

Biotechnologie  
von  
*Theobroma cacao* L.

Dissertation

Zur Erlangung der  
Würde des Doktors der Naturwissenschaften

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

vorgelegt von  
Claudia Bahmann  
aus Hamburg

Hamburg, 2014

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. R. LIEBEREI  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Professor Dr. B. BISPING  
Tag der Disputation: 13. Dezember 2013

Hamburg, den 28. November 2013



Professor Dr. C. Lohr  
Vorsitzender des  
Fach-Promotionsausschusses Biologie

für Dominic

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>6</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>11</b>
4.1	Inkubationen.....	11
4.1.1	Inkubationstemperaturen.....	11
4.1.2	Säurekonzentration und –art.....	11
4.1.3	pH-Werte.....	12
4.1.4	Vorbehandlung der Samen.....	12
4.2	Entfetten der Kakaosamen.....	12
4.3	Gewinnung des Kakaoschleims.....	13
4.4	HPLC.....	13
4.4.1	Bestimmung der freien Aminosäuren.....	13
4.4.2	Bestimmung der Polyphenole und Anthocyane.....	15
4.4.3	Bestimmung der Monosaccharide.....	16
4.4.4	Massenspektrometrische Charakterisierung der Schleimproteine.....	16
4.5	Mikroskopie.....	17
4.5.1	Lichtmikroskopie.....	17
4.5.1.1	Einbettung von Testagewebe in LR White Medium Grade™.....	18
4.5.1.2	Erstellen von Semidünnschnitten.....	18
4.5.1.3	Färbung der Präparate.....	18
4.5.2	Rasterelektronenmikroskopie.....	19
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>20</b>
5.1	Inkubationen.....	20
5.1.1	Freie Aminosäuren.....	21
5.1.1.1	Entwicklung der freien Aminosäuren während der Inkubation.....	21
5.1.1.1.1	Temperaturverlauf mit der Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C.....	22
5.1.1.1.2	Temperaturverlauf mit der Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C.....	27
5.1.1.1.3	Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 37°C.....	30
5.1.1.1.4	Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 41°C.....	35
5.1.1.1.5	Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 50°C.....	39

5.1.1.1.6	Einfluss der Samenbehandlung auf die Entwicklung der freien Aminosäuren während der Inkubation.....	42
5.1.1.1.7	Zusammenfassung.....	48
5.1.1.2	Hydrophobe Aminosäuren.....	49
5.1.1.2.1	Temperaturverlauf mit der Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C.....	51
5.1.1.2.2	Temperaturverlauf mit der Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C.....	54
5.1.1.2.3	Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 37°C.....	57
5.1.1.2.4	Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 41°C.....	62
5.1.1.2.5	Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 50°C.....	64
5.1.1.2.6	Einfluss der Samenbehandlung auf die Entwicklung der hydrophoben Aminosäuren während der Inkubation.....	67
5.1.1.2.7	Zusammenfassung.....	72
5.1.1.3	$\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA).....	75
5.1.1.3.1	Temperaturverlauf mit der Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C.....	78
5.1.1.3.2	Temperaturverlauf mit der Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C.....	81
5.1.1.3.3	Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 37°C.....	84
5.1.1.3.4	Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 41°C.....	86
5.1.1.3.5	Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 50°C.....	89
5.1.1.3.6	Einfluss der Samenbehandlung auf den Gehalt an $\gamma$ -Aminobuttersäure während der Inkubation.....	92
5.1.1.3.7	Zusammenfassung.....	96
5.1.2	Polyphenole.....	98
5.1.2.1	Epicatechin.....	98
5.1.2.1.1	Temperaturverlauf mit der Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C.....	99
5.1.2.1.2	Temperaturgradient mit der Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C.....	103
5.1.2.1.3	Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 37°C.....	105
5.1.2.1.4	Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 41°C.....	108
5.1.2.1.5	Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 50°C.....	110
5.1.2.1.6	Einfluss der Samenbehandlung auf den Epicatechingehalt während der Inkubation.....	113
5.1.2.1.7	Zusammenfassung.....	117
5.1.2.2	Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid.....	120
5.1.2.2.1	Temperaturverlauf mit der Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C.....	121
5.1.2.2.2	Temperaturgradient mit der Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C.....	123

5.1.2.2.3	Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 37°C .....	123
5.1.2.2.4	Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 41°C .....	124
5.1.2.2.5	Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 50°C .....	125
5.1.2.2.6	Einfluss der Samenbehandlung auf die Gehalte an Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid während der Inkubation .....	125
5.1.2.2.7	Zusammenfassung: .....	126
5.1.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Inkubationen .....	127
5.2	Struktur und Funktion der Testa .....	129
5.2.1	Mikroskopische Untersuchung der Testa eines frischen Kakaosamens .....	129
5.2.2	Lichtmikroskopische Untersuchung der Testa .....	131
5.2.3	Untersuchungen der Testa mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	133
5.2.3.1	Veränderungen der Testa während der Inkubation .....	134
5.2.3.2	Schleimkavernen .....	136
5.2.3.3	Wasseraufnahme und Quellung des Schleimes .....	137
5.3	Analyse der stofflichen Zusammensetzung des Schleims aus den Testakavernen .....	139
5.3.1	Zuckerkomponenten des Schleims .....	140
5.3.2	Aminosäurezusammensetzung .....	142
5.3.3	Proteinidentifizierung durch Massenspektrometrie .....	145
5.3.4	Wirkung des testaassoziierten Schleims in der Fermentation .....	148
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>150</b>
6.1	Steuerung der samenbürtigen Aromavorstufen mittels externer Faktoren .....	150
6.1.1	Einfluss der externen Faktoren .....	150
6.1.2	Einfluss der Mikroorganismen auf die Fermentation .....	154
6.2	Einfluss der Testa auf den Inkubationsverlauf .....	155
6.3	Bedeutung und Funktion der inneren Schleimschicht .....	158
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>163</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>164</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>173</b>
<b>10</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>174</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>180</b>
<b>12</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>182</b>

# 1 Zusammenfassung

Im Zuge der Nacherntebehandlung von Rohkakao, der Fermentation, werden durch mikrobiellen Pulpaabbau Ethanol und später Essigsäure erzeugt bei gleichzeitiger deutlicher Temperaturerhöhung auf über 45°C. Diese Bedingungen in der Fermentationsmasse führen im Samen zu einer Ansäuerung des Kotyledonengewebes und – als Folge davon zu einer massiven Proteolyse der Speicherproteine durch endogene, bei Gewebeansäuerung aktivierte Proteasen. Die Spaltungsaktivität der Proteasen und die stark konservierten Aminosäuresequenzen der Proteine liefern ein definiertes Muster der Aromavorstufen des Kakaos. In der vorliegenden Arbeit werden analog zu den Bedingungen in der Fermentation durch Inkubationen der Samen in entsprechenden sauren Medien mit verschiedenen pH-Werten und unterschiedlichen Säuren die grundsätzlichen Einwirkungen dieser Faktoren auf die Samen in Hinsicht auf die Proteolyse untersucht. Um den Fermentationsbedingungen zu entsprechen, werden die Inkubationen bei verschiedenen Temperaturen ausgeführt.

Der höchste Gehalt an freien Aminosäuren wird bei einem pH-Wert von 2,9, einer Essigsäurekonzentration von 100mM und einer Temperatur von konstant 41°C erreicht. Die Abtötung der Samengewebe ließ sich über die Freisetzung der phenolischen Inhaltsstoffe in das Medium nachweisen. Eine Temperatur von über 50°C ist eindeutig als zellmembranschädigend einzustufen. Ebenso zerstört eine Säurekonzentration von über 300mM Essigsäure die Membran und lässt sich durch die Freisetzung der phenolischen Substanzen nachweisen.

Die direkte Einwirkung dieser externen Faktoren wird durch das Vorhandensein einer intakten Samenschale verzögert, so dass diese strukturelle Komponente als eine Barriere zwischen Inkubationsmedium und Samenspeichergewebe nachweisbar ist. Von besonderer Bedeutung erweist sich eine bislang kaum untersuchte stark quellbare Schleimschicht, die nach der Entfernung der Pulpa durch Behandlung mit Pectinex BE XXL<sup>®</sup> aus Schleimbehältern durch Quellung gebildet wird und die bei intakter Pulpa noch in speziellen Höhlungen oder Kavernen in der äußeren Lage der Testa vorliegt. Weitergehende Analysen des Schleims belegen, dass nach Hydrolyse überwiegend Aminosäuren vorhanden sind und nur geringe Mengen freie Zucker nachweisbar sind. Die elektrophoretischen Analysen des Schleims belegen, dass ca. 30 trennbare Eiweiße nach SDS-Elektrophorese vorliegen. Mit Hilfe von HPLC-MS lassen sich drei Eiweiße im Schleim charakterisieren, die eine fungizide Wirkung haben. Die Bedeutung dieser Komponenten für die Samenkeimung und Fermentation wird diskutiert.

## 2 Abstract

In the course of the post-harvest treatment of cocoa beans, the fermentation, the pulp is microbially degraded. While the temperature constantly rises to about 45°C first ethanol, then acetic acid is produced. The conditions in the fermentation mass entail the acidification of the cotyledon tissue and an extensive proteolysis of storage proteins. The latter is carried out by endogenous proteases that are activated by acidic conditions. The cleavage activity of the proteases as well as the conservative amino acid sequences of storage proteins provide a defined pattern of flavor precursors of cocoa. In the study at hand seeds have been incubated under conditions analog to those of the fermentation. Media with different pH-values – all in the acid range – and different organic acids have been used. The basic effects of these factors on the seed with regard to the proteolysis are examined. In order to imitate the temperature conditions of fermentation, incubations are carried out under the influence of different temperature-regimes.

The highest content of free amino acids is achieved under the influence of a pH-value of 2.9, an acetic acid concentration of 100mM and a constant temperature of 41°C. A temperature of about 50°C as well as an acetic acid concentration higher than 300mM lead to a damage of the cell membrane. This destruction of the seed tissue and the following release of phenolic compounds can be verified by the detection of the latter in the medium.

The direct impact of these external factors is delayed by the presence of an intact seed coat. This structural component is considered as a barrier between incubation medium and seed storage tissue.

A so far hardly studied strongly swellable layer of mucilage is of particular importance. It is formed out of slime containers by swelling after removal of the pulp by treating the seed with Pectinex BE XXL<sup>®</sup>. Even in seeds with an intact pulp this mucilage is proven to be present in special cavities or caverns in the outer layer of the testa.

Further analyzes demonstrate that the prominent hydrolysis products of the mucilage are amino acids. Only a few free sugars are detectable. The electrophoretic analysis of the mucilage demonstrates that about 30 proteins can be separated by SDS electrophoresis. Via HPLC-MS three of those proteins could be characterized. These proteins were shown to have an antifungal effect. The importance of these proteins for seed germination and fermentation is discussed.

### 3 Einleitung

Um zu dem Handelsprodukt Rohkakao zu gelangen, müssen frische Kakaosamen einer Nacherntebehandlung, der Fermentation, unterzogen werden. Hierbei läuft eine Vielzahl biochemischer Prozesse ab, die in ihrer Gesamtheit zum Produkt „Rohkakao“ führen.

Unter natürlichen Bedingungen beginnt der Kakaosamen nach der Reifung und der Freisetzung aus der Frucht mit der Keimung, die unter anderem biochemisch durch eine Spaltung der Speicherproteine durch zwei gut beschriebene sameneigene Enzyme, der Aspartylendoprotease und der Carboxypeptidase, gekennzeichnet ist (Voigt et al., 1994a, Stoll, 2010) und wächst dann nach den typischen entwicklungsspezifischen Prozessen dikotyle Pflanzen zu einer neuen Kakaopflanze heran. Dieser Vorgang wird in der Nachernteprozessierung, der Fermentation, die zum Handelsprodukt Rohkakao führt, massiv verändert und führt letztendlich dazu, dass die Entwicklung zur Pflanze verhindert wird.

Die Fermentation des Kakaosamens, lässt sich in verschiedene Phasen aufteilen (Lopez und Dimick, 1995). In der anaeroben Phase zu Beginn der Fermentation erfolgt eine Besiedelung der Pulpa mit Hefen und mit Milchsäurebakterien. Die Hefen vergären die zuckerhaltige Pulpa zu Ethanol und die Milchsäurebakterien produzieren aus dem Zucker vor allem Milchsäure (Schwan und Wheals, 2004). Durch diesen mikrobiellen Abbau verflüssigt sich die Pulpa und läuft aus der angehäuften Kakaosamenmasse ab. Die Verflüssigung der Pulpa erfolgt durch Pektinasen, die von Hefen in der Fermentationsmasse freigesetzt werden (Schwan und Wheals, 2004). Die anaerobe Phase dauert in der Regel zwischen 24 und 48 Stunden und wird durch das Abfließen der Pulpa und das mechanische Wenden der Fermentationsmasse beendet, bei der der Sauerstoffzutritt forciert wird. Der in die Fermentationsmasse eintretende Sauerstoff ist die Voraussetzung für die Umsetzung des vorhandenen Alkohols zu Essigsäure durch Essigsäurebakterien. Die Alkoholoxidation ist ein stark exothermer Prozess, durch den die Fermentationsmasse auf bis zu 55°C erhitzt wird. Aufgrund der Ansäuerung des Gewebes durch die entstehende Essigsäure kombiniert mit dem Temperaturanstieg stirbt der Kakaosamen ab. Die Zellkompartimentierung geht verloren. Die Essigsäure kann das Gewebe der Samen auf einen pH-Wert von 4,0 – 4,5 ansäuern (Biehl, 1973).

Während die oben genannten Prozesse in der Fermentationsmasse ablaufen, erfolgt zeitgleich ein Abbau der Speicherproteine innerhalb der Samen. Dieser Abbau erfolgt zuerst durch die Aspartylendoprotease, die die Speicherproteine hydrolytisch im Bereich der hydrophoben Aminosäuren zu Oligopeptiden mit hydrophoben Enden spaltet. Die Aspartylendoprotease hat

ein pH-Optimum von 3,4 (Biehl et al., 1991) und wird daher erst nach der Ansäuerung des Gewebes durch die eindringende Essigsäure aktiviert. Die entstehenden Peptide werden von der Carboxypeptidase in einzelne Aminosäuren gespalten. Die Carboxypeptidase mit einem pH-Optimum von 5,8 (Kratzer et al., 2009; Stoll, 2010) wird nun, nachdem der pH-Wert des Gewebes durch die Pufferwirkung der entstehenden Peptide und freien Aminosäuren gegenüber der eindringenden Säure wieder angehoben wurde, aktiv. Durch die Pufferwirkung der entstehenden freien Aminosäuren und Peptide steigt der pH-Wert innerhalb der Samen an und es erfolgt zusätzlich eine enzymatische Oxidation der Polyphenole (Lieberei et al., 2013). Durch die Aufhebung der Zellkompartimentierung werden die in den Idioblasten gespeicherten Polyphenole und Anthocyane ausgeschwemmt und kommen nun mit dem sie oxidierenden Enzym, der Polyphenoloxidase, in Kontakt. Durch diesen enzymatisch katalysierten Prozess erfolgt eine Vergerbung der Proteine und es entstehen polymere Bräunungsprodukte, wodurch ein Großteil der Polyphenole und noch vorhandene Proteine in unlösliche Verbindungen überführt werden. Neben dem Speicherproteinabbau erfolgt auch eine Spaltung der sameneigenen Saccharose durch das Enzym Invertase in Glucose und Fructose während der Fermentation. Da die Invertase ein pH-Optimum von 4,5 hat (Hansen et al., 1998), kann sich ihre Aktivität während der Ansäuerung des Gewebes steigern. Die entstehenden reduzierenden Zucker sind wichtige Aromavorstufen, da sie während der Röstung in Kombination mit den freien Aminosäuren in Maillardreaktionen unter anderem das Schokoladenaroma bilden (z. B. Noor-Soffalina et al., 2009).

Die oben genannten Prozesse bieten die Möglichkeit an vielen Stellen durch eine Veränderung der Bedingungen in die Fermentation einzugreifen. Dies verändert auch den Ablauf der Prozesse innerhalb des Samens und damit auch die Zusammensetzung der Aromavorstufen. Um eine Aussage über die Veränderungen treffen zu können, müssen die Fermentationsbedingungen sorgfältig eingestellt werden. Außerdem beeinflussen sich die einzelnen Faktoren gegenseitig, so dass auch diese Wechselwirkungen bei der Untersuchung der einzelnen Parameter berücksichtigt werden müssen. Aus diesem Grund werden für die Bewertung der einzelnen Faktoren keine Fermentationen unter natürlichen Bedingungen, sondern Inkubationen im Labormaßstab durchgeführt, da so die Steuerung der einzelnen Parameter weitgehend unabhängig von anderen Einflüssen möglich ist. Ist die Auswirkung einzelner Faktoren auf die sameninternen Prozesse bekannt und damit auch auf die Entstehung der wichtigen Aromavorstufen, kann durch die Veränderung der Parameter gezielt

in diese Prozesse eingegriffen werden. Dieses bedeutet, dass sich dadurch die Qualität und die Menge der entstehenden Aromavorstufen regulieren lassen.

Die Durchführung fermentationsähnlicher Inkubationen im Labormaßstab ermöglicht die exakte Einstellung der verschiedenen Parameter und deren gezielte Veränderung. Dadurch kann der Einfluss auf die sameninternen Prozesse nachverfolgt werden. Durch diese Steuerung können die Auswirkungen der unterschiedlichen Parameter auf die sameninternen Prozesse erfasst werden. Wichtige Faktoren der Fermentation sind die Temperatur, die entstehenden Säuren (Essig- und Milchsäure) und deren Konzentrationen, der pH-Wert, die Sauerstoffverfügbarkeit und die Durchlässigkeit der Samenschale für die außerhalb des Samens vorhandenen Substanzen. Die Variationen der einzelnen Parameter beinhalten fermentationsähnliche und niedrigere sowie höhere Werte als bei der Fermentation, um ein möglichst breites Spektrum der verschiedenen Faktoren zu erproben.

Alle diese Parameter, mit Ausnahme der Sauerstoffverfügbarkeit, wurden in unterschiedlichen Kombinationen untereinander in verschiedenen Inkubationen auf ihre Auswirkungen in Bezug auf den Gehalt an freien Aminosäuren und an Polyphenolen getestet. Die Sauerstoffverfügbarkeit blieb in allen getesteten Inkubationen unverändert.

Ziel dieser Faktorkombinationen ist es eine Aussage treffen zu können, welche Kombination zu einer bestimmten gewünschten Qualität, wie z.B. einem hohen Gehalt an freien Aminosäuren, führt, um so optimale Bedingungen für verschiedene Rohkakaosqualitäten für die unterschiedlichsten Schokoladenprodukte zu entwickeln.

Bei einer gelenkten Fermentation ist es zusätzlich wichtig zu erforschen, welchen Einfluss die Samenschale auf den Fermentationsverlauf hat, denn die Testa stellt eine natürliche Barriere zwischen dem Außenmedium und dem Sameninneren dar. Wie weit ist eine Regulation beim Vorhandensein einer Testa möglich und in welchem Maße und zu welchem Zeitpunkt beeinflusst diese Barriere den Reaktionsablauf?

Zur Klärung des Stoffaustausches während der Fermentation, bei der sowohl außerhalb als auch innerhalb der Samen biochemische Vorgänge ablaufen, bedarf es einer näheren Untersuchung. Andersson et al. (2006) konnten zeigen, dass die Samenschale des Kakaos für Luciferingelb CH, einem Fluoreszenzfarbstoff mit einer ähnlichen Dissoziationskonstanten wie Essigsäure, im frischen Samenstadium undurchlässig ist. Nicht nur die Permeabilität selber ist wichtig für das Verständnis der Funktion der Testa, sondern auch der Zeitpunkt, ob

und ab wann die Testa durchlässig wird. Ist die Testa zu Beginn der Fermentation für Stoffe von außerhalb undurchlässig, ist eine Beeinflussung der biochemischen Reaktionen im Samen nur durch Faktoren möglich, die nicht auf einem Stoffaustausch beruhen, wie z. B. die Temperatur. Daher ist der Einfluss der Samenschale des Kakaos auf die Fermentation ein wichtiger zu untersuchender Aspekt. Die Durchlässigkeit der Testa bestimmt, welche Stoffe in den Samen oder aus ihm heraus gelangen. Durch einen Stoffaustausch können die biochemischen Prozesse innerhalb der Samen beeinflusst werden, z.B. durch die Ansäuerung des Gewebes aufgrund der eindringenden Säuren (Rodriguez-Campos et al., 2011).

Da die Entwicklung der Samen zu Beginn der Fermentation noch keimungsähnlich ist (Stoll, 2010), liegt ein besonderes Augenmerk auf der Radicula. Diese streckt sich zu Beginn der Keimung rein physikalisch durch Wasseraufnahme und durchstößt dabei die Testa an der Mikropyle. Dieses Durchstoßen führt dazu, dass die Stoffaustauschbarriere Testa durchlässig wird. Damit können Substanzen ungehindert von außen nach innen und umgekehrt gelangen und Einfluss auf die im Samen ablaufenden Reaktionen nehmen.

Zur Klärung, ob es während der Inkubation zu einem Durchstoßen der Testa durch die Radicula kommt und wenn ja, zu welchem Zeitpunkt dies erfolgt, wird die Samenschale unterschiedlich lang inkubierter Samen im Rasterelektronenmikroskop auf Veränderungen ihrer Struktur im Bereich der Mikropyle untersucht. Als Vergleich dienen die Samenschalen nicht inkubierter Samen.

Zusätzlich weist die Samenschale von *Theobroma cacao* L. eine Besonderheit auf: Sie besitzt eine Schleimschicht direkt unterhalb der äußeren Epidermis. Dieser Schleim wurde bisher in der Literatur zu *Theobroma cacao* L. nicht näher beschrieben, auch ist zu seiner chemischen Zusammensetzung nichts bekannt. Daher besteht die grundsätzlich Möglichkeit, dass bei seinem Abbau durch Mikroorganismen potenzielle Wirkstoffe (z.B. Aromavorstufen) freigesetzt werden. Ebenso kann er als Bestandteil der Samenschale Auswirkungen auf den Fermentationsverlauf haben.

Inkubationen mit unterschiedlich behandelten Samen (entpulppte Samen und Samen ohne Testa) sollen einen potentiellen Einfluss dieses Schleims auf die Fermentation aufklären.

Eine Untersuchung der chemischen Zusammensetzung soll klären, welche Funktion dieser Schleim im lebenden, keimenden Samen haben kann und ob er zur Bildung von Aromavorstufen während der Fermentation beitragen kann.

Somit gliedert sich die vorliegende Arbeit in einen biotechnologischen Teil, dessen Schwerpunkt die Ergebnisse der Inkubationen bilden, einen strukturellen Teil, der sich mit den morphologischen Aspekten der Testa befasst und einen analytischen Teil, in dem die biochemische Analyse und die biologische Wertigkeit des innerhalb der Testa befindlichen Schleims behandelt wird.

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Inkubationen**

Zum besseren Verständnis der Abläufe während der Kakaofermentationen wurden Inkubationsversuche mit frischen Kakaosamen in verschiedenen säurehaltigen Medien unter Laborbedingungen durchgeführt, bei denen fermentationsbestimmende Faktoren wie Temperatur, Säurekonzentration und –art, sowie der pH-Wert vorgegeben waren. Bei allen Inkubationen erfolgte eine Stickstoffbegasung (Durchflußgeschwindigkeit: 15NI/h) zur Schaffung anaerober Bedingungen während der ersten 48 Stunden. In den zweiten 48 Stunden erfolgte eine Begasung mit Luft (Durchflußgeschwindigkeit: 15NI/h) für aerobe Bedingungen. Als Kontrolle dienten Inkubationen mit destilliertem Wasser anstelle der Säuremedien. Inkubiert wurden frische, aus der Frucht entfernte und von der Plazenta befreite Kakaosamen. Die Kakaofrüchte stammten von der Elfenbeinküste und wurden direkt nach der Ernte versendet.

#### **4.1.1 Inkubationstemperaturen**

Es wurden Inkubationen unter konstanten Temperaturen über den Zeitraum von 0-96h durchgeführt. Angewendete Temperaturen waren 37°C, 41°C, 50°C und 60°C. Ebenso wurden Inkubationen mit Temperaturgradienten durchgeführt. Ein Gradient mit dem Temperaturverlauf 0-24h 30°C, 24-48h 35°C und 48-96h 55°C (im Folgenden mit 30-35-55°C abgekürzt), der andere Gradient mit 0-48h 37°C und 48-96h 50°C (im Folgenden mit 37-50°C abgekürzt). Eine genaue Auflistung der einzelnen Inkubationsversuche befindet sich im Anhang (s. Tab. 12-1).

#### **4.1.2 Säurekonzentration und –art**

Neben Inkubationen mit reiner Essig- und Milchsäure als Medium wurden auch Inkubationen mit Essig-/Milchsäuregemischen zu gleichen Teilen durchgeführt. Bei den Gemischen bezieht sich die Konzentration [mmol/l] auf jede Säure für sich, z. B. enthält das Gemisch mit der Bezeichnung „25mmol/l Essig-/Milchsäure“ 25mmol/l Essigsäure und 25mmol/l Milchsäure.

Gewählte Konzentrationen waren 12,5mmol/l (im Weiteren mit mM abgekürzt), 25mM, 50mM, 100mM, 300mM, 600mM und 1000mM. Eine genaue Auflistung der einzelnen Inkubationsvariationen befindet sich im Anhang (s. Tab. 12-1).

Es wurden auch sogenannte trockene Inkubationen durchgeführt. Trocken bezeichnet Inkubationen, bei denen nur die der gewählten Konzentration entsprechende Säuremenge ohne Zugabe von destilliertem Wasser verwendet wurde. Am Beispiel der trockenen 300mM Essigsäureinkubation bedeutet dies eine Zugabe von 2,57ml Essigsäure (entspricht der Säuremenge von 150ml einer 300mM-Lösung) auf die zu inkubierenden Kakaosamen.

### **4.1.3 pH-Werte**

Die pH-Werte der verschiedenen Inkubationsmedien wurden, falls diese nicht mit ihrem natürlichen pH-Wert verwendet wurden, mit 1mol/l NaOH-Lösung eingestellt. Folgende pH-Werte wurden eingestellt: 2,3, 2,4, 2,5, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 4,4, 4,5, 5,5, 5,8.

### **4.1.4 Vorbehandlung der Samen**

Für die einzelnen Inkubationen wurden drei verschiedene Vorbehandlungen der Kakaosamen verwendet. Eine Variante waren Samen, die keiner Vorbehandlung unterzogen wurden, im weiteren Verlauf „unbehandelte Samen“ genannt. Für die zweite Variante „entpulperte Samen“ wurde die Pulpa der Samen vor Inkubationsbeginn enzymatisch mittels Pectinex<sup>®</sup> BE XXL (bestehend aus Polygalacturonase und Pektinlyase) entfernt. Dies erfolgte über Nacht bei 35°C in destilliertem Wasser bei einem pH-Wert von 4,5. Die so behandelten Samen wurden direkt im Anschluss in die Inkubationsmedien überführt. Als dritte Variante „Samen ohne Testa“ wurden Samen verwendet, deren komplette Testa inklusive der Pulpa entfernt wurde.

## **4.2 Entfetten der Kakaosamen**

Zum Entfetten wurden gefriergetrocknete Kakaosamen ohne Testa verwendet. Je 2g Material wurden mit 10ml n-Hexan in einer Kugelmühle 10 Minuten bei einer Frequenz von 20/s zerkleinert. Anschließend wurde das Mahlgut mit 3 mal 25ml Petrolether quantitativ auf einen

Filter überführt und mittels Vakuum filtriert. Der Rückstand wurde im Vakuumtrockner getrocknet und das fettfreie Kakaopulver bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

### **4.3 Gewinnung des Kakaoschleims**

Frische Kakaosamen einer Frucht wurden über Nacht mit 0,5ml Pectinex® BE XXL in 250ml destilliertem Wasser bei pH 4,5 und 37°C inkubiert. Anschließend konnte die verdaute Pulpa abgewaschen werden und die entpulpten Samen wurden eine weitere Nacht in 5ml destilliertem Wasser pro Samen zum Quellen belassen. Die gebildete Schleimschicht wurde mit einem Skalpell von den Samen entfernt, gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei -18°C aufbewahrt.

### **4.4 HPLC**

Bei der HPLC handelt es sich um ein säulenchromatographisches Flüssig-Trennverfahren. In der mobilen Phase, dem Laufmittel, wird das zu trennende Substanzgemisch gelöst und auf die Säule aufgetragen. Die Trennung beruht auf der unterschiedlichen Adsorption der Substanzen an die Säulenmatrix (stationäre Phase), von der die Substanzen zu unterschiedlichen Retentionszeiten eluiert werden. Bei der Reversed Phase HPLC (RP-HPLC) werden unpolare stationäre Phasen und polare mobile Phasen verwendet. Für die stationäre Phase werden Kieselgele verwendet, deren Oberflächen mit Alkylgruppen unterschiedlicher Länge modifiziert sind. Autosampler: Merck Hitachi AS-2000 und Waters 717 plus, Pumpen: Knauer Smartline Pump 1000, UV-Detektor: Merck Hitachi F-1050 Fluorescence Spectrometer, PDA-Detektor: Waters 996 Photodiode Array Detector.

#### **4.4.1 Bestimmung der freien Aminosäuren**

100mg entfettetes Kakaopulver wurden in ein 50ml Zentrifugenglas eingewogen und mit 0,3g PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon) versetzt. Nach Zufügen von 5ml destilliertem Wasser, welches mit 50%iger wässriger Trifluoressigsäure auf einen pH von 2,0 voreingestellt war, wurde der pH-Wert mit 50%iger wässriger Trifluoressigsäure auf 2,5 eingestellt. Weitere 5ml der trifluoressigsäuren Lösung wurden addiert. Das Kakaopulver wurde 1h mittels

Magnetrührer auf Eis extrahiert und die so erhaltene Suspension bei 5000 U/min (Heraeus Thermoscientific Megafuge 11R) 10 Minuten zentrifugiert. Der klare Probenüberstand wurde durch ein 0,45µm Filter gegeben und 30µl dieses Filtrats in einem HPLC-Probenvial eine Stunde bei -20°C und 0,05mbar gefriergetrocknet. Zur Vermessung wurde zu der gefriergetrockneten Probe 800µl Boratpuffer gegeben und kurz vor der Injektion 400µl OPA-Reagenz (o-Phtaldialdehyd-Reagenz) addiert. Nach 2 Minuten wurden 20µl dieses Gemisches in die HPLC-Anlage injiziert. Der verwendete Polaritätsgradient ist in Tab. 4-1 aufgeführt. Als Laufmittel A wurde ein Gemisch aus Natriumacetatlösung, Methanol und Tetrahydrofuran (1600/50/20) (v/v/v), als Laufmittel B ein Gemisch aus Natriumacetatlösung und Methanol (200/800) (v/v/v) verwendet.

Reagenzien:

Boratpuffer (200mM; pH 9,5): 12,38g Borsäure werden in 800ml Wasser gelöst und mit konzentrierter KOH auf pH 9,5 eingestellt. Die Lösung wird 5 Minuten aufgekocht und mit gekochtem Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Die Lagerung erfolgt im Kühlschrank bei 4°C.

OPA-Reagenz: 100mg o-Phtaldialdehyd werden in 2,5ml Methanol gelöst. Anschließend werden 22,4ml Boratpuffer pH 9,5 und 100µl 2-Mercaptoethanol addiert. Das OPA-Reagenz muss 24 Stunden vor der Verwendung hergestellt werden.

Laufmittel:  
A: 1,6 Liter 50mM Natriumacetat-Lösung pH 6,2, 50ml Methanol lichrosolv gradient grade, 20ml Tetrahydrofuran lichrosolv  
B: 200ml 50mM Natriumacetat-Lösung pH 6,2, 800ml Methanol lichrosolv gradient grade

Bei allen Lösungsmitteln, die bei der HPLC verwendet wurden, handelt es sich um Chemikalien mit der Reinheitsstufe „HPLC gradient grade“.

Die Trennung der freien Aminosäuren erfolgte mit einer LiChroCART 250-4 Trennsäule und einer vorgeschalteten Lichrospher 100 RP-18 Vorsäule. Bei einer Säulentemperatur von 30°C betrug die Fließgeschwindigkeit 1,3ml/min.

#### 4.4.2 Bestimmung der Polyphenole und Anthocyane

100mg entfettetes Kakaopulver wurden in ein Zentrifugenglas eingewogen, 3ml Methanol addiert und 20-30 Sekunden mit Hilfe eines Ultraturrax T25 extrahiert. Mit 2ml Methanol wurde der Rührstab abgespült und die extrahierte Probe 15min im Eisbad stehen gelassen, danach wurde die Probe bei 5000 U/min (Heraeus Thermoscientific Megafuge 11R) 10 Minuten zentrifugiert. Der klare methanolische Überstand wurde in einen Spitzkolben dekantiert.

**Tab. 4-1: Polaritätsgradient zur Auftrennung der freien Aminosäuren.**

Laufmittel A: Natriumacetatlg./Methanol/Tetrahydrofuran(1600/50/20)(v/v/v), Laufmittel B: Natriumacetatlg./Methanol (200/800)(v/v/v)

Zeit [min]	Fließgeschwindigkeit [ml/min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	1,3	100	0
2	1,3	85	15
15	1,3	70	30
21	1,3	70	30
40	1,3	0	100
45	1,3	0	100
50	1,3	100	0
55	1,3	100	0

**Tab. 4-2: Polaritätsgradient zur Auftrennung der Polyphenole und Anthocyane**

Laufmittel A: 2% Essigsäure, Laufmittel B: Acetonitril/Wasser/Eisessig (400/90/10)(v/v/v)

Zeit [min]	Fließgeschwindigkeit [ml/min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel 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

Dieser Extraktionsvorgang wurde zweimal mit nur zweiminütiger Eisbadbehandlung wiederholt. Die vereinigten Methanolextrakte wurden am Rotationsverdampfer bei 40°C / 100mbar bis zur Trockne eingengt und der Rückstand in 3ml Methanol (lichrosolv) aufgenommen. Nach abschließender Filtration durch Einmalfilter (0,45µm) wurde die Probe gegen eine Eichlösung mit Hilfe der HPLC vermessen. Das Injektionsvolumen betrug 20µl. Die Trennung der phenolischen Substanzen erfolgte mit einer Merck LiChroCART 250-4 Trennsäule bei einer Säulentemperatur von 26°C. Der verwendete Polaritätsgradient ist in der Tab. 4-2 aufgeführt. Als Laufmittel A wurde 2%ige Essigsäure, als Laufmittel B ein Gemisch aus Acetonitril, Wasser und Eisessig (400/90/10, v/v/v) verwendet.

### **4.4.3 Bestimmung der Monosaccharide**

30mg gefriergetrockneter bzw. hydrolysierter getrockneter Schleim wurden mit 4ml Pyridin und 0,5ml Benzoylchlorid versetzt. Die Hydrolyse erfolgte mittels 37%iger Salzsäure bei 100°C über Nacht. Dieses Gemisch wurde zur Derivatisierung im verschlossenen Gefäß 1h bei 60°C im Ultraschallbad inkubiert. Alle 15min wurde die Probe geschwenkt. Anschließend wurden 0,5ml Methanol zugegeben. Nach 10min wurde mit 40ml destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Lösung wurde portionsweise mittels Vakuum durch eine Sepak-RP-18-Kartusche filtriert, anschließend wurde mit 4x 5ml destilliertem Wasser nachgespült. Die Spülflüssigkeit wurde verworfen. Mit 10x 5ml einer Mischung aus Acetonitril/Wasser/tert. Butylmethylether (250/150/35) (v/v/v) wurden die Zuckerderivate aus der Kartusche in einen 50ml Meßkolben eluiert. Dieser wurde bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung wurde für die HPLC-Bestimmung verwendet. Die Vermessung erfolgte isokratisch mit einer Mischung aus Acetonitril/Wasser/tert. Butylmethylether (250/150/35)(v/v/v) mit einer LiChroCART 250-4 Trennsäule bei 21°C und einer Fließgeschwindigkeit von 1,0ml/min. Die UV-Detektion erfolgte bei 230nm.

### **4.4.4 Massenspektrometrische Charakterisierung der Schleimproteine**

Die folgenden Arbeiten wurden durch die Arbeitsgruppe von Dr. Friedrich Buck am Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Der frische Schleim wurde in Lämmli-Puffer (5fach konzentriert: 5ml 10% SDS-Lsg., 1,25ml 2mol/l Tris pH 6,8, 0,7707g DTT, 3ml Glycerin, Spatelspitze Bromphenolblau) gelöst und 5min auf 95°C erhitzt. Die Proteine wurden mittels einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel bestand aus einem 12%igen Acrylamid-Trenngel und einen 4%igen Acrylamid-Sammelgel. An das Gel wurde eine Spannung von 64V für das Sammelgel und von 120V für das Trenngel angelegt und anschließend mit Coomassie G gefärbt. Die intensivsten Banden wurden ausgeschnitten, die Proteine mit DTT (Dithiothreitol) (10mM, 56°C, 30min) reduziert, die Cysteine mit Iodacetamid (55mM, Raumtemperatur, 20min im Dunkeln) modifiziert und die Proteine im Gel mit Trypsin (5ng/µl Trypsin in 50mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lsg., 37°C, über Nacht) verdaut. Nach dem Verdau wurden die Gelstücke wiederholt extrahiert (50% Acetonitril und 5% Ameisensäure, gemischt), die vereinigten Extrakte im Vacuumtrockner getrocknet, in einem Gemisch aus 5% Methanol und 5% Ameisensäure wieder gelöst. Die gelösten Peptide wurden über eine C18mZipTip-Spritze (Millipore) entsalzt und mit 1µl eines Gemisches aus 60% Methanol und 5% Ameisensäure eluiert. Die Probe wurde durch Nanoelektrospray-Massenspektrometrie an einem QTOF II-Tandem-Massenspektrometer (Micromass, Manchester) analysiert. Die MS/MS Spektren, erhalten durch kollisioninduzierte Fragmentierung der Peptide, wurden manuell und mittels Mascot MS/MS-Ionen-Suchalgorithmen ausgewertet.

## **4.5 Mikroskopie**

### **4.5.1 Lichtmikroskopie**

Mit Lichtmikroskopen kann man kleine Strukturen durch die Ausnutzung optischer Effekte soweit vergrößern, dass sie für das menschliche Auge sichtbar werden. Bei der Durchlichtmikroskopie wird das Licht vom Objektiv des Mikroskops aufgefangen nachdem es durch das Präparat geleitet wurde. Daher werden für diese Art der Mikroskopie sehr dünne oder durchsichtige Präparate benötigt. Durch verschiedene Färbemethoden können unterschiedliche Strukturen der Präparate angefärbt und so die optische Darstellung noch verbessert werden. Toluidinblau ist ein blauer, metachromatischer Farbstoff, der für histologische Färbungen Verwendung findet. Er eignet sich gut für in Kunstharz eingebettete Präparate, da er in der Lage ist das dichte Kunstharz zu durchdringen und die eingebetteten Proben zu färben.

#### **4.5.1.1 Einbettung von Testgewebe in LR White Medium Grade™**

Testgewebe, das für mindestens 24 h in 4%iger Formaldehydlösung fixiert wurde, wurde mit einem Skalpell in ungefähr 4mm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten.

Zuerst wurde das Gewebe in einer Ethanolreihe vollständig entwässert. Die in Eppendorfgläser überführten Präparate wurden 2x 0,5h in 70%igem Ethanol p.a. und 2x 0,5h in 96% Ethanol p.a. entwässert. Anschließend wurden sie für 1h in 100% LR White Medium Grade™ überführt. Danach wurde das Medium gegen frisches ausgetauscht und die Präparate über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Überführung der Präparate in 0,36cm<sup>3</sup> fassende Gelatinekapseln, die mit LR White Medium Grade™ gefüllt wurden. Zum Polymerisieren des Kunstharzes wurden diese Kapseln bei 60°C im Vakuumtrockenschrank 24h inkubiert. Vor der Weiterverwendung wurden die Kapseln einige Tage bei Raumtemperatur gelagert.

#### **4.5.1.2 Erstellen von Semidünnschnitten**

Mittels einer Rasierklinge wurden die ausgehärteten Kunstharzpräparate angespitzt und anschließend im Ultramikrotom eingespannt. Mit frisch hergestellten Glasmessern wurden 1,5 bis 2,0µm dicke Schnitte hergestellt, welche anschließend auf Objektträger übertragen wurden. Die Objektträger wurden für kurze Zeit auf eine Heizplatte gelegt um die Schnitte zu glätten und sie fest an die Objektträger antrocknen zu lassen.

#### **4.5.1.3 Färbung der Präparate**

Für die Färbung der Dünnschnitte wurde Toluidinblau O verwendet. Dafür wurden die Objektträger mit einer 0,05% (w/v) Toluidinblau O-Lösung überschichtet, die wenige Minuten einwirkte. Danach wurde die Lösung mit destilliertem Wasser abgespült und der Objektträger auf einer Heizplatte getrocknet. Toluidinblau O färbt Cytoplasma und unverholzte Zellwände violett und phenolhaltige Zellen blaugrün (O'Brien et al., 1965).

## 4.5.2 Rasterelektronenmikroskopie

Das Rasterelektronenmikroskop ist ein Elektronenmikroskop, bei dem ein Elektronenstrahl die Oberfläche in einem bestimmten Muster abtastet. Die Wechselwirkung der Elektronen mit dem Objekt werden zur Wiedergabe der Oberfläche des Objektes genutzt.

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurde die Pulpa von den Kakaosamen mit Pectinex® BE XXL entfernt, um die Testoberfläche freizulegen. Die Proben wurden in 4%iger Formaldehyd-Lösung mindestens 24h fixiert und in einer Ethanol-Reihe [30-100% (v / v) in Wasser] dehydriert. Anschließend wurden die Proben gefriergetrocknet, auf Aluminium-Stubs geklebt und mit Gold in einem Sputter-Coater überzogen. Die Aufnahmen der Explantate erfolgten mit einem Philips XL 20 Rasterelektronenmikroskop.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Inkubationen

Zur Bildung des typischen Kakaoaromas ist eine Fermentation der frischen Kakaosamen erforderlich, da erst durch die während der Fermentation ablaufenden Prozesse die erforderlichen Aromavorstufen gebildet werden. Diese Vorstufen sind primär Abbauprodukte der Speicherproteine der Kakaosamen, Oligopeptide und freie Aminosäuren (Biehl und Voigt, 1994). Ein gutes Kakaoaroma wird vor allem durch das Zusammenspiel zweier Enzyme, der Aspartylendoprotease und der Carboxypeptidase, erreicht. Die Enzyme haben unterschiedliche pH-Optima, so dass sie zu unterschiedlichen Ansäuerungsstufen während der Fermentation besonders aktiv sind. Es ist wichtig, dass die Aspartylendoprotease zu Beginn der Fermentation aktiviert wird und im späteren Verlauf die Carboxypeptidase, denn so entstehen aus den Speicherproteinen aus spezifischen Spaltungen erst Peptide und dann daraus freie Aminosäuren. Voigt et al. (1994) konnten zeigen, dass die Bildung der Aromavorstufen aus den Speicherproteinen auch ohne den Pulpaabbau unter aseptischen Bedingungen durch eine Erwärmung auf 45-50°C und ein Ansäuern auf pH 5,0 erreicht werden kann. Bei diesen Inkubationen erfolgt eine Umsetzung der Speicherproteine durch die beiden sameneigenen Enzyme und es entstehen die für das Aroma wichtigen hydrophilen Oligopeptide und hydrophoben Aminosäuren.

Da die Entwicklung des Kakaoaromas grundsätzlich unabhängig von einer mikrobiell gesteuerten Fermentation möglich ist, bietet sich hier die Entwicklung eines biotechnologischen Ansatzes zur Produktion eines guten Rohkakaos. Inkubationen könnten die Gefahr ausschließen durch Witterungseinflüsse und/oder durch schlecht durchgeführte mikrobielle Fermentationen einen minderwertigen Rohkakao zu produzieren.

Da die Inkubationen nicht von mikrobiell gesteuerten Vorgängen abhängig sind, können auch Bedingungen getestet werden, die bei natürlich ablaufenden Fermentationen nicht vorkommen. Dies bietet die Möglichkeit einzelne Parameter zu verändern und diese auf ihre Auswirkung auf das Aromapotenzial zu untersuchen.

Auf den folgenden Seiten sind die Ergebnisse verschiedenster Inkubationen dargestellt, bei denen als variable Parameter die Temperatur, die Art der Säure, deren Konzentration und pH-Wert verwendet wurden. Zusätzlich werden auch noch Inkubationen durchgeführt, bei denen die Kakaosamen vor Inkubationsbeginn unterschiedlichen Behandlungen unterzogen werden.

Neben unbehandelten Samen werden Samen verwendet, deren Pulpa enzymatisch entfernt wurde und Samen, denen neben der Pulpa auch noch die Samenschale entfernt wurde. Durch diese Vorbehandlungen soll ein potenzieller Einfluss der Samenschale auf den Inkubationsverlauf untersucht werden.

### **5.1.1 Freie Aminosäuren**

Während der fermentationsähnlichen Inkubation erfolgt ein Abbau der Speicherproteine des Kakaosamens zu freien Aminosäuren mittels zweier sameneigener Proteasen, der Aspartylendoprotease und der Carboxypeptidase (Voigt et al., 1994b). Die Aspartylendoprotease spaltet die Speicherproteine hydrolytisch im Bereich der hydrophoben Aminosäuren zu Oligopeptiden mit hydrophoben Enden, dabei zeigt sie Spaltungsmuster ähnlich denen von Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin, während weitere Spaltungsstellen bisher ungeklärt sind (Zacharias, 2012). Anschließend spaltet die Carboxypeptidase einzelne Aminosäuren von diesen hydrophoben Oligopeptiden ab. In der Anfangsphase des Proteinabbaus entstehen so vor allem die typischen hydrophoben Aminosäuren durch die Abspaltung der hydrophoben Enden der proteolytisch gebildeten Peptide. Diese enzymatische Proteolyse durch die Exopeptidase führt im Verlauf der Inkubation zur Bildung freier Aminosäuren, die eine wichtige Vorstufe auf dem Weg zum Kakaoaroma bilden. Während der Röstung bilden sich durch Maillardreaktionen aus freien Aminosäuren und reduzierenden Zuckern die Kakaoaromen.

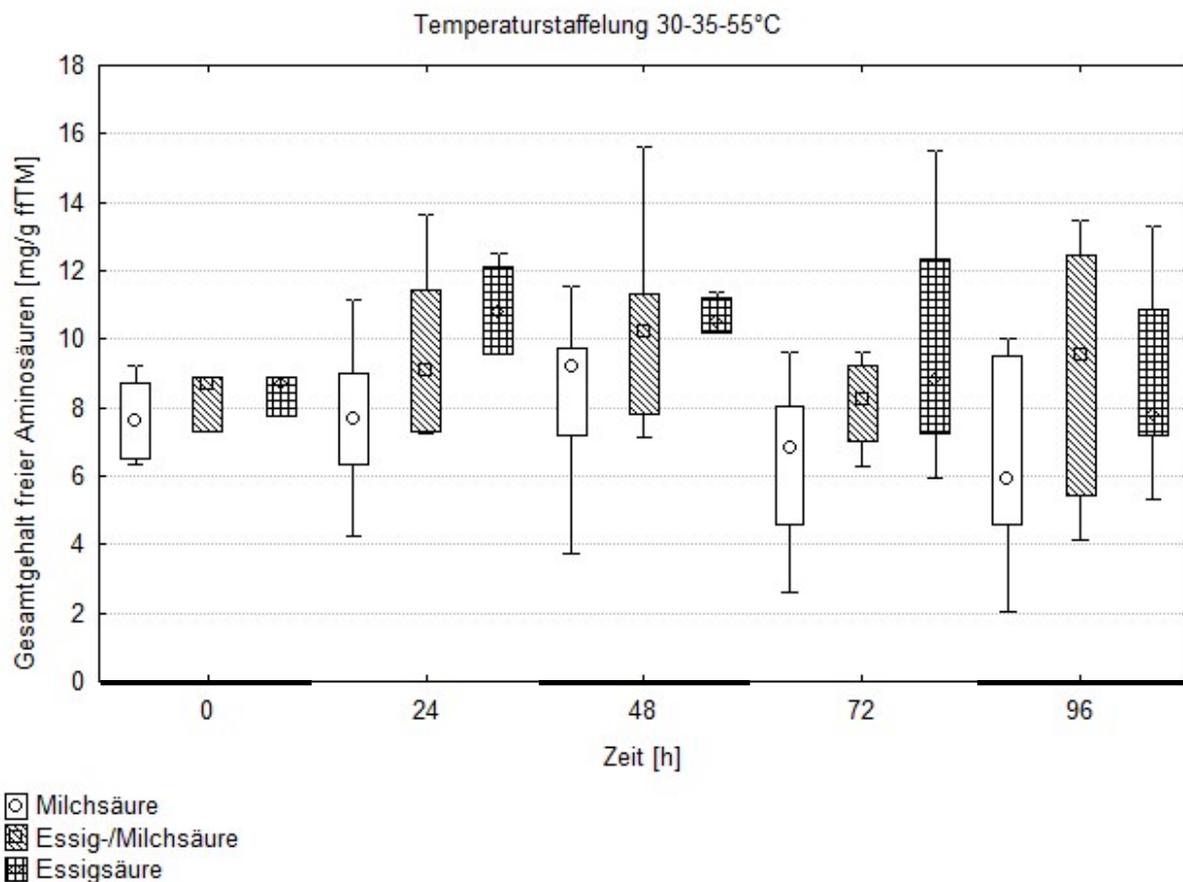
Da es sich bei den freien Aminosäuren grundsätzlich um wesentliche Faktoren bei der Aromabildung im Röstungsprozess handelt, wurden die Samen aus den verschiedenen Inkubationen zeitabhängig auf ihren Gehalt an freien Aminosäuren untersucht. Ein hoher Gehalt an freien Aminosäuren in den Samen steht prinzipiell für ein hohes Aromapotenzial.

#### **5.1.1.1 Entwicklung der freien Aminosäuren während der Inkubation**

Im Hinblick auf die Entwicklung der freien Aminosäuren während der Inkubation stellt sich die Frage, welcher oder welche Parameter die Freisetzung der Aminosäuren beeinflussen. Unter welchen Bedingungen können hohe Gehalte an freien Aminosäuren in den Kakaosamen erreicht werden, um damit eine Steigerung des Aromapotentials zu erzielen? Durch die Variation der verschiedenen Parameter wird deren Einfluss auf die Freisetzung der

Aminosäuren untersucht. Dabei werden für die einzelnen Parameter auch solche Bedingungen gewählt, die in einer Fermentation nicht erreicht werden. Die variablen Parameter Temperatur, Art der Säure, Säurekonzentration und pH-Wert, ebenso wie die Vorbehandlung der Samen werden im Weiteren genauer betrachtet. Zusätzlich zu den im Folgenden aufgeführten Inkubationstemperaturen wurden auch Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 60°C durchgeführt, bei der die proteolytischen Enzyme sehr schnell hitzedenaturiert werden, so dass keine Freisetzung von Aminosäuren auftritt (s. Tab.12-2).

#### 5.1.1.1 Temperaturverlauf mit der Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C

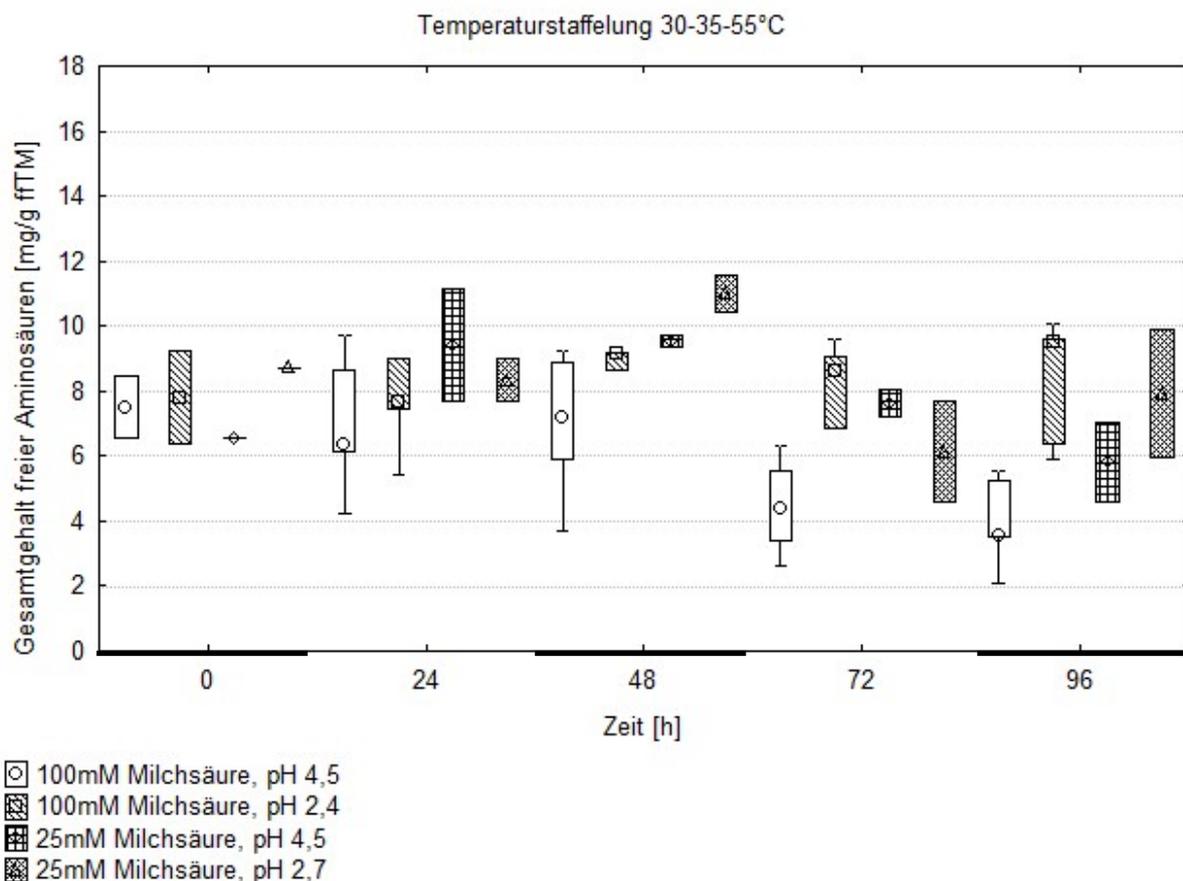


**Abbildung 5-1: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit der für das Inkubationsmedium gewählten Säure bzw. Säuregemisches.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 12,5mmol/l bis 100mmol/l. n=7-14 (zusammengefasste Daten)

Bei diesem Temperaturgradienten wurde die Temperatur schrittweise im Verlauf der 96stündigen Inkubation erhöht. Die ersten 24 Stunden betrug die Temperatur 30°C, für die nächsten 24 Stunden wurde auf 35°C erhöht, gefolgt von einer weiteren Erhöhung für die restliche Zeit auf 55°C. Zusätzlich wurde in den ersten 48 Stunden mit Stickstoff begast, um anaerobe Bedingungen zu erzeugen, danach wurde auf Luftbegasung umgestellt. Im Folgenden wird diese Staffelung mit 30-35-55°C abgekürzt.

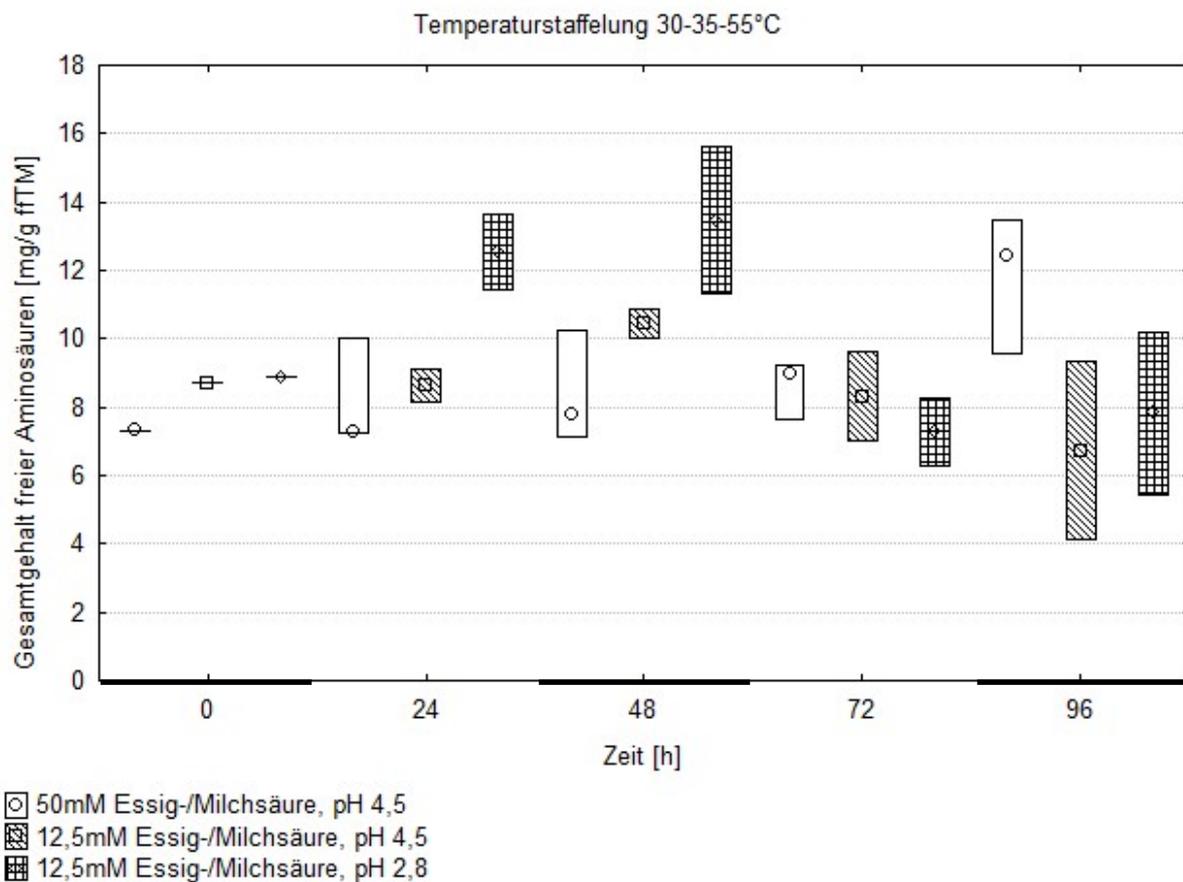
In Abbildung 5-1 sind die Resultate aller Inkubationen des genannten Temperaturverlaufes dargestellt, unabhängig von der Säurekonzentration und dem pH-Wert. Diese Darstellung legt bereits dar, dass ein Anstieg des Gesamtgehaltes an freien Aminosäuren innerhalb der ersten 48 Stunden zu beobachten ist. Danach findet eine Abnahme, ein Verlust an freien Aminosäuren statt. Diese Abnahme tritt mit der Temperaturerhöhung von 35°C auf 55°C auf.



**Abbildung 5-2: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Milchsäure bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l  
n=2-5

Inkubationen, die mit Essigsäure bzw. einem Essig-/Milchsäuregemisch durchgeführt wurden, haben im Mittel einen höheren Gesamtgehalt der Samen an freien Aminosäuren als bei reinen Milchsäureinkubationen (s. Abbildung 5-1). Die Gesamtgehalte an freien Aminosäuren der Essigsäureinkubationen unterscheiden sich nach 72 Stunden deutlich von den Resultaten der Milchsäureinkubationen, ebenso nach 96 Stunden. Bei den Inkubationen mit einem Essigsäure/Milchsäuregemisch liegen die Konzentrationen an freien Aminosäuren zwischen den beiden anderen Säureinkubationen, nach 96 Stunden unterscheiden sich die Aminosäuregehalte bei der gemischten Inkubation ebenfalls deutlich von den Milchsäureinkubationen.



**Abbildung 5-3: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit einem Essigsäure/Milchsäuregemisch bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=2-3

Bei der Temperaturstaffelung 30-35-55°C hat die Auswahl der Säure einen Einfluss auf die Freisetzung der freien Aminosäuren. Da die verschiedenen Säuren sich aber unterschiedlich auswirken, werden sie im Folgenden getrennt behandelt, um den jeweiligen Einfluss ihrer Konzentration und des pH-Wertes zu untersuchen.

Bei Einsatz von Milchsäure während der Inkubation unterscheiden sich nach 48 Stunden die beiden Milchsäureinkubationen mit einer Konzentration von 25mmol/l (im Weiteren mit mM abgekürzt) im Hinblick auf die Bildung der freien Aminosäuren nicht voneinander, ebenso verhält es sich mit den beiden 100mM-Inkubationen und den beiden Inkubationen mit einem pH-Wert von 4,5 (s. Abbildung 5-2). Die Inkubation mit einer Konzentration von 25mM und einem pH-Wert von 2,7 unterscheidet sich von der Inkubation mit einer Konzentration von 100mM und einem pH-Wert von 4,5. Bei niedrigen Milchsäurekonzentrationen werden nach 48 Stunden höhere Gehalte an freien Aminosäuren (9,5 und 11,0mg/g ffTM zu 7,2 und 9,2 mg/g ffTM) gefunden als bei höheren Konzentrationen von 100mM.

24 Stunden später unterscheiden sich weiterhin die beiden Inkubationen mit 25mM Milchsäure nicht voneinander, allerdings besteht ein deutlicher Unterschied bei den beiden Inkubationen mit 100mM Milchsäure.

Bei der Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 55°C sinken die Gehalte an freien Aminosäuren in den Samen wieder. Offensichtlich treten außer der Proteolyse auch Prozesse auf, bei denen Aminosäuren aus den Samen verlorengehen.

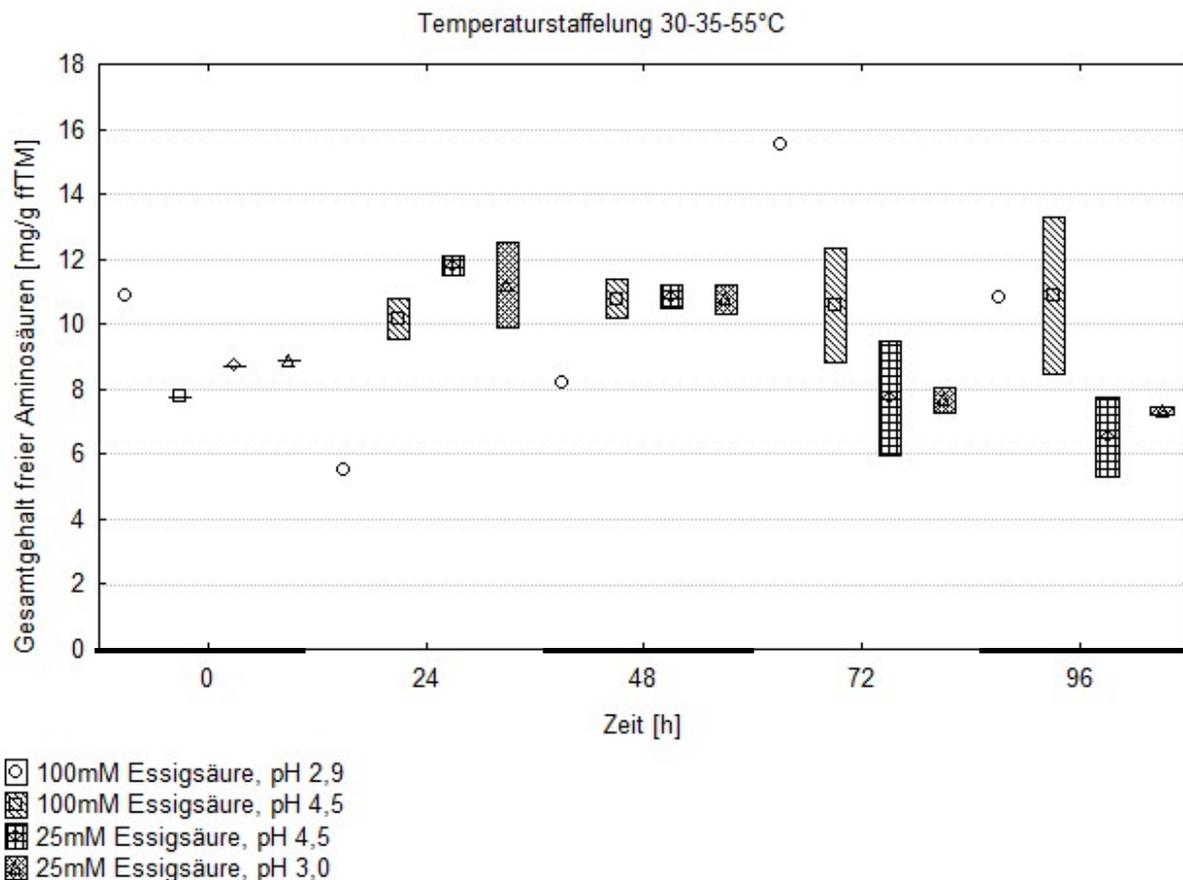
Zum Ende der Inkubation unterscheiden die beiden Inkubationen mit 25mM Milchsäure weiterhin nicht, wohingegen sich die beiden Inkubationen mit 100mM Milchsäure weiterhin eindeutig unterscheiden. Erst nach 96stündiger Inkubation erreicht die Inkubation mit 100mM Milchsäure und pH 2,4 einen ähnlichen Aminosäuregehalt (9,5mg/g ffTM) wie die beiden 25mM-Inkubationen nach 48 Stunden.

Unter den gewählten Bedingungen hat der pH-Wert nur bei einer Konzentration von 100mM Milchsäure einen Einfluss auf die Freisetzung der Aminosäuren, bei einer Konzentration von 25mM sind die Ergebnisse für die pH-Werte 2,7 und 4,5 nicht eindeutig unterschiedlich. Für beide Milchsäurekonzentrationen wird bei einem niedrigeren pH-Wert der höhere Aminosäuregehalt erreicht, dieser wirkt sich also positiv auf die Freisetzung aus.

Die höchsten Gehalte an freien Aminosäuren werden bereits nach 48 Stunden von den beiden Inkubationen mit 25mM Milchsäure erreicht, nämlich 11,0mg/g ffTM bei einem pH-Wert von 2,7 und 9,5mg/g ffTM bei einem pH-Wert von 4,5.

Die verschiedenen Inkubationen mit Essig- und Milchsäure führen zu einem ähnlichen Verlauf wie die reinen Milchsäureinkubationen. Die Gehalte an freien Aminosäuren der Inkubationen mit Essig- und Milchsäure liegen teilweise erheblich über denen der reinen Milchsäureinkubationen.

Nach 48 Stunden erreicht die Inkubation mit dem niedrigsten pH-Wert (12,5mM Essig-/Milchsäure, pH 2,8) mit 13,5mg/g fTMM den höchsten Gehalt an freien Aminosäuren während der gesamten Inkubationsdauer (s. Abbildung 5-3). Die beiden Inkubationen mit einem pH-Wert von 4,5 unterscheiden sich im Gehalt an freien Aminosäuren trotz der unterschiedlichen Säurekonzentration zu diesem Zeitpunkt nicht voneinander, sind aber geringer als bei einem pH-Wert von 2,8.



**Abbildung 5-4: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Essigsäure bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM =mmol/l; n=1-2

Weitere 24 Stunden später sind die Aminosäuregehalte der drei verschiedenen Inkubationen soweit einander angenähert, dass sie sich statistisch nicht voneinander unterscheiden. Den höchsten Median erreicht jetzt die Inkubation mit einer Konzentration von 50mM Essig-/Milchsäure mit 9,0mg/g ffTM. Da die Gehalte an freien Aminosäuren geringer sind als bei den Werten bei einer Temperatur von 35°C muss offensichtlich wieder ein Prozess vorliegen, der zu einem Verlust an freien Aminosäuren führt.

Zum Ende der Inkubation nach 96 Stunden unterscheidet sich die 50mM Inkubation mit einem pH-Wert von 4,5 deutlich von den beiden anderen Inkubationen. Die beiden 12,5mM Inkubationen unterscheiden sich trotz der verschiedenen pH-Werte nicht voneinander.

Mit der Erhöhung auf 55°C erfolgt auch bei den Inkubationen mit Essig- und Milchsäure eine Abnahme der Gesamtgehalt an freien Aminosäuren. Eine Ausnahme bildet hier die Inkubation mit einer Konzentration von 50mM Essig- und Milchsäure, die nach 72 Stunden eine Steigerung im Gehalt an freien Aminosäuren aufweist. Auch bei den Inkubationen mit einem Gemisch aus Essig- und Milchsäure sind nach 48 Stunden wie auch bei den reinen Milchsäureinkubationen die höchsten Gehalte an freien Aminosäuren erreicht.

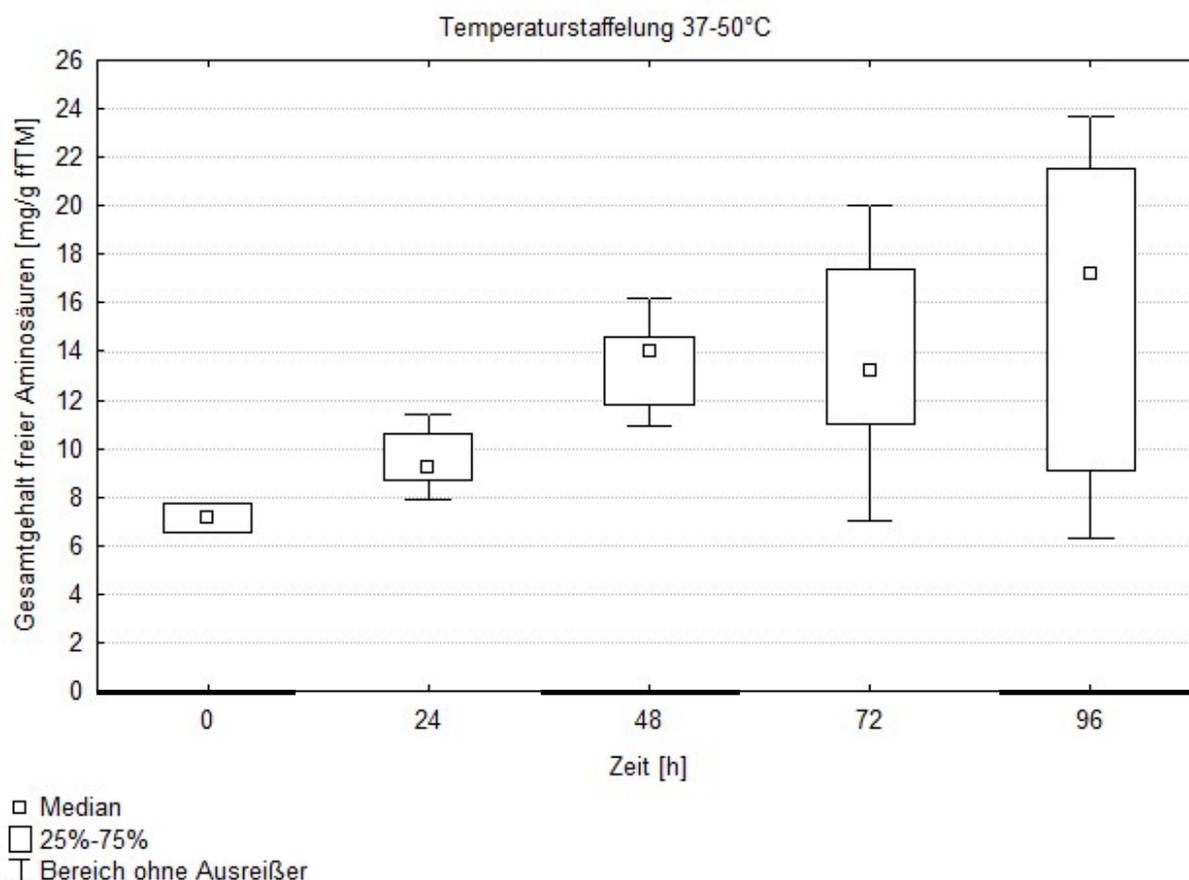
Unter den Essigsäure-Bedingungen sind die Abnahmen der freien Aminosäuren bei der Temperaturerhöhung auf 55°C auffällig gering. In einem Fall sind die Gehalte an freien Aminosäuren sogar sehr hoch, dies ist jedoch ein Einzelwert. Von daher kann lediglich geschlossen werden, dass der Verlust an freien Aminosäuren nicht so ausgeprägt ist (s. Abbildung 5-4). Da bei Inkubationen mit einer Essigsäurekonzentration von 100mM offensichtlich kein Verlust an freien Aminosäuren auftritt, kann vermutet werden, dass diese Bedingung weiterhin eine rein chemisch katalysierte Proteolyse unterstützt.

#### **5.1.1.1.2 Temperaturverlauf mit der Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C**

Bei diesem Temperaturgradienten wurde die Temperatur schrittweise im Verlauf der 96stündigen Inkubation erhöht. Die ersten 48 Stunden betrug die Temperatur 37°C, für die restlichen 48 Stunden wurde die Temperatur auf 50°C erhöht. Zusätzlich wurde in den ersten 48 Stunden mit Stickstoff begast, um anaerobe Bedingungen zu erzeugen, für die restliche Zeit wurde auf Luftbegasung umgestellt.

Nach 48stündiger Inkubation wird ein Gehalt an freien Aminosäuren erzielt, der mit 14,0mg/g ffTM alle bisherigen Gehalte zu diesem Zeitpunkt übersteigt. Wird die weitere Entwicklung bei 50°C Inkubationstemperatur verfolgt, gibt es bei einigen Ansätzen eine Steigerung, jedoch

bei vielen auch eine Abnahme an freien Aminosäuren. Dies stellt sich besonders gut in der starken Streuung um den Median bei 72 Stunden und 96 Stunden dar. Offensichtlich gibt es unter diesen Bedingungen sowohl weitere Freisetzungen von Aminosäuren, aber auch klare Verluste an freien Aminosäuren aus den inkubierten Samen. Die Prozesse müssen im Detail weiter analysiert werden.



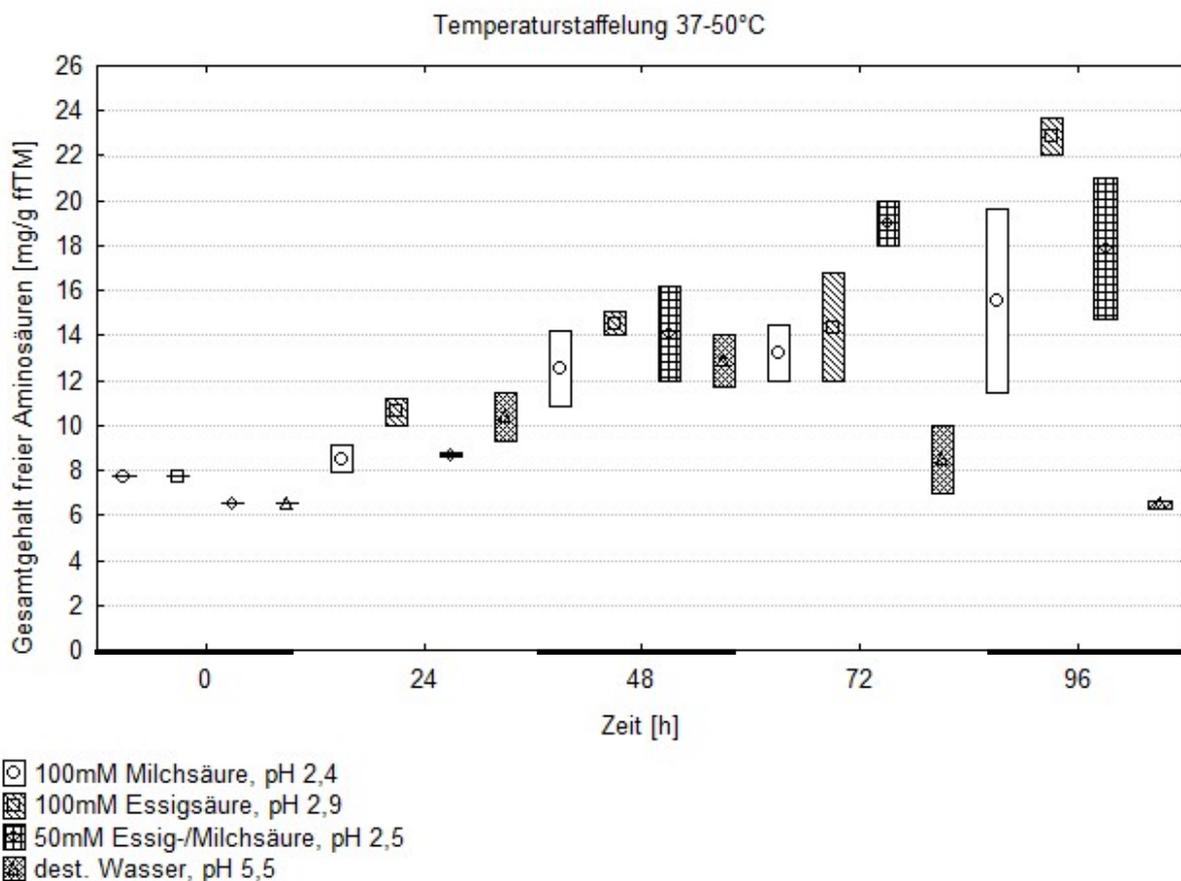
**Abbildung 5-5: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Die Ergebnisse aller Inkubationen bei diesem Temperaturverlauf wurden zusammengefasst. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. n=8

Werden bei der Temperaturstaffelung 37-50°C die verschiedenen Inkubationsparameter, wie die Art der Säure, deren Konzentration und pH-Wert unberücksichtigt gelassen, ergibt sich eine Steigerung der Gehalte an freien Aminosäuren im Verlauf der Inkubation (s. Abbildung 5-5), wobei ebenfalls die Schwankungsbreite der Perzentilen kontinuierlich ansteigt. Eine Möglichkeit, die Proteolyse, soweit sie unter den Inkubationsbedingungen enzymatisch katalysiert ist, abzuklären, kann durch die Bildung des Quotienten aus dem Gehalt an hydrophoben Aminosäuren und dem Gesamtgehalt an freien Aminosäuren erfolgen.

Rückschlüsse, ob es sich bei der Freisetzung der Aminosäuren um eine gesteuerte Proteolyse oder um einen unspezifischen Abbau handelt, sind darin begründet, dass die Aspartylendoprotease durch den Abbau der Speicherproteine hydrophobe Peptide bildet, von denen die Carboxypeptidase die hydrophoben Enden abspaltet. Eine Erhöhung des Quotienten von 0,08 auf 0,56 während der Inkubation weist auf eine Zunahme der hydrophoben Aminosäuren hin und zeigt damit, dass der Abbau primär enzymatisch erfolgt. Bei den zusammengefassten Inkubationen des Temperaturgradienten 37-50°C steigt der Quotient von 0,08 zu Beginn der Inkubation über 0,38 nach 48 Stunden auf 0,56 zum Ende der Inkubation kontinuierlich an.

Aufgrund der Vergrößerung der Perzentilen im Verlauf der Inkubation ist ein Einfluss der anderen Inkubationsparameter auf die Freisetzung der Aminosäuren wahrscheinlich, daher erfolgt im Weiteren eine Aufteilung der Inkubationen nach der gewählten Säure, deren Konzentration und des pH-Wertes (s. Abbildung 5-6).



**Abbildung 5-6: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C in Abhängigkeit von dem verwendeten Inkubationsmedium.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=2

Während der ersten 48 Stunden verlaufen die verschiedenen Inkubationen sehr ähnlich. Deutliche Unterschiede in der Freisetzung der freien Aminosäuren sind nicht zu erkennen. 24 Stunden später, nach Erhöhung der Temperatur auf 50°C, trennen sich die Verläufe. Die Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser erreicht eindeutig nur niedrigere Werte als die drei Säureinkubationen. Bei den Säureinkubationen sticht die Inkubation mit einem Essig-/Milchsäuregemisch mit deutlich höheren Gehalten an freien Aminosäuren hervor. Die reine Milch- und Essigsäureinkubationen liegen zwischen diesen beiden Inkubationen und zeigen zueinander keine Unterschiede. Zum Ende der Inkubation nach 96 Stunden bleibt die Kontrollinkubation mit 6,5mg/g ffTM deutlich hinter den erreichbaren Werten zurück. Die reine Essigsäureinkubation führt zudem höchsten Wert an freigesetzten Aminosäuren mit 22,9mg/g ffTM. Die Milchsäureinkubation und die Inkubation mit dem Säuregemisch liegen zwischen diesen beiden Inkubationen und zeigen keine Unterschiede zueinander.

Bei dem Vergleich mit der Inkubation mit destilliertem Wasser wird deutlich, dass die Säure einen entscheidenden Einfluss auf die Freisetzung der freien Aminosäuren ausübt. Ebenso wie beim 30-35-55°C Gradienten liegen auch hier die Werte der Milchsäureinkubation im unteren Bereich der erreichbaren Werte, durch die veränderten Temperaturbedingungen allerdings im effektiven Gehalt höher als beim 30-35-55°C Gradienten. Im Gegensatz zu den Inkubationen mit Essigsäure ist bei den Milchsäureinkubationen bereits nach 48 Stunden die maximale Freisetzungsrage erreicht, danach erfolgt nur noch eine geringfügige Freisetzung von freien Aminosäuren.

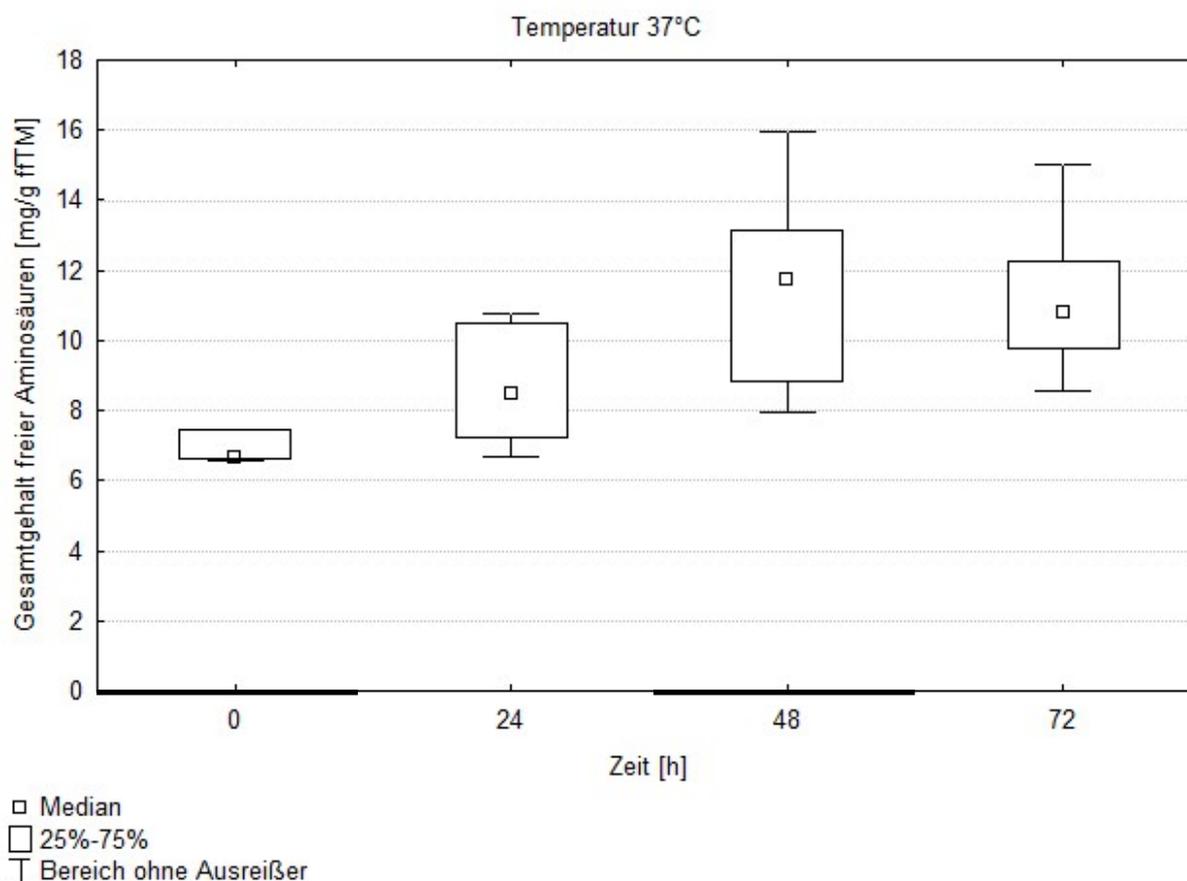
Bei den Inkubationen mit reiner Milchsäure erfolgt nach 72 Stunden keine gerichtete Freisetzung der Aminosäuren mehr, da der Quotient aus den hydrophoben Aminosäuren und dem Gesamtgehalt an freien Aminosäuren keine Steigerung mehr aufweist (0,51 nach 72 Stunden und 0,48 nach 96 Stunden). Auch bei der Inkubation mit reiner Essigsäure findet nach 72 Stunden keine gezielte Freisetzung mehr statt. Wird ein Gemisch aus Milch- und Essigsäure für die Inkubation verwendet, erfolgt bis zum Ende der Inkubation eine gesteuerte Freisetzung der Aminosäuren.

#### **5.1.1.1.3 Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 37°C**

Bei einer konstanten Temperatur von 37°C während der Inkubation findet in den ersten 48 Stunden eine gleichmäßige Zunahme der Gehalte an freien Aminosäuren statt (s. Abbildung 5-7). Danach ist die Zunahme nur noch gering. Wird die Temperatur konstant bei 37°C

gehalten, erfolgt die hauptsächliche Freisetzung der Aminosäuren innerhalb der ersten 48 Stunden.

In den ersten 24 Stunden unterscheiden sich die verschiedenen Säureinkubationen nicht voneinander. Nach 48 Stunden setzen sich die Milchsäureinkubationen durch einen starken Anstieg im Aminosäuregehalt deutlich von der Essig-/Milchsäureinkubation ab (s. Abbildung 5-8). Die reine Essigsäureinkubation liegt zwischen diesen beiden Inkubationen. Zum Ende der Inkubation nach 72 Stunden hat die Essigsäureinkubation nach einem starken Anstieg der freien Aminosäuren innerhalb von 24 Stunden den höchsten Gehalt an freien Aminosäuren erreicht (14,9mg/g fTfM). Sie unterscheidet sich damit von den beiden anderen Säureinkubationen, die untereinander keine deutlichen Unterschiede aufweisen. Wie auch bei den beiden vorherigen Temperaturvarianten beschrieben, erreichen die reinen Milchsäureinkubationen bereits nach 48 Stunden ihren höchsten Gehalt an freien Aminosäuren.

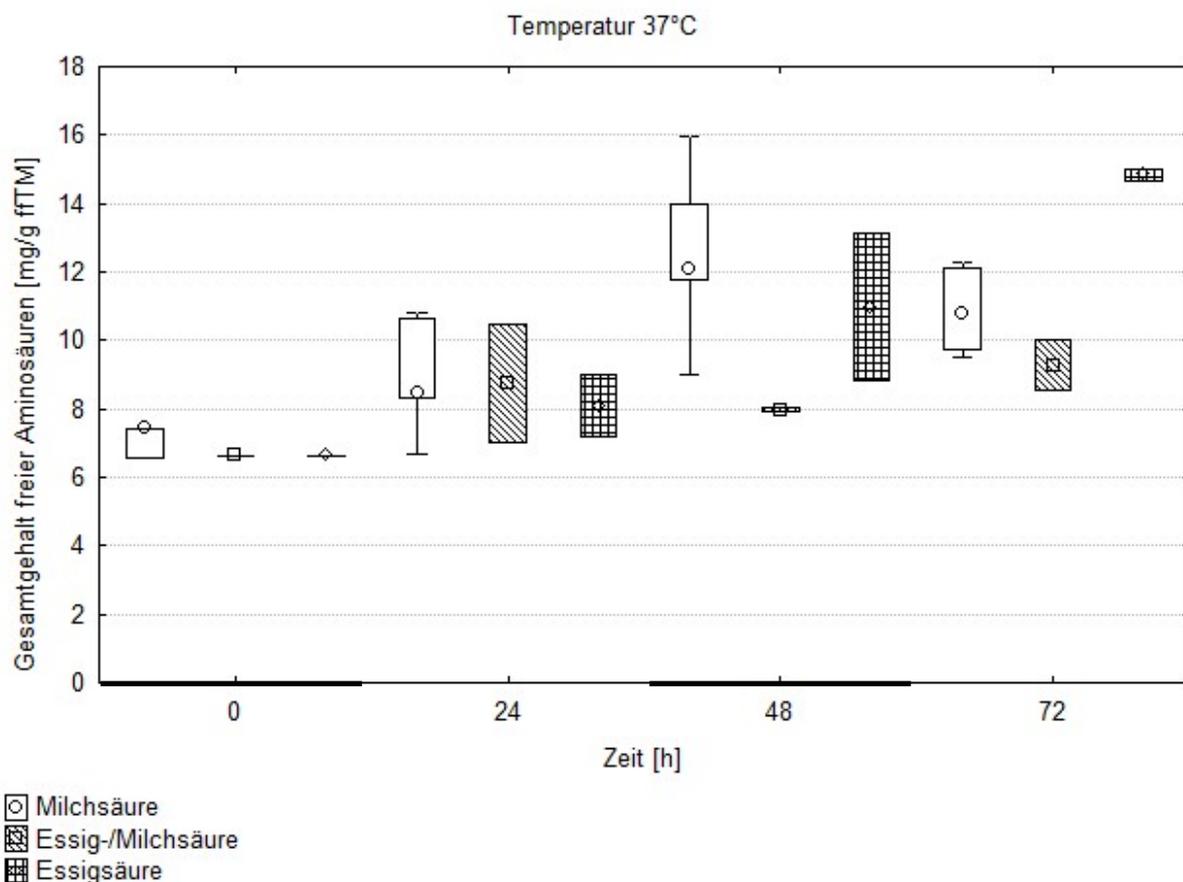


**Abbildung 5-7: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer Inkubationstemperatur von 37°C**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Die Ergebnisse aller Inkubationen bei dieser Temperatur wurden zusammengefasst. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. n=9

Bei den Inkubationen mit reiner Milchsäure bleibt der Quotient von hydrophoben Aminosäuren und dem Gesamtgehalt an freien Aminosäuren nach 24 Stunden bei 0,33 stabil, während er bei den Inkubationen, die Essigsäure enthalten, kontinuierlich auf ein Maximum von 0,59 bis zum Ende der Inkubation ansteigt.

Ein unterschiedlicher Verlauf in der Freisetzung der freien Aminosäuren erfolgt während der Inkubation bei den einzelnen Säuren, daher werden die verschiedenen Säureinkubationen im Einzelnen dargestellt.

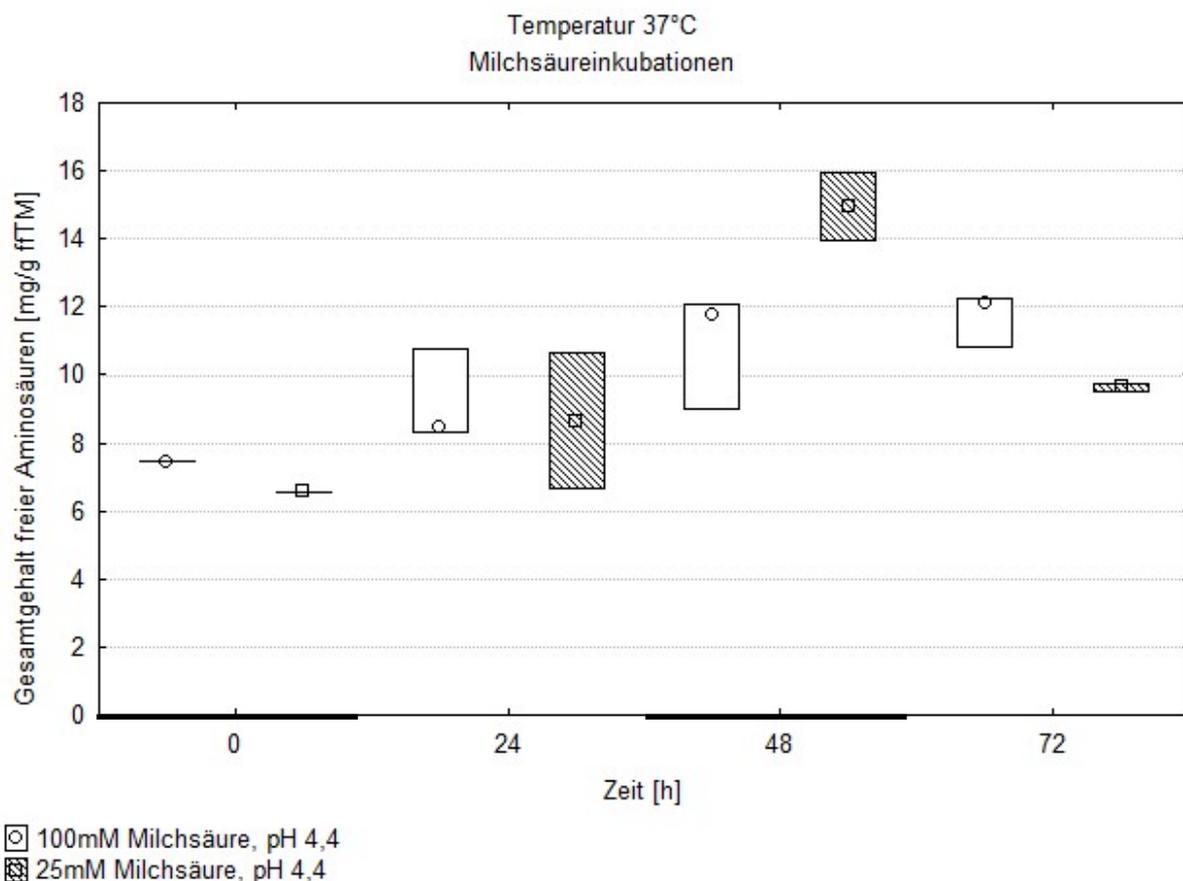


**Abbildung 5-8: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit von der für das Inkubationsmedium gewählten Säure bzw. von dem Säuregemisch.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 25mmol/l bis 100mmol/l. n=2-5

In den ersten 24 Stunden verlaufen beide Milchsäureinkubationen sehr ähnlich. Nach 48 Stunden liegt der Gehalt an freien Aminosäuren bei der Inkubation mit 25mM Milchsäure deutlich über der mit 100mM Milchsäure (s. Abbildung 5-9). Weitere 24 Stunden ist eine

Abnahme im Gehalt an freien Aminosäuren bei der Inkubation mit 25mM Milchsäure erfolgt und die 100mM Milchsäureinkubation liegt jetzt über der mit 25mM Milchsäure. Die Werte liegen zu nah beieinander, um einen statistisch relevanten Unterschied zu zeigen. Der höchste Gehalt an freien Aminosäuren bei reinen Milchsäureinkubationen beträgt 15,0mg/g ffTM nach 48 Stunden. Werden die Quotienten aus den hydrophoben Aminosäuren und dem Gesamtgehalt an freien Aminosäuren der einzelnen Inkubationen mit Milchsäure einzeln betrachtet, steigen beide nach 24 Stunden nur noch leicht bis zum Ende der Inkubation an. Bei einer Inkubation mit 100mM Milchsäure erfolgt nach 24 Stunden eine Steigerung des Quotienten aus den hydrophoben Aminosäuren und dem Gesamtgehalt an freien Aminosäuren von 0,34 auf 0,38 nach 72 Stunden, bei einer Konzentration von 25mM Milchsäure von 0,30 nach 24 Stunden auf 0,31 nach 72 Stunden. Demnach ist offensichtlich keine hohe Endoproteaseaktivität vorhanden.

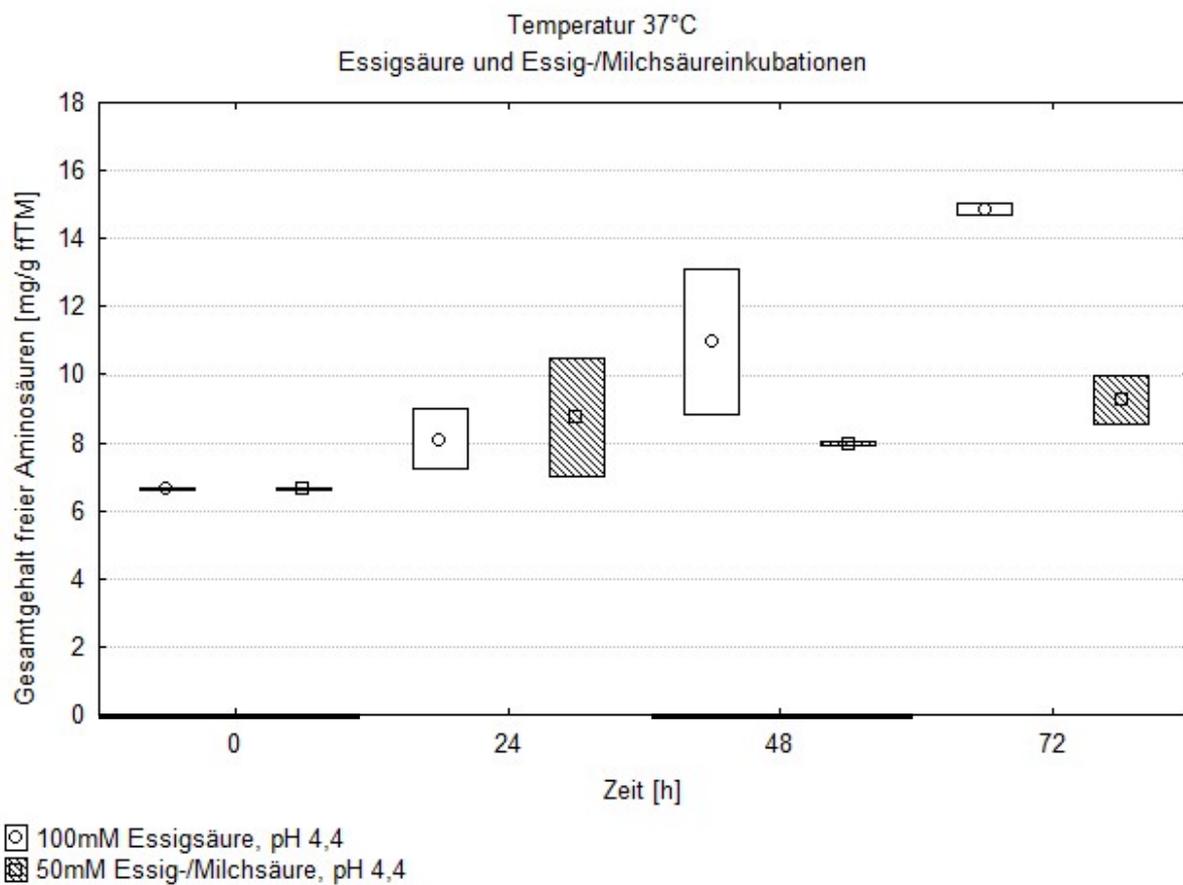


**Abbildung 5-9: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=2-3

Nach 48 Stunden wird bei Inkubationen mit reiner Milchsäure bereits der höchste Gehalt an freien Aminosäuren erreicht. Eine geringere Konzentration an Milchsäure wirkt sich in den ersten 48 Stunden der Inkubation positiv auf die Freisetzung der Aminosäuren aus.

Neben den Inkubationen mit reiner Milchsäure wurden auch Inkubationen mit reiner Essigsäure und einem Gemisch aus Essig- und Milchsäure durchgeführt. Die Ergebnisse der Inkubationen, die Essigsäure enthalten, werden im Folgenden dargestellt.



**Abbildung 5-10: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Essigsäure und Essig-/Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=2

Zwischen der reinen Essigsäureinkubation und einer Inkubation aus einem Gemisch von Essig- und Milchsäure besteht in den ersten 48 Stunden kein Unterschied (s. Abbildung 5-10). Nach 72 Stunden unterscheiden sich die beiden Inkubationsvarianten allerdings deutlich voneinander. Der Gehalt der reinen Essigsäureinkubation liegt mit 14,9mg/g fTMM deutlich über dem Gehalt des Säuregemisches mit 9,3mg/g fTMM. Die reine Essigsäureinkubation führt

auch nach 48 Stunden im Gegensatz zu Inkubationen, die Milchsäure enthalten, noch zu einer weiteren Freisetzung von freien Aminosäuren. Bei den Inkubationen unter Anwesenheit von Essigsäure steigt der Quotient aus hydrophoben Aminosäuren zum Gesamtgehalt der freien Aminosäuren über die gesamte Inkubationsdauer kontinuierlich an.

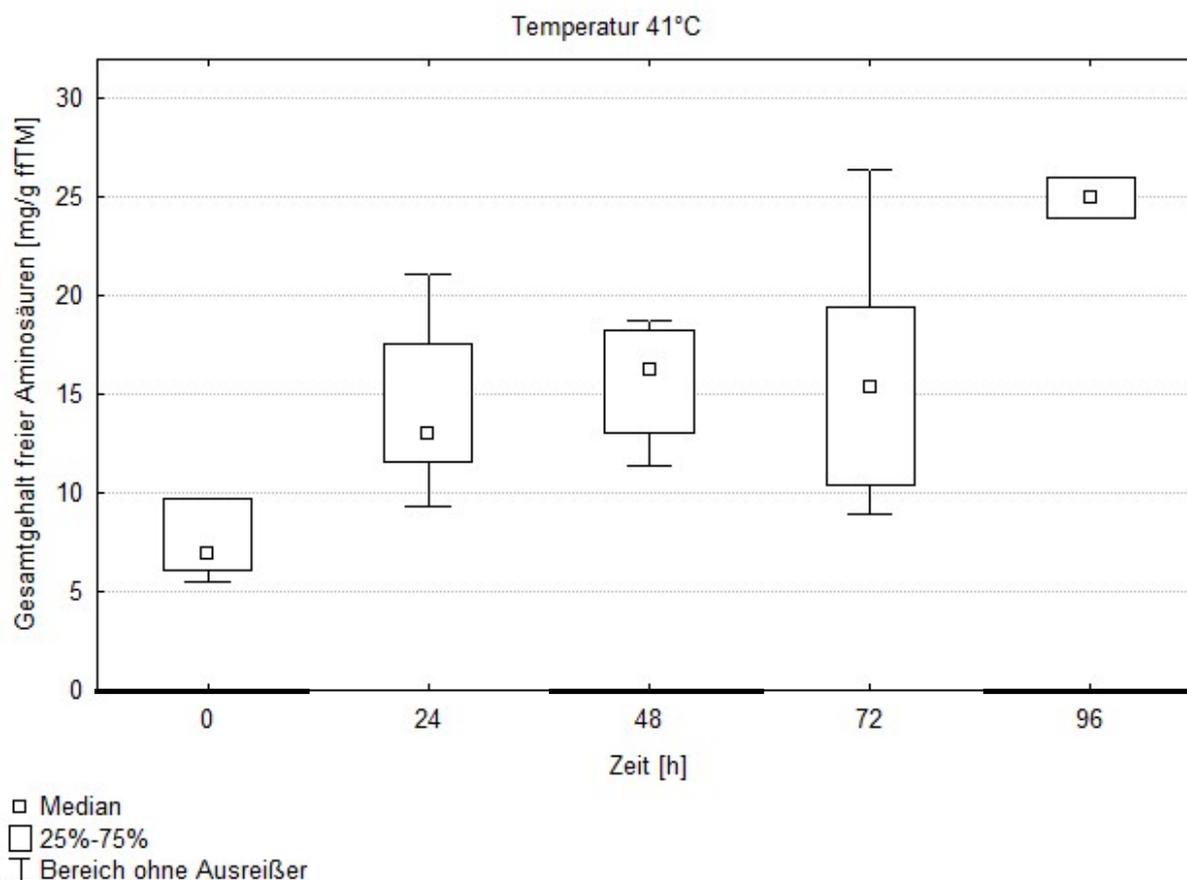
Die höchsten Gehalte bei einer konstanten Temperatur von 37°C werden von den reinen Essigsäure und Milchsäureinkubationen erreicht. Inkubationen mit Milchsäure erreichen den maximalen Gehalt an freien Aminosäuren bereits nach 48 Stunden, Inkubationen mit Essigsäure 24 Stunden später. Bei der Milchsäure werden diese Gehalte nur bei geringen Konzentrationen erreicht, höhere Konzentrationen führen zu einer schlechteren Freisetzung der freien Aminosäuren. Die Werte der Inkubationen mit einer Konzentration von 100mM Milchsäure liegen im gleichen Bereich wie die Ergebnisse der Inkubationen mit einem Säuregemisch. Da alle getesteten Inkubationen mit dem gleichen pH-Wert durchgeführt wurden, kann hier ein Einfluss des pH-Wertes ausgeschlossen werden.

Die Quotienten aus hydrophoben Aminosäuren zum Gesamtgehalt der freien Aminosäuren unterscheiden sich bei den Inkubationen mit reiner Milchsäure und denen, die Essigsäure enthalten deutlich. Die Inkubationen mit Milchsäure erreichen nach 72 Stunden einen Maximalwert von 0,38 bei einer Konzentration von 100mM Milchsäure (25mM Milchsäure: 0,31), während die Inkubationen mit Essigsäure, sowohl reine als auch ein Gemisch aus Essig- und Milchsäure, nach 72 Stunden einen Maximalwert von 0,59 erreichen.

#### **5.1.1.1.4 Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 41°C**

Werden die Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 41°C durchgeführt, tritt eine Freisetzung der freien Aminosäuren in 3 Phasen auf (s. Abbildung 5-11). In den ersten 24 Stunden erfolgt ein steiler Anstieg der Gehalte an freien Aminosäuren, gefolgt von einer schwachen Zunahme innerhalb der nächsten 48 Stunden. Nach 72 Stunden Inkubation steigen die freien Aminosäuren wieder an und erreichen den höchsten Wert im Vergleich zu den anderen Inkubationstemperaturen mit 25,0mg/g fTm. Der Anstieg nach 72 Stunden in der Abbildung 5-11 beruht zum Teil auf der Tatsache, dass die zwei Inkubationen mit der geringsten Freisetzung an freien Aminosäuren, die mit einer Konzentration von 600 und 1000mM Essigsäure, nur über 72 Stunden durchgeführt wurden und daher nicht in die Berechnung des Gehaltes an freien Aminosäuren nach 96 Stunden einfließen. Der Quotient aus den hydrophoben Aminosäuren und dem Gesamtgehalt an freien Aminosäuren sinkt nach 48 Stunden leicht ab, da aber der Gehalt an hydrophoben Aminosäuren über die gesamte

Inkubationsdauer kontinuierlich ansteigt (s. Kap. 5.1.1.2.4), lässt dies den Schluss zu, dass unter diesen Bedingungen die Carboxypeptidase nicht nur die hydrophoben Enden der Peptide abspaltet, sondern die Peptide und gegebenenfalls auch andere Proteine, z.B. die Albumine, abbaut und so auch vermehrt nicht hydrophobe Aminosäuren freisetzt.



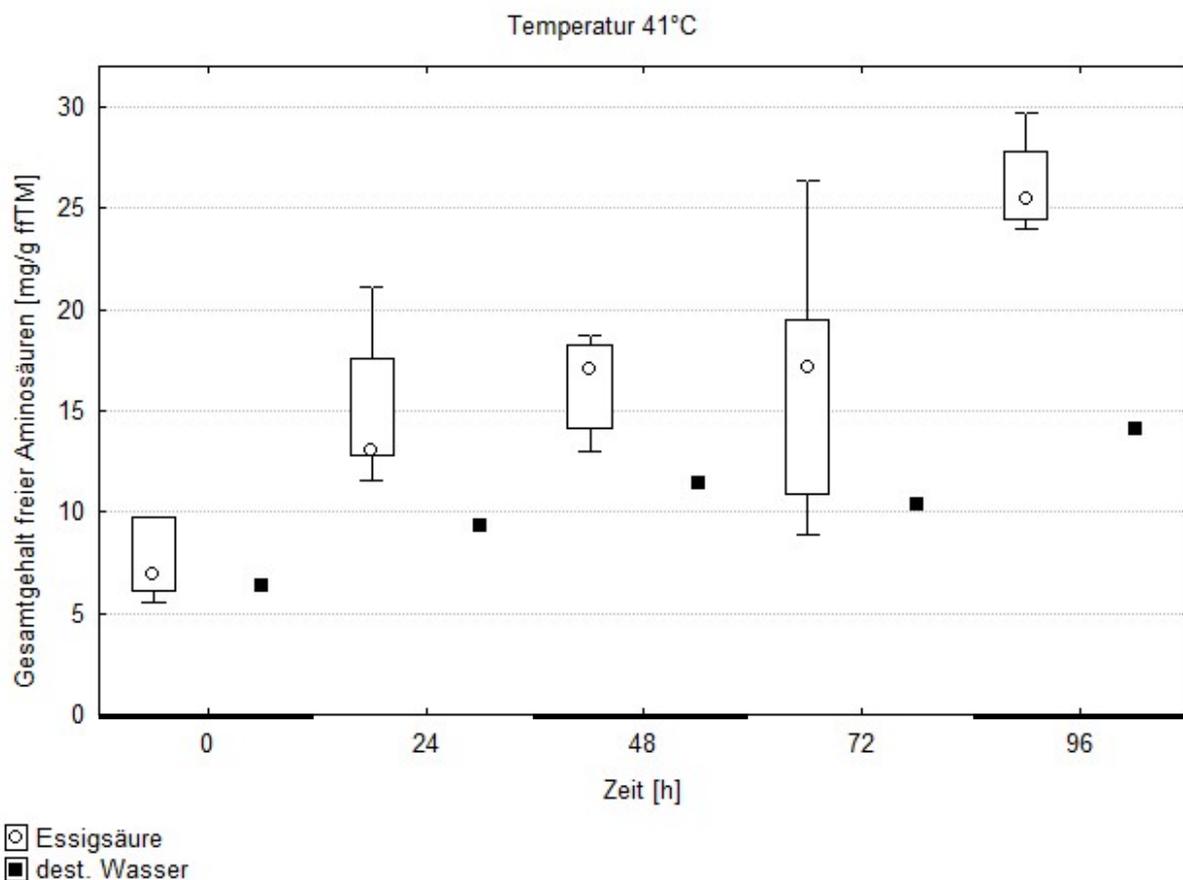
**Abbildung 5-11: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer Inkubationstemperatur von 41°C**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Die Ergebnisse aller Inkubationen bei dieser Temperatur wurden zusammengefasst. Die Dauer der einzelnen Inkubationen lag bei 72 und 96 Stunden. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. n=4-6

In den ersten 72 Stunden steigen sowohl bei reinen Essigsäureinkubationen als auch bei Inkubation mit destilliertem Wasser die Gehalte der freien Aminosäuren bei einer konstanten Temperatur von 41°C an (s. Abbildung 5-12). Danach erfolgt ein weiterer Anstieg in den nächsten 24 Stunden. Die Gehalte an freien Aminosäuren sind bei der Inkubation mit destilliertem Wasser über die gesamte Inkubationsdauer geringer (14,1mg/g fTtM) als bei den Essigsäureinkubationen (25,5mg/g fTtM). Der Anstieg der Inkubationen mit Essigsäure nach 72 Stunden in der Abbildung 5-12 beruht zum Teil auf der Tatsache, dass die zwei

Inkubationen mit der geringsten Freisetzung an freien Aminosäuren, die mit einer Konzentration von 600 und 1000mM Essigsäure, nur über 72 Stunden durchgeführt wurden und nicht über 96 Stunden.

Der Quotient aus den hydrophoben Aminosäuren und dem Gesamtgehalt an freien Aminosäuren steigt bei den Inkubationen mit Essigsäure in den ersten 48 Stunden an, was auf einen Abbau der hydrophoben Enden der entstandenen Peptide hinweist, während nach 48 Stunden eine Verringerung des Quotienten aus den hydrophoben Aminosäuren und dem Gesamtgehalt an freien Aminosäuren auftritt (von 0,55 nach 48 Stunden über 0,50 nach 72 Stunden auf 0,47 nach 96 Stunden).



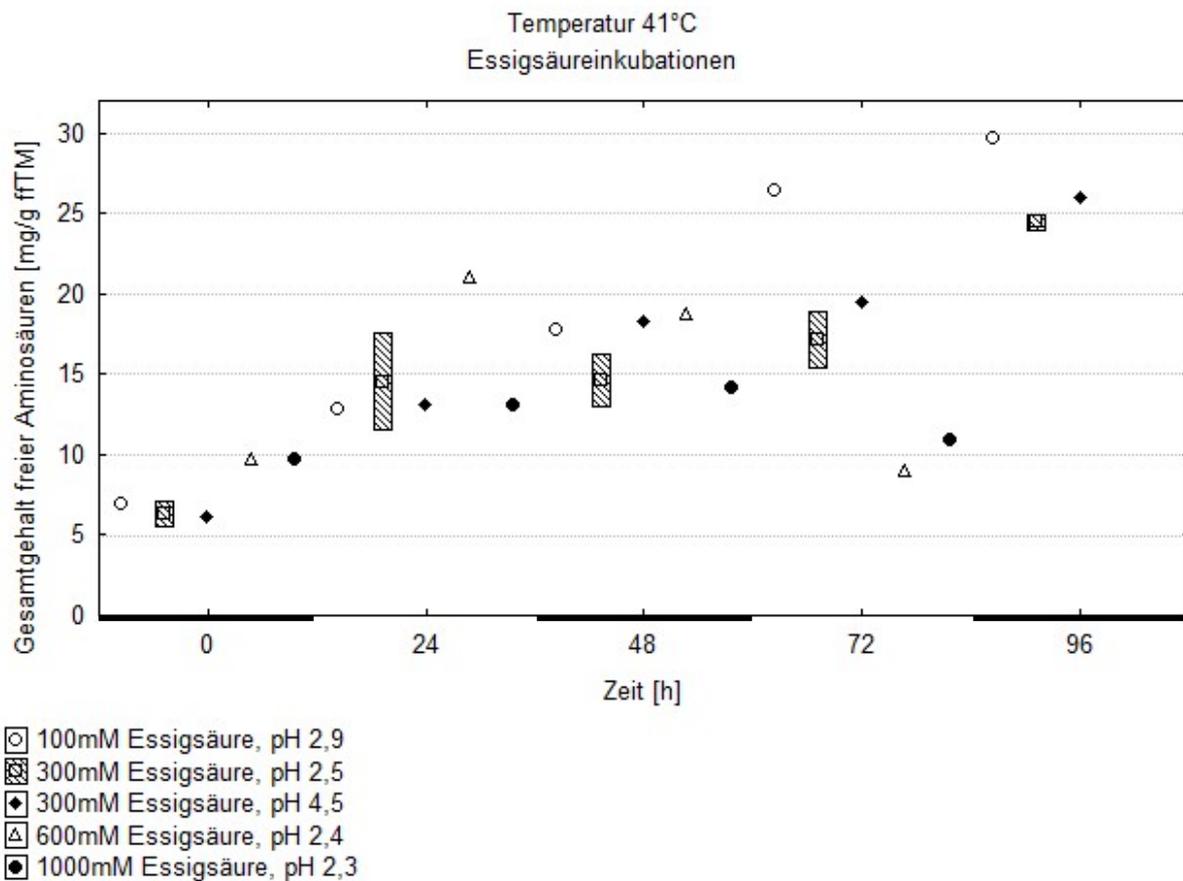
**Abbildung 5-12: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 41°C in Abhängigkeit von Inkubationsmedium mit Essigsäure oder destilliertem Wasser.**

Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Die Dauer der einzelnen Inkubationen lag bei 72 und 96 Stunden. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 100mmol/l bis 1000mmol/l. n=1-5

Zwischen 72 Stunden und 96 Stunden erfolgt ein weiterer Abbau der Peptide durch die Carboxypeptidase, wodurch vermutlich auch nicht hydrophobe Aminosäuren aus den

Peptiden freigesetzt werden und so eine Verringerung des Quotienten aus den hydrophoben Aminosäuren und dem Gesamtgehalt an freien Aminosäuren erklärbar ist.

In der folgenden Grafik (s. Abbildung 5-13) werden die einzelnen Essigsäureinkubationen nach der Konzentration der Essigsäure aufgeschlüsselt.



**Abbildung 5-13: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 41°C in Abhängigkeit von dem gewählten Inkubationsmedium.**

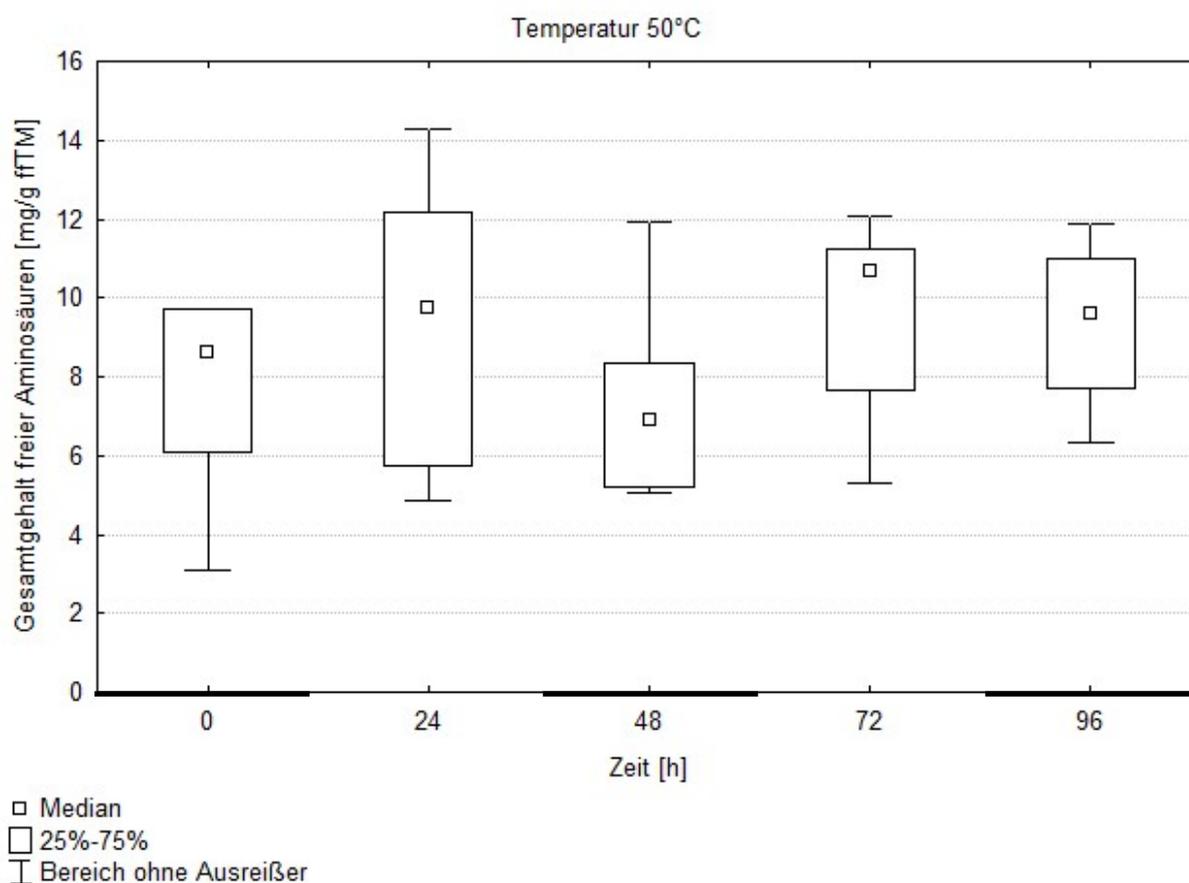
Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. n=1-2

Bei der Aufschlüsselung der einzelnen Konzentrationen der Essigsäure wird deutlich, dass nur die Konzentrationen von 100 und 300mM zu guten Ergebnissen in der Freisetzung der freien Aminosäuren führen (s. Abbildung 5-13). Wobei die 100mM Essigsäure die höchsten Werte an freien Aminosäuren erreicht (29,7mg/g fTMM). Die Inkubation mit 600mM Essigsäure steigt in den ersten 24 Stunden steil an, fällt aber zum Ende der Inkubation wieder stark ab. Die Konzentrationen an freien Aminosäuren bei Inkubationen mit 600mM bzw. 1000mM Essigsäure (8,9mg/g fTMM bzw. 10,9mg/g fTMM) sind nach 72 Stunden Inkubation geringer

als bei der Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser. Da die beiden Inkubationen mit 300mM Essigsäure mit unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt wurden, aber trotzdem sehr ähnliche Gehalte an freien Aminosäuren erreicht werden, wirkt sich bei diesen Inkubationsbedingungen der anfangs eingestellte pH-Wert nicht entscheidend auf die Freisetzung der Aminosäuren aus.

#### 5.1.1.1.5 Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 50°C

Nur sehr geringe Mengen an Aminosäuren werden im Verlauf der Inkubation bei einer konstanten Temperatur von 50°C freigesetzt (s. Abbildung 5-14). Eine Steigerung der Aminosäuregehalte im Verlauf der Inkubation ist nur geringfügig vorhanden.



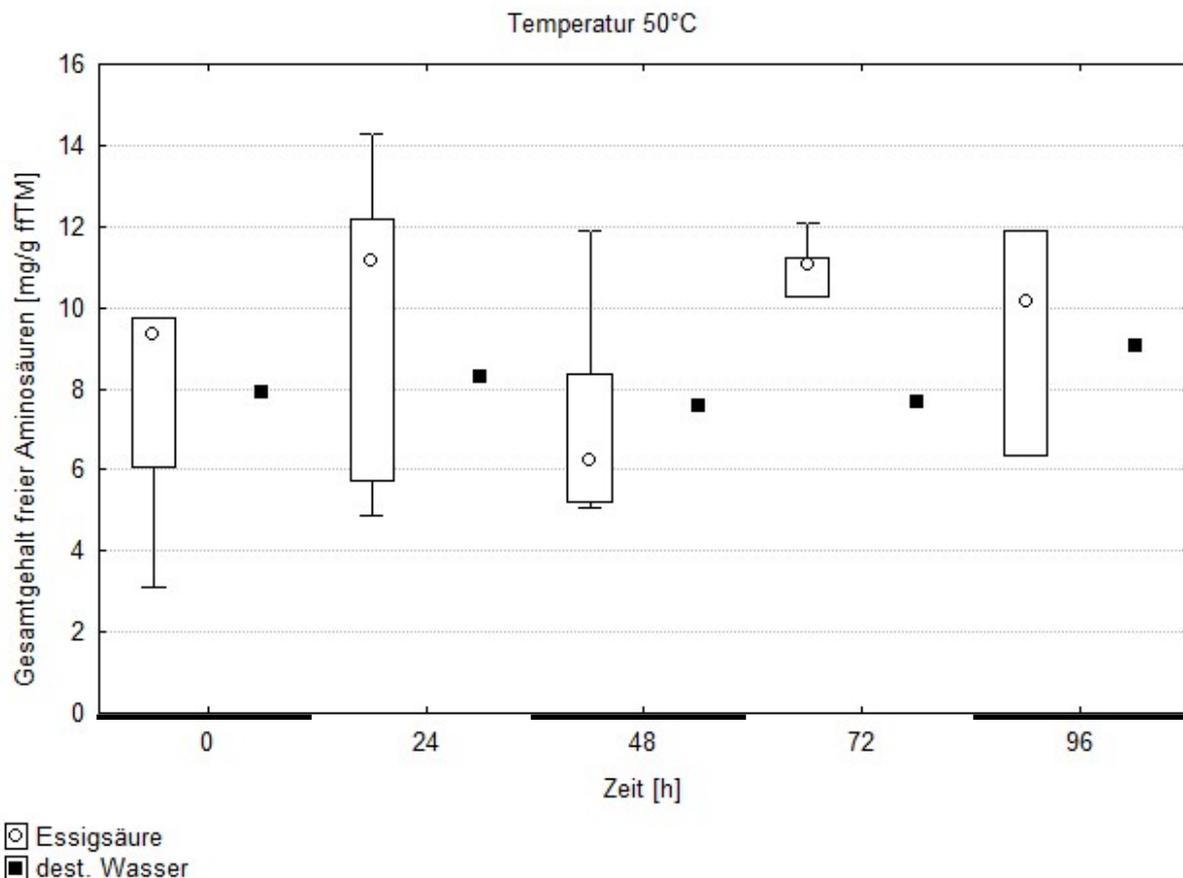
**Abbildung 5-14: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer Inkubationstemperatur von 50°C**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Die Ergebnisse aller Inkubationen bei dieser Temperatur wurden zusammengefasst. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. n=6

Bei einer konstanten Temperatur von 50°C erfolgt eine Steigerung des Quotienten aus den hydrophoben Aminosäuren und dem Gesamtgehalt an freien Aminosäuren nur innerhalb der ersten 48 Stunden, wobei in den ersten 24 Stunden die größte Steigerung stattfindet.

Nach 48 Stunden bleibt der Quotient aus den hydrophoben Aminosäuren und dem Gesamtgehalt an freien Aminosäuren konstant. Dies lässt den Schluss zu, dass bei einer Temperatur von 50°C eine Inaktivierung der proteolytischen Enzyme aufgrund der hohen Temperatur stattfindet.

Offensichtlich wird zu Beginn der Inkubation eine Proteolyse in der Phase, in der die Temperatur im Samen ansteigt, eingeleitet. Bei 50°C tritt dann aber die temperaturbedingte Inaktivierung auf.

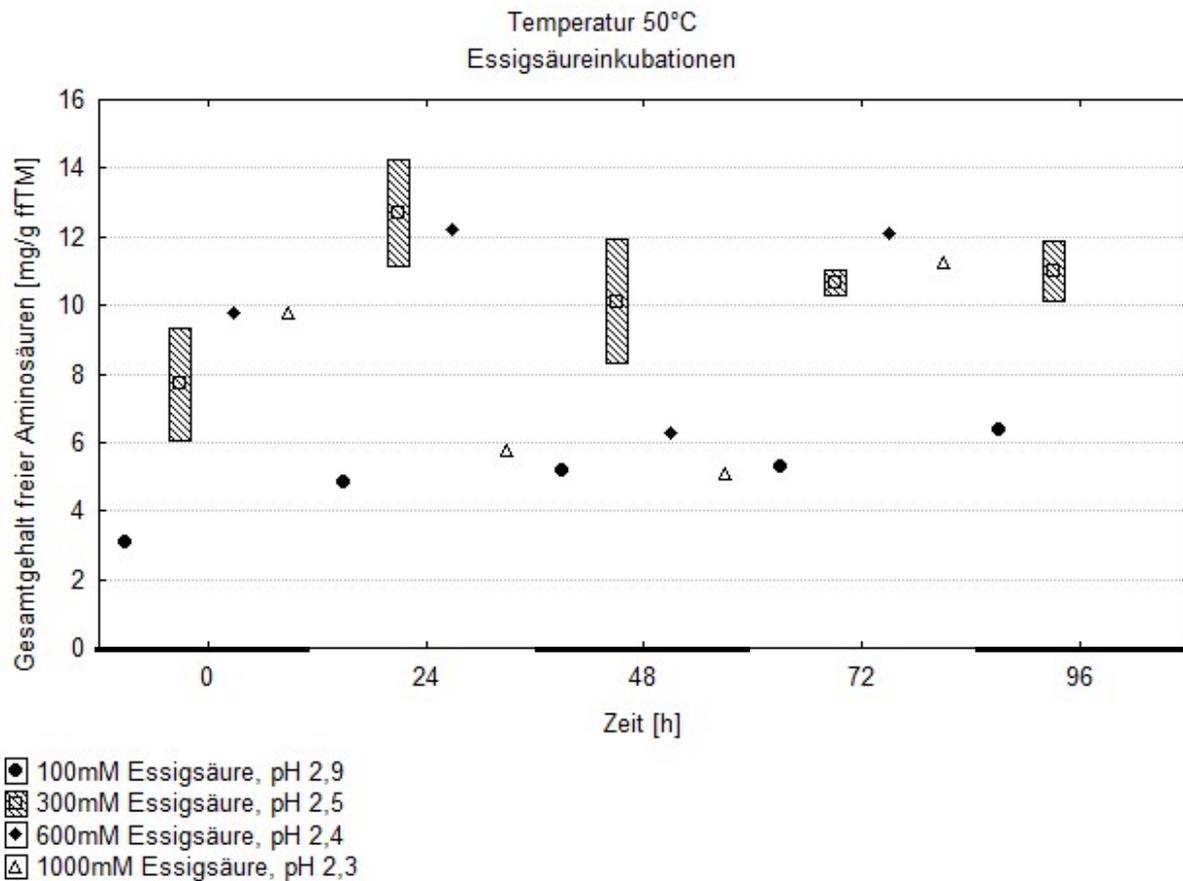


**Abbildung 5-15: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 50°C in Abhängigkeit von dem Inkubationsmedium mit Essigsäure oder destilliertem Wasser.**

Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit der dazugehörigen Perzentile (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 100mmol/l bis 1000mmol/l. n=1-5

Diese Annahme wird durch den Verlauf bei Inkubationen mit destilliertem Wasser unterstützt. Die Ergebnisse für Essigsäure und destilliertes Wasser unterscheiden sich nicht voneinander (s. Abbildung 5-15).

Im Folgenden werden die verschiedenen Essigsäurekonzentrationen mit den dazugehörigen pH-Werten einzeln aufgeführt.



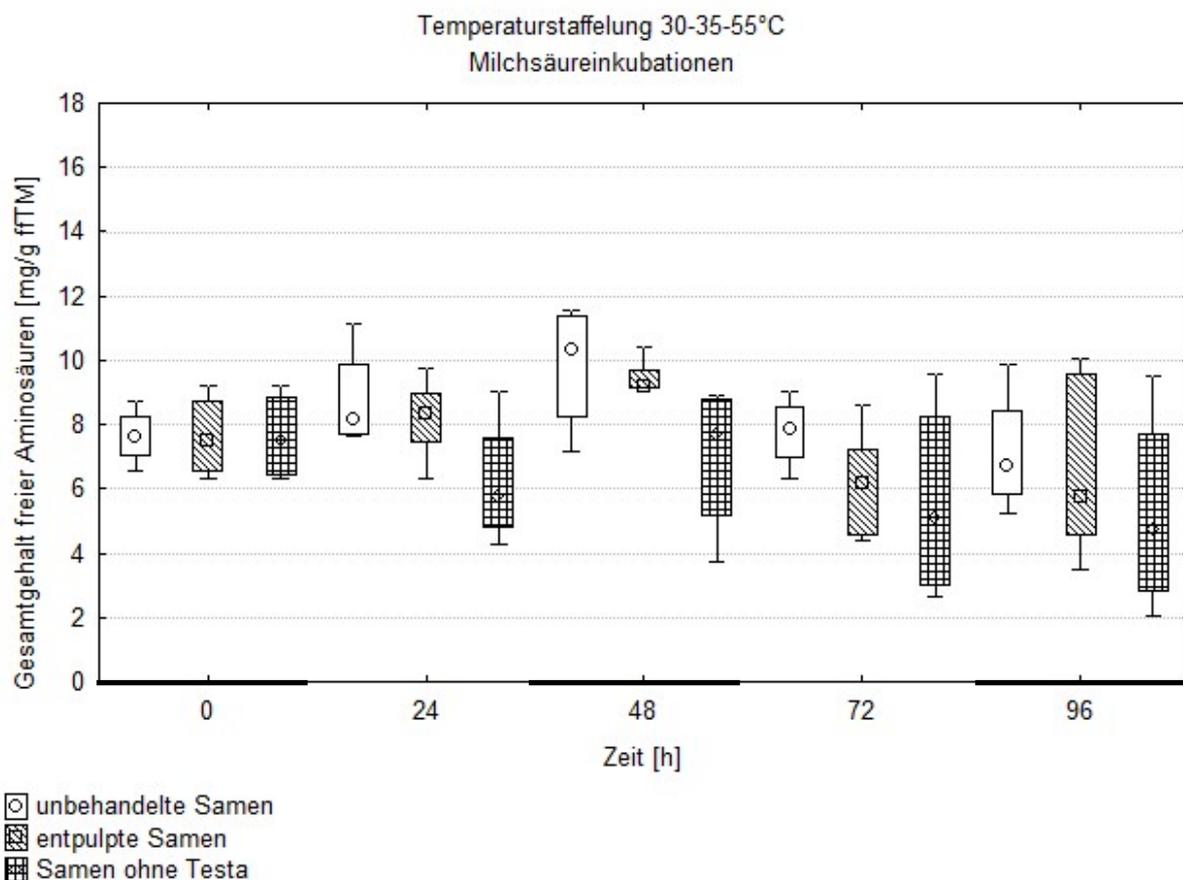
**Abbildung 5-16: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren im Verlauf der Essigsäureinkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 50°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. n=1-2

Bei einer konstanten Temperatur von 50°C erfolgt nur in den ersten 24 Stunden eine Freisetzung von Aminosäuren unabhängig von den verschiedenen Essigsäurekonzentrationen und deren pH-Werten, danach stagniert der Gehalt an freien Aminosäuren (Abbildung 5-16). Die Gehalte steigen, wenn überhaupt, nur sehr gering über den Ausgangswert an. Der höchste erreichte Gehalt liegt bei 12,7mg/g ffTM. Bei optimalen Inkubationsabläufen mit anderen Parametern werden Gehalte bis zu 29,7mg/g ffTM erzielt (s. Kap. 5.1.1.1.4).

### 5.1.1.1.6 Einfluss der Samenbehandlung auf die Entwicklung der freien Aminosäuren während der Inkubation

Da die Testa und die Pulpa als Barriere für einen freien Stoffaustausch während der Inkubationen wirken können und so einen Einfluss auf den Verlauf und auf die Gehalte der freien Aminosäuren in den Samen haben können, wurden verschiedene Samenvorbehandlungen vor Beginn der Inkubation durchgeführt. Unbehandelte Samen, entpulpte Samen, sowie Samen ohne Testa wurden vergleichend für die Inkubationen verwendet.

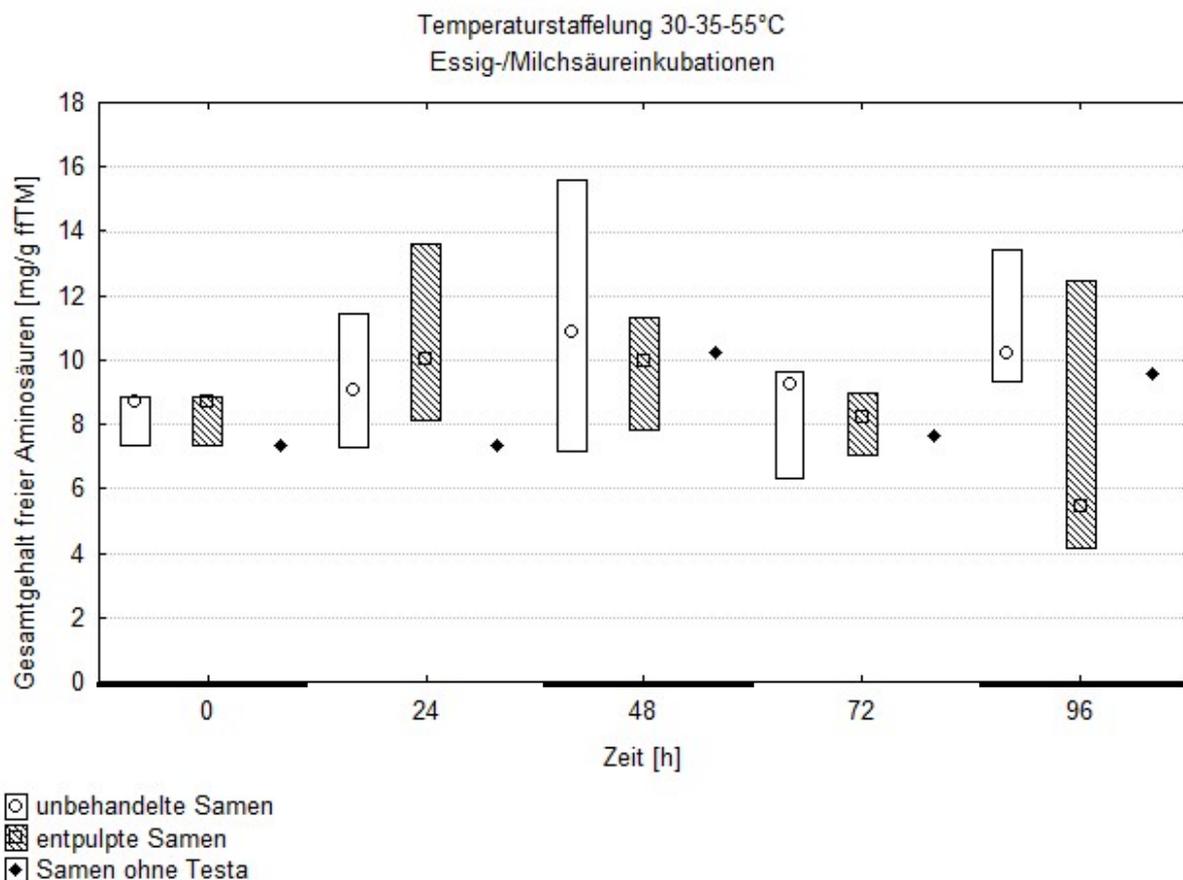


**Abbildung 5-17: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung der freien Aminosäuren während der Milchsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Eine Unterscheidung der Inkubationen nach der Konzentration und dem pH-Wert der Milchsäuremedien erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 25mmol/l bis 100mmol/l. n=4-6

Der Verlauf der Bildung freier Aminosäuren ist für unbehandelte und entpulpte Samen prinzipiell gleich (s. Abbildung 5-17) und entspricht dem in Abbildung 5-2 dargestellten

Ergebnis. Innerhalb der ersten 48 Stunden bei einer Temperatur von 30°C und 35°C nimmt der Gehalt an freien Aminosäuren in den Samen zu, danach nimmt der Gehalt in den Samen ab. Somit bestätigt sich der Befund, dass ab 48 Stunden, einhergehend mit der Temperaturerhöhung auf 55°C, dem proteolytischen Freisetzungsprozess eine Abnahme der freien Aminosäuren überlagert ist. Zusätzlich muss davon ausgegangen werden, dass bei 55°C durch Hitzeinaktivierung die proteolytische Freisetzung der Aminosäuren nach kurzer Anfangsaktivität gestoppt wird (s. dazu Abbildung 5-3 und Abbildung 5-4).

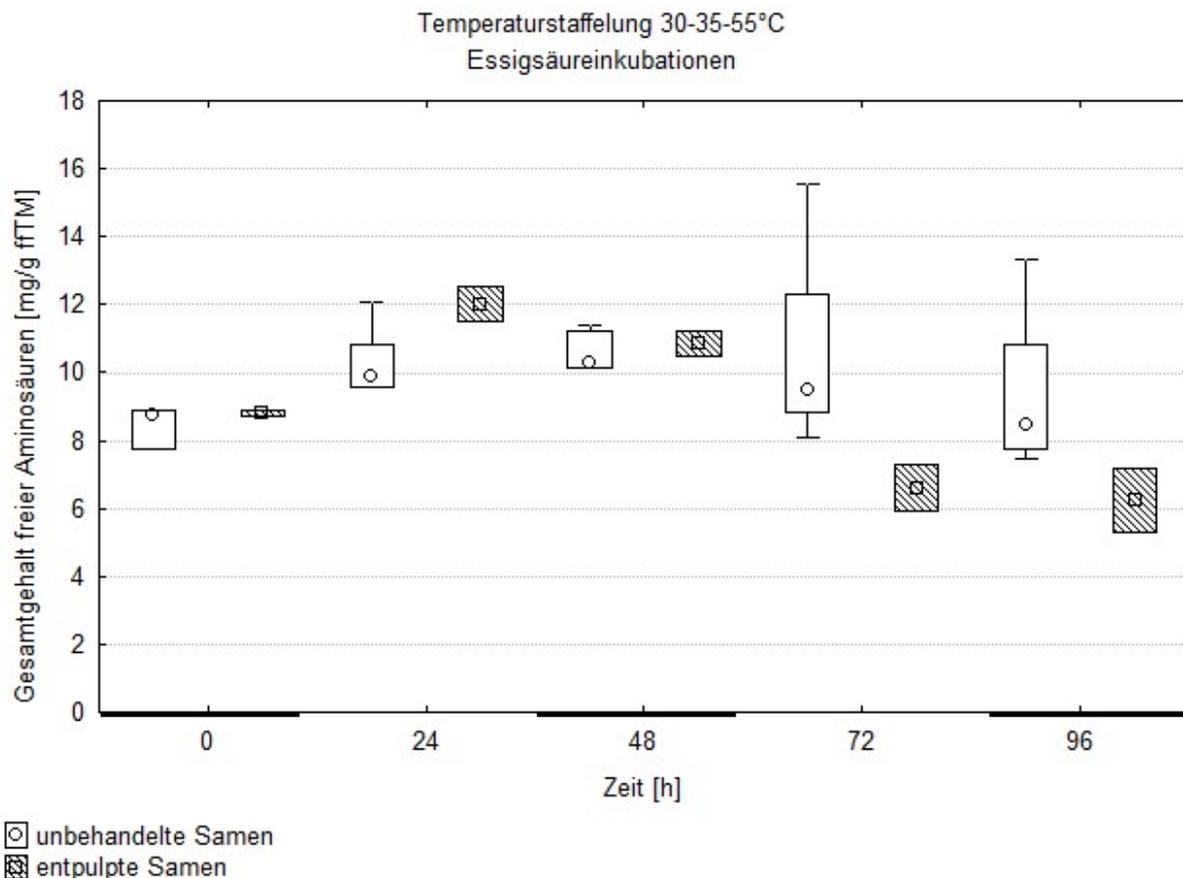


**Abbildung 5-18: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung der freien Aminosäuren während der Essig-/Milchsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C.**

Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Eine Unterscheidung der Inkubationen nach der Konzentration und dem pH-Wert der Essig-/Milchsäuremedien erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 12,5mmol/l bis 50mmol/l. n=1-3

Die Samen ohne Testa weisen keine Anreicherung an freien Aminosäuren während der Inkubation mit Milchsäuremedien auf. Sie entsprechen im Anfangsgehalt an freien Aminosäuren (0 Std.) den Vergleichsansätzen und fallen im Verlauf der Inkubation bis zu 96 Std. im Gehalt an freien Aminosäuren unter den Ausgangswert ab.

Auch die anderen Ansätze fallen nach der Temperaturerhöhung auf 55°C ab 48 Std. unter die Ausgangswerte ab. Dies lässt vermuten, dass die Testa, sofern sie eine Kontrollfunktion auf den Ein- und Austransport von Substraten hat, diese Funktion ab 48 Std. Inkubation nicht mehr ausübt. Der höchste erhaltene Gesamtgehalt an freien Aminosäuren wird auch hier nach 48 Stunden von unbehandelten Samen mit einem Gehalt von 10,3mg/g ffTM erreicht.



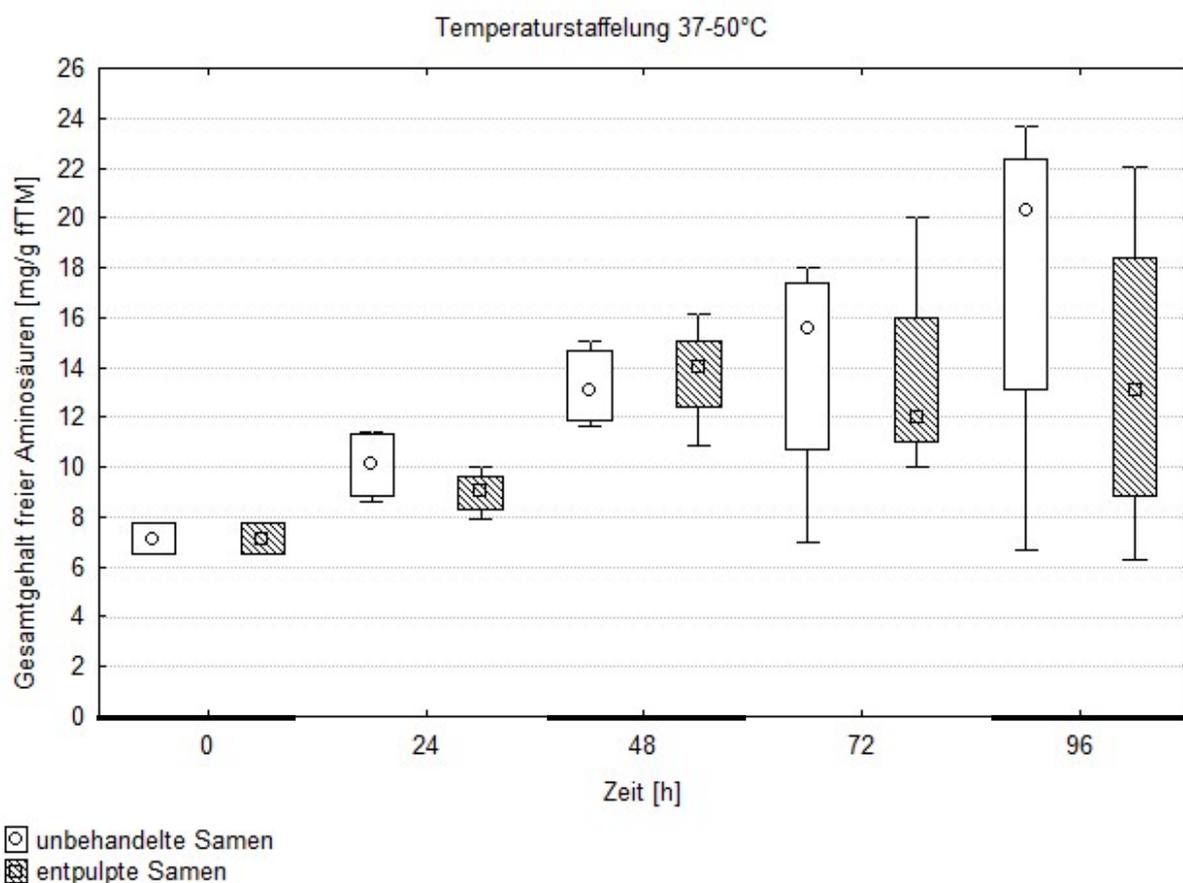
**Abbildung 5-19: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung der freien Aminosäuren während der Essigsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Eine Unterscheidung der Inkubationen nach der Konzentration und dem pH-Wert der Essigsäuremedien erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 25mmol/l bis 100mmol/l. n=2-5

Bei einer Inkubation mit einem Gemisch aus Essig- und Milchsäure haben die verschiedenen Behandlungen keinen eindeutigen Einfluss auf den Gesamtgehalt an freien Aminosäuren (s. Abbildung 5-18) bei dem Temperaturverlauf 30-35-55°C. Der höchste Gehalt mit 10,9mg/g ffTM wird wieder nach 48 Stunden von den unbehandelten Samen erreicht. Die Temperaturerhöhung nach 48 Stunden auf 55°C bewirkt wieder eine Abnahme der Gehalte an

freien Aminosäuren in den Samen. Die Werte sind bei 96 Stunden stark schwankend und schwer zu deuten.

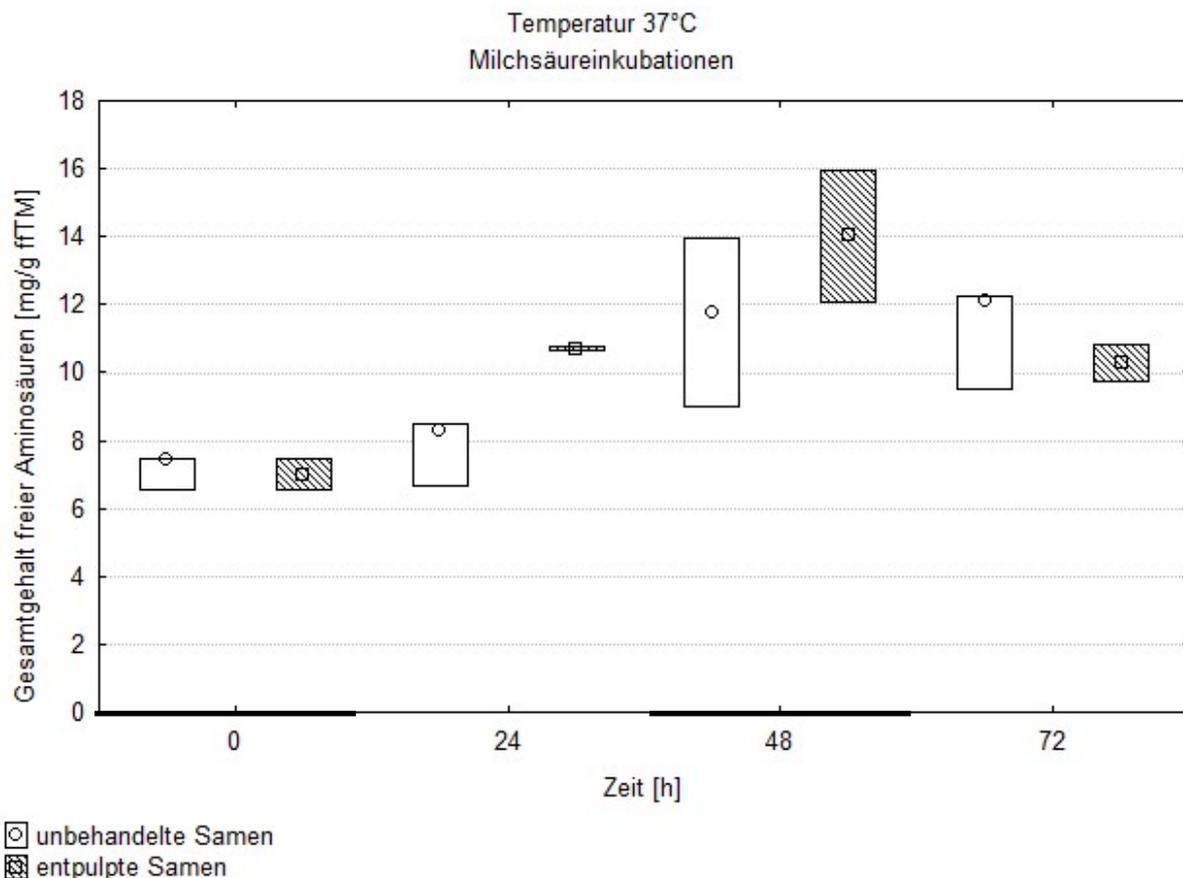
Die Entfernung der Testa inklusive der Pulpa vor der Inkubation wirkt einer Anreicherung der freien Aminosäuren in den Samen entgegen und führt auch zu einer sehr schnellen Ansäuerung der Gewebe im Inkubationsansatz, wie aus dem AiF Projekt 14491-N (Rohsius und Lieberei, 2008) abgeleitet werden kann. Inwieweit die Samen mit Testa mit vorhandener Pulpa und die Samen mit Testa nach Entfernung der Pulpa mittels Pectinex® BE XXL sich im Verlauf der Anreicherung der freien Aminosäuren unterscheiden, wird in den folgenden Experimenten überprüft.



**Abbildung 5-20: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung der Aminosäuren während der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Eine Unterscheidung der Inkubationen nach verwendeter Säure, deren Konzentration und pH-Wert erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 50mmol/l bis 100mmol/l. n=4

In Samen mit Testa mit und ohne Pulpa ist bei Inkubationen mit Essigsäure eine Zunahme der freien Aminosäuren über die Inkubationszeit bis 48 Stunden, bei entpulpten Samen nur bis 24 Stunden zu verzeichnen (s. Abbildung 5-19). Mit der Temperaturerhöhung auf 55°C nach 48 Stunden erfolgt die Abnahme der Gehalte an freien Aminosäuren in den Samen ohne Pulpa deutlich schneller und sinkt unter die Ausgangswerte.

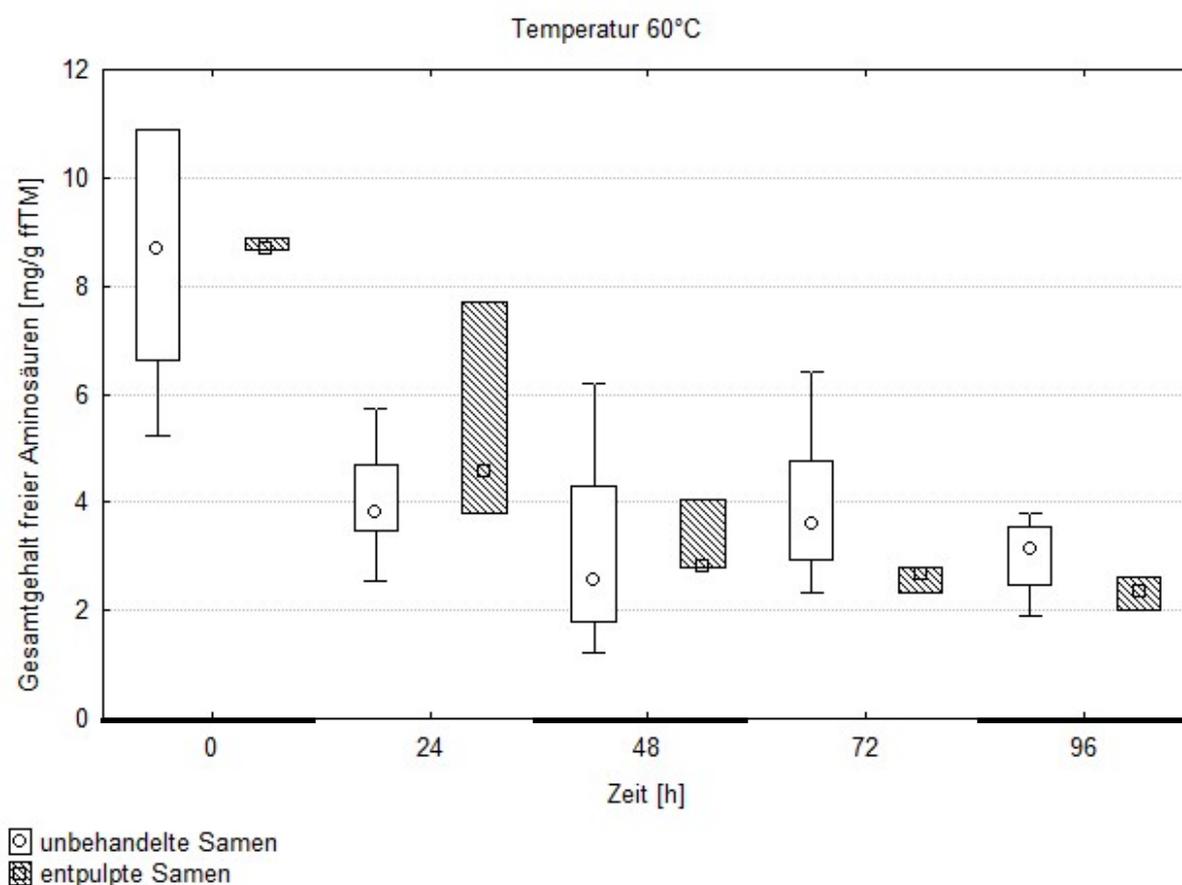


**Abbildung 5-21: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung der freien Aminosäuren während der Inkubation mit Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C.** Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). Eine Unterscheidung der Inkubationen nach der Konzentration und dem pH-Wert der Milchsäuremedien erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 25mmol/l bis 100mmol/l. n=2-3

Bei der Temperaturstaffelung 37-50°C wirkt sich die unterschiedliche Behandlung der Samen vor Inkubationsbeginn nicht stark auf die Aminosäuregehalte der Samen aus. Sowohl die unbehandelten wie auch die entpulpten Samen sind über 48 Stunden durch Zunahme der Gehalte an freien Aminosäuren gekennzeichnet (s. Abbildung 5-20). Bei der Temperatursteigerung von 37°C auf 50°C ist bei den unbehandelten Samen eine weitere Zunahme der freien Aminosäuren zu verzeichnen, bei den entpulpten Samen bleibt diese Zunahme aus. Wie schon bei früheren Inkubationen schwanken die Gehalte an freien

Aminosäuren bei den Inkubationszeiten von 72 Stunden und 96 Stunden. Dies ist vermutlich mit der Überlagerung von Aminosäurefreisetzung durch Proteolyse und parallelen Aminosäureverlust durch andere Prozesse, wahrscheinlich durch Abgabe an das Medium, zu erklären.

Auch bei Inkubationen mit einer konstanten Temperatur von 37°C wurden unterschiedlich behandelte Samen eingesetzt. Die Ergebnisse der verschiedenen Behandlungsarten bei den unterschiedlichen Säureinkubationen werden im Folgenden dargestellt.



**Abbildung 5-22: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung der freien Aminosäuren während der Inkubation bei einer konstanten Temperatur von 60°C.**

Angegeben sind die Mediane mit der dazugehörigen Perzentile (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Eine Unterscheidung der Inkubationen nach verwendeter Säure, deren Konzentration und pH-Wert erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. n=3-9

Bei Säureinkubationen mit reiner Milchsäure steigt der Gehalt an freien Aminosäuren in den Samen innerhalb der ersten 48 Stunden an, über diesen Zeitraum hinaus jedoch nicht. Die Samenbehandlung zeigt bei den reinen Milchsäureinkubationen bei einer konstanten Temperatur von 37°C nur nach 24 Stunden einen Einfluss auf die Freisetzung der freien

Aminosäuren (s. Abbildung 5-21). Danach ist der Verlauf der Inkubationen mit unbehandelten und entpulpten Samen sehr ähnlich, so dass keine deutlichen Unterschiede festgestellt werden können. Beide Varianten der Samenbehandlung erreichen bei den Inkubationen mit reiner Milchsäure die höchsten Gehalte an freien Aminosäuren nach 48 Stunden.

Wird die Samenbehandlung bei Inkubationen mit einer Temperatur von konstant 60°C durchgeführt, ergibt die Vorbehandlung keinen Einfluss auf die Entwicklung der freien Aminosäuren. Bei 60°C vermindert sich der Gehalt der freien Aminosäuren bei beiden Varianten im Verlauf der Inkubation (s. Abbildung 5-22). Eine Freisetzung von Aminosäuren findet bei einer Temperatur von konstant 60°C, aufgrund der Inaktivierung der Enzyme, nicht statt. Ein Absterben der Samen und dadurch bedingt eine Auswaschung der vorhandenen Aminosäuren in das Inkubationsmedium ist wahrscheinlich und führt zu einer Verringerung der Gehalte an freien Aminosäuren in den Samen im Verlauf der Inkubation.

#### **5.1.1.1.7 Zusammenfassung**

Die Gehalte an freien Aminosäuren in den Kakaosamen lassen sich durch eine Veränderung der Inkubationsbedingungen variieren. Das gewählte Temperaturregime hat einen entscheidenden Einfluss auf die Freisetzung der Aminosäuren. Zum Erreichen eines hohen Gehaltes an freien Aminosäuren bedarf es nicht zwingend fermentationsähnlicher Temperaturfolgen. Ausschlaggebend ist es, dass optimale Bedingungen für die beiden Proteolyseenzyme zum Abbau der Speicherproteine vorliegen. Die Wahl einer für viele Enzyme extremen Temperatur wie z.B. 60°C führt durch die Hitzeinaktivierung der Enzyme zu einem deutlich geringeren Gehalt an freien Aminosäuren in den Samen.

Die höchsten Gehalte an freien Aminosäuren werden bei einer konstanten Temperatur von 41°C erzielt. Innerhalb der 41°C Inkubationen werden mit 100mM Essigsäure (pH 2,9) die höchsten Gehalte an freien Aminosäuren mit 29,7mg/g fTMM nach 96 Stunden erreicht (s. Abbildung 5-13). Ähnliche Gehalte an freien Aminosäuren wie bei den 41°C Inkubationen werden mit dem Temperaturgradienten 37-50°C erreicht (s. Abbildung 5-6).

Inkubationen mit reiner Essigsäure wirken sich auf die Gehalte an freien Aminosäuren bei verschiedenen Temperaturen (30-35-55°C, 37°C und 41°C) während der Inkubation positiv aus. Inkubationen mit reiner Milchsäure dagegen führt bei den Temperaturen von 30-35-55°C und 37°C zu niedrigeren Gehalten an freien Aminosäuren. Dieser Unterschied in den

Gehalten an freien Aminosäuren kann in einer unterschiedlichen lokalen Ansäuerung des Speichergewebes bzw. der Aleuronvakuolen begründet sein, wodurch die Enzymaktivität unterschiedlich beeinflusst wird. Diffundieren die beiden Säuren (Essig- und Milchsäure) unterschiedlich schnell durch das Samengewebe erfolgt auch die Ansäuerung des Gewebes zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Ansäuerung des Gewebes ist wichtig für den Abbau der Speicherproteine, da die Aspartylendoprotease ein pH-Optimum von 3,4 hat. Die durch die Proteolyse der Speicherproteine freigesetzten Peptide und Aminosäuren puffern die eindringenden Säuren ab. Eine eventuell unterschiedliche Abpufferung von Essig- und Milchsäure wirkt sich auf die weitere Freisetzung von Peptiden und Aminosäuren aus, so dass die Gehalte an freien Aminosäuren säurespezifisch verschieden sein können.

Bei einer konstanten Temperatur von 50°C führt die Verwendung von Säuren im Inkubationsmedium gegenüber destilliertem Wasser während der Inkubation nicht mehr zu einer Verbesserung der Gehalte an freien Aminosäuren. Die Gehalte an freien Aminosäuren der Samengewebe bei den Inkubationen mit Säure und der mit destilliertem Wasser sind sehr ähnlich. Bei dieser Temperatur wird die Enzymaktivität durch das Vorhandensein von einer Säure im Inkubationsmedium nicht mehr positiv beeinflusst.

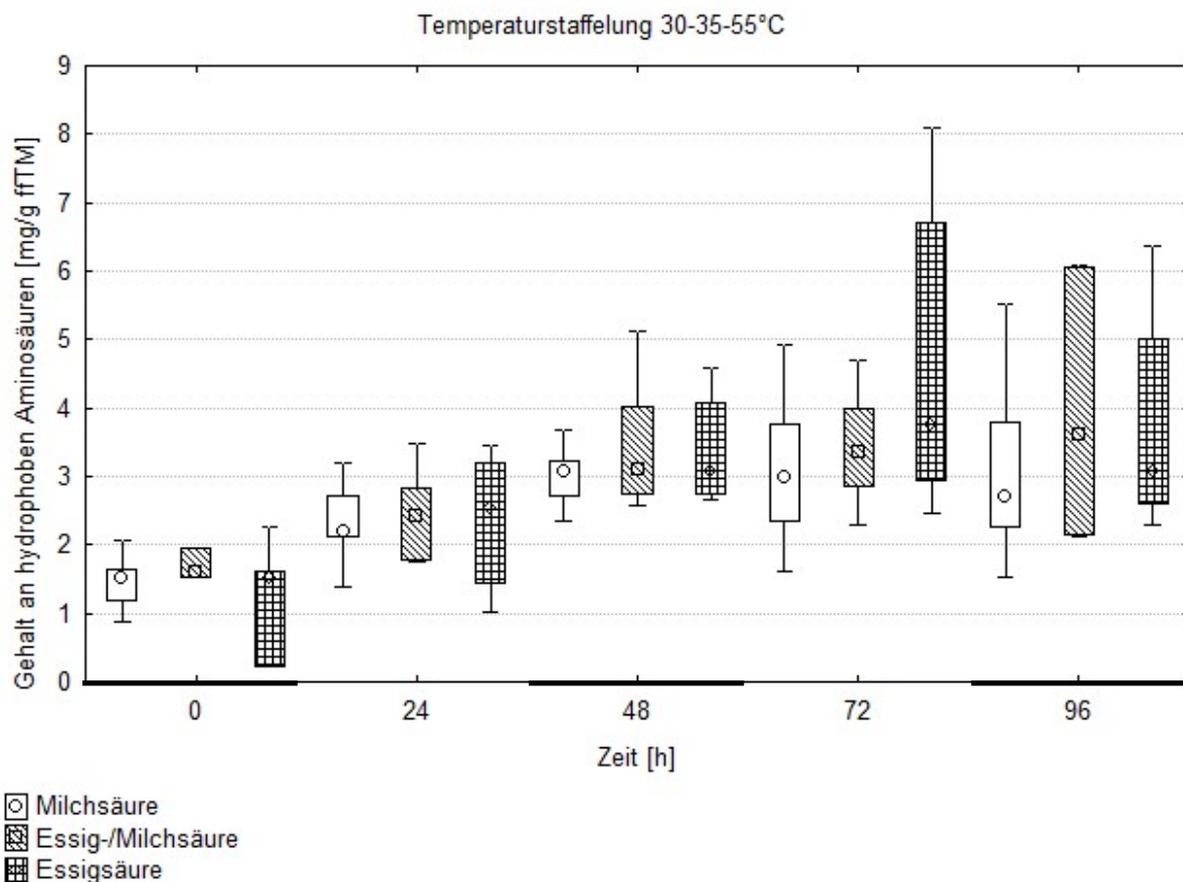
Zur Untersuchung des Einflusses der Pulpa und der Testa auf die Inkubation wurden folgende Samen für die Inkubation verwendet: Samen ohne Testa und Pulpa, entpulperte Samen und unbehandelte Samen.

Die Entfernung der Pulpa führt bei verschiedenen Temperaturen nicht zu einer stärkeren Anreicherung der freien Aminosäuren, allerdings sind die Verluste der Aminosäuren nach Entfernung der Pulpa in der späteren Phase der Inkubation stärker als in unbehandelten Samen.

### **5.1.1.2 Hydrophobe Aminosäuren**

Während des Speicherproteinabbaus durch die Aspartylendoprotease entstehen vorwiegend Peptide mit hydrophoben Enden. Diese hydrophoben Aminosäuren werden durch die Carboxypeptidase abgespalten, wodurch freie hydrophobe Aminosäuren entstehen. Diese hydrophoben Aminosäuren, insbesondere Leucin, Alanin, Phenylalanin und Tyrosin, haben eine Schlüsselfunktion für die Bildung des Kakaoaromas (Hashim et al., 1998). Für die Auswertung wurden die hydrophoben Aminosäuren Leucin, Alanin, Phenylalanin, Valin, Isoleucin und Tyrosin herangezogen, da den hydrophoben Aminosäuren eine besondere

Bedeutung für das Aromapotential zukommt. Deshalb wurde untersucht, ob sich die Gehalte an hydrophoben Aminosäuren mittels der Variation der Inkubationsparameter erhöhen lassen. Zusätzlich zu den im Folgenden aufgeführten Inkubationstemperaturen wurden auch Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 60°C durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Inkubationen bei 60°C sind wegen ihrer geringen Gehalte an hydrophoben Aminosäuren, begründet durch die bei dieser hohen Temperatur erfolgten Inaktivierung der Enzyme, anstatt graphisch nur tabellarisch im Anhang (s. Tab.12-2) aufgeführt.

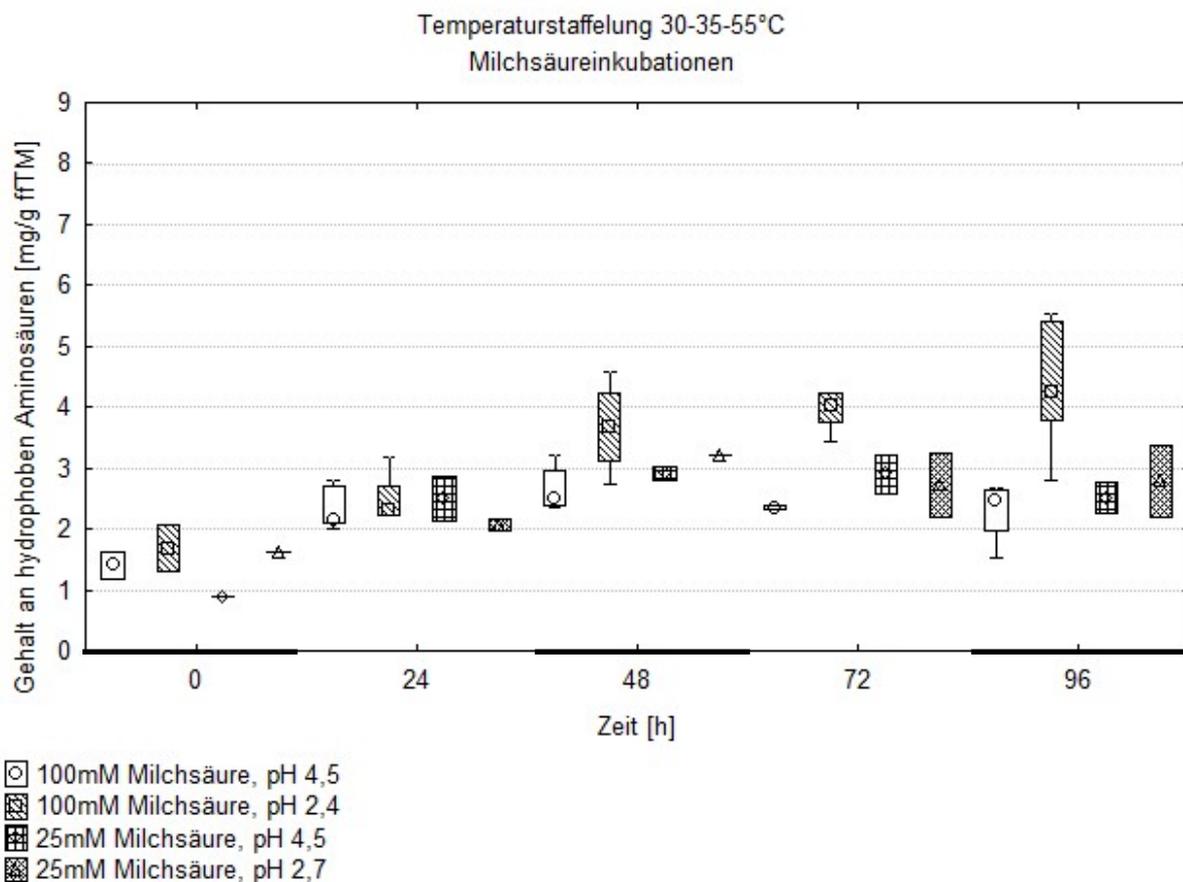


**Abbildung 5-23: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der für das Inkubationsmedium gewählten Säure bzw. von dem Säuregemisch.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 12,5mmol/l bis 100mmol/l. n=7-14 (zusammengefasste Daten)

### 5.1.1.2.1 Temperaturverlauf mit der Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C

Zu Beginn verhalten sich die Inkubation mit den verschiedenen Säuren ähnlich, erst nach 72 Stunden sind Unterschiede zu erkennen (s. Abbildung 5-23). Die Sameninkubationen mit reinen Milch- und Essigsäuremedien unterscheiden sich zu diesem Zeitpunkt voneinander. Die Essigsäure/Milchsäureinkubation liegt mit ihren Gehalten zwischen diesen beiden Inkubationen.

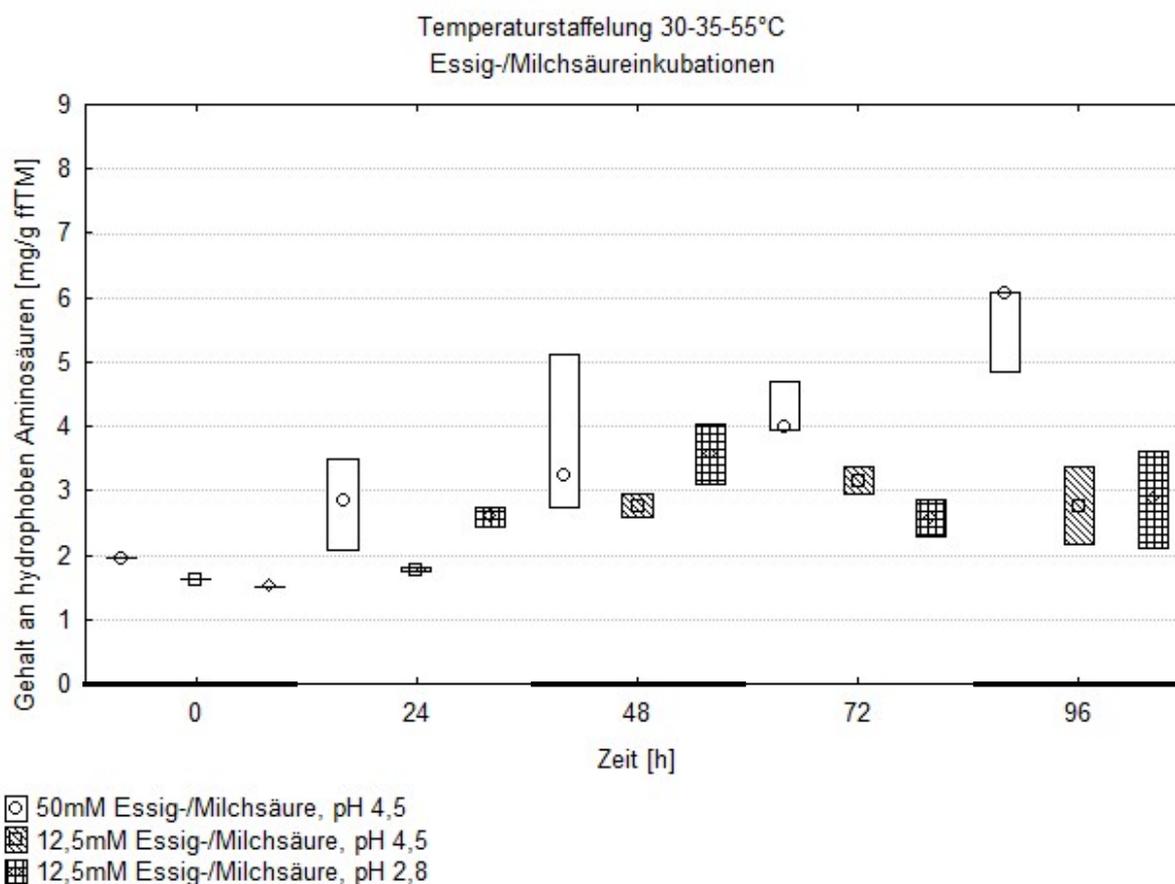


**Abbildung 5-24: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Milchsäure bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=2-5

Bei den Inkubationen mit reiner Milchsäure sind schon nach 48 Stunden die ersten Unterschiede (s. Abbildung 5-24) zu beobachten. Die beiden Inkubationen mit 100mM Milchsäure weisen zu diesem Zeitpunkt einen Unterschied im Gehalt an hydrophoben Aminosäuren auf, wohingegen sich die beiden Inkubationen mit 25mM Milchsäure nicht

voneinander unterscheiden. Dieses Bild bleibt auch nach 72 Stunden noch bestehen. Allerdings liegt die Inkubation mit 100mM Milchsäure und pH 2,4 mittlerweile deutlich über den anderen Inkubationen mit Milchsäure. Zum Ende der Inkubation nach 96 Stunden hat sich diese Inkubation wegen ihres Gehaltes an hydrophoben Aminosäuren weiter von den anderen Inkubationen entfernt. Mit Ausnahme der Inkubationen mit 100mM Milchsäure und pH 2,4 erfolgt nach 48 Stunden Inkubation nur noch ein geringer Anstieg der Gehalte an hydrophoben Aminosäuren.



**Abbildung 5-25: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit einem Essigsäure/Milchsäuregemisch bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=2-3

Bei Inkubationen mit 100mM Milchsäure und pH 2,4 verläuft die Entstehung der hydrophoben Aminosäuren über 48 Stunden nahezu linear, flacht später, nach 48 Stunden, ab, erreicht aber nach 96 Stunden noch einen Gehalt von 4,2mg/g fTMM. Bei der Inkubation mit 100mM Milchsäure und pH 4,5 ist die Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren geringer.

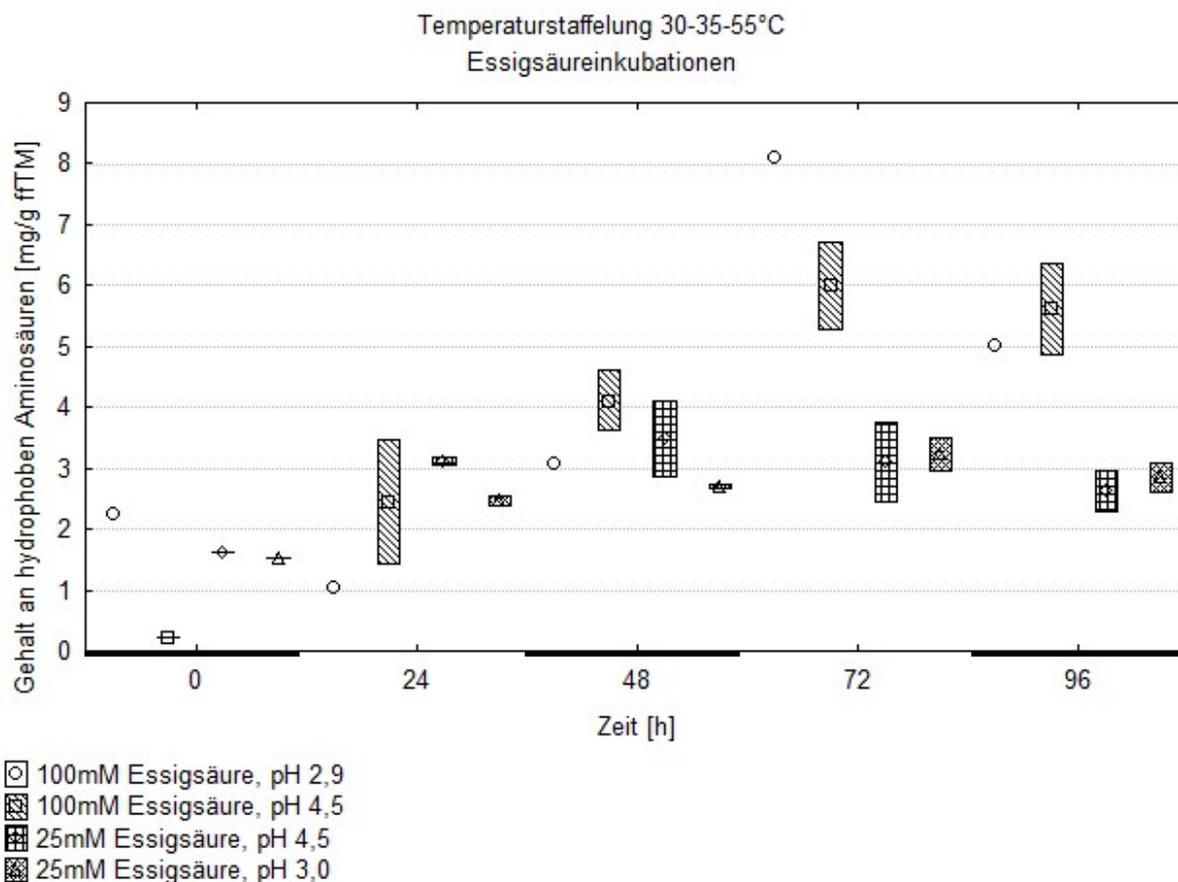
Bei Verwendung von 25mM Milchsäure mit pH 2,7 oder pH 4,5 als Inkubationsmedium ist in jedem Fall die Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren geringer und liegt mit 2,5 bzw. 2,8mg/g ffTM deutlich niedriger als bei Einsatz von 100mM Milchsäure mit pH 2,4 als Inkubationsmedium.

Die Gehalte an hydrophoben Aminosäuren nehmen in den höchstkonzentrierten Essig-/Milchsäuremedien nahezu linear über die gesamte Inkubationszeit zu (s. Abbildung 5-25). Der Höchstwert wird mit 6,1mg/g ffTM nach 96 Stunden erreicht. Die Inkubationen mit 12,5mM Essig-/Milchsäure liefern nur eine geringe Menge an freien hydrophoben Aminosäuren und unterscheiden sich in ihrer Auswirkung trotz unterschiedlicher Anfangs-pH-Werte nicht. Nach 48 Stunden Einwirkzeit findet keine Zunahme der Gehalte an hydrophoben Aminosäuren mehr statt.

Bei den Inkubationen mit einem Gemisch aus Essigsäure und Milchsäure als Inkubationsmedium beeinflusst die Säurekonzentration die Entstehung der hydrophoben Aminosäuren stärker als der pH-Wert.

Im Gegensatz zu Inkubationen mit reiner Milchsäure unterscheiden sich die Inkubationen mit reiner Essigsäure nach 48 Stunden nicht. Erst nach 72 Stunden unterscheiden sich die beiden Inkubationen mit 100mM Essigsäure von den Inkubationen mit 25mM Essigsäure, wobei sich nur die Inkubation mit 100mM Essigsäure und einem pH-Wert von 2,9 deutlich von den anderen drei Inkubationen unterscheidet (s. Abbildung 5-26). Nach 96 Stunden ist der Gehalt bei der Inkubation mit 100mM Essigsäure und einem pH-Wert von 2,9 an hydrophoben Aminosäuren verglichen mit dem Wert nach 72 Stunden gesunken und liegt jetzt im gleichen Bereich wie die entsprechende Inkubation mit einem pH-Wert von 4,5. Die Gehalte der beiden Inkubationen mit einer Konzentration von 25mM Essigsäure liegen unter denen mit einer Konzentration von 100mM. Deutlich unterscheidet sich nur die Inkubation mit 100mM Essigsäure und einem pH-Wert von 4,5 von den beiden Inkubationen mit 25mM Essigsäure.

Bei den Inkubationen mit reiner Essigsäure unterliegen die Gehalte der hydrophoben Aminosäuren einem Einfluss der verwendeten Säurekonzentration, ein Einfluss des pH-Wertes ist nicht festzustellen. Eine weitere Freisetzung an hydrophoben Aminosäuren über die ersten 48 Stunden hinaus ist nur bei den Inkubationen mit einer Essigsäurekonzentration von 100mM zu beobachten.



**Abbildung 5-26: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Essigsäure bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

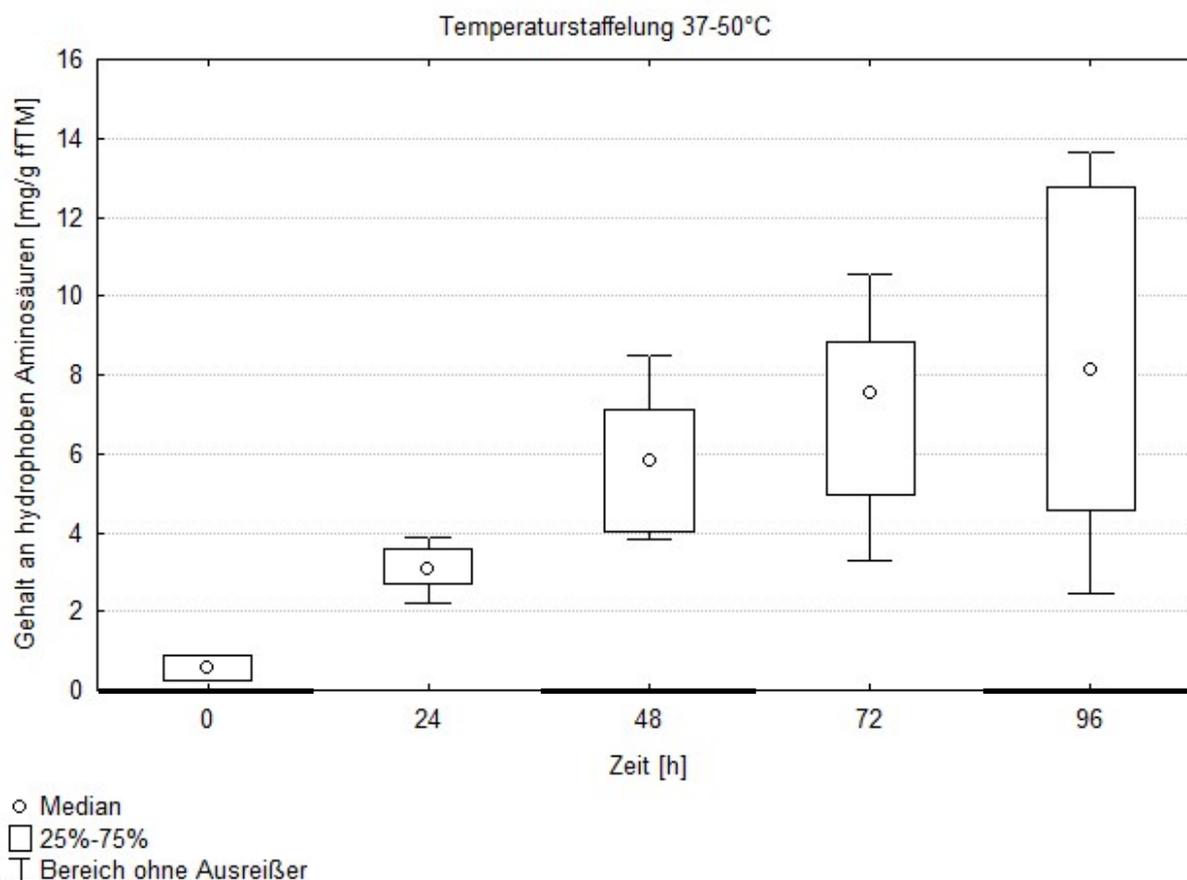
Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=1-2

#### 5.1.1.2.2 Temperaturverlauf mit der Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C

Bleiben die anderen Inkubationsparameter unberücksichtigt steigt der Gehalt an hydrophoben Aminosäuren beim Temperaturgradienten 37-50°C im Laufe der Inkubation kontinuierlich an (s. Abbildung 5-27). Die Vergrößerung der Perzentile im Verlauf der Inkubation weist daraufhin, dass die anderen Inkubationsparameter wie Art der Säure und der verwendete pH-Wert Auswirkungen auf die Bildung der hydrophoben Aminosäuren haben.

Daher werden im Folgenden die verschiedenen Inkubationen einzeln dargestellt (s. Abbildung 5-28).

Die verschiedenen getesteten Inkubationsvarianten unterscheiden sich bei der Temperaturstaffelung 37-50°C deutlich in den Gehalten an hydrophoben Aminosäuren. Schon nach 24 Stunden setzt sich die Inkubation mit reiner Essigsäure stark von der Inkubation mit reiner Milchsäure ab.

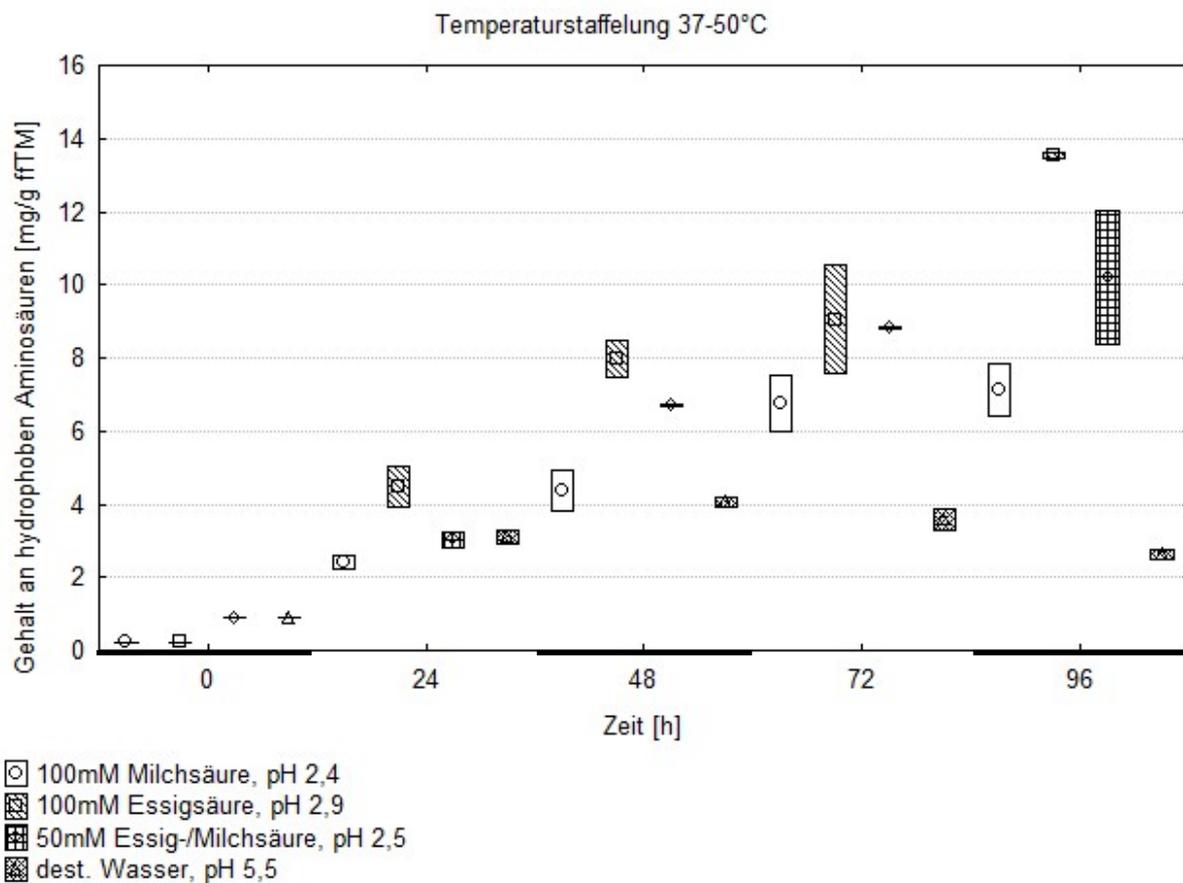


**Abbildung 5-27: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Die Ergebnisse aller Inkubationen bei diesem Temperaturgradient wurden zusammengefasst. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. n=8

24 Stunden später unterscheiden sich die Inkubationen mit Essigsäure und die mit Essigsäure/Milchsäure eindeutig von der Inkubation mit Milchsäure und der Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser, die beide einen niedrigeren Gehalt an hydrophoben Aminosäuren aufweisen, als die Inkubationen, die Essigsäure enthalten (s. Abbildung 5-28). Die beiden Inkubationen, die Essigsäure enthalten, bleiben auch die restliche Dauer der Inkubation in ihren Gehalten an hydrophoben Aminosäuren über den beiden anderen Inkubationen. Bei der Kontrollinkubation werden geringere Gehalte erzielt als bei Inkubationen mit säurehaltigen Medien. Zum Ende der Inkubation, nach 96 Stunden,

unterscheiden sich alle vier Varianten deutlich voneinander. Die Inkubation mit reiner Essigsäure erreicht nach 96 Stunden mit 13,6mg/g fTTM den höchsten Gehalt an hydrophoben Aminosäuren, gefolgt von der Inkubation mit einem Essig-/Milchsäuregemisch.



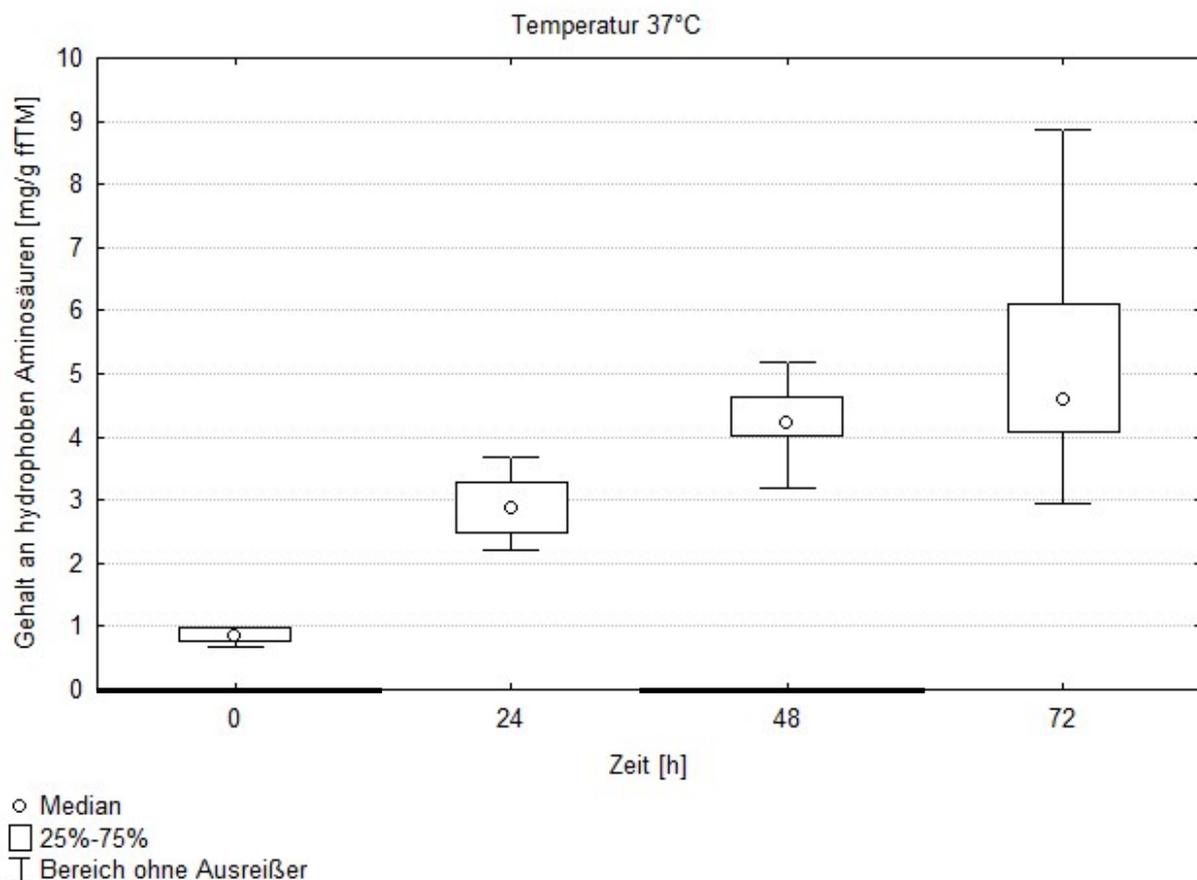
**Abbildung 5-28: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C in Abhängigkeit von dem verwendeten Inkubationsmedium.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=2

Bei dem Temperaturgradienten 37-50°C wird deutlich, dass das verwendete Inkubationsmedium einen starken Einfluss auf die freigesetzten hydrophoben Aminosäuren hat und zwar führt die Inkubation mit 100mM Essigsäure und pH 2,9 zu der höchsten Freisetzung an hydrophoben Aminosäuren.

### 5.1.1.2.3 Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 37°C

Wird die Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 37°C durchgeführt, steigen die Gehalte an hydrophoben Aminosäuren während der Inkubation stetig an (s. Abbildung 5-29). Nach 48 Stunden Inkubation ist nur noch eine geringe Steigerung in der Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren zu beobachten. Die Schwankung der Perzentilen ist hierbei geringer als bei den beiden getesteten Temperaturgradienten.

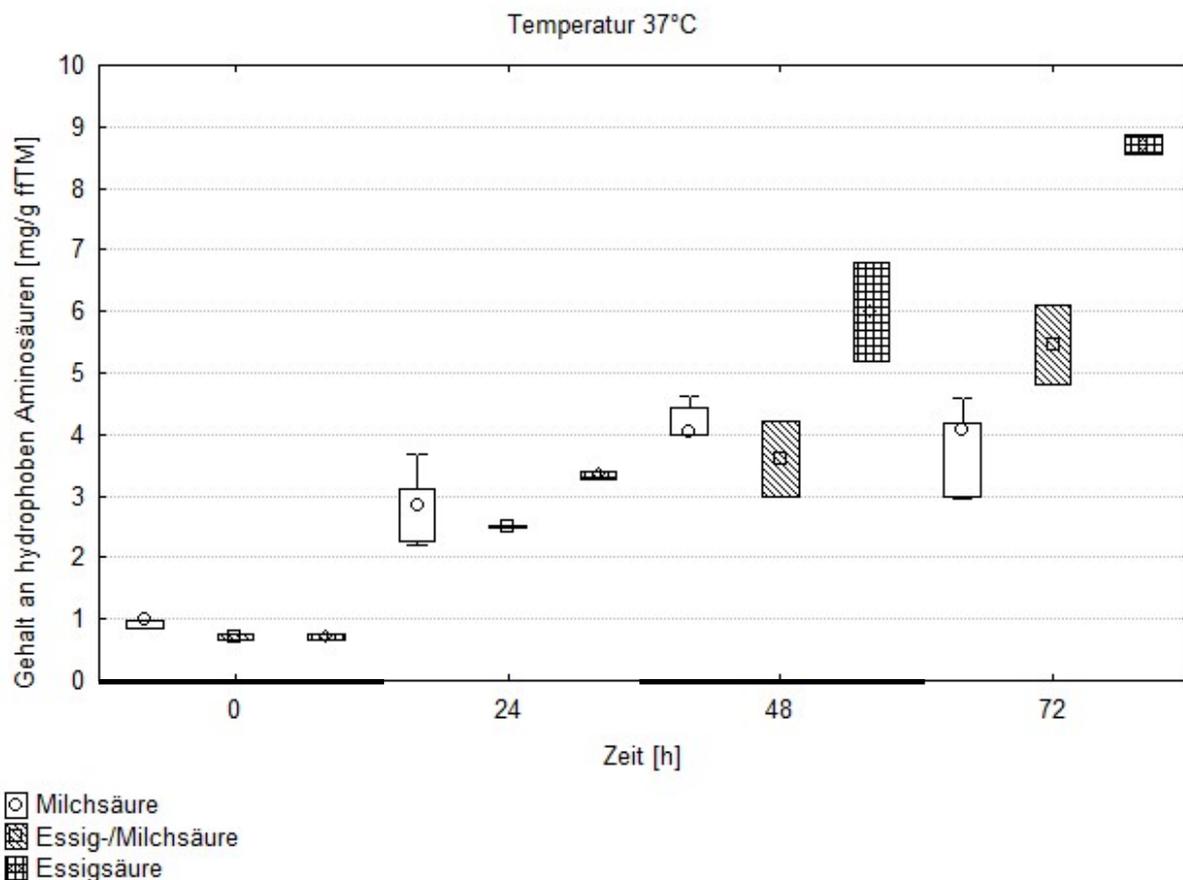


**Abbildung 5-29: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer Inkubationstemperatur von 37°C**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Die Ergebnisse aller Inkubationen bei konstant 37°C wurden zusammengefasst. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. n=9

Eine differenzierte Analyse der erreichten Gehalte an hydrophoben Aminosäuren je nach den Inkubationsmedien während der Inkubation zeigt deutliche Unterschiede (s. Abbildung 5-30). In den ersten 24 Stunden liegen die Gehalte an hydrophoben Aminosäuren bei den verschiedenen Inkubationen mit säurehaltigen Medien noch im gleichen Bereich. Nach 48 Stunden hat sich der Gehalt an hydrophoben Aminosäuren bei der Inkubation mit reiner

Essigsäure deutlich erhöht, während die Inkubationen mit Milchsäure und mit einem Gemisch aus Essig- und Milchsäure in ihren Gehalten nur leicht gestiegen sind und sich im Gegensatz zur Inkubation mit Essigsäure nicht voneinander unterscheiden. Im weiteren Verlauf der Inkubation setzt sich die Inkubation mit Essigsäure weiter von den anderen Inkubationen ab und erreicht den höchsten Gehalt an hydrophoben Aminosäuren. Nach 72 Stunden unterscheiden sich auch die Inkubationen mit Milchsäure und die mit einem Gemisch aus Essigsäure und Milchsäure deutlich voneinander. Die Inkubation mit Milchsäure führt zum geringsten Gehalt an hydrophoben Aminosäuren, die Inkubation mit Essigsäure/Milchsäure liegt mit den Gehalten an hydrophoben Aminosäuren zwischen den beiden anderen Inkubationen.

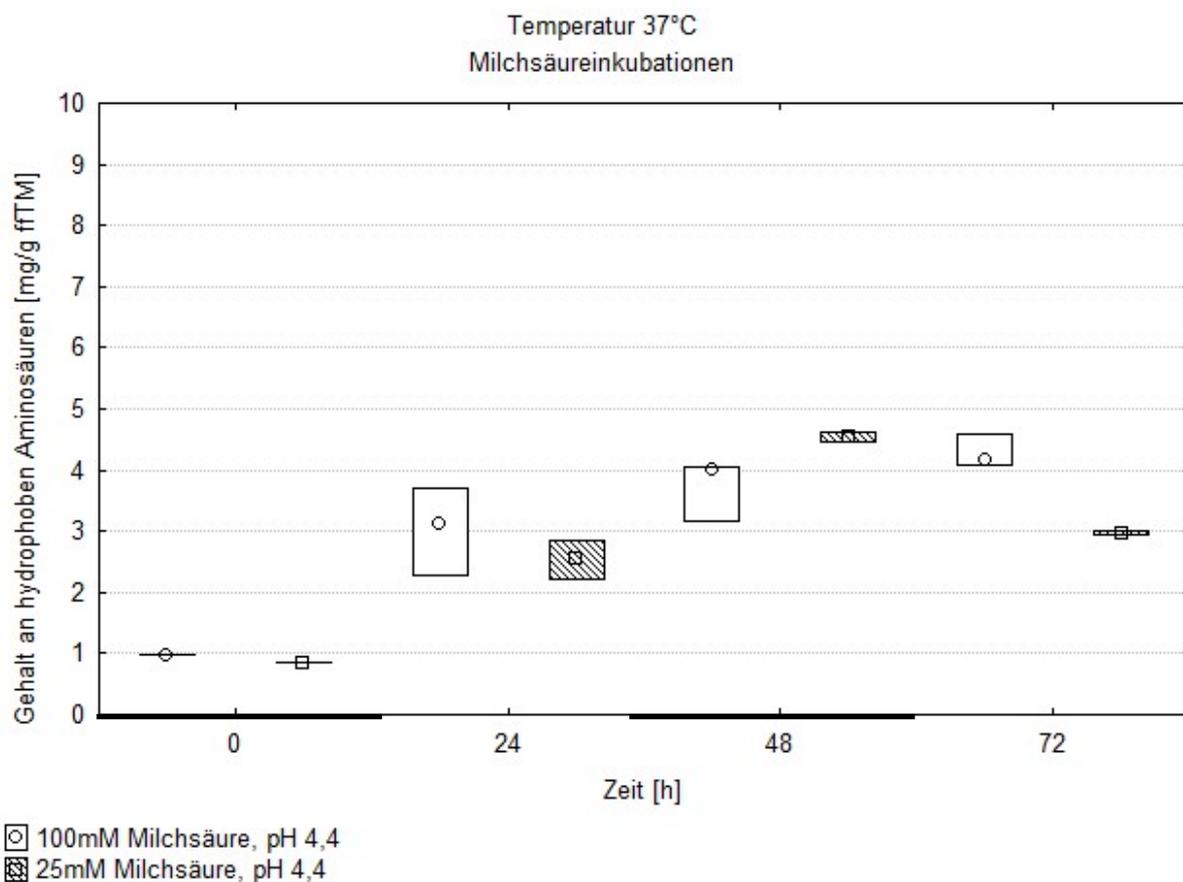


**Abbildung 5-30: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit von der für das Inkubationsmedium gewählten Säure bzw. von dem Säuregemisch.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 25mmol/l bis 100mmol/l. n=2-3

Bei den Inkubationen mit Essigsäure steigt der Gehalt an hydrophoben Aminosäuren auch nach 48 Stunden noch an. Bei den reinen Milchsäureinkubationen erfolgt nach 48 Stunden keine weitere Freisetzung an hydrophoben Aminosäuren.

Nachdem der Vergleich der milchsäurehaltigen Inkubationsmedien mit den Inkubationen mit essigsäurehaltigen Medien (s. Abbildung 5-30) den Hinweis darauf gab, dass die Freisetzung an hydrophoben Aminosäuren bei milchsäurehaltigen Medien geringer ist, sind im Folgenden die einzelnen Inkubationen mit Essig- und Milchsäure bzw. einem Gemisch der beiden Säuren aufgeführt.



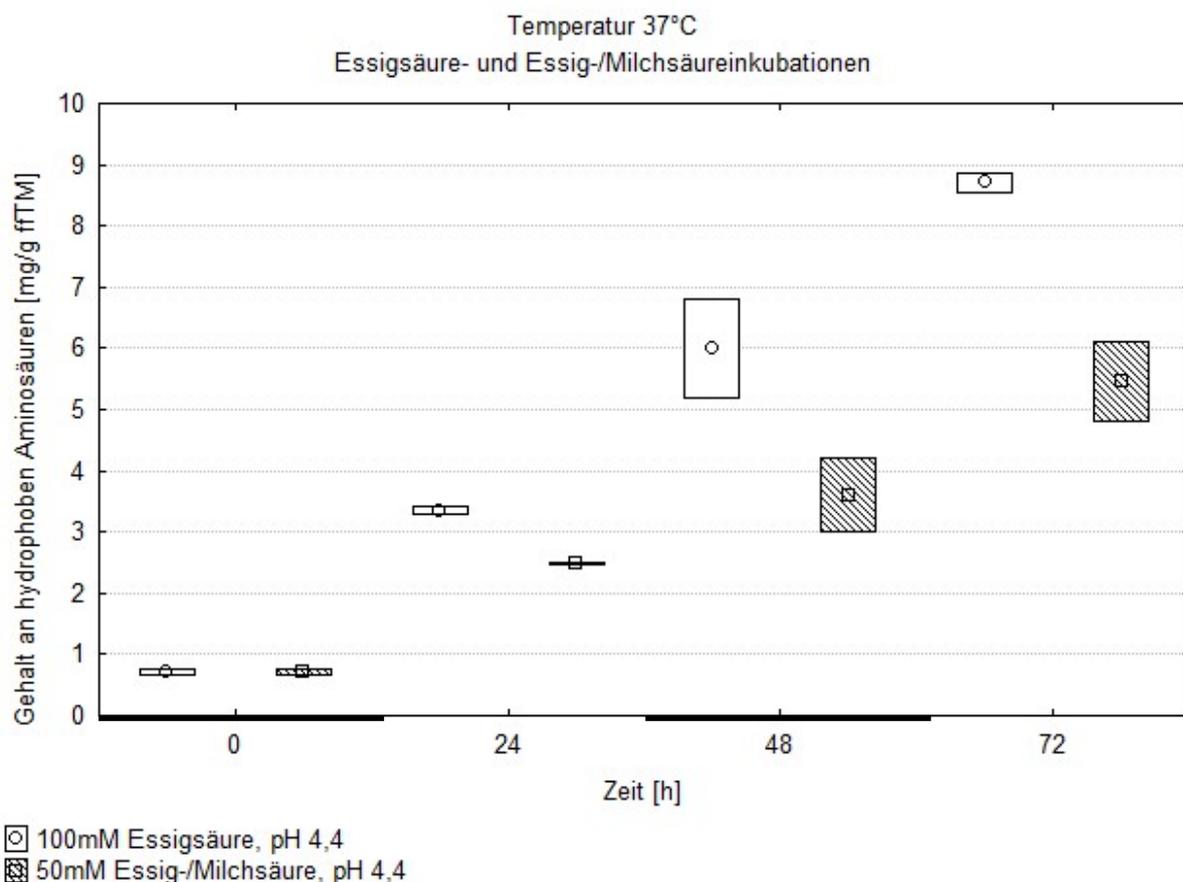
**Abbildung 5-31: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=2-5

Die beiden getesteten Inkubationen mit Milchsäure unterscheiden sich zu Beginn der Inkubation nicht voneinander (s. Abbildung 5-31). Nach 48 Stunden hat die Inkubation mit

einer Milchsäurekonzentration von 25mM einen höheren Gehalt an hydrophoben Aminosäuren als die Inkubation mit 100mM Milchsäure.

Weitere 24 Stunden später kehren sich die Verhältnisse um, nun hat die Inkubation mit 100mM Milchsäure einen deutlich höheren Gehalt an hydrophoben Aminosäuren. Der Gehalt an hydrophoben Aminosäuren sinkt bei der Inkubation mit 25mM Milchsäure nach 48 Stunden wieder ab, hatte aber zu diesem Zeitpunkt mit 4,5mg/g fTfM den höchsten Gehalt von beiden getesteten Inkubationen mit Milchsäure erreicht.



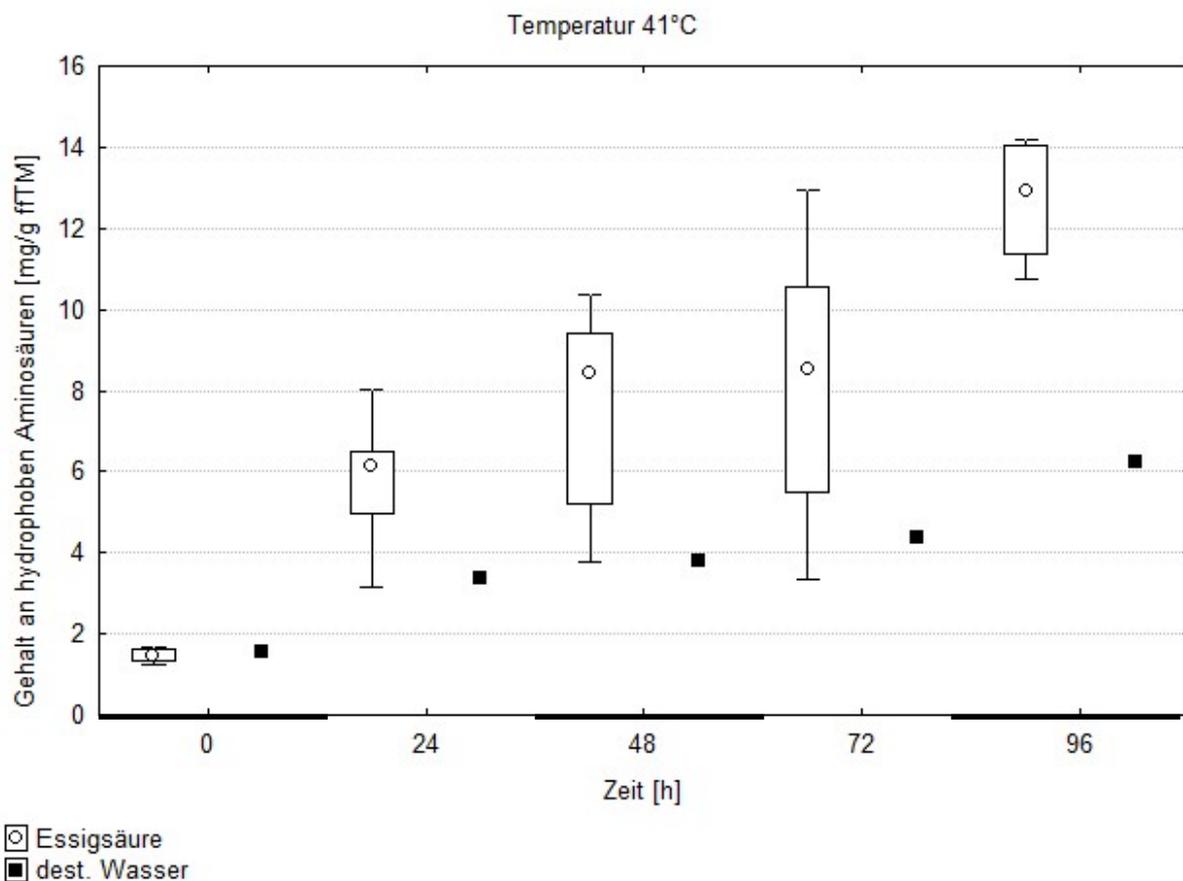
**Abbildung 5-32: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Essigsäure und Essigsäure/Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=2

Aufgrund der Schwankung in den Gehalten an hydrophoben Aminosäuren ergibt sich keine Schlussfolgerung darüber, inwieweit eine Erhöhung der Milchsäurekonzentration die Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren positiv beeinflusst. Allerdings ist dabei nur der pH-Wert 4,4 für das Inkubationsmedium verwendet worden. Bei niedrigeren pH-Werten (pH

2,4; s. Abbildung 5-28) sind allerdings keine hohen Freisetzungswerte an hydrophoben Aminosäuren zu erzielen.

Die Gehalte an freigesetzten hydrophoben Aminosäuren unterscheiden sich deutlich bei den Inkubationen mit Essigsäure und denen mit einem Gemisch aus Essig- und Milchsäure (s. Abbildung 5-32). Da beide Inkubationen mit dem gleichen pH-Wert durchgeführt wurden, kann dieser nicht die Unterschiede bewirkt haben. Nach 48 Stunden hat die Inkubation mit reiner Essigsäure einen deutlich höheren Gehalt an hydrophoben Aminosäuren erreicht als die Inkubation mit dem Säuregemisch. Nach 72 Stunden hat die Inkubation mit Essigsäure mit 8,7mg/g fFTM die höchste Konzentration an hydrophoben Aminosäuren von allen getesteten Varianten bei einer konstanten Temperatur von 37°C erreicht. Die Inkubation mit einem Gemisch aus Essig- und Milchsäure bleibt deutlich dahinter zurück.



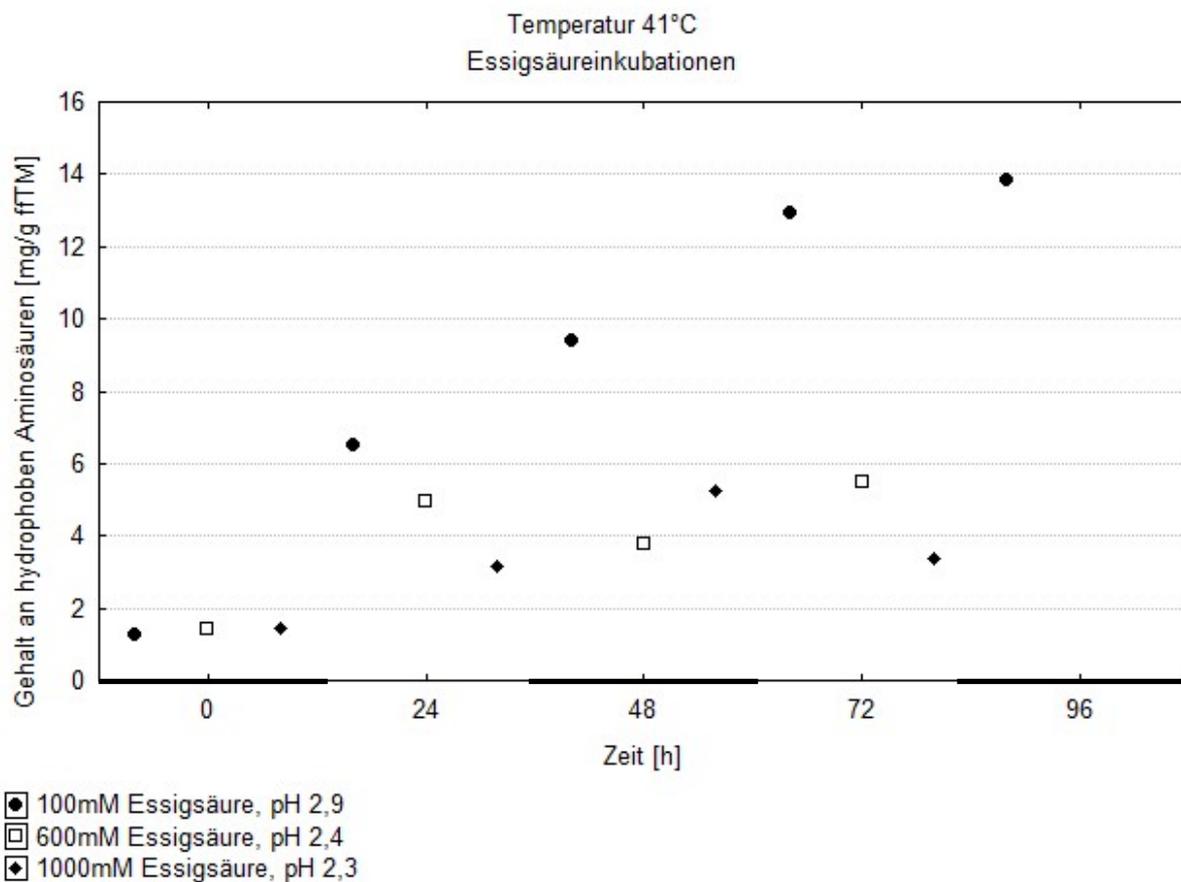
**Abbildung 5-33: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 41°C in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium mit Essigsäure oder destilliertem Wasser.**

Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 100mmol/l bis 1000mmol/l. n=1-5

Die verwendete Säure hat einen entscheidenden Einfluss auf die die Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 37°C. Essigsäure wirkt sich dabei positiv aus, wohingegen mit Milchsäure nur eine schwache Freisetzung an hydrophoben Aminosäuren erfolgt. Wird ein Gemisch aus beiden Säuren verwendet, liegt die freigesetzte Menge zwischen den beiden reinen Säureinkubationen.

#### 5.1.1.2.4 Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 41°C

Bei einer konstanten Temperatur von 41°C steigen die Gehalte an hydrophoben Aminosäuren bei der Verwendung von essigsäurehaltigen Inkubationsmedien stetig an.

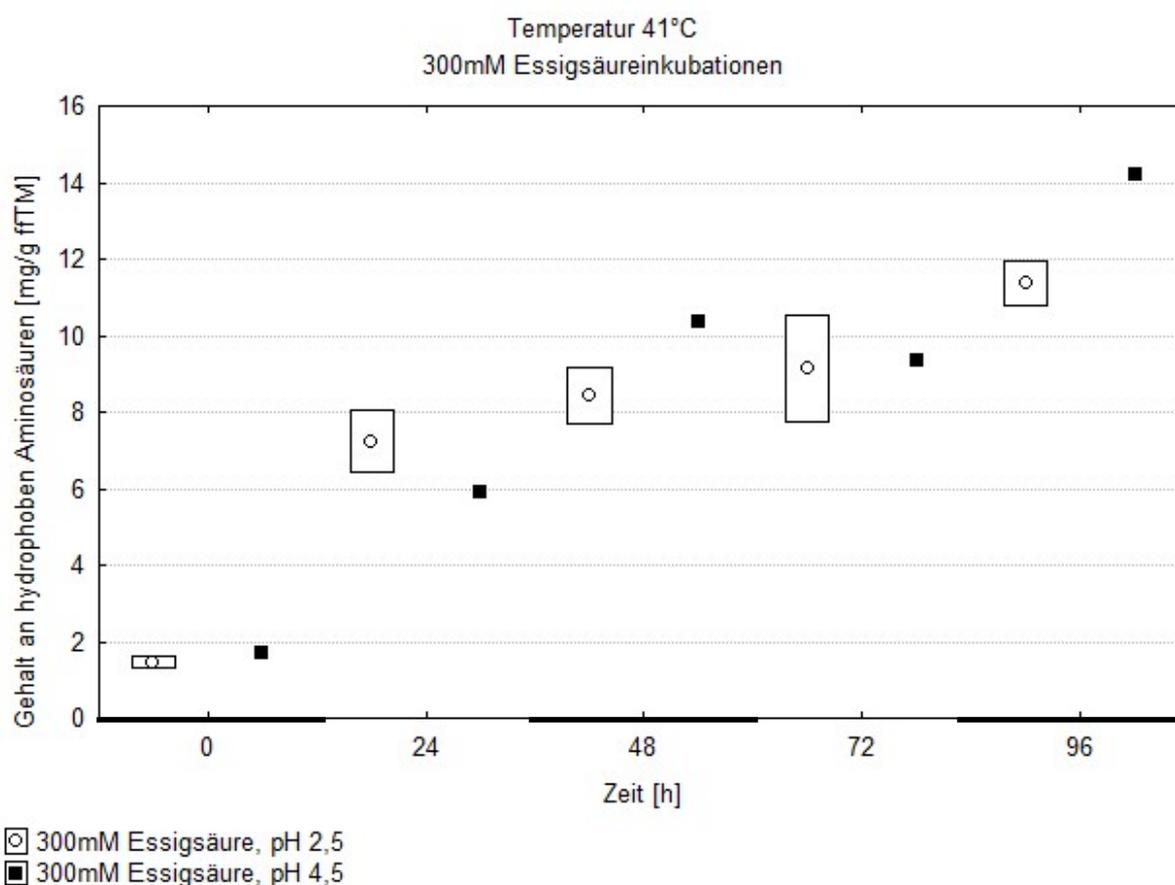


**Abbildung 5-34: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 41°C in Abhängigkeit von dem gewählten Inkubationsmedium.**

Angegeben sind Einzelwerte. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=1

Allerdings unterscheidet sich die Entwicklung der hydrophoben Aminosäuren im Verlauf der Inkubation bei der Verwendung von Essigsäure oder destilliertem Wasser als Inkubationsmedium (s. Abbildung 5-33). Die Inkubation mit destilliertem Wasser bleibt in ihren Gehalten an hydrophoben Aminosäuren unter denen mit Essigsäure im Inkubationsmedium.

Wird eine niedrige Essigsäurekonzentration von 100mM mit deutlich höheren Konzentrationen (600 und 1000mM) auf ihren Einfluss auf die Freisetzung von hydrophoben Aminosäuren während der Inkubation hin verglichen, wird deutlich, dass sie zu höheren Gehalten an hydrophoben Aminosäuren (13,9mg/g ffTM) führt als höhere Konzentrationen (s. Abbildung 5-34).



**Abbildung 5-35: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 41°C in Abhängigkeit von dem gewählten Inkubationsmedium.**

Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=1-2

Nach 48 Stunden unterscheidet sich die Inkubation mit 100mM Essigsäure bereits eindeutig von der Inkubation mit 600mM Essigsäure. Nach 72 Stunden unterscheidet sich die Inkubation mit 100mM Essigsäure dann auch von der Inkubation mit einer Essigsäurekonzentration von 1000mM.

Von dem Einsatz der hohen Essigsäurekonzentration im Inkubationsmedium wird nach diesem Befund Abstand genommen, jedoch wird die Eignung der Essigsäure mit einer Konzentration von 300mM noch überprüft (s. Abbildung 5-35).

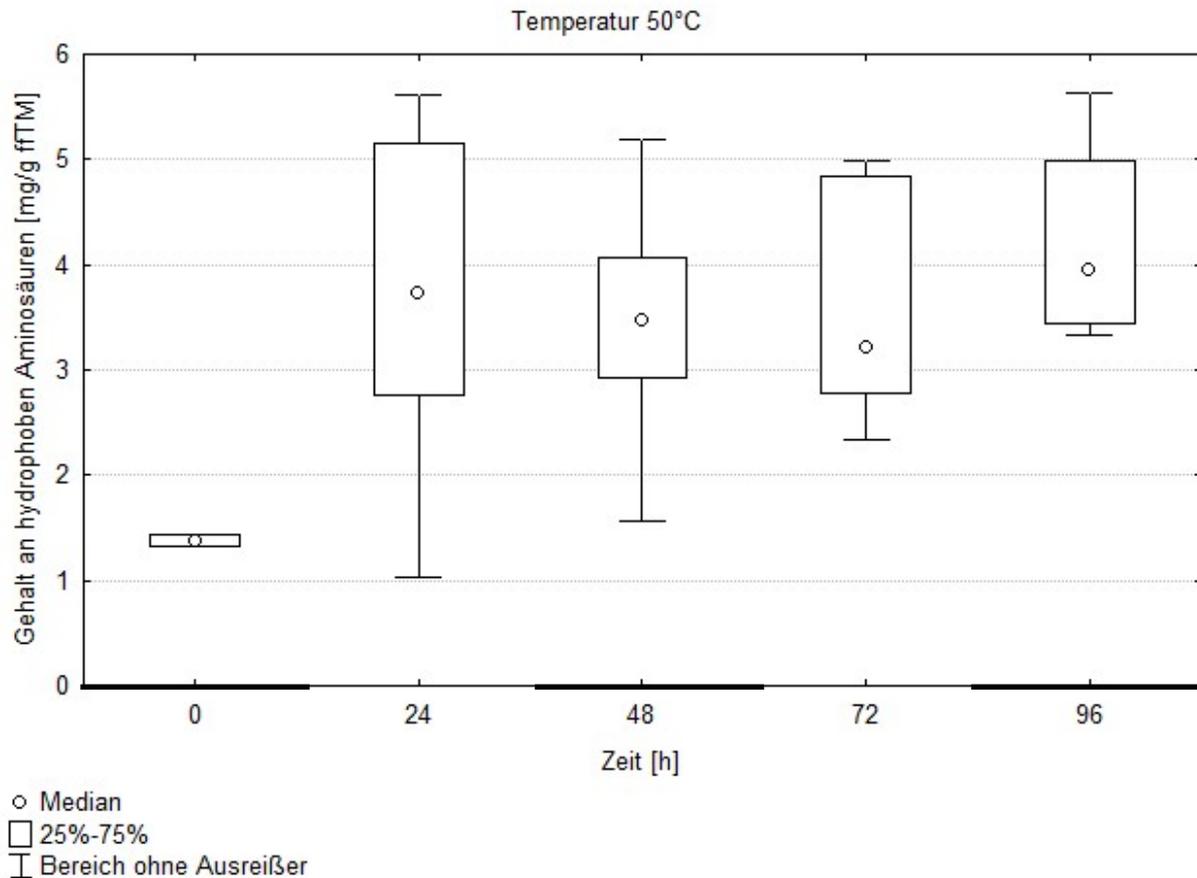
Bei dem Vergleich der beiden Inkubationen mit 300mM Essigsäure, die mit unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt wurden, wird deutlich, dass beide Inkubationen sehr ähnlich verlaufen. Über die gesamte Inkubationsdauer unterscheiden sich die beiden Inkubationen nicht eindeutig voneinander (s. Abbildung 5-35).

Den höchsten Gehalt an hydrophoben Aminosäuren erreicht die Inkubation mit 300mM Essigsäure und einem pH-Wert von 4,5 mit 14,2mg/g ffTM. Dies ist höher als der Wert der Inkubation mit 100mM Essigsäure. Ein grundsätzlicher Unterschied besteht zwischen den Inkubationen mit einer Konzentration von 100mM und 300mM Essigsäure nicht.

Hohe Konzentrationen an Essigsäure (über 300mM) führen zu einer deutlichen Verringerung der Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren. Der pH-Wert hat im Gegensatz zur Konzentration keinen starken Einfluss auf den Gehalt an hydrophoben Aminosäuren.

#### **5.1.1.2.5 Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 50°C**

Wird für die Inkubation eine konstante Temperatur von 50°C über die gesamte Inkubationsdauer verwendet, steigt der Gehalt der hydrophoben Aminosäuren in den ersten 24 Stunden leicht an und bleibt dann für den Rest der Inkubationszeit konstant (s. Abbildung 5-36). Die erreichten Gehalte liegen deutlich unter denen der anderen getesteten Inkubationstemperaturen.



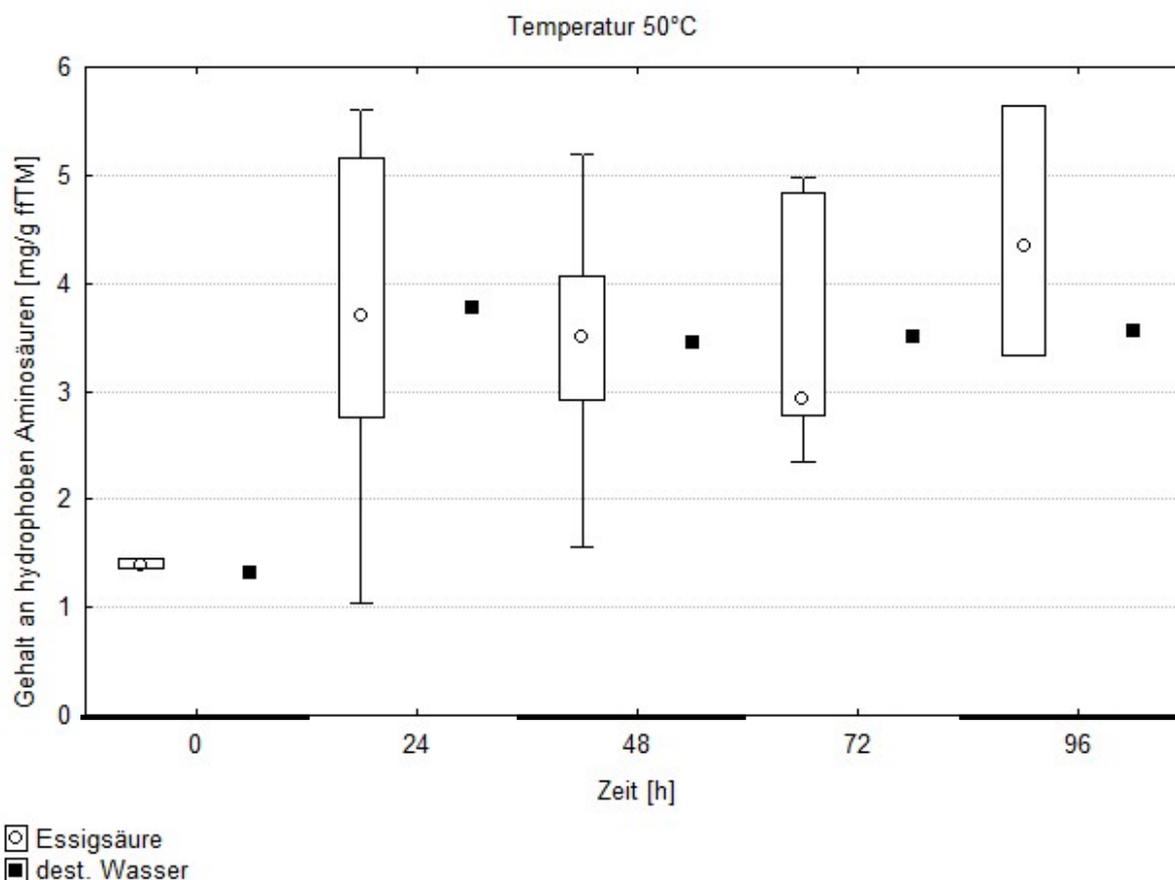
**Abbildung 5-36: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer Inkubationstemperatur von 50°C.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Die Ergebnisse aller Inkubationen bei diesem Temperaturgradient wurden zusammengefasst. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. n=6

Werden die Essigsäureinkubationen mit der Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser bei konstant 50°C verglichen, sind über die gesamte Inkubationsdauer keine Unterschiede zu beobachten (s. Abbildung 5-37). Bei dieser Temperatur hat die Säure keinen Einfluss auf die Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren.

Werden die verschiedenen Essigsäureinkubationen einzeln betrachtet, ergeben sich Unterschiede in den Gehalten an hydrophoben Aminosäuren. Die Inkubation mit 300mM Essigsäure liegt in den Gehalten an hydrophoben Aminosäuren die gesamte Inkubationsdauer über den Gehalten der anderen Inkubationen. Die Inkubation mit einer Essigsäurekonzentration von 1000mM unterscheidet sich nach 24 Stunden deutlich in ihren Gehalten an hydrophoben Aminosäuren von den Inkubationen mit 300 und 600mM Essigsäure. Nach 48 Stunden unterscheidet sich die Inkubation mit 300mM Essigsäure weiterhin eindeutig von der Inkubation mit 1000mM Essigsäure. 24 Stunden später

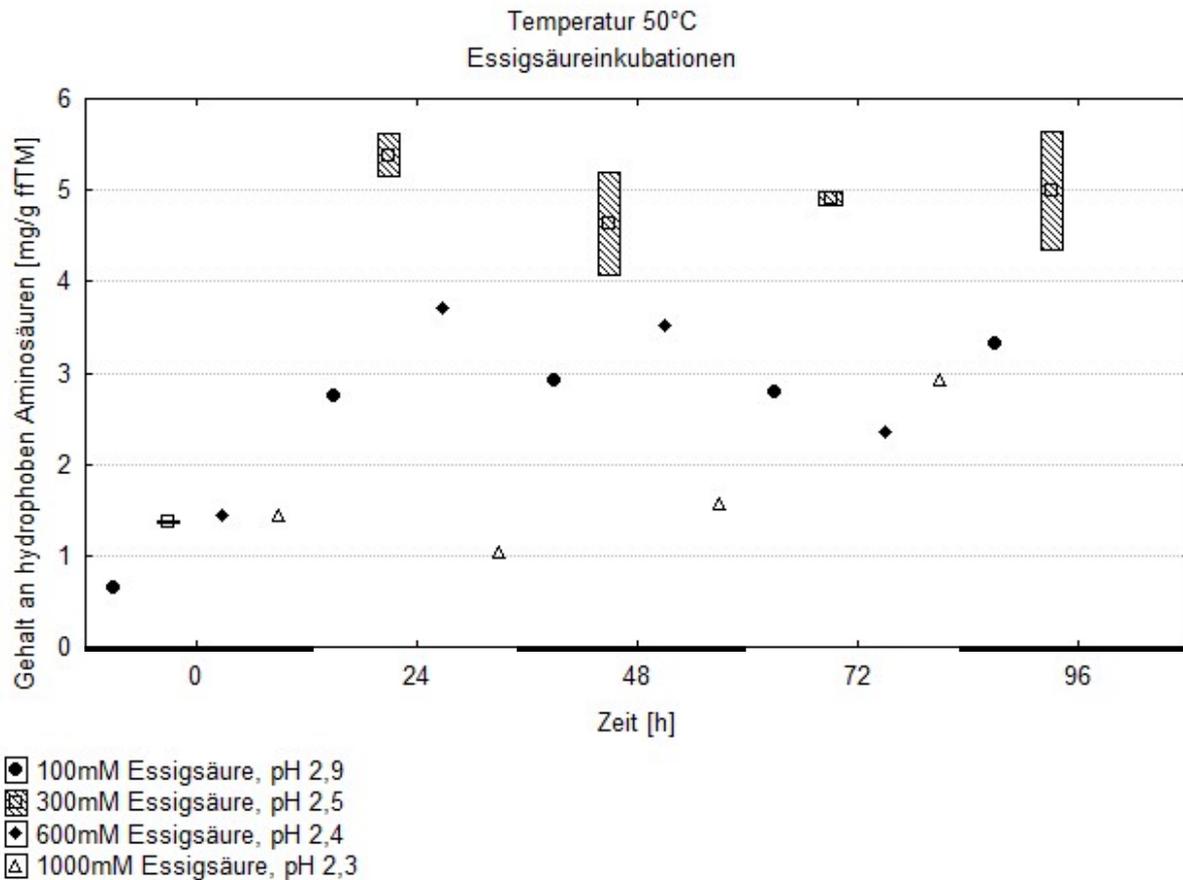
unterscheidet sich die Inkubation mit 300mM Essigsäure deutlich von allen anderen Inkubationen (s. Abbildung 5-38). Nach 96 Stunden hat sich der Gehalt an hydrophoben Aminosäuren bei der Inkubation mit 100mM Essigsäure leicht erhöht und unterscheidet sich nicht mehr von den Gehalten der Inkubation mit 300mM Essigsäure.



**Abbildung 5-37: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 50°C in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium mit Essigsäure oder destilliertem Wasser.**

Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit der dazugehörigen Perzentile (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 100mmol/l bis 1000mmol/l. n=1-5

Bei einer konstanten Temperatur von 50°C während der Inkubation haben die Säure und deren Konzentration nur einen geringen Einfluss auf die Gehalte an hydrophoben Aminosäuren. Der höchste Gehalt (5,4mg/g fTTM) wird mit einer Inkubation mit 300mM Essigsäure und einem pH-Wert von 2,5 nach 24 Stunden erreicht. Nach 24 Stunden erfolgt bei allen Inkubationen keine weitere Freisetzung von hydrophoben Aminosäuren mehr.

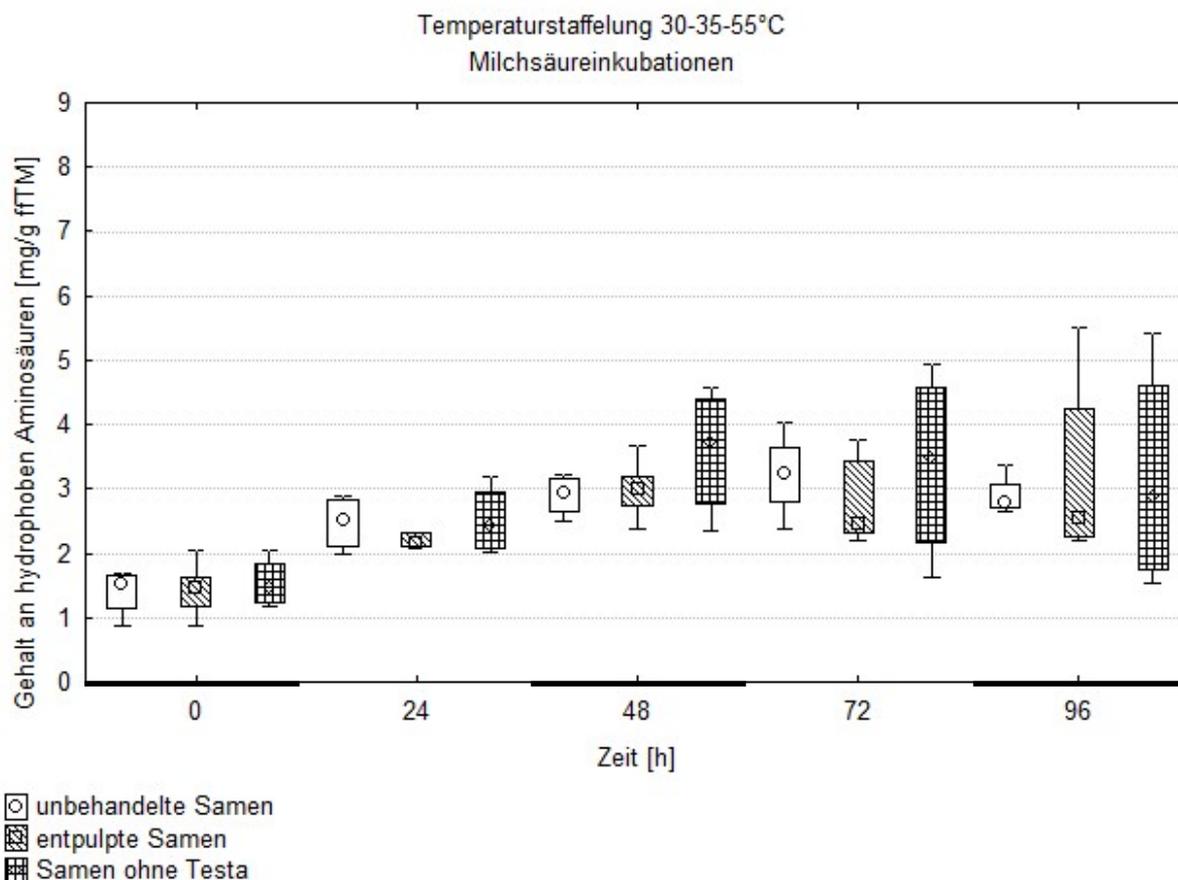


**Abbildung 5-38: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren im Verlauf der Essigsäureinkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 50°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=1-2

#### 5.1.1.2.6 Einfluss der Samenbehandlung auf die Entwicklung der hydrophoben Aminosäuren während der Inkubation

Im Weiteren wird die Vorbehandlung der Samen auf ihren Einfluss auf die Entwicklung der hydrophoben Aminosäuren während der Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturregimen untersucht.

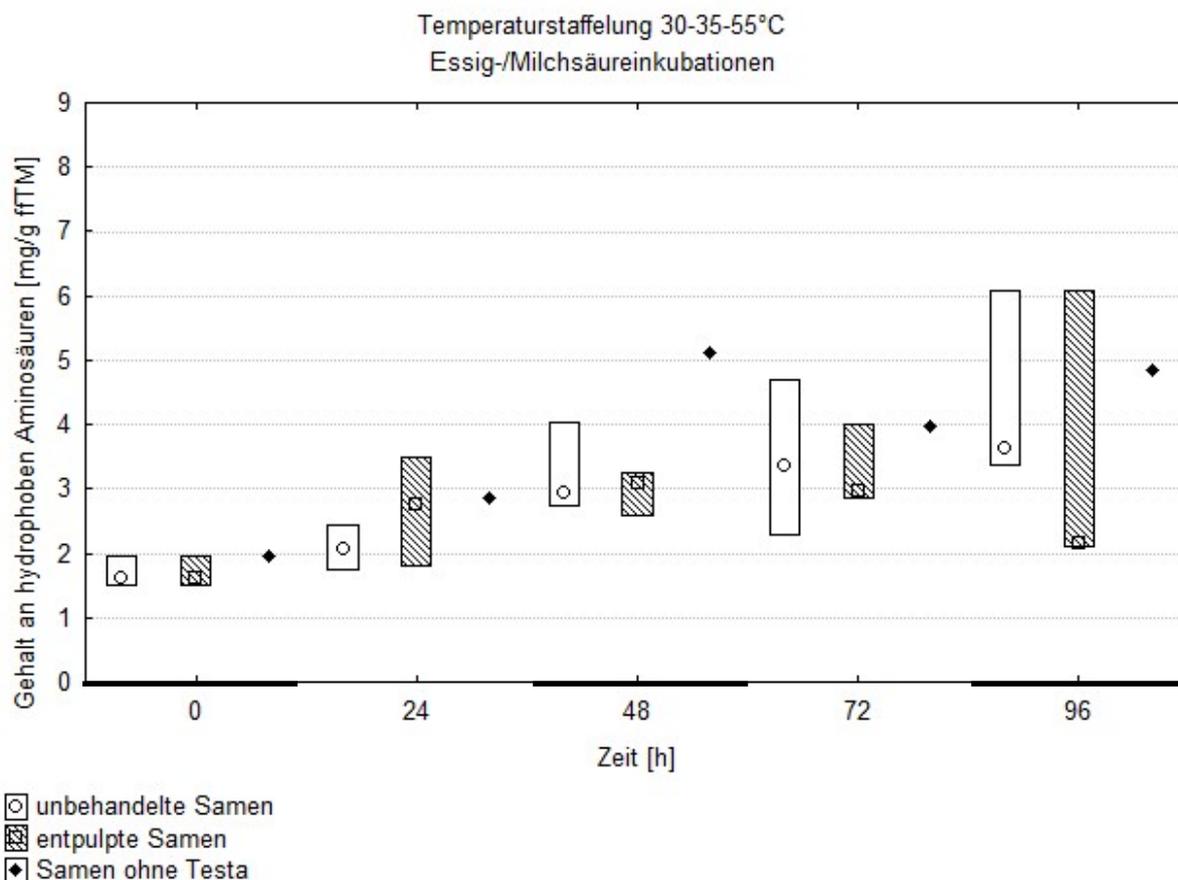


**Abbildung 5-39: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die hydrophoben Aminosäuren während der Milchsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Eine Unterscheidung der Inkubationen nach der Konzentration und dem pH-Wert der Milchsäuremedien erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 25mmol/l bis 100mmol/l. n=4-6

Die Vorbehandlung hat über die gesamte Inkubationsdauer keinen Einfluss auf den Gehalt an hydrophoben Aminosäuren, wenn Milchsäure für die Inkubationen mit dem Temperaturgradienten 30-35-55°C verwendet wird (s. Abbildung 5-39).

Ebenso wie bei den Milchsäureinkubationen hat die Vorbehandlung der Samen auch bei den entsprechenden Inkubationen mit einem Gemisch aus Essig- und Milchsäure keine Auswirkungen auf die gebildeten hydrophoben Aminosäuren (s. Abbildung 5-40).

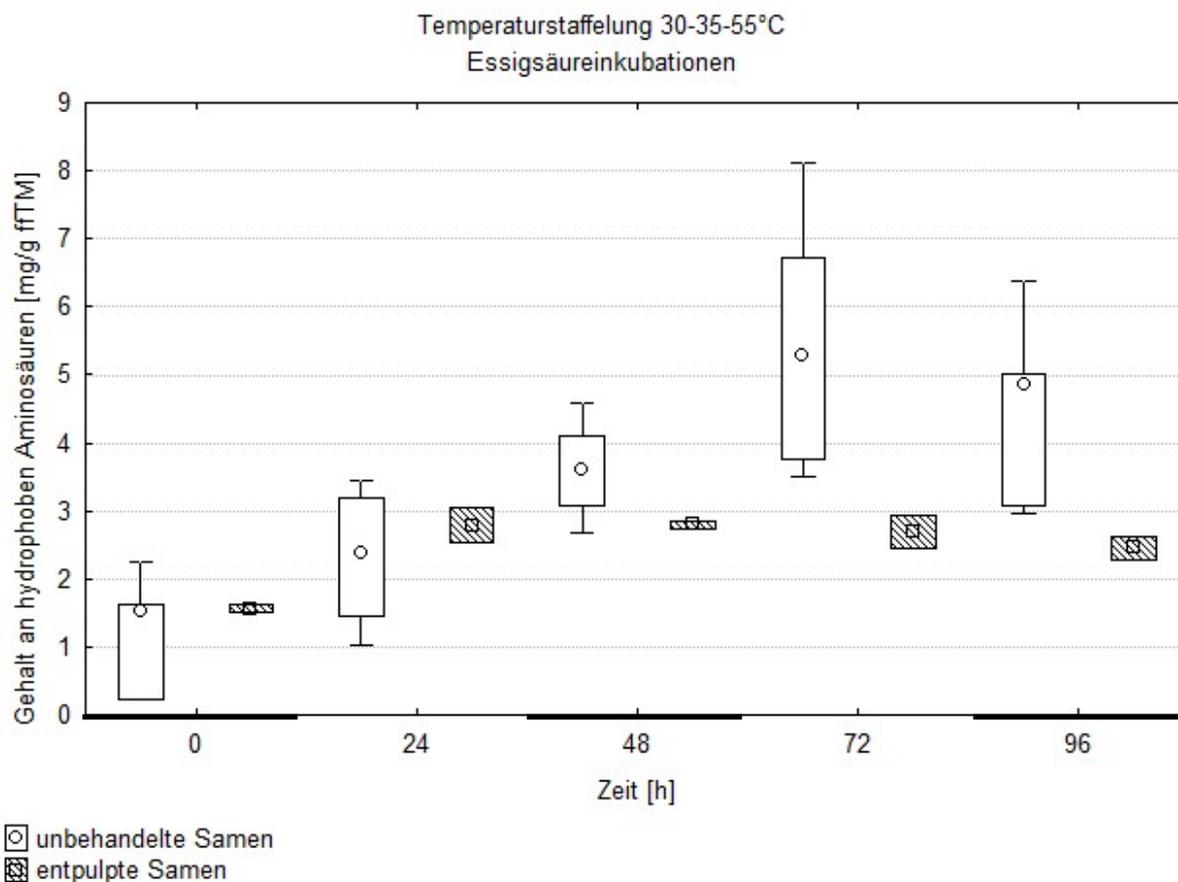


**Abbildung 5-40: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die hydrophoben Aminosäuren während der Essigsäure/Milchsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C.**

Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Eine Unterscheidung der Inkubationen nach der Konzentration und dem pH-Wert der Essig-/Milchsäuremedien erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 12,5mmol/l bis 50mmol/l. n=1-3

Bei den reinen Essigsäureinkubationen mit dem Temperaturgradienten 30-35-55°C unterscheiden sich die unbehandelten Samen von den entpulpften nach 72 Stunden. Allerdings haben sich die Gehalte der hydrophoben Aminosäuren nach 96 Stunden wieder einander genähert, so dass kein Unterschied mehr besteht (s. Abbildung 5-41). Daher hat auch hier die Samenbehandlung keinen nennenswerten Einfluss auf die Entwicklung der hydrophoben Aminosäuren, mit Ausnahme des mittleren Zeitbereichs.

Die Behandlung der Samen vor Inkubationsbeginn wirkt sich beim Temperaturgradienten 37-50°C nicht auf die Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren aus. Bei beiden Varianten sind eine ähnliche Entwicklung und ähnliche Gehalte an hydrophoben Aminosäuren zu beobachten (s. Abbildung 5-42).

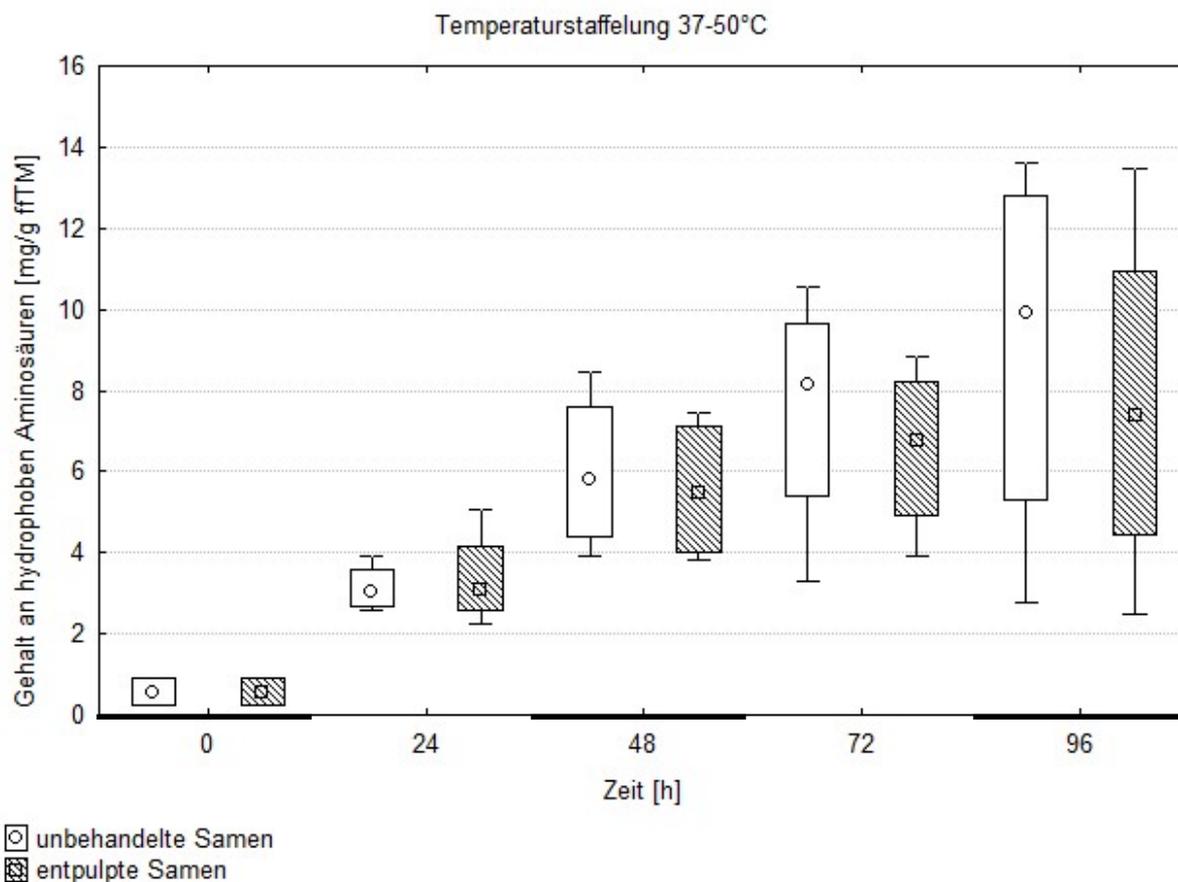


**Abbildung 5-41: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die hydrophoben Aminosäuren während der Essigsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Eine Unterscheidung der Inkubationen nach der Konzentration und dem pH-Wert der Essigsäuremedien erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 25mmol/l bis 100mmol/l. n=2-5

Bei den reinen Milchsäureinkubationen wirkt sich bei einer konstanten Temperatur von 37°C die Vorbehandlung der Samen nicht auf die Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren aus (s. Abbildung 5-43). Über die gesamte Inkubationsdauer unterscheiden sich die beiden Varianten im Gehalt an hydrophoben Aminosäuren nicht voneinander.

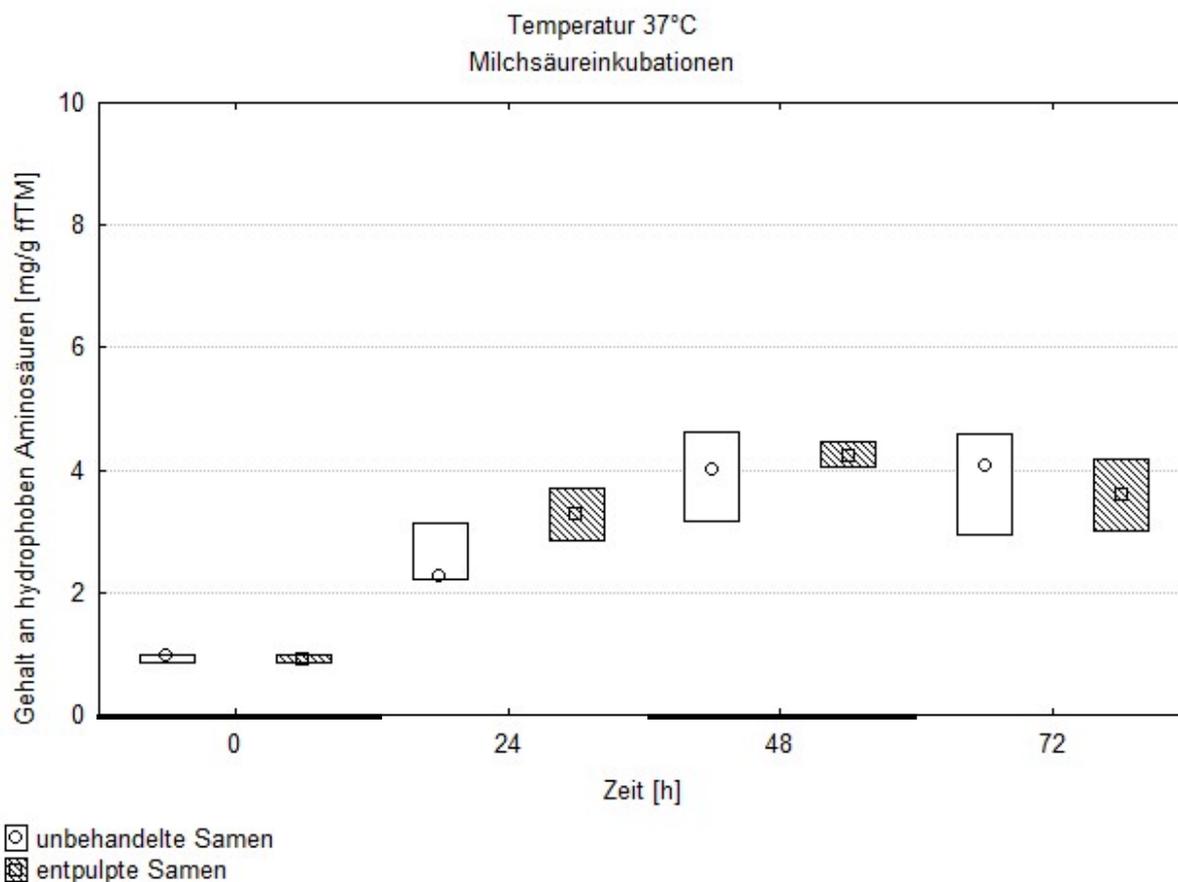
Im Gegensatz zu den reinen Milchsäureinkubationen führen die Samenvorbehandlungen bei den Essigsäure/Milchsäureinkubationen bei einer konstanten Temperatur von 37°C zu Unterschieden in den Konzentrationen an hydrophoben Aminosäuren. Nach 48 und ebenso nach 72 Stunden liegt der Gehalt an hydrophoben Aminosäuren bei den entpulpften Samen unterhalb derer der unbehandelten Samen (s. Abbildung 5-44).



**Abbildung 5-42: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung der hydrophoben Aminosäuren während der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Eine Unterscheidung der Inkubationen nach verwendeter Säure, deren Konzentration und pH-Wert erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 50mmol/l bis 100mmol/l. n=4

Bei den Inkubationen mit reiner Essigsäure bei konstant 37°C unterscheiden sich nach 48 Stunden die unbehandelten und entpulpten Samen in der Konzentration an hydrophoben Aminosäuren (s. Abbildung 5-45). Im Gegensatz zu den Inkubationen mit einem Gemisch aus Essigsäure und Milchsäure ist hier der Gehalt an hydrophoben Aminosäuren bei den entpulpten Samen höher als bei den unbehandelten. Nach 72 Stunden haben sich die beiden Inkubationen in ihrer Konzentration an hydrophoben Aminosäuren soweit einander angenähert, dass kein Unterschied mehr besteht. Grundsätzlich sind unbehandelte Samen im Gehalt an hydrophoben Aminosäuren gleich hoch oder höher als Samen ohne Pulpa.



**Abbildung 5-43: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung der hydrophoben Aminosäuren während der Inkubation mit Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). Eine Unterscheidung der Inkubationen nach der Konzentration und dem pH-Wert der Milchsäuremedien erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 25mmol/l bis 100mmol/l. n=2-3

Für die Inkubationen bei 60°C wurden zwei verschiedene Samenbehandlungen getestet, unbehandelte und entpulpte Samen. Beide Varianten entwickeln sich während der Inkubation in ihren Gehalten an hydrophoben Aminosäuren gleich (s. Abbildung 5-46).

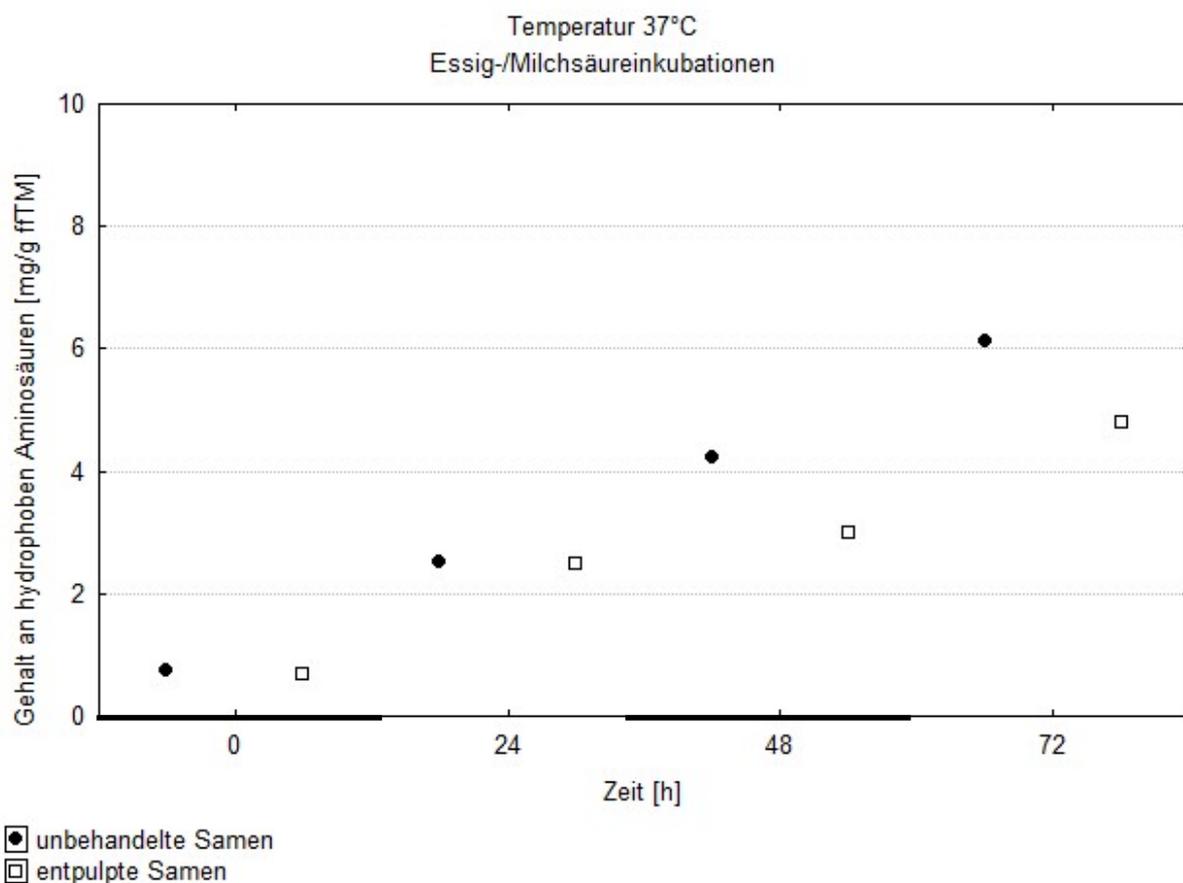
Beide weisen einen unverändert niedrigen Gehalt an hydrophoben Aminosäuren auf, da bei 60°C offensichtlich die enzymatische Aktivität hitzeinaktiviert ist.

### 5.1.1.2.7 Zusammenfassung

Der entscheidende quantitative Faktor bei der Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren, ebenso wie bei der Entwicklung der Gehalte an freien Aminosäuren, ist die Temperatur. Die gleichen Temperaturen, die sich positiv auf den Gehalt an freien Aminosäuren auswirken, führen erwartungsgemäß auch zu den höchsten Gehalten an hydrophoben Aminosäuren.

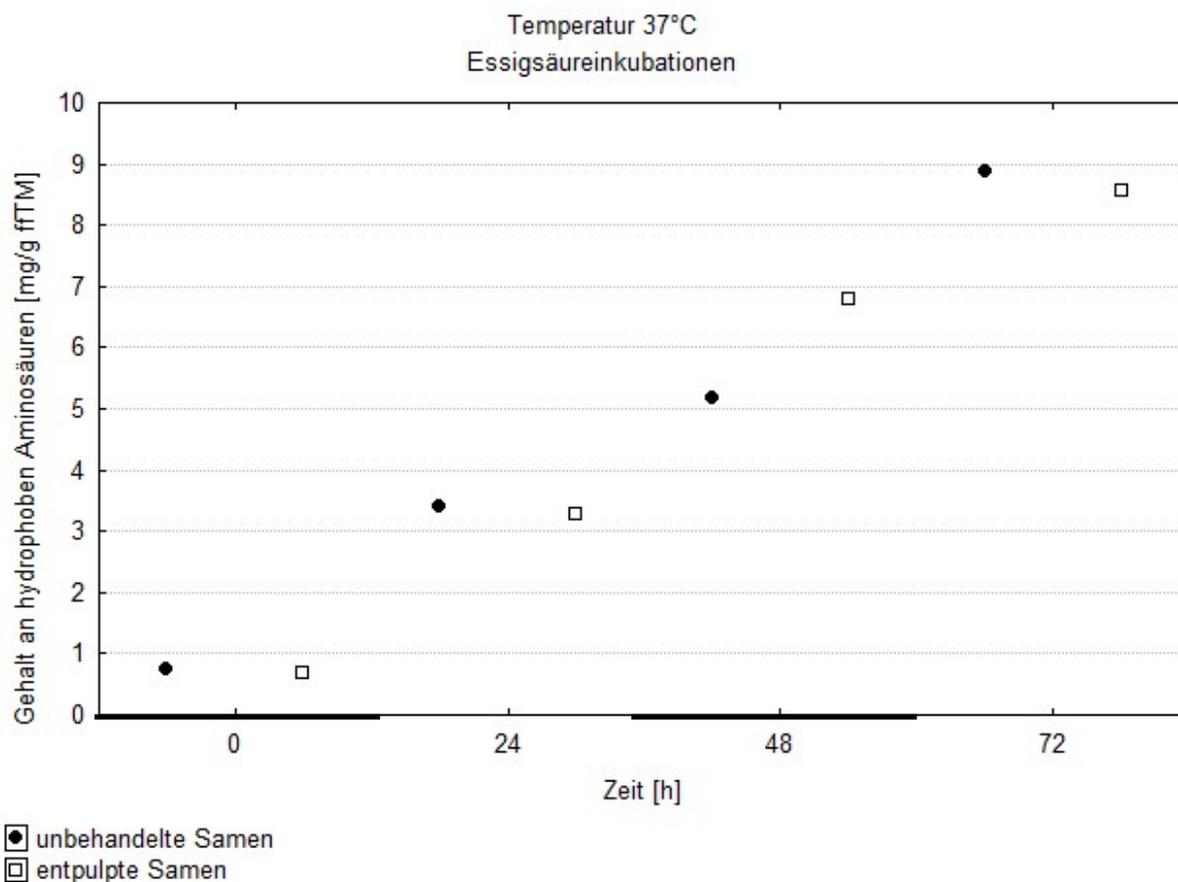
Ebenso wie für die Gehalte an freien Aminosäuren führt auch für die Gehalte an hydrophoben Aminosäuren eine konstante Temperatur von 41°C zu den höchsten Werten. Die Inkubation mit 300mM Essigsäure (pH 4,5) erreicht mit 14,2mg/g ffTM den höchsten Gehalt an hydrophoben Aminosäuren. Mit dem Temperaturgradienten 37-50°C werden ähnliche Gehalte an hydrophoben Aminosäuren erreicht wie mit den Inkubationen bei konstant 41°C. Die Inkubationen mit einer konstanten Temperatur von 50°C erzielen, ebenso wie bei den Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 60°C (Daten s. Anhang) die niedrigsten Gehalte an hydrophoben Aminosäuren.

Inkubationsmedien mit reiner Essigsäure haben im Gegensatz zu Inkubationsmedien mit reiner Milchsäure eine positive Auswirkung auf die erreichten Gehalte an hydrophoben Aminosäuren.



**Abbildung 5-44: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung der hydrophoben Aminosäuren während der Inkubation mit einem Gemisch aus Essigsäure und Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C.**

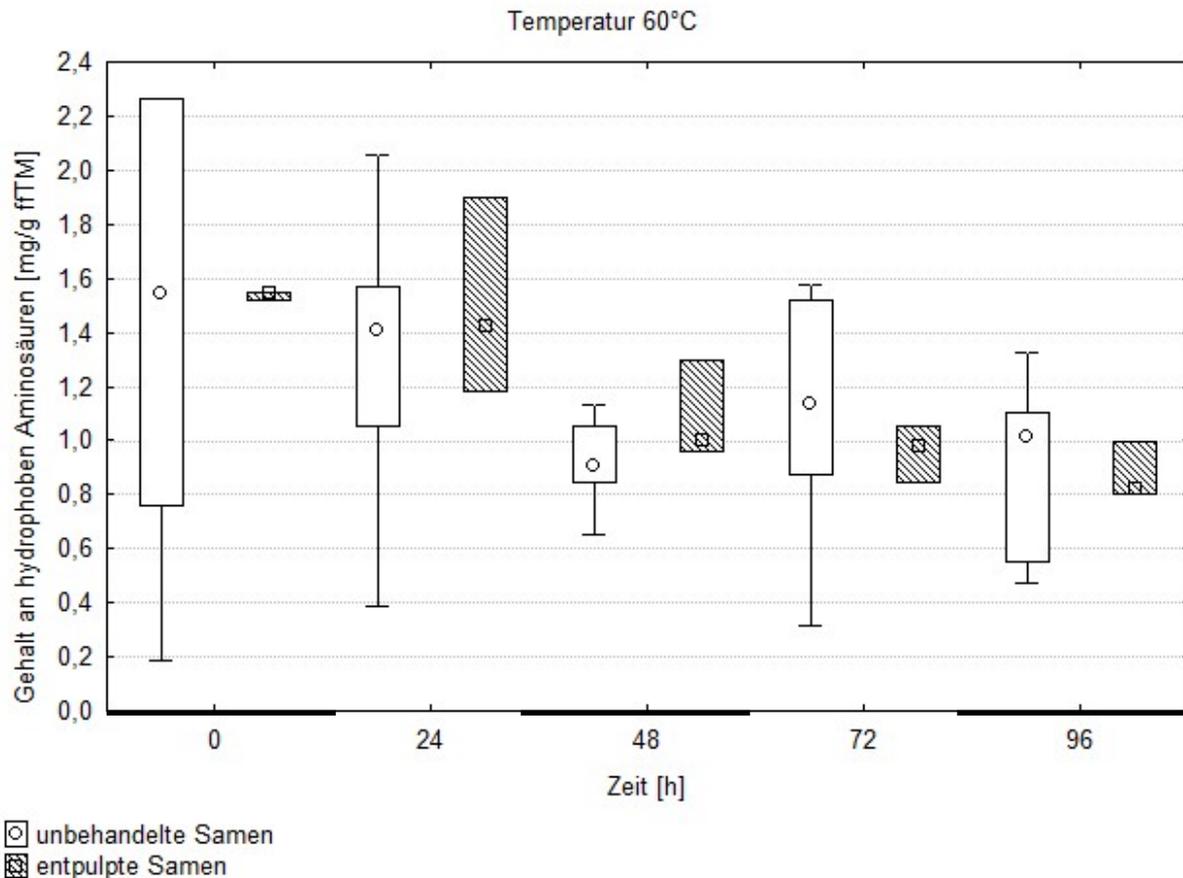
Angegeben sind Einzelwerte. Eine Unterscheidung der Inkubationen nach der Konzentration und dem pH-Wert der Essig-/Milchsäuremedien erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Säurekonzentration: 50mmol/l. n=1



**Abbildung 5-45: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung der hydrophoben Aminosäuren während der Inkubation mit Essigsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C.**

Angegeben sind Einzelwerte. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. Säurekonzentration: 100mmol/l. n=1

Im Falle der hydrophoben Aminosäuren übt die Entpulpung der Samen einen leichten Einfluss auf die Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren während einer Inkubation mit konstant 37°C aus. Die entpulpften Samen enthalten geringere Mengen an hydrophoben Aminosäuren als die unbehandelten. Dies wird bei den Inkubationen mit einem Gemisch aus Essigsäure und Milchsäure am deutlichsten, die Inkubationen mit reiner Essigsäure zeigen nur eine leichte Veränderung und die Inkubationen mit reiner Milchsäure zeigen keine Veränderung. Bei den anderen Temperaturen hat die Samenbehandlung keinen Einfluss auf den Gehalt an freigesetzten hydrophoben Aminosäuren.



**Abbildung 5-46: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung der hydrophoben Aminosäuren während der Inkubation bei einer konstanten Temperatur von 60°C.**

Angegeben sind die Mediane mit der dazugehörigen Perzentile (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Eine Unterscheidung der Inkubationen nach verwendeter Säure, deren Konzentration und pH-Wert erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 50mmol/l bis 1000mmol/l. n=3-9

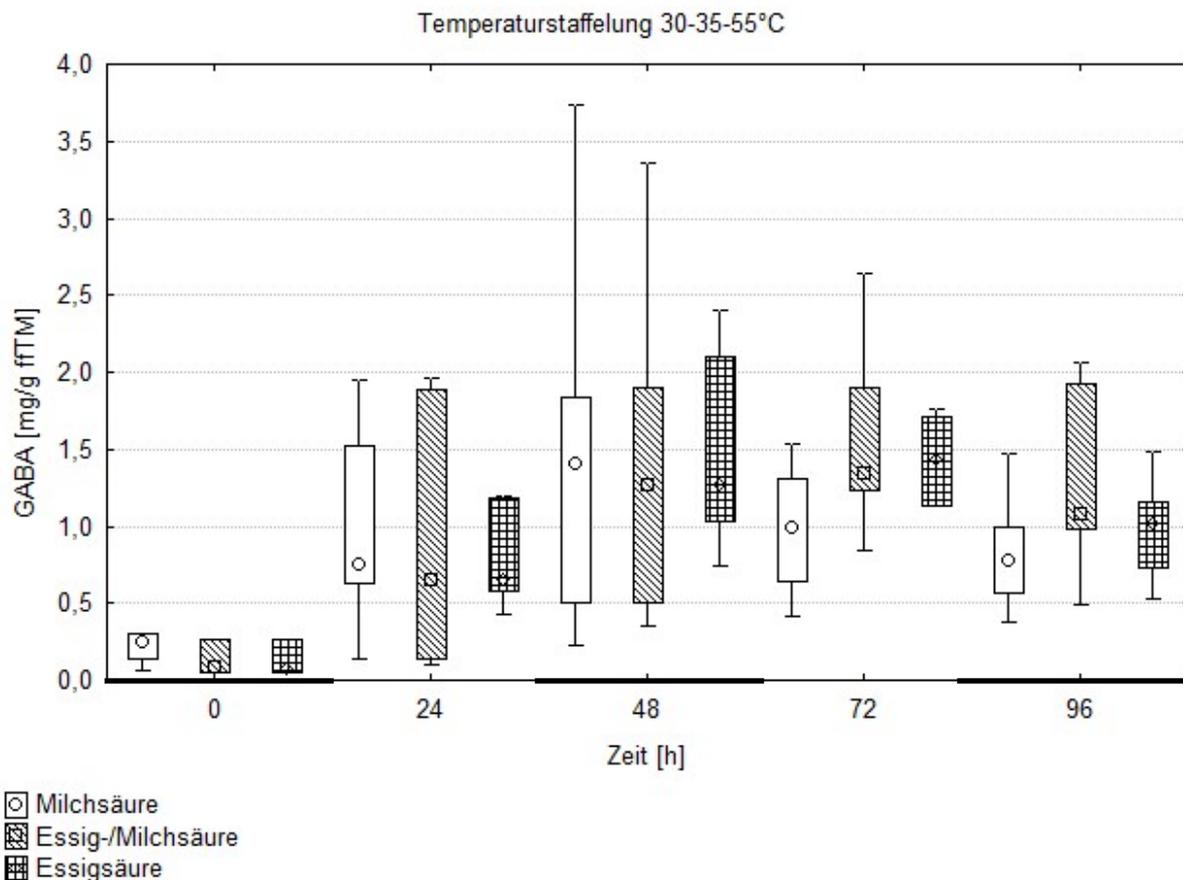
### 5.1.1.3 $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)

Bei der  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) handelt es sich um eine nichtproteinogene Aminosäure, da sich die Aminogruppe am dritten Kohlenstoffatom nach dem Carboxyl-Kohlenstoffatom befindet und nicht wie bei proteinogenen Aminosäuren ( $\alpha$ -Aminosäuren) am ersten Kohlenstoffatom nach dem Carboxyl-Kohlenstoffatom.

Die Bildung von GABA erfolgt durch das Enzym Glutamatdecarboxylase, welches im Cytosol lokalisiert ist, durch die Decarboxylierung von Glutaminsäure. Das pH-Optimum der Glutamatdecarboxylase liegt bei 5,8 (Shelp et al., 1999). Abgebaut wird GABA in den Mitochondrien, indem die Aminogruppe auf Pyruvat übertragen wird, wodurch Alanin entsteht. Da GABA durch ein im Cytosol lokalisiertes Enzym gebildet wird, ist seine Entstehung unabhängig von der Proteolyse, durch die die proteinogenen Aminosäuren

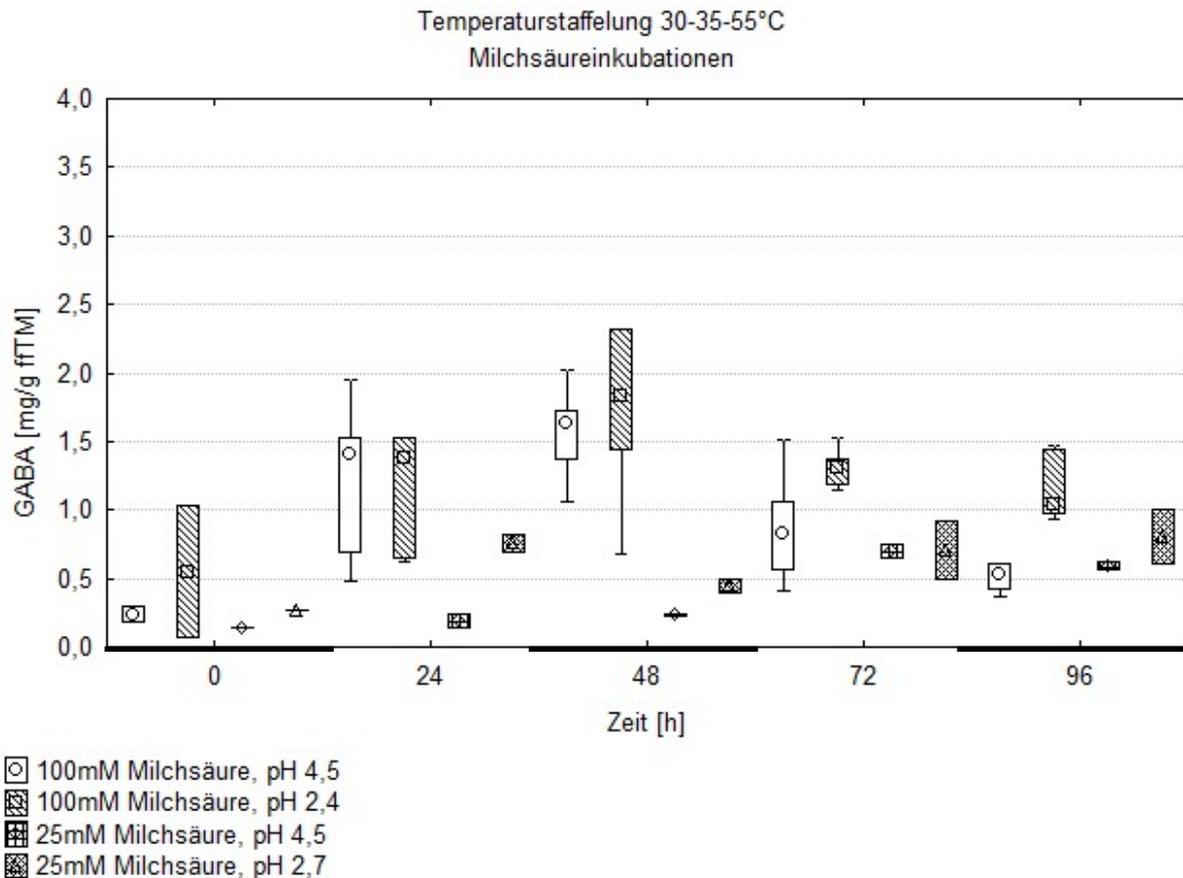
freigesetzt werden. Aus diesem Grund ist zu erwarten, dass die Entwicklung des GABA-Gehaltes während der Inkubation anders verläuft als die Entwicklung der Gehalte der proteinogenen Aminosäuren. Allenfalls kann in der Bilanz der freigesetzten Aminosäuren die Glutaminsäure durch Decarboxylierung vermindert sein.

GABA ist ein Indikator für Pflanzenstress und ihre Bildung kann durch mechanische Schäden, Hitze, Cytosolansäuerung, anaerobe Bedingungen, Wasserstress und Phytohormone gefördert werden. Dies ist mit einem Anstieg des  $H^+$ - und  $Ca^{2+}$ - Gehaltes im Cytosol in Zusammenhang gestellt worden (Bown und Shelp, 1997). In Kaffee wurde ein stressinduzierter Anstieg von GABA während der Fermentation von Kaffeesamen beschrieben (Bytof et al., 2005). Auch für die ersten Tage der Kakaofermentation wurde ein Anstieg des GABA-Gehaltes beschrieben (Stoll et al., 2006).



**Abbildung 5-47: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der für das Inkubationsmedium gewählten Säure bzw. von dem Säuregemisch.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 12,5mmol/l bis 100mmol/l. n=7-14 (zusammengefasste Daten)



**Abbildung 5-48: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Milchsäure bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=2-5

Da GABA aus einer Aminosäure gebildet wird, wieder zu einer Aminosäure abgebaut wird und es sich bei GABA um einen hemmenden Neurotransmitter im menschlichen Gehirn handelt (Decavel und van den Pol, 1990), wurden die Auswirkungen der Inkubationsbedingungen auf den Gehalt dieser nicht proteinogenen Aminosäure untersucht. Zusätzlich zu den im Folgenden aufgeführten Inkubationstemperaturen wurden auch Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 60°C durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Inkubationen werden aufgrund ihrer geringen erreichten Gehalte an GABA in diesem Kapitel nicht näher erläutert, sondern werden tabellarisch im Anhang (s. Tab.12-2) aufgeführt.

### 5.1.1.3.1 Temperaturverlauf mit der Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C

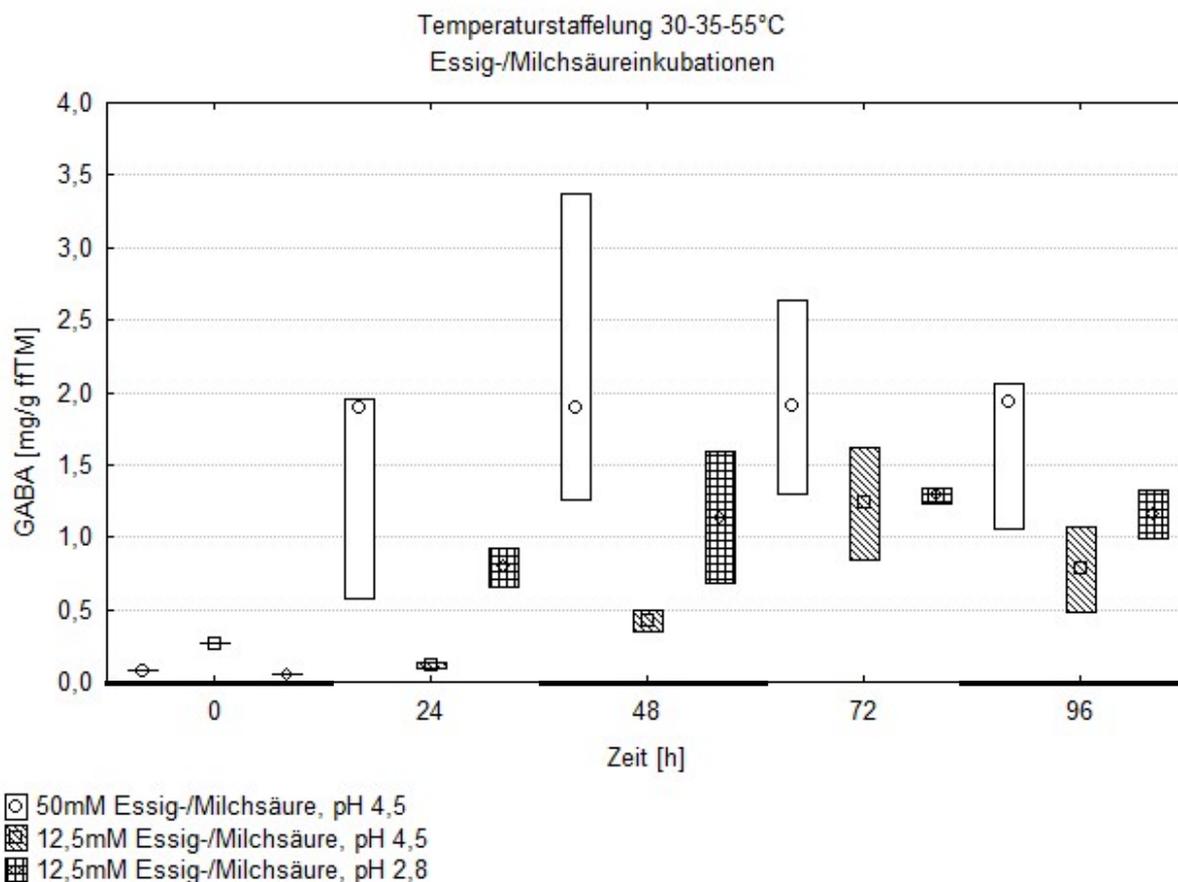
Der GABA-Gehalt steigt im Verlauf der Inkubation leicht an, fällt aber nach 96 Stunden wieder ab. Die verschiedenen Säurevarianten (Milchsäure, Essigsäure/Milchsäure und Essigsäure) der Inkubationen unterscheiden sich in ihrer GABA-Entwicklung im Verlauf der Inkubationen nicht (s. Abbildung 5-47). Da die Perzentilen der einzelnen Säurevarianten teilweise groß sind und dies wahrscheinlich auf einen Einfluss der Konzentration der Säure und/oder des pH-Wertes beruht, erfolgt im Weiteren eine Aufschlüsselung der einzelnen Inkubationen.

Die Varianten der Inkubationen mit Milchsäure unterscheiden sich zu Beginn bis zu 48 Stunden Inkubation voneinander. Im weiteren Verlauf, 72 und 96 Stunden, gleichen sich die GABA-Gehalte der Varianten einander an (s. Abbildung 5-48). Nach 24 Stunden unterscheidet sich die Inkubation mit 100mM Milchsäure und einem pH-Wert von 2,4 eindeutig von der Inkubation mit 25mM Milchsäure und einem pH-Wert von 4,5. 24 Stunden später trennen sich die Inkubationen mit 100mM Milchsäure deutlich von den Inkubationen mit 25mM Milchsäure. Die Inkubationen mit 100mM Milchsäure unterscheiden sich untereinander nicht, ebenso die Inkubationen mit 25mM Milchsäure. Nach 48 Stunden sinkt der GABA-Gehalt der beiden Inkubationen mit 100mM Milchsäure ab, der der Inkubationen mit 25mM Milchsäure steigt weiter leicht an. Nach 72 Stunden liegen die GABA-Gehalte der verschiedenen Inkubationen mit Milchsäure alle im Bereich von 0,7mg/g ffTM und 1,3mg/g ffTM, nach 96 Stunden zwischen 0,5mg/g ffTM und 1,0mg/g ffTM.

Den höchsten GABA-Gehalt erreicht die Inkubation mit 100mM Milchsäure und einem pH-Wert von 2,4 nach 48 Stunden mit 1,8mg/g ffTM.

Die höchsten GABA-Gehalte werden nach 48 Stunden erreicht, danach, gleichzeitig mit der Temperaturerhöhung auf 55°C, sinken die GABA-Gehalte ab.

Da sich die beiden Inkubationen mit einem pH-Wert von 4,5 deutlich unterscheiden, beeinflusst eher die Konzentration und nicht der pH-Wert den GABA-Gehalt. Dies bestätigt auch der eindeutige Unterschied der Inkubationen mit 100mM Milchsäure zu den Inkubationen mit 25mM Milchsäure nach 48 Stunden, während sich die GABA-Gehalte der Inkubationen untereinander, trotz der verschiedenen pH-Werte, nicht unterscheiden.



**Abbildung 5-49: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit einem Essigsäure/Milchsäuregemisch bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

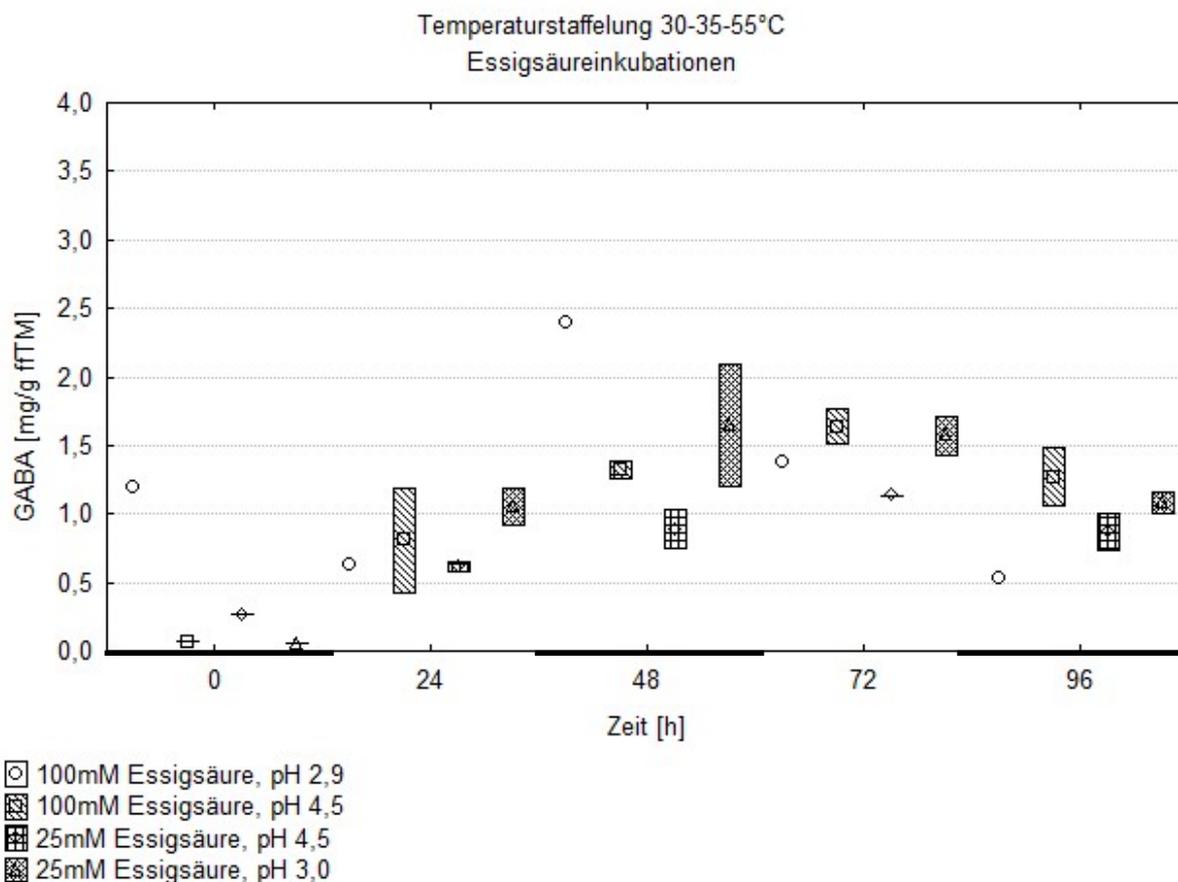
Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM =mmol/l; n=2-3

Auch bei den Essigsäure/Milchsäureinkubationen steigen die GABA-Gehalte erst an und sinken zum Ende der Inkubation wieder ab. Nach 24 Stunden liegen die GABA-Gehalte der Inkubation mit einer Konzentration von 50mM Essigsäure/Milchsäure und einem pH-Wert von 4,5 deutlich über denen der Inkubation mit 12,5mM Essigsäure/Milchsäure und dem gleichen pH-Wert (s. Abbildung 5-49). Die Inkubation mit einer Konzentration von 12,5mM Essigsäure/Milchsäure und einem pH-Wert von 2,8 unterscheidet sich nicht von der Inkubation mit 50mM Essigsäure/Milchsäure. Das Gleiche gilt für die Situation nach 48 Stunden. Durch das Absinken der GABA-Gehalte nach 72 Stunden der Inkubation mit 50mM Essigsäure/Milchsäure und dem Anstieg des Gehaltes der Inkubation mit einer Konzentration von 12,5mM und einem pH-Wert von 4,5 unterscheiden sich die drei Varianten nicht mehr, gleiches gilt für die GABA-Gehalte nach 96 Stunden. Der höchste GABA-Gehalt wird von der Inkubation mit einer Konzentration von 50mM Essigsäure/Milchsäure mit pH 4,5 nach 96 Stunden mit 1,9mg/g fTfM erreicht.

Da sich die beiden Inkubationen mit einem pH-Wert von 4,5 zum Anfang der Inkubation deutlich unterscheiden, ist der Unterschied im GABA-Gehalt auf die Konzentration des Essigsäure/Milchsäuregemisches zurückzuführen. Wird allerdings bei der niedrigen Konzentration von 12,5mM ein geringer pH-Wert verwendet - in diesem Fall 2,8 - liegen die erhaltenen GABA-Gehalte nach 96 Stunden höher als bei einem pH-Wert von 4,5. Ein geringerer pH-Wert führt bei einer geringen Konzentration von 12,5mM Essigsäure/Milchsäure zu einer Erhöhung des GABA-Gehaltes.

Ebenso wie bei den beiden anderen Säurevarianten steigt der Gehalt an GABA zu Anfang der Inkubationen mit Essigsäure an und fällt zum Ende hin wieder ab (s. Abbildung 5-50). Nach 48 Stunden sind deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Inkubationen mit Essigsäure zu beobachten. Die beiden Inkubationen mit einer Konzentration von 100mM Essigsäure unterscheiden sich in ihren GABA-Gehalten voneinander, ebenso die beiden Inkubationen mit einer Konzentration von 25mM Essigsäure (s. Abbildung 5-50). Da sich die Inkubationen trotz der gleichen Essigsäurekonzentration nach 48 Stunden unterscheiden, wirkt sich der pH-Wert auf den GABA-Gehalt aus. Die beiden Inkubationen mit einem pH-Wert von 4,5 unterscheiden sich, trotz der Konzentrationsunterschiede der Säuren, nicht voneinander und die Inkubationen mit den pH-Werten 2,9 und 3,0 liegen in ihren GABA-Gehalten nahe beieinander. Nach 72 Stunden haben sich die GABA-Gehalte der einzelnen Varianten einander genähert und unterscheiden sich nicht mehr voneinander. Da der GABA-Gehalt der Inkubation mit einer Konzentration von 100mM Essigsäure mit pH 2,9 zum Ende der Inkubation stark sinkt, unterscheidet sich diese Inkubation nach 96 Stunden von der Inkubation mit einer Konzentration von 100mM Essigsäure und einem pH-Wert von 4,5. Die anderen Inkubationen unterscheiden sich nach 96 Stunden nicht voneinander. Der höchste GABA-Gehalt wird von der Inkubation mit einer Konzentration von 100mM Essigsäure und einem pH-Wert von 2,9 nach 48 Stunden mit 2,4mg/g fTMM erreicht.

Bei den Inkubationen, die Milchsäure enthalten, beeinflusst die Säurekonzentration die GABA-Gehalte, während bei den reinen Essigsäureinkubationen der pH-Wert der beeinflussende Faktor ist.



**Abbildung 5-50: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Essigsäure bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

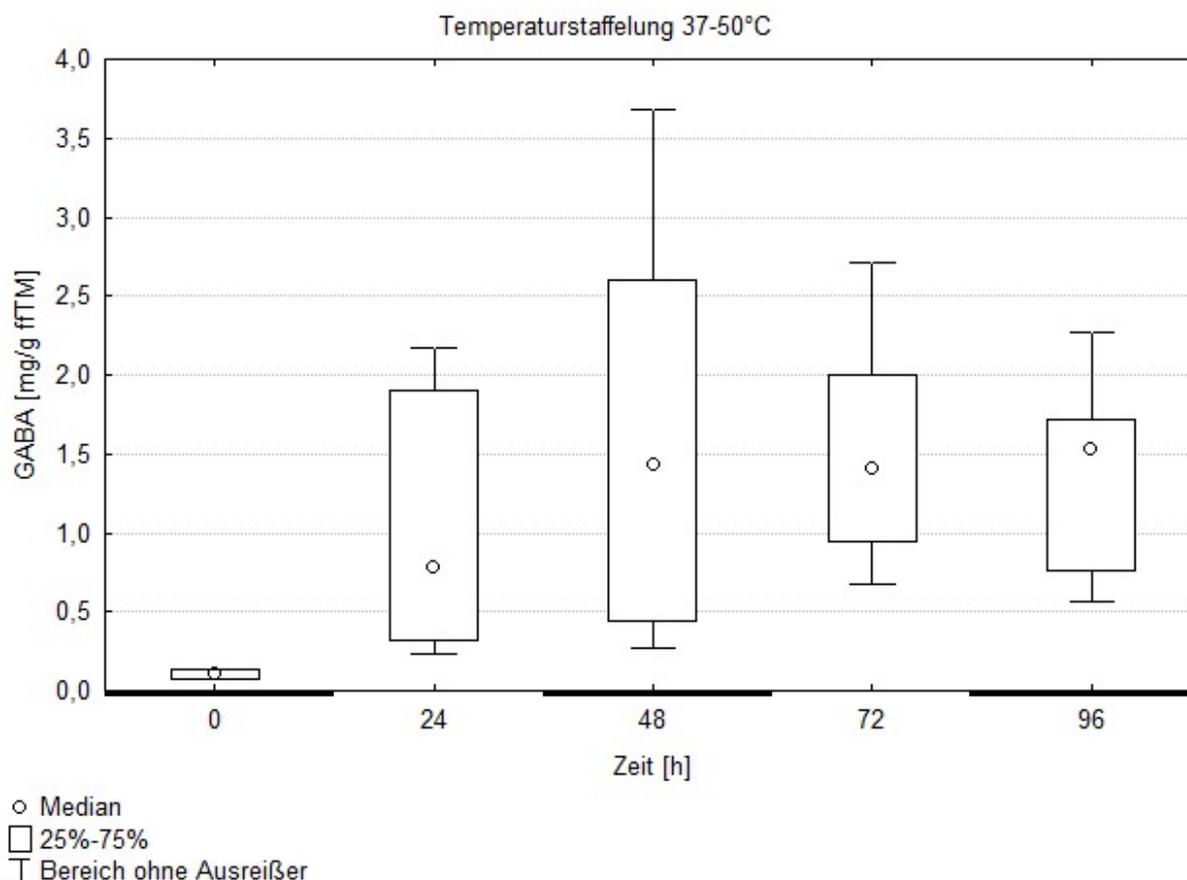
Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=1-2

### 5.1.1.3.2 Temperaturverlauf mit der Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C

Beim Temperaturgradienten 37-50°C steigen die GABA-Gehalte zu Beginn der Inkubation an und stagnieren nach 72 Stunden. Zum Ende der Inkubation sinken sie wieder ab (s. Abbildung 5-51). Nach 24 und 48 Stunden sind die Perzentilen am größten, so dass hier bei den einzelnen getesteten Inkubationsvarianten die meisten Unterschiede zu erwarten sind.

Die einzelnen Inkubationsvarianten unterscheiden sich im Verlauf der Inkubation im GABA-Gehalt. Nach 24 Stunden unterscheiden sich die Essigsäureinkubation und die Essigsäure/Milchsäureinkubation sowohl eindeutig von der Milchsäureinkubation als auch von der Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser (s. Abbildung 5-52). Die Essigsäure- und die Essigsäure/Milchsäureinkubation unterscheiden sich nicht voneinander, ebenso die

Milchsäure- und die Kontrollinkubation. 24 Stunden später ist das Bild das gleiche, mit der Ausnahme, dass sich nun auch die Essigsäure/Milchsäureinkubation deutlich von der Essigsäureinkubation unterscheidet. Die Essig-/Milchsäureinkubation erreicht zu diesem Zeitpunkt die höchste GABA-Konzentration mit 3,3mg/g ffTM. Im weiteren Verlauf der Inkubation nähern sich die GABA-Gehalte der einzelnen Varianten wieder etwas aneinander an.



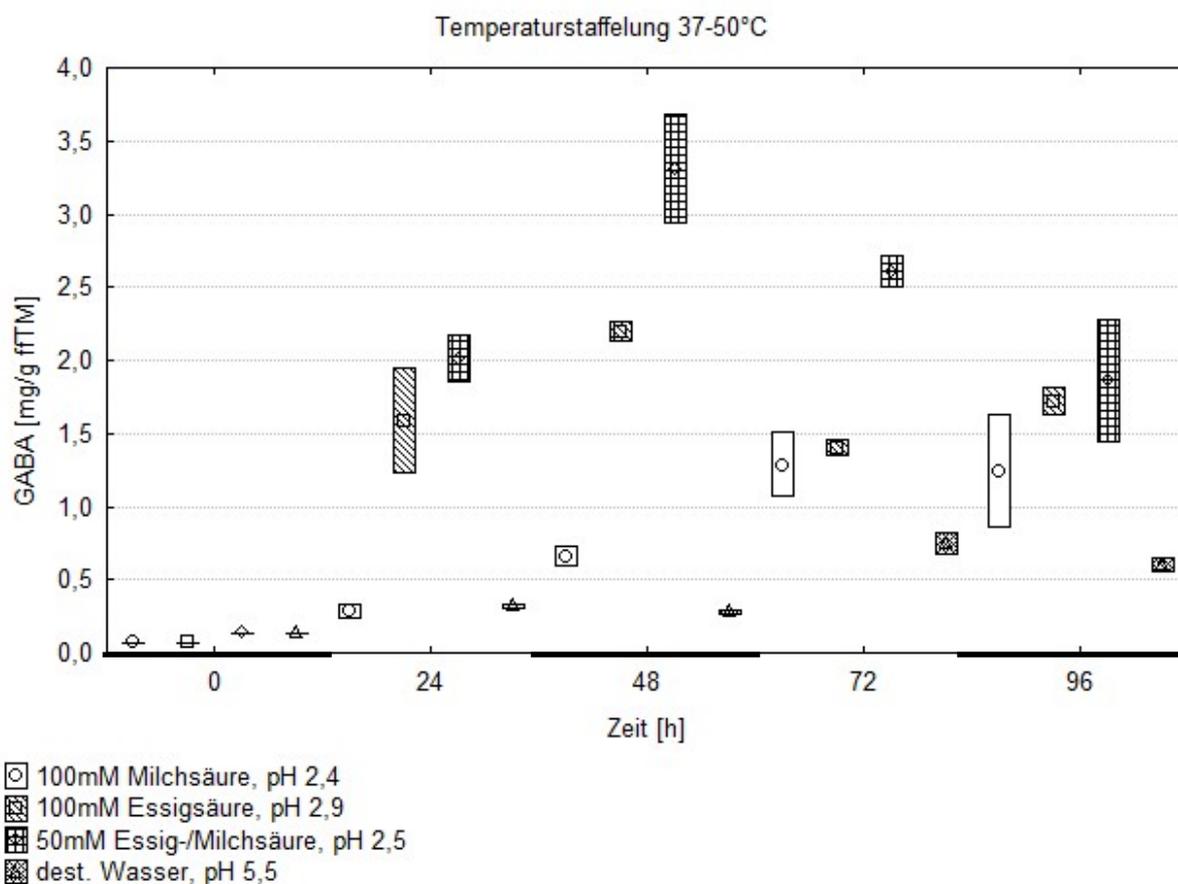
**Abbildung 5-51: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Die Ergebnisse aller Inkubationen bei diesem Temperaturgradient wurden zusammengefasst. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. n=8

Nach 72 Stunden unterscheidet sich die Essigsäure/Milchsäureinkubation weiterhin von den anderen Inkubationen. Die Essigsäureinkubation unterscheidet sich nicht mehr von der Milchsäureinkubation, aber noch von der Kontrollinkubation und der Essigsäure/Milchsäureinkubation. Zum Ende der Inkubation nach 96 Stunden liegen die Essigsäure und die Essigsäure/Milchsäureinkubation mit ihren GABA-Gehalten im gleichen Bereich. Die Essigsäure/Milchsäureinkubation unterscheidet sich weiterhin deutlich von der

Kontroll- und der Milchsäureinkubation. Die Essigsäureinkubation unterscheidet sich auch zum Ende noch eindeutig von der Kontrollinkubation. Auch die Milchsäureinkubation liegt mit ihrem GABA-Gehalt zu diesem Zeitpunkt deutlich über der Kontrollinkubation.

Offensichtlich bewirkt die Temperatur von 50°C eine grundsätzliche Störung. Da bereits bei den Studien zu den freien Aminosäuren (s. Kap. 5.1.1) klar wurde, dass eine Abnahme der freien Aminosäuren bei 50°C auftritt, scheint dieser Effekt für GABA ebenfalls so aufzutreten.



**Abbildung 5-52: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C in Abhängigkeit von dem verwendeten Inkubationsmedium.**

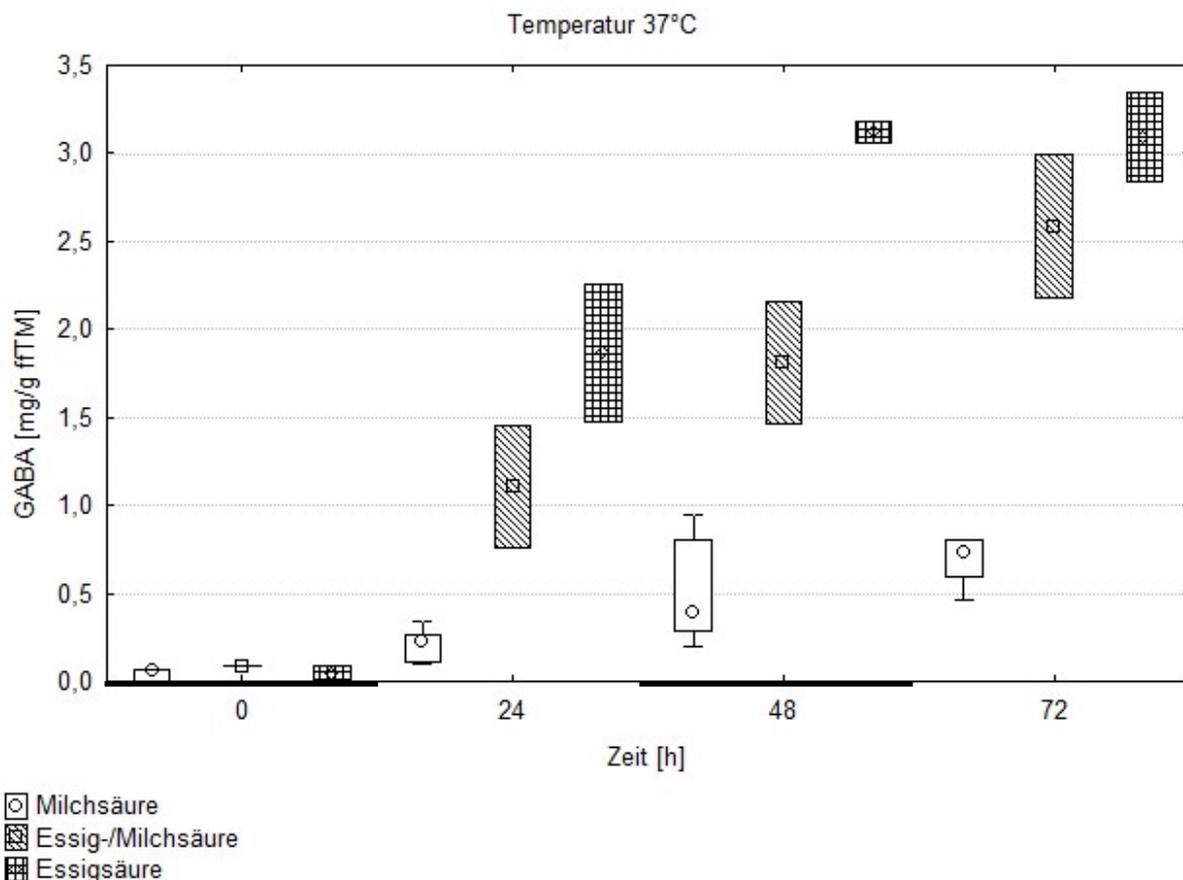
Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=2

Die höchsten GABA-Gehalte werden bei dem Temperaturgradienten 37-50°C mit einem Gemisch aus Essig- und Milchsäure erreicht. Die Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser hat die geringsten Gehalte über die Dauer der Inkubation. Die pH-Werte der verschiedenen Säurevarianten sind zwar nicht gleich, liegen aber dicht beieinander, so dass die Unterschiede in den GABA-Gehalten eher den Säuren als den pH-Werten zugerechnet werden können. Das

Absinken der GABA-Gehalte nach 48 Stunden fällt mit der Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 50°C zusammen.

### 5.1.1.3.3 Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 37°C

Bei einer konstanten Temperatur von 37°C liegen die GABA-Gehalte der verschiedenen Inkubationen mit säurehaltigen Medien schon 24 Stunden nach Beginn der Inkubation deutlich auseinander. Die Inkubation mit Essigsäure erreicht den höchsten Wert, gefolgt von der Inkubation mit einem Gemisch aus Essig- und Milchsäure und den geringsten GABA-Gehalt haben die Inkubationen mit Milchsäure (s. Abbildung 5-53).



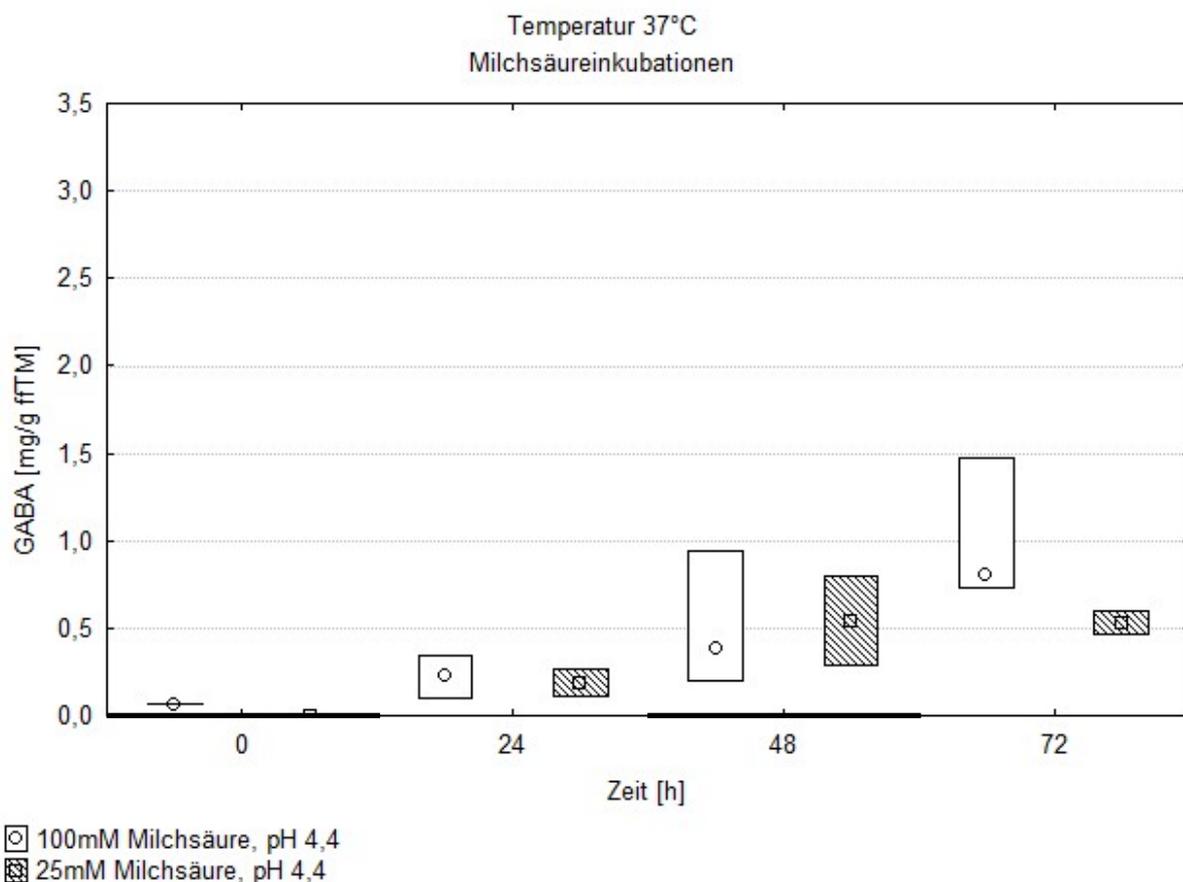
**Abbildung 5-53: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit von der für das Inkubationsmedium gewählten Säure bzw. von dem Säuregemisch.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 25mmol/l bis 100mmol/l. n=2-5

Nach 48 Stunden bleiben diese deutlichen Unterschiede bestehen, wobei sich die GABA-Gehalte der einzelnen Inkubationen etwas weiter voneinander entfernt haben. 24 Stunden

später bleibt der Gehalt der Inkubationen mit Milchsäure niedrig, während die Inkubation mit einem Gemisch aus Essig- und Milchsäure sich an den Gehalt der Inkubation mit Essigsäure angenähert hat.

Die GABA-Gehalte der beiden getesteten Milchsäureinkubationen unterscheiden sich trotz der unterschiedlichen Konzentrationen über den Verlauf der Inkubation nicht deutlich voneinander (s. Abbildung 5-54). Bei den Milchsäureinkubationen hat die gewählte Säurekonzentration keine Auswirkungen auf den GABA-Gehalt.

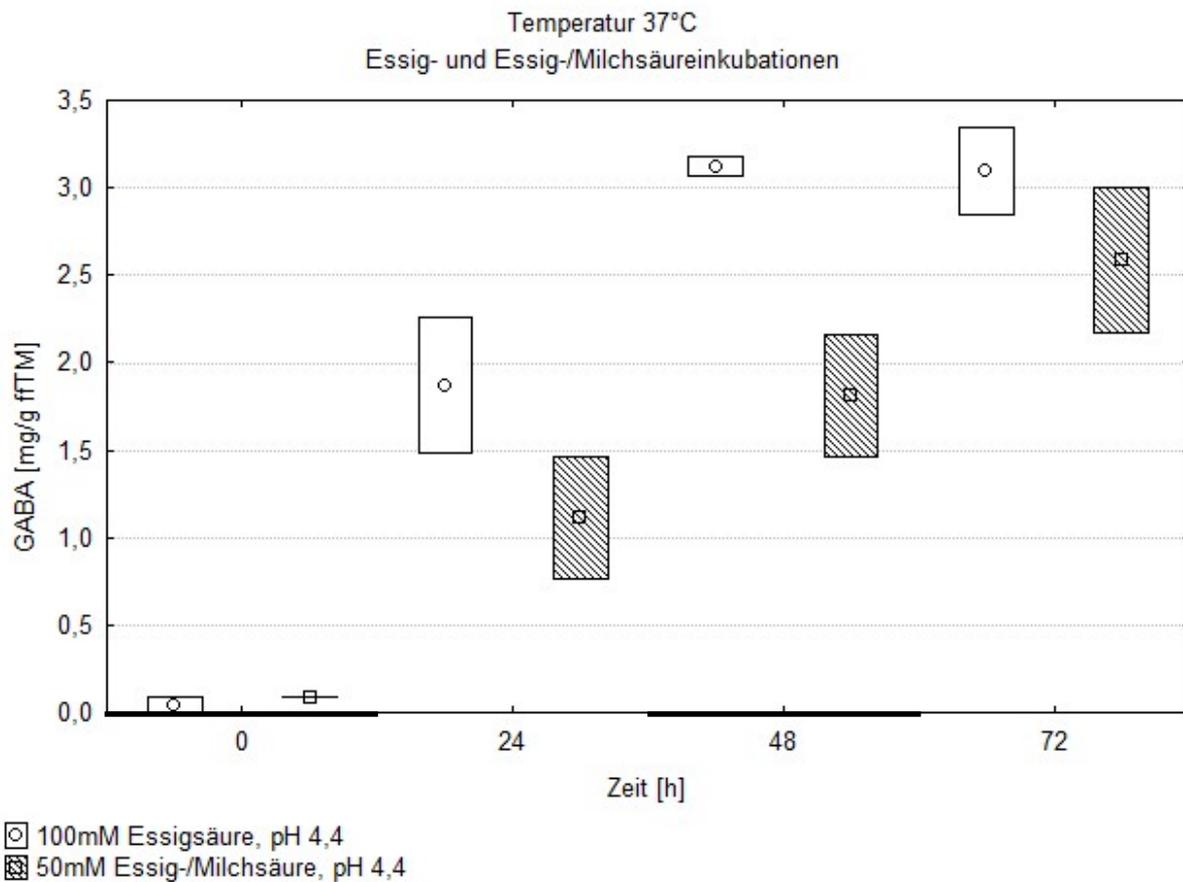


**Abbildung 5-54: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=2-3

Die Inkubationen, die Essigsäure enthalten, erreichen deutlich höhere GABA-Gehalte als die Inkubationen ohne Essigsäure. Die Inkubation mit 100mM Essigsäure unterscheidet sich deutlich in den GABA-Gehalten zur Mitte der Inkubation nach 48 Stunden im Vergleich mit der Inkubation mit einem Gemisch aus Essig-/Milchsäure. Vorher und nachher liegt kein

eindeutiger Unterschied vor. Die Inkubation mit 100mM Essigsäure erreicht nach 48 Stunden einen Maximalwert von 3,1mg/g fTTM (s. Abbildung 5-55).



**Abbildung 5-55: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Essigsäure und Essig-/Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

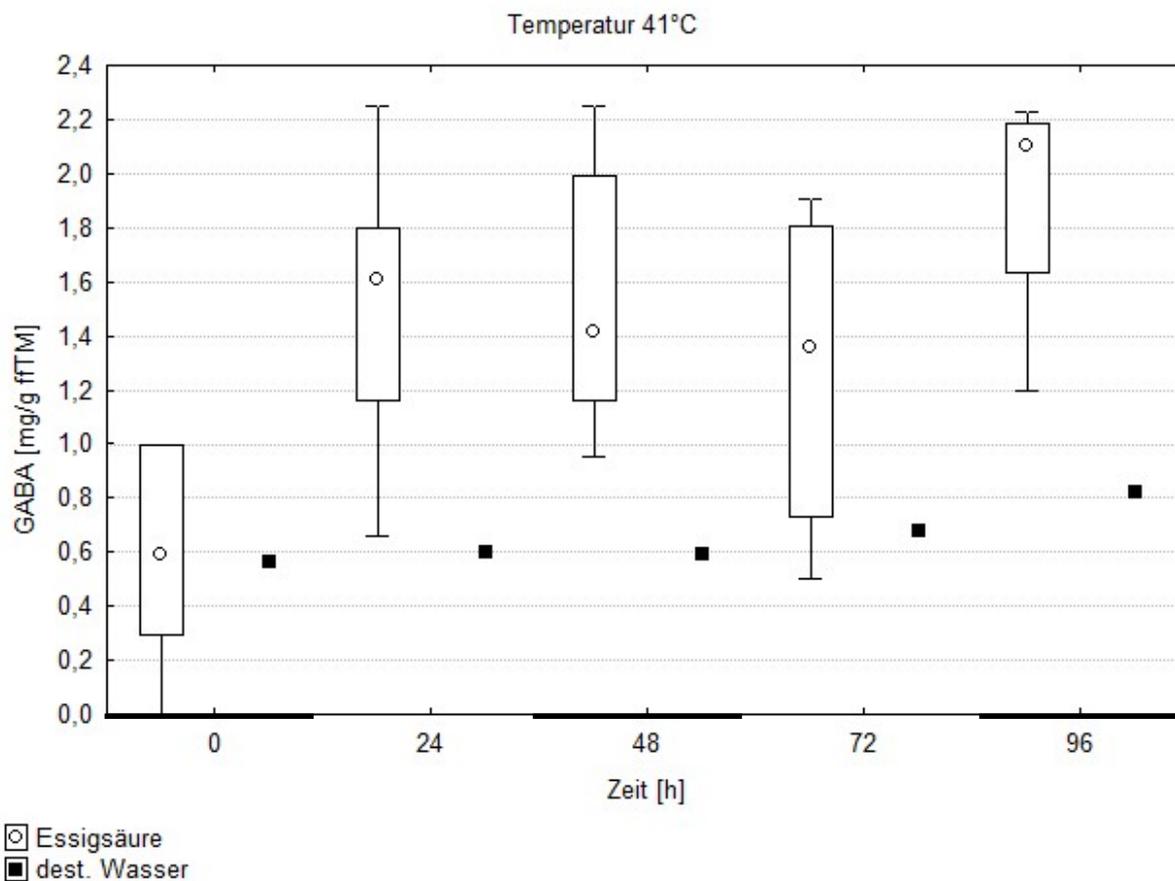
Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=2

Bei einer konstanten Temperatur von 37°C während der Inkubation führt eine Inkubation mit reiner Milchsäure zu deutlich geringeren GABA-Gehalten als Inkubationen, die mit Essigsäure im Medium durchgeführt wurden.

#### 5.1.1.3.4 Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 41°C

Bei einer konstanten Temperatur von 41°C steigt der GABA-Gehalt in den Samen über die Inkubationsdauer an. Der erste Anstieg erfolgt in den ersten 24 Stunden, die nächsten 48 Stunden bleibt der GABA-Gehalt nahezu konstant und steigt die letzten 24 Stunden nochmals

an (s. Abbildung 5-56). Dies gilt sowohl für die Essigsäureinkubationen wie auch die Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser. Trotz der unterschiedlichen Inkubationsmedien unterscheiden sich diese beiden Varianten in ihren GABA-Gehalten nicht voneinander.



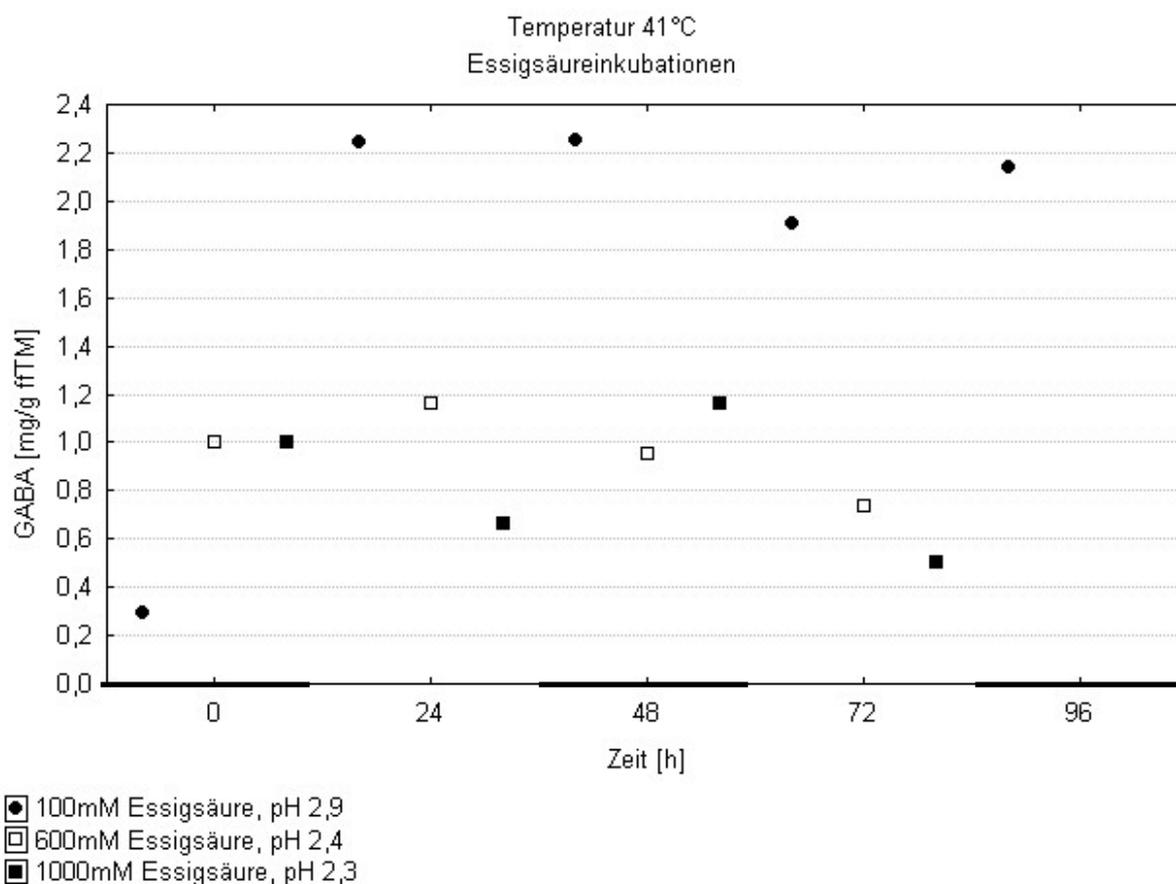
**Abbildung 5-56: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 41°C in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium mit Essigsäure oder destilliertem Wasser.**

Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 100mmol/l bis 1000mmol/l. n=1-5

Bei den Essigsäureinkubationen mit hohen Konzentrationen (600 und 1000mM) bleiben die GABA-Gehalte die gesamte Inkubationsdauer unterhalb derer mit einer Konzentration von 100mM Essigsäure (s. Abbildung 5-57). Trotz des Unterschiedes in den Gehalten unterscheiden sich diese Inkubationen nicht eindeutig voneinander. Nach 48 Stunden wird mit der Inkubation mit einer Konzentration von 100mM Essigsäure der höchste Gehalt mit 2,3mg/g ffTM erreicht.

Zusätzlich zu den Inkubationen mit 100, 600 und 1000mM Essigsäure wurden noch zwei Inkubationen mit jeweils 300mM Essigsäure durchgeführt. Diese beiden Inkubationen werden der Übersicht halber separat betrachtet.

Die Inkubationen mit 300mM Essigsäure unterscheiden sich trotz des unterschiedlichen pH-Wertes nicht in ihren GABA-Gehalten (s. Abbildung 5-58). Ebenso unterscheiden sie sich über den Inkubationszeitraum nicht von den anderen Inkubationen mit 100, 600 und 1000mM Essigsäure.

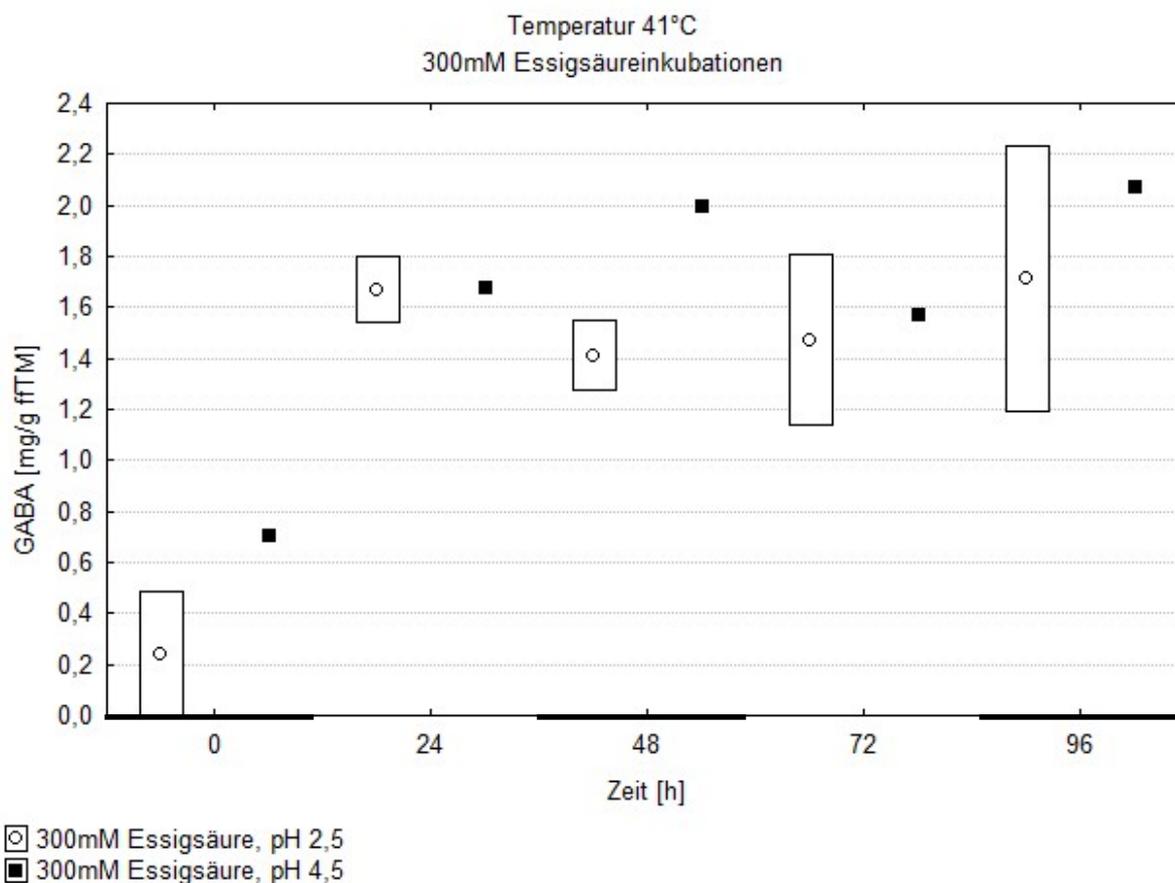


**Abbildung 5-57: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 41°C in Abhängigkeit von dem gewählten Inkubationsmedium.**

Angegeben sind Einzelwerte. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=1

Die Essigsäurekonzentration hat einen Einfluss auf den GABA-Gehalt, da die Gehalte der Inkubationen mit 600 und 1000mM Essigsäure unterhalb der Inkubationen mit 100 und 300mM Essigsäure liegen. Die Säure wirkt sich bei konstant 41°C nur geringfügig auf den GABA-Gehalt aus, da die Inkubationen mit 600 und 1000mM Essigsäure einen ähnlichen

GABA-Gehalt aufweisen wie die Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser. Der pH-Wert wirkt sich nicht auf den GABA-Gehalt aus.



**Abbildung 5-58: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 41°C in Abhängigkeit von dem gewählten Inkubationsmedium.**

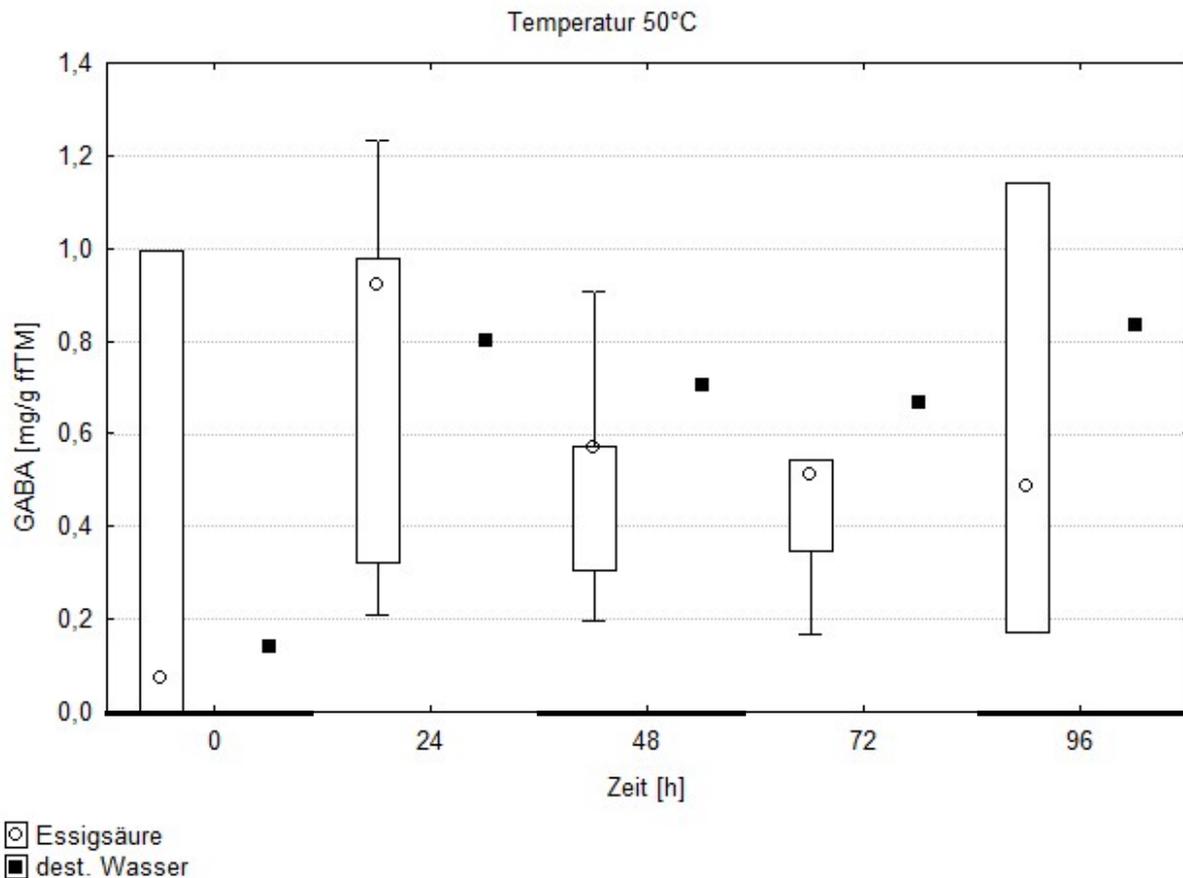
Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=1-2

#### 5.1.1.3.5 Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 50°C

Bei einer konstanten Temperatur von 50°C während der Inkubation steigt der GABA-Gehalt in den ersten 24 Stunden leicht an und verbleibt die restliche Inkubationszeit fast auf dem gleichen Niveau (s. Abbildung 5-59). Dies gilt für die Inkubationen mit Essigsäure genauso wie für die Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser. Die Gehalte der beiden Varianten unterscheiden sich im Verlauf der Inkubation nicht voneinander. Die bei einer Temperatur von konstant 50°C erreichten GABA-Gehalte liegen über den gesamten Inkubationsverlauf niedriger als bei den anderen Temperaturvarianten. Eine Inaktivierung der

Glutamatdecarboxylase aufgrund der hohen Temperatur ist eine mögliche Erklärung für die niedrigeren GABA-Gehalte.

Da die gewählten Perzentilen (25-75%) für die zusammengefassten Inkubationen mit Essigsäure groß sind, werden die Inkubationen mit Essigsäure einzeln betrachtet. Der besseren Übersicht wegen werden sie in zwei Abbildungen aufgeteilt.



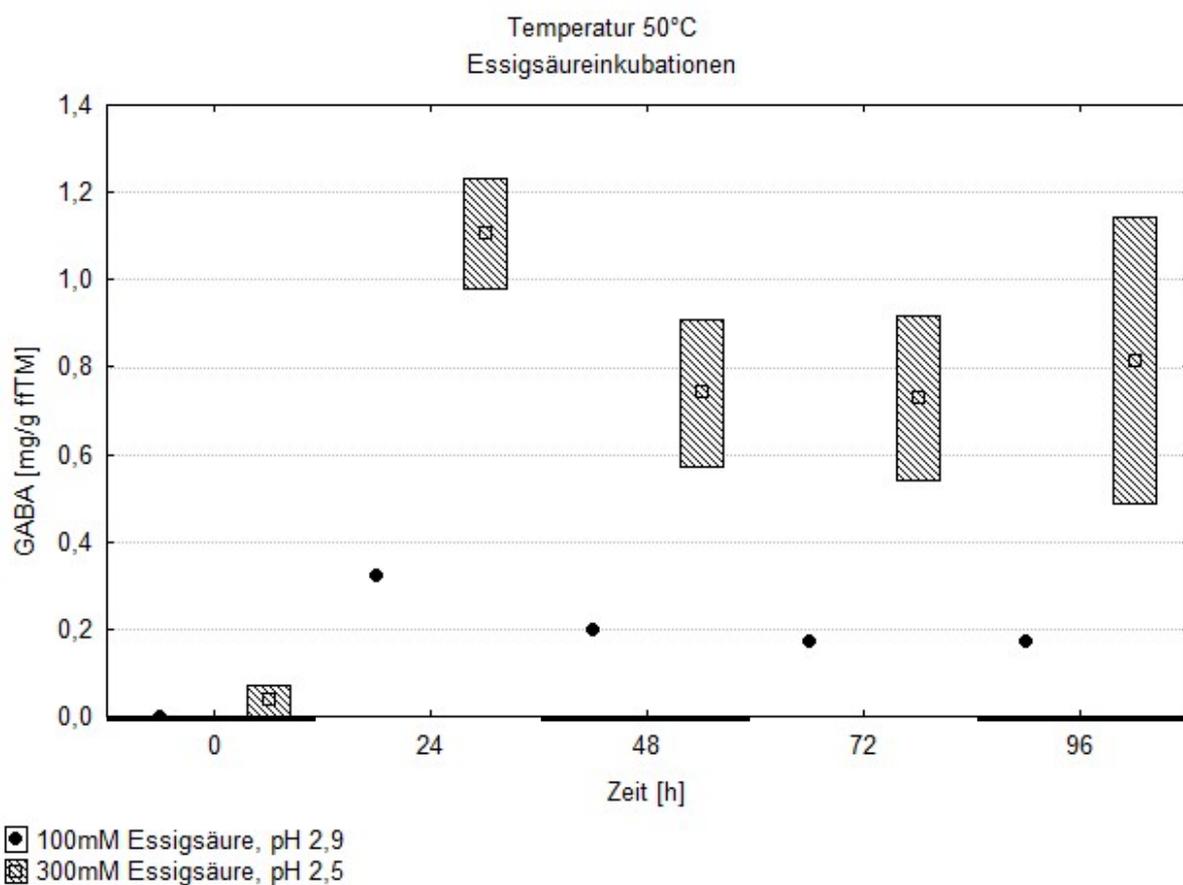
**Abbildung 5-59: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 50°C in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium mit Essigsäure oder destilliertem Wasser.**

Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit der dazugehörigen Perzentile (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 100mmol/l bis 1000mmol/l. n=1-5

Die GABA-Gehalte der Inkubation mit einer Konzentration von 100mM Essigsäure liegen während der gesamten Versuchsdauer unterhalb derer mit einer Konzentration von 300mM Essigsäure (s. Abbildung 5-60). Letztere liegen in einem ähnlichen Bereich wie die Gehalte der Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser.

Die Samen, die für die Inkubationen mit einer Essigsäurekonzentration von 600mM bzw. 1000mM verwendet wurden, weisen schon bei Beginn der Inkubation einen hohen GABA-Gehalt gegenüber den Samen der anderen Inkubationen auf. Dieser sinkt während der Inkubation ab und schwankt danach nur mäßig bis zum Ende der Inkubation (s. Abbildung 5-61). Die beiden Konzentrationen unterscheiden sich nicht eindeutig voneinander.

Trotz des anderen Verlaufs der Inkubationen mit Essigsäurekonzentrationen von 600mM und 1000mM gegenüber 100mM und 300mM, der durch die hohen GABA-Gehalte zu Beginn begründet ist, unterscheiden sich alle vier getesteten Essigsäureinkubationen nicht voneinander.

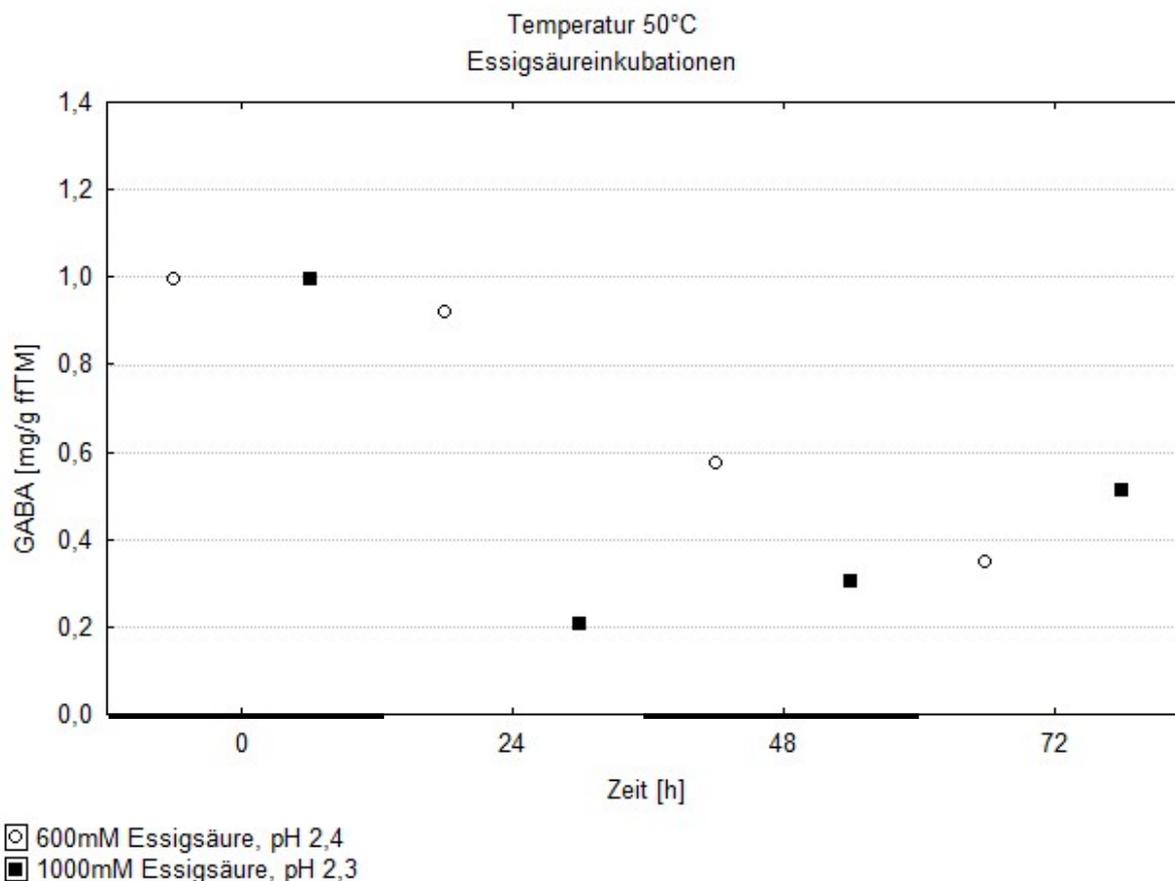


**Abbildung 5-60: Entwicklung des GABA-Gehaltes im Verlauf der Essigsäureinkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 50°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=1-2

Wird für die Inkubation eine konstante Temperatur von 50°C verwendet, gibt es keine Unterschiede im GABA-Gehalt zwischen den einzelnen Inkubationen mit Essigsäure, trotz

unterschiedlicher Säurekonzentrationen und pH-Werten, ebenso wie zur Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser. Die durchgehend niedrigen GABA-Gehalte im Vergleich zu anderen Temperaturvarianten legen einen Einfluss der Temperatur nahe.



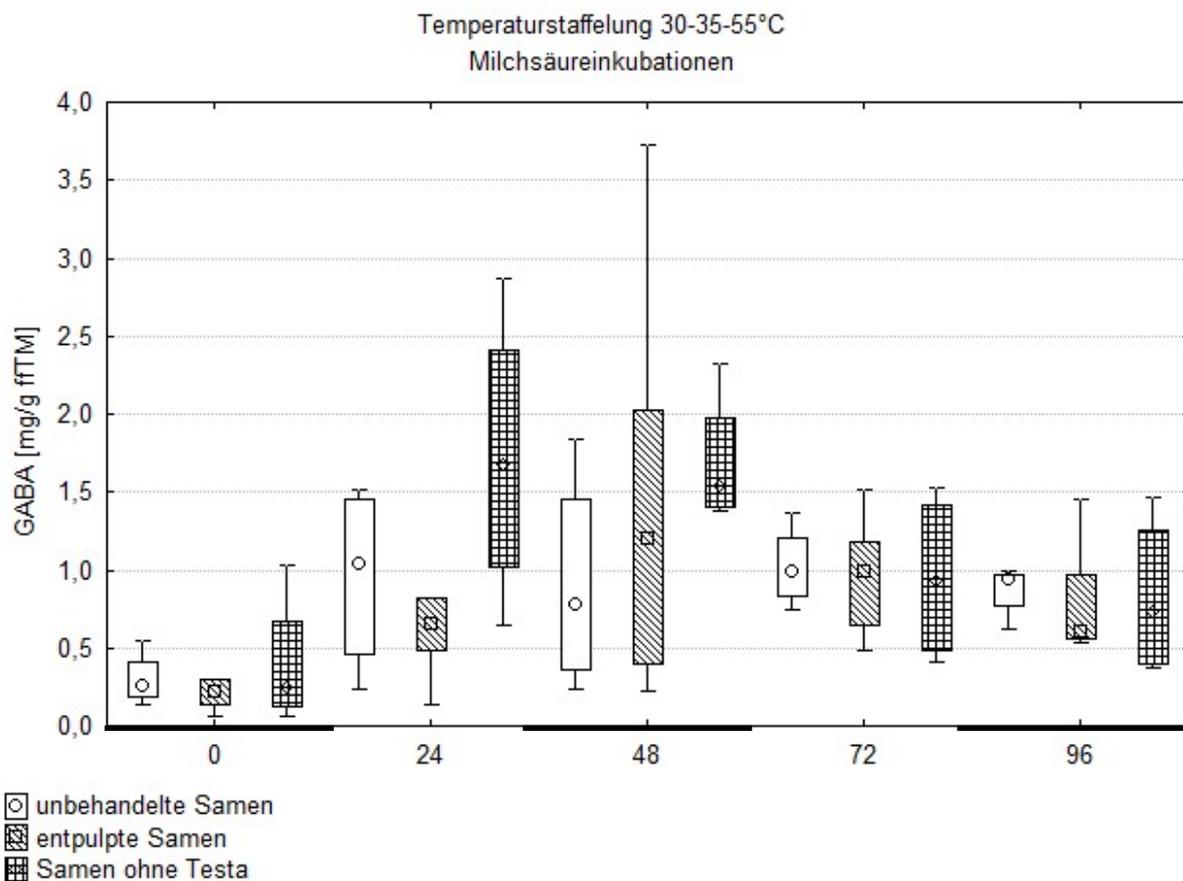
**Abbildung 5-61: Entwicklung des GABA-Gehaltes im Verlauf der Essigsäureinkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 50°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

Angegeben sind Einzelwerte. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=1

#### 5.1.1.3.6 Einfluss der Samenbehandlung auf den Gehalt an $\gamma$ -Aminobuttersäure während der Inkubation

Die drei unterschiedlichen Samenbehandlungen haben bei Inkubationen mit Milchsäure bei der Temperaturstaffelung 30-35-55°C mit einer Ausnahme keinen Einfluss auf die GABA-Gehalte während der Inkubation (s. Abbildung 5-62). Nur nach 24 Stunden unterscheiden sich die entpulpten Samen von den Samen ohne Testa eindeutig in ihrem GABA-Gehalt.

Bei den Inkubationen mit einem Gemisch aus Essig- und Milchsäure bei der Temperaturstaffelung 30-35-55°C hat die Samenbehandlung zu Beginn der Inkubation einen Einfluss auf den GABA-Gehalt (s. Abbildung 5-63).

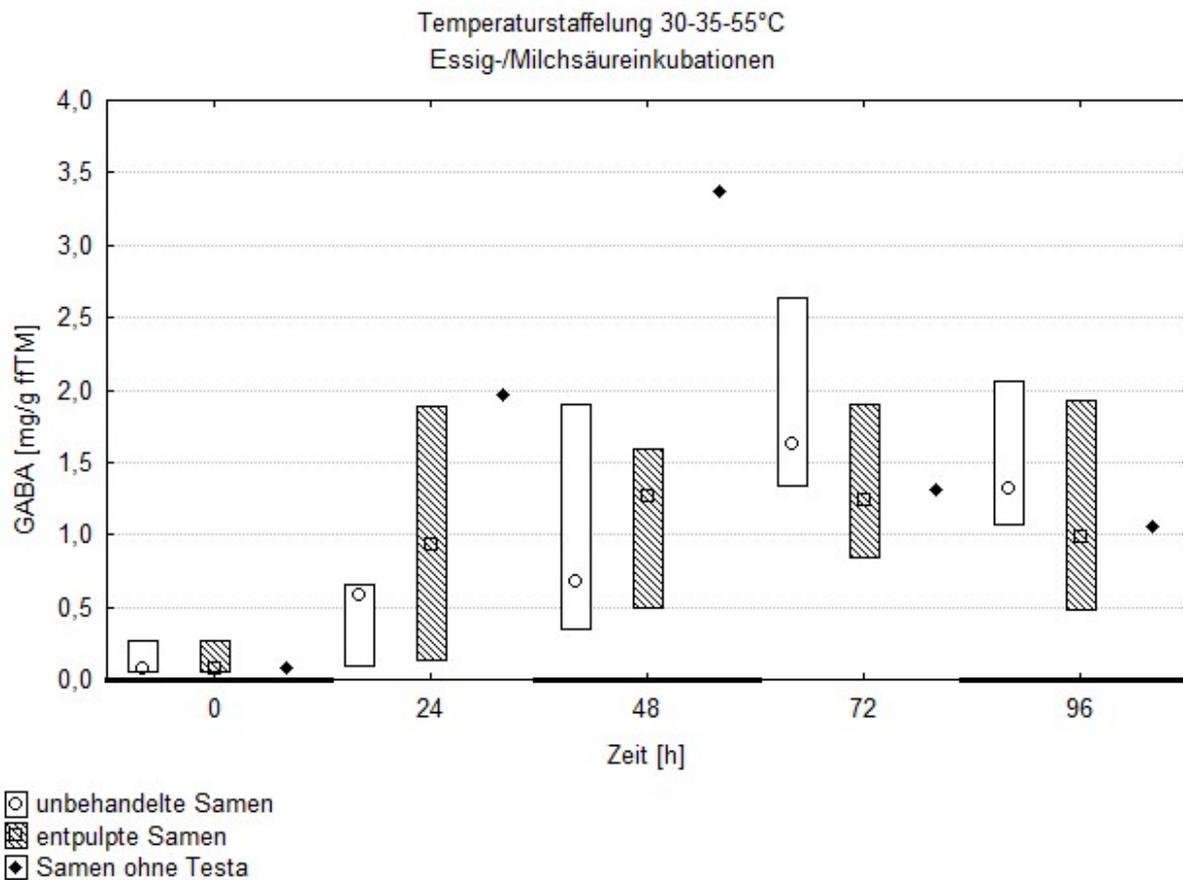


**Abbildung 5-62: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf den GABA-Gehalt während der Milchsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Eine Unterscheidung der Inkubationen nach der Konzentration und dem pH-Wert der Milchsäuremedien erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 25mmol/l bis 100mmol/l. n=4-6

Nach 24 Stunden haben die unbehandelten Samen im Vergleich zu den Samen ohne Testa einen deutlich geringeren GABA-Gehalt. Der GABA-Gehalt der entpulppten Samen liegt zwischen diesen beiden Varianten. Nach 48 Stunden unterscheidet sich der GABA-Gehalt der Samen ohne Testa jetzt deutlich von den beiden anderen Varianten. Die hohen GABA-Gehalte der Samen ohne Testa während der ersten 48 Stunden der Inkubation könnten auf einer erhöhten Stressreaktion begründet sein, die durch den veränderten Stoffaustausch aufgrund der fehlenden Testa bedingt ist. Nach einer deutlichen Verringerung des GABA-

Gehaltes der Samen ohne Testa unterscheiden sich die drei verschiedenen Inkubationen die restliche Inkubationsdauer nicht voneinander.

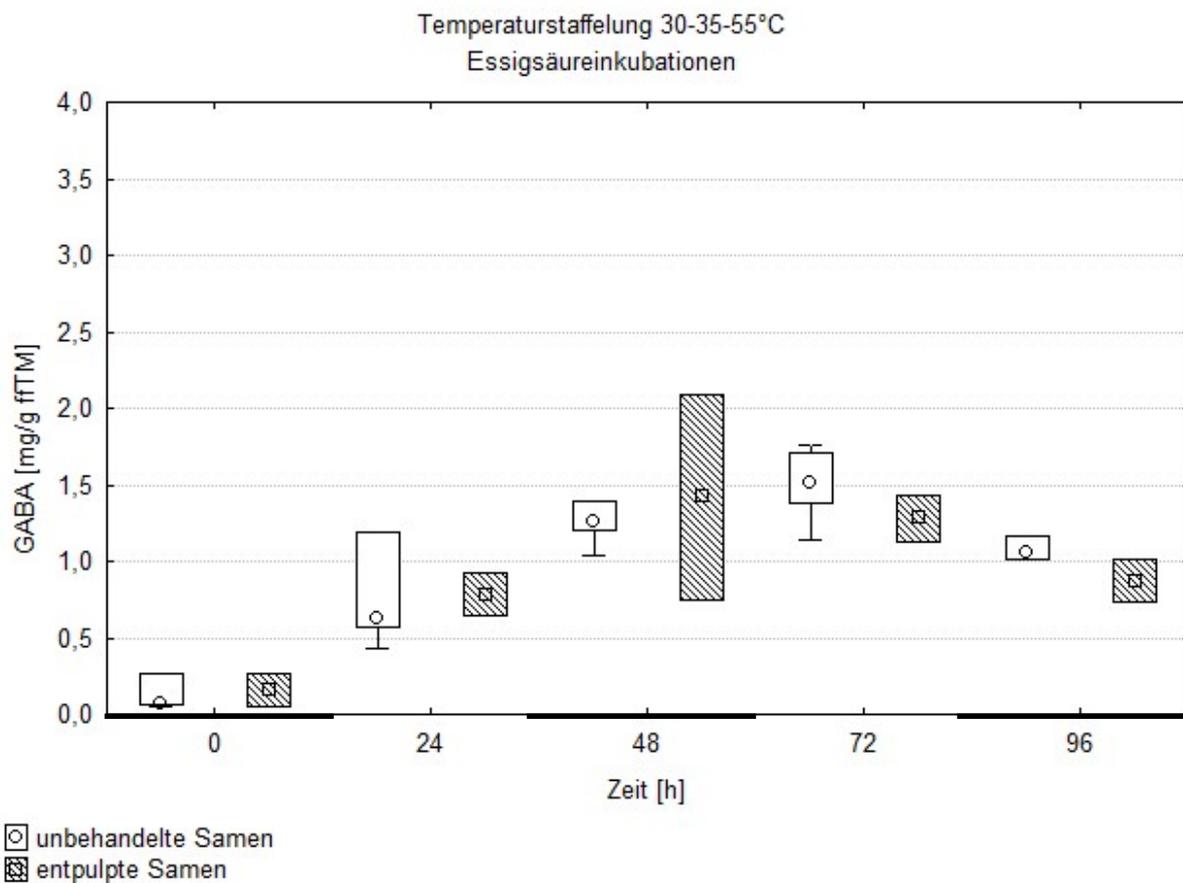


**Abbildung 5-63: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf den GABA-Gehalt während der Essigsäure/Milchsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C.**

Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Eine Unterscheidung der Inkubationen nach der Konzentration und dem pH-Wert der Essig-/Milchsäuremedien erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 12,5mmol/l bis 50mmol/l. n=1-3

Die Samenbehandlung hat auf den GABA-Gehalt der Inkubationen mit Essigsäure bei der Temperaturstaffelung 30-35-55°C während der gesamten Dauer der Inkubation keinen Einfluss (s. Abbildung 5-64). Die GABA-Gehalte der unbehandelten und der entpulpften Samen liegen für den getesteten Zeitraum im gleichen Bereich. Beide Varianten weisen zu Beginn der Inkubation einen Anstieg in den GABA-Gehalten auf, die nach der Erhöhung der Temperatur auf 55°C wieder leicht absinken.

Die beiden getesteten Samenbehandlungsarten haben beim Temperaturverlauf 37-50°C keine Auswirkungen auf die Entwicklung des GABA-Gehaltes während der Inkubation (s. Abbildung 5-65). Der Verlauf und die GABA-Gehalte sind bei beiden Varianten ähnlich.

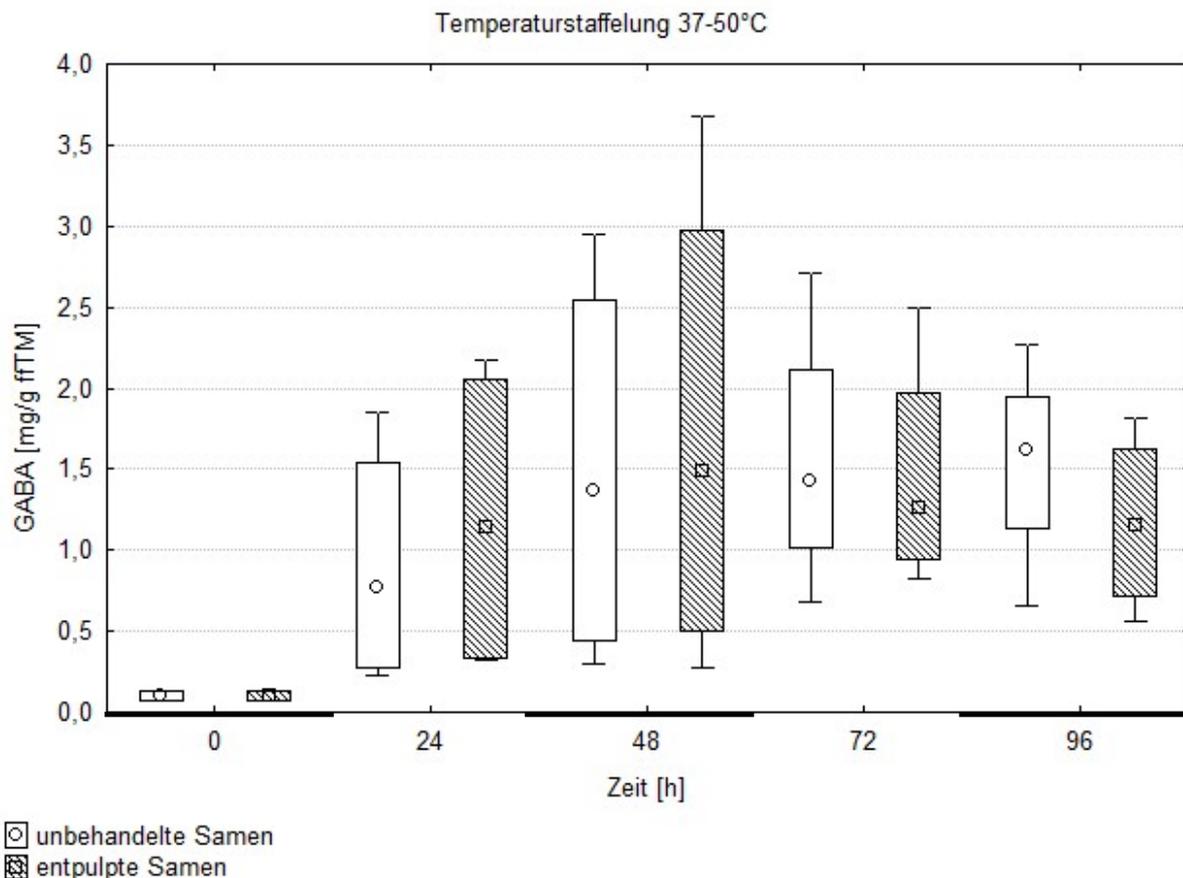


**Abbildung 5-64: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf den GABA-Gehalt während der Essigsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Eine Unterscheidung der Inkubationen nach der Konzentration und dem pH-Wert der Essigsäuremedien erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 25mmol/l bis 100mmol/l. n=2-5

Bei einer konstanten Temperatur von 37°C wirkt es sich nicht auf den GABA-Gehalt aus, ob unbehandelte oder entpulpnte Samen für die Inkubationen verwendet wurden. Dies gilt auch für die unterschiedlichen Säurevarianten der verschiedenen Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 37°C. Aus diesem Grund sind die Ergebnisse für die Vorbehandlung der Samen bei Inkubationen mit einer konstanten Temperatur von 37°C hier nicht graphisch dargestellt.

Bei einer konstanten Temperatur von 60°C weisen die entpulperten Samen nach 24 Stunden einen höheren GABA-Gehalt in den Samen auf als die unbehandelten Samen (s. Abbildung 5-66). Beide getesteten Varianten unterscheiden sich im weiteren Verlauf der Inkubation nicht voneinander. In den ersten 24 Stunden der Inkubation hat die Temperatur von 60°C einen stärkeren Einfluss auf die entpulperten Samen als auf die unbehandelten Samen.



**Abbildung 5-65: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung des GABA-Gehaltes während der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C.**

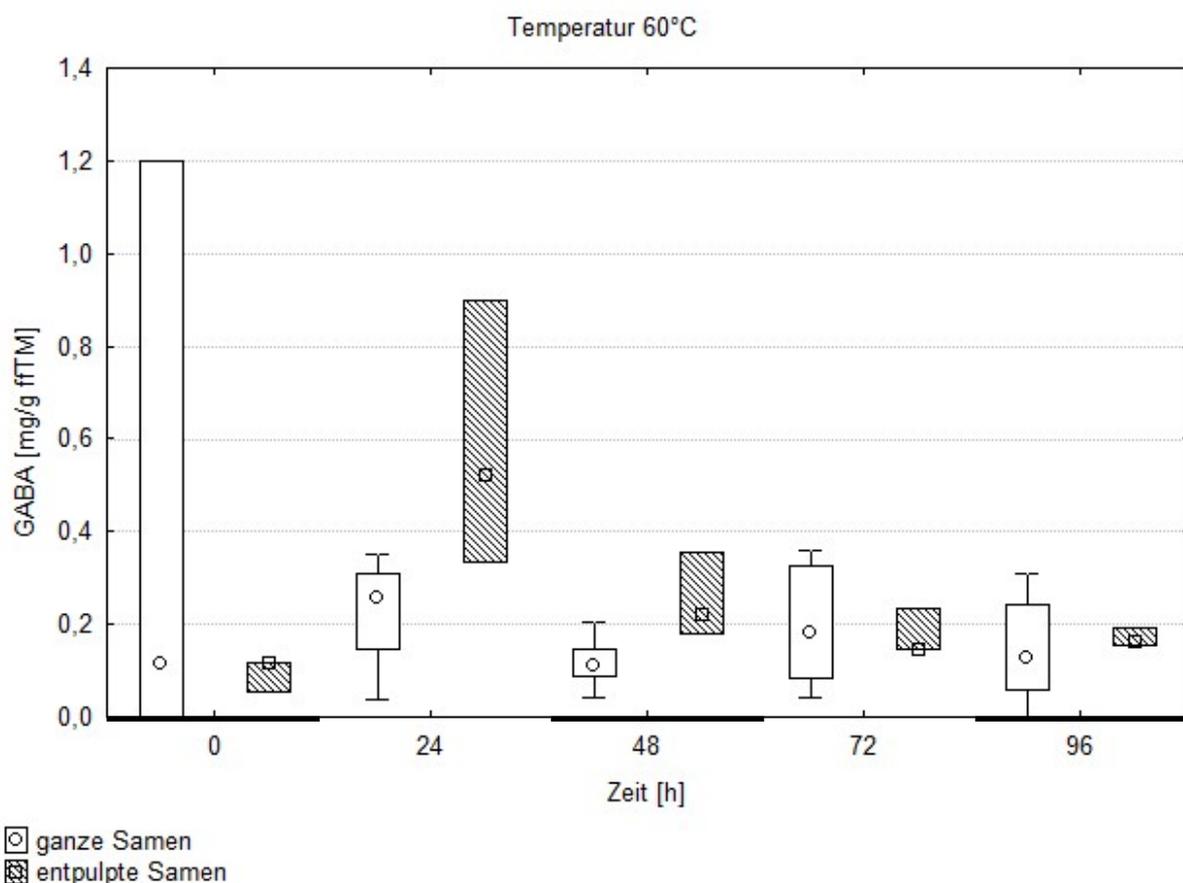
Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Eine Unterscheidung der Inkubationen nach verwendeter Säure, deren Konzentration und pH-Wert erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. n=4

### 5.1.1.3.7 Zusammenfassung

Der GABA-Gehalt lässt sich durch das gewählte Temperaturregime, aber auch durch die verwendete Säure beeinflussen. Eine konstante Temperatur von 41°C führt nicht wie bei den hydrophoben Aminosäuren und dem Aminosäuregesamtgehalt zu den höchsten GABA-Gehalten.

Der höchste GABA-Gehalt mit 3,4mg/g fTTM wurde bereits nach 48 Stunden bei der Temperaturstaffelung 30-35-55°C in Samen ohne Testa bei Inkubationen mit einem Gemisch aus Essig- und Milchsäure gefunden. Ähnlich hohe Gehalte an GABA zeigen sich bei der Temperaturstaffelung 37-50°C, wenn die Inkubationsmedien Essigsäure enthalten. Reine Milchsäure führt zu niedrigeren GABA-Gehalten. Bei einer konstanten Temperatur von 37°C werden ähnliche Gehalte wie bei der Temperaturstaffelung 37-50°C erreicht, wenn sich Essigsäure im Inkubationsmedium befindet. Reine Milchsäure als Inkubationsmedium führt auch hier zu deutlich geringeren Gehalten. Die 60°C Inkubationen sind durch die geringsten Gehalte an GABA charakterisiert.

Essigsäure, rein oder als Gemisch mit Milchsäure, führt bei drei der getesteten Temperaturregimen (37-50°C, 37°C und 41°C) zu höheren GABA-Gehalten als reine Milchsäure.



**Abbildung 5-66: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung des GABA-Gehaltes während der Inkubation bei einer konstanten Temperatur von 60°C.**

Angegeben sind die Mediane mit der dazugehörigen Perzentile (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Eine Unterscheidung der Inkubationen nach verwendeter Säure, deren Konzentration und pH-Wert erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. n=3-9

Der GABA-Gehalt wird von der Entfernung der Pulpa vor Inkubationsbeginn bei den verschiedenen Temperaturen nicht beeinflusst.

### 5.1.2 Polyphenole

Kakaosamen enthalten sehr viele Polyphenole. Bezogen auf die fettfreie Trockenmasse sind 12 bis 18% phenolische Verbindungen vorhanden (Kim und Keeney, 1984). Der überwiegende Anteil sind (-)-Epicatechin ( $\geq 4\%$ ) und dessen Oligomere. Diese Verbindungen sind vor allem in speziellen Idioblasten des Speichergewebes lokalisiert. Diese Phenolspeicherzellen enthalten ca. 14% Purine und über 66% phenolische Verbindungen (Forsyth und Quesnel, 1963). Im Zuge der Fermentation oder bei Inkubationen werden die phenolischen Substanzen freigesetzt, wenn die Biomembranen (Plasmalemma und Tonoplast) der Idioblasten zerstört werden.

Nach Freisetzung treten die Substanzen in die umgebenden Gewebe ein und werden stark verändert, entweder indem sie als Antioxidantien wirken oder über enzymatische Katalyse durch Peroxidasen oder Polyphenoxidasen. Die Oxidationsprodukte reagieren häufig mit Eiweißen oder freien Aminosäuren zu unlöslichen Bräunungsprodukten.

Einerseits wird durch die Oxidation ein Anteil der Polyphenole der Geschmacksbildung entzogen und die adstringierende Wirkung wird vermindert, andererseits wird die antioxidative Aktivität gesenkt.

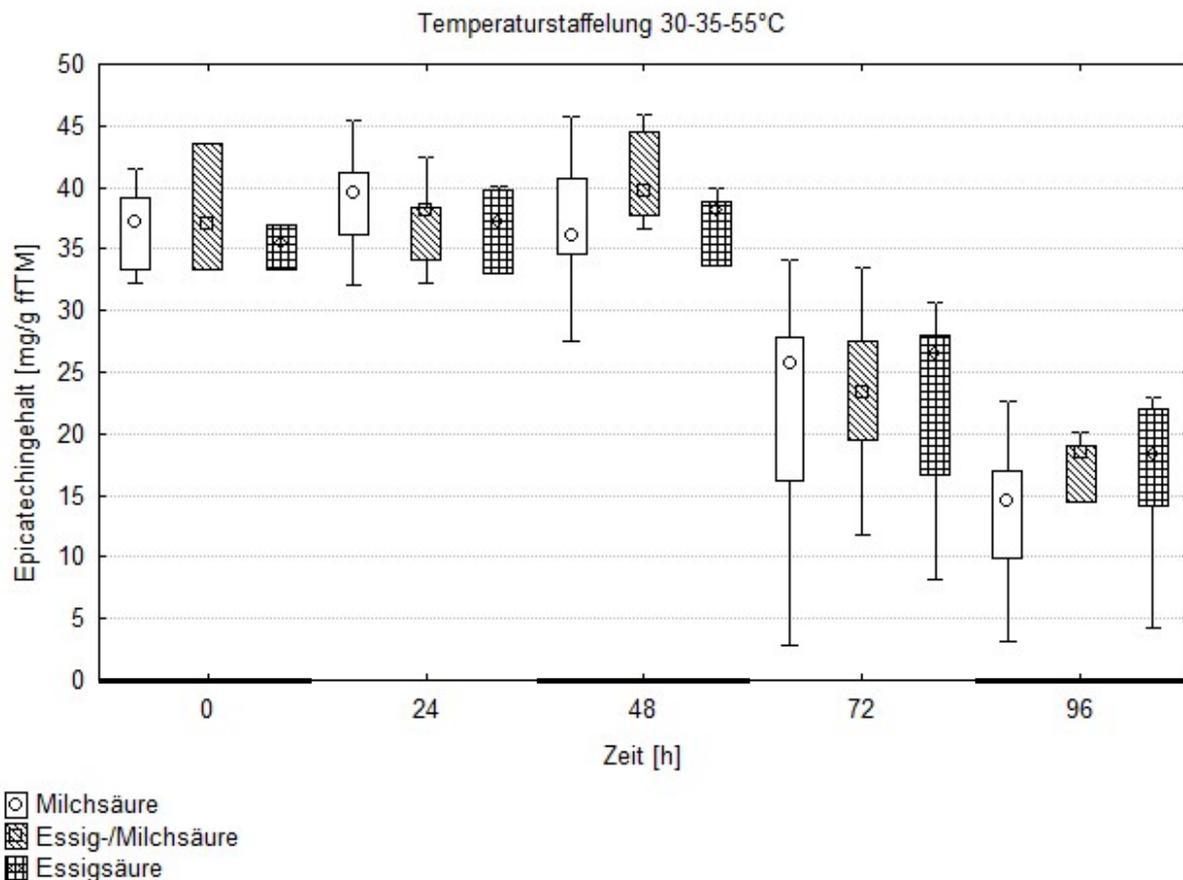
Es ist möglich, über die Inkubationsbedingungen auf die Polyphenole Einfluss zu nehmen.

#### 5.1.2.1 Epicatechin

Der (-)-Epicatechinanteil an dem Gesamtgehalt an Polyphenolen beträgt ca. 35% (Kim und Keeney, 1984). Epicatechin liegt nicht ausschließlich als Monomer vor, es bildet auch Oligomere. Das Monomer kann im Darm vom menschlichen Körper resorbiert werden (Schröder, 2002), für die Oligomere ist dies noch nicht abgesichert. Für das Dimer konnten Holt et al. (2002) zeigen, dass dieses *in vivo* resorbiert werden kann. Die Auswirkungen der Inkubationsbedingungen auf die Epicatechingehalte wurden untersucht. Zusätzlich zu den im Folgenden aufgeführten Inkubationstemperaturen wurden auch Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 60°C durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Inkubationen sind tabellarisch im Anhang (s. Tab.12-3) aufgeführt.

### 5.1.2.1.1 Temperaturverlauf mit der Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C

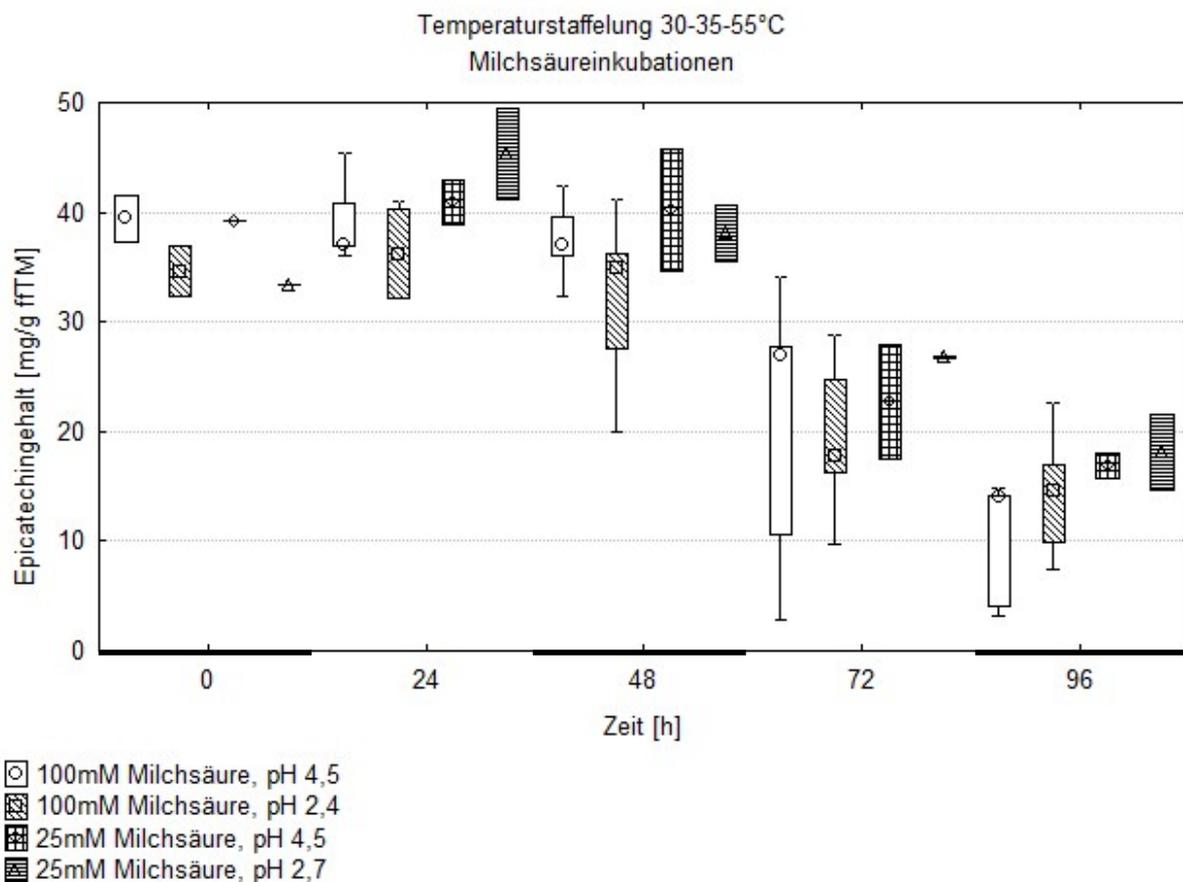
Der Epicatechingehalt von ca. 4% der fettfreien Trockenmasse bleibt bei den niedrigen Inkubationstemperaturen von 30°C und 35°C unverändert, unabhängig von den Säuren im Inkubationsmedium (s. Abbildung 5-67, Abbildung 5-68, Abbildung 5-69 und Abbildung 5-70). Die Temperaturerhöhung auf 55°C bewirkt eine Gehaltsabnahme von bis zu 50%. Man kann daraus folgen, dass erhebliche Anteile des Epicatechins aus den Idioblasten ins Gewebe ausgetreten sind und entweder dort gebunden wurden oder aus dem Gewebe in das Inkubationsmedium ausgetreten sind. Da das Medium im Zuge der Inkubation eine braunrötliche Färbung angenommen hat, sind vermutlich zahlreiche sekundäre Reaktionen mit dem freigesetzten phenolischen Substanzen abgelaufen.



**Abbildung 5-67: Entwicklung des Epicatechingehaltes im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der für das Inkubationsmedium gewählten Säure bzw. von dem Säuregemisch.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 12,5mmol/l bis 100mmol/l. n=7-14 (zusammengefasste Daten)

Werden die einzelnen Varianten der Inkubationen mit Milchsäure separat dargestellt, wird deutlich, dass sie sich in Bezug auf die Epicatechingehalte nicht unterscheiden (s. Abbildung 5-68). Den höchsten Epicatechingehalt (45,3mg/g fTTM) weisen die Samen der Inkubation mit 25mM Milchsäure und pH 2,7 nach 24 Stunden auf, den niedrigsten (14,1mg/g fTTM) die Inkubation mit 100mM Milchsäure und pH 4,5 nach 96 Stunden. Die Konzentration und der verwendete pH-Wert des Inkubationsmediums üben keinen Einfluss auf den Epicatechingehalt aus.



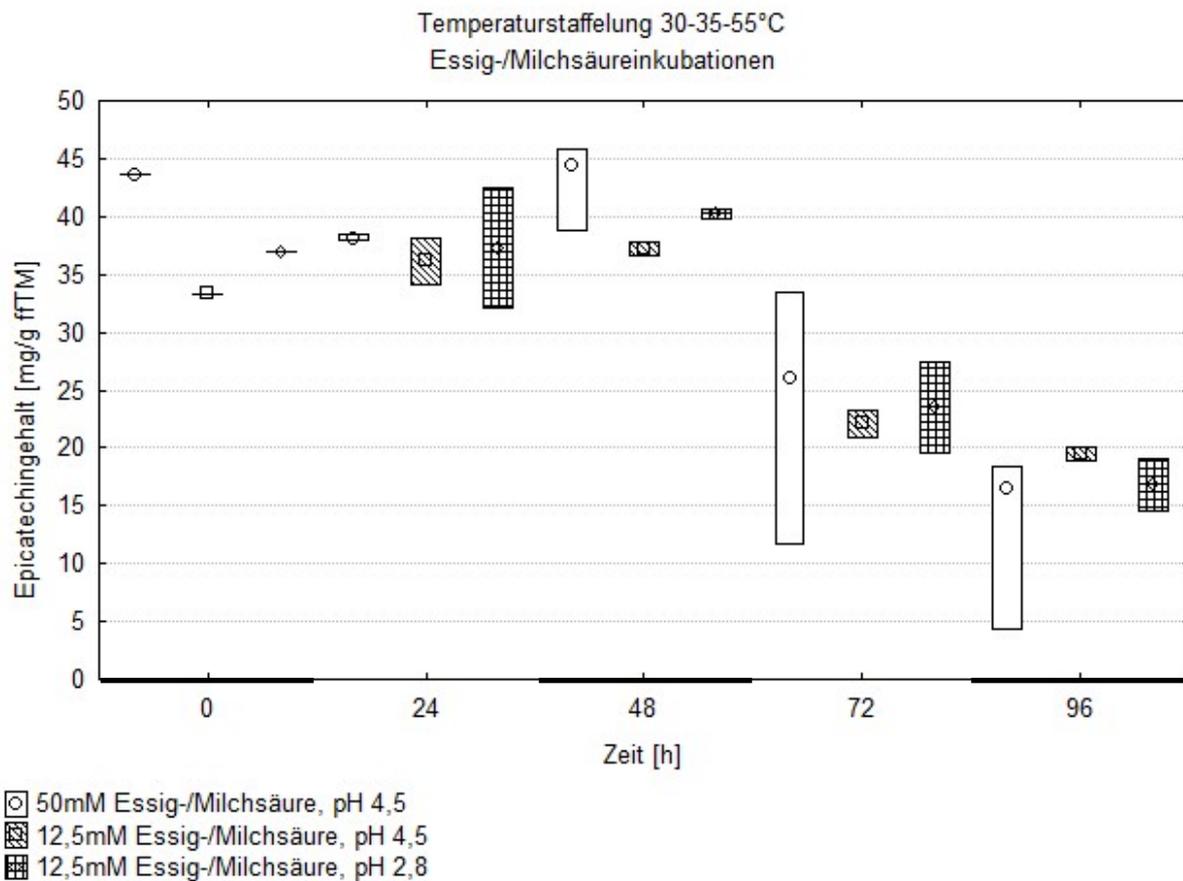
**Abbildung 5-68: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Milchsäure bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=2-5

Ebenso wie bei den einzelnen Varianten der Inkubationen mit Milchsäure unterscheiden sich auch die verschiedenen Inkubationen mit Essig-/Milchsäure in Bezug auf die Säurekonzentration und den pH-Wert nicht eindeutig im Epicatechingehalt (s. Abbildung 5-69). Den höchsten Epicatechingehalt (44,5mg/g fTTM) ebenso wie den niedrigsten

(16,5mg/g ffTM) haben die Samen der Inkubation mit 50mM Essig-/Milchsäure und pH 4,5 nach 48 Stunden bzw. 96 Stunden.

Auffällig ist die rasche Abnahme von Epicatechin bei der Sameninkubation mit 100mM Essigsäure und pH 2,9 bei 35°C (s. Abbildung 5-70), wobei hier berücksichtigt werden muss, dass es sich um eine Einzelbestimmung handelt.



**Abbildung 5-69: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit einem Essig-/Milchsäuregemisch bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

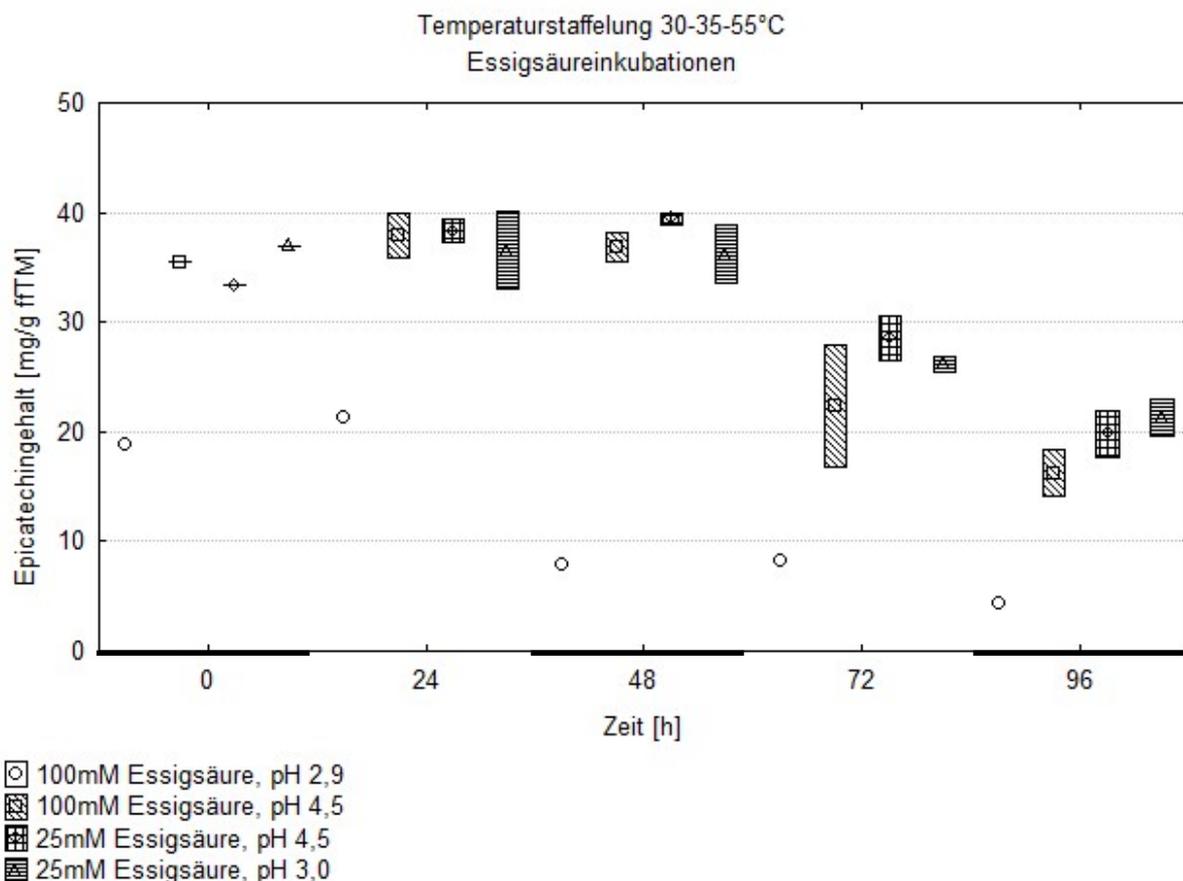
Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=2-3

Nach 24 Stunden, wahrscheinlich bedingt durch den schon geringen Startgehalt an Epicatechin, weisen die Samen nur 2% Epicatechin, also ca. die Hälfte des Epicatechingehaltes der anderen Behandlungen auf. Die unterschiedliche Freisetzung durch Inkubation in Milchsäuremedien im Vergleich zu Essigsäuremedien wird zusätzlich in der Abbildung 5-74 und der Abbildung 5-75 bestätigt.

Essigsäure bewirkt vor allem eine schnellere Freisetzung von Epicatechin und anderen phenolischen Substanzen aus den Idioblasten und wirkt bereits in Zusammenhang mit

Inkubationstemperaturen ab 35°C. Erstaunlich ist in diesem Zusammenhang der Befund, dass bereits durch 100mM Essigsäure (pH 2,9) bei 30°C innerhalb der ersten 24 Stunden der Inkubation eine starke Epicatechinminderung vorliegt. Dieser Befund ist nicht durch ähnlich schnelle Abläufe bei anderen Inkubationen erhärtet worden, ganz im Gegenteil, der Verlauf der Epicatechinabnahme bei 41°C Inkubationstemperatur liegt im Erfahrungsbereich aller anderen Experimente (s. Abbildung 5-77) und widerspricht dem Befund in Abbildung 5-70.

Bei den Inkubationen mit Milchsäure und Essig-/Milchsäure verursachen verschiedene Säurekonzentrationen und pH-Werte keine Abnahme des Epicatechingehaltes. Bei den verschiedenen Inkubationen mit Essigsäure unterscheidet sich nur die Inkubation mit 100mM Essigsäure und einem pH-Wert von 2,9 von den restlichen Inkubationen durch einen deutlich geringeren Epicatechingehalt.

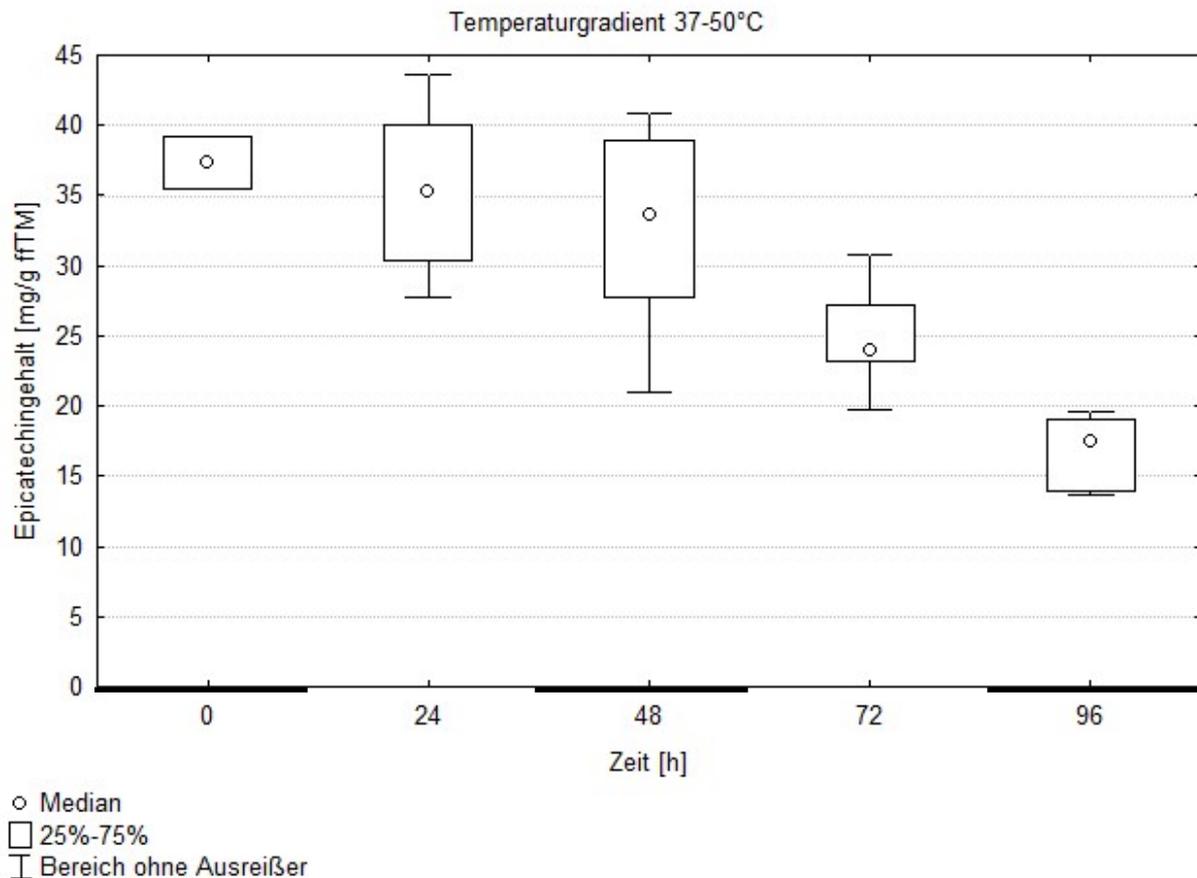


**Abbildung 5-70: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Essigsäure bei einem Temperaturgradienten mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=1-2

### 5.1.2.1.2 Temperaturgradient mit der Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C

Bei dem Temperaturgradienten 37-50°C verringert sich der Epicatechingehalt kontinuierlich im Verlauf der Inkubation. Im Gegensatz zum Gradienten 30-35-55°C startet die Abnahme gleich zu Beginn der Inkubation und nicht erst nach 48 Stunden wie beim 30-35-55°C Gradienten (s. Abbildung 5-71).

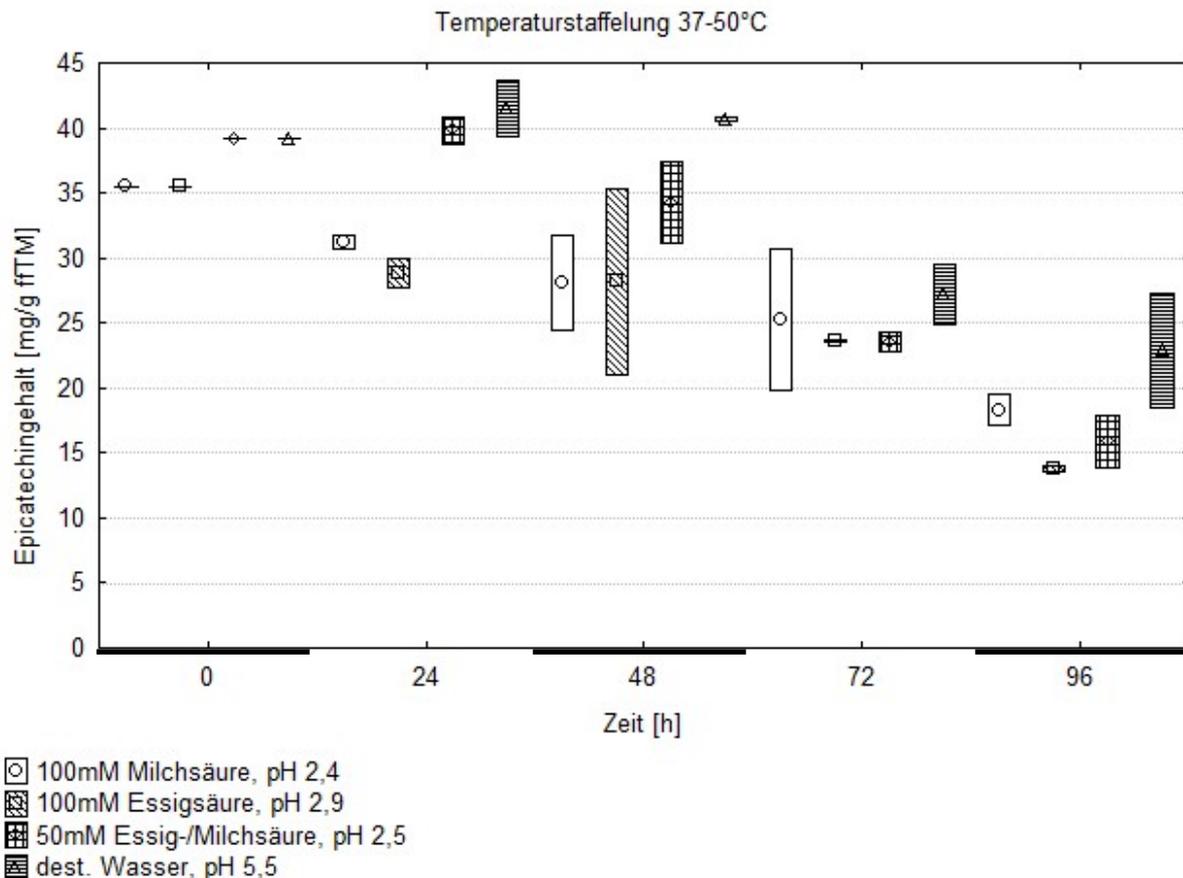


**Abbildung 5-71: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturgradienten mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Die Ergebnisse aller Inkubationen bei diesem Temperaturgradient wurden zusammengefasst. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. n=8

Beim Temperaturgradienten 37-50°C weicht das Resultat der Inkubationen mit Essigsäure und mit Milchsäure nach 24 Stunden deutlich von der Inkubation mit dem Gemisch aus Essig- und Milchsäure und der Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser ab. Letztere liegen in ihren Epicatechingehalten oberhalb der anderen beiden Varianten (s. Abbildung 5-72). Nach 48 Stunden ist der Epicatechingehalt der Inkubation mit Essig-/Milchsäure gesunken und liegt nun im Bereich der Epicatechingehalte der Inkubationen mit den Einzelsäuren, Milch- und

Essigsäure. Nur die Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser unterscheidet sich noch deutlich von der Inkubation mit Milchsäure und der Inkubation mit Essigsäure. 24 Stunden später, bei einer Temperatur von 50°C unterscheiden sich die getesteten Varianten nicht mehr voneinander. Zum Ende der Inkubation nach 96 Stunden liegen die Epicatechingehalte der Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser und der Inkubation mit Essigsäure deutlich auseinander.



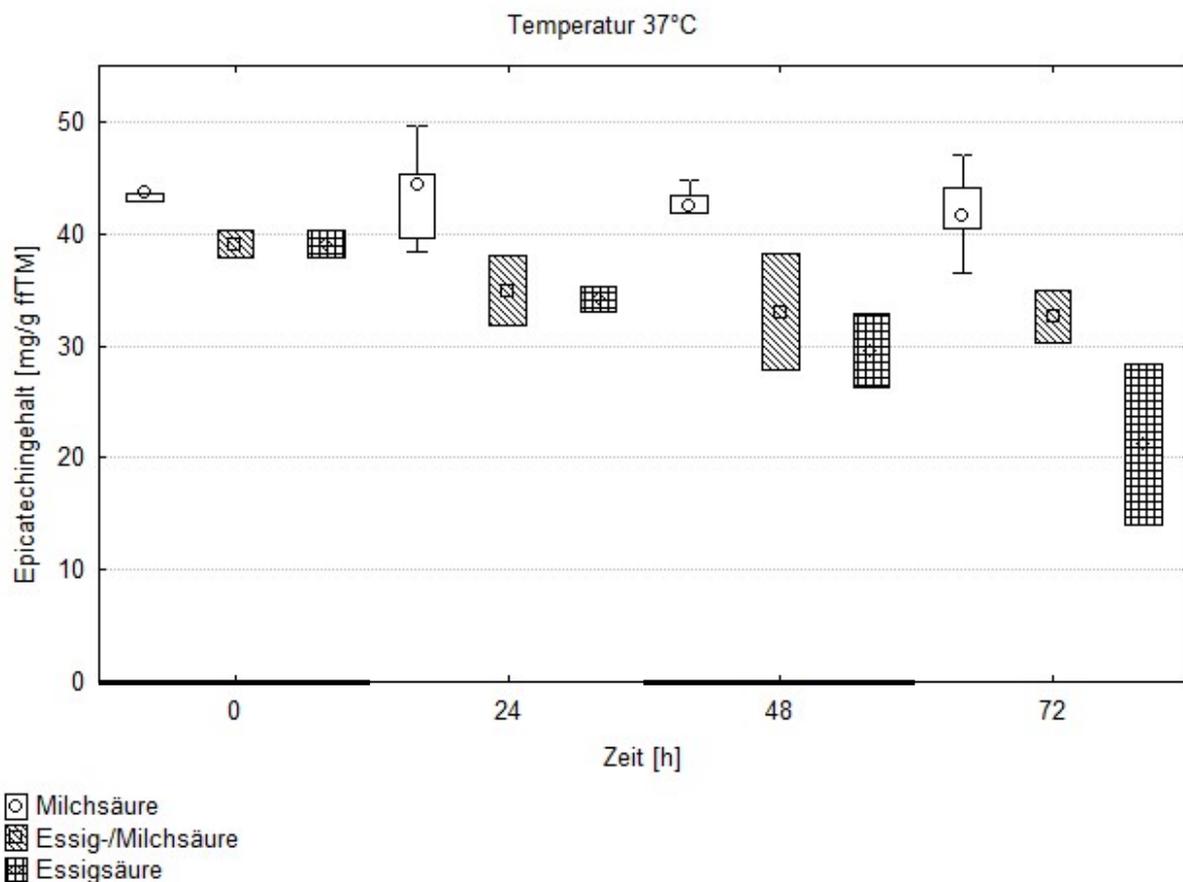
**Abbildung 5-72: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C in Abhängigkeit von dem verwendeten Inkubationsmedium.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=2

Die Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser weist fast durchgehend höhere Gehalte an Epicatechin auf als die verschiedenen Säurevarianten. Die einzelnen Säurevarianten unterscheiden sich nur teilweise zu Anfang der Inkubation. Auf den Epicatechingehalt wirkt sich das Vorhandensein einer Säure aus, nicht die Art der Säure. Die Auswirkung einer Temperatur von 50°C auf den Epicatechingehalt ist auf jeden Fall, unabhängig vom Medium, deutlich.

### 5.1.2.1.3 Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 37°C

Bei den einzelnen Säurevarianten der 37°C Inkubationen sind bereits nach 24 Stunden Unterschiede in den Epicatechingehalten zu beobachten. Die Gehalte der Inkubationen mit Milchsäure liegen deutlich über denen der Inkubationen, die Essigsäure enthalten (s. Abbildung 5-73). Letztere unterscheiden sich erst nach 72 Stunden, dann liegt der Gehalt der Inkubation mit Essigsäure deutlich unterhalb der Inkubation mit Essig-/Milchsäure.

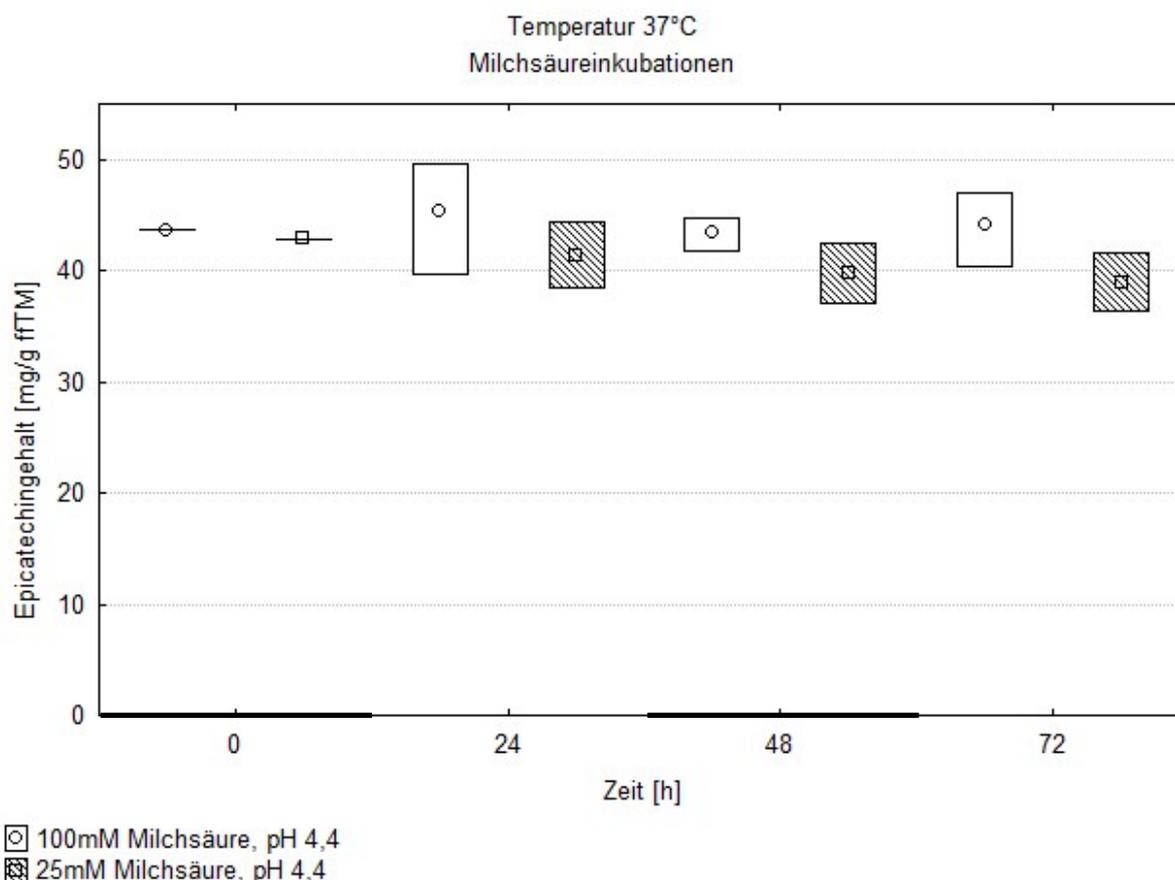


**Abbildung 5-73: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit von der für das Inkubationsmedium gewählten Säure bzw. von dem Säuregemisch.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 25mmol/l bis 100mmol/l. n=2-5

Die beiden Inkubationsvarianten mit Milchsäure unterscheiden sich trotz der unterschiedlichen Milchsäurekonzentration nicht in ihren Epicatechingehalten (s. Abbildung 5-74). Eine Verringerung der Milchsäurekonzentration von 100mM auf 25mM bei gleichem pH-Wert führt zur keiner Änderung in den Epicatechingehalten während der Inkubation. Den

höchsten Epicatechingehalt (45,3mg/g ffTM) weist die Inkubation mit einer Milchsäurekonzentration von 100mM nach 24 Stunden auf, den niedrigsten innerhalb der Inkubationen mit Milchsäure mit 39,0mg/g ffTM nach 72 Stunden die Inkubation mit 25mM Milchsäure.



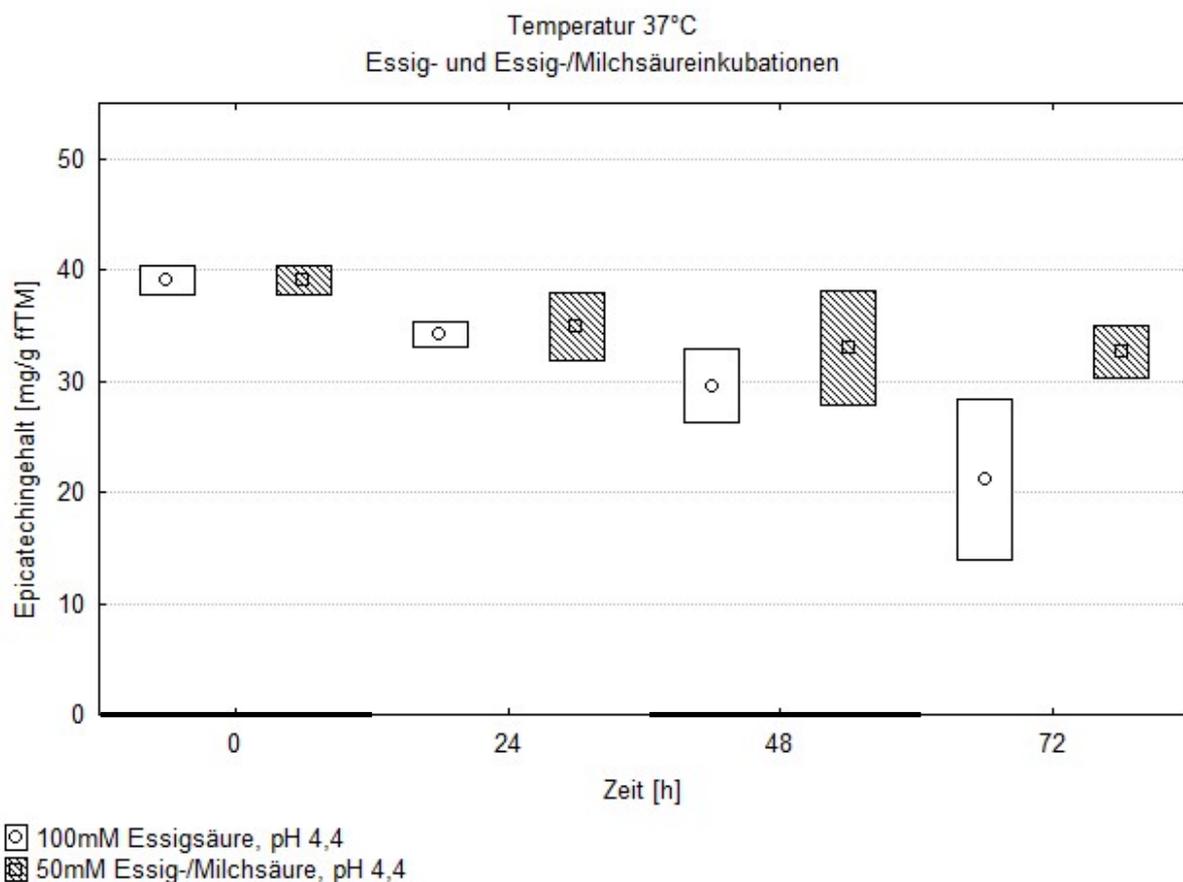
**Abbildung 5-74: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=2-3

Der Verlauf und die Epicatechingehalte der Inkubationen mit Essigsäure und der mit Essig-/Milchsäure sind sich sehr ähnlich (s. Abbildung 5-75). Erst nach 72 Stunden ist ein Unterschied zwischen den beiden Varianten zu beobachten, der Epicatechingehalt der Inkubation mit Essigsäure liegt nun deutlich unter der Variante mit Essig-/Milchsäure. Bei den Inkubationen, die Essigsäure enthalten, liegt der höchste Gehalt bei 39,1mg/g ffTM zum Start der Inkubation und der niedrigste mit 21,2mg/g ffTM nach 72 Stunden mit 50mM Essig-/Milchsäure. Im Vergleich zu den Inkubationen mit Milchsäure unterscheiden sich die

Inkubationen, die Essigsäure enthalten, während der gesamten Zeit eindeutig von der Inkubation mit 100mM Milchsäure (s. Abbildung 5-74 und Abbildung 5-75).

Bei einer konstanten Temperatur von 37°C während der Inkubation tritt bei Behandlung mit reiner Milchsäure im Inkubationsmedium keine Änderung im Epicatechingehalt auf. Bei diesen Inkubationen verbleiben höhere Gehalte an Epicatechin im Samen als bei den Inkubationen mit einer Mischung aus Essig- und Milchsäure. Inkubationen mit Essigsäure weisen die kleinsten Gehalte an Epicatechin auf. Milchsäure scheint die Abnahme des Epicatechins zu verlangsamen.



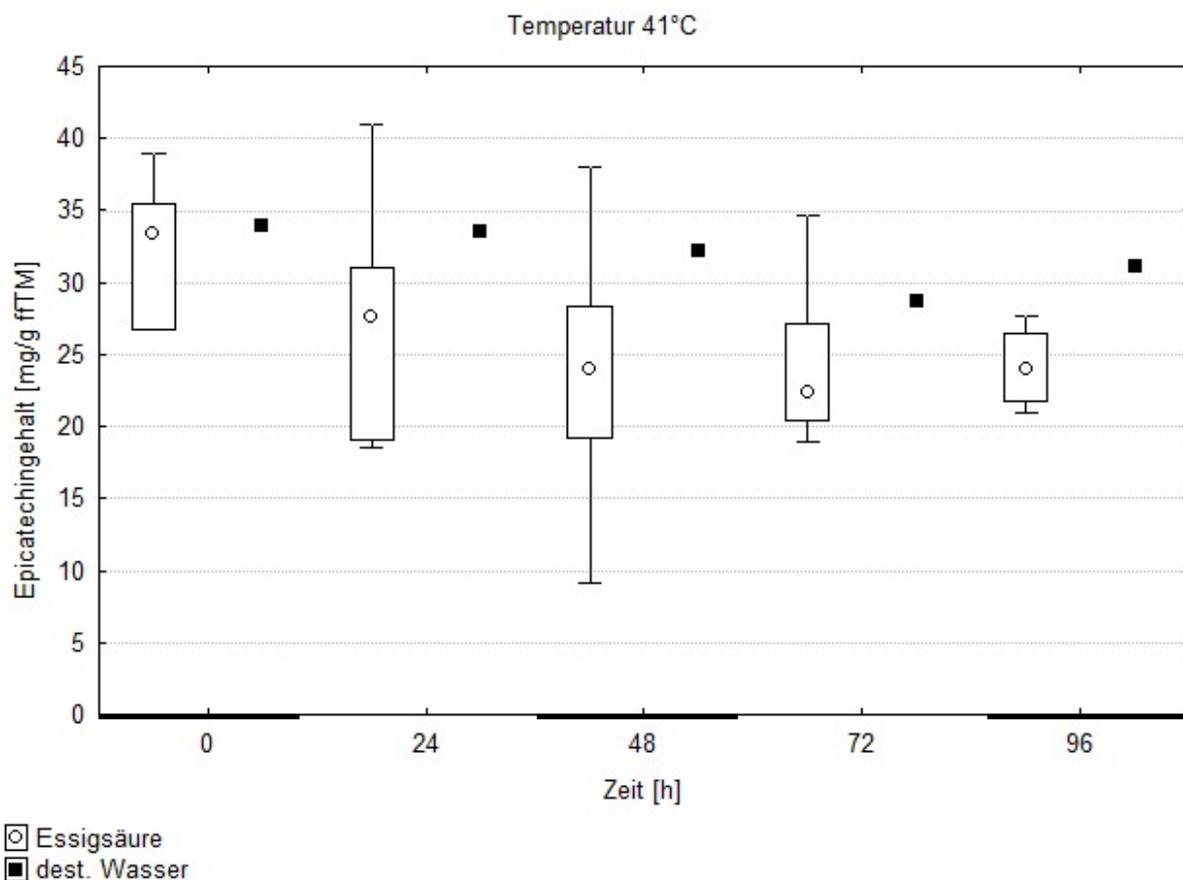
**Abbildung 5-75: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Essigsäure und Essig-/Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit vorder gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=2

#### 5.1.2.1.4 Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 41°C

Wird für die Inkubationen eine konstante Temperatur von 41°C eingesetzt, erfolgt im Verlauf der Inkubation eine leichte Abnahme des Epicatechingehaltes bei der Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser und der Inkubationen mit Essigsäure. Die Epicatechingehalte der Kontrollinkubation unterschieden sich nicht von denen der Inkubationen mit Essigsäure (s. Abbildung 5-76).

Da die Inkubation mit Essigsäure mit verschiedenen Konzentrationen an Essigsäure und pH-Werten durchgeführt wurden, werden diese Varianten nochmals einzeln aufgeführt.

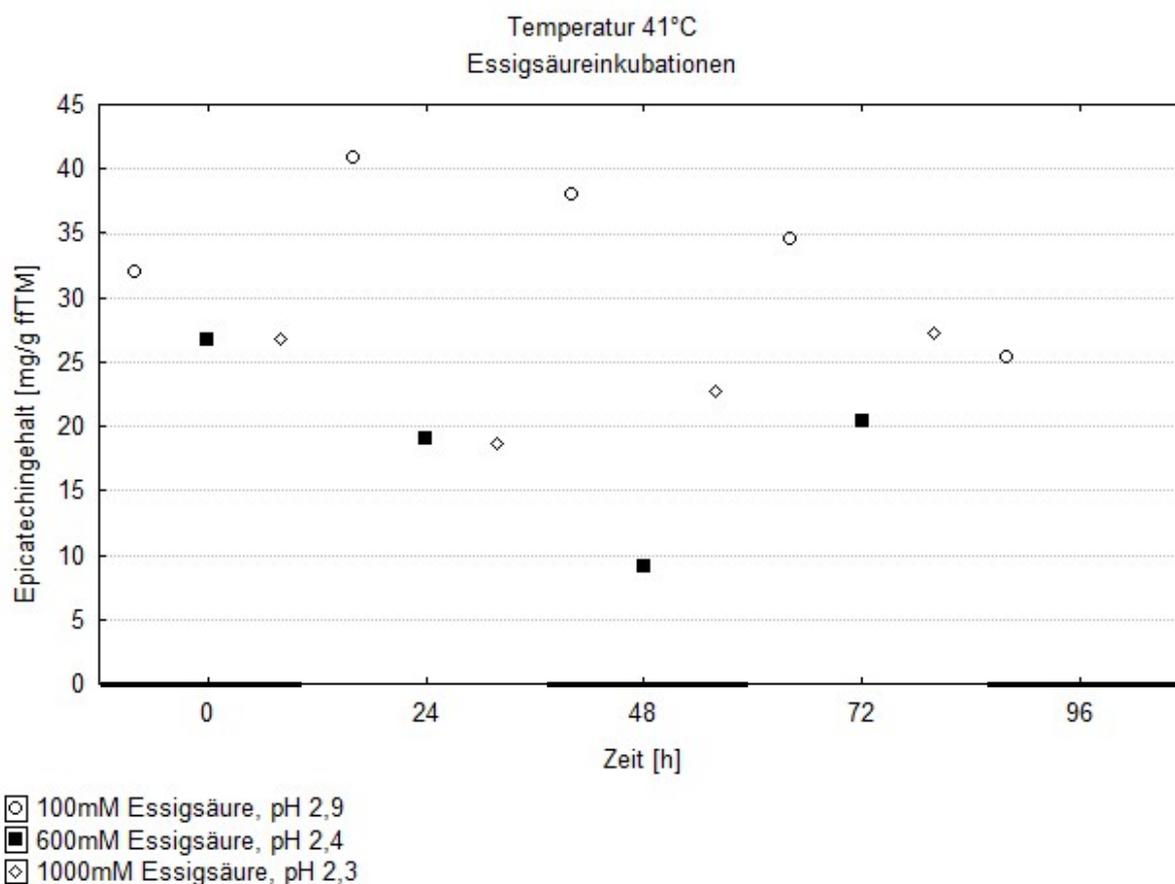


**Abbildung 5-76: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 41°C in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium mit Essigsäure oder destilliertem Wasser.**

Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Die Dauer der einzelnen Inkubationen lag bei 72 und 96 Stunden. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 100mmol/l bis 1000mmol/l. n=1-5

Die Inkubationen mit einer Essigsäurekonzentration von 600mM bzw. 1000mM haben einen anderen Verlauf der Epicatechingehalte als die Inkubation mit 100mM Essigsäure. Die

Epicatechingehalte der Inkubation mit 100mM Essigsäure liegen durchgehend über denen der 600mM bzw. 1000mM Variante (s. Abbildung 5-77). Ein deutlicher Unterschied in den Gehalten liegt nur während der ersten 72 Stunden zwischen der Inkubation mit 100mM und der mit 600mM Essigsäure vor, zu der Variante mit 1000mM Essigsäure ist der Unterschied während der ersten 48 Stunden eindeutig. Den höchsten Epicatechingehalt (40,9mg/g ffTM) weist die Inkubation mit einer Konzentration von 100mM Essigsäure nach 24 Stunden auf, den niedrigsten mit 9,2mg/g ffTM nach 48 Stunden die Inkubation mit 600mM Essigsäure.



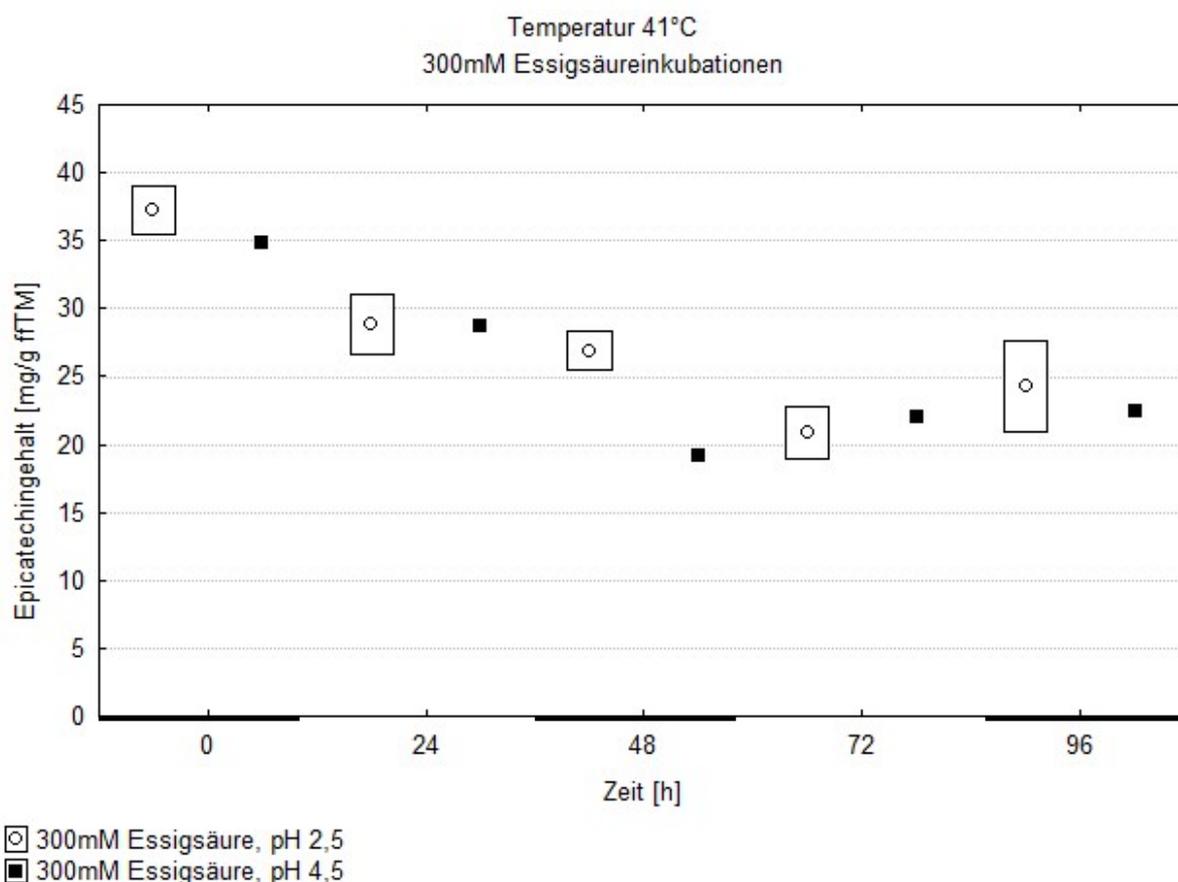
**Abbildung 5-77: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 41°C in Abhängigkeit von dem gewählten Inkubationsmedium.**

Angegeben sind Einzelwerte. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=1

Die beiden Inkubationen mit einer Essigsäurekonzentration von 300mM unterscheiden sich trotz der verschiedenen pH-Werte nicht in ihren Epicatechingehalten (s. Abbildung 5-78).

Die beiden Varianten mit 300mM Essigsäure unterscheiden sich in den ersten 72 Stunden deutlich von der Inkubation mit 100mM Essigsäure, allerdings haben sich die Epicatechingehalte aller drei Varianten nach 96 Stunden aneinander angenähert.

Die verschiedenen Essigsäurekonzentrationen wirken sich deutlich auf den Epicatechingehalte während der Inkubation aus. Eine niedrige Essigsäurekonzentration (100mM) stabilisiert den Epicatechingehalt, während hohe Konzentrationen wie 600mM und 1000mM den Gehalt an Epicatechin mindern. Der pH-Wert beeinflusst die Entwicklung des Epicatechingehaltes während der Inkubation nicht.



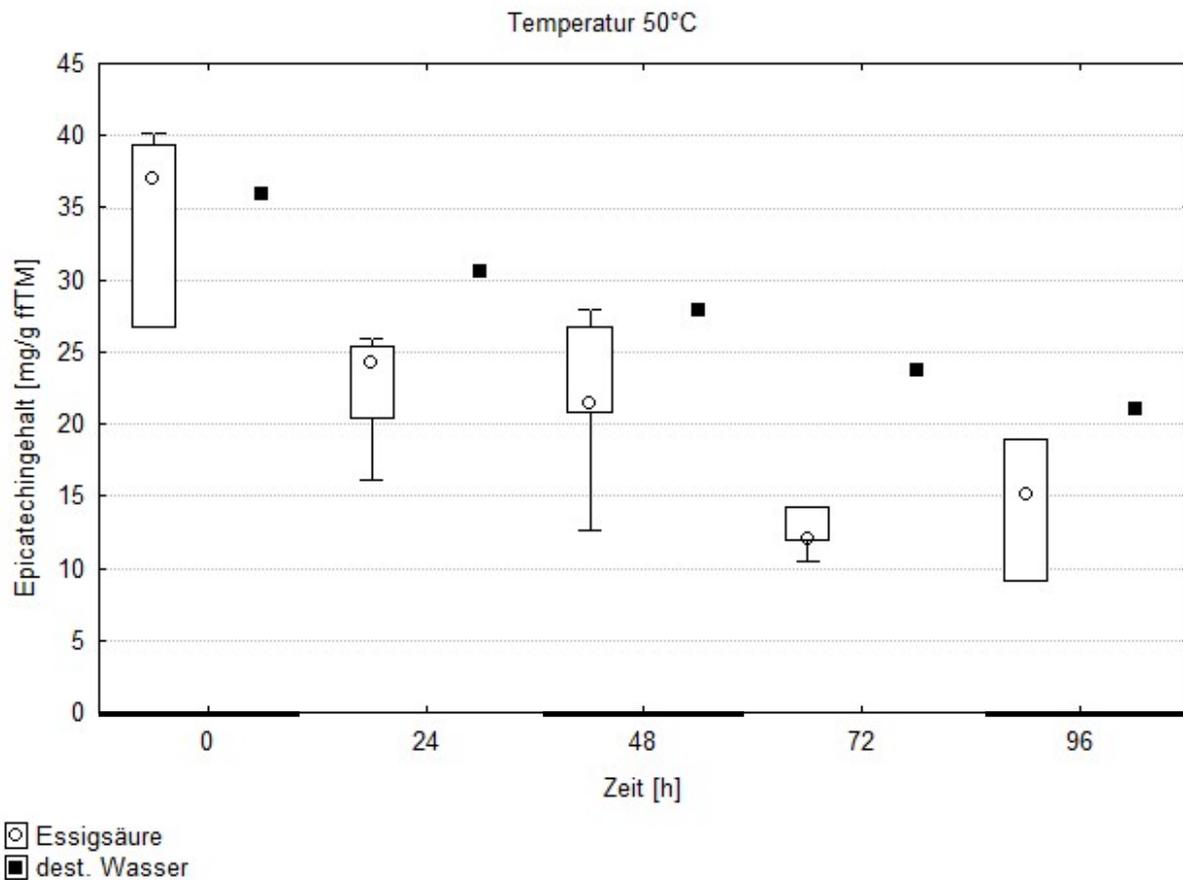
**Abbildung 5-78: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 41°C in Abhängigkeit von dem gewählten Inkubationsmedium.**

Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=1-2

### 5.1.2.1.5 Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 50°C

Bei der Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser und den Inkubationen mit Essigsäure nehmen die Epicatechingehalte während der Inkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 50°C kontinuierlich ab. Die Kontrollinkubation mit destilliertem

Wasser weist nach 24 Stunden bis zum Ende der Inkubation höhere Gehalte an Epicatechin auf als die Inkubation mit Essigsäure im Medium.



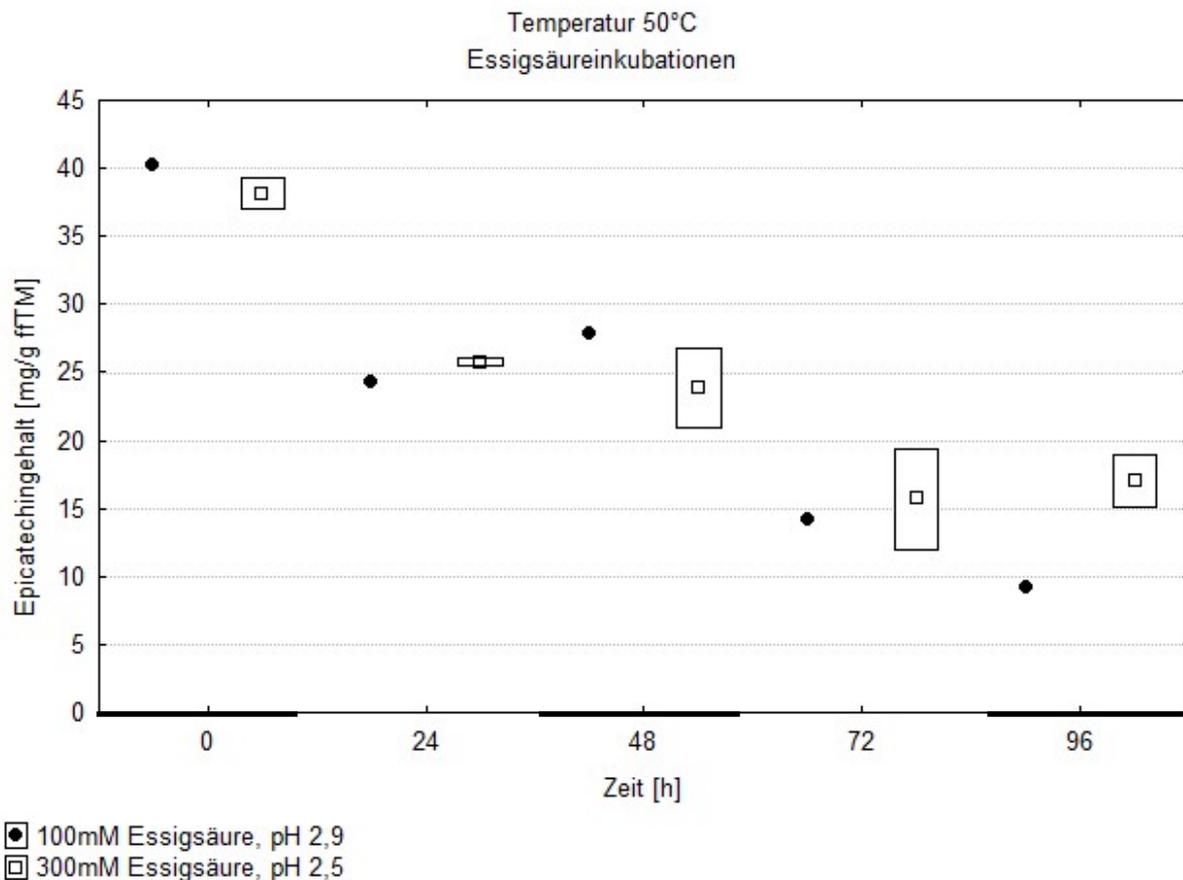
**Abbildung 5-79: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 50°C in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium mit Essigsäure oder destilliertem Wasser.**

Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit der dazugehörigen Perzentile (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 100mmol/l bis 1000mmol/l. n=1-5

Werden die verschiedenen Inkubationen mit Essigsäure einzeln dargestellt, sind keine Unterschiede in den Epicatechingehalten der Inkubationen mit Essigsäure - mit der Ausnahme nach 48 Stunden – zu beobachten (s. Abbildung 5-80 und Abbildung 5-81). Nach 48 Stunden unterscheiden sich die Epicatechingehalte der Inkubation mit 1000mM Essigsäure deutlich von den Inkubationen mit einer Konzentration von 100mM und 300mM Essigsäure.

Den höchsten Epicatechingehalt, ohne Berücksichtigung des Epicatechingehaltes zu Beginn der Inkubation, erreicht die Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser nach 24 Stunden mit

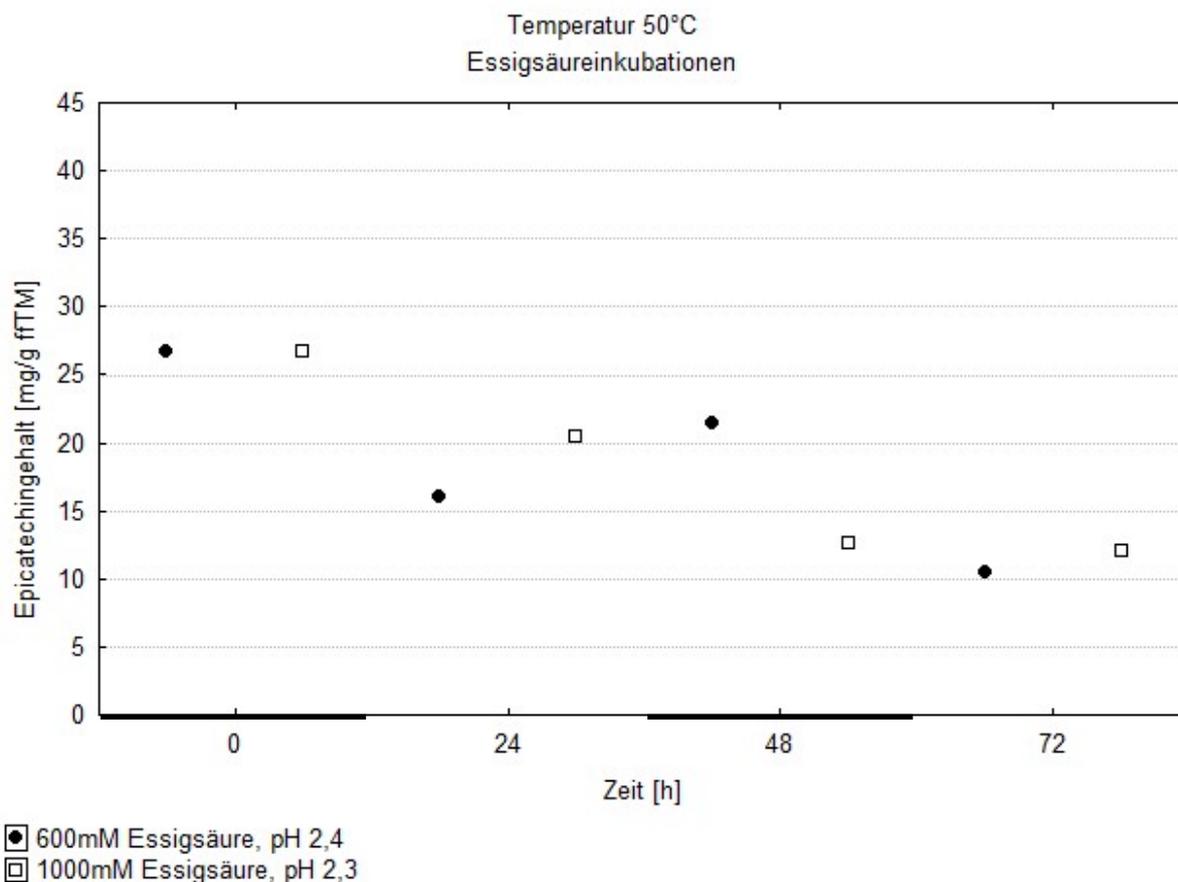
30,6mg/g ffTM (s. Abbildung 5-79). Der niedrigste Epicatechingehalt (9,1mg/g ffTM) wurde bei der Inkubation mit 100mM Essigsäure, pH 2,9 nach 96 Stunden gemessen.



**Abbildung 5-80: Entwicklung des Epicatechingehaltes im Verlauf der Essigsäureinkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 50°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=1-2

Die verschiedenen Inkubationen mit Essigsäure haben nur einen geringen Einfluss auf die Epicatechingehalte während der Inkubation. Da die Epicatechingehalte der Kontrollinkubation sich ähnlich wie die Inkubationen mit Essigsäure verhalten, scheint die Inkubation unabhängig von der Art der Säure abzulaufen. Die starke Abnahme des Epicatechingehaltes, die bei den Temperaturstaffelungen mit der Temperaturerhöhung auf 50°C bzw. 55°C einherging, erfolgt bei den Inkubationen mit einer konstanten Temperatur von 50°C schon zu Beginn der Inkubation. Hier wird deutlich, dass sich primär die Temperatur auf den Epicatechingehalt auswirkt.

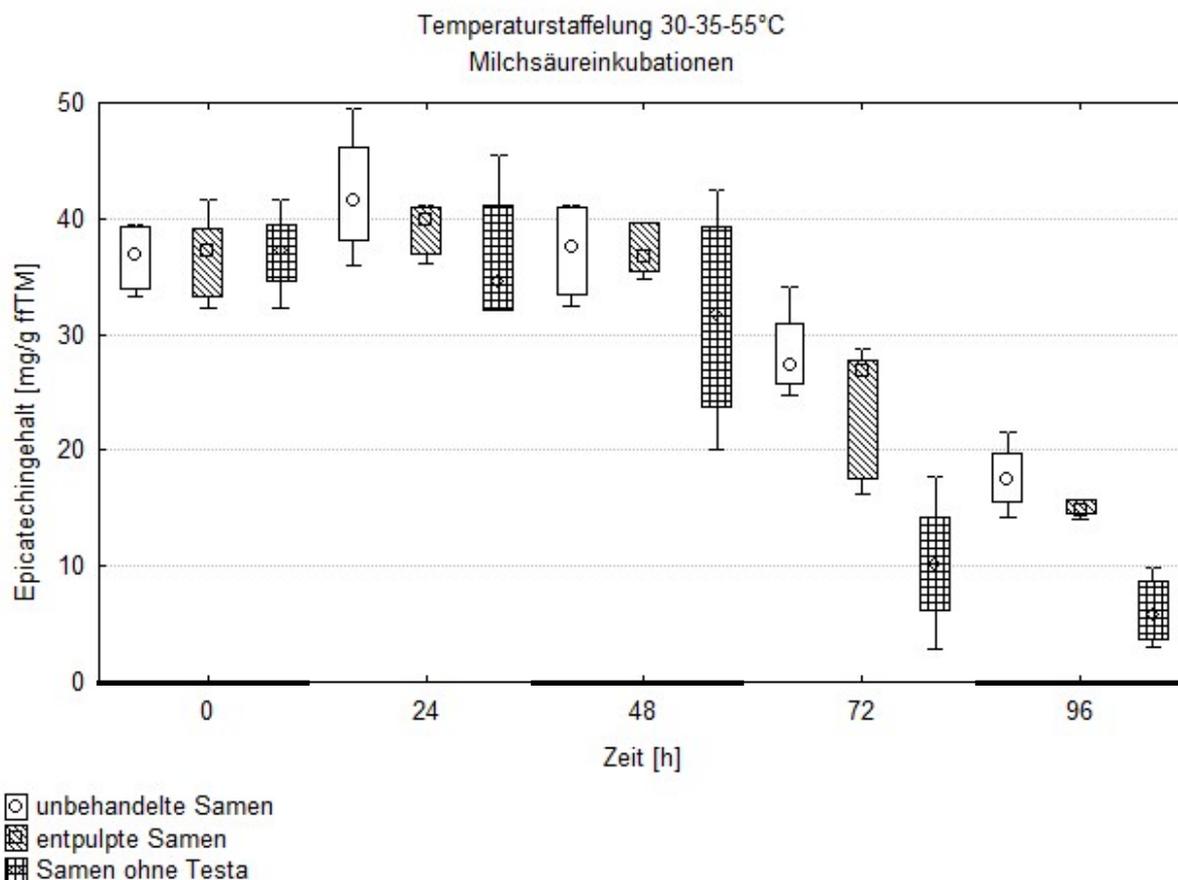


**Abbildung 5-81: Entwicklung des Epicatechingehaltes im Verlauf der Essigsäureinkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 50°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.**

Angegeben sind Einzelwerte. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Die unterschiedlichen Samenbehandlungen wurden für diese Darstellung unberücksichtigt gelassen. mM = mmol/l; n=1

#### **5.1.2.1.6 Einfluss der Samenbehandlung auf den Epicatechingehalt während der Inkubation**

Es ergeben sich während der Inkubation deutliche Unterschiede im Epicatechingehalt, wenn die Samen bei den Inkubationen mit Milchsäure mit der Temperaturstaffelung 30-35-55°C vor Inkubationsbeginn unterschiedlich behandelt werden. Bereits nach 48 Stunden unterscheiden sich die Samen ohne Testa von den entpulperten Samen, nach 72 Stunden zusätzlich von den unbehandelten (s. Abbildung 5-82). Dieser Unterschied im Epicatechingehalt bleibt bis zum Ende der Inkubation bestehen. Die Epicatechingehalte der Samen ohne Testa sind niedriger als die Gehalte der beiden anderen Varianten, die sich in ihren Gehalten nicht unterscheiden.

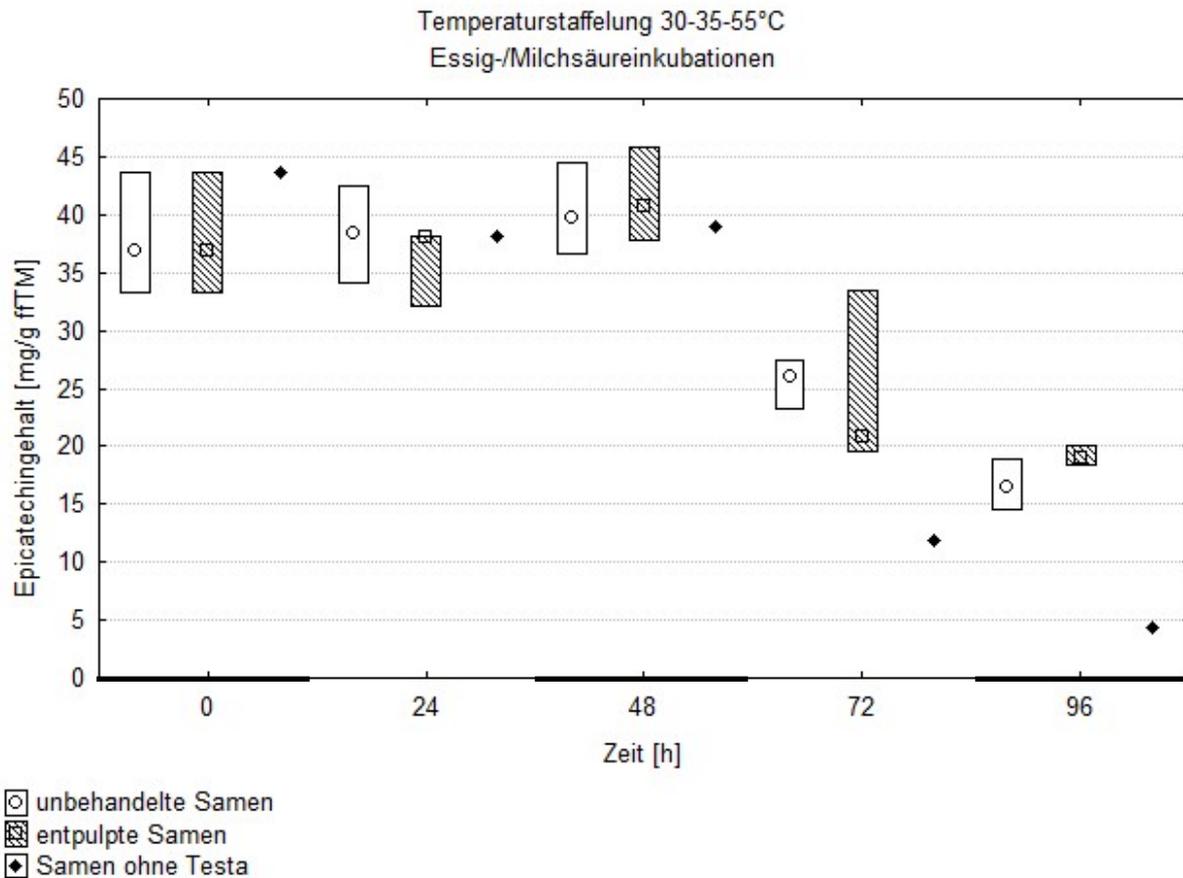


**Abbildung 5-82: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf den Epicatechingehalt während der Milchsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Eine Unterscheidung der Inkubationen nach der Konzentration und dem pH-Wert der Milchsäuremedien erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 25mmol/l bis 100mmol/l. n=4-6

Anders als bei den Inkubationen mit Milchsäure treten Unterschiede im Epicatechingehalt aufgrund der Samenbehandlung vor Inkubationsbeginn bei den Inkubationen mit Essig-/Milchsäure erst nach 72 Stunden auf (s. Abbildung 5-83). Der Gehalt an Epicatechin bei den Samen ohne Testa liegt ab diesem Zeitpunkt deutlich unterhalb der beiden anderen Varianten. Die Epicatechingehalte der unbehandelten und entpulppten Samen unterscheiden sich nicht voneinander.

Genauso wie bei den beiden anderen Säurevarianten unterscheiden sich auch bei den Inkubationen mit Essigsäure die unbehandelten Samen in ihrem Epicatechingehalt nicht von den entpulppten Samen (s. Abbildung 5-84).

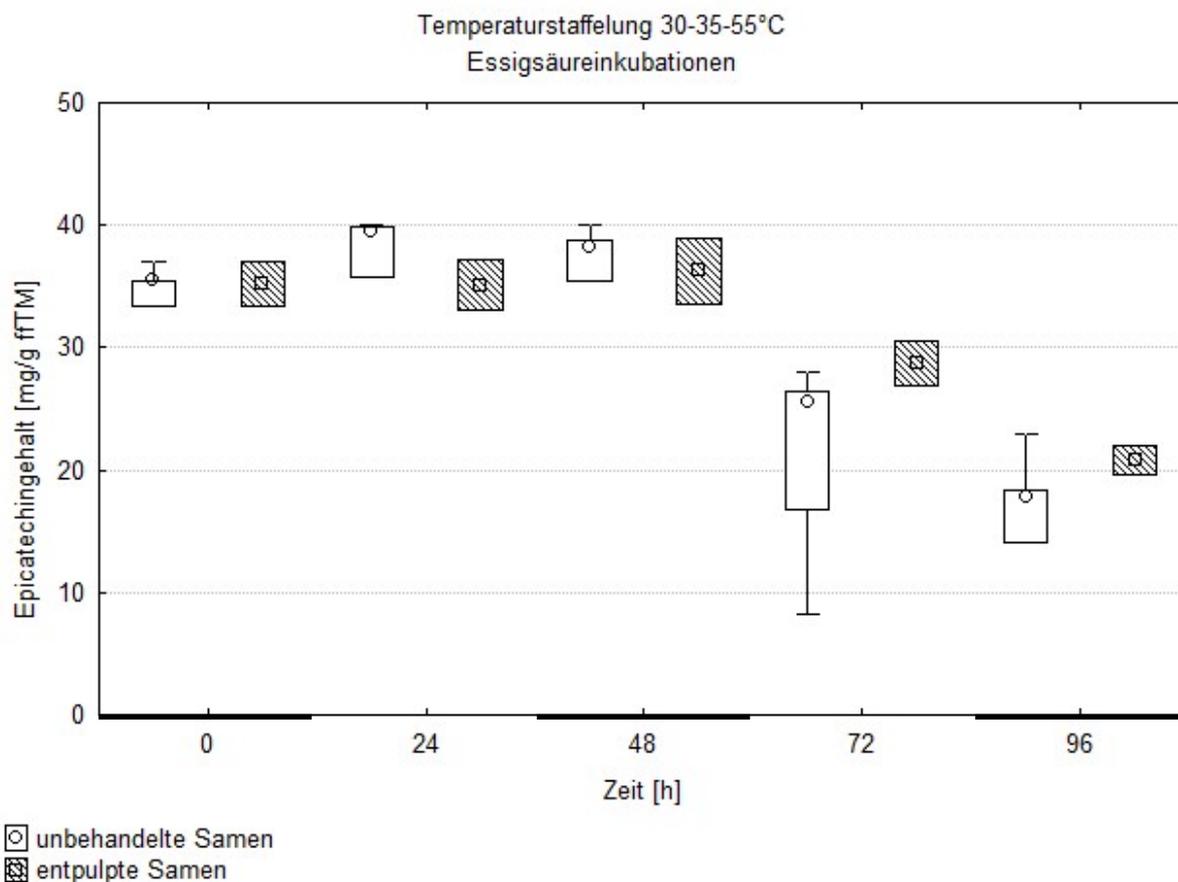


**Abbildung 5-83: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf den Epicatechingehalt während der Essigsäure/Milchsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C.**

Angegeben sind Einzelwerte und die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Eine Unterscheidung der Inkubationen nach der Konzentration und dem pH-Wert der Essig-/Milchsäuremedien erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 12,5mmol/l bis 50mmol/l. n=1-3

Ebenso wie bei der 30-35-55°C Staffelung zeigen entpulppte Samen beim Temperaturgradienten 37-50°C den gleichen Verlauf im Epicatechingehalt wie unbehandelte Samen. Zwischen den beiden Behandlungsarten gibt es keine eindeutigen Unterschiede (s. Abbildung 5-85).

In Bezug auf die Inkubationen mit Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C wirken sich die Vorbehandlungen der Samen auf den Epicatechingehalt aus (s. Abbildung 5-86). Nach 48 Stunden liegt der Epicatechingehalt der entpulpften Samen signifikant über den unbehandelten, nach 72 Stunden unterscheiden sich die beiden Varianten nicht. Zum Ende der Inkubation liegt der Epicatechingehalt der unbehandelten Samen über dem der entpulpften Samen. Aufgrund der Schwankungen lässt sich nicht auf eine Auswirkung der Vorbehandlungen auf den Epicatechingehalt schließen.

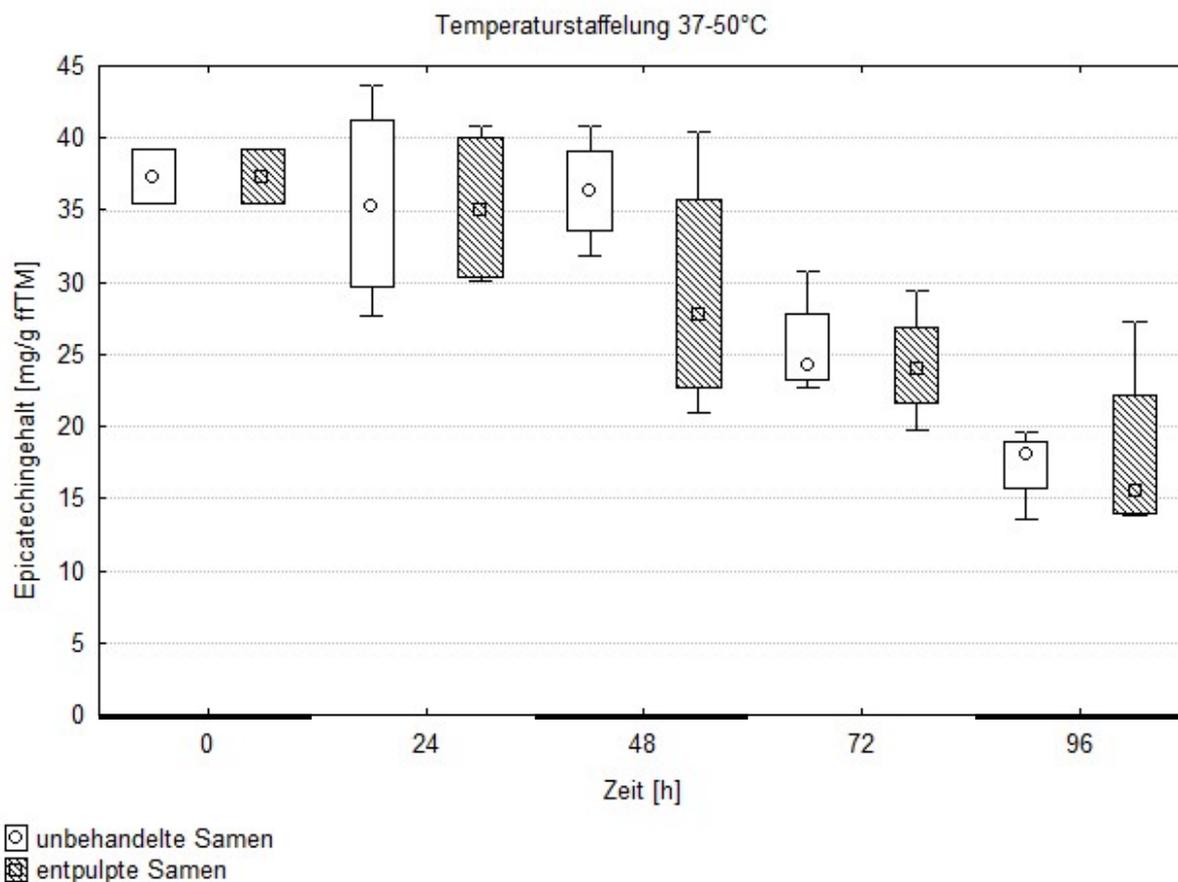


**Abbildung 5-84: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf den Epicatechingehalt während der Essigsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Eine Unterscheidung der Inkubationen nach der Konzentration und dem pH-Wert der Essigsäuremedien erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 25mmol/l bis 100mmol/l. n=2-5

Bei den Essigsäure enthaltenden Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 37°C haben die beiden Vorbehandlungsarten keinen Einfluss auf die Epicatechingehalte der Samen während der Inkubation (s. Abbildung 5-87). Die Samenvorbehandlung hat auf die Epicatechingehalte der verschiedenen Säureinkubation nur einen geringen oder keinen Einfluss.

Die verschiedenen Vorbehandlungen der Samen bei einer konstanten Temperatur von 60°C führen nicht zu unterschiedlichen Epicatechingehalten. Die Entwicklung des Epicatechingehaltes lässt sich von der gewählten Vorbehandlung nicht beeinflussen (s. Abbildung 5-88).

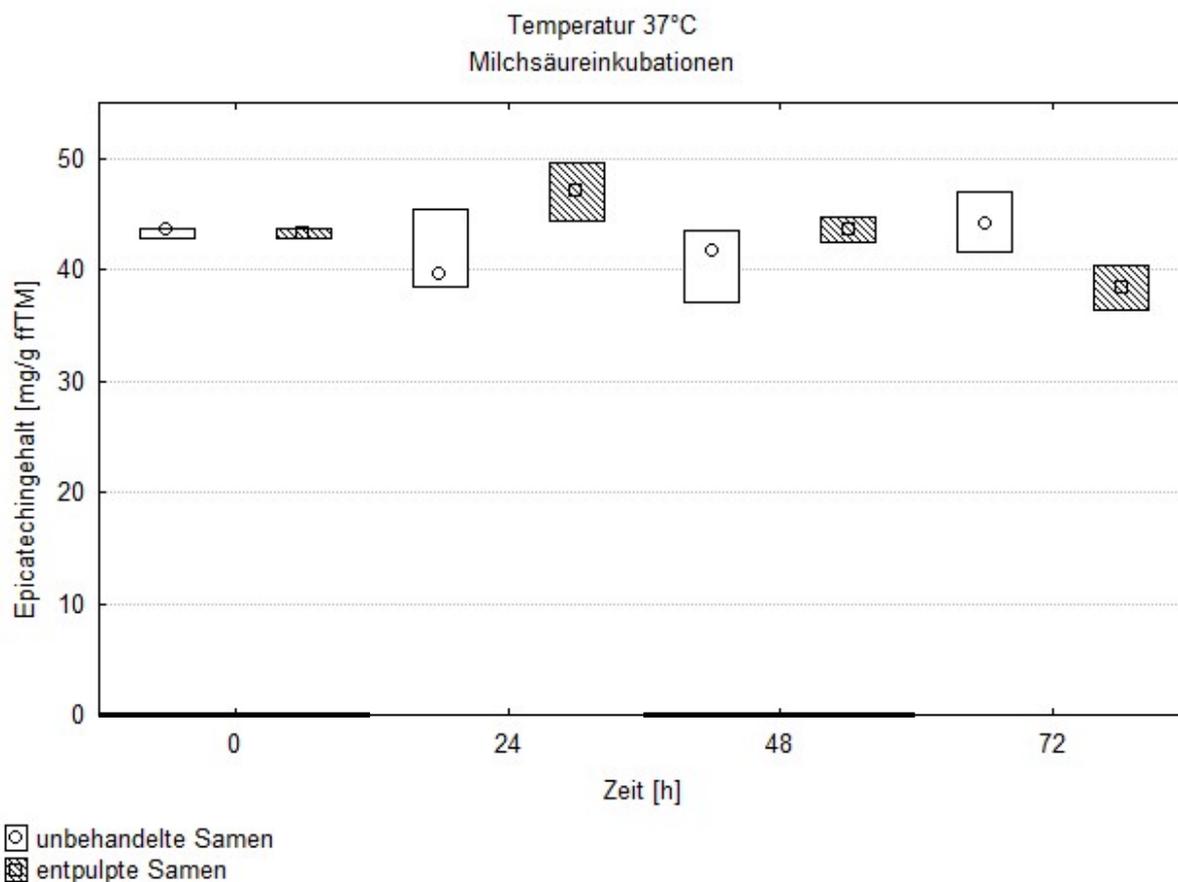


**Abbildung 5-85: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung des Epicatechingehaltes während der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C.**

Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Eine Unterscheidung der Inkubationen nach verwendeter Säure, deren Konzentration und pH-Wert erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 50mmol/l bis 100mmol/l. n=4

### 5.1.2.1.7 Zusammenfassung

Inkubationen mit reiner Milchsäure führen bei einer konstanten Temperatur von 37°C zu höheren Epicatechingehalten als mit reiner Essigsäure. Milchsäure verringert den Abbau des Epicatechins. Mögliche Ursache dafür könnte eine andere Diffusionsgeschwindigkeit der Milchsäure im Samengewebe im Gegensatz zur Essigsäure sein. Dadurch wäre auch eine unterschiedliche Ansäuerung des Gewebes bei den beiden Säuren gegeben und durch die unterschiedlichen entstehenden pH-Werte innerhalb des Gewebes eine veränderte Enzymaktivierung. Zusätzlich ist Milchsäure eine stärkere Säure als Essigsäure was auch eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Epicatechinverläufe sein könnte.



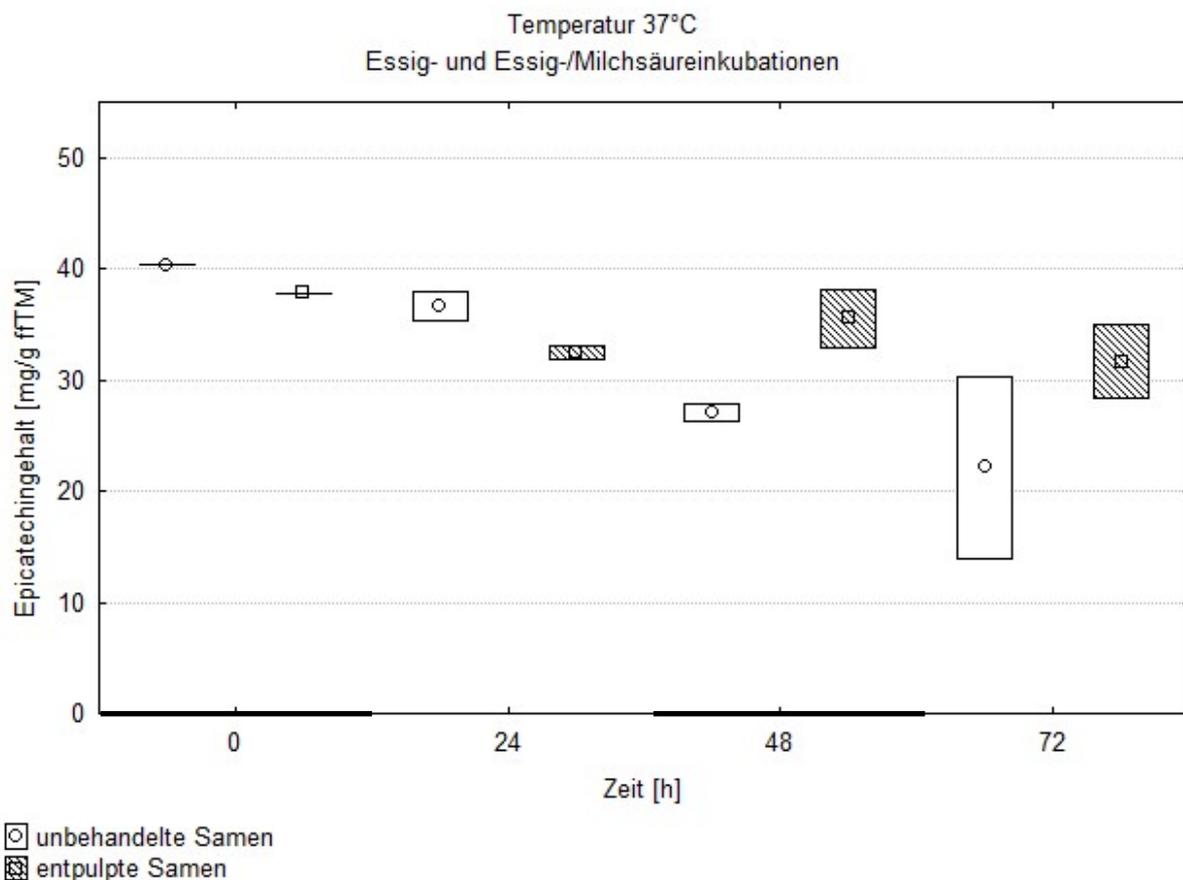
**Abbildung 5-86: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung des Epicatechingehaltes während der Inkubation mit Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C.** Angegeben sind die Mediane mit den dazugehörigen Perzentilen (25-75%). Eine Unterscheidung der Inkubationen nach der Konzentration und dem pH-Wert der Milchsäuremedien erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 25mmol/l bis 100mmol/l. n=2-3

Der Einsatz von destilliertem Wasser kann bei einigen Temperaturen (37-50°C, 41°C und 50°C) zu ähnlichen Gehalten an Epicatechin wie mit Inkubationen, die Säure enthalten, führen. Die Ansäuerung hat bei Temperaturen über 37°C in Bezug auf die Epicatechingehalte keinen starken Einfluss.

Der höchste Gehalt an Epicatechin bleibt bei einer konstanten Temperatur von 37°C nach 24 Stunden mit 45,3mg/g fTTM mit 100mM Milchsäure (pH 4,4) erhalten. Ähnliche Gehalte bleiben auch beim Temperaturgradienten 37-50°C erhalten. Bei verschiedenen Temperaturen wirken sich Essig- und Milchsäure unterschiedlich auf den Epicatechingehalt aus. Bei 37°C und dem Temperaturgradienten 37-50°C weisen die Inkubationen mit Milchsäure höhere Epicatechingehalte auf als die Inkubationen mit Essigsäure. Beim Temperaturverlauf 30-35-55°C sind bei den Inkubationen mit Essigsäure und denen mit Milchsäure keine Unterschiede im Epicatechingehalt zu beobachten. Der positive Effekt der Milchsäure scheint primär bei

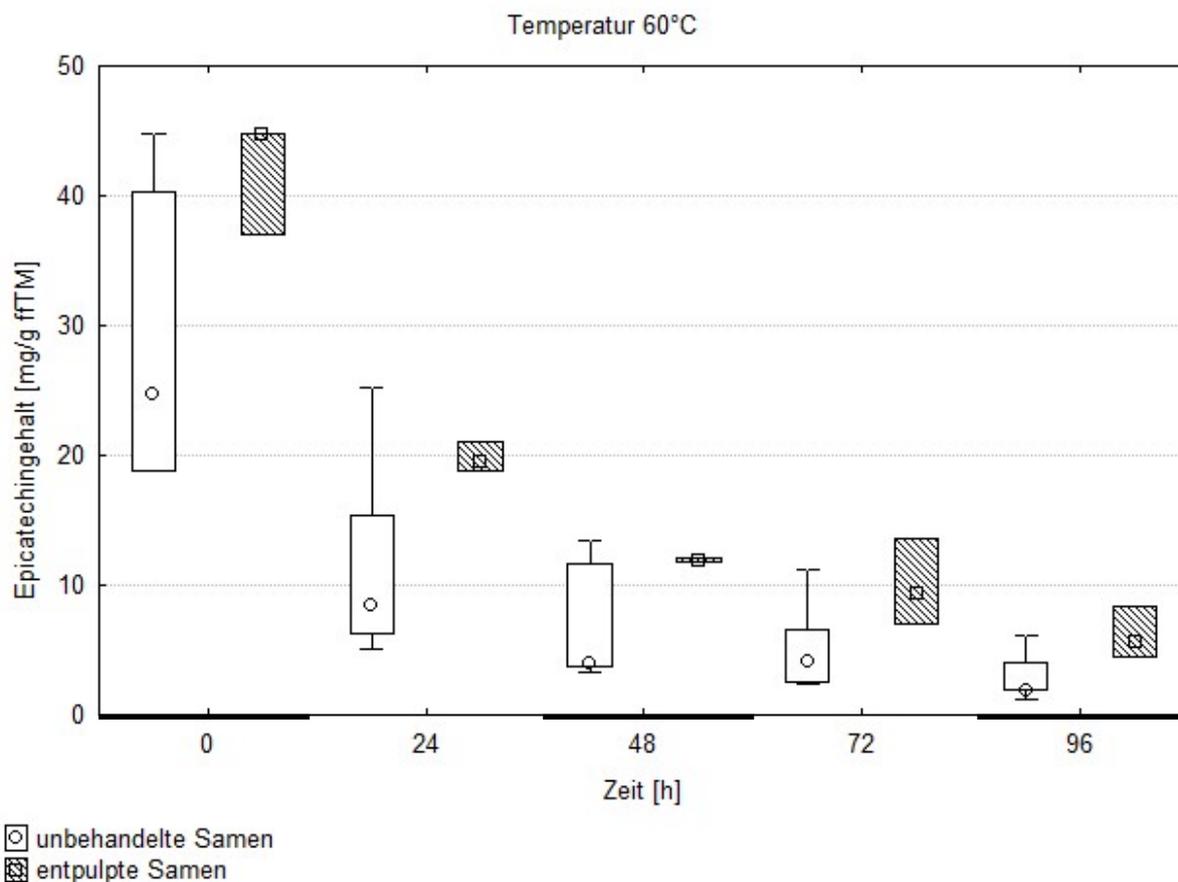
niedrigen Temperaturen zu wirken und wird durch die Temperaturerhöhung auf über 50°C wieder aufgehoben.

Bei den Vorbehandlungen der Kakaosamen bei der Temperaturstaffelung 30-35-55°C zeigen nur die Samen ohne Testa eine Änderung ihres Epicatechingehaltes im Vergleich zu den beiden anderen Varianten. Ihr Epicatechingehalt liegt deutlich unterhalb der Gehalte der entpulpten und unbehandelten Samen. Die entpulpten und unbehandelten Samen unterscheiden sich unabhängig von der verwendeten Säurevariante nicht in ihren Epicatechingehalten. Auch bei den anderen Temperaturvarianten unterscheiden sich die unbehandelten Samen in den Epicatechingehalten nicht von den entpulpten Samen.



**Abbildung 5-87: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung des Epicatechingehaltes während der Inkubation mit Essigsäure bzw. einem Gemisch aus Essig- und Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C.**

Angegeben sind die Mediane mit der dazugehörigen Perzentile (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Eine Unterscheidung der Inkubationen nach der Konzentration und dem pH-Wert der Essigsäure- und Essig-/Milchsäuremedien erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. Säurekonzentration: summarisch über alle untersuchten Konzentrationen von 50mmol/l bis 100mmol/l. n=2



**Abbildung 5-88: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung des Epicatechingehaltes während der Inkubation bei einer konstanten Temperatur von 60°C.**

Angegeben sind die Mediane mit der dazugehörigen Perzentile (25-75%) und dem Bereich ohne Ausreißer. Eine Unterscheidung der Inkubationen nach verwendeter Säure, deren Konzentration und pH-Wert erfolgte bei dieser Darstellung nicht. In den ersten 48 Stunden der Inkubation wurde mit Stickstoff begast, die restliche Zeit mit Druckluft. n=3-9

### 5.1.2.2 Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid

Catechin gehört wie Epicatechin zu den phenolischen Substanzen. Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid gehören zu den Anthocyanen, die ca. 4,5% an den phenolischen Substanzen eines frischen Kakaosamens ausmachen können (Baigrie, 1994). Zusätzlich zu den im Folgenden aufgeführten Inkubationstemperaturen wurden auch Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 60°C durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Inkubationen sind tabellarisch im Anhang (s. Tab.12-3) aufgeführt, da die Gehalte der Anthocyane in diesem Fall ausschließlich von der Temperatur beeinflusst werden.

Da die Verläufe der Gehalte an Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid mit dem Verlauf der Epicatechingehalte aus dem vorherigen Kapitel im Zuge der verschiedenen Inkubationsvarianten korrelieren, werden im Folgenden die Daten nicht mehr

graphisch dargestellt. Die entsprechenden Daten zu den Gehalten an Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid der verschiedenen Inkubationen finden sich tabellarisch im Anhang (s. Tab.12-4). Zu jeder Temperaturvariante findet sich im weiteren Verlauf eine Kurzzusammenfassung der Ergebnisse.

#### **5.1.2.2.1 Temperaturverlauf mit der Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C**

Die Gehalte an Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-2-arabinosid in dem Samengewebe sinken im Verlauf der Inkubation ab. Nach 72 Stunden ist die stärkste Abnahme zu beobachten, in Korrelation mit der Temperaturerhöhung auf 55°C nach 48 Stunden.

Werden unterschiedliche Säuren für die Inkubation verwendet, hat dies keinen Einfluss auf den Gehalt an Catechin bei der Temperaturstaffelung 30-35-55°C. Da der Catechingehalt im Verlauf der verschiedenen Inkubationen relativ stabil bleibt, scheint sich weder die verwendete Säure noch deren pH-Wert oder die Temperatur auf den Gehalt auszuwirken. Beim Epicatechingehalt wurden ebenfalls bei der Temperaturstaffelung 30-35-55°C keine Unterschiede zwischen den Inkubationen mit unterschiedlichen Säuren festgestellt. Da bei der graphischen Darstellung der verschiedenen Inkubationen die Perzentilen bei den verschiedenen Säuren weit auseinander liegen, können dadurch potentielle Einflüsse der verschiedenen Säuren verdeckt werden. Allerdings liegen die Mediane der Catechingehalte der Inkubationen mit Essigsäure über die gesamte Inkubation unterhalb der Mediane der Inkubationen mit Milchsäure.

Bei den Gehalten der beiden Anthocyane, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid, zeigen sich nur zu Beginn der Inkubation leichte Unterschiede in den Gehalten bei den unterschiedlichen Säurevarianten, im weiteren Verlauf der Inkubation sind keine Unterschiede in den Gehalten zu beobachten.

Bei den verschiedenen Inkubationen mit Milchsäure sind nur geringe Veränderungen des Catechingehaltes zu beobachten. Zum Ende der Inkubation weisen die Inkubationen mit 100mM Milchsäure geringere Gehalte an Catechin auf als die Inkubationen mit 25mM Milchsäure. Der pH-Wert hat auf den Gehalt an Catechin keinen Einfluss.

Die Gehalte der beiden Anthocyane, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid, werden nicht von den unterschiedlichen Milchsäurekonzentrationen und dem pH-Wert

beeinflusst. Bei allen Inkubationen mit Milchsäure erfolgt nach 24 Stunden eine kontinuierliche Verringerung der Gehalte an Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid.

Bei den unterschiedlichen Inkubationen mit Essig-/Milchsäure sind die Gehalte an Catechin über den Verlauf stabil, erst nach 96 Stunden ergeben sich Veränderungen. Die Inkubation mit 50mM Essig-/Milchsäure führt zu einem geringeren Gehalt an Catechin. Der pH-Wert hat auf den Gehalt an Catechin keinen Einfluss.

Bei den Inkubationen mit Essig-/Milchsäure erfolgt wie bei den Inkubationen mit Milchsäure eine kontinuierliche Abnahme der Anthocyane, allerdings ist in den ersten 48 Stunden der Gehalt an Cyanidin-3-galactosid bei den Inkubationen mit 50mM Essig-/Milchsäure höher. Cyanidin-3-arabinosid wird weder von der Konzentration des Säuregemisches noch von dessen pH-Wert beeinflusst.

Bei den Inkubationen mit Essigsäure unterscheiden sich über die gesamte Dauer der Inkubation die einzelnen Inkubationen leicht in den Catechingehalten. Die Catechingehalte der einzelnen Inkubationen mit Essigsäure sind über die Versuchsdauer stabil.

Auch bei den Inkubationen mit Essigsäure werden die Anthocyane, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid, nicht von der Konzentration der Essigsäure und dem pH-Wert beeinflusst. Die Gehalte an Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid liegen deutlich unterhalb der mit Milchsäure inkubierten Samen. Essigsäure scheint sich negativ auf die Stabilisierung der Anthocyane auszuwirken.

Der Catechingehalt ist bei allen Säurevarianten über die Inkubationsdauer stabil. Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid nehmen kontinuierlich ab. Wird Essigsäure für die Inkubation verwendet, liegen die Gehalte an Anthocyanen deutlich unter den Gehalten der Inkubationen mit Milchsäure. Der pH-Wert hat bei den verschiedenen Säurevarianten keine Auswirkungen auf die Gehalte an Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid. Bei den einzelnen Säurevarianten hat die Konzentration nur einen geringen Einfluss, wobei es von der Art der Säure abhängig ist, ob sich eine höhere Konzentration positiv oder negativ auswirkt.

#### **5.1.2.2.2 Temperaturgradient mit der Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C**

Bei dem Temperaturgradienten 37-50°C nehmen die Gehalte von Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid während der Inkubation ab. Der Catechingehalt bleibt über den Zeitraum der Inkubation im Gegensatz zu den Anthocyanen relativ stabil. Eine Ausnahme bildet der Catechingehalt der Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser, nach 72 Stunden liegt der Gehalt an Catechin deutlich oberhalb der verschiedenen Inkubationen, die Säure enthalten.

Die Verringerung der Anthocyankonzentrationen erfolgt bei der Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser verzögert. Bei Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid erfolgt die Abnahme der Gehalte bei der Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser erst nach 48 Stunden und nicht bereits wie bei den Inkubationen, die Säure enthalten, nach 24 Stunden. Die verschiedenen Säuren haben nach 48 Stunden keinen Einfluss auf den Verlauf der Gehalte an Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid, ebenso wie die Konzentration und der pH-Wert.

Die verschiedenen Säureinkubationen unterscheiden sich nur geringfügig in ihren Gehalten an Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid. Die Verwendung einer Säure als Inkubationsmedium hat einen Einfluss auf die Gehalte an Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid, da sich die Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser von den säurehaltigen Inkubationen unterscheidet.

#### **5.1.2.2.3 Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 37°C**

Bei den verschiedenen säurehaltigen Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 37°C weisen über den gesamten Versuchszeitraum die Inkubationen mit reiner Milchsäure höhere Gehalte an Catechin auf als die Inkubationen, die Essigsäure enthalten. Auch hier verändern sich die Catechingehalte der verschiedenen Inkubationen im Lauf der Zeit nur leicht.

Die Inkubationen mit Milchsäure weisen nach 48 Stunden bis zum Ende der Inkubation höhere Gehalte an Cyanidin-3-galactosid auf. Bei den Gehalten an Cyanidin-3-arabinosid sind die Gehalte nach 48 Stunden bei den Inkubationen mit Milchsäure höher als bei denen, die Essigsäure enthalten.

Die Gehalte an Catechin unterscheiden sich zwischen den Inkubationen mit Essigsäure und denen mit Essig-/Milchsäure nicht voneinander. Auch bei den Gehalten der beiden

Anthocyane zeigen sich zwischen den Inkubationen mit Essigsäure und denen mit Essig-/Milchsäure keine Unterschiede.

Bei den Inkubationen mit Milchsäure beeinflusst die Säurekonzentration die Catechingehalte nicht.

Bei den Gehalten an Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid führt eine Inkubationen mit Milchsäure zu einem verringerten Abbau dieser Substanzen über die Dauer der Inkubation bei einer konstanten Temperatur von 37°C. Ein Einfluss der Milchsäurekonzentration auf den verringerten Abbau dieser Substanzen liegt nicht vor.

#### **5.1.2.2.4 Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 41°C**

Bei einer konstanten Temperatur von 41°C sinken die Gehalte an Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid während der Inkubation kontinuierlich ab, während der Gehalt an Catechin relativ konstant bleibt.

Die Inkubationen mit Essigsäure unterscheiden sich im Gehalt an Catechin erst zum Ende der Inkubation nach 96 Stunden von den Catechingehalten der Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser. Auch wenn die Gehalte an Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid bei der Kontrollinkubation mit destilliertem Wasser etwas höher sind als bei den Inkubationen mit Essigsäure unterscheiden sie sich nicht signifikant.

Die Gehalte an Catechin der Inkubationen, die verschiedene Konzentrationen an Essigsäure enthalten, unterscheiden sich während der Inkubation nicht. Der Catechingehalt wird nicht von der Säurekonzentration beeinflusst. Da sich die beiden Inkubationen mit einer Essigsäurekonzentration von 300mM, trotz der unterschiedlichen pH-Werte, ebenfalls nicht unterscheiden, beeinflusst auch der pH-Wert den Catechingehalt nicht.

In den ersten 24 Stunden erfolgt die Verringerung an Cyanidin-3-arabinosid bei der Inkubation mit 100mM Essigsäure etwas verzögert. Auf den Abbau an Cyanidin-3-galactosid haben die Säurekonzentration und der pH-Wert keinen Einfluss.

Bei einer konstanten Temperatur von 41°C hat die Säurekonzentration nur geringe Auswirkungen auf die Gehalte an Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-

arabinosid. Der pH-Wert hat keinen feststellbaren Einfluss auf die Gehalte dieser drei Substanzen.

#### **5.1.2.2.5 Inkubationen bei einer konstanten Temperatur von 50°C**

Bei einer konstanten Temperatur von 50°C sinken die Gehalte an Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid während der Inkubation kontinuierlich ab, während der Gehalt an Catechin relativ konstant bleibt.

Die Inkubationen mit Essigsäure unterscheiden sich in den Gehalten Catechin, Cyanidin-3-galactosid, Cyanidin-3-arabinosid nicht von den Kontrollinkubationen mit destilliertem Wasser, obwohl auch hier die Kontrollinkubation durchgehend etwas höhere Gehalte aufweist.

Die einzelnen Inkubationen mit Essigsäure unterscheiden sich in ihren Gehalten an Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid nicht voneinander.

Bei einer konstanten Temperatur von 50°C beeinflusst die Art der Säure, die Konzentration der Säure und der pH-Wert die Gehalte an Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid nicht. In diesem Fall ist die Temperatur der bestimmende Faktor.

#### **5.1.2.2.6 Einfluss der Samenbehandlung auf die Gehalte an Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid während der Inkubation**

Die Samenbehandlung wirkt sich bei den Inkubationen mit Milchsäure beim Temperaturgradienten 30-35-55°C erst nach 72 Stunden auf den Gehalt an Catechin aus. Die Samen ohne Testa weisen dann einen geringeren Catechingehalt als die beiden anderen Varianten auf.

Auf die Anthocyangelhalte hat die Samenbehandlung beim Temperaturgradienten 30-35-55°C keinen Einfluss.

Die Samenbehandlung wirkt sich bei den Inkubationen mit Essig-/Milchsäure beim Temperaturgradienten 30-35-55°C zum Ende der Inkubation auf den Gehalt an Catechin aus. Der Catechingehalt ist bei den Samen ohne Testa geringer als bei den zwei anderen Varianten.

Auch hier hat die Samenbehandlung keine Auswirkungen auf den Gehalt an Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid.

Bei den Inkubationen mit Essigsäure beim Temperaturgradienten 30-35-55°C wirkt sich die Samenbehandlung über die gesamte Inkubationsdauer nicht auf den Gehalt an Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid aus.

Auch beim Temperaturgradienten 37-50°C hat die Samenbehandlung über die gesamte Inkubationsdauer keinen Einfluss auf die Gehalte an Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid.

Bei den verschiedenen Samenbehandlungen unterscheiden sich die Inkubationen mit Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C nicht im Gehalt an Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid.

Bei den Inkubationen mit Essigsäure und mit Essig-/Milchsäure wirkt sich die Samenbehandlung bei einer konstanten Temperatur von 37°C nicht auf den Gehalt an Catechin aus.

Bei den Inkubationen, die Essigsäure enthalten, liegen die Anthocyangehalte der entpulpften Samen nach 72 Stunden deutlich über den Gehalten der unbehandelten Samen.

Die Samenbehandlung hat auf den Catechingehalt bei den verschiedenen Säurevarianten der Inkubationen mit einer konstanten Temperatur von 37°C keinen Einfluss. Bei den Inkubationen, die Essigsäure enthalten weisen die entpulpften Samen einen verringerten Abbau an Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid auf, wodurch sie zum Ende der Inkubation einen höheren Anthocyangehalt besitzen.

In Bezug auf die Samenbehandlung unterscheiden sich bei einer konstanten Temperatur von 60°C die Inkubationen im Gehalt an Catechin. Der Catechingehalt der entpulpften Samen ist über die gesamte Inkubationsdauer höher als der Gehalt bei den unbehandelten Samen.

Im Gegensatz dazu sind bei den beiden Anthocyanen Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid keine Unterschiede zwischen den beiden Samenbehandlungen zu beobachten.

#### **5.1.2.2.7 Zusammenfassung:**

Bei einer konstanten Temperatur von 37°C sind zum Ende der Inkubation noch die höchsten Gehalte an Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid vorhanden. Höhere Temperaturen oder Gradienten mit einer höheren Endtemperatur führen zu geringeren Gehalten an Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid zum Ende der Inkubation.

Milchsäure wirkt sich bei 37°C positiv aus. Auch beim Catechin und den Anthocyanen zeigt sich, wie beim Epicatechin, dass die Säure im Inkubationsmedium keinen starken Einfluss auf den Erhalt dieser Substanzen hat, da auch hier mit destilliertem Wasser bei einigen Temperaturregimen ähnliche Gehalte erhalten bleiben (37-50°C, 41°C und 50°C).

Die Samenbehandlung wirkt sich bei den verschiedenen Temperaturregimes unterschiedlich auf die Gehalte an Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid aus. Die Verwendung von Samen ohne Testa führt bei dem Temperaturgradienten 30-35-55°C zu geringeren Gehalten an Catechin, während sich entpulperte Samen positiv auf die Gehalte der drei Substanzen auswirken können.

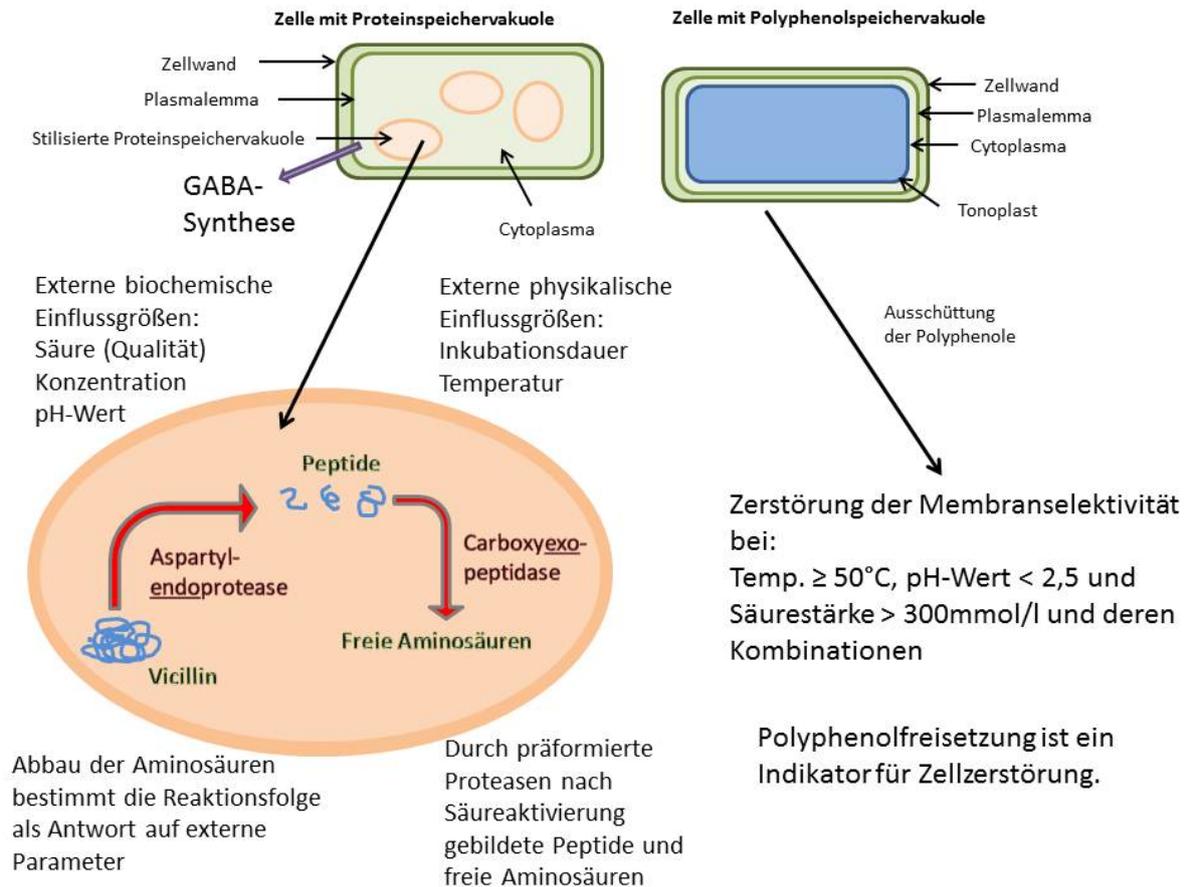
### **5.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Inkubationen**

Durch die Regulierung einzelner Parameter der Inkubation lassen sich die Gehalte der verschiedenen Inhaltsstoffe (Gesamtaminosäuren, hydrophobe Aminosäuren und Polyphenole), die als Qualitätsparameter gelten, beeinflussen. Eine Steuerung der im Kakaosamen ablaufenden Prozesse durch externe Faktoren ist möglich.

Temperatur und Zeit sind die Faktoren, die den größten Einfluss auf die untersuchten Parameter haben. Ein zusätzlicher Einfluss innerhalb der verschiedenen Temperaturen erfolgt durch die Säure, deren jeweiliger Konzentration und den resultierenden pH-Wert. Eine Übersicht über die ablaufenden Prozesse und der beeinflussenden Faktoren ist in der Abbildung 5-89 schematisch dargestellt.

Hohe Gehalte an freien Aminosäuren werden durch eine gleichbleibende Temperatur von 41°C und einem Inkubationsmedium mit 100mM Essigsäure (pH 2,9) erzielt. Diese Temperatur wirkt sich auch auf den Gehalt an hydrophoben Aminosäuren positiv aus. In Kombination mit einem Medium aus 300mM Essigsäure (pH 4,5) wurden die höchsten Gehalte an hydrophoben Aminosäuren erzielt. Der GABA-Gehalt wird positiv von Inkubationsmedien mit Essigsäure beeinflusst, bei Milchsäure sind geringere Gehalte zu

beobachten. Der höchste Gehalt an Epicatechin bleibt bei einer konstanten Temperatur von 37°C mit 100mM Milchsäure (pH 4,4) erhalten. Auch die Gehalte an Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid werden durch Inkubationsmedien mit Milchsäure positiv beeinflusst, eine konstante Temperatur von 37°C stabilisiert die Gehalte am besten.



**Abbildung 5-89: Externe Einflüsse in den Proteinspeichervakuolen auf die endogene Proteolyse und auf den Abbau der Polyphenole in den Phenolzellen.** Der Faktor Sauerstoffverfügbarkeit ist nicht in das Schaubild aufgenommen, da dieser Faktor vor allem in Bezug auf mikrobielle Aktivität eine Einflussgröße darstellt.

## 5.2 Struktur und Funktion der Testa

Die Samenschale oder Testa wird maternal gebildet und soll den Embryo gegen ungünstige Umweltbedingungen schützen. Sie bildet eine physikalische und chemische Barriere und verhindert so in den frühen Entwicklungsphasen des Samens Verletzungen, Infektionen und Schädigungen des Embryos durch Mikroorganismen und Fraßfeinde.

Durch die Samenschale ist der gesamte Embryo des Kakaosamens zwar zunächst geschützt, aber gleichzeitig von der Außenwelt abgegrenzt. Er bildet somit eine weitgehend in sich geschlossene funktionelle Einheit.

Die Testa von Kakao ist keine einfache mechanisch verstärkte Schale, sondern eine recht komplex aufgebaute für mehrere Funktionen wirksame Hülle. Sie besteht aus mehreren Lagen schwammartiger Parenchymzellen, einer unregelmäßigen Ansammlung von großen Schleimbehältern in der subepidermalen Struktur des früheren äußeren Integuments, gefolgt von Gefäßbündeln. Die Aufteilung in eine Exotesta sowie eine Endotesta sind klar zu erkennen. Die beiden Integumente, äußeres und inneres, sind zu den Außenseiten hindurch eine Epidermis abgeschlossen.

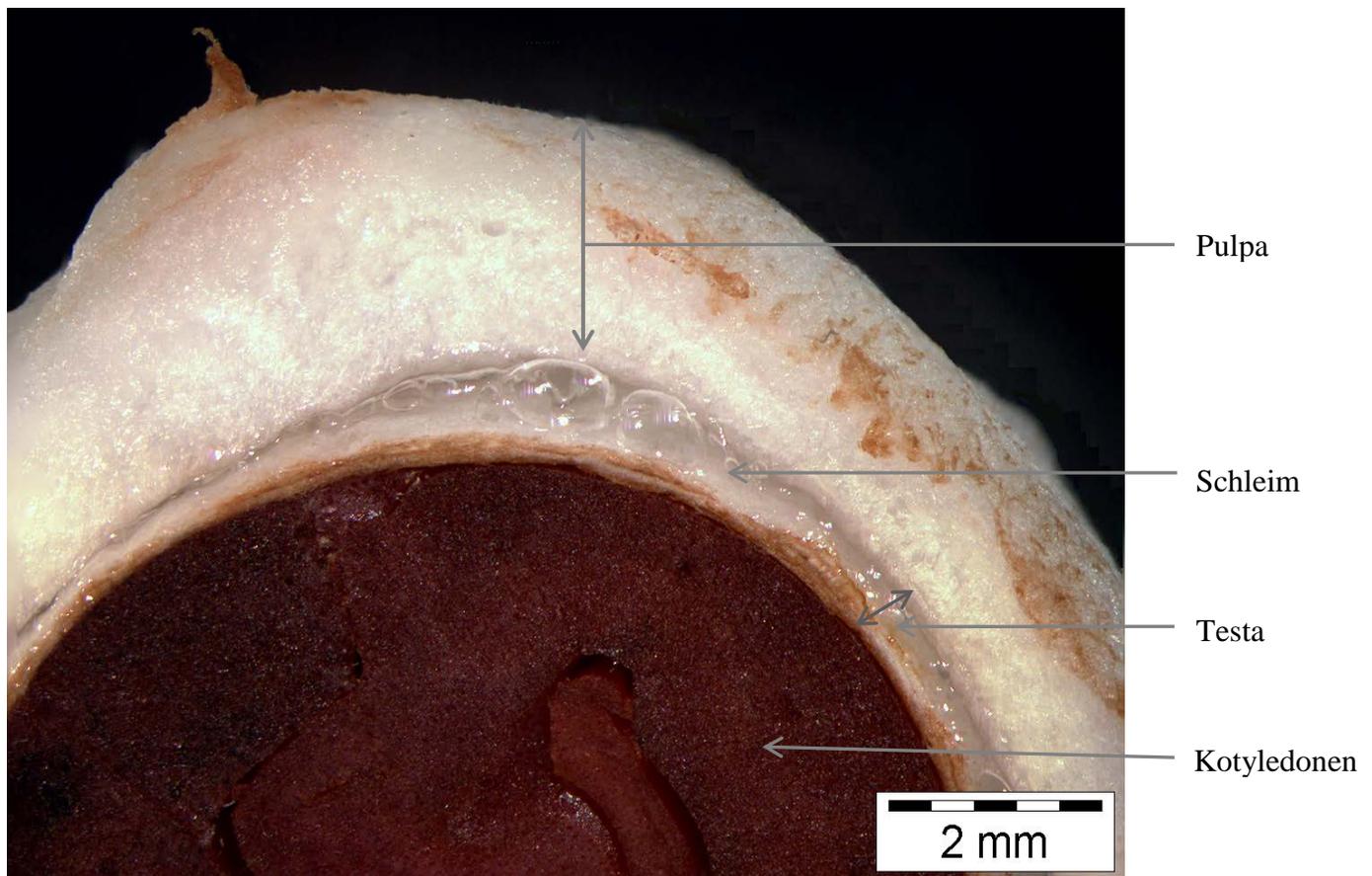
Während der Fermentation der Kakaosamen stellt die Testa eine Barriere zwischen dem äußeren Reaktionsraum, in dem außen die Fermentationsprozesse (alkoholische Gärung, Bildung von Essig- und Milchsäure) ablaufen und den gefalteten Kotyledonen und dem Embryo im Inneren dar. Da für die Proteolyse der Speicherproteine zu hydrophilen Peptiden und hydrophoben Aminosäuren eine Ansäuerung des Samengewebes stattfinden muss und die entsprechenden Säuren außerhalb des Samens vor allem von den Essig- und Milchsäurebakterien gebildet werden, ist für das Verständnis des Fermentationsablaufs die Kenntnis der Durchlässigkeit der Testa für diese Substanzen wichtig.

### 5.2.1 Mikroskopische Untersuchung der Testa eines frischen Kakaosamens

Der Querschnitt durch einen frischen Kakaosamen mit anhaftender Pulpa weist von innen nach außen verschiedene, klar voneinander abgegrenzte Strukturen auf (s. Abbildung 5-90).

Ganz außen befindet sich die leicht schleimige, süßlich-sauer schmeckende Pulpa aus schlauchförmigen Zellen. Diese Schicht ist eine Bildung des Endokarps (Elwers, 2008). Darunter liegt die komplex aufgebaute Samenschale, die Testa, die in der Exotesta (Andersson et al., 2006) eine von der Epidermis abgegrenzte deutlich sichtbare Ansammlung

von Kavernen aufweist, in denen farbloser Schleim gelagert ist. Die Größe der Schleimkavernen (s. Abbildung 5-92), legt nahe, dass es sich bei dem Ablagerungsort nicht um Zellen handelt, sondern eher um Zellzwischenräume bzw. Kavernen, die lysogen oder rhexigen entstanden sind. Cheesman (1927) beschreibt, dass die Schleimzellen anfangs Zellwände besitzen, die zur Samenreife endgültig verschwinden. Er beschreibt das Phänomen jedoch nicht eindeutig. Daher ist zwar eine lysigene Entstehung zu vermuten, jedoch bislang nicht bewiesen. Auf die Exotesta folgt die Endotesta. An diese schließt sich nach innen hin das dünne Silberhäutchen, ein Rest des zellulären Endosperms, an, das auf der Abbildung 5-90 leider nicht erkennbar ist, gefolgt von dem Embryo, mit den stark violett gefärbten oder weißen Kotyledonen, je nach Genotyp bzw. Sorte.



**Abbildung 5-90: Querschnitt durch einen frischen Kakaosamen**

Wird der Kakaosamen von der Pulpa befreit, sind die Konturen der Leitbündel deutlich an der Außenseite des Samens erkennbar (s. Abbildung 5-91). Diese verlaufen in der Exotesta. Sie entspringen an der Chalaza im Bereich der Hypostase, die Region in die die Raphe, ein großes Leitbündel ausgehend von der Plazenta, mündet. Sie verlaufen in Richtung der Mikropyle und enden in deren Nähe im Gewebe ohne eine Anbindung an weitere Leitgewebe (Rinas, 2010).

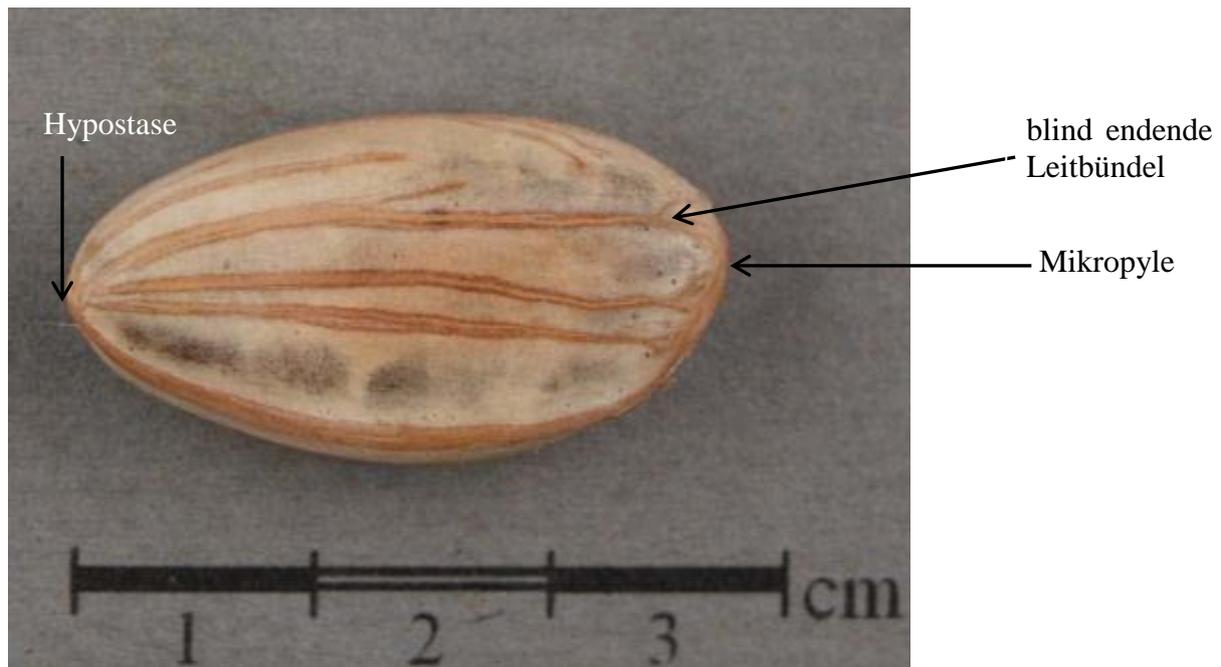
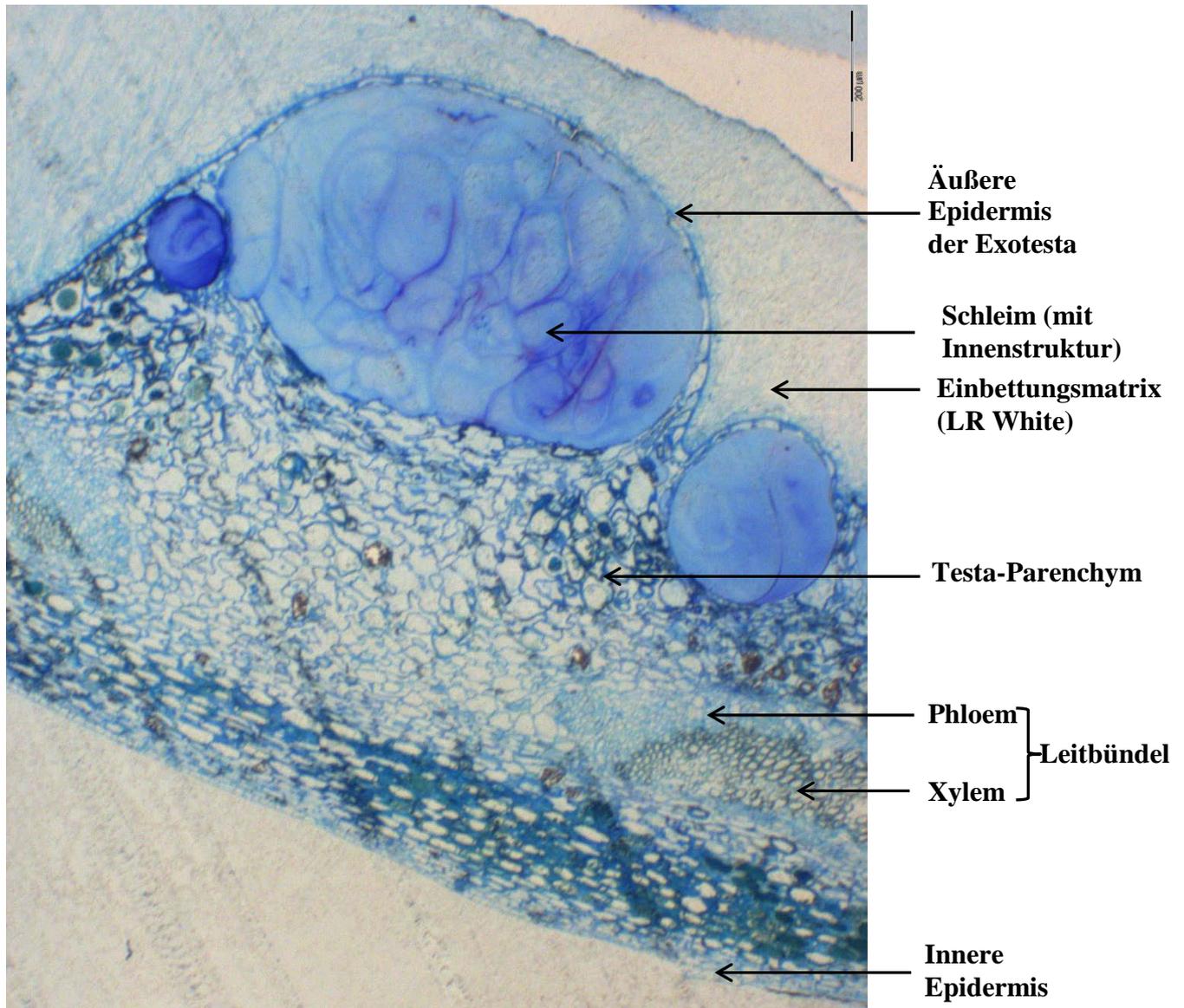


Abbildung 5-91: Verlaufsdiagramm der Leitbündel innerhalb der Kakaotesta; Foto: Rinas (2010)

### 5.2.2 Lichtmikroskopische Untersuchung der Testa

Ein Querschnitt durch die Testa eines entpulten Kakaosamens weist die großen, optisch klar hervortretenden Schleimkavernen direkt unterhalb der äußeren Epidermis der Exotesta auf (s. Abbildung 5-90 und Abbildung 5-92). Darunter folgt erst ein lockeres Parenchymgewebe, in dem die Leitbündel liegen, danach ein dichtes gepacktes Parenchym mit zahlreichen Zellen, in deren Vakuolen offensichtlich phenolische Substanzen gespeichert sind. Den Abschluss der Testa bildet die innere Epidermis.

Die Testa ist aus den Integumenten der Samenanlagen entstanden und im gereiften Zustand in die Exo- und die Endotesta unterteilt. Die äußere Testa umfasst die Schleimkavernen und das lockere Parenchymgewebe mit den darin eingebetteten Leitbündeln. Die Schleimkavernen besitzen keine eigene Zellwand, sondern sind nur von den umgebenden Zellen begrenzt. Die innere Testa besteht aus dem dicht gepackten Parenchym und wird durch die innere Epidermis abgeschlossen. Dieser Teil des Parenchyms enthält viele Zellen, die in der Vakuole phenolische Substanzen speichern. Die Zellen, die in der Vakuole phenolische Substanzen speichern, sind gut an ihrer dunkelblauen Färbung zu erkennen (s. Abbildung 5-92).



**Abbildung 5-92: Querschnitt durch die Testa eines entpulten Kakaosamens**  
 Maßstab: 200µm

Die beiden ehemaligen Integumente, zu Exo- und Endotesta umgebildet, werden durch eine Sklereidenschicht voneinander getrennt, deren Zellwände im Idealfall verdickt sind und die nach Andersson et al. (2006) für einen Fluoreszenztracer (Lucifergelb CH), der die gleichen Dissoziationseigenschaften besitzt wie Essigsäure, undurchlässig ist. Durch diesen zellulären Aufbau der beiden Integumente mit der Sklereidenschicht wird ein Stoffaustausch zwischen der äußeren Umgebung des Samens mit den für den Stofftransport notwendigen Leitbündeln und dem im Inneren eingebetteten Embryo in den ersten Tagen nach Entnahme der Samen aus der Frucht nahezu unmöglich gemacht. Die zum Stofftransport während der Reifung des Embryos dienenden Leitbündel verlaufen in der Exotesta in Richtung Mikropyle und haben ihren Ursprung in der Hypostase, in die die Raphe mündet. Die Leitbündel innerhalb der Testa enden im Gewebe ohne eine direkte Anbindung an weitere Leitungsbahnen in der Nähe

der Mikropyle, so dass auch hier bisher keine direkte Verbindung für den Stofftransport zwischen diesen Gefäßen und dem Embryo nachgewiesen werden konnte.

### 5.2.3 Untersuchungen der Testa mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Schichtung der einzelnen Zelllagen eines entpulpten Kakaosamens wird bei einer rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme eines Testaquerschnitts deutlich.

Die Anzahl der Zelllagen variiert bei verschiedenen Querschnitten, im Mittel umfasst die gesamte Testa zwischen 25 und 36 Zelllagen (s. Tab. 5-1, Abbildung 5-93 und Abbildung 5-94). Die in der Abbildung 5-93 beispielhaft gezeigte innere Testa besitzt konstant 15 Zelllagen. Die äußere Testa weist eine höhere strukturelle Variabilität auf als die innere Testa.

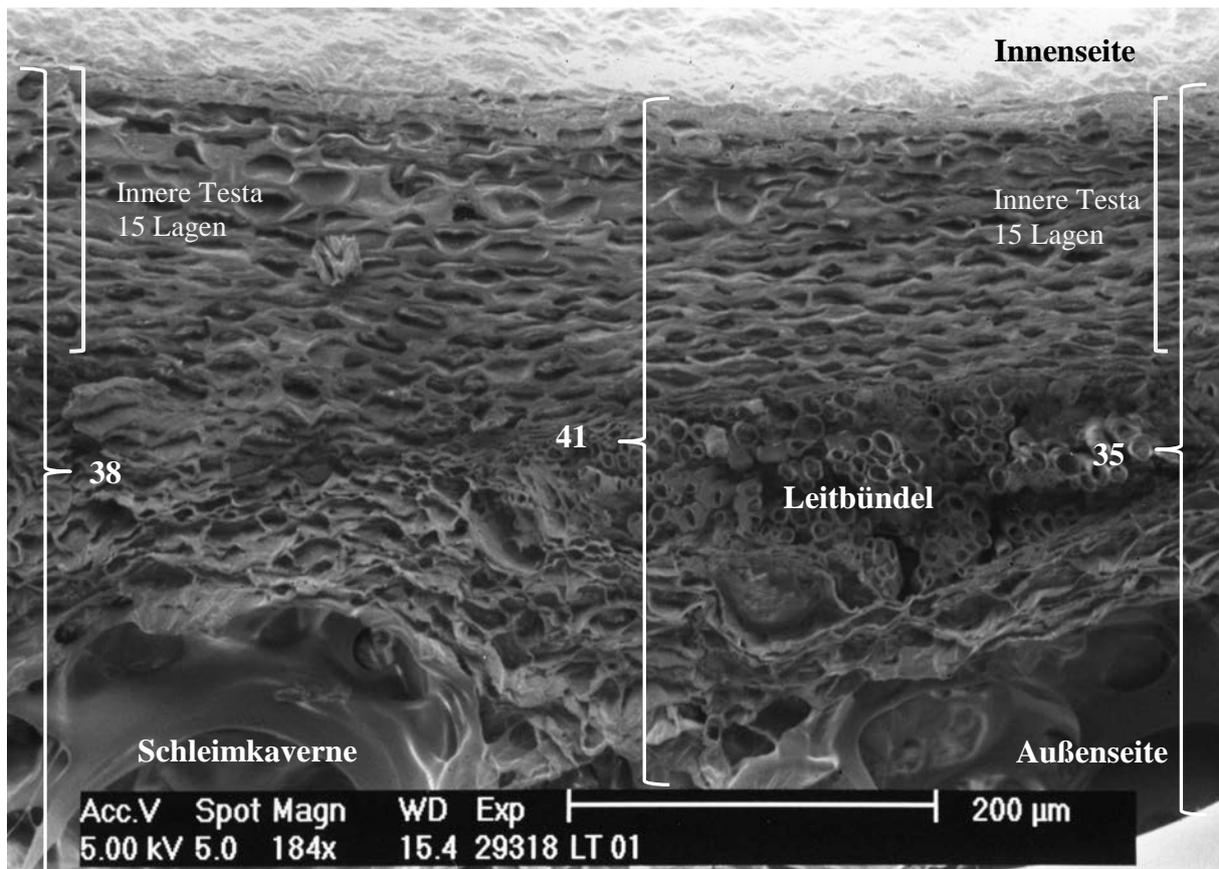
**Tab. 5-1: An drei verschiedenen Querschnittenausgezählte Zelllagen der Testa.**

Es wurden an jedem Querschnitt 7 Zählungen der aufsummierten Exo- und Endotestazelllagen durchgeführt und der Mittelwert berechnet.

Querschnitt	Zelllagen							Mittelwert
1	25	28	36	35	33	35	31	32±4
2	28	24	20	32	29	17	25	25±5
3	35	41	38	34	34	36	34	36±3

Die Schleimkavernen direkt unterhalb der äußeren Epidermis sind auch auf den Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop gut zu erkennen. Diese erscheinen auf den Aufnahmen ungefüllt, da die Präparate vollständig getrocknet wurden. Ebenso zeigt sich die ungleiche Dichte des Parenchymgewebes in der äußeren und inneren Testa. Die innere Testa umfasst im Schnitt 15 und die äußere etwa 20 Zelllagen. Die Leitbündel sind ebenfalls gut zu erkennen und sind an der Grenze des locker gepackten zum dichter gepackten Parenchym lokalisiert.

An der Chalaza endet die Raphe, ein großes Leitbündel, das die Nährstoffe von der Plazenta während der Frucht- und Samenentwicklung zum Samen transportiert. Es lässt sich von der Innenseite des Präparates (s. Abbildung 5-95) erkennen, dass mehrere Leitbündel an diesem Punkt, der Hypostase, entspringen. Diese Leitbündel haben keinen direkten Kontakt zu dem Leitbündel der Raphe (s. Abbildung 5-95), sondern leiten von dem lockeren Gewebereich der Hypostase die Transportmedien innerhalb der Testa am Samen herab.



**Abbildung 5-93: REM-Aufnahme eines Querschnitts durch die Testa eines frischen, entpulten Kakaosamens**

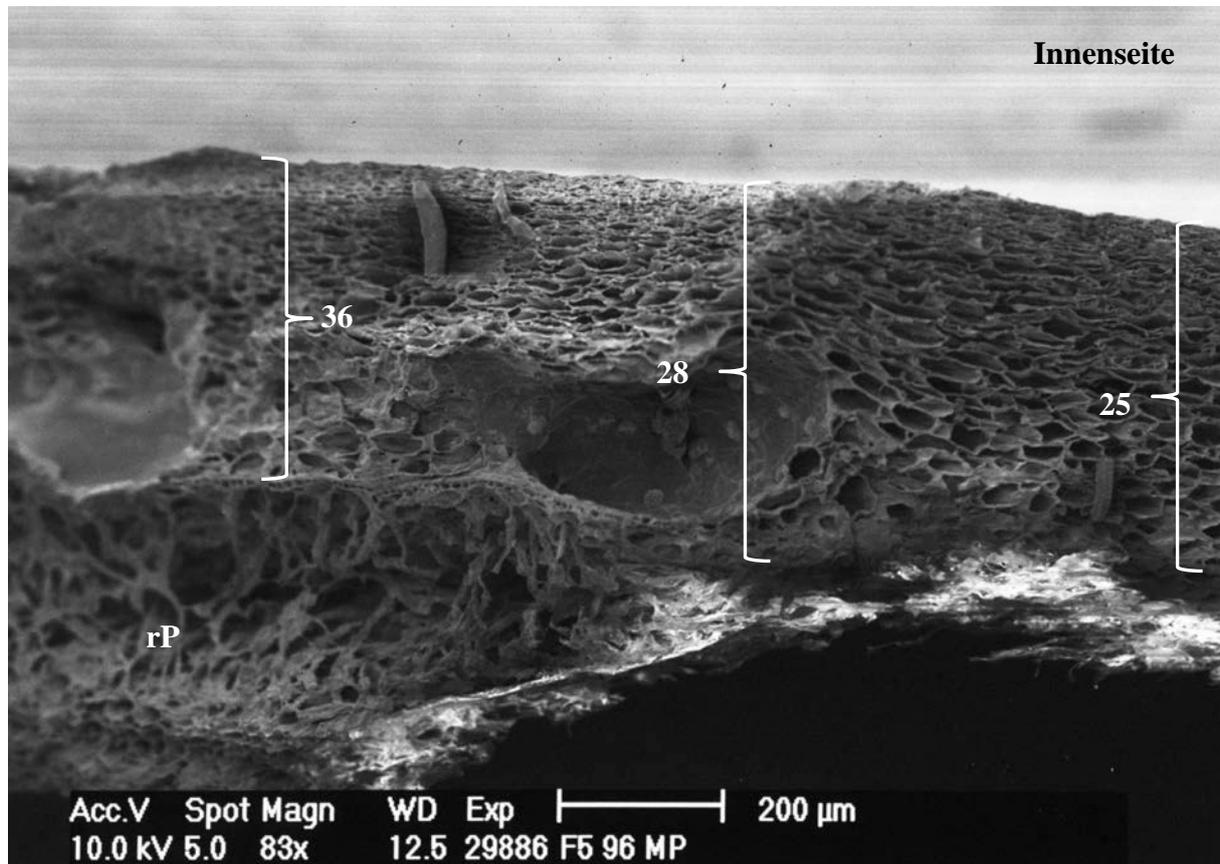
Vergrößerung: s. Maßstab. Die Zahlen geben die Anzahl der ermittelten Zellschichten an. Die innere Testa hat über alle drei Querschnitte dieser Abbildung jeweils 15 Zellschichten.

### 5.2.3.1 Veränderungen der Testa während der Inkubation

Zu Beginn der Inkubation streckt sich die Radicula im Wesentlichen durch die physikalische Wasseraufnahme des Samens über die Raphe und durchstößt dadurch die Testa an der Mikropyle. Aus diesem Grund wurde diese Region für genauere Untersuchungen zur Durchlässigkeit der Testa während der Inkubation ausgewählt.

Die Innenansicht der Mikropyle eines frischen Kakaosamens zeigt eine glatte Oberfläche und eine ringförmige Erhöhung rund um die Mikropyle (s. Abbildung 5-96). Die spätere Öffnung der Mikropyle ist zu diesem Zeitpunkt noch fest verschlossen. Die glatte Innenseite der Testa spricht dafür, dass diese im frischen ungequollenen Samen undurchlässig ist. Im Verlauf der Inkubation verändert sich diese Oberfläche, sie wird rauer und nach 48 Stunden zeigen sich die ersten Risse im Außenbereich rund um die Mikropyle (s. Abbildung 5-97). Diese Risse führen dazu, dass der vorher von der Umgebung abgeschlossene Embryo in Kontakt mit dem

den Samen umgebenden Inkubationsmedium kommt. Ab diesem Zeitpunkt kann frühestens ein Stoffaustausch zwischen dem Embryo und seiner Umgebung beginnen.



**Abbildung 5-94: REM-Aufnahme eines Querschnitts durch die Testa eines frischen, entpulpten Kakaosamens**

Vergrößerung: s. Maßstab. Die Zahlen geben die Anzahl der ermittelten Zellschichten an. rP = restliche Pulpa, der Testa aufsitzend. Dieser Bereich der getrockneten Pulpa weist als typische Struktur schlauchartige Zellen auf, die stark kollabiert sind als Folge der Vakuumtrocknung.

Dadurch ist eine Beeinflussung der biochemischen Vorgänge im Embryo in den ersten 48 Stunden der Inkubation nur über Faktoren möglich, die die Testa, um wirksam zu sein, nicht stofflich durchdringen müssen, wie z.B. der Temperaturverlauf im Fermentationsmedium. Nach 48 Stunden Inkubationszeit ist dann auch eine Einflussnahme über andere Faktoren möglich, die in direkten Kontakt mit dem Embryo treten müssen, wie z.B. Säuren. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass in der anaeroben Phase der ersten Tage auch Milchsäure im Samen selbst entsteht (Sherwin and Simon, 1969).

Die Inkubation lässt sich daher in 2 Phasen einteilen:

- in der ersten Phase ist nur eine indirekte Beeinflussung der biochemischen Vorgänge im Embryo möglich,
- in der zweiten Phase, nach ca. 48 Stunden, ist eine Einflussnahme auch durch direkt wirkende exogene Faktoren möglich.

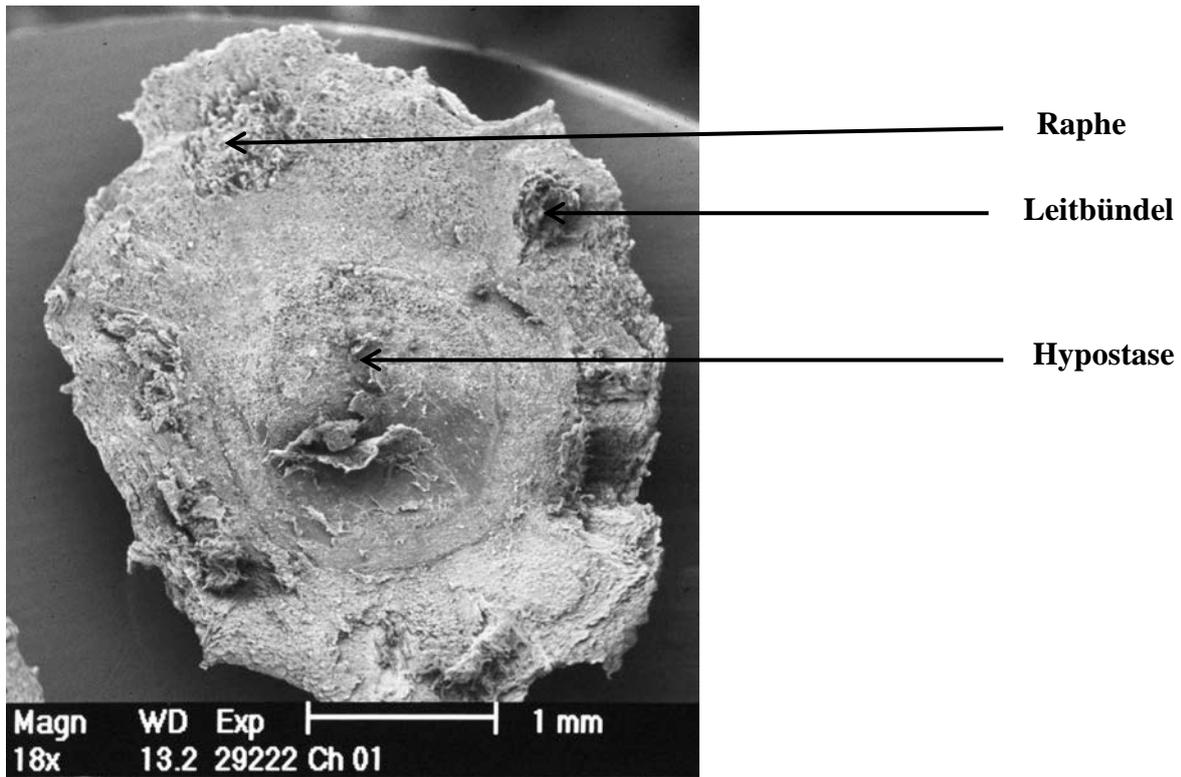


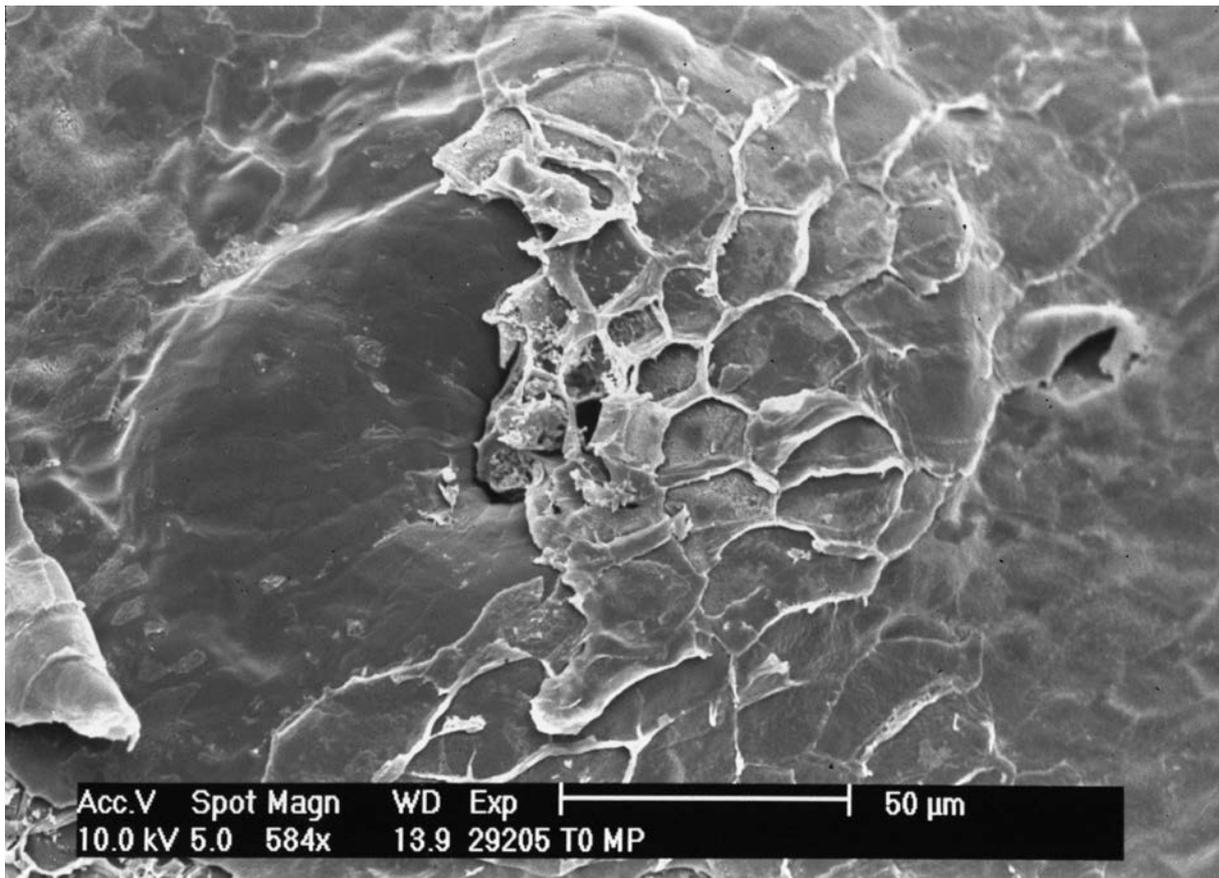
Abbildung 5-95: REM-Aufnahme der Chalaza eines frischen Kakaosamens von der Innenseite, an der Hypostase.

Vergrößerung: s. Maßstab; Foto: Rinas (2010)

### 5.2.3.2 Schleimkavernen

Die Ausdehnung der Schleimkavernen im Verhältnis zur Testa wird bei den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ebenso deutlich wie bei den lichtmikroskopischen Aufnahmen. Die Schleimkavernen sind nicht von einer Zellwand umgeben, sondern befinden sich zwischen den anderen wesentlich kleineren Zellen in den Zellzwischenräumen direkt unterhalb der äußeren Epidermis und können eine Längsausdehnung von über 100µm bis zu 200µm erreichen. Nach Cheesman (1927) sind die Kavernen zu Beginn ihrer Entstehung noch von einer Zellwand umgeben, die aber mit zunehmender Reife immer weiter abgebaut wird. Dies führt dazu, dass sich der Schleim in diesen großen Hohlräumen ansammelt.

Durch die Trocknung während der Präparation erscheinen die Kavernen selbst hohl (s. Abbildung 5-98).



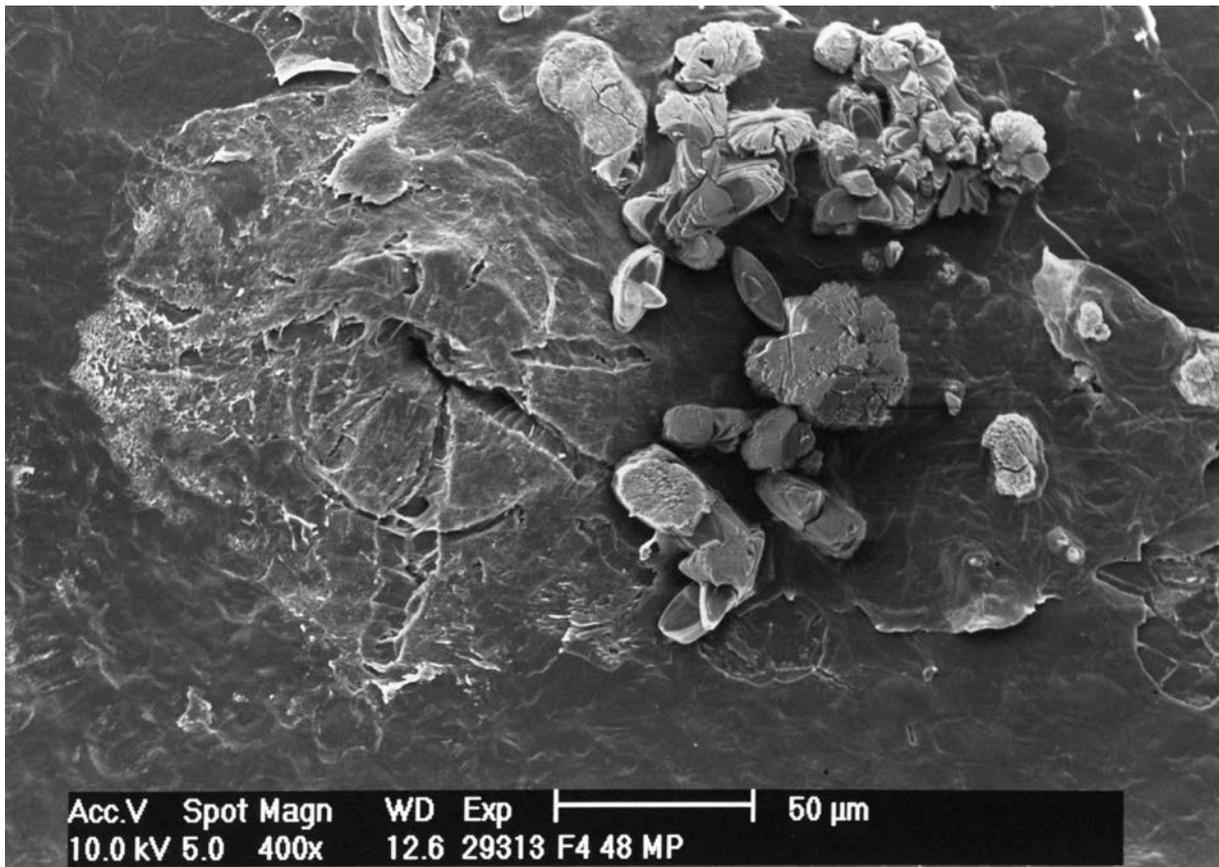
**Abbildung 5-96: REM-Aufnahme der Innenseite der Mikropyle eines frischen Kakaosamens**

Vergrößerung: s. Maßstab. Zu diesem Zeitpunkt besteht noch kein direkter Kontakt zwischen Embryo und Keimungsmedium außerhalb der Testa.

Während der Inkubation kann der Schleim unterhalb der Pulpa in begrenztem Maße quellen und kann dann auch außerhalb der eigentlichen Kavernen nachgewiesen werden. Wird die Pulpa vor der Inkubation von den Samen entfernt, z.B. durch pektinolytischen Abbau, bildet der Schleim schon nach wenigen Stunden eine gut erkennbare, massiv ausgeprägte gallertige Schicht, die den Samen komplett umhüllt (s. Abbildung 5-100).

### 5.2.3.3 Wasseraufnahme und Quellung des Schleimes

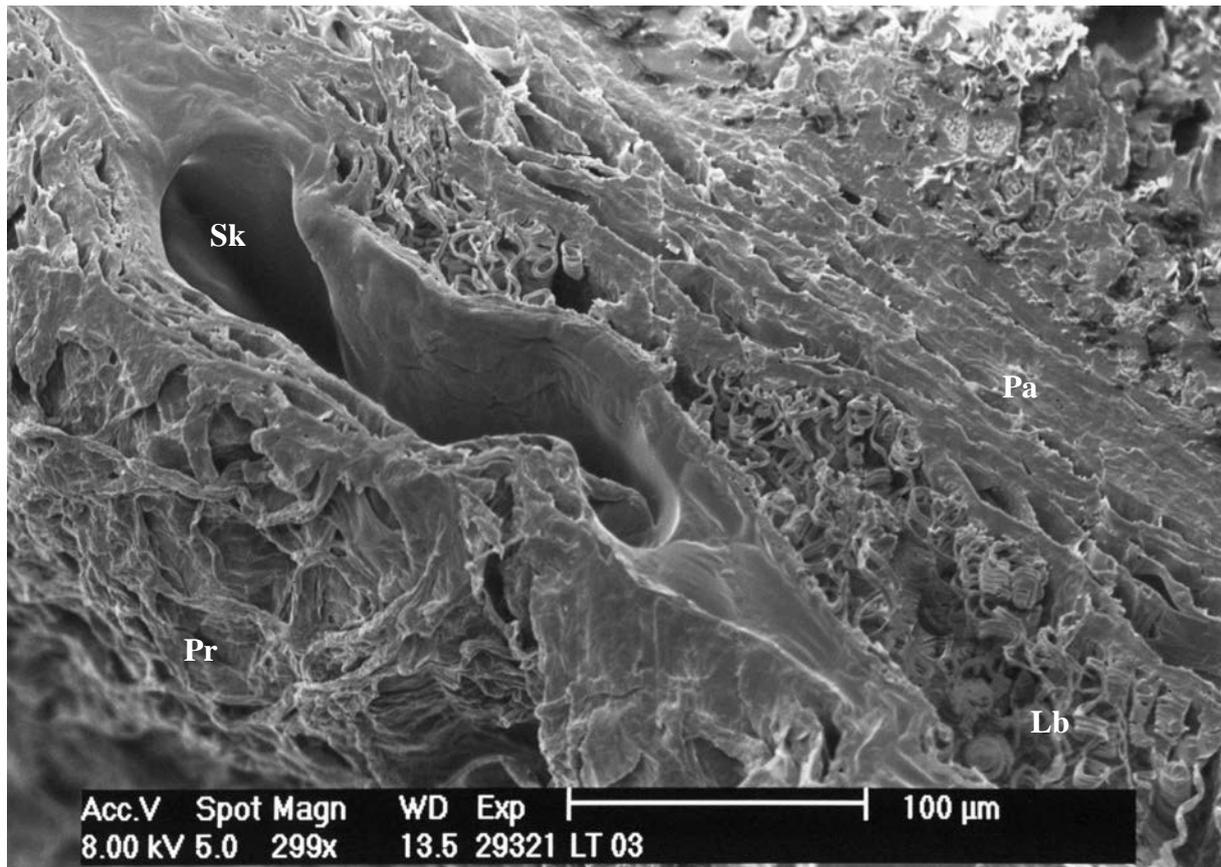
Die Schleimschicht innerhalb der Testa weist eine hohe Wasserbindungseigenschaft auf, die durch die Wasseraufnahme und Quellfähigkeit des Schleimes belegt wird (s. Abbildung 5-99). Für die Untersuchungen wurden unbehandelte Samen und entpulperte Samen vergleichend verwendet. Als dritte Variante wurden Samen verwendet, deren komplette Testa inklusive Pulpa entfernt wurde. Bei allen drei Varianten wurde die Wasseraufnahme über eine Zeit von 4 Tagen als prozentuale Gewichtszunahme gemessen.



**Abbildung 5-97: REM-Aufnahme der Innenseite der Mikropyle eines Kakaosamens nach 48stündiger Inkubation**

Vergrößerung: s. Maßstab. Die Mikropyle ist geöffnet und weist Risse in den randlichen Zelllagen auf.

Die geringste Wasseraufnahme weisen die Embryonen mit ca. 27% Gewichtszunahme auf. Die Zunahme beruht vermutlich auf der physikalischen langsam anlaufenden Quellung der Speicherproteine in den ersten Tagen. Mehr Wasser kann der unbehandelte Samen aufnehmen, da die Pulpa, zusätzlich zur Quellung der Speicherproteine, sowohl Wasser zwischen den Saftschläuchen bindet als auch osmotisch Wasser in die Vakuolen aufnehmen kann. Deutlich davon abgesetzt, liegt die Wasseraufnahmekapazität der entpulpften Samen mit einer Gewichtszunahme von 295% (s. Abbildung 5-99). Der Schleim bildet eine mehrere Millimeter dicke gallertige Schicht um den entpulpften Samen und hüllt diesen vollständig ein (s. Abbildung 5-100). Die Bildung dieser Schleimschicht wird offensichtlich in Gegenwart der Pulpa verhindert. Dies spiegelt sich deutlich in der Wasseraufnahmekapazität wider, da diese im Vergleich zu den entpulpften Samen nur ca. 70% beträgt. Diese Schleimschicht nimmt kontinuierlich über die ersten 3 Tage zu und wird mit zunehmender Wasserbindung schleimiger und zieht bei mechanischer Behandlung Fäden.

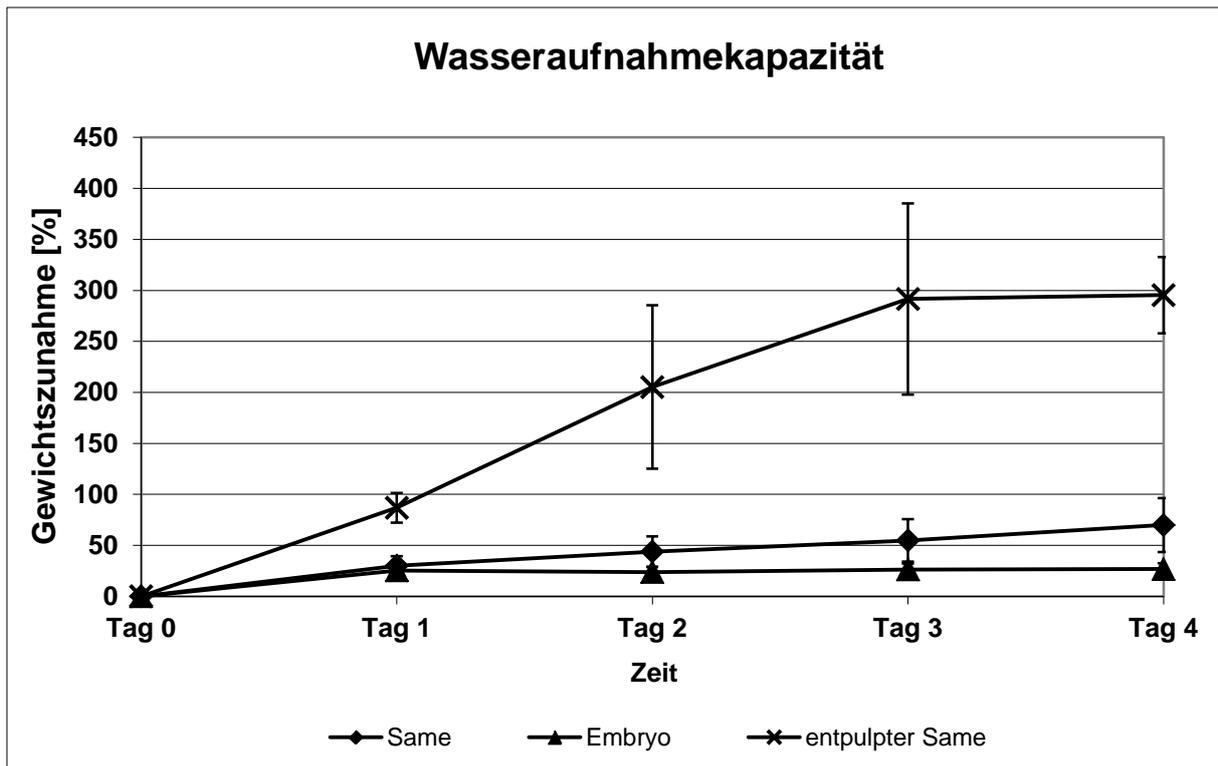


**Abbildung 5-98: REM-Aufnahme eines Querschnitts durch die Testa eines frischen, entpulpten Kakaosamens**

Vergrößerung: s. Maßstab; Lb = Leitbündel, Pa = Parenchym, Pr = Pulparest, Sk = Schleimkaverne

### **5.3 Analyse der stofflichen Zusammensetzung des Schleims aus den Testakavernen**

Der Schleim innerhalb der Testa des Kakaosamens ist in den Schleimkavernen lokalisiert und lässt sich mit Toluidinblau gut anfärben. Da der Schleim nicht von dem zum Entpulpen verwendeten Pectinex<sup>®</sup> BE XXL (bestehend aus Polygalacturonase und Pektinlyase) verdaut wird, kann er nicht aus Pektin bestehen, da Pektin vom Pectinex<sup>®</sup> BE XXL abgebaut wird. Die starke Quellfähigkeit des Schleimes wirft die Frage auf, um welches Material es sich bei dem Schleim handelt. Prinzipiell kann es sich um ein vernetztes Polysaccharid oder um ein Proteingemisch handeln. Viele im Pflanzenreich bekannte Schleime sind als vernetzte Polysaccharide beschrieben worden (Tomoda et al., 1987 und Cui et al., 1994). Daher wurde zuerst die Zuckerzusammensetzung des Schleimes geprüft.

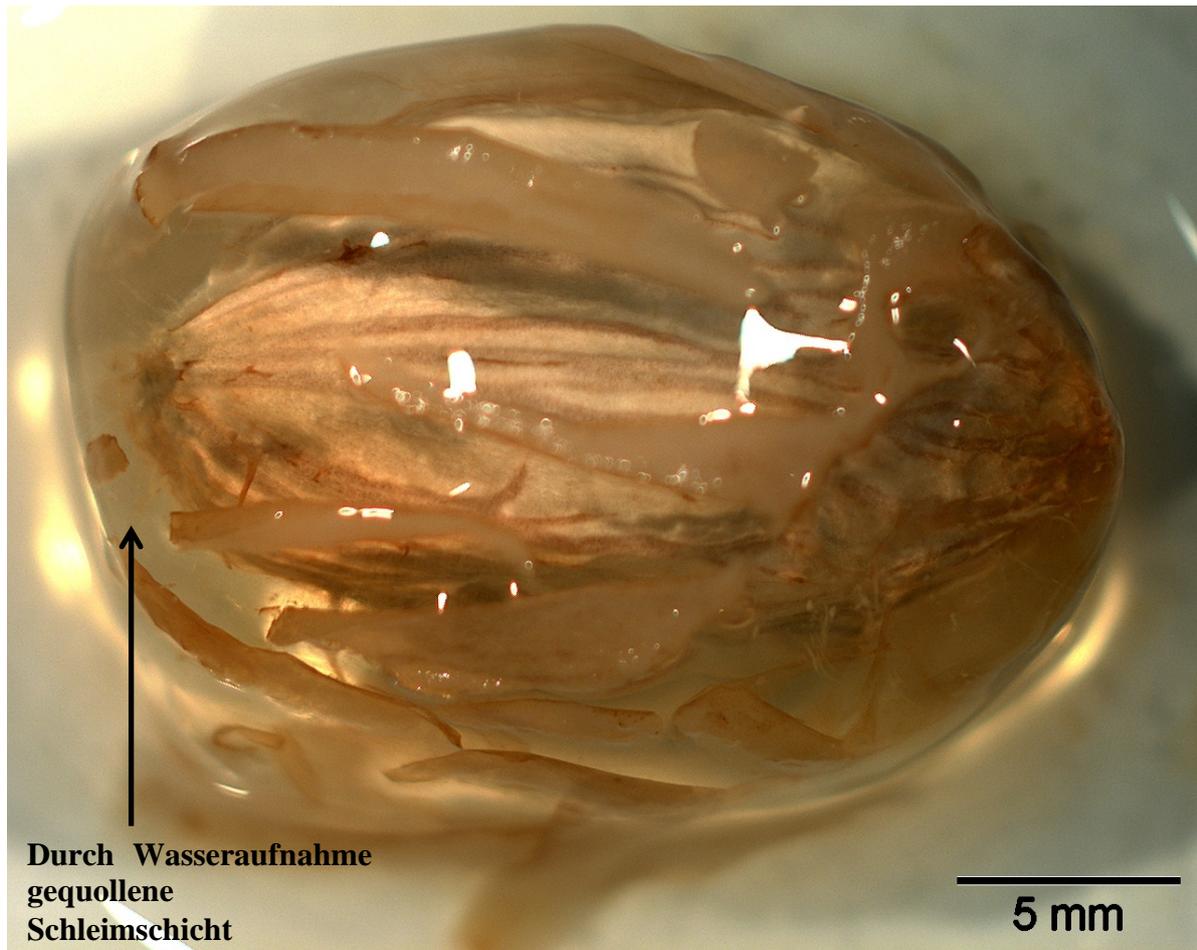


**Abbildung 5-99: Wasseraufnahmekapazität von Kakaosamen, Embryonen und entpulperten Kakaosamen über einen Zeitraum von 4 Tagen.**

Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. n=10.

### 5.3.1 Zuckerkomponenten des Schleims

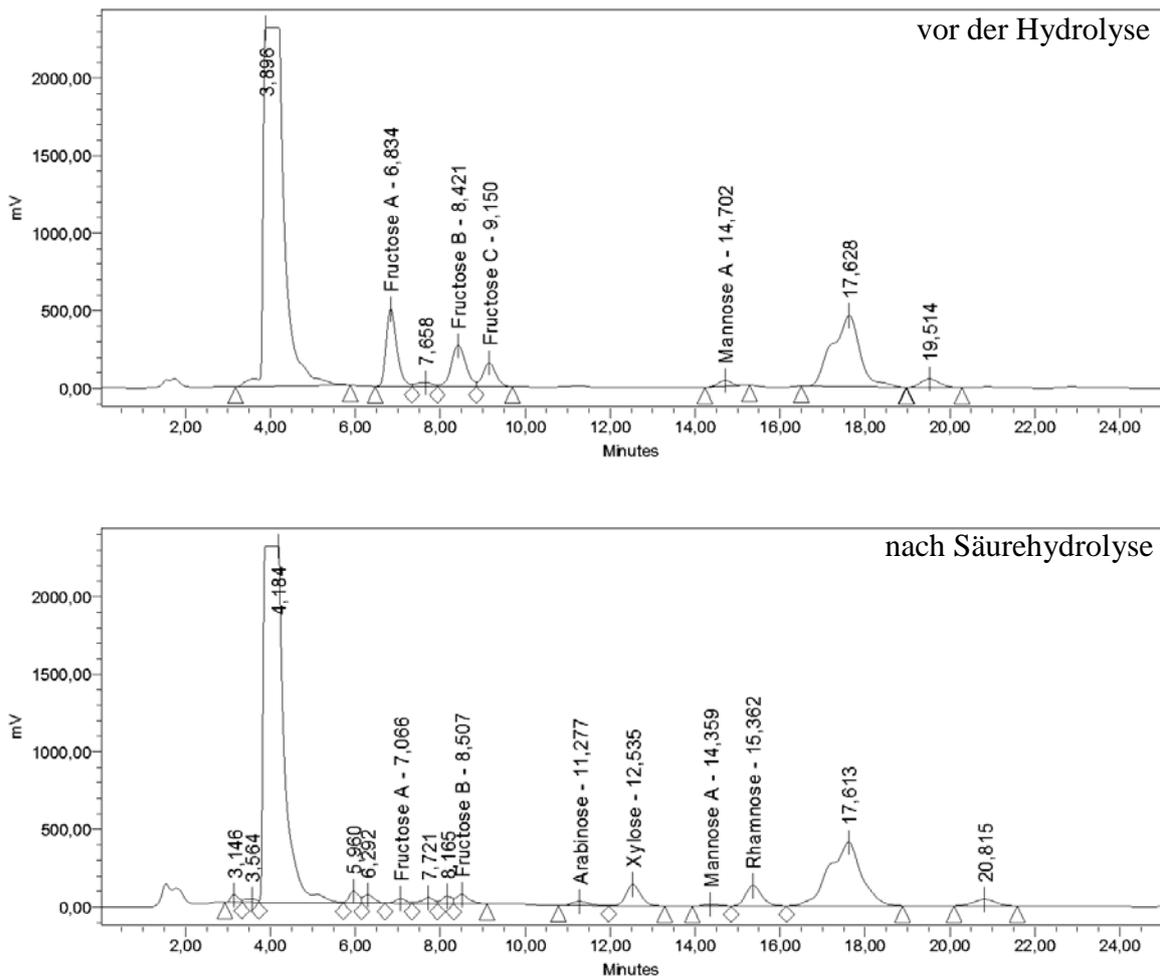
Eine HPLC-Analyse der Monosaccharide im Schleim zeigt, dass sich hier Fructose, Glucose, Mannose und ein unbekanntes Monosaccharid nachweisen lassen. Die Glucose ist Bestandteil des im Chromatogramm bei 17 Minuten-Retentionszeit sichtbaren Doppelpeaks zusammen mit dem unbekanntem Monosaccharid (s. Abbildung 5-101). Der Doppelpeak bildet sich, da beide Substanzen die Trennsäule der HPLC kurz nacheinander verlassen. Bei der Derivatisierung der Fructose mit Benzoylchlorid entstehen drei verschiedene Derivatisierungsprodukte, die sich in ihren chemischen Eigenschaften leicht unterscheiden. Daher erscheinen im HPLC-Chromatogramm drei Fructose-Peaks. Da die Gehalte an Glucose und Fructose nach einer sauren Hydrolyse des Schleims nicht ansteigen, stammen diese beiden Monosaccharide wahrscheinlich aus der Pulpa, die unter anderem Glucose und Fructose enthält (Forsyth und Quesnel, 1963). Sowohl Glucose wie auch Fructose gelangen wahrscheinlich während des enzymatischen Verdaus der Pulpa in den Schleim.



**Abbildung 5-100: Gequollene Schleimschicht eines entpulpten Kakaosamens nach 8 Stunden in Wasser**

Nach der Hydrolyse werden zusätzlich die Monosaccharide Xylose, Arabinose und Rhamnose nachgewiesen. Diese müssen also vorher in gebundener Form vorgelegen haben und wurden erst durch die Hydrolyse als Monosaccharide freigesetzt.

Da für die Analyse ausschließlich der innere Schleim der Testa verwendet wurde, müssen diese Monosaccharide Bestandteil des Schleimes sein. Wie und in welchen Mengenverhältnissen diese Zucker im Schleim miteinander verknüpft sind, müssen weitere Untersuchungen klären. Auch das Vorliegen eventuell vorhandener anderer Zucker oder Zuckersäuren im Schleim bedarf weiterer Analysen. Obwohl der Zuckeranteil nach der Hydrolyse nicht stark ansteigt, kann sein Anteil eventuell höher sein, da die Möglichkeit besteht, dass Zuckermoleküle durch die während der Hydrolyse verwendeten Säure zerstört wurden (Heimann, 1972).



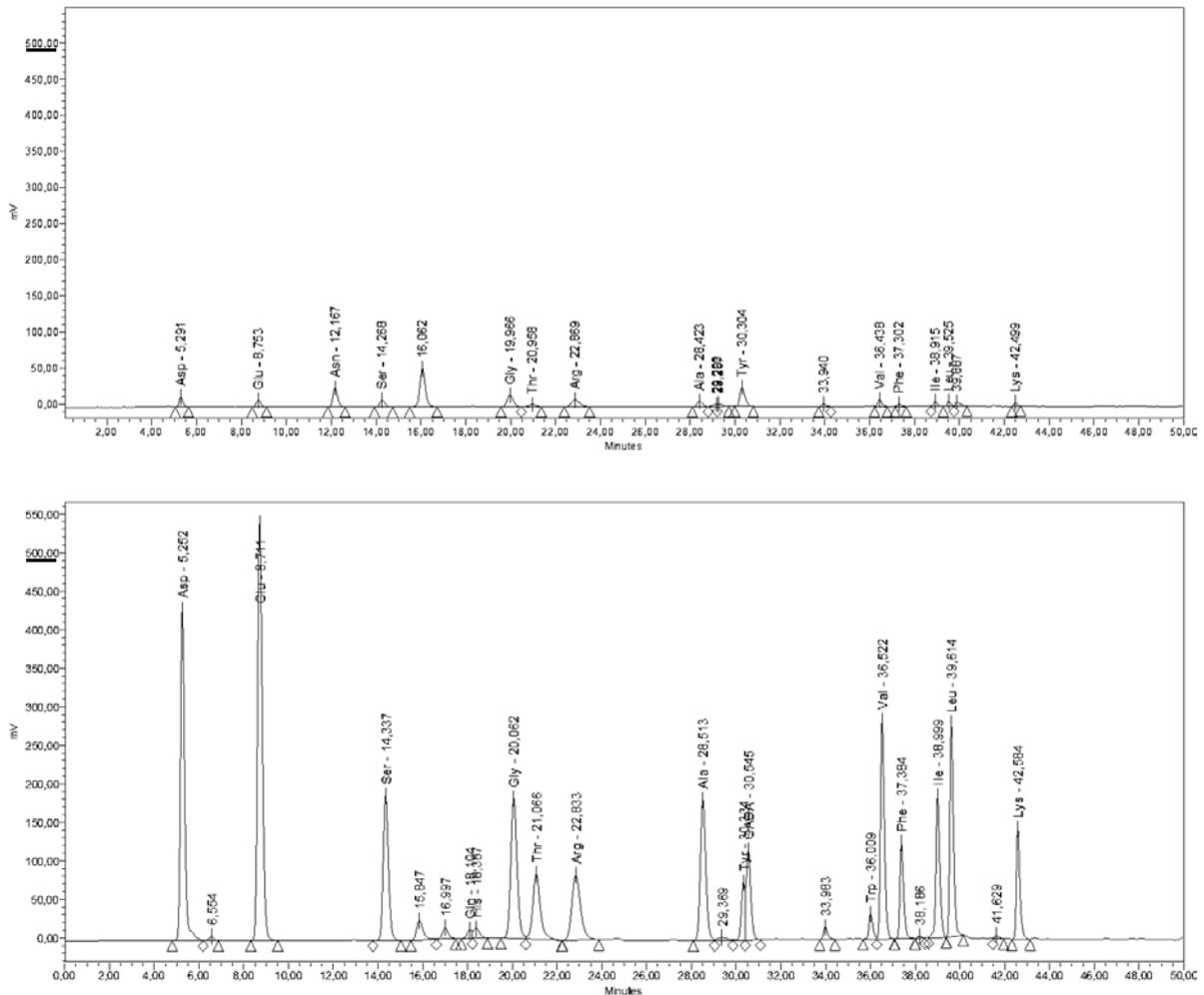
**Abbildung 5-101: HPLC-Chromatogramm der Monosaccharide im Schleim der Testa vor (oben) und nach (unten) der sauren Hydrolyse**

Der Doppelpeak nach 17 Minuten besteht aus Glucose und einem unbekanntem Monosaccharid.

### 5.3.2 Aminosäurezusammensetzung

Der Schleim enthält im unbehandelten Zustand nur geringe Mengen an freien Aminosäuren. Wird der Schleim mittels einer sauren Hydrolyse in seine Komponenten zerlegt, steigt der Gehalt der einzelnen Aminosäuren stark an (s. Abbildung 5-103).

Die höchsten Gehalte erreichen die Aminosäuren Glutaminsäure, Lysin und Asparaginsäure. Glutamin, Histidin und Tryptophan sind erst nach der Hydrolyse in detektierbaren Mengen vorhanden (s. Abbildung 5-102).



**Abbildung 5-102: HPLC-Chromatogramm der freien Aminosäuren im Schleim der Testa vor (oben) und nach (unten) der sauren Hydrolyse**

Die hohen Gehalte an freien Aminosäuren nach der Hydrolyse belegen im Gegensatz zu den gefundenen Zuckern, dass der Schleim Proteine enthält. Wie und ob die Proteine mit den Kohlenhydraten verbunden sind, bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Steigerung der Gehalte an Aminosäuren nach der Hydrolyse beweist, dass es sich nicht um einen Pflanzenschleim handelt, der ausschließlich aus vernetzten Polysacchariden besteht (s. Abbildung 5-103 und Abbildung 5-104). Das Vorhandensein von Proteinen legt die Frage nahe, ob eine weiterführende funktionelle Bedeutung des Schleims, zusätzlich zu der Wasserspeicherkapazität, vorliegt.

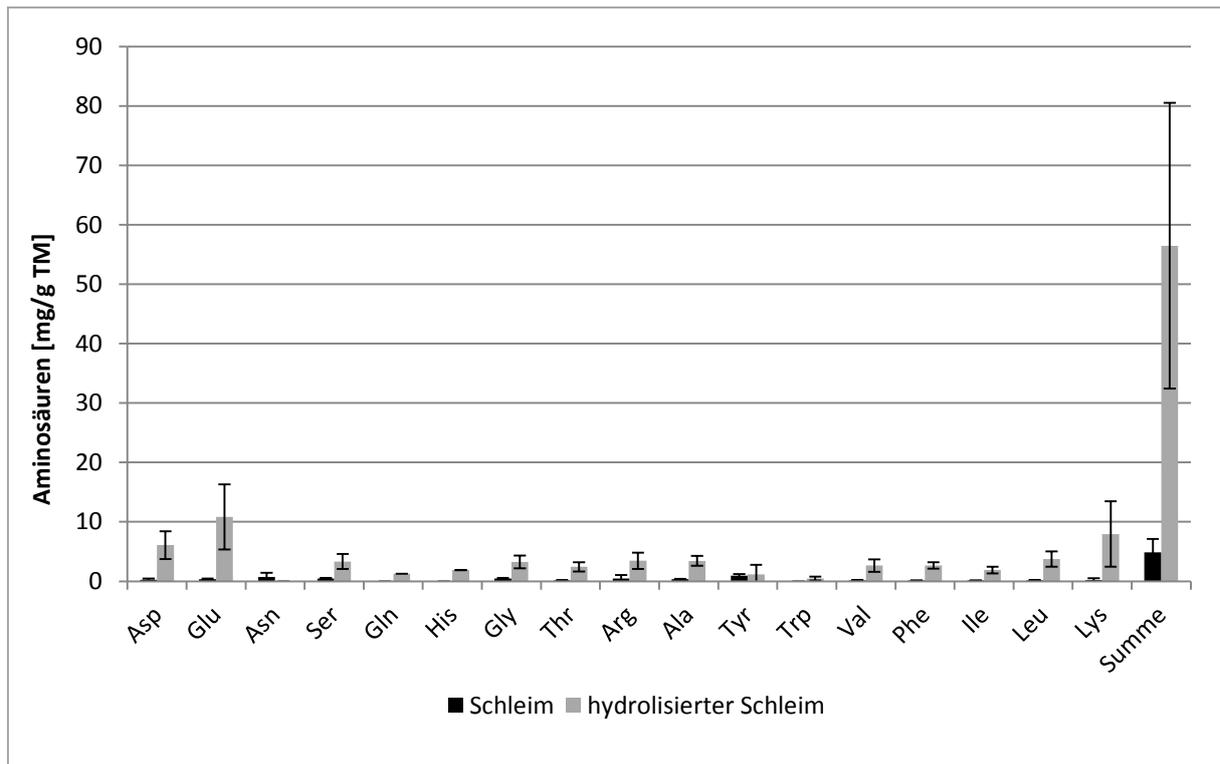


Abbildung 5-103: Gehalt an freien Aminosäuren und deren Summe vor und nach einer sauren Hydrolyse des Kakaoschleims.

n=2

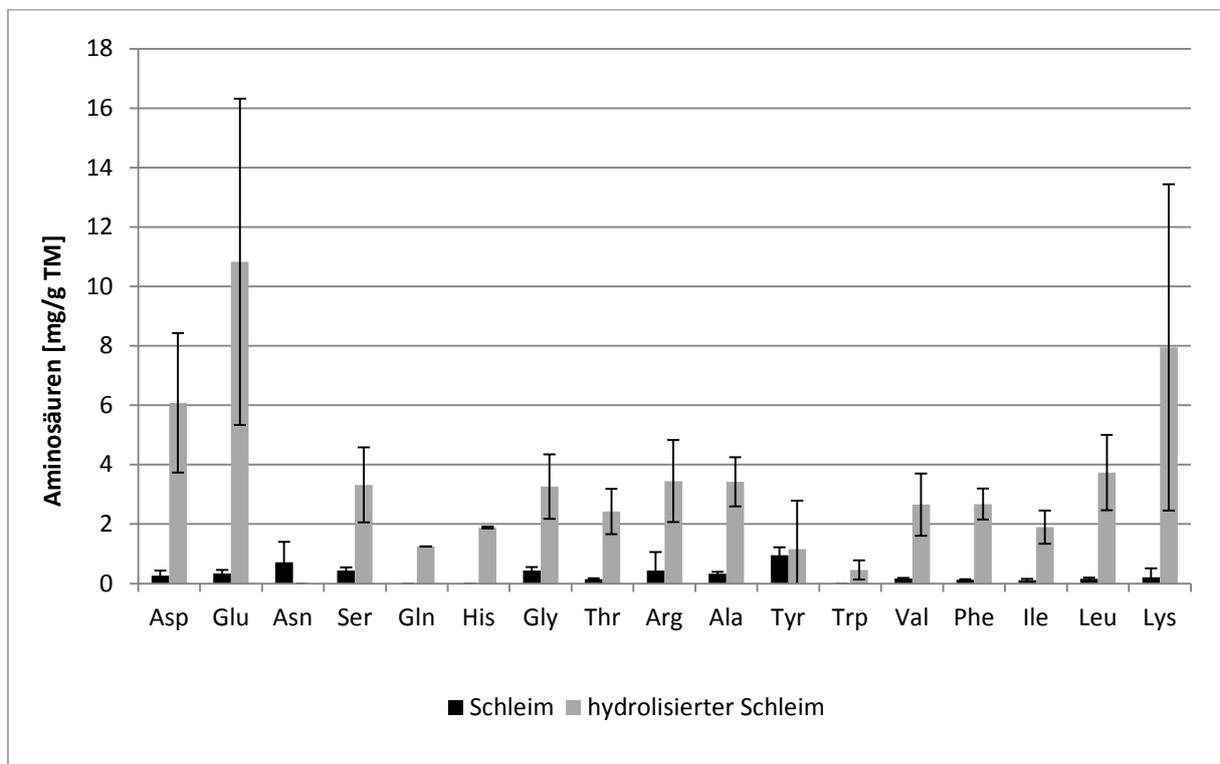


Abbildung 5-104: Gehalt der einzelnen freien Aminosäuren vor und nach der sauren Hydrolyse des Kakaoschleims.

n=2

Im Folgenden wird die Proteinfraction des Schleims nach dem Molekulargewicht getrennt und einzelne Proteine genauer charakterisiert.

### 5.3.3 Proteinidentifizierung durch Massenspektrometrie

Die Trennung der Schleimproteine erfolgte durch Auftragung auf SDS-Gele und anschließende Elektrophorese. Der Schleim enthält mehrere Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts (s. Abbildung 5-105). Die beiden Enzyme des Pectinex® BE XXL (Polygalacturonase und Pektinlyase), die zum Verdau der Pulpa eingesetzt wurden und eventuell als methodische Verunreinigung auftreten könnten, haben Molekulargewichte von ca. 40 und 50kDa. Die getrennten, aber nicht eindeutig identifizierten Proteine sind nach steigendem Molekulargewicht gereiht in Tab. 5-2 aufgeführt.

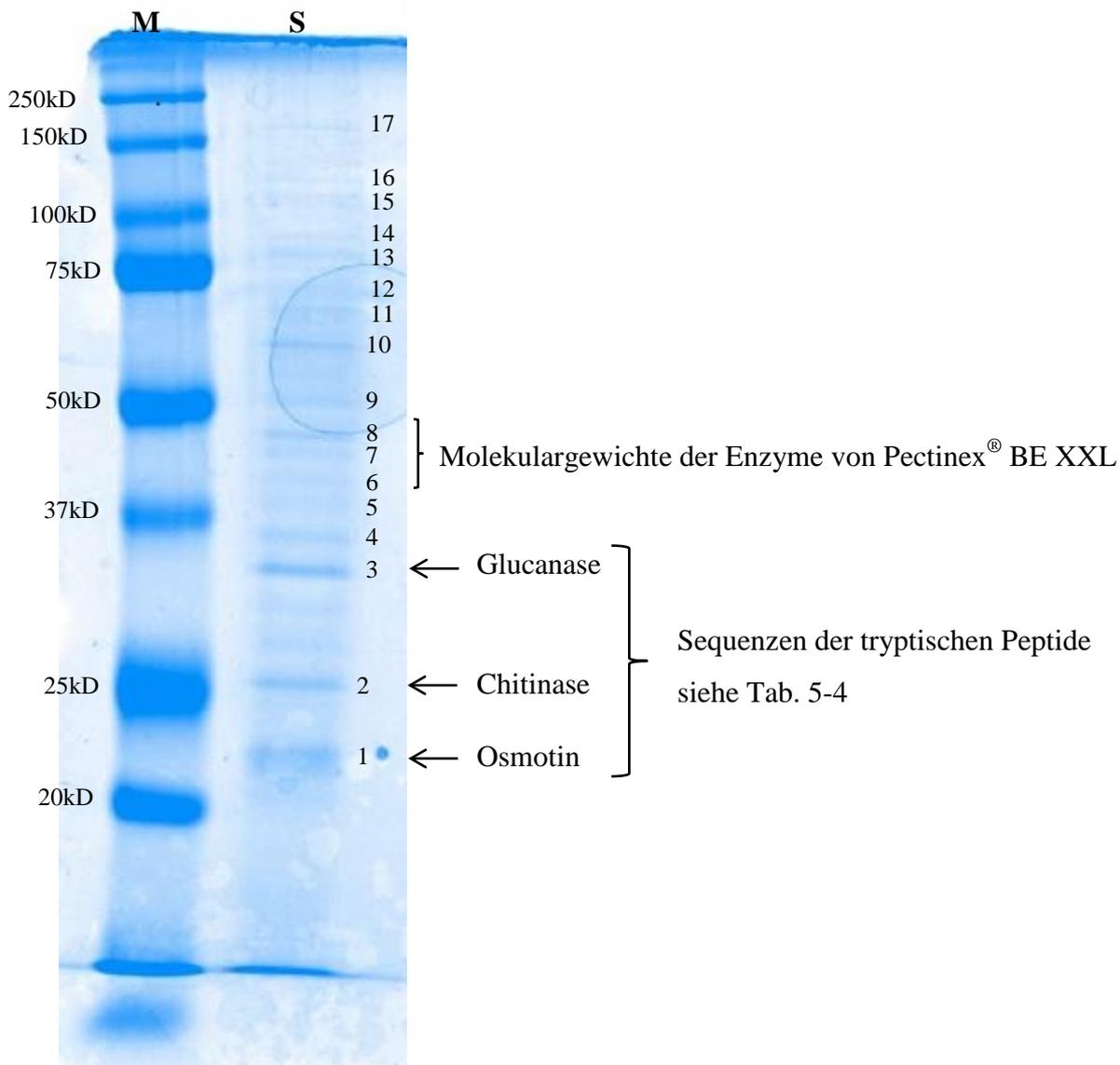
**Tab. 5-2: Auflistung der getrennten, jedoch nicht identifizierten Proteine des Schleims, sortiert nach aufsteigendem Molekulargewicht**

Protein	Größe [kDa]
4	ca. 35
5	ca. 38
6	ca. 40
7	ca. 45
8	ca. 47
9	ca. 50
10	ca. 60
11	ca. 70
12	ca. 74
13	ca. 80
14	ca. 90
15	ca. 110
16	ca. 120
17	ca. 160

Mittels Nanospray-Massenspektrometrie konnten nach einem Trypsinverdau der ausgeschnittenen Banden die Sequenzen der erhaltenen tryptischen Peptide in EST-Datenbanken von *Theobroma cacao* L. identifiziert werden. Aus diesen ESTs konnten die

Gesamtsequenzen der jeweiligen Proteine zusammengesetzt und durch Vergleiche mit anderen Spezies identifiziert werden. Folgende Proteine konnten anhand der entstehenden Peptide identifiziert werden: Chitinase, Osmotin und Glucanase.

Die mit Hilfe von EST-Datenbanken zusammengesetzten Sequenzen der betreffenden Proteine sind in der Tab. 5-3 aufgeführt.



**Abbildung 5-105: Gelelektrophorese des Schleimes der Kakaotesta**

S = Schleim, die Zahlen markieren die später mittels HPLC-MS identifizierten deutlich sichtbaren Proteine 1=Osmotin, 2= Chitinase, 3= Glucanase, 4-17 = unidentifizierte Proteine; M = Größenmarker

In der Tab. 5-4 finden sich die aus den EST-Sequenzen der Peptide abgeleiteten EST-Sequenzen der dazugehörigen Proteine. Alle neun Peptidsequenzen der Glucanase finden sich vollständig in der aus EST-Sequenzen zusammengesetzten Aminosäuresequenz des Proteins

wieder, das gleiche gilt für die vier Peptide des Osmotins. Bei der Chitinase finden sich 4 Peptide vollständig und 2 teilweise wieder.

Osmotin dient in Pflanzen als Osmoregulator und spielt auch in der Pathogenabwehr eine Rolle (Abin et al., 2011). Osmotin gehört zur PRP (pathogen-related proteins)-Familie. Osmotin hat eine fungizide Wirkung, die sich durch Lysis der Sporen, verhinderte Sporenkeimung und eine verringerte Überlebensfähigkeit der gekeimten Sporen auszeichnet (Abad et al., 1996).

**Tab. 5-3: EST-Sequenzen der Kakaoschleimpeptide und das dazugehörige Protein nach Massenspektrometrie**

<b>Protein</b>	<b>Sequenz der Peptide</b>
Chitinase	DLFNEMLK VQSYGDNLD IANVDLLNNDPAVAR SFGAFGTTGDTNTR AINVDLLNNDPAVAR GPIQISYNYNYGPAGK CYNQRPFA
Osmotin	CQTGDCGGVLECK PTSLFTCPTGTNYK GETWQISAAPGTTQAR NNCPYTVWAAAVPGGGR
Glucanase	LYPYFSYDDNSDIR AQNPVVSDPPLQYR AGGGSLEIVVSESGWPSAGGR VSTAITVTLGESFPPSK YIAVGNEVKPSDPAAR NAIVGAGLGNQIK FVVPAMQNIR LEGLAANQANANAWVQDNVR APLLVNLYPYFSYDDNSDIR

Ebenso wie das Osmotin ist auch die Chitinase in der Pathogenabwehr aktiv. Die Chitinase baut bei der Abwehr pathogener Pilze die neu synthetisierten Chitinketten ab (Kasprzewska, 2003).

Das dritte gefundene Protein, die Glucanase, gehört auch zu den PR-Proteinen. Versuche von Arlorio et al. (1992) haben ergeben, dass eine Kombination von Chitinase und Glucanase besonders effektiv gegen pathogene Pilze wirkt. Die Glucanase greift dabei ebenso wie die Chitinase die Zellwände der Pilzhyphen an.

Da alle drei gefundenen Proteine in den Pflanzen eine fungizide Wirkung ausüben, ist eine Beeinflussung der Hefen in der Fermentationsmasse durch den austretenden Schleim nach Abbau der pektinhaltigen Pulpa sehr wahrscheinlich.

#### **5.3.4 Wirkung des testaassoziierten Schleims in der Fermentation**

Der testaassoziierte Schleim (TA-Schleim) wird erst wirksam, nachdem die Pulpa abgebaut ist und wässriges Medium bis an die Schleimkavernen gelangen kann. Dann wird in großen Mengen eine Schleimhülle um den Samen gebildet, die dann den Samen mit einer durchgehenden Schicht umgibt. In dieser Hülle befinden sich Proteine, u.a. auch Enzyme mit pilzzellwandabbauenden Eigenschaften, die Chitinase und die Glucanase.

Somit muss davon ausgegangen werden, dass in dieser Phase der Keimung bzw. der Fermentation eine biochemische Kontrolle des Pilzwachstums stattfindet. Bei einem Pilzhemmtest, in dem auf plattiertem Pilzaufwuchs mit den isolierten Pilzen *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Mortierella isabellina*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium purpurogenum*, *Penicillium roquefortii*, *Candida krusei*, *Candida lipolytica*, *Candida guilliermondii*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* Filterpapierscheiben mit steigenden Konzentrationen an TA-Schleim belegt wurden, ließen sich konzentrationsabhängig Hemmhöfe erzielen. Somit ist die pilzhemmende Wirkung des Schleimes eindeutig belegt. Die höchste Verdünnung des Schleims, ausgehend von lyophilisiertem Schleim, mit deutlicher Hemmwirkung lag bei 10mg/ml, vor allem bei Hefen (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula rubra*, *Candida lipolytica*) (Fahrurrozi et al., 2013).

Der Hemmtest mit Bakterien war in jedem Fall negativ, dies gilt für Milchsäurebakterien und Essigsäurebakterien sowie einer Auswahl grampositiver und – negativer Bakterien (Fahurrozi et al., 2013).

**Tab. 5-4: Identifizierte Proteine und deren abgeleitete EST-Sequenzen**

Fett sind die gefundenen Sequenzen aufgeführt, die sich vollständig in den EST-Sequenzen des entsprechenden Proteins wiederfinden, in grau die gefundenen Sequenzen, die nur teilweise übereinstimmen.

<b>Protein</b>	<b>Abgeleitete EST-Sequenz</b>
Osmotin	MSSFKTLPTLSFLFVTLFSLAHAATFDIRNNCPYTVWAAAVPGGGRRM NRGETWQISAAPGTTQARIWARTNCQFDASGRGKCQTGDCGGVLE <b>CKGYGSP</b> PNTLAEYAIGQFANQDFIDISNIDGFNVPMEFSSNSPGCTRVI KCTADIVGQCPNELKVPGGCNGPCPVFKTEEHCCNSGNCGPTNFSKFFK DRCPDAYSYPKDD <b>PTSLFTCPTGTNYKVIFCPS</b> Stop
Chitinase	MRFLTLLVACILASLSRALADITPLISR <b>DLFNEM</b> LKHRNDANCPGNGFY TYDGFIAAANS <b>SFGAFGTTGDVD</b> TRKREIAAFLAQTSHETTGGWATAP DGPYAWGYCFVQEQQNPGDYCVASQEWPCVPGKKYFGR <b>GPIQIS</b> YNY <b>NYGPAGKAINVDLLNPD</b> AVARDPTISFKTALWFWMTPQSPKPSCHD VITGQKPSAQDTAAGRVPGYGVITNIINGGIECGKGSNPQVEDRIGFYKR YCDIL <b>QVSYGD</b> NLD <b>CYNQR</b> PFAS <b>Stop</b>
Glucanase	MGKSYLAGNFGFMAS <b>TMLL</b> FGLLVASLRTTSAQVGVCYGM <b>LGNN</b> LPP RPEVIALFNQRNIRRMRLYGPDKPALEALRGSNIELMLGVPNDKLEGL AANQANANA <b>WVQDN</b> VRNYGNVKFRYIAVGNEVK <b>PSDPAARFV</b> VPA <b>MQNIR</b> NAIVGAGLGN <b>QIKV</b> STAITVTLGES <b>FPPSKGS</b> FRPDYRPLLD PIIRFLVNNK <b>APLL</b> VNLYPYFSYDDNS <b>DIRLDYALFKAQNPV</b> VSD <b>PPL</b> <b>QYRN</b> LFDAILDVYA <b>ALEKAG</b> GS <b>LEIV</b> VSESG <b>WPSAGGR</b> KRGATNI DNARTYNQNLIQVKPPGKPIEAYIFAMFDENNKQGE <b>EIER</b> HWGLFLPNK QPKYPIN <b>FN</b> Stop

Neben einer potentiellen Bedeutung des TA-Schleims in der Keimungsökologie des Kakaos als potentielle Schutzschicht ist vor allem wichtig zu erfassen, inwieweit der TA-Schleim während der unterschiedlichen Phasen der Fermentation einen steuernden Einfluss auf die mikrobiell gesteuerten Prozesse hat. Insbesondere die Hemmung der an der frühen Phase der Fermentation beteiligten Hefen muss dringend untersucht werden. Eine spätere steuernde Wirkung des Schleims als Regulator der frühen Prozesse ist nicht auszuschließen.

## **6 Diskussion**

### **6.1 Steuerung der samenbürtigen Aromavorstufen mittels externer Faktoren**

Die Fermentation nimmt eine Schlüsselfunktion in der Produktion von Rohkakao ein. Frische Kakaosamen weisen kein Schokoladenaroma auf und entwickeln während der Röstung auch kein Aroma aus entsprechenden Vorstufen. Fermentierter Rohkakao enthält dagegen Aromavorstufen, aus denen sich während der Röstung das typische Schokoladenaroma entwickelt (Rohan, 1964). Die Entstehung der Aromavorstufen basiert auf einer Kette von biochemischen Prozessen, die neben dem Abbau der Speicherproteine (Voigt et al., 1994a) auch eine Verringerung der im Kakaosamen vorhandenen Polyphenole bewirken. Ebenso nehmen die Pyrazine während der Dauer der Fermentation zu. Pyrazine sind ebenfalls wichtige Aromakomponenten im Rohkakao, da sie bis zu 40% der im Kakaoaroma identifizierten Substanzen ausmachen (Hashim et al., 1998). Die biochemischen Prozesse werden durch die in der Fermentationsmasse ablaufenden mikrobiellen Prozesse beeinflusst, die zu einer Temperaturerhöhung und zur Bildung von Milch- und Essigsäure führen. Bei den traditionellen Fermentationen in den Anbauländern des Kakaos stirbt der Kakaosamen durch die Temperaturerhöhung während der Essigsäurebildung und an der Säure selber ab. Dies führt zu einer Aufhebung der Zellkompartimente im Samengewebe (Hoskin et al., 1980). Die Aufhebung der Membranstabilität hat zur Folge, dass vorher getrennt vorliegende Substanzen im gleichen Reaktionsraum gemischt werden und miteinander wechselwirken können. Ebenso wie bei der Fermentation werden während der Inkubation der Kakaosamen ebenfalls die Kompartimente durch Säure- und Temperatureinfluss aufgehoben (Lux, 2011).

#### **6.1.1 Einfluss der externen Faktoren**

Die unter kontrollierten Bedingungen durchgeführten Inkubationen erreichen in Bezug auf die untersuchten Indikatoren (freie Aminosäuren und Polyphenole) gleiche oder sogar bessere Ergebnisse als bei der Fermentation. Biehl und Passern haben bereits 1982 nachgewiesen, dass die Aromavorstufen auch bei der Autolyse der isolierten Proteinfraction gebildet werden, d.h., ohne die Mitwirkung von Mikroorganismen. Auch während der Inkubationen erfolgt die Bildung der Aromavorstufen ohne Beteiligung von Mikroorganismen.

Durch Zugabe der Säure gleich zu Beginn der Inkubationen kann die Zeit bis zum Erreichen fermentationsähnlicher Gehalte an freien Aminosäuren deutlich reduziert werden. Bereits nach 48 bis 72 Stunden werden bei einigen Inkubationen Gehalte an freien Aminosäuren erreicht, die bei Fermentationen erst nach 5 Tagen erzielt werden. Diese Verkürzung der Reaktionszeit beruht darauf, dass der zeitaufwändige mikrobielle Bildungsprozess der Säuren in der Fermentationsmasse durch Mikroorganismen übersprungen wird.

Durch die Zeitersparnis und die Möglichkeit der externen Steuerung bietet die Inkubation gegenüber der Fermentation zahlreiche Vorteile, da so Rohkakao einer gewünschten Qualität unter kontrollierten Bedingungen produziert werden kann, zusätzlich ist sie witterungsunabhängig und nicht von der Besiedelung und dem Wachstum von Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukten abhängig. Eine Steuerung der Fermentation durch Mikroorganismen wie bei Lefeber et al. (2012) ist bei der Inkubation unnötig, da hier die Steuerung direkt über die chemischen und physikalischen Parameter erfolgt. Potentielle Einflüsse, positiv oder negativ, von abgegebenen sekundären Stoffwechselprodukten der Mikroorganismen werden während der Inkubation ausgeschlossen. Ein Teil der Zeitersparnis gegenüber der Fermentation beruht wahrscheinlich auf der Tatsache, dass die Säuren bereits zu Beginn der Inkubation zugegen sind und nicht erst aus dem entstehenden Alkohol während der Fermentation gebildet werden müssen. So ist direkt nach dem Öffnen der Mikropyle in der Samenschale, ca. 48 Stunden nach Beginn der Inkubation, Säure zum Ansäuern des Samengewebes vorhanden. Nach 48 Stunden sind in einer Fermentation erst geringe Säuremengen gebildet worden. Da die Ansäuerung des Samengewebes eine Aktivierung und Steigerung der Aktivität der Aspartylendoprotease bewirkt (Biehl et al., 1985), ist diese Freisetzung während der Inkubation durch die dauerhafte Anwesenheit der Säure begünstigt. Die Aspartylendoprotease spielt eine zentrale Rolle bei dem Abbau der Speicherproteine und bildet die erste Stufe zur Freisetzung der Aromavorstufen aus den Speicherproteinen.

Die Entwicklung der verschiedenen Indikatoren (vor allem die Menge an freien Aminosäuren) ist von der Art der Säure, deren Konzentration und pH-Wert sowie der Temperatur abhängig. Im Falle der Temperatur führt eine durchgehende Temperatur von 60°C zu einer drastischen Schädigung des Samens, die sich dadurch bemerkbar macht, dass a) keine enzymatische Freisetzung von freien Aminosäuren stattfindet und b) die phenolischen Substanzen ausgeschwemmt werden und nur noch Restmengen im Samen verbleiben. Temperaturen unterhalb von 50°C führen nur zu einer geringen Gewebeschädigung und weisen entsprechend höhere Gehalte an freien Aminosäuren auf, was auf eine entsprechende

Enzymaktivität im Samen schließen lässt. Ebenso folgt der Abbau der phenolischen Substanzen einem anderen Verlauf, da je nach gewählter Temperatur die Aufhebung der Zellkompartimentierung später oder gar nicht auftritt. Im lebenden Samen sind die Polyphenole in den Vakuolen spezialisierter Phenolzellen gespeichert (Forsyth und Quesnel, 1963). Das sie oxidierende Enzym, die Polyphenoloxidase (PPO), befindet sich außerhalb der Vakuole in den Chloroplasten bzw. im Cytoplasma dieser Zellen. Durch das Absterben der Samen während der Fermentation wird die Zellkompartimentierung und damit die räumliche Trennung der PPO und ihrer Substrate aufgehoben. Die Freisetzung der Polyphenole führt, neben der durch die Aufhebung der Kompartimentierung ermöglichten Oxidation der Polyphenole durch die PPO, zu einer Vergerbung vorhandener Proteine durch die Polyphenole zu unlöslichen Komplexen (Wong et al., 1990) und verringert dadurch die Konzentration adstringierend wirkender freier Polyphenole. Beide Prozesse führen zu einer Senkung des Polyphenolgehaltes und damit zu einer Abnahme der Adstringenz im Endprodukt (Misnawi et al., 2002). Allerdings verfügen die Polyphenole auch über ein antioxidatives Potenzial, dass durch ihre chemische Veränderung ebenfalls verringert wird.

Temperaturverläufe sowie Inkubationen bei konstanten Temperaturen führen nach 48 Stunden zu Veränderungen in den Gehalten an freien Aminosäuren und phenolischen Substanzen. Die Verläufe der Gehalte an freien Aminosäuren und Polyphenolen verändern sich zu diesem Zeitpunkt in der Rate der Zu- bzw. Abnahme. Bei konstanten Temperaturen unter 50°C steigt der Gehalt an freien Aminosäuren weiter an, während er bei den Temperaturverläufen aufgrund der Temperaturerhöhung auf 50°C bzw. 55°C absinkt. Außerdem tritt bei den konstanten Temperaturen nach 48 Stunden auch eine Verlaufsveränderung auf, daher kann dies nicht ausschließlich auf der Temperaturerhöhung beruhen. Die Untersuchungen zur Veränderung der Testa während der Inkubation haben ergeben, dass nach 48 Stunden Risse um die Mikropyle in der Testa auftreten. Dadurch kann nach 48 Stunden ein freier Stoffaustausch stattfinden, der sich offenbar direkt auf die Bildung der freien Aminosäuren und der Abbau der phenolischen Substanzen auswirkt. Werden die Samen bei einer mäßigen Temperatur von 41°C und einer Säurekonzentration von maximal 300mM inkubiert, bleibt die Zellkompartimentierung über die gesamte Inkubationszeit erhalten, was dazu führt, dass zum einen die Proteolyse der Speicherproteine kontinuierlich erfolgt und zum anderen der Abbau der phenolischen Substanzen verringert ist, da diese nur in geringem Maße ausgeschwemmt und kaum durch die Polyphenoloxidase oxidiert werden.

Neben der Temperatur beeinflussen auch die Art der Säure, deren Konzentration und der pH-Wert die verschiedenen Indikatoren. Im Falle des pH-Wertes, der Säurecharakteristik und

Säurekonzentration wird für die Indikatoren freie Aminosäuren und phenolische Substanzen je nach Säure eine unterschiedliche Antwort erhalten.

Durch die unterschiedliche Diffusionsgeschwindigkeit von Milch- und Essigsäure innerhalb der lipophilen Phase im Gewebe des Kakaosamens (Lux, 2011) bleiben mit Milchsäure im Inkubationsmedium mehr phenolische Substanzen erhalten, wohingegen mit Essigsäure die Gehalte an freien Aminosäuren höher sind, was darauf hindeutet, dass die Proteolyse der Speicherproteine durch die Essigsäure gefördert wird, evtl. durch eine stärkere Ansäuerung des Speichergewebes.

Eine Ansäuerung des Gewebes während der Inkubation mit einer Säurekonzentration von über 300mM bedingt wahrscheinlich eine Schädigung des Gewebes, die zu einer Verminderung der Proteolyse und zu einer Aufhebung der Zellkompartimentierung führt, da die Indikatoren freie Aminosäuren und phenolische Substanzen geringere Gehalte bei diesen Säurekonzentrationen aufweisen.

Durch die Ansäuerung des Gewebes aufgrund der während der Inkubation verwendeten Säuren verändert sich im Laufe der Zeit der pH-Wert im Gewebe, er sinkt. Die im Samen vorhandene Aspartylendoprotease hat ein pH-Optimum von 3,4 (Biehl et al., 1991) und mit sinkendem pH-Wert nimmt ihre Aktivität zu. Die entstehenden Peptide wiederum puffern die eingedrungene Säure im Gewebe ab und der pH-Wert steigt wieder an. Das zweite Enzym, das am Abbau der Speicherproteine im Kakaosamen beteiligt ist, die Carboxypeptidase, hat ein pH-Optimum von 5,8 (Voigt et al., 1994a, Kratzer et al., 2009, Stoll, 2010).

Der pH-Wert des Inkubationsmediums wirkt sich auf die Indikatoren schwächer aus als die Säurekonzentration des Mediums. Trotzdem erfolgt die Proteolyse bei einem pH-Wert unter 4,5 in einer etwas höheren Rate. Dies ist wahrscheinlich durch ein beschleunigtes Absinken des pH-Wertes im Samengewebe bedingt verglichen mit der Ansäuerungsgeschwindigkeit des Samengewebes bei einem höheren pH-Wert des Inkubationsmediums. Ein Einfluss des pH-Wertes auf den Abbau der Polyphenole ist kaum vorhanden. Die Stabilisierung der Polyphenole erfolgt wahrscheinlich durch die Ansäuerung an sich.

Die höchsten Gehalte an freien Aminosäuren werden bei einer konstanten Temperatur von 41°C in einem Zeitrahmen von 48-72 Stunden erreicht. Mit einem Inkubationsmedium aus 100mM – 300mM Essigsäure und einem pH-Wert unter 4,5 weisen die Kakaosamen Gehalte an freien Aminosäuren von über 20mg/g ffTM und über 8mg/g ffTM an hydrophoben Aminosäuren auf.

Das meiste Epicatechin als „Repräsentant“ der Polyphenole bleibt bei einer konstanten Temperatur von 37°C und nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden mit einem Medium aus 100mM Milchsäure bei einem pH-Wert von 4,4 erhalten.

Schon diese beiden Substanzgruppen machen deutlich, dass sich durch die Inkubation der Kakaosamen nicht nur gleiche und sogar höhere Gehalte an Aromavorstufen im Kakaosamen erzeugen lassen wie mittels herkömmlicher Fermentationen, sondern auch zeitlich gesehen erreichen lassen, nämlich nach nur 72 Stunden anstatt nach 4-6 Tagen.

### **6.1.2 Einfluss der Mikroorganismen auf die Fermentation**

Während der Fermentation bauen Mikroorganismen die Pulpa des Kakaosamens ab und es werden Alkohol, Milchsäure und Essigsäure gebildet, die einen maßgeblichen Einfluss auf die im Samen stattfindende Bildung der Aromavorstufen haben. Bei der Inkubation hingegen kann dieser Prozess durch die direkte Zugabe der entsprechenden Säuren und durch die Regulierung der Temperatur auch ohne mikrobiellen Einfluss erreicht werden.

Die an der Fermentation beteiligten Mikroorganismen können allerdings zusätzlich zu Alkohol und Säuren weitere Stoffwechselprodukte bilden, die eventuell das spätere Aroma des Rohkakaos beeinflussen (Schwan und Wheals, 2004). Um zu klären, ob diese Metaboliten eine Veränderung des Aromapotentials bewirken, sollten in Zukunft Inkubationen unter Zugabe solcher in Frage kommender Schlüsselsubstanzen durchgeführt werden.

Zusätzlich ist neben dem Abbau der Pulpa auch eine Degradation der Testa durch die Mikroorganismen denkbar. Dies würde die Permeabilität der Testa und damit die Dynamik des Stoffaustausches verändern. Beides sind wichtige Faktoren für die biochemischen Prozesse innerhalb des Samengewebes, die weitergehende Untersuchungen erfordern.

Die Schwierigkeit bei der Durchführung einer Inkubation anstelle einer Fermentation ist in den Anbaugebieten das Aufrechterhalten der konstanten Temperatur über 72 Stunden. Da sowohl die Temperatur, die sich als optimal für die Freisetzung der Aminosäuren erwiesen hat, als auch die Temperatur zum Erhalt der Polyphenole über der Durchschnittstemperatur liegen, ist eine externe Wärmequelle notwendig. Bei den konventionellen Fermentationen erfolgt die starke Erhöhung der Temperatur durch die exotherme Oxidation des von Hefen gebildeten Alkohols durch Essigsäurebakterien zu Essigsäure. Diese Reaktion führt zu einer deutlichen Temperaturerhöhung innerhalb der Fermentationsmasse. Da bei den Inkubationen

kein Alkohol zu Verfügung steht, sondern gleich die Säure zur Anwendung kommt, kann keine Temperaturerhöhung durch diesen exothermen Prozess erfolgen und eine andere Energiequelle muss daher zum Einsatz kommen. Es wäre denkbar, mit Sonnenenergie einfache Systeme zur Temperaturerhöhung zu erstellen.

## **6.2 Einfluss der Testa auf den Inkubationsverlauf**

Die Samenschale des Kakaosamens dient dem Schutz des Embryos vor mechanischen Beschädigungen und stellt auch eine physikalische Barriere für Mikroorganismen zum Schutz der nährstoffreichen Speicherkotyledonen dar. Neben dieser ökologischen Bedeutung nimmt die Testa auch Einfluss auf den Verlauf der Inkubationen. Die Pulpa hat dagegen nur eine untergeordnete Bedeutung für die Bildung der sameneigenen Aromavorstufen, da sich die Inkubationen mit unbehandelten Samen und entpulpten Samen nur geringfügig in ihren Gehalten an freien Aminosäuren, hydrophoben Aminosäuren, GABA und Polyphenolen unterscheiden (s. Kap. 5.1). Im Gegensatz dazu weisen Samen ohne Testa teilweise deutliche Unterschiede zu den beiden anderen Varianten auf. Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass nicht die Pulpa, sondern die Testa die Funktion einer Barriere hat. Allerdings kann auch der in der ersten Subepidermalschicht der Testa befindliche testaassoziierte Schleim (TA-Schleim) eine Kontrollschicht in Bezug auf den Stoffaustausch darstellen. Der TA-Schleim bildet ebenso wie die schleimige Pulpa eine Transferbarriere für Substanzen des Inkubationsmediums zum Embryo. Diese Funktion besteht für die endogen erzeugten Komponenten, wie den durch den Speicherproteinabbau gebildeten freien Aminosäuren und die durch die Degradation der Polyphenole entstehenden Substanzen. Für weitere Aromakomponenten, z.B. Linalool (Amores, 2006), die aus der Pulpa nach ca. 72 Stunden in den Embryo gelangen, ist diese Funktion nicht gegeben, da sich diese Substanzen in der Pulpa befinden und mit der Degradation der Pulpa entfernt werden.

Der Unterschied von Samen mit und ohne Pulpa zu den Samen ohne Testa zeigt auch, dass die Testa einen bedeutenden Einfluss auf den Inkubationsverlauf hat, zumindest auf den Stoffaustausch.

Während der Inkubation ist die Testa eine natürliche Barriere zwischen dem Inkubationsmedium und dem Embryo. Da die Testa zu Beginn der Inkubation undurchlässig ist, kann zu diesem Zeitpunkt nur mit Faktoren, die nicht auf einem Stoffaustausch basieren, wie z. B. der Temperatur, Einfluss auf die Vorgänge im Inneren des Samens genommen

werden. Dieser Status ist in den ersten 48 Stunden der Inkubation gegeben, danach bilden sich in der Nähe der Mikropyle-Region Risse in der Testa, so dass ein Stoffaustausch durch die Testa möglich wird. Die Risse entstehen vermutlich durch die Streckung der Radicula, da diese zunächst rein physikalisch Wasser aufnimmt, quillt und dabei die Testa durchbricht. Nach 48 Stunden ist somit eine Beeinflussung der endogenen Prozesse im Samen durch Faktoren möglich, die auf einem Stoffaustausch beruhen, wie z.B. die Art der Säure und dem pH-Wert. Diese Hypothese, dass erst 48 Stunden nach Beginn der Fermentation ein Eintransport aus dem Fermentationsmedium stattfinden kann, hat indirekt Amores (2006) erhärtet. Er hat an Feinkakaosamen gefunden, dass die Aromakomponente Linalool erst nach 72 Stunden im Rohkakao nachweisbar ist, nicht aber nach 24 und 48 Stunden.

Eine andere Möglichkeit wäre prinzipiell ein Transport von Inkubationsmedium über die Raphe ins Innere des Samens. Dies wird jedoch zum einen durch die blind endenden Leitbündel in der Testa behindert, die den Samen umschließen und zum anderen dadurch, dass im Bereich der Chalaza keine direkte Verbindung des Leitbündels der Raphe zu den hier entspringenden Leitbündeln des Samens existiert (Rinas, 2010). Ein Quertransport durch die Testa, unabhängig von den Leitbündeln, stoppt an der Sklereidschicht, die das äußere Integument vom inneren trennt. Andersson et al. (2006) konnten nachweisen, dass diese Schicht für den Fluoreszenztracer Lucifergelb CH, der eine ähnliche Dissoziationskonstante besitzt wie Essigsäure, undurchlässig ist. Diese einzelnen Indizien lassen den Schluss zu, dass der Samen in den ersten 48 Stunden ein in sich geschlossenes System darstellt und als eigenständiger Reaktionsraum zu verstehen ist. Für die anfängliche Undurchlässigkeit der Testa spricht auch die Beobachtung, dass die Violettverfärbung und später die Verbräunung des Samengewebes während der Fermentation an der Mikropyle beginnt, dann entlang der Samenschale auftritt und erst spät die Außenbereiche erreicht (Rohsius et al., 2006). Wäre ein Transport der Säuren durch die Testa möglich, müsste die violette Verfärbung und später die Verbräunung in den Außenbereichen des Samens beginnen.

Die Temperatur der Inkubation innerhalb der ersten 48 Stunden hat einen entscheidenden Einfluss auf die biochemischen Abläufe innerhalb des Kakaosamens. Aufgrund der geschlossenen Samenschale während dieses Zeitraumes können die sameninternen Abläufe primär durch die Temperatur gesteuert werden. Diese Beobachtung lässt die Schlussfolgerung zu, dass auch während der Fermentationen von Kakao die Temperaturentwicklung zu Beginn der Fermentation einen wesentlichen Einfluss auf die Qualität des Rohkakaos hat. Die Gehalte an freien Aminosäuren sind bei der Verwendung einer konstanten Temperatur von 41°C am höchsten, außerdem werden hohe Gehalte an freien Aminosäuren während der Inkubationen

schon nach 72 Stunden erreicht. Um eine gute Rohkakaqualität mittels Fermentation zu erreichen, sollte also die Fermentationstemperatur innerhalb der ersten 24-48 Stunden auf einen Wert von über 40°C steigen. Diese Temperatur wirkt sich positiv auf die Enzymaktivitäten der die Speicherproteine abbauenden Enzyme aus und damit auch auf die Freisetzung der Aromavorstufen, die freien Aminosäuren und Peptide. Die bisherigen Ausführungen belegen einen bedeutenden Einfluss der Testa auf die Abläufe innerhalb des Kakaosamens und dem Stoffaustausch während der Fermentation und Inkubation.

Eine noch zu klärende Fragestellung ist die nach der Morphologie der Testa bei verschiedenen Genotypen des Kakaos. Die Zeiträume für die Fermentationen von Massenkakao und Edelkakao sind nach Lopez und Dimick (1995) deutlich verschieden. Dies kann ein Hinweis auf eventuelle Unterschiede der Testae von Edelkakao, wie Criollo und Nacional, zu der Testa von Forasterokakao sein. Samen von Edelkakaoklonen werden ca. 3 Tage fermentiert, während die Fermentationen von Massenkakaoklonen bis zu 7 Tagen dauern können (Lopez und Dimick, 1995). Neben dem Erhalt der Fruchtaromen bei der Edelkakaofermentation könnte auch eine andersartige Permeabilität der Testa für die kurze Fermentationsdauer verantwortlich sein.

Sowohl Testa als auch Pulpa werden aus rein maternalem Gewebe der Samenanlage und der Fruchtblätter gebildet, wohingegen der Embryo mütterliches und väterliches Erbgut besitzt. Die Morphologie und Permeabilität der Testa wird also von der Mutterpflanze determiniert.

Die Pulpa des Kakaosamens dient während der Fermentation als Kohlenstoffquelle für die an der Fermentation beteiligten Mikroorganismen. Dies ermöglicht die Produktion von Alkohol, Milch- und Essigsäure, die essentiell für die biochemischen Vorgänge im Kakaosamen sind. Bei den Inkubationen hingegen ist das Vorhandensein der Pulpa für das Ergebnis nicht ausschlaggebend, da hier die Pulpa nicht als Quelle für Alkohol und Säuren, aufgrund der Zugabe der Säure zu Beginn der Inkubation, dienen muss.

Die Pulpa ist aber nicht nur ein Substratlieferant für die an der Fermentation beteiligten Mikroorganismen, sie kann auch eine Transferbarriere für den Stoffaustausch zwischen dem Sameninneren und der äußeren Fermentationsmasse sein. Gleiches gilt für die sich nach dem Verdau der Pulpa ausbildende Schleimschicht. Bei dem Vergleich der Inkubationen, die mit entpulpten Samen und unbehandelten Samen durchgeführt wurden, wird deutlich, dass die Barriere, die die Pulpa für den Stofftransport darstellen kann, durch die quellende Schleimschicht ersetzt werden kann. Diese Schleimschicht kann sich erst nach dem Entfernen der Pulpa ausbilden, da diese die Quellung des TA-Schleimes behindert. Dies führt dazu, dass

die Inkubationen mit und ohne Pulpa sich nicht in den Gehalten an freien Aminosäuren und Polyphenolen unterscheiden.

Bei den verschiedenen Inkubationen weisen die unbehandelten Samen in ihren Gehalten an freien Aminosäuren, hydrophoben Aminosäuren, GABA und Polyphenolen kaum Unterschiede zu den entpulpten Samen auf (s. Kap. 5.1). Dies lässt den Schluss zu, dass die Pulpa auf die Bildung der sameneigenen Aromavorstufen keinen großen Einfluss hat. Da diese beiden Varianten sich kaum in ihren Gehalten an Aromavorstufen unterscheiden, lässt diese Tatsache darauf schließen, dass der nach dem Entpulpen frei quellbare Schleim in der Inkubation die Pulpaschicht ersetzen kann. Er bildet ebenso wie die schleimige Pulpa eine Transferbarriere zum Embryo. Diese Ersatzfunktion hat Bedeutung für die endogenen Prozesse, wie den Speicherproteinabbau und die Degradation der Polyphenole. Für Aromakomponenten, die während der Nacherntebehandlung aus der Pulpa in den Embryo gelangen, z.B. Linalool (Amores, 2006), ist diese Ersatzfunktion nicht gegeben, da sich diese Substanzen in der Pulpa befinden.

Im Gegensatz zu den unbehandelten und den entpulpten Samen unterscheiden sich Samen ohne Testa teilweise deutlich von diesen beiden Varianten. Der deutliche Unterschied zu den Samen ohne Testa weist auch darauf hin, dass die Testa einen bedeutenden Einfluss auf den Inkubationsverlauf hat. Die Samen ohne Testa verfügen nicht mehr über die Pulpa, die als Barriere dienen kann und ebenso sind sie durch das Entfernen der Testa nicht mehr in der Lage durch den quellenden TA-Schleim eine sie umgebende Schleimschicht zu bilden. Nicht nur, dass durch die Testa in den ersten 48 Stunden der Inkubation der Stoffaustausch unterbunden ist, sie verhindert auch ein Ausschwemmen der Aromavorstufen aus dem Samen. Die deutlich geringeren Gehalte an freien Aminosäuren und Polyphenolen bei den ohne Testa inkubierten Samen machen die Bedeutung der Samenschale für die Qualität des Rohkakaos deutlich.

### **6.3 Bedeutung und Funktion der inneren Schleimschicht**

Es konnte nachgewiesen werden, dass der Schleim im Inneren der Testa des Kakaosamens aus Proteinen und Kohlenhydraten besteht. Damit grenzt sich dieser Schleim von einer Vielzahl anderer Pflanzenschleime ab, die als weitverzweigte Polysaccharide beschrieben werden (Tomoda et al., 1987 und Cui et al., 1994).

Eine genauere biochemische Untersuchung ergab, dass es sich bei dem Proteinanteil nicht um ein einzelnes Protein handelt, sondern um mindestens 17 verschiedene, von denen 3 bestimmt werden konnten. Es handelt sich um Osmotin, Chitinase und Glucanase. Alle drei Proteine werden in Zusammenhang mit der Abwehr von pflanzenpathogenen Pilzen beschrieben (Abad et al., 1996, Collinge et al., 1993, Gomes et al., 1996).

Osmotin wirkt in der Pflanze als Osmoregulator. In der Pathogenabwehr, insbesondere bei Pilzen, wirkt es dadurch, dass die Pilzsporen und Keimhyphen lysieren oder an der Keimung gehindert werden oder nach der Keimung eine verringerte Überlebensfähigkeit aufweisen (Abad et al., 1996). Diese Hemmwirkung des Osmotins beruht auf der Aufhebung des pH-Gradienten an den Membranen der Pilzzellen (Abad et al., 1996).

Bei der Chitinase beruht die Hemmwirkung gegenüber pathogenen Pilzen auf ihrer Fähigkeit neu gebildete Chitinketten höherer Pilze abzubauen, wodurch das Wachstum der Pilzhyphen gehemmt wird (Kasprzewska, 2003). Chitinasen bauen das Chitin der Pilze zu Oligosacchariden ab, diese Elicitoren fungieren als Signalmoleküle (Kasprzewska, 2003). Ebenso wie die Chitinase greift auch die Glucanase die Zellwände der Pilze an (Arlorio et al., 1992). Glucane bilden den Hauptbestandteil der Pilzzellwände von Oomyceten und niederen Pilzen und können von der Glucanase angegriffen werden.

Versuche ergaben, dass dieser Schleim *in vitro* eine Wachstumshemmung gegenüber verschiedenen Hefen und Pilzen verursachen kann (Fahrurrozi et al., 2013), während er gegenüber Essig- und Milchsäurebakterien keine Hemmwirkung ausübt. Nach einer Hitzebehandlung des TA-Schleimes treten keine Hemmhöfe mehr auf. Die Hemmwirkung des TA-Schleimes wird offenbar durch die Denaturierung der Proteine aufgehoben.

Der Schleim beginnt bei Gegenwart von Wasser erst dann unbegrenzt zu quellen, wenn die Pulpa vorher entfernt wurde. Man muss davon ausgehen, dass sich Hefen zu Beginn der Fermentation auf der Pulpa ansiedeln und diese metabolisieren können, nach Abfluss der Pulpa aber mit dem freiwerdenden Schleim konfrontiert sind und durch den TA-Schleim in ihrem Wachstum gehemmt werden. Dies erlaubt, dass sich Milch- und Essigsäurepopulationen etablieren können, die die für die Fermentation notwendigen Säuren und durch die Oxidation des Ethanol die notwendige Temperatur erzeugen. Milch- und Essigsäurebakterien werden durch den Schleim nicht in ihrem Wachstum gehemmt (Fahrurrozi et al., 2013). Ein frühzeitiges Freisetzen des Schleimes durch z.B. Abpressen der Pulpa vor Beginn der Fermentation, wirkt sich also auf die anschließende Besiedelung der Fermentationsmasse durch Mikroorganismen aus, da die Hefen schon zu Beginn der Fermentation in ihrem Wachstum gehemmt werden. Es wird weniger Alkohol gebildet und

durch die Verringerung des Substrates der Essigsäurebakterien auch weniger Essigsäure. Diese Prozessierung kann aufgrund der geringeren Säureproduktion zu einer verminderten Ansäuerung der Samen führen und dadurch die Proteolyse der Speicherproteine verringern, also die Bildung der freien Aminosäuren als Aromavorstufen, wodurch nicht das volle Aromapotential erreicht wird. Ebenso kann über diesen Weg eine starke Säureproduktion verringert werden, die sich häufig negativ auf den Geschmack des Rohkakaos auswirkt.

Die biotechnologische Bedeutung des testassoziierten Schleims zur Steuerung der Sequenz an Hefen und Bakterien während der Fermentation muss in weiterführenden Inkubations- und Fermentationsversuchen geprüft werden.

Der Schleim hat nicht nur eine deutliche Auswirkung auf den Ablauf der Fermentation, er besitzt aller Wahrscheinlichkeit nach auch eine ökologisch wichtige Funktion im Zuge der Keimung und der Sämlingsentwicklung: Affen und Nagetiere öffnen die Kakaofrüchte, um an die Samen, im Besonderen an die süß-saure Pulpa, zu gelangen. Der Samen selber wird dabei nicht gefressen oder grundsätzlich geschädigt, da er durch seinen hohen Gehalt an Polyphenolen und Purinalkaloiden sehr bitter und adstringierend ist. Durch das Abfressen der Pulpa wird der darunter liegende testassoziierte Schleim bei Wasserverfügbarkeit ungehindert quellen. Solange die Pulpa intakt ist, ist die Quellfähigkeit stark eingeschränkt. Die enorme Quellfähigkeit des Schleimes bewirkt auch eine hohe Wasserbindung direkt am Samen (s. Abbildung 5-99), die dem keimenden Samen eine ausreichende Versorgung mit Wasser garantiert. Eine hohe Wasserbindung durch quellbare Substanzen findet sich auch bei schleimbildenden Samen aus Wüstengebieten (Guterman und Shem-Tov, 1997). Diese ökologische Funktion ist gut beschrieben. In feuchttropischen Regenwaldgebieten muss aber auch davon ausgegangen werden, dass der Schleim zusätzlich durch die Entwicklung einer sich verdickenden Barriere einen Schutzmantel zwischen dem Samen und umgebenden Bakterien und Pilzen bildet. Somit sind die nährstoffreichen Speicherkotyledonen mechanisch und biochemisch geschützt. Bei dem derzeitigen Ergebnisstand, bei dem erst drei der funktionellen Proteine des Schleims bekannt sind und noch eine erhebliche Anzahl weiterer Proteine nicht im Hinblick auf die Funktion analysiert sind, ist zu erwarten, dass auch diese Proteine eine Rolle bei der Keimung und dem Schutz des Embryos spielen könnten.

Unter dem Ansatz ein biotechnologisches Verfahren im Gegensatz zum fermentativen Ansatz zu entwickeln wurden diverse funktionelle Komponenten untersucht und es konnten sowohl biophysikalische Eigenschaften als auch biotechnologisch nutzbare Komponenten herausgearbeitet werden. Eine Übersicht über die strukturellen und funktionellen

Komponenten des Kakaosamens in Bezug auf die Aspekte der vorliegenden Arbeit ist in der Abbildung 6-1 dargestellt.

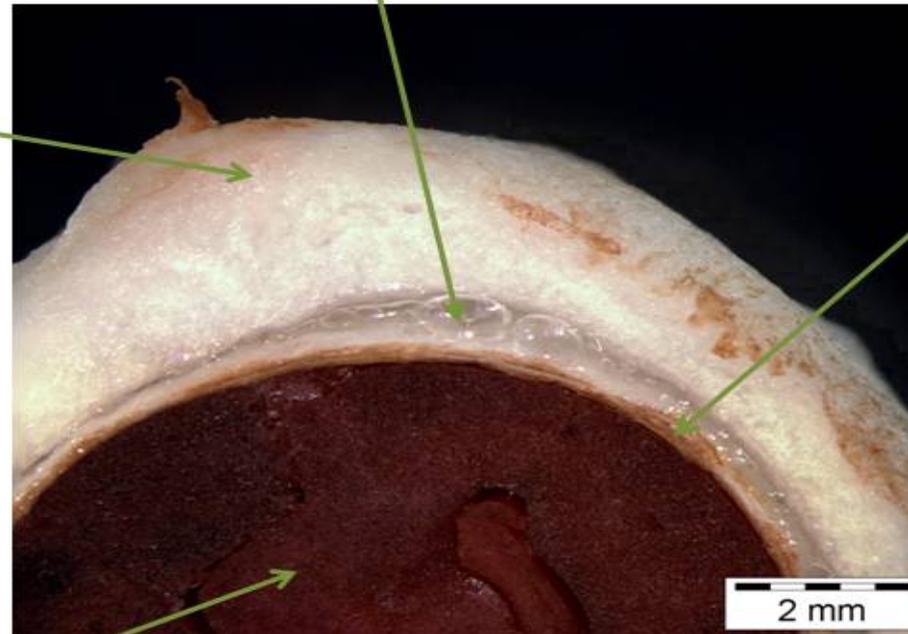
## Strukturelle und funktionelle Komponenten des Kakaosamens

### Testassoziierter Schleim:

- Fungizide Wirkung aufgrund von versch. Enzymen
- Biochemische und physikalische Barriere für Mikroorganismen
- Unbegrenzt quellfähig

### Pulpa:

- Behindert die Quellung des testaassozierten Schleims
- Nährstoffquelle für die Mikroorganismen während der Fermentation
- Quelle für organische Säuren



### Testa:

- Barriere während der Inkubation und Fermentation
- Öffnung nach ca. 48h durch Streckung der Radicula
- Enthält den testaassozierten Schleim

### Kotyledonen:

- Enthalten Protein- und Polyphenolspeicherzellen
- Enzymatischer Abbau der Proteine führt zur Bildung von hydrophoben Peptiden und freien Aminosäuren (Aromavorstufen)
- Abbau der Polyphenole reduziert die Adstringenz aber auch das antioxidative Potential

Abbildung 6-1: Übersicht über die Bedeutung der strukturellen und funktionellen Komponenten des Kakaosamens

## 7 Abkürzungsverzeichnis

DL	Druckluft
DTT	Dithiothreitol
EST	expressed sequence tag
ffTM	fettfreie Trockenmasse
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
HPLC	high performance liquid chromatography
LR White	London Resin White
Lsg.	Lösung
mM	mmol/l
MS	Massenspektrometer
NI/h	Massestrom l/h
OPA	o-Phtaldialdehyd
p.a.	pro analysi
PPO	Polyphenoloxidase
PR	pathogen related
PRP	pathogen related proteins
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
REM	Rasterelektronenmikroskop
SDS	Natriumdodeylsulfat
Std.	Stunden
TA-Schleim	testaassoziierter Schleim
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 5-1: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit der für das Inkubationsmedium gewählten Säure bzw. Säuregemisches. ....	22
Abbildung 5-2: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Milchsäure bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert. ....	23
Abbildung 5-3: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit einem Essigsäure/Milchsäuregemisch bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert. ....	24
Abbildung 5-4: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Essigsäure bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert. ....	26
Abbildung 5-5: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C. ...	28
Abbildung 5-6: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C in Abhängigkeit von dem verwendeten Inkubationsmedium. ....	29
Abbildung 5-7: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer Inkubationstemperatur von 37°C.....	31
Abbildung 5-8: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit von der für das Inkubationsmedium gewählten Säure bzw. von dem Säuregemisch.....	32
Abbildung 5-9: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.....	33
Abbildung 5-10: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Essigsäure und Essig-/Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.....	34
Abbildung 5-11: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer Inkubationstemperatur von 41°C.....	36

Abbildung 5-12: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 41°C in Abhängigkeit von Inkubationsmedium mit Essigsäure oder destilliertem Wasser. ....	37
Abbildung 5-13: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 41°C in Abhängigkeit von dem gewählten Inkubationsmedium. ....	38
Abbildung 5-14: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer Inkubationstemperatur von 50°C.....	39
Abbildung 5-15: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 50°C in Abhängigkeit von dem Inkubationsmedium mit Essigsäure oder destilliertem Wasser. ....	40
Abbildung 5-16: Entwicklung des Gesamtgehaltes freier Aminosäuren im Verlauf der Essigsäureinkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 50°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert. ....	41
Abbildung 5-17: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung der freien Aminosäuren während der Milchsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C.....	42
Abbildung 5-18: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung der freien Aminosäuren während der Essig-/Milchsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C.....	43
Abbildung 5-19: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung der freien Aminosäuren während der Essigsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C.....	44
Abbildung 5-20: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung der Aminosäuren während der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C. ....	45
Abbildung 5-21: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung der freien Aminosäuren während der Inkubation mit Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C. ....	46
Abbildung 5-22: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung der freien Aminosäuren während der Inkubation bei einer konstanten Temperatur von 60°C. ...	47
Abbildung 5-23: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der für das Inkubationsmedium gewählten Säure bzw. von dem Säuregemisch.....	50
Abbildung 5-24: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Milchsäure bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C,	

24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert. .....	51
Abbildung 5-25: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit einem Essigsäure/Milchsäuregemisch bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert. ....	52
Abbildung 5-26: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Essigsäure bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert. .....	54
Abbildung 5-27: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C. ...	55
Abbildung 5-28: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C in Abhängigkeit von dem verwendeten Inkubationsmedium. ....	56
Abbildung 5-29: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer Inkubationstemperatur von 37°C.....	57
Abbildung 5-30: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit von der für das Inkubationsmedium gewählten Säure bzw. von dem Säuregemisch. ....	58
Abbildung 5-31: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert. ....	59
Abbildung 5-32: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Essigsäure und Essigsäure/Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert. ....	60
Abbildung 5-33: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren von Kakaosamen im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 41°C in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium mit Essigsäure oder destilliertem Wasser. ....	61
Abbildung 5-34: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 41°C in Abhängigkeit von dem gewählten Inkubationsmedium. ....	62
Abbildung 5-35: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 41°C in Abhängigkeit von dem gewählten Inkubationsmedium. ....	63
Abbildung 5-36: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer Inkubationstemperatur von 50°C.....	65

Abbildung 5-37: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 50°C in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium mit Essigsäure oder destilliertem Wasser. ....	66
Abbildung 5-38: Freisetzung der hydrophoben Aminosäuren im Verlauf der Essigsäureinkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 50°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert. ....	67
Abbildung 5-39: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die hydrophoben Aminosäuren während der Milchsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C. ....	68
Abbildung 5-40: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die hydrophoben Aminosäuren während der Essigsäure/Milchsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C. ....	69
Abbildung 5-41: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die hydrophoben Aminosäuren während der Essigsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C. ....	70
Abbildung 5-42: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung der hydrophoben Aminosäuren während der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C. ....	71
Abbildung 5-43: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung der hydrophoben Aminosäuren während der Inkubation mit Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C. ....	72
Abbildung 5-44: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung der hydrophoben Aminosäuren während der Inkubation mit einem Gemisch aus Essigsäure und Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C. ....	73
Abbildung 5-45: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung der hydrophoben Aminosäuren während der Inkubation mit Essigsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C. ....	74
Abbildung 5-46: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung der hydrophoben Aminosäuren während der Inkubation bei einer konstanten Temperatur von 60°C. ....	75
Abbildung 5-47: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der für das Inkubationsmedium gewählten Säure bzw. von dem Säuregemisch. ....	76
Abbildung 5-48: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Milchsäure bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert. ....	77

Abbildung 5-49: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit einem Essigsäure/Milchsäuregemisch bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert. ....	79
Abbildung 5-50: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Essigsäure bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.....	81
Abbildung 5-51: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C. ....	82
Abbildung 5-52: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C in Abhängigkeit von dem verwendeten Inkubationsmedium. ....	83
Abbildung 5-53: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit von der für das Inkubationsmedium gewählten Säure bzw. von dem Säuregemisch.....	84
Abbildung 5-54: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert. ....	85
Abbildung 5-55: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Essigsäure und Essig-/Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert.....	86
Abbildung 5-56: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 41°C in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium mit Essigsäure oder destilliertem Wasser. ....	87
Abbildung 5-57: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 41°C in Abhängigkeit von dem gewählten Inkubationsmedium. ....	88
Abbildung 5-58: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 41°C in Abhängigkeit von dem gewählten Inkubationsmedium. ....	89
Abbildung 5-59: Entwicklung des GABA-Gehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 50°C in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium mit Essigsäure oder destilliertem Wasser. ....	90
Abbildung 5-60: Entwicklung des GABA-Gehaltes im Verlauf der Essigsäureinkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 50°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert. ....	91

Abbildung 5-61: Entwicklung des GABA-Gehaltes im Verlauf der Essigsäureinkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 50°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert. ....	92
Abbildung 5-62: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf den GABA-Gehalt während der Milchsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C. ....	93
Abbildung 5-63: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf den GABA-Gehalt während der Essigsäure/Milchsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C. ....	94
Abbildung 5-64: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf den GABA-Gehalt während der Essigsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C. ....	95
Abbildung 5-65: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung des GABA-Gehaltes während der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C. ....	96
Abbildung 5-66: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung des GABA-Gehaltes während der Inkubation bei einer konstanten Temperatur von 60°C. ....	97
Abbildung 5-67: Entwicklung des Epicatechingehaltes im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der für das Inkubationsmedium gewählten Säure bzw. von dem Säuregemisch. ....	99
Abbildung 5-68: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Milchsäure bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert. ....	100
Abbildung 5-69: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit einem Essig-/Milchsäuregemisch bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert. ....	101
Abbildung 5-70: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Essigsäure bei einem Temperaturgradienten mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert. ....	102
Abbildung 5-71: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturgradienten mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C. ....	103
Abbildung 5-72: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C in Abhängigkeit von dem verwendeten Inkubationsmedium. ....	104

Abbildung 5-73: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit von der für das Inkubationsmedium gewählten Säure bzw. von dem Säuregemisch. .... 105

Abbildung 5-74: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert. .... 106

Abbildung 5-75: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubationen mit Essigsäure und Essig-/Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert. .... 107

Abbildung 5-76: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 41°C in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium mit Essigsäure oder destilliertem Wasser. .... 108

Abbildung 5-77: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 41°C in Abhängigkeit von dem gewählten Inkubationsmedium. .... 109

Abbildung 5-78: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 41°C in Abhängigkeit von dem gewählten Inkubationsmedium. .... 110

Abbildung 5-79: Entwicklung des Epicatechingehaltes in Kakaosamen im Verlauf der Inkubation mit einer konstanten Temperatur von 50°C in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium mit Essigsäure oder destilliertem Wasser. .... 111

Abbildung 5-80: Entwicklung des Epicatechingehaltes im Verlauf der Essigsäureinkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 50°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert. .... 112

Abbildung 5-81: Entwicklung des Epicatechingehaltes im Verlauf der Essigsäureinkubation bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 50°C in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration und dem pH-Wert. .... 113

Abbildung 5-82: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf den Epicatechingehalt während der Milchsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C. .... 114

Abbildung 5-83: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf den Epicatechingehalt während der Essigsäure/Milchsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C. .... 115

Abbildung 5-84: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf den Epicatechingehalt während der Essigsäureinkubationen bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-24h 30°C, 24-48h 35°C, 48-96h 55°C. .... 116

Abbildung 5-85: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung des Epicatechingehaltes während der Inkubation bei einem Temperaturverlauf mit folgender Staffelung 0-48h 37°C, 48-96h 50°C. ....	117
Abbildung 5-86: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung des Epicatechingehaltes während der Inkubation mit Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C. ....	118
Abbildung 5-87: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung des Epicatechingehaltes während der Inkubation mit Essigsäure bzw. einem Gemisch aus Essig- und Milchsäure bei einer konstanten Temperatur von 37°C. ....	119
Abbildung 5-88: Einfluss der Behandlung der Samen vor Beginn der Inkubation auf die Entwicklung des Epicatechingehaltes während der Inkubation bei einer konstanten Temperatur von 60°C. .	120
Abbildung 5-89: Externe Einflüsse in den Proteinspeichervakuolen auf die endogene Proteolyse und auf den Abbau der Polyphenole in den Phenolzellen. ....	128
Abbildung 5-90: Querschnitt durch einen frischen Kakaosamen.....	130
Abbildung 5-91: Verlauf der Leitbündel innerhalb der Kakaotesta.....	131
Abbildung 5-92: Querschnitt durch die Testa eines entpulpten Kakaosamens.....	132
Abbildung 5-93: REM-Aufnahme eines Querschnitts durch die Testa eines frischen, entpulpten Kakaosamens.....	134
Abbildung 5-94: REM-Aufnahme eines Querschnitts durch die Testa eines frischen, entpulpten Kakaosamens.....	135
Abbildung 5-95: REM-Aufnahme der Chalaza eines frischen Kakaosamens von der Innenseite, an der Hypostase.....	136
Abbildung 5-96: REM-Aufnahme der Innenseite der Mikropyle eines frischen Kakaosamens.....	137
Abbildung 5-97: REM-Aufnahme der Innenseite der Mikropyle eines Kakaosamens nach 48stündiger Inkubation.....	138
Abbildung 5-98: REM-Aufnahme eines Querschnitts durch die Testa eines frischen, entpulpten Kakaosamens.....	139
Abbildung 5-99: Wasseraufnahmekapazität von Kakaosamen, Embryonen und entpulpten Kakaosamen über einen Zeitraum von 4 Tagen. ....	140
Abbildung 5-100: Gequollene Schleimschicht eines entpulpten Kakaosamens nach 8 Stunden in Wasser.....	141
Abbildung 5-101: HPLC-Chromatogramm der Monosaccharide im Schleim der Testa vor (oben) und nach (unten) der sauren Hydrolyse.....	142
Abbildung 5-102: HPLC-Chromatogramm der freien Aminosäuren im Schleim der Testa vor (oben) und nach (unten) der sauren Hydrolyse.....	143
Abbildung 5-103: Gehalt an freien Aminosäuren und deren Summe vor und nach einer sauren Hydrolyse des Kakaoschleims.....	144

Abbildung 5-104: Gehalt der einzelnen freien Aminosäuren vor und nach der sauren Hydrolyse des Kakaoschleims.....	144
Abbildung 5-105: Gelelektrophorese des Schleimes der Kakaotesta.....	146
Abbildung 6-1: Übersicht über die Bedeutung der strukturellen und funktionellen Komponenten des Kakaosamens .....	162

## 9 Tabellenverzeichnis

Tab. 4-1: Polaritätsgradient zur Auftrennung der freien Aminosäuren.....	15
Tab. 4-2: Polaritätsgradient zur Auftrennung der Polyphenole und Anthocyane .....	15
Tab. 5-1: An drei verschiedenen Querschnitten ausgezählte Zelllagen der Testa.....	133
Tab. 5-2: Auflistung der getrennten, jedoch nicht identifizierten Proteine des Schleims, sortiert nach aufsteigendem Molekulargewicht.....	145
Tab. 5-3: EST-Sequenzen der Kakaoschleimpeptide und das dazugehörige Protein nach Massenspektrometrie .....	147
Tab. 5-4: Identifizierte Proteine und deren abgeleitete EST-Sequenzen.....	149
Tab. 12-1: Liste aller durchgeführten Inkubationen.....	182
Tab.12-2: Gehalte an freien Aminosäuren der bei einer konstanten Temperatur von 60°C durchgeführten Inkubationen von Kakaosamen .....	187
Tab.12-3: Gehalte an Phenolen und Anthocyanen der bei einer konstanten Temperatur von 60°C durchgeführten Inkubationen von Kakaosamen .....	189
Tab.12-4: Gehalte an Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid aller durchgeführten Inkubationen .....	190

## 10 Literatur

Abad, L. R., D'Urzo, M. P., Liu, D., Narasimhan, M. L., Reuveni, M., Zhu, J. K., Niu, X., Singh, N. K., Hasegawa, P. M, Bressan, R. A. (1996): Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Sci.* 118: 11-23

Abin, M.Z., Kiran, U., Alam, A. (2011): Analysis of osmotin, a PR protein as metabolic modulator in plants. *Bioinformation* 5 (8): 336-340

Amores, F. (2006): Proyecto para establecer parametros fisicos, quimicos y organolepticos que permitan diferenciar entre cacao fino y ordinario. Evaluacion de parametros quimicos volatiles. Taller international para presentacion de resultados. Guayaquil

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. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 80 (1): 48-62

Arlorio, M., Ludwig A., Boller, T., Bonfante, P. (1992): Inhibition of fungal growth by plant chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases. *Protoplasma* 171: 34-43

Baigrie, B. D. (1994): Cocoa flavour. In *Understanding Natural Flavours*; Piggott, J. R., Patterson, A., Eds.; Blackie: Glasgow, U.K., 268-282.

Biehl, B. (1973): Veränderungen der subcellulären Struktur in Keimblättern von Kakaosamen (*Theobroma cacao* L.) während der Fermentation und Trocknung. *Lebensm. Unters.-Forsch.* 153: 137-150

Biehl, B., Passern, D. (1982): Proteolysis during fermentation-like incubation of cocoa seeds. *J. Sci. Food Agric.* 33: 1280-1290

Biehl, B., Brunner, E., Passern, D., Quesnel, V.C., Adomako, D. (1985): Acidification, proteolysis and flavour potential in fermenting cocoa beans. *J. Sci. Food Agric.* 36: 583-598

- Biehl, B., Ziegeler-Berghausen, H., Srivastava, S., Xiong, Q., Passern, D., Heinrichs, H., Hammor, M. (1991): Cocoa specificity of proteolytic flavour precursors: the cocoa seed proteases. Proceedings of the 1991 International Cocoa Conference: Challenges in the 90s, 25-27 September 1991, Kuala Lumpur, Malaysia.
- Biehl, B.; Voigt, J. (1994): Nacherntebehandlung, Fermentation, Proteolyse und Bildung der Aromavorstufen beim Kakao. Angewandte Botanik Berichte 5, Applied Botany Reports, Tropische Nutzpflanzen, Hamburg: 124-137
- Bown, A.W., Shelp, B.J. (1997): The metabolism and functions of  $\gamma$ -aminobutyric acid. Plant Physiol., 115: 1-5
- Bytof, G., Knopp, S.-E., Schieberle, P., Teutsch, I., Selmar, D. (2005): Influence of processing on the generation of  $\gamma$ -aminobutyric acid in green coffee beans. Eur. Food Res. Technol. 220: 245-250
- Cheesman, E.E. (1927): Fertilization and embryogeny in *Theobroma cacao*, L.. Ann. Bot. 41: 107-126
- Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., Rasmussen, U., Vad, K. (1993): Plant chitinases. The Plant Journal 3 (1): 31-40
- Cui, W., Mazza, G., Biliaderis, C.G. (1994): Chemical structure, molecular size distributions, and rheological properties of flaxseed gum. J. Agric. Food Chem. 42: 1891-1895
- Decavel, C., van den Pol, A.N. (1990): GABA: A dominant neurotransmitter in the hypothalamus. J.Comp. Neurol. 302: 1019-1037
- Elwers, S. (2008): Zusammensetzung und histologische Verteilung der phenolischen Substanzen in Samen von Massen- und Edelkakao-Varietäten (*Theobroma cacao* L.). Dissertation Universität Hamburg
- Fahrurrozi, Bahmann, C., Lieberei, R., Bisping, B. (2013): Antifungal activity in seed coat extracts of *Theobroma cacao* L.. Poster Jahrestagung VAAM 10. – 13. März in Bremen

- Forsyth, W.G.C., Quesnel, V.C. (1963): The mechanism of cacao curing. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 25: 457-492
- Gomes, V. M., Oliveira, A. E. A., Xavier-Filho, J. (1996): A chitinase and a  $\beta$ -1,3-glucanase isolated from the seeds of cowpea (*Vigna unguiculata* L Walp) inhibit the growth of fungi and insect pests of the seed. *J. Sci. Food Agric.* 72: 86-90
- Gutterman, Y., Shem-Tov, S. (1997): Mucilaginous seed coat structure of *Carrichtera annua* and *Anastatica hierochuntica* from the Negev Desert highlands of Israel, and its adhesion to the soil crust. *Journal of Arid Environments* 35: 695-705
- Hansen, C. E., del Olmo, M., Burri, C. (1998): Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 77: 273-281
- Hashim, P., Selamat, J., Muhammad, S.K.S., Ali, A. (1998): Changes in free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation. *J. Sci. Food Agric.*, 78: 535-542
- Heimann, W. (1972): *Grundzüge der Lebensmittelchemie*. 2. Auflage Verlag Theodor Steinkopff Dresden
- Holt, R.R., Lazarus, S.A., Sullards, M. C., Zhu, Q.Y., Schramm, D.D., Hammerstone, J.F., Fraga, C.G., Schmitz, H.H., Keen, C.L. (2002): Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 $\beta$ -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of flavanol-rich cocoa. *Am. J. Clin. Nutr.* 76 (4): 798-804
- Hoskin, J.M., Dimick, P.S., Daniels, R.R. (1980): Scanning electron microscopy of the *Theobroma cacao* seed. *J. Food Sci.* 45: 1538-1540
- Kasprzewska, A. (2003): Plant Chitinases – regulation and function. *Cellular & Molecular Biology Letters* 8: 809-824
- Kim, H., Keeney, P.G. (1984): (-)-Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. *J. Food Sci.* 49 (4): 1090-1092

- Kratzer, U., Frank, R., Kalbacher, H., Biehl, B., Wöstemeyer, J., Voigt, J. (2009): Subunit structure of the vicilin-like globular storage protein of cocoa seeds and the origin of cocoa- and chocolate-specific aroma precursors. *Food Chem.* 113: 903-913
- Lefeber, T., Papalexandratou, Z., Gobert, W., Camu, N., de Vuyst, L. (2012): On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof. *Food Microbiol.* 30 (2): 379-392
- Lieberei, R., Kadow, D., Seigler, D. (2013): Cocoa cultivation and directed breeding and polyphenolics. DOI 10.1007/978-3-642-22144-6\_51 Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Lopez, A.S., Dimick, P.S. (1995): Cocoa Fermentation. *Biotechnology Second, Completely Revised Edition*, G. Reed, T.W. Nagodawithana, VCH Verlagsgesellschaft mbH: 561-577
- Lux, S. (2011): Biochemische und histologische Untersuchung zur Kakaofermentation. Bachelorarbeit, Universität Hamburg
- Misnawi, Selamat, J., Bakar, J. and Saari, N. (2002): Oxidation of polyphenols in unfermented and partly fermented cocoa beans by cocoa polyphenol oxidase and tyrosinase. *J. Sci. Food Agric.*, 82: 559–566
- Noor-Soffalina, S.S., Jinap, S., Nazamid S., Nazimah, S. A. H. (2009): Effect of polyphenol and pH on cocoa Maillard-related flavor precursors in a lipidic model system. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44: 168-180
- O'Brien, T.P., Feder, N., McCully, M.E. (1965): Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. *Protoplasma* 59: 368-373
- Rinas, T. (2010): Strukturelle und funktionelle Aspekte der Kakaotesta. Diplomarbeit, Universität Hamburg

- Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H.B., Orozco-Avila, I., Lugo-Cervantes, E., Jaramillo-Flores, M.E. (2011): Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Res. Int.* 44: 250-258
- Rohan, T.A. (1964): The precursors of chocolate aroma: A comparative study of fermented and unfermented cocoa beans. *J. Food Sci.* 29 (4): 456-459
- Rohsius, C., Andersson, M., Niemenak, N., Sukha, D., Lieberei, R. (2006): Fermentation quality and its dependence on the testa structure and transport processes. Oral presentation, 15th International Cocoa Research Conference, San José, Costa Rica
- Rohsius, C., Lieberei, R. (2008): Abschlußbericht AiF Projekt 14491-N
- Schröder, P. (2002): Die biologische Bedeutung des Flavonoids Epicatechin im Schutz vor Peroxynitrid. Dissertation, Universität Düsseldorf
- Schwan, R. F., Wheals, A. E. (2004): The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit. Rev. Food Sci.Nutr.* 44 (4): 205-221
- Shelp, B.J., Bown, A.W., McLean, M.D. (1999): Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant Sci.* 4 (1): 446-452
- Sherwin, T., Simon, E.W. (1969): The appearance of lactic acid in Phaseolus seeds germinating under wet conditions. *J. Exp. Bot.* 20 (65): 776-785
- Stoll, L., Rohsius, C., Niemenak, N., Sukha, D., Lieberei, R. (2006): Formation of the bitter tasting  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in the course of fermentation and germination processes. Proceedings of the 15th International Cocoa Conference. Poster Nr. 060
- Stoll, L. (2010): Biochemische Indikatoren für Keimung und Fermentation in Samen von Kakao (*Theobroma cacao* L.).Dissertation, Universität Hamburg

Tomoda, M., Shimizu, N., Oshima, Y., Takahashi, M., Murakami, M., Hikino, H. (1987): Hypoglycemic activity of twenty plant mucilages and three modified products. *Planta Medica* 1: 8-11

Voigt, J., Biehl, B., Heinrichs, H., Voigt, G. (1994): Die Bildung kakaospezifischer Aromavorstufen aus dem Reserveglobulin des Kakaosamens. *Angewandte Botanik Berichte* 5, *Applied Botany Reports, Tropische Nutzpflanzen*, Hamburg 1994: 124-137

Voigt, J., Biehl, B., Heinrichs, H., Kamaruddin, S., Marsoner, G. G., Hugi, A. (1994a): In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa-seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. *Food Chem.* 49: 173-180

Voigt, J., Wrann, D., Heinrichs, H., Biehl, B. (1994b): The proteolytic formation of essential cocoespecific 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 Chem.* 51: 197-205

Wong, M. K., Dimick, P. S., Hammerstedt, R. H. (1990): Extraction and high performance liquid chromatographic enrichment of polyphenol oxidase from *Theobroma cacao* seeds. *J. Food Sci.* 55 (4): 1108-1111

Zacharias, E. (2012): Biochemische und chromatographische Untersuchungen zur Kakaofermentation. Bachelorarbeit, Hochschule für Angewandte Wissenschaften, Hamburg

## 11 Danksagung

Prof. Dr. Reinhard Lieberei danke ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit, im Besonderen für die unendlich vielen Ratschläge und Aufmunterungen während der Erstellung dieser Arbeit und seiner unerschöpflichen Geduld während des Zusammenschreibens.

Prof. Dr. Bernward Bisping danke ich für die Übernahme des Postens als 2. Gutachter.

Dr. Buck vom UKE danke ich für Übernahme der Analyse der Proteine im testaassoziierten Schleim.

Thomas Tumforde danke ich für die Vermessung der Unmengen an Proben und der geduldigen Interpretation meiner Beschriftung und Einwaagen. Außerdem für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die tatkräftige Unterstützung einer teilweise etwas verplanten Doktorandin.

Dr. Helmut Kassner danke ich für das geduldige Korrekturlesen der diversen Fassungen dieser Arbeit und dass er trotzdem dabei seinen Humor nicht verloren hat. Sorry für das 1. Ergebniskapitel.

Detlef Böhm danke ich für die Unterstützung bei diversen technischen Problemen, die er mit viel Geduld und Geschick gelöst hat.

Ein ganz spezieller Dank geht an meine fantastische Arbeitsgruppe, mit der es einfach nie langweilig wird und die es auch an vollgepackten Tagen fertig bringt, mit einer gehörigen Portion Humor und Selbstironie noch Spaß an der Arbeit zu verbreiten.

Jutta Krüger danke ich für die tollen Fotos des etwas renitenten Schleimes, der sich Fotoversuchen meinerseits erfolgreich widersetzt hat.

Karen Dehn danke ich für die Einführung in die Tiefen des Rasterelektronenmikroskops und das Vertrauen dieses alleine bedienen zu dürfen.

Janine Peikert möchte ich danken für die erholsamen Erörterungen über die Tragkraft von Notduschen und das Einführen in die Geheimnisse von Nadeln und Wolle.

Meine Eltern danke ich für die unermüdliche Unterstützung während der gesamten Zeit meines Studiums und der Dissertation.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dominic Bahmann, der nicht nur die Zeit der Diplomarbeit mit mir erlebt und überlebt hat, sondern auch noch die Promotion und es trotzdem immer noch mit mir aushält. Gehen wir die nächste Promotion an!

Die Arbeit stellt unter anderem die Ergebnisse des Projektes „Cocoa seed processing“ gefördert durch die Firma Barry Callebaut Belgium N.V. dar.

## 12 Anhang

Tab. 12-1: Liste aller durchgeführten Inkubationen

Inkubation	Material	Medium	pH	Temperatur	Begasung	Herkunft
<b>F4</b>	ganze Samen	100mM Milchsäure	4,5	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F5</b>	entpulp Samen	100mM Milchsäure	4,5	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F6</b>	Samen ohne Testa und Pulpa	100mM Milchsäure	4,5	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F7</b>	ganze Samen	50mM Essigsäure + 50mM Milchsäure	4,5	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F8</b>	entpulp Samen	50mM Essigsäure + 50mM Milchsäure	4,5	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F9</b>	Samen ohne Testa und Pulpa	50mM Essigsäure + 50mM Milchsäure	4,5	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F10</b>	ganze Samen	100mM Milchsäure	2,4	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F11</b>	entpulp Samen	100mM Milchsäure	2,4	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F12</b>	Samen ohne Testa und Pulpa	100mM Milchsäure	2,4	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F16</b>	ganze Samen	100mM Milchsäure	4,5	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Ecuador
<b>F17</b>	Samen ohne Pulpa (behandelt mit Pectinex® BE XXL )	100mM Milchsäure	4,5	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Ecuador
<b>F18</b>	Samen ohne Testa und Pulpa	100mM Milchsäure	4,5	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Ecuador
<b>F19</b>	ganze Samen	100mM Milchsäure	2,4	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Ecuador
<b>F20</b>	Samen ohne Pulpa (behandelt mit Pectinex® BE XXL )	100mM Milchsäure	2,4	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Ecuador
<b>F21</b>	Samen ohne Testa und Pulpa	100mM Milchsäure	2,4	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Ecuador
<b>F24</b>	ganze Samen	100mM Milchsäure	4,4	0-72h 37°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-72h DL	Elfenbeinküste
<b>F25</b>	Samen ohne Pulpa (behandelt mit Pectinex® BE XXL )	100mM Milchsäure	4,4	0-96h 72°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-72h DL	Elfenbeinküste
<b>F26</b>	ganze Samen	100mM Milchsäure	4,4	0-96h 72°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-72h DL	Elfenbeinküste

Inkubation	Material	Medium	pH	Temperatur	Begasung	Herkunft
<b>F27</b>	ganze Samen	100mM Essigsäure	5,8	0-72h 60°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-72h DL	Elfenbeinküste
<b>F28</b>	ganze Samen	100mM Essigsäure	5,8	0-96h 72°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-72h DL	Elfenbeinküste
<b>F29</b>	ganze Samen	100mM Essigsäure	4,4	0-72h 37°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-72h DL	Elfenbeinküste
<b>F30</b>	Samen ohne Pulpa (behandelt mit Pectinex® BE XXL)	100mM Essigsäure	4,4	0-72h 37°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-72h DL	Elfenbeinküste
<b>F31</b>	ganze Samen	100mM Essigsäure	4,4	0-72h 37°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-72h DL	Elfenbeinküste
<b>F32</b>	ganze Samen	50mM Essigsäure + 50mM Milchsäure	4,4	0-72h 37°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-72h DL	Elfenbeinküste
<b>F33</b>	Samen ohne Pulpa (behandelt mit Pectinex® BE XXL)	50mM Essigsäure + 50mM Milchsäure	4,4	0-72h 37°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-72h DL	Elfenbeinküste
<b>F34</b>	ganze Samen	50mM Essigsäure + 50mM Milchsäure	4,4	0-72h 37°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-72h DL	Elfenbeinküste
<b>F35</b>	ganze Samen	25mM Milchsäure	4,4	0-72h 37°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-72h DL	Elfenbeinküste
<b>F36</b>	Samen ohne Pulpa (behandelt mit Pectinex® BE XXL)	25mM Milchsäure	4,4	0-72h 37°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-72h DL	Elfenbeinküste
<b>F39</b>	ganze Samen	100mM Essigsäure	2,9	0-48h 37°C; 48-96h 50°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F40</b>	Samen ohne Pulpa (behandelt mit Pectinex® BE XXL)	100mM Essigsäure	2,9	0-48h 37°C; 48-96h 50°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F41</b>	ganze Samen	100mM Milchsäure	2,4	0-48h 37°C; 48-96h 50°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F42</b>	Samen ohne Pulpa (behandelt mit Pectinex® BE XXL)	100mM Milchsäure	2,4	0-48h 37°C; 48-96h 50°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F43</b>	ganze Samen	100mM Essigsäure	4,5	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F44</b>	ganze Samen	100mM Essigsäure	4,5	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F45</b>	ganze Samen	50mM Essigsäure + 50mM Milchsäure	2,5	0-48h 37°C; 48-96h 50°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F46</b>	Samen ohne Pulpa (behandelt mit Pectinex® BE XXL)	50mM Essigsäure + 50mM Milchsäure	2,5	0-48h 37°C; 48-96h 50°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F47</b>	ganze Samen	aqua dest.	5,5	0-48h 37°C; 48-96h 50°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F48</b>	Samen ohne Pulpa (behandelt mit Pectinex® BE XXL)	aqua dest.	5,5	0-48h 37°C; 48-96h 50°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste

Inkubation	Material	Medium	pH	Temperatur	Begasung	Herkunft
<b>F49</b>	ganze Samen	25mM Milchsäure	4,5	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F51</b>	ganze Samen	25mM Essigsäure	4,5	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F52</b>	Samen ohne Pulpa (behandelt mit Pectinex® BE XXL )	25mM Essigsäure	4,5	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F53</b>	ganze Samen	12,5mM Essigsäure + 12,5mM Milchsäure	4,5	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F54</b>	Samen ohne Pulpa (behandelt mit Pectinex® BE XXL )	12,5mM Essigsäure + 12,5mM Milchsäure	4,5	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F55</b>	ganze Samen	25mM Milchsäure	2,7	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F56</b>	Samen ohne Pulpa (behandelt mit Pectinex® BE XXL )	25mM Milchsäure	2,7	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F57</b>	Samen ohne Pulpa (behandelt mit Pectinex® BE XXL )	100mM Essigsäure	5,8	0-96h 60°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F58</b>	ganze Samen	100mM Milchsäure	5,8	0-96h 60°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F59</b>	Samen ohne Pulpa (behandelt mit Pectinex® BE XXL )	100mM Milchsäure	5,8	0-96h 60°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F60</b>	ganze Samen	50mM Essigsäure + 50mM Milchsäure	5,8	0-96h 60°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F61</b>	Samen ohne Pulpa (behandelt mit Pectinex® BE XXL )	50mM Essigsäure + 50mM Milchsäure	5,8	0-96h 60°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F62</b>	ganze Samen	25mM Essigsäure	3,0	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F63</b>	Samen ohne Pulpa (behandelt mit Pectinex® BE XXL )	25mM Essigsäure	3,0	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste

Inkubation	Material	Medium	pH	Temperatur	Begasung	Herkunft
<b>F64</b>	ganze Samen	12,5mM Essigsäure + 12,5mM Milchsäure	2,8	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F65</b>	Samen ohne Pulpa (behandelt mit Pectinex® BE XXL )	12,5mM Essigsäure + 12,5mM Milchsäure	2,8	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 66</b>	ganze Samen	aqua dest.	5,5	0-96h 41°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 67</b>	ganze Samen	300mM Essigsäure	2,5	0-96h 41°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 68</b>	ganze Samen	300mM Essigsäure	4,5	0-96h 41°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 69</b>	ganze Samen	300mM Essigsäure/trocken	2,5	0-96h 41°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 70</b>	ganze Samen	aqua dest.	5,5	0-96h 50°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 71</b>	ganze Samen	300mM Essigsäure	2,5	0-96h 50°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 72</b>	ganze Samen	aqua dest.	5,5	0-96h 41°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 73</b>	ganze Samen	300mM Essigsäure	2,5	0-96 h 41°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 74</b>	ganze Samen	aqua dest.	5,5	0-96h 50°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 75</b>	ganze Samen	300mM Essigsäure	2,5	0-96h 50°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 76</b>	ganze Samen	100mM Essigsäure	2,9	0-96h 41°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 77</b>	ganze Samen	300mM Essigsäure/trocken	2,5	0-96h 41°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 79</b>	ganze Samen	300mM Essigsäure/trocken	2,5	0-96h 50°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 80</b>	ganze Samen	300mM Essigsäure/trocken	2,5	0-96h 50°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 81</b>	ganze Samen	aqua dest.	5,5	0-96h 50°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 81,1</b>	ganze Samen	300mM Essigsäure	2,5	0-72h 50°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 72h DL	Elfenbeinküste
<b>F 82</b>	ganze Samen	aqua dest.	5,5	0-72h 41°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 72h DL	Elfenbeinküste
<b>F 83</b>	ganze Samen	300mM Essigsäure	2,5	0-72h 41°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 72h DL	Elfenbeinküste
<b>F 84</b>	ganze Samen	300mM Essigsäure/trocken	2,5	0-72h 41°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 72h DL	Elfenbeinküste
<b>F 85</b>	ganze Samen	300mM Essigsäure	4,5	0-72h 41°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48- 72h DL	Elfenbeinküste

## Anhang

Inkubation	Material	Medium	pH	Temperatur	Begasung	Herkunft
<b>F 86</b>	ganze Samen	600mM Essigsäure	2,4	0-72h 50°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-72h DL	Elfenbeinküste
<b>F 87</b>	ganze Samen	1000mM Essigsäure	2,3	0-72h 50°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-72h DL	Elfenbeinküste
<b>F 88</b>	ganze Samen	600mM Essigsäure	2,4	0-72h 41°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-72h DL	Elfenbeinküste
<b>F 89</b>	ganze Samen	1000mM Essigsäure	2,3	0-72h 41°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-72h DL	Elfenbeinküste
<b>F 91</b>	ganze Samen	100mM Essigsäure	2,9	0-24h 30°C; 24-48h 35°C; 48-96h 55°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 92</b>	ganze Samen	100mM Essigsäure	2,9	0-96h 60°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 93</b>	ganze Samen	300mM Essigsäure	2,5	0-96h 60°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 94</b>	ganze Samen	600mM Essigsäure	2,4	0-96h 60°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 95</b>	ganze Samen	1000mM Essigsäure	2,3	0-96h 60°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 96</b>	ganze Samen	aqua dest.	5,5	0-96h 60°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 97</b>	ganze Samen	100mM Essigsäure	4,5	0-96h 60°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 98</b>	ganze Samen	100mM Essigsäure	2,9	0-96h 50°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 99</b>	ganze Samen	300mM Essigsäure	2,5	0-96h 50°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste
<b>F 100</b>	ganze Samen	300mM Essigsäure	2,5	0-96h 41°C	0-48h N <sub>2</sub> ; 48-96h DL	Elfenbeinküste

Tab.12-2: Gehalte an freien Aminosäuren der bei einer konstanten Temperatur von 60°C durchgeführten Inkubationen von Kakaosamen

	Tag	mg*g <sup>-1</sup> ffTM														%		mg*g <sup>-1</sup> ffTM
		Asp	Glu	Asn	Ser	Gly	Thr	Ala	Tyr	Trp	Val	Phe	Ile	Leu	Lys	Gesamtgehalt	Hydrophobe Aminosäuren	GABA
<b>F 57</b>	0	1,50	2,97	1,49	0,18	0,07	0,09	0,25	0,46	0,04	0,21	0,26	0,17	0,17	0,33	8,87	17,10	0,05
	1	0,15	3,48	0,91	0,16	0,07	0,07	0,44	0,50	0,05	0,21	0,30	0,14	0,30	0,43	7,71	24,61	0,90
	2	0,09	1,00	0,38	0,08	0,04	0,04	0,20	0,23	-	0,09	0,16	0,06	0,21	-	2,81	34,31	0,18
	3	0,15	0,69	0,36	0,07	0,04	0,03	0,20	0,22	-	0,07	0,13	0,04	0,19	-	2,32	36,41	0,15
	4	0,09	0,76	0,34	0,08	0,05	0,04	0,20	0,24	0,03	0,11	0,15	0,06	0,23	-	2,62	38,22	0,16
<b>F 58</b>	0	0,54	4,31	1,22	0,16	0,08	0,08	0,24	0,44	0,03	0,23	0,31	0,16	0,16	0,25	8,69	17,76	0,12
	1	0,11	0,81	0,46	0,09	0,04	0,04	0,35	0,22	-	0,09	0,15	0,07	0,17	-	2,74	38,48	0,26
	2	0,15	0,78	0,31	0,08	0,05	0,04	0,21	0,20	-	0,08	0,15	0,05	0,16	-	2,55	33,17	0,20
	3	0,11	1,34	0,34	0,11	0,06	0,06	0,23	0,22	0,03	0,15	0,18	0,10	0,25	-	3,61	31,51	0,33
	4	0,12	0,70	0,40	0,11	0,06	0,06	0,21	0,20	0,04	0,14	0,20	0,08	0,31	-	3,03	37,58	0,21
<b>F 59</b>	0	0,54	4,31	1,22	0,16	0,08	0,08	0,24	0,44	0,03	0,23	0,31	0,16	0,16	0,25	8,69	17,76	0,12
	1	0,14	1,48	0,35	0,10	0,06	0,05	0,34	0,25	-	0,13	0,20	0,09	0,17	-	3,79	31,18	0,34
	2	0,10	0,93	0,23	0,08	0,05	0,04	0,22	0,25	-	0,11	0,16	0,07	0,20	-	2,79	35,82	0,22
	3	0,11	0,84	0,22	0,10	0,05	0,05	0,25	0,23	-	0,11	0,17	0,07	0,22	-	2,79	37,68	0,24
	4	0,12	0,81	0,24	0,09	0,05	0,04	0,15	0,17	-	0,10	0,13	0,07	0,19	-	2,35	34,80	0,19
<b>F 60</b>	0	0,54	4,31	1,22	0,16	0,08	0,08	0,24	0,44	0,03	0,23	0,31	0,16	0,16	0,25	8,69	17,76	0,12
	1	0,27	0,86	0,66	0,12	0,05	0,05	0,53	0,27	0,03	0,10	0,21	0,08	0,22	-	3,81	36,89	0,35
	2	0,09	1,60	0,51	0,13	0,06	0,07	0,30	0,36	0,05	0,21	0,30	0,13	0,35	-	4,84	34,11	0,50
	3	0,13	1,30	0,40	0,14	0,07	0,07	0,22	0,27	0,04	0,17	0,22	0,09	0,30	0,16	4,10	31,19	0,34
	4	0,11	1,03	0,33	0,13	0,06	0,07	0,21	0,24	0,05	0,17	0,25	0,10	0,36	0,15	3,80	34,87	0,27
<b>F 61</b>	0	0,54	4,31	1,22	0,16	0,08	0,08	0,24	0,44	0,03	0,23	0,31	0,16	0,16	0,25	8,69	17,76	0,12
	1	0,07	1,94	0,33	0,11	0,07	0,07	0,27	0,29	-	0,20	0,22	0,16	0,28	-	4,57	31,15	0,52
	2	0,07	1,50	0,28	0,10	0,06	0,07	0,26	0,29	0,03	0,16	0,21	0,10	0,28	0,11	4,05	31,95	0,36
	3	0,15	0,64	0,31	0,08	0,04	0,04	0,18	0,16	0,03	0,12	0,18	0,07	0,26	-	2,68	36,40	0,15
	4	0,07	0,62	0,18	0,07	0,04	0,04	0,14	0,16	-	0,10	0,14	0,06	0,22	-	2,00	40,03	0,16
<b>F 92</b>	0	0,60	1,21	1,20	0,31	0,11	0,16	0,48	0,18	0,47	0,49	0,23	0,34	0,54	-	10,89	20,63	1,20
	1	0,31	0,51	0,33	0,12	0,04	0,05	0,30	0,19	0,55	0,22	0,38	0,11	0,48	-	5,71	29,10	0,33
	2	0,08	0,16	0,09	0,05	0,02	0,02	0,10	0,14	0,50	0,13	0,21	0,06	0,27	-	4,25	21,50	0,09
	3	0,14	0,30	0,21	0,13	0,06	0,06	0,22	0,22	0,38	0,20	0,35	0,12	0,44	-	2,94	53,03	0,21
	4	0,17	0,23	0,15	-	0,05	0,04	0,17	0,13	0,23	0,14	0,20	0,08	0,28	-	1,90	52,61	0,15

<b>F 93</b>	0	0,60	1,21	1,20	0,31	0,11	0,16	0,48	0,18	0,47	0,49	0,23	0,34	0,54	-	10,89	20,63	1,20
	1	0,11	0,31	0,24	0,09	0,03	0,05	0,18	0,17	0,47	0,20	0,40	0,11	0,47	-	4,68	32,65	0,24
	2	0,10	0,17	0,08	0,05	0,02	0,02	0,10	0,11	0,49	0,12	0,21	0,05	0,28	-	4,28	20,25	0,08
	3	0,19	0,19	0,04	0,07	0,03	0,02	0,14	0,11	0,52	0,12	0,20	0,05	0,25	-	4,90	17,87	0,04
	4	0,06	0,10	0,06	0,04	-	-	0,05	0,06	0,53	0,08	1,00	0,03	0,16	-	3,57	13,18	0,06
<b>F 94</b>	0	0,60	1,21	1,20	0,31	0,11	0,16	0,48	0,18	0,47	0,49	0,23	0,34	0,54	-	10,89	20,63	1,20
	1	0,06	0,15	0,14	-	-	-	0,07	0,04	0,49	0,08	0,11	0,03	0,18	-	3,49	14,75	0,14
	2	0,20	0,36	0,15	0,09	0,04	0,04	0,16	0,15	0,67	0,15	0,26	0,07	0,35	-	6,20	17,91	0,15
	3	0,08	0,09	0,06	-	-	-	0,05	-	0,55	0,06	0,07	0,02	0,13	-	3,55	8,90	0,06
	4	0,21	0,31	0,31	0,12	0,06	0,05	0,19	0,13	0,43	0,16	0,21	0,08	0,29	-	3,52	3-	0,31
<b>F 95</b>	0	0,60	1,21	1,20	0,31	0,11	0,16	0,48	0,18	0,47	0,49	0,23	0,34	0,54	-	10,89	20,63	1,20
	1	0,19	0,35	0,31	0,12	0,06	0,05	0,18	0,13	0,37	0,15	0,21	0,09	0,34	-	2,54	43,49	0,31
	2	0,11	0,14	0,11	-	0,04	-	0,08	0,05	0,33	0,07	0,11	0,04	0,17	-	1,21	43,36	0,11
	3	0,22	0,33	0,36	0,11	0,05	0,04	0,20	0,19	0,62	0,19	0,36	0,10	0,52	-	6,40	24,54	0,36
	4	0,17	0,20	0,11	0,08	0,05	0,02	0,11	0,07	0,41	1,00	0,12	0,04	0,19	-	2,55	24,47	0,11
<b>F 96</b>	0	0,55	0,28	-	0,05	-	-	0,05	-	0,60	0,06	-	0,02	0,06	-	5,22	3,57	-
	1	0,19	0,15	0,04	0,04	0,02	-	0,10	-	0,53	0,08	0,07	0,03	0,11	-	4,25	9,11	0,04
	2	0,22	0,24	0,10	0,09	0,05	0,04	0,17	0,11	0,36	0,10	1,00	0,05	0,17	-	1,79	34,88	0,10
	3	0,18	0,19	0,09	0,07	0,03	-	0,13	0,07	0,50	1,00	0,11	0,04	0,17	-	4,77	13,05	0,09
	4	0,15	0,15	-	0,07	0,05	-	0,10	0,05	0,41	0,09	0,08	0,04	0,15	-	2,38	19,97	-
<b>F 97</b>	0	0,55	0,28	-	0,05	-	-	0,05	-	0,60	0,06	-	0,02	0,06	-	5,22	3,57	-
	1	0,38	0,33	0,11	0,14	0,04	0,07	0,29	0,24	0,47	0,29	0,50	0,14	0,59	-	5,73	34,08	0,11
	2	0,16	0,18	0,04	-	0,05	0,04	0,15	0,12	0,29	0,12	0,21	0,05	0,26	-	1,77	51,22	0,04
	3	0,13	0,23	0,17	0,10	0,05	0,04	0,16	0,14	0,18	0,12	0,22	0,05	0,30	-	2,34	43,55	0,17
	4	0,17	0,21	0,06	0,10	0,06	0,04	0,16	0,14	0,44	0,16	0,21	0,07	0,29	-	3,26	31,60	0,06

**Tab.12-3: Gehalte an Phenolen und Anthocyanen der bei einer konstanten Temperatur von 60°C durchgeführten Inkubationen von Kakaosamen**

	Tag	mg*g <sup>-1</sup> ffTM			
		Epicatechin	Catechin	Cyanidin-3-galactosid	Cyanidin-3-arabinosid
<b>F 57</b>	0	36,97	0,46	1,06	2,17
	1	18,76	1,00	0,15	0,49
	2	11,89	1,25	0,03	0,21
	3	13,66	2,06	-	0,14
	4	5,64	1,56	-	-
<b>F 58</b>	0	44,71	0,63	1,29	2,32
	1	15,33	1,06	0,20	0,58
	2	12,60	1,17	0,12	0,35
	3	8,24	0,82	-	0,16
	4	6,18	0,68	-	-
<b>F 59</b>	0	44,71	0,63	1,29	2,32
	1	19,57	1,49	0,21	0,69
	2	12,08	1,25	0,11	0,28
	3	9,39	1,16	-	0,13
	4	8,35	1,26	-	-
<b>F 60</b>	0	44,71	0,63	1,29	2,32
	1	25,21	1,07	0,26	0,77
	2	13,49	1,10	0,07	0,31
	3	11,19	1,18	-	0,23
	4	5,38	0,75	-	-
<b>F 61</b>	0	44,71	0,63	1,29	2,32
	1	21,09	1,18	0,17	0,67
	2	11,81	1,28	0,08	0,26
	3	7,01	0,86	-	0,09
	4	4,50	1,06	-	-
<b>F 91</b>	0	18,80	0,55	0,89	1,20
	1	21,24	0,40	1,06	1,89
	2	7,85	0,26	0,23	0,54
	3	8,16	0,26	-	-
	4	4,30	0,30	-	-
<b>F 92</b>	0	18,80	0,55	0,89	1,20
	1	9,75	0,45	-	0,15
	2	4,01	0,18	-	-
	3	2,58	0,16	-	-
	4	2,57	0,17	-	-
<b>F 93</b>	0	18,80	0,55	0,89	1,20
	1	6,25	0,28	-	-
	2	3,77	0,10	-	-
	3	3,02	0,13	-	-
	4	1,85	-	-	-

<b>F 94</b>	0	18,80	0,55	0,89	1,20
	1	8,45	0,24	-	0,19
	2	4,20	0,10	-	-
	3	4,16	0,08	-	-
	4	1,97	0,08	-	-
<b>F 95</b>	0	18,80	0,55	0,89	1,20
	1	5,15	0,18	-	-
	2	3,23	0,09	-	-
	3	2,46	0,09	-	-
	4	1,90	0,03	-	-
<b>F 96</b>	0	24,67	0,50	1,03	2,02
	1	6,63	0,77	-	-
	2	3,67	0,67	-	-
	3	2,38	0,47	-	-
	4	1,22	0,28	-	-
<b>F 97</b>	0	24,67	0,50	1,03	2,02
	1	5,64	0,31	-	-
	2	3,73	0,21	-	-
	3	4,61	0,34	-	-
	4	1,92	0,16	-	-

**Tab.12-4: Gehalte an Catechin, Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinsid aller durchgeführten Inkubationen**

	Tag	mg*g <sup>-1</sup> ffTM		
		Catechin	Cyanidin-3-galactosid	Cyanidin-3-arabinsid
<b>F 4</b>	0	0,72	2,58	4,88
	1	0,87	1,25	3,69
	2	0,77	1,35	4,16
	3	1,16	-	0,71
	4	0,91	-	-
<b>F 5</b>	0	0,72	2,58	4,88
	1	0,67	2,22	4,46
	2	0,74	1,31	3,88
	3	1,36	-	0,97
	4	0,81	-	-
<b>F 6</b>	0	0,72	2,58	4,88
	1	0,87	1,03	5,03
	2	0,86	1,19	3,87
	3	0,12	-	-
	4	0,11	-	-

<b>F 7</b>	0	0,40	2,77	5,71
	1	0,48	2,54	4,86
	2	0,83	2,34	3,70
	3	0,48	-	1,04
	4	0,53	-	-
<b>F 8</b>	0	0,40	2,77	5,71
	1	0,39	1,97	4,57
	2	0,86	2,31	4,62
	3	0,71	-	0,93
	4	0,53	-	-
<b>F 9</b>	0	0,40	2,77	5,71
	1	0,52	1,97	4,13
	2	0,49	1,25	3,26
	3	0,25	-	-
	4	0,13	-	-
<b>F 10</b>	0	0,62	1,41	2,87
	1	0,62	0,57	3,33
	2	0,97	1,64	3,35
	3	1,06	-	0,39
	4	0,78	-	-
<b>F 11</b>	0	0,62	1,41	2,87
	1	0,72	2,19	6,03
	2	0,56	1,30	2,85
	3	0,98	-	0,68
	4	1,10	-	-
<b>F 12</b>	0	0,62	1,41	2,87
	1	0,63	1,32	4,15
	2	0,27	0,28	1,29
	3	0,51	-	-
	4	0,28	-	-
<b>F 16</b>	0	0,46	1,54	2,69
	1	0,61	1,45	2,55
	2	0,82	0,05	0,65
	3	0,88	1,85	3,37
	4	0,76	-	0,15
<b>F 17</b>	0	0,46	1,54	2,69
	1	0,49	2,14	3,62
	2	0,60	1,52	2,83
	3	0,99	-	0,71
	4	0,78	-	0,18

<b>F 18</b>	0	0,46	1,54	2,69
	1	0,48	1,91	3,75
	2	0,44	1,11	2,32
	3	0,40	-	0,20
	4	0,18	-	-
<b>F 19</b>	0	0,85	1,45	2,38
	1	0,81	1,50	2,64
	2	0,83	1,21	2,58
	3	0,57	-	0,32
	4	0,43	-	-
<b>F 20</b>	0	0,85	1,45	2,38
	1	0,71	1,68	3,05
	2	0,67	0,94	2,15
	3	0,42	-	0,20
	4	0,42	-	0,31
<b>F 21</b>	0	0,85	1,45	2,38
	1	0,82	0,67	1,39
	2	0,26	-	0,80
	3	0,17	-	-
	4	0,13	-	-
<b>F 24</b>	0	0,80	1,38	2,21
	1	0,71	1,66	3,09
	2	0,57	1,11	2,29
	3	0,75	1,63	2,80
<b>F 25</b>	0	0,80	1,38	2,21
	1	0,94	1,31	2,08
	2	0,69	1,55	2,92
	3	0,68	1,27	2,21
<b>F 26</b>	0	0,80	1,38	2,21
	1	0,50	1,27	2,42
	2	0,68	1,15	1,97
	3	0,67	1,56	2,72
<b>F 27</b>	0	0,31	1,60	3,33
	1	0,79	0,21	0,76
	2	1,02	-	0,32
	3	1,02	-	0,18
<b>F 28</b>	0	0,53	1,35	2,43
	1	0,82	0,21	0,66
	2	0,92	0,07	0,38
	3	0,50	-	0,11
<b>F 29</b>	0	0,31	1,60	3,33
	1	0,42	2,15	3,67
	2	0,42	1,33	2,72
	3	0,19	0,38	1,00

<b>F 30</b>	0	0,31	1,60	3,33
	1	0,37	1,07	2,62
	2	0,28	0,80	1,83
	3	0,24	0,74	2,21
<b>F 31</b>	0	0,53	1,35	2,43
	1	0,63	1,18	1,85
	2	0,41	0,45	0,70
	3	0,16	-	0,18
<b>F 32</b>	0	0,31	1,60	3,33
	1	0,49	1,40	2,87
	2	0,80	1,15	2,04
	3	0,62	0,54	1,42
<b>F 33</b>	0	0,31	1,60	3,33
	1	0,19	0,99	2,32
	2	0,39	0,91	1,87
	3	0,44	0,93	1,77
<b>F 34</b>	0	0,53	1,35	2,43
	1	0,60	1,28	2,41
	2	0,29	0,64	1,09
	3	0,28	0,66	1,34
<b>F 35</b>	0	0,53	1,35	2,43
	1	1,01	1,84	3,20
	2	0,94	1,22	2,22
	3	0,68	0,86	1,74
<b>F 36</b>	0	0,53	1,35	2,43
	1	0,75	1,56	2,80
	2	0,88	1,69	2,62
	3	0,87	1,42	2,46
<b>F 39</b>	0	0,56	0,81	1,46
	1	0,51	0,39	0,93
	2	0,62	0,27	0,97
	3	0,56	-	-
	4	0,24	-	-
<b>F 40</b>	0	0,56	0,81	1,46
	1	0,44	0,33	0,71
	2	0,56	0,22	0,60
	3	0,44	-	0,12
	4	0,30	-	-
<b>F 41</b>	0	0,56	0,81	1,46
	1	0,59	0,50	0,98
	2	0,50	0,69	1,36
	3	0,98	-	0,23
	4	0,49	-	0,10

<b>F 42</b>	0	0,56	0,81	1,46
	1	0,63	0,57	0,99
	2	0,58	0,57	0,87
	3	0,43	-	0,14
	4	0,42	-	0,16
<b>F 43</b>	0	0,56	0,81	1,46
	1	0,55	0,63	1,83
	2	0,60	0,80	1,54
	3	0,48	-	0,14
	4	0,43	-	-
<b>F 44</b>	0	0,56	0,81	1,46
	1	0,77	1,00	2,05
	2	0,82	0,56	0,87
	3	0,65	-	0,44
	4	0,58	-	0,14
<b>F 45</b>	0	0,64	1,44	2,87
	1	0,42	1,50	2,72
	2	0,75	0,51	1,74
	3	0,51	-	0,25
	4	0,46	-	0,20
<b>F 46</b>	0	0,64	1,44	2,87
	1	0,48	1,57	2,92
	2	0,36	0,54	1,55
	3	0,62	-	0,34
	4	0,33	-	-
<b>F 47</b>	0	0,64	1,44	2,87
	1	0,54	1,30	2,26
	2	0,35	1,75	2,84
	3	1,07	0,07	0,48
	4	1,40	-	0,32
<b>F 48</b>	0	0,64	1,44	2,87
	1	0,80	1,74	3,23
	2	0,71	1,46	2,29
	3	1,49	-	0,40
	4	2,10	-	0,23
<b>F 49</b>	0	0,64	1,44	2,87
	1	0,66	1,23	2,58
	2	0,60	1,80	3,17
	3	1,05	-	0,46
	4	1,40	-	0,29

<b>F 50</b>	0	0,64	1,44	2,87
	1	0,56	1,67	2,98
	2	0,90	1,20	2,41
	3	0,87	0,03	0,46
	4	0,92	-	0,29
<b>F 51</b>	0	0,34	1,19	1,98
	1	1,09	1,30	2,07
	2	0,46	1,15	2,37
	3	1,02	-	0,35
	4	0,79	-	0,16
<b>F 52</b>	0	0,34	1,19	1,98
	1	0,92	1,08	1,67
	2	0,35	0,98	1,73
	3	0,65	0,05	0,60
	4	0,71	-	0,31
<b>F 53</b>	0	0,34	1,19	1,98
	1	0,35	1,19	1,98
	2	0,64	1,12	1,72
	3	0,45	-	0,47
	4	0,90	-	0,19
<b>F 54</b>	0	0,34	1,19	1,98
	1	0,32	1,30	2,49
	2	0,31	1,25	2,76
	3	0,60	-	0,32
	4	0,77	-	0,29
<b>F 55</b>	0	0,34	1,19	1,98
	1	0,55	1,36	3,05
	2	0,55	1,09	2,49
	3	0,88	-	0,48
	4	1,53	-	0,24
<b>F 56</b>	0	0,34	1,19	1,98
	1	0,55	1,16	2,56
	2	0,58	1,03	1,82
	3	0,85	-	0,47
	4	1,09	-	0,11
<b>F 57</b>	0	0,46	1,06	2,17
	1	1,00	0,15	0,49
	2	1,25	0,03	0,21
	3	2,06	-	0,14
	4	1,56	-	-

<b>F 58</b>	0	0,63	1,29	2,32
	1	1,06	0,20	0,58
	2	1,17	0,12	0,35
	3	0,82	-	0,16
	4	0,68	-	-
<b>F 59</b>	0	0,63	1,29	2,32
	1	1,49	0,21	0,69
	2	1,25	0,11	0,28
	3	1,16	-	0,13
	4	1,26	-	-
<b>F 60</b>	0	0,63	1,29	2,32
	1	1,07	0,26	0,77
	2	1,10	0,07	0,31
	3	1,18	-	0,23
	4	0,75	-	-
<b>F 61</b>	0	0,63	1,29	2,32
	1	1,18	0,17	0,67
	2	1,28	0,08	0,26
	3	0,86	-	0,09
	4	1,06	-	-
<b>F 62</b>	0	0,46	1,06	2,17
	1	0,44	1,16	2,34
	2	0,61	0,95	2,17
	3	0,60	-	0,37
	4	0,73	-	0,17
<b>F 63</b>	0	0,46	1,06	2,17
	1	0,39	0,91	1,90
	2	0,36	0,76	1,88
	3	0,74	-	0,49
	4	0,70	-	0,22
<b>F 64</b>	0	0,46	1,06	2,17
	1	0,76	0,90	1,86
	2	0,68	0,89	1,78
	3	0,89	-	0,49
	4	0,63	-	0,18
<b>F 65</b>	0	0,46	1,06	2,17
	1	0,34	0,87	1,57
	2	0,37	1,05	1,95
	3	0,59	-	0,38
	4	0,81	-	0,20

<b>F 66</b>	0	0,70	2,18	3,78
	1	0,41	1,25	2,28
	2	1,04	0,88	1,70
	3	0,67	0,24	0,83
	4	0,84	0,21	0,94
<b>F 67</b>	0	0,70	2,18	3,78
	1	0,37	0,09	1,36
	2	0,42	-	1,29
	3	0,60	-	0,24
	4	0,32	-	-
<b>F 68</b>	0	0,70	2,18	3,78
	1	0,77	0,48	2,40
	2	0,31	-	0,60
	3	0,44	-	0,51
	4	0,30	-	0,15
<b>F 69</b>	0	0,70	2,18	3,78
	1	0,31	0,38	1,41
	2	0,90	0,43	1,33
	3	0,32	0,46	1,52
	4	0,33	0,21	0,53
<b>F 70</b>	0	0,70	2,18	3,78
	1	1,06	0,27	1,50
	2	1,46	-	0,38
	3	1,42	-	0,16
	4	1,51	-	0,24
<b>F 71</b>	0	0,70	2,18	3,78
	1	0,50	-	0,68
	2	0,45	-	0,19
	3	0,32	-	0,17
	4	0,31	-	0,10
<b>F 72</b>	0	0,52	2,27	4,18
	1	0,67	1,82	4,13
	2	0,78	0,63	1,79
	3	0,90	0,22	0,86
	4	1,04	0,21	1,09
<b>F 73</b>	0	0,52	2,27	4,18
	1	0,48	0,22	1,96
	2	0,60	-	1,26
	3	0,49	-	0,30
	4	0,32	-	0,06

<b>F 74</b>	0	0,52	2,27	4,18
	1	1,06	0,19	1,32
	2	1,33	-	0,31
	3	1,55	-	0,36
	4	1,71	-	0,23
<b>F 75</b>	0	1,16	1,53	3,02
	1	0,81	-	0,25
	2	0,48	-	0,27
	3	0,48	-	0,06
	4	0,40	-	0,11
<b>F 76</b>	0	0,52	2,27	4,18
	1	0,67	0,81	3,16
	2	0,65	0,07	1,00
	3	0,72	-	0,48
	4	0,42	-	0,33
<b>F 77</b>	0	1,16	1,53	3,02
	1	1,06	0,31	1,43
	2	0,65	0,32	1,37
	3	0,53	-	0,32
	4	0,54	0,13	0,45
<b>F 79</b>	0	1,65	1,22	2,39
	1	0,56	0,26	0,77
	2	0,55	0,32	0,98
	3	0,17	-	0,33
	4	0,31	-	0,20
<b>F 80</b>	0	1,65	1,22	2,39
	1	0,97	0,14	1,11
	2	1,31	-	0,34
	3	1,36	-	0,19
	4	1,43	-	0,14
<b>F 81</b>	0	1,65	1,22	2,39
	1	0,85	0,37	0,97
	2	0,34	0,29	1,04
	3	0,24	0,17	0,47
	4	0,31	-	0,28
<b>F 81.1</b>	0	0,72	1,65	2,53
	1	0,47	-	0,31
	2	0,67	-	-
	3	0,57	-	-
<b>F 82</b>	0	0,72	1,65	2,53
	1	0,73	0,36	1,55
	2	0,84	0,16	0,72
	3	0,90	-	0,30

<b>F 83</b>	0	0,72	1,65	2,53
	1	0,51	-	0,46
	2	0,80	-	0,24
	3	0,31	-	-
<b>F 84</b>	0	0,72	1,65	2,53
	1	0,59	0,20	0,73
	2	0,33	0,08	0,49
	3	0,48	-	0,15
<b>F 85</b>	0	0,72	1,65	2,53
	1	0,89	-	0,81
	2	0,92	-	0,19
	3	0,49	-	-
<b>F 86</b>	0	0,39	1,36	3,03
	1	0,48	0,15	0,84
	2	0,58	0,16	0,75
	3	0,32	-	0,16
<b>F 87</b>	0	0,39	1,36	3,03
	1	0,48	0,28	1,20
	2	0,30	0,10	0,38
	3	0,31	-	0,19
<b>F 88</b>	0	0,39	1,36	3,03
	1	0,63	-	0,85
	2	-	-	-
	3	0,70	-	0,25
<b>F 89</b>	0	0,39	1,36	3,03
	1	0,53	-	0,75
	2	0,68	0,05	0,83
	3	0,65	0,13	0,80
<b>F 91</b>	0	0,55	0,89	1,20
	1	0,40	1,06	1,89
	2	0,26	0,23	0,54
	3	0,26	-	-
	4	0,30	-	-
<b>F 92</b>	0	0,55	0,89	1,20
	1	0,45	-	0,15
	2	0,18	-	-
	3	0,16	-	-
	4	0,17	-	-
<b>F 93</b>	0	0,55	0,89	1,20
	1	0,28	-	-
	2	0,10	-	-
	3	0,13	-	-
	4	-	-	-

<b>F 94</b>	0	0,55	0,89	1,20
	1	0,24	-	0,19
	2	0,10	-	-
	3	0,08	-	-
	4	0,08	-	-
<b>F 95</b>	0	0,55	0,89	1,20
	1	0,18	-	-
	2	0,09	-	-
	3	0,09	-	-
	4	0,03	-	-
<b>F 96</b>	0	0,50	1,03	2,02
	1	0,77	-	-
	2	0,67	-	-
	3	0,47	-	-
	4	0,28	-	-
<b>F 97</b>	0	0,50	1,03	2,02
	1	0,31	-	-
	2	0,21	-	-
	3	0,34	-	-
	4	0,16	-	-
<b>F 98</b>	0	0,98	2,06	3,39
	1	0,93	-	0,36
	2	0,65	-	-
	3	0,13	-	-
	4	0,09	-	-
<b>F 99</b>	0	0,98	2,06	3,39
	1	0,82	-	0,65
	2	0,22	-	-
	3	0,54	-	-
	4	0,53	-	-
<b>F 100</b>	0	0,98	2,06	3,39
	1	0,99	1,12	3,69
	2	1,17	-	0,92
	3	0,63	-	0,26
	4	0,57	-	-