbildung 116: Carboxypeptidaseaktivität in den entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Keimung. 142

Abbildung 117: Carboxypeptidaseaktivität in den entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Keimung. 143

Abbildung 118: Wassergehalt in unterschiedlich lang inkubierten Kakaosamen ohne Testa nach der Trocknung an der Sonne. 145

Abbildung 119: Frisch- und Trockengewichte unterschiedlicher Kakaosamen. 146

Abbildung 120 a und b: Samen im Längsschnitt vor und nach 1- bis 4-tägiger Inkubation; 147

Abbildung 121 a und b: Samen im Längsschnitt vor und nach 1- bis 4-tägiger Inkubation; 148

Abbildung 122 a und b: Samen im Längsschnitt vor und nach 1- bis 4-tägiger Inkubation; 148

Abbildung 123 a und b: Samen im Längsschnitt vor und nach 1- bis 4-tägiger Inkubation; 148

Abbildung 124 a und b: Samen im Längsschnitt vor und nach 1- bis 4-tägiger Inkubation; 149

Abbildung 125 a und b: Samen im Längsschnitt vor und nach 1- bis 4-tägiger Inkubation; 149

Abbildung 126: Samen im Längsschnitt vor und nach 1- bis 4-tägiger Inkubation; 149

Abbildung 127: Gewichtszu- und Gewichtsabnahme [%] der Kotyledonen im Verlauf der Inkubation. 150

Abbildung 128: pH-Werte der Kakaosamen im Verlauf der Inkubationsversuche. 151

Abbildung 129: pH-Werte der Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubationsversuche. 152

Abbildung 130: pH-Werte der Kakaosamen von German Cocoa im Verlauf der Inkubationsversuche. 153

Abbildung 131: Proteingehalt im Acetontrockenpulver der Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation. 156

Abbildung 132: Proteingehalt im Acetontrockenpulver der Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation. 157

Abbildung 133 Veränderung der Speicherproteinfraktionen in den Samen (Tri1-I) während einer 4-tägigen Inkubation (DISC-SDS-PAGE). 158

Abbildung 134 a - j: Oligopeptidspektren der Samen des Genotypen SNK 13 (SNK 13-F1). 160

Abbildung 135 a - j: Oligopeptidspektren von German Cocoa-Samen (GcA-F3). 161

Abbildung 136: Gehalte der einzelnen Aminosäuren der Oligopeptide der Samen des Genotypen SNK 13 und der Samen einer German Cocoa-Frucht im Verlauf der Inkubation. 163

Abbildung 137 Gesamtgehalt an freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation. 165

Abbildung 138: Mittelwert des prozentualen Gehaltes an hydrophoben und sauren freien Aminosäuren Säureamiden sowie an den anderen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation. 165

Abbildung 139a/b: Gehalt der einzelnen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation. 166

Abbildung 140: Aminosäuregehalte in Inkubationsmedien im Verlauf der Inkubationen. 167

Abbildung 141: Gesamtgehalt an freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation. 169

Abbildung 142: Mittelwert des prozentualen Gehaltes an hydrophoben und sauren freien Aminosäuren und deren Säureamiden sowie an den anderen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation. 169

Abbildung 143: Gehalt der einzelnen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation 170

Abbildung 144: Gesamtgehalt an freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation. 171

Abbildung 145: Mittelwert des prozentualen Gehaltes an hydrophoben und sauren freien Aminosäuren und deren Säureamiden sowie an den anderen freien Aminosäuren in sonnengetrockneten und entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation. 172

Abbildung 146: Mittelwert des prozentualen Gehaltes an hydrophoben und sauren freien Aminosäuren und deren Säureamiden sowie an den anderen freien Aminosäuren in direkt gefriergetrockneten und entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation. 172

Abbildung 147a/b: Gehalt der einzelnen freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation 173

Abbildung 148: Gesamtgehalt an freien Aminosäuren in entfetteten Samen von Catongo-Früchten im Verlauf der Inkubation. 174

Abbildung 149: γ-Aminobuttersäuregehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation. 176

Abbildung 150: Zunahme des γ-Aminobuttersäuregehaltes in einigen Inkubationsmedien im Verlauf der Inkubationen. 176

Abbildung 151: γ-Aminobuttersäuregehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation. 178

Abbildung 152: γ-Aminobuttersäuregehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation. 180

Abbildung 153: γ-Aminobuttersäuregehalt der entfetteten Samen von Catongo-Früchten im Verlauf der Inkubation. 180

Abbildung 154: Epicatechingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation. 184

Abbildung 155: Epicatechingehalte in Inkubationsmedien im Verlauf der Inkubationen. 184

Abbildung 156: Epicatechingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation. 185

Abbildung 157: Epicatechingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf von Inkubation. 186

Abbildung 158: Epicatechingehalt der entfetteten Samen von Catongo-Früchten im Verlauf der Inkubation. 187

Abbildung 159: Catechingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation. 187

Abbildung 160: Catechingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation. ... 188
Abbildung 161: Catechingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation. ... 189
Abbildung 162: Catechingehalt der entfetteten Samen von Catongo-Früchten im Verlauf der Inkubation. ... 189
Abbildung 163: Cyanidin-3-galactosidgehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation. ... 190
Abbildung 164: Cyanidin-3-arabinosidgehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation. ... 191
Abbildung 165: Cyanidin-3-galactosidgehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation. ... 192
Abbildung 166: Cyanidin-3-arabinosidsidgehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation. ... 192
Abbildung 167: Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosidgehalt der entfetteten Samen von Catongo-Früchten im Verlauf der Inkubation. ... 193
Abbildung 168: Inkubationsmedien nach 2-, 3- und 4-tägiger Inkubation von Samen aus zwei unterschiedlichen Früchten der Genotypengruppe WAA. ... 193
Abbildung 169: Inkubationsmedien nach 3-tägiger Inkubation von Samen der Genotypen ICS 40 (links im Bild), SNK 13 (rechts) und eines German Cocoas (in der Mitte). ... 194
Abbildung 170: Saccharosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation. ... 195
Abbildung 171: Saccharosegehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation. ... 196
Abbildung 172: Saccharosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation. ... 197
Abbildung 173: Fructosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation. ... 198
Abbildung 174: Fructosegehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation. ... 198
Abbildung 175: Fructosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation. ... 199
Abbildung 176: Glucosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation. ... 200
Abbildung 177: Glucosegehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation. ... 200
Abbildung 178: Glucosegehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation. ... 201
Abbildung 179: Theobromingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation. ... 202
Abbildung 180: Theobromingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation. ... 203
Abbildung 181: Theobromingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation. ... 204
Abbildung 182: Coffeingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation. ... 205
Abbildung 183: Coffeingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation. ... 206
Abbildung 184: Coffeingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation. ... 206

Abbildung 185: Putrescingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation. ... 208

Abbildung 186: Putrescingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation. ... 209

Abbildung 187: Putrescingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation. ... 209

Abbildung 188: Spermidingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation. ... 210

Abbildung 189 Spermidingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation. ... 211

Abbildung 190: Spermidingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation. ... 212

Abbildung 191: Spermingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad im Verlauf der Inkubation. ... 212

Abbildung 192: Spermingehalt in entfetteten Kakaosamen unterschiedlicher Genotypen im Verlauf der Inkubation. ... 213

Abbildung 193: Spermingehalt in entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation. ... 214

Abbildung 194: PPO-Aktivität einzelner Kakaosamen (Tri1-I) während der Keimung. ... 216

Abbildung 195: PPO-Aktivität einzelner Kakaosamen (Tri2-I) während der Keimung. ... 216

Abbildung 196: PPO-Aktivität einzelner Kakaosamen einer German Cocoa-Frucht (GcA-F5) während der Keimung. ... 217

Abbildung 197: Aspartylendoproteaseaktivität in den entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad und der Dominikanischen Republik im Verlauf der Inkubation. ... 219

Abbildung 198 Aspartylendoproteaseaktivität in den entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation. ... 220

Abbildung 199: Carboxypeptidaseaktivität in den entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen Früchten aus Trinidad und der Dominikanischen Republik im Verlauf der Inkubation. ... 221

Abbildung 200: Carboxypeptidaseaktivität in den entfetteten Kakaosamen von unterschiedlichen German Cocoa-Früchten im Verlauf der Inkubation. ... 222

Abbildung 201: Prozentuale Gewichtszu- und Gewichtsabnahme von Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation. ... 223

Abbildung 202: pH-Werte der Samen im Verlauf von Keimung und Inkubation. ... 224

Abbildung 203: Proteingesamtgehalt im Acetontrockenpulver von Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation. ... 225

Abbildung 204: Oligopeptidspektren von Samen am 4. Tag der a) Keimung und b) Inkubation ... 227

Abbildung 205: Gesamtgehalt an freien Aminosäuren und pH-Werte von Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation. ... 228

Abbildung 206: γ-Aminobuttersäuregehalt in entfetteten Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation. ... 231

Abbildung 207: Phenolische Substanzen in entfetteten Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation. ... 233

Abbildung 208: Phenolische Substanzen in entfetteten Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation. ... 233

Abbildung 209: Zuckergehalte in entfetteten Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation. ... 235

Abbildung 210: Zuckergehalte in entfetteten Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation. ... 235

Abbildung 211: Summe Theobromin + Coffein in entfetteten Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation. ... 237

Abbildung 212: Polyamingehalte in entfetteten Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation. 238
Abbildung 213: PPO-Aktivität (im Sediment) in Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation. 239
Abbildung 214: Aktivität der Proteasen in entfetteten Kakaosamen im Verlauf von Keimung und Inkubation. 240
Abbildung 215: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 5-tägigen Keimung in den Samen einer Frucht aus Trinidad (Tri3-K) (DISC-SDS-PAGE). 330
Abbildung 216: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 10-tägigen Keimung in den Samen einer Frucht aus Trinidad (Tri5-K) (DISC-SDS-PAGE). 330
Abbildung 217: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 6-tägigen Keimung in den Samen des Genotypen SNK 13 (SNK13-K1) (DISC-SDS-PAGE). 331
Abbildung 218: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 6-tägigen Keimung in den Samen des Genotypen ICS 40 (ICS40-K1) (DISC-SDS-PAGE). 331
Abbildung 219: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 6-tägigen Keimung in den Samen des Genotypen T 79/501 (T79/501-K1) (DISC-SDS-PAGE). 331
Abbildung 220: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 6-tägigen Keimung in den Samen einer German Cocoa Frucht (GcM-K) (DISC-SDS-PAGE). 332
Abbildung 221: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 6-tägigen Keimung in den Samen einer German Cocoa Frucht (GcR-K1) (DISC-SDS-PAGE). 332
Abbildung 222: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 6-tägigen Keimung in den Samen einer German Cocoa Frucht (GcG-K1) (DISC-SDS-PAGE). 332
Abbildung 223: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 6-tägigen Keimung in den Samen einer German Cocoa Frucht (GcA-K3) (DISC-SDS-PAGE). 333
Abbildung 224: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 4-tägigen Keimung in den Samen einer German Cocoa Frucht (GcA-K5) (DISC-SDS-PAGE). 333
Abbildung 225: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 4-tägigen Inkubation in den Samen einer Frucht aus Trinidad (Tri2-I) (DISC-SDS-PAGE). 333
Abbildung 226: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 4-tägigen Inkubation in den Samen einer German Cocoa Frucht (GcR-F1) (DISC-SDS-PAGE). 334
Abbildung 227: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 4-tägigen Inkubation in den Samen einer German Cocoa Frucht (GcG-F1) (DISC-SDS-PAGE). 334
Abbildung 228: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 3- und 4-tägigen Inkubation in den Samen einer German Cocoa Frucht (GcA-F5/6) (DISC-SDS-PAGE). 334
Abbildung 229: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 4-tägigen Inkubation in den Samen einer German Cocoa Frucht (GcA-F3) (DISC-SDS-PAGE). 335
Abbildung 230 a – n: Oligopeptidspektren der Samen des Genotypen ICS 40-K1. 337
Abbildung 231 a – n: Oligopeptidspektren der Samen des Genotypen T 79/501-K1. 338
Abbildung 232 a - n: Oligopeptidspektren der Samen des German Cocoas GcM-K. 340
Abbildung 233 a - n: Oligopeptidspektren der Samen des German Cocoas GcR-K1. 341
Abbildung 234 a - n: Oligopeptidspektren der Samen des German Cocoas GcG-K1. 343
Abbildung 235 a - f: Oligopeptidspektren der Samen des German Cocoas GcA-K5. 344
Abbildung 236 a - j: Oligopeptidspektren der Samen des Genotypen ICS 40-F1. 345
Abbildung 237 a - j: Oligopeptidspektren der Samen des Genotypen T 79/501-F1. 346
Abbildung 238 a - j: Oligopeptidspektren der Samen des German Cocoas GcM-F. 347
Abbildung 239 a - j: Oligopeptidspektren der Samen des German Cocoas GcR-F1. 348
Abbildung 240 a - j: Oligopeptidspektren der Samen des German Cocoas GcG-F1. 349
Abbildung 241 a - h: Oligopeptidspektren der Samen des German Cocoas GcA-F5. 350

Abbildung 242 a - f: Oligopeptidspektren der Samen des German Cocoas GcA-F6. 351
Abbildung 243: Gehalte der einzelnen Aminosäuren der Oligopeptide im Verlauf der Keimung. 352
Abbildung 244: Gehalte der einzelnen Aminosäuren der Oligopeptide im Verlauf der Inkubation. 352

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gegenüberstellung von Keimung und Inkubation/ Fermentation 9
Tabelle 2 Probenliste der zur Inkubation verwendeten Proben: 35
Tabelle 3: Probenliste der zur Keimung verwendeten Proben: 36
Tabelle 4: Probenliste der zur Wasseraufnahme- und Wassergehaltsbestimmung verwendeten Proben: 37
Tabelle 5: Laufmittel-Gradientenparameter für die HPLC-Vermessung der Aminosäuren: angegeben sind die Zeit und die Anteile der Laufmittel A und B im Gemisch 48
Tabelle 6: Laufmittelzusammensetzung, Zeit und Fließgeschwindigkeit für die Vermessung der Polyphenole und Anthocyane. 55
Tabelle 7: Laufmittelprofil für die Vermessung der Polyamine. 58
Tabelle 8: Gehalte einzelner hydrophober Aminosäuren in den Samen der Genotypengruppe WAA vor und nach der Inkubation [mg/g ffTM]. 164
Tabelle 9: Gehalte einzelner hydrophober Aminosäuren in den Samen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501 vor und nach der Inkubation [mg/g ffTM]. 168
Tabelle 10: Gehalte einzelner hydrophober Aminosäuren in den Samen des German Cocoas vor und nach der Inkubation [mg/g ffTM]. 171
Tabelle 11: γ-Aminobuttersäuregehalt in frischen, getrockneten Kakaosamen der Genotypen SNK 13, ICS 40 und T 79/501, welche 2 bzw. 5 Tage nach der Ernte aus den Früchten der unterschiedlichen Genotypen entnommen wurden. 177
Tabelle 12: Zunahme des Gehaltes an freien Aminosäuren [%] bezogen auf den Anfangsgehalt in entfetteten Kakaosamen während der Keimung und der fermentationsähnlicher Inkubation. 228
Tabelle 13: Zusammensetzung der freien Aminosäuren in frischen, frisch getrockneten, inkubierten, inkubiert getrockneten oder gekeimten Kakaosamen unterschiedlicher Herkunft. 231
Tabelle 14: γ-Aminobuttersäuregehalt in frischen, frisch getrockneten, inkubierten, inkubiert getrockneten oder gekeimten Kakaosamen unterschiedlicher Herkunft. 232
Tabelle 15: Durchschnittliche Gehalte an phenolischen Substanzen in frischen Kakaosamen unterschiedlicher Herkunft. 234
Tabelle 16: Theobromin- und Coffeingehalte frischer Kakaosamen unterschiedlicher Herkunft. 238
Tabelle 17: Mittelwerte der PPO-Aktivität (im Sediment) in Kotyledonen des German Cocoas und der anderen untersuchten Varietäten im Verlauf von Keimung und Inkubation. 240
Tabelle 18: Gegenüberstellung der in den Samen ablaufenden biochemischen und enzymatischen Prozesse während der Keimung und der fermentationsähnlichen Inkubation 242
Tabelle 19: Mittelwerte der Polyphenolgehalte und der PPO-Aktivität in frischen Kotyledonen des German Cocoas und in den anderen untersuchten Varietäten. 267
Tabelle 20: Zusammenfassung: Angegeben sind die Ergebnisse für die untersuchten biochemischen Indikatoren in frischen Kakaosamen unterschiedlicher Herkunft und im Verlauf von Keimung und Inkubation. 301
Tabelle 21: Gehalte der einzelnen freien Aminosäuren und Gesamtgehalt der freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen in frischen Kakaosamen unterschiedlicher Herkunft und im Verlauf von Keimung und Inkubation. 303

Tabelle 22: Einzelwerte der Proben: Restfeuchtigkeit nach Trocknung, pH-Werte, phenolische Substanzen, Zucker 304
Tabelle 23: Einzelwerte der Proben: Methylxanthine, Polyamine, Proteaseaktivitäten 311
Tabelle 24: Einzelwerte der Proben: freie Aminosäuren 316
Tabelle 25: Einzelwerte der Proben: Aminosäuren nach Hydrolyse der Oligopeptide 323
Tabelle 26: Wassergehalt in frischen Samen unterschiedlicher Kakao-Varietäten 325
Tabelle 27: Gewicht der Samen unterschiedlicher German Cocoa Früchte im Verlauf der Keimung 326
Tabelle 28: Frisch- und Trockengewichte unterschiedlicher Kakaosamen. 326
Tabelle 29: PPO-Aktivität (im Sediment) einzelner Kakaosamen während Keimung und Inkubation. 327
Tabelle 30: PPO-Aktivität (im Überstand) einzelner Kakaosamen während Keimung und Inkubation. 328
Tabelle 31: Aminosäuregehalte in Inkubationsmedien im Verlauf der Inkubationen. 329
Tabelle 32: GABA-Gehalte in Inkubationsmedien im Verlauf der Inkubationen. 329
Tabelle 33: Epicatechingehalte in Inkubationsmedien im Verlauf der Inkubationen. 329

7.4 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µkat	Mikrokatal
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AcTP	Acetontrockenpulver
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	N,O-bis(Trimethylsilyl)acetamid
c	Stoffmengenkonzentration (z.B. mol/l)
C	Catongo
ca.	circa
DISK-SDS-PAGE	Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
et al.	et allii (und andere)
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
F	Fermentation
Fa.	Firma
ffTM	fettfreies Trockenmaterial
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure (γ-amino butyric acid)
Gc	German Cocoa
GcA	German Cocoa aus Awae, Kamerun
GcG	gelbe German Cocoa-Früchte aus Ngat, Kamerun
GcL	German Cocoa aus Lekiassi, Kamerun
GcM	German Cocoa aus Mbangassina, Kamerun
GcR	rote German Cocoa-Früchte aus Ngat, Kamerun
GcY	German Cocoa aus Yaounde, Kamerun
h	Stunde
ICS 40	Genotypenbezeichnung (Imperial College Selection)
ICS 84	Genotypenbezeichnung (Imperial College Selection)
I	Inkubtion
IAA	Indol-3-Essigsäure
K	Keimunh
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
konz.	konzentriert

λ	Wellenlänge
l	Liter
LMW	Low Molecular Weight
Lsg.	Lösung
max.	maximal
mbar	Millibar
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mol	Mol
OPA	o-Phtaldialdehyd
p. a.	pro analysi
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PPO	Polyphenoloxidase
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
RP-HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography
Sca 6	Genotypenbezeichnung (Scavina)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
sek	Sekunden
SNK 10	Genotypenbezeichnung (Selection N'Koemvone)
SNK 13	Genotypenbezeichnung (Selection N'Koemvone)
T 79/501	Genotypenbezeichnung (Trinidad)
TEMED	Tetramethyl-ethylendiamin
Tri	Trinidad
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
v	Volumen
w	weight, Masse
WAA	Genotypengruppe (West African Amelonado)

8 Danksagung

Ohne Rat und Tat von vielen Seiten wäre mir die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Hierfür möchte ich mich bedanken:

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Lieberei.

Ich bedanke mich bei ihm für die vielen Anregungen, die Unterstützung, die Motivation und das Vertrauen, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Mein Dank gilt auch allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Lieberei.

Insbesondere möchte ich Thomas Thumforde danken für die Hilfe an der HPLC und für das Vertrauen, das er mir bei der Einweihung in die Geheimnisse der HPCL bewies, und bei Detlef Böhm, der bei jeder auftretenden Schwierigkeit eine Lösung findet.

Desweiteren danke ich Dr. Christina Rohsius, Claudia Pisowotzki und Daniel Kadow für ihre Unterstützung.

Bei Dr. Helmut Kassner bedanke ich mich besonders für das unermüdliche Korrekturlesen.

Weiterhin danke ich Dr. Nicolas Niemenak, durch dessen tatkräftige Hilfe die in Yaounde durchgeführten Versuche zustande gekommen sind und der mich mit immer neuen German Cocoa-Früchten versorgt hat. Dank gebührt auch Dr. Darin Sukha, von dem ich Früchte aus Trinidad erhielt.

Meiner Familie danke ich für ihre umfassende Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt meinem Vater für die geduldige Betreuung meiner Tochter und meiner Mutter für unermüdliche Motivation.

Die vielen anderen Unterstützer, die ich hier namentlich nicht genannt habe, sind in meinen herzlichen Dank eingeschlossen!

9 Anhang

Tabelle 20: Zusammenfassung: Angegeben sind die Ergebnisse für die untersuchten biochemischen Indikatoren in frischen Kakaosamen unterschiedlicher Herkunft und im Verlauf von Keimung und Inkubation.
Bei den Angaben während der Keimung (ohne Testa) und der Inkubation handelt es sich um Mittelwerte aus den unterschiedlichen untersuchten Kakaovarietäten. Soweit nicht anders angegeben wurden die Samen direkt nach der Probennahme gefriergetrocknet.
Angegeben sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen. Wegen der Übersichtlichkeit der Darstellung wurde bei dem Verhältnis von hydrophoben zu sauren Aminosäuren (Standardabweichung 0 bis 9 %) und bei Putrescin (Standardabweichung 0,001 bis 0,02 mg/g ffTM) auf die Angaben der Standardabweichungen verzichtet.

	WAA-Gruppe	**SNK 13**	**ICS 40**	**T 79/501**	**German Cocoa**	**getrocknet**	**Keimung**			**Inkubation**			
										ungetrocknet	getrocknet	ungetrocknet	getrocknet
	Tag 0						Tag 4	Tag 6	Tag 10	Tag 2		Tag 4	
Wasseraufnahme [%]							28 ± 7	35 ± 5		7 ± 7		1,3 ± 6	
pH-Wert	6,13 ± 0,1	6,48 ± 0			6,18 ± 0,1	6,61 ± 0.1	6,33 ± 0	6,19 ± 0		5,43 ± 0,1	5,93 ± 0,1	4,98 ± 0,1	5,07 ± 0,1
Gesamtproteingehalt [mg/g AcTP]	313 ± 18	407 ± 0	421 ± 0	489 ± 0	396 ± 37	362 ± 9	383 ± 80	412 ± 75		339 ± 78	349 ± 83	231 ± 84	254 ± 62
Globulinabbau [AcTP]	-	-	-	-	-	-	-	(+)	++	+	+	+++	+++
Albuminabbau [AcTP]	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	++	++
Anzahl der Oligopeptidpeaks	0 - 3	0 - 3	0 - 3	0 - 3	5 – 10	0 - 5	0 – 3	0 – 5		4 - 10	< 15	< 20	< 25
Gesamtgehalt freier Aminosäuren [mg/g ffTM]	7,0 ± 2	3,8 ± 0,1	15,4 ± 2	5,0 ± 0,5	4,9 ± 1	4,3 ± 1	6,9 ± 2	6,8 ± 2	8,4 ± 0	11,3 ± 4	8,4 ± 1	15,1 ± 4	16,7 ± 3
hydrophobe : saure Aminosäuren [%]	17 : 77	27 : 66	7 : 92	25 ± 70	24 : 70	41 : 46	18 : 73	23 : 66	17 : 70	55 : 26	53 : 22	61 : 15	54 : 15
γ-Aminobuttersäure [mg/kg ffTM]	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0	0,5 ± 0	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,3	0,9 ± 0,3	0,7 ± 0,4	1,1 ± 0,4	1,1 ± 0,3	2,1 ± 0,5	2,4 ± 0,4	1,1 ± 0,5	1,8 ± 0,4
Epicatechin [mg/g ffTM]	36 ± 9	36 ± 8	43 ± 9	25 ± 2	45 ± 13	37 ± 6	37 ± 10	36 ± 11	51 ± 10	30 ± 10	25 ± 6	20 ± 4	13 ± 5

	WAA-Gruppe	SNK 13	ICS 40	T 79/501	German Cocoa	getrocknet	Keimung			Inkubation			
										ungetrocknet	getrocknet	ungetrocknet	getrocknet
	Tag 0						Tag 4	Tag 6	Tag 10	Tag 2		Tag 4	
Catechin [mg/g ffTM]	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,5 ± 0,3	0,9 ± 0,4	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,4	0,9 ± 0,5	1,5 ± 0,7	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,2
Cyanidin-3-Galactosid [mg/g ffTM]		2,6 ± 1,4	1,9 ± 1,0	2,5 ± 0,9	5,1 ± 3,1	3,1 ± 1,5	2,7 ± 1,4	2,9 ± 1,7	1,4 ± 0,7	2,9 ± 0,1	1,4 ± 0,9	0	0
Cyanidin-3-Arabinosid [mg/g ffTM]		4,4 ± 2,8	6,2 ± 3,0	6,4 ± 3,4	14,2 ± 7,7	7,6 ± 4,4	6,9 ± 3,6	7,6 ± 4,3	4,1 ± 0,7	9,9 ± 2,6	4,2 ± 2,5	0,9 ± 0	0,2 ± 0,2
Fructose [mg/g ffTM]	-	-	-	-	-	-	0,6 ± 0,9	1,8 ± 0,9	4,7 ± 0,2	2,7 ± 1,6	3,0 ± 1,1	8,2 ± 0,3	11,0 ± 0,7
Glucose [mg/g ffTM]	-	-	-	-	-	-	0,3 ± 0,7	2,0 ± 1,0	5,7 ± 0,2	3,2 ± 1,8	1,0 ± 1,8	8,7 ± 0,8	7,1 ± 0,5
Saccharose [mg/g ffTM]	38 ± 2,7	36 ± 0	47 ± 0	33 ± 0	34 ± 4,3	34 ± 4,4	29 ± 4,9	29 ± 4,0	36 ± 4,3	20 ± 2,6	17 ± 2,1	2 ± 2,8	5 ± 0,4
Theobromin [mg/g ffTM]	30 ± 4,3	41 ± 0	50 ± 0	26 ± 0	35 ± 7,4	33 ± 11	33 ± 7,2	36 ± 5,4	35 ± 0	31 ± 5,2	32 ± 7,3	23 ± 9,9	28 ± 1,3
Coffein [mg/g ffTM]	2,1 ± 2,2	5,7 ± 0	4,0 ± 0	1,7 ± 0	1,4 ± 0,9	1,9 ± 1,9	2,5 ± 2,0	2,6 ± 1,4	1,3 ± 0	1,3 ± 1,6	1,1 ± 1,0	1,1 ± 1,9	1,4 ± 0,3
Putrescin [mg/g ffTM]	0,002	0,005	0,014	0,007	0,006	0,007	0,021	0,026	0,021	0,001	0,005	0,001	0,007
PPO-Aktivität [µkat/g Frischgewicht]	0,38 ± 0,2				6,17 ± 0,7		0,52 ± 0,3	0,67 ± 0,3	0,90 ± 0,2	0,05 ± 0,02		0,04 ± 0,02	
Apsartylendoprotease [µkat/g ffTM]	0,30 ± 0,09	0,28 ± 0,08	0,15 ± 0,01	0,22 ± 0,05	0,15 ± 0,05	0,23 ± 0,08	0,23 ± 0,11	0,19 ± 0,10	0,31 ± 0,11	0,26 ± 0,11	0,18 ± 0,09	0,12 ± 0,07	0,08 ± 0,03
Carboxypeptidase [µkat/g ffTM]	0,24 ± 0,11	0,30 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,34 ± 0,06	0,36 ± 0,04	0,69 ± 0,22	0,82 ± 0,22	1,26 ± 0,15	0,23 ± 0,08	0,25 ± 0,07	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01

Tabelle 21: Gehalte der einzelnen freien Aminosäuren und Gesamtgehalt der freien Aminosäuren in entfetteten Kakaosamen in frischen Kakaosamen unterschiedlicher Herkunft und im Verlauf von Keimung und Inkubation.

Bei den Angaben während der Keimung und der Inkubation handelt es sich um die Mittelwerte (± Standardabweichungen) aus den unterschiedlichen untersuchten Kakaovarietäten. Soweit nicht anders angegeben wurden die Samen direkt nach der Probennahme gefriergetrocknet.

		WAA-Gruppe	**SNK 13**	**ICS 40**	**T 79/501**	**German Cocoa**	**getrocknet**	**Keimung**			**Inkubation**			
											unge-trocknet	getrocknet	unge-trocknet	getrocknet
		Tag 0						Tag 4	Tag 6	Tag 10	Tag 2		Tag 4	
hydrophobe Aminosäuren	**Leucin**	0,10 ± 0,07	0,13 ± 0,00	0,13 ± 0,04	0,13 ± 0,02	0,18 ± 0,04	0,14 ± 0,05	0,18 ± 0,09	0,23 ± 0,06	0,14 ± 0,02	1,41 ± 0,74	1,01 ± 0,28	2,59 ± 0,68	2,70 ± 0,54
	Alanin	0,16 ± 0,10	0,07 ± 0,03	0,11 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,59 ± 0,15	0,11 ± 0,06	0,32 ± 0,18	0,49 ± 0,19	0,33 ± 0,02	1,06 ± 0,34	0,47 ± 0,16	1,14 ± 0,35	1,14 ± 0,24
	Phenylalanin	0,24 ± 0,07	0,24 ± 0,00	0,21 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,25 ± 0,05	0,24 ± 0,05	0,12 ± 0,05	0,18 ± 0,05	0,22 ± 0,05	1,51 ± 0,76	1,05 ± 0,26	2,54 ± 0,66	2,31 ± 0,43
	Valin	0,13 ± 0,10	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,23 ± 0,04	0,20 ± 0,05	0,15 ± 0,05	0,18 ± 0,07	0,24 ± 0,06	0,24 ± 0,04	0,70 ± 0,20	0,76 ± 0,17	0,91 ± 0,17	1,08 ± 0,21
	Isoleucin	0,19 ± 0,06	0,21 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,21 ± 0,04	0,22 ± 0,06	0,23 ± 0,05	0,17 ± 0,08	0,19 ± 0,06	0,11 ± 0,01	0,60 ± 0,12	0,63 ± 0,15	0,70 ± 0,12	0,78 ± 0,15
	Tyrosin	0,40 ± 0,17	0,23 ± 0,08	0,24 ± 0,04	0,26 ± 0,03	0,34 ± 0,10	0,32 ± 0,13	0,17 ± 0,05	0,22 ± 0,06	0,35 ± 0,03	0,97 ± 0,35	0,67 ± 0,14	1,34 ± 0,30	1,21 ± 0,14
	Summe	1,23 ± 0,42	1,03 ± 0,15	1,01 ± 0,05	1,25 ± 0,06	1,78 ± 0,29	1,19 ± 0,29	1,13 ± 0,41	1,55 ± 0,38	1,39 ± 0,13	6,25 ± 2,40	4,59 ± 0,98	9,22 ± 2,17	9,22 ± 1,08
saure Aminosäurn	**Asparaginsäure**	1,79 ± 0,77	1,09 ± 0,02	12,82 ± 1,7	1,35 ± 0,05	0,17 ± 0,06	1,58 ± 0,52	2,09 ± 2,34	1,70 ± 1,77	1,60 ± 0,07	0,23 ± 0,06	0,22 ± 003	0,32 ± 0,04	0,36 ± 0,05
	Glutaminsäure	1,65 ± 0,54	0,72 ± 0,18	0,74 ± 0,16	0,90 ± 0,33	1,16 ± 0,27	1,12 ± 0,48	1,27 ± 0,54	1,09 ± 0,51	1,50 ± 0,46	0,65 ± 024	0,61 ± 0,15	0,77 ± 0,27	1,04 ± 0,16
	Asparagin	1,75 ± 0,80	0,65 ± 0,08	0,62 ± 0,23	1,24 ± 0,29	0,57 ± 0,20	0,75 ± 0,26	1,75 ± 0,66	1,67 ± 0,51	2,17 ± 0,70	1,74 ± 0,67	0,86 ± 0,10	1,09 ± 0,44	0,99 ± 0,21
	Glutamin	0,19 ± 0,10	-	-	-	0,21 ± 0,05	-	0,37 ± 0,22	0,61 ± 0,42	0,55 ± 0,21	0,36 ± 0,12	0,25 ± 0,06	0,28 ± 0,22	0,25 ± 0,09
	Summe	5,37 ± 1,55	2,45 ± 0,24	14,19 ± 1,8	3,49 ± 0,58	2,12 ± 0,47	3,45 ± 1,01	5,48 ± 2,30	5,07 ± 1,84	5,82 ± 0,14	2,98 ± 1,04	1,95 ± 0,29	2,47 ± 0,85	2,64 ± 0,49
andere Aminosäuren	**Arginin**	0,11 ± 0,04	-	-	-	-	0,07 ± 0,00	0,26 ± 000	0,45 ± 0,30	0,24 ± 0,00	0,72 ± 0,41	-	1,69 ± 0,28	-
	Serin	0,17 ± 0,10	0,07 ± 0,00	0,09 ± 0,04	0,13 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,10 ± 0,03	0,30 ± 0,12	0,37 ± 0,12	0,28 ± 0,06	0,44 ± 0,10	0,40 ± 0,07	0,53 ± 0,13	0,63 ± 0,12
	Histidin	0,08 ± 0,03	0,08 ± 0,00	-	-	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,00	0,24 ± 0,09	0,31 ± 0,10	0,39 ± 007	0,54 ± 0,10	0,47 ± 0,16	0,51 ± 0,06	0,61 ± 0,17
	Glycin	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,17 ± 0,11	0,07 ± 0,05	0,06 ± 0,03	0,07 ± 0,04	0,10 ± 0,02	0,23 ± 0,06	0,25 ± 0,08	0,24 ± 0,08	0,30 ± 0,08
	Threonin	0,06 ± 0,03	0,08 ± 0,06	0,06 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,04	0,04 ± 0,02	0,07 ± 0,03	0,10 ± 0,04	0,24 ± 0,02	0,29 ± 0,13	0,36 ± 0,05	0,33 ± 0,08	0,55 ± 0,21
	Methionin	-	0,10 ± 0,00	-	0,10 ± 0,00	0,32 ± 0,08	0,17 ± 0,20	0,25 ± 0,14	0,28 ± 0,13	-	0,14 ± 0,00	0,48 ± 0,12	-	1,04 ± 0,17
	Tryptophan	0,04 ± 0,02	-	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,04	0,05 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,16 ± 0,11	0,10 ± 0,05	0,37 ± 0,08	0,43 ± 0,12
	Lysin	-	0,03 ± 0,00	-	-	0,09 ± 0,16	-	0,33 ± 0,00	0,18 ± 0,00	0,18 ± 0,00	0,74 ± 0,89	0,34 ± 0,06	2,43 ± 2,14	2,09 ± 0,88
	Summe	0,51 ± 0,02	0,41 ± 0,02	0,23 ± 0,14	0,37 ± 0,04	0,92 ± 0,27	0,62 ± 0,13	1,57 ± 0,25	1,79 ± 0,35	1,54 ± 0,04	3,26 ± 1,70	2,41 ± 0,33	6,12 ± 3,13	5,64 ± 1,51
Gesamtgehalt		7,11 ± 2,15	3,90 ± 0,12	15,43 ± 1,9	5,12 ± 0,54	4,81 ± 0,80	5,26 ± 1,27	8,18 ± 2,12	8,42 ± 1,94	8,75 ± 0,04	12,50 ± 1,3	8,95 3,64	17,81 ± 3,6	17,50 ± 2,9

Tabelle 22: Einzelwerte der Proben: Restfeuchtigkeit nach Trocknung, pH-Werte, phenolische Substanzen, Zucker

Probenbezeichnung	Tag	Restfeuchtigkeit nach Sonnentrocknung	pH-Wert	Protein	Epicatechin	Catechin	Cyanidin-3-Galactosid	Cyanidin-3-Arabinosid	Fructose	Glucose	Saccharose
		[%]		[mg/g AcTP]	[mg/g ffTM]						
Tri2-K Keimung	0			318	38	0,8	-	-	0,0	0,0	38,2
	1			296	35	0,7	-	-	0,0	0,0	37,4
	2			299	41	0,7	-	-	0,0	0,0	32,9
	3			293	41	0,6	-	-	0,0	0,0	30,5
	4			292	45	0,8	-	-	0,0	0,0	31,4
	5			278	43	0,9	-	-	0,0	0,0	26,6
Tri3-K Keimung	0			312	33	0,7	-	-			
	1			279	27	0,7	-	-			
	2			298	38	0,7	-	-			
	3			266	39	0,7	-	-			
	4			264	41	0,7	-	-			
	5			250	37	0,8	-	-			
Tri4-K Keimung	0			327	40	0,8	-	-			
	3			305	44	1,0	-	-			
	6			305	44	1,2	-	-			
	8			297	44	0,8	-	-			
	10				40	0,7	-	-			
Tri5-K Keimung	0			373	24	0,5	-	-			
	3			357	24	0,3	-	-			
	6			381	21	0,3	-	-			
	8			339	30	0,8	-	-			
	10			360	26	0,9	-	-			
Tri1-I Inkubation	0		6,14	325	57	0,7	-	-	0,0	0,0	35,7
	1		5,95	319	53	0,6	-	-	0,0	0,0	38,8
	2		5,44	280	46	0,6	-	-	3,3	4,3	17,2
	3		4,91	208	27	0,4	-	-	9,2	10,3	0,0
	4		5,05	213	22	0,5	-	-	8,5	9,3	0,0
Tri2-I Inkubation	0		6,23	282	33	0,8	-	-	0,0	0,0	40,7
	1		5,89	280	25	0,8	-	-	0,0	0,0	38,2
	2		5,35	264	23	0,5	-	-	4,0	4,9	23,0
	3		4,79	187	21	0,5	-	-	9,5	10,6	0,0
	4		4,93	158	15	0,4	-	-			
Tri3-I Inkubation	0		6,05		40	0,5	-	-	0,0	0,0	39,7
	1		5,86		33	0,4	-	-	0,0	0,0	37,5
	2		5,43		30	0,5	-	-	4,1	4,6	20,0
	3		4,88		15	0,3	-	-	8,9	10,3	0,0

Probenbezeichnung	Tag	Restfeuchtigkeit nach Sonnentrocknung	pH-Wert	Protein	Epicatechin	Catechin	Cyanidin-3-Galactosid	Cyanidin-3-Arabinosid	Fructose	Glucose	Saccharose
		[%]		[mg/g AcTP]	[mg/g ffTM]						
Tri4-I Inkubation	0		6,07		36	0,4	-	-	0,0	0,0	37,1
	1		5,84		31	0,4	-	-	0,0	0,0	33,0
	2		5,33		23	0,4	-	-	4,0	4,3	16,5
	3		4,88		15	0,3	-	-	9,2	10,5	0,0
Tri5-I Inkubation	0		6,20		35	0,7	-	-	0,0	0,0	35,7
	1		5,54		30	0,5	-	-	0,0	0,0	31,7
	2		5,42		15	0,3	-	-	1,0	1,7	21,1
	3		5,20		19	0,4	-	-	3,5	4,7	13,9
Tri6-I Inkubation	0		6,12		35	0,7	-	-	0,0	0,0	34,0
	1		5,37		32	0,6	-	-	1,2	0,0	24,4
	2		5,24		26	0,6	-	-	3,6	4,1	13,0
	3		5,02		13	0,5	-	-	5,6	6,6	5,7
Tri1-K Keimung	0		6,13		25	0,6	-	-	0,0	0,0	41,9
	1		6,20		24	0,6	-	-	0,0	0,0	32,2
	2		6,22		23	0,6	-	-	0,0	0,0	29,3
	3		6,26		30	1,0	-	-	0,0	0,0	31,4
	4		6,34		26	0,9	-	-	0,0	0,0	29,6
SNK 64-K Keimung	0				52	1,7	0,92	4,63	0,0	0,0	35,9
	2				52	1,5	1,73	4,95	0,0	0,0	28,7
	4				53	1,8	1,42	4,97	0,0	0,0	30,0
	6				59	1,8	0,92	5,27	2,5	2,5	29,9
	8				55	1,7	1,73	4,28	3,0	3,3	30,9
	10				59	1,7	1,91	4,60	4,8	5,9	39,2
ICS 84-K Keimung	0				45	1,9	1,08	2,09	0,0	0,0	38,1
	2				47	2,0	1,10	2,57	0,0	0,0	30,0
	4				47	2,0	1,11	3,54	1,8	2,0	30,1
	6				48	2,1	0,91	2,10	2,9	3,4	25,3
	8				56	2,1	1,51	4,26	4,3	5,1	27,2
	10				55	2,1	0,98	3,63	4,5	5,5	33,2
SNK 13-K1 Keimung	0		6,48	407	30	1,2	1,65	2,41	0,0	0,0	36,4
	1		6,34	460	34	1,2	1,67	2,51	0,0	0,0	32,8
	2		6,35	487	31	1,2	1,88	2,90	0,0	0,0	39,1
	3		6,36	451	35	1,2	2,51	3,63	0,0	0,0	37,1
	4		6,33	458	40	1,2	2,00	2,81	0,0	0,0	31,3
	5		6,26	475	27	0,8	1,96	2,97	1,6	0,0	26,9
	6		6,19	474	22	0,9	1,78	2,14	2,5	2,9	34,2

Probenbezeichnung	Tag	Restfeuchtigkeit nach Sonnentrocknung	pH-Wert	Protein	Epicatechin	Catechin	Cyanidin-3-Galactosid	Cyanidin-3-Arabinosid	Fructose	Glucose	Saccharose
		[%]		[mg/g AcTP]	[mg/g ffTM]						
SNK 13-K2 Keimung	0				42	0,9	3,58	6,44			
	1				40	1,2	3,97	6,76			
	2				40	0,8	3,20	6,81			
	3				37	0,8	4,02	6,10			
	4				37	0,8	3,91	7,52			
	5				37	0,8	3,78	7,46			
	6				36	1,1	4,39	8,14			
ICS 40-K1 Keimung	0			421	37	0,9	1,18	4,03	0,0	0,0	46,6
	1			418	27	0,8	1,45	2,96	0,0	0,0	44,8
	2			388	41	0,8	1,39	4,11	0,0	0,0	36,6
	3			410	34	1,0	1,13	3,13	0,0	0,0	37,8
	4			408	39	0,8	1,15	4,01	2,0	0,0	32,1
	5			322	27	0,5	1,10	3,68	1,8	0,0	35,4
	6			389	27	0,5	0,78	5,09	1,5	1,5	24,9
ICS 40-K2 Keimung	0				49	0,6	2,64	8,34			
	1				47	0,7	3,47	9,06			
	2				44	1,0	2,27	8,56			
	3				31	0,6	1,34	4,46			
	4				30	0,6	1,06	3,27			
	5				29	0,4	1,30	3,68			
	6				26	0,8	1,82	5,20			
T 79/501-K1 Keimung	0			489	24	0,8	3,19	8,78	0,0	0,0	32,6
	1			519	24	0,5	3,28	8,13	0,0	0,0	30,1
	2			532	30	0,8	3,56	10,01	0,0	0,0	24,3
	3			516	24	0,4	3,11	7,99	0,0	0,0	31,8
	4			518	27	0,4	2,99	8,01	0,9	0,0	29,2
	5			531	25	0,4	3,21	10,50	1,8	1,6	29,7
	6			537	26	0,4	3,58	10,24	1,3	1,5	27,9
T 79/501-K2 Keimung	0				26	0,3	1,90	4,00			
	1				34	0,4	2,38	4,92			
	2				37	0,5	2,71	6,45			
	3				36	0,5	3,23	6,47			
	4				33	0,4	2,45	6,53			
	5				38	0,5	2,84	6,53			
	6				28	0,4	2,11	4,32			

Probenbezeichnung	Tag	Restfeuchtigkeit nach Sonnentrocknung	pH-Wert	Protein	Epicatechin	Catechin	Cyanidin-3-Galactosid	Cyanidin-3-Arabinosid	Fructose	Glucose	Saccharose
		[%]		[mg/g AcTP]	[mg/g ffTM]						
GcM-K Keimung	0			405	22	0,4	1,30	8,85	0,0	0,0	36,1
	1			394	25	0,4	2,22	9,99	0,0	0,0	29,8
	2			380	25	0,4	2,10	9,38	0,0	0,0	24,6
	3			378	19	0,3	1,01	5,63	0,0	0,0	30,1
	4			445	16	0,2	1,02	4,54	0,0	0,0	16,3
	5			375	13	0,1	0,91	6,14	2,8	3,1	26,0
	6			441	19	0,3	1,98	7,43	2,5	2,6	30,7
GcR-K1 Keimung	0			433	29	0,7	2,81	11,50	0,0	0,0	33,3
	1			398	32	0,6	3,64	11,03	0,0	0,0	32,2
	2			357	33	0,7	4,12	12,37	0,0	0,0	34,7
	3			410	32	0,5	2,93	6,48	0,0	0,0	35,0
	4			377	38	0,7	2,31	9,81	0,0	0,0	33,0
	5			422	35	0,6	2,66	8,78	0,0	0,0	39,0
	6			406	28	0,5	2,78	7,33	1,9	1,5	26,7
GcR-K2 Keimung	0				41	1,1	2,09	8,68			
	1				36	0,9	3,19	5,44			
	2				35	0,7	2,00	6,37			
	3				37	1,1	3,45	6,77			
	5				38	1,0	3,79	6,81			
	6				39	0,9	3,31	7,56			
GcG-K1 Keimung	0			344	46	0,9	6,01	13,87	0,0	0,0	32,6
	1			360	43	0,9	5,53	13,37	0,0	0,0	29,6
	2			398	45	0,8	5,82	16,28	0,0	0,0	34,1
	3			305	37	0,7	5,36	13,94	0,0	0,0	27,7
	4			346	36	0,6	4,38	11,33	0,0	0,0	36,3
	5			378	38	0,7	4,72	10,46	0,0	0,0	33,9
	6			419	45	0,8	5,44	14,23	0,0	0,0	36,9
GcG-K2 Keimung	0				41	1,0	3,82	8,54			
	1				36	0,9	3,76	7,51			
	2				37	0,8	3,09	7,44			
	3				35	0,9	3,37	6,56			
	4				29	0,7	2,99	6,25			
	5				29	0,6	2,71	6,42			
	6				35	0,9	4,13	8,32			

Probenbezeichnung	Tag	Restfeuchtigkeit nach Sonnentrocknung	pH-Wert	Protein	Epicatechin	Catechin	Cyanidin-3-Galactosid	Cyanidin-3-Arabinosid	Fructose	Glucose	Saccharose
		[%]		[mg/g AcTP]	[mg/g ffTM]						
GcA-K3 Keimung	0			385	41	0,6	6,19	16,87	0,0	0,0	35,4
	1			357	41	0,5	5,45	14,60	0,0	0,0	30,1
	2			372	44	0,5	5,97	16,15	0,0	0,0	32,9
	3			358	44	0,5	5,82	15,46	0,0	0,0	28,8
	4			317	49	0,6	6,10	16,70	1,1	0,0	25,0
	5			378	64	0,8	8,77	25,79	1,1	0,0	25,6
	6			330	50	0,6	6,30	18,22	1,5	2,4	28,3
GcA-K4 Keimung	0				45	0,7	4,95	10,91			
	1				36	0,7	2,70	6,01			
	2				32	0,4	3,24	7,34			
	3				28	0,4	2,93	6,44			
	4				30	0,4	3,39	7,82			
	5				32	0,5	3,16	6,48			
	6				39	0,6	3,04	7,89			
GcA-K5 Keimung	0			431	61	0,8	4,72	12,46	0,0	0,0	36,8
	2			416	61	0,7	4,61	12,29	0,0	0,0	29,2
	4			406	51	0,6	3,25	8,26	0,0	0,0	24,9
GcA-K6 Keimung	0				43	0,8	3,37	7,30	0,0	0,0	28,6
	1				44	0,8	3,41	7,42	0,0	0,0	28,8
	2				49	0,9	3,89	8,86	0,0	0,0	24,4
	3				41	0,7	2,67	5,38	0,0	0,0	29,4
	4				42	1,0	2,89	5,81	2,2	1,7	28,2
C1-K Keimung	0				24	1,3	2,53	5,39			
	1				26	1,1	2,72	6,24			
	2				30	1,0	2,87	5,16			
	3				22	0,7	2,46	4,23			
	4				22	0,9	2,33	4,24			
	5				21	0,8	1,99	4,31			
SNK 13-F1 Inkubation	0	0,80	6,54		34	0,9	1,78	3,59	0,0	0,0	28,4
	1	1,16	6,64		32	1,4	1,79	3,44	0,0	0,0	26,9
	2	0,60	5,92		16	0,7	0,00	0,00	3,7	3,1	20,8
	3	0,58	5,68		14	0,5	0,00	0,00	6,5	5,8	20,4
	4	0,59	5,71		7	0,1	0,00	0,00	8,4	7,1	12,1
SNK 13-F2 Inkubation	0				33	1,2	2,48	4,34			
	1				32	1,0	2,92	5,42			
	2				28	0,7	2,65	5,19			
	3				24	0,5	0,32	1,81			
	4				18	0,6	0,00	0,45			

Probenbezeichnung	Tag	Restfeuchtigkeit nach Sonnentrocknung	pH-Wert	Protein	Epicatechin	Catechin	Cyanidin-3-Galactosid	Cyanidin-3-Arabinosid	Fructose	Glucose	Saccharose
		[%]		[mg/g AcTP]	[mg/g ffTM]						
ICS 40-F1 Inkubation	0	1,00	6,61		38	0,5	0,92	3,00	0,0	0,0	36,5
	1	1,22	6,62		39	0,7	0,95	3,32	0,0	0,0	38,0
	2	0,55	5,85		29	0,8	0,24	0,85	7,7	7,8	27,9
	3	0,68	5,49		20	0,5	0,00	0,34	11,1	10,0	24,0
	4	0,54	5,57		17	0,3	0,00	0,00	15,3	12,3	11,2
ICS 40-F2 Inkubation	0				49	0,8	3,64	10,69			
	1				42	0,5	2,40	8,11			
	2				31	0,6	1,64	7,18			
	3				23	0,4	0,00	0,95			
	4				19	0,6	0,00	0,00			
T 79/501-F1 Inkubation	0	1,09	6,71		38	0,8	2,91	6,65	0,0	0,0	28,7
	1	1,10	6,59		33	0,4	2,86	5,90	0,0	0,0	26,3
	2	0,78	5,97		22	0,2	0,51	1,48	3,7	3,6	24,8
	3	0,79	5,56		11	0,1	0,00	0,30	7,5	5,9	15,2
	4	0,49	5,52		8	0,1	0,00	0,00	11,5	9,2	8,5
T 79/501-F2 Inkubation	0				41	0,6	4,23	10,41			
	1				37	0,5	3,46	11,98			
	2				27	0,3	2,96	7,81			
	3				31	0,4	0,60	3,24			
	4				12	0,2	0,00	0,34			
GcM-F Inkubation	0	1,04	6,73		27	0,4	1,88	5,15	0,0	0,0	39,7
	1	1,27	6,69		22	0,3	1,49	4,57	0,0	0,0	34,5
	2	0,67	5,96		14	0,2	0,32	0,80	5,4	4,1	28,1
	3	0,34	5,82		8	0,1	0,00	0,00	10,4	8,2	15,1
	4	0,38	5,84		5	0,1	0,00	0,00	18,1	14,0	6,5
GcR-F1 Inkubation	0	1,62	6,66	353	36	0,8	3,31	5,96	0,0	0,0	37,2
	1	1,72	6,58	357	38	0,6	3,57	6,74	0,0	0,0	33,5
	2	0,53	6,02	367	27	0,5	0,44	1,54	4,3	3,1	14,8
	3	0,53	5,63	260	24	0,6	0,00	0,79	9,9	6,7	4,5
	4	0,61	5,21	222	9	0,1	0,00	0,00	10,3	7,4	5,3
GcR-F2 Inkubation	0				33	0,7	4,41	10,20			
	1				35	0,7	3,60	12,33			
	2				15	0,3	0,83	2,59			
	3				23	0,5	0,00	1,62			
	4				19	0,5	0,00	0,34			

Probenbezeichnung	Tag	Restfeuchtigkeit nach Sonnentrocknung	pH-Wert	Protein	Epicatechin	Catechin	Cyanidin-3-Galactosid	Cyanidin-3-Arabinosid	Fructose	Glucose	Saccharose
		[%]		[mg/g AcTP]	[mg/g ffTM]						
GcG-F1 Inkubation	0	1,42	6,60	364	37	0,7	1,62	2,74	0,0	0,0	36,2
	1	1,76	6,51	349	32	0,5	1,24	2,49	0,0	0,0	28,8
	2	0,92	5,84	258	28	0,4	0,67	1,41	2,4	0,0	18,9
	3	0,22	5,19	244	11	0,2	0,00	0,00	11,3	7,4	6,2
	4	0,69	5,01	215	9	0,3	0,00	0,00	11,7	7,5	4,6
GcG-F2 Inkubation	0				43	0,9	6,39	16,49			
	1				35	0,7	4,98	12,45			
	2				31	0,6	1,18	5,19			
	3				25	0,5	0,00	1,91			
	4				12	0,3	0,00	0,50			
GcA-F3 Inkubation	0	1,85	6,42	370	37	0,7	2,66	5,09	0,0	0,0	33,1
	1	0,77	6,23	328	30	0,6	2,28	4,26	0,0	0,0	24,9
	2	0,40	5,93	421	24	0,4	0,63	1,81	2,5	0,0	16,4
	3	0,79	5,36	308	20	0,3	0,00	0,53	8,8	5,5	5,8
	4	0,70	4,99	325	8	0,2	0,00	0,00	11,0	6,6	4,9
GcA-F4 Inkubation	0				29	0,4	4,53	14,35			
	1				27	0,4	5,87	14,31			
	2				18	0,2	1,28	5,42			
	3				16	0,2	0,00	2,19			
	4				8	0,1	0,00	0,00			
GcA-F5 Inkubation	0		6,15	351	59	1,3	10,90	29,43	0,0	0,0	39,0
	1		5,74	397	43	1,0	7,52	20,71	0,0	0,0	31,4
	2		5,41	401	39	0,9	2,86	11,71	2,5	2,6	23,2
	3		5,06	387	28	0,5	0,52	8,95	6,9	7,0	8,8
GcA-F6 Inkubation	0		6,21	424	62	1,9	9,99	28,10	0,0	0,0	26,4
	2		5,62	411	30	0,8	2,95	8,01	0,0	0,0	19,4
	4		4,95	324	23	0,6	0,00	0,85	8,0	8,1	4,0
C1-F Inkubation	0		6,15		28	1,2	2,53	3,92			
	1		6,43		28	1,4	2,82	4,36			
	2		6,34		27	0,9	2,15	3,93			
	3		5,91		16	0,6	0,00	0,77			
	4		5,56		9	0,4	0,00	0,00			

Tabelle 23: Einzelwerte der Proben: Methylxanthine, Polyamine, Proteaseaktivitäten

Probenbezeichnung	Tag	Theobromin	Coffein	Putrescin	Spermidin	Spermin	Aspartyl-endoprotease a	Aspartyl-endoprotease b	Carboxy-peptidase a	Carboxy-peptidase b
		[mg/g ffTM]					[µkat/g ffTM]			
Tri2-K Keimung	0	34	2,5	0,000	0,050	0,017	0,36	0,38	0,35	0,32
	1	33	1,8	0,000	0,035	0,012	0,35	0,35	0,37	0,32
	2	34	2,3	0,000	0,018	0,004	0,33	0,37	0,49	0,55
	3	31	1,1	0,008	0,023	0,005	0,34	0,34	0,64	0,48
	4	32	1,2	0,009	0,025	0,005	0,32	0,27	0,65	0,73
	5	31	1,2	0,015	0,021	0,002	0,35	0,32	0,87	0,90
Tri3-K Keimung	0	24	0,0	0,006	0,093	0,051	0,29	0,29	0,28	0,29
	1	23	0,0	0,004	0,064	0,023	0,29	0,25	0,27	0,32
	2	26	0,0	0,017	0,090	0,029	0,33	0,28	0,40	0,49
	3	25	0,0	0,024	0,081	0,019	0,36	0,27	0,66	0,69
	4	25	0,0	0,032	0,064	0,015	0,31	0,27	0,89	0,83
	5	25	0,6	0,020	0,041	0,008	0,27	0,23	0,82	0,85
Tri4-K Keimung	0	31	1,2	0,001	0,069	0,036	0,33	0,32	0,31	0,34
	3	31	1,2	0,012	0,051	0,012	0,32	0,27	0,65	0,80
	6	31	0,9	0,024	0,063	0,016	0,35	0,35	0,92	0,82
	8	34	1,1	0,031	0,077	0,020	0,33	0,38	1,25	1,06
	10	35	1,3	0,045	0,109	0,034	0,29	0,34	1,45	1,05
Tri5-K Keimung	0	21	0,0				0,20	0,23	0,69	0,55
	3	19	0,0				0,20	0,28	1,01	0,87
	6	23	0,0				0,22	0,24	1,08	1,02
	8	15	0,0				0,34	0,23	1,55	1,37
	10	15	0,0				0,36	0,35	1,61	1,41
Tri1-I Inkubation	0	33	1,1	0,000	0,069	0,036	0,22	0,22	0,11	0,11
	1	31	1,1	0,000	0,017	0,008	0,31	0,37	0,30	0,23
	2	31	1,0	0,000	0,025	0,011	0,41	0,40	0,22	0,24
	3	26	0,8	0,000	0,013	0,006	0,25	0,27	0,08	0,05
	4	21	0,0	0,000	0,016	0,007	0,20	0,20	0,04	0,04
Tri2-I Inkubation	0	27	0,0	0,001	0,048	0,033	0,29	0,26	0,19	0,17
	1	26	0,0	0,001	0,050	0,039	0,34	0,28	0,19	0,17
	2	26	0,0	0,001	0,036	0,029	0,39	0,42	0,24	0,26
	3	18	0,0	0,001	0,025	0,018	0,29	0,29	0,04	0,05
	4	14	0,0	0,001	0,035	0,026	0,14	0,14	0,00	0,00
Tri3-I Inkubation	0	33	0,9	0,000	0,044	0,013	0,30	0,28	0,36	0,30
	1	33	1,0	0,000	0,035	0,011	0,25	0,29	0,29	0,30
	2	32	0,9	0,000	0,044	0,012	0,29	0,36	0,30	0,26
	3	26	0,7	0,000	0,044	0,019	0,16	0,17	0,05	0,05

Probenbezeichnung	Tag	Theobromin	Coffein	Putrescin	Spermidin	Spermin	Aspartyl-endoprotease a	Aspartyl-endoprotease b	Carboxy-peptidase a	Carboxy-peptidase b
		[mg/g ffTM]					[µkat/g ffTM]			
Tri4-I Inkubation	0	31	1,2	0,000	0,040	0,015	0,35	0,36	0,37	0,30
	1	30	1,0	0,000	0,051	0,016	0,31	0,30	0,32	0,32
	2	25	0,5	0,000	0,039	0,015	0,19	0,28	0,07	0,06
	3	29	0,9	0,000	0,039	0,016	0,25	0,36	0,03	0,20
Tri5-I Inkubation	0	29	4,8	0,009	0,045	0,027	0,44	0,45	0,31	0,32
	1	30	7,2	0,004	0,033	0,026	0,33	0,34	0,36	0,27
	2	28	4,3	0,001	0,080	0,026	0,18	0,22	0,18	0,13
	3	29	5,8	0,001	0,076	0,023	0,23	0,45	0,23	0,24
Tri6-I Inkubation	0	36	5,4	0,005	0,017	0,027	0,13	0,14	0,03	0,04
	1	32	5,8	0,006	0,081	0,054	0,17	0,24	0,03	0,05
	2	30	3,7	0,007	0,057	0,026	0,42	0,36	0,23	0,15
	3	28	3,4	0,001	0,041	0,022	0,31	0,38	0,17	0,15
Tri1-K Keimung	0	32	5,9	0,001	0,035	0,024	0,27	0,40	0,21	0,19
	1	29	7,2	0,001	0,029	0,029	0,30	0,32	0,20	0,16
	2	33	7,3	0,001	0,021	0,034	0,28	0,31	0,24	0,21
	3	31	6,1	0,005	0,034	0,022	0,35	0,41	0,33	0,34
	4	31	6,6	0,004	0,033	0,028	0,31	0,33	0,40	0,39
SNK 64-K Keimung	0			0,007	0,036	0,008	0,31	0,33	0,38	0,34
	2			0,005	0,014	0,002	0,33	0,39	0,73	0,64
	4			0,017	0,014	0,002	0,44	0,45	1,02	0,92
	6			0,009	0,010	0,001	0,36	0,38	1,10	1,02
	8			0,011	0,013	0,001	0,39	0,36	1,22	1,22
	10			0,009	0,011	0,001	0,40	0,45	1,31	1,30
ICS 84-K Keimung	0			0,004	0,019	0,020	0,26	0,35	0,38	0,36
	2			0,017	0,033	0,023	0,28	0,32	0,90	0,82
	4			0,032	0,056	0,013	0,25	0,22	1,15	1,04
	6			0,037	0,056	0,015	0,12	0,24	1,22	1,25
	8			0,010	0,005	0,000	0,19	0,24	1,28	1,05
	10			0,008	0,007	0,000	0,17	0,22	1,12	1,35
SNK 13-K1 Keimung	0	41	5,7	0,005	0,020	0,005	0,23	0,34	0,31	0,29
	1	34	8,6	0,006	0,052	0,021	0,22	0,22	0,37	0,34
	2	34	8,6	0,003	0,020	0,012	0,22	0,32	0,32	0,33
	3	28	4,6	0,004	0,040	0,009	0,18	0,19	0,40	0,44
	4	21	6,0	0,010	0,052	0,011	0,27	0,23	0,61	0,67
	5	37	8,3	0,016	0,064	0,018	0,22	0,24	0,75	0,85
	6	27	4,7	0,016	0,059	0,015	0,14	0,31	0,75	0,78

Probenbezeichnung	Tag	Theobromin	Coffein	Putrescin	Spermidin	Spermin	Aspartyl-endoprotease a	Aspartyl-endoprotease b	Carboxy-peptidase a	Carboxy-peptidase b
		[mg/g ffTM]					[µkat/g ffTM]			
ICS 40-K1 Keimung	0	50	4,0	0,014	0,074	0,020	0,16	0,14	0,25	0,24
	1	41	7,5	0,019	0,076	0,021	0,14	0,09	0,25	0,24
	2	51	8,0	0,017	0,062	0,009	0,11	0,17	0,33	0,34
	3	33	8,0	0,012	0,052	0,010	0,12	0,15	0,45	0,45
	4	35	4,1	0,006	0,020	0,004	0,14	0,17	0,61	0,53
	5	44	4,9	0,010	0,046	0,010	0,12	0,11	0,53	0,44
	6	36	4,4	0,009	0,030	0,005	0,06	0,07	0,54	0,58
T 79/501-K1 Keimung	0	26	1,7	0,007	0,031	0,008	0,19	0,25	0,40	0,39
	1	21	1,3	0,007	0,021	0,007	0,28	0,18	0,41	0,40
	2	26	1,7	0,009	0,029	0,005	0,16	0,18	0,46	0,49
	3	29	2,0	0,010	0,037	0,005	0,16	0,16	0,58	0,54
	4	30	1,0	0,012	0,039	0,006	0,15	0,22	0,68	0,67
	5	21	1,4	0,003	0,013	0,004	0,22	0,22	0,81	0,75
	6	35	1,6	0,009	0,036	0,005	0,18	0,19	0,84	0,73
GcM-K Keimung	0	23	0,0	0,003	0,064	0,020	0,23	0,17	0,44	0,40
	1	25	0,0	0,007	0,075	0,014	0,20	0,18	0,37	0,38
	2	19	0,0	0,028	0,094	0,014	0,15	0,15	0,61	0,60
	3	23	1,0	0,021	0,070	0,013	0,17	0,14	0,70	0,66
	4	24	1,0	0,050	0,119	0,021	0,13	0,14	0,77	0,76
	5	27	1,0	0,063	0,110	0,017	0,11	0,15	0,80	0,84
	6	35	1,8	0,062	0,130	0,023	0,14	0,18	0,96	0,81
GcR-K1 Keimung	0	38	1,8	0,015	0,150	0,023	0,11	0,14	0,27	0,23
	1	52	2,0	0,022	0,146	0,017	0,10	0,11	0,29	0,32
	2	33	1,9	0,022	0,104	0,014	0,15	0,16	0,35	0,33
	3	46	1,8	0,019	0,113	0,014	0,18	0,07	0,37	0,42
	4	40	2,0	0,020	0,078	0,009	0,10	0,09	0,55	0,48
	5	40	1,7	0,013	0,059	0,007	0,13	0,09	0,49	0,44
	6	40	2,1	0,042	0,130	0,016	0,11	0,10	0,62	0,61
GcG-K1 Keimung	0	39	1,8	0,010	0,064	0,011	0,12	0,15	0,22	0,28
	1	40	1,8	0,007	0,047	0,004	0,12	0,11	0,26	0,27
	2	44	1,8	0,013	0,052	0,006	0,14	0,09	0,33	0,28
	3	38	1,5	0,025	0,093	0,010	0,13	0,09	0,36	0,33
	4	42	2,0	0,020	0,067	0,010	0,08	0,12	0,35	0,42
	5	42	1,9	0,018	0,046	0,004	0,12	0,09	0,55	0,56
	6	41	2,1	0,022	0,052	0,008	0,15	0,12	0,53	0,61

Probenbezeichnung	Tag	Theobromin	Coffein	Putrescin	Spermidin	Spermin	Aspartyl-endoprotease a	Aspartyl-endoprotease b	Carboxy-peptidase a	Carboxy-peptidase b
		[mg/g ffTM]					[µkat/g ffTM]			
GcA-K3 Keimung	0	42	1,8	0,009	0,073	0,013	0,12	0,17	0,33	0,33
	1	40	1,8	0,010	0,113	0,014	0,12	0,17	0,29	0,27
	2	42	2,2	0,011	0,050	0,004	0,16	0,14	0,41	0,41
	3	41	2,0	0,024	0,129	0,014	0,14	0,15	0,56	0,52
	4	42	2,6	0,034	0,104	0,010	0,09	0,16	0,59	0,55
	5	44	2,5	0,027	0,043	0,004	0,11	0,12	0,87	0,82
	6	44	3,1	0,031	0,042	0,004	0,11	0,10	0,93	0,81
GcA-K5 Keimung	0	39	1,8	0,001	0,019	0,001	0,13	0,09	0,41	0,41
	2	42	1,7	0,006	0,031	0,003	0,12	0,12	0,55	0,50
	4	41	1,8	0,016	0,032	0,001	0,14	0,13	0,74	0,83
GcA-K6 Keimung	0	35	1,5	0,001	0,051	0,008	0,18	0,25	0,33	0,33
	1	36	1,6	0,005	0,035	0,007	0,08	0,14	0,47	0,37
	2	35	1,6	0,012	0,038	0,004	0,16	0,19	0,24	0,60
	3	36	2,0	0,011	0,052	0,008	0,15	0,18	0,33	0,43
	4	33	1,5	0,036	0,049	0,010	0,12	0,16	0,26	0,38
SNK 13-F1 Inkubation	0	55	4,1	0,006	0,060	0,017				
	1	33	1,9	0,003	0,068	0,020				
	2	21	1,3	0,007	0,090	0,025				
	3	36	1,3	0,005	0,060	0,015				
	4	27	1,3	0,004	0,064	0,017				
ICS 40-F1 Inkubation	0	23	4,8	0,011	0,038	0,007				
	1	15	1,6	0,015	0,021	0,004				
	2	14	1,0	0,011	0,063	0,012				
	3	21	2,7	0,012	0,083	0,023				
	4	8	1,1	0,010	0,057	0,010				
T 79/501-F1 Inkubation	0	20	1,0	0,019	0,057	0,006				
	1	25	2,0	0,012	0,072	0,011				
	2	23	1,0	0,011	0,047	0,006				
	3	14	0,9	0,016	0,071	0,012				
	4	23	1,1	0,016	0,058	0,009				
GcM-F Inkubation	0	30	0,0	0,003	0,107	0,032				
	1	24	0,0	0,004	0,103	0,024				
	2	19	0,0	0,006	0,079	0,019				
	3	15	0,0	0,006	0,078	0,021				
	4	12	0,0	0,005	0,043	0,014				

Probenbezeichnung	Tag	Theobromin	Coffein	Putrescin	Spermidin	Spermin	Aspartyl-endoprotease a	Aspartyl-endoprotease b	Carboxy-peptidase a	Carboxy-peptidase b
		[mg/g ffTM]					[µkat/g ffTM]			
GcR-F1 Inkubation	0	27	0,0	0,004	0,052	0,009	0,17	0,13	0,32	0,31
	1	23	0,0	0,003	0,014	0,004	0,10	0,14	0,30	0,31
	2	25	0,0	0,007	0,066	0,011	0,06	0,07	0,17	0,17
	3	37	1,8	0,003	0,035	0,005	0,00	0,00	0,03	0,04
	4	28	1,1	0,011	0,065	0,012	0,07	0,03	0,00	0,00
GcG-F1 Inkubation	0	37	1,1	0,004	0,022	0,003	0,23	0,24	0,39	0,37
	1	35	1,0	0,005	0,057	0,009	0,23	0,24	0,35	0,40
	2	40	2,0	0,006	0,062	0,010	0,22	0,21	0,27	0,24
	3	33	1,5	0,009	0,073	0,010	0,17	0,19	0,04	0,04
	4	28	1,7	0,007	0,062	0,011	0,10	0,11	0,02	0,01
GcA-F3 Inkubation	0	37	2,1	0,003	0,036	0,006	0,31	0,32	0,42	0,35
	1	35	1,3	0,002	0,054	0,011	0,29	0,29	0,32	0,34
	2	32	1,3	0,002	0,045	0,008	0,27	0,25	0,33	0,30
	3	35	2,6	0,004	0,049	0,009	0,27	0,15	0,15	0,15
	4	26	1,3	0,004	0,047	0,014	0,11	0,05	0,01	0,02
GcA-F5 Inkubation	0	23	0,0	0,006	0,060	0,011	0,09	0,09	0,34	0,36
	1	28	0,0	0,005	0,075	0,013	0,14	0,13	0,39	0,39
	2	35	0,0	0,003	0,073	0,016	0,10	0,29	0,26	0,28
	3	38	4,0	0,002	0,042	0,007	0,19	0,10	0,20	0,22
GcA-F6 Inkubation	0	38	2,2	0,001	0,035	0,005	0,13	0,16	0,32	0,37
	2	39	2,4	0,001	0,018	0,004	0,06	0,12	0,35	0,31
	4	34	3,3	0,001	0,040	0,005	0,00	0,00	0,02	0,03
DomRep-I1 Inkubation	0						0,22	0,34	0,30	0,27
	1						0,18	0,27	0,26	0,23
	2						0,31	0,37	0,23	0,19
	3						0,12	0,21	0,00	0,02
	4						0,04	0,05	0,03	0,01
DomRep-I2 Inkubation	0						0,13	0,20	0,36	0,34
	1						0,20	0,23	0,31	0,30
	2						0,12	0,21	0,32	0,27
	3						0,16	0,17	0,04	0,02
	4						0,17	0,15	0,00	0,03
DomRep-I3 Inkubation	0						0,27	0,24	0,26	0,30
	1						0,23	0,26	0,28	0,28
	2						0,27	0,30	0,19	0,23
	3						0,11	0,18	0,01	0,03
	4						0,14	0,16	0,02	0,01

Tabelle 24: Einzelwerte der Proben: freie Aminosäuren

Probenbezeichnung	Tag	Gesamtgehalt freier Aminosäuren	Leucin	Alanin	Phenylalanin	Valin	Isoleucin	Tyrosin	Asparaginsäure	Glutaminsäure	Asparagin	Glutamin	Argini	Serin	Histidin	Glycin	Threonin	Methionin	Trptophan	Lysin	„hydrophobe“ Aminosäuren	„saure“ Aminosäuren	„andern“ Aminosäuren	GABA
		[mg/g ffTM]																						
Tri2-K Keimung	0	7,78	0,07	0,14	0,21	0,07	0,20	0,58	1,81	1,30	2,75	0,20	0,08	0,16	0,05	0,05	0,06	-	0,04	-	1,27	6,06	0,45	0,51
	1	7,20	0,04	0,14	0,05	-	0,13	0,43	2,00	1,38	2,21	0,20	0,05	0,16	0,29	0,06	0,06	-	0,04	-	0,79	5,78	0,66	0,27
	2	6,97	0,05	0,12	-	0,03	0,07	0,29	2,07	1,30	2,24	0,21	-	0,22	0,23	0,06	0,07	-	0,03	-	0,55	5,82	0,60	0,46
	3	6,23	0,06	0,11	0,05	0,05	0,04	0,13	1,99	1,13	1,99	0,17	-	0,21	0,19	0,04	0,06	-	0,02	-	0,43	5,28	0,53	0,53
	4	7,14	0,06	0,13	0,04	0,05	0,05	0,19	1,84	1,42	2,45	0,20	-	0,28	0,22	0,05	0,07	-	0,03	-	0,53	5,91	0,65	0,43
	5	6,52	0,07	0,14	0,06	0,06	0,05	0,13	1,83	1,44	1,86	0,18	0,07	0,23	0,26	0,05	0,07	-	0,03	-	0,52	5,30	0,70	0,48
Tri3-K Keimung	0	6,25	0,15	0,12	0,16	0,22	0,26	0,23	1,93	1,50	1,23	0,16	-	0,13	0,05	0,05	0,06	-	0,02	-	1,13	4,82	0,32	0,30
	1	5,15	0,12	0,12	0,06	0,13	0,22	0,15	1,67	1,05	0,55	-	0,09	0,22	0,65	0,06	0,08	-	0,03	-	0,80	3,27	1,13	0,51
	2	6,11	0,10	0,14	0,05	0,09	0,17	0,12	1,65	1,05	1,63	0,17	0,09	0,27	0,43	0,05	0,08	-	0,03	-	0,66	4,50	0,95	0,65
	3	7,95	0,17	0,26	0,07	0,17	0,18	0,16	1,82	1,22	2,48	0,18	0,18	0,42	0,39	0,08	0,13	-	0,03	-	1,03	5,70	1,23	0,73
	4	9,17	0,20	0,24	0,10	0,22	0,16	0,13	1,86	1,29	3,47	0,18	0,26	0,43	0,37	0,08	0,16	-	0,03	-	1,05	6,80	1,32	0,89
	5	10,4	0,28	0,35	0,17	0,33	0,24	0,19	1,81	1,62	3,46	0,23	0,38	0,71	0,38	0,10	0,19	-	0,03	-	1,55	7,12	1,80	0,89
Tri4-K Keimung	0	7,11	0,06	0,11	0,29	0,06	0,17	0,51	2,03	1,19	2,02	0,29	-	0,11	0,14	0,05	0,06	-	0,03	-	1,19	5,53	0,39	0,49
	3	7,37	0,07	0,15	0,05	0,06	0,06	0,13	1,99	1,13	2,21	0,22	0,08	0,26	0,41	0,05	0,08	-	-	-	0,51	5,56	0,89	0,75
	6	7,88	0,17	0,22	0,16	0,20	0,12	0,17	1,90	1,16	2,27	0,23	0,23	0,41	0,39	0,06	0,16	-	0,02	-	1,03	5,57	1,29	1,00
	8	7,37	0,15	0,23	0,24	0,22	0,13	0,21	1,85	0,78	2,20	0,20	0,22	0,36	0,30	0,06	0,18	-	0,02	-	1,19	5,02	1,16	1,19
	10	8,44	0,13	0,30	0,27	0,21	0,12	0,36	1,67	1,09	2,70	0,33	0,24	0,34	0,30	0,13	0,26	-	-	-	1,40	5,79	1,26	1,40
Tri5-K Keimung	0	19,6	0,06	0,56	0,11	0,09	0,06	0,40	2,56	2,33	9,61	0,73	1,09	0,26	1,53	0,11	0,14	-	0,04	-	1,29	15,2	3,18	0,28
	3	28,1	0,10	0,46	0,09	0,08	0,05	0,21	2,45	1,75	5,72	0,65	0,73	0,43	0,50	0,13	0,17	-	0,02	-	0,99	10,5	1,99	2,08
	6	14,1	0,30	0,36	0,32	0,32	0,20	0,31	0,81	3,56	3,36	0,56	0,66	0,43	2,56	0,12	0,26	-	0,03	-	1,81	8,29	4,06	2,05
	8	28,1	0,73	0,64	1,05	0,92	0,57	0,72	1,10	4,72	7,80	0,70	2,17	0,55	5,62	0,24	0,53	-	0,07	-	4,63	14,3	9,17	2,63
	10	25,6	0,65	0,62	0,87	0,78	0,47	0,72	0,88	4,57	5,21	1,01	2,12	0,45	6,53	0,23	0,46	-	0,07	-	4,11	11,6	9,85	4,83
Tri1-I Inkubation	0	4,74	0,05	0,09	0,21	0,04	0,12	0,34	1,36	0,79	1,35	0,19	-	0,08	0,06	0,03	0,03	-	0,03	-	0,85	3,69	0,23	0,35
	1	6,27	0,24	0,88	0,39	0,16	0,24	0,59	0,18	0,96	1,64	0,31	0,18	0,18	0,14	0,06	0,06	-	0,04	-	2,51	3,09	0,67	1,26
	2	11,8	1,45	1,19	1,61	0,70	0,60	1,07	0,19	0,55	1,89	0,52	0,55	0,42	0,48	0,24	0,25	-	0,18	0,39	6,62	3,15	2,12	2,12
	3	17,3	3,00	1,48	2,91	0,96	0,74	1,47	0,30	0,90	1,60	0,46	1,36	0,54	0,57	0,27	0,41	-	0,41	3,59	10,5	3,26	3,56	1,60
	4	19,2	3,37	1,48	3,30	1,07	0,80	1,65	0,37	1,03	1,52	0,44	1,89	0,62	0,57	0,29	0,42	-	0,43	4,91	11,6	3,36	4,23	1,22
Tri2-I Inkubation	0	4,76	0,09	0,10	0,18	0,13	0,19	0,23	1,28	1,25	0,97	0,11	-	0,12	0,07	0,03	0,04	-	0,02	-	0,92	3,61	0,29	0,54
	1	4,88	0,31	0,77	0,31	0,24	0,28	0,35	0,19	0,83	0,86	0,13	0,16	0,17	0,14	0,06	0,04	-	0,03	-	2,26	2,01	0,61	1,30
	2	12,0	1,83	1,29	1,90	0,96	0,75	1,01	0,22	0,52	1,09	0,27	0,63	0,39	0,49	0,22	0,31	-	0,17	0,48	7,73	2,09	2,21	1,74
	3	15,9	2,83	1,21	2,78	0,96	0,74	1,26	0,31	0,90	0,97	0,34	1,54	0,49	0,62	0,22	0,37	-	0,36	2,12	9,78	2,52	3,61	1,10
	4	12,4	2,22	0,78	2,19	0,74	0,57	1,07	0,30	0,79	0,63	0,13	1,50	0,38	0,45	0,15	0,27	-	0,27	1,17	7,57	1,85	3,02	0,48
Tri3-I Inkubation	0	7,63	0,08	0,26	0,24	0,07	0,20	0,58	0,74	2,09	2,61	0,20	0,13	0,19	0,09	0,05	0,05	-	0,04	-	1,43	5,64	0,56	0,76
	1	8,11	0,26	0,82	0,40	0,17	0,30	0,76	0,23	1,38	2,64	0,27	0,25	0,22	0,19	0,09	0,09	-	0,05	-	2,71	4,52	0,88	1,63
	2	13,3	1,34	1,33	1,48	0,66	0,56	1,14	0,27	0,80	2,84	0,39	0,66	0,51	0,61	0,25	0,35	-	0,14	-	6,52	4,30	2,52	2,61
	3	14,0	2,06	1,31	2,09	0,79	0,57	1,25	0,25	0,73	1,87	0,26	0,92	0,48	0,50	0,28	0,38	-	0,28	1,07	8,06	3,11	2,84	1,64

Probenbezeichnung	Tag	Gesamtgehalt freier Aminosäuren	Leucin	Alanin	Phenylalanin	Valin	Isoleucin	Tyrosin	Asparaginsäure	Glutaminsäure	Asparagin	Glutamin	Argini	Serin	Histidin	Glycin	Threonin	Methionin	Trptophan	Lysin	„hydrophobe“ Aminosäuren	„saure“ Aminosäuren	„andere“ Aminosäuren	GABA
		[mg/g ffTM]																						
Tri4-I Inkubation	0	9,26	0,09	0,17	0,26	0,08	0,24	0,62	1,95	2,01	2,96	0,26	0,14	0,20	0,11	0,06	0,06	-	0,04	-	1,47	7,17	0,61	0,52
	1	9,40	0,33	0,72	0,50	0,22	0,36	0,84	0,28	1,72	3,00	0,31	0,27	0,28	0,28	0,10	0,13	-	0,05	-	2,97	5,31	1,12	1,90
	2	18,7	2,82	1,47	2,94	0,97	0,73	1,58	0,34	1,11	2,41	0,43	1,42	0,62	0,65	0,32	0,54	-	0,38	2,33	10,5	4,29	3,93	2,22
	3	14,3	1,52	1,19	1,75	0,76	0,68	1,30	0,28	0,91	2,80	0,45	0,74	0,52	0,62	0,25	0,40	-	0,16	-	7,20	4,43	2,69	2,77
Tri5-I Inkubation	0	6,40	0,07	0,14	0,23	0,13	0,12	0,26	1,92	1,95	0,98	0,06	0,13	0,17	-	0,05	0,07	-	-	-	0,95	4,92	0,43	0,12
	1	10,6	1,38	0,84	1,53	0,97	0,66	0,90	0,27	0,50	1,33	0,36	0,55	0,52	-	0,22	0,32	0,20	0,09	-	6,28	2,45	1,91	2,76
	2	7,18	0,77	0,65	0,77	0,55	0,41	0,58	0,17	0,66	1,21	0,21	0,34	0,31	-	0,14	0,21	0,14	0,07	-	3,72	2,25	1,21	2,73
	3	19,2	2,61	1,48	3,03	1,75	1,17	1,64	0,51	1,08	1,88	0,65	1,17	0,98	-	0,39	0,61	-	0,31	-	11,6	4,11	3,45	2,79
Tri6-I Inkubation	0	4,93	0,11	0,09	0,19	0,16	0,12	0,16	1,26	1,81	0,80	0,03	0,05	0,09	-	0,03	0,04	-	-	-	0,84	3,90	0,20	0,29
	1	6,96	0,92	0,58	0,94	0,62	0,45	0,64	0,19	0,42	1,07	0,23	0,36	0,30	-	0,15	0,21	0,13	-	-	4,16	1,91	1,15	1,95
	2	13,8	1,95	1,05	2,27	1,21	0,83	1,29	0,34	0,69	1,29	0,51	0,85	0,62	-	0,26	0,48	-	0,20	-	8,60	2,83	2,41	1,90
	3	18,7	2,78	1,32	3,37	1,68	1,10	1,64	0,46	1,10	1,48	0,67	1,13	0,84	-	0,28	0,59	-	0,31	-	11,8	3,71	3,14	1,52
Tri1-K Keimun	0	11,4	0,27	0,40	0,39	0,38	0,30	0,51	3,62	2,62	1,82	0,35	0,11	0,44	-	0,06	0,15	-	0,09	-	2,24	8,40	0,85	0,27
	1	7,27	0,29	0,38	0,12	0,32	0,21	0,18	2,75	1,26	0,66	0,43	0,08	0,38	-	0,05	0,12	-	0,02	-	1,52	5,10	0,65	0,56
	2	7,40	0,19	0,26	0,07	0,27	0,15	0,16	2,48	1,87	0,68	0,72	0,06	0,32	-	0,05	0,12	-	-	-	1,10	5,76	0,55	0,40
	3	11,1	0,18	0,29	0,10	0,25	0,15	0,33	3,16	2,36	3,06	0,48	0,12	0,44	-	0,05	0,18	-	0,03	-	1,29	9,05	0,82	0,81
	4	7,00	0,08	0,15	0,06	0,14	0,08	0,09	2,04	1,87	2,04	0,26	-	0,19	-	0,04	0,08	-	-	-	0,60	6,21	0,32	0,14
SNK 64-K Keimung	0	6,39	0,04	0,11	0,32	0,04	0,11	0,55	1,65	1,26	1,24	0,12	-	0,06	0,37	-	0,11	-	0,21	0,26	1,17	4,26	0,76	0,08
	2	7,01	0,06	0,13	0,06	0,04	0,07	0,43	2,03	1,13	1,63	0,78	-	0,11	0,37	-	0,05	-	0,13	-	0,79	5,56	0,66	0,42
	4	7,67	0,08	0,17	0,07	0,09	0,04	0,13	2,17	1,26	2,57	0,52	-	0,13	0,31	0,02	0,07	-	0,08	-	0,58	6,52	0,61	0,64
	6	7,87	0,11	0,26	0,10	0,16	0,07	0,15	1,96	1,57	2,21	0,54	-	0,18	0,35	0,07	0,14	-	-	-	0,84	6,28	0,75	0,73
	8	7,27	0,13	0,28	0,18	0,20	0,10	0,24	1,75	1,30	1,62	0,66	-	0,23	0,27	0,03	0,16	-	0,11	-	1,13	5,33	0,80	0,94
	10	8,37	0,13	0,34	0,17	0,21	0,10	0,32	1,54	1,42	2,42	0,60	-	0,23	0,41	0,08	0,22	-	0,11	0,18	1,25	5,98	1,05	1,06
ICS 84-K Keimung	0	5,50	0,17	0,14	0,14	0,26	0,27	0,22	2,19	1,03	0,73	0,18	-	0,06	-	-	0,04	-	0,16	-	1,21	4,12	0,26	0,17
	2	6,21	0,16	0,19	0,05	0,20	0,21	0,18	1,79	1,16	1,14	0,75	-	0,08	-	0,02	0,07	-	0,20	-	0,99	4,84	0,37	0,56
	4	7,80	0,19	0,23	0,12	0,26	0,19	0,21	2,21	1,81	1,22	0,68	-	0,15	0,25	0,03	0,08	-	0,18	-	1,19	5,92	0,68	0,52
	6	9,50	0,21	0,34	0,18	0,40	0,21	0,19	2,56	2,06	1,34	1,06	-	0,23	0,33	0,09	0,18	-	0,12	0,18	1,53	7,02	0,95	0,73
	8	8,85	0,14	0,33	0,19	0,27	0,12	0,22	1,65	1,46	2,60	0,80	-	0,26	0,35	0,09	0,20	-	0,09	-	1,26	6,51	0,99	0,88
	10	8,39	0,17	0,35	0,24	0,28	0,12	0,36	1,59	2,00	1,38	0,73	-	0,26	0,45	0,10	0,23	-	0,14	-	1,51	5,70	1,18	0,81
SNK 13-K1 Keimung	0	3,68	0,12	0,09	0,24	0,17	0,23	0,28	1,10	0,59	0,59	-	-		0,08	-	0,12	-	-	0,03	1,13	2,28	0,27	-
	1	4,44	0,18	0,22	0,20	0,20	0,27	0,21	1,25	0,73	0,79	-	-	0,20	-	0,13	0,04	-	0,04	-	1,27	2,76	0,41	0,76
	2	4,82	0,16	0,21	0,16	0,16	0,25	0,25	1,32	0,58	1,30	-	-	0,18	-	0,13	0,07	-	0,04	-	1,20	3,20	0,42	0,67
	3	4,52	0,13	0,18	0,12	0,16	0,19	0,16	1,24	0,34	1,66	-	-	0,21	-	0,09	0,04	-	-	-	0,93	3,24	0,35	0,72
	4	4,81	0,19	0,49	0,14	0,18	0,21	0,21	0,41	1,30	1,12	-	-	0,34	-	0,12	0,06	-	0,03	-	1,42	2,83	0,55	0,94
	5	5,46	0,23	0,48	0,18	0,22	0,19	0,24	0,60	0,95	1,65	-	-	0,44	0,13	0,13	0,08	-	0,02	-	1,53	3,20	0,73	1,13
	6	6,06	0,27	0,81	0,25	0,32	0,25	0,32	0,51	0,79	1,71	-	-	0,54	-	0,15	0,10	-	0,04	-	2,22	3,01	0,83	1,61

Probenbezeichnung	Tag	Gesamtgehalt freier Aminosäuren	Leucin	Alanin	Phenylalanin	Valin	Isoleucin	Tyrosin	Asparaginsäure	Glutaminsäure	Asparagin	Glutamin	Argini	Serin	Histidin	Glycin	Threonin	Methionin	Trptophan	Lysin	„hydrophobe“ Aminosäuren	„saure“ Aminosäuren	„andere“ Aminosäuren	GABA
		[mg/g ffTM]																						
SNK 13-K2 Keimung	0	3,85	0,13	0,05	0,23	0,16	0,19	0,17	1,08	0,84	0,71	-	-	0,07	-	0,05	0,04	0,10	-	-	0,90	2,72	0,23	0,34
	1	4,40	0,22	0,15	0,19	0,23	0,27	0,18	1,14	0,72	0,73	-	-	0,12	0,16	0,05	0,07	0,20	-	-	1,22	2,59	0,60	0,84
	2	4,21	0,20	0,19	0,14	0,19	0,21	0,15	1,10	0,76	0,69	-	-	0,13	0,18	0,09	0,07	0,12	-	-	1,07	2,54	0,60	0,85
	3	5,11	0,26	0,21	0,16	0,25	0,30	0,23	1,25	0,82	0,95	-	-	0,18	0,17	0,08	0,08	0,17	-	-	1,42	3,02	0,68	0,79
	4	5,44	0,22	0,18	0,15	0,21	0,19	0,20	1,33	0,94	1,37	-	-	0,22	0,11	0,07	0,09	0,20	-	-	1,16	3,64	0,64	0,79
	5	4,73	0,24	0,27	0,11	0,22	0,22	0,13	1,13	0,64	1,20	-	-	0,26	-	0,04	0,08	0,27	-	-	1,12	2,97	0,64	1,03
	6	6,87	0,30	0,71	0,21	0,27	0,27	-	0,56	1,53	1,76	-	-	0,53	0,17	0,10	0,13	0,33	-	-	1,76	3,85	1,27	1,72
ICS 40-K1 Keimung	0	16,7	0,10	0,13	0,21	0,14	0,20	0,27	14,0	0,63	0,79	-	-	0,11	-	0,05	0,06	-	0,03	-	1,05	15,4	0,26	0,48
	1	14,4	0,13	0,22	0,10	0,16	0,19	0,20	11,3	0,74	1,06	-	-	0,19	-	0,02	0,05	-	0,03	-	1,01	13,1	0,29	0,52
	2	10,1	0,16	0,26	0,09	0,18	0,21	0,23	7,23	0,73	0,60	-	-	0,21	0,11	0,10	0,09	-	0,04	-	1,13	8,56	0,49	0,61
	3	14,6	0,15	0,20	0,10	0,17	0,20	0,19	11,3	0,85	1,11	-	-	0,21	-	0,09	0,07	-	0,04	-	1,01	13,2	0,41	0,46
	4	11,0	0,14	0,26	0,11	0,20	0,14	0,16	7,52	0,77	1,22	-	-	0,30	-	0,09	0,09	-	0,03	-	1,01	9,51	0,51	0,85
	5	10,8	0,15	0,31	0,12	0,18	0,15	0,18	7,32	0,90	1,04	-	-	0,27	-	0,09	0,08	-	0,04	-	1,10	9,25	0,48	0,89
	6	8,02	0,23	0,50	0,22	0,27	0,20	0,17	3,89	0,91	0,99	-	-	0,40	-	0,10	0,12	-	0,03	-	1,59	5,79	0,64	1,15
ICS 40-K2 Keimung	0	13,9	0,15	0,08	0,20	0,15	0,17	0,21	11,6	0,85	0,46	-	-	0,06	-	-	-	-	-	-	0,98	12,9	0,06	0,52
	1	14,9	0,24	0,20	0,20	0,22	0,27	0,28	11,4	0,68	0,56	-	-	0,12	0,13	-	0,04	0,58	-	-	1,41	12,7	0,80	1,07
	2	10,4	0,12	0,10	0,09	0,13	0,15	0,16	8,85	0,39	0,36	-	-	0,06	-	-	0,02	-	-	-	0,75	9,61	0,07	0,54
	3	12,3	0,17	0,19	0,17	0,19	0,22	0,25	9,46	0,77	0,82	-	-	0,11	-	-	0,03	-	0,03	-	1,19	11,0	0,15	1,00
	4	12,3	0,27	0,26	0,11	0,23	0,23	0,25	9,29	0,86	0,60	-	-	0,15	-	0,02	0,04	-	-	-	1,36	10,7	0,22	0,97
	5	12,6	0,30	0,43	0,14	0,29	0,22	-	9,30	0,84	0,81	-	-	0,19	-	0,02	0,06	-	-	-	1,38	10,9	0,28	1,32
	6	11,6	0,33	0,42	0,18	0,29	0,28	0,32	7,37	1,17	0,83	-	-	0,27	-	0,03	0,06	0,09	-	-	1,82	9,37	0,45	1,51
T 79/501-K1 Keimung	0	5,39	0,12	0,15	0,29	0,20	0,18	0,28	1,32	1,13	1,44	-	-	0,15	-	0,08	0,02	-	0,03	-	1,21	3,90	0,28	0,18
	1	4,98	0,14	0,26	0,19	0,17	0,17	0,24	1,50	0,60	1,31	-	-	0,24	-	0,08	0,04	-	0,03	-	1,18	3,41	0,39	0,44
	2	5,24	0,13	0,26	0,14	0,15	0,13	0,22	1,48	0,88	1,40	-	-	0,28	-	0,08	0,03	-	0,05	-	1,03	3,76	0,45	0,44
	3	5,08	0,17	0,40	0,12	0,18	0,14	0,17	0,88	0,86	1,52	-	-	0,44	-	0,09	0,05	-	0,04	-	1,19	3,26	0,62	0,83
	4	5,82	0,20	0,57	0,16	0,19	0,14	0,20	0,66	1,07	1,80	-	-	0,60	-	0,11	0,06	-	0,06	-	1,45	3,53	0,83	1,05
	5	5,81	0,20	0,47	0,15	0,20	0,13	0,18	1,27	0,81	1,78	-	-	0,51	-	0,03	0,03	-	0,04	-	1,33	3,86	0,61	0,88
	6	5,89	0,16	0,63	0,16	0,20	0,12	0,24	0,88	0,81	1,95	-	-	0,49	-	0,12	0,08	-	0,06	-	1,50	3,65	0,74	1,07
T 79/501-K2 Keimung	0	4,62	0,14	0,10	0,31	0,26	0,23	0,24	1,39	0,67	1,03	-	-	0,11	-	0,08	0,04	0,10	-	-	1,25	3,08	0,29	0,50
	1	4,88	0,23	0,26	0,23	0,22	0,24	0,23	1,43	0,74	0,81	-	-	0,17	0,11	0,04	0,05	0,19	-	-	1,41	2,98	0,49	0,84
	2	4,14	0,15	0,17	0,09	0,12	0,12	0,19	1,65	0,44	0,96	-	-	0,16	-	0,04	0,05	0,02	-	-	0,84	3,04	0,26	1,10
	3	5,79	0,27	0,46	0,20	0,23	0,19	0,20	0,75	1,41	1,49	-	-	0,50	-	0,02	0,05	0,12	-	-	1,45	3,65	0,69	1,29
	4	5,51	0,29	0,49	0,19	0,21	0,16	-	0,69	1,05	1,60	-	-	0,47	0,19	0,07	0,11	0,08	-	-	1,35	3,34	0,82	1,67
	5	5,60	0,24	0,37	0,17	0,23	0,15	-	0,92	0,87	2,00	-	-	0,48	-	0,04	0,09	0,03	-	-	1,16	3,79	0,65	1,57
	6	4,41	0,24	0,27	0,17	0,21	0,15	-	1,34	0,22	1,46	-	-	0,23	-	0,03	0,07	-	-	-	1,05	3,02	0,34	1,25

Probenbezeichnung	Tag	Gesamtgehalt freier Aminosäuren	Leucin	Alanin	Phenylalanin	Valin	Isoleucin	Tyrosin	Asparaginsäure	Glutaminsäure	Asparagin	Glutamin	Argini	Serin	Histidin	Glycin	Threonin	Methionin	Trptophan	Lysin	„hydrophobe“ Aminosäuren	„saure“ Aminosäuren	„andere“ Aminosäuren	GABA
		[mg/g ffTM]																						
GcM-K Keimung	0	6,39	0,15	0,11	0,27	0,20	0,23	0,24	2,32	1,00	1,32	-	-	0,16	0,14	0,17	0,09	-	0,05	-	1,21	4,64	0,54	0,26
	1	4,41	0,15	0,18	0,11	-	0,20	0,18	1,86	0,44	0,66	-	-	0,23	-	0,08	0,05	-	0,27	-	0,82	2,96	0,64	0,40
	2	5,36	0,09	0,19	0,09	0,14	0,15	0,10	1,79	0,22	2,09	-	-	0,33	-	0,03	0,02	-	0,16	-	0,70	4,11	0,55	0,70
	3	5,80	0,19	0,34	0,13	0,18	0,18	0,14	1,40	0,30	2,28	-	-	0,55	-	0,03	0,03	-	0,05	-	1,16	3,98	0,66	1,04
	4	5,03	0,14	0,18	0,11	0,14	0,08	0,08	1,39	0,28	2,29	-	-	0,28	-	0,02	0,02	-	0,02	-	0,72	3,96	0,35	0,37
	5	7,06	0,30	0,72	0,31	0,27	0,18	0,21	0,74	1,10	2,41	-	0,58	0,65	-	0,09	0,11	-	0,03	-	1,62	4,26	1,17	1,36
	6	6,89	0,26	-	0,28	0,25	0,19	0,24	0,69	1,13	2,46	-	0,66	0,54	-	0,08	0,10	-	0,03	-	1,21	4,27	1,41	1,34
GcR-K1 Keimung	0	4,31	0,14	-	0,21	0,14	0,20	0,25	1,36	0,97	0,75	-	0,07	0,09	-	0,05	0,04	-	0,04	-	0,94	3,08	0,29	0,25
	1	5,04	0,17	-	0,20	0,16	0,24	0,29	0,53	2,26	0,57	-	0,29	0,20	-	0,05	0,05	-	0,03	-	1,06	3,35	0,63	0,28
	2	5,20	0,16	-	0,18	0,15	0,23	0,25	1,05	1,53	1,12	-	0,19	0,23	-	0,04	0,04	-	0,04	-	0,97	3,70	0,53	0,34
	3	5,41	0,16	-	0,16	0,16	0,21	0,26	1,44	1,33	1,18	-	0,14	0,22	-	0,06	0,05	-	0,03	-	0,96	3,95	0,50	0,35
	4	5,72	0,16	0,24	0,17	0,17	0,21	0,20	1,45	1,00	1,72	-	-	0,26	-	0,06	0,05	-	0,02	-	1,16	4,17	0,39	0,48
	5	6,58	0,20	0,55	0,25	0,22	0,26	0,33	0,96	1,36	1,99	-	-	0,35	-	0,05	0,05	-	0,03	-	1,80	4,30	0,48	0,64
	6	6,80	0,25	0,69	0,21	0,25	0,22	0,25	0,72	1,97	1,57	-	-	0,46	-	0,07	0,09	-	0,05	-	1,87	4,26	0,67	0,76
GcR-K2 Keimung	0	4,09	0,16	0,14	0,22	0,15	0,23	0,23	1,66	0,71	0,59	-	-	0,08	-	0,02	0,04	0,03	-	-	1,00	2,96	0,14	0,49
	1	4,07	0,19	0,19	0,14	0,15	0,26	0,27	1,21	0,81	0,54	-	-	0,14	-	0,02	0,04	0,11	-	-	1,19	2,56	0,32	1,01
	2	5,54	0,22	0,37	0,13	0,18	0,28	0,30	1,52	0,98	1,18	-	-	0,25	-	0,02	0,04	0,08	-	-	1,47	3,68	0,38	0,97
	3	5,38	0,25	0,44	0,17	0,19	0,27	0,25	0,64	1,23	1,57	-	-	0,30	-	0,02	0,05	-	-	-	1,58	3,44	0,36	1,14
	5	6,97	0,36	0,54	0,22	0,34	0,29	-	1,05	1,01	2,49	-	-	0,53	-	0,03	0,11	-	-	-	1,75	4,55	0,67	1,56
	6	5,77	0,23	0,29	0,14	0,22	0,18	-	1,73	0,43	2,15	-	-	0,26	-	0,02	0,08	-	0,03	-	1,06	4,31	0,40	1,20
GcG-K1 Keimung	0	3,53	0,11	0,13	0,21	0,11	0,19	0,25	0,76	1,16	0,43	-	-	0,08	-	0,04	0,03	-	0,03	-	1,00	2,35	0,18	0,37
	1	3,39	0,14	0,15	0,14	0,12	0,22	0,20	1,02	0,71	0,42	-	-	0,13	-	0,04	0,04	-	0,04	-	0,99	2,16	0,25	0,39
	2	4,33	0,14	0,20	0,12	0,12	0,19	0,23	1,10	0,94	0,95	-	-	0,21	-	0,05	0,05	-	0,04	-	1,00	2,98	0,34	0,44
	3	4,46	0,12	0,32	0,09	0,12	0,17	0,17	1,04	0,95	1,12	-	-	0,24	-	0,05	0,05	-	0,04	-	0,99	3,11	0,37	0,31
	4	4,38	0,15	0,33	0,12	0,14	0,18	0,19	0,54	0,88	1,43	-	-	0,28	-	0,05	0,05	-	0,04	-	1,12	2,85	0,41	0,42
	5	5,67	0,18	0,49	0,14	0,17	0,20	0,23	0,71	1,14	1,88	-	-	0,35	-	0,06	0,06	-	0,05	-	1,42	3,73	0,52	0,55
	6	6,15	0,21	0,63	0,19	0,19	0,20	0,26	0,84	1,27	1,82	-	-	0,38	-	0,06	0,07	-	0,05	-	1,67	3,92	0,55	0,58
GcG-K2 Keimung	0	5,10	0,25	0,27	0,29	0,28	0,36	0,26	1,16	1,27	0,80	-	-	0,09	-	0,02	0,06	-	-	-	1,71	3,23	0,16	1,07
	1	4,30	0,23	0,16	0,20	0,22	0,31	0,25	1,29	0,95	0,57	-	-	0,10	-	-	0,04	-	-	-	1,36	2,81	0,13	0,92
	2	4,62	0,26	0,19	0,10	0,21	0,31	0,21	1,40	0,93	0,75	-	-	0,20	-	0,02	0,05	-	-	-	1,27	3,08	0,27	0,91
	3	4,56	0,25	0,46	0,12	0,21	0,29	-	0,93	1,06	0,98	-	-	0,19	-	0,02	0,06	-	-	-	1,33	2,96	0,27	0,77
	4	5,78	0,36	0,64	0,19	0,30	0,35	-	0,56	1,46	1,11	-	-	0,31	-	0,02	0,07	0,39	-	-	1,85	3,13	0,80	1,17
	5	5,09	0,30	0,64	0,15	0,25	0,27	-	0,58	1,14	1,13	-	-	0,26	-	0,02	0,07	0,26	-	-	1,62	2,85	0,62	1,18
	6	5,34	0,31	0,63	0,18	0,27	0,25	-	0,68	0,95	1,20	-	-	0,37	-	0,02	0,08	0,40	-	-	1,64	2,83	0,88	1,30

Probenbezeichnung	Tag	Gesamtgehalt freier Aminosäuren	Leucin	Alanin	Phenylalanin	Valin	Isoleucin	Tyrosin	Asparaginsäure	Glutaminsäure	Asparagin	Glutamin	Argini	Serin	Histidin	Glycin	Threonin	Methionin	Trptophan	Lysin	„hydrophobe“ Aminosäuren	„saure“ Aminosäuren	„andere“ Aminosäuren	GABA
		[mg/g ffTM]																						
GcA-K3 Keimung	0	3,14	0,09	0,07	0,20	0,10	0,17	0,23	1,24	0,43	0,44	-	-	0,07	-	0,04	0,03	-	0,03	-	0,86	2,12	0,16	0,19
	1	3,29	0,15	0,23	0,17	0,11	0,21	0,26	0,82	0,75	0,35	-	-	0,12	-	0,04	0,04	-	0,04	-	1,13	1,92	0,24	0,30
	2	4,17	0,18	0,26	0,13	0,14	0,24	0,26	1,17	0,74	0,68	-	-	0,21	-	0,05	0,05	-	0,04	-	1,22	2,60	0,35	0,31
	3	5,71	0,23	0,54	0,18	0,20	0,26	0,32	0,57	1,40	1,47	-	-	0,40	-	0,04	0,05	-	0,06	-	1,73	3,43	0,54	0,61
	4	5,14	0,25	0,59	0,17	0,22	0,26	0,26	0,57	0,87	1,38	-	-	0,43	-	0,04	0,06	-	0,05	-	1,75	2,81	0,59	0,61
	5	3,22	0,14	0,38	0,09	0,12	0,12	0,11	0,39	0,58	0,96	-	-	0,24	-	0,02	0,03	-	0,02	-	0,97	1,93	0,32	0,27
	6	3,56	0,14	0,55	0,11	0,14	0,11	0,13	0,38	0,80	0,96	-	-	0,20	-	0,01	0,02	-	0,02	-	1,17	2,13	0,26	0,28
GcA-K4 Keimung	0	4,45	0,14	0,10	0,27	0,13	0,22	0,33	1,32	1,00	0,62	-	-	0,08	-	-	-	0,31	-	-	1,13	2,94	0,38	0,42
	1	4,50	0,17	0,14	0,20	0,12	0,22	0,27	1,47	0,83	0,61	-	-	0,12	-	-	0,02	0,33	-	-	1,11	2,91	0,47	0,83
	2	4,77	0,22	0,40	0,21	0,16	0,24	0,31	0,68	1,35	0,75	-	-	0,21	-	0,02	0,03	0,34	-	-	1,38	2,79	0,60	0,87
	3	5,37	0,26	0,35	0,15	0,20	0,22	0,22	0,84	1,38	1,01	-	-	0,28	-	0,02	0,05	0,32	0,34	-	1,30	3,23	0,85	0,72
	4	5,91	0,29	0,58	0,15	0,22	0,23	-	0,74	1,29	1,69	-	-	0,33	-	0,02	0,06	0,32	-	-	1,46	3,73	0,72	1,08
	5	5,85	0,24	0,55	0,13	0,19	0,19	-	1,03	0,95	1,89	-	-	0,27	-	0,02	0,05	0,36	-	-	1,30	3,86	0,69	0,90
	6	6,02	0,26	0,47	0,16	0,24	0,16	-	1,12	0,70	2,09	-	-	0,37	-	0,05	0,10	0,28	-	-	1,30	3,91	0,80	1,55
GcA-K5 Keimung	0	6,51	0,12	0,07	0,30	0,15	0,24	0,51	1,74	2,26	0,86	-	-	0,12	-	0,08	0,02	-	0,04	-	1,39	4,86	0,26	0,00
	2	5,50	0,05	0,11	0,04	0,05	0,13	0,17	2,35	1,26	0,90	-	-	0,22	-	0,12	0,05	-	0,05	-	0,55	4,51	0,44	0,21
	4	7,26	0,10	0,18	0,06	0,12	0,10	0,10	1,98	2,07	2,08	-	-	0,32	-	0,07	0,04	-	0,04	-	0,65	6,14	0,47	0,21
GcA-K6 Keimung	0	6,59	0,13	0,07	0,26	0,16	0,27	0,44	2,55	1,56	0,88	-	-	0,12	-	0,09	0,02	-	0,03	-	1,33	4,99	0,27	0,00
	1	5,64	0,05	0,10	0,06	0,05	0,17	0,30	2,09	2,09	0,41	-	-	0,17	-	0,08	0,02	-	0,05	-	0,73	4,59	0,32	0,00
	2	5,97	0,06	0,10	0,04	0,06	0,12	0,06	2,10	1,95	1,13	-	-	0,20	-	0,08	0,03	-	0,03	-	0,45	5,18	0,35	0,19
	3	7,19	0,05	0,08	0,04	0,06	0,10	0,08	2,14	2,26	2,02	-	-	0,22	-	0,08	0,03	-	0,03	-	0,41	6,42	0,36	0,08
	4	8,24	0,05	0,11	0,04	0,05	0,13	0,17	2,48	2,68	2,08	-	-	0,22	-	0,12	0,05	-	0,05	0,33	0,55	7,25	0,45	0,22
C1-K Keimung	0	3,49	0,12	0,19	0,12	0,14	0,17	0,11	0,76	0,80	0,88	-	-	0,12	-	0,03	0,03	-	0,02	-	0,85	2,44	0,20	0,25
	1	2,94	0,11	0,15	0,09	0,14	0,15	0,09	0,73	0,76	0,53	-	-	0,11	-	0,03	0,03	-	0,01	-	0,74	2,02	0,18	0,29
	2	3,41	0,13	0,17	0,09	0,15	0,13	0,11	0,95	0,58	0,87	-	-	0,15	-	0,02	0,03	-	0,02	-	0,78	2,41	0,22	0,28
	3	6,16	0,29	0,56	0,20	0,29	0,27	0,24	0,77	1,78	1,24	-	-	0,34	-	0,06	0,07	-	0,04	-	1,86	3,79	0,51	0,59
	4	6,34	0,28	0,48	0,17	0,27	0,30	0,23	0,98	1,27	1,77	-	-	0,42	-	0,07	0,08	-	0,04	-	1,72	4,01	0,61	0,62
	5	6,00	0,21	0,57	0,12	0,23	0,17	0,16	1,04	0,93	2,03	-	-	0,43	-	0,05	0,05	-	0,02	-	1,46	4,00	0,55	0,71
SNK 13-F2 Inkubation	0	5,00	0,20	0,53	0,25	0,25	0,25	0,39	0,18	1,13	0,71	0,23	0,00	0,14	0,14	0,15	0,13	0,33	0,00	0,00	1,87	2,25	0,88	1,42
	1	5,86	0,36	0,44	0,37	0,38	0,35	0,44	0,21	1,10	0,57	0,22	0,00	0,18	0,21	0,15	0,19	0,44	0,03	0,21	2,33	2,11	1,42	1,70
	2	7,13	0,66	0,28	0,71	0,57	0,49	0,46	0,18	0,65	0,84	0,28	0,00	0,31	0,43	0,21	0,36	0,36	0,02	0,33	3,16	1,94	2,02	2,57
	3	14,8	1,79	0,95	1,79	1,11	0,85	1,03	0,32	0,83	1,28	0,36	0,00	0,59	0,83	0,34	0,69	0,69	0,18	1,25	7,52	2,79	4,56	2,66
	4	18,9	2,64	1,15	2,28	1,13	0,82	1,32	0,37	0,94	1,01	0,29	0,00	0,69	0,56	0,32	0,94	1,05	0,47	2,93	9,35	2,61	6,95	2,14

Probenbezeichnung	Tag	Gesamtgehalt freier Aminosäuren	Leucin	Alanin	Phenylalanin	Valin	Isoleucin	Tyrosin	Asparaginsäure	Glutaminsäure	Asparagin	Glutamin	Argini	Serin	Histidin	Glycin	Threonin	Methionin	Trptophan	Lysin	„hydrophobe“ Aminosäuren	„saure“ Aminosäuren	„andere“ Aminosäuren	GABA
		[mg/g ffTM]																						
ICS 40-F2 Inkubation	0	4,69	0,20	0,46	0,25	0,21	0,20	0,43	0,16	1,03	0,47	0,17	0,00	0,12	0,14	0,13	0,13	0,29	0,02	0,27	1,76	1,83	1,11	1,70
	1	5,70	0,39	0,53	0,44	0,37	0,31	0,52	0,15	0,98	0,55	0,19	0,00	0,20	0,15	0,10	0,19	0,37	0,04	0,21	2,56	1,88	1,26	2,21
	2	6,60	0,62	0,32	0,68	0,53	0,44	0,51	0,23	0,47	0,70	0,20	0,00	0,32	0,31	0,18	0,37	0,40	0,06	0,26	3,11	1,60	1,89	2,29
	3	13,3	1,75	0,86	1,67	1,10	0,77	0,93	0,35	0,74	1,00	0,25	0,00	0,59	0,62	0,29	0,68	0,71	0,24	0,76	7,08	2,34	3,89	2,36
	4	14,1	2,01	0,91	1,74	0,83	0,60	0,98	0,32	0,85	0,91	0,12	0,00	0,48	0,66	0,20	0,76	0,84	0,27	1,63	7,08	2,19	4,84	1,66
T 79/501-F2 Inkubation	0	4,72	0,17	0,48	0,27	0,18	0,16	0,11	0,15	1,30	0,85	0,30	0,00	0,13	0,14	0,15	0,10	0,19	0,02	0,00	1,37	2,61	0,74	1,06
	1	5,90	0,42	0,41	0,46	0,40	0,32	0,44	0,13	1,17	0,66	0,35	0,00	0,18	0,24	0,20	0,21	0,28	0,03	0,00	2,45	2,31	1,14	1,84
	2	7,70	0,75	0,37	0,80	0,62	0,47	0,56	0,20	0,47	0,94	0,32	0,00	0,36	0,40	0,22	0,38	0,38	0,05	0,40	3,58	1,93	2,19	1,86
	3	14,3	1,89	0,86	1,92	1,15	0,82	0,95	0,32	0,79	1,22	0,37	0,00	0,63	0,51	0,36	0,71	0,74	0,33	0,81	7,59	2,71	4,09	2,55
	4	20,2	3,45	1,50	2,78	1,41	0,54	-	0,45	1,11	1,39	0,28	-	0,82	0,33	0,32	0,63	0,94	0,52	3,77	9,68	3,23	7,34	2,52
GcR-F1 Inkubation	0	4,30	0,18	0,69	0,26	0,23	0,25	0,39	0,18	1,18	0,50	-	-	0,13	-	0,22	0,05	-	0,03	-	2,01	1,86	0,43	0,69
	1	3,27	0,23	0,37	0,30	0,25	0,25	0,40	0,08	0,39	0,40	-	-	0,15	-	0,26	0,15	-	0,03	-	1,80	0,87	0,59	1,39
	2	9,43	1,23	0,58	1,23	0,81	0,68	0,81	0,25	0,57	0,86	-	-	0,46	0,70	0,39	0,42	-	0,12	0,33	5,33	1,67	2,43	2,14
	3	10,2	1,56	0,81	1,49	0,82	0,66	0,90	0,24	0,57	0,82	-	-	0,49	0,46	0,35	0,29	-	0,23	0,55	6,23	1,63	2,37	1,60
	4	14,4	2,25	1,12	1,97	0,94	0,77	1,35	0,33	0,98	0,93	-	-	0,58	0,81	0,43	0,44	-	0,34	1,23	8,40	2,24	3,83	1,68
GcR-F2 Inkubation	0	5,35	0,25	0,82	0,28	0,28	0,32	-	0,18	1,31	0,96	0,18	-	0,12	0,10	0,11	0,09	0,35	-	-	1,94	2,64	0,77	1,01
	1	5,15	0,38	0,65	0,41	0,35	0,36	-	0,14	0,85	0,83	0,18	-	0,18	0,16	0,12	0,13	0,42	0,02	-	2,14	1,99	1,01	2,04
	2	10,9	1,46	0,82	1,40	1,09	0,89	-	0,29	0,97	1,05	0,20	-	0,50	0,40	0,23	0,42	0,63	0,17	0,43	5,66	2,50	2,78	2,73
	3	14,6	2,28	1,20	2,22	1,24	0,96	-	0,31	1,08	1,15	0,25	-	0,62	0,27	0,30	0,54	0,91	0,38	0,95	7,91	2,79	3,98	2,49
	4	20,8	3,56	1,56	3,05	1,36	1,04	-	0,41	1,38	1,27	0,30	-	0,79	0,34	0,38	0,63	1,36	0,64	2,79	10,5	3,37	6,92	2,09
GcG-F1 Inkubation	0	4,17	0,17	0,73	0,28	0,19	0,22	0,41	0,14	1,10	0,57	-	-	0,12	-	0,19	0,04	-	0,03	-	2,00	1,80	0,37	0,71
	1	4,20	0,34	0,43	0,45	0,32	0,33	0,50	0,14	0,43	0,59	-	-	0,22	-	0,27	0,16	-	0,04	-	2,36	1,17	0,67	1,47
	2	7,75	0,97	0,46	1,05	0,70	0,60	0,77	0,21	0,54	0,80	-	-	0,42	0,57	0,31	0,31	-	0,10	-	4,55	1,55	1,65	1,81
	3	13,7	2,05	1,01	1,99	1,07	0,85	1,16	0,37	0,98	1,00	-	-	0,61	0,86	0,37	0,45	-	0,21	0,73	8,13	2,34	3,24	1,63
	4	12,5	2,18	0,92	1,86	0,83	0,71	1,20	0,30	0,86	0,72	-	-	0,51	0,64	0,20	0,23	-	0,27	1,17	7,69	1,88	3,01	1,25
GcG-F2 Inkubation	0	4,75	0,24	0,80	0,32	0,26	0,32	-	0,13	1,15	0,45	0,21	-	0,10	0,10	0,11	0,09	0,44	-	-	1,95	1,95	0,85	1,03
	1	4,88	0,49	0,56	0,52	0,42	0,44	-	0,11	0,48	0,47	0,22	-	0,19	0,16	0,16	0,20	0,44	0,02	-	2,44	1,28	1,16	2,33
	2	8,53	1,16	0,40	1,15	0,84	0,74	0,71	0,19	0,64	0,82	-	-	0,36	0,29	0,19	0,31	0,57	0,16	-	5,00	1,65	1,88	3,07
	3	14,9	2,26	0,96	2,16	1,20	0,97	1,11	0,31	0,99	1,04	-	-	0,62	0,44	0,31	0,48	0,83	0,40	0,89	8,66	2,34	3,98	2,51
	4	17,4	2,97	1,03	2,43	1,13	0,93	1,15	0,35	1,07	0,93	-	-	0,64	0,65	0,27	0,47	1,03	0,49	1,91	9,63	2,35	5,45	1,90
GcA-F3 Inkubation	0	3,77	0,15	0,56	0,23	0,16	0,22	0,38	0,11	1,27	0,36	-	-	0,11	-	0,15	0,03	-	0,03	-	1,71	1,74	0,32	0,50
	1	4,53	0,47	0,36	0,47	0,38	0,40	0,49	0,11	0,33	0,52	-	-	0,24	0,30	0,23	0,18	-	0,06	-	2,56	0,96	1,00	1,55
	2	8,67	1,08	0,51	1,17	0,79	0,65	0,83	0,24	0,55	0,88	-	-	0,47	0,72	0,35	0,37	-	0,10	-	5,04	1,67	1,97	2,13
	3	14,5	2,17	1,04	2,11	1,22	0,98	1,16	0,37	0,81	1,14	-	-	0,72	0,66	0,44	0,52	-	0,35	0,88	8,68	2,32	3,57	2,14
	4	13,3	2,49	1,05	2,17	0,95	0,79	1,35	0,38	1,12	0,82	-	-	0,58	0,78	0,32	0,41	-	0,40	1,76	8,81	2,32	4,25	1,40

Probenbezeichnung	Tag	Gesamtgehalt freier Aminosäuren	Leucin	Alanin	Phenylalanin	Valin	Isoleucin	Tyrosin	Asparaginsäure	Glutaminsäure	Asparagin	Glutamin	Argini	Serin	Histidin	Glycin	Threonin	Methionin	Trptophan	Lysin	„hydrophobe“ Aminosäuren	„saure“ Aminosäuren	„andere“ Aminosäuren	GABA
		[mg/g ffTM]																						
GcA-F4 Inkubation	0	4,30	0,18	0,56	0,28	0,16	0,23	0,26	0,12	1,32	0,46	0,18	-	0,10	-	0,08	0,06	0,31	0,04	-	1,67	2,07	0,56	0,75
	1	5,02	0,47	0,43	0,52	0,41	0,42	0,52	0,10	0,37	0,48	0,15	-	0,19	0,25	0,15	0,17	0,38	-	-	2,77	1,11	1,15	2,53
	2	9,18	1,16	0,45	1,29	0,86	0,72	0,75	0,22	0,66	0,87	-	-	0,43	0,40	0,19	0,30	0,57	0,15	0,30	5,24	1,76	2,19	2,78
	3	15,7	2,33	0,93	2,42	1,28	0,99	1,11	0,36	1,08	1,14	-	-	0,67	0,69	0,32	0,51	0,82	0,36	0,74	9,06	2,58	4,10	2,58
	4	16,7	2,75	0,99	2,55	1,09	0,84	1,14	0,34	1,01	0,97	-	-	0,62	0,71	0,25	0,45	1,02	0,45	1,57	9,36	2,32	5,07	1,80
GcA-F5 Inkubation	0	3,72	0,07	0,06	0,14	0,10	0,20	0,19	1,44	0,78	0,54	-	-	0,07	-	0,07	0,02	-	0,03	-	0,76	2,77	0,19	0,09
	1	4,27	0,25	0,60	0,31	0,24	0,26	0,36	0,16	0,71	0,79	-	-	0,20	0,15	0,15	0,07	-	0,04	-	2,01	1,66	0,60	0,94
	2	8,72	0,97	0,61	1,03	0,63	0,65	0,65	0,20	0,35	1,58	-	-	0,41	0,60	0,29	0,30	-	0,09	0,37	4,54	2,13	2,06	1,67
	3	11,4	1,82	0,83	1,81	0,92	0,83	0,99	0,25	0,63	1,02	-	-	0,52	0,33	0,20	0,15	-	0,29	0,87	7,19	1,89	2,36	1,66
GcA-F6 Inkubation	0	5,79	0,13	0,12	0,28	0,14	0,25	0,59	1,83	1,21	0,97	-	-	0,14	-	0,09	0,02	-	0,03	-	1,51	4,01	0,27	0,00
	2	7,38	0,69	0,88	0,81	0,45	0,53	0,76	0,20	0,58	1,18	-	-	0,42	0,39	0,18	0,11	-	0,06	0,15	4,12	1,96	1,30	1,52
	4	13,6	2,17	1,15	2,14	0,90	0,73	1,31	0,30	0,49	1,12	-	-	0,60	0,53	0,30	0,30	-	0,40	1,22	8,40	1,91	3,35	1,54
C1-F Inkubation	0	8,58	0,31	1,38	0,32	0,47	0,35	0,41	0,54	2,78	1,47	-	-	0,35	-	0,09	0,07	-	0,04	-	3,24	4,79	0,55	1,46
	1	5,86	0,52	0,82	0,43	0,53	0,52	0,41	0,27	0,51	1,08	-	-	0,30	0,16	0,15	0,11	-	0,05	-	3,23	1,86	0,76	1,44
	2	8,60	0,88	0,64	0,83	0,71	0,69	0,63	0,27	1,18	1,24	-	-	0,45	0,38	0,26	0,22	-	0,10	0,23	4,38	2,69	1,53	1,87
	3	14,2	2,01	1,03	1,96	1,18	1,03	1,01	0,39	1,43	1,35	-	-	0,67	0,44	0,31	0,35	-	0,33	0,72	8,22	3,17	2,81	1,79
	4	18,2	2,63	1,62	2,36	1,24	1,02	1,47	0,61	1,68	1,76	-	-	0,81	0,56	0,32	0,42	-	0,48	2,12	9,53	4,05	4,71	2,32

Tabelle 25: Einzelwerte der Proben: Aminosäuren nach Hydrolyse der Oligopeptide

Probenbezeichnung	Tag	Gesamtgehalt freier Aminosäuren	Leucin	Alanin	Phenylalanin	Valin	Isoleucin	Tyrosin	Asparaginsäure	Glutaminsäure	Asparagin	Glutamin	Arginin	Serin	Histidin	Glycin	Threonin	Metheonin	Trptophan	Lysin	„hydrophobe“ Aminosäuren	„saure“ Aminosäuren	„andere“ Aminosäuren
		[mg/g AcTP]																					
SNK 13-K1 Keimung	0	18,61	1,56	1,03	0,88	1,66	0,65	0,97	3,31	2,83	-	0,12	-	2,65	-	1,39	1,20	0,23	0,13	-	6,74	6,26	5,61
	1	16,14	1,50	0,92	0,88	1,14	0,63	0,82	3,14	2,63	-	0,08	-	1,80	-	1,14	1,29	-	0,17	-	5,89	5,85	4,40
	2	15,20	1,38	0,84	0,85	1,10	0,61	0,60	3,07	2,55	-	0,07	-	1,71	-	1,05	1,24	-	0,15	-	5,37	5,68	4,15
	3	21,62	1,97	1,14	1,12	1,55	0,94	0,80	4,94	3,38	-	0,12	-	2,47	-	1,44	1,54	-	0,20	-	7,52	8,45	5,66
	4	19,18	1,83	1,03	1,02	1,43	0,86	0,97	3,73	3,24	-	0,12	-	2,15	-	1,29	1,31	-	0,20	-	7,14	7,09	4,95
	5	26,87	2,63	1,45	1,45	2,09	1,24	1,31	5,55	3,79	-	0,16	-	3,27	-	1,84	1,91	-	0,17	-	10,1	9,50	7,19
	6	17,54	1,68	0,88	0,97	1,40	0,83	0,84	3,98	2,62	-	0,05	-	1,79	-	1,13	1,15	-	0,22	-	6,61	6,65	4,28
ICS 40-K1 Keimung	0	20,40	1,95	1,03	1,07	1,61	0,98	0,93	4,61	2,94	-	0,11	-	2,24	-	1,30	1,41	-	0,21	-	7,57	7,66	5,17
	1	25,18	2,38	1,34	1,37	1,91	1,17	1,16	5,45	3,55	-	0,12	-	2,96	-	1,66	1,80	-	0,29	-	9,34	9,13	6,71
	2	26,50	2,55	1,35	1,42	2,15	1,25	1,19	5,94	3,67	-	0,07	-	3,04	-	1,78	1,80	-	0,29	-	9,91	9,68	6,91
	3	19,78	1,88	1,08	1,06	1,39	0,81	0,96	4,49	2,79	-	0,10	-	2,43	-	1,19	1,39	-	0,22	-	7,17	7,38	5,22
	4	33,20	2,77	1,67	1,65	2,03	1,26	1,44	7,17	4,32	-	0,17	-	3,81	0,14	2,13	2,17	0,32	0,38	1,76	10,8	11,6	8,96
	5	34,58	2,86	1,77	1,70	2,23	1,37	1,46	7,31	4,95	-	0,21	-	3,79	0,17	2,14	2,33	-	0,37	1,91	11,3	12,4	8,81
	6	26,16	2,23	1,40	1,30	1,71	1,03	1,58	5,55	3,49	-	0,08	-	2,81	0,14	1,84	1,66	0,20	0,31	0,83	9,24	9,13	6,96
T 79/501-K1 Keimung	0	33,28	2,74	1,66	1,57	2,11	1,33	1,40	7,05	5,24	-	0,21	-	3,65	0,14	2,23	2,15	-	0,31	1,47	10,8	12,5	8,50
	1	34,52	2,62	1,84	1,48	2,21	1,31	0,85	6,94	5,09	-	0,16	-	4,06	0,18	2,35	2,54	0,30	0,27	2,32	10,3	12,1	9,70
	2	26,71	0,36	-	0,09	0,15	0,72	1,41	7,07	5,28	-	0,26	-	3,87	0,17	2,25	2,17	-	0,30	2,61	2,74	12,6	8,76
	3	35,51	2,70	1,62	1,67	2,36	1,41	1,31	7,33	4,89	-	0,17	-	4,21	0,24	2,25	2,25	0,35	0,31	2,43	11,0	12,3	9,61
	4	34,86	2,76	1,74	1,71	2,42	1,48	0,86	7,19	4,75	-	0,23	-	4,22	0,22	2,27	2,24	0,41	0,24	2,13	10,9	12,1	9,58
	5	58,26	4,22	2,71	2,63	3,50	5,56	1,20	11,5	7,65	-	0,39	-	6,24	0,27	3,27	3,36	-	0,46	5,23	19,8	19,6	13,6
	6	77,71	5,47	3,65	3,14	3,83	6,10	2,28	13,9	8,39	-	0,44	-	9,00	0,35	4,71	4,94	-	0,64	10,8	24,4	22,7	19,6
GcM-K Keimung	0	24,18	1,89	1,15	1,11	1,30	2,24	1,03	5,42	4,38	-	0,29	-	2,25	0,14	1,35	1,40	-	0,24	-	8,71	10,0	5,38
	1	22,90	1,76	1,07	1,05	1,24	1,41	1,06	5,05	4,72	-	0,13	-	2,00	0,12	1,32	1,27	0,53	0,20	-	7,57	9,89	5,44
	2	11,42	0,98	0,55	0,63	0,75	0,46	0,49	2,61	2,48	-	0,07	-	0,94	0,00	0,65	0,67	-	0,14	-	3,86	5,15	2,40
	3	14,66	1,19	0,72	0,78	0,95	0,60	0,61	3,21	2,98	-	0,05	-	1,32	0,12	0,88	0,86	0,23	0,16	-	4,86	6,24	3,56
	4	22,02	1,70	1,03	0,98	1,46	0,84	0,74	5,53	3,40	-	-	-	2,90	-	1,57	1,68	-	0,18	-	6,76	8,93	6,33
	5	15,03	1,34	0,83	0,91	1,14	0,72	0,53	3,10	2,66	-	0,09	-	1,51	0,09	0,92	1,00	-	0,18	-	5,48	5,85	3,70
	6	14,98	1,13	0,78	0,79	1,04	0,74	0,41	3,65	2,62	-	0,09	-	1,49	0,10	0,95	1,00	-	0,17	-	4,90	6,36	3,72
GcR-K1 Keimung	0	11,18	1,01	0,62	0,62	0,77	0,52	0,51	2,82	2,05	-	0,05	-	1,06	-	0,27	0,76	-	0,12	-	4,04	4,93	2,21
	1	15,17	1,26	0,82	0,82	1,09	0,78	0,47	3,27	2,61	-	0,06	-	1,61	0,08	1,06	1,10	-	0,14	-	5,25	5,94	3,98
	2	11,21	0,87	0,60	0,58	0,71	0,50	0,56	2,63	1,84	-	-	-	1,21	0,06	0,75	0,78	-	0,12	-	3,82	4,47	2,93
	3	13,52	1,08	0,65	0,72	0,91	0,63	0,61	3,25	2,10	-	0,06	-	1,29	0,08	0,77	0,83	0,42	0,12	-	4,60	5,41	3,51
	4	8,49	0,97	0,47	0,56	0,73	0,42	0,50	2,16	1,33	-	-	-	0,51	-	0,35	0,39	-	0,11	-	3,64	3,49	1,37
	5	14,21	1,49	0,75	0,83	1,18	0,69	-	3,64	1,74	-	-	-	1,67	0,07	0,94	1,08	-	0,14	-	4,94	5,38	3,89
	6	13,87	1,51	0,68	0,83	1,22	0,74	-	3,61	1,61	-	-	-	1,61	-	0,87	1,05	-	0,15	-	4,98	5,22	3,67

Probenbezeichnung	Tag	Gesamtgehalt freier Aminosäuren	Leucin	Alanin	Phenylalanin	Valin	Isoleucin	Tyrosin	Asparaginsäure	Glutaminsäure	Asparagin	Glutamin	Arginin	Serin	Histidin	Glycin	Threonin	Metheonin	Trptophan	Lysin	„hydrophobe“ Aminosäuren	„saure“ Aminosäuren	„andere“ Aminosäuren
		[mg/g AcTP]																					
GcG-K1 Keimung	0	10,40	1,03	0,56	0,62	0,85	0,47	0,57	2,16	1,83	-	0,01	-	0,95	-	0,57	0,66	-	0,12	-	4,10	4,00	2,30
	1	12,55	1,22	0,66	0,73	0,98	0,57	0,65	2,84	2,09	-	-	-	1,19	0,05	0,68	0,77	-	0,13	-	4,80	4,93	2,82
	2	15,81	1,36	0,85	0,97	1,20	0,80	0,82	3,13	2,95	-	0,03	-	1,54	0,09	0,88	1,00	-	0,20	-	6,01	6,11	3,69
	3	11,46	1,12	0,62	0,69	0,93	0,50	0,56	2,63	1,72	-	-	-	1,05	-	0,77	0,73	-	0,12	-	4,43	4,35	2,67
	4	5,86	0,59	0,31	0,35	0,48	0,20	0,21	1,59	0,77	-	-	-	0,50	-	0,39	0,41	-	0,07	-	2,13	2,35	1,37
	5	13,87	1,29	0,69	0,77	1,09	0,56	-	3,48	1,75	-	-	-	1,35	0,06	0,89	0,94	-	0,13	0,85	4,41	5,23	3,37
	6	13,08	1,20	0,81	0,73	0,92	0,50	-	3,49	2,10	-	-	-	1,41	-	0,88	0,91	-	0,13	-	4,16	5,59	3,33
GcA-K3 Keimung	0	11,53	1,05	0,62	0,62	0,80	0,45	0,55	2,57	2,03	-	0,11	-	1,13	-	0,75	0,74	-	0,10	-	4,09	4,71	2,72
	1	19,83	1,71	1,08	1,05	1,33	0,76	0,62	3,90	3,22	-	0,12	-	1,89	0,12	1,32	1,29	-	0,20	1,24	6,54	7,24	4,81
	2	20,16	1,72	1,09	1,07	1,35	0,77	0,54	3,87	3,50	-	0,18	-	2,01	0,15	1,36	1,31	-	0,21	1,03	6,54	7,55	5,04
	3	20,47	1,64	1,14	1,00	1,36	0,79	0,84	4,11	3,39	-	0,23	-	2,10	0,15	1,32	1,33	-	0,19	0,88	6,76	7,74	5,08
	4	16,63	1,57	0,88	0,96	1,28	0,69	0,48	3,69	2,14	-	-	-	1,72	0,06	0,97	1,14	-	0,16	0,88	5,87	5,83	4,05
	5	14,86	1,47	0,83	0,89	1,20	0,75	-	3,84	2,17	-	-	-	1,57	-	0,89	1,07	-	0,16	-	5,14	6,02	3,69
	6	12,96	1,21	0,65	0,71	1,07	0,65	0,58	3,15	1,93	-	0,06	-	1,30	-	0,74	0,78	-	0,13	-	4,87	5,15	2,95
GcA-K5 Keimung	0	15,84	1,41	0,95	1,00	1,20	0,84	0,70	3,26	2,73	-	0,16	-	1,44	0,13	0,94	0,90	-	0,18	-	6,10	6,15	3,59
	2	14,94	1,49	0,94	0,99	1,28	0,76	0,74	2,83	2,42	-	0,11	-	1,40	0,11	0,85	0,86	-	0,17	-	6,19	5,36	3,39
	4	19,21	1,87	1,20	1,22	1,60	0,94	0,83	3,89	3,13	-	0,13	-	1,89	0,15	1,06	1,12	-	0,18	-	7,65	7,15	4,40
SNK 13-F1 Inkubation	0	145	0,18	0,05	0,09	0,12	0,06	0,04	0,48	0,18	-	-	-	0,12	-	0,02	0,09	-	0,03	-	0,55	0,66	0,25
	1	0,97	0,16	0,03	0,07	0,11	0,08	0,05	0,30	0,06	-	-	-	0,04	-	0,01	0,05	-	0,02	-	0,50	0,35	0,12
	2	6,47	0,42	0,37	0,29	0,35	0,20	0,31	1,58	1,39	-	-	-	0,49	-	0,47	0,48	-	0,10	-	1,94	2,97	1,56
	3	15,43	0,87	0,86	0,62	0,75	0,44	0,49	3,68	3,52	-	-	-	1,38	-	1,45	1,37	-	0,22	-	4,02	7,20	4,20
	4	1,43	0,12	0,05	0,07	0,12	0,05	0,08	0,44	0,31	-	-	-	0,07	-	0,03	0,04	-	0,05	-	0,49	0,75	0,19
ICS 40-F1 Inkubation	0	1,44	0,14	0,08	0,07	0,13	0,07	0,01	0,45	0,31	-	-	-	0,07	-	0,04	0,05	-	0,03	-	0,49	0,75	0,19
	1	1,75	0,19	0,09	0,11	0,17	0,10	0,04	0,46	0,28	-	-	-	0,11	-	0,08	0,11	-	0,02	-	0,69	0,74	0,32
	2	4,41	0,30	0,22	0,27	0,32	0,17	-	1,34	1,28	-	-	-	0,30	-	0,08	0,05	-	0,07	-	1,29	2,61	0,51
	3	14,08	1,45	0,72	0,83	1,21	0,71	0,35	3,13	2,05	-	-	-	1,48	-	0,95	1,08	-	0,13	-	5,27	5,18	3,64
	4	3,37	0,26	0,18	0,20	0,26	0,13	0,13	0,88	0,90	-	-	-	0,18	-	0,09	0,11	-	0,07	-	1,15	1,78	0,45
T 79/501-F1 Inkubation	0	3,05	0,17	0,12	0,12	0,17	0,10	0,03	1,06	0,87	-	-	-	0,15	-	0,10	0,11	-	0,06	-	0,70	1,92	0,42
	1	4,97	0,50	0,23	0,29	0,44	0,30	0,19	1,29	0,73	-	-	-	0,40	-	0,25	0,29	-	0,06	-	1,96	2,02	1,00
	2	20,84	2,02	1,14	1,12	1,73	1,03	0,89	4,32	2,58	-	-	-	2,70	-	1,52	1,58	-	0,21	-	7,93	6,91	6,00
	3	4,52	0,31	0,23	0,23	0,27	0,14	0,16	1,28	1,28	-	-	-	0,27	-	0,12	0,14	-	0,10	-	1,34	2,56	0,62
	4	4,69	0,36	0,26	0,24	0,32	0,16	0,23	1,39	1,17	-	-	-	0,28	-	0,10	0,12	-	0,07	-	1,57	2,55	0,57
GcM-F Inkubation	0	0,81	0,07	0,00	0,02	0,05	0,02	0,04	0,30	0,20	-	-	-	0,04	-	0,03	-	-	0,03	-	0,21	0,50	0,10
	1	1,77	0,16	0,10	0,12	0,16	0,08	0,13	0,40	0,33	-	-	-	0,10	-	0,06	0,07	-	0,06	-	0,75	0,73	0,30
	2	9,40	1,02	0,49	0,59	0,80	0,50	0,43	2,35	1,77	-	-	-	0,95	-	0,41	-0,03	-	0,12	-	3,83	4,12	1,45
	3	12,14	1,10	0,59	0,64	0,90	0,55	0,50	2,64	2,57	-	-	-	1,14	-	0,69	0,70	-	0,12	-	4,27	5,21	2,65
	4	0,79	0,07	0,04	0,07	0,05	0,03	0,04	0,21	0,19	-	-	-	0,03	-	0,01	0,01	-	0,02	-	0,30	0,40	0,08

Probenbezeichnung	Tag	Gesamtgehalt freier Aminosäuren	Leucin	Alanin	Phenylalanin	Valin	Isoleucin	Tyrosin	Asparaginsäure	Glutaminsäure	Asparagin	Glutamin	Arginin	Serin	Histidin	Glycin	Threonin	Metheonin	Trptophan	Lysin	„hydrophobe“ Aminosäuren	„saure“ Aminosäuren	„andere“ Aminosäuren
		[mg/g AcTP]																					
GcR-F1 Inkubation	0	3,17	0,37	0,17	0,21	0,31	0,19	0,18	0,70	0,42	-	-	-	0,25	-	0,15	0,19	-	0,04	-	1,42	1,12	0,64
	1	6,51	0,72	0,34	0,37	0,59	0,36	0,29	1,45	0,90	-	0,01	-	0,64	-	0,37	0,40	-	0,08	-	2,66	2,36	1,48
	2	5,54	0,36	0,32	0,23	0,34	0,21	0,24	1,32	1,68	-	0,06	-	0,40	-	0,20	0,10	-	0,07	-	1,71	3,06	0,77
	3	11,51	0,74	0,71	0,58	0,71	0,41	0,25	2,66	3,62	-	0,17	-	1,00	-	0,36	0,11	-	0,19	-	3,40	6,45	1,66
	4	21,03	1,29	1,30	0,99	1,20	0,68	0,88	4,62	5,77	-	0,24	-	1,92	-	1,00	0,85	-	0,30	-	6,33	10,6	4,06
GcG-F1 Inkubation	0	11,43	1,19	0,60	0,68	0,86	0,53	0,64	2,58	1,82	-	0,03	-	1,21	-	0,66	0,54	-	0,09	-	4,50	4,43	2,50
	1	13,55	1,36	0,75	0,79	1,03	0,64	0,67	3,05	2,14	-	0,06	-	1,49	-	0,79	0,66	-	0,13	-	5,23	5,26	3,07
	2	8,28	0,62	0,43	0,40	0,52	0,32	0,37	1,93	2,11	-	-	-	0,70	-	0,43	0,39	-	0,06	-	2,66	4,04	1,59
	3	11,72	0,59	0,64	0,53	0,73	0,38	0,36	2,74	3,96	-	-	-	0,98	-	0,43	0,27	-	0,12	-	3,23	6,70	1,80
	4	18,26	1,07	1,11	0,72	1,10	0,65	0,58	4,09	5,49	-	0,03	-	1,70	-	0,84	0,62	-	0,25	-	5,24	9,60	3,42
GcA-F3 Inkubation	0	5,62	0,60	0,30	0,35	0,46	0,29	0,31	1,25	0,93	-	-	-	0,46	-	0,30	0,30	-	0,07	-	2,31	2,17	1,13
	1	9,63	0,92	0,50	0,53	0,78	0,45	0,44	1,88	1,53	-	0,03	-	1,03	-	0,73	0,70	-	0,09	-	3,63	3,44	2,56
	2	7,43	0,58	0,41	0,40	0,51	0,32	0,34	1,70	1,85	-	-	-	0,69	-	0,34	0,20	-	0,08	-	2,56	3,55	1,31
	3	10,38	0,51	0,57	0,43	0,58	0,34	0,26	2,38	3,39	-	-	-	0,86	-	0,53	0,45	-	0,08	-	2,70	5,76	1,92
	4	14,81	0,79	0,87	0,60	0,95	0,54	0,37	3,32	4,23	-	0,07	-	1,36	-	0,77	0,78	-	0,17	-	4,12	7,62	3,07
GcA-F5 Inkubation	0	12,01	1,08	0,65	0,66	0,84	0,52	0,53	2,77	2,25	-	0,08	-	1,13	-	0,69	0,70	-	0,09	-	4,28	5,11	2,62
	1	11,61	1,08	0,60	0,66	0,89	0,53	0,57	2,75	1,84	-	0,08	-	1,14	-	0,65	0,73	-	0,10	-	4,33	4,67	2,61
	2	13,42	1,03	0,73	0,69	0,92	0,74	0,59	3,09	2,59	-	0,00	-	1,26	0,05	0,77	0,82	-	0,14	-	4,70	5,69	3,03
	3	14,50	0,84	0,72	0,47	0,43	0,43	-	3,32	3,93	-	-	-	0,90	0,08	0,41	0,50	-	2,48	-	2,90	7,24	4,36
GcA-F6 Inkubation	0	6,27	0,72	0,38	0,33	0,54	0,32	0,53	1,34	0,89	-	-	-	0,45	-	0,30	0,39	-	0,08	-	2,82	2,24	1,22
	2	19,52	1,86	1,09	1,13	1,50	0,94	1,18	3,93	3,12	-	0,10	-	1,84	0,11	1,24	1,15	-	0,22	0,10	7,70	7,16	4,56
	4	21,16	1,22	1,22	0,85	1,25	0,75	-	5,15	6,16	-	0,56	-	1,77	0,21	0,98	0,86	-	0,16	-	5,29	11,8	3,99

Tabelle 26: Wassergehalt in frischen Samen unterschiedlicher Kakao-Varietäten

	Samen 1	Samen 2	Samen 3	Samen 4	Samen 5
	[%]				
Trinidad 1	35,6	40,7	34,4	33,8	33,0
Trinidad 2	29,2	31,7	29,8	28,0	28,5
GcY1	27,7	31,2	31,6	35,1	31,3
GcY2	36,4	33,0	34,3	31,4	32,0
GcY4	38,8	37,8	35,8	36,9	36,3
GcL	53,1	55,6	54,5	55,0	54,6
ICS 84	32,6	34,1	32,2	32,1	32,3
SCA 6	47,1	47,3	47,5	46,3	42,5
SNK 10	49,5	43,9	48,5	47,9	46,5

Tabelle 27: Gewicht der Samen unterschiedlicher German Cocoa Früchte im Verlauf der Keimung.
Die Samen wurden mit (mT) bzw. ohne Testa (oT) bei 25°C zum Keimen ausgelegt. Angegeben sind die Mittelwerte aus den Verläufen der Gewichtszunahme von jeweils 5 Einzelsamen

	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 11
	[g]								
Trinidad 1 mT	2,36	2,26	2,10	2,10	2,15	2,18			
Trinidad 1 oT	1,56	1,88	2,05	2,09	2,17	2,27			
Trinidad 2 mT	2,05	2,03	1,92	1,93	2,01	2,08			
Trinidad 2 oT	1,51	1,77	1,87	1,94	1,98	2,05			
GcY3 mT	1,16	0,90	0,91	0,94	0,96	0,98	1,00	1,02	1,07
GcY3 oT	0,75	0,85	0,87	0,88	0,91	0,95	1,01		
ICS 84 mT	2,72	2,70	2,59	2,55	2,59	2,64	2,64	2,69	2,76
ICS 84 oT	2,25	2,40	2,49	2,60	2,68	2,79	2,89		
SCA 6 mT	2,09	1,86	1,70	1,75	1,81	1,86	1,91	1,98	2,19
SCA 6 oT	1,51	1,78	1,81	1,88	1,95	2,04	2,11		
GcY4 mT	1,52	1,46	1,44	1,46	1,48	1,52	1,53	1,56	1,77
GcY4 oT	1,13	1,30	1,36	1,39	1,42	1,48	1,54		

Tabelle 28: Frisch- und Trockengewichte unterschiedlicher Kakaosamen.
Angegeben sind die Mittelwerte von je 8 bis 12 Einzelsamen

	Frischgewicht	Trockengewicht	Wassergehalt
	[g]		[%]
ICS 40	3,43	2,28	33,5
SNK 13	1,88	1,37	27,3
T 79/501	1,11	0,86	22,3
GcA2	1,70	1,05	37,9
GcM		1,25	
GcR1		1,23	
GcG1		1,19	
Catongo	1,37		

Tabelle 29: PPO-Aktivität (im Sediment) einzelner Kakaosamen während Keimung und Inkubation. Die zur Messung verwendeten Samen wurden zerkleinert, in cyanidhaltigem SÖRENSEN-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Die PPO-Aktivität wurde sowohl in dem daraus resultierenden Sediment, als auch im Überstand gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2).

Probenbezeichnung			**Tag 0**	**Tag 1**	**Tag 2**	**Tag 3**	**Tag 4**	**Tag 5**	**Tag 6**	**Tag 8**	**Tag 10**
			[µkat/g Frischgewicht]								
Sca 6	Kotyledonen	Same 1	0,63		0,72		0,73		0,88	0,96	
		Same 2	0,63		0,34		0,30		0,47	0,38	
		Same 3	0,39		0,29		0,20		0,30	0,36	
Sca 6	Kotyledonen	Same 1	0,35		0,47		0,47		0,42	0,61	
		Same 2	0,34		0,58		0,21		0,43	0,40	
		Same 3	0,33		0,32						
Sca 6	Kotyledonen	Same 1	0,67	0,25	0,40	0,51	0,39	0,47			
		Same 2	0,41	0,35	0,26	0,39	0,19	0,41			
SNK 64	Kotyledonen	Same 1	0,40		0,50		0,72		0,94	0,45	0,74
		Same 2	0,35		0,50		0,62		0,93	0,40	0,72
ICS 84	Kotyledonen	Same 1	0,60		0,50		1,21		0,71	1,45	0,91
		Same 2	0,70		0,65		0,69		0,95	0,89	1,24
GcA-K5	Kotyledonen	Same 1	5,72		6,93		4,93				
		Same 2	6,71		6,93		4,12				
GcA-K6	Kotyledonen	Same 1	6,82	6,37	8,64	5,32	5,24				
		Same 2	5,78	4,77	3,74	7,79	5,31				
Sca 6	Sämlingsachse	Same 1	6,18		4,12		1,30		0,98	0,99	
		Same 2	3,50		3,36		2,06		1,18	0,59	
Sca 6	Sämlingsachse	Same 1	2,14	1,38	2,78	1,36	1,45	0,98			
		Same 2	2,68	3,23	1,69	1,62	0,91	0,94			
SNK 64	Sämlingsachse	Same 1	5,76		2,60		3,00		0,91	2,04	0,71
		Same 2	2,73		3,42		1,71		0,92	1,51	1,59
ICS 84	Sämlingsachse	Same 1	2,35		4,48		1,79		1,39	1,45	0,61
		Same 2	5,69		4,58		1,27		1,78	1,19	0,69
Tri1-I	Kotyledonen	Same 1	0,48	0,20	0,07	0,05	0,05				
		Same 2	0,52	0,29	0,06	0,06	0,06				
Tri2-I	Kotyledonen	Same 1	0,38	0,16	0,03	0,04	0,03				
		Same 2	0,15	0,30	0,04	0,05	0,03				
GcA-F5	Kotyledonen	Same 1	6,84	6,49	2,72	0,70					
		Same 2	5,18	7,28	3,29	0,78					

Tabelle 30: PPO-Aktivität (im Überstand) einzelner Kakaosamen während Keimung und Inkubation.
Die zur Messung verwendeten Samen wurden zerkleinert, in cyanidhaltigem SÖRENSEN-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Die PPO-Aktivität wurde sowohl in dem daraus resultierenden Sediment, als auch im Überstand gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2).

Probenbezeichnung			**Tag 0**	**Tag 1**	**Tag 2**	**Tag 3**	**Tag 4**	**Tag 5**	**Tag 6**	**Tag 8**	**Tag 10**
			[µkat/g Frischgewicht]								
Sca 6	Kotyledonen	Same 1	0,026		0,019		0,045		0,014	0,010	
		Same 2	0,008		0,030		0,005		0,016		0,008
		Same 3	0,024		0,014		0,003		0,009		0,005
Sca 6	Kotyledonen	Same 1	0,005		0,005		0,012		0,001	0,001	
		Same 2	0,009		0,008		0,007		0,002	0,004	
		Same 3	0,015		0,017						
Sca 6	Kotyledonen	Same 1	0,004	0,006	0,017	0,001	0,015	0,009			
		Same 2	0,003	0,018	0,017	0,003	0,027	0,001			
SNK 64	Kotyledonen	Same 1	0,010		0,005		0,004		0,029	0,014	0,008
		Same 2	0,005		0,008		0,005		0,013	0,003	0,007
ICS 84	Kotyledonen	Same 1	0,003		0,002		0,002		0,007	0,002	0,006
		Same 2	0,009		0,002		0,001		0,011	0,003	0,035
GcA-K5	Kotyledonen	Same 1	0,011		0,012		0,009				
		Same 2	0,039		0,004		0,010				
GcA-K6	Kotyledonen	Same 1	0,139	0,173	0,096	0,372	0,103				
		Same 2	0,098	0,284	0,951	0,394	0,126				
Sca 6	Radicula	Same 1	0,095		0,027		0,022		0,002	0,003	
		Same 2	0,059		0,027		0,024		0,034	0,007	
Sca 6	Radicula	Same 1	0,039	0,037	0,031	0,010	0,046	0,017			
		Same 2	0,044	0,045	0,079	0,003	0,053	0,014			
SNK 64	Radicula	Same 1	0,155		0,094		0,018		0,023	0,039	0,007
		Same 2	0,183		0,174		0,035		0,014	0,458	0,034
ICS 84	Radicula	Same 1	0,168		0,108		0,014		0,013	0,015	0,007
		Same 2	0,226		0,109		0,008		0,018	0,005	0,017
Tri1-I	Kotyledonen	Same 1	0,010	0,015	0,002	0,002	0,001				
		Same 2	0,008	0,005	0,000	0,002	0,002				
Tri2-I	Kotyledonen	Same 1	0,019	0,024	0,004	0,002	0,001				
		Same 2	0,027	0,060	0,002	0,002	0,004				
GcA-F5	Kotyledonen	Same 1	0,052	0,017	0,016	0,004					
		Same 2	0,024	0,036	0,005	0,003					

Tabelle 31: Aminosäuregehalte in Inkubationsmedien im Verlauf der Inkubationen.

	[mg/g Samen]				
	Tag 0	**Tag 1**	**Tag 2**	**Tag 3**	**Tag 4**
Medium Tri1-I	0	1,29	1,03	5,40	9,67
Medium Tri2-I	0	2,12	1,50	8,15	14,37
Medium Tri3-I	0	0,83	1,42	9,83	
Medium Tri4-I	0	1,76	4,11	16,19	

Tabelle 32: GABA-Gehalte in Inkubationsmedien im Verlauf der Inkubationen.

	[mg/g Samen]				
	Tag 0	**Tag 1**	**Tag 2**	**Tag 3**	**Tag 4**
Medium Tri1-I	0	0,10	0,14	0,67	1,00
Medium Tri2-I	0	0,17	0,19	0,79	1,38
Medium Tri3-I	0	0,23	0,41	1,97	
Medium Tri4-I	0	0,22	0,76	2,57	

Tabelle 33: Epicatechingehalte in Inkubationsmedien im Verlauf der Inkubationen.

	[mg/g Samen]				
	Tag 0	**Tag 1**	**Tag 2**	**Tag 3**	**Tag 4**
Medium Tri1-I	0	0	0,21	2,90	4,90
Medium Tri2-I	0	0	0,19	4,29	6,34
Medium Tri3-I	0	0	0	3,86	
Medium Tri4-I	0	0	0,74	4,54	

Charakterisierung einzelner Proteine mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970)

Keimung:

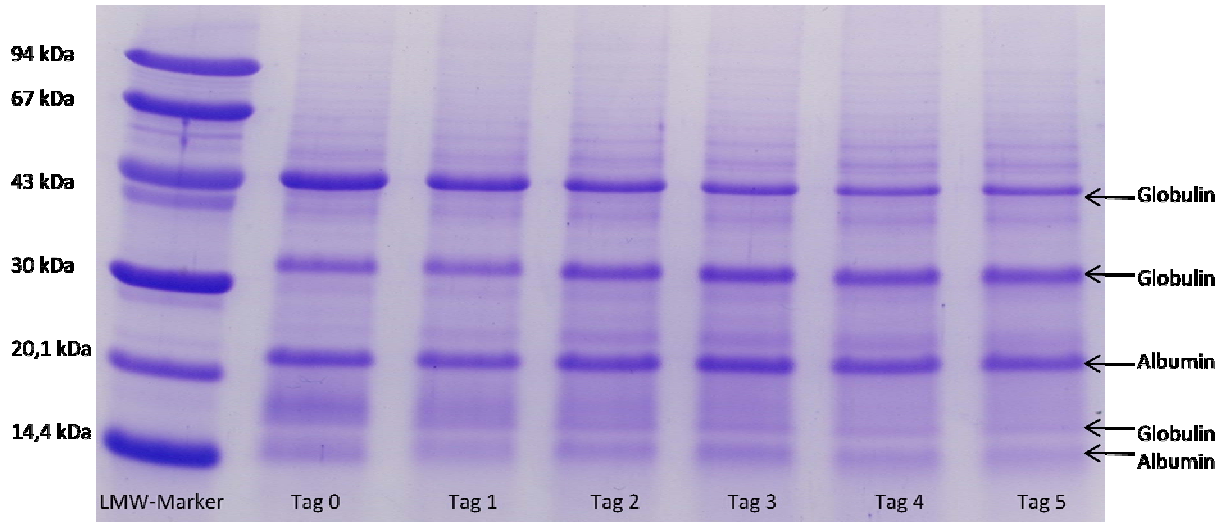


Abbildung 215: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 5-tägigen Keimung in den Samen einer Frucht aus Trinidad (Tri3-K) (DISC-SDS-PAGE).
Zur Auftrennung der Proteine wurde Acetontrockenpulver verwendet. Es wurden je 10 µl Probe aufgetragen, welche 0,04 mg Acetontrockenpulver in SDS-Puffer gelöst enthielten. Die Färbung der Proteine erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R 250 Färbelösung.

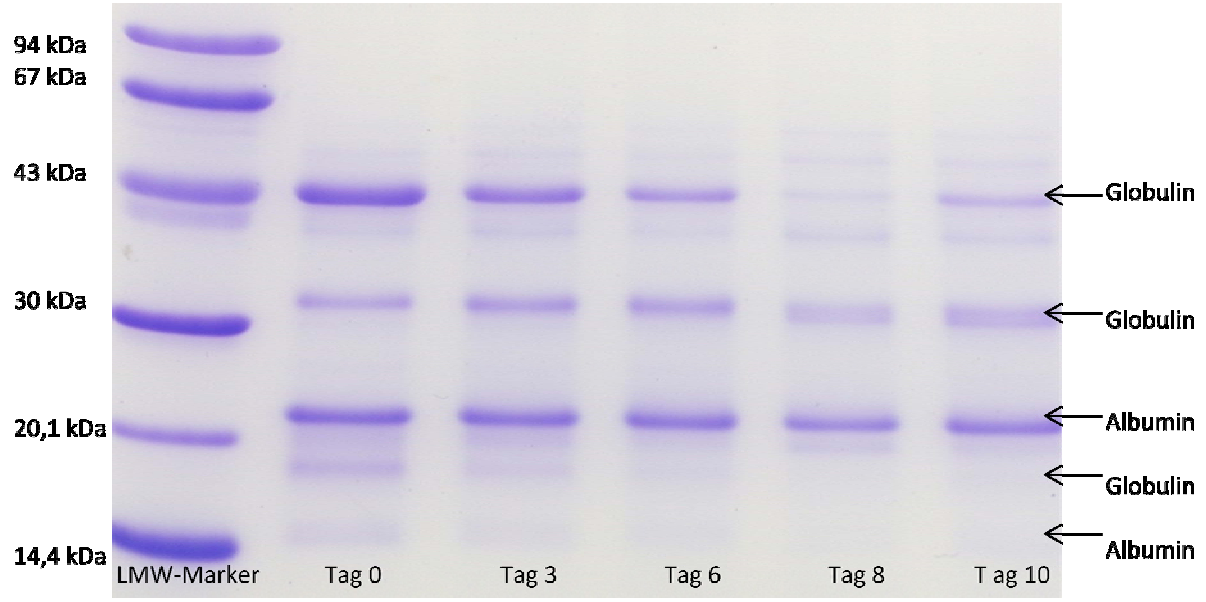


Abbildung 216: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 10-tägigen Keimung in den Samen einer Frucht aus Trinidad (Tri5-K) (DISC-SDS-PAGE).

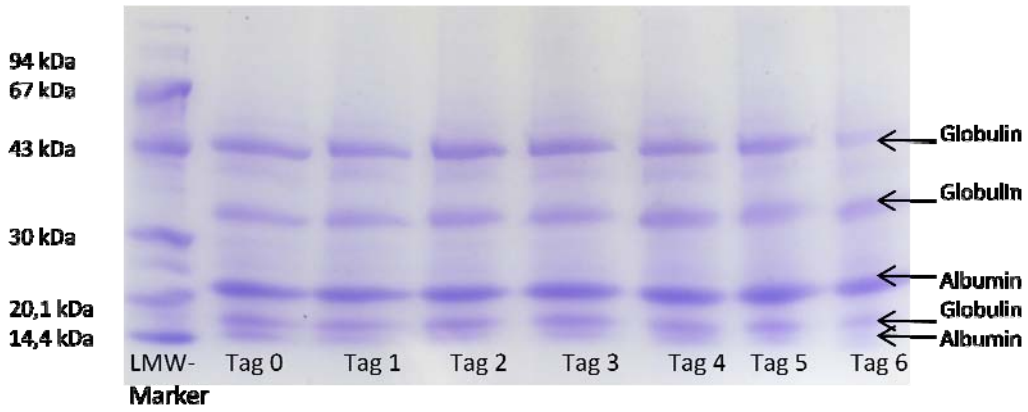


Abbildung 217: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 6-tägigen Keimung in den Samen des Genotypen SNK 13 (SNK13-K1) (DISC-SDS-PAGE).

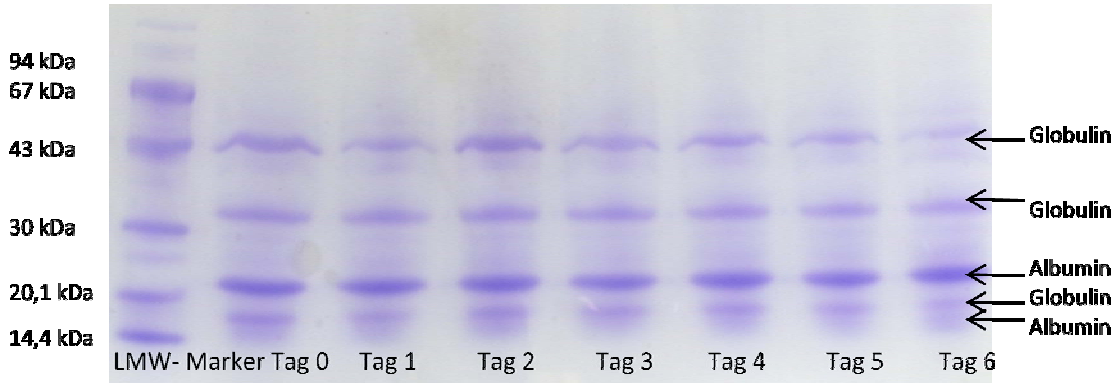


Abbildung 218: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 6-tägigen Keimung in den Samen des Genotypen ICS 40 (ICS40-K1) (DISC-SDS-PAGE).

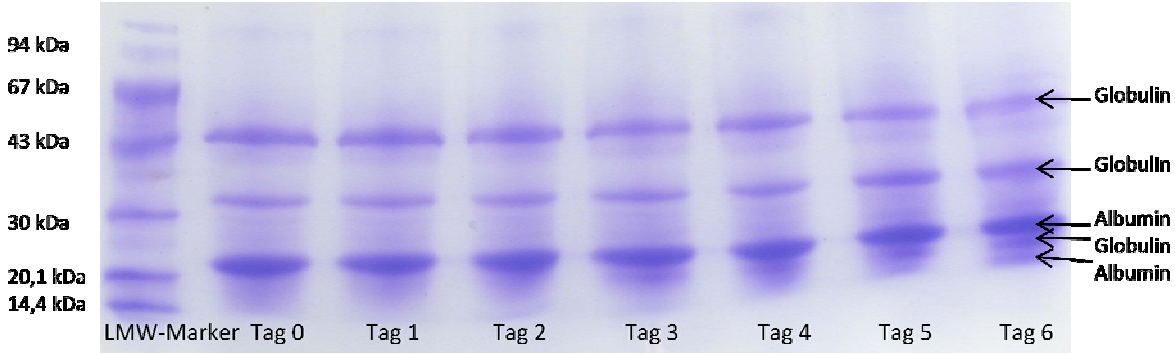


Abbildung 219: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 6-tägigen Keimung in den Samen des Genotypen T 79/501 (T79/501-K1) (DISC-SDS-PAGE).

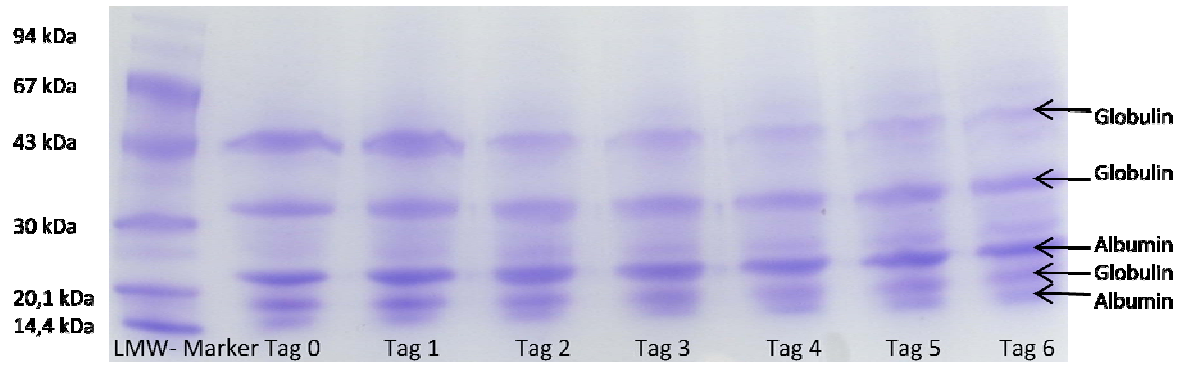


Abbildung 220: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 6-tägigen Keimung in den Samen einer German Cocoa Frucht (GcM-K) (DISC-SDS-PAGE).

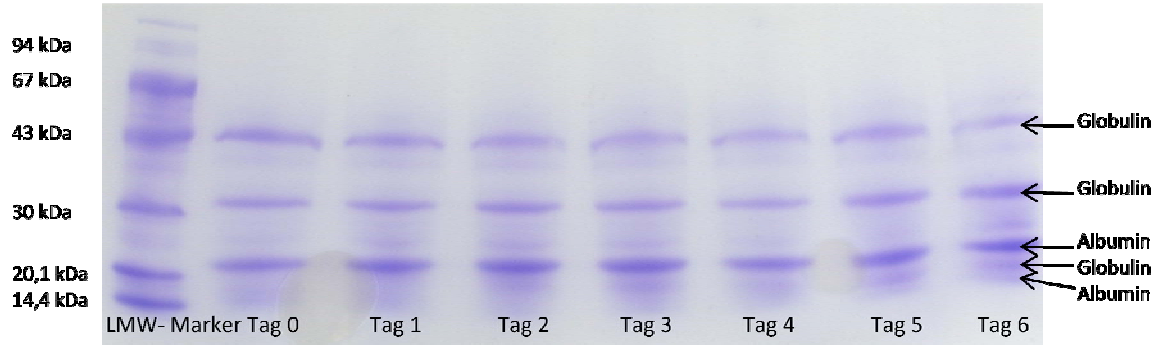


Abbildung 221: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 6-tägigen Keimung in den Samen einer German Cocoa Frucht (GcR-K1) (DISC-SDS-PAGE).

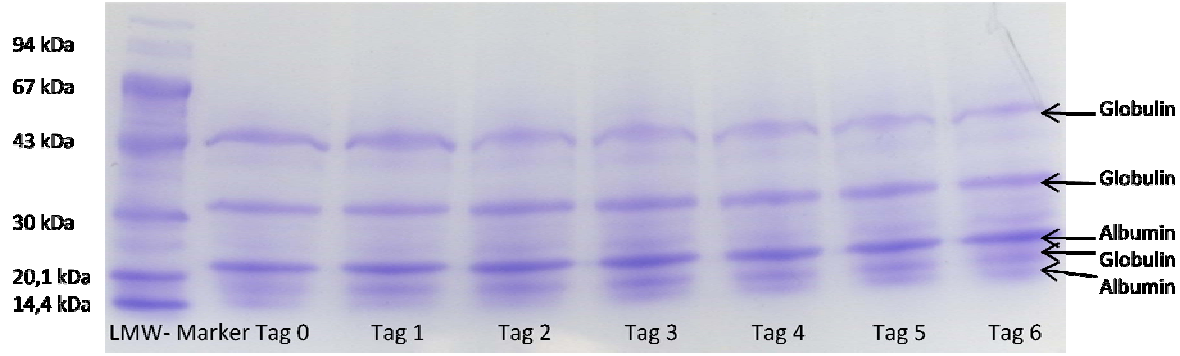


Abbildung 222: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 6-tägigen Keimung in den Samen einer German Cocoa Frucht (GcG-K1) (DISC-SDS-PAGE).

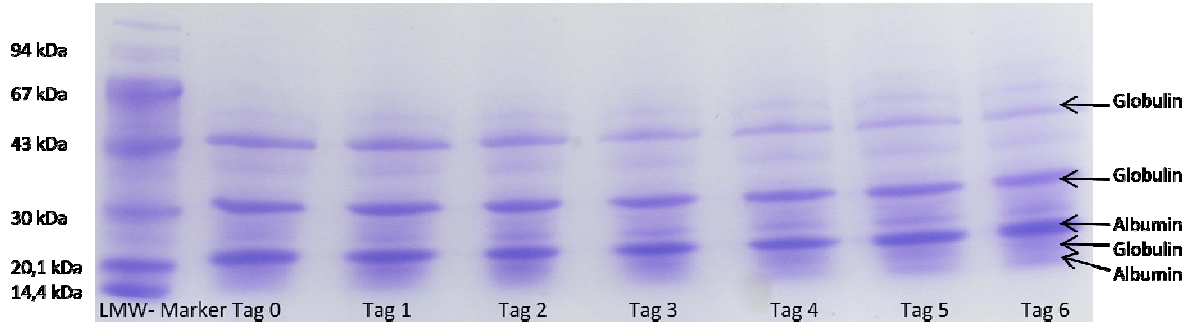


Abbildung 223: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 6-tägigen Keimung in den Samen einer German Cocoa Frucht (GcA-K3) (DISC-SDS-PAGE).

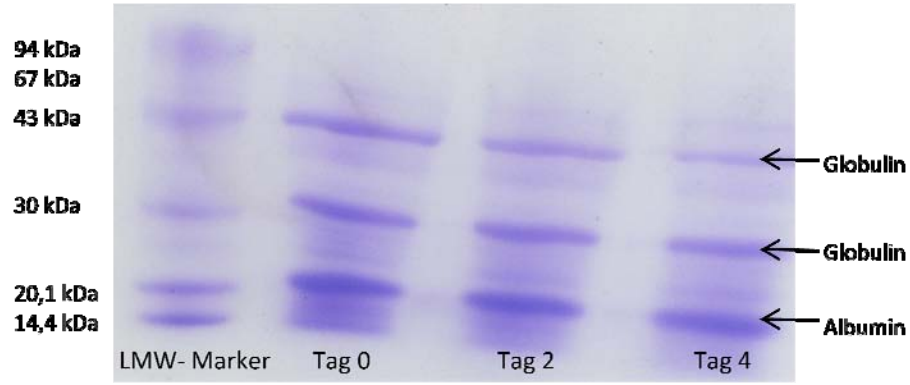


Abbildung 224: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 4-tägigen Keimung in den Samen einer German Cocoa Frucht (GcA-K5) (DISC-SDS-PAGE).

Inkubation:

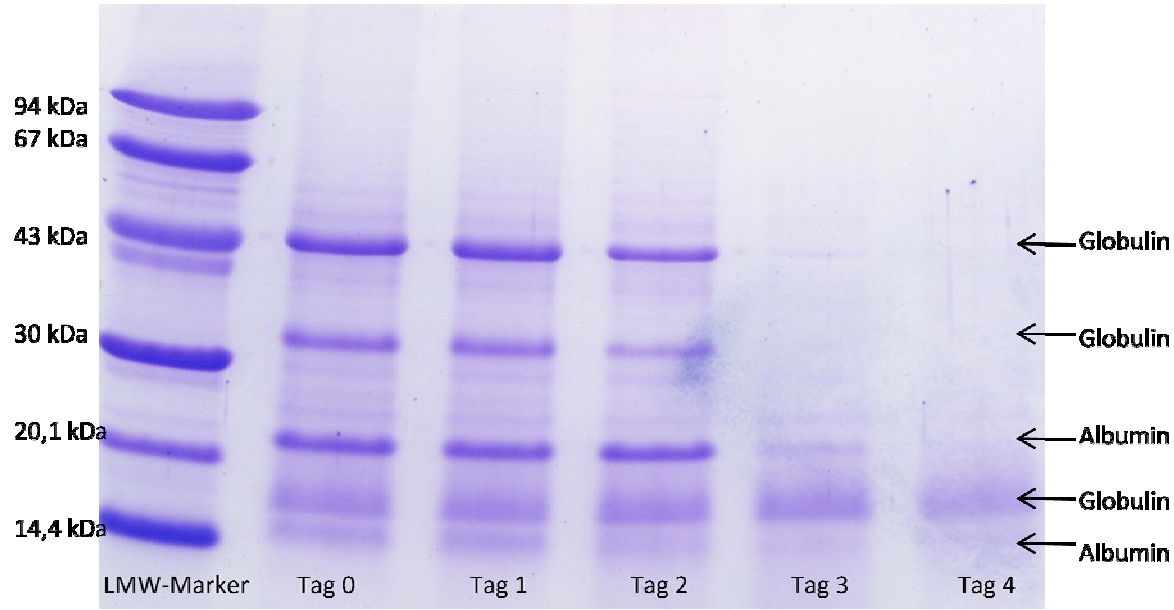


Abbildung 225: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 4-tägigen Inkubation in den Samen einer Frucht aus Trinidad (Tri2-I) (DISC-SDS-PAGE).

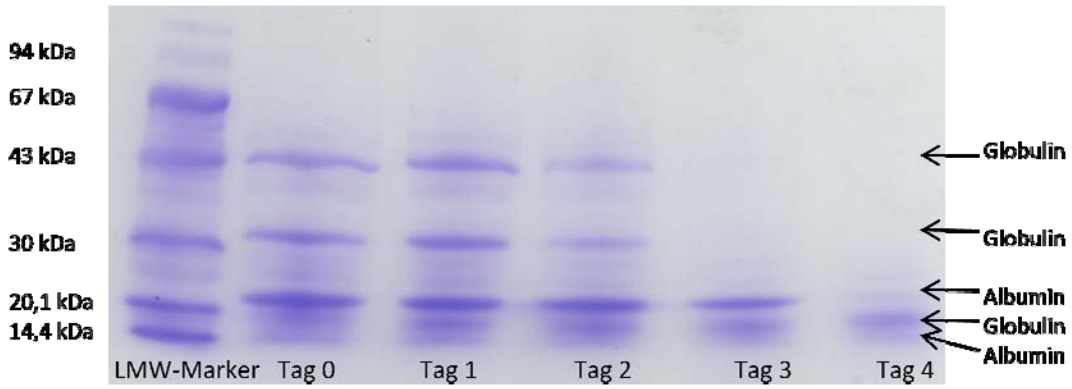


Abbildung 226: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 4-tägigen Inkubation in den Samen einer German Cocoa Frucht (GcR-F1) (DISC-SDS-PAGE).

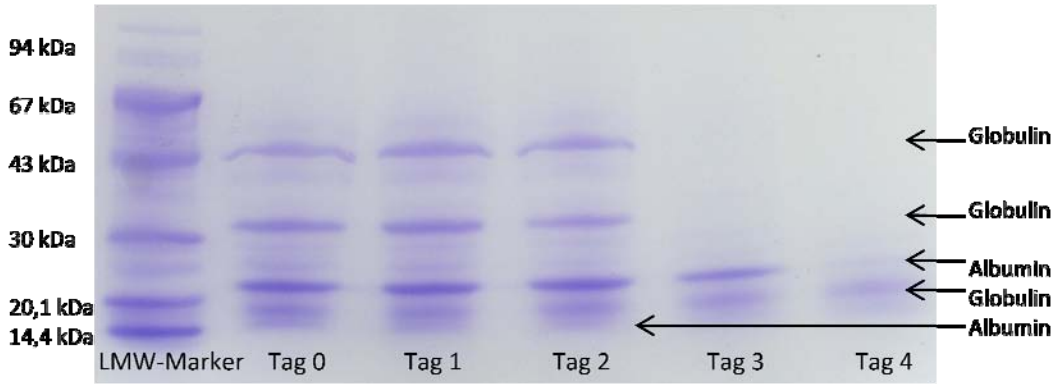


Abbildung 227: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 4-tägigen Inkubation in den Samen einer German Cocoa Frucht (GcG-F1) (DISC-SDS-PAGE).

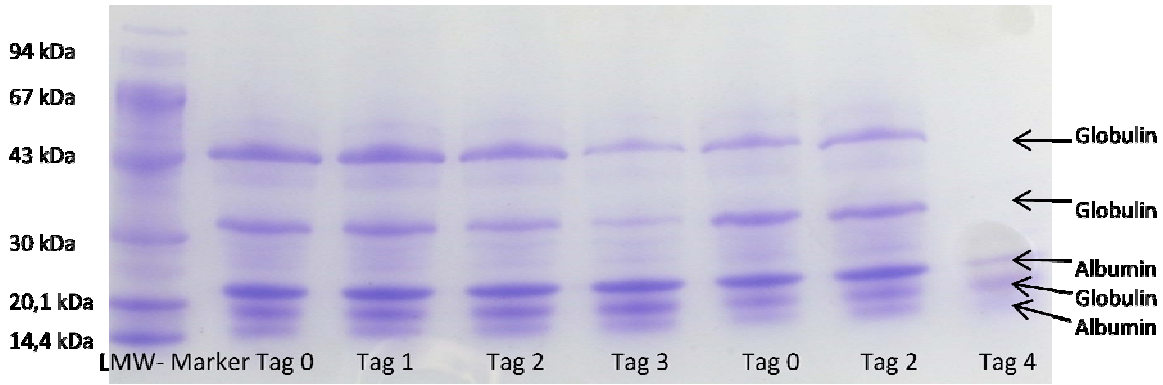


Abbildung 228: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 3- und 4-tägigen Inkubation in den Samen einer German Cocoa Frucht (GcA-F5/6) (DISC-SDS-PAGE).

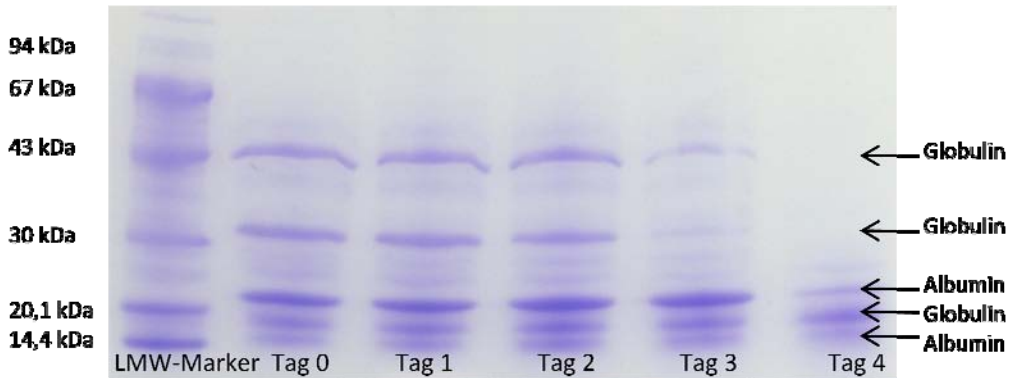


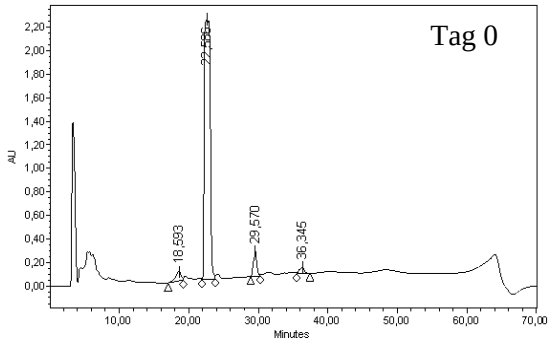
Abbildung 229: Veränderung der Speicherproteinfraktionen während einer 4-tägigen Inkubation in den Samen einer German Cocoa Frucht (GcA-F3) (DISC-SDS-PAGE).

Oligopeptidspektren vor und nach der Hydrolyse

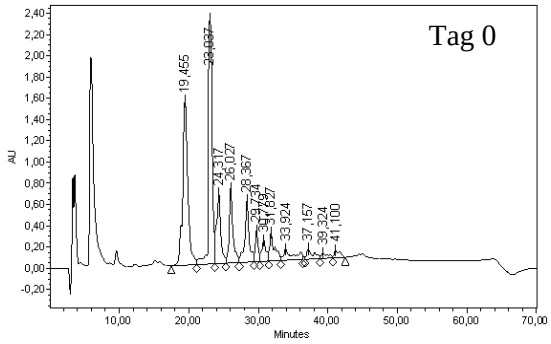
Oligopeptidspektren

nach der Hydrolyse

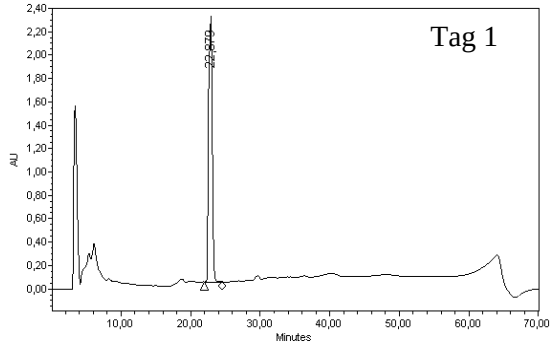
a



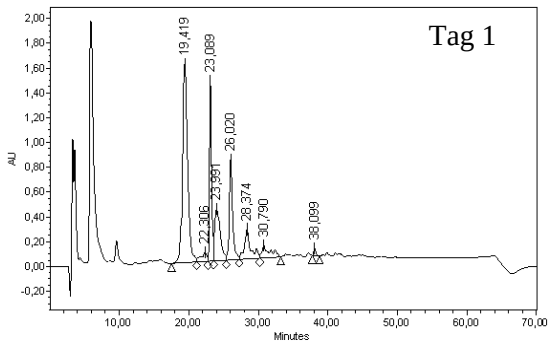
h



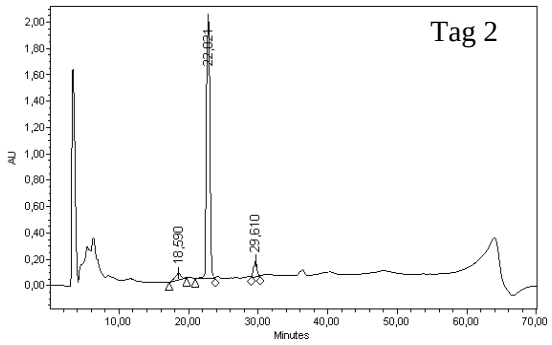
b



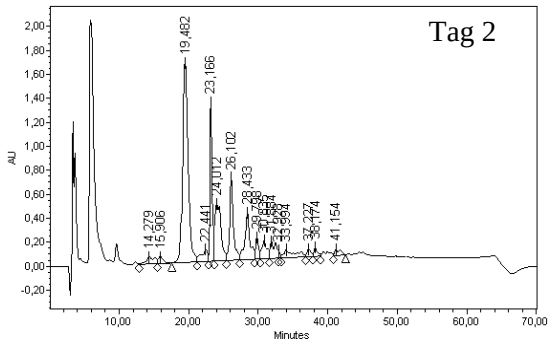
i



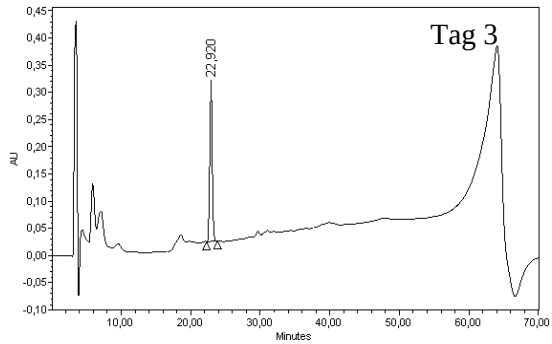
c



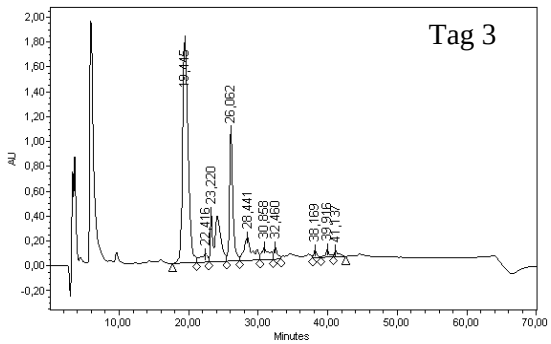
j



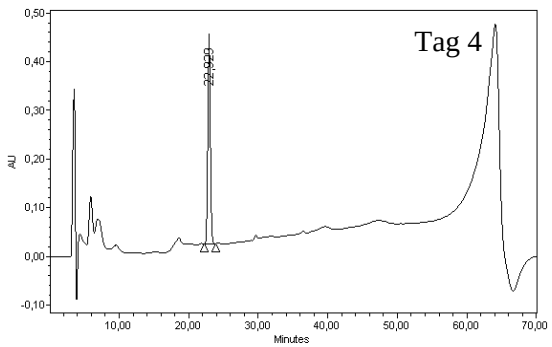
d



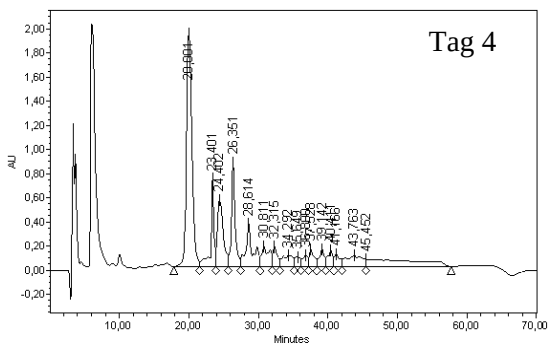
k



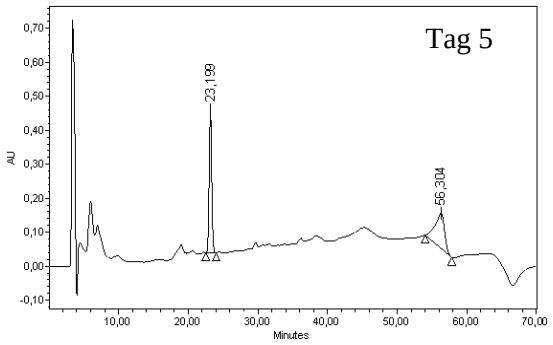
e



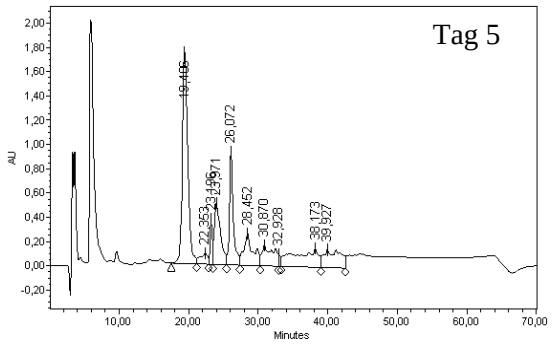
l



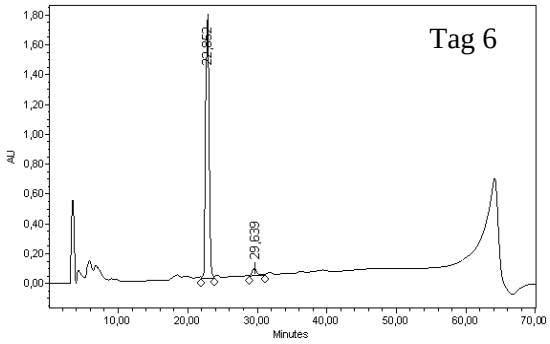
f



m



g



n

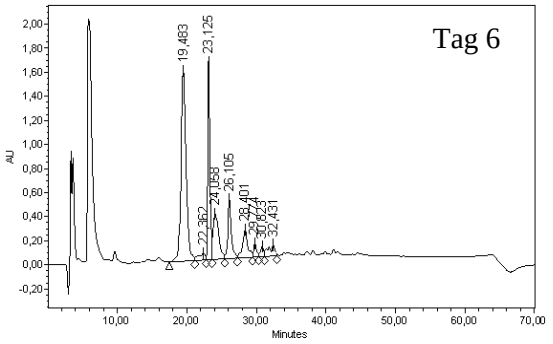
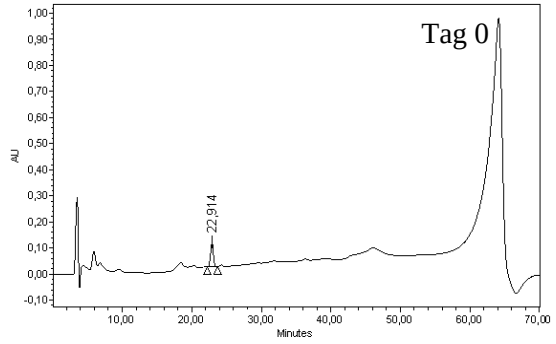


Abbildung 230 a – n:Oligopeptidspektren der Samen des Genotypen ICS 40-K1.
a) - g) Tag 0 bis Tag 6 der Keimung; h) - n) nach der Hydrolyse.

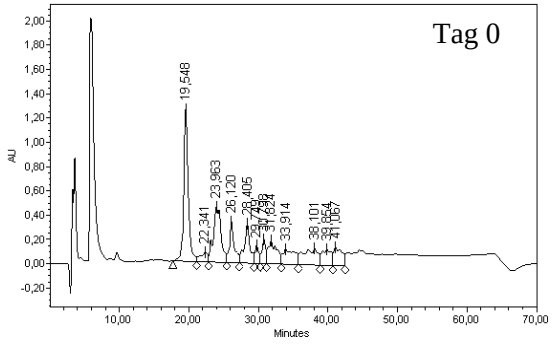
Oligopeptidspektren

nach der Hydrolyse

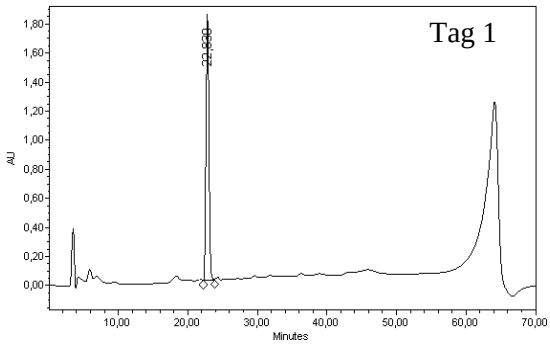
a



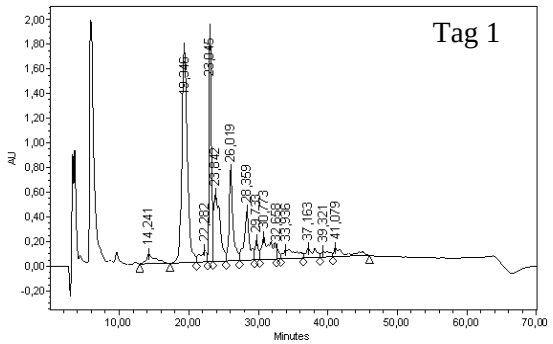
h

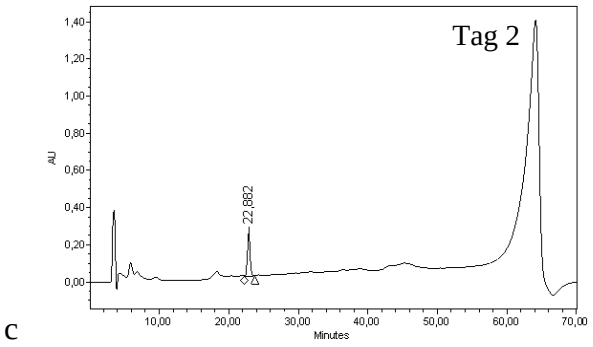


b

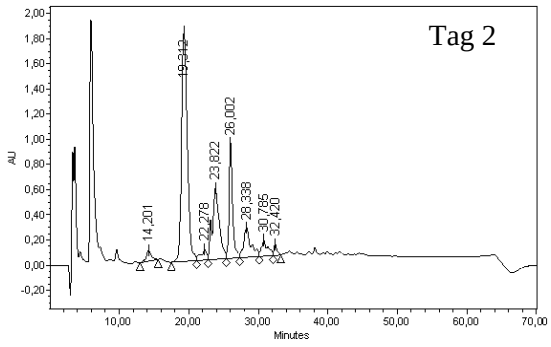


i

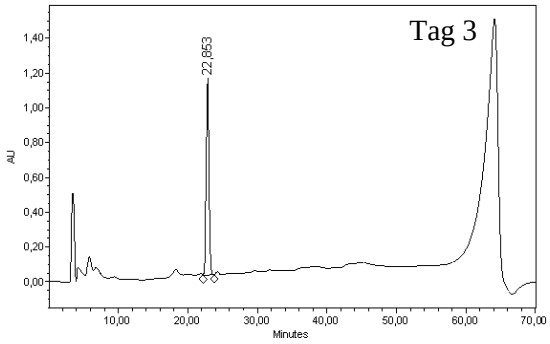




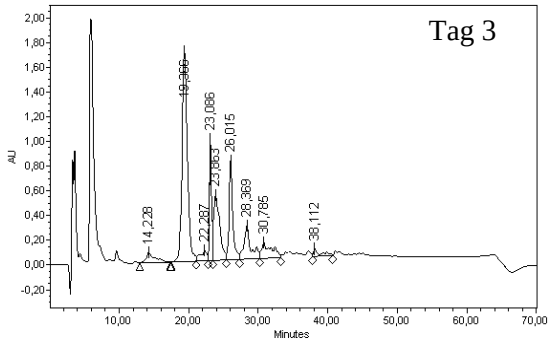
c



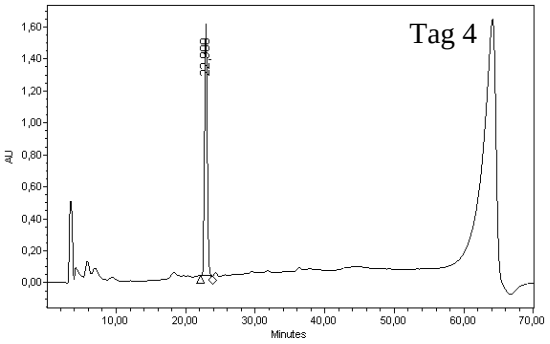
j



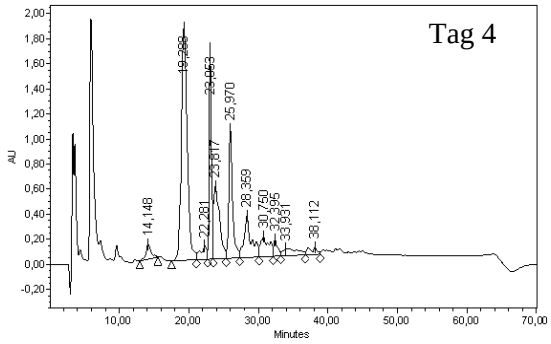
d



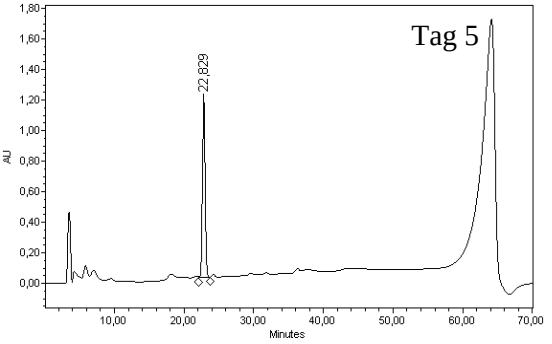
k



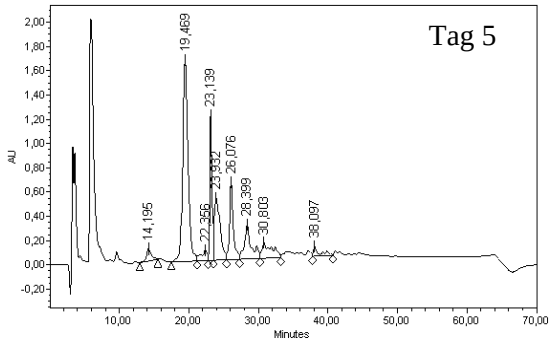
e



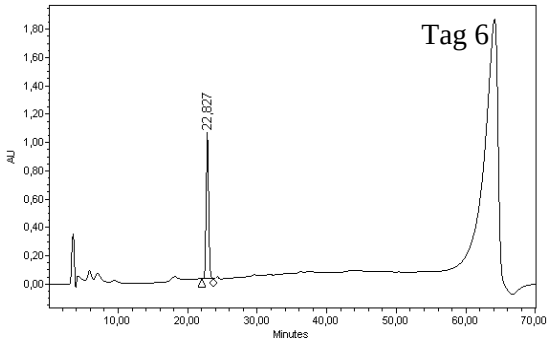
l



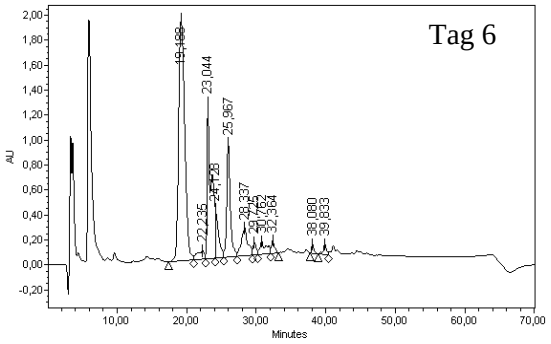
f



m



g



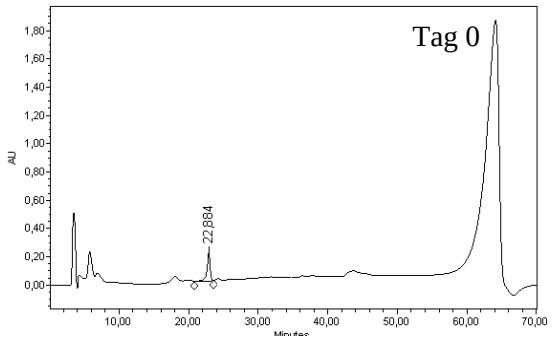
n

Abbildung 231 a – n:Oligopeptidspektren der Samen des Genotypen T 79/501-K1.
a) – g) Tag 0 bis Tag 6 der Keimung; h) - n) nach der Hydrolyse.

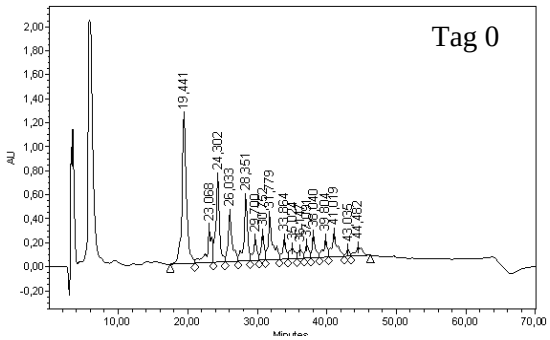
Oligopeptidspektren

nach der Hydrolyse

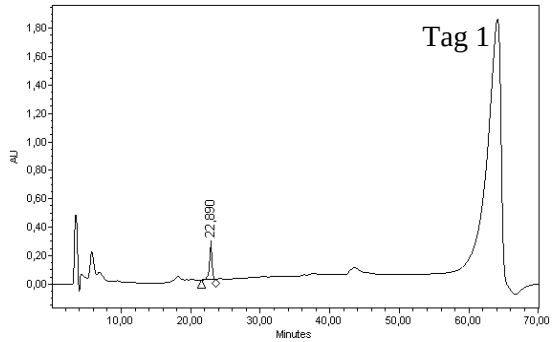
a



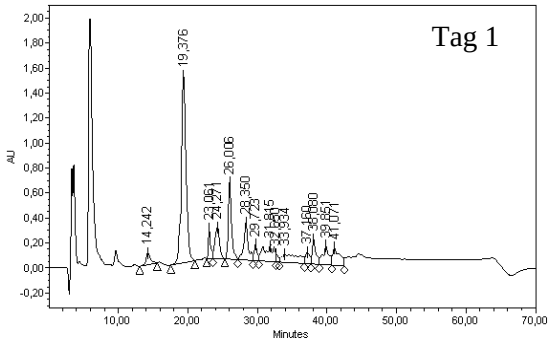
h



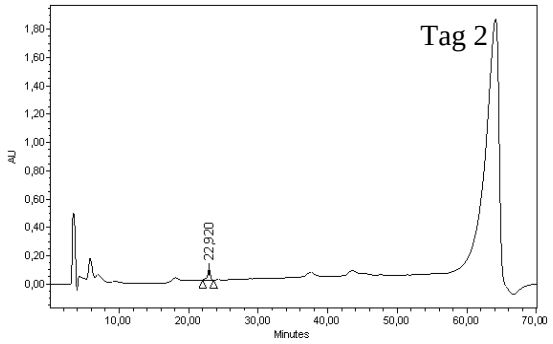
b



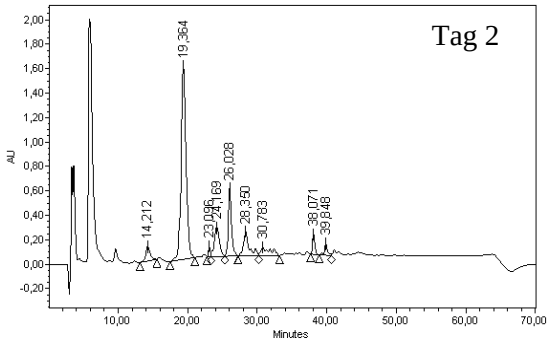
i



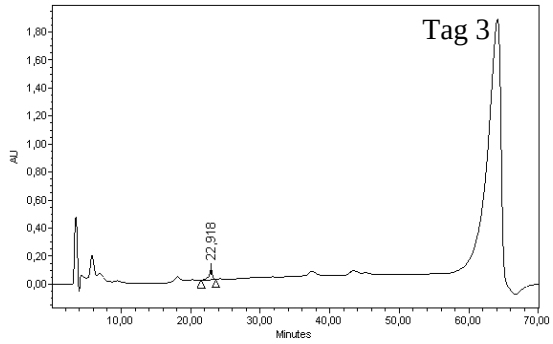
c



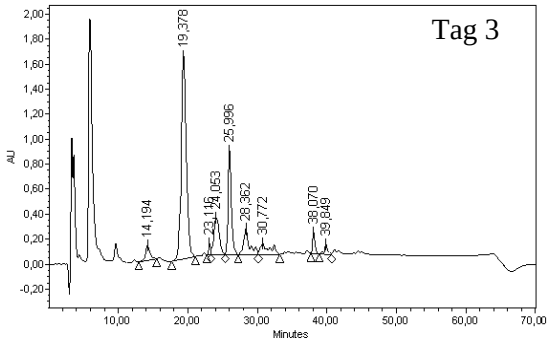
j



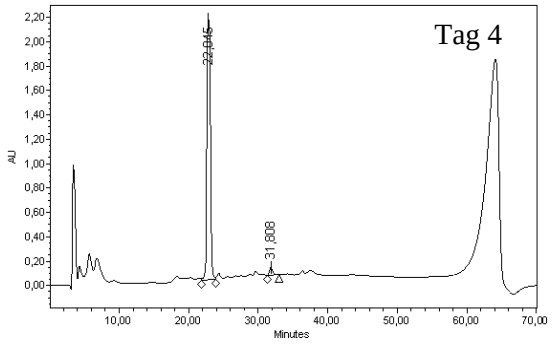
d



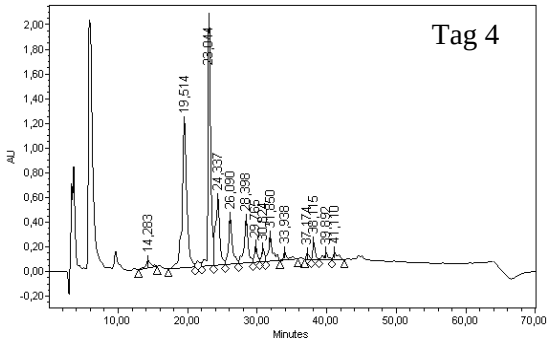
k



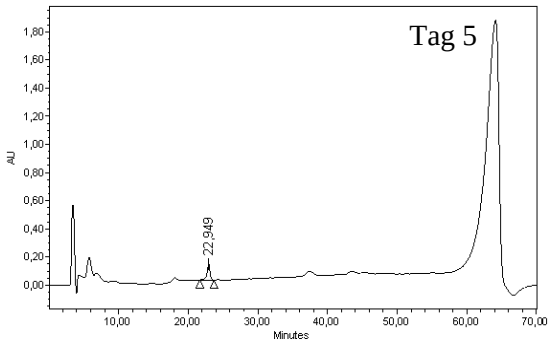
e



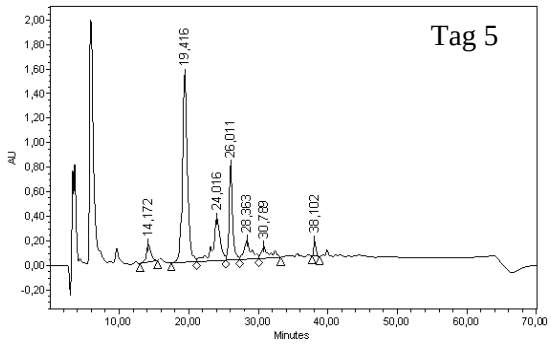
l



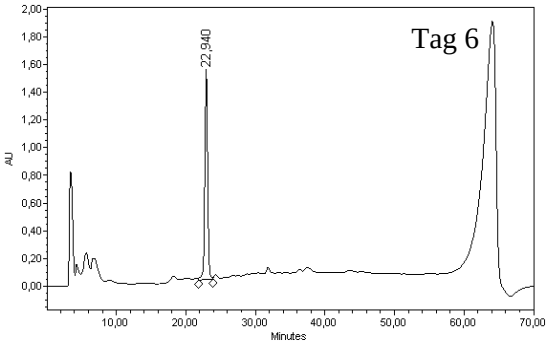
f



m



g



n

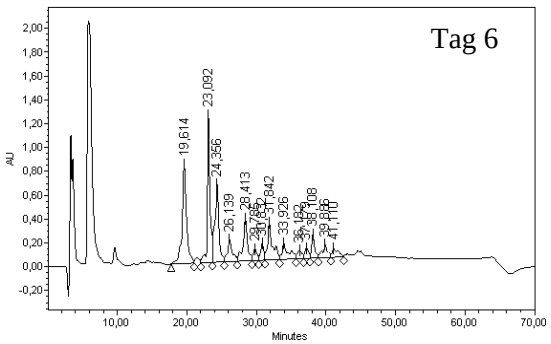
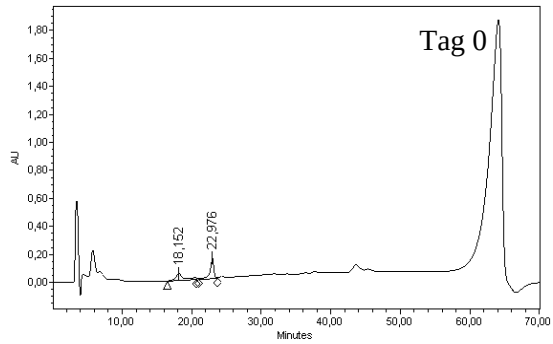


Abbildung 232 a - n: Oligopeptidspektren der Samen des German Cocoas GcM-K.
a) - g) Tag 0 bis Tag 6 der Keimung; h) - n) nach der Hydrolyse.

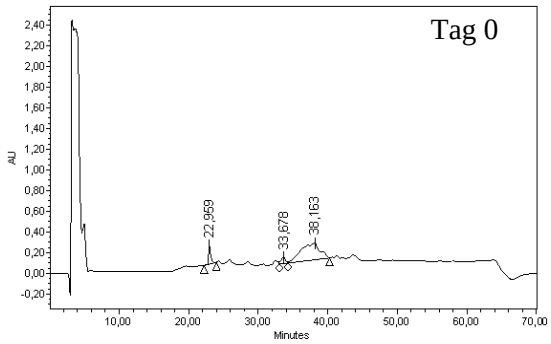
Oligopeptidspektren

nach der Hydrolyse

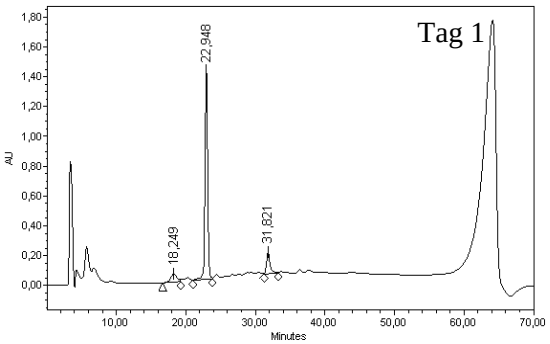
a



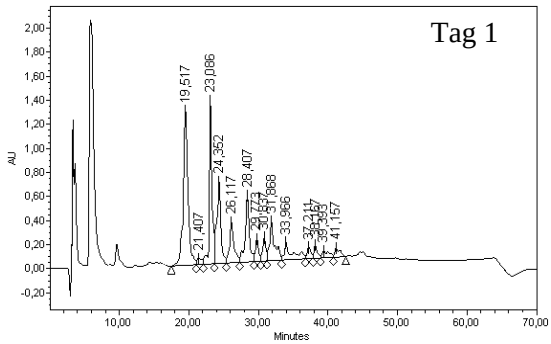
h

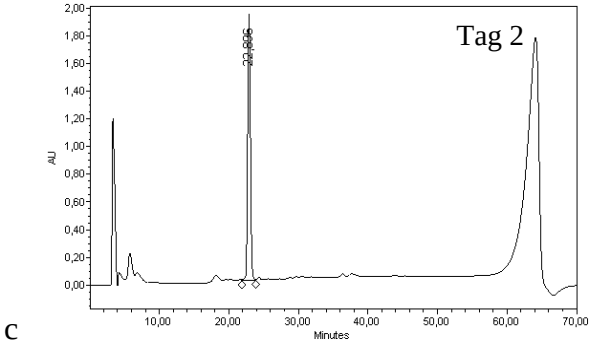


b

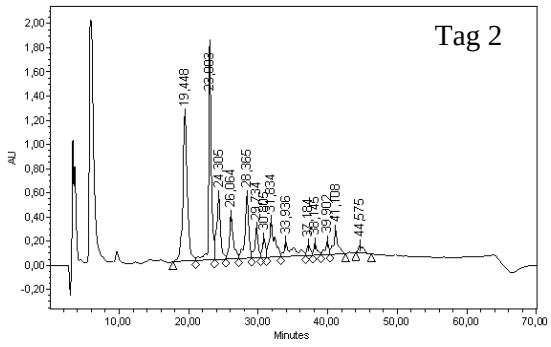


i

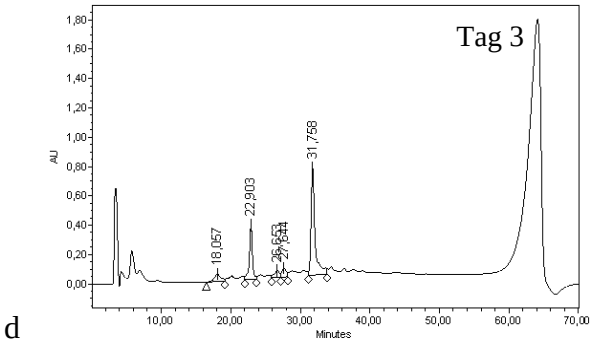




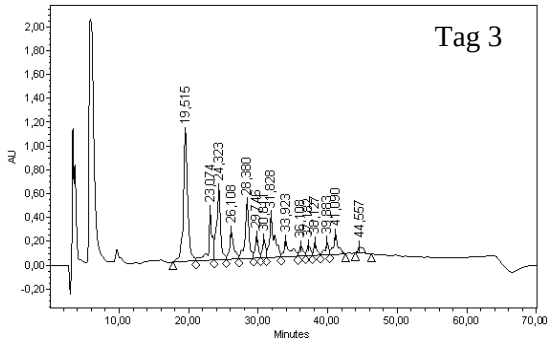
c



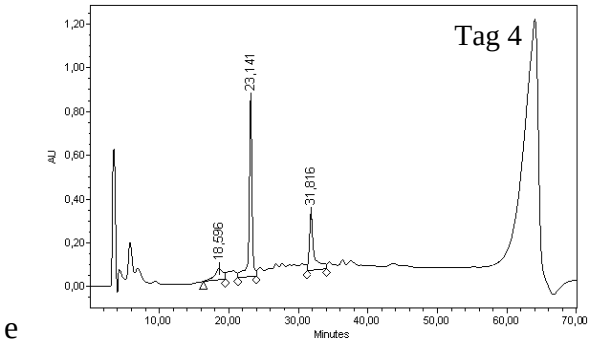
j



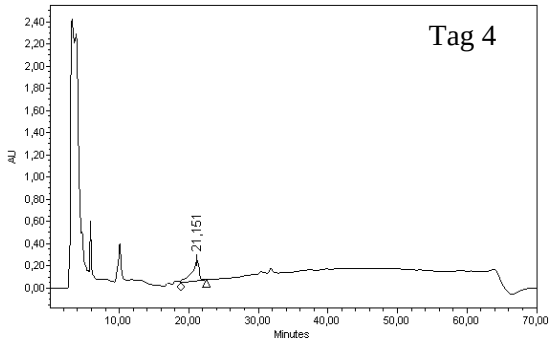
d



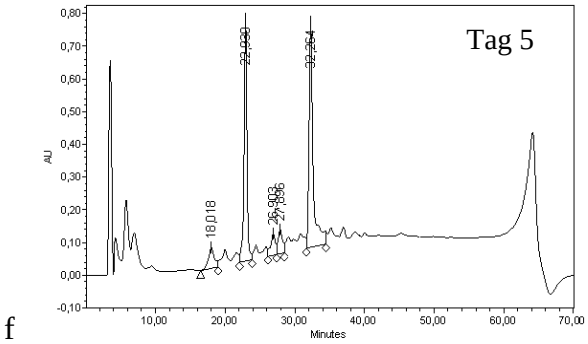
k



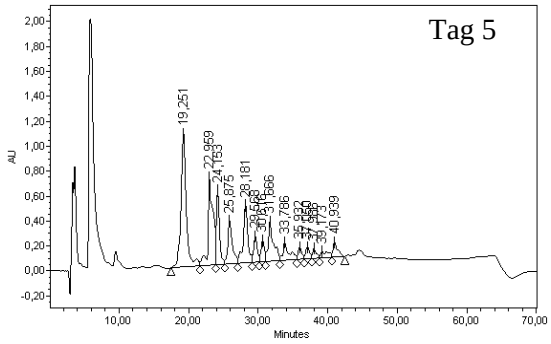
e



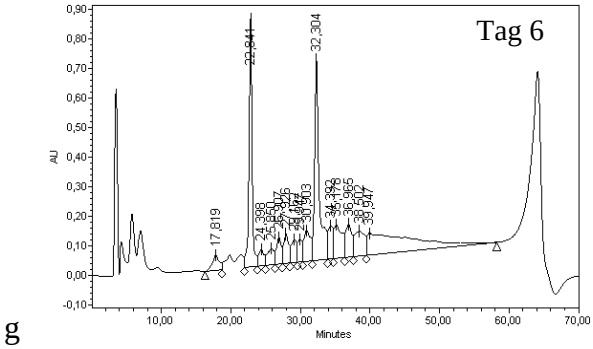
l



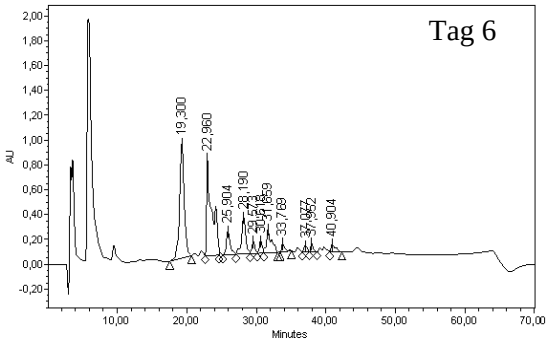
f



m



g



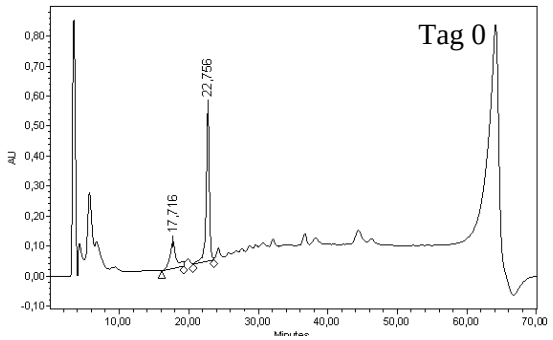
n

Abbildung 233 a - n: Oligopeptidspektren der Samen des German Cocoas GcR-K1.
a) - g) Tag 0 bis Tag 6 der Keimung; h) - n) nach der Hydrolyse.

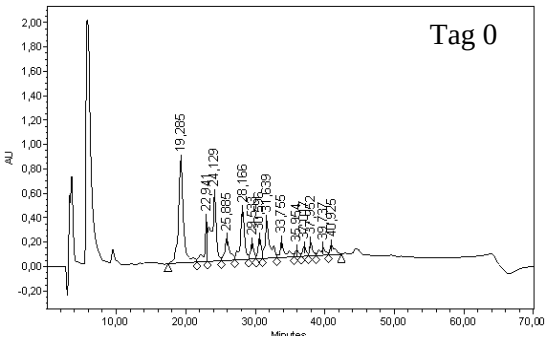
Oligopeptidspektren

nach der Hydrolyse

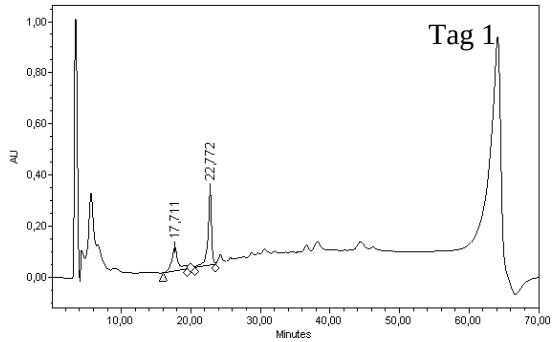
a



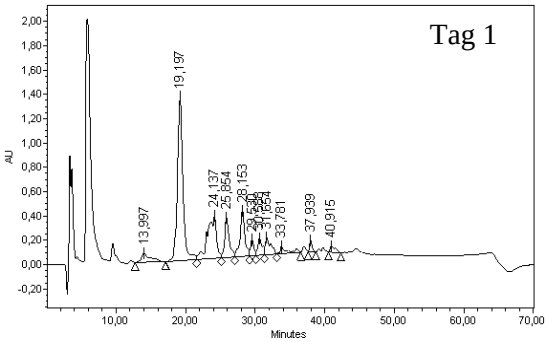
h



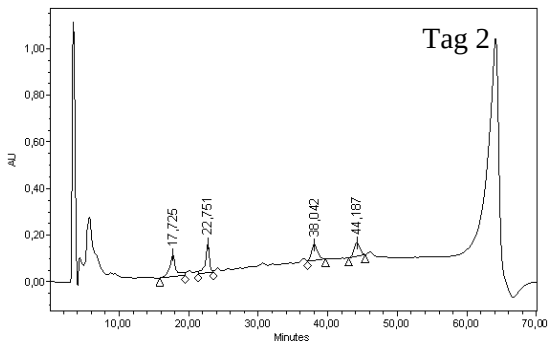
b



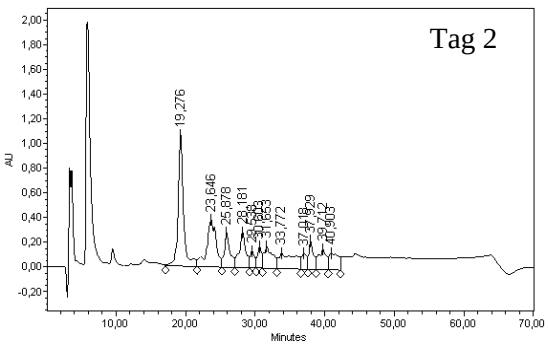
i



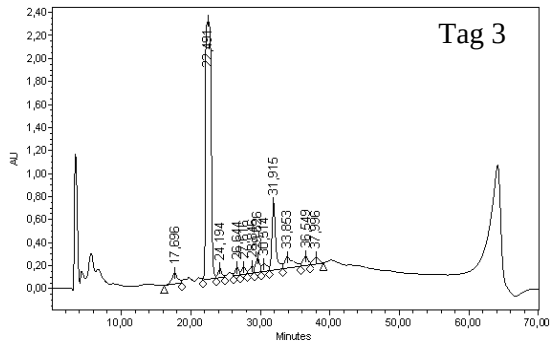
c



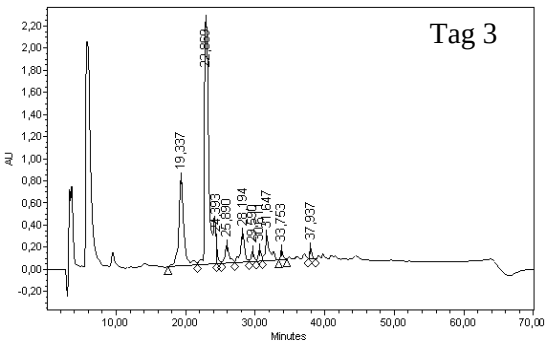
j



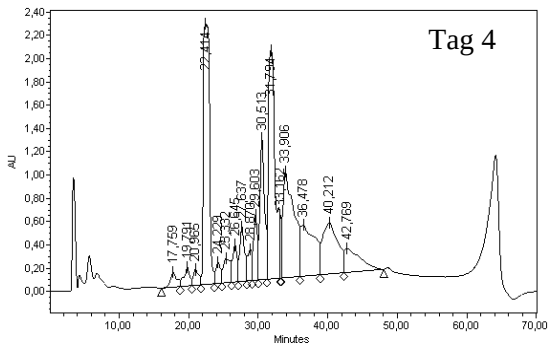
d



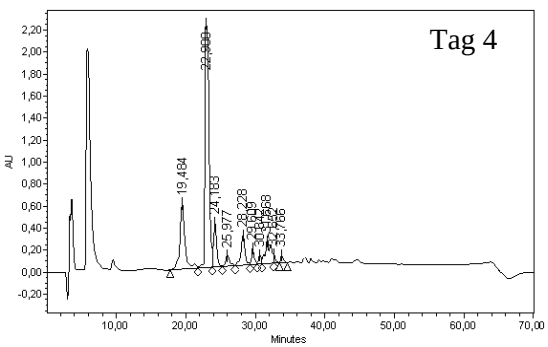
k

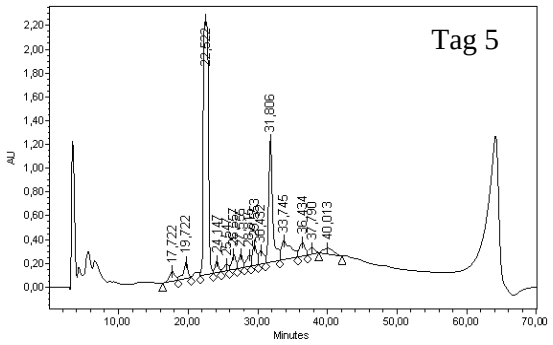


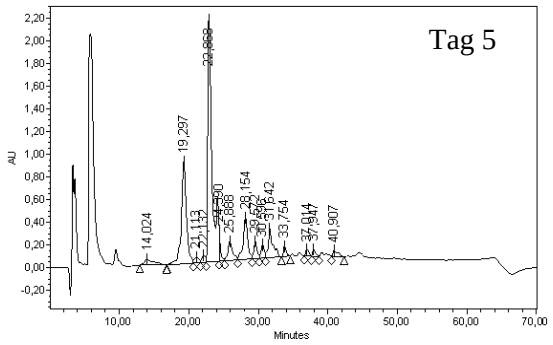
e

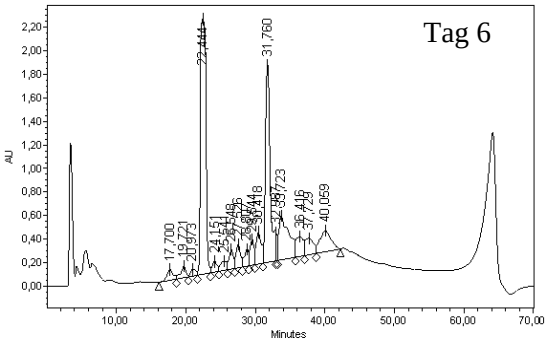


l



f 

m 

g 

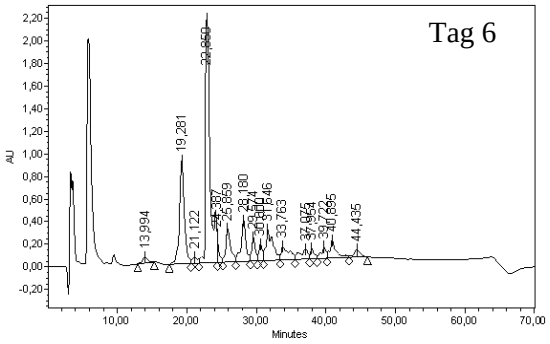
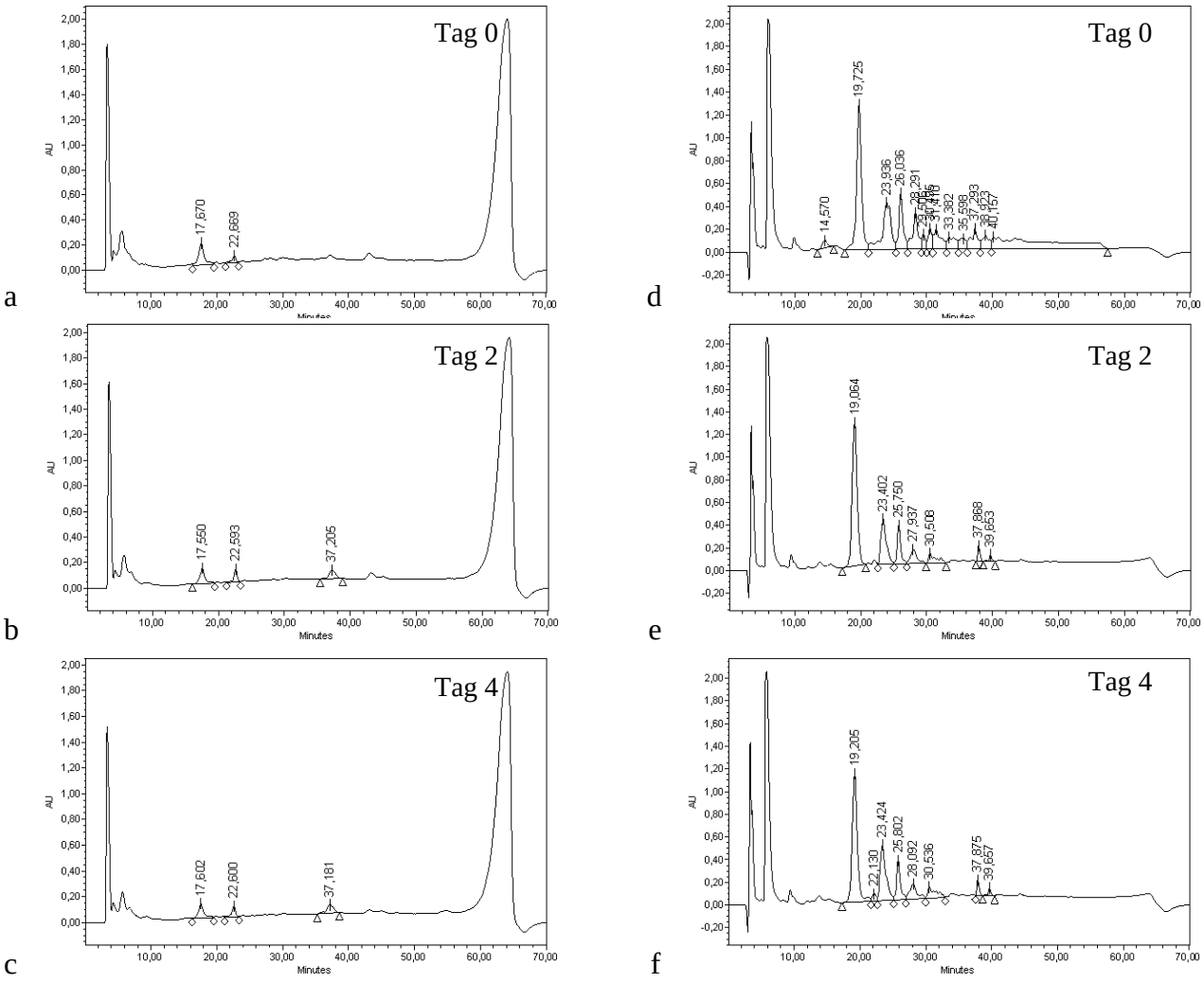
n 

Abbildung 234 a - n: Oligopeptidspektren der Samen des German Cocoas GcG-K1.
a) - g) Tag 0 bis Tag 6 der Keimung; h) - n) nach der Hydrolyse.

Oligopeptidspektren

nach der Hydrolyse

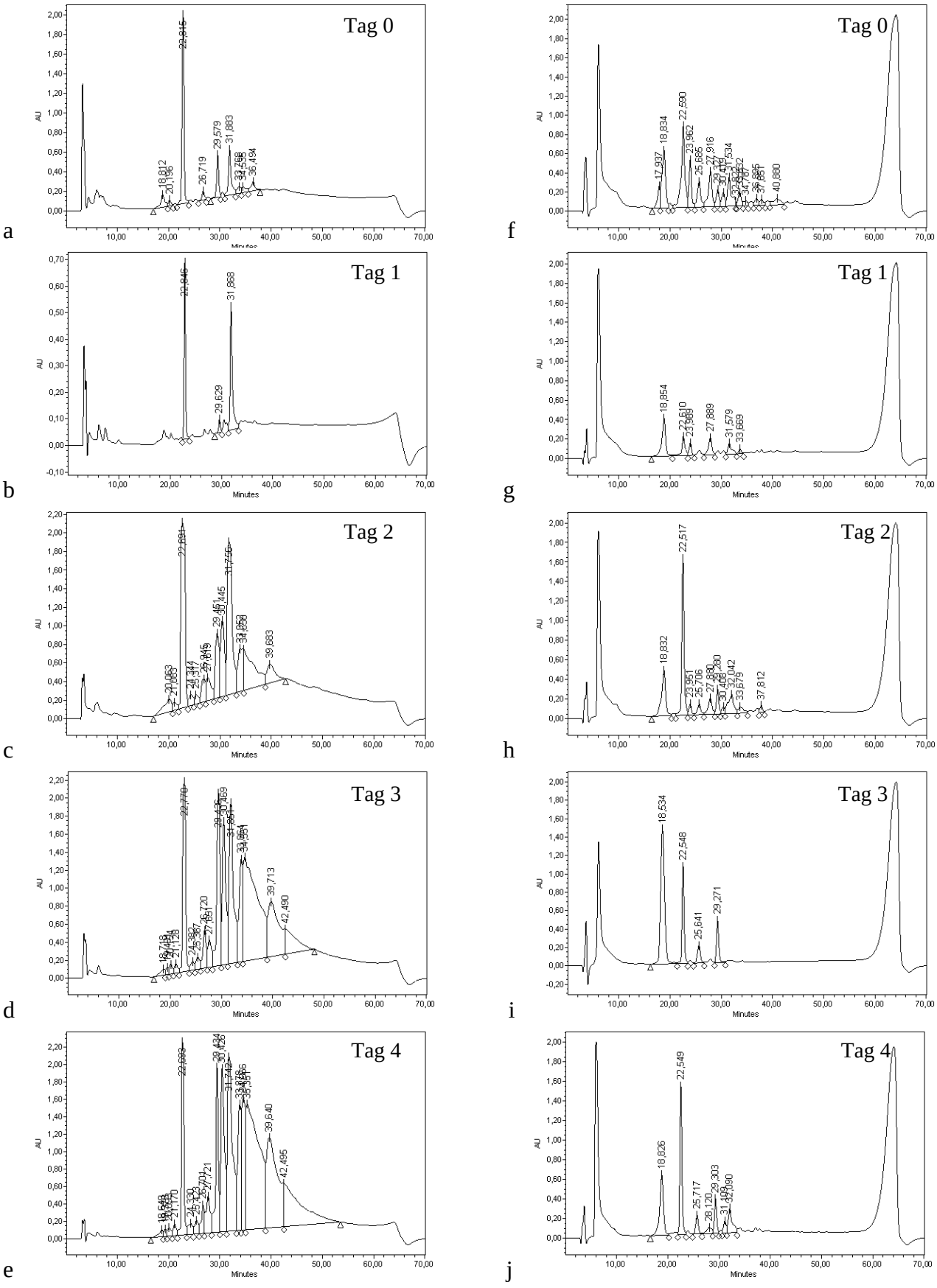


a b c d e f

Abbildung 235 a - f: Oligopeptidspektren der Samen des German Cocoas GcA-K5.
a) - c) Tag 0, 2 und 4 der Keimung; d) - f) nach der Hydrolyse.

Oligopeptidspektren

nach der Hydrolyse

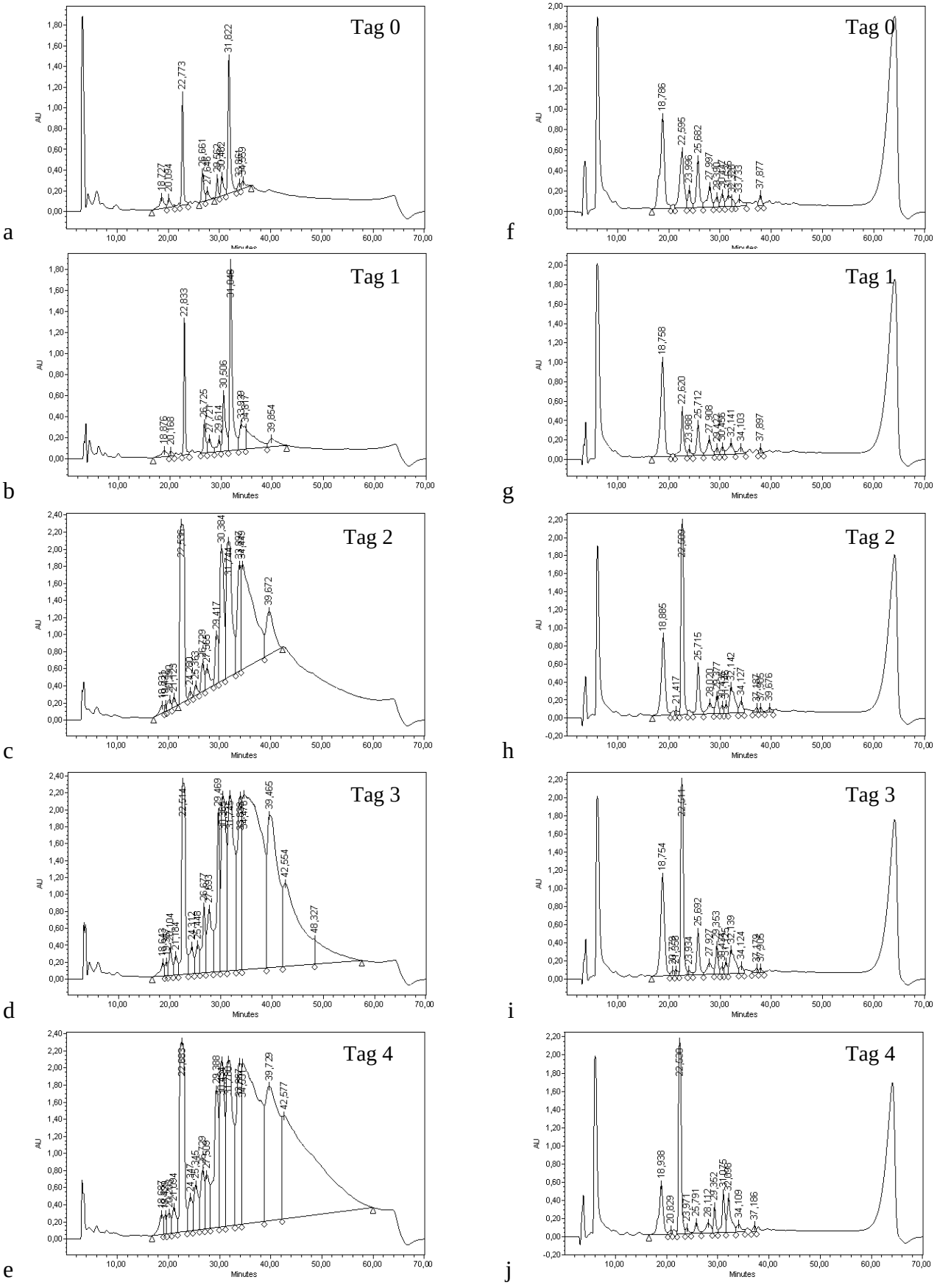


a f b g c h d i e j

Abbildung 236 a - j: Oligopeptidspektren der Samen des Genotypen ICS 40-F1.
a) - e) Tag 0 bis Tag 4 der Inkubation; f) - j) nach der Hydrolyse.

Oligopeptidspektren

nach der Hydrolyse



a f b g c h d i e j

Abbildung 237 a - j: Oligopeptidspektren der Samen des Genotypen T 79/501-F1.
a) - e) Tag 0 bis Tag 4 der Inkubation; f) - j) nach der Hydrolyse.

Oligopeptidspektren

nach der Hydrolyse

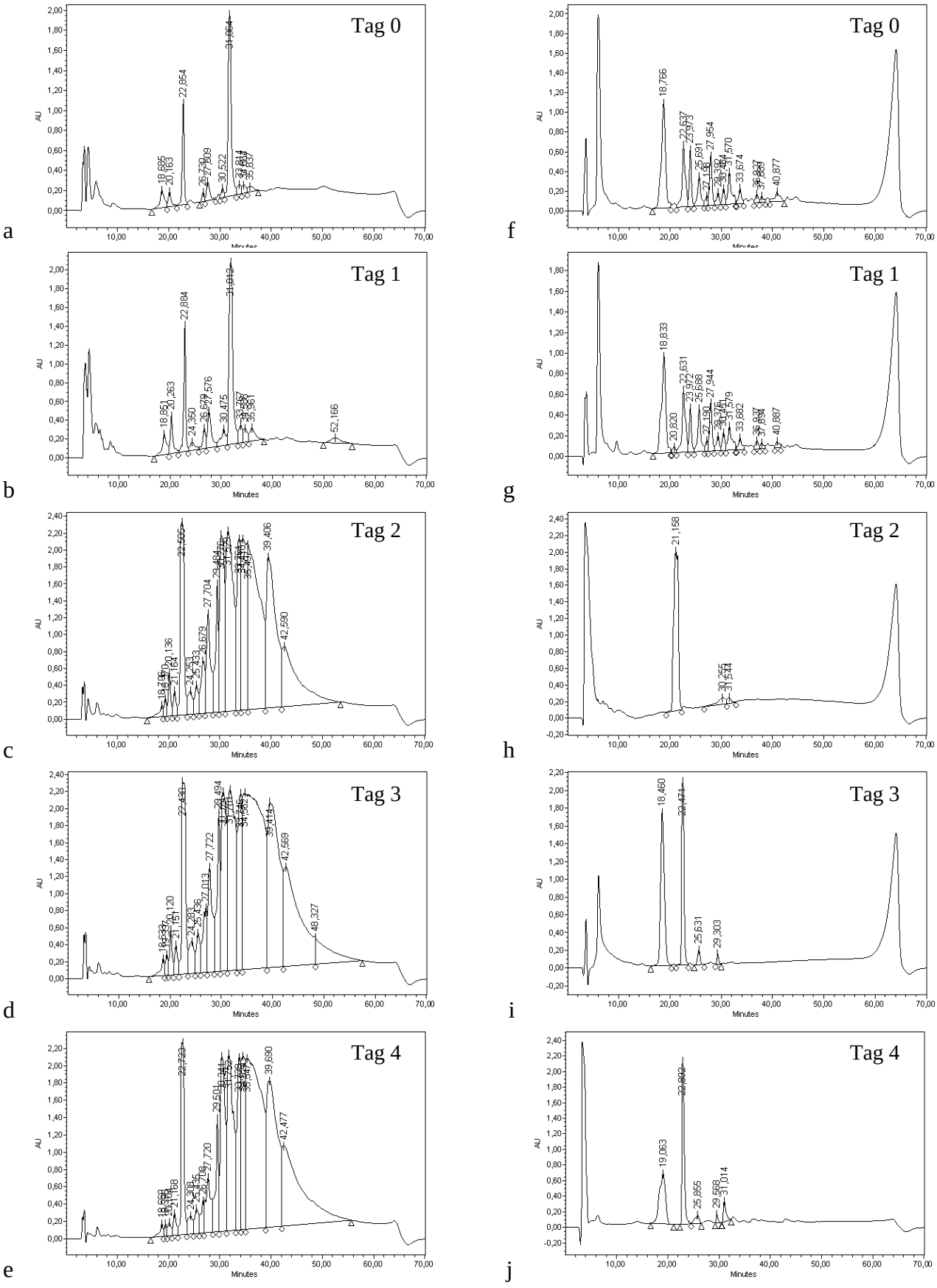


Abbildung 238 a - j: Oligopeptidspektren der Samen des German Cocoas GcM-F.
a) - e) Tag 0 bis Tag 4 der Inkubation; f) - j) nach der Hydrolyse.

Oligopeptidspektren nach der Hydrolyse

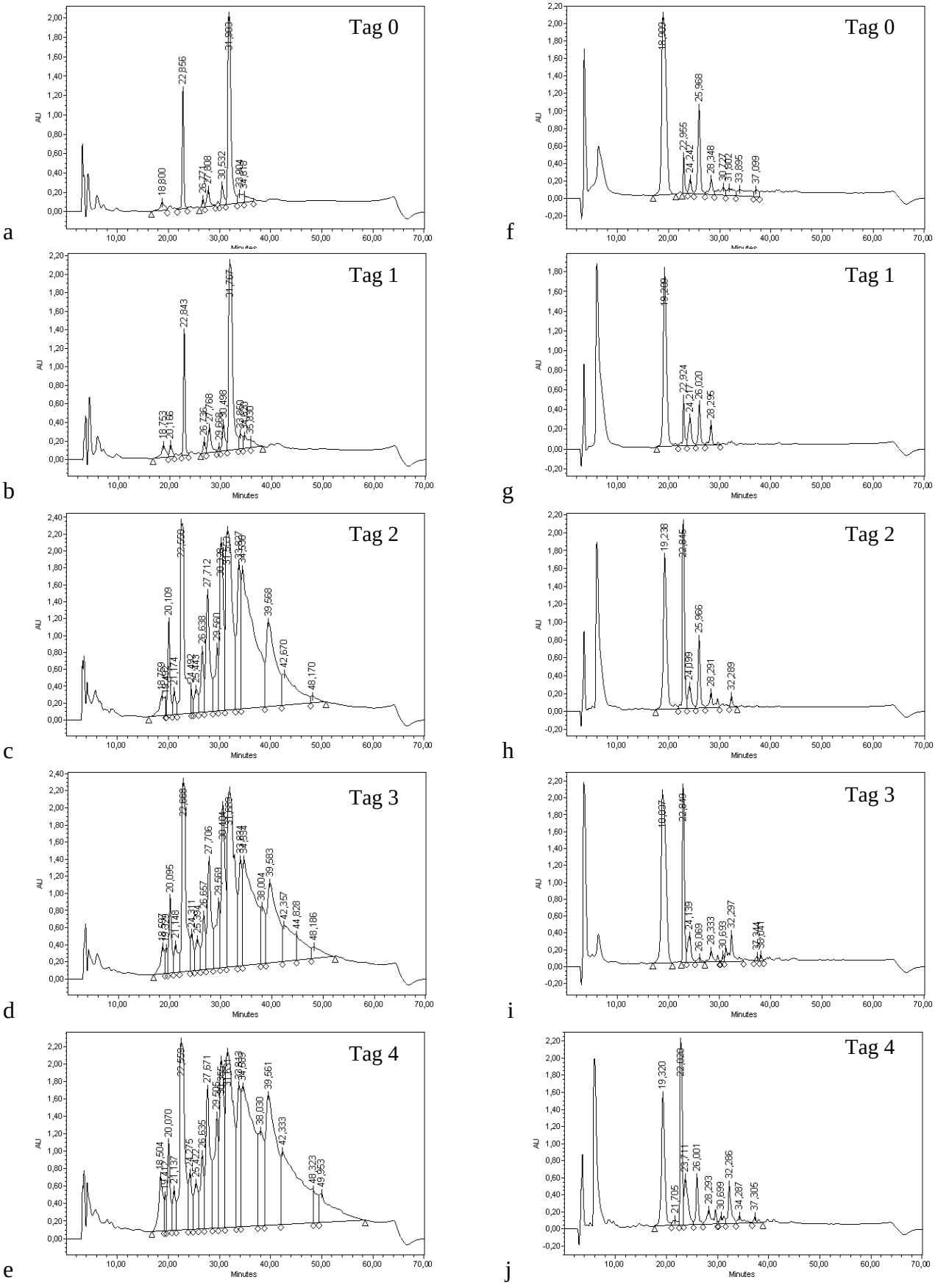


Abbildung 239 a - j: Oligopeptidspektren der Samen des German Cocoas GcR-F1.
a) - e) Tag 0 bis Tag 4 der Inkubation; f) - j) nach der Hydrolyse.

Oligopeptidspektren nach der Hydrolyse

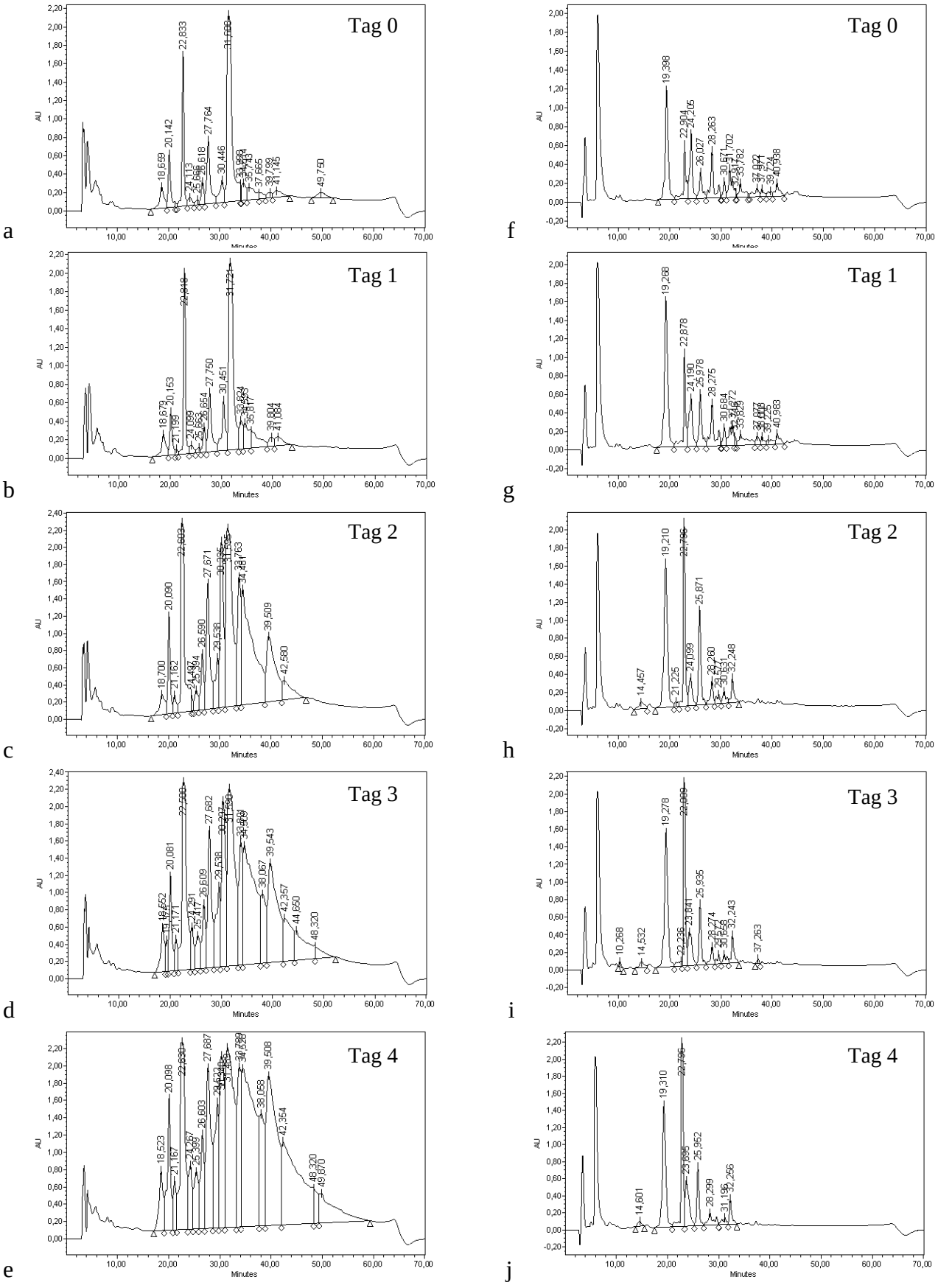
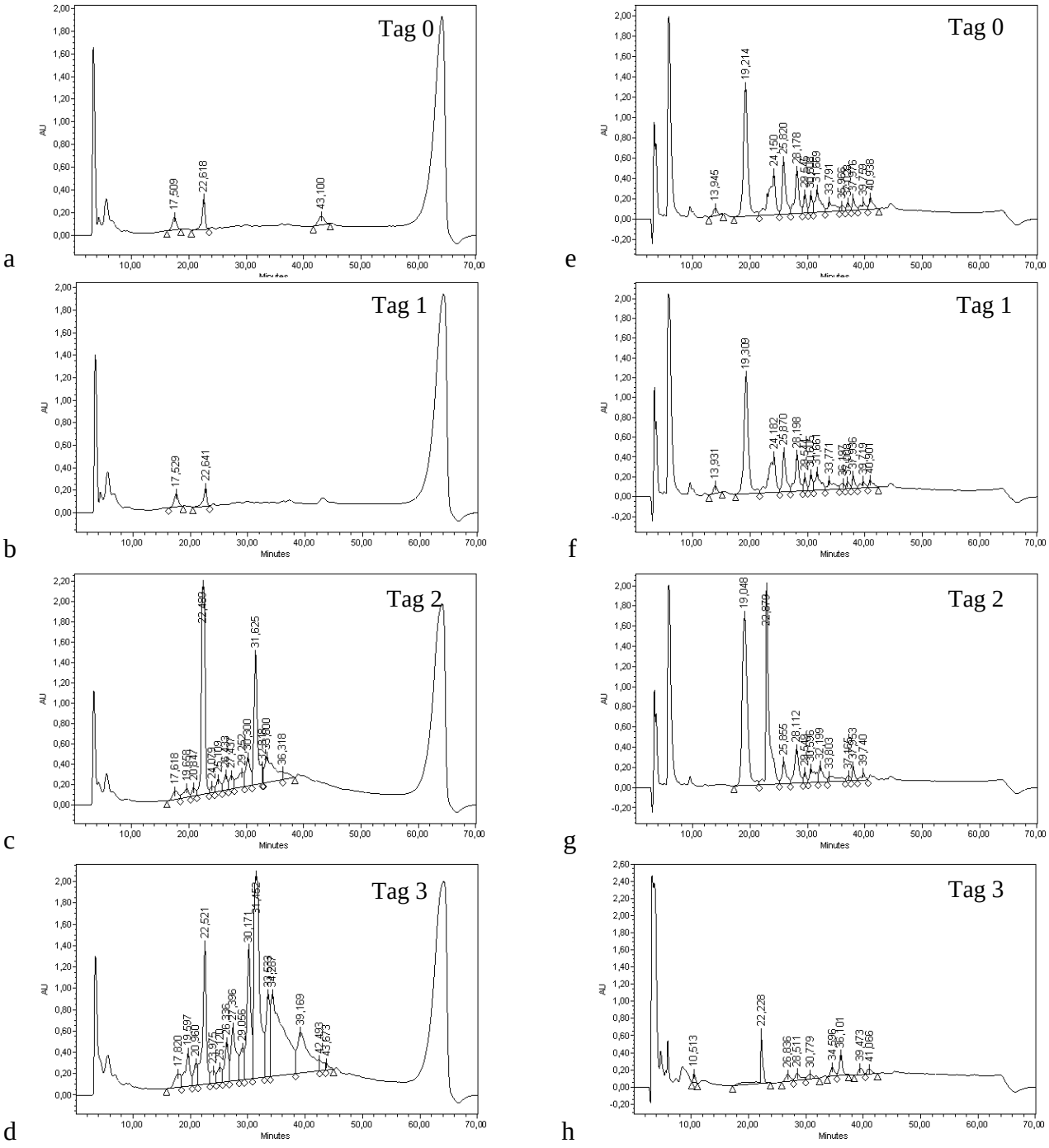


Abbildung 240 a - j: Oligopeptidspektren der Samen des German Cocoas GcG-F1.
a) - e) Tag 0 bis Tag 4 der Inkubation; f) - j) nach der Hydrolyse.

Oligopeptidspektren

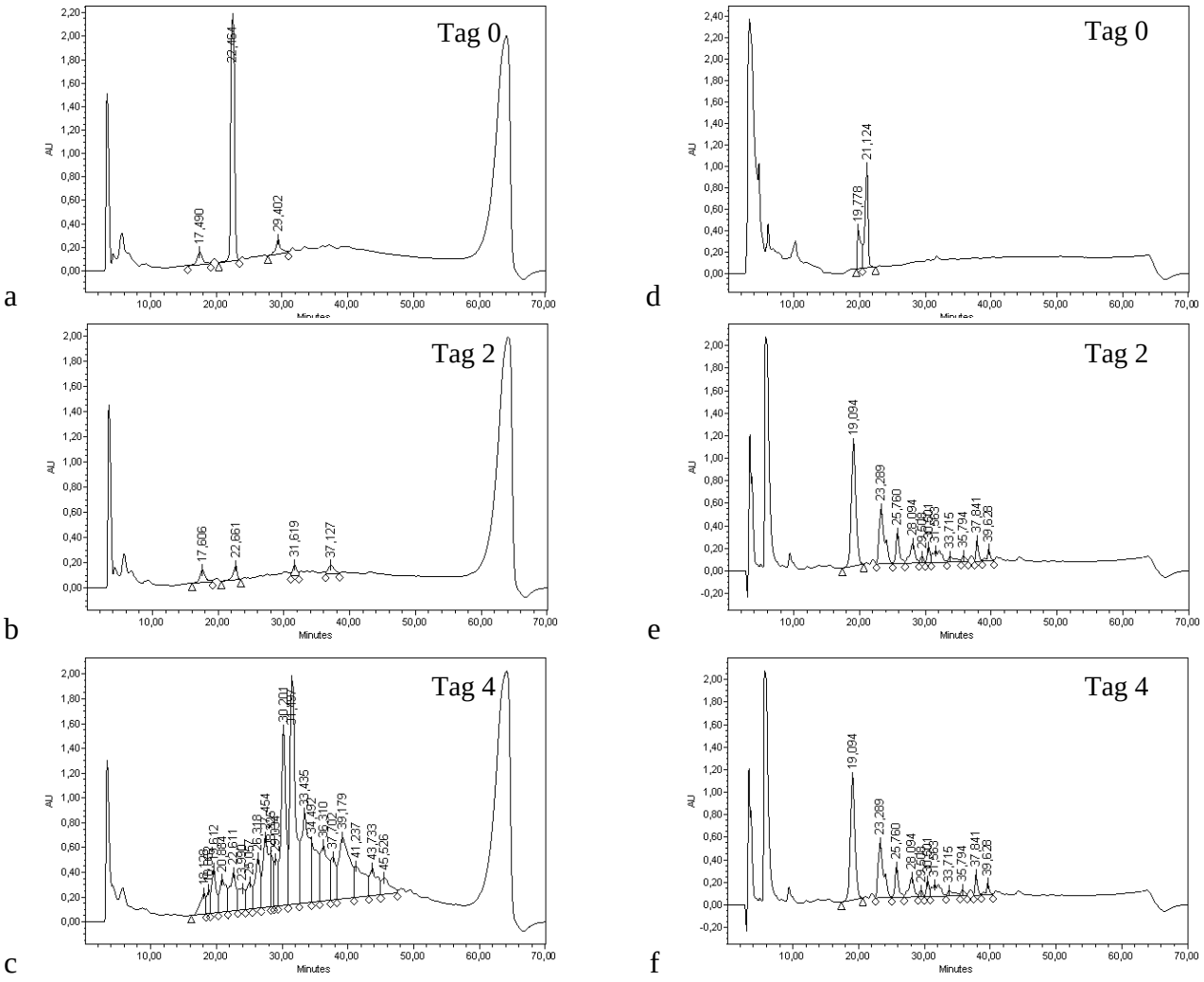
nach der Hydrolyse



a e b f c g d h

Abbildung 241 a - h: Oligopeptidspektren der Samen des German Cocoas GcA-F5.
a) - d) Tag 0 bis Tag 3 der Inkubation; e) - h) nach der Hydrolyse.

Oligopeptidspektren nach der Hydrolyse



a b c d e f

Abbildung 242 a - f: Oligopeptidspektren der Samen des German Cocoas GcA-F6.
a) - c) Tag 0, 2 und 4 der Inkubation; d) - f) nach der Hydrolyse.

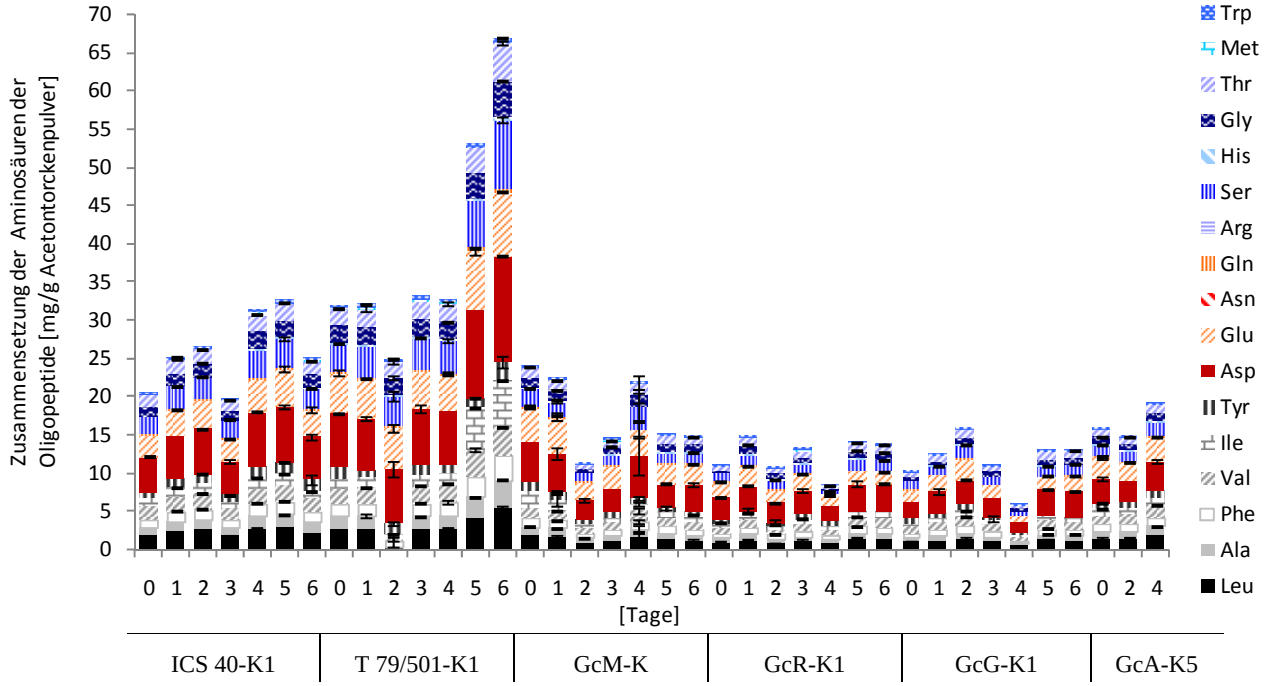


Abbildung 243: Gehalte der einzelnen Aminosäuren der Oligopeptide im Verlauf der Keimung. Hydrophobe Aminosäuren sind in schwarz, saure in rot und andere in blau dargestellt.

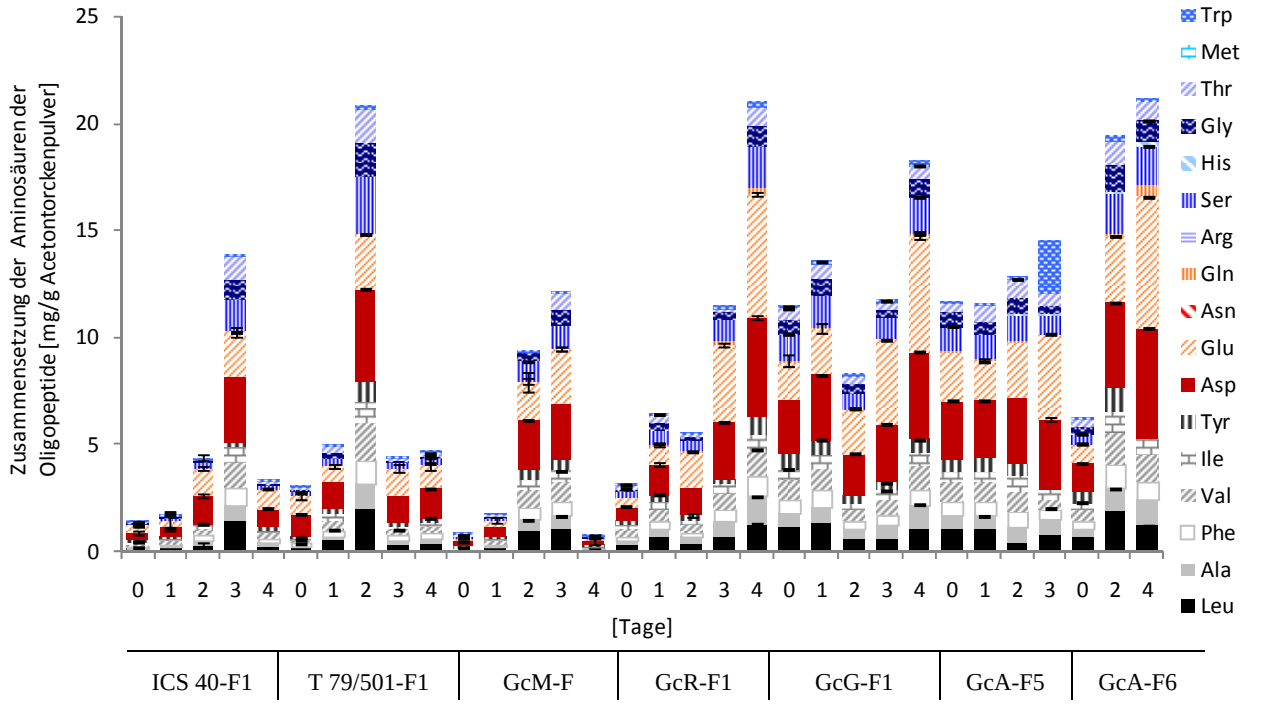


Abbildung 244: Gehalte der einzelnen Aminosäuren der Oligopeptide im Verlauf der Inkubation. Hydrophobe Aminosäuren sind in schwarz, saure in rot und andere in blau dargestellt.