

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Science

Biochemische und chromatographische Untersuchungen
zur Kakaofermentation

Bachelorarbeit
im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Zacharias, Eileen

Hamburg
am 24.02.2012

Gutachter: Prof. Dr. Birger Anspach (HAW Hamburg)

Gutachter: Dr. Daniel Kadow (Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt in den Laboratorien vom Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg im Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Eppendorf, Campus Forschung, Abteilung Klinische Chemie

Inhalt

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1 ZUSAMMENFASSUNG	6
2 ABSTRACT	7
3 EINLEITUNG	8
4 HINTERGRUND	10
4.1 Der Kakaobaum und die Aromavariation seiner Samen.....	10
4.2 Fermentationsprozess	12
4.3 Trocknung und Röstung	14
4.4 Die Speicherproteine als Aromavorstufenbildner	15
5 MATERIAL UND METHODEN.....	18
5.1 Verwendetes Material	18
5.2 Probenvorbereitung	18
5.2.1 Entwässerung.....	18
5.2.2 Entfettung	19
5.3 Herstellung von Acetontrockenpulver	19
5.4 Extraktion	19
5.4.1 Extraktion im Sörensen-Puffer	20
5.4.2 Oligopeptidextraktion aus Acetontrockenpulver.....	20
5.5 Entfernung der Phenole	21
5.6 Verdaukontrolle der Proteine mithilfe der SDS-PAGE	21
5.6.1 Zusammensetzung und Gießen der Gele	22
5.6.2 Probenvorbereitung	22
5.6.3 Messung.....	23
5.6.4 Färben und Entfärben	23
5.7 Inkubation des Proteinrohextraktes	24
5.8 Inkubationen von frischen Kakaosamen	24
5.8.1 Einstellungen bei den Proben aus Ecuador und Trinidad.....	25
5.8.2 Einstellungen bei den Proben aus Costa Rica	26

5.9	Trocknung und Röstung frischer Kakaosamen	26
5.10	Messung freier Aminosäuren	27
5.10.1	Probenaufbereitung.....	27
5.10.2	Vermessung und Quantifizierung	28
5.11	Trennung der Peptide aus den Speicherproteinen mittels HPLC	29
5.11.1	Probenvorbereitung	29
5.11.2	Vermessung und Darstellung	29
5.12	Detektion der Peptidsequenzen mittels MS	30
5.12.1	Probenvorbereitung	30
5.12.2	Vermessung und Auswertung.....	30
5.13	Messung der organischen Säuren	33
5.13.1	Probenvorbereitung	33
5.13.2	Vermessung und Quantifizierung.....	33
5.14	Erstellen von 3D-Strukturen der Speicherproteine	34
5.15	Versuchsanordnung	35
5.15.1	Fließdiagramm für Versuche mit dem Proteinrohextrakt.....	35
5.15.2	Fließdiagramm für Versuche mit frischen Samen.....	36
6	ERGEBNISSE	37
6.1	Peptid- und Spaltungsmuster.....	37
6.1.1	Peptidzuordnung.....	37
6.1.2	Spaltungsspezifität.....	38
6.1.3	3D-Struktur der Speicherproteine.....	40
6.2	Steuerung der Proteolyse über pH-Wert und Inkubationsdauer.....	43
6.2.1	Vergleich hinsichtlich des pH-Wertes	43
6.2.2	Vergleich hinsichtlich der Inkubationsdauer	44
6.3	Steuerung in Fermentation bzw. fermentationsähnlichen Inkubationen .	47
6.3.1	Vergleich zwischen Essig- und Milchsäure.....	47
6.3.2	Vergleich von vorgetrockneten bzw. nicht getrockneten Samen	49
6.3.3	Auswirkungen der Inkubationsdauer	50
6.3.4	Auswirkungen von pH-Wert und Inkubationszeit auf Röstung ..	53

7	DISKUSSION	54
7.1	Peptid- und Spaltungsmuster.....	54
7.2	Steuerung der Proteolyse über pH-Wert und Inkubationsdauer.....	56
7.3	Steuerung in Fermentation bzw. fermentationsähnlichen Inkubationen.	58
	LITERATURVERZEICHNIS.....	61
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	64
	ANHANG.....	65
A	Konstruktionszeichnung.....	65
B	Sequenzen analysierter Proteine.....	66
B.1	Aminosäure-Sequenz von Albumin.....	66
B.2	Aminosäure-Sequenz von Vicilin.....	67

Abkürzungsverzeichnis

AA – Essigsäure (Engl.: acetic acid)
ADP – Acetontrockenpulver (Engl.: aceton dry powder)
AA – Aminosäure(n) (Engl.: amino acid(s))
DM – Trockenmasse (Engl.: dry mass)
ffdm – fettfreie Trockenmasse (Engl.: fatty free dry mass)
HPLC – High Performance Liquid Chromatography
IEXC – Ionenaustauschchromatographie (Engl.: ion exchange chromatography)
isokr. – isokratisch
KT – keine Trocknung
LA – Milchsäure (Engl.: lactic acid)
mp – mit pH-Wert-Einstellung
MS – Massenspektrometrie
op – ohne pH-Wert-Einstellung
org. – organisch
RP – reversed phase
RPC – reversed phase chromatography
RT – Raumtemperatur
sog. – sogenannte
TFA – Trifluoressigsäure
UPLC – Ultra Performance Liquid Chromatography
VT - Vortrocknung

1 Zusammenfassung

Die essentiellen Schokoladenaromavorstufen werden während der Fermentation durch die Proteolyse der kakaoeigenen Speicherproteine gebildet. Die Speicherproteine beinhalten zu 53 % Albumin und zu 48 % Vicilin. Letzteres besteht aus drei Untereinheiten mit Molekulargewichten von 47 kDa, 31 kDa und 15 kDa. Durch Inkubationsversuche mit Proteinextrakten und frischen Kakaosamen wurde die Steuerbarkeit der Proteolyse untersucht. Peptidspektren, die mittels HPLC erstellt wurden, gaben Aufschluss über den Einfluss des pH-Wertes und der Inkubationsdauer. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der pH-Wert eine bedeutendere Rolle spielt als die Inkubationsdauer. Dafür sprechen auch die Ergebnisse aus den Messungen der freien Aminosäuren. Diese zeigen, dass bei einem pH-Wert von 3 der Gehalt an freien Aminosäuren um etwa 90 % geringer ist als bei pH 4 oder pH 5.

Bei Vorortfermentationen gibt es die Möglichkeit einer Vortrocknung der Kakaosamen. Diese bedingt, dass die Pulpa schneller abfließt. Die Auswirkungen auf die Aromabildung wurden experimentell ermittelt. Die Inkubation von Kakaosamen mit Milchsäure simuliert eine Trocknung der Samen. Dies konnte anhand einer Verschiebung der organischen Säuren belegt werden. Werden die Samen vorgetrocknet, so wird die Fermentation von Milchsäure dominiert. Die Ergebnisse der resultierenden Peptidspektren zeigen, dass eine Vortrocknung zu einem schwächer ausgeprägten Peptidspektrum führt. Da hydrophile Peptide zu den aromarelevanten Vorstufen gehören, sollten davon möglichst viele entstehen. Durch zusätzliche chromatographische Messungen wurde weiterhin bestätigt, dass eine Inkubation in Essigsäure mehr freie Aminosäuren hervorruft als eine Inkubation in Milchsäure. Die hydrophoben Aminosäuren bilden zusammen mit den Peptiden die Grundlage für die aromarelevanten Vorstufen. Der Speicherproteinabbau wird ebenfalls durch eine von Essigsäure dominierende Inkubation der Samen beschleunigt. Diese Ergebnisse sprechen neben den Peptidspektren und der Verschiebung der organischen Säuren gegen eine Vortrocknung der Samen.

Massenspektrometrische Untersuchungen ergaben eine Anzahl von Peptiden, die während der Inkubation entstanden. Die detektierten Peptide des Albumins deckten 63 % dessen Aminosäure-Sequenz ab. Vom Vicilin wurden 18 % der Sequenz durch detektierte Peptide abgedeckt. Bei der Betrachtung der Spaltungsspezifität der Proteasen wurde deutlich, dass die Spaltungsstellen nicht nur mit den bekannten Mustern, hervorgerufen durch Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin, erklärt werden können. Weitere Untersuchungen könnten klären, ob der Aspartylendoproteasentyp TcAP1 oder die Aminopeptidase Einfluss auf das Spaltungsmuster haben.

2 Abstract

The essential chocolate flavor precursors are generated during fermentation by proteolysis of the cocoa storage protein. The storage proteins contain 53 % of albumin and 48 % of vicilin. The latter consists of three subunits with molecular weights of 47 kDa, 31 kDa and 15 kDa. Incubations with protein extracts and fresh cocoa seeds indicate the controllability of the proteolysis. Peptide spectra by means of HPLC provide informations about the influence of the pH-value and the incubation length. The results revealed that the cause variable pH-value is more important than the duration of incubation. Due to this, measurements of free amino acids at a pH-value of 3 have shown that the amount is about 90 % lower than at pH-values of 4 or 5.

Within the scope of fermentations on-site, there is the possibility of seed-drying before the genuine fermentation has started. This causes a faster drainage of the pulp. The effect on the aroma development was tested. The incubation of cocoa seeds with lactic acid simulated the pre-drying. This was proved by the shift of the organic acid ratio. The fermentation is dominated by lactic acid when the seeds are pre-dried. The results of the peptide spectra have shown that the pre-drying causes a lower spectrum. Since these hydrophilic peptides are one of the relevant aroma precursors, a lot of them should be generated. Additional chromatographic measurements have also shown that an incubation of seeds in acetic acid causes more free amino acids than the incubation in lactic acid. Hydrophobic amino acids and peptides are the basic compounds for the aroma specific precursors. The degradation of the storage protein is accelerated by acetic acid. These results indicate beneath the peptide spectra and the shift of organic acids that a pre-drying is not useful.

Mass-spectrometric experiments resulted in a number of peptides which were generated during incubation. The peptides of the albumin covered 63 % of the amino acid sequence and the peptides from the vicilin covered 18 % of those amino acid sequence. The splitting pattern of the proteases intimate, that the known pattern of trypsin, chymotrypsin and pepsin cannot be responsible for all splits. Further experiments on other enzymes like aminopeptidase and TcAP1 could clarify if they have influence on the splitting pattern.

3 Einleitung

Das Genussmittel Schokolade ist heute jedem bekannt, die aufwendige Kakaoherstellung jedoch nur den Wenigsten.

Die Kakaosamen werden reifen Früchten entnommen und mikrobiologisch weiterverarbeitet, da frische Samen kein Schokoladenaroma aufweisen. Der Weg führt über die Fermentation, Trocknung sowie Röstung. Diese Prozessschritte sind unabdingbar für das unverwechselbare Schokoladenaroma (KIRCHHOFF et al., 1989; ROHAN, 1964), die Lagerfähigkeit, Haltbarkeit und Reduktion der Adstringenz.

Der Fermentationsprozess, welcher bis zu 7 Tage dauert, ist durchzogen von biochemischen Reaktionen. Exogene und endogene Faktoren beeinflussen einander im Wechsel. Angelockt durch den Zuckergehalt der Pulpa, initiieren Mikroorganismen die anaerobe Gärung. Die in der Pulpa befindliche Saccharose wird zu Glucose und Fructose umgewandelt. Die entstandene Glucose wird durch Hefen, die von den Beinen der Fruchtfliegen stammen, zu Ethanol und CO₂ abgebaut. Die Pulpa wird flüssig und fließt ab. Sauerstoff gelangt in die Fermentationsmasse und das zuvor entstandene Ethanol wird zu Essigsäure oxidiert. Milchsäure und Essigsäure, die durch Bakterien entstehen, dringen in die Kakaosamen ein und bedingen deren Absterben. Durch den Oxidationsprozess wird Wärme freigesetzt. Die Proteasen werden durch die Ansäuerung aktiviert und katalysieren den Abbau der Speicherproteine (VOIGT et al., 1995). Die Aspartylendoprotease, die ein pH-Optimum bei 3,5 hat, spaltet die Proteine zunächst in Peptide. Sobald der pH-Wert im Samengewebe ansteigt, spaltet die Carboxypeptidase, die ihr Optimum bei pH 5,8 hat, einzelne Aminosäuren ab (BIEHL et al., 1993). Die Peptide und freie Aminosäuren sind chromatographisch erfassbar. Der Abbauprozess der Peptide erfolgt sequenziell. Die enzymatische Spaltung der Speicherproteine spielt eine zentrale Rolle für die Entwicklung der Aromavorstufen.

Woher genau die Idee der Fermentation stammt ist nicht bekannt; sie begünstigt nach wie vor die Entfernung der Pulpa. Die Assoziation mit der Aromabildung wurde erst im letzten Jahrhundert hergestellt (LOPEZ und DIMICK, 1995).

Unterschiedliche Kakaotypen werden auf verschiedene Weise fermentiert. Der Criollo erlangt nach einer verkürzten Fermentationsdauer von 3 Tagen neben dem Schokoladenaroma eine nussige Note. In dieser Zeit findet eine geringe Proteolyse statt, daher bleibt mehr Speicherprotein intakt.

Die Typen Trinitario und Forastero, die über einen Zeitraum von 6-7 Tagen fermentiert werden, zeigen diese nussige Note ausschließlich, wenn sie einer Vortrocknung unterzogen wurden. Bei einer Vortrocknung reduziert sich die Menge der Pulpa. Die

aerobe Phase verkürzt sich, da der Sauerstoff wesentlich schneller in die Fermentationsmasse gelangt. Der pH-Wert verändert sich im Gegensatz zu einer klassischen Fermentation ohne Vortrocknung.

Aus diesem Kontext ergeben sich folgende Leitfragen, die im Laufe dieser Arbeit bearbeitet werden:

- Welche Peptide entstehen bei der Proteolyse der Speicherproteine und welche Spaltungsspezifität kann den relevanten Enzymen zugeordnet werden?
- Inwieweit kann die Proteolyse über den pH-Wert und die Inkubationszeit gesteuert werden?
- Können Auswirkungen der Proteolyse bei fermentationsähnlichen Inkubationen mit Milch- und Essigsäure festgestellt werden?
- Welche Auswirkungen hat eine Vortrocknung der Samen direkt nach der Ernte? Wie verändert sich das Verhältnis organischer Säuren mit und ohne Vortrocknung?
- Welchen Einfluss haben die Inkubationszeit und die pH-Wert-Einstellung bei fermentationsähnlichen Inkubationen? Ab welchem Tag der Inkubation wird beim Rösten der Samen ein Schokoladenaroma erlangt?

4 Hintergrund

4.1 Der Kakaobaum und die Aromavariation seiner Samen

Die Wildpflanze Kakao (*Theobroma cacao* L.) stammt ursprünglich aus dem Amazonasgebiet, wo er von den indianischen Ureinwohnern domestiziert wurde.

Mittlerweile wachsen die kultivierten Pflanzen in Gebieten rund um den Tropengürtel (20° N - 24° S). Die natürliche Umgebung von Kakaobäumen befindet sich im schattigen Unterholz von feuchten, tropischen Regenwäldern mit durchschnittlichen Temperaturen von 24 - 28°C. Die ideale Niederschlagsmenge liegt im Bereich von 1500 - 2000 mm, verteilt über das ganze Jahr. Kultiviert wird der Kakaobaum vorwiegend in Mischkulturen unter Schattenbäumen, aber auch in Monokulturen mit direkter Sonneneinstrahlung, wobei auf genügende Wasser- und Mineralstoffzufuhr geachtet werden muss (ROHSIUS et al., 2010). Der Kakaobaum kann eine Höhe von bis zu 15 m erreichen, in den Plantagen wird er jedoch auf 2 bis 4 m gestutzt.

Die Früchte, die eine Länge von bis zu 25 cm erreichen, reifen in 5 - 8 Monaten und beinhalten 5 Reihen von 25 - 50 Samen, die in das Fruchtfleisch eingebettet sind (siehe Abbildung 1). Sie wachsen direkt aus dem Stamm, welcher bis zu 50 dieser Früchte pro Saison trägt. Die unreife Frucht hat eine grüne Farbe, wohingegen die reifen Früchte ein Farbspektrum von gelb über rot bis hin zu braun aufweisen.

Die bohnenförmigen Samen haben eine Länge von ca. 2 cm und eine Breite von ca. 1 cm (INTERNETQUELLE NR.1). Je nach Sorte sind die

Kotyledonen (Keimblätter) meist lilafarbig oder wie bei dem Criollo-Typ weiß bis rosa. Sie befinden sich im Inneren des Samens (siehe Abbildung 2), zugehörig zu dem Embryo, und enthalten die Speicherproteine, die einen Anteil von 8- 10 % ausmachen. Die Kotyledonen, gebunden an die Embryonalachse, sind umschlossen von der Testa, welche eine Barriere während der Ansäuerung im Laufe der Fermentation darstellt. Die äußere Schicht ist die Pulpa, welche hauptsächlich aus Wasser besteht (LOPEZ und DIMICK, 1995).



Abbildung 1: Geöffnete reife Kakaofrucht mit den von der Pulpa umschlossenen Samen.

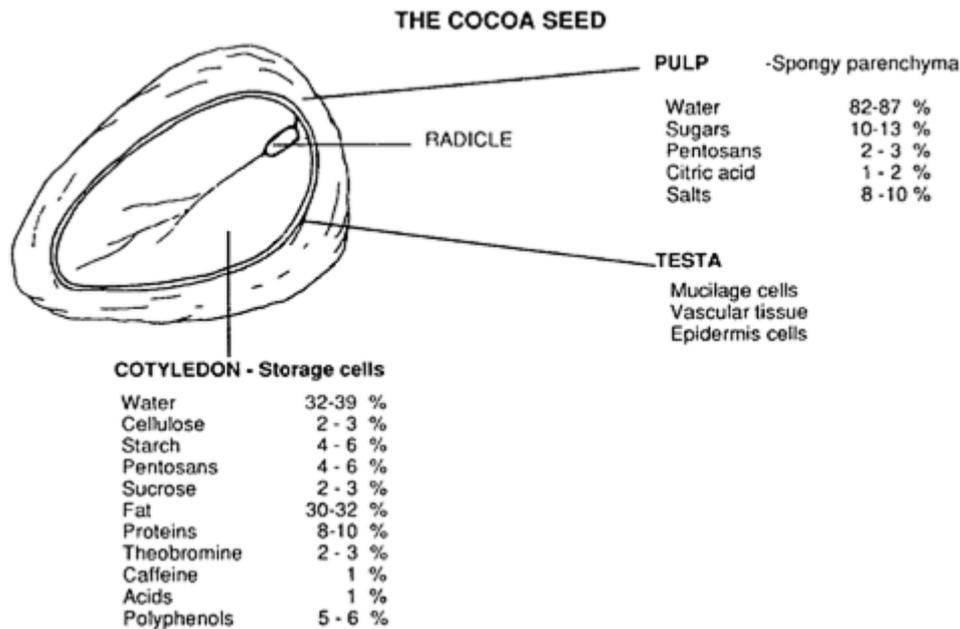


Abbildung 2: Biologische Übersicht des Kakaosamens (LOPEZ und DIMICK, 1995). Die Pulpa liegt direkt auf der Testa, welche die Kotyledonen umschließt. Im Inneren des Samens sind die Kotyledonen mit Speicherzellen sowie die Embryonalachse abgebildet.

Unterschieden werden Genotypen, die Kakao für die Massenproduktion liefern und Kakao, der sehr feine Aromaten ausbildet. Die Kakaogruppen Criollo, Nacional und Trinitario weisen ein feines Aroma auf und beispielsweise die Sorte Forastero wird für den Massenkakao verwendet (siehe Tabelle 1).

Die Fermentation von Feinkakao, der vorwiegend für dunkle Premium Schokolade Verwendung findet, beträgt lediglich 2 - 4 Tage, wohingegen der Massenkakao 4 - 7 Tage fermentiert wird. Um den Grad der Fermentation zu kontrollieren, werden regelmäßig Proben entnommen. Der Schnitttest (Cut-Test), bei dem die Samen der Länge nach durchgeschnitten werden, zeigt die Färbung im Inneren des Samens. Werden die Samen nicht fermentiert, sind die Samen im Inneren grau („slaty“). Im Laufe der Ansäuerung färben sie sich violett. Bei optimaler Fermentation sind die Samen hellbraun. Eine zu dunkle Braunfärbung weist auf eine Überfermentation hin, wobei ungewünschte Aromakomponenten (sog. „off-flavors“) gebildet werden (ROHSIUS et al., 2010).

Feinkakaosorten wie z. B. Arriba, Criollo, Nacional, Trinitariokulturen (Einteilung erfolgte durch den Handel) enthalten zusätzliche aromatische Komponenten (wie blumig, fruchtig, nussig, würzig, weinähnlich), die von der Pulpa abstammen und stark durch den Genotyp und die Wachstumsbedingungen beeinflusst werden (AFOAKWA et

al. 2008). Die feinen Aromen sind schwächer ausgebildet, so dass sie nicht den Kakaobasisgeschmack überdecken. Die Bildung von Alkohol und Säuren begünstigt die Produktion von aromarelevanten Estern mit fruchtigen Noten. Bei zu hoher Säurebelastung kann sich dies jedoch negativ auf das Aroma auswirken, da einige Verbindungen empfindlich auf zu hohe Säurekonzentrationen reagieren (LIEBEREI und VOIGT, im Druck).

Tabelle 1: Zuordnung der aromatischen Eigenschaften zu den bekanntesten Sorten (in Anlehnung an BUTLER, 2006).

Sorte	Aroma-Eigenschaften
Criollo	nussig, blumig,
Nacional	blumig, roh/bohlig/grün, fruchtig
Trinitario	sauer, fruchtig, blumig
Forastero	schokoladig, bitter, fruchtig

4.2 Fermentationsprozess

Die Kakaofrüchte werden nach der Ernte geöffnet und ihre zunächst sterilen Samen, die von der Pulpa umschlossen sind, werden mitsamt ihrer Pulpa auf einem Haufen oder in einer Holzkiste gesammelt. Dort verbleiben sie bis zu 7 Tage. Während dieser Zeit laufen außerhalb und innerhalb des Kakaosamens eine Vielfalt von biochemischen Prozessen ab.

Die Fermentation besteht aus den drei Phasen der Pulpazersetzung, der Ansäuerung und der Bräunung.

Die Zersetzung der Pulpa findet in den ersten beiden Tagen der Fermentation statt. In diesem Zeitraum herrschen anaerobe Bedingungen, da die Pulpa die Samen nahezu vollständig bedeckt. Hefen und Milchsäurebakterien, die entweder durch Fliegen oder durch Starterkulturen hinzugegeben werden, vergären den Zucker der Pulpa (SCHWAN und WHEALS, 2004), wobei Ethanol und etwas Milchsäure entstehen. Die Temperaturen liegen in diesen ersten beiden Tagen zwischen 35 und 45 °C. Der pH-Wert im Samen beträgt am Anfang der Fermentation ca. 6,3 (siehe Abbildung 3).

Während des 2 Tages wird die Masse von Hand durchmischt, um den Samen, die an den kälteren Randbereichen der Fermentationsmasse liegen, bessere Bedingungen zu schaffen. Die Ansäuerung findet während des 3. bis 5. Tages statt. Die Pulpa fließt nach und nach ab. Infolgedessen herrschen zunehmend aerobe Bedingungen in der Fermentationsmasse. Essigsäurebakterien oxidieren den Ethanol zu Essigsäure, was

einen Temperaturanstieg auf 45 - 55 °C hervorruft. Die Essig- und Milchsäure dringen durch Öffnen der Testa an der Mikropyle in den Samen ein, was zu einer Zersetzung der Zellstruktur führt (LIEBEREI und VOIGT, im Druck). Der Same stirbt aufgrund der Hitze und der Ansäuerung ab. Begleitet wird das Absterben von einer Ansammlung interner Flüssigkeit (sog. „aqua sangre“). Der pH-Wert im Sameninneren liegt im Bereich von 4,5 - 5,2 (ROHSIUS et al., 2010).

Während des 6. und 7. Tags wird die Masse ein weiteres Mal durchmischt. Initiiert durch die Ansäuerung, findet die Spaltung der Speicherproteine (siehe Kap. 4.4) und Zucker statt. Die beiden Enzyme Aspartylendoprotease (pH-Optimum 3,5) und Carboxypeptidase (pH-Optimum 5,8) sind entsprechend ihren pH-Optima aktiv (BIEHL et al., 1993). Die Aspartylendoprotease spaltet zunächst bei niedrigen pH-Werten die Proteine, insbesondere das Speicherprotein Vicilin-Globulin. Die hydrophoben Peptide werden bei pH-Wert-Erhöhung von der Carboxypeptidase in hydrophile Peptide und hydrophobe freie Aminosäuren zersetzt. Hieraus entstehen die essentiellen Aromavorläufer, die später in der Trocknung und Röstung für den typischen Kakaogeschmack verantwortlich sind (VOIGT et al. 1994a). Abgesehen davon, ist die Bildung der Vorläufer auch abhängig von dem Substrat und der Teilungsspezifität der Aspartylendoprotease (LIEBEREI und VOIGT, im Druck).

Desweiteren werden in dieser Phase die Polyphenole oxidiert, was zur Bräunung der Samen führt, sowie die Bitterkeit und Adstringenz reduziert (ROHSIUS et al., 2010).

Die Rohkakaqualität ist abhängig von der Dauer der Ansäuerung, sowie der Dauer der gesamten Fermentation und dem End-pH-Wert (VOIGT und BIEHL, 1995). Werden die Samen zu lange fermentiert, spricht man von einer Überfermentation. Die freigesetzten Aminosäuren und essentiellen Peptide werden durch aerobe Mikroorganismen abgebaut. Dabei werden biogene Amine durch Decarboxylierung freigesetzt und diese verursachen einen schinkenartigen Geruch bei der Röstung (LIEBEREI und VOIGT, im Druck).

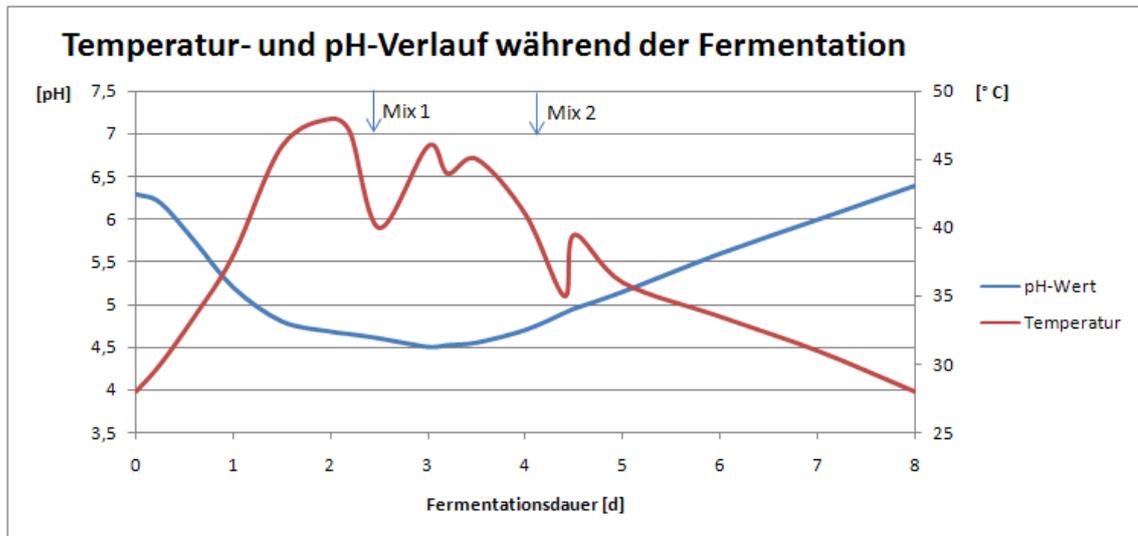


Abbildung 3: Verlauf von Temperatur und pH-Wert während der Fermentation (in Anlehnung an ROHSIUS et al., 2010). Die Kakaomasse wird bei Standortfermentationen am 2. und 4. Tag von Hand durchmischt. Dies verursacht Schwankungen im Temperaturverhalten.

4.3 Trocknung und Röstung

Im Anschluss an die Fermentation werden die Kakaosamen getrocknet. Dafür gibt es verschiedene Konstruktionen, die in verschiedenen Ländern unterschiedlich weit entwickelt sind. Der Solardryer ist dem Gewächshaus optisch zunächst ähnlich, unterschiedlich sind jedoch die beiden Dachschrägen, die übereinander versetzt angelegt sind. Der so entstandene Spalt dient dazu, die Feuchtigkeit aus dem Solardryer entweichen zu lassen. Bei zu kleiner Öffnung werden die Samen im Prinzip weiter fermentiert, was zu unerwünschten Aromen oder Schimmelpilzbildung führt. Einige Kakaobauern trocknen ihre Samen durch Ofenluft. Dabei können wiederum unerwünschte Aromen ausgebildet werden. Weiterhin gibt es Auslegeflächen, die mit Schiebedächern bei Regen geschlossen werden können. Die preisgünstigste Variante ist das einfache Auslegen der Samen auf dem Boden oder der Straße; dies wird vorrangig von Kleinbauern in der Form gehandhabt.

Die Trocknung dauert, abhängig von Methode und Wetterlage, ca. 6 - 14 Tage, wobei der Wassergehalt der Samen auf unter 7 % zurückgeht. Dies ist wichtig für die spätere Lagerung. Die Essigsäure verflüchtigt sich beim Trocknen, es bleiben jedoch noch eine Menge an Säuren enthalten (ROHSIUS et al., 2010). Die Aromabildung schreitet abhängig von der Trocknungsmethode, auch in dieser Zeit weiter voran, da weitere biochemische Prozesse ablaufen. Erwähnenswert ist diesbezüglich die Polyphenoloxidation. Der pH-Wert liegt am Ende der Fermentation bei ca. 6,4; bei

diesem Wert ist die Phenoloxidase noch aktiv, solange noch genügend Feuchtigkeit in den Samen ist. Durch die Trocknung wird das Enzym zunehmend inaktiviert (HANSEN et al., 2000).

Die Schichtdicke der ausgelegten Samen wird dünn gewählt, damit die Samen gleichmäßig trocknen. In den ersten beiden Tagen werden die Samen nicht länger als 5 h der Sonne ausgesetzt. Nachts werden sie vor Feuchtigkeit geschützt, indem sie in Plastiksäcke gefüllt werden. Durch regelmäßige Schnitt-Tests wird der Grad der Trocknung kontrolliert (ROHSIUS ET AL., 2010).

Sobald die Kakaosamen getrocknet sind, werden sie in Jutesäcke gefüllt und können so problemlos gelagert werden. Die Röstung der Samen findet vorwiegend in den Verbraucherländern statt.

Während der Röstung werden die Samen auf 130 -150 °C für ca. eine halbe Stunde erhitzt. Durch diesen Vorgang wird der Wassergehalt zunehmend gesenkt. Außerdem findet weiterhin die Aromabildung statt. Bei der Röstung ist die Anwesenheit von reduzierenden Zuckern und deodorisierter Kakaobutter wichtig für die Maillard-Reaktion, welche eine nicht-enzymatische Bräunungsreaktion ist (SCHERMANN und SCHIEBERLE, 1997). Eine Temperatur von unter 100 °C führt zu einer geringen Aromaentwicklung (LOPEZ und DIMICK, 1995).

Anschließend wird der Kakao gebrochen, geschält und bei ca. 50 °C gemahlen, um ihn zu einer viskosen Masse zu verarbeiten. Die biochemische Aromabildung ist jedoch durch den Röstvorgang abgeschlossen.

Für die Weiterverarbeitung zu Kakaopulver wird der Masse Fett entzogen, da eine Trocknung sonst nicht möglich ist. (LIEBEREI und REISDORFF, 2007)

4.4 Die Speicherproteine als Aromavorstufenbildner

Speicherproteine werden als Quelle von Stickstoff, Kohlenstoff und Schwefel benötigt; sie werden während der Keimung und Reifestadien angereichert (AMIN et. al., 1997).

Im Laufe der Fermentation werden die Speicherproteine des Kakaosamens selektiv degradiert. VOIGT und BIEHL haben bereits 1993 bewiesen, dass es sich dabei um die Proteine Albumin (19 kDa) und das Vicilin-Globulin (150 kDa, Untereinheiten: 47 kDa, 31 kDa, 14,5 kDa) handelt. Erstgenanntes macht einen Anteil von 52 % am Gesamtproteingehalt aus und letzteres einen Anteil von 43 %.

KRATZER 2008 sprach hingegen von einer 15 kDa Untereinheit beim Vicilin.

AMIN et al. 1997 zählte zwei Vicilin Untereinheiten mit den Größen von 47,1 und 39,2 kDa und einem Molekulargewicht von 21,1 kDa beim Albumin.

Durch tägliche Probenahme während der Fermentation konnte der Abbau der Proteine mittels Gelelektrophorese kontrolliert werden. Dabei zeigte sich, dass das Albumin kaum zersetzt wird; auch am letzten Fermentationstag konnten Spuren des unverdauten Proteins nachgewiesen werden (HANSEN et al., 1998). Das Globulin wird hingegen vollständig verdaut; bereits am 2. Fermentationstag sind die Banden im Gel nicht mehr sichtbar (BUYUKPAMUKCU et al., 2001).

Im Detail werden während der Fermentation die Proteine zunächst bei niedrigem pH-Wert gespalten. Die daraus entstehenden hydrophoben Peptide werden im weiteren Verlauf in hydrophile Peptide und hydrophobe freie Aminosäuren zersetzt (VOIGT et al. 1994a).

VOIGT et al. 1994c haben gezeigt, dass beim Rösten von hydrophoben freien Aminosäuren und hydrophilen Peptiden in Anwesenheit von reduzierenden Zuckern ein Schokoladenaroma entsteht. Werden die Aromavorläufer von fermentierten Samen extrahiert und teilweise aufgereinigt, beinhalten sie auch prädominante hydrophile Peptide und hydrophobe freie Aminosäuren. Nach einer Inkubation von unfermentierten Samen bei einem pH-Wert von 3,5 wurden keine Aromavorläufer im Acetontrockenpulver gefunden. Es wurden einige Aminosäuren frei, hauptsächlich jedoch hydrophobe Peptide. Wenn diese hydrophoben Peptide mit der Carboxypeptidase verdaut werden, entsteht eine Mischung aus hydrophilen Peptiden und hydrophoben freien Aminosäuren, die das Schokoladenaroma aufweisen. Röstet man eine synthetisch hergestellte Mischung aus den Aminosäuren, die bei fermentierten Samen zu finden sind, mit reduzierenden Zuckern, entsteht keinerlei typisches Kakaoaroma.

Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass sich die essentiellen Aromavorläufer unter den hydrophilen Oligopeptiden befinden (VOIGT et al., 1994a).

Die Enzyme Aspartylendoprotease und Carboxypeptidase sind bei der Entstehung der Aromavorläufer von großer Bedeutung. Eine hohe Aktivität der Aspartylendoprotease ist Voraussetzung für eine hohe Aromavorstufenbildung, die Aktivität der Carboxypeptidase jedoch nicht (HANSEN et al., 2000). Beide Enzyme zeigen große Unterschiede im pH-Optimum und der Stabilität während der Fermentation. Weitere Enzyme, wie Aminopeptidase, Invertase und Polyphenoloxidase werden stark inaktiviert, die Carboxypeptidase jedoch nur zum Teil. Die Endopeptidase und Glycosidase bleiben während der Fermentation durchweg aktiv.

Zu den Aromavorläufern zählen die freien Aminosäuren, die Peptide und die reduzierenden Zucker. Sie alle werden während der Röstung der Maillard-Reaktion unterzogen und bilden dabei die typischen Aromakomponenten. (HANSEN et al., 1998).

Weiterhin untersuchten VOIGT et al 1994b die Proteolysemuster der Speicherproteine einiger Kulturpflanzen (Kakao, Kokosnuss, Haselnuss und Sonnenblumenkerne). Die Speicherproteine wurden mit den Enzymen Aspartylendoprotease und Carboxypeptidase verdaut. Nach dem Vergleich der Proteolyseprodukte wurde festgestellt, dass Kakaoaroma nur entsteht, wenn die Vorläufer von Vicilin geröstet werden, aber kein Aroma entsteht, wenn die Vorläufer vom Albumin mit anderen Samenglobulinen geröstet werden.

5 Material und Methoden

5.1 Verwendetes Material

Für die Inkubationsversuche wurden Samen aus reifen Kakaofrüchten (*Theobroma cacao* L.) verwendet.

Die Früchte der ersten Inkubationsreihe stammen aus Ecuador und wurden von der Firma Procosan zur Verfügung gestellt.

Die Früchte der zweiten Inkubationsreihe stammen aus Trinidad und wurden von der Cocoa Research Unit (CRU, University of the West Indies) zur Verfügung gestellt.

Die Früchte der dritten Inkubationsreihe stammen aus Costa Rica und wurden von dem Forschungsinstitut CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza - Center for Tropical Agronomy Research and Teaching) zur Verfügung gestellt.

Die Früchte für die Versuche mit dem Proteinrohextrakt stammen aus Venezuela von einer kommerziellen Plantage der Region Mérida.

Die Chemikalien für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden von der Firma Th. Geyer (Hamburg, Germany) bezogen.

5.2 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung aus der Entwässerung und Entfettung erfolgt für alle späteren Untersuchungen bei jeder Probe in gleicher Weise.

5.2.1 Entwässerung

Um den frischen Kakaosamen das Wasser zu entziehen, verweilen sie vor jeder Weiterverarbeitung für ca. 3 - 5 Tage in der Gefriertrocknungsanlage (Alpha I-6, Fa. Christ) (nach STOLL, 2010). Das Gerät arbeitet unter Bildung eines Vakuums bei Temperaturen unter 0 °C. Anhand von Gewichtskontrollen wurde überprüft, ob das Wasser schon vollständig entwichen ist.

5.2.2 Entfettung

Die Kakaosamen enthalten viel Fett, was bei nachfolgenden Untersuchungen störend war. Zur Entfettung (nach STOLL, 2010) wird die frische Probe in einen Behälter der Kugelmühle (Fa. Retsch) mitsamt drei kleinen und drei größeren Metallkugeln gegeben. Der Behälter wurde mit Hexan aufgefüllt und in den Schüttler eingespannt. Die Probe wurde für 10 min bei einer Frequenz von 25 s^{-1} zerkleinert. Das Homogenat wurde mit ca. 75 ml Petrolether quantitativ aus dem Mahlgefäß gespült und filtriert. Der Filtrerrückstand wurde in einem Vakuumtrockenschrank (Fa. Heraeus) getrocknet und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

5.3 Herstellung von Acetontrockenpulver

Die Herstellung von Acetontrockenpulver (nach KIRCHHOFF et al., 1989) wurde für die Entfernung der Phenole, sowie für die Extraktion der Oligopeptide benötigt. Pro 1 g entfettete Probe wurden 15 ml 80 %-ige Acetonlösung hinzugegeben und für 15 min im Eisbad im Kühlraum geschüttelt (Fa. The Belly Dancer). Anschließend wurden die Proben 15 min bei -4 °C mit 20.210 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und der Rückstand wurde ein weiteres Mal mit 80 %-iger und zweimal mit 70 %-iger Acetonlösung extrahiert. Zur Entwässerung des Rückstandes wurde nach der Polyphenolextraktion einmal mit 25 ml Aceton extrahiert. Das Aceton wurde dekantiert und die Proben wurden im Vakuumtrockenschrank (Fa. Heraeus) vom restlichen Aceton befreit. Das fertige Acetontrockenpulver wurde bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert.

Acetonlösungen

je 5 mM Natriumascorbat (Antioxidationsmittel)

vor Verwendung auf -20 °C gekühlt

5.4 Extraktion

Die Extraktion der Proteine kann nach unterschiedlichen Methoden erfolgen. Dies ist abhängig vom späteren Verwendungszweck. Für Analysen, bei denen der Proteinrohextrakt von unfermentierten Samen verwendet wurde, konnte die Extraktion im Sörensen-Puffer erfolgen.

Wurden die Proteine von bereits fermentierten Samen benötigt, so wurden sie durch die Extraktion aus Acetontrockenpulver gewonnen.

5.4.1 Extraktion im Sörensen-Puffer

Bei der Extraktion im Sörensen-Puffer (67 mM, pH 6,4) (nach STOLL, 2010) erfolgte im Anschluss einer ca. 30 minütigen Inkubation eine fünfminütige Behandlung (13.500 - 20.500 rpm) mit dem Ultra-Turrax T25 (IKA-Labortechnik Fa. Janke & Kunkel), der diesen Vorgang unterstützte. Waren in der Probe noch phenolische Substanzen enthalten, wurde der cyanidhaltige Puffer verwendet, um eine Oxidation zu unterbinden.

Sörensen-Puffer 67 mM, pH 6,4

KH₂PO₄-Lösung: 67 mM

Na₂HPO₄-Lösung: 67 mM

Triton X-100: 0,5 % (v/v)

Cyanidhaltiger Sörensen-Puffer, pH 6,4

Sörensen-Puffer (pH 6,4, 67 mM)

H₃PO₄ (85 %-ig): 1,7 mM

KCN: 10 mM

Der pH-Wert des Sörensen-Puffers wurde eingestellt, indem die Dinatriumhydrogenphosphat zu dem Kaliumdihydrogenphosphat unter Messung des pH-Wertes hinzugegeben wurde.

Der so gewonnene Extrakt wird als **Proteinrohextrakt** bezeichnet.

5.4.2 Oligopeptidextraktion aus Acetontrockenpulver

Für die Oligopeptidextraktion (nach STOLL, 2010) wurden 0,4 g Acetontrockenpulver eingewogen und mit 40 ml 70 %-iger Methanollösung versetzt. Die Extraktion erfolgte für 60 min bei RT unter Rühren. Anschließend wurden beide Proben 10 min bei 2.819 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde je in einen 100 ml Rundkolben dekantiert. Zu jedem Pellet wurden 20 ml der 70 %-igen Methanollösung gegeben und für 20 min unter Rühren bei RT inkubiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 2.819 g und 4 °C wurde der Überstand in den jeweiligen Rundkolben hinzugefügt. Das Methanol wurde durch den Rotationsverdämpfer (100 mbar, 40 °C, 200 rpm) entfernt (Pumpe: Fa. Vacubran, Gerät: resonatechnics).

Durch eine letzte 30 minütige Zentrifugation bei 2.819 g und 4 °C wurden die restlichen Feststoffe pelletiert. Um das Wasser aus dem Überstand zu entfernen, wurden die

Proben gefriergetrocknet. An dieser Stelle konnten die Proben bis zur Vermessung bei - 20 °C zwischengelagert werden.

5.5 Entfernung der Phenole

Um die Phenole aus den Proteinrohextrakt oder dem fettfreien gefriergetrockneten Material zu entfernen, kann entweder eine PD10 Säule (Fa. GE Healthcare) verwendet werden oder es kann das Acetontrockenpulver hergestellt werden.

Probenaufbereitung mittels PD10 Säule (Prinzip Gelfiltration)

Während die Proben bei 2.819 g zentrifugieren, wurde mit der Equilibrierung einer PD10 Säule begonnen. Die Säule enthält Sephadex G-25 Medium. Sie dient zur Separation hochmolekularer Gruppen von niedermolekularen Gruppen. Das technische Prinzip ist die Gelfiltration. Die Moleküle, die größer als die größte Pore der Säule sind, werden vom Porensystem ausgeschlossen und eluieren zuerst. Die kleinen Moleküle müssen das Porensystem durchlaufen, sie haben somit einen längeren Weg und eluieren später.

Zur Equilibrierung wurde die Säule fünf Mal mit 5 ml des cyanidfreien Sörensen-Puffers gespült. Anschließend wurden 2,5 ml der zentrifugierten Probe aufgetragen. Die Fette und Phenole binden an die Matrix. Zur Elution wurden 3,5 ml des cyanidfreien Sörensen-Puffers aufgetragen. Die erhaltene Probe wurde aufgefangen und konnte bis zur Messung eingefroren werden. Die letzten 500 µl wurden verworfen, da diese noch KCN-Rückstände beinhalten.

5.6 Verdaukontrolle der Proteine mithilfe der SDS-PAGE

Die Gelelektrophorese (nach LAEMMLI, 1979) wird zur Charakterisierung der Speicherproteine eingesetzt. Die Proteine haben aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrischen Ladungen, hervorgerufen durch die Ladungen der Aminosäuren, verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld und können daher im Gel der Größe nach aufgetrennt werden.

5.6.1 Zusammensetzung und Gießen der Gele

12,5 %-ige Trenngele und 5 %-ige Sammelgele wurden gegossen. Die im Gelansatz genannten Reagenzien des Trenngels wurden vermischt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Temed als letztes hinzupipettiert wurde, da dieses Reagenz die Polymerisation startet. Die Gelkammer wurde befüllt und mit einer Schicht Isopropanol versiegelt, damit das Gel eine gerade Abschlusskante erhält. Nach beendeter Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel angesetzt, wobei wiederum das Temed als letztes hinzugefügt wurde. Der Ansatz wurde auf das Trenngel geschichtet und anschließend der Kamm eingesteckt, der später die Taschen für die Proben bildete.

Sammelgelpuffer (pH 6,8)

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan: 0,625 M
 SDS (Dodecylsulfat): 1 % (w/v)
 EDTA (Ethylendinitrotetraessigsäuredihydrat, Dinatriumsalz): 20 mM

Trenngelpuffer (pH 8,8)

Tris: 1,5 M
 SDS: 0,4 % (w/v)
 EDTA: 8 mM

Gelansatz

dH₂O
 Acrylamidlösung (40%-ig)
 Trenngelpuffer (pH 8,8)
 Sammelgelpuffer (pH 6,8)
 SDS (10%ig)
 APS (10%ig)
 Temed

Trenngel (12,5 %)

2,11 ml
 1,57 ml
 1,25 ml
 -
 50 µl
 25 µl
 4 µl

Sammelgel (5 %)

1,5 ml
 0,312 ml
 -
 0,62 ml
 25 µl
 12,5 µl
 4 µl

5.6.2 Probenvorbereitung

150 mg Acetontrockenpulver wurden eingewogen und mit 600 µl SDS-Probenpuffer vermischt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation wurden die Proben für 10 min bei 95 °C im Heizblock (Thermostat 5320, Fa. Eppendorf) denaturiert. Es wurden 2,5 - 10 µl der Probe für das Gel verwendet.

Alternativ wurden von den inkubierten Proteinrohextrakten 2,5 µl mit 2,5 µl Probenpuffer vermischt und ebenfalls für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die gesamte Menge wurde auf das Gel aufgetragen.

SDS-Probenpuffer (LAEMMLI)

Tris: 0,025 M
(mit HCl auf pH 6,8 eingestellt)
SDS: 2 % (w/v)
Mercaptoethanol: 5 % (v/v)
Glycin: 10% (v/v)
Bromphenolblau: 0,001 % (w/v)

Low Molecular Weight Marker

Phosphorylase b (97 kDa)
Albumin (66 kDa)
Ovalbumin (45 kDa)
Carbonic anhydrase (30 kDa)
Trypsin inhibitor (20,1 kDa)
A-Lactalbumin (14,4 kDa)

5.6.3 Messung

Das auspolymerisierte Gel wurde in der Kammer (Fa. Biorad, Mini Protean II) beladen und der Laufpuffer wurde hinzugegeben.

Die Spannung wurde solange bei 75 V betrieben, bis die Lauffront vom Sammelgel in das Trenngel übergegangen ist, danach wurde die Spannung auf 150 V erhöht, bis die Lauffront nahezu das Ende des Gels erreicht hat.

Laufgelpuffer (10 x)

Tris (0,05 M)
Glycin (0,32 M)

Puffer 10 x mit dH₂O verdünnt
+ 1 % SDS bezogen auf Endkonzentration

5.6.4 Färben und Entfärben

Das Gel wurde zunächst über Nacht in der Färbelösung auf dem Schüttler (The Belly Dancer, Fa. Stovall Life Science) inkubiert. Die anschließende Entfärbung dauerte ca. 6 h und erfolgte ebenfalls auf dem Schüttler.

Färbelösung

Methanol: 40 % (v/v)
Essigsäure: 10 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue R-250:
0,18 % (w/v)

Entfärbelösung

Methanol: 40 % (v/v)
Essigsäure: 10 % (v/v)

5.7 Inkubation des Proteinrohextraktes

Für die Inkubation wurden die Proteinextrakte von eingefrorenen Samen verwendet. Zur Einstellung der unterschiedlichen pH-Werte (3,0 – 4,0 – 5,0) diente 5 %-ige Essigsäure. Alle Proben wurden in einem Thermocycler (Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf) bei 42 °C und 500 rpm inkubiert. Die jeweilige Probenahme erfolgte nach 24 – 48 – 96 h. Bis zur weiteren Verwendung konnten die Proben bei – 20 °C gelagert werden.

5.8 Inkubationen von frischen Kakaosamen

Die Inkubationen der Kakaosamen simuliert die reale Fermentation von Kakaosamen. Vorbereitend wurden die frischen Kakaofrüchte unter sterilen Bedingungen geöffnet, ohne die Samen dabei zu beschädigen. Sie wurden mitsamt ihrer Pulpa in sterile, mit Medium befüllte Schottflaschen überführt. Um die Temperatur während der gesamten Inkubation zu regulieren, wurden die Flaschen in ein beheizbares Wasserbad (MGW Lauda M20, Fa. Lauda) gestellt, wobei die Wasseroberfläche mit Schaumstoffflocken bedeckt war (siehe Abbildung 4). Der Deckel der Schottflaschen hatte einen Zugang und einen Ausgang, die jeweils durch Sterilluftfilter Keime abhielten. An den Zugang mit der Glasverlängerung, die bis in das Medium hineinragte, wurde die Begasung angeschlossen. Die Restluft sowie andere flüchtige Komponenten entwichen durch den Ausgang (Konstruktionszeichnung siehe Anhang A).

Um sicherzustellen, dass die Samen die Reise aus Ecuador und Trinidad unbeschadet überstanden haben, wurden von jeder Frucht einige Samen zur Keimung ausgelegt. Bei den Samen aus Costa Rica wurden Schnittproben von den Samen gemacht, da anhand der Färbung der Kotyledonen die Vitalität erkannt werden kann.



Abbildung 4: Flaschenkonstruktion und deren Anordnung im temperierten Wasserbad

5.8.1 Einstellungen bei den Proben aus Ecuador und Trinidad

Medienzusammensetzung

Für die Inkubationsreihen wurden 4 Medienansätze benötigt. Der erste Ansatz enthielt 0,15 M Essigsäure. Der pH-Wert wurde auf 4,5 eingestellt. Der zweite Ansatz enthielt ebenfalls Essigsäure in gleicher Konzentration, jedoch wurde der pH-Wert bei 2,8 belassen. Weiterhin wurden zwei Ansätze mit 0,15 M Milchsäure benötigt, von denen einer einen auf 4,5 eingestellten pH-Wert besaß und der andere bei pH 2,2 belassen wurde.

Pro Same wurden ca. 5 ml Medium veranschlagt.

Temperaturverlauf

Die Auswahl des Temperaturverlaufs während der 5-tägigen Inkubation bei den Versuchen mit den Proben aus Ecuador und Trinidad basiert auf den durchschnittlichen Temperaturwerten während der Fermentation (SCHWAN und WHEALS, 2004).

Die Temperatur des Wasserbads wurde zu Beginn auf 30 °C eingestellt. Nach 24 h wurde sie auf 35 °C erhöht. Wiederum 24 h später wurde sie auf 45 °C gestellt. Die letzten 48 h der Inkubation lag die Temperatur bei 52 °C.

Begasung

Die ersten 48 h wurden die Schottflaschen mit Stickstoff begast (anaerobe Phase). Anschließend wurde die Begasung auf Sauerstoff umgestellt (aerobe Phase).

Probenahme

Die Gefäße wurden an den Tagen 3, 4 und 5 steril geöffnet, um je 5 - 7 Samen zu entnehmen. Diese wurden von der Testa befreit und im flüssigen Stickstoff schockgefroren bevor sie bei - 20 °C gelagert wurden.

5.8.2 Einstellungen bei den Proben aus Costa Rica

Medienzusammensetzung

Die drei benötigten Medienansätze bestanden zunächst alle aus 5 %-iger Ethanollösung. Nach 48 h wurden diese durch verschiedene Essigsäurelösungen ersetzt. Die Konzentration des ersten Ansatzes lag bei 0,6 M und der pH-Wert wurde nicht eingestellt. Die Konzentration der Essigsäure lag im zweiten Ansatz bei 0,15 M und der pH-Wert wurde auf 4 erhöht. Der dritte Ansatz unterschied sich vom zweiten nur in einem eingestellten pH-Wert von 5.

Pro Same wurden ebenfalls ca. 5 ml Medium veranschlagt.

Temperaturverlauf

Die Auswahl des Temperaturverlaufs während der 5-tägigen Inkubation bei den Versuchen mit den Proben aus Costa Rica basiert auf den durchschnittlichen Temperaturwerten während der Fermentation (SCHWAN und WHEALS, 2004).

Die Temperatur des Wasserbads wurde zu Beginn auf 30 °C eingestellt. Nach 24 h wurde sie auf 35 °C erhöht. Wiederum 24 h später wurde sie abweichend von den durchschnittlichen Werten auf 52 °C gestellt und für die restliche Dauer der Inkubation dabei belassen.

Begasung

Die Begasung erfolgte wie bei den Proben aus Ecuador und Trinidad.

Probenahme

Die Gefäße wurden an den Tagen 3, 4 und 5 steril geöffnet, um je 7 Samen zu entnehmen. Diese wurden direkt für die Trocknung weiterverarbeitet.

5.9 Trocknung und Röstung frischer Kakaosamen

Die inkubierten Samen wurden zunächst grob von der Pulpa befreit, bevor sie für den Trocknungsvorgang in den auf 30 °C beheizten Ofen (Fa. Memmert) gelegt wurden. Nach 24 h wurden die Samen in einen zweiten Ofen überführt, der auf 40 °C temperiert

war. Nachdem die Samen vom fünften Inkubationstag 24 h getrocknet wurden und die Samen der anderen Tage entsprechend länger getrocknet wurden, wurde die Temperatur auf 45 °C erhöht. Bei dieser Temperatur trockneten die Samen weitere 24 h.

Anschließend wurden die Samen in einem Mörser zerkleinert und bei 110 °C für 30 min im Ofen geröstet. Mitglieder der Arbeitsgruppe haben an den Proben gerochen, um zu bewerten, ob sich Schokoladenaroma entwickelt hat.

5.10 Messung freier Aminosäuren

Die chromatographische Trennung der freien Aminosäuren erfolgte über eine RP-HPLC durch Kombination einer unpolaren stationären und einer polaren mobilen Phase (nach KIRCHHOFF et al., 1989). Die Säule bestand aus Kieselgel mit C18 Alkylresten. Die Probe wurde mit dem Laufmittel auf die Säule gegeben. Die Trennung erfolgte aufgrund der Wechselwirkungen der Probe mit der Säulenmatrix, so dass die Elution zu unterschiedlichen Retentionszeiten erfolgte.

5.10.1 Probenaufbereitung

0,1 g fettfreie Trockenmasse und 0,3 g Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) wurden in 10 ml 4° C kaltem deionisiertem Wasser (pH 2,0 mit TFA-Lösung eingestellt) gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert unter Rühren mit 50 %-iger TFA-Lösung auf 2,5 eingestellt. Die Extraktion erfolgte während einer einstündigen Inkubation im Eisbad. Danach wurde die Probe 10 min bei 2.819 g zentrifugiert (Megafuge 11R Centrifuge, Fa. Thermo Scientific Heraeus) und der daraus resultierende Überstand wurde filtriert (0,45 µm, Multoclear-25 PVDF, Fa. CS Chromatographie Service).

Vorbereitend für die Vermessung der freien Aminosäuren wurden 30 µl des Filtrats für 1 h bei – 20 °C und 0,05 mbar gefriergetrocknet (Alpha I-6, Fa. Christ).

Die zuvor beschriebene Methode wurde für die inkubierten Samen angewandt. Alternativ wurde für die inkubierten Proteinrohextrakte eine definierte Menge Extrakt ohne weitere Aufbereitung gefriergetrocknet und vermessen.

5.10.2 Vermessung und Quantifizierung

Zu den gefriergetrockneten Proben wurden 800 µl Boratpuffer (0,2 M, pH 9,5, 5 min aufgeköcht) gegeben sowie 400 µl OPA-Reagenz (100 mg Phthaldialdehyd in 2,5 ml Methanol + 22,4 ml Boratpuffer pH 9,5 und 100 µl 2-Mercaptoethanol) zur Derivatisierung hinzugegeben. Aus diesem Gemisch wurden nach 2 min 20 µl in das HPLC-System injiziert.

Die Auftrennung und Fluoreszenzdetektion der freien Aminosäuren erfolgte an einem mit Millennium³² Version 3.20 Chromatography Manager Software (Fa. Waters) ausgerüsteten HPLC-System. Weitere Bestandteile waren ein Intelligent Autosampler (AS-4000, Fa. Merck Hitachi), eine Pumpe (HPLC-Pump 64 mit analytischem Pumpenkopf, Fa. Knauer), ein Gradientenmischer (Dynamic Mixing Chamber, Fa. Knauer) und ein Vacuum Degasser (Fa. Knauer), der zur Entgasung des Laufmittels verwendet wurde. Die am Fluoreszenz-Spektrometer gemessenen Werte wurden durch einen Digitalwandler (bus SAT/IN Modlue, Fa. Waters) umgewandelt und auf eine Millennium³² Chromatography Manger Software übertragen.

Die Vermessung der Aminosäuren erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 334 nm und einer Emissionswellenlänge von 425 nm.

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

Die Vermessung erfolgte gegen Standardlösungen, die die zu bestimmenden Aminosäuren in Boratpuffer gelöst enthielten und ebenfalls 2 min mit 400 µl OPA Reagenz derivatisiert wurden.

Gradientenparameter:

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	100	0
2	85	15
15	70	30
21	70	30
40	0	100
45	0	100
50	100	0
55	100	0

A: 1,6 L Na-Acetat (50 mM, pH 6,2 durch Eisessig)
in 2 l H₂O (lichrosolv) gelöst
+ 50 ml Methanol (lichrosolv gradient grade)
+ 20 ml Tetrahydrofuran (lichrosolv) (17,8 g/20 ml)

B: 200 ml Na-Acetat (50mM, pH 6,2)
+ 800 ml Methanol (lichrosolv gradient grade)

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

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

5.11 Trennung der Peptide aus den Speicherproteinen mittels HPLC

5.11.1 Probenvorbereitung

Die Proben waren je nach Inkubationsdauer und pH-Wert unterschiedlich autolytisiert und wiesen demnach unterschiedliche Peptidspektren auf. Die Rohextrakte stammten aus der Oligopeptidextraktion; sie wurden kurz vor der Vermessung aufgetaut und daraus 10 µl mit 360 µl 0,1%-iger TFA versetzt. Das Gemisch wurde geschüttelt (Vortex Genie 2, Fa. Scientific Industries) und 5 min zentrifugiert, um Verunreinigungen zu pelletieren.

5.11.2 Vermessung und Darstellung

Die Trennung erfolgte durch eine RP-HPLC-Anlage (Fa. abi Applied Biosystems 130 A Separation System). Aus dem Probengemisch wurden 200 µl mit einer Hamiltonspritze auf eine Säule (RP-4 (Kieselgel), 5 µm Korngröße, 300 A Porosität, 250 mm x 2,1 mm, Fa. Vydac), die eine integrierte Vorsäule (20 mm x 2,1 mm) besaß, aufgetragen. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,2 ml/min. Die Elution erfolgte durch einen Gradienten.

Gradientenparameter:

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	98	2
10	98	2
55	20	80
60	0	100
62	98	2
68	98	2

A: 0,1 % TFA in H₂O

B: 70 % Acetonitril + 0,08 % TFA in H₂O

Die Messungen fanden bei konstanter Temperatur von 30 °C und einer Wellenlänge von 210 nm statt. Die Fließmittel wurden vor jeder Messung mit Helium entgast, damit keine Luftbläschen in das System gelangen.

Die Darstellung der Peptidspektren erfolgte mit MS Excel, indem die Absorptionen gegenüber der Zeit aufgetragen wurden. Die Werte wurden auf die maximal gemessene Absorption während der Trennung bezogen.

5.12 Detektion der Peptidsequenzen mittels MS

Biomoleküle wie Peptide und Proteine waren der Massenspektrometrie lange Zeit nicht zugänglich, da geeignete Ionisationsmethoden fehlten, die in der Lage waren, diese nicht flüchtigen Verbindungen unzersetzt in die Gasphase zu transferieren.

Durch die Einführung der schonenden Elektrospray Ionisationsmethode (ESI) wurde die Analyse möglich (FENN et al., 1989; SCHLOSSER, 2002).

Die Massenspektrometrie diente zur Identifizierung unbekannter Peptide, die bei der Spaltung durch die Enzyme Aspartylendoprotease und Carboxypeptidase entstanden. Mit den Massen der Peptide wurde eine Datenbanksuche durchgeführt. Da das Spaltungsmuster der Proteasen bisher nicht bekannt war, wurden alle möglichen Peptide in Betracht gezogen.

5.12.1 Probenvorbereitung

Die zu untersuchenden Peptide für die Massenspektrometrie stammen aus den zuvor durchgeführten Trennungen mittels HPLC. Sie werden mit der Gefriertrocknungsanlage (Speedvac Concentrator, Fa. Thermo Scientific Savant) eingedampft und vor der Messung in 20 µl 0,1%-iger Ameisensäure aufgenommen. Pro Messung wurden 0,1 - 1 µl der Probe für die Massenspektrometrie weiterverwendet.

5.12.2 Vermessung und Auswertung

Die LC-MS Läufe wurden in einem QTOF Premier Tandem Massenspektrometer (Fa. Waters-Micromass) mit einer Elektrosprayionisationsquelle durchgeführt, welches mit einer UPLC (Fa. Waters) ausgestattet war. Die Proben wurden auf eine Säule (nano

Aquity UPLC column, C18, 180 μm x 20 mm, Fa. Waters) aufgetragen und für 10 min mit 5 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure (5 $\mu\text{l}/\text{min}$) gewaschen und anschließend auf der Trennsäule (nano Aquity UPLC column, C18, 100 μm x 100 mm, 400 nl/min , Fa. Waters) mittels Gradienten (A: 0,1 % Ameisensäure, B: 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril, 5-50 % B in 120 min) eluiert (MORTEZAI et al., 2010).

Die Auswertung der Messergebnisse wurde mit spezifischer Software (MassLynx™ 4.1 und ProteinLynx 2.3, Fa. Waters) durchgeführt. Die Chromatogramme wurden herangezogen und nach den dominantesten Peaks gesucht. Dabei musste auf die mehrfach geladenen Ionen sowie die Addukte geachtet werden. Die dazugehörigen Massen wurden mit den Massen der durch das Programm gefundenen Peptide verglichen. Bei Übereinstimmen der Massen, wurde das Peptid als detektiert bezeichnet.

Die Auswertung eines Chromatogramms soll beispielhaft gezeigt werden.

Nach Beendigung der Messung wurde ein Massenspektrum durch das Programm MassLynx erzeugt (siehe Abbildung 5).

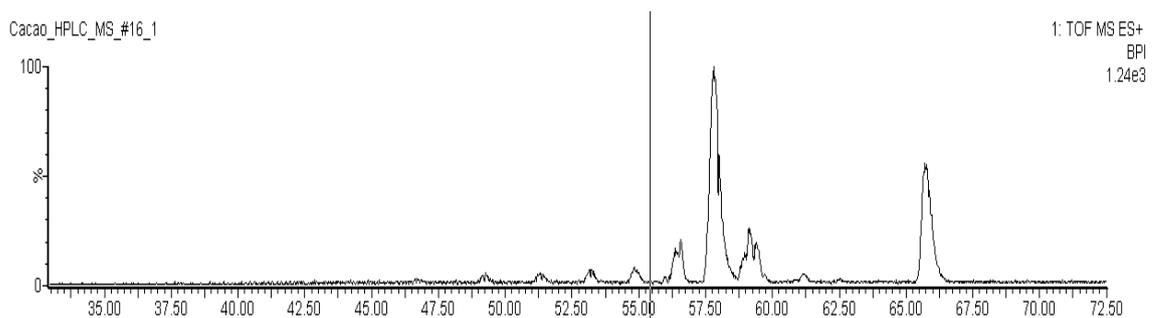


Abbildung 5: Massenspektrum einer zuvor durch die HPLC getrennten Peptidfraktion.

Die dominanten Peaks wurden genauer betrachtet, da es sich bei unterschiedlichen Ladungen eventuell um die selben Peptide handeln könnte (siehe Abbildung 6). Desweiteren wurde überprüft, ob es sich um ein Addukt handelt, indem die Masse von z.B. Natrium oder Kalium hinzuaddiert wurde.

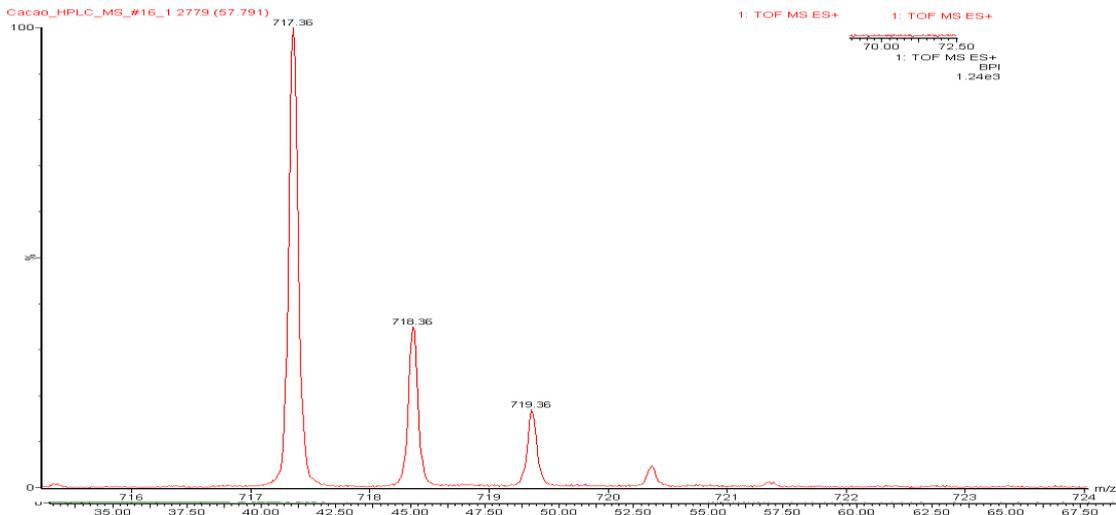


Abbildung 6: Betrachtung eines dominanten Peaks und dessen Ladung, die in diesem Fall einfach ist. Dies ist erkennbar anhand der Häufigkeit der Peaks pro Einheit der m/z Achse.

Die Massen der dominanten Peaks wurden anschließend mit denen verglichen, die das Programm ProteinLynx automatisch auflistet. Dort wurde das m/z Verhältnis, die Ladung, das molekulare Gewicht des Peptids sowie seine Aminosäure-Sequenz angezeigt (siehe Abbildung 7). Das Programm zeigt zusätzlich noch Peaks an, deren Aminosäure-Sequenz nicht mit denen aus der Datenbank übereinstimmen, diese sind im mittleren Teil der Abbildung 7, im Gegensatz zu den roten zugeordneten Peaks, grau markiert.

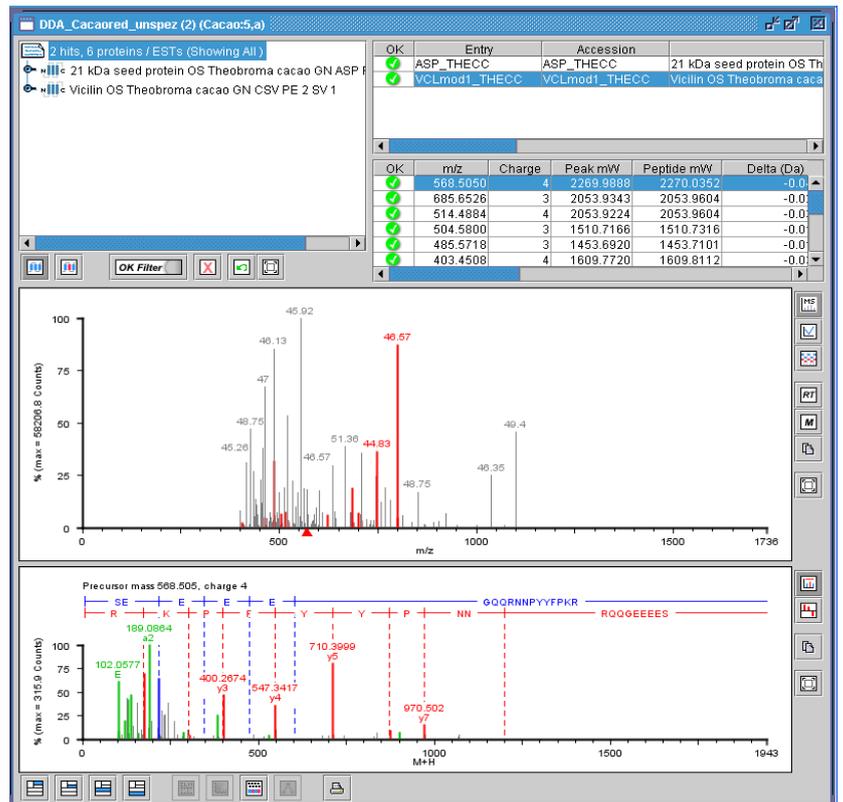


Abbildung 7: Darstellung der detektierten Peptide durch das Programm ProteinLynx

5.13 Messung der organischen Säuren

Der Gehalt der organischen Säuren im Kakaosamen wurde durch die Vermessung mit der HPLC Anlage (nach ROHSIUS, 2010) ermittelt. Vermessen wurden die Essigsäure und die Milchsäure.

5.13.1 Probenvorbereitung

Zur Extraktion der organischen Säuren wurden 2 g geschrotete Kakaobohnen unter Zugabe von 10 ml 0,2 %-iger Benzoesäure in der Kugelmühle (Typ MM200, Fa. Retsch) für 10 min bei 25 s^{-1} mit einer großen Kugel zerkleinert. Die Probe wurde anschließend in ein 20 ml Zentrifugenglas überführt und 10 min bei 2.819 g zentrifugiert (Megafuge 11R Centrifuge, Fa. Thermo Scientific Heraeus). Der Überstand wurde in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und erneut 10 min bei 2.819 g zentrifugiert. Anschließend wurde dieser Überstand über die Anionenaustauscherkartuschen (BAKERBOND spe Säulen, Quarternary Amine N+) aufgereinigt. Die Konditionierung der Säule erfolgte zunächst mit 5 ml Methanol für 5 min. Danach wurde die Säule mit 2 ml destilliertem Wasser für 10 min konditioniert und das Eluat verworfen. Zur Reinigung des Extraktes wurden 5 ml Messkolben in dem Vakuumsystem vorgelegt. 1 ml der Probe wurde aufgegeben und mit 3,7 ml Phosphatpuffer (16,1 ml 0,667 M KH_2PO_4 + 83,9 ml 0,857 M Na_2HPO_4 , 1:10 verdünnt mit H_2O) eluiert. Der Messkolben wurde mit Wasser bis zur Markierung aufgefüllt und für die Vermessung verwendet.

Die Konditionierung, sowie die Elution erfolgten durch ein Vacuumsystem (BAKER-10SPE System, Fa. J. T. Baker Chemical Co.) und durch die Regulierung der Durchflusshähne der Säulen.

Die Proben wurden unter isokratischen Bedingungen gegen eine Standardreihe bei einer Wellenlänge von 215 nm vermessen.

5.13.2 Vermessung und Quantifizierung

Die isokratische Vermessung wurde mit einer RP-HPLC durchgeführt. Es wurden 20 μl der Probe mittels Probengeber (Autosampler 717plus, Fa. Waters) und Pumpe (HPLC Pumpe 64, Fa. Knauer) auf die Trennsäule (Kationenaustauscher, Aminex HPX-87H; 300 x 7,8 mm; HPLC Organic Acid Analysis; Fa. Bio-Rad), aufgetragen. Die Elution erfolgte bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min in Schwefelsäure (0,013 M), welche zuvor entgast (Degassex DG-4400, Fa. Phenomenex) wurde. Die UV-Detektion (UV-VIS-Detektor L-7520, Merck Hitachi) erfolgte bei 215 nm. Die Säulentemperatur

betrug 26 °C. Es wurde gegen zwei Eichreihen vermessen (Milchsäure: 375 µg/ml, 759 µg/ml, 1500 µg/ml (Einwaage als Li-Lactat) und Essigsäure: 300 µg/ml, 600 µg/ml, 1200 µg/ml (Einwaage als Na-acetat)).

Gradientenparameter:

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	100	0
7	100	0
60	50	50
62	100	0
70	100	0

A: 0,1 % TFA in H₂O

B: 800 ml Acetonitril (lichrosolv, gradient grade)
+ 0,1 % TFA
+ 200 ml Laufmittel A

Die Quantifizierung der Essig- und Milchsäure erfolgte durch die Flächenintegration der Proben gegen die Standardlösungen unter Berücksichtigung der Verdünnungen.

5.14 Erstellen von 3D-Strukturen der Speicherproteine

Die Generierung von dreidimensionalen Strukturen wurde durch ein voll automatisiertes Programm namens SWISS-MODEL der Universität Basel durchgeführt. Durch Eingabe der Aminosäure-Sequenz wurde anhand von bereits bekannten Strukturen ein 3D-Model erstellt.

In diesem Fall wurde das Albumin anhand von Strukturen des Currybaums (*Berberis koenigii*) erzeugt.

Die Strukturen des gesamten Vicilins und der 47 kDa Untereinheit wurden angelehnt an die Struktur der Adzukibohne (*Vigna angularis*). Die Struktur der 15 kDa Untereinheit hatte ihren Ursprung in der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) und die 31 kDa Untereinheit in einem großen Erdnuss Allergen (Ara h 1).

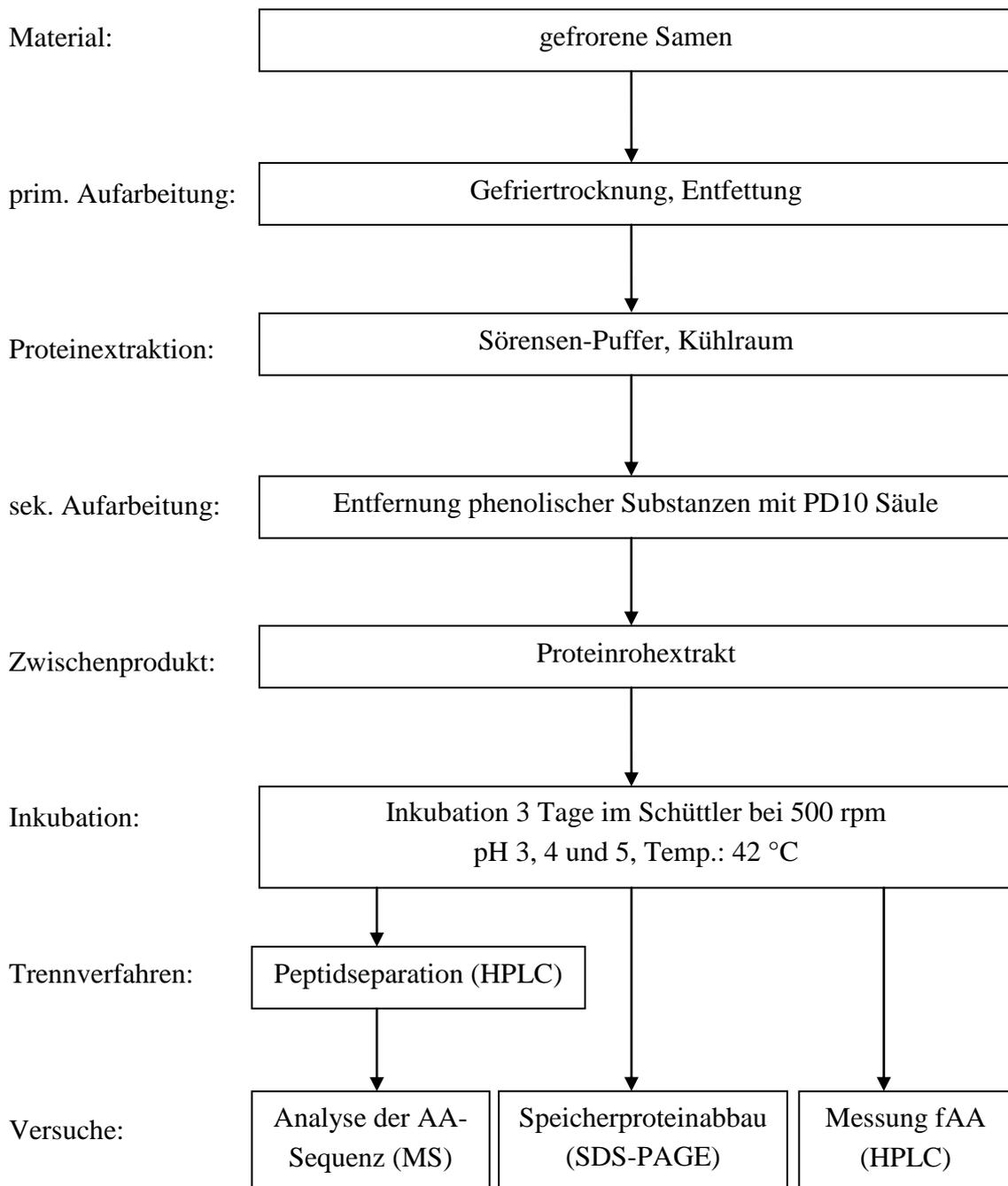
Die genauen Abgrenzungen der Vicilin-Untereinheiten sind bisher nicht bekannt, KRATZER hat jedoch 2008 eine grobe Einteilung vorgenommen, die bei der Generierung berücksichtigt wurde.

Die Bearbeitung der 3D-Strukturen erfolgte mit der Software UCSF Chimera (Version 1.5.3.).

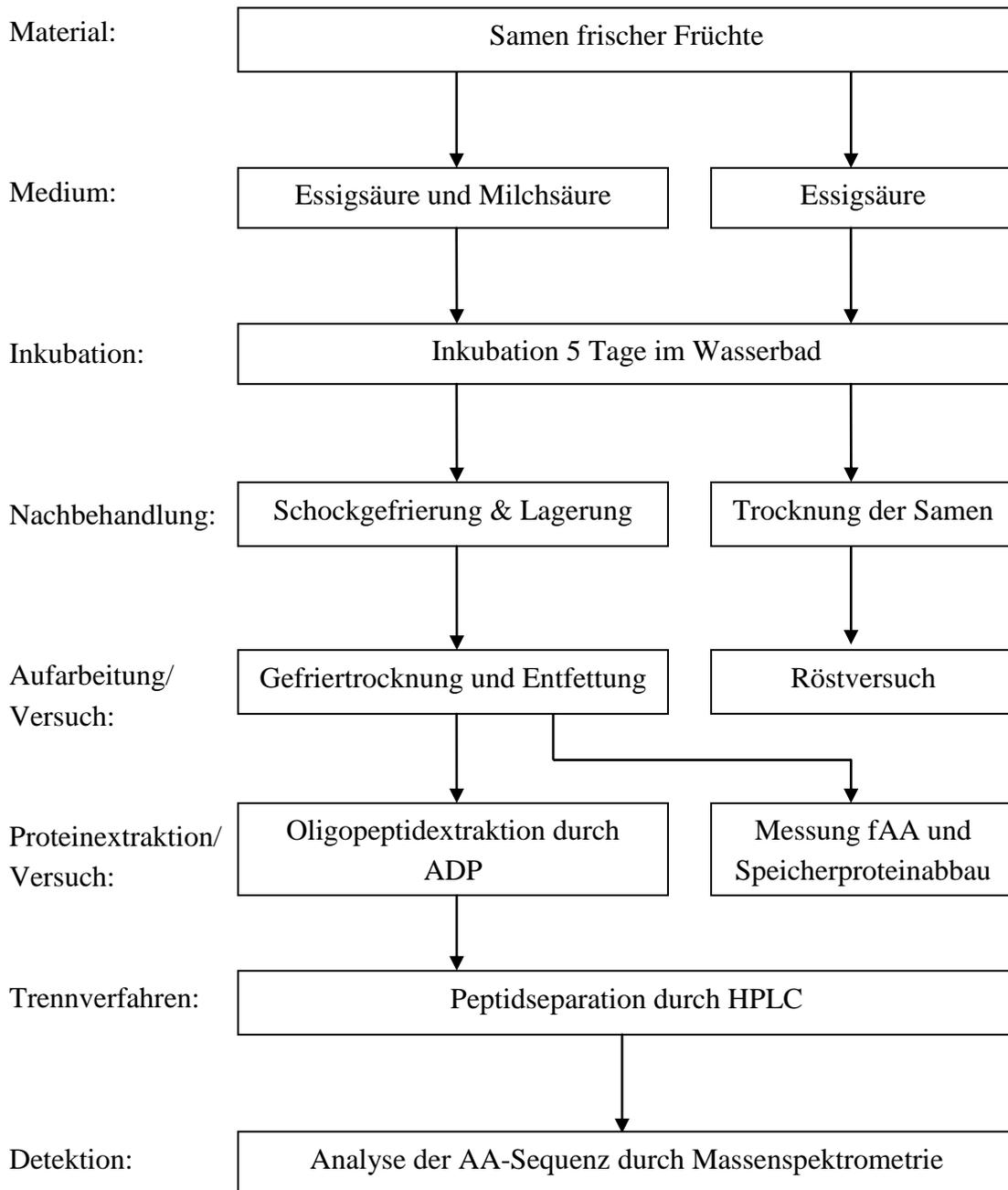
5.15 Versuchsanordnung

Zur Veranschaulichung der Versuchsabläufe sollen zwei Fließdiagramme dienen.

5.15.1 Fließdiagramm für Versuche mit dem Proteinrohextrakt



5.15.2 Fließdiagramm für Versuche mit frischen Samen



6 Ergebnisse

6.1 Peptid- und Spaltungsmuster

Die inkubierten Proteinrohextrakte wurden hinsichtlich ihres Peptidspektrums durch eine Trennung mit der HPLC untersucht. Einzelne Peaks, aber auch ganze Fraktionen, befreit von unverdauten Proteinen, wurden massenspektrometrisch analysiert.

6.1.1 Peptidzuordnung

In Tabelle 2 sind die detektierten Peptide der beiden Speicherproteine Albumin und Vicilin aufgeführt.

Tabelle 2: Durch MS detektierte Peptide aus Albumin und Vicilin

Albumin

anspvltdgdgdelqtgvqyyvl
 anspvltdgdgdelqtgvqy
 anspvltdgdgdelqtgvq
 ssisgaggggla
 ssisgagggglalgratgq
 rsldngtpvifsnadskd
 rsldngtpvif
 ldngtpvifsnadskddvvr
 ngtpvifsnadskddvvr
 snadskddvvr
 snadskddvvrvstd
 dskddvvrvstd
 vniefvpird
 iefvpird
 ststvwrl
 ststvwrl
 ldnydnsagkw
 dnydnsagkw
 nydnsagkw
 wtttdgvkgepgpn
 wtttdgvk
 wfkiekagvlgyk
 alsdnewawmfkkask
 fkkaskt

Vicilin

qqrnnpyyfpk
 gindyrla
 gindyrlam
 pvnspgkyel
 lsqspvysnqngrf
 sqspvysnqngrf
 qqvkaplspgdvfvapaghavtf
 glnaqnnqrif
 naqnnqrif

6.1.2 Spaltungsspezifität

Um die Spaltungsspezifität zu betrachten, werden die Peptide innerhalb ihrer Aminosäure-Sequenz betrachtet. Diejenigen Peptide, bei denen sich die Sequenzen überlappen, werden in einer Gruppe zusammengefasst. Die Gruppen des Albumins sind in Abbildung 8 farblich voneinander unterschieden, die des Vicilins in Abbildung 9.

Albumin

```

mktatavll lfaftksyf fgvanaansp vldtdgdelq tgvqyyvlss isgaggggla
                                ansp vldtdgdelq tgvqyyvl
                                ansp vldtdgdelq tgvqy
                                ansp vldtdgdelq tgvq
                                                                ss isgaggggla
                                                                ss isgaggggla>
lgratgqscp eivvqrrsd1 dngtpvifsn adskddvrv stdvniefvp irdrlcstst
lgratgq
                                rsdl dngtpvifsn adskd
                                rsdl dngtpvif
                                  l dngtpvifsn adskddvrv
                                    ngtpvifsn adskddvrv
                                      sn adskddvrv
                                        sn adskddvrv std
                                          dskddvrv std
                                                                vniefvp ird
                                                                iefvp ird
                                                                stst>
                                                                stst>
vwrl dnydns agkwwvtt dg vkgepgpntl cswfkiekag vlgykfrfcp svcdscttlc
vwrl d
vwrl
  ldnydns agkw
  dnydns agkw
  nydns agkw
                                wvtt dg vkgepgpn
                                wvtt dg vk
                                                                wfkiekag vlgyk
sdigrhsddd gqirlalsdn ewawmfkkas ktikqvnan d
                                alsdn ewawmfkkas k
                                fkkas kt

```

Abbildung 8: Aminosäure-Sequenz des Albumins mit Peptidgruppierung

Vicilin

```

mviskspfiv lifslllsfa llcsgvsayg rkqyerdprq qyeqcqrrce seateereqe
qceqrcerey keqqrqqeee lqrqyqqcqq rcqeqqqqqr eqqqcqrkcw eqykeqerge
henyhnkkn rseeeegqqr nnpyyfpkrr sfqtrfrdee gnfkilqrfa enspplkgin
                                qqr nnpyyfpk
                                                                gin>
                                                                gin>
dyrlamfean pntfilphhc daeaiyfvtn gkgtitfvth enkesynvqr gtvvsvpags
dyrla
dyrlam
tvyvvsqdnq ekltiavlal pvnspgkyel ffpagnnkpe syygafsyev letvfntqre
                                pvnspgkyel
kleeileeqr gqkrqqqqgq mfrkakpeqi raisqqatp rhrggerlai nllsqspvys
                                                                lsqspvys>
                                                                sqspvys>
nqngrffeac pedfsqfqn dvavsafkln qgafivphyn skatfvvfvtd dgygyaqmac
nqngrf
nqngrf
phlsrqsqgs qsgrqdrreq eeeseetfg efefqqvkap lspgdvfvap aghavtffas
                                qqvkap lspgdvfvap aghavtf
kdqplnavaf glnaqnnqri flagkknlv r qmdseakels fgvp sklvdn ifnnpdesyf
                                glnaqnnqri f
                                naqnnqri f
msfsqqrqrg derrgnplas ildfarlf
    
```

Abbildung 9: Aminosäure-Sequenz des Vicilins mit Peptidgruppierung

In Tabelle 3 sind die Aminosäure-Sequenzen der Peptidgruppen dargestellt, wobei zusätzlich die angrenzenden Aminosäuren rot markiert sind. Dies dient der Betrachtung der Spaltungsspezifität.

Tabelle 3: Peptidgruppen von Albumin und Vicilin mit markierten angrenzenden Aminosäuren

Albumin

```

aanspvltdgdeldtqgvqyyvls
lssisgagggglalgratgqs
rrsdlndgtpvifsnadskddvrvstdv
dvniefvpirdr
cststvwrlndnydnsagkw
rldnydnsagkw
wvtttdgvkgeppnt
swfkiekagvlgykf
lalsdnewawmfkkaskt
    
```

Vicilin

```

gqqrnnpyyfpkr
kgindyrlamf
lpvnspgkyelf
llsqspvysnqngrff
fqvkaplspgdvfvapaghavtff
fglnaqnnqrifl
    
```

Die Spaltungsstellen nach l, f, w, k, r, c, m und w lassen sich durch die Spaltungsspezifitäten von Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin erklären. Es gibt noch weitere Spaltungsstellen nach d, q, a, s und n, die in kein bekanntes Muster passen.

6.1.3 3D-Struktur der Speicherproteine

Die 3D-Strukturen wurden durch das Programm SWISS-MODEL erzeugt und durch UCSF Chimera bearbeitet.

Die Generierung durch das erstgenannte Programm bedingte, dass die Proteine nicht vollständig dargestellt werden können. Die Abschnitte der Aminosäure-Sequenzen, die fehlen, sind im Anhang bei den verwendeten Sequenzen (siehe Anhang B) genau markiert.

Albumin

In der Abbildung 10 ist die Grundstruktur des Albumins dargestellt. In der nebenstehenden Abbildung 11 sind alle detektierten Peptide gelb markiert.

Die Aminosäure-Sequenz des Albumins wurde zu 63,35 % durch die detektierten Peptide abgedeckt. In der Darstellung ist zu beachten, dass 14,03 % der Aminosäure-Sequenz fehlen. Die Abbildungen dienen dazu, sichtbar zu machen, wo sich die detektierten Peptide befinden.

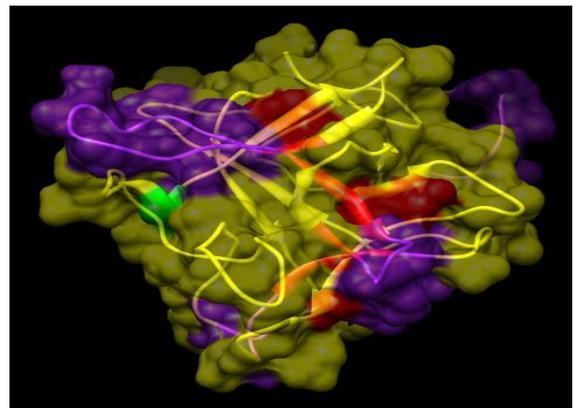
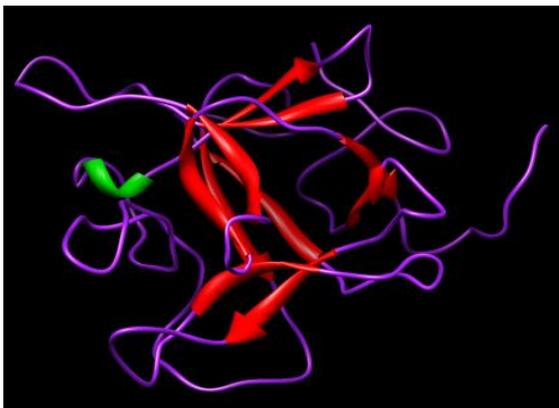


Abbildung 10: 3D-Struktur des Albumins. Die roten Pfeile stellen die β -Faltblätter dar und die grüne Windung die α -Helix.

Abbildung 11: 3D-Struktur des Albumins, wobei alle detektierten Peptide gelb markiert sind. Die Proteinoberfläche wurde transparent angezeigt.

Vicilin

Die Peptide des Vicilins (siehe Abbildung 12) waren deutlich schwerer zu detektieren. Die 3D-Strukturen der einzelnen Vicilin-Untereinheiten sind in der Abbildung 13 zu sehen. Die Aminosäure-Sequenz des Vicilins wurde zu 18,04 % durch die detektierten Peptide abgedeckt. Weiterhin ist zu beachten, dass die Aminosäure-Sequenz nicht vollständig berücksichtigt wurde. Die ersten 134 sowie die letzten 23 Aminosäuren fehlen in der Darstellung (Gesamtanteil von 40,46 %). Da das Vicilin binnen kürzester Zeit in seine Untereinheiten gespalten wird, werden diese genauer betrachtet. Die durch Massenspektrometrie detektierten Peptide wurden gelb dargestellt.



Abbildung 12: 3D-Struktur des Vicilins. Die roten Pfeile stellen die β -Faltblätter dar und die grünen Windungen die α -Helix.

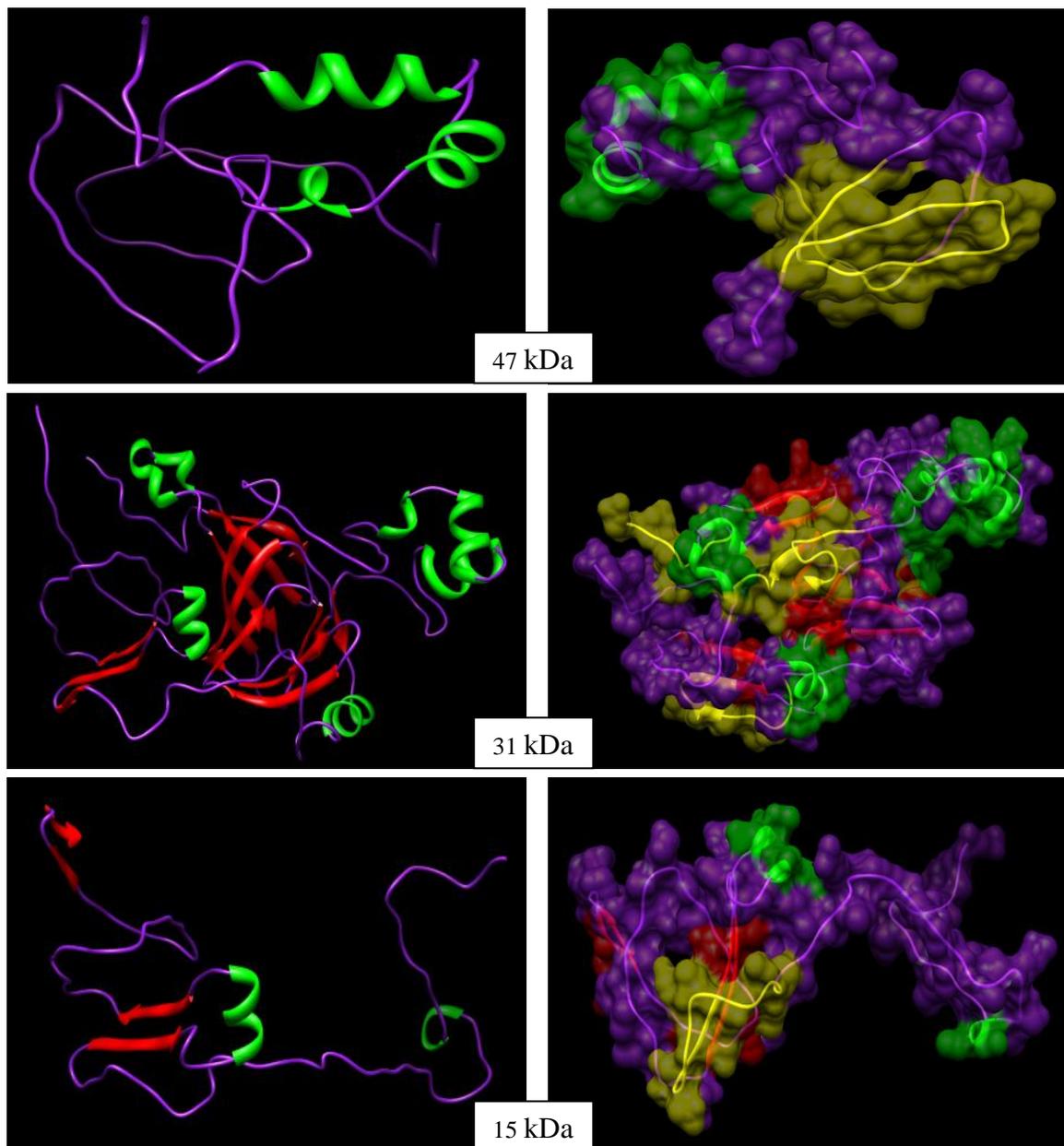


Abbildung 13: In der linken Spalte sind untereinander die 47, 31 und 15 kDa Untereinheiten des Vicilins abgebildet. In der rechten Spalte sind die Untereinheiten an den Stellen gelb markiert, an denen die Peptide detektiert wurden.

6.2 Steuerung der Proteolyse über pH-Wert und Inkubationsdauer

Die Proteinrohextrakte wurden bei den pH-Werten 3, 4 und 5 inkubiert. Die Probenahme erfolgte nach 24, 48 bzw. 96 h. Aus diesen Proben wurden Peptidspektren erzeugt, die freien Aminosäuren gemessen, sowie der Abbau der Speicherproteine kontrolliert.

6.2.1 Vergleich hinsichtlich des pH-Wertes

Peptidspektren

Im Vergleich der Peptidspektren im Hinblick auf ihren pH-Wert bei gleicher Inkubationszeit (siehe linke Spalte in Abbildung 16, S. 46) wird deutlich, dass die Menge an Peptiden, die im Zeitraum zwischen 15 - 35 min eluieren, bei pH 3 am größten ist. Die Unterschiede zwischen pH 4 und 5 sind weniger ausgeprägt und insgesamt ist die Peptidmenge niedriger.

Speicherproteinabbau

Die inkubierten Proteinrohextrakte wurden mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe Abbildung 14, S. 45). Der Proteinabbau fand in einem pH-Bereich zwischen 3 und 5 über einen Zeitraum von bis zu 96 h statt.

Die Banden des Albumins sind bei pH 3 unabhängig von der Inkubationszeit nicht sichtbar. Bei pH 4 und 5 sind die Banden wesentlich stärker ausgeprägt. Mit sinkendem pH-Wert nimmt der Abbau der Proteine zu.

Die Banden der 31 und 47 kDa Untereinheiten des Vicilins sind nur sehr schwach sichtbar. Bei pH 3 sind sie unabhängig von der Inkubationsdauer zu erahnen. Die Banden bei pH 4 und 5 sind deutlicher erkennbar.

Desweiteren sind im Bereich von 16 kDa Banden sichtbar. Hierbei handelt es sich vermutlich um Abbauprodukte. Sie sind bei allen pH-Werten sichtbar, bei pH 3 und 4 jedoch von annähernd gleicher Intensität und bei pH 5 etwas stärker.

Gehalt an freien Aminosäuren

Durch die spezifische Aktivität der sameneigenen Proteasen werden nach voranschreitender Inkubation mehr Aminosäuren frei. Die Enzyme, die an der Proteolyse

beteiligt sind, die Aspartylendoprotease und die Carboxypeptidase, haben ihre pH-Optima bei 3,5 bzw. bei 5,8. Unfermentierte Kakaosamen enthalten nur wenige freie Aminosäuren. Im Verlauf der Fermentation steigt der Gehalt zunehmend, da die Carboxypeptidase einzelne Aminosäuren abspaltet. Es entstehen hydrophile Oligopeptide und hydrophobe Aminosäuren.

In Abbildung 15 wird der Gehalt an freien Aminosäuren in den Proteinrohextrakten gezeigt. Der Gehalt ist bei pH 3 mit Werten zwischen 1,5 und 2,1 mg/g ffdm durchschnittlich um etwa 90 % niedriger als bei pH 4 und 5, die Maximalwerte von 19,4 mg/g ffdm aufweisen.

6.2.2 Vergleich hinsichtlich der Inkubationsdauer

Peptidspektren

Bei dem Vergleich der Peptidspektren bezüglich der Inkubationszeit des Proteinrohextraktes (siehe rechte Spalte in Abbildung 16) bei gleichem pH-Wert und verschiedener Inkubationsdauer ist erkennbar, dass die Unterschiede deutlich schwächer ausgeprägt sind als bei dem Vergleich bezüglich des pH-Wertes.

Die Peptide weisen nach 24 und 48 h ein sehr ähnliches Spektrum auf. Nach 96 h ist die Menge an Peptide insgesamt etwas geringer.

Speicherproteinabbau

Die Banden des Albumins (siehe Abbildung 14) sind bei pH 3 unabhängig von der Inkubationszeit nicht sichtbar. Ab einer Inkubationsdauer von 96 h nimmt der Abbau der Speicherproteine zu, bei pH 4 deutlicher als bei pH 5.

Die Banden der 31 und 47 kDa Untereinheiten des Vicilins sind nur sehr schwach sichtbar. Bei pH 3 sind sie unabhängig von der Inkubationsdauer zu erahnen. Nach 96 h Inkubation sind jedoch auch diese Banden kaum noch sichtbar. Bei den Banden der 15 kDa Untereinheit ist erkennbar, dass der Abbau bereits nach 48 h eintritt und nach 96 h zunimmt.

Bei den vermuteten Abbauprodukten ist nach 96 h ein Speicherproteinabbau zu verzeichnen.

Gehalt an freien Aminosäuren

Im Zeitraum von 24 – 48 h steigt die Menge an freien Aminosäuren bei pH 3 um 40 %, bei pH 4 um 39,7 % und bei pH 5 um 28,5 % (siehe Abbildung 15). Die Mengenangaben beziehen sich auf die fettfreie Trockenmasse.

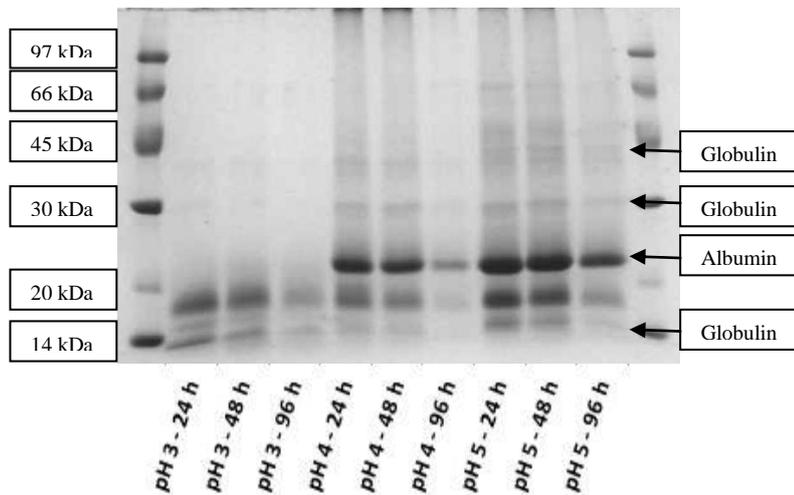


Abbildung 14: Veränderung der Speicherproteine im Laufe der Inkubation von Proteinrohextrakten bei unterschiedlichen pH-Werten durch SDS-PAGE.

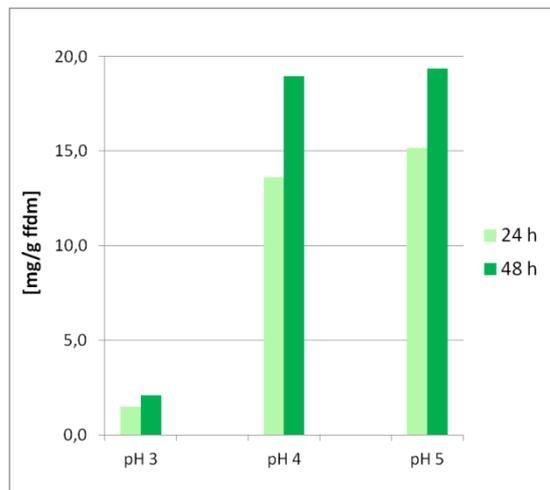


Abbildung 15: Gehalt an freien Aminosäuren nach 24 und 48 h bei den pH-Werten 3, 4 und 5 gemessen durch RPC (C18).

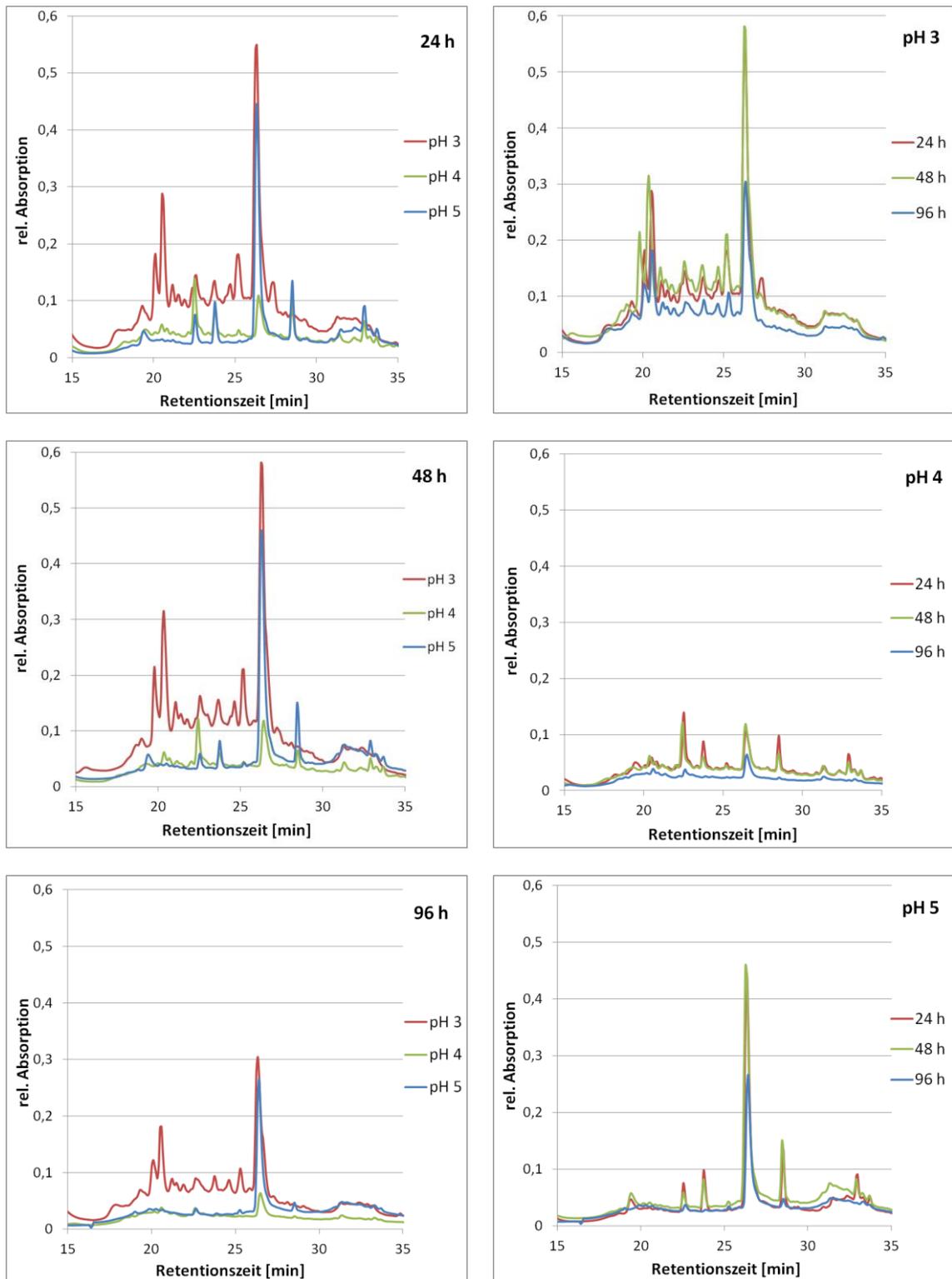


Abbildung 16: Dargestellt sind die durch RPC (C4) erzeugten Peptidspektren inkubierter Proteinrohextrakte. In der linken Spalte wurden die Spektren bezüglich ihres pH-Wertes verglichen und in der rechten Spalte hinsichtlich ihrer Inkubationsdauer.

6.3 Steuerung in Fermentation bzw. fermentationsähnlichen Inkubationen

In diesem Ergebnisteil werden die Peptidspektren in Bezug auf eine Vortrocknung untersucht. Das geschieht anhand des Vergleichs zwischen den Inkubationsmedien Essig- und Milchsäure. Weiterhin geben die organischen Säuren von Vorortfermentationen Aufschluss über die Vortrocknung. Ferner wird die Inkubationsdauer als Steuerungsfaktor anhand fermentationsähnlicher Inkubationen betrachtet und der Röstversuch ausgewertet.

6.3.1 Vergleich zwischen Essig- und Milchsäure

Vergleich der Peptidspektren inkubierter Samen bezüglich ihres Mediums

Die Peptidspektren werden in Abbildung 17 von zwei Inkubationsreihen im Hinblick auf die Auswirkungen des Mediums verglichen. In 4 von 6 Spektren sind die Peptidmengen in den Ansätzen mit Essigsäure größer.

Generell sind keine charakteristischen Gemeinsamkeiten in den Spektren zu finden.

Auch der Vergleich zwischen eingestelltem (mp) und belassenem (op) pH-Wert zeigt keine Abhängigkeit. Jedoch ist nach 3 Tagen ein großer Unterschied zwischen mp und op zu erkennen. Das Spektrum op ist deutlich ausgeprägter und enthält mehr als die dreifache Menge an Peptiden. In den Spektren nach 4 und 5 Tagen sind die Unterschiede nicht mehr so prägnant.

Speicherproteinabbau

In Abbildung 22 auf Seite 52 ist erkennbar, dass die Banden der Proben, die mit Milchsäure inkubiert wurden, intensiver sind als die der Proben, welche mit Essigsäure inkubiert wurden.

Die Banden der zweiten Inkubationsreihe zeigen zum Teil einen ähnlichen Verlauf. Die Banden der Milchsäure sind ebenso intensiver, als die der Essigsäure.

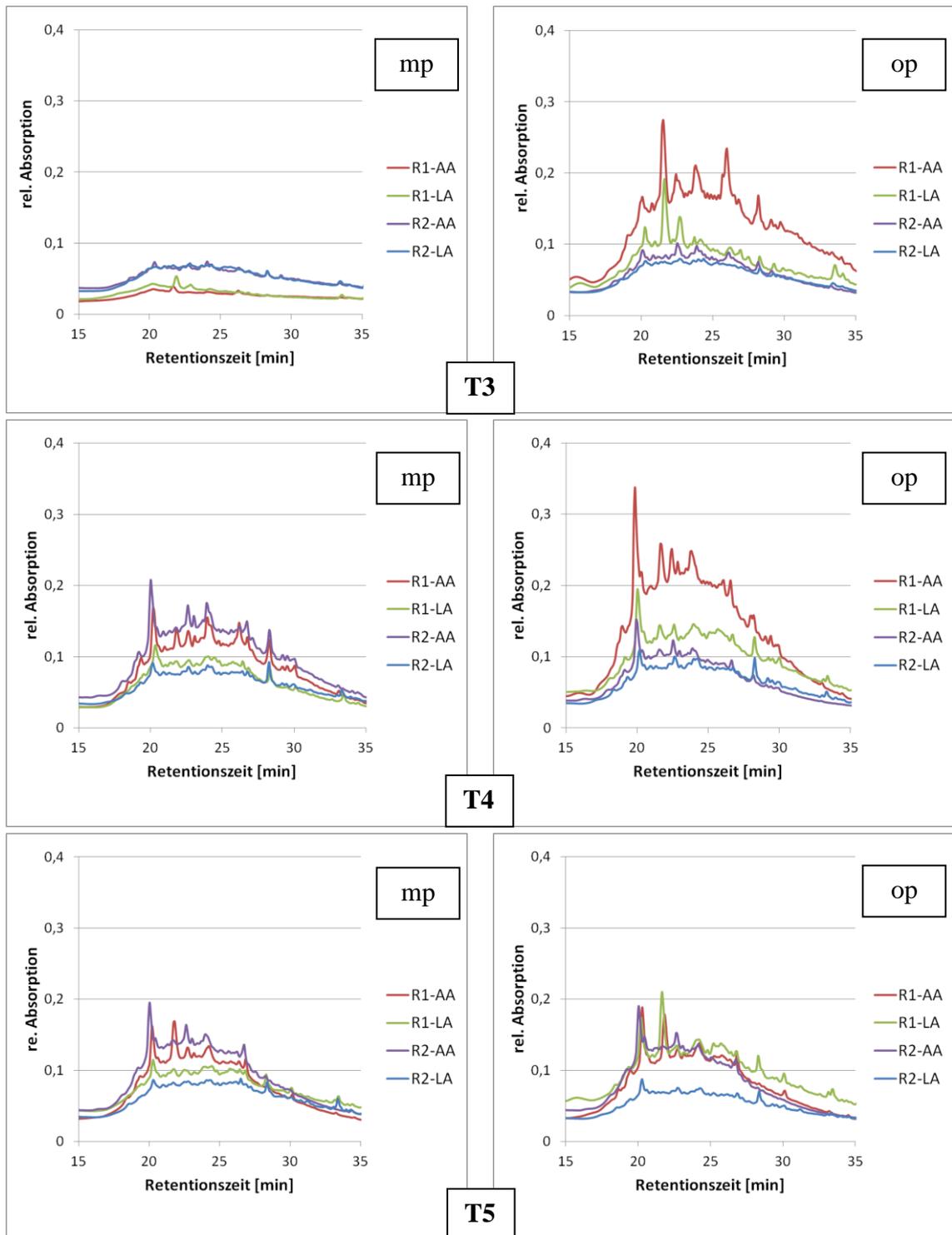


Abbildung 17: Dargestellt sind die durch RPC (C4) erzeugten Peptidspektren aus ADP von Samen der fermentationsähnlichen Inkubation. Die Samen stammen aus den Ansatzreihen 1 und 2 (R1 und R2) von den Tagen 3, 4 und 5 bei denen das Medium (Essigsäure = AA; Milchsäure = LA) in der linken Spalten einen eingestellten pH-Wert (mp) besaß und in der rechten Spalte keinen eingestellten pH-Wert (op) besaß.

6.3.2 Vergleich von vorgetrockneten bzw. nicht getrockneten Samen

Peptidspektren fermentierter Samen

Verglichen werden hier die Peptidspektren von fermentierten Samen, von denen ein Teil der Samen vorgetrocknet wurden (siehe Abbildung 18). Die Samen ohne Vortrocknung (KT) zeigen ein abweichendes Peptidspektrum im Gegensatz zu den Samen, die vorgetrocknet wurden (VT). Die Fermentation fand in beiden Fällen in gleicher Weise statt. Die Menge der Peptide unterscheidet sich in ihren Maxima um über 5 %. Dennoch können einige der vorhandenen Peaks in dem Spektrum, dessen Ausgangsmaterial vorgetrocknet wurde (VT), mit denen der Proben ohne Vortrocknung (KT) zugeordnet werden.

Gehalt an organischen Säuren

Der Gehalt an Essigsäure ist in beiden Messungen deutlich niedriger als der an Milchsäure. Das Verhältnis von Essigsäure zu Milchsäure ist im Falle einer Vortrocknung (bei Gleichsetzung von Essigsäure auf 1) 1:14,7. Ohne eine entsprechende Vortrocknung verschiebt sich das Verhältnis auf 1:8,2 (siehe Abbildung 19).

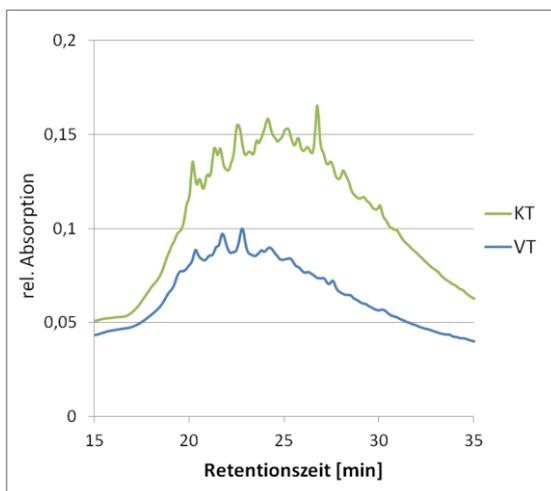


Abbildung 18: Durch RPC (C4) erzeugte Peptidspektren aus ADP von fermentierten Samen mit (VT) und ohne (KT) Vortrocknung

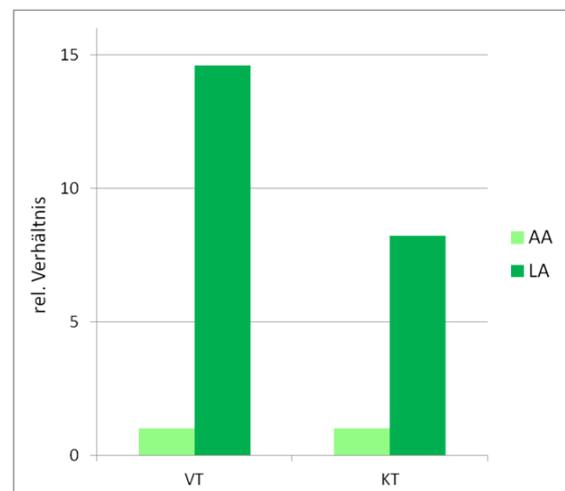


Abbildung 19: relativiertes Verhältnis von Essig- (AA) zu Milchsäure (LA) bei fermentierten Samen vermessen durch IEXC

6.3.3 Auswirkungen der Inkubationsdauer

Peptidspektren inkubierter Samen

In der Abbildung 20 werden die Spektren zweier Ansatzreihen hinsichtlich ihrer Inkubationsdauer verglichen.

Bei dem Vergleich der Inkubationsdauer sind keine gemeinsamen Charakteristika zu sehen.

Gehalt an freien Aminosäuren

Der Gehalt an freien Aminosäuren von zwei Inkubationsreihen liegt in einem Bereich von 12,6 und 30,9 mg/g fettfreier Trockenmasse (siehe Abbildung 21). Die Mengen sind in den beiden Inkubationsreihen bis auf eine Ausnahme bei den Proben „T5-AA“ relativ ähnlich. Im Vergleich der Inkubationsmedien gibt es mehr freie Aminosäuren, wenn die Samen in Essigsäure inkubiert wurden. Die Inkubationsdauer wirkt sich scheinbar nicht auf den Gehalt an freien Aminosäuren aus.

Speicherproteinabbau

In Abbildung 22 ist der Proteinabbau von zwei Inkubationsreihen abgebildet. Die Banden der ersten Inkubationsreihe zeigen mit fortschreitender Inkubationsdauer eine deutliche Abschwächung ihrer Intensitäten. Das gilt sowohl für Albumin als auch für Vicilin.

Die Banden der 15 kDa Untereinheit des Vicilins sind am 4. und 5. Tag scheinbar intensiver als am dritten Tag.

Die Globulinbanden sind im Vergleich zum 3. Tag ab dem 4. Tag erkennbar schwächer. Ab dem 5. Inkubationstag wird das Globulin weiter abgebaut. Dies ist in der ersten Inkubationsreihe deutlicher sichtbar.

Der Abbau des Albumins in der ersten Ansatzreihe nimmt mit fortschreitender Inkubationsdauer zu. Dies ist jedoch nicht in dem zweiten Ansatz zu erkennen.

Die Proben, die mit Essigsäure inkubiert wurden, zeigen einen schnelleren Abbau. Das liegt daran, dass die Essigsäure mit einem pH-Wert von 2,8 im Gegensatz zu Milchsäure mit einem pH-Wert von 2,2 dichter am pH-Optimum der Aspartylendoprotease liegt, welche für die Entstehung der Untereinheit verantwortlich ist.

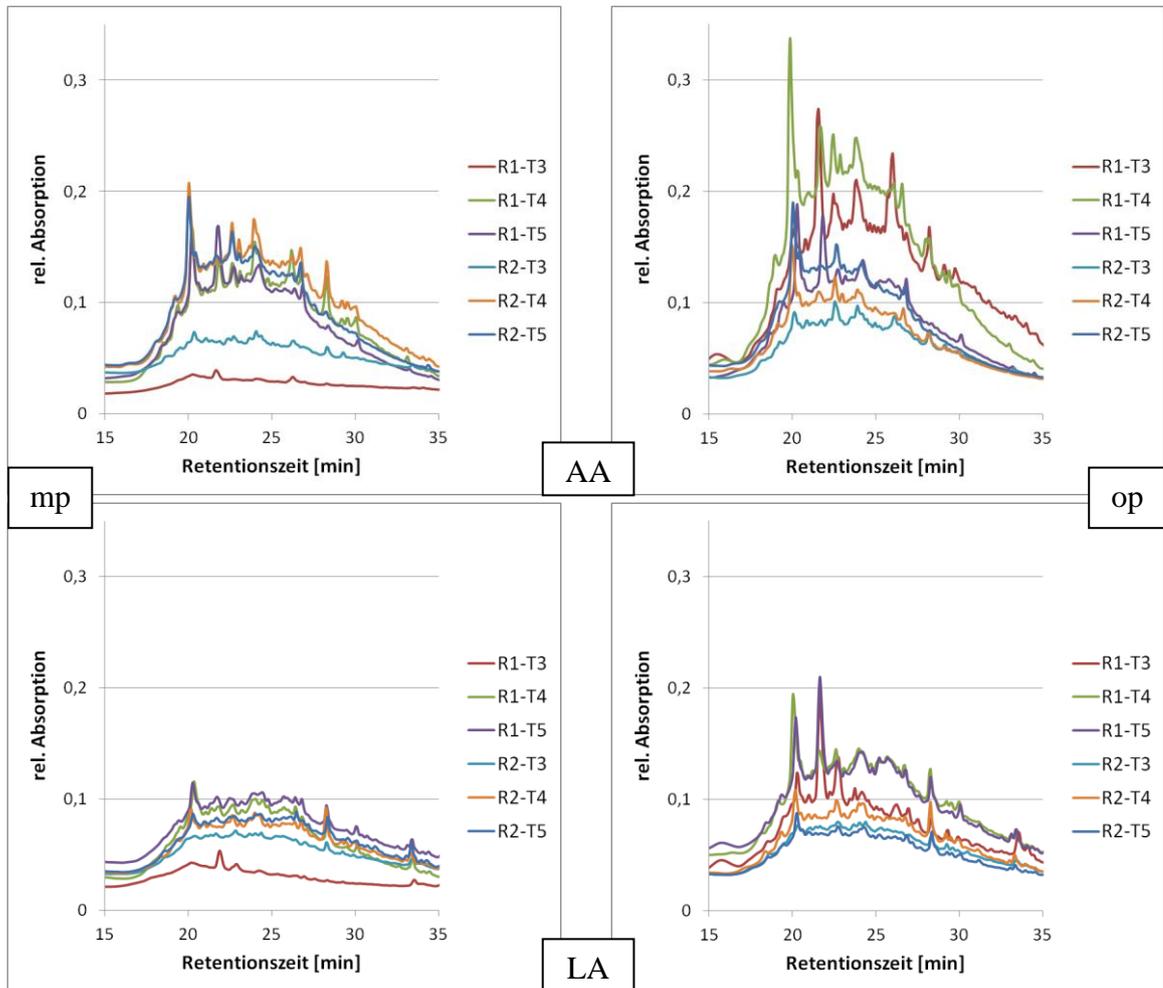


Abbildung 20: Dargestellt sind die Peptidspektren, erzeugt durch RPC (C4), aus ADP von Samen der fermentationsähnlichen Inkubation. Die Samen stammen aus den Ansatzreihen 1 und 2 (R1 und R2) von den Tagen 3, 4 und 5 aus den Medien Essigsäure (AA) und Milchsäure (LA) bei einem eingestellten pH-Wert von 4,5 (mp) und einem belassenen pH-Wert (op).

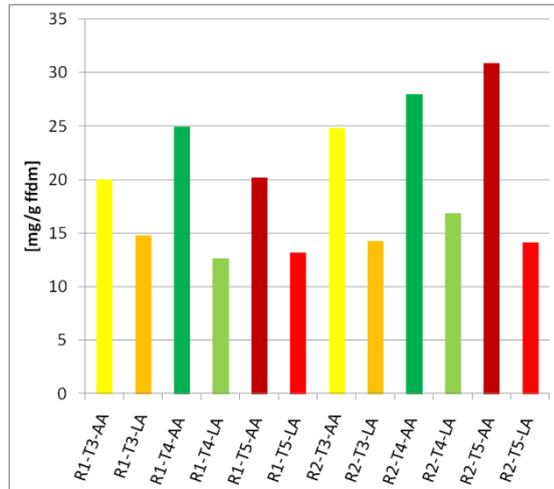


Abbildung 21: Dargestellt sind die durch RPC (C18) ermittelten Gehalte an freien Aminosäuren in den inkubierten Samen aus fettfreier Trockenmasse bei unterschiedlichen Medien und Inkubationszeiten. Die Medien hatten keinen eingestellten pH-Wert.

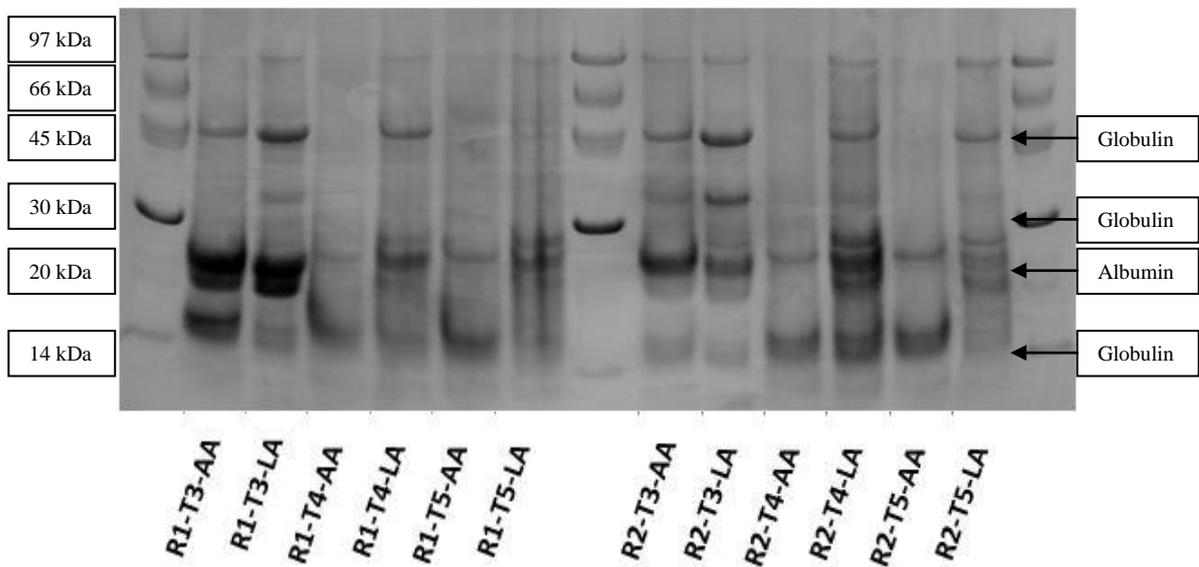


Abbildung 22: Veränderung der Speicherproteine aus ADP im Laufe der Inkubation von Samen bei unterschiedlichen Medien und Inkubationszeiten (durch SDS-PAGE). Es wurden lediglich die Proben aus den Inkubationsreihen untersucht, die keinen eingestellten pH-Wert besaßen.

6.3.4 Auswirkungen von pH-Wert und Inkubationszeit auf Röstung

Für den Röstversuch wurden die inkubierten Kakaosamen aus Costa Rica verwendet. Alle Proben mit einem pH-Wert von 2,8 wiesen starke Essigsäurerückstände auf. In den Proben des 3. Inkubationstages wurde unabhängig vom pH-Wert kein Schokoladenaroma gerochen. Eine von fünf Personen roch ein nussiges Aroma bei pH 5. In den Proben des 4. Inkubationstages wurden bei pH 4 und 5 von allen Personen leichtes Schokoladenaroma gerochen. Bei pH 2,8 wurde dies nicht gerochen. Eine Person empfand den Geruch als weinähnlich. Die Proben des 5. Inkubationstages riefen unterschiedliche Meinungen hervor. Zwei von fünf Personen rochen bereits bei pH 2,8 neben dem Essigsäuregeruch ein leichtes Schokoladenaroma. Bei pH 4 und 5 rochen 3 von 5 Personen eine schokoladige Note.

Die Proben mit einem pH-Wert von 2,8 zeigten im Inneren noch eine rötlich-lila Färbung. Die Samen mit pH-Werteinstellungen von 4 und 5 waren bereits innen braun gefärbt.

7 Diskussion

7.1 Peptid- und Spaltungsmuster

Ziel der Untersuchungen ist es, festzustellen, welche Peptide generell bei der Proteolyse der Speicherproteine entstehen. Außerdem sollen Aussagen über die Spaltungsspezifität getroffen werden können, da es bisher keine genauen Aussagen über das Spaltungsmuster der kakaoeigenen Proteasen gibt.

Die durch die massenspektrometrischen Messungen gefundenen Peptide stammen überwiegend aus dem Albumin. Zum Teil kann die Feststellung von VOIGT und BIEHL 1993, die besagt, dass der Gesamtgehalt an Albumin um 9 % höher ist als der des Vicilins, dazu beigetragen haben. Dies kann jedoch nicht der alleinige Grund sein. Mit einer Länge von 221 Aminosäuren existieren weniger mögliche Peptide als bei dem Vicilin mit einer Länge von 568 Aminosäuren.

Desweiteren werden in der Massenspektrometrie nie alle zu erwarteten Peptide erfasst. Die Abdeckung der Sequenz durch detektierte Peptide beträgt in der Regel etwa 30 - 50 %. Die detektierten Peptide deckten die Aminosäure-Sequenz des Albumins zu 63 % ab. Die Aminosäure-Sequenz des Vicilins wurde zu 18 % durch die detektierten Peptide abgedeckt. Ein weiterer möglicher Grund kann darin liegen, dass die angewandten Extraktionsmethoden nicht alle vorhandenen Peptide hervorbringen konnten.

BUYUKPAMUKCU et al. haben bereits 2001 zwei Peptide des Vicilins mittels Massenspektrometrie analysiert. Zum Einen das Nonapeptid `ap1spgdvf` und zum Anderen das Hexapeptid `spgdvf`. Ersteres, so BUYUKPAMUKCU et al., entsteht vermutlich früh während der Fermentation und degradiert nach drei Tagen. Das Hexapeptid wird erst verzögert gebildet.

Die Peptide wurden auch in der vorliegenden Untersuchung innerhalb des detektierten Sequenzabschnittes `qqvkap1spgdvfvapaghavtf` gefunden.

In den 3D-Strukturen ist erkennbar, dass die nicht detektierten Bereiche zum Teil frei zugänglich sind, obwohl wiederum schwerer zugängliche Stellen im innenliegenden Bereich der Proteine detektiert wurden. Allerdings ist zu beachten, dass die Strukturen der Proteine an bereits bekannte Strukturen angepasst wurden. Teile der Aminosäure-Sequenzen wurden nicht berücksichtigt und könnten aber eine wichtige Rolle bei der Strukturgebung spielen. Außerdem wurden die 3D-Modelle der Untereinheiten nicht anhand der gleichen Strukturen erstellt.

Die Spaltungsspezifität der Aspartylendoprotease konnte nicht vollständig durch die bekannten Muster von Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin erklärt werden. Unspezifische

Spaltungen wurden zwischen d-v, d-r, q-s, a-a, s-w, c-s und n-t beobachtet.

Die Aspartylendoprotease wurde von LALOI et al. 2002 kritisch untersucht. Durch Versuche konnte bewiesen werden, dass es zwei klar trennbare Gene des Enzyms gibt. Sie werden in TcAP1 und TcAP2 unterteilt. Ihre DNA ist zu 73 % identisch. Beide Varianten entstehen während der Samenentstehung. TcAP2 wird deutlich stärker exprimiert, wohingegen die Exprimierung von TcAP1 erst langsam während der Keimung ansteigt. Es wird vermutet, dass die beiden Proteasen unterschiedliche Funktionen im Samen haben. Durch weitere Versuche wurde gezeigt, dass TcAP2, exprimiert in Hefe (*Yarrowia Lipolytica*), bovines Hämoglobin bei saurem pH-Wert hydrolysiert und sensitiv zu Pepstatin A ist. Somit wird geschlossen, dass es sich bei TcAP2 um das aromarelevante Enzym handelt.

Fraglich bleibt die Funktion und Spaltungsspezifität von TcAP1. Der Anteil der Protease ist zwar deutlich geringer, könnte jedoch für die nicht zugeordneten Spaltungen verantwortlich sein. Ob die Spaltungen spezifisch sind, wäre ebenfalls durch weitere Untersuchungen zu klären.

Eine mögliche Ursache für weitere ungeklärte Schnittstellen könnte die Aktivität der Aminopeptidase sein. Sie zeigt laut HANSEN et al. 1998 eine höhere Aktivität als die Carboxypeptidase, hat jedoch ein pH-Optimum bei etwa 6,8 - 7. Dieser pH-Wert wird während der Fermentation im Kakaosamen nicht erreicht. Die maximalen Werte liegen bei pH 6,4 am Anfang und am Ende der Fermentation.

Zusammenfassung

Durch massenspektrometrische Untersuchungen konnten die aus den Speicherproteinen stammenden Peptide bei Albumin und Vicilin zu 63 bzw. 18 % detektiert werden.

Neben den bekannten Spaltungsmustern, hervorgerufen durch Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin, bleiben weitere Spaltungsstellen ungeklärt. Gründe hierfür könnten die bisher weniger betrachteten Enzyme Aminopeptidase oder TcAP1 sein.

7.2 Steuerung der Proteolyse über pH-Wert und Inkubationsdauer

In diesem Kapitel geht es darum, Aussagen zur Steuerung der Proteolyse über den pH-Wert und die Inkubationsdauer machen zu können. Die Grundlage hierfür waren die bei verschiedenen pH-Werten inkubierten Proteinrohextrakte.

Der Gesamtproteinanteil bei jeweiligem pH-Wert und Inkubationsdauer setzt sich zusammen aus der Menge der Peptide und den freien Aminosäuren, daher wird die Steuerung auf allen drei Ebenen betrachtet.

Die Peptide entstehen durch die Proteolyse der Speicherproteine. Sie sind mitsamt den freien Aminosäuren Voraussetzung bei der Aromavorstufenentwicklung (VOIGT et al., 1994a).

Betrachtung des pH-Wertes als Steuerungsfaktor

Aus den Vergleichen der Peptidspektren geht hervor, dass ein pH-Wert von 3 ein ausgeprägteres Spektrum hervorruft, als pH 4 und pH 5. Diese zeigen ähnliche Spektren. Die Aspartylendoprotease, welche die Proteine zu Peptiden spaltet, hat ein pH-Optimum bei 3,5. Das Spektrum hätte bei pH 4 erwartungsgemäß ausgeprägter sein müssen, als bei pH 5, denn dort ist die Aspartylendoprotease aktiver (HANSEN et al., 1998). Desweiteren hat die Aspartylendoprotease eine bedeutend höhere Aktivität von 469 U/g DM im Gegensatz zu der Carboxypeptidase mit einer Aktivität von 1,38 U/g DM bei unfermentierten Samen (HANSEN et al., 1998). Folglich könnte die Carboxypeptidase bei pH 4 schon einige Peptide zu freien Aminosäuren gespalten haben, jedoch mit einer wesentlich geringeren Aktivität. Dies könnte durch Messungen der Enzymaktivität nach täglicher Probenahme während einer fermentationsähnlichen Inkubation festgestellt werden.

Die Untersuchungen mittels SDS-PAGE zeigen, dass der pH-Wert Einfluss auf den Speicherproteinabbau hat. Bei pH 3 ist unabhängig von der Inkubationsdauer kein Albumin vorhanden. Dies kann zum Einen daran liegen, dass das Albumin bereits innerhalb der ersten 24 h zersetzt wurde. Andererseits könnte eine mangelnde Extraktion bewirkt haben, dass die Proteine nicht aus ihrer Ausgangssubstanz extrahiert wurden. Dagegen sprechen würde jedoch, dass bei pH 3 ein ausgeprägtes Peptidspektrum erzeugt werden konnte. Außerdem ist Albumin mit 53 % in größerer Menge in den Speicherzellen vorhanden als Vicilin mit 43 % (VOIGT und BIEHL, 1993). Der Abbau des Albumins nimmt mit steigendem pH-Wert zu. Weitere Untersuchungen mit geringeren Inkubationszeiten könnten darüber Aufschluss geben. Die Vicilinbanden der beiden großen Untereinheiten sind unabhängig vom pH-Wert nur schwach sichtbar. Eine mangelnde Extraktion der größeren Untereinheiten wäre hier ebenfalls nicht

wahrscheinlich, da in der Massenspektrometrie Peptide aus allen drei Untereinheiten detektiert wurden. Der pH-Wert scheint für den Abbau des Vicilins nicht entscheidend zu sein.

Die Banden, die in den Ergebnissen als Abbauprodukte vermutet wurden, können von dem Albumin stammen, wobei die Carboxypeptidase bereits einige Aminosäuren abgespalten haben könnte. Dies könnte durch Extraktion der Proteine aus den Banden und schließlich einer massenspektrometrischen Untersuchung geklärt werden.

Der Gehalt an freien Aminosäuren wurde bei pH 3, 4 und 5 nach 24 bzw. 48 h gemessen. Erwartungsgemäß zeigt die Carboxypeptidase, aufgrund ihres pH-Optimums bei 5,8, kaum Aktivität bei pH 3, so dass nur wenige Aminosäuren abgespalten werden. Der Gehalt ist um etwa 90 % geringer als bei pH 4 und 5.

Betrachtung der Inkubationsdauer als Steuerungsfaktor

Bei dem Vergleich der Peptidspektren bei gleichem pH-Wert und verschiedener Inkubationsdauer ist erkennbar, dass die Unterschiede deutlich schwächer ausgeprägt sind als bei dem Vergleich bezüglich des pH-Wertes. Dies lässt vermuten, dass die Inkubationsdauer nur ein gering ausschlaggebender Faktor bei der Peptidbildung ist. Die Spektren weisen nach 24 und 48 h ein nahezu identisches Spektrum an Peptiden auf, welches sich jedoch nach 96 h etwas reduziert.

Der Abbau der Speicherproteine nimmt insgesamt betrachtet bei zunehmender Inkubationsdauer ab. Dies entspricht den Erwartungen, da die Speicherproteine durch die Wirkung der Proteasen zunehmend zersetzt werden.

Die Inkubationszeit wirkt sich in geringerem Maße auf den Gehalt der freien Aminosäuren aus. Bei pH 3 beträgt der Anstieg des Aminosäuregehalts etwa 28 %, bei pH 4 und 5 ca. 40 %. Wie bereits erwähnt, ist die Carboxypeptidaseaktivität bei pH 3 niedrig, so dass überwiegend die Aspartylendoprotease die Proteine in Peptide spaltet. Allerdings wurde nur der Zeitraum von 24 und 48 h betrachtet. Um genauere Aussagen treffen zu können, müssten Messungen zu weiteren Inkubationszeiten durchgeführt werden.

Zusammenfassung

In den Versuchen wurde festgestellt, dass der pH-Wert einen größeren Einfluss auf das Peptidspektrum hat als die Inkubationsdauer. Letztere zeigt jedoch Auswirkungen auf den Speicherproteinabbau und den Gehalt an freien Aminosäuren.

7.3 Steuerung in Fermentation bzw. fermentationsähnlichen Inkubationen

Vergleich zwischen Essig- und Milchsäure

Die Untersuchungen mit Essigsäure stellen eine klassische Fermentation dar; die Versuche mit Milchsäure hingegen eine Fermentation mit vorangegangener Vortrocknung. Da bei der Vortrocknung die Pulpamenge reduziert wird, kann der Sauerstoff bei der eigentlichen Fermentation schneller in die Fermentationsmasse gelangen. Dadurch wird die anaerobe Phase stark verkürzt und es entsteht weniger Essigsäure.

Die Betrachtung der Peptidspektren ergab, dass die Peptidmenge, bei Verwendung von Milchsäure im Medium, um 10 % niedriger ist, als bei Verwendung von Essigsäure. Desweiteren führt eine pH-Wert-Einstellung von 4,5 zu einem ausgeprägteren Spektrum.

Die Inkubation der Samen in Essigsäure bewirkte, dass der Gehalt an freien Aminosäuren höher ist, als bei den Inkubationen in Milchsäure. Dies war bei allen Messungen der beiden Ansatzreihen der Fall. Die Menge der freien Aminosäuren reduziert sich auf Werte zwischen 25 – 55 % bei einer Inkubation in Milchsäure.

Die Speicherproteine werden schneller abgebaut, wenn das Medium Essigsäure enthält. Passend dazu wurde bereits erwähnt, dass die Peptidmenge, dargestellt durch ihre Spektren, bei Essigsäureinkubation zunimmt. Das bedeutet, dass die relevanten Aromavorstufen vermutlich eher gebildet werden, wenn die Samen keiner Vortrocknung unterzogen werden.

Vergleich zwischen vorgetrockneten bzw. nicht getrockneten Samen

Bei den Vorortfermentationen wurde ein Teil der Samen vorgetrocknet. In den Peptidspektren ist erkennbar, dass diese Vortrocknung die Ausbildung der Peptide erschwert und somit weniger Peptide hervorbringt, die für die Aromavorstufenbildung relevant sein können.

Desweiteren bedingt die Vortrocknung eine Verschiebung der Anteile an organischen Säuren. Bei gleichbleibender Essigsäurekonzentration sinkt der Anteil an Milchsäure ohne eine Vortrocknung um etwa 45 %. Das deutet darauf hin, dass, wie in den Spektren bereits gezeigt, die Entstehung der Peptide begünstigt wird. Desweiteren

verbleibt die Milchsäure im Gegensatz zur flüchtigen Essigsäure eher im Samen, was zu einem niedrigeren pH-Wert und folglich zu einer erhöhten Aktivität der Aspartylendoprotease führt. Diese wiederum sorgt für die Entstehung von Peptiden.

Inkubationsdauer

Die Peptidspektren zeigen in Bezug auf die Inkubationsdauer keine Hinweise auf eine Steuerbarkeit.

Der Gehalt an freien Aminosäuren zeigt ebenfalls keine Abhängigkeit zur Inkubationsdauer.

Lediglich bei der Betrachtung des Speicherproteinabbaus wurden Anzeichen auf eine Steuerbarkeit durch die Inkubationsdauer erkannt.

Auswirkungen von pH-Wert und Inkubationsdauer auf Röstung

Die Essigsäure war in den Proben mit einem pH-Wert von 2,8 noch deutlich zu riechen. Dies liegt vermutlich daran, dass die Samen erst nach der mehrtägigen Trocknung zerkleinert wurden und daher die Essigsäure noch nicht vollständig verflogen war. Auch die Samenfarbe deutete noch darauf hin, dass es saure Bereiche im Sameninneren gab. Die Feinaromen wie nussig oder weinähnlich wurden nach 3 bzw. 4 Tagen Fermentation bei pH-Werten von 5 bzw. 2,8 gerochen. Am meisten Schokoladenaroma wurde an den Inkubationstagen 4 und 5 bei den pH-Werten 4 und 5 gerochen.

Da die Teilnehmer der Arbeitsgruppe keine ausgebildeten Geruchsexperten sind, sind diese Ergebnisse auf die persönliche Einschätzung und Erfahrung zurückzuführen.

Zusammenfassung

Bei fermentationsähnlichen Inkubationen mit Essig- bzw. Milchsäure konnten Auswirkungen beobachtet werden. Zum Einen wird ein ausgeprägteres Peptidspektrum erhalten, wenn die Inkubation mit Essigsäure durchgeführt wurde.

Zum Anderen wurde festgestellt, dass die Speicherproteine besser durch Essigsäure als durch Milchsäure abgebaut werden. Weiterhin ist die Menge an freien Aminosäuren höher bei einer Inkubation in Essigsäure.

Das bedeutet, dass die relevanten Aromavorstufen aus Peptiden und freien Aminosäuren vermutlich eher gebildet werden, wenn die Samen keiner Vortrocknung unterzogen werden. Die Verschiebung der organischen Säuren deutet dies ebenfalls an.

Die Inkubationsdauer scheint kein relevanter Faktor zu sein, da weder in den Spektren, noch in den freien Aminosäuren Anzeichen auf eine Abhängigkeit zu finden sind. Lediglich der Speicherproteinabbau, wie in den Inkubationen des Proteinrohextraktes bereits gezeigt, schreitet mit zunehmender Inkubationsdauer voran.

Der Röstversuch zeigte, dass eine Inkubationsdauer von wenigen Tagen zur Ausbildung von Feinaromen beitragen kann. Die Samen des 3. Inkubationstags erzeugten nur bei zwei Personen den Anschein eines Schokoladenaromas. Erst bei Inkubationszeiten von 4 und 5 Tagen bei pH-Werten von 4 und 5 wurde die Schokoladennote intensiver gerochen.

Das Verhältnis von freien Aminosäuren zu Speicherprotein und der Peptidmenge kann durch den pH-Wert und die Inkubationsdauer bestimmt werden. Der pH-Wert kann zum Einen durch Milchsäure und zum Anderen durch eine verkürzte Inkubation gesenkt werden. Anhand der Abbildung 3 wird ersichtlich, dass der pH-Wert nach einer kurzen Fermentation im Samen sehr niedrig ist. Der Criollo entwickelt vermutlich unter diesen Bedingungen die nussige Aromanote.

Literaturverzeichnis

Amin I, Jinap S, Jamilah B. 1997. Vicilin-class globulin and their degradation during cocoa fermentation. *Food Chemistry*. 59: 1-5

Afoakwa EO, Paterson A, Fowler M, Ryan A. 2008. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48: 840-857

Biehl B, Heinrichs H, Ziegeler-Berghausen H, Hammor M, Senyuk V. 1993. The proteases of ungerminated cocoa seeds and their role in the fermentation process. *Angw. Bot.* 67: 59-65

Butler, DR. 2006. Parameters to distinguish between fine or flavour and bulk cocoa. Presentation at the Chocolate Technology

Buyukpamukcu E, Goodall DM, Hansen CE, Keely BJ, Kochhar S, Wille H. 2001. Characterization of peptides formed during fermentation of cocoa bean. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5822-5827

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* No.246, 64-71.

Hansen CE, del Olmo M, Burri C. 1998. Enzyme Activities in Cocoa Beans During Fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 77: 273-281.

Hansen CE, Manez A, Burri C, Bousbaine A. 2000. Comparison of enzyme activities involved in flavor precursor formation in unfermented beans of different cocoa genotypes. *J. Sci. Food Agric.* 80: 1193-1198.

Kirchhoff PM, Biehl B, Crone G. 1989. Peculiarity of the accumulation of free amino acids during cocoa fermentation. *Food Chem.* 31: 295-311.

Kratzer U, Frank R, Kalbacher H, Biehl B, Wöstemeyer J, Voigt J. 2009. Subunit structure of vicilin-like globular storage protein of cocoa seeds and the origin of cocoa- and chocolate-specific aroma precursors. *Food Chem.* 113: 903-913

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.

Lalio M, McCarthy J, Morandi O, Gysler C, Bucheli P. 2002. Molekular and biochemical characterisation of two aspartic proteinases TcAP1 and TcAP2 from *Theobroma cacao* seeds. *Planta* (2002) 215: 754-762

Lieberei R, Reisdorff C. 2007. Nutzpflanzenkunde Georg Thieme Verlag; 7.; vollständig überarbeitete Fassung, begründet von Franke W. S. 154, 295-297

Lieberei R, Voigt J. im Druck. Biochemistry of cocoa fermentation. CRC press

Lopez AS, Dimick PS. 1995. Cocoa Fermentation. Biotechnology - Second, completely revised edition. (G.Reed and T. W. Ngodawithana) VHG Verlagsgesellschaft

Mortezai N, Harder S, Schnabel C, Moors E, Gaulty M, Schlüter H, Wagener C, Buck F. 2010. Tandem affinity depletion: A combination of affinity fractionation and immunoaffinity depletion allows the detection of low-abundance components in the complex proteomes of body fluids. *Journal of Proteome Research* 6126-6134

Rohan T. 1964. The precursor of chocolate aroma: A comparative study of fermented and unfermented cocoa beans. *J. Sci Food Agric.* 29: 456-459.

Rohsius C, Elwers S, Lieberei R. 2010. Cocoa Atlas German Cocoa and Chocolate Foundation

Schermann P, Schieberle P. 1997. Evaluation of key odorants in milk chocolate and cocoa mass by extract dilution analyses. *J. Agric. Food Chem.* 45: 867-872

Schlosser A. 2002. Analyse der Proteinphosphorylierung und anderer kovalenter Proteinmodifikationen mit Elektrospray-Massenspektrometrie. *Dissertation.* Johann Wolfgang Goethe-Universität, Deutschland

Schwan R F, Wheals A E. 2004. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44: 205-221.

Stoll L. 2010. Biochemische Indikatoren für Keimung und Fermentation in Samen von Kakao (*Theobroma cacao L.*). *Dissertation.* Universität Hamburg, Deutschland

Voigt J, Biehl B. 1993. The major seed proteins of *Theobroma cacao L.* *Food Chem.* 47: 145-151.

Voigt J, Biehl B, Heinrichs H, Kamaruddin S, Gaim Marsoner, G Hugl 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 cocoa-specific aroma precursors depends on particular chemical structures on the vicilin-class globulin of the cocoa seed lacking in the globular storage proteins of coconuts, hazelnuts and sunflower seeds. *Food Chem.* 51: 197-205

Voigt J, Biehl B, Heinrichs H. 1994c. In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma-related peptides generate from cocoa-seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. *Food Chem.* 49: 173-180.

Voigt J, Biehl B. 1995. Precursors of the cocoa specific aroma components are derived from the vicilin-class (7S) globulin of the cocoa seeds by proteolytic processing. *Bot. Acta.* 108: 283-289.

Voigt J, Kamaruddin S, Heinrichs H, Wrann D, Senyuk V, Biehl B. 1995. Developmental stage-dependent variation of the levels of globular storage protein and aspartic endoprotease during ripening and germination of *Theobroma cacao* L. Seeds. *J. Plant Physiol.* Vol. 145, no 3 (1995) pp. 299-307

Abbildungen

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004 Oct;25(13):1605-12.

Internetquellen

Nr. 1: Schokolade & Kakao: Der Kakaobaum – *Theobroma cacao* L.
<http://www.theobroma-cacao.de/wissen/kakaobaum/>
letztes Zugriffsdatum: 20.02.2012

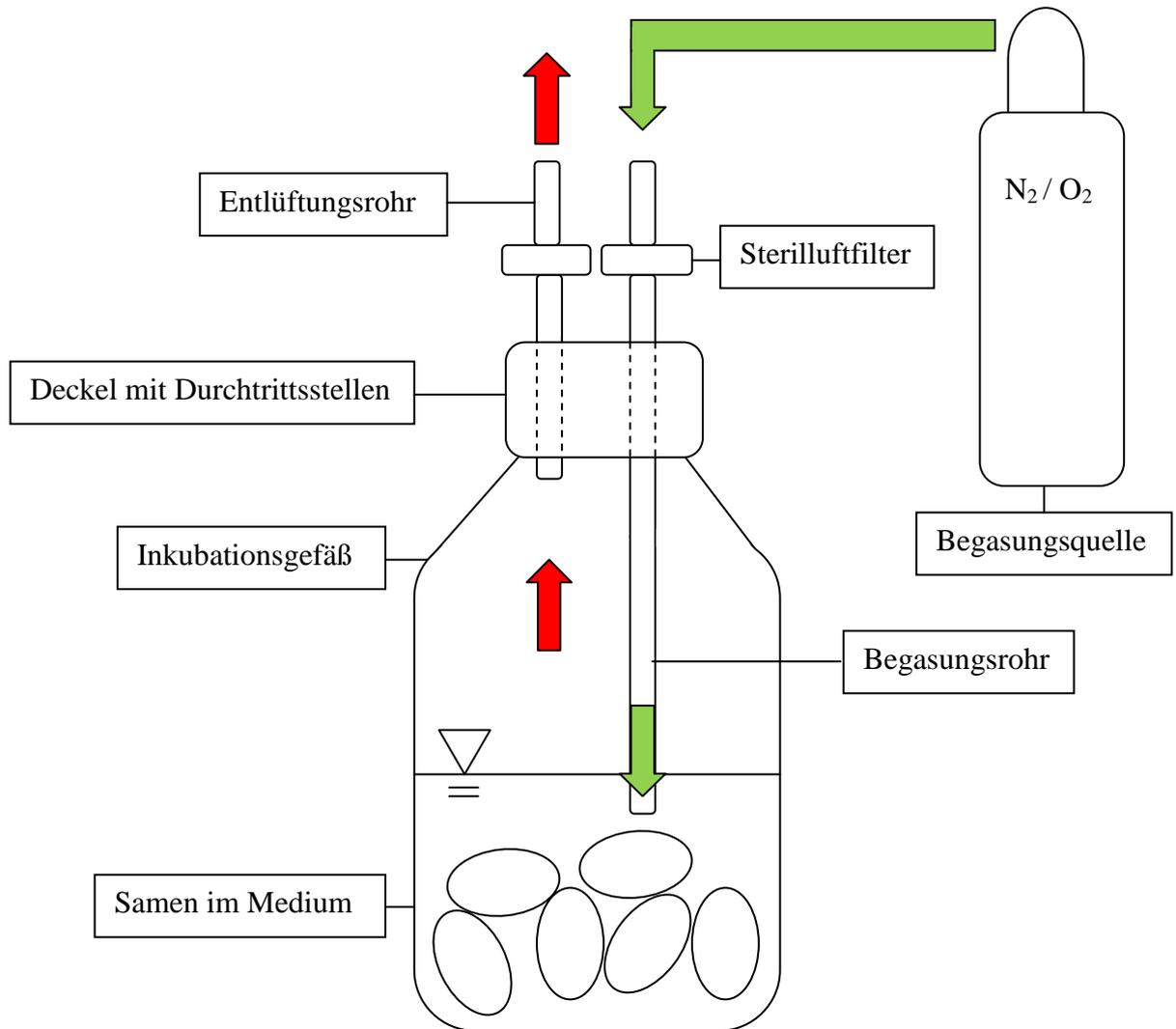
Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, Eileen Zacharias, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig verfasst wurde und ich keine anderen als die hier angegeben Hilfsmittel, insbesondere keine im Quellenverzeichnis nicht benannten Internetquellen, benutzt habe. Die Arbeit wurde von mir zuvor noch bei keinem anderen Prüfungsverfahren eingereicht. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Ich bin damit einverstanden, dass die Bachelorarbeit veröffentlicht wird.

Anhang

A Konstruktionszeichnung



B Sequenzen analysierter Proteine

Die Aminosäure-Sequenz wurde in schwarzer Schrift dargestellt. Die detektierten Peptide sind darunter grün hinterlegt. Die im Folgenden gelb hinterlegten Bereiche wurden bei der Erstellung der 3D-Strukturen aufgrund der automatisierten Programmierung nicht berücksichtigt. Dies gilt für die Proteine Albumin und Vicilin, sowie deren Untereinheiten. Bei der Darstellung der Untereinheiten wurden die Sequenzabschnitte im Gegensatz zu der gesamten Aminosäure-Sequenz in blauer Schrift markiert.

B.1 Aminosäure-Sequenz von Albumin

```

mktatavvll lfaftkskyf fgvanaansp vldtdgdelq tgvqyyvlss isgaggggla
                                ansp vldtdgdelq tgvqyyvl
                                ansp vldtdgdelq tgvqy
                                ansp vldtdgdelq tgvq
                                                                ss isgaggggla
                                                                ss isgaggggla>

lgratgqscp eivvqrrsd l dngtpvifsn adskddvrv stdvniefvp irdrclcstst
lgratgq
                                rsdl dngtpvifsn adskd
                                rsdl dngtpvif
                                l dngtpvifsn adskddvrv
                                ngtpvifsn adskddvrv
                                sn adskddvrv
                                sn adskddvrv std
                                dskddvrv std
                                                                vniefvp ird
                                                                iefvp ird
                                                                stst>
                                                                stst>

vwrl dnydns agkwvtttdg vkgepgpntl cswfkiekag vlgykfrfcp svcdscttlc
vwrl d
vwrl
                                ldnydns agkw
                                dnydns agkw
                                nydns agkw
                                vwtttdg vkgepgpn
                                vwtttdg vk
                                                                wfkiekag vlgyk

sdigrhsddd gqirlalsdn ewawmfkkas ktikqvvnan d
                                alsdn ewawmfkkas k
                                fkkas kt

```

B.2 Aminosäure-Sequenz von Vicilin

Aminosäure-Sequenz von Vicilin (Gesamtprotein)

```

mviskspfiv lifslllsfa llcsgvsayg rkqyerdprq qyeqcqrrce seateerege
qceqrcerey keqqrqqeee lqrqyqqcqq rcqeqqqqqr eqqqcqrkcw eqykeqerge
henyhnhkkn rseeeggqr npyyfpkrr sfqtrfrdee gnfkilorfa enspplkgin
                                qqr npyyfpk
                                                                gin>
                                                                gin>
dyrlamfean pntfilphhc daeaiyfvtn gkgtitfvth enkesynvqr gtvvsvpags
dyrla
dyrlam
tvyvvsqdnq ekltiavlal pvnspgkyel ffpagnnkpe syygafsyev letvfntqre
                                pvnspgkyel
kleeeileeqr gqkrqggggg mfrkakpeqi raisqqatasp rhrggerlai nllsqspvys
                                                                lsqspvys>
                                                                sqspvys>
nqngrffeac pedfsqfqnq dvavsafkln qgaifvphyn skatfvvfvvt dgygyaqmac
nqngrf
nqngrf
phlsrqsqgs qsgrqdrreq eeeseetfg efefqqvkap lspgdvfvap aghavtffas
                                qqvkap lspgdvfvap aghavtf
kdqplnavaf glnaqnnqri flagkknlv r qmdseakels fgvp sklvdn ifnnpdesyf
                                glnaqnnqri f
                                naqnnqri f
msfsqqrrqrg derrgnplas ildfarlf

```

Aminosäure-Sequenz von Vicilin-Untereinheit 47 kDa

```

mviskspfiv lifslllsfa llcsgvsayg rkqyerdprq qyeqcqrrce seateerege
qceqrcerey keqqrqqeee lqrqyqqcqq rcqeqqqqqr eqqqcqrkcw eqykeqerge
henyhnhkkn rseeeggqr npyyfpkrr sfqtrfrdee gnfkilorfa enspplkgin
                                qqr npyyfpk
                                                                gin>
                                                                gin>
dyrlamfean pntfilphhc daeaiyfvtn gkgtitfvth enkesynvqr gtvvsvpags
dyrla
dyrlam
tvyvvsqdnq ekltiavlal pvnspgkyel ffpagnnkpe syygafsyev letvfntqre
                                pvnspgkyel
kleeeileeqr gqkrqggggg mfrkakpeqi raisqqatasp rhrggerlai nllsqspvys
                                                                lsqspvys>
                                                                sqspvys>
nqngrffeac pedfsqfqnq dvavsafkln qgaifvphyn skatfvvfvvt dgygyaqmac
nqngrf
nqngrf
phlsrqsqgs qsgrqdrreq eeeseetfg efefqqvkap lspgdvfvap aghavtffas
                                qqvkap lspgdvfvap aghavtf
kdqplnavaf glnaqnnqri flagkknlv r qmdseakels fgvp sklvdn ifnnpdesyf
                                glnaqnnqri f
                                naqnnqri f
msfsqqrrqrg derrgnplas ildfarlf

```

Aminosäure-Sequenz von Vicilin-Untereinheit 31 kDa

```

mviskspfv lifsl11sfa llcsgvsayg rkqyerdprq qyeqcqrrce seateereqe
qceqrcerey keqqrqqeee lqrqyqqcgg rcqeqqqqqr eqqqcqrkcw eqykeqerge
henyhnhkkn rseeeegqqr npyyfpkrr sfqtrfrdee gnfkilorfa enspplkgin
                qqr npyyfpk
                                                                gin>
                                                                gin>
dyrlamfean pntfilphhc daeaiyfvtn gkgtitfvth enkesynvqr gtvvsvpags
dyrla
dyrlam
tvvvvsqdnq ekltiavlal pvnspgkyel ffpagnnkpe syygafsyev letvfntqre
                pvnspgkyel
kleeileeqr gqkrqqgggg mfrkakpeqi raisqqatp rhrggerlai nllsqspvys
                                                                lsqspvys>
                                                                sqspvys>
nqngrffeac pedfsqfqn dvavsafkln qgaifvphyn skatfvvfvv dgygyaqmac
nqngrf
nqngrf
phlsrqsqgs qsgrqdrreq eeeseetfg efefqqvkap lspgdvfvap aghavtffas
                qqvkap lspgdvfvap aghavtf
kdqplnavaf glnaqnnqri flagkknlv rmdseakels fgvpsklvnd ifnnpdesyf
                glnaqnnqri f
                naqnnqri f
msfsqqrqrg derrgnplas ildfarlf

```

Aminosäure-Sequenz von Vicilin-Untereinheit 15 kDa

```

mviskspfv lifsl11sfa llcsgvsayg rkqyerdprq qyeqcqrrce seateereqe
qceqrcerey keqqrqqeee lqrqyqqcgg rcqeqqqqqr eqqqcqrkcw eqykeqerge
henyhnhkkn rseeeegqqr npyyfpkrr sfqtrfrdee gnfkilorfa enspplkgin
                qqr npyyfpk
                                                                gin>
                                                                gin>
dyrlamfean pntfilphhc daeaiyfvtn gkgtitfvth enkesynvqr gtvvsvpags
dyrla
dyrlam
tvvvvsqdnq ekltiavlal pvnspgkyel ffpagnnkpe syygafsyev letvfntqre
                pvnspgkyel
kleeileeqr gqkrqqgggg mfrkakpeqi raisqqatp rhrggerlai nllsqspvys
                                                                lsqspvys>
                                                                sqspvys>
nqngrffeac pedfsqfqn dvavsafkln qgaifvphyn skatfvvfvv dgygyaqmac
nqngrf
nqngrf
phlsrqsqgs qsgrqdrreq eeeseetfg efefqqvkap lspgdvfvap aghavtffas
                qqvkap lspgdvfvap aghavtf
kdqplnavaf glnaqnnqri flagkknlv rmdseakels fgvpsklvnd ifnnpdesyf
                glnaqnnqri f
                naqnnqri f
msfsqqrqrg derrgnplas ildfarlf

```