

**Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences**

GC-MS Analytik sekundärer Stoffwechselprodukte unterschiedlicher Hefen aus
Fermentationen von *Theobroma cacao* L.

Masterarbeit
im Masterstudiengang Food Science

vorgelegt von
Sandra Traber

Hamburg
am 20.02.2019

Gutachterin: Prof. Dr. med. vet. Katharina Riehn (HAW Hamburg)
Gutachter: Matthieu Nourrisson (Universität Hamburg)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Katharina Riehn und Herrn Prof. Dr. Bernward Bisping für die Bereitstellung des spannenden Themas im Rahmen des „Cocoa Chain“-Projekts, die gute Betreuung sowie die wertvollen Anregungen.

Für die Einarbeitung, Betreuung und stete Hilfsbereitschaft im Labor bedanke ich mich besonders bei Khanitta Ratprakhon. Vielen Dank für deine Unterstützung! Für die herzliche Gesellschaft in den Mittagspausen möchte ich mich bei euch, Khanitta, Christina und Stephanie bedanken. Ein besonderer Dank geht auch an Matthieu Nourrisson für die technische Anleitung, die Betreuung und die vielen Ratschläge während der Erstellung meiner Arbeit! Ich danke dir für deine Mühen!

Für die Beratung und Unterstützung bei der statistischen Auswertung bedanke ich mich bei Herrn Erhard Köhn.

Mein größter Dank gilt meinem Freund Fabian, meiner Familie und meinen Freunden, die mich auf vielfältigste Weise unterstützt und gestärkt haben. Ich danke euch für eure Unterstützung, eure motivierenden Worte und euren Glauben an mich. Ohne euch stände ich nicht dort, wo ich jetzt stehe!

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	viii
Abkürzungsverzeichnis	ix
Übersetzungsverzeichnis	x
Kurzfassung/ Abstract	xii
1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Allgemeines zu <i>Theobroma cacao</i> L.	3
2.1.1 Die Kakaopflanze	3
2.1.2 Ernte und Nacherntebehandlung	4
2.1.3 Ablauf der Fermentation	6
2.2 Kakaoaroma	8
2.2.1 Entstehung und Einflussfaktoren	8
2.2.2 Bedeutung der Hefen	9
2.3 Instrumentelle Analytik	10
2.3.1 Festphasenmikroextraktion (SPME)	10
2.3.2 Gaschromatographie	11
2.3.3 Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie	12
2.3.4 Kopplung von Gaschromatographie und Olfaktometrie	13
2.4 Clusteranalyse	14
3 Material und Methoden	16
3.1 Verwendetes Probenmaterial	16
3.1.1 Aus Kakaofermentationen isolierte Hefestämme	16
3.1.2 Hefestämme zur Weinherstellung	17
3.1.3 Kakaopulpe	18
3.1.4 Rohkakao	19
3.2 Geräte und Materialien	20
3.3 Kultivierung und Fermentation der Hefen	20
3.4 Methode zur Analyse der KPSM- und Kakaopulpeproben	22
3.4.1 Probenvorbereitung	22
3.4.2 Probenvermessung	22
3.5 Methode zur Analyse des Rohkakaos	25
3.5.1 Probenvorbereitung	25
3.5.2 Probenvermessung	25
3.6 Auswertung der Messungen	27
3.6.1 Auswertung der Chromatogramme	27
3.6.2 Statistische Auswertung	28

4	Ergebnisse	29
4.1	Analyse der Sekundärstoffwechselprodukte der KPSM-Fermentationen . . .	29
4.1.1	Darstellung der identifizierten volatilen Substanzen	29
4.1.2	Veränderungen im Fermentationsverlauf	45
4.1.3	Identifizierung geruchsaktiver Substanzen mittels GC-O	65
4.1.4	Gruppierung der Hefen	70
4.2	Analyse der volatilen Komponenten der Realmatrix-Proben	74
4.2.1	Darstellung der identifizierten volatilen Substanzen	74
4.2.2	Identifizierung geruchsaktiver Substanzen mittels GC-O	76
4.3	Analyse der volatilen Komponenten des Rohkakaos	80
4.3.1	Darstellung der identifizierten volatilen Substanzen	80
4.3.2	Veränderungen im Fermentationsverlauf	82
5	Diskussion	85
5.1	Sekundärstoffwechselprodukte der KPSM-Fermentationen	85
5.1.1	Fermentationsprodukte	86
5.1.2	GC-O-Analytik	94
5.1.3	Gruppierung der Hefen	96
5.2	Volatile Komponenten der Realmatrix-Proben	98
5.3	Volatile Komponenten des Rohkakaos	100
6	Zusammenfassung	103
7	Ausblick	105
	Literaturverzeichnis	106
	Anhang	113

Abbildungsverzeichnis

1	Darstellung von Kakaofrüchten unterschiedlicher Kakaogenotypen	4
2	Prinzip der Probenahme durch HS-SPME	11
3	Schematische Darstellung des Aufbaus einer Gaschromatographie-Anlage .	12
4	Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers	13
5	Darstellung des Sniffings bei der Gaschromatographie-Olfaktometrie	14
6	Darstellung der Hauptkomponenten der 6 <i>S. cerevisiae</i> -Isolate aus Indonesien der Gruppe 2 zum Zeitpunkt t_{72}	31
7	Darstellung der Hauptkomponenten der 34 <i>S. cerevisiae</i> -Isolate aus Indonesien der Gruppe 1 zum Zeitpunkt t_{72}	32
8	Darstellung der Hauptkomponenten des <i>S. cerevisiae</i> -Isolats IDE-Y096 aus Ecuador zum Zeitpunkt t_{72}	33
9	Darstellung der Hauptkomponenten des <i>S. cerevisiae</i> -Isolats IDT-Y15 aus Trinidad und Tobago zum Zeitpunkt t_{72}	33
10	Darstellung der Hauptkomponenten des <i>S. roseus</i> -Isolats IDI-Y019 aus Indonesien zum Zeitpunkt t_{72}	34
11	Darstellung der Hauptkomponenten der <i>H. guilliermondii</i> -Isolate IDI-Y035 und IDI-Y036 aus Indonesien zum Zeitpunkt t_{72}	35
12	Darstellung der Hauptkomponenten des <i>H. guilliermondii</i> -Isolats IDT-Y11 aus Trinidad und Tobago zum Zeitpunkt t_{72}	35
13	Darstellung der Hauptkomponenten des <i>H. opuntiae</i> -Isolats IDI-Y030 aus Indonesien zum Zeitpunkt t_{72}	36
14	Darstellung der Hauptkomponenten des <i>H. thailandica</i> -Isolats IDI-Y034 aus Indonesien zum Zeitpunkt t_{72}	36
15	Darstellung der Hauptkomponenten des <i>H. uvarum</i> -Isolats IDE-Y068 aus Ecuador zum Zeitpunkt t_{72}	37
16	Darstellung der Hauptkomponenten des <i>Candida</i> sp.-Isolats IDT-Y13 aus Trinidad und Tobago zum Zeitpunkt t_{72}	37
17	Darstellung der Hauptkomponenten des <i>C. tropicalis</i> -Isolats IDI-Y031 aus Indonesien zum Zeitpunkt t_{72}	38
18	Darstellung der Hauptkomponenten der <i>T. delbrueckii</i> -Isolate IDI-Y043 und IDI-Y057 aus Indonesien zum Zeitpunkt t_{72}	39
19	Darstellung der Hauptkomponenten des <i>T. delbrueckii</i> -Isolats IDE-Y064 aus Ecuador zum Zeitpunkt t_{72}	39
20	Darstellung der Hauptkomponenten der <i>P. kudriavzevii</i> -Isolate IDI-Y051 und IDI-Y055 aus Indonesien zum Zeitpunkt t_{72}	40
21	Darstellung der Hauptkomponenten des <i>P. guilliermondii</i> -Isolats IDE-Y045 aus Ecuador zum Zeitpunkt t_{72}	41
22	Darstellung der Hauptkomponenten der sieben <i>P. anomala</i> -Isolate aus Ecuador zum Zeitpunkt t_{72}	41
23	Darstellung der Hauptkomponenten der in KPSM fermentierten <i>S. bayanus</i> -Hefen SIHA [®] 9, EC1118 und QA23 zum Zeitpunkt t_{72}	42

24	Darstellung der Hauptkomponenten der in KPSM fermentierten <i>S. cerevisiae</i> -Hefen CY3079, GHM und Zymaflore® x5 zum Zeitpunkt t ₇₂	43
25	Darstellung der Hauptkomponenten der in KPSM fermentierten <i>S. cerevisiae</i> -Hefe Portwein zum Zeitpunkt t ₇₂	43
26	Darstellung der Hauptkomponenten der in KPSM fermentierten <i>L. thermotolerans</i> -Hefe zum Zeitpunkt t ₇₂	44
27	Darstellung der Hauptkomponenten der in KPSM fermentierten <i>T. delbrueckii</i> -Hefe zum Zeitpunkt t ₇₂	44
28	Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentationen von <i>S. cerevisiae</i> Gruppe 1 in KPSM bestimmt mittels GC-MS	46
29	Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von <i>S. roseus</i> (IDI-Y019) in KPSM bestimmt mittels GC-MS	47
30	Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentationen von indonesischen <i>H. guilliermondii</i> (IDI-Y035, IDI-Y036) in KPSM bestimmt mittels GC-MS	48
31	Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von <i>H. opuntiae</i> (IDI-Y030) in KPSM bestimmt mittels GC-MS	50
32	Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von <i>H. thailandica</i> (IDI-Y034) in KPSM bestimmt mittels GC-MS	51
33	Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von <i>H. uvarum</i> (IDE-Y068) in KPSM bestimmt mittels GC-MS	52
34	Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von indonesischer <i>C. tropicalis</i> (IDI-Y031) in KPSM bestimmt mittels GC-MS	53
35	Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von <i>Candida</i> sp. aus Trinidad und Tobago (IDT-Y13) in KPSM bestimmt mittels GC-MS	54
36	Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentationen von indonesischen <i>T. delbrueckii</i> (IDI-Y043, IDI-Y057) in KPSM bestimmt mittels GC-MS	55
37	Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von ecuadorianischer <i>T. delbrueckii</i> (IDE-Y064) in KPSM bestimmt mittels GC-MS	56
38	Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentationen von <i>P. kudriavzevii</i> (IDI-Y051, IDI-Y055) in KPSM bestimmt mittels GC-MS	57
39	Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von <i>P. guilliermondii</i> (IDE-Y045) in KPSM bestimmt mittels GC-MS	58
40	Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentationen von <i>P. anomala</i> (n=7) in KPSM bestimmt mittels GC-MS	59
41	Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentationen von <i>S. bayanus</i> (SIHA® 9, EC1118, QA23) in KPSM bestimmt mittels GC-MS	60
42	Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von Zymaflore® x5 (<i>S. cerevisiae</i>) in KPSM bestimmt mittels GC-MS	61
43	Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von <i>S. cerevisiae</i> Portwein in KPSM bestimmt mittels GC-MS	62
44	Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von <i>L. thermotolerans</i> in KPSM bestimmt mittels GC-MS	63
45	Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von <i>T. delbrueckii</i> in KPSM bestimmt mittels GC-MS	64
46	Dendrogramm der hierarchisch-agglomerativen Clusteranalyse aller analysierten Hefestämme	71

47	Darstellung der Hauptkomponenten des Homogenisats von Pulpe und Samen aus vietnamesischen Kakaofrüchten (n=1)	74
48	Darstellung der Hauptkomponenten der Kakaopulpe aus Quillabamba, Peru (n=2)	75
49	Darstellung der Hauptkomponenten der Kakaopulpe aus El Cacao, Nicaragua (n=2)	76
50	Darstellung der Hauptkomponenten der Rohkakaoprobe PQ 18a aus der Spontanfermentation zum Zeitpunkt t_{72}	81
51	Darstellung der Hauptkomponenten der Rohkakaoprobe PQ 18b aus der mit Zymaflore [®] x5 inokulierten Fermentation zum Zeitpunkt t_{72}	81
52	Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Spontanfermentation PQ 18a bestimmt mittels GC-MS	82
53	Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der mit Zymaflore [®] x5 inokulierten Fermentation PQ 18b bestimmt mittels GC-MS	84

Tabellenverzeichnis

1	Auflistung der verwendeten Hefespezies aus Ecuador und die jeweiligen Institutsbezeichnungen	16
2	Auflistung der verwendeten Hefespezies aus Indonesien und die jeweiligen Institutsbezeichnungen	17
3	Auflistung der verwendeten Hefespezies aus Trinidad und Tobago und die jeweiligen Institutsbezeichnungen	17
4	Auflistung der verwendeten Hefestämme zur Weinherstellung und der jeweiligen Hersteller	18
5	Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien	20
6	Zusammensetzung des für die Fermentation der Hefestämme verwendeten KPSM	22
7	5-Punkte-Intensitätsskala zur Erfassung der Intensität eines Aromas mittels GC-O	23
8	Übersicht der verwendeten HS-SPME-GC-MS-Methode zur Vermessung der in KPSM fermentierten Hefen und der Kakaopulpeproben	24
9	Übersicht der verwendeten HS-SPME-GC-MS-Methode zur Vermessung der Rohkakaoproben	26
10	Auflistung der volatilen Komponenten von reinem KPSM in 3-fach Bestimmung (Mittelwert \pm Standardabweichung)	30
11	Auflistung der volatilen, aromaaktiven Komponenten einiger aus Kakaofermentationen isolierter Hefestämme nach 72-stündiger Fermentation von KPSM, bestimmt mittels GC-O und Angabe der Intensität in Klammern (5-Punkt-Skala)	66
12	Geruchsbeschreibungen der aromaaktiven Substanzen einiger aus Kakaofermentationen isolierter Hefestämme nach 72-stündiger Fermentation von KPSM, bestimmt mittels GC-O und Vergleich mit Literaturbeschreibungen	67
13	Klasseneinteilung aller Hefestämme durch die hierarchisch-agglomerative Clusteranalyse	72
14	Auflistung der volatilen, aromaaktiven Komponenten in einigen Kakaopulpeproben unterschiedlicher Herkunft, bestimmt mittels GC-O und Angabe der Intensität in Klammern (5-Punkt-Skala)	77
15	Geruchsbeschreibungen der aromaaktiven Substanzen in einigen Kakaopulpeproben unterschiedlicher Herkunft, bestimmt mittels GC-O und Vergleich mit Literaturbeschreibungen	78

Abkürzungsverzeichnis

AAB	Essigsäurebakterien (engl.: acetic acid bacteria)
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AHC	agglomeratives, hierarchisches Clustering
CAS	Chemical Abstracts Service
DI-Extraktion	Eintauch-Extraktion (engl.: direct immersion)
EI	electron impact
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GC-O	Gaschromatographie-Olfaktometrie
HPLC	Hochleistungsgelchromatographie (engl.: high performance liquid chromatography)
HS-SPME	Kopfraum-Festphasenmikroextraktion (engl.: headspace-solid-phase microextraction)
ID	Identifikator
KPSM	Kakaopulpe-Simulationsmedium
LAB	Milchsäurebakterien (engl.: lactic acid bacteria)
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NIST	National Institute of Standards and Technology
PDMS/DVB	Polydimethylsiloxan/Divinylbenzol
RT	Retentionszeit
S/N	Signal/Rausch-Verhältnis (engl.: signal to noise ratio)
sp.	Spezies (Einzahl)
spp.	Spezies (Mehrzahl)
Y	Hefe (engl.: yeast)
YEPD	Yeast Extract Peptone Dextrose Bouillon (dt.: Hefeextrakt Peptone Dextrose Bouillon)

Übersetzungsverzeichnis

Englisch	Deutsch	CAS-Nr.
1,1-Diethoxyethane	1,1-Diethoxyethan	105-57-7
1,3-Di-tert-butylbenzene	1,3-Di-tert-butylbenzol	1014-60-4
1-Phenylethyl acetate	1-Phenylethyacetat	93-92-5
2,2,4-Trimethylpentane	2,2,4-Trimethylpentan	540-84-1
2,3-Butanediol	2,3-Butandiol	513-85-9
2,3-Butanediol diacetate	2,3-Butandioldiacetat	1114-92-7
2,4-Dimethylheptane	2,4-Dimethylheptan	2213-23-2
2-Acetoxy-3-butanone	2-Acetoxy-3-butanon	4906-24-5
2-Heptanol acetate	2-Heptanolacetat	5921-82-4
2-Heptanone	2-Heptanon	110-43-0
2-Methylpentane	2-Methylpentan	107-83-5
2-Methylpropanoic acid	Isobuttersäure	79-31-2
2-Methylpropanoic acid ethyl ester	Isobuttersäureethylester	97-62-1
2-Methylpropyl acetate	Essigsäureisobutylester	110-19-0
2-Pentanol acetate	2-Pentanolacetat	626-38-0
2-Pentanone	2-Pentanon	107-87-9
2-Phenylethyl acetate	2-Phenylacetat	103-45-7
3-Methyl-1-butanol acetate	Essigsäureisopentylester	123-92-2
3-Methylbutanoic acid	Isopentansäure	503-74-2
3-Methylbutanoic acid ethyl ester	Isopentansäureethylester	108-64-5
4-Methylbenzaldehyde	4-Tolualdehyd	104-87-0
Acetaldehyde	Acetaldehyd	75-07-0
Acetic acid	Essigsäure	64-19-7
Acetic acid butyl ester	Essigsäure-n-butylester	123-86-4
Acetone	Aceton	67-64-1
Benzaldehyde	Benzaldehyd	100-52-7
Benzeneacetic acid ethyl ester	Phenyllessigsäureethylester	101-97-3
β -Cymene	β -Cymol	535-77-3
β -Terpinyl acetate	β -Terpinylacetat	10198-23-9
Butanoic acid	Buttersäure	107-92-6
Butanoic acid ethyl ester	Buttersäureethylester	105-54-4
Carvomenthene	4-Isopropyl-1-methylcyclohexen	5502-88-5
Citronellyl formate	Citronellylformiat	105-85-1
Decanoic acid ethyl ester	Decansäureethylester	110-38-3
Dimethyl sulfide	Dimethylsulfid	75-18-3
Dodecanoic acid ethyl ester	Laurinsäureethylester	106-33-2
Ethyl acetate	Essigsäureethylester	141-78-6

Fortsetzung nächste Seite

Übersetzungsverzeichnis

Fortsetzung vorherige Seite

Englisch	Deutsch	CAS-Nr.
Ethylbenzene	Ethylbenzol	100-41-4
Heptanoic acid ethyl ester	Heptansäureethylester	106-30-9
Hexadecanoic acid ethyl ester	Palmitinsäureethylester	628-97-7
Hexanoic acid ethyl ester	Hexansäureethylester	123-66-0
n-Decanoic acid	Decansäure	334-48-5
Nonanoic acid	Nonansäure	112-05-0
Nonanoic acid ethyl ester	Nonansäureethylester	123-29-5
Octanoic acid	Octansäure	124-07-2
Octanoic acid ethyl ester	Octansäureethylester	106-32-1
Octanoic acid, 3-methylbutyl ester	Isoamyl octanoat	2035-99-6
Oxime-, methoxy-phenyl-	Methyl-n-hydroxybenzolcarboximidoat	00-00-0
Pentadecanoic acid, 3-methylbutyl ester	Isoamyl decanoat	2306-91-4
Pentanoic acid ethyl ester	Pentansäureethylester	539-82-2
Phenylethyl Alcohol	2-Phenylethanol	60-12-8
Propanoic acid ethyl ester	Propionsäureethylester	105-37-3
p- α -Dimethylphenethylamine	p- α -Dimethylphenethylamin	64-11-9
Tetramethylpyrazine	Tetramethylpyrazin	1124-11-4
Toluene	Toluol	108-88-3
trans-Carane	trans-Caran	18968-23-5

Kurzfassung/ Abstract

Kurzfassung

Das Ziel der vorliegenden Masterarbeit war die Analyse von 69 aus Fermentationen von *Theobroma cacao* L. isolierten Hefestämmen (12 verschiedene Spezies) bezüglich der Bildung volatiler Aromakomponenten. Die Fermentationen der einzelnen Hefestämme erfolgten für 72 h in Kakaopulpe-Simulationsmedium (KPSM). Die Identifizierung und Quantifizierung der Substanzen wurde mittels HS-SPME-GC-MS gekoppelt an die Olfaktometrie durchgeführt. Insgesamt wurden 58 volatile Komponenten in den Proben der KPSM-Fermentationen identifiziert. Hauptprodukte waren Ethanol, 3-Methyl-1-butanol sowie einige Acetate- und Ethylester, wie Ethyl acetate, 3-Methyl-1-butanol acetate and Octanoic acid ethyl ester. Es konnten Unterschiede bezüglich der Zusammensetzung der volatilen Komponenten der einzelnen Hefestämme erkannt werden. Vor allem die *Saccharomyces* spp. bildeten mehr volatile Komponenten im Vergleich zu den Nicht-Saccharomyceten. Die Ergebnisse zeigten aber, dass nicht nur die Spezies, sondern auch der jeweilige Stamm einen Einfluss darauf hat. Durch die Analyse mittels Olfaktometrie konnte die Aromarelevanz einiger Substanzen für das Kakaoaroma bestätigt werden. Besonders Esterverbindungen, die niedrige Geruchsschwellenwerte aufweisen, wurden wahrgenommen und mit Attributen wie frisch, fruchtig und blumig beschrieben. Auch 3-Methyl-1-butanol wurde in allen Proben detektiert und wies süßliche, Kakao- und Schokoladennoten auf. Die agglomerative hierarchische Clusteranalyse war erfolgreich und bildete vier Gruppen. Es konnte eine Trennung von Saccharomyceten und Nicht-Saccharomyceten beobachtet werden.

Abstract

In the present master thesis a total of 69 different yeast strains (12 different species), isolated from fermentations of *Theobroma cacao* L., were analyzed concerning their ability of forming volatile aroma compounds during fermentation. The lab-scale fermentations of single strains were conducted in cocoa pulp simulation media (CPSM) for 72 h. A HS-SPME-GC-MS method with olfactometry was applied for identification and quantification of volatile compounds. In total 58 compounds have been identified in the fermentations of CPSM. Main compounds identified were Ethanol, 3-Methyl-1-butanol and several acetate and ethyl esters, like Ethyl acetate, 3-Methyl-1-butanol acetate and Octanoic acid ethyl ester. Differences concerning the composition of volatiles amongst the yeast strains could be observed. Especially the *Saccharomyces* spp. formed more volatiles compared to the non-*Saccharomyces* species. However, the results show that not only the species, but the particular yeast strain has an influence on the composition of volatiles as well. With olfactometry the relevance of several compounds for the aroma profile of cocoa could be confirmed. Especially esters, which have low odour threshold values, have been identified and impart fresh, fruity and flowery notes, having a positive influence on cocoa aroma. 3-Methyl-1-butanol has been detected in all analyzed samples and imparts sweet, cocoa and chocolate notes. Clustering of the analyzed yeast strains with agglomerative hierarchical clustering (AHC) regarding the composition of volatiles was successful and four groups could be found. A separation of *Saccharomyces* spp. and non-*Saccharomyces* species could be observed.

1 Einleitung

Rohkakao wird aus den Samen des Kakaobaumes (*Theobroma cacao* L.) gewonnen und ist der Schlüsselrohstoff für die Schokoladenherstellung. Qualitativ hochwertiger Rohkakao ist dabei besonders entscheidend für Schokolade mit ausgeprägter, sensorischer Qualität. Diese zeichnet sich durch ein ausgewogenes, harmonisches Kakaoaroma aus, ergänzt durch blumige, fruchtige, karamellige und nussige Noten. Eine gezielte Beeinflussung des Aromaprofils und der sensorischen Qualität von Rohkakao und der daraus hergestellten Endprodukte ist demnach aus industrieller Sicht wünschenswert.

Die Aromazusammensetzung von Kakao wird durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst, wie dem verwendeten Kakaogenotyp, den Klima- und Bodenbedingungen, denen der Kakaobaum ausgesetzt ist, sowie den Nacherntebehandlungen (Afoakwa et al., 2008). Vor allem die Fermentation, welche nach der Ernte und der Öffnung der Kakaofrüchte durch spontane Inokulation der Kakaosamen mit Mikroorganismen aus der Umgebung und den verwendeten Fermentationsbehältnissen erfolgt, ist essenziell für die Entwicklung des Kakaoaromas (De Vuyst und Weckx, 2016). Aufgrund dieser spontanen Besiedlung mit Mikroorganismen kann die Kakaofermentation jedoch kaum gesteuert werden und das Risiko für die Bildung von Fehlparmen oder Schimmel, der zum Verderb des Rohkakaos führen kann, ist gegeben. Zum einen entstehen durch den Fermentationsprozess wichtige Aromavorstufen, die während der Trocknung und Röstung zu, für das spätere Schokoladenaroma, entscheidenden Aromakomponenten umgesetzt werden und zum anderen werden bereits Aromakomponenten gebildet, die sich in den Kakaosamen anreichern können. Besonders die an der Fermentation beteiligten Hefen scheinen eine wichtige Rolle in der Bildung der Aromakomponenten zu spielen. Hefen sind in der Lage aromaaktive Sekundärstoffwechselprodukte, wie Esterverbindungen und höhere Alkohole, zu bilden, die mit Attributen wie süßlich, fruchtig und blumig beschrieben werden können (Ho et al., 2014; Bonvehí, 2005). Mikrobielle Starterkulturen könnten zu einer verbesserten Kontrollierbarkeit des Fermentationsprozesses beitragen und zudem die Ausbildung gewünschter Aromaprofile fördern (Meersman et al., 2016; Crafack

et al., 2014).

Für die Analyse volatiler Aromakomponenten wird häufig die Methode der Kopfraum-Festphasenmikroextraktion gekoppelt an die Gaschromatographie-Massenspektrometrie eingesetzt. Diese erlaubt eine Identifizierung und Quantifizierung von Aromastoffen und kann mit der Olfaktometrie verknüpft werden, um zusätzlich Aussagen über die Aromaaktivität treffen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher die Fähigkeiten zur Bildung aromaaktiver Sekundärstoffwechselprodukte von einer Vielzahl aus Kakaofermentationen isolierter Hefestämme analysiert werden. Zudem wird das Potential einiger Reinzuchthefen für die Weinherstellung zur Bildung volatiler Aromakomponenten untersucht. Im Zuge vorangegangener Arbeiten wurden die Fermentationen der Hefestämme im Labormaßstab in einem Kakaopulpe-Simulationsmedium durchgeführt (Frommann, 2017; Sevinc, 2018; Cordsen, 2018). Ziel der Analyse mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie ist die Bestimmung der volatilen Komponenten und die Herausarbeitung für das Aroma besonders relevanter Substanzen. Es soll geprüft werden, ob sich die Hefestämme bezüglich der Bildung dieser Stoffe unterscheiden und ob eine Gruppierung möglich ist. Diese Einteilung könnte zur Auswahl von Hefestämmen für die Zusammenstellung einer Starterkultur, im Hinblick auf die Aromarelevanz, herangezogen werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Allgemeines zu *Theobroma cacao* L.

2.1.1 Die Kakaopflanze

Der Kakaobaum *Theobroma cacao* L. wird der Familie der Malvaceae (Malvengewächse) zugeordnet und ist in den Tropen beheimatet. Das Anbaugebiet ist beschränkt zwischen 20 °C nördlicher und 20 °C südlicher Breite. Ursprünglich stammt der Kakaobaum aus Mittel- und Südamerika, aber heutzutage stellt Westafrika mit 70 % der weltweiten Kakaoproduktion den Hauptproduzent dar (Miedaner, 2018). Die Früchte dieser Gewächse haben die größte wirtschaftliche Bedeutung in der Kakao- und Schokoladenherstellung. Der Begriff „Kakao“ umfasst dabei den Kakaosamen und die durch Weiterverarbeitung hergestellten Produkte wie Kakaopulver, Kakaomasse und Kakaobutter. Die Kakaosorten von *Theobroma cacao* L. werden unter drei für die Kakaoherstellung besonders relevanten Handelsbezeichnungen zusammengefasst: Criollo, Forastero und ihre Kreuzmischung Trinitario. Forastero-Sorten werden auch als Konsumkakao bezeichnet und vor allem in Westafrika, Ghana, Nigeria und Brasilien angebaut. Mit ca. 80 % des Weltanbaus ist diese Sorte vorherrschend und zeichnet sich durch hohe Erträge und eine gute Widerstandsfähigkeit gegenüber Krankheiten aus. Das Aroma von Forastero ist aber eher schwach ausgeprägt und weist eine herbe und bittere Note auf. Criollo und Trinitario werden aufgrund ihrer besonderen, aromatischen Eigenschaften als Edelkakaosorten (engl.: fine or flavor cocoa) gehandelt. Erstere werden überwiegend in West-Venezuela, Ecuador und Indonesien angebaut, sind allerdings schwer kultivierbar und wenig widerstandsfähig gegenüber Krankheiten. Letztere vereinen die Eigenschaften beider Ausgangssorten, sind robust und besitzen das feine Aroma von Criollo (Rimbach et al., 2015). Anbauländer sind z.B. Trinidad, Venezuela, Ecuador und Kamerun (ICCO (International Cocoa Organization), 2013). Eine Ausnahme stellt beispielsweise die Sorte Nacional aus Ecuador dar, die dem Forastero-Typ zugeordnet, aber als Edelkakao gehandelt wird (ICCO (International Cocoa Organization), 2017). Bei dem in dieser Arbeit analysierten Chuncho-

2 Theoretische Grundlagen

Kakao handelt es sich um eine Edelkakaosorte, die in der Provinz La Conveccion, Cusco, Peru beheimatet ist und mit zu den ältesten Kakaosorten zählt. Ihr werden besonders hohe Qualitäten bezüglich des Aromas zugeschrieben.

Bei den Früchten des Kakaobaumes handelt es sich botanisch betrachtet um Beeren. Sie sind zwischen 15 und 30 cm lang und oval geformt. Die Färbung reicht je nach Reifegrad und Varietät von grün, gelb über rot, purpur bis braun. In Abhängigkeit vom Genotyp variieren Form, Farbe und Größe stark (vgl. Abb. 1). In der Frucht befinden sich zwischen 20 und 40 Kakaosamen, die meist lila gefärbt sind. Sie bestehen aus zwei ineinander gefalteten Keimblättern (Kotyledonen), in denen sich der Embryo befindet. Umgeben sind die Kotyledonen von der Testa. Die Samen sind in weißem Fruchtfleisch (Pulpe) eingebettet. Die Pulpe setzt sich hauptsächlich aus 82-87 % Wasser, 10-15 % Zucker, 1-3 % Citronensäure und 1-1,5 % Pektin zusammen. Proteine, Aminosäuren, Vitamine und Mineralien sind ebenfalls in Spuren enthalten (Schwan und Wheals, 2004).

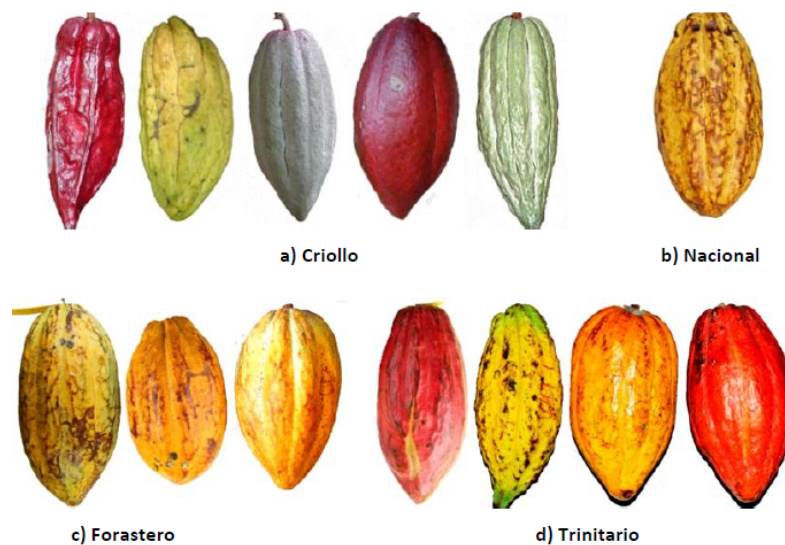


Abbildung 1: Darstellung von Kakaofrüchten unterschiedlicher Kakaogenotypen, a) Criollo, b) Nacional, c) Forastero und d) Trinitario (Fahrurrozi, 2015)

2.1.2 Ernte und Nacherntebehandlung

Die Kakaofrüchte werden in der Regel zweimal jährlich (Frühjahr und Sommer) mit Pflückmessern geerntet. Die bohnenförmigen Samen werden mechanisch (meist per Hand) von der Fruchtschale getrennt und im Anschluss einer Fermentation unterzogen. Diese dient der Entfernung der Pulpe, Verbesserung der Lagerstabilität, Verminderung der im frischen Samen enthaltenen Bitterstoffe und der Bildung von Vorstufen (Precursor) des typischen

Kakaoaromas. Die Fermentation verläuft je nach Genotyp, Klimabedingungen und Fermentationsmethode sehr unterschiedlich und führt zu einer Variation der Qualität des Rohkakaos. Zumeist werden Haufen- oder Kastenfermentationen durchgeführt. Bei ersterer werden die Samen auf Bananenblättern zu Haufen aufgeschüttet und mit diesen bedeckt. In regelmäßigen Abständen wird die Masse umgeschichtet, um die Belüftung zu verbessern und die Mikroorganismen gleichmäßig zu verteilen. Bei der Kastenfermentation werden die Samen in spezielle Holzkisten geschüttet und ebenfalls mit Bananenblättern abgedeckt. Die Boxen sind mit Löchern versehen, durch welche die sich verflüssigende Pulpe abfließen kann und die Belüftung gewährleistet ist. Die Dauer variiert zwischen zwei und sieben Tagen (Stoll, 2010). Die Besiedlung der Masse mit den an der Fermentation beteiligten Mikroorganismen erfolgt spontan und kann daher wenig gesteuert werden. Wichtige Quellen für die Kontamination sind dabei die Umgebung (Luft, Erde und Staub), Insekten wie Fruchtfliegen, Arbeitsgerätschaften, Bananenblätter und die Oberfläche der Kakaofrüchte selbst (De Vuyst und Weckx, 2016). Bei den an der Fermentation beteiligten Mikroorganismen handelt es sich vor allem um Hefen, Milchsäurebakterien (engl.: lactic acid bacteria; LAB) und Essigsäurebakterien (engl.: acetic acid bacteria; AAB). Zeitlich werden die zu Beginn in der Pulpe ablaufenden Reaktionen von den später einsetzenden Reaktionen im Kakaosamen unterschieden (Rimbach et al., 2015). Der Ablauf der Fermentation und die stattfindenden Reaktionen werden in Kapitel 2.1.3 detaillierter ausgeführt. Nach der Fermentation müssen die Samen einer Trocknung unterzogen werden, um die Restfeuchte von ca. 60 % auf ca. 6 % zu reduzieren und so eine gute Lagerstabilität zu erzielen. Zudem ist dieser Prozessschritt wichtig für die Entwicklung des Kakaoaromas, da weitere Aromavorstufen und -stoffe gebildet werden. Es stehen die klimaabhängige Sontrocknung und standardisierte, künstliche Trocknungsverfahren zur Verfügung. Bei einer zu langsamen Trocknung besteht die Gefahr des Schimmelwachstums und damit der potenziellen Bildung von Mykotoxinen, die gesundheitsschädlich und qualitätsmindernd sind. Auch darf sie nicht zu schnell erfolgen, da sonst der allmähliche Abschluss der Fermentation, durch anhaltende Enzymaktivität, unterbrochen und die Verflüchtigung von Säuren verringert wird. Die Dauer der Trocknung beträgt ca. sieben Tage (Stoll, 2010). Die beschriebenen Prozesse erfolgen in den Anbauländern. Zur Weiterverarbeitung wird der Rohkakao meist in die Verbraucherländer verschifft. Durch unterschiedliche Verfahren werden die Samen zunächst von organischen Bestandteilen und mineralischen Fremdstoffen getrennt. Anschließend folgt die Röstung für 10-45 Minuten bei Temperaturen zwischen 70 und 140 °C. Während des Prozesses löst sich die Samenschale, die dann gut abgetrennt

werden kann. Durch thermische Reaktionen, wie die Maillard-Reaktion, werden die Produkte der Fermentation zu den kakaotypischen Aroma- und Farbstoffen umgesetzt. Die gerösteten Kakaobohnen müssen im Anschluss gebrochen und gekühlt werden. Aufgrund des hohen Fettgehaltes des Kakaobruchs (40-65 %) entsteht bei der Vermahlung ein zähflüssiger Brei, die Kakaomasse. Diese dient als Rohstoff für unterschiedliche Produkte, wie z. B. Kakaopulver und Schokolade. Für ersteres wird die Kakaomasse mittels Alkalisieren und Pressen entfettet. Neben dem Kakaopulver entsteht bei diesem Prozess die Kakaobutter. Schokolade wird direkt aus der Kakaomasse durch Zugabe von Zucker und weiteren sortenspezifischen Zutaten, wie z.B. Milchpulver und Kakaobutter, hergestellt. Durch Rühren, Walzen und Conchieren wird eine zarte Masse erzeugt, die dann in Form gegossen wird und langsam abkühlen muss (Rimbach et al., 2015; Stoll, 2010).

2.1.3 Ablauf der Fermentation

Prozesse in der Kakaopulpe

Der Verlauf der Fermentation kann in drei Phasen unterteilt werden, die einander überlappen und nach den jeweils dominierenden Mikroorganismen benannt sind. In den ersten 48 Stunden der Fermentation dominieren Hefen, die dank der zuckerhaltigen und sauren Pulpe (pH=3,6) optimale Wachstumsbedingungen vorfinden (Schwan und Wheals, 2004). Aufgrund der dichten Packung der Masse verläuft diese Phase anaerob und die Hefen verstoffwechseln einen Großteil der enthaltenen Zucker zu Ethanol und Kohlenstoffdioxid. Bevorzugt wird hierbei die vorhandene Glucose umgesetzt. Diese stammt aus der Hydrolyse des Zweifachzuckers Saccharose in Glucose und Fructose durch das Enzym Invertase (pulpeeigene und/oder Hefe-Invertase). Da es sich um einen exothermen Prozess handelt, wird Energie in Form von Wärme freigesetzt, was zu einem leichten Temperaturanstieg der Masse von 25-30 °C auf 35-40 °C führt (De Vuyst und Weckx, 2016). Zudem produzieren einige Hefestämme pektinolytische Enzyme, die den Abbau der Pulpe begünstigen. Diese verflüssigt sich und fließt ab (Schwan und Wheals, 2004).

Fast zeitgleich erfolgt eine Besiedelung der Fermentationsmasse sowohl durch homofermentative wie auch heterofermentative Milchsäurebakterien. Zu Beginn handelt es sich vor allem um mikroaerophile, fructophile, säure- und ethanoltolerante Spezies. Diese werden im Verlauf der Fermentation von der strikt heterofermentativen Spezies *Lactobacillus fermentum* abgelöst. Die LAB setzen Glucose und Fructose entweder homofermentativ in Milchsäure oder heterofermentativ in Milchsäure sowie Essigsäure, Kohlenstoffdioxid und Ethanol um. Zudem

können einige Spezies die vorhandene Citronensäure in Milchsäure umwandeln, was zu einer leichten Erhöhung des pH-Wertes führt (De Vuyst und Weckx, 2016). Durch das Abfließen der Pulpe und gelegentlichem Umschichten der Fermentationsmasse, kann zunehmend Sauerstoff eindringen. Das, der leichte Anstieg des pH-Wertes und der Temperaturanstieg führen nach ca. 24 h zu einer Abnahme der Hefen und zu einer Dominanz der LAB. Durch die Abnahme der Energiequellen, die zunehmende Temperatur und Ethanolkonzentration, sinkt schließlich auch die Anzahl der LAB (De Vuyst und Weckx, 2016).

Die veränderten Bedingungen sind günstig für ein verstärktes Wachstum der Essigsäurebakterien (aerobe Phase). Nach ca. 48 Stunden dominieren diese Mikroorganismen in der Fermentationsmasse. Sie sind für die Oxidation des, von den Hefen gebildeten, Ethanols zu Essigsäure und die Zersetzung der Essigsäure in Kohlenstoffdioxid und Wasser verantwortlich. Beide Prozesse sind exotherm und führen zu einem weiteren Temperaturanstieg auf bis zu 50 °C. Zudem können die AAB die von den LAB gebildete Milchsäure zu Essigsäure und Acetoin oxidieren (De Vuyst und Weckx, 2016).

Prozesse in den Kakaosamen

Essigsäure und Ethanol, die während der Fermentation gebildet werden, können durch die Testa in die Kotyledonen eindringen. Im Zusammenspiel mit der steigenden Temperatur führt dies schließlich zu einem Absterben des Embryos. Durch die zunehmende Essigsäurekonzentration und die damit verbundene Absenkung des pH-Wertes in den Kotyledonen von ca. 6,3-7,0 auf 4,0-5,5 wird eine Auflösung der inneren Zellkompartimente (v.a. Speicherstoffe und Pigmentzellen) und eine Freisetzung von Substraten und Enzymen bewirkt. Daraufhin können viele biochemische und enzymatische Reaktionen erfolgen, die für das spätere Schokoladenaroma entscheidend sind. Es werden Reaktionen angestoßen, die zum Abbau von Saccharose durch Invertase und von Speicherproteinen durch Proteasen führen. Es werden reduzierende Zucker, freie Aminosäuren und kurzkettige Peptide gebildet, die als Vorstufen für das spätere Kakaoaroma fungieren. Zudem werden Polyphenole oxidiert und damit die Adstringenz und Bitterkeit reduziert. Die Abbauprodukte können unlösliche Komplexe bilden, die den Kakaosamen die typische, braune Farbe verleihen (De Vuyst und Weckx, 2016; Hegmann, 2015).

2.2 Kakaoaroma

Generell beschreibt der Begriff „Aroma“ (abgeleitet von dem engl. Wort: flavor) das Zusammenspiel von Geruch, Geschmack und Textur bei dem Verzehr eines Lebensmittels. Unterschieden werden Substanzen, die für den Geschmack und solche, die für den Geruch verantwortlich sind. Es gibt aber auch Stoffe, die beide Sinneseindrücke auslösen (Belitz et al., 2009). Das Kakaoaroma ist ein sehr komplexes Aroma und setzt sich aus nicht volatilen und volatilen Substanzen zusammen. Bei den ersteren handelt es sich um Methylxanthine (Theobromin und Coffein) und Polyphenole (z. B. Leukoanthocyane, Catechine) sowie organischen Säuren (z.B. Essig- und Citronensäure) (Rimbach et al., 2015).

2.2.1 Entstehung und Einflussfaktoren

Besonders die volatilen Komponenten und deren Vielfältigkeit tragen in großem Maße zum Kakaoaroma bei. Bereits während der Fermentation laufen einige wichtige biochemische Prozesse in den Samen ab, die entscheidend für das spätere Aroma sind und von Faktoren, wie dem pH-Wert, der Temperatur und Feuchtigkeit abhängen. Durch enzymatische Reaktionen werden Proteine zu Peptiden und freien Aminosäuren sowie Saccharose zu Glucose und Fructose abgebaut. Während der Röstung werden aus diesen Vorstufen durch thermische Prozesse, wie die Maillard-Reaktion, entscheidende Aromastoffe gebildet. Bei diesem Prozess reagieren die freien Aminosäuren mit reduzierenden Zuckern und bilden eine Vielzahl an aroma- und farbgebenden Produkten, wie Furanone und Pyranone. Geruchsintensive Aldehyde, wie 2-Methylbutanal und 3-Methylbutanal, entstehen während der Röstung überwiegend durch den Strecker-Abbau von freien Aminosäuren. Reaktive α -Dicarbonyle, Zwischenprodukte der Maillard-Reaktion, können mit Aminosäuren zu den Strecker-Aldehyden reagieren. Hierbei fallen zudem α -Aminoketone an. Durch Kondensation zweier α -Aminoketone werden Pyrazine gebildet, die dem Kakao vor allem röstige, erdige und schokoladige Noten verleihen. (Crafack et al., 2014; Legrum, 2011). Es konnten viele Faktoren identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Entwicklung des Aromaprofils haben. So konnte gezeigt werden, dass bereits der Kakaogenotyp einen großen Einfluss auf die Zusammensetzung der volatilen Komponenten hat. Einige wichtige Substanzen werden möglicherweise bereits während der Fruchtreifung in der Pulpe gebildet und können dann in die Samen migrieren (Kadow et al., 2013; Hegmann, 2015; Qin et al., 2017; Chetschik et al., 2018). Auch die Nacherntebehandlungen spielen eine große Rolle. So konnten Rodriguez-Campos et al. (2012) zeigen, dass

sich der Gehalt der flüchtigen Substanzen in Abhängigkeit von der Fermentationsdauer und der Trocknungstemperatur änderte. Auch die Fermentationsmethode scheint einen großen Einfluss zu haben. Die Ergebnisse von Crafacck et al. (2014) deuten darauf hin, dass durch Kastenfermentationen höhere Gehalte an volatilen Komponenten erzielt werden können, im Vergleich zu Haufenfermentationen. Zudem konnten sie beobachten, dass die Röstung zu einer Zunahme der Konzentration von Aldehyden, Alkoholen und Pyrazinen führte. Diese Substanzen können der Schokolade blumige und fruchtige, aber auch röstige, nussige, Kaka- und Schokoladennoten verleihen (Crafacck et al., 2014). Auch das Conchieren kann die Zusammensetzung der volatilen Komponenten verändern. Durch die Hitzeeinwirkung über einen längeren Zeitraum kann es zu einem Verlust an flüchtigen Substanzen kommen. Meersman et al. (2016) konnten hier einen Zusammenhang zwischen den jeweiligen Siedepunkten und dem Verbleib der Substanzen in der Schokolade beobachten.

2.2.2 Bedeutung der Hefen

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf den an der Fermentation beteiligten Hefen und deren Einfluss auf das Kakaoaroma. Die Vielfalt der an Kakaofermentationen beteiligten Hefespezies ist groß. Ozturk und Young (2017) identifizierten eine Kerngruppe an Spezies, die aus einer Vielzahl spontaner Kakaofermentationen isoliert werden konnten. Hierbei handelt es sich um: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Torulaspota delbrueckii*, *Pichia kudriavzevii* und *Pichia kluyveri*. Hefen bilden neben dem Hauptprodukt Ethanol, aromaaktive, sekundäre Stoffwechselprodukte, wie z.B. höhere Alkohole, Ester und Carbonsäuren, welche zur Ausbildung des Aromas beitragen (Schwan und Wheals, 2004). Ho et al. (2014) konnten zeigen, dass der Gehalt an Esterverbindungen und höheren Alkoholen in Rohkakao aus Fermentationen, bei denen das Hefewachstum mittels Natamycin verhindert wurde, deutlich geringer war, als nach unbehandelten Fermentationen. Bei Natamycin handelt es sich um ein Antimykotikum, das das Wachstum von Hefen und Schimmelpilzen hemmt. Den Hefen scheint daher in der Bildung dieser Substanzen eine entscheidende Rolle zuzukommen. Da diese Substanzen vor allem mit fruchtigen und süßlichen Attributen beschrieben werden, könnten sie einen positiven Einfluss auf das Kakaoaroma haben. Die Schokolade, die aus mit Hefen fermentierten Kakaobohnen hergestellt wurde, wurde in einem Präferenztest besser bewertet und wies ein vollmundigeres Schokoladenaroma auf (Ho et al., 2014). In einigen Studien, in denen die Kakaofermentationen mit unterschiedlichen Starterkulturen durchgeführt wurden, konnte beobachtet werden,

dass eine Beeinflussung des Endproduktes durch die Verwendung unterschiedlicher Hefen möglich ist. Häufig wurden die Produkte aus inokulierten Fermentationen als fruchtiger und blumiger wahrgenommen. Die Unterschiede waren zum Teil noch gering und konnten nur von trainierten Panelisten erkannt werden (Crafack et al., 2014; Meersman et al., 2016; Batista et al., 2016; Crafack et al., 2013).

2.3 Instrumentelle Analytik

2.3.1 Festphasenmikroextraktion (SPME)

Die Festphasenmikroextraktion (engl.: solid-phase microextraction; SPME) ist eine schnelle und lösungsmittelfreie Probenahmemethode. Diese Methode wird mittlerweile in zahlreichen Bereichen der Lebensmittelanalytik eingesetzt, da eine aufwändige Probenvorbereitung vor der eigentlichen Analyse entfällt. Die Analyten werden hierbei direkt auf eine, mit einer stationären Phase beschichtete, Quarz- oder Glasfaser extrahiert und können mithilfe von Gaschromatographie, Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS), Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (engl.: high performance liquid chromatography; HPLC) oder Flüssigkeitschromatografie-Massenspektrometrie (LC-MS) detektiert werden. Es werden zwei Extraktionsmodi unterschieden, die Kopfraum-Extraktion (engl.: headspace; HS) und die Eintauch-Extraktion (engl.: direct immersion; DI). Bei der DI-Extraktion wird die Faser direkt in eine flüssige Probe eingetaucht. Bei der HS-Extraktion befindet sich die Faser im Kopfraum über einer gasförmigen, flüssigen oder festen Probe (Kataoka et al., 2000). Für die Analyse der volatilen Substanzen in Kakaomatrices bietet sich die HS-Extraktion an, da die Analyten verdampft werden können und sich über der Kakaoprobe im Kopfraum anreichern. Das Prinzip dieser Methode ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Eine festgelegte Probenmenge befindet sich in einem verschlossenen Probengefäß (Vial) und wird bei einer bestimmten Temperatur für eine definierte Zeit equilibriert, der sog. Equilibrierzeit. Die volatilen und semivolatilen Substanzen gehen in die Gasphase über und es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen der Probe und dem Kopfraum ein. Die beschichtete Faser wird durch ein Septum in das Vial eingestochen und verbleibt für eine definierte Zeit, der sog. Extraktionszeit, in dieser Position. Die flüchtigen Stoffe werden, in Abhängigkeit von ihrer und der Polarität der Beschichtungsmaterialien, in dieser Zeit auf die Faser übertragen. Es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen dem Kopfraum und der Faser ein. Die Faserbeschichtung sollte nach den Eigenschaften der zu erwartenden Substanzen gewählt werden (Pawliszyn,

2012). Die Analyse der extrahierten Substanzen erfolgt dann mittels GC-MS. Hierfür wird die Faser nach der Extraktionszeit aus dem Vial herausgezogen und in den Injektionsport eines GC gefahren. Dort erfolgt durch hohe Temperaturen die Desorption der Analyten von der Faser.

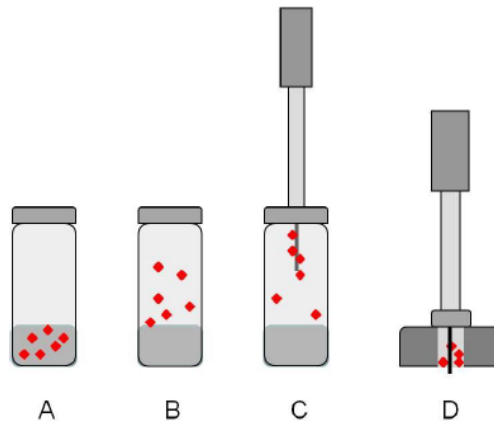


Abbildung 2: Prinzip der Probenahme durch HS-SPME (Gottzein, 2012)
A) Probe mit Analyten; B) Equilibrierung führt zu Übergang der Analyten in die Gasphase; C) Extraktion der Analyten durch die Faser; D) Desorption im Injektor des GC

2.3.2 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie ist ein Verfahren zur Trennung von flüchtigen und gasförmigen Analyten, die mit einer gasförmigen mobilen Phase, dem Trägergas, über eine mit einer stationären Phase beschichtete Säule transportiert werden. Die Analyten müssen dabei unzersetzt verdampfbar sein.

Bei der HS-SPME-GC wird die mit den Analyten beladene Faser (vgl. Kapitel 2.3.1) in den Injektionsport gefahren und die Analyten werden durch hohe Temperaturen für eine bestimmte Zeit, der sog. Desorptionszeit, von der Faser desorbiert. Die Substanzen werden vom Trägergas aufgenommen und durch die Säule transportiert. Als Trägergase werden Inertgase, wie z.B. Wasserstoff, Helium oder Stickstoff, eingesetzt, die weder mit der Säule noch mit dem Probengemisch reagieren. Die Säule ist mit einer stationären Phase beschichtet und befindet sich in einem Ofen (vgl. Abbildung 3). In Abhängigkeit von der Polarität der stationären Phase und der Analyten, wechselwirken diese unterschiedlich stark miteinander und es kommt zu einer Auftrennung des Analytengemisches. Durch ein gezieltes Temperaturprogramm des Ofens kann die Qualität der Trennung beeinflusst werden. Die Zeit, die ein Analyt benötigt, um die Säule zu durchlaufen, wird als Retentionszeit (RT) bezeichnet und ist spezifisch für die jeweilige Substanz. Die Detektion kann mithilfe unterschiedlicher Detektortypen erfolgen, wie

z.B. dem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD) oder dem Flammenionisationsdetektor (FID). Häufig wird auch die Kopplung an die Massenspektrometrie angewendet (Harris et al., 2014).

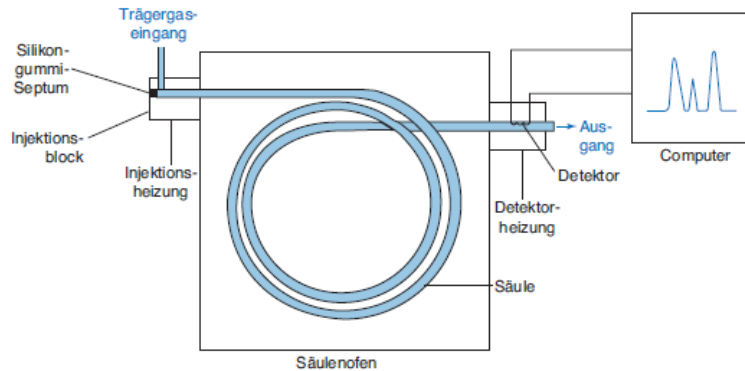


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Gaschromatographie-Anlage (Harris et al., 2014)

2.3.3 Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie

Bei der Massenspektrometrie handelt es sich um eine Methode zur Trennung und Messung von Ionen in der Gasphase. Da die Analyten am Säulenausgang noch gasförmig vorliegen, werden sie nach der Einbringung in das Massenspektrometer direkt ionisiert und bezüglich des Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) getrennt. MS-Systeme bestehen grundsätzlich aus einem Einlass-System für die Probe, einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Ionendetektor (vgl. Abbildung 4). In der Analytik werden unterschiedliche Massenanalysatoren eingesetzt, wie z. B. Quadrupole, Ionenfallen, Flugzeitanalysatoren oder Hybrid-Massenspektrometer. Die Kombination aus Gaschromatographie und Quadrupol-Massenspektrometrie wird dabei häufig angewendet (Matissek et al., 2014).

Vorteil der Massenspektrometrie ist, dass sie sowohl qualitative wie auch quantitative Informationen liefert. So können unbekannte Substanzen durch den Vergleich deren Spektren mit Referenzspektren in Datenbanken identifiziert werden. Für die quantitative Analyse werden die Peakflächen verwendet, da diese proportional zur Konzentration der Analyten sind (Harris et al., 2014).

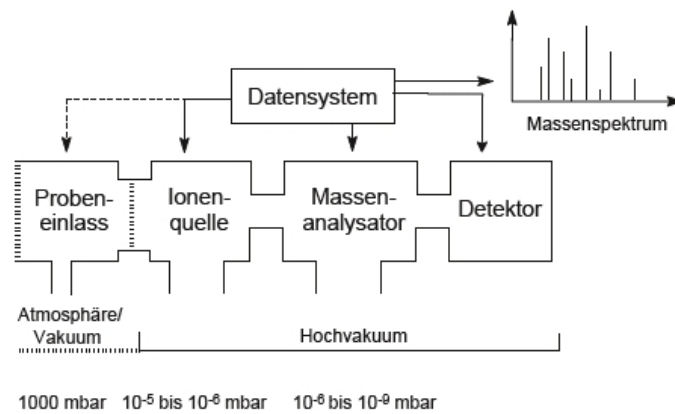


Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers (Gross, 2013)

2.3.4 Kopplung von Gaschromatographie und Olfaktometrie

In dieser Arbeit wurde die Olfaktometrie für einige Proben zu Screening-Zwecken eingesetzt. Die Kopplung der Analyse von Proben mittels GC-MS an die Analyse mittels Gaschromatographie-Olfaktometrie (GC-O) ermöglicht eine Verknüpfung von Analytik und Sensorik. Mithilfe dieser beiden Detektionsmethoden, Massenspektrometrie und Olfaktometrie, können unbekannte Analyten identifiziert und deren geruchsaktives Potenzial analysiert werden. Die GC-O erlaubt dabei, die Detektion und Beschreibung einzelner volatiler Substanzen, nach einer gaschromatographischen Trennung, durch menschliche Prüfer. Der Gasstrom wird nach Verlassen der GC-Säule geteilt und ein Teil gelangt in das MS und der andere in den sog. Sniffing-Port. Der Prüfer sitzt an dem Sniffing-Port und atmet das Eluat aus dem Gaschromatographen durch die Nase ein und durch den Mund wieder aus (vgl. Abbildung 5). Die Wahrnehmung erfolgt durch einen olfaktorischen Rezeptor. Wenn der Prüfer etwas wahrnimmt, beschreibt dieser den Geruch, die Intensität und wie lange der Eindruck anhält. Durch die gleichzeitige Detektion mittels MS, kann bestimmt werden, welche Substanzen geruchsaktiv und somit relevant für das Aroma sind (Delahunty et al., 2006).

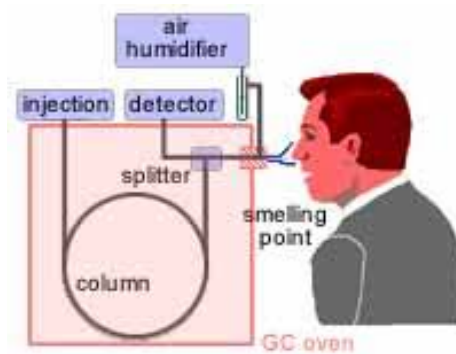


Abbildung 5: Darstellung des Sniffings bei der Gaschromatographie-Olfaktometrie (Resources.schoolscience.co.uk, o.J.)

2.4 Clusteranalyse

Bei der Clusteranalyse handelt es sich um ein exploratives, strukturentdeckendes Verfahren der multivariaten Analysemethoden. Dieses Verfahren wird dann eingesetzt, wenn zu Beginn der Analyse keine Vorstellungen zu den in einem Datensatz vorherrschenden Beziehungen vorliegen, da das Verfahren in der Lage ist, Zusammenhänge zwischen Variablen oder Objekten eines Datensatzes zu entdecken. Dem gegenüber stehen die konfirmatorischen, strukturprüfenden Verfahren, die der Überprüfung von Zusammenhängen zwischen Variablen dienen. Zu Beginn der Analyse muss der Anwender bereits eine Vorstellung über die Zusammenhänge zwischen den Variablen haben, die dann überprüft werden kann (z.B. Varianzanalyse, lineare/ nichtlineare Regression).

Ziel der Clusteranalyse ist die Bündelung von Objekten, das heißt die Objekte sollen so zu Gruppen zusammengefasst werden, dass die Objekte einer Gruppe möglichst ähnlich und die Gruppen untereinander möglichst unähnlich sind. Charakteristisch für diese Methode ist, dass zur Gruppenbildung alle Eigenschaften gleichzeitig betrachtet werden. Es gibt verschiedene Verfahren, die für die Gruppenbildung ausgewählt werden können. Diese unterscheiden sich vor allem bezüglich zweier Aspekte:

1. **Auswahl des Proximitätsmaßes**, das Maß mit dem Ähnlichkeit (Ähnlichkeitsmaß) bzw. Unähnlichkeit (Distanzmaß) zwischen Objekten gemessen wird
2. **Auswahl des Fusionierungsalgorithmus**, die Vorgehensweise nach der die Zusammenfassung von Objekten zu Gruppen erfolgen soll.

Distanzmaße messen die Unähnlichkeit zwischen zwei Objekten, was bedeutet, dass mit der Zunahme der Unähnlichkeit, auch die Distanz der zwei Objekte zunimmt. Bei metrischem

Skalenniveau der Daten bietet sich die Verwendung des Distanzmaßes „Euklidische Distanz“ an. Hierbei werden für jedes Objektpaar die Differenzwerte jeder Eigenschaft quadriert und anschließend addiert. Durch das Ziehen der Quadratwurzel der Summe ergibt sich die Euklidische Distanz. Für die Clusteranalyse kann sowohl die Euklidische Distanz wie auch die quadrierte Euklidische Distanz angewendet werden. Anhand dieser Berechnungen wird eine Distanzmatrix gebildet. Diese bildet den Ausgangspunkt für die Fusionierungsalgorithmen zur Clusterbildung (Backhaus et al., 2016).

Bei den hierarchisch-agglomerativen Verfahren zur Fusionierung, wird zu Beginn jedes Objekt als eigenes Cluster betrachtet, das im Verlauf mit anderen Objekten zu Gruppen zusammengefasst wird. Im ersten Schritt werden die beiden Objekte mit der geringsten Distanz fusioniert. Anschließend werden die Abstände zwischen den neuen Gruppen berechnet und die ähnlichsten Gruppen zu neuen Clustern zusammengefasst. Diese Schritte werden so lange wiederholt, bis alle Objekte in einem Gesamtcluster integriert sind. Das Dendrogramm ist eine Möglichkeit um die Fusionierungsschritte von hierarchisch-agglomerativen Verfahren zu visualisieren. Auf der X-Achse dieses Diagramms sind die Objekte und auf der Y-Achse die Werte des Distanzmaßes aufgetragen. Das Ward-Verfahren zur Fusionierung ist ein leistungsstarkes Verfahren und liefert vor allem dann gute Ergebnisse, wenn ein Distanzmaß als Proximitätsmaß verwendet wird. Zudem sollten die Variablen metrisches Skalenniveau aufweisen. Als Grundlage zur Fusionierung mit dem Ward-Verfahren wird das Varianzkriterium angewendet. Ziel dabei ist, die jeweiligen Cluster zu vereinen, die zur minimalsten Erhöhung der Varianz des neugebildeten Clusters führen. Abschließend muss die Clusteranzahl bestimmt werden (Cluster-Lösung). Hier entsteht häufig ein Zielkonflikt zwischen der „Homogenitätsanforderung an die Cluster-Lösung“ und der „Handhabbarkeit der Cluster-Lösung“. Statistische Kriterien und sachlogische Überlegungen können zur Bestimmung der Clusteranzahl herangezogen werden (Backhaus et al., 2016).

3 Material und Methoden

3.1 Verwendetes Probenmaterial

3.1.1 Aus Kakaofermentationen isolierte Hefestämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Hefen stammten aus der Stammsammlung der Arbeitsgruppe „Lebensmittelmikrobiologie und Biotechnologie“ von Prof. Dr. B. Bisping an der Universität Hamburg. Sie wurden ursprünglich aus spontanen Kakaofermentationen in Indonesien, Trinidad und Tobago und Ecuador isoliert (Fahrurrozi, 2015). Die Hefespezies sind nach Herkunftsland gegliedert in den folgenden Tabellen aufgeführt (vgl. Tabelle 1 bis 3). Die Institutsbezeichnung setzt sich folgendermaßen zusammen:

ID = Identifikator

I/T/E = Indonesien/ Trinidad und Tobago/ Ecuador (Herkunftsland)

Y = yeast (dt.: Hefe)

Nummer = fortlaufende, zufällige Nummer

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Hefespezies aus Ecuador und die jeweiligen Institutsbezeichnungen

Hefespezies	Institutsbezeichnung
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IDE-Y096
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	IDE-Y068
<i>Pichia guilliermondii</i>	IDE-Y045
<i>Pichia anomala</i>	IDE-Y022, IDE-Y035, IDE-Y036, IDE-Y037, IDE-Y050, IDE-Y051, IDE-Y058
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	IDE-Y064

3 Material und Methoden

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Hefespezies aus Indonesien und die jeweiligen Institutsbezeichnungen

Hefespezies	Institutsbezeichnung
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IDI-Y001-IDI-Y018; IDI-Y020-IDI-29; IDI-Y032; IDI-Y033; IDI-Y037; IDI-Y038; IDI-Y40-IDI-Y042; IDI-Y044-IDI-Y050; IDI-Y053; IDI-Y054; IDI-Y056
<i>Sporobolomyces roseus</i>	IDI-Y019
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	IDI-Y030
<i>Candida tropicalis</i>	IDI-Y031
<i>Hanseniaspora thailandica</i>	IDI-Y034
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	IDI-Y035, IDI-Y036
<i>Pichia kudriavzevii</i>	IDI-Y051, IDI-Y055
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	IDI-Y043, IDI-Y057

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Hefespezies aus Trinidad und Tobago und die jeweiligen Institutsbezeichnungen

Hefespezies	Institutsbezeichnung
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IDT-Y15
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	IDT-Y11
<i>Candida sp.</i>	IDT-Y13

3.1.2 Hefestämme zur Weinherstellung

Es wurden außerdem neun Reinzuchthefen eingesetzt, die nicht aus Kakaofermentationen isoliert wurden. Bei den hier verwendeten Hefen handelte es sich um Hefestämme, die zur industriellen Herstellung klassischer Rot- und Weißweine eingesetzt werden. Diese wurden bei verschiedenen Herstellern des industriellen Weinhandels erworben. Die verwendeten Hefen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

3 Material und Methoden

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Hefestämme zur Weinherstellung und der jeweiligen Hersteller

Hersteller	Marke	Name	Spezies
Eaton	SIHA®	Aktivhefe 9	<i>Saccharomyces bayanus</i>
Lallemand Inc.	LALVIN®	EC 1118	<i>Saccharomyces bayanus</i>
Lallemand Inc.	LALVIN®	QA 23 YSEO	<i>Saccharomyces bayanus</i>
Lallemand Inc.	LALVIN®	CY 3079 YSEO	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Lallemand Inc.	uvaferm®	GHM YSEO	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Laffort	Zymaflore®	x5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Arauner	Reinzuchthefer	Portwein	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
unbekannt	unbekannt	-	<i>Torulasporea delbrueckii</i>
unbekannt	unbekannt	-	<i>Lachancea thermotolerans</i>

3.1.3 Kakaopulpe

Außerdem wurden einige Realmatrixproben unterschiedlicher Herkunft analysiert. Die Details zu den verschiedenen Proben sind im Folgenden dargestellt. Die Probenvorbereitungen erfolgten ebenfalls in der Arbeitsgruppe „Lebensmittelmikrobiologie und Biotechnologie“ von Prof. Dr. B. Bisping (Universität Hamburg) im Rahmen der Arbeit von Cordsen (2018).

Pulpe aus Nicaragua

Die Pulpe wurde direkt nach der Öffnung der Kakaofrucht (Sorte unbekannt, vermutlich Forastero) in El Cacao, Nicaragua entnommen. Die Proben wurden bis zum Transport nach Deutschland bei +4 bis -20 °C gelagert. In Deutschland erfolgte die Lagerung der Pulpe bei -22 °C bis zur Analyse.

Pulpe aus Peru

Die Pulpe wurde direkt nach der Öffnung der Kakaofrüchte (Sorte: Chuncho) in Quillabamba, Peru, beim Abfließen gewonnen. Die Proben wurden bis zum Transport nach Deutschland bei +4 °C gelagert. In Deutschland erfolgte die Lagerung der Pulpe bei -22 °C bis zur Analyse.

Kakaofrüchte aus Vietnam

Die in dieser Arbeit analysierten Kakaofrüchte wurden in frischem Zustand aus Vietnam importiert. Diese waren bei Anlieferung weder beschädigt, noch von Schädlingen befallen. Die Früchte wurden nummeriert, steril geöffnet und die Samen ohne Beschädigung der Samenschale samt Pulpe entnommen. Die Früchte befanden sich in unterschiedlichen Reifestadien und hatten daher unterschiedlich viel Pulpe. Pulpe und Samen wurden gestomachert, zentrifugiert und der Überstand in ein Vial abgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei -22 °C bis zur Analyse.

3.1.4 Rohkakao

Des Weiteren wurden Rohkakaoproben der Sorte Chuncho aus zwei unterschiedlichen Kakaofermentationen analysiert. Beide Fermentationen wurden im Mai 2018 in Quillabamba, Peru durchgeführt. Eine der Kakaofermentationen war eine spontan ablaufende Fermentation (PQ 18a), der zweiten wurde ein Inokulum mit der Weinhefe Zymaflore[®] x5 zugesetzt (PQ 18b). Die Probenahme erfolgte im Verlauf der Fermentationen mindestens einmal täglich vor dem Umschichten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proben der Zeitpunkte t_0 , t_{24} , t_{48} und t_{72} vermessen. Anschließend wurden die Bohnen in der Sonne getrocknet, bis sie einen Restfeuchtegehalt von weniger als 8% aufwiesen. Nach der Einführung der Rohkakaoproben nach Deutschland wurden diese bei Raumtemperatur bis zur Analyse an der HAW Hamburg gelagert.

3.2 Geräte und Materialien

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien

Geräte/Materialien	Angaben
Analysenwaage	Quintix 2241s, 2013/11, d= 0,0001g; Satorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland
Autosampler	CONCEPT; PAS Technologies, Kansas City, USA
Bördelkappe	Magnetic Crimp Caps N20, silber, Loch, Lot: 150704582; Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Bördelzange	20 mm; Altmann Analytik, München, Deutschland
Detektor	5975C VL MSD mit Triple-Quadrupol Detektor; Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
Filter GC	Gas Clean Moisture Filter (CP17971)/ Gas Clean Hydrocarbon Filter (CP17972); Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
GC-Anlage	6890N Network GC System, N.06.07; Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
GC-Säule	DB-WAX 30m, 0,25mm narrowbore, 0,25 µm, 20-250 °C (260 °C); Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
Gefrierschrank (-22 °C)	Froster-Lab; Philipp Kirsch GmbH, Willstätt-Sand, Deutschland
Headspace-Vial	20mL, Klarglas, abgerundeter Boden, Lg.Hals, 75,5x22,5mm; LABSO-LUTE®, Renningen, Deutschland
Septa	Septa N19 Butyl beige, PTFE grau, 1,3mm Lot: 12028/16; Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Sniff- Port	JAS - joint analytical systems, Moers, Deutschland
SPME-Faser	PDMS/DVB, Stableflex 23 Ga, Mantel: 50/30 µm, Länge: 1 cm; Supelco, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

3.3 Kultivierung und Fermentation der Hefen

Die Fermentationen von sog. Kakaopulpe-Simulationsmedium (KPSM) durch aus Kakaofermentationen isolierte Hefestämme und Reinzuchthefen zur Weinherstellung wurden im Zuge vorangegangener Arbeiten zum Primär- und Sekundärstoffwechsel der Hefen von Frommann (2017), Sevinc (2018) und Cordsen (2018) durchgeführt. Das Vorgehen soll der

3 Material und Methoden

Vollständigkeit halber an dieser Stelle kurz erläutert werden.

Zur Herstellung des Inokulums wurde zunächst steriler Schrägagar mit Zellmaterial beimpft und für 24 h bei 30 °C bebrütet. Anschließend wurde Zellmaterial aus den Schrägagarröhrchen entnommen, in 10 mL YEPD-Bouillon (Yeast Extract Peptone Dextrose Bouillon) gelöst und für 24 h bei 30 °C inkubiert. Danach wurde die Bouillon in 15 mL Röhrchen überführt und für 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der Rückstand mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung resuspendiert und die Lösung in ein steriles Eppendorf-Cap überführt. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit jeweils 1 mL steriler NaCl-Lösung. Hierfür wurde für je 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand mit 1 mL NaCl-Lösung resuspendiert. Der Zelltiter der gewaschenen Zelllösung wurde auf $1,0 \times 10^6$ Zellen pro mL eingestellt.

Von dem zuvor hergestellten KPSM wurden je 200 mL in 500 mL Kulturkolben mit Schikanen abgefüllt und bei 121 °C und 1,1 bar für 20 min autoklaviert. Die Lagerung bis zum Versuchsbeginn erfolgte bei 4 °C. Anschließend wurde das sterile KPSM mit dem Inokulum der Hefekulturen beimpft und für 72h bei 30 °C inkubiert. Nach Homogenisierung durch Umschwenken der Kulturkolben erfolgte jeweils eine Probenahme zu den Zeitpunkten t_0 , t_{24} , t_{48} und t_{72} . Anschließend wurde eine Kontaminationskontrolle am Mikroskop durchgeführt und das Vorhandensein von fremden Zellen wie Stäbchen oder Kokken überprüft. Kontaminierte Proben wurden verworfen und der Versuchsansatz wiederholt. Nicht kontaminierte Proben wurden steril filtriert. Im Anschluss wurden für die Sekundärstoffwechsel-Analytik ca. 5 g Probe in ein 20 mL Headspace-Vial abgewogen und das Vial mit einer Bördelkappe und einem Septum gasdicht verschlossen. Zum Verschließen wurde eine Bördelzange verwendet. Die Proben wurden bis zur GC-Analyse bei -22 °C gelagert.

Das für die Fermentationen verwendete Kakaopulpe-Simulationsmedium wurde von Pettipher (1986) entwickelt und von Lefeber et al. (2010) als Grundlage genutzt und in weiteren Versuchen optimiert, um die chemische Zusammensetzung der realen Pulpe so genau wie möglich nachzuempfinden und auch die Veränderungen, die im Laufe der Fermentation erfolgen, darzustellen. Ihr Ziel war vor allem die Analyse des Wachstums der beteiligten Bakterien (Milchsäurebakterien und Essigsäurebakterien), die die Fermentationsmasse zu unterschiedlichen Zeiten besiedeln und unterschiedliche Bedingungen favorisieren. Es wurde daher zwischen dem KPSM-LAB, das das Wachstum von LAB fördert, und dem KPSM-AAB, welches das Wachstum von AAB fördert, unterschieden. Ersteres spiegelt die

3 Material und Methoden

Zusammensetzung der Pulpe zu Beginn der Fermentation wider und letzteres die der Pulpe nach zwei Tagen Fermentation (Lefeber et al., 2010). Da die Hefen mit zu den Erstbesiedlern der Fermentationsmasse zählen, wurde das KPSM-LAB für die Fermentationen der Hefen in den vorausgehenden Arbeiten verwendet. Die Zusammensetzung des KPSM ist in Tabelle 6 aufgeführt. Der pH-Wert wurde mit einer 10 M NaOH-Lösung auf 3,5 eingestellt.

Tabelle 6: Zusammensetzung des für die Fermentation der Hefestämme verwendeten KPSM nach Lefeber et al. (2010)

Substanz	Menge [g/L]
Fructose	2
Glucose	25
Citronensäure	10
Hefeextrakt	5
Soja Pepton	5
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,5
Mangansulfat-Monohydrat	0,2
Tween 80 (Polysorbat 80)	1 mL/L

3.4 Methode zur Analyse der KPSM- und Kakaopulpeproben

3.4.1 Probenvorbereitung

Am Tag der Analyse wurden die Proben simultan aus der Tiefkühlagerung entnommen und bei Raumtemperatur langsam aufgetaut. Pro Analysetag konnten durchschnittlich sechs Proben vermessen werden.

3.4.2 Probenvermessung

Die Vermessung der Proben erfolgte mit einer GC-MS-Anlage der HAW Hamburg, die mit einer Agilent DB-WAX Kapillarsäule ausgestattet war. Die Konditionierung der PDMS/DVB-Fasern vor der ersten Verwendung wurde gemäß Herstellerangabe im Injektor bei 250 °C für 30 min durchgeführt. Zu Beginn einer Sequenz erfolgte die Durchführung eines Blank-Laufes (ohne Injektion), um die Säule zu reinigen und eines Leerlaufes (Injektion von temperierter Raumluft), um mögliche Rückstände von der SPME-Faser zu entfernen. Nach jeder dritten Probe wurde erneut ein Leerlauf durchgeführt.

3 Material und Methoden

Die Methode zur Vermessung der KPSM- und Kakaopulpeproben wurde in Anlehnung an die Methode von Hegmann (2015) an die örtlichen Gegebenheiten angepasst. In Tabelle 8 sind die Parameter der beschriebenen Methode zusammengefasst. Vor der Probenahme wurde das Probenmaterial für je 20 min bei 35 °C im Heizblock equilibriert, um die volatilen Komponenten im Kopfraum über der Probe anzureichern. Anschließend wurden die Analyten für je 20 min bei 35 °C auf die PDMS/DVB-Faser extrahiert. Die Desorption erfolgte automatisch im Injektor bei 270 °C für 5 min. Die Anfangstemperatur des Ofens lag bei 40 °C und wurde für 3 min gehalten. Es folgte eine Erhöhung von 2,5 °C/min auf 56 °C, was für 4 min gehalten wurde. Anschließend wurde mit 3 °C/min auf 80 °C geheizt und mit 15 °C/min auf 120 °C. Im weiteren Verlauf folgte eine Erhöhung um 40 °C/min auf 200 °C und um 10 °C/min bis die Endtemperatur von 240 °C erreicht war. Die Dauer des Temperaturprogramms lag bei 30 Minuten. Die Gesamtzeit eines Laufes, inklusive Equilibrierung und Extraktion, betrug 70 min. Die aufgetrennten Substanzen wurden im gekoppelten Massenspektrometer erfasst. Die Detektion erfolgte im electron impact mode (EI) mit 70 eV Ionisationsenergie und vollem Scanbereich (35-350 m/z).

Einige der analysierten Proben wurden zusätzlich mittels Olfaktometrie erfasst. Hierfür wurde ein Teil des von der Trennsäule austretenden Eluats zum Sniff-Port geleitet. Das Verhältnis von Sniff-Port zu Massenspektrometer lag bei 2:1, d.h. zwei Teile des Eluats wurden in den Sniff-Port geleitet und ein Teil in das MS. Zu dem Eluat für den Sniff-Port wurde zudem mit Wasser befeuchtetes Stickstoffgas geleitet, um die Nase des Panelisten vor Austrocknung zu schützen. Ein Probenlauf wurde mit zwei geschulten Panelisten durchgeführt und die Sniff-Zeit pro Panelist lag bei ca. 14 Minuten. Es erfolgte eine Erfassung der Zeit, zu der ein Aroma wahrgenommen werden konnte, zusätzlich zu der Intensität mithilfe einer 5-Punkte-Intensitätsskala (vgl. Tabelle 7) sowie der Beschreibung des wahrgenommenen Geruchs.

Tabelle 7: 5-Punkte-Intensitätsskala zur Erfassung der Intensität eines Aromas mittels GC-O nach Szymanski et al. (2013)

Skalapunkt	1	2	3	4	5
Intensität	schwach	etwas	mittel	ziemlich	sehr
Wahrnehmung	schwer		klar		eindeutig

3 Material und Methoden

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten HS-SPME-GC-MS-Methode zur Vermessung der in KPSM fermentierten Hefen und der Kakaopulpeproben

Element	Einstellung	Parameter
HS-SPME	Faser	PDMS/DVB
	Equilibrierung	20 min bei 35 °C
	Extraktion	20 min bei 35 °C
	Probenmenge	5 g
	Desorption	5 min bei 270 °C
Gaschromatograph	Injektor	Modus: splitless Temperatur: 270 °C Druck: 1,121 bar
	Front Inlet	Druck: 1,122 bar
	Trennsäule	DB-Wax 30 m, 0,25 µm
	Trärgas	Wasserstoff, 3,4 mL/min (konst. Flussrate)
	Ofen	Temperaturprogramm: 40 °C für 3 min, 2,5 °C/min 56 °C für 4 min, 3 °C/min 80 °C, 15 °C/min 120 °C, 40 °C/min 200 °C, 10 °C/min 240 °C
	Olfaktometrie	Verhältnis Sniff-Port/MS: 2:1, befeuchtet mit Stickstoffgas
	Massenspektrometer	EI-Modus
MS Source		230 °C
MS Quad		150 °C
Scanbereich		35-350 m/z

3.5 Methode zur Analyse des Rohkakaos

3.5.1 Probenvorbereitung

Am Tag der Analyse wurden die getrockneten Kakaobohnen grob in einem Mörser zerstoßen, anschließend ca. 2 g in ein 20 mL Headspace-Vial eingewogen und das Vial mit einer Bördelkappe und einem Septum mittels Bördelzange gasdicht verschlossen.

3.5.2 Probenvermessung

Zur Vermessung der Proben wurde die von Sobotta (2017) entwickelte Methode für Rohkakaos verwendet. Vor der Probenahme wurde das Probenmaterial für je 26 min bei 60 °C im Heizblock equilibriert. Anschließend wurden die Analyten für je 10 min bei 60 °C auf die PDMS/DVB-Faser extrahiert. Die Desorption erfolgte automatisch im Injektor bei 270 °C für 5 min. Die Anfangstemperatur des Ofens lag bei 40 °C und wurde für 3 min gehalten. Es folgte eine Erhöhung von 3 °C/min auf 56 °C, was für 2 min gehalten wurde. Anschließend wurde mit 15 °C/min auf 80 °C geheizt und mit 6 °C/min auf 120 °C. Im weiteren Verlauf folgte eine Erhöhung um 10 °C/min auf 200 °C und um 30 °C/min bis die Endtemperatur von 250 °C erreicht war. Die Dauer des Temperaturprogramms lag bei 28 Minuten. Die Gesamtzeit eines Laufes, inklusive Equilibrierung und Extraktion, betrug 64 min. Die aufgetrennten Substanzen wurden im gekoppelten Massenspektrometer erfasst. Die Detektion erfolgte im EI-Modus mit 70 eV Ionisationsenergie und vollem Scanbereich (35-350 m/z). In Tabelle 9 sind die Parameter der beschriebenen Methode zusammengefasst.

3 Material und Methoden

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten HS-SPME-GC-MS-Methode zur Vermessung der Rohkakaoproben

Element	Einstellung	Parameter
HS-SPME	Faser	PDMS/DVB
	Equilibrierung	26 min bei 60 °C
	Extraktion	10 min bei 60 °C
	Probenmenge	2 g
	Desorption	5 min bei 270 °C
Gaschromatograph	Injektor	Modus: splitless Temperatur: 270 °C Druck: 1,121 bar
	Front Inlet	Druck: 1,122 bar
	Trennsäule	DB-Wax 30 m, 0,25 µm
	Trägergas	Wasserstoff, 3,4 mL/min (konst. Flussrate)
	Ofen	Temperaturprogramm: 40 °C für 3 min, 3 °C/min 56 °C für 2 min, 15 °C/min 80 °C, 6 °C/min 120 °C, 10 °C/min 200 °C, 30 °C/min 250 °C
	Massenspektrometer	EI-Modus 70 eV MS Source 230 °C MS Quad 150 °C Scanbereich 35-350 m/z

3.6 Auswertung der Messungen

3.6.1 Auswertung der Chromatogramme

Die Auswertung der Chromatogramme wurde mit der Software GCMS Data Analysis, die in der HP ChemStation Software (Version A.03.00) integriert ist, und der Software OpenChrom® (Enterprise Edition 1.4.0) durchgeführt. Mit diesen Programmen können Peaks detektiert, identifiziert und quantifiziert werden. Für die Detektion der Peaks wurde ein Signal/Rausch-Verhältnis (engl.: signal to noise ratio; S/N) von mindestens 15 festgelegt. Die Identifizierung der Substanzen erfolgte durch den Abgleich der Massenspektren der detektierten Komponenten mit den Referenzspektren der NIST-Datenbank (National Institute of Standards and Technology). Zur Orientierung bei der Annahme, ob es sich um die angegebenen Substanzen handelte, wurden der Match Faktor und die Wahrscheinlichkeit herangezogen, die jeweils von der NIST-Datenbank berechnet wurden. Zusätzlich wurden die Peakflächen der einzelnen Substanzen bestimmt. Die Einzelpeakfläche ist dabei proportional zu der Konzentration der jeweiligen Substanz in der Probe. Aus diesen Größen wurde anschließend die Peakfläche pro Gramm Probenmatrix der einzelnen Stoffe einer Probe nach Gleichung 3.1 berechnet. Dies ermöglichte die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Proben bezüglich der Konzentrationen der gebildeten volatilen Komponenten untereinander.

$$\text{Peakfläche/g Probenmatrix} = \frac{\text{Peakfläche}_x}{\text{Einwaage}} \quad (3.1)$$

mit

Peakfläche_x = Peakfläche einer Substanz x

Einwaage = Einwaage einer Probe in [g]

Zum Teil wurden mehrere unterschiedliche Hefestämme derselben Spezies analysiert. Wenn sich die Ergebnisse ähnelten und die Hefen ähnliche volatile Komponenten bildeten, wurden die Ergebnisse zusammengefasst und mit den jeweiligen EXCEL-Funktionen die Mittelwerte (MITTELWERT) sowie die Standardabweichungen (STABW.S) berechnet. Der Mittelwertberechnung lag die Gleichung 3.2 zugrunde und die Standardabweichung wurde nach Gleichung 3.3 berechnet.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (3.2)$$

mit

\bar{x} = arithmetischer Mittelwert

n = Anzahl der Proben

x_i = Peakfläche/g Probenmatrix der Substanz i

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (3.3)$$

mit

s = Standardabweichung

n = Anzahl der Proben

x_i = Peakfläche/g Probenmatrix der Substanz i

\bar{x} = arithmetischer Mittelwert

3.6.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm XLSTAT (Version 2018.5) vorgenommen. Als Berechnungsgrundlage wurde eine Datenmatrix erzeugt, in der die einzelnen Objekte in den Zeilen und die einzelnen Variablen in den Spalten aufgeführt waren. Als Variablen wurden die volatilen Substanzen und deren Konzentrationen (als Peakfläche/g KPSM) zum Zeitpunkt t_{72} eingesetzt. Für Substanzen, die bei den jeweiligen Hefen nicht nachgewiesen werden konnten, wurde eine Peakfläche von Null angenommen. Die Variablen wiesen ein metrisches Skalenniveau auf. Es wurde ein agglomeratives, hierarchisches Clustering (AHC) durchgeführt. Als Maß der Unähnlichkeit (Distanzmaß) wurde die euklidische Distanz und als Fusionierungsmethode das Ward-Verfahren angewendet. Die mögliche Anzahl an Clustern wurde zwischen 2 und 10 Klassen beschränkt. Die Clusteranzahl wurde durch das Programm festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der Sekundärstoffwechselprodukte der KPSM-Fermentationen

4.1.1 Darstellung der identifizierten volatilen Substanzen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die sekundären Stoffwechselprodukte unterschiedlicher Hefen aus Fermentationen von *Theobroma cacao* L. und von Reinzuchthefen aus der Weinherstellung analysiert. Die einzelnen Hefeisolate wurden hierfür im Labormaßstab submers in Kakaopulpe-Simulationsmedium fermentiert und im Laufe der Fermentation zu den Zeitpunkten t_0 , t_{24} , t_{48} und t_{72} beprobt. Im Folgenden sind die analysierten Produkte zum Endzeitpunkt der Fermentationen aufgeführt, d.h. die Stoffe, die in den t_{72} -Proben mittels NIST-Datenbank identifiziert werden konnten. Insgesamt handelte es sich um 58 volatile Komponenten der folgenden Stoffgruppen: Acetale, Aldehyde, Alkane, Alkohole, Amine, Aromate, Carbonsäureester, Carbonsäuren und Ketone. In Anhang 6 ist eine Auflistung dieser Substanzen zu finden. Da in der Literatur häufig unterschiedliche Namen für einen Stoff verwendet werden, sind zusätzlich die CAS-Nummern sowie gebräuchliche Synonyme aufgeführt. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit der Literatur zu erleichtern, wurden in der vorliegenden Arbeit die englischen Substanznamen übernommen. Ein Übersetzungsverzeichnis ist der Arbeit angehängt. Die Substanzen Octamethylcyclotetrasiloxane, Hexamethylcyclotrisiloxane und Dimethylsilanediol stammen von der GC-Kapillarsäule und sind ein Zeichen für Säulenbluten. Dies ist in geringem Ausmaß eine natürliche Begleiterscheinung der thermischen Belastung, der die Säule bei erhöhten Temperaturen ausgesetzt ist und resultiert in einem Abbau des stationären Phasenmaterials (Harris et al., 2014). Diese Substanzen werden daher nicht in die weiteren Auswertungen einbezogen. Weitere Stoffe die durch HS-SPME-GC-MS detektiert wurden, sich bei der Auswertung aber nicht eindeutig identifizieren ließen, konnten ebenfalls nicht in der Auswertung berücksichtigt werden.

Im Folgenden werden die von den jeweiligen Hefespezies gebildeten Aromastoffe dargestellt.

4 Ergebnisse

Falls mehrere unterschiedliche Hefestämme derselben Spezies analysiert wurden, sind die Mittelwerte plus Standardabweichungen angegeben, sofern die Hefen einen ähnlichen Sekundärstoffwechsel aufwiesen. In den Abbildungen 6 bis 27 werden die Hauptkomponenten, deren Peakfläche/g KPSM $> 1,5 \times 10^5$ ist, grafisch abgebildet. Sensorisch relevante Minor-komponenten (Peakfläche $< 1,5 \times 10^5$) sind im Folgenden nicht dargestellt, werden aber in Kapitel 5 diskutiert.

Kakaopulpe-Simulationsmedium

Zu Beginn wurden einige reine, unfermentierte KPSM-Proben vermessen, um die Zusammensetzung der volatilen Komponenten dieses Mediums zu bestimmen und herauszufinden, welche Substanzen möglicherweise bereits vor Zugabe der Hefen vorlagen. In Tabelle 10 sind die Substanzen und die Konzentrationsmittelwerte plus Standardabweichungen dargestellt. Mit größtem Anteil lag Acetone vor, gefolgt von 3-Methylbutanal, Furfural und Benzaldehyde. Weitere Substanzen die in geringeren Mengen vorliegen waren: 2,2,4-Trimethylpentane, 2-Methylpentane, 2-Methylpropanoic acid und Acetic acid.

Tabelle 10: Auflistung der volatilen Komponenten von reinem KPSM in 3-fach Bestimmung (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Substanz	Menge [Peakfläche/g KPSM]
p- α -Dimethylphenethylamine	$5,19 \times 10^4 \pm 5,43 \times 10^3$
2-Methylpentane	$1,40 \times 10^5 \pm 3,72 \times 10^4$
2,2,4-Trimethylpentane	$2,97 \times 10^5 \pm 8,53 \times 10^4$
Acetone	$1,03 \times 10^7 \pm 9,86 \times 10^5$
3-Methylbutanal	$2,19 \times 10^6 \pm 5,19 \times 10^5$
Toluene	$6,66 \times 10^4 \pm 4,01 \times 10^3$
Hexanal	$7,08 \times 10^4 \pm 6,88 \times 10^3$
Heptanal	$6,54 \times 10^4 \pm 3,38 \times 10^3$
Acetic acid	$1,02 \times 10^5 \pm 1,78 \times 10^4$
Furfural	$4,51 \times 10^5 \pm 3,32 \times 10^4$
Benzaldehyde	$3,83 \times 10^5 \pm 4,26 \times 10^4$
2-Methylpropanoic acid	$1,26 \times 10^5 \pm 7,78 \times 10^3$
Butanoic acid	$8,32 \times 10^4 \pm 1,49 \times 10^4$
2-Furanmethanol	$2,34 \times 10^4 \pm 5,65 \times 10^3$
Nonanoic acid	$3,03 \times 10^4 \pm 4,06 \times 10^3$
5-Hydroxymethylfurfural	$8,14 \times 10^4 \pm 8,00 \times 10^3$

Aus Kakaofermentationen isolierte Hefestämme

Saccharomyces cerevisiae

Insgesamt wurden 47 Isolate von *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. 45 der Hefen stammten aus Kakaofermentationen in Indonesien, eine aus Trinidad und Tobago und eine weitere aus Ecuador. Die Ergebnisse werden zum einen nach Herkunftsland gegliedert und zum anderen erfolgt eine Unterteilung der Isolate aus Indonesien aufgrund der Gruppengröße und der sich daraus ergebenden Unterschiede.

Einige der indonesischen Stämme bildeten insgesamt weniger Substanzen und Ethanol sowie Ethyl acetate in geringeren Konzentrationen. Die Ergebnisse dieser Stämme wurden daher separat zusammengefasst (Gruppe 2, vgl. Abbildung 6). Folgende Isolate wurden dieser Gruppe zugeordnet: IDI-Y006, IDI-Y007, IDI-Y017, IDI-Y041, IDI-Y053 und IDI-Y056. Den größten Anteil der volatilen Komponenten machten Octanoic acid ethyl ester und 3-Methyl-1-butanol aus, gefolgt von Decanoic acid ethyl ester und Phenylethyl Alcohol. Zudem wurden einige wichtige Ester wie z.B. Hexanoic acid ethyl ester, 3-Methyl-1-butanol acetate und Dodecanoic acid ethyl ester gebildet.

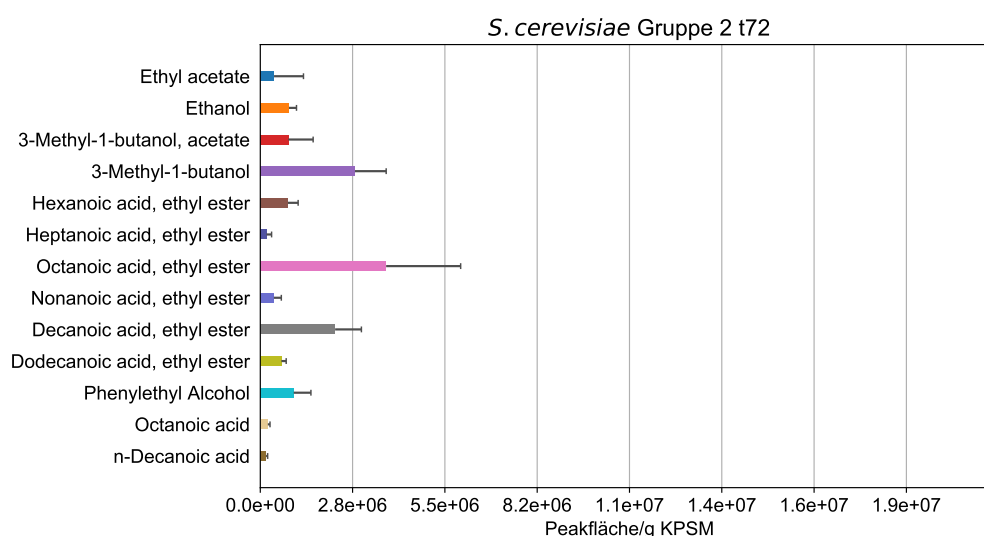


Abbildung 6: Darstellung der Hauptkomponenten der 6 *S. cerevisiae*-Isolate aus Indonesien der Gruppe 2 zum Zeitpunkt t_{72}

Die restlichen 39 Stämme sind in Gruppe 1 zusammengefasst (vgl. Abbildung 7). Diese bildeten insgesamt mehr Substanzen und Ethanol sowie Ethyl acetate in größeren Mengen. Den größten Anteil machten Ethanol und 3-Methyl-1-butanol aus, gefolgt von Octanoic acid ethyl ester, Decanoic acid ethyl ester und Ethyl acetate. Auch Phenylethyl Alcohol, 3-Methyl-1-butanol acetate und Dodecanoic acid ethyl ester wurden in größeren Mengen nachgewiesen.

4 Ergebnisse

Die Rolle der Substanzen wie z.B. Butanoic acid, ethyl ester und 2-Methyl-1-propanol, die von den Isolaten der Gruppe 2 nicht oder nur in geringen Mengen gebildet wurden, ist in Kapitel 5 erläutert.

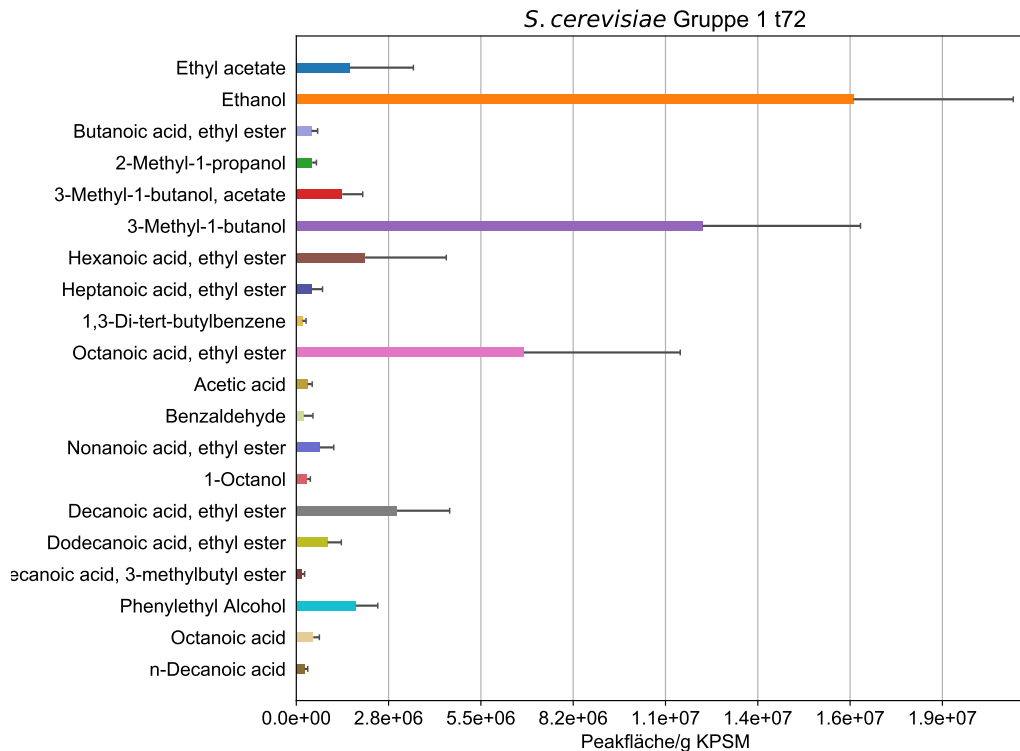


Abbildung 7: Darstellung der Hauptkomponenten der 34 *S. cerevisiae*-Isolate aus Indonesien der Gruppe 1 zum Zeitpunkt t_{72}

In Abbildung 8 sind die Hauptkomponenten der ecuadorianischen Hefe (IDE-Y096) dargestellt. Diese bildete viele Substanzen, darunter viele Ester, in hohen Konzentrationen. Den größten Anteil machte 3-Methyl-1-butanol aus, gefolgt von Ethanol und den beiden Estern Octanoic acid ethyl ester und Decanoic acid ethyl ester. Weitere für das Aroma wichtige Komponenten sind Phenylethyl Alcohol, Hexanoic acid ethyl ester, Ethyl acetate und 3-Methyl-1-butanol acetate, die ebenfalls in größeren Mengen gebildet wurden. Das Profil der gebildeten Stoffwechselprodukte glich dem der indonesischen *S. cerevisiae*-Stämme aus Gruppe 1.

Im Vergleich dazu sind in Abbildung 9 die Hauptkomponenten des Hefeisolats aus Trinidad und Tobago (IDT-Y15) dargestellt. Es kann beobachtet werden, dass dieses weniger Substanzen gebildet hat und auch die Gehalte der Stoffe geringer waren. Den größten Anteil machte Octanoic acid ethyl ester aus, gefolgt von Decanoic acid ethyl ester und 3-Methyl-1-butanol. Ethyl acetate konnte nur in geringen Mengen mit einer Peakfläche von $5,3 \times 10^4$ /g KPSM nachgewiesen werden. Das Profil der gebildeten Stoffwechselprodukte glich dem der

4 Ergebnisse

indonesischen *S. cerevisiae*-Stämme aus Gruppe 2.

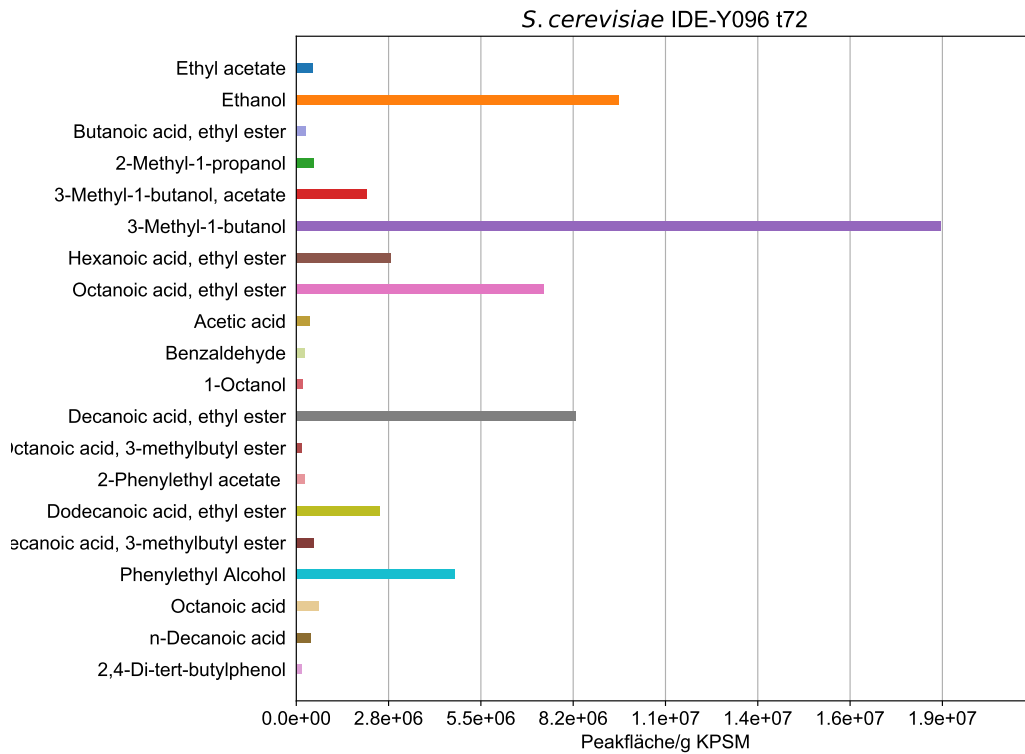


Abbildung 8: Darstellung der Hauptkomponenten des *S. cerevisiae*-Isolats IDE-Y096 aus Ecuador zum Zeitpunkt t_{72}

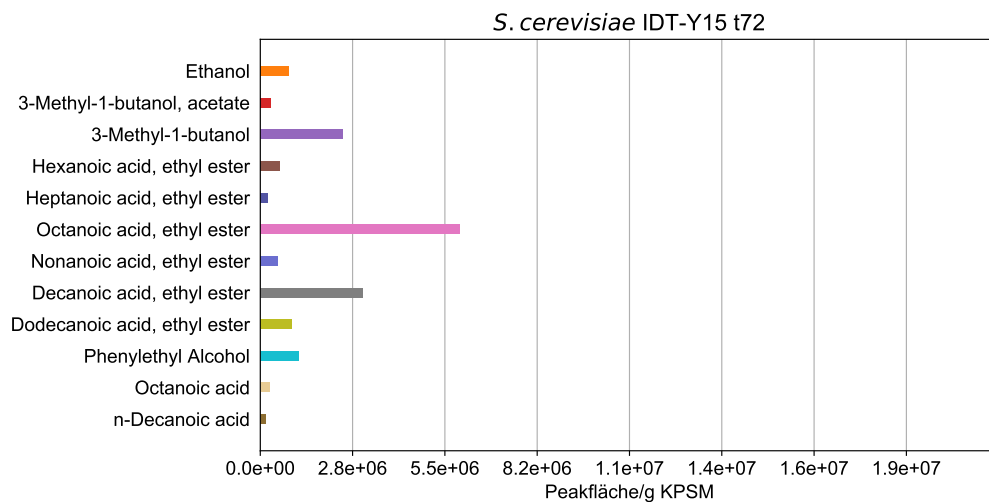


Abbildung 9: Darstellung der Hauptkomponenten des *S. cerevisiae*-Isolats IDT-Y15 aus Trinidad und Tobago zum Zeitpunkt t_{72}

Sporobolomyces roseus

Es wurde ein Hefeisolat der Art *Sporobolomyces roseus* (IDI-Y019) analysiert. Dieses wurde aus einer Kakaofermentation in Indonesien isoliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10

4 Ergebnisse

dargestellt. Diese Hefe bildete am meisten 3-Methyl-1-butanol und Octanoic acid ethyl ester. Zudem konnten weitere wichtige Esterverbindungen nachgewiesen werden, wie Decanoic acid ethyl ester, Ethyl acetate, Hexanoic acid ethyl ester, Butanoic acid, Ethyl acetate und 3-Methyl-1-butanol acetate. Die sekundären Stoffwechselprodukte dieser Spezies ähnelten in Vielzahl und Konzentration denen der indonesischen *S. cerevisiae*-Hefen.

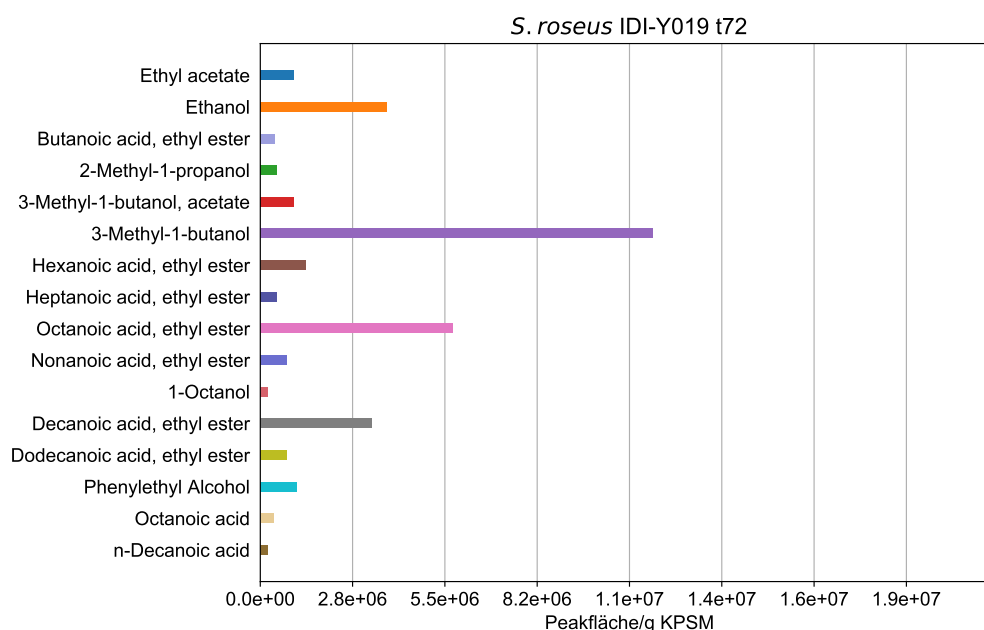


Abbildung 10: Darstellung der Hauptkomponenten des *S. roseus*-Isolats IDI-Y019 aus Indonesien zum Zeitpunkt t_{72}

Hanseniaspora guilliermondii

Von der Hefeart *Hanseniaspora guilliermondii* wurden drei Isolate analysiert. Zwei der Isolate stammten aus Fermentationen in Indonesien, eines aus einer Fermentation von Trinidad und Tobago. Da die Hefen unterschiedliche Substanzen in unterschiedlichen Mengen produzierten, wurden die Ergebnisse nach Herkunftsland getrennt betrachtet.

In Abbildung 11 sind die Hauptkomponenten der beiden indonesischen Isolate (IDI-Y035 und IDI-Y036) dargestellt. Beide Isolate bildeten vor allem Ethyl acetate, Ethanol, 3-Methyl-1-butanol und 3-Methyl-1-butanol acetate. Auffällig ist, dass im Vergleich zu den vorigen Isolaten Esterverbindungen, wie z.B. Octanoic acid ethyl ester ($1,58 \times 10^5$ /g KPSM), Hexanoic acid ethyl ester ($1,21 \times 10^5$ /g KPSM) und Decanoic acid ethyl ester ($7,71 \times 10^4$ /g KPSM) nur von dem IDI-Y035-Isolat in geringen Mengen gebildet wurden. Benzaldehyde lag bei beiden Isolaten im Vergleich zu den vorherigen Hefespezies in höherer Konzentration ($8,97 \times 10^5$ /g KPSM $\pm 1,67 \times 10^5$) vor.

4 Ergebnisse

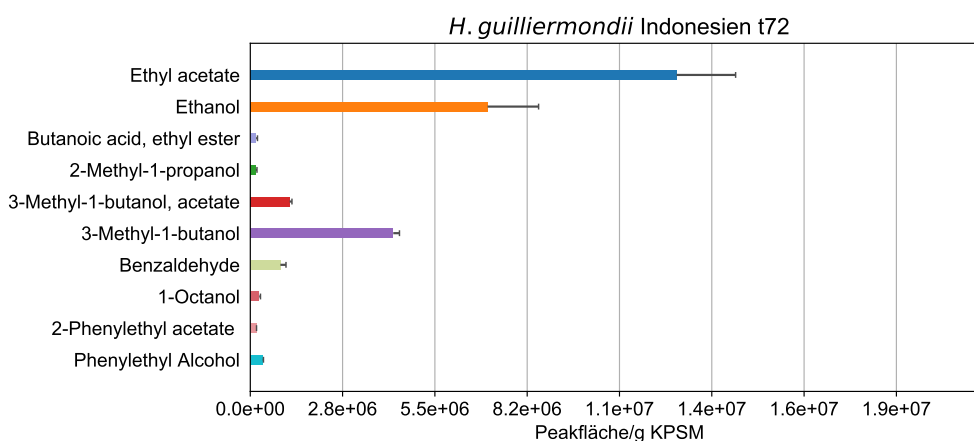


Abbildung 11: Darstellung der Hauptkomponenten der *H. guilliermondii*-Isolate IDI-Y035 und IDI-Y036 aus Indonesien zum Zeitpunkt t_{72}

Die Substanzen von *H. guilliermondii* aus Trinidad und Tobago (IDT-Y11) sind in Abbildung 12 abgebildet. Es konnten nur wenige Stoffe in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Ähnlich wie bei den indonesischen Isolaten wurde hauptsächlich Ethyl acetate, Ethanol und 3-Methyl-1-butanol gebildet, allerdings in deutlich geringeren Mengen.

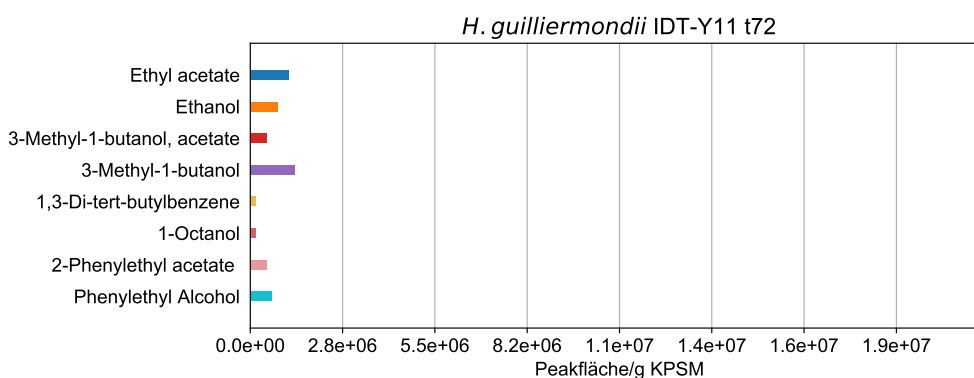


Abbildung 12: Darstellung der Hauptkomponenten des *H. guilliermondii*-Isolats IDT-Y11 aus Trinidad und Tobago zum Zeitpunkt t_{72}

Hanseniaspora opuntiae

In Abbildung 13 sind die Ergebnisse des Hefeisolats *Hanseniaspora opuntiae* (IDI-Y030) dargestellt. Von dieser Art wurde ein Isolat aus einer Kakaofermentation in Indonesien vermessen. Dies bildete überwiegend Ethyl acetate, Ethanol, 3-Methyl-1-butanol und 3-Methyl-1-butanol acetate. Zudem konnte ebenfalls Benzaldehyde in etwas höherer Konzentration nachgewiesen werden. Esterverbindungen lagen kaum vor - wenn überhaupt, dann nur in geringen Mengen. Insgesamt ähnelten sich die Stoffwechselprodukte der indonesischen *H. guilliermondii*-Isolate und der *H. opuntiae*-Hefe.

4 Ergebnisse

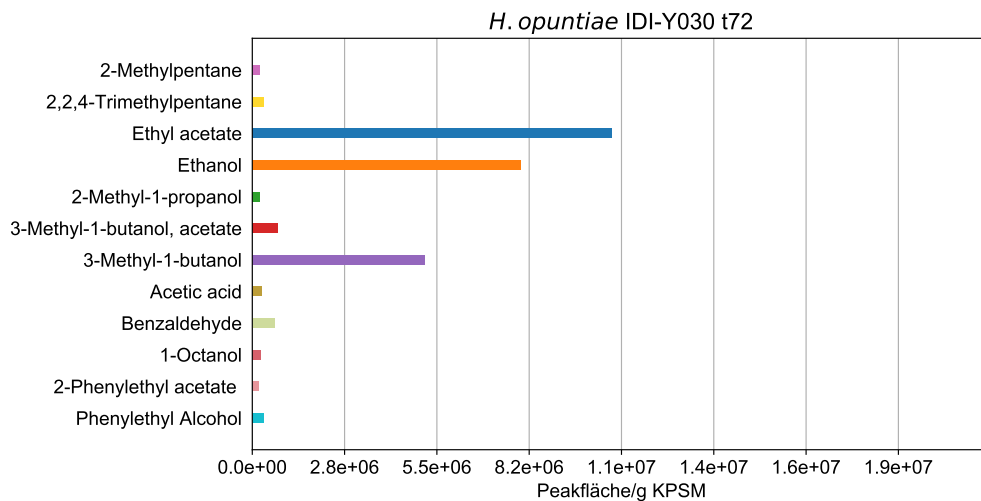


Abbildung 13: Darstellung der Hauptkomponenten des *H. opuntiae*-Isolats IDI-Y030 aus Indonesien zum Zeitpunkt t_{72}

Hanseniaspora thailandica

Es wurde ein Hefeisolat der Art *Hanseniaspora thailandica* (IDI-Y034) analysiert. Dieses wurde aus einer Kakaofermentation in Indonesien isoliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Es konnten nur wenige Hauptkomponenten nachgewiesen werden. Hauptsächlich wurde 3-Methyl-1-butanol acetate gebildet, gefolgt von 3-Methyl-1-butanol, Ethyl acetate und Ethanol.

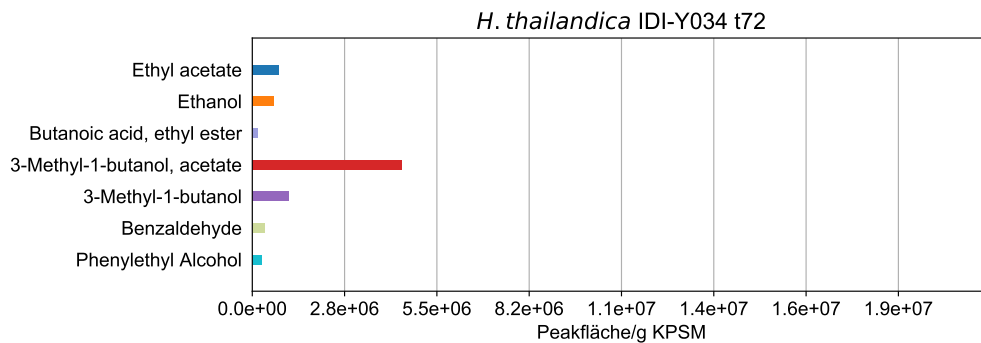


Abbildung 14: Darstellung der Hauptkomponenten des *H. thailandica*-Isolats IDI-Y034 aus Indonesien zum Zeitpunkt t_{72}

Hanseniaspora uvarum

In Abbildung 15 sind die Ergebnisse des Hefeisolats *Hanseniaspora uvarum* (IDE-Y068) aus einer ecuadorianischen Fermentation dargestellt. Dieses produzierte überwiegend Ethyl acetate und 3-Methyl-1-butanol, aber auch Ethanol, 3-Methyl-1-butanol acetate und Phenylethyl Alcohol.

4 Ergebnisse

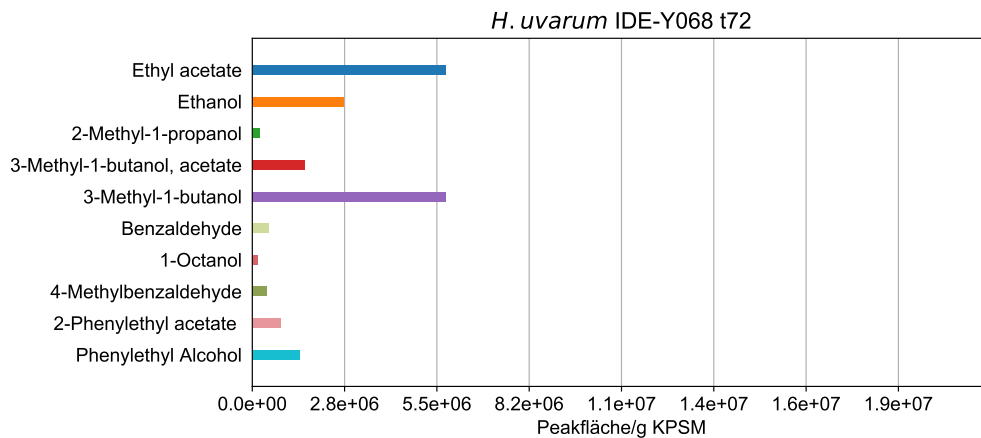


Abbildung 15: Darstellung der Hauptkomponenten des *H. uvarum*-Isolats IDE-Y068 aus Ecuador zum Zeitpunkt t_{72}

***Candida* spp.**

Es wurden zwei *Candida*-Arten analysiert. Bei dem ersten Isolat handelte es sich um eine nicht weiter definierte *Candida* sp. (IDT-Y13), aus einer Fermentation von Trinidad und Tobago. Das zweite Isolat, *Candida tropicalis* (IDI-Y031), stammte aus einer Kakaofermentation in Indonesien.

Das *Candida* sp.-Isolat bildete insgesamt nur wenige Substanzen und zwar hauptsächlich 3-Methyl-1-butanol und Ethanol (vgl. Abbildung 16). Die Ergebnisse der indonesischen Hefe sind in Abbildung 17 dargestellt. Diese bildete größtenteils 3-Methyl-1-butanol und Ethanol, gefolgt von 2-Methyl-1-propanol und 1,1-Diethoxyethane. Die weiteren Komponenten wurden in deutlich geringeren Mengen gebildet, darunter einige Esterverbindungen und Phenylethyl Alcohol.

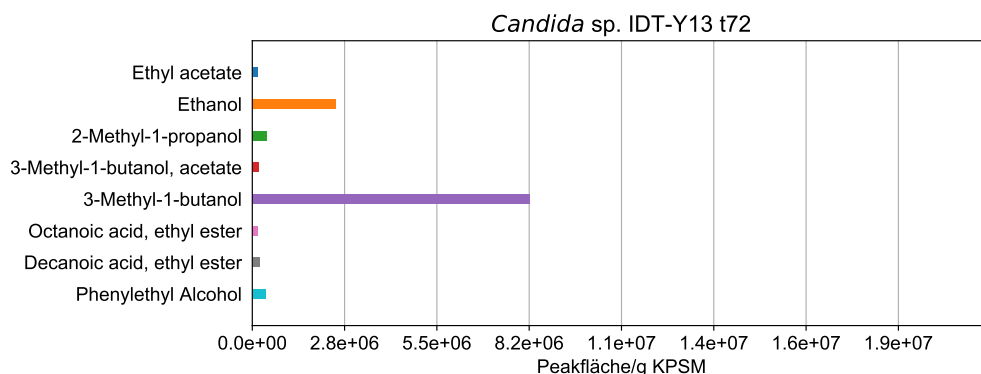


Abbildung 16: Darstellung der Hauptkomponenten des *Candida* sp.-Isolats IDT-Y13 aus Trinidad und Tobago zum Zeitpunkt t_{72}

4 Ergebnisse

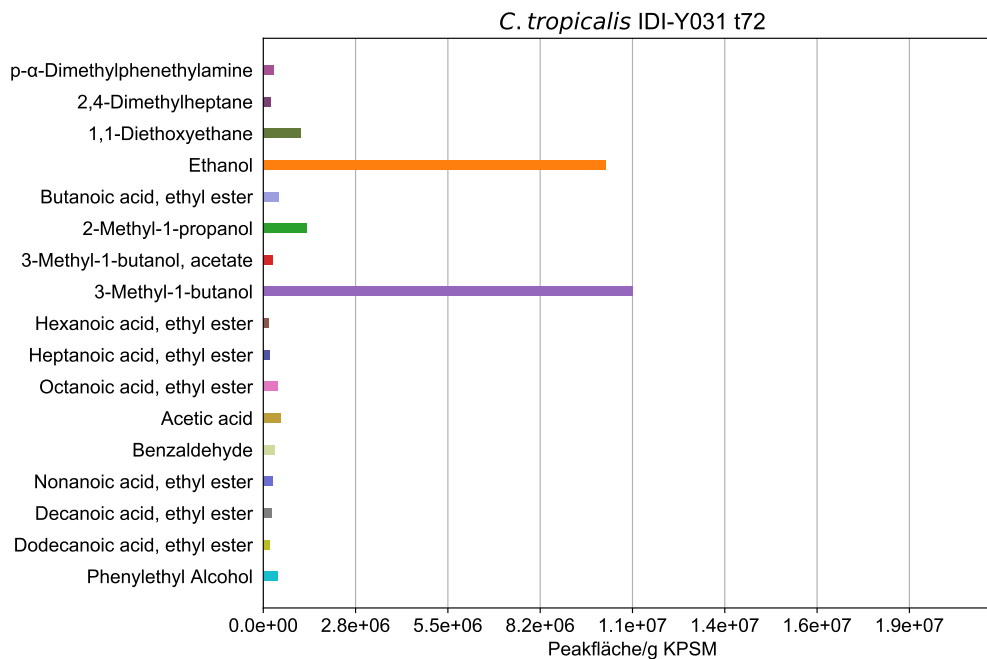


Abbildung 17: Darstellung der Hauptkomponenten des *C. tropicalis*-Isolats IDI-Y031 aus Indonesien zum Zeitpunkt t₇₂

Torulaspora delbrueckii

Es wurden drei Isolate der Art *Torulaspora delbrueckii* vermessen. Zwei stammten aus Fermentationen in Indonesien (IDI-Y043, IDI-Y057) und eines aus einer Fermentation in Ecuador (IDE-Y064).

Die Ergebnisse der indonesischen Isolate sind in Abbildung 18 zusammengefasst, da die Hauptkomponenten ähnlich waren. Beide Hefen bildeten v.a. 3-Methyl-1-butanol und Ethanol. Zudem konnten einige Ester, wie z.B. Octanoic acid ethyl ester, Hexanoic acid ethyl ester und 3-Methyl-1-butanol acetate, nachgewiesen werden. Auffällig ist Propanoic acid ethyl ester, welcher bisher bei keiner Hefe als Hauptkomponente vorlag. Bezüglich zweier Stoffe konnten Unterschiede zwischen den Isolaten beobachtet werden. IDI-Y043 bildete Decanoic acid ethyl ester ($7,84 \times 10^5$ /g KPSM), welches bei IDI-Y057 nicht nachgewiesen werden konnte. Hier wurde allerdings für Benzaldehyde eine Peakfläche von $6,38 \times 10^5$ /g KPSM beobachtet, welches bei IDI-Y043 nicht vorhanden war.

Im Vergleich dazu sind in Abbildung 19 die gebildeten Stoffe der ecuadorianischen Hefe dargestellt. Es konnten deutlich weniger Hauptkomponenten in geringeren Konzentrationen beobachtet werden. Größtenteils wurde 3-Methyl-1-butanol, gefolgt von Benzaldehyde und Ethanol nachgewiesen. Zudem lagen einige Esterverbindungen, wie z.B. Hexanoic acid ethyl ester und Octanoic acid ethyl ester, sowie der Alkohol Phenylethy Alcohol vor.

4 Ergebnisse

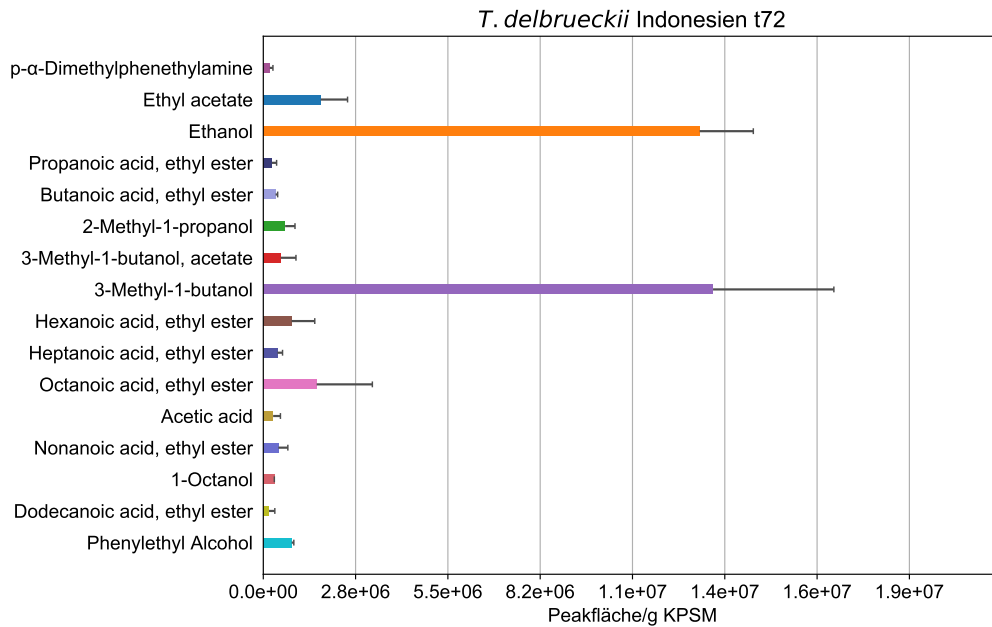


Abbildung 18: Darstellung der Hauptkomponenten der *T. delbrueckii*-Isolate IDI-Y043 und IDI-Y057 aus Indonesien zum Zeitpunkt t_{72}

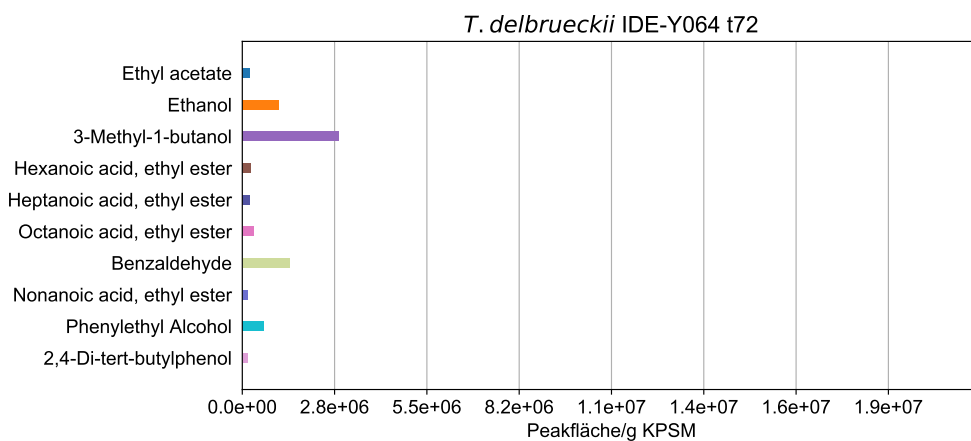


Abbildung 19: Darstellung der Hauptkomponenten des *T. delbrueckii*-Isolats IDE-Y064 aus Ecuador zum Zeitpunkt t_{72}

Pichia kudriavzevii

Von *Pichia kudriavzevii* wurden zwei Isolate (IDI-Y051 und IDI-Y055) aus Fermentationen in Indonesien analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 zusammengefasst. Beide bildeten am meisten Ethyl acetate, gefolgt von 3-Methyl-1-butanol und Ethanol. Auch Phenylethyl Alcohol wurde in größeren Mengen produziert. Ähnlich wie bei den indonesischen *T. delbrueckii*-Isolaten lag auch Propanoic acid ethyl ester als Hauptkomponente vor. Insgesamt bildete IDI-Y055 mehr Substanzen als IDI-Y051, jedoch nur zwei Hauptkomponenten, Heptanoic acid ethyl ester ($1,91 \times 10^5$ /g KPSM) und Acetic acid ($2,34 \times 10^5$ /g KPSM), welche in dem zweiten Isolat nicht nachgewiesen werden konnten.

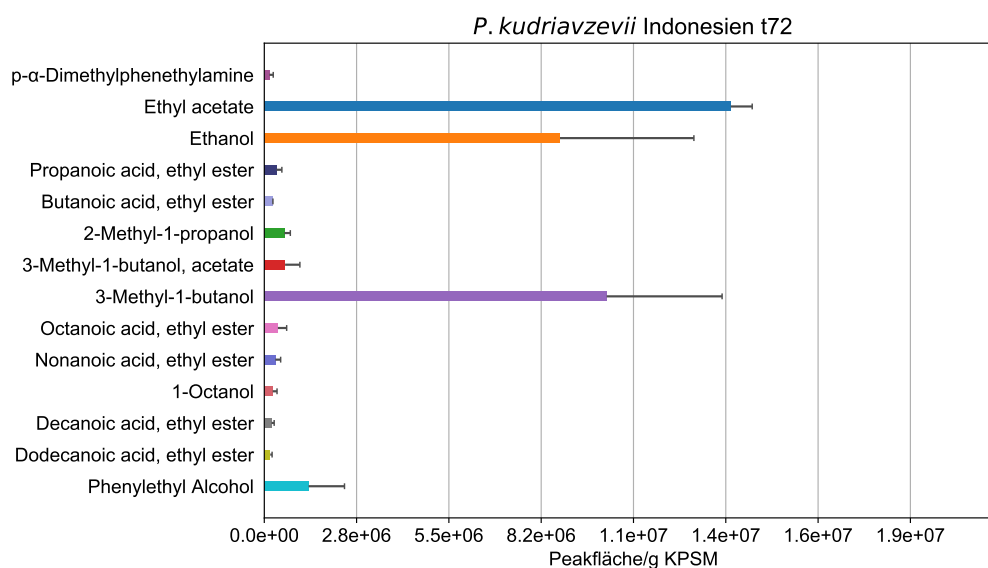


Abbildung 20: Darstellung der Hauptkomponenten der *P. kudriavzevii*-Isolate IDI-Y051 und IDI-Y055 aus Indonesien zum Zeitpunkt t_{72}

Pichia guilliermondii

Es wurde ein Isolat der Art *Pichia guilliermondii* (IDE-Y045) vermessen. Dieses wurde aus einer Fermentation in Ecuador isoliert. Das Isolat bildete insgesamt die wenigsten sekundären Stoffwechselprodukte und diese lagen nur in geringen Mengen vor (vgl. Abbildung 21). Es konnten lediglich drei Hauptkomponenten beobachtet werden, wovon 3-Methyl-1-butanol dominierte, gefolgt von Ethyl acetate und Phenylethyl Alcohol. Außer 3-Methyl-1-butanol acetate ($6,96 \times 10^4$ /g KPSM) wurden keine weiteren Esterverbindungen gebildet.

4 Ergebnisse

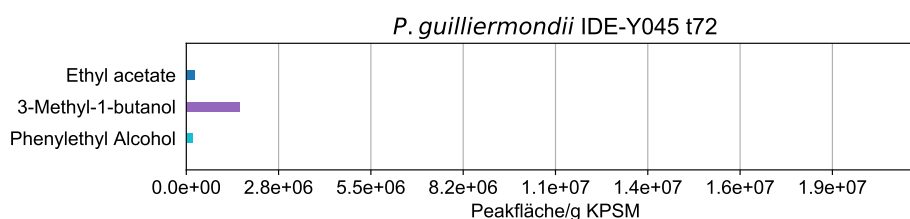


Abbildung 21: Darstellung der Hauptkomponenten des *P. guilliermondii*-Isolats IDE-Y045 aus Ecuador zum Zeitpunkt t_{72}

Pichia anomala

Von der Hefeart *Pichia anomala* wurden sieben Isolate aus ecuadorianischen Fermentationen vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 zusammengefasst. In den Hefeproben konnten ähnliche Substanzen nachgewiesen werden, die Mengen unterschieden sich jedoch etwas. 3-Methyl-1-butanol wurde von allen Isolaten am meisten gebildet, gefolgt von Ethyl acetate, Ethanol und Phenylethyl Alcohol. Auch 3-Methyl-1-butanol acetate konnte in höherer Konzentration nachgewiesen werden. Im Vergleich zu anderen Spezies, wie beispielsweise *S. cerevisiae*, bildeten die *P. anomala*-Stämme weniger volatile Komponenten und kaum Esterverbindungen.

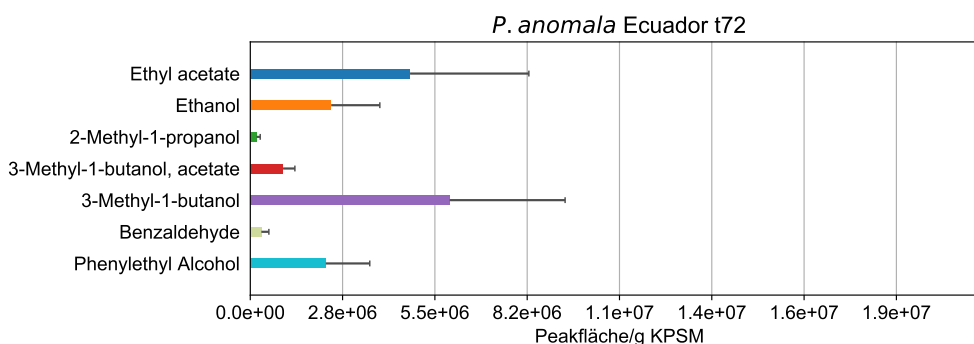


Abbildung 22: Darstellung der Hauptkomponenten der sieben *P. anomala*-Isolate aus Ecuador zum Zeitpunkt t_{72}

Hefestämme zur Weinherstellung

Saccharomyces bayanus

Bei drei der analysierten Hefestämme (SIHA[®] 9, EC1118, QA23) handelte es sich um *Saccharomyces bayanus*. Da diese Hefespezies in den Submersfermentationen ähnliche volatile Komponenten bildeten, sind die Ergebnisse in Abbildung 23 zusammengefasst. Die Hefen bildeten einige Substanzen in hohen Konzentrationen. Den größten Anteil machten 3-Methyl-1-butanol und Ethanol aus, gefolgt von Octanoic acid ethyl ester und Decanoic

4 Ergebnisse

acid ethyl ester. Weitere Ester wie 3-Methyl-1-butanol acetate, Hexanoic acid ethyl ester, Ethyl acetate und der Alkohol Phenylethyl Alcohol wurden ebenfalls in größeren Mengen gebildet. Insgesamt sind die gebildeten volatilen Komponenten dieser Reinzuchthefen mit denen der indonesischen *S. cerevisiae*-Stämme aus Gruppe 1 (aus Kakaofermentationen isolierte Stämme) vergleichbar.

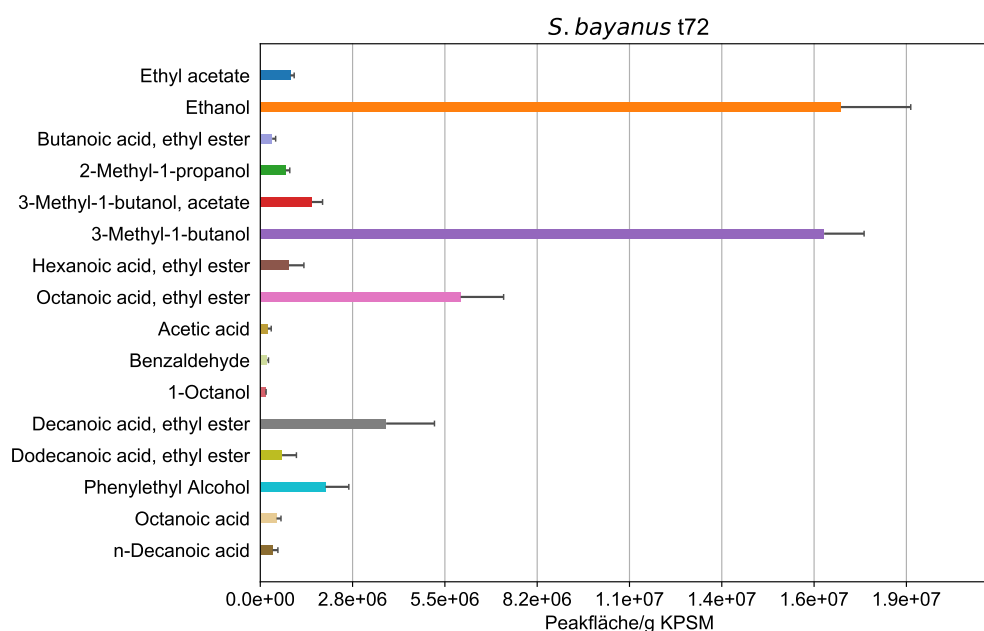


Abbildung 23: Darstellung der Hauptkomponenten der in KPSM fermentierten *S. bayanus*-Hefen SIHA[®] 9, EC1118 und QA23 zum Zeitpunkt t_{72}

Saccharomyces cerevisiae

Bei vier der Hefestämme handelte es sich um Hefen der Spezies *Saccharomyces cerevisiae*. Die drei Hefen CY3079, GHM und Zymaflore[®] x5 bildeten im Versuch ähnliche sekundäre Stoffwechselprodukte, weswegen die Ergebnisse dieser in Abbildung 24 zusammengefasst sind. Auch diese Hefen bildeten am meisten Ethanol und 3-Methyl-1-butanol, gefolgt von Octanoic acid ethyl ester, Decanoic acid ethyl ester, Phenylethy Alcohol und 3-Methyl-1-butanol acetate.

Die Stoffwechselprodukte der Portwein-Hefe unterschieden sich deutlich von den bisher beschriebenen Ergebnissen, vor allem bezüglich der Konzentrationen. Die Ergebnisse dieses Hefeisolats sind daher in Abbildung 25 dargestellt. Diese Hefe bildete überwiegend Ethanol, in deutlich höherer Konzentration ($5,09 \times 10^7$ /g KPSM) im Vergleich zu den anderen Hefestämmen, weswegen der Maßstab der x-Achse für Abb. 25 verändert wurde. Des Weiteren wurden 3-Methyl-1-butanol, Octanoic acid ethyl ester, Phenylethyl Alcohol und Decanoic

4 Ergebnisse

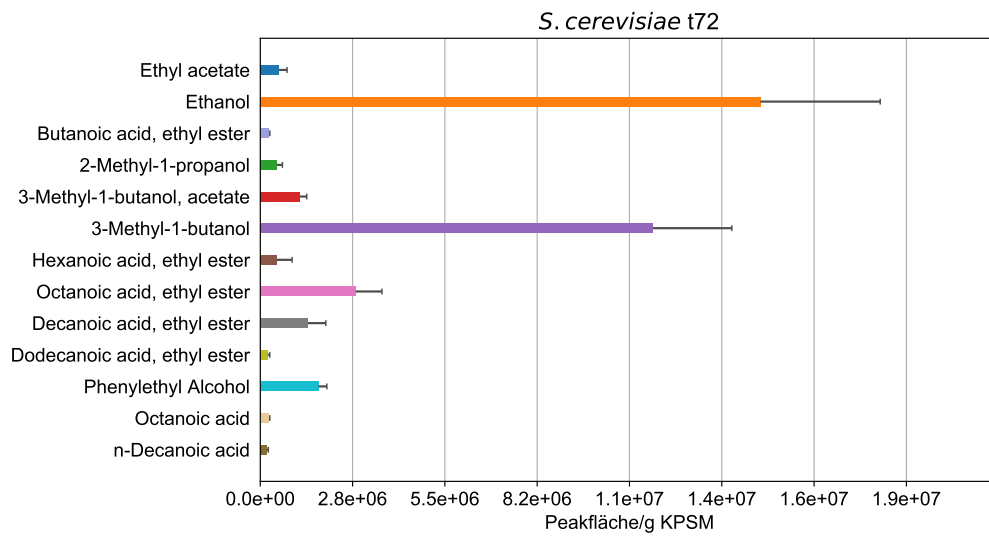


Abbildung 24: Darstellung der Hauptkomponenten der in KPSM fermentierten *S. cerevisiae*-Hefen CY3079, GHM und Zymaflore® x5 zum Zeitpunkt t_{72}

acid ethyl ester in höheren Konzentrationen gebildet. Der Alkohol 2-Methyl-1-butanol konnte bisher bei keiner Hefe als Hauptkomponente nachgewiesen werden. Die Konzentration dieser Substanz lag in der Portwein-Probe bei einer Peakfläche von $1,24 \times 10^6$ /g KPSM.

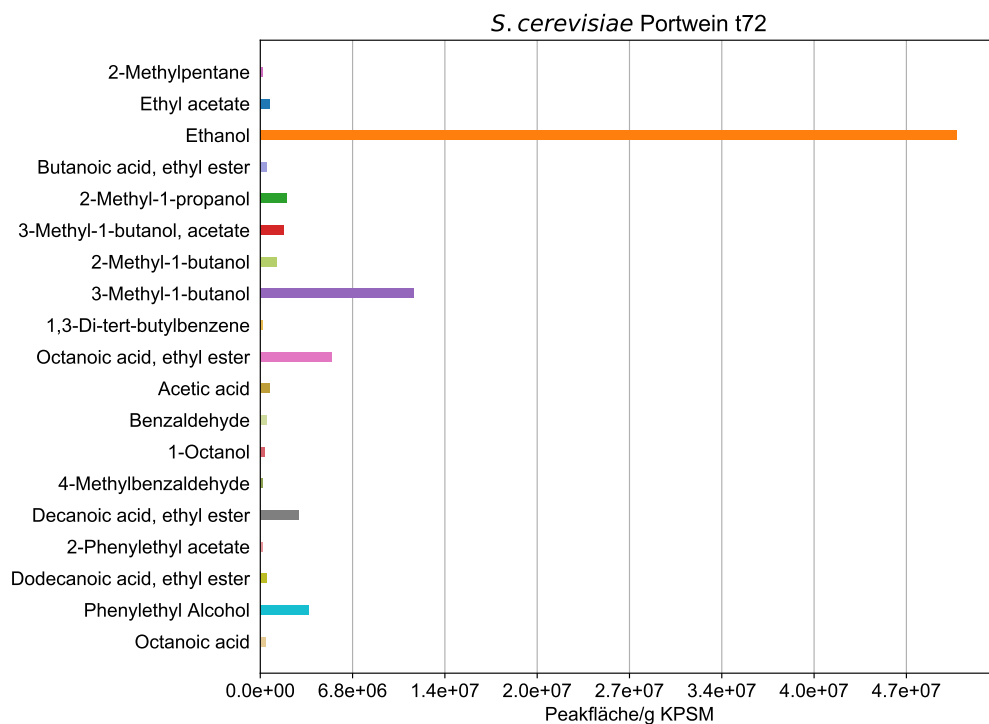


Abbildung 25: Darstellung der Hauptkomponenten der in KPSM fermentierten *S. cerevisiae*-Hefe Portwein zum Zeitpunkt t_{72}

Lachancea thermotolerans

In Abbildung 26 sind die Hauptkomponenten des Hefestamms *Lachancea thermotolerans* dargestellt. Den größten Anteil machten Ethanol und 3-Methyl-1-butanol aus. Auch Benzaldehyde und Phenylethyl Alcohol lagen in größeren Mengen vor. Die Hefe bildete insgesamt wenige Esterverbindungen. Lediglich Ethyl acetate, Butanoic acid ethyl ester und 3-Methyl-1-butanol acetate konnten unter den Hauptkomponenten identifiziert werden.

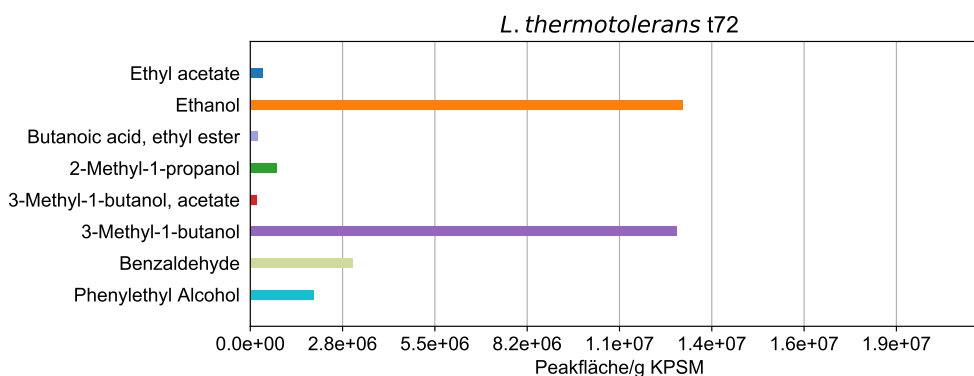


Abbildung 26: Darstellung der Hauptkomponenten der in KPSM fermentierten *L. thermotolerans*-Hefe zum Zeitpunkt t_{72}

Torulasporea delbrueckii

Die Ergebnisse der Fermentation des Hefestammes *Torulasporea delbrueckii* sind in Abbildung 27 abgebildet. Diese Hefe bildete größtenteils Ethanol, gefolgt von 3-Methyl-1-butanol und Ethyl acetate. Ähnlich wie *L. thermotolerans* bildete auch diese Hefe insgesamt wenige Esterverbindungen. Ethyl acetate lag in etwas höherer Konzentration vor und auch Propanoic acid ethyl ester und Butanoic acid ethyl ester waren unter den Hauptkomponenten vertreten.

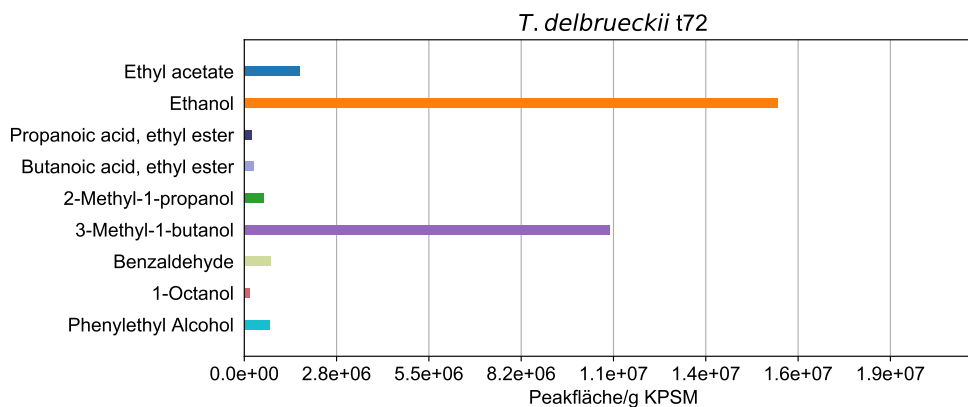


Abbildung 27: Darstellung der Hauptkomponenten der in KPSM fermentierten *T. delbrueckii*-Hefe zum Zeitpunkt t_{72}

4.1.2 Veränderungen im Fermentationsverlauf

Aus Kakaofermentationen isolierte Hefestämme

Saccharomyces cerevisiae

Für die *S. cerevisiae*-Stämme ist stellvertretend der Fermentationsverlauf der indonesischen Hefestämme aus Gruppe 1, gegliedert nach Stoffgruppen, dargestellt (vgl. Abb. 28). Die Ergebnisse der indonesischen Stämme aus Gruppe 2, des ecuadorianischen Isolats und der Isolate aus Trinidad und Tobago befinden sich im Anhang (vgl. Anhang 1 bis 3).

Innerhalb der ersten 48 h stieg der Gehalt der Ester an, in den letzten 24 h änderte sich dieser kaum noch (vgl. Abb. 28a). Alkohole wurden über den gesamten Fermentationsverlauf gebildet und vor allem in den ersten 24 h. In großem Maße wurden 3-Methyl-1-butanol und Ethanol produziert (vgl. Abb. 28b). Auch die beiden Säuren Octanoic acid und n-Decanoic acid wurden kontinuierlich während der gesamten Fermentation gebildet (vgl. Abb. 28d). Benzaldehyde lag bereits zum Zeitpunkt t_0 in geringer Konzentration vor und wurde in den ersten 24 h vermehrt gebildet, anschließend sank die Konzentration wieder auf das Anfangsniveau (vgl. Abb. 28c). Der Fermentationsverlauf des ecuadorianischen Isolats war sehr ähnlich. Die Verläufe der indonesischen Stämme aus Gruppe 2 und der Isolate aus Trinidad und Tobago ähnelten sich. Beide bildeten Ester, Alkohole und Säuren in den ersten 24 h, im weiteren Verlauf konnte ein Absinken der Konzentrationen beobachtet werden, besonders der Alkoholkonzentrationen.

4 Ergebnisse

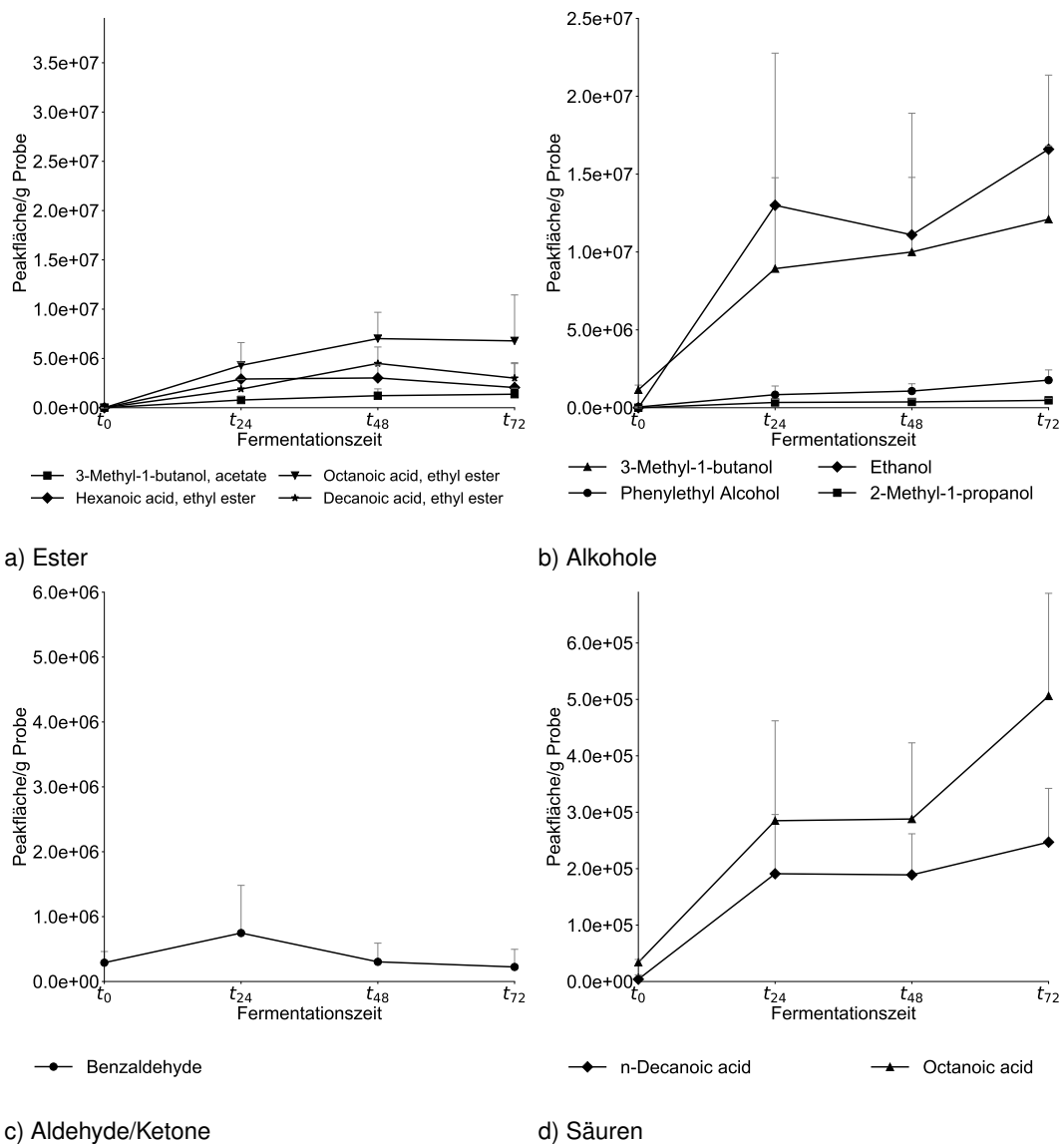


Abbildung 28: Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentationen von *S. cerevisiae* Gruppe 1 in KPSM bestimmt mittels GC-MS. Zusammengefasst zu folgenden Stoffgruppen: a) Ester, b) Alkohole, c) Aldehyde/Ketone und d) Säuren

Sporobolus roseus

Der Fermentationsverlauf von *S. roseus* (IDI-Y019) ist in Abbildung 29 dargestellt. Die Probe zum Zeitpunkt t_0 wurde nicht vermessen, weswegen die Kurven bei t_{24} beginnen. Der Verlauf der Ester und Alkohole deutet daraufhin hin, dass diese Substanzen v.a. in den ersten 24 h gebildet wurden. Im Folgenden konnte eine Abnahme der Konzentrationen bis Fermentationsende beobachtet werden (vgl. Abb. 29a und b). Auch der Gehalt von Octanoic acid und n-Decanoic acid nahm wahrscheinlich in den ersten 24 h stark zu, sank dann leicht ab, um in den letzten 24 h wieder etwas anzusteigen. Butanoic acid konnte erst nach 48 h

4 Ergebnisse

nachgewiesen werden (vgl. Abb. 29d). Die Anfangskonzentration von Benzaldehyd kann nur abgeschätzt werden und lag wahrscheinlich unter einer Peakfläche $1,0 \times 10^6$ /g KPSM. Demzufolge könnte von einem Anstieg der Konzentration in den ersten 24 h, gefolgt von einem Absinken im weiteren Verlauf ausgegangen werden (vgl. Abb. 29c).

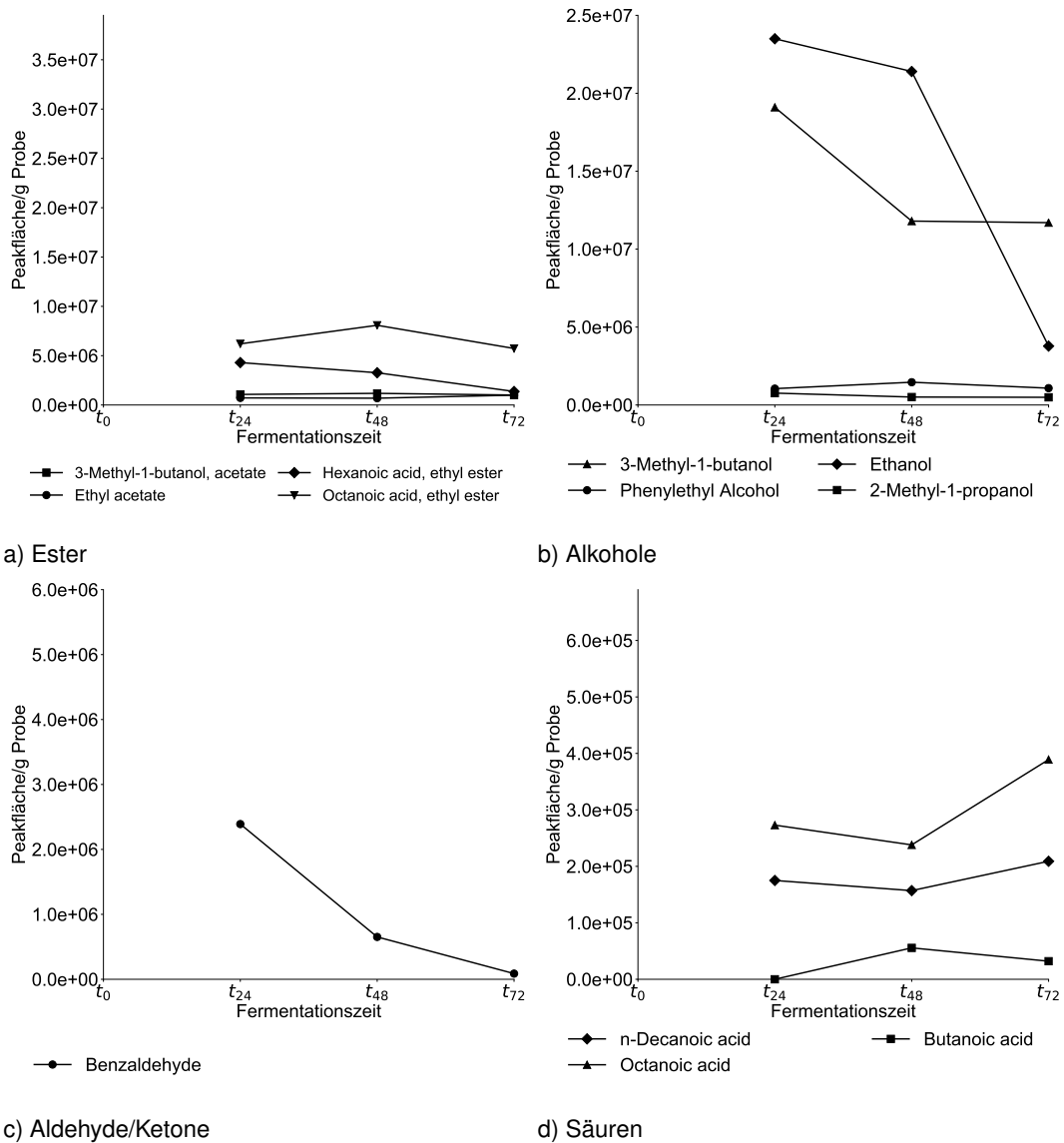


Abbildung 29: Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von *S. roseus* (IDI-Y019) in KPSM bestimmt mittels GC-MS. Zusammengefasst zu folgenden Stoffgruppen: a) Ester, b) Alkohole, c) Aldehyde/Ketone und d) Säuren

Hanseniaspora guilliermondii

In Abbildung 30 ist der Fermentationsverlauf der beiden indonesischen Isolate dargestellt. Dieser deutete auf einen Anstieg der Gehalte von Estern und Alkoholen in den ersten 24 h hin. Es wurden vor allem die Ester 3-Methyl-1-butanol acetate und Ethyl acetate gebildet.

4 Ergebnisse

Im Anschluss folgte ein leichtes Absinken der Gehalte. Die Konzentration von 2-Phenylethyl acetate verlief konstant. Butanoic acid ethyl ester konnte erst zum Zeitpunkt t_{72} nachgewiesen werden (vgl. Abb. 30a). Die Alkohole 3-Methyl-1-butanol und Ethanol wurden ebenfalls überwiegend zu Beginn gebildet und die Konzentrationen von Phenylethyl Alcohol und 2-Methyl-1-propanol änderten sich kaum im Fermentationsverlauf (vgl. Abb. 30b). Butanoic acid war erst zum Zeitpunkt t_{48} nachweisbar und der Gehalt von Octanoic acid stieg im Verlauf der Fermentation leicht an (vgl. Abb. 30d). Benzaldehyde wurde wahrscheinlich vermehrt in den ersten 24 h gebildet, nahm im Verlauf aber wieder ab. Für das Isolat aus Trinidad und Tobago konnten ähnliche Verläufe beobachtet werden (vgl. Anhang 4).

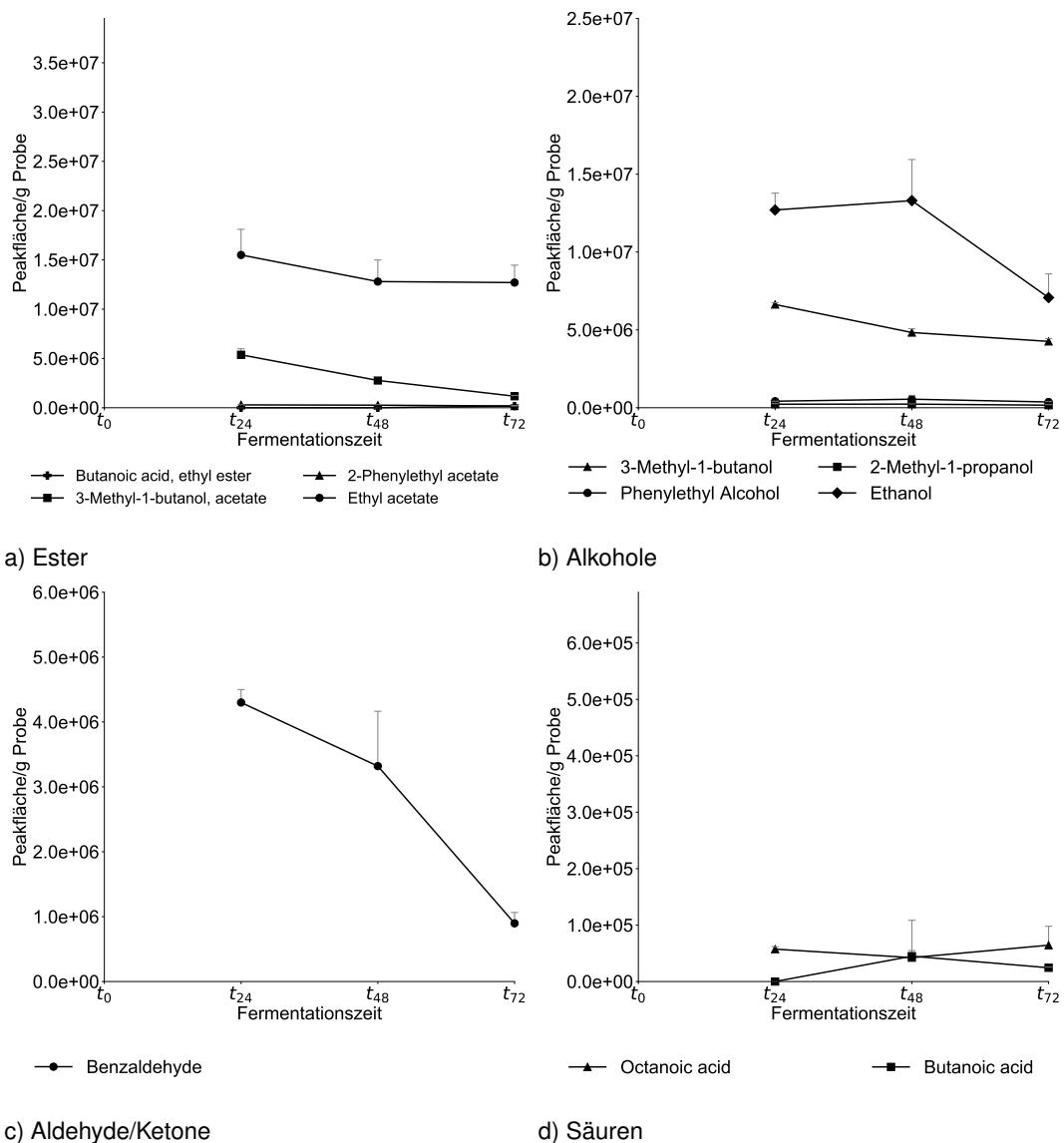


Abbildung 30: Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentationen von indonesischen *H. guilliermondii* (IDI-Y035, IDI-Y036) in KPSM bestimmt mittels GC-MS. Zusammengefasst zu folgenden Stoffgruppen: a) Ester, b) Alkohole, c) Aldehyde/Ketone und d) Säuren

Hanseniaspora opuntiae

Der Fermentationsverlauf von *H. opuntiae* (IDI-Y030) ist in Abbildung 31 dargestellt. Auch hier konnte ein Anstieg der Konzentrationen der Ester und Alkohole in den ersten 24 h beobachtet werden. Der Gehalt an 3-Methyl-1-butanol acetate und Ethyl acetate sank dann wieder ab, von 2-Phenylethyl acetate verlief er konstant (vgl. Abb. 31a). Für Ethanol konnte eine Abnahme der Konzentration in den letzten 24 h beobachtet werden, für 3-Methyl-1-butanol ein konstanter Verlauf (vgl. Abb. 31b). Im Vergleich zu den vorigen Isolaten, konnte hier ab dem Zeitpunkt t_{48} Acetic acid nachgewiesen werden. Die Konzentration von Octanoic acid sank nach 24 h leicht ab (vgl. Abb. 31d). Wie auch schon für die vorigen Hefen kann zu Beginn ein Anstieg von Benzaldehyde angenommen werden. Im weiteren Verlauf fiel die Konzentration auf das Anfangsniveau (vgl. Abb. 31c).

4 Ergebnisse

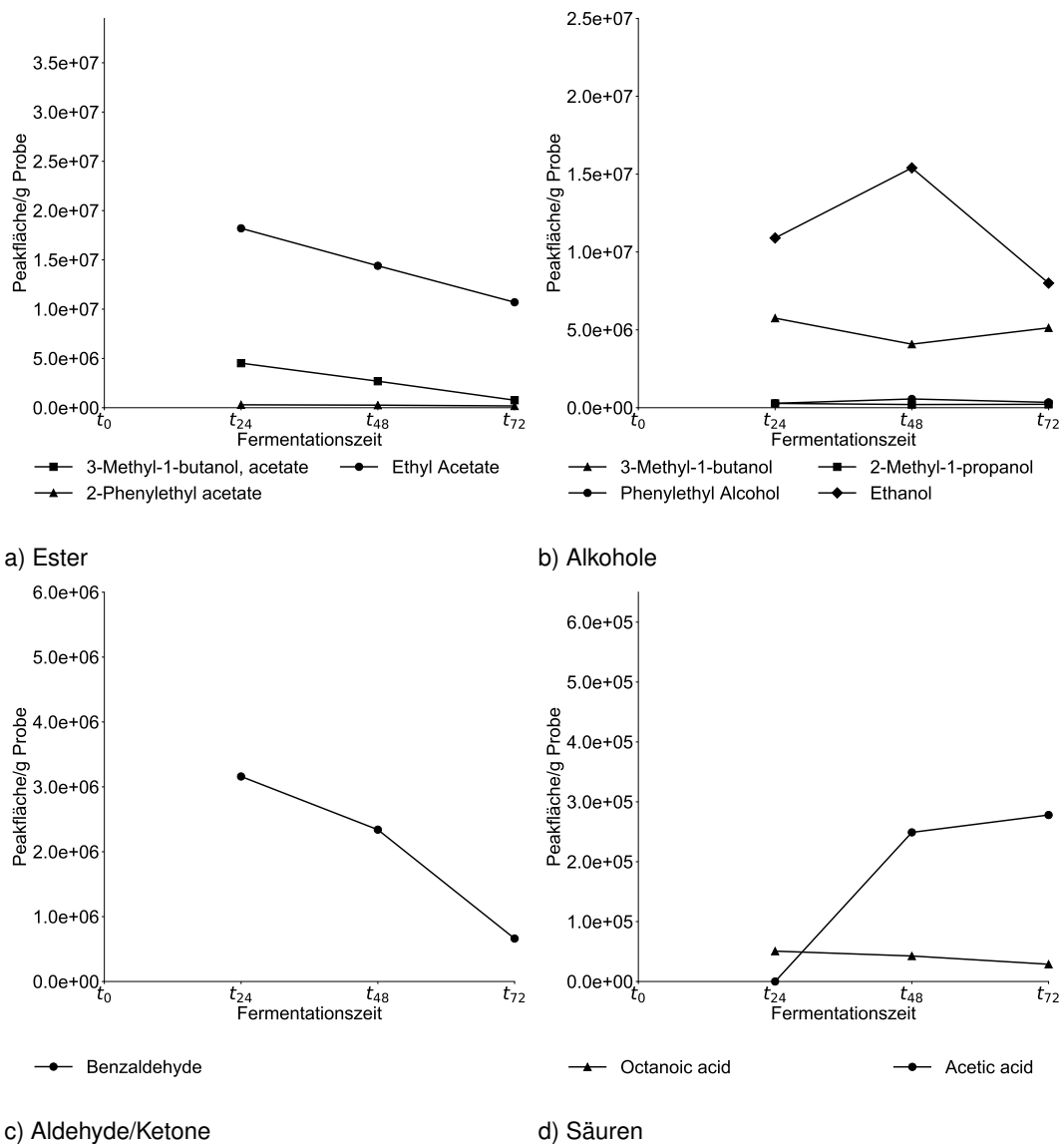


Abbildung 31: Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von *H. opuntiae* (IDI-Y030) in KPSM bestimmt mittels GC-MS. Zusammengefasst zu folgenden Stoffgruppen: a) Ester, b) Alkohole, c) Aldehyde/Ketone und d) Säuren

Hanseniaspora thailandica

Die Entwicklungen der Konzentrationen einiger Substanzen von *H. thailandica* (IDI-Y034) sind in Abbildung 32 dargestellt. Diese glichen denen der anderen *Hanseniaspora* spp.-Hefen. Für die Ester, Alkohole und Aldehyde kann ein Anstieg in den ersten 24 h angenommen werden. Besonders Ethyl acetate wurde in großen Mengen gebildet und sank im weiteren Verlauf stark ab. Butanoic acid ethyl ester konnte erst zum Zeitpunkt t_{72} nachgewiesen werden (vgl. Abb. 32a). Der Gehalt an Octanoic acid änderte sich kaum (vgl. Abb. 32d).

4 Ergebnisse

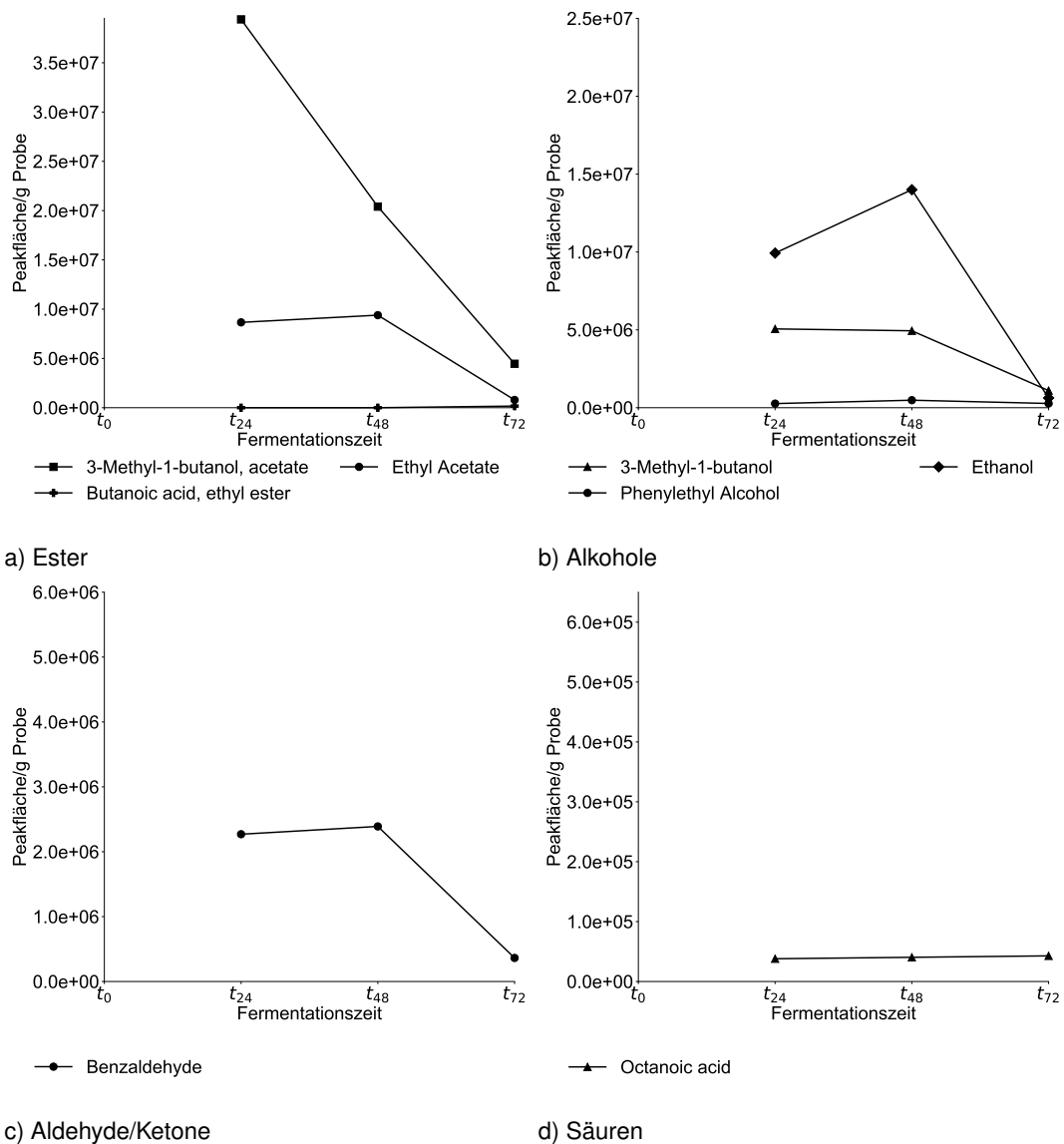


Abbildung 32: Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von *H. thailandica* (IDI-Y034) in KPSM bestimmt mittels GC-MS. Zusammengefasst zu folgenden Stoffgruppen: a) Ester, b) Alkohole, c) Aldehyde/Ketone und d) Säuren

Hanseniaspora uvarum

In Abbildung 33 (IDE-Y068) sind die Ergebnisse des *H. uvarum*-Isolats dargestellt. Es konnte beobachtet werden, dass zu Beginn der Fermentation keine Ester und Alkohole vorlagen. Diese wurden kontinuierlich in den ersten 48 h gebildet. In den letzten 24 h war ein leichtes Absinken der Esterkonzentrationen zu beobachten (vgl. Abb. 33a). Ein ähnliches Verhalten zeigten die Alkohole (vgl. Abb. 33b). Acetic acid wurde stark in den ersten 24 h gebildet und im weiteren Verlauf komplett verbraucht, sodass sie zum Zeitpunkt t_{72} nicht mehr nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 33d). Neben Benzaldehyde, das stark in den ersten 24 h gebildet

4 Ergebnisse

wurde, konnte das Keton Acetoin nachgewiesen werden. Dieses lag erst nach 24 h vor, im weiteren Verlauf war die Konzentration dann konstant (vgl. Abb. 33c).

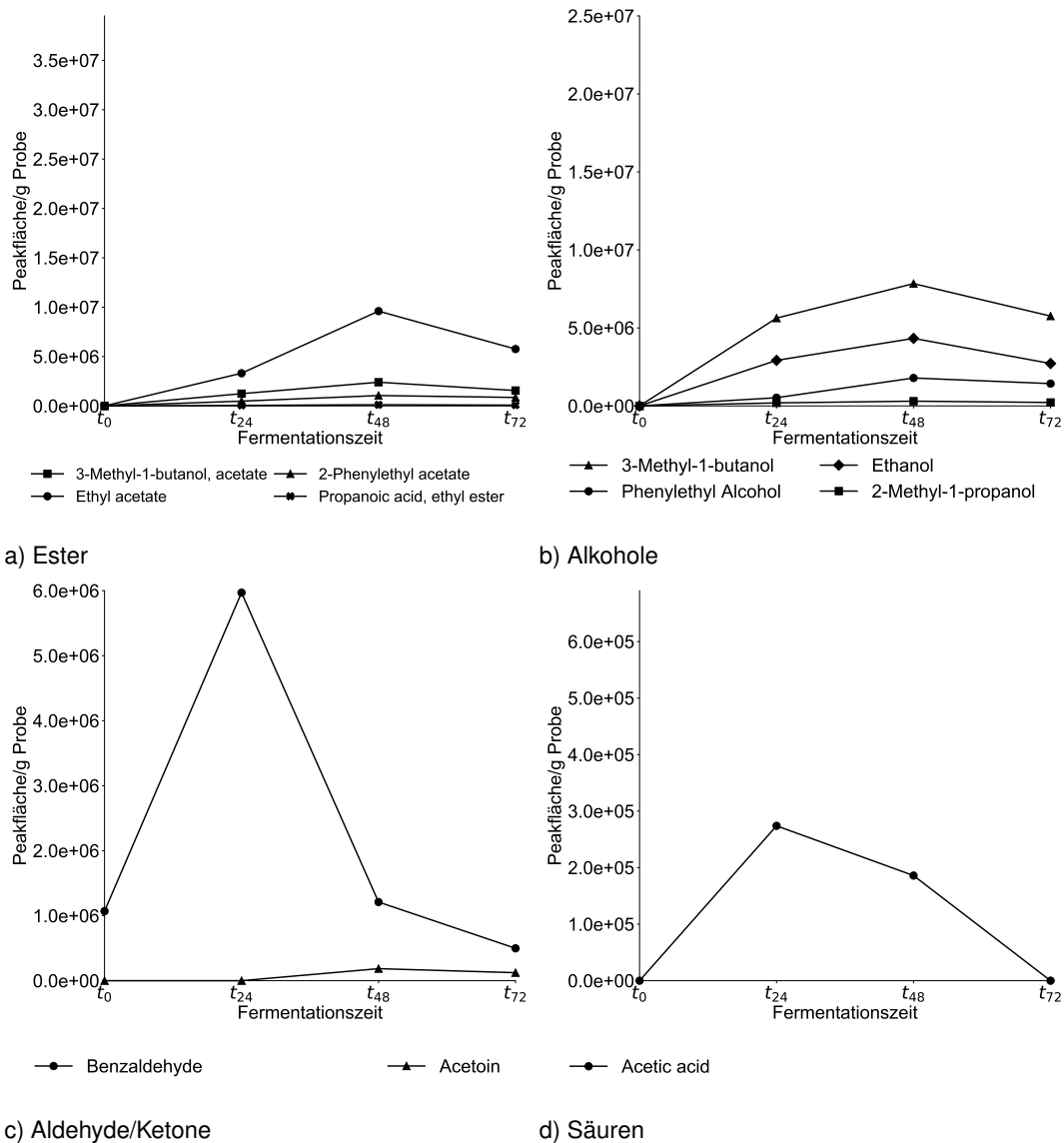


Abbildung 33: Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von *H. uvarum* (IDE-Y068) in KPSM bestimmt mittels GC-MS. Zusammengefasst zu folgenden Stoffgruppen: a) Ester, b) Alkohole, c) Aldehyde/Ketone und d) Säuren

Candida spp.

Der Fermentationsverlauf von *C. tropicalis* (IDI-Y031) ist in Abbildung 34 dargestellt. Es zeigte sich, dass dieses Isolat die Esterverbindungen nur in sehr geringen Konzentrationen bildete (vgl. Abb. 34a). Der Konzentrationsverlauf der Alkohole glich denen der *Hanseniaspora* spp.-Isolate. In den ersten 24 h kann ein starker Anstieg angenommen werden, vor allem für Ethanol und 3-Methyl-1-butanol. Die Endkonzentrationen beider Alkohole glichen denen

4 Ergebnisse

der Konzentrationen zu t_{24} (vgl. Abb. 34b). Dieses Isolat bildete im gesamten Verlauf der Fermentation Acetic acid und hauptsächlich in den letzten 24 h. Der Gehalt an Butanoic acid blieb konstant (vgl. Abb. 34d). Auch die Konzentration von Benzaldehyde änderte sich kaum während der Fermentation (vgl. Abb. 34c).

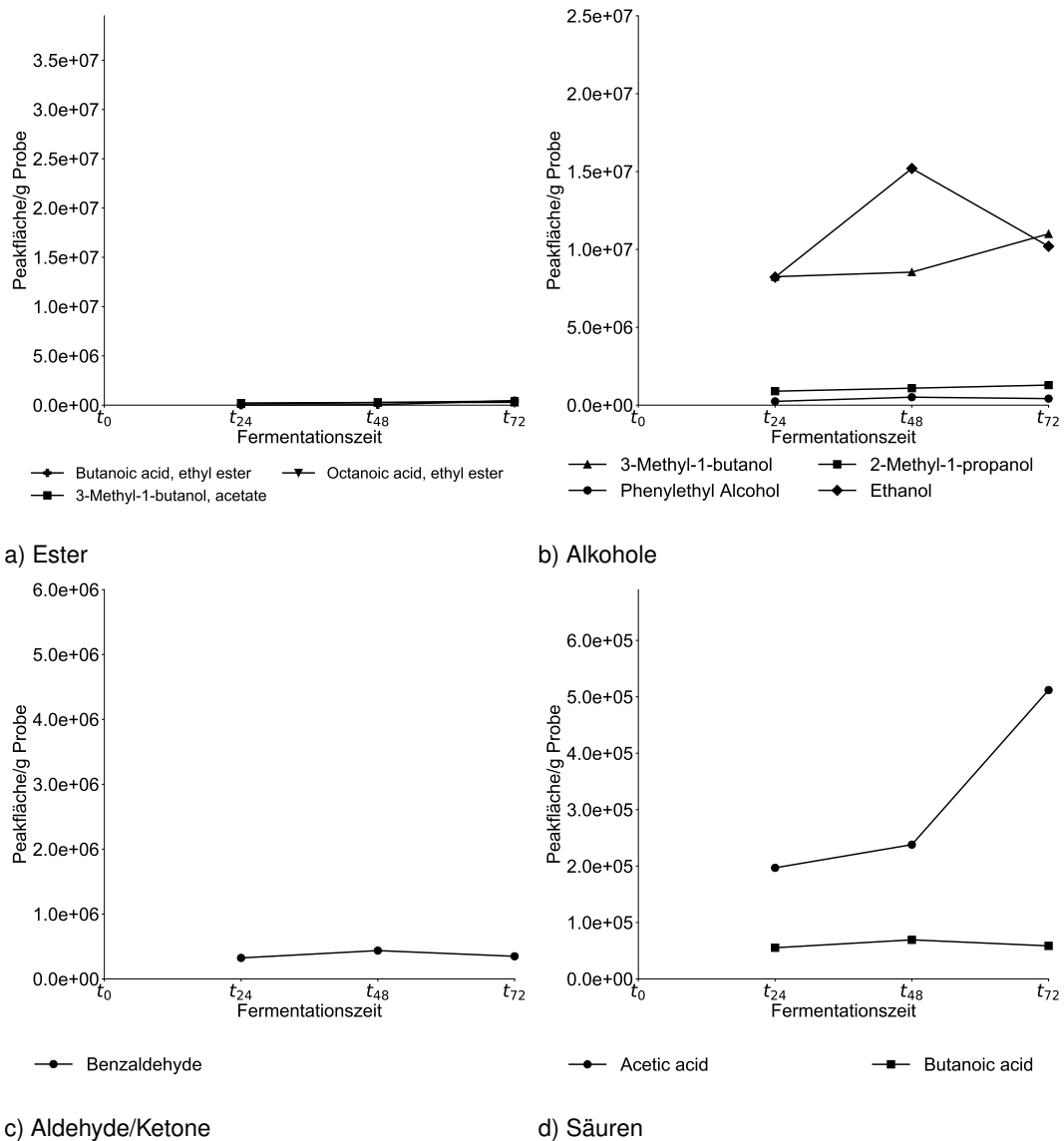


Abbildung 34: Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von indonesischer *C. tropicalis* (IDI-Y031) in KPSM bestimmt mittels GC-MS. Zusammengefasst zu folgenden Stoffgruppen: a) Ester, b) Alkohole, c) Aldehyde/Ketone und d) Säuren

In Abbildung 35 sind die Ergebnisse des nicht weiter definierten *Candida* sp.-Isolats (IDT-Y13) aus Trinidad und Tobago dargestellt. Dieses zeigte nur eine geringe Bildung von volatilen Komponenten, vor allem in der Gruppe der Ester. Ethyl acetate konnte nach den ersten 24 h nachgewiesen werden, 3-Methyl-1-butanol acetate erst nach 48 h und Octanoic acid ethyl ester zum Zeitpunkt t_{72} (vgl. Abb. 35a). Die Alkohole wurden kontinuierlich während

4 Ergebnisse

der gesamten Fermentation gebildet (vgl. Abb. 35b). Benzaldehyde konnte in diesen Proben nicht nachgewiesen werden, aber das Keton Acetoin ab dem Zeitpunkt t_{48} (vgl. Abb. 35c). Die Säure 2-Methylpropanoic acid lag zu Beginn in höherer Konzentration vor, im Verlauf nahm der Gehalt ab und stieg nach 48 h wieder leicht an (vgl. Abb. 35d).

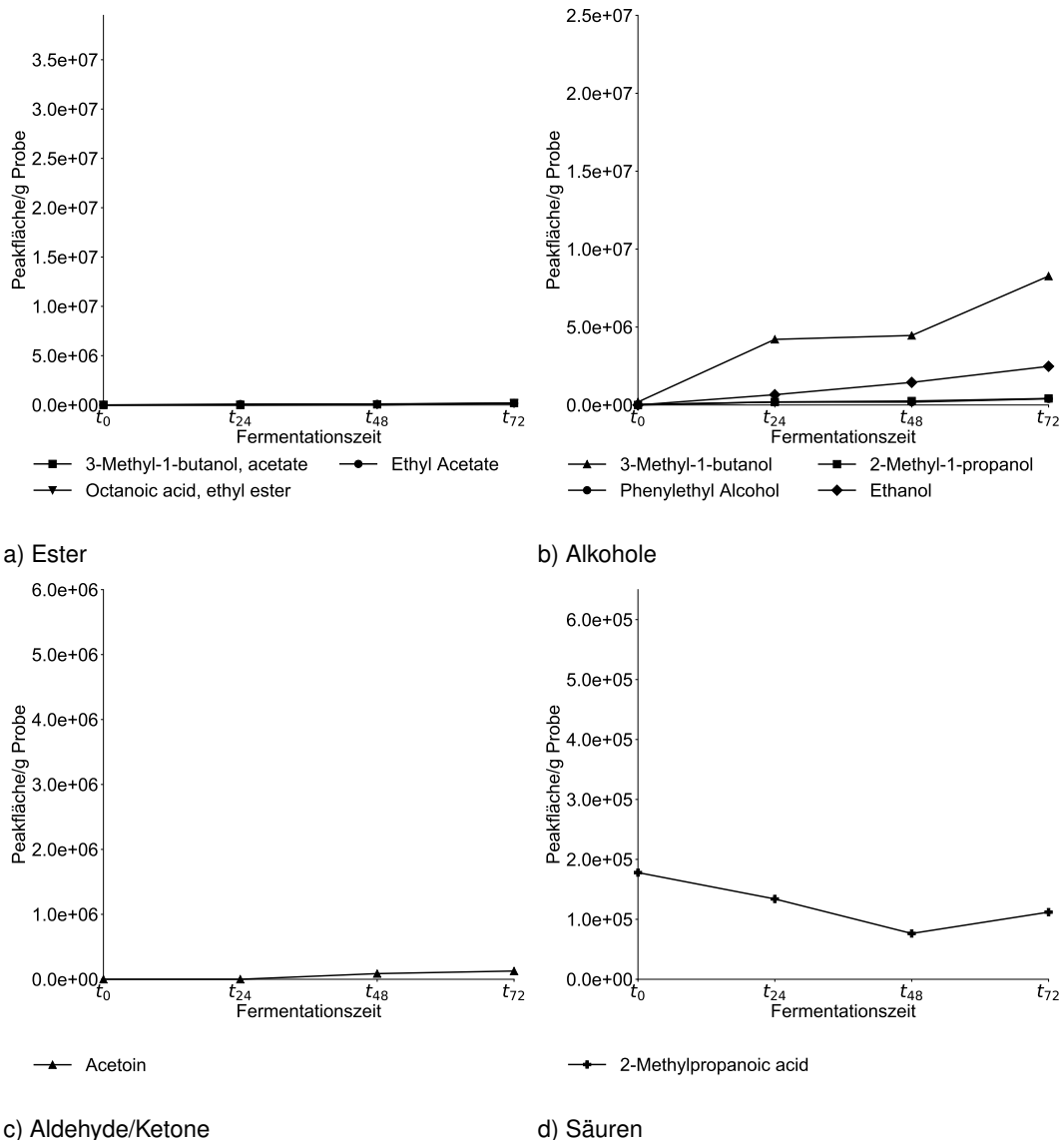


Abbildung 35: Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von *Candida* sp. aus Trinidad und Tobago (IDT-Y13) in KPSM bestimmt mittels GC-MS. Zusammengefasst zu folgenden Stoffgruppen: a) Ester, b) Alkohole, c) Aldehyde/Ketone und d) Säuren

Torulaspora delbrueckii

Die Konzentrationsänderungen der indonesischen *T. delbrueckii*-Isolate (IDI-Y043 und IDI-Y057) sind in Abbildung 36 dargestellt. Die Esterverbindungen lagen während der gesamten Fermentation in relativ geringen Konzentrationen vor, sie nahmen aber stetig zu (vgl. Abb.

4 Ergebnisse

36a). Die Alkohole 3-Methyl-1-butanol und Ethanol wurden ebenfalls kontinuierlich im gesamten Fermentationsverlauf gebildet. Das Isolat IDI-Y057 produzierte diese Substanzen in etwas höheren Mengen, was die großen Standardabweichungen erklärt (vgl. Abb. 36b). Octanoic acid wurde von beiden Isolaten in gleichem Maß gebildet. Zum Zeitpunkt t_{48} konnte sie in beiden Proben nicht nachgewiesen werden und stieg dann in den letzten 24 h noch einmal an (vgl. Abb. 36d). Benzaldehyde wurde von beiden Isolaten bis zum Zeitpunkt t_{48} gebildet und im weiteren Verlauf verbraucht. Allerdings produzierte das Isolat IDI-Y057 deutlich mehr Benzaldehyde als IDI-Y043 (vgl. Abb. 36c).

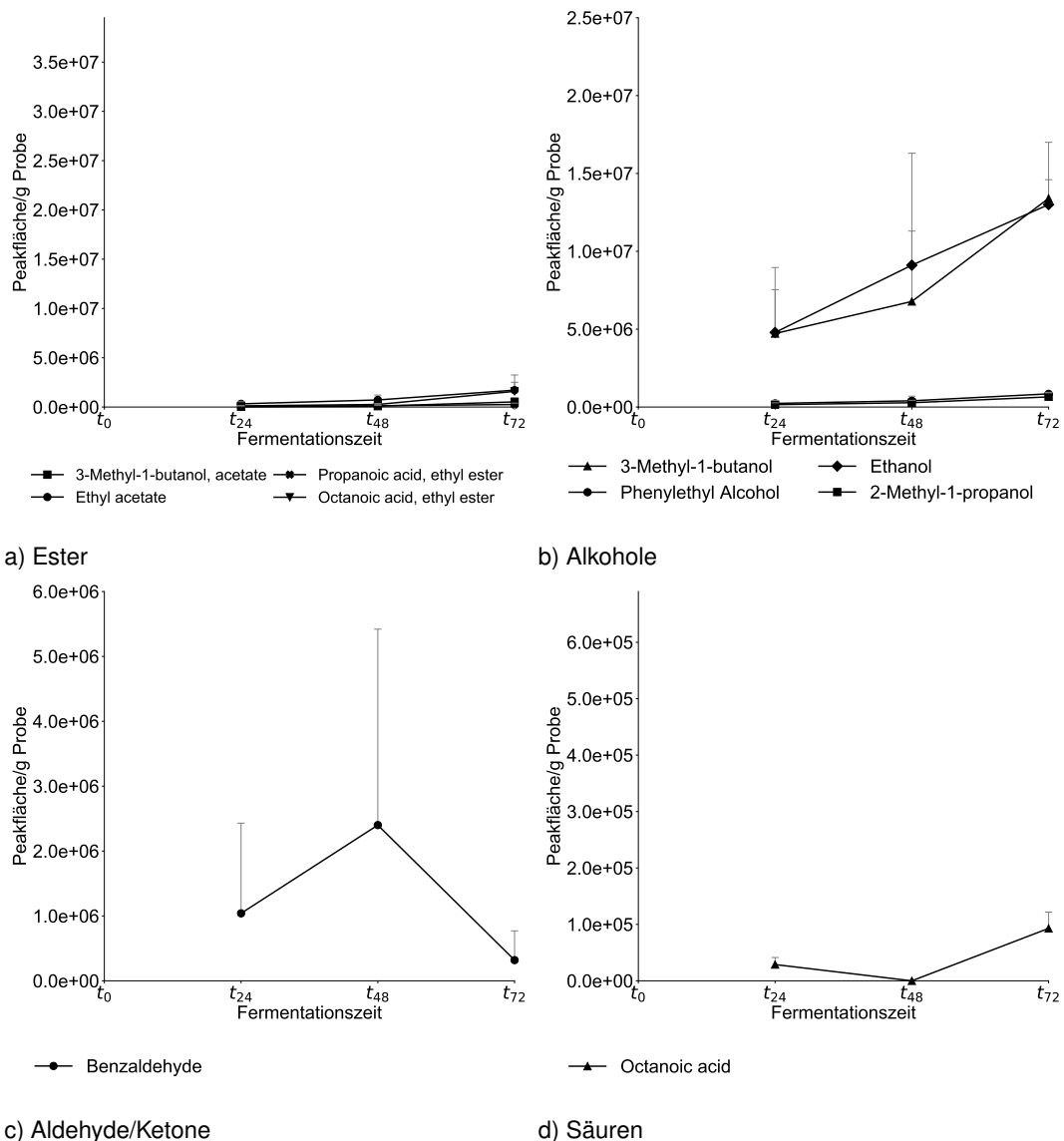


Abbildung 36: Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentationen von indonesischen *T. delbrueckii* (IDI-Y043, IDI-Y057) in KPSM bestimmt mittels GC-MS. Zusammengefasst zu folgenden Stoffgruppen: a) Ester, b) Alkohole, c) Aldehyde/Ketone und d) Säuren

In Abbildung 37 sind die Ergebnisse des ecuadorianischen Isolats IDE-Y064 dargestellt.

4 Ergebnisse

Dieses bildete nur wenige Esterverbindungen, in geringen Konzentrationen. Zum Zeitpunkt t_0 lagen diese nicht vor, Ethyl acetate und Octanoic acid ethyl ester konnten nach 24 h nachgewiesen werden, Hexanoic acid ethyl ester erst nach 48 h (vgl. Abb. 37a). Auch die Alkohole waren zum Zeitpunkt t_0 nicht vorhanden. Die Konzentration von 3-Methyl-1-butanol und Ethanol nahm in den ersten 48 h zu und im weiteren Verlauf ab. Phenylethyl Alcohol wurde kontinuierlich gebildet (vgl. Abb. 37d). Die Konzentration von Octanoic acid veränderte sich kaum im Fermentationsverlauf (vgl. Abb. 37d). Ähnlich verhielt es sich mit Benzaldehyde, hier konnte eine leichte Zunahme beobachtet werden (vgl. Abb. 37c).

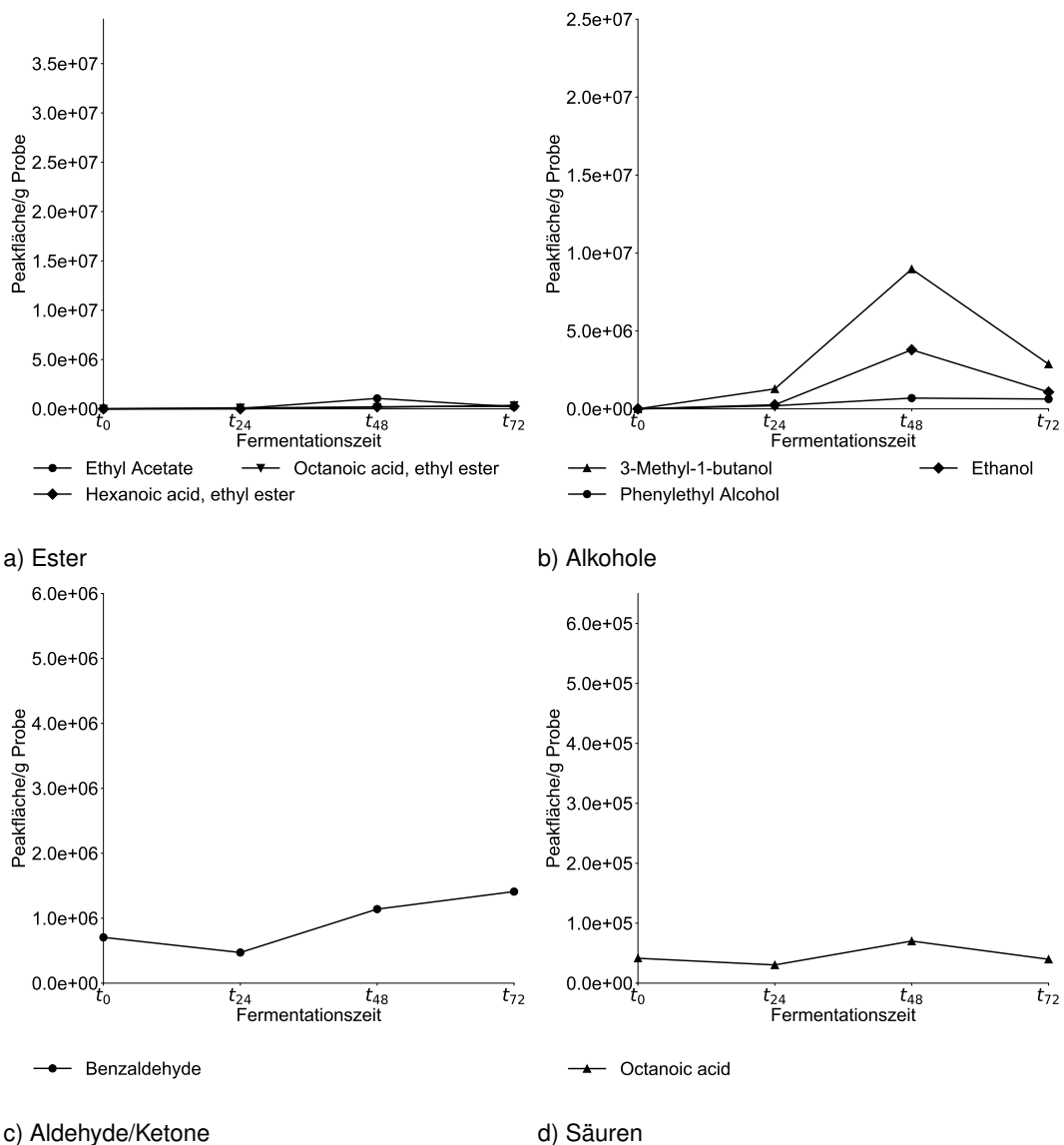


Abbildung 37: Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von ecuadorianischer *T. delbrueckii* (IDE-Y064) in KPSM bestimmt mittels GC-MS. Zusammengefasst zu folgenden Stoffgruppen: a) Ester, b) Alkohole, c) Aldehyde/Ketone und d) Säuren

Pichia kudriavzevii

Die Ergebnisse der *P. kudriavzevii*-Isolate (IDI-Y051, IDI-Y055) sind in Abbildung 38 dargestellt. Die Probe t_{48} von IDI-Y055 wurde nicht gemessen, weswegen hier keine Standardabweichung angegeben ist. Die Ester wurden v.a. in den ersten 24 h gebildet. Die Konzentration von Ethyl acetate, Propanoic acid ethyl ester und Octanoic acid ethyl ester änderte sich im weiteren Verlauf kaum, von 3-Methyl-1-butanol acetate nahm sie ab (vgl. Abb. 38a). Für die Alkohole konnte ein Anstieg in den ersten 48 h beobachtet werden, der Gehalt von 3-Methyl-1-butanol und Ethanol nahm dann ab, von Phenylethyl Alcohol und 2-Methyl-1-propanol blieb er konstant (vgl. Abb. 38b). Die Konzentration von Octanoic acid stieg stetig im Verlauf der Fermentation an (vgl. Abb. 38c). Aldehyde und Ketone wurden nicht gebildet.

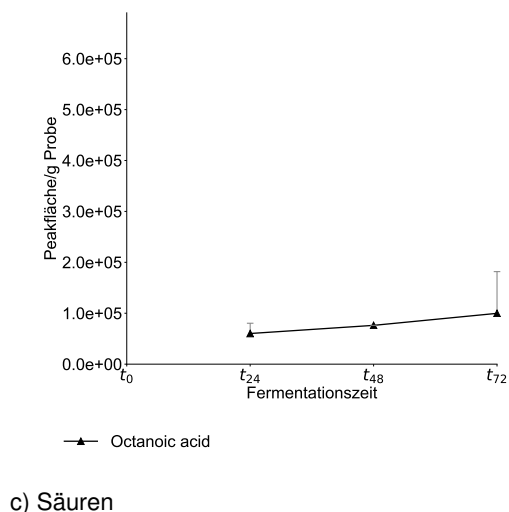
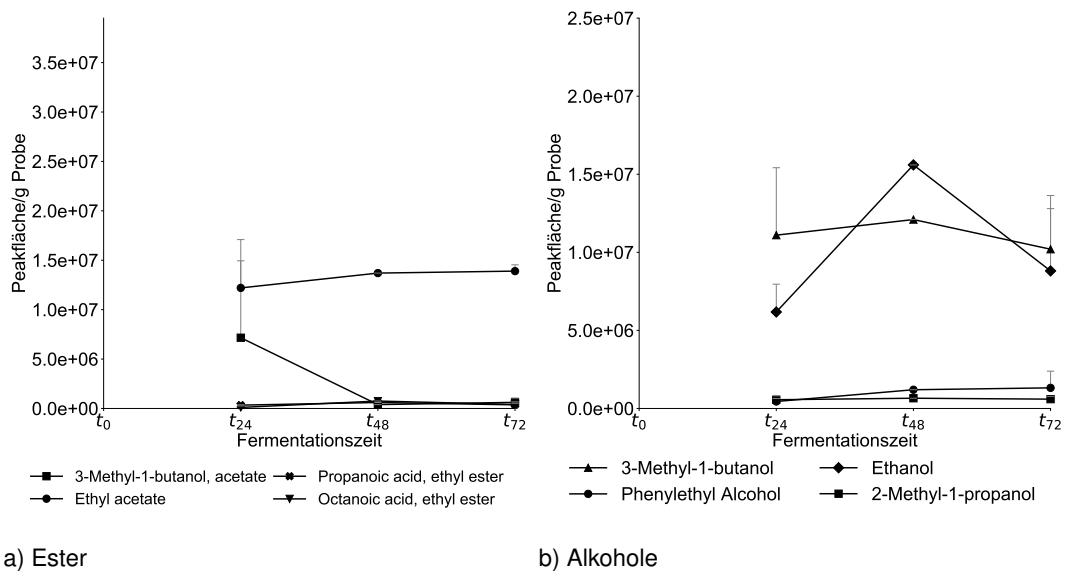
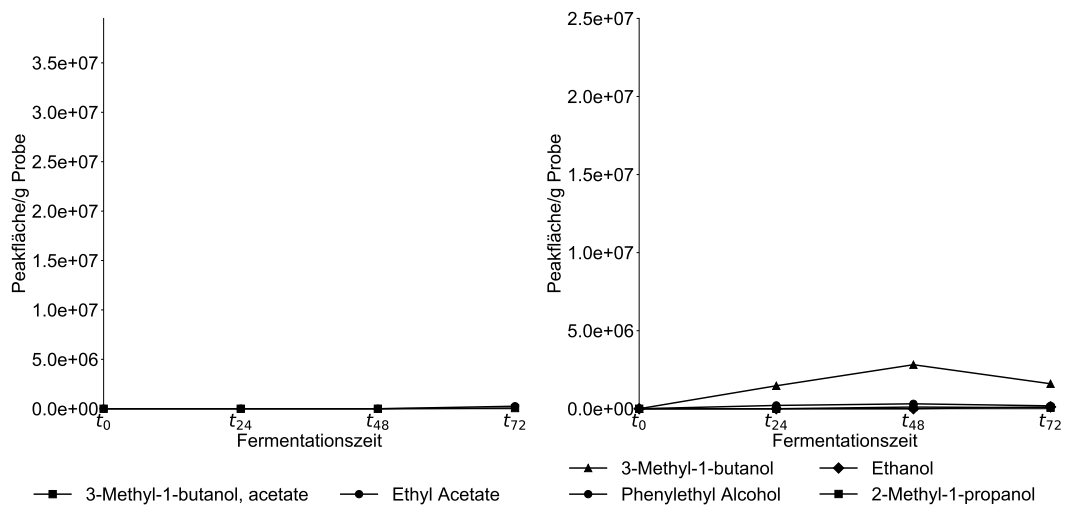


Abbildung 38: Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentationen von *P. kudriavzevii* (IDI-Y051, IDI-Y055) in KPSM bestimmt mittels GC-MS. Zusammengefasst zu folgenden Stoffgruppen: a) Ester, b) Alkohole und c) Säuren

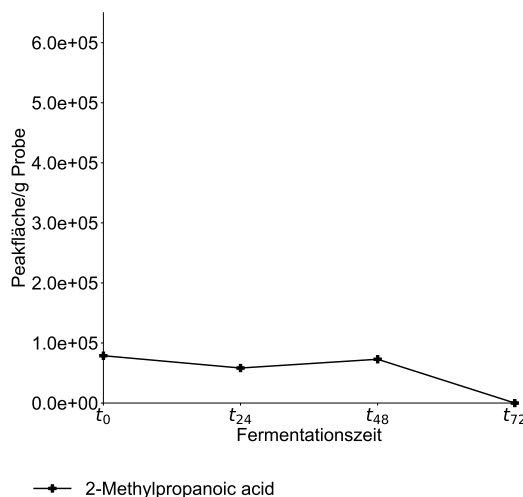
Pichia guilliermondii

Für das *P. guilliermondii*-Isolat (IDE-Y045) bestätigte sich, was bereits im vorherigen Kapitel beobachtet werden konnte. Es bildete im gesamten Fermentationsverlauf kaum volatile Komponenten. Die beiden Ester 3-Methyl-1-butanol acetate und Ethyl acetate konnten erst zum Zeitpunkt t_{72} nachgewiesen werden (vgl. Abb. 39a). Der Gehalt von 3-Methyl-1-butanol nahm in den ersten 48 h zu und sank dann wieder. Ethanol konnte erst zum Zeitpunkt t_{72} nachgewiesen werden, Phenylethyl Alcohol nach 24 h und 2-Methyl-1-propanol nach 48 h (vgl. Abb. 39b). 2-Methylpropanoic acid lag zu Beginn der Fermentation vor und wurde dann vollständig abgebaut (vgl. Abb. 39c).



a) Ester

b) Alkohole



c) Säuren

Abbildung 39: Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von *P. guilliermondii* (IDE-Y045) in KPSM bestimmt mittels GC-MS. Zusammengefasst zu folgenden Stoffgruppen: a) Ester, b) Alkohole und c) Säuren

Pichia anomala

Die Ergebnisse der sieben *P. anomala*-Isolate sind in Abbildung 40 zusammengefasst. Die Ester wurden während der gesamten Fermentation gebildet. Die Konzentration von 3-Methyl-1-butanol acetate stieg stark in den letzten 24 h an (vgl. Abb. 40a). Bis auf 3-Methyl-1-butanol, dessen Gehalt in den letzten 24 h abnahm, wurden alle Alkohole kontinuierlich gebildet (vgl. Abb. 40b). Acetic acid lag zu Beginn in geringer Konzentration vor und wurde ebenfalls während der gesamten Fermentation gebildet. 2-Methylpropanoic acid wurde zum Zeitpunkt t_0 nachgewiesen. Die Säure wurde dann vollständig abgebaut und war nach 72 h nicht mehr vorhanden (vgl. Abb. 40d). Auch Benzaldehyde wurde stetig abgebaut (vgl. Abb. 40c).

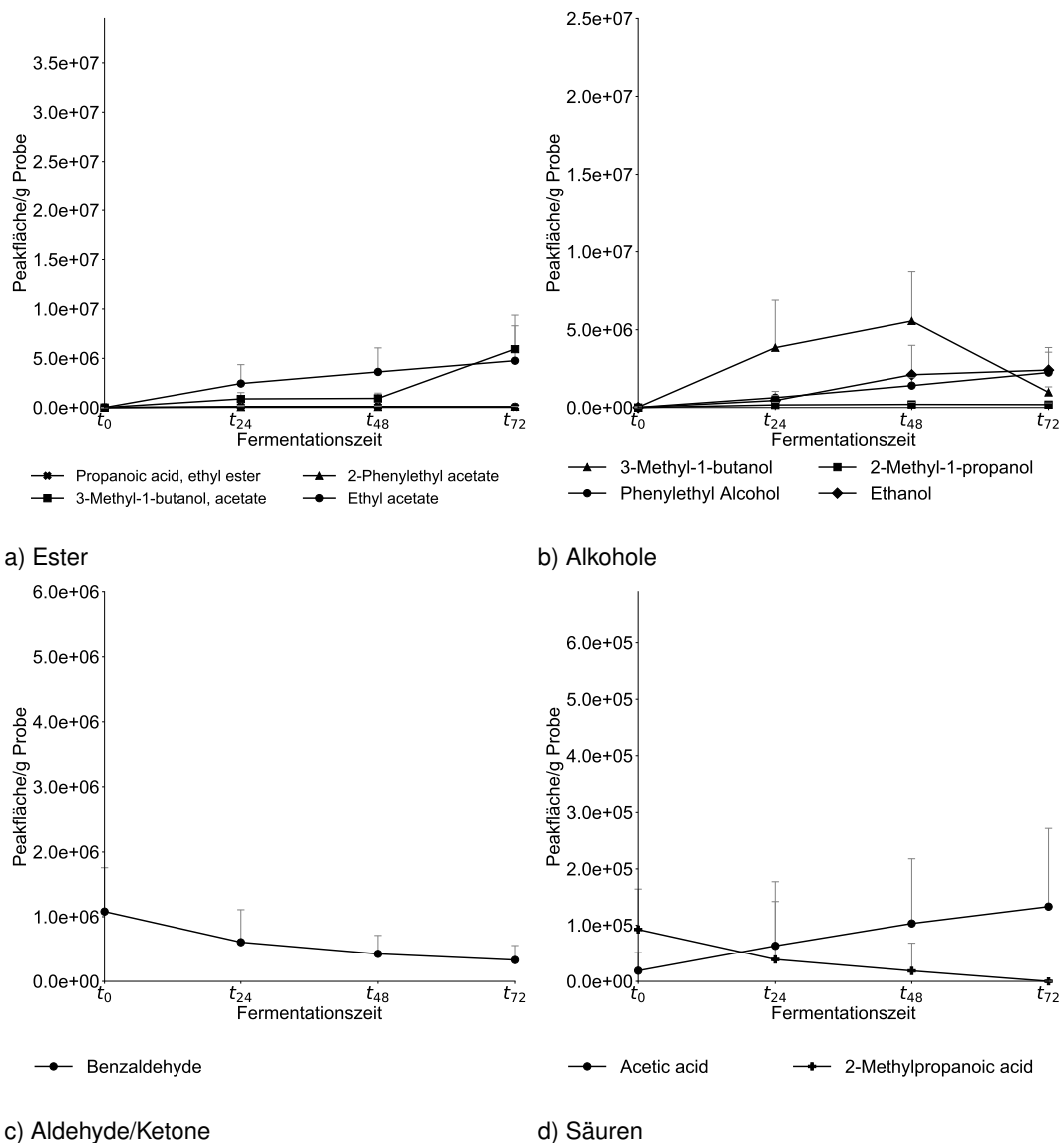


Abbildung 40: Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentationen von *P. anomala* (n=7) in KPSM bestimmt mittels GC-MS. Zusammengefasst zu folgenden Stoffgruppen: a) Ester, b) Alkohole, c) Aldehyde/Ketone und d) Säuren

Hefestämme zur Weinherstellung

Saccharomyces bayanus

Die Fermentationsverläufe der drei *S. bayanus*-Hefen (SIHA[®] 9, EC1118, QA23) sind in Abbildung 41 zusammengefasst. Die Ester wurden kontinuierlich in den ersten 48 h der Fermentation gebildet. Anschließend änderte sich der Gehalt kaum noch (vgl. Abb. 41a). Ähnliches konnte für die Alkohole beobachtet werden (vgl. Abb. 41b). Octanoic acid wurde während der gesamten Fermentation gebildet und n-Decanoic acid v.a. in den ersten 48 h. Acetic acid lag bereits zu Beginn der Fermentation vor und nach 24 h stieg die Konzentration (vgl. Abb. 41d). Der Gehalt von Benzaldehyde nahm kontinuierlich ab (vgl. Abb. 41c).

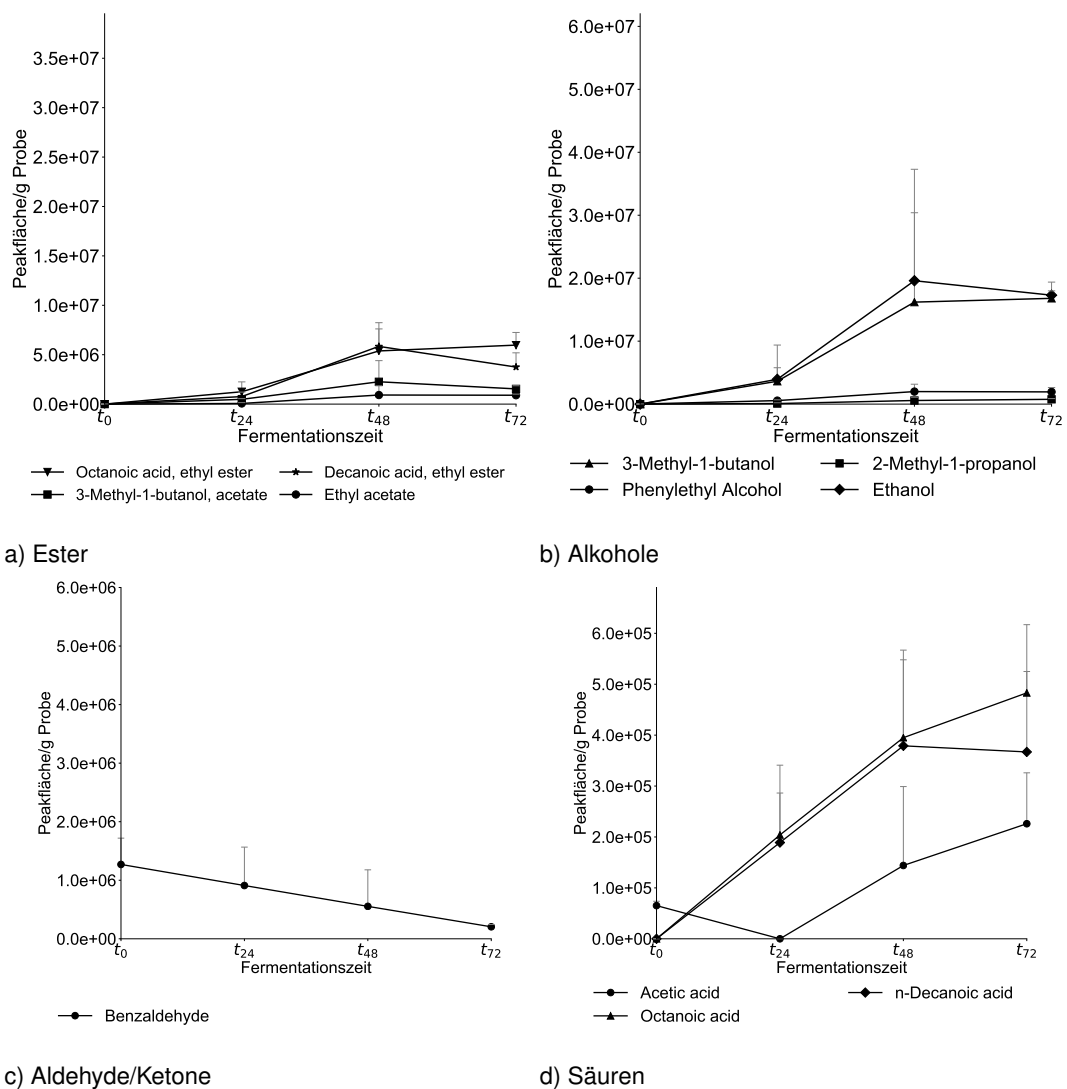


Abbildung 41: Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentationen von *S. bayanus* (SIHA[®] 9, EC1118, QA23) in KPSM bestimmt mittels GC-MS. Zusammengefasst zu folgenden Stoffgruppen: a) Ester, b) Alkohole, c) Aldehyde/Ketone und d) Säuren

Saccharomyces cerevisiae

In Abbildung 42 ist beispielhaft für *S. cerevisiae* der Fermentationsverlauf von Zymaflore® x5 dargestellt, da eine Kakaofermentation in Peru mit dieser Hefe inokuliert wurde (vgl. Kapitel 4.3.2). Die Fermentationsverläufe der beiden anderen Stämme CY3079 und GHM sind in Anhang 5 zusammengefasst. Die Ester wurden in den ersten 48 h der Fermentation gebildet, anschließend sank der Gehalt wieder leicht (vgl. Abb. 42a). Ähnliches konnte für die Alkohole beobachtet werden. Besonders Ethanol wurde in den ersten 48 h in großen Mengen gebildet, danach nahm die Konzentration wieder deutlich ab (vgl. Abb. 42b). Auch die Säuren folgten diesem Muster (vgl. Abb. 42d). Benzaldehyd wurde kontinuierlich abgebaut (vgl. Abb. 42c).

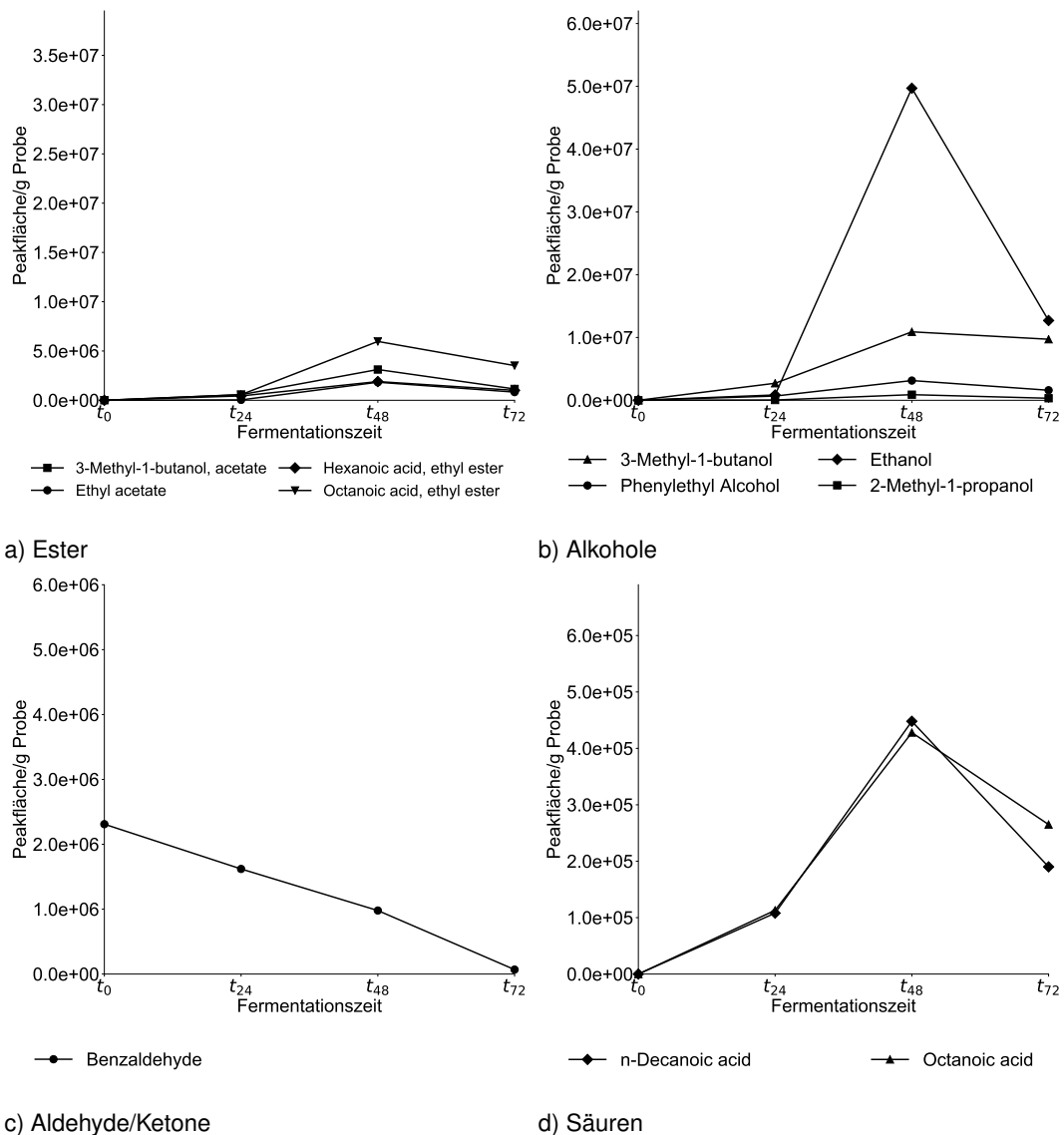


Abbildung 42: Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von Zymaflore® x5 (*S. cerevisiae*) in KPSM bestimmt mittels GC-MS. Zusammengefasst zu folgenden Stoffgruppen: a) Ester, b) Alkohole, c) Aldehyde/Ketone und d) Säuren

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse von *S. cerevisiae* Portwein sind in Abbildung 43 dargestellt. Die Konzentration der Ester nahm im Verlauf der Fermentation zu (vgl. Abb. 43a). Ähnliches konnte für die Alkohole beobachtet werden. Besonders der Gehalt von Ethanol nahm in den letzten 24 h stark zu (vgl. Abb. 43b). Auch die Säuren wurden über den gesamten Fermentationsverlauf gebildet (vgl. Abb. 43d). Lediglich Benzaldehyde, welches bereits zu Beginn vorlag, wurde kontinuierlich abgebaut (vgl. Abb. 43c).

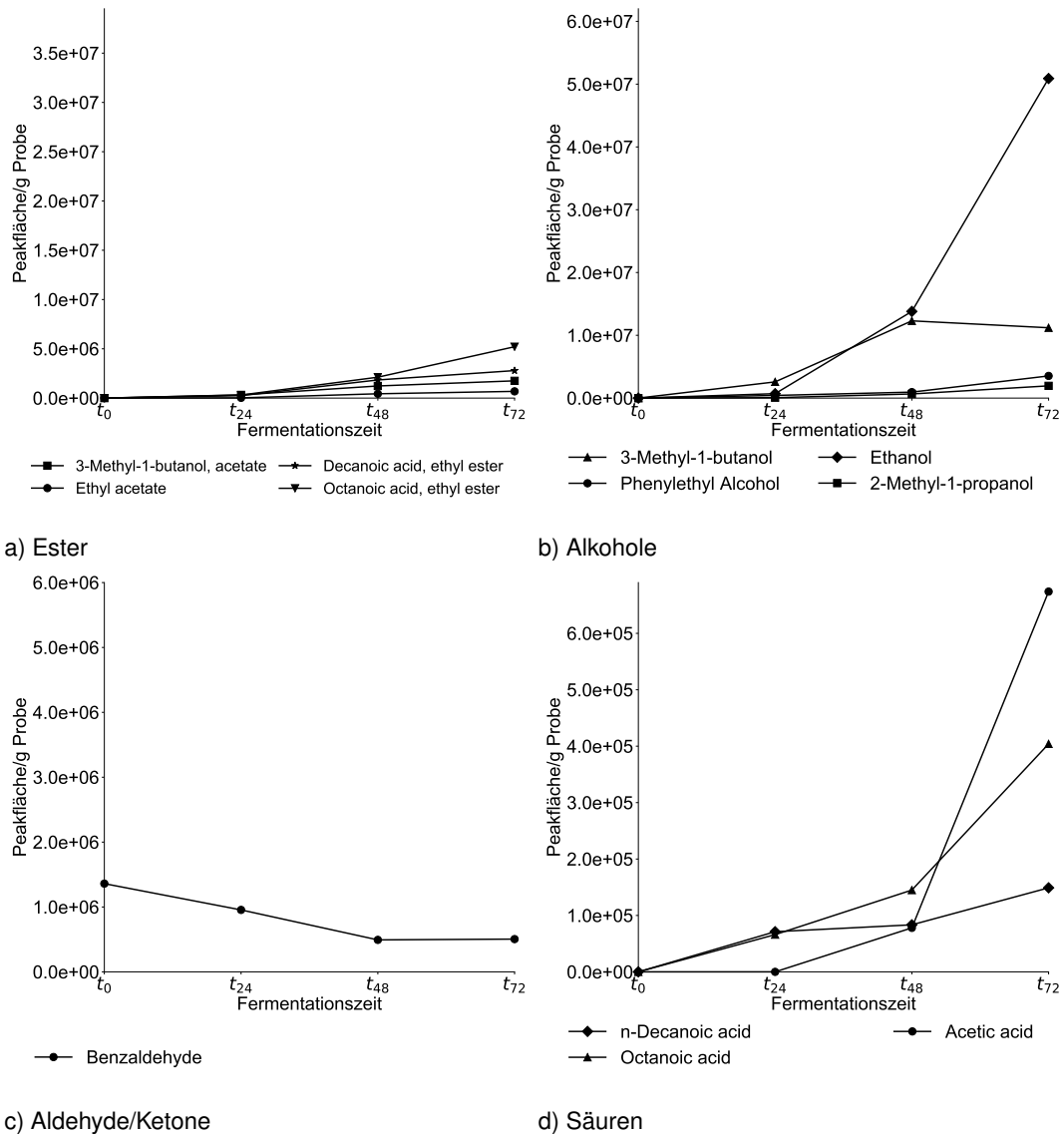
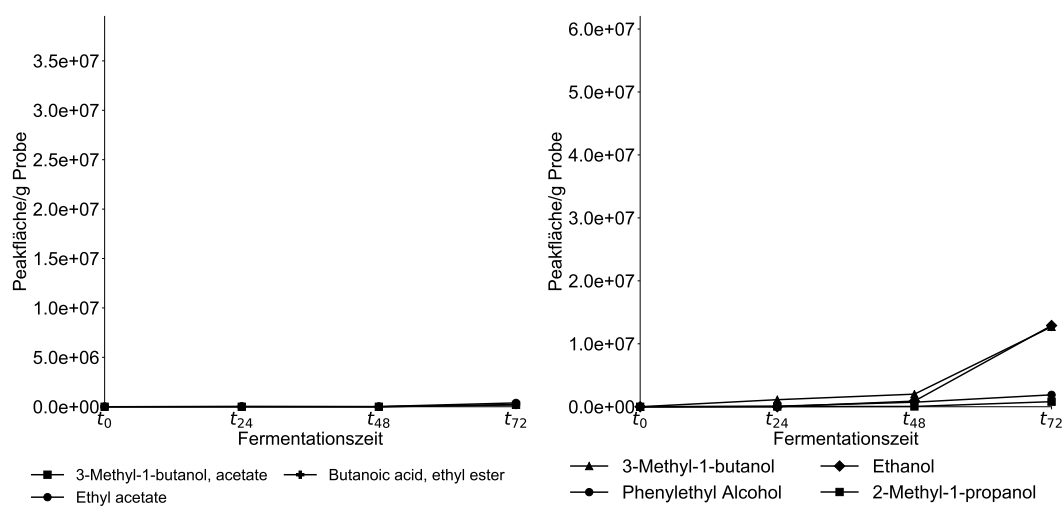


Abbildung 43: Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von *S. cerevisiae* Portwein in KPSM bestimmt mittels GC-MS. Zusammengefasst zu folgenden Stoffgruppen: a) Ester, b) Alkohole, c) Aldehyde/Ketone und d) Säuren

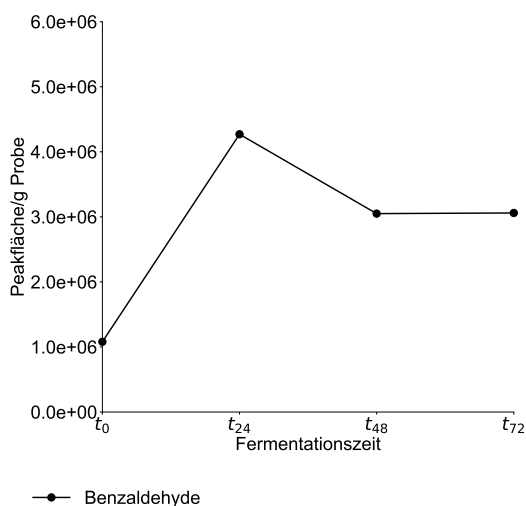
Lachancea thermotolerans

Die Ergebnisse der Fermentation von *L. thermotolerans* sind in Abbildung 44 dargestellt. Die Produktbildung war insgesamt geringer im Vergleich zu den *Saccharomyces* spp.. Esterverbindungen wurden nur in geringen Konzentrationen gebildet. Ethyl acetate konnte bereits zum Zeitpunkt t_0 nachgewiesen werden, 3-Methyl-1-butanol acetate und Butanoic acid ethyl ester erst bei t_{72} (vgl. Abb. 44a). Die Alkohole wurden kontinuierlich während der Fermentation gebildet, insbesondere der Gehalt an Ethanol und 3-Methyl-1-butanol stieg in den letzten 24 h (vgl. Abb. 44b). Benzaldehyde wurde in großen Mengen in den ersten 24 h gebildet, im weiteren Verlauf nahm der Gehalt etwas ab und blieb dann konstant (vgl. Abb. 44c).



a) Ester

b) Alkohole



c) Aldehyde/Ketone

Abbildung 44: Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von *L. thermotolerans* in KPSM bestimmt mittels GC-MS. Zusammengefasst zu folgenden Stoffgruppen: a) Ester, b) Alkohole und c) Aldehyde/Ketone

4 Ergebnisse

Torulaspora delbrueckii

Für *T. delbrueckii* sind die Ergebnisse in Abbildung 45 dargestellt. Ester und Alkohole wurden während der gesamten Fermentation gebildet und vor allem in den letzten 24 h konnte ein Anstieg beobachtet werden (vgl. Abb. 45a und b). Butanoic acid lag nur zum Zeitpunkt t_0 vor und wurde dann abgebaut (vgl. Abb. 45d). Benzaldehyde wurde in den ersten 48 h der Fermentation verbraucht und in den letzten 24 h von der Hefe in geringen Mengen gebildet (vgl. Abb. 45c).

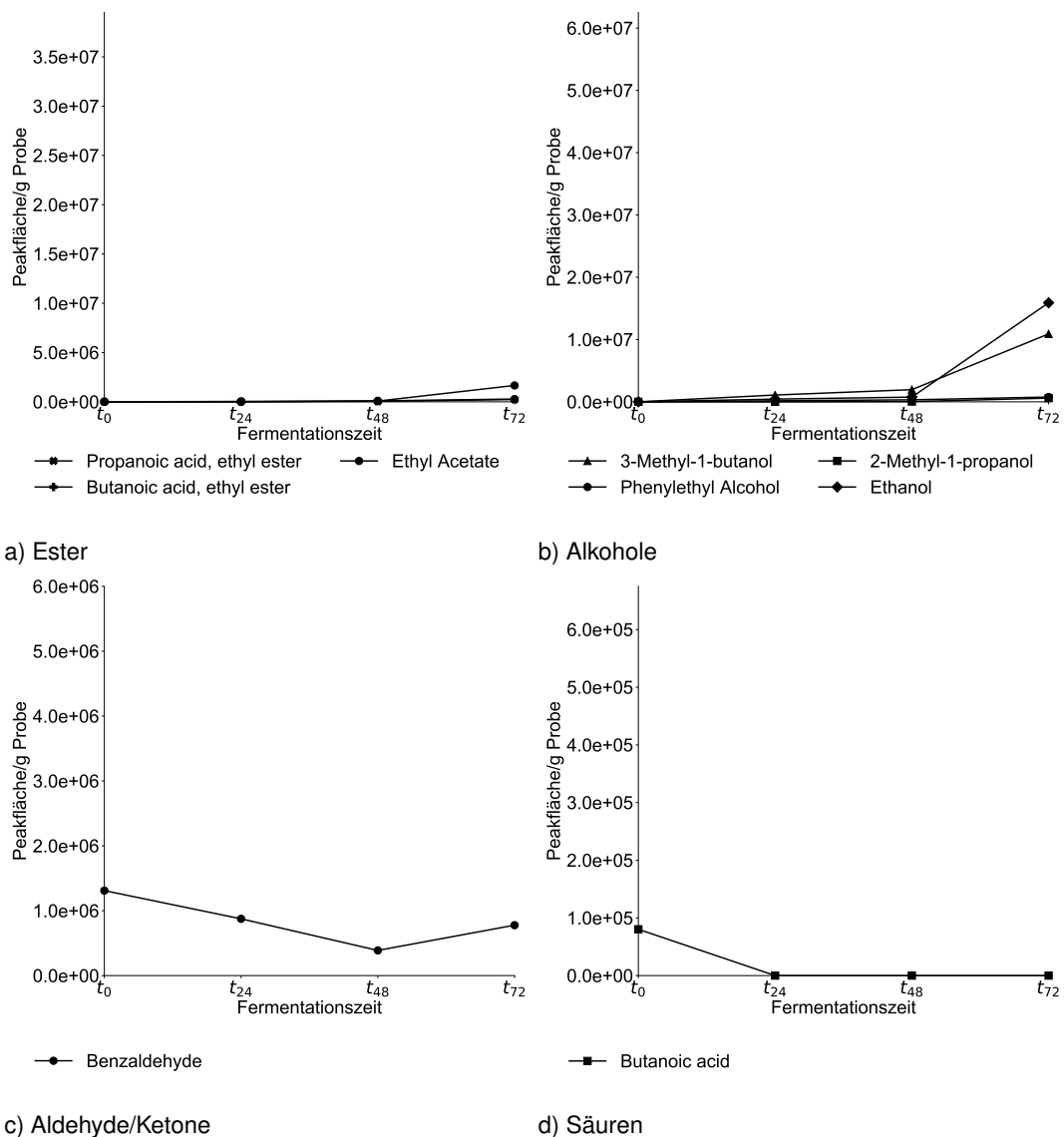


Abbildung 45: Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Fermentation von *T. delbrueckii* in KPSM bestimmt mittels GC-MS. Zusammengefasst zu folgenden Stoffgruppen: a) Ester, b) Alkohole, c) Aldehyde/Ketone und d) Säuren

4.1.3 Identifizierung geruchsaktiver Substanzen mittels GC-O

Um einen Eindruck zu erhalten, welche der identifizierten volatilen Substanzen geruchsaktiv sind und wie diese Gerüche beschrieben werden können, wurden sechs Hefeproben (t_{72}) mittels GC-O analysiert. Insgesamt konnten dabei 30 Substanzen in den analysierten Proben detektiert werden. In Tabelle 11 sind die in den unterschiedlichen Proben wahrgenommenen, volatilen Komponenten dargestellt. In Klammern sind jeweils die Intensitäten (5-Punkt-Skala) angegeben, die von den Panelisten zusätzlich zur Geruchsbeschreibung abgefragt wurden. Einige Substanzen wurden in fast allen Proben sensorisch wahrgenommen und das mit zum Teil hohen Intensitäten zwischen 2 und 4, so z.B. die Ester 2-Methylpropanoic acid ethyl ester, Butanoic acid ethyl ester und 3-Methylbutanoic acid ethyl ester. Auch Ethyl acetate, Hexanoic acid ethyl ester und Heptanoic acid ethyl ester wurden in fast allen Proben detektiert. Die Substanz 3-Methyl-1-butanol konnte in allen Proben identifiziert werden. Insgesamt waren vor allem Esterverbindungen sensorisch wahrnehmbar. Auffällig war die Probe IDI-Y031. Hier wurden deutlich weniger Substanzen und diese nur mit geringen Intensitäten detektiert, bis auf 1,1-Diethoxyethane, welches sehr deutlich und nur in dieser Probe gerochen wurde. Auch wurden kaum Esterverbindungen wahrgenommen.

Die Beschreibungen der Panelisten zu den einzelnen Substanzen sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Die detektierten Esterverbindungen wurden hauptsächlich mit Adjektiven wie fruchtig, süßlich, blumig und bestimmten Früchten beschrieben. Dies deckte sich in vielen Fällen mit den Beschreibungen, die in der Literatur gefunden wurden. Die enthaltenen Alkohole wurden größtenteils mit weniger positiven Attributen beschrieben. Bei diesen Verbindungen fielen Begriffe wie muffig, stechend, alkoholisch, grün und süßlich. 3-Methyl-1-butanol wurde als süßlich, fruchtig mit Kakao- und Schokoladennoten und einem leicht fermentierten, muffigen Geruch wahrgenommen. Phenylethyl Alcohol wurde lediglich in der Probe IDI-Y051 detektiert und mit den Attributen stinkig und hefig und einer Intensität von 2 beschrieben. Die blumigen und honigartigen Noten, die in der Literatur beschrieben sind, wurden nicht genannt. Die detektierten Säuren wurden mit geringen Intensitäten zwischen 1 und 2 und Attributen wie süßlich, fruchtig aber auch stechend und muffig charakterisiert. In der Literatur werden Säuren wie Butanoic acid und Octanoic acid eher mit Adjektiven wie käsig und süßlich beschrieben.

Tabelle 11: Auflistung der volatilen, aromaaktiven Komponenten einiger aus Kakaofermentationen isolierter Hefestämme nach 72-stündiger Fermentation von KPSM, bestimmt mittels GC-O und Angabe der Intensität in Klammern (5-Punkt-Skala)

Substanz	IDI-Y014	IDI-Y019	IDI-Y031	IDI-Y035	IDI-Y043	IDI-Y051
p- α -Dimethylphenethylamine				x (4)		x (1)
Acetaldehyde	x (4)					
2,4-Dimethylheptane	x (2)		x (1)	x (3)		
Ethyl acetate		x (2)		x (3)	x (1)	x (3)
1,1-Diethoxyethane			x (4)			
Ethanol	x (2)					
2-Methylpropanoic acid, ethyl ester	x (4)	x (3)		x (3)	x (3)	x (3)
Butanoic acid, ethyl ester	x (4)	x (2)		x (3)	x (2)	x (3)
3-Methylbutanoic acid, ethyl ester	x (4)	x (3)			x (2)	x (4)
Acetic acid, butyl ester				x (3)		
Pentanoic acid, ethyl ester	x (2)	x (1)			x (1)	
2-Methyl-1-propanol				x (1)		
3-Methyl-1-butanol, acetate			x (1)	x (2)		
1-Butanol			x (1)			
3-Methyl-1-butanol	x (4)	x (2)	x (1)	x (3)	x (1)	x (2)
Hexanoic acid, ethyl ester	x (2)	x (2)		x (2)	x (1)	x (1)
Heptanoic acid, ethyl ester	x (1)		x (1)	x (2)		x (1)
1,3-Di-tert-butylbenzene						x (2)
Octanoic acid, ethyl ester		x (2)			x (1)	x (2)
Acetic acid	x (1)				x (1)	x (2)

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 11 – Fortsetzung vorherige Seite

Substanz	IDI-Y014	IDI-Y019	IDI-Y031	IDI-Y035	IDI-Y043	IDI-Y051
1-Heptanol		x (2)				x (1)
Benzaldehyde		x (1)	x (1)	x (2)		
Nonanoic acid, ethyl ester		x (2)			x (1)	
2-Methylpropanoic acid			x (1)			
1-Octanol	x (1)				x (1)	x (1)
Butanoic acid		x (2)				
Oxime-, methoxy-phenyl-		x (2)			x (2)	
Dodecanoic acid, ethyl ester		x (2)				x (3)
Phenylethyl Alcohol						x (2)
Octanoic acid	x (1)	x (2)			x (1)	
2,4-Di-tert-butylphenol					x (1)	

67

Tabelle 12: Geruchsbeschreibungen der aromaaktiven Substanzen einiger aus Kakaofermentationen isolierter Hefestämme nach 72-stündiger Fermentation von KPSM, bestimmt mittels GC-O und Vergleich mit Literaturbeschreibungen

Substanz	Beschreibung durch Panelisten	Literaturvergleich (TheGoodScentsCompany, o.J.)
p- α -Dimethylphenethylamine	citrus, pfeffrig, süßlich	nicht verfügbar
Acetaldehyde	fermentiert, gärig, leicht alkoholisch	stechend, etherisch, fruchtig, muffig
2,4-Dimethylheptane	süßlich, blumig, leicht metallisch, Kakao, schokoladig, leicht erdig	nicht verfügbar
Ethyl acetate	fruchtig, süßlich, leicht nach Bonbon, fermentiert, schokoladig, leicht alkoholisch	etherisch, fruchtig, süßlich, grün
1,1-Diethoxyethane	alkoholisch, stechend, Lösungsmittel	etherisch, grün, erdig, süßlich, gemüseartig

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 12 – Fortsetzung vorherige Seite

Substanz	Beschreibung durch Panelisten	Literaturvergleich (TheGoodScentsCompany, o.J.)
Ethanol	staubig, leicht muffig	alkoholisch, medizinisch
2-Methylpropanoic acid, ethyl ester	blumig, süßlich, fruchtig, Melone, Erdbeere	süßlich, etherisch, fruchtig, mit Rum/alkohol. Note
Butanoic acid, ethyl ester	blumig, süßlich, fruchtig, Melone, Erdbeere	fruchtig, Fruchtsaft, Ananas
3-Methylbutanoic acid, ethyl ester	süßlich, blumig, fruchtig, frisch, Blaubeere	fruchtig, süßlich, Apfel, Ananas, Orange
Acetic acid, butyl ester	süßlich, Erdbeer, fruchtig, leicht muffig, alkoholisch	fruchtig, Banane, etherisch
Pentanoic acid, ethyl ester	blumig, süßlich, fruchtig, Honigmelone	fruchtig, süßlich, säuerlich, Ananas, tropisch (Frucht)
2-Methyl-1-propanol	leicht chemisch	etherisch, nach Wein
3-Methyl-1-butanol, acetate	leicht süßlich	süßlich, fruchtig, Banane
1-Butanol	fruchtig, leicht stechend, alkoholisch	Fuselöl, süßlich, fruchtig, leicht alkoholisch
3-Methyl-1-butanol	süßlich, fruchtig, Kakao, schokoladig, leicht fermentiert, muffig	Fuselöl, alkoholisch, Whiskey, Banane, fruchtig
Hexanoic acid, ethyl ester	Erdbeer, fruchtig, süßlich, leicht blumig, beerig	fruchtig, süßlich, Ananas, leicht grüne Banane
Heptanoic acid, ethyl ester	blumig, fruchtig, leicht muffig, fermentiert	fruchtig, süßlich, Ananas, Banane, beerig
1,3-Di-tert-butylbenzene	leicht schokoladig, muffig	nicht verfügbar
Octanoic acid, ethyl ester	citrus, fruchtig, frisch, süßlich	fruchtig, Wein, wachsig, süßlich, Aprikose, Banane, Brandy
Acetic acid	leicht muffig, gärig, süßlich, stechend	sauer, beißend, stechend, Essig
1-Heptanol	frisch, stechend, sauer, leicht süßlich	stechend, grün, muffig, süßlich
Benzaldehyde	leicht erdig, muffig, nussig, citrus	nussig, süßlich, fruchtig, herb
Nonanoic acid, ethyl ester	grün, citrus	fruchtig, wachsig, Apfel, Banane, alkoholisch
2-Methylpropanoic acid	leicht süßlich, blumig	käsigt, Butter, ranzig, süßlich
1-Octanol	leicht erdig, muffig, würzig, metallisch	wachsig, grün, leicht pilzig
Butanoic acid	fruchtig, leicht citrus	käsigt, Butter, fruchtig
Oxime-, methoxy-phenyl-	süßlich, fruchtig, leicht grün, erdig	nicht verfügbar

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 12 – Fortsetzung vorherige Seite

Substanz	Beschreibung durch Panelisten	Literaturvergleich (TheGoodScentsCompany, o.J.)
Dodecanoic acid, ethyl ester	süßlich, gärig, hefig	süßlich, wachsig, seifig, blumig
Phenylethyl Alcohol	stinkig, hefig	süßlich, blumig, Honig, leicht nach Brot
Octanoic acid	leicht erdig, muffig, säuerlich, süßlich,	fettig, wachsig, ranzig, käsig
2,4-Di-tert-butylphenol	leicht stinkig	nicht verfügbar

4.1.4 Gruppierung der Hefen

Um Strukturen in den Datensätzen aufzudecken und eine Einteilung der Hefestämme in verschiedene Gruppen vornehmen zu können, wurde eine Clusteranalyse durchgeführt. Grundlage für die Clusterung bildeten die enthaltenen volatilen Komponenten und deren Konzentrationen in den t_{72} -Proben der einzelnen Hefestämme. Die aus Kakaofermentationen isolierten Hefestämme und die Hefestämme zur Weinherstellung wurden gleichermaßen in die Clusterung miteinbezogen. Die Klassen, die sich durch die Clusteranalyse ergaben, sind in Tabelle 13 dargestellt. Die Hefestämme wurden in vier Klassen eingeteilt, wobei sich Klasse 1 aus 22 (K1), Klasse 2 aus 27 (K2) und Klasse 3 aus 23 (K3) Isolaten zusammensetzte. In Klasse 4 befand sich lediglich der *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm Portwein (K4), da dieser keiner der anderen Klassen zugeordnet werden konnte. Das zentrale Objekt von Klasse 1 war das Hefeisolat IDI-Y002, das von Klasse 2 war IDE-Y051 und von Klasse 3 war es IDI-Y037. Die zentralen Objekte repräsentieren die jeweiligen Klassen und gruppieren die weiteren Clusterobjekte um sich. K1 setzte sich überwiegend aus indonesischen *S. cerevisiae*-Stämmen zusammen, zudem wurden die beiden indonesischen *Torulasporea delbrueckii*-Isolate und der *Candida tropicalis*-Stamm hier eingeordnet. Fast alle Hefestämme zur Weinherstellung befanden sich in dieser Gruppe. In K2 waren alle Hefeisolate aus Trinidad und Tobago sowie fast alle ecuadorianischen Hefestämme zusammengefasst. Zudem wurden alle *Hanseniaspora* spp. und *Pichia* spp. hier eingeordnet. Auch einige indonesische *S. cerevisiae*-Isolate befanden sich in dieser Klasse, hauptsächlich aus Gruppe 2 (vgl. 4.1.1). Klasse 3 setzte sich überwiegend aus indonesischen *S. cerevisiae*-Stämmen zusammen. Zudem wurden das ecuadorianische *S. cerevisiae*-Isolat und der *Saccharomyces bayanus*-Stamm SIHA[®] 9 zur Weinherstellung hier eingeordnet. Das Dendrogramm in Abbildung 46 stellt die Cluster-Lösung der Clusteranalyse dar. Es zeigt sich, dass K1 und K3 insgesamt ähnlich sind und auch die Distanz zu K4 ist weniger groß. K2 hingegen unterscheidet sich sehr deutlich von den drei anderen Clustern.

Einige Substanzen führten zu einer Unterscheidung zwischen allen Klassen. In Klammern ist die Klasse angegeben, die jeweils die höchste Konzentration aufwies. Bei den Substanzen handelte es sich um 3-Methyl-1-butanol (K1 und K3), 3-Methyl-1-butanol acetate (K4), 1-Octanol (K3), 2-Methyl-1-propanol (K4), Acetic acid (K4), 2-Phenylethyl acetate (K4), Benzaldehyde (K3), Butanoic acid ethyl ester (K4), Ethanol (K4), Ethyl acetate (K2), Phenylethyl Alcohol (K4) und p- α -Dimethylphenethylamine (K4). Esterverbindungen, wie z.B. Hexanoic

4 Ergebnisse

acid ethyl ester, Heptanoic acid ethyl ester, Octanoic acid ethyl ester und Decanoic acid ethyl ester waren am meisten in Klasse 3 vertreten, gefolgt von Klasse 1. Klasse 2 unterschied sich bezüglich dieser Substanzen deutlich, da sie von diesen Hefestämmen kaum gebildet wurden. Lediglich der Ester Propanoic acid ethyl ester war für diese Klasse charakteristisch und die Hefen der anderen Cluster produzierten diesen nicht. Der *S. cerevisiae*-Stamm Portwein bildete insgesamt wenige dieser Esterverbindungen, aber Octanoic acid ethyl ester und Decanoic acid ethyl ester lagen in ähnlicher Konzentration wie in K1 und K3 vor. Ähnliches konnte für die Säuren, wie Butanoic acid, Octanoic acid und n-Decanoic acid beobachtet werden. Auch diese wurden in höchsten Konzentrationen von den Hefestämmen der Klasse 3 gebildet, gefolgt von denen aus Klasse 1. In Klasse 2 konnten diese Säuren kaum nachgewiesen werden. Octanoic acid und n-Decanoic acid wurden in Klasse 4 in ähnlichen Konzentrationen wie in Klasse 1 detektiert.

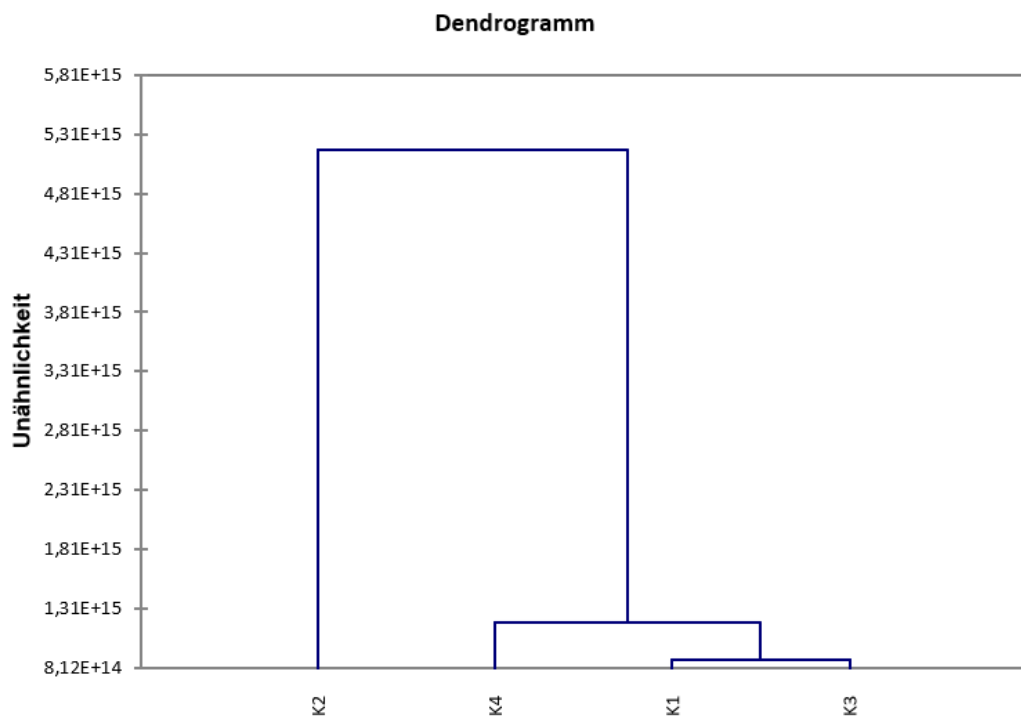


Abbildung 46: Dendrogramm der hierarchisch-agglomerativen Clusteranalyse aller analysierten Hefestämme

Tabelle 13: Klasseneinteilung aller Hefestämme durch die hierarchisch-agglomerative Clusteranalyse

Klasse 1		Klasse 2		Klasse 3		Klasse 4	
Name	Spezies	Name	Spezies	Name	Spezies	Name	Spezies
IDI-Y001	<i>S. cerevisiae</i>	IDT-Y13	<i>Candida sp.</i>	IDE-Y096	<i>S. cerevisiae</i>	Portwein	<i>S. cerevisiae</i>
IDI-Y002	<i>S. cerevisiae</i>	IDT-Y11	<i>H. guilliermondii</i>	IDI-Y010	<i>S. cerevisiae</i>		
IDI-Y003	<i>S. cerevisiae</i>	IDT-Y15	<i>S. cerevisiae</i>	IDI-Y018	<i>S. cerevisiae</i>		
IDI-Y004	<i>S. cerevisiae</i>	IDI-Y035	<i>H. guilliermondii</i>	IDI-Y020	<i>S. cerevisiae</i>		
IDI-Y005	<i>S. cerevisiae</i>	IDI-Y036	<i>H. guilliermondii</i>	IDI-Y021	<i>S. cerevisiae</i>		
IDI-Y008	<i>S. cerevisiae</i>	IDI-Y030	<i>H. opuntiae</i>	IDI-Y022	<i>S. cerevisiae</i>		
IDI-Y011	<i>S. cerevisiae</i>	IDI-Y034	<i>H. thailandica</i>	IDI-Y024	<i>S. cerevisiae</i>		
IDI-Y012	<i>S. cerevisiae</i>	IDI-Y006	<i>S. cerevisiae</i>	IDI-Y027	<i>S. cerevisiae</i>		
IDI-Y013	<i>S. cerevisiae</i>	IDI-Y007	<i>S. cerevisiae</i>	IDI-Y028	<i>S. cerevisiae</i>		
IDI-Y014	<i>S. cerevisiae</i>	IDI-Y017	<i>S. cerevisiae</i>	IDI-Y029	<i>S. cerevisiae</i>		
IDI-Y015	<i>S. cerevisiae</i>	IDI-Y038	<i>S. cerevisiae</i>	IDI-Y032	<i>S. cerevisiae</i>		
IDI-Y016	<i>S. cerevisiae</i>	IDI-Y041	<i>S. cerevisiae</i>	IDI-Y033	<i>S. cerevisiae</i>		
IDI-Y031	<i>C. tropicalis</i>	IDI-Y053	<i>S. cerevisiae</i>	IDI-Y037	<i>S. cerevisiae</i>		
IDI-Y043	<i>T. delbrueckii</i>	IDI-Y056	<i>S. cerevisiae</i>	IDI-Y040	<i>S. cerevisiae</i>		
IDI-Y057	<i>T. delbrueckii</i>	IDI-Y051	<i>P. kudriavzevii</i>	IDI-Y042	<i>S. cerevisiae</i>		
CY3079	<i>S. cerevisiae</i>	IDI-Y055	<i>P. kudriavzevii</i>	IDI-Y044	<i>S. cerevisiae</i>		
Zymaflore® x5	<i>S. cerevisiae</i>	IDI-Y019	<i>S. roseus</i>	IDI-Y045	<i>S. cerevisiae</i>		
GHM	<i>S. cerevisiae</i>	IDE-Y068	<i>H. uvarum</i>	IDI-Y046	<i>S. cerevisiae</i>		
QA23	<i>S. bayanus</i>	IDE-Y022	<i>P. anomala</i>	IDI-Y047	<i>S. cerevisiae</i>		
EC 1118	<i>S. bayanus</i>	IDE-Y035	<i>P. anomala</i>	IDI-Y048	<i>S. cerevisiae</i>		

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 13 – Fortsetzung vorherige Seite

Klasse 1		Klasse 2		Klasse 3		Klasse 4	
Name	Spezies	Name	Spezies	Name	Spezies	Name	Spezies
L. thermotolerans	<i>L. thermotolerans</i>	IDE-Y037	<i>P. anomala</i>	IDI-Y049	<i>S. cerevisiae</i>		
T. delbrueckii	<i>T. delbrueckii</i>	IDE-Y050	<i>P. anomala</i>	IDI-Y054	<i>S. cerevisiae</i>		
		IDE-Y051	<i>P. anomala</i>	SIHA® 9	<i>S. bayanus</i>		
		IDE-Y058	<i>P. anomala</i>				
		IDE-Y036	<i>P. anomala</i>				
		IDE-Y045	<i>P. guilliermondii</i>				
		IDE-Y064	<i>T. delbrueckii</i>				

4.2 Analyse der volatilen Komponenten der Realmatrix-Proben

4.2.1 Darstellung der identifizierten volatilen Substanzen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige Kakaopulpe-Proben unterschiedlicher Herkunft mittels GC-MS analysiert. Insgesamt wurden 52 Substanzen in diesen Proben bestimmt. Diese Stoffe sind mit den jeweiligen CAS-Nr. in Anhang 6 aufgeführt. Weitere Peaks wurden detektiert, ließen sich bei der Auswertung allerdings nicht eindeutig identifizieren. Die Konzentrationen der volatilen Komponenten in den Pulpe-Proben waren insgesamt höher im Vergleich zu den zuvor dargestellten KPSM-Fermentationen. In den folgenden Abbildungen werden die Hauptkomponenten, deren Peakfläche/g Probe größer als $5,0 \times 10^5$ ist, dargestellt.

Kakaofrüchte aus Vietnam

Von den frischen Kakaofrüchten aus Vietnam wurde ein Homogenisat aus Pulpe und Samen analysiert. Die Hauptkomponenten sind in Abbildung 47 dargestellt. Den größten Anteil machte 2-Pentanol aus. Alle weiteren Substanzen lagen in deutlich geringeren Mengen vor, wie z.B. 2-Pentanone, 2-Pentanol acetate, 2-Heptanone, 3-Methyl-1-butanol und 2-Heptanol.

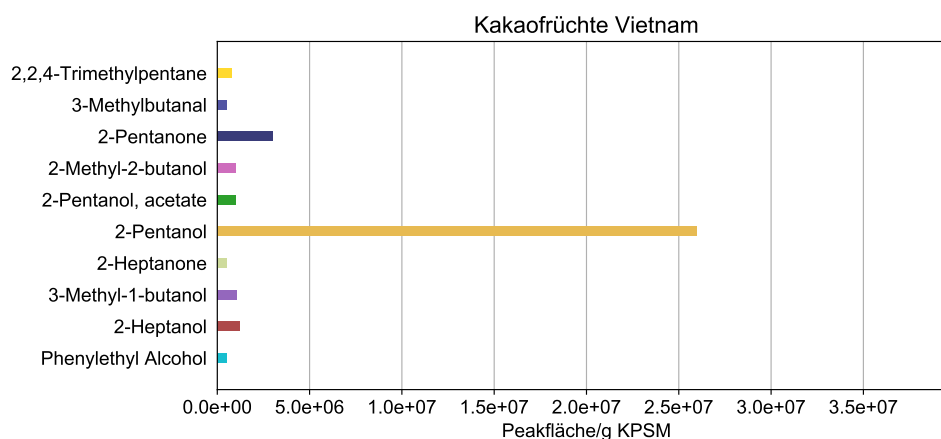


Abbildung 47: Darstellung der Hauptkomponenten des Homogenisats von Pulpe und Samen aus vietnamesischen Kakaofrüchten (n=1)

Kakaopulpe aus Peru

In Abbildung 48 sind die Ergebnisse der Zweifachbestimmung der Pulpe aus Quillabamba, Peru dargestellt. Den größten Anteil machte Ethyl acetate aus, gefolgt von 2-Pentanol acetate, Decanoic acid ethyl ester und Dodecanoic acid ethyl ester. Einige weitere Substanzen konnten

4 Ergebnisse

in etwas geringeren Konzentrationen nachgewiesen werden, wie z.B. Octanoic acid ethyl ester, Ethanol, 3-Methyl-1-butanol acetate, 3-Methyl-1-butanol und 2-Heptanol acetate. Im Vergleich zu der Probe aus Vietnam wies die peruanische Pulpe deutlich mehr volatile Hauptkomponenten auf und dies in deutlich höheren Konzentrationen.

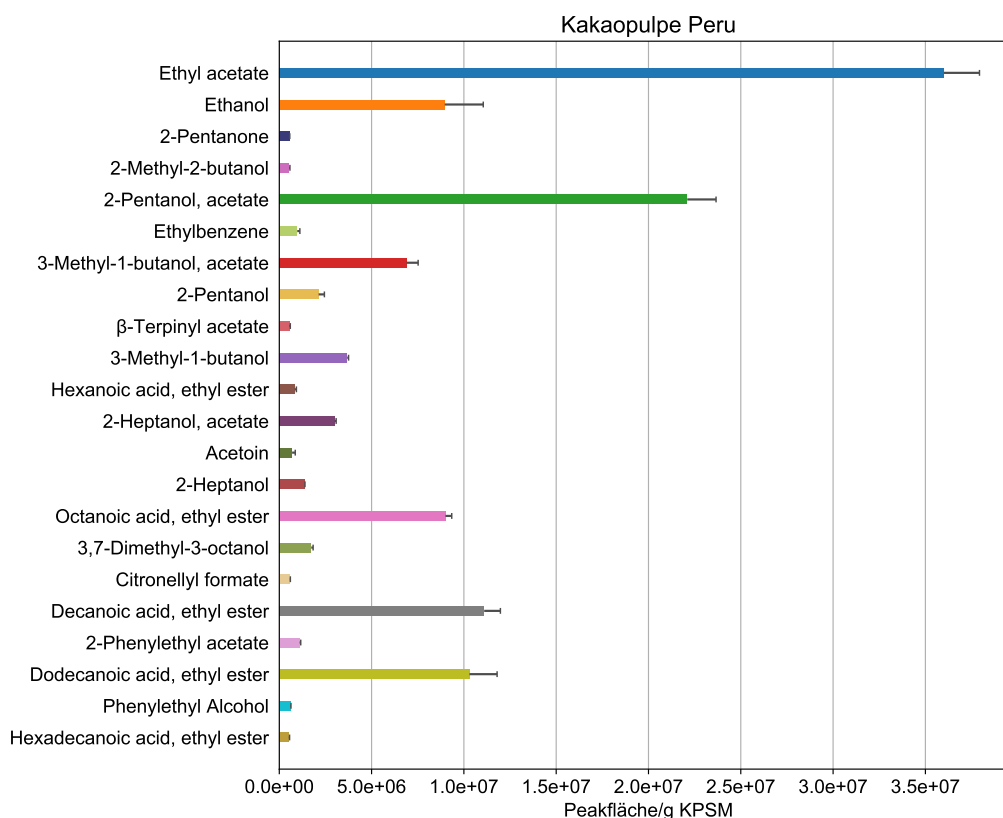


Abbildung 48: Darstellung der Hauptkomponenten der Kakaopulpe aus Quillabamba, Peru (n=2)

Kakaopulpe aus Nicaragua

Die Ergebnisse der Zweifachbestimmung der Pulpe aus El Cacao, Nicaragua sind in Abbildung 49 dargestellt. Hier konnte größtenteils 2-Pentanol acetate nachgewiesen werden, gefolgt von 2-Heptanol acetate, Ethanol und 2-Heptanol. Weitere Substanzen, die in geringeren Konzentrationen vorlagen, waren 2-Pentanol, Ethyl acetate, β-Terpinyl acetate und 2-Heptanone. Auch diese Pulpe wies im Vergleich zu der peruanischen Pulpe deutlich weniger volatile Hauptkomponenten auf und die Konzentrationen dieser waren in den Proben aus Nicaragua geringer.

4 Ergebnisse

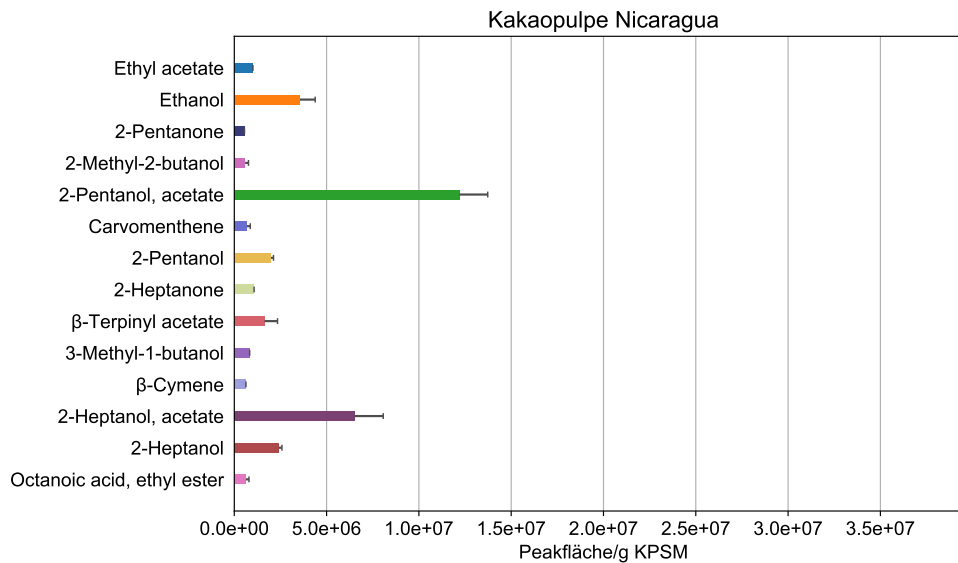


Abbildung 49: Darstellung der Hauptkomponenten der Kakaopulpe aus El Cacao, Nicaragua (n=2)

4.2.2 Identifizierung geruchsaktiver Substanzen mittels GC-O

Vier der Pulpe-Proben wurden ebenfalls mittels GC-O analysiert, um aromaaktive Substanzen identifizieren zu können. In Tabelle 14 sind die volatilen Komponenten dargestellt, die in der Pulpe aus Nicaragua (Pulpe N(a) und N(b)) sowie in der Pulpe aus Peru (Pulpe Q(b) und Q(c); Probe Q(a) musste verworfen werden) wahrgenommen wurden. In Klammern sind die Intensitäten angegeben. Insgesamt konnten 26 Substanzen detektiert werden. Die Stoffe Ethanol, β-Terpinyll acetate und 2-Heptanol wurden in allen Proben erkannt. Viele weitere Komponenten, wie 2-Pentanone, trans-Carane, 2-Pentanol acetate, 3-Methyl-1-butanol, Hexanoic acid ethyl ester, Octanoic acid ethyl ester, 2-Nonanol, Nonanoic acid ethyl ester und Decanoic acid ethyl ester, wurden in drei der Proben detektiert. Carvomenthe konnte in beiden Proben aus Nicaragua wahrgenommen werden. In der peruanischen Pulpe wurde diese Substanz nicht nachgewiesen. Ebenso verhielt es sich mit 3-Methyl-1-butanol acetate, welches nur in der peruanischen Pulpe enthalten war, nicht aber in den nicaraguanischen Proben. In Tabelle 15 sind die Geruchsbeschreibungen der Panelisten zu den einzelnen Substanzen sowie Angaben aus der Literatur zusammengefasst.

4 Ergebnisse

Tabelle 14: Auflistung der volatilen, aromaaktiven Komponenten in einigen Kakaopulpe-Proben unterschiedlicher Herkunft, bestimmt mittels GC-O und Angabe der Intensität in Klammern (5-Punkt-Skala)

Substanz	Pulpe N(a)	Pulpe N(b)	Pulpe Q(b)	Pulpe Q(c)
Dimethyl sulfide	x (2)			
Ethanol	x (2)	x (2)	x (2)	x (1)
Propanoic acid, ethyl ester			x (2)	x (2)
2-Pentanone		x (3)	x (3)	x (3)
2-Methylpropyl acetate			x (1)	
2-Methyl-2-butanol		x (1)		x (2)
trans-Carane	x (2)	x (4)		x (3)
2-Pentanol, acetate		x (2)	x (3)	x (2)
Carvomenthene	x (2)	x (2)		
3-Methyl-1-butanol, acetate			x (2)	x (3)
2-Pentanol		x (1)	x (2)	
β -Terpinyl acetate	x (2)	x (1)	x (4)	x (2)
3-Methyl-1-butanol	x (2)		x (3)	x (1)
Hexanoic acid, ethyl ester	x (3)	x (1)	x (2)	
2-Heptanol, acetate	x (2)			
2-Heptanol	x (2)	x (3)	x (3)	x (1)
Octanoic acid, ethyl ester		x (2)	x (2)	x (2)
3,7-Dimethyl-1-octanol			x (2)	
2-Nonanol	x (1)	x (2)	x (2)	
Nonanoic acid, ethyl ester		x (2)	x (2)	x (2)
Citronellyl formate			x (2)	
Decanoic acid, ethyl ester	x (1)	x (2)		x (2)
1-Phenylethyl acetate				x (2)
2-Phenylethyl acetate			x (1)	
Phenylethyl Alcohol			x (2)	
Tetradecanoic acid, ethyl ester				x (2)

Tabelle 15: Geruchsbeschreibungen der aromaaktiven Substanzen in einigen Kakaopulpe-Proben unterschiedlicher Herkunft, bestimmt mittels GC-O und Vergleich mit Literaturbeschreibungen

Substanz	Beschreibung durch Panelisten	Literaturvergleich (TheGoodScentsCompany, o.J.)
Dimethyl sulfide	gärig, süßlich	schwefelig, süßlich
Ethanol	muffig, chemisch, blumig, fruchtig	alkoholisch, medizinisch
Propanoic acid, ethyl ester	frisch, fruchtig, blumig	süßlich, fruchtig, Weintraube, Ananas
2-Pentanone	fruchtig, frisch, blumig, süßlich	süßlich, fruchtig, Banane, holzig
2-Methylpropyl acetate	keine Beschreibung	süßlich, fruchtig, Apfel, Banane
2-Methyl-2-butanol	süßlich, chemisch, fruchtig	stechend
trans-Carane	fruchtig, süßlich, Erdbeere, Melone	nicht verfügbar
2-Pentanol, acetate	leicht grün, grasig, frisch, süßlich, fruchtig	pflanzlich, grün, Orange, fruchtig
Carvomenthene	Rucola, leicht scharf, Gemüse, muffig	nicht verfügbar
3-Methyl-1-butanol, acetate	süßlich, fruchtig, leicht Eisbonbon	süßlich, fruchtig, Banane
2-Pentanol	frisch, nach Gummi	grün, Fuselöl, fermentiert, süßlich
β -Terpinyl acetate	gärig, frisch, leicht grün, stechend, fruchtig	nicht verfügbar
3-Methyl-1-butanol	schokoladig, leicht käsig, süßlich, muffig	Fuselöl, alkoholisch, Whiskey, Banane, fruchtig
Hexanoic acid, ethyl ester	süßlich, frisch, fruchtig, leicht alkoholisch	fruchtig, süßlich, Ananas, leicht grüne Banane
2-Heptanol, acetate	frisch, fruchtig, süßlich, leicht blumig	fruchtig, Bockshornklee
2-Heptanol	fruchtig, süßlich, minzig, leicht Vanille	frisch, Zitronengras, fruchtig, süßlich, grün
Octanoic acid, ethyl ester	grasig, frisches Holz, süßlich	fruchtig, Wein, wachsig, süßlich, Aprikose, Banane, Brandy
3,7-Dimethyl-1-octanol	blumig	blumig
2-Nonanol	grün, leicht erdig, pflanzlich, holzig, frisch	wachsig, grün, citrus
Nonanoic acid, ethyl ester	würzig, Paprika, holzig	fruchtig, wachsig, Apfel, Banane, alkoholisch

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 15 – Fortsetzung vorherige Seite

Substanz	Beschreibung durch Panelisten	Literaturvergleich (TheGoodScentsCompany, o.J.)
Citronellyl formate	Paprika	süßlich, grün, wachsig, blumig
Decanoic acid, ethyl ester	frisch, stechend, blumig, seifig	süßlich, wachsig, fruchtig, Apfel
1-Phenylethyl acetate	blumig, grün	grün, blumig, fruchtig
2-Phenylethyl acetate	blumig	blumig, süßlich, Honig, fruchtig
Phenylethyl Alcohol	süßlich, frisch	süßlich, blumig, Honig, leicht nach Brot
Tetradecanoic acid, ethyl ester	blumig, seifig	süßlich, wachsig

4.3 Analyse der volatilen Komponenten des Rohkakaos

4.3.1 Darstellung der identifizierten volatilen Substanzen

Es wurden Rohkakaoproben aus zwei unterschiedlichen Fermentationen (PQ 18a, Spontanfermentation; PQ 18b, inokuliert mit Zymaflore[®] x5) analysiert. In diesem Kapitel werden die Hauptkomponenten der Proben zum Zeitpunkt t_{72} dargestellt, da dies der Zeitpunkt während der Fermentation ist, an dem die Anzahl der Hefen bereits stark abgenommen hat und sie nur noch eine untergeordnete Rolle spielen (Schwan und Wheals, 2004). Die Veränderungen der Konzentrationen einiger volatiler Komponenten werden in Kapitel 4.3.2 erläutert. In den beiden analysierten t_{72} -Proben konnten insgesamt 36 Substanzen bestimmt werden. In Anhang 6 sind diese Stoffe mit den zugehörigen CAS-Nr. aufgelistet. Weitere Stoffe wurden detektiert, konnten bei der Auswertung allerdings nicht eindeutig identifiziert werden. In den folgenden Abbildungen werden die Hauptkomponenten, deren Peakflächen/g Probe größer als $5,0 \times 10^5$ sind, dargestellt.

Spontanfermentation

In Abbildung 50 sind die Ergebnisse der Rohkakaoprobe der Spontanfermentation (PQ 18a) dargestellt. Zum Zeitpunkt t_{72} konnte größtenteils Acetic acid nachgewiesen werden, gefolgt von Ethyl acetate und 3-Methyl-1-butanol acetate. Zudem lagen die Substanzen 2-Phenylethyl acetate, Phenylethyl Alcohol, 3-Methylbutanoic acid, 2,3-Butanediol, Tetramethylpyrazine und Acetoin in ähnlichen Konzentrationen vor. Sowohl für 2,3-Butanediol wie auch für 2,3-Butanediol diacetate konnten jeweils zwei Peaks zu unterschiedlichen Retentionszeiten detektiert werden. Dies deutet daraufhin, dass für beide Substanzen jeweils zwei Isomere vorliegen. Durch den Vergleich der Massenspektren mit den Referenzspektren der NIST-Datenbank, kann jedoch nicht eindeutig identifiziert werden, welche Isomere zu welchen Retentionszeiten in den Chromatogrammen erscheinen. Daher wurden in der Auswertung die Peakflächen/g Probe der beiden Isomere von 2,3-Butanediol zusammengefasst und die Isomere als eine Substanz angenommen. Das gleiche erfolgte für die Isomere von 2,3-Butanediol diacetate.

4 Ergebnisse

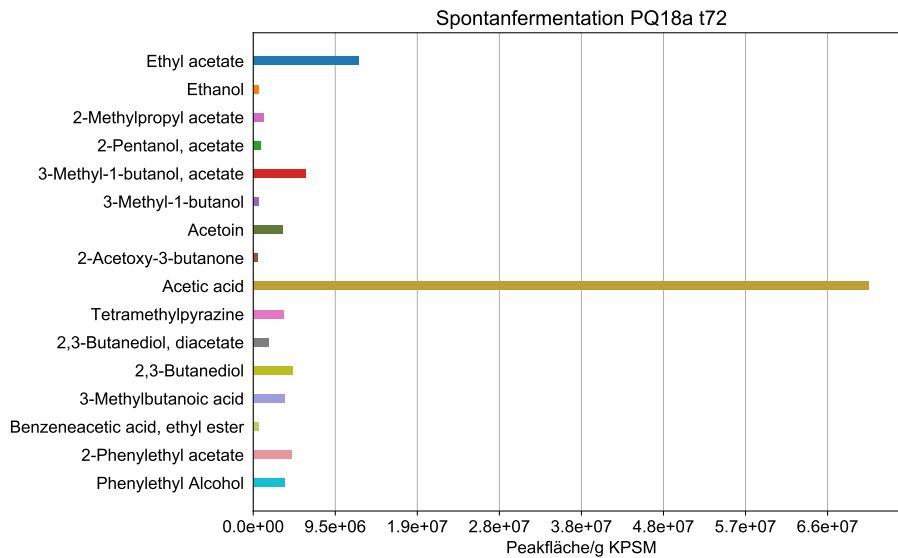


Abbildung 50: Darstellung der Hauptkomponenten der Rohkakaoprobe PQ 18a aus der Spontanfermentation zum Zeitpunkt t_{72}

Inokulierte Fermentation

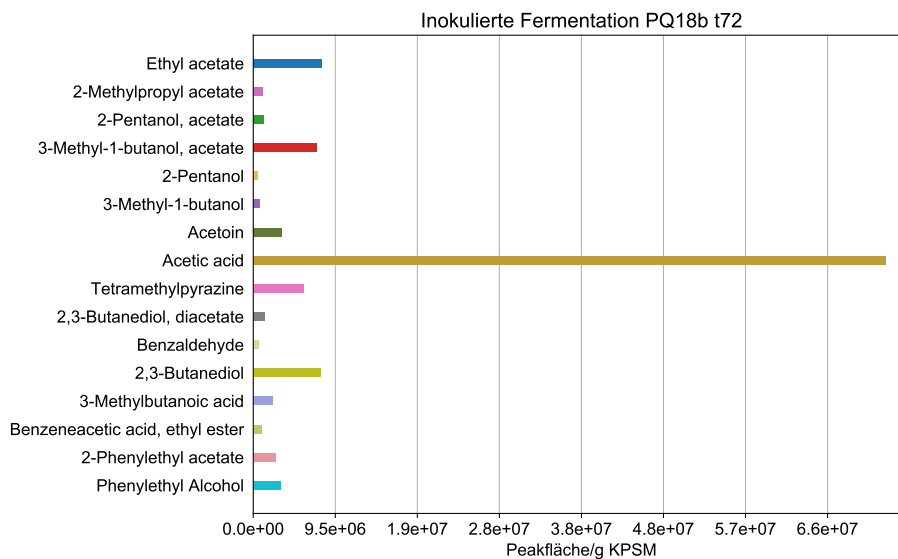


Abbildung 51: Darstellung der Hauptkomponenten der Rohkakaoprobe PQ 18b aus der mit Zymaflore[®] x5 inokulierten Fermentation zum Zeitpunkt t_{72}

Die Hauptkomponenten der mit Zymaflore[®] x5 inokulierten Fermentation (PQ 18b) zum Zeitpunkt t_{72} sind in Abbildung 51 dargestellt. Auch hier konnte größtenteils Acetic acid nachgewiesen werden. 3-Methyl-1-butanol acetate, Ethyl acetate, Tetramethylpyrazine und 2,3-Butanediol lagen in ähnlichen Mengen vor. Des Weiteren waren ebenfalls 2-Phenylethyl acetate, Phenylethyl Alcohol, 3-Methylbutanoic acid und Acetoin in ähnlichen Konzentrationen

4 Ergebnisse

vorhanden. Im Vergleich zu PQ 18a, konnte Ethanol in der inokulierten Fermentation zum Zeitpunkt t_{72} nicht mehr unter den Hauptkomponenten nachgewiesen werden.

4.3.2 Veränderungen im Fermentationsverlauf

Spontanfermentation

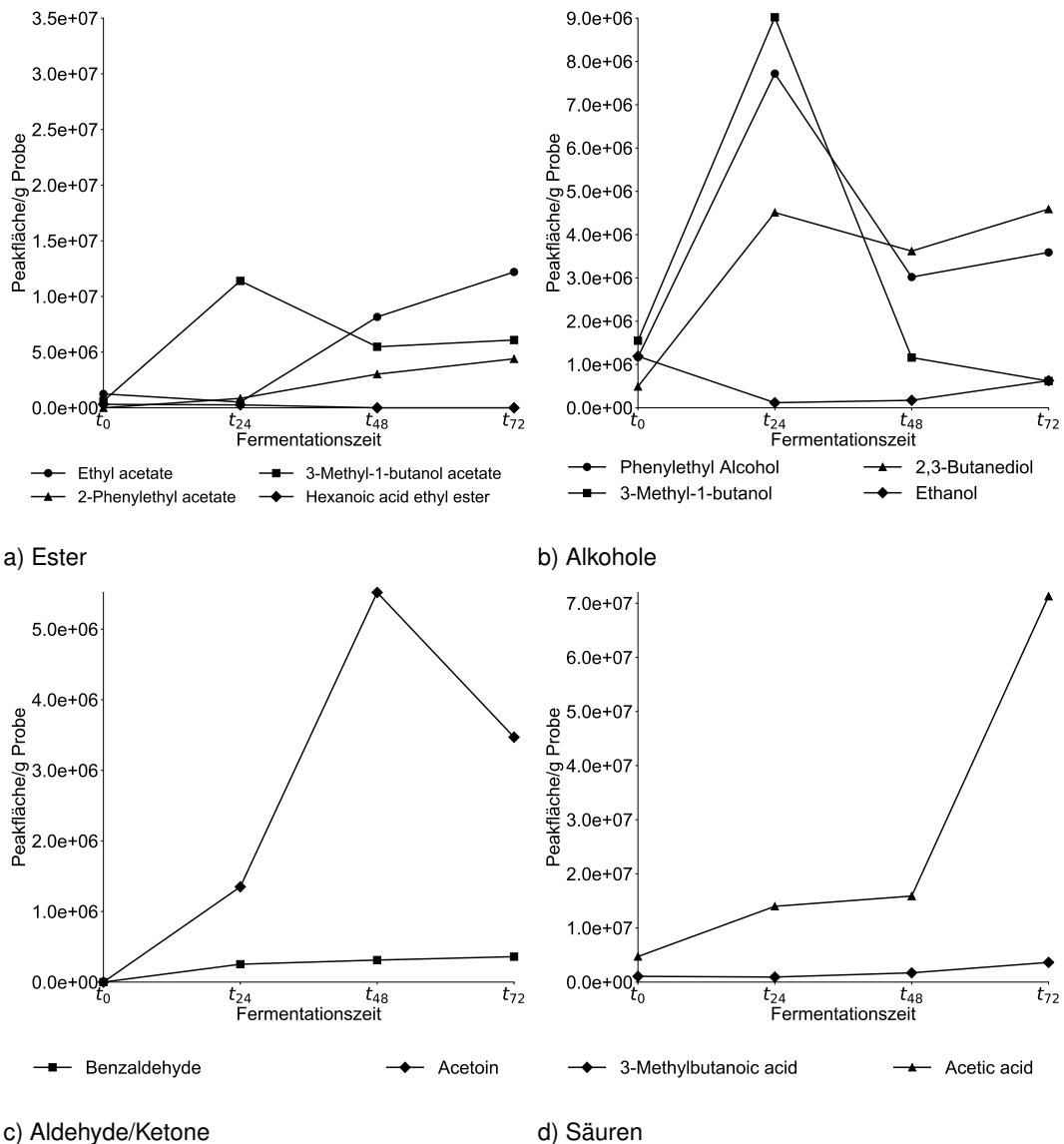


Abbildung 52: Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der Spontanfermentation PQ 18a bestimmt mittels GC-MS. Zusammengefasst zu folgenden Stoffgruppen: a) Ester, b) Alkohole, c) Aldehyde/Ketone und d) Säuren

In Abbildung 52 sind die Konzentrationsveränderungen einiger Substanzen der Spontanfermentation PQ 18a dargestellt. Bereits bei Fermentationsbeginn lag etwas Ethyl acetate vor, in den ersten 24 Stunden nahm die Konzentration etwas ab und stieg dann im weiteren

Verlauf wieder stark an. 2-Phenylethyl acetate konnte zum Zeitpunkt t_0 nicht nachgewiesen werden, wurde im Verlauf der Fermentation aber gebildet. Für 3-Methyl-1-butanol acetate konnte in den ersten 24 Stunden ein starker Anstieg beobachtet werden, dann sank die Konzentration aber wieder ab. Hexanoic acid ethyl ester konnte lediglich zu den Zeitpunkten t_0 und t_{24} nachgewiesen werden (vgl. Abb.52a). Ethanol lag zu Beginn in der Probe vor, wurde in den ersten 24 h leicht abgebaut und im weiteren Verlauf wieder in geringen Mengen produziert. Phenylethyl Alcohol und 3-Methyl-1-butanol wurden in den ersten 24 Stunden in großen Mengen gebildet. Im weiteren Verlauf sank die Konzentration beider Stoffe ab. Ebenso wie im vorherigen Kapitel wurden von 2,3-Butanediol die Peakflächen/g Probe beider Peaks zusammengefasst. Diese Komponente wurde überwiegend in den ersten 24 h gebildet, dann änderte sich der Gehalt kaum noch (vgl. Abb. 52b). Das Keton Acetoin lag zu Beginn nicht vor und wurde in den ersten 48 h in großen Mengen gebildet. Im Anschluss nahm die Konzentration wieder etwas ab. Benzaldehyde konnte zu Beginn nicht nachgewiesen werden und wurde im weiteren Verlauf in geringen Mengen gebildet (vgl. Abb. 52c). Bei beiden Säuren nahm die Konzentration im Verlauf der Fermentation zu. Für Acetic acid konnte vor allem ab t_{48} ein starker Anstieg beobachtet werden (vgl. Abb. 52d).

Inokulierte Fermentation

In Abbildung 53 sind die Konzentrationsveränderungen einiger Substanzen der mit Zymaflore® x5 inokulierten Fermentation dargestellt. Im Verlauf nahm die Konzentration des Esters Ethyl acetate stark zu und erreichte nach 48 h das Maximum, welches deutlich höher lag im Vergleich zu PQ 18a. Danach fiel die Konzentration stark ab. 3-Methyl-1-butanol acetate konnte bereits zu Beginn nachgewiesen werden. Im Verlauf nahm die Konzentration leicht zu. Auch die Konzentration von 2-Phenylethyl acetate, welches zu Beginn nicht nachgewiesen werden konnte, erhöhte sich leicht. Hexanoic acid ethyl ester konnte zu keinem Zeitpunkt detektiert werden (vgl. Abb. 53a). Alle vier dargestellten Alkohole lagen bereits zum Zeitpunkt t_0 vor. Ethanol wurde in den ersten 24 h stark gebildet, anschließend sank der Gehalt wieder. Die Konzentration von 3-Methyl-1-butanol nahm zunächst ab, zwischen t_{24} und t_{48} stieg sie wieder leicht an, um dann deutlich abzusinken. Der Gehalt von 2-Phenylethyl Alcohol änderte sich während der Fermentation kaum. Die Konzentration von 2,3-Butanediol nahm kontinuierlich zu (vgl. Abb. 53b). Acetoin wurde hauptsächlich in den ersten und den letzten 24 h gebildet. Benzaldehyde wurde kontinuierlich gebildet (vgl. Abb. 53c). Den größten Anteil machte Acetic acid aus, dessen Konzentration sowohl in den ersten wie auch in den letzten

4 Ergebnisse

24 h stark anstieg. Der Gehalt von 3-Methylbutanoic acid stieg kontinuierlich an (vgl. Abb. 53d).

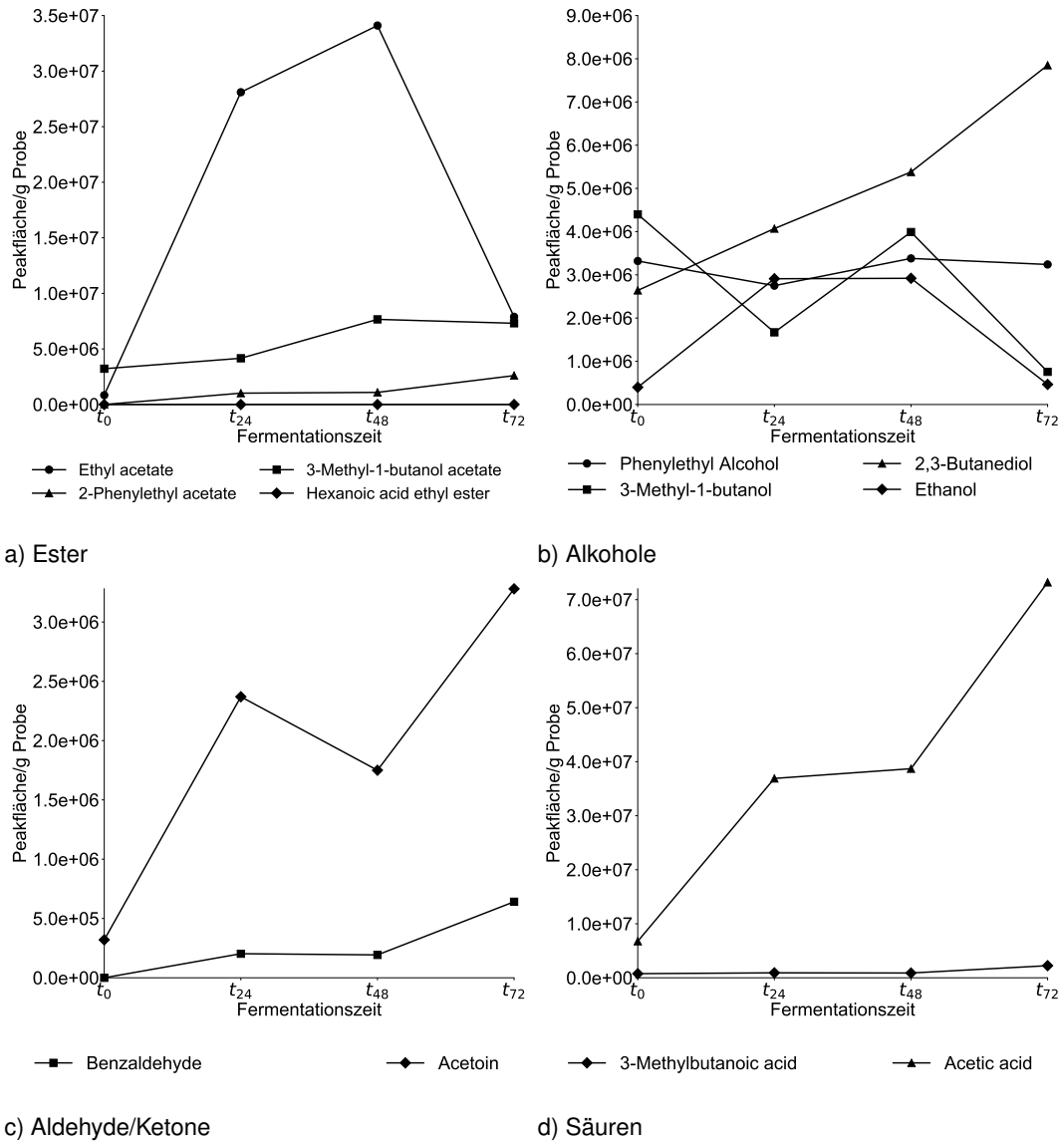


Abbildung 53: Konzentrationen verschiedener Substanzen im Verlauf der mit Zymaflore® x5 inokulierten Fermentation PQ 18b bestimmt mittels GC-MS. Zusammengefasst zu folgenden Stoffgruppen: a) Ester, b) Alkohole, c) Aldehyde/Ketone und d) Säuren

5 Diskussion

5.1 Sekundärstoffwechselprodukte der KPSM-Fermentationen

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen die simulierte Fermentation von *Theobroma cacao* L. und vor allem die durch beteiligte Hefen gebildeten, volatilen Aromakomponenten. Hierbei wurden einzelne Hefestämme in Kakaopulpe-Simulationsmedium fermentiert und diese Hefe-Proben anschließend analysiert. Somit ist es möglich, dass einige der in den mit Hefen fermentierten KPSM-Proben identifizierten Substanzen aus dem unfermentierten KPSM stammen könnten. Quelle für die volatilen Komponenten des KPSM könnte der im Medium enthaltene Hefeextrakt sein. Ames und Leod (1985) konnten in einer mittels GC-MS analysierten Hefeextraktzubereitung unter anderem folgende Stoffe nachweisen, die auch in reinem KPSM vorliegen: 3-Methylbutanal, Toluene, Furfural, Benzaldehyde, 2-Methylpropanoic acid, Butanoic acid und 2-Furanmethanol. Zudem wurden Hexanal, Heptanal und Nonanoic acid von Comuzzo et al. (2006) und Acetone von Ames und Elmore (1992) in Hefeextrakten detektiert. Acetone kann in der vorliegenden Arbeit nur noch in Spuren in einigen wenigen Hefe-Proben identifiziert werden, was daraufhin deutet, dass es aus dem unfermentierten KPSM stammt und nicht von den Hefeisolaten gebildet wird. Ähnliches gilt für 3-Methylbutanal, welches ein Produkt des Strecker-Abbaus der Aminosäure Leucin ist (Ames und Leod, 1985). Die Stoffe Toluene, Hexanal, Heptanal, Furfural und 5-Hydroxymethylfurfural sind in den Hefe-Proben nicht mehr nachweisbar und können daher als Komponenten des reinen KPSM angenommen werden. Denkbar wäre auch, dass einige der Substanzen während des Autoklavierens von KPSM durch Maillard-Reaktion aus den enthaltenen Zuckern und Aminosäuren des Hefeextraktes und Soja Peptons gebildet wurden (Rüffer, 2017). 5-Hydroxymethylfurfural und Furfural sind beispielsweise Produkte dieses Prozesses, die zudem mit Leucin zu 3-Methylbutanal reagieren können (Legrum, 2011). Einige weitere Substanzen können hingegen sowohl in unfermentiertem KPSM, wie auch in vielen mit Hefen fermentierten KPSM-Proben identifiziert werden, wie Acetic acid, 2-

Methylpropanoic acid, Butanoic acid und Nonanoic acid. Auch Hefen können diese Stoffe bilden, weswegen nicht eindeutig abgegrenzt werden kann, ob es sich um KPSM-eigene Stoffe oder Stoffwechselprodukte der Hefeisolate handelt. Die in Kapitel 5.1.1 diskutierten Fermentationsverläufe, könnten hierüber Aufschluss geben.

5.1.1 Fermentationsprodukte

Alkohole

Ethanol ist eines der Hauptprodukte, das von Hefen während der Fermentation aus Glucose und Fructose gebildet wird. Diese Substanz kann zum Zeitpunkt t_{72} in allen Hefe-Proben identifiziert werden und das zum Teil in hohen Konzentrationen mit Peakflächen von $8,81 \times 10^6$ bis $1,66 \times 10^7$ /g KPSM, wie bei *Saccharomyces cerevisiae* der Gruppe 1, *Pichia kudriavzevii* (IDI-Y051, IDI-Y055) und *Torulaspota delbrueckii* (IDI-Y043, IDI-Y057). Auch das ecuadorianische *S. cerevisiae*-Isolat (IDE-Y096), *Hanseniaspora guilliermondii* (IDI-Y035, IDI-Y036) und *Hanseniaspora opuntiae* (IDI-Y030) aus Indonesien sowie der *Candida tropicalis*-Stamm (IDI-Y031) weisen höhere Ethanolgehalte (zwischen $7,07 \times 10^6$ und $1,02 \times 10^7$ /g KPSM) auf. In der Probe von *Pichia guilliermondii* (IDE-Y045) kann Ethanol nur in sehr geringer Konzentration ($1,17 \times 10^5$ /g KPSM) nachgewiesen werden. Sevinc (2018) beobachtete bereits bei der Beurteilung der Wachstumskurven, dass dieses Isolat in KPSM kaum kultivierbar war. Die meisten Hefestämme bilden Ethanol hauptsächlich in den ersten 48 h, anschließend kann eine Konzentrationsabnahme beobachtet werden. Für *S. cerevisiae* aus Ecuador und Indonesien (Gruppe 1) sowie für die indonesischen *T. delbrueckii*-Isolate steigt der Ethanolgehalt während der gesamten Fermentation stark an und für *Pichia anomala* und *Candida* sp. (IDT-Y13) aus Trinidad und Tobago zwar langsamer aber kontinuierlich. *Sporobolomyces roseus* (IDI-Y019) bildet Ethanol in den ersten 24 h in hoher Konzentration.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels HS-SPME-GC-MS eine quantitative Bestimmung des im Kopfraum vorliegenden Ethanols durchgeführt, eine quantitative Bestimmung mittels HPLC des gelösten Ethanols erfolgte in den vorangegangenen Arbeiten von Frommann (2017) und Sevinc (2018). Hierbei wurden *Saccharomyces* sp., *Pichia* sp., *Sporobolomyces* sp. und *Torulaspota* sp. als gärstark und *Candida* spp., *Hanseniaspora* spp. und die ecuadorianischen *P. anomala*-Isolate als gärschwächer eingeschätzt (Frommann, 2017; Sevinc, 2018). Diese Einschätzung deckt sich mit den Beobachtungen in dieser Arbeit. Die Hefen zur Weinherstellung weisen einen hohen Gehalt an Ethanol auf, insbesondere der *S. cerevisiae*-Stamm Portwein unterscheidet sich deutlich von den anderen Hefen (Peakfläche Ethanol

$5,09 \times 10^7$ /g KPSM). In der Arbeit von Cordsen (2018) konnte gezeigt werden, dass die *S. cerevisiae*- und *Saccharomyces bayanus*-Hefen gärstark und die *Lachancea thermotolerans*- sowie die *T. delbrueckii*-Hefe eher gärschwächer waren. Auch in der vorliegenden Arbeit kann für die gärstarken Hefen ein starker Anstieg der Ethanol-Konzentration in den ersten 48 h beobachtet werden und für die gärschwächeren ein langsamerer, kontinuierlicher Anstieg während der gesamten Fermentation. Der Ethanolgehalt der gärstärkeren Weinhefen zum Zeitpunkt t_{72} lag zwischen $1,49 \times 10^7$ und $1,73 \times 10^7$ /g KPSM, für die gärschwächeren Weinhefen zwischen $1,29 \times 10^7$ und $1,59 \times 10^7$ /g KPSM. Der produzierte Ethanol könnte anschließend von den Hefen genutzt werden, um weitere sekundäre Stoffwechselprodukte zu produzieren wie z.B. Ethylester, die durch Veresterung einer Carbonsäure mit Ethanol entstehen (Pires et al., 2014).

Höhere Alkohole werden von Hefen während der Fermentation gebildet und sind Produkte des Aminosäure-Stoffwechsels. α -Ketosäuren, die für die Bildung von höheren Alkoholen benötigten Zwischenprodukte, können zum einen durch Glykolyse aus Zuckern und zum anderen aus Aminosäuren gewonnen werden. Die strukturell zugrunde liegenden Aminosäuren von 3-Methyl-1-butanol, 2-Phenylethyl Alcohol und 2-Methyl-1-propanol sind jeweils Isoleucin, Phenylalanine und Valin (Ugliano und Henschke, 2009). Ho et al. (2014) konnten zeigen, dass der Gehalt an höheren Alkoholen in Fermentationen ohne Hemmung der Hefen stark anstieg, in Fermentationen mit Natamycin hingegen nicht. Das belegt, dass es sich um Metabolite des Hefestoffwechsels handelt. Zudem können die höheren Alkohole unter anaeroben Bedingungen von den Hefen enzymatisch mit Acetyl-CoA zu Acetate-Estern, den Estern von Acetic acid, umgesetzt werden (Pires et al., 2014).

3-Methyl-1-butanol kann in allen Proben und häufig in ähnlichen Konzentrationen wie Ethanol nachgewiesen werden. Besonders viel bilden *S. cerevisiae*-Stämme aus Ecuador (IDE-Y096) und Indonesien (Gruppe 1) sowie die indonesischen *T. delbrueckii*-Isolate mit Peakflächen zwischen $1,21 \times 10^7$ und $1,92 \times 10^7$ /g KPSM. Auch in den Proben von *P. kudriavzevii* (IDI-Y051, IDI-Y055), *C. tropicalis* (IDI-Y031) und *S. roseus* (IDI-Y019) kann 3-Methyl-1-butanol in größeren Mengen identifiziert werden ($1,02 \times 10^7$ bis $1,17 \times 10^7$ /g KPSM). Ähnliches wird für die Weinhefen beobachtet (Peakflächen von $1,09 \times 10^7$ bis $1,68 \times 10^7$ /g KPSM). Im Fermentationsverlauf bilden einige Hefestämme diese Substanz während der gesamten Fermentation, wie die indonesischen *S. cerevisiae*-Isolate aus Gruppe 1 und Ecuador, das *C. tropicalis*-Isolat und die indonesischen *T. delbrueckii*-Stämme sowie die Weinhefen *T.*

delbrueckii und *L. thermotolerans*. Andere bilden 3-Methyl-1-butanol nur während den ersten 24h bzw. 48 h, wie *Hanseniaspora* spp., *Pichia* spp. und die Weinhefen von *Saccharomyces* spp.. Rodriguez-Campos et al. (2012) und Lee et al. (2018) konnten eine Abnahme von 3-Methyl-1-butanol nach den ersten 48 h der analysierten Fermentationen beobachten. Zum Zeitpunkt t_{72} lag der Gehalt von 3-Methyl-1-butanol in den Proben von Lee et al. (2018) bei einer Peakfläche von ungefähr $2,5 \times 10^7$ /g Nibs. 3-Methyl-1-butanol wird als wünschenswert für Kakaoprodukte eingeschätzt (Schwan und Wheals, 2004), da es mit Attributen wie bitter und schokoladig beschrieben wird (Bonvehí, 2005). Aufgrund der Flüchtigkeit von Alkoholen könnte angenommen werden, dass der Gehalt von 3-Methyl-1-butanol während der Verarbeitung von Rohkakao durch die Hitzeeinwirkung während Trocknung und Röstung abnimmt. Rodriguez-Campos et al. (2011) beobachteten, dass sich der Gehalt des während der Fermentation gebildeten 3-Methyl-1-butanol während 5-tägiger Trocknung nicht signifikant änderte. Auch die Trocknungstemperatur (Variation zwischen 60 °C, 70 °C und 80 °C) hatte hierauf keinen Einfluss (Rodriguez-Campos et al., 2012). Ho et al. (2014) hingegen konnten eine leichte Abnahme während Trocknung und Röstung feststellen. Ascrizzi et al. (2017), die die volatilen Komponenten im Verlauf der Verarbeitung des Kakaos „Blanco de Criollo“ ausgehend von fermentiertem und getrocknetem Rohkakao analysierten, stellten eine Abnahme von 3-Methyl-1-butanol während der Röstung und des Conchierens fest, konnten es im Endprodukt „Schokolade“ aber noch nachweisen.

Zudem ist **Phenylethyl Alcohol** in allen Hefe-Proben nachweisbar. Diese Substanz wird von *S. cerevisiae*, *S. roseus*, *Hanseniaspora uvarum*, *P. kudriavzevii* und *P. anomala*, im Vergleich zu den anderen Spezies, in größeren Mengen, mit Peakflächen zwischen $9,95 \times 10^5$ und $4,72 \times 10^6$ /g KPSM, gebildet. Auch die Weinhefen *S. bayanus*, *S. cerevisiae* und *L. thermotolerans* weisen höhere Gehalte auf (Peakflächen von $1,73 \times 10^6$ bis $1,94 \times 10^6$ /g KPSM). Im Verlauf der Fermentationen kann beobachtet werden, dass die Stämme, die Phenylethyl Alcohol in etwas höheren Konzentrationen enthalten, dieses hauptsächlich in den ersten 48 h bilden, wie z.B. *S. cerevisiae* und *H. uvarum*, zum Teil aber auch während der gesamten Fermentation, wie z.B. *P. anomala*. Ähnlich verhält es sich bei den Stämmen zur Weinherstellung. Die restlichen Spezies bilden den Alkohol vor allem in den ersten 24h und im weiteren Verlauf bleibt die Konzentration konstant. Bei Ho et al. (2014) war Phenylethyl Alcohol die Hauptkomponente in der Gruppe der höheren Alkohole mit einer Peakfläche von $2,0 \times 10^8$ /g Pulpe nach 72-stündiger Fermentation. Ähnliches konnten Lee et al. (2018) in im Labormaßstab-fermentierten Kakaobohnen ($1,0 \times 10^8$ /g Nibs nach 72 h Fermentation)

beobachten. Die Konzentrationsunterschiede dieser Arbeiten und der vorliegenden Arbeit könnten auf die Beteiligung mehrerer unterschiedlicher Hefestämme bei Lee et al. (2018) und Ho et al. (2014) - nicht nur eines einzigen - zurückgeführt werden. Auch Phenylethyl Alcohol ist eine für das Aromaprofil von Kakao erwünschte Komponente, da es mit Attributen wie blumig und honigartig beschrieben wird (Bonvehí, 2005). Ascrizzi et al. (2017) konnten zudem zeigen, dass der Gehalt dieses Alkohols im Verlauf der Prozessschritte zur Herstellung von Schokolade relativ konstant blieb. Crafacck et al. (2014) konnten einen Anstieg der Gehalte während der Röstung und des Conchierens feststellen, was daraufhin deutet, dass Phenylethyl Alcohol auch während der Maillard-Reaktion gebildet wird.

2-Methyl-1-propanol kann in fast allen mit Hefen fermentierten KPSM-Proben in geringen Mengen unter den Hauptkomponenten (vgl. Kapitel 4.1.1) nachgewiesen werden. *C. tropicalis* weist, im Vergleich zu den anderen aus Kakaofermentationen isolierten Spezies, die höchste Konzentration auf ($1,29 \times 10^6$ /g KPSM). Zu Beginn der Fermentation ist 2-Methyl-1-propanol nicht vorhanden und wird in den ersten 24h gebildet, im weiteren Verlauf bleibt die Konzentration bei den meisten Hefen konstant. Rodriguez-Campos et al. (2012) beobachteten eine Abnahme des Gehalts dieser Substanz mit zunehmender Fermentationsdauer, vor allem zwischen Tag 2 und 4 der Fermentation. Die Temperatur während der Trocknung beeinflusste die Konzentration nicht. Diese Substanz wird mit, für das Kakaoaroma, weniger positiven Attributen wie alkoholisch und weinartig beschrieben (Bonvehí, 2005). Insgesamt sind die von den Hefeisolaten gebildeten Konzentrationen aber gering (Peakflächen unter $8,0 \times 10^5$ /g KPSM), weshalb sie möglicherweise keine große Relevanz für das Aromaprofil haben. Crafacck et al. (2014) verglichen Kakaomassen, die sowohl aus ungeröstetem wie auch aus geröstetem Rohkakao hergestellt wurden. In allen ungerösteten Proben konnte 2-Methyl-1-propanol nachgewiesen werden, in den gerösteten hingegen nicht. Auch in der aus den gerösteten Kakaomassen hergestellten Schokolade war diese Substanz nicht enthalten (Crafacck et al., 2014). Dies deutet daraufhin, dass 2-Methyl-1-propanol im Laufe der Verarbeitung des Kakaos weiterreagiert oder sich verflüchtigt und damit keinen Einfluss auf das Kakaoaroma hat.

Säuren

Es können fünf organische Säuren in den Proben identifiziert werden: Acetic acid, Butanoic acid, Octanoic acid, n-Decanoic acid und 2-Methylpropanoic acid. Alle Säuren liegen in geringen Konzentrationen vor und nicht in allen Hefe-Proben können jeweils alle fünf Säuren

detektiert werden. Acetic acid könnte für die Bildung von Acetate-Estern wichtig sein und kurz- und mittelkettige Fettsäuren für die Bildung von Ethylestern wie beispielsweise Hexanoic acid ethyl ester und Octanoic acid ethyl ester (Verstrepen et al., 2003; Pires et al., 2014). Die flüchtigen Fettsäuren sind Nebenprodukte der Synthese langkettiger Fettsäuren (Ugliano und Henschke, 2009).

Acetic acid kann bei folgenden Hefeisolaten zum Zeitpunkt t_{72} unter den Hauptkomponenten (vgl. Kapitel 4.1.1) nachgewiesen werden: *S. cerevisiae* Gruppe 1, ecuadorianische *S. cerevisiae* (IDE-Y096), *H. opuntiae* (IDI-Y030), *C. tropicalis* (IDI-Y031) und indonesische *T. delbrueckii* sowie bei den Weinhefen *S. bayanus* und *S. cerevisiae* Portwein. Die Konzentrationen sind aber gering (Peakflächen zwischen $2,78 \times 10^5$ und $6,74 \times 10^5$ /g KPSM). In den unfermentierten KPSM-Proben ist ebenfalls Acetic acid enthalten ($1,02 \times 10^5 \pm 1,78 \times 10^4$ /g KPSM). Allerdings zeigen die Fermentationsverläufe, dass die Konzentration von Acetic acid von t_0 nach t_{72} zunimmt. Nur das *H. uvarum*-Isolat (IDE-Y068) bildet lediglich in den ersten 24h Acetic acid, im weiteren Fermentationsverlauf wird die Substanz dann vollständig abgebaut. Acetic acid wird von Hefen enzymatisch durch Aldehyd-Dehydrogenasen aus Acetaldehyde gebildet (Ugliano und Henschke, 2009). Koné et al. (2016) konnten ebenfalls beobachten, dass einzelne auf Sabouraud-Medium kultivierte Hefen, wie *C. tropicalis*, *P. kudriavzevii* und *S. cerevisiae*, Acetic acid bildeten. Acetic acid wird mit, in Bezug auf das Kakaoaroma, weniger positiven Geruchsattributen wie stechend, sauer und essigartig beschrieben (Afoakwa et al., 2009; Bonvehí, 2005). Der Gehalt an Acetic acid wird durch Verarbeitungsschritte wie Trocknung, Röstung und Conchieren gesenkt (Afoakwa, 2012).

Butanoic acid, Octanoic acid und n-Decanoic acid können nur in geringen Mengen, mit Peakflächen unter $6,7 \times 10^5$ /g KPSM, in den Proben nachgewiesen werden. Butanoic acid liegt in keiner Probe als Hauptkomponente vor, die anderen beiden Fettsäuren können in den Hefeisolaten und den Reinzuchthefen von *S. cerevisiae* und *S. bayanus* sowie dem *S. roseus*-Isolat (IDI-Y019) als Hauptkomponenten detektiert werden. Butanoic acid kann bereits in reinem KPSM identifiziert werden ($8,32 \times 10^4 \pm 1,49 \times 10^4$ /g KPSM), aber die Zunahme der Konzentration ab t_{24} bei *S. roseus* und *C. tropicalis* (IDI-Y031) deutet auf eine Bildung durch diese Hefen hin. Im Fermentationsverlauf kann bei den *Saccharomyces* spp.-Stämmen und dem *S. roseus*-Isolat eine kontinuierliche Bildung von Octanoic acid und n-Decanoic acid beobachtet werden. Die *Hanseniaspora* spp.-Isolate bilden Octanoic acid nur in sehr geringer Konzentration, ebenso die analysierten *T. delbrueckii*- und die indonesischen *P. kudriavzevii*-Stämme. Koné et al. (2016) detektierten Octanoic acid in einem auf Sabouraud-

Medium kultivierten *S. cerevisiae*-Isolat und Rodriguez-Campos et al. (2012) wiesen Octanoic acid und n-Decanoic acid in mexinkanischem Rohkakao (nach Spontanfermentation und Trocknung) nach. Auch diese Säuren werden mit, im Hinblick auf das Kakaoaroma, weniger positiven Geruchsattributen wie ranzig, fettig und käsig beschrieben (Bonvehí, 2005).

2-Methylpropanoic acid kann in dem analysierten, reinen KPSM ($1,26 \times 10^5 \pm 7,78 \times 10^3$) und bei folgenden Isolaten nachgewiesen werden: ecuadorianische *P. anomala*, *P. guilliermondii* (IDE-Y045) und *Candida* sp. (IDT-Y13). Bei den *Pichia* spp. nimmt der Gehalt von 2-Methylpropanoic acid im Fermentationsverlauf ab und kann zum Zeitpunkt t_{72} nicht mehr nachgewiesen werden. Bei letzterem Stamm kann eine leichte Zunahme der Peakfläche nach 48 h, von $7,64 \times 10^4$ auf $1,12 \times 10^5$ /g KPSM nach 72 h, festgestellt werden. Die analysierten Hefen bilden 2-Methylpropanoic acid während der Fermentation von KPSM scheinbar nur in sehr geringem Maß. Koné et al. (2016) konnten 2-Methylpropanoic acid qualitativ bei einem auf Sabouraud-Medium kultivierten Isolat von *Pichia galeiformis* nachweisen. 2-Methylpropanoic acid verursacht Fehlparfums in Kakao und wird mit Attributen wie käsig und schweißig beschrieben (Bonvehí, 2005). Die Verarbeitung von Rohkakao zu Schokolade könnte zu einer Verflüchtigung der Säure führen (Crafack et al., 2014).

Ester

In den analysierten Proben können vor allem zwei Arten von Esterverbindungen identifiziert werden, die Acetate-Ester und die Ethylester. In die erste Gruppe fallen die Substanzen **Ethyl acetate**, **3-Methyl-1-butanol acetate** und **2-Phenylethyl acetate** und in die zweite die Ester der kurz- und mittelkettigen Fettsäuren wie z.B. **Propanoic acid ethyl ester**, **Butanoic acid ethyl ester**, **Hexanoic acid ethyl ester**, **Octanoic acid ethyl ester**, **Decanoic acid ethyl ester** und **Dodecanoic acid ethyl ester**. Acetate-Ester werden durch Kondensation von höheren Alkoholen und Acetyl-CoA gebildet. Diese Reaktionen werden von Alkohol-Acetyltransferasen katalysiert (Ugliano und Henschke, 2009; Pires et al., 2014). Ethylester der Fettsäuren werden durch Kondensation von Ethanol und aktivierten Fettsäuren (sog. Acyl-CoA) gebildet. Dies wird von Acyl-CoA/Ethanol-O-Acyltransferasen katalysiert (Pires et al., 2014). In den KPSM-Proben können keine Esterverbindungen nachgewiesen werden. Für fast alle Ester zeigt sich ein Anstieg in den ersten 24 h, danach unterscheiden sich die Verläufe je nach Spezies etwas. Für einige *Hanseniaspora*-Isolate kann bereits eine leichte Abnahme der Ester-Konzentrationen nach 24 h beobachtet werden, für *H. uvarum* (IDE-Y068), *S. roseus* (IDI-Y019), das ecuadorianische *T. delbrueckii*-Isolat (IDE-Y064) und die

S. cerevisiae-Isolate aus Gruppe 2 erst nach 48 h. Für die restlichen Spezies kann eine Zunahme an Estern in den ersten 48 h festgestellt werden und ein relativ konstanter Verlauf in den letzten 24 h. Der Konzentrationsverlauf der Ester verhält sich bei den Stämmen zur Weinherstellung ähnlich. Rodriguez-Campos et al. (2012) konnten einige der genannten Ethyl- und Acetate-Ester in getrocknetem Rohkakao nachweisen. Hier nahm mit zunehmender Fermentationsdauer der Gesamtgehalt an Estern ab, die Trocknungstemperatur hatte darauf keinen Einfluss.

Interessanterweise kann beobachtet werden, dass einige Spezies sehr viele Ester bilden und andere nur wenige und in geringen Konzentrationen. Letztere bilden dann hauptsächlich Acetate-Ester. Dazu zählen die *Hanseniaspora* spp.-Isolate, das *Candida* sp.-Isolat (IDT-Y13) aus Trinidad und Tobago, das *P. guilliermondii*-Isolat (IDE-Y045) und die ecuadorianischen *P. anomala*-Isolate. Die *C. tropicalis*-Hefe (IDI-Y31), die *T. delbrueckii*- und die *P. kudriavzevii*-Isolate bilden Esterverbindungen in größerer Anzahl also die zuvor genannten Spezies, allerdings in geringen Konzentrationen. Die größte Quantität verschiedener Esterverbindungen und in größeren Konzentrationen mit Peakflächen von $1,56 \times 10^5$ bis $8,33 \times 10^6$ /g KPSM produzieren die *S. cerevisiae*-Isolate (vor allem aus Gruppe 1 und Ecuador). Ähnliches kann für die Weinhefen beobachtet werden. Hierbei dominieren die *Saccharomyces* spp., die im Vergleich zu den Nicht-Saccharomyceten viele Ester und in hohen Konzentrationen bilden. Auch Meersman et al. (2016) konnten dies beobachten. Es scheint ein Zusammenhang zwischen der Gäraktivität der Hefen und der Bildung von Sekundärstoffwechselprodukten zu bestehen, denn die gärstärkeren Hefen produzieren Esterverbindungen in größerer Anzahl und Konzentration.

Esterverbindungen werden mit fruchtigen, süßlichen und blumigen Noten charakterisiert und könnten daher einen positiven Einfluss auf das spätere Schokoladenaroma haben. Problematisch ist die Abnahme des Gehaltes dieser Substanzen im Verlauf der Kakaoverarbeitung. Meersman et al. (2016) verarbeiteten fermentierte Kakaobohnen zu Kakaomasse und Schokolade. In den Kakaomassen konnte noch eine Vielzahl an Ethyl- und Acetate-Estern nachgewiesen werden, das Conchieren führte allerdings zu einer Abnahme der Gesamtkonzentration. Vor allem kurzkettige Ester waren in den Schokoladen nicht mehr oder nur in geringer Konzentration nachweisbar. Es konnte ein positiver Zusammenhang zwischen dem Verbleib der Ester in der Schokolade und dem Siedepunkt der jeweiligen Ester gezeigt werden. Auch die bessere Fettlöslichkeit der mittelkettigen Fettsäureethylester schien eine Rolle zu spielen. Die Anpassung der Parameter des Conchierens könnte zu einer

Reduzierung des Verlustes an volatilen Komponenten beitragen (Meersman et al., 2016).

Aldehyde und Ketone

Benzaldehyde kann in den analysierten Hefe-Proben nach 72-stündiger Fermentation unter den Hauptkomponenten nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 4.1.1), aber auch in den unfermentierten KPSM-Proben (Peakfläche $3,83 \times 10^5 \pm 4,26 \times 10^4$ /g KPSM). Die Fermentationsverläufe deuten daraufhin, dass die meisten Spezies Benzaldehyde bilden können. Die Spezies *P. anomala*, *C. tropicalis* und die Weinhefen *Saccharomyces* spp. und *T. delbrueckii* scheinen kein Benzaldehyde zu bilden, da die Benzaldehyde-Konzentration im Fermentationsverlauf dieser Spezies kontinuierlich abnimmt. Für die restlichen Spezies kann eine Konzentrationszunahme hauptsächlich in den ersten 24 h bzw. 48 h beobachtet werden, gefolgt von einem Absinken. Die Peakflächen von Benzaldehyde zum Zeitpunkt t_{24} liegen bei den Spezies, die es bilden können, zwischen $4,72 \times 10^5$ und $5,97 \times 10^6$ /g KPSM. Nach 72-stündiger Fermentation sind die Peakflächen von Benzaldehyde kleiner als $3,06 \times 10^6$ /g KPSM. Benzaldehyde könnte von Hefen zu Benzyl Alcohol abgebaut werden (Delfini et al., 1991). Diese Substanz kann in den analysierten KPSM-Fermentationen aber nicht identifiziert werden. Ho et al. (2014) wiesen Benzaldehyde ebenfalls im Fermentationsverlauf von Spontanfermentationen und Fermentationen mit Hemmung des Hefewachstums durch Natamycin nach. Sie analysierten dabei die Veränderungen in der Pulpe und die Veränderungen in den Samen. Unabhängig vom Vorhandensein der Hefen, konnten sie in der Pulpe nur eine geringe Bildung von Benzaldehyde beobachten, im Gegensatz zu den Samen, wo eine höhere Bildung stattfand. Sie führten dies darauf zurück, dass Benzaldehyde vor allem durch biochemische Prozesse in den Samen gebildet wurde und der Beitrag der Hefen zum Benzaldehyde-Gehalt in Rohkakao eher gering war (Ho et al., 2014). Ascricci et al. (2017) konnten eine leichte Abnahme im Verlauf der Produktionskette von Rohkakao bis hin zu Schokolade feststellen. Benzaldehyde wird mit Attributen wie bitter und nussig beschrieben (Bonvehí, 2005; Afoakwa et al., 2009). Dies könnte in Abhängigkeit vom Produkt erwünscht, beispielsweise bei Bitterschokolade mit hohem Kakaoanteil, oder eher unerwünscht, z.B. bei süßen Vollmilchschokoladen, sein.

Das Keton **Acetoin** ist nur in geringen Mengen in den Proben des *Candida* sp.-Isolats (IDT-Y13) aus Trinidad und Tobago und des *H. uvarum*-Stamms (IDE-Y068) ab t_{24} nachweisbar. Die Peakflächen nach 72-stündiger Fermentation betragen $1,27 \times 10^5$ und $1,23 \times 10^5$ /g KPSM. Acetoin kann von Hefen als Nebenprodukt bei der Verstoffwechslung von Kohlenhydraten

gebildet werden (Romano und Suzzi, 1996). In den Rohkakaoproben von Rodriguez-Campos et al. (2012) war Acetoin das Hauptprodukt in der Gruppe der Aldehyde und Ketone. Die Konzentration nahm in den ersten sechs Fermentationstagen und mit anschließender Trocknung bei 60 °C zu. Das Keton wird mit, für das Kakaoaroma, weniger positiven Attributen wie butterartig, sahnig, fettig beschrieben (TheGoodScentsCompany, o.J.). Crafacck et al. (2014) beobachteten, dass die Konzentration von Acetoin während der Röstung abnahm. Allerdings stellten sie ebenfalls fest, dass das Conchieren wieder zu einer Zunahme führte, was daraufhin deutet, dass Acetoin auch während diesem Prozessschritt, möglicherweise durch Maillard-Reaktion, gebildet wurde (Crafacck et al., 2014).

5.1.2 GC-O-Analytik

Einige der identifizierten volatilen Komponenten können mittels GC-O sensorisch wahrgenommen werden. Besonders die flüchtigen Esterverbindungen, die in den ersten 15 Minuten des GC-Laufes eluieren, können detektiert werden. Darunter befinden sich Minor Komponenten, wie z.B. 2-Methylpropanoic acid ethyl ester (Peakflächen zwischen $4,16 \times 10^4$ und $9,57 \times 10^4$ /g KPSM), 3-Methylbutanoic acid ethyl ester (S/N < 15) und Pentanoic acid ethyl ester (S/N < 15), sowie Hauptkomponenten, wie Butanoic acid ethyl ester (Peakflächen zwischen $2,03 \times 10^5$ und $4,56 \times 10^5$ /g KPSM), 3-Methyl-1-butanol acetate (Peakflächen zwischen $2,84 \times 10^5$ und $1,12 \times 10^6$ /g KPSM) und Hexanoic acid ethyl ester (Peakflächen zwischen $7,06 \times 10^4$ und $1,37 \times 10^6$ /g KPSM). Die Peakfläche einiger dieser Substanzen war so klein, dass diese Peaks aufgrund des festgelegten S/N-Verhältnisses von 15 als Rauschen interpretiert wurden. Die genannten Ester sind charakterisiert durch fruchtige und süßliche Noten und scheinen sehr niedrige Geruchsschwellenwerte aufzuweisen, da sie in den Proben nur in geringen Konzentrationen vorliegen. Der von Bonvehí (2005) ermittelte Geruchsschwellenwert von Pentanoic acid ethyl ester in Wasser beispielsweise liegt bei 1,5 µg/L. Diese Substanz kann in dem *Saccharomyces cerevisiae*-Isolat (IDI-Y014), dem *Sporobolomyces roseus*-Isolat (IDI-Y019) und dem *Torulasporea delbrueckii*-Isolat (IDI-Y043) detektiert werden. Interessanterweise können in den Proben des *S. cerevisiae*- und des *S. roseus*-Stammes viele Esterverbindungen, vor allem Ethylester, wahrgenommen werden und das mit relativ hohen Intensitäten (zwischen 2 und 4). Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus dem vorangegangenen Abschnitt, da diese Spezies Esterverbindungen in größerer Anzahl bilden. Auch bei dem *Hanseniaspora guilliermondii*-Isolat (IDI-Y035) können einige Ethylester detektiert werden, obwohl der Stamm sie nur in geringen Konzentrationen bildet (Peakflächen unter

$2,03 \times 10^5$ /g KPSM). Das deutet auf das hohe Aromapotential dieser Substanzen hin. Im Vergleich dazu sind die von Bonvehí (2005) ermittelten Geruchsschwellenwerte der Alkohole in Wasser mit $300 \mu\text{g/L}$ für 3-Methyl-1-butanol und $1100 \mu\text{g/L}$ für Phenylethyl Alcohol deutlich höher. Ersterer kann in den sechs analysierten KPSM-Fermentationsproben detektiert werden und scheint aufgrund der positiven Geruchsbeschreibungen wie schokoladig, Kakao und süßlich von großer Relevanz für das Kakaoaroma zu sein. Die Konzentrationen von 3-Methyl-1-butanol mit Peakflächen zwischen $4,39 \times 10^6$ und $1,59 \times 10^7$ /g KPSM liegen in den Proben über der Geruchsschwelle. Phenylethyl Alcohol kann nur bei dem *Pichia kudriavzevii*-Isolat (IDI-Y051) wahrgenommen werden. Die in der Literatur beschriebenen Noten von Honig und Blumen werden hier nicht genannt (Bonvehí, 2005). Denkbar wäre, dass diese Substanz von anderen geruchsaktiven Komponenten überlagert und daher in den anderen Proben nicht erkannt wird. Begleitende Riechstoffe können zudem die Geruchsschwelle einer anderen Substanz verschieben (Legrum, 2011). *P. kudriavzevii* weist mit einer Peakfläche von $5,63 \times 10^5$ /g KPSM nicht den höchsten Gehalt an Phenylethyl Alcohol auf. Dies ist bei *S. roseus* (IDI-Y019) mit $1,08 \times 10^6$ /g KPSM der Fall.

Auffällig ist das *Candida tropicalis*-Isolat (IDI-Y031). Hier können die wenigsten geruchsaktiven Substanzen detektiert werden, wenn überhaupt, dann nur mit geringen Intensitäten. Ein Vergleich mit den identifizierten Hauptkomponenten zeigt zwar, dass dieses Hefeisolat insgesamt viele Substanzen bildet, allerdings nur in geringen Konzentrationen. 1,1-Diethoxyethane, welches nur bei diesem Isolat einen höheren Gehalt aufweist (Peakfläche $1,12 \times 10^6$ /g KPSM), kann sensorisch deutlich wahrgenommen werden (Intensität von 4) und wird mit Attributen wie alkoholisch, stechend und Lösungsmittel beschrieben. Dies deckt sich nicht mit den Literaturangaben (etherisch, grün, erdig und süßlich (TheGoodScentsCompany, o.J.)). Es eluiert direkt nach Ethyl acetate, möglicherweise kommt es dadurch zu einer Überlagerung und veränderten Wahrnehmung des Geruchs. Zudem können Geruchsstoffe mit Veränderung ihrer Konzentration unterschiedliche Geruchsnoten auslösen (Legrum, 2011).

Grundsätzlich müssen bei der Anwendung der GC-O-Methodik Faktoren wie die sensorische Ermüdung der Panelisten sowie Identifizierungsschwierigkeiten durch eine ungenügende Trennung von Peaks bedacht werden. Diese Einflussfaktoren können kaum vermieden werden. Ein kurzer GC-Lauf ist zwar zur Vermeidung von Ermüdung vorteilhaft für die Panelisten, führt aber zu einer verschlechterten Trennleistung. Dies kann die Identifizierung der Substanzen und die Zuordnung von Signalen der Panelisten zu den jeweiligen Peaks erschweren. Die Wahrnehmung einer Substanz und die Reaktionszeit können je nach Stoff und Panelist

variieren. Meist bleiben nur wenige Sekunden, um einen Geruch wahrzunehmen und zu bewerten, was zu fehlerhaften Beschreibungen führen kann. Eine gute Schulung des Panels kann zu einer Verminderung des Einflusses dieser Faktoren führen (Chambers IV und Koppel, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die GC-O-Technik vor allem zu Screening-Zwecken eingesetzt, weswegen die oben genannten Faktoren eher eine untergeordnete Rolle spielen.

5.1.3 Gruppierung der Hefen

Das hierarchisch-agglomerative Clustering ergibt drei etwa gleichgroße Klassen und eine Klasse, die lediglich den Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* Portwein enthält. Das könnte vor allem auf den deutlich höheren Ethanol-Gehalt in dieser Probe zurückgeführt werden, aber auch 2-Methyl-1-propanol, 2-Phenylethyl acetate und Phenylethyl Alcohol werden von diesem Hefeisolat in höheren Konzentrationen gebildet. Der Stamm könnte daher als Ausreißer angenommen werden, da er keinen weiteren Einfluss auf die Cluster-Lösung hat. Klasse 1 und 3 ähneln sich bezüglich der gebildeten Substanzen und deren Konzentrationen. Interessanterweise setzen sich die beiden Klassen überwiegend aus *S. cerevisiae*-Stämmen aus Indonesien zusammen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus den vorigen Kapiteln. Besonders die Isolate aus Gruppe 1 und der ecuadorianische Stamm (IDE-Y096) weisen eine Vielzahl an volatilen Komponenten in hohen Konzentrationen auf, darunter viele Ethylester und Acetate-Ester, aber auch Alkohole und Fettsäuren, aus denen die Esterverbindungen gebildet werden können. Die Konzentrationen der meisten Substanzen sind in Klasse 3 noch etwas höher im Vergleich zu Klasse 1. Es kann daraus geschlossen werden, dass besonders die Stämme aus K3 zu einem fruchtigen, blumigen und süßlichen Aroma beitragen und somit einen positiven Einfluss auf das Gesamtaroma von Kakao haben können. Aber auch die Stämme in K1 haben das Potential, Substanzen mit fruchtigen Noten in höheren Konzentrationen zu bilden und dominieren über die K3-Hefen bezüglich 3-Methyl-1-butanol acetate und Ethyl acetate. Schwan und Wheals (2004) beobachteten ebenfalls, dass ein Stamm von *S. cerevisiae* var. *chevalieri* die meisten Aromakomponenten im Vergleich zu anderen Nicht-Saccharomyceten bildete. Auch Meersman et al. (2016), die mit *S. cerevisiae*-Stämmen sowie *Pichia kluyveri* und *Cyberlindnera fabianii* inokulierte Fermentationen bezüglich der Bildung von fruchtigen Esterverbindungen analysierten, stellten fest, dass *S. cerevisiae* größere Mengen dieser Substanzen bildeten.

Die Hefeisolate der Klasse 2 unterscheiden sich deutlich von den drei anderen Klassen. Diese Stämme bilden generell weniger Ethylester-Verbindungen, in Anzahl und Konzentration, und

eher Acetate-Ester. Charakteristisch für K2 sind Ethyl acetate und Propanoic acid ethyl ester, diese liegen in höheren Mengen als in K1 und K3 vor. Interessanterweise sind in dieser Gruppe alle Hefestämme aus Trinidad und Tobago sowie fast alle ecuadorianischen Stämme eingeordnet. Bei den meisten handelt es sich um Nicht-Saccharomyceten. Die *S. cerevisiae*-Stämme, die Klasse 2 zugeordnet sind, stammen fast alle aus Gruppe 2 der indonesischen Isolate. Sie zeichnen sich durch eine geringere Bildung von volatilen Komponenten aus, im Vergleich zu den restlichen, indonesischen *S. cerevisiae*-Isolaten (Gruppe 1). Die geografische Herkunft von Rohkakao kann einen Einfluss auf die Zusammensetzung der volatilen Komponenten haben. Das konnten Tran et al. (2015) beobachten, die geröstete Kakaobohnen unterschiedlicher Herkunft und Sorte analysierten. Die indonesischen Proben wiesen dabei insgesamt die höchsten Konzentrationen an volatilen Substanzen auf, unter anderem auch einige Ester. Sie konnten aber auch zeigen, dass die Herkunft nur einer von vielen wichtigen Faktoren war und weitere Parameter das Aromaprofil beeinflussten (Tran et al., 2015). Ein direkter Vergleich der in den Kakaoproben identifizierten Substanzen mit den in dieser Arbeit nachgewiesenen Stoffen ist jedoch schwierig, da die nach der Fermentation erfolgende Röstung einen großen Einfluss auf die Zusammensetzung der volatilen Komponenten hat. Um das Potential der Reinzuchthefen zur Weinherstellung, die ebenfalls in KPSM fermentiert wurden, einschätzen zu können, wurden diese auch in die Clusteranalyse miteinbezogen. Bis auf die Hefe SIHA® 9, die K3 zugeordnet ist, befinden sich alle Weinhefen in Klasse 1. Das zeigt, dass diese Hefen zu einem fruchtigen Aroma beitragen können. Für die *Saccharomyces bayanus*- und *S. cerevisiae*-Stämme können ähnliche Aromaprofile beobachtet werden, wie für die aus Kakaofermentationen isolierten *S. cerevisiae*-Stämme. Die Hefen *Lachancea thermotolerans* und *Torulaspota delbrueckii* sind möglicherweise aufgrund der hohen Gehalte an Alkoholen, wie Ethanol, 3-Methyl-1-butanol und Phenylethyl Alcohol, und der geringen Konzentration von Ethyl acetate der Klasse 1 zugeordnet. Beide bilden allerdings relativ wenige Esterverbindungen und könnten unter diesem Gesichtspunkt betrachtet auch Klasse 2 zugeordnet werden.

Durch die Verwendung von standardisiertem Kakaopulpe-Simulationsmedium kann der Einfluss von Faktoren wie Sorte, Klima- und Erntebedingungen, die bei Untersuchungen von regulären Kakaofermentationen auftreten, ausgeschlossen werden. Die beobachteten Unterschiede können also auf die unterschiedlichen Hefespezies, aber auch auf die jeweiligen Einzelstämme innerhalb einer Spezies zurückgeführt werden, da das Genom eines jeden Stammes einzigartig ist und dadurch einen Einfluss auf das Aromaprofil hat (Pires et al.,

2014). Dies wurde ebenfalls von Meersman et al. (2016) festgestellt, die verschiedene *S. cerevisiae*-Hybride mit unterschiedlichen Fähigkeiten zur Esterbildung in Kakaofermentationen analysierten. Auch Steensels et al. (2014), die 301 *Saccharomyces* spp. bezüglich des Potentials zur Bildung unterschiedlicher Aromakomponenten während der Fermentation von Bierwürze untersuchten, zeigten Unterschiede innerhalb der jeweiligen Spezies auf.

Da im Rahmen dieser Arbeit Einfachbestimmungen durchgeführt wurden, können keine strukturprüfenden Statistikmethoden angewendet werden. Aus diesem Grund können keine Aussagen darüber getroffen werden, ob sich die Konzentrationen der volatilen Komponenten zwischen den einzelnen Hefestämmen signifikant unterscheiden.

5.2 Volatile Komponenten der Realmatrix-Proben

Die GC-MS-Analyse der Kakaopulpe-Proben unterschiedlicher Herkunft zeigt deutliche Unterschiede bezüglich der volatilen Komponenten. Die meisten Hauptkomponenten (vgl. Kapitel 4.2.1) sind in der peruanischen Pulpe enthalten (22 Hauptkomponenten), gefolgt von der Pulpe aus Nicaragua (14 Hauptkomponenten). Die wenigsten volatilen Komponenten und die geringsten Konzentrationen können in den analysierten Proben der Kakaofrüchte aus Vietnam beobachtet werden (10 Hauptkomponenten).

Auffällig in der peruanischen Pulpe sind die hohen Konzentrationen an Ethanol ($8,96 \times 10^6 \pm 2,09 \times 10^6$ /g Probe), Ethyl acetate ($3,6 \times 10^7 \pm 1,93 \times 10^6$ /g Probe) und diversen Esterverbindungen, wie 3-Methyl-1-butanol acetate ($6,89 \times 10^6 \pm 6,32 \times 10^5$ /g Probe), Hexanoic acid ethyl ester ($8,32 \times 10^5 \pm 9,55 \times 10^4$ /g Probe), Octanoic acid ethyl ester ($9,00 \times 10^6 \pm 3,42 \times 10^5$ /g Probe) und Decanoic acid ethyl ester ($2,39 \times 10^5 \pm 3,70 \times 10^4$ /g Probe), die auf eine bereits eingesetzte Fermentation während des Transportes hindeuten. Acetic acid kann nicht nachgewiesen werden, die Fermentation scheint daher in der Anfangsphase zu sein, in der die Pulpe vor allem von Hefen und Milchsäurebakterien besiedelt wird. Cordsen (2018) konnte aus der hier analysierten, peruanischen Pulpe Hefestämme der Spezies *Pichia manshurica* und *Torulasporea delbrueckii* isolieren. Das ist interessant, denn es können Parallelen bezüglich der volatilen Komponenten in der Pulpe und den KPSM-Fermentationen von *T. delbrueckii* und *Pichia* spp. beobachtet werden. Diese Stämme bilden in KPSM Ethyl acetate, 3-Methyl-1-butanol und 3-Methyl-1-butanol acetate in größeren Mengen sowie einige Ethylester. Es können einige Substanzen identifiziert werden, die in den fermentierten KPSM-Proben nicht enthalten waren, wie zum Beispiel 2-Pentanone, 2-Pentanol acetate, 2-Pentanol, β -Terpinyl

acetate, 2-Heptanol acetate, 2-Heptanol, 3,7-Dimethyl-3-octanol (Tetrahydrolinalool) und Citronellyl formate.

Auch in der Pulpe aus Nicaragua können bereits Ethanol ($3,56 \times 10^6 \pm 8,23 \times 10^5$ /g Probe) und Ethyl acetate ($1,01 \times 10^6 \pm 5,62 \times 10^2$ /g Probe) nachgewiesen werden, allerdings in etwas geringerer Konzentration. Octanoic acid ethyl ester ($6,33 \times 10^5 \pm 1,64 \times 10^5$ /g Probe) ist der einzige Ethylester unter den Hauptkomponenten. Das deutet ebenfalls auf eine bereits eingesetzte Fermentation während des Transportes hin, möglicherweise etwas weniger fortgeschritten im Vergleich zu der peruanischen Pulpe. Cordsen (2018) konnte aus dieser Pulpe mehrere Hefestämme von *Hanseniaspora* spp., *Meyerozyma* sp., *Schizosaccharomyces pombe* und *Trichosporon asahii* isolieren. Einige der in der Pulpe enthaltenen Hauptkomponenten konnten nicht in den KPSM-Fermentationen nachgewiesen werden, wie beispielsweise 2-Pentanone, 2-Pentanol acetate, Carvomenthe, 2-Heptanone, 2-Heptanol acetate und 2-Heptanol. Dies weist darauf hin, dass diese Stoffe vom Genotyp der jeweiligen Kakaopflanze abhängig sein könnten.

Hegmann (2015), die die Aromakomponenten von frischen Kakaopulpen unterschiedlicher Kakaogenotypen analysierte, konnte einige der genannten Substanzen in den von ihr analysierten Pulpen identifizieren. Die Komponenten mit den höchsten Gehalten (Peakflächen zwischen $7,9 \times 10^9$ und $1,0 \times 10^9$) waren 2-Pentanol acetate und 2-Heptanol acetate (Hegmann, 2015). Diese beiden Substanzen sowie 2-Pentanone, 2-Pentanol, 2-Heptanol und 2-Heptanone wurden von Kadow et al. (2013) unter anderem als Markersubstanzen für „fine flavor“-Kakao diskutiert, da sie dem Kakao süßliche und fruchtige Noten verleihen können. Besondere Bedeutung kam den Stoffen 2-Heptanol, 2-Heptanol acetate und 2-Heptanone zu, da diese in einer Kontrollprobe (Pulpe eines Konsumkakaos) in sehr geringen Mengen enthalten waren (Kadow et al., 2013). Die Autoren konnten durch die Analyse der Kakaopulpen unterschiedlicher Genotypen zeigen, dass bereits einige dieser Fein aromakomponenten in den Pulpen vorlagen und der Genotyp einen großen Einfluss auf die Zusammensetzung des Aromaprofils hatte. Sie vermuteten, dass diese Komponenten bereits während der Reifung aus der Pulpe in die Kotyledonen migrierten und dort aufgrund ihrer Fettlöslichkeit in den Speicherfetten angereichert wurden (Kadow et al., 2013).

Von den vietnamesischen Kakaofrüchten wurde ein Homogenisat aus Pulpe und Samen analysiert. Da die Früchte im Labor unter sterilen Bedingungen geöffnet wurden, kann eine Besiedelung mit Mikroorganismen vor der Analyse ausgeschlossen werden. In geringen Mengen liegen 3-Methyl-1-butanol (Peakfläche $1,04 \times 10^6$ /g Probe) und Phenylethyl Alcohol

(Peakfläche $5,14 \times 10^5$ /g Probe) in den vietnamesischen Kakaofrüchten vor. Letzterer konnte auch von Pino et al. (2010) und Chetschik et al. (2018) in Kakaopulpe nachgewiesen werden. Hauptsächlich sind 2-Pentanol (Peakfläche $2,60 \times 10^7$ /g Probe) und 2-Pentanone (Peakfläche $2,98 \times 10^6$ /g Probe) in den vietnamesischen Früchten enthalten. Diese beiden Substanzen konnten von Kadow et al. (2013) vor allem in den Kotyledonen von Kakaosamen identifiziert werden. Da in der vorliegenden Arbeit ein Homogenisat aus Pulpe und Samen analysiert wurde, könnte dies die hohen Konzentrationen der beiden Stoffe erklären.

Die GC-O-Analyse der Pulpen aus Peru und Nicaragua bestätigt, dass einige der bereits genannten Substanzen sensorisch wahrgenommen werden können. Die Aromaprofile der Pulpen sind geprägt von süßlichen, fruchtigen, blumigen sowie leicht grünen, grasigen und fermentierten Noten. Interessant ist, dass sowohl die von Kadow et al. (2013) beschriebenen Feinaromakomponenten, aber auch die von den Hefen gebildeten Substanzen, wie Ethylester und Acetate-Ester, in den meisten Proben detektiert werden können. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch die Hefen das Potential besitzen, das Aromaprofil von Kakao zu beeinflussen.

5.3 Volatile Komponenten des Rohkakaos

Die identifizierten Hauptkomponenten beider Rohkakao-Proben zum Zeitpunkt t_{72} unterscheiden sich kaum. In den fermentierten Kakaosamen der Spontanfermentation PQ 18a sind Ethanol und 2-Acetoxy-3-butanone (Acetoin acetate) als Hauptkomponenten (vgl. Kapitel 4.3.1) nachweisbar, in denen der inokulierten Fermentation PQ 18b nicht. In PQ 18b hingegen liegen 2-Pentanol und Benzaldehyde als Hauptkomponenten vor. In vergleichbaren Studien zur Analyse von volatilen Komponenten in Rohkakao konnten einige gleiche Substanzen nachgewiesen werden. Unter anderem wurden Alkohole wie 2-Pentanol, 3-Methyl-1-butanol, 2,3-Butanediol und 2-Phenylethyl Alcohol häufig in diesen Arbeiten identifiziert, ebenso Ester wie 2-Pentanol acetate, 3-Methyl-1-butanol acetate, 2,3-Butanediol diacetate und 2-Phenylethyl acetate. Auch Acetoin, Tetramethylpyrazine und 3-Methylbutanoic acid wurden häufig detektiert (Ascrizzi et al., 2017; Rodriguez-Campos et al., 2012; Batista et al., 2016; Ramos et al., 2014).

Die Fermentationsverläufe von PQ 18a und PQ 18b unterscheiden sich bezüglich einiger Substanzen. Bei der Spontanfermentation steigt der Gehalt von Ethyl acetate stetig an. In der inokulierten Fermentation wird Ethyl acetate in hohen Konzentrationen in den ersten 48 h

gebildet und in den letzten 24 stark abgebaut. Für Ethanol kann in PQ 18a eine Abnahme in den ersten 24 h und eine Zunahme nach 48 h beobachtet werden. In PQ 18b wird Ethanol vermehrt in den ersten 24 h gebildet und gegen Ende der Fermentation abgebaut. 3-Methyl-1-butanol und Phenylethyl Alcohol werden in der Spontanfermentation in großem Maße in den ersten 24 h gebildet, in der inokulierten Fermentation wird 3-Methyl-1-butanol zunächst abgebaut und nach 24h gebildet. Die Konzentration von Phenylethyl Alcohol ändert sich in PQ 18b kaum, von 2,3-Butanediol steigt sie dagegen stetig an. 2,3-Butanediol wird in der Spontanfermentation überwiegend in den ersten 24 h gebildet. Der Gehalt an Acetic acid steigt in der Spontanfermentation erst nach 48 h stark an, in PQ 18b bereits in den ersten 24 h und wieder in den letzten 24 h.

Bei der inokulierten Fermentation wird im Vergleich zu der Spontanfermentation in den ersten 24 h deutlich mehr Ethanol gebildet (Peakflächen von $2,91 \times 10^6$ bzw. $1,18 \times 10^5$ /g Probe). Zudem kann ein starker Anstieg der Konzentration von Acetic acid in den ersten 24 h beobachtet werden (PQ 18b: Zunahme Peakfläche um $3,01 \times 10^7$ /g Probe; PQ 18a: Zunahme um $9,28 \times 10^6$ /g Probe). Möglicherweise haben Essigsäurebakterien bereits zu diesem Zeitpunkt einen Teil des Ethanols in einer exothermen Reaktion zu Acetic acid umgesetzt. Dies könnte den starken Anstieg der Konzentration von Ethyl acetate erklären (Zunahme Peakfläche um $2,73 \times 10^6$ /g Probe), das von Hefen enzymatisch aus Ethanol und Acetic acid gebildet werden kann (Pires et al., 2014). Gesetzt dem Fall, dass sich die zugegebene Reinzuchtheffe *Saccharomyces cerevisiae* Zymaflore® x5 zu Beginn der Fermentation gegenüber den natürlich vorliegenden Hefestämmen durchsetzen konnte, deutet das daraufhin, dass diese Hefe schnell große Mengen Ethanol produziert und damit zu einer schnellen Ansäuerung und einem schnelleren Temperaturanstieg der Fermentationsmasse beiträgt. Biehl et al. (1985) stellten die Hypothese auf, dass eine langsamere Ansäuerung und ein damit verbundener moderater Temperaturanstieg aufgrund einer zielgerichteteren Proteolyse in den Kakaosamen zu einem höheren Aromapotential des Rohkakaos führen. Dies konnte ebenfalls von Meersman et al. (2016) bei dem Einsatz unterschiedlicher Starterkulturen festgestellt werden. Zudem kann beobachtet werden, dass die Bildung der höheren Alkohole, wie 3-Methyl-1-butanol und Phenylethyl Alcohol, mit der Bildung der jeweiligen Ester einhergeht. In der Spontanfermentation werden diese Substanzen in erhöhtem Maße in den ersten 24 h gebildet, in der inokulierten Fermentation ist dagegen nur ein moderater Anstieg erkennbar. 2,3-Butanediol, welches mit Attributen wie fruchtig und sahnig beschrieben wird (TheGoodScentsCompany, o.J.), liegt in beiden Fermentationen vor. Einige LAB-Spezies sind in der

Lage, Citronensäure über Pyruvat und Acetoin zu 2,3-Butanediol umzusetzen (Mayo et al., 2010). Die Bildung von 2,3-Butanediol konnten Lefeber et al. (2011) für alle analysierten, kakaospezifischen *Lactobacillus fermentum*-Stämme, die in KPSM-LAB fermentiert wurden, beobachten. Dies könnte den parallelen Anstieg von Acetoin und 2,3-Butanediol in den Fermentationsverläufen beider Fermentationen (PQ 18a und PQ 18b) erklären. 2,3-Butanediol kann in den in dieser Arbeit analysierten KPSM-Fermentationen durch unterschiedliche Hefespezies nicht nachgewiesen werden und scheint kein Produkt des Sekundärstoffwechsels dieser Spezies zu sein. In der vorliegenden Arbeit kann Tetramethylpyrazine in beiden fermentierten Kakaosamen unter den Hauptkomponenten nachgewiesen werden. Pyrazine sind generell Produkte der Maillard-Reaktion und werden hauptsächlich während der Röstung gebildet. Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass Pyrazine von *Bacillus subtilis* während der Kakaofermentation gebildet werden können. Zak et al. (1972) konnten nachweisen, dass der Gehalt an Tetramethylpyrazine im Fermentationsverlauf zweier Spontanfermentationen zunahm, ebenso wie die Zellzahl von *B. subtilis*. In einem in-vitro-Versuch konnten sie bestätigen, dass ein aus einer Kakaofermentation isolierter *B. subtilis*-Stamm in einem Pulpe-Simulationsmedium Tetramethylpyrazine bildete (Zak et al., 1972).

Zymaflore® x5 zeigte in KPSM ein gutes Wachstum, bildete Ethanol in hoher Konzentration (Cordsen, 2018) und auch einige volatile Acetate- und Ethylester. Ethylester können in der inokulierten Fermentation allerdings nicht nachgewiesen werden. Diesbezüglich unterscheiden sich die beiden Fermentationen (PQ 18a und PQ 18b) nicht. Meersman et al. (2016) konnten zeigen, dass der Einsatz von *S. cerevisiae*-Hybriden als Starterkulturen, die eine gute Hitzetoleranz und vermehrte Bildung von Acetate-Estern aufwiesen, zu einem hohen Gehalt an Acetate-Estern und einem reproduzierbaren Aromaprofil führten. Die Unterschiede an „Fruchtigkeit“ der hergestellten Schokoladen konnten von einem trainierten Panel wahrgenommen werden (Meersman et al., 2016).

Im Rahmen dieser Arbeit kann nicht bestimmt werden, ob sich die zugesetzte Reinzuchtheife gegen die heimischen Mikroorganismen durchsetzen konnte und einen signifikanten Einfluss auf die Fermentation hatte. Hierfür müssten die zu den jeweiligen Probenahmezeitpunkten vorliegenden Mikroorganismen identifiziert werden. Die Fermentationsverläufe deuten aber an, dass die beiden Fermentationen unterschiedlich verlaufen sind. Interessant wäre zu prüfen, ob Unterschiede bezüglich des Aromaprofils in aus dem Rohkakao hergestellten Schokoladen erkennbar wären.

6 Zusammenfassung

Die HS-SPME-GC-MS-Analyse der KPSM-Fermentationen unterschiedlicher aus Kakaofermentationen isolierter Hefestämme zeigte Unterschiede in der Zusammensetzung der volatilen Komponenten sowohl in Anzahl wie auch in Konzentration. Hauptfermentationsprodukte waren Ethanol, 3-Methyl-1-butanol sowie einige Acetate- und Ethylester, wie 3-Methyl-1-butanol acetate, Ethyl acetate und Octanoic acid ethyl ester. Zudem konnten kurz- und mittelkettige Fettsäuren in geringeren Konzentrationen nachgewiesen werden. Aldehyde und Ketone spielten eher eine untergeordnete Rolle. Eine Signifikanzprüfung der Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Hefestämmen war aufgrund der Einfachbestimmung im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Für eine Vielzahl der Stämme konnte vor allem in den ersten 48 h Stunden eine Bildung von Alkoholen, Estern und Säuren und eine leichte Abnahme bzw. geringe Änderung der Konzentrationen in den letzten 24 h, der insgesamt 72 h andauernden Fermentation, beobachtet werden. Dies deutet daraufhin, dass die Hefestämme in der Lage waren, die gebildeten Alkohole und Säuren zu den entsprechenden Esterverbindungen umzusetzen. Besonders die gärstärkeren Hefespezies bildeten vermehrt sekundäre Stoffwechselprodukte, speziell Esterverbindungen und vor allem die *Saccharomyces*-Stämme waren diesbezüglich anderen Hefespezies überlegen. Es wurde aber auch deutlich, dass nicht nur die Spezies, sondern auch der jeweilige Hefestamm einen Einfluss darauf hat, was der Vergleich der indonesischen *S. cerevisiae*-Stämme aus Gruppe 1 und 2 zeigt.

Die Reinzuchthefen zur Weinherstellung konnten in KPSM kultiviert werden und bildeten sekundäre Stoffwechselprodukte, die ebenfalls von den Hefestämmen aus Kakaofermentationen gebildet wurden. Auch hier waren die gärstärkeren *Saccharomyces*-Stämme den Nicht-Saccharomyceten überlegen, vor allem im Hinblick auf die gebildeten Esterverbindungen. Die Analyse einiger Hefe-Proben mittels GC-O konnte die Aromarelevanz bestimmter Substanzen für das spätere Kakaoaroma bestätigen. Es wurden besonders viele Ester wahrgenommen, da diese eine niedrige Geruchsschwelle aufweisen sowie einige Alkohole. Die

Ester wurden meist mit, für das Kakaoaroma, positiven Attributen wie fruchtig und blumig beschrieben, 3-Methyl-1-butanol, welches in allen Proben detektiert wurde, mit Begriffen wie süßlich, Kakao und Schokolade.

Mittels agglomerativem, hierarchischem Clustering war eine Gruppierung der Hefen in vier Gruppen möglich. Die Gruppeneinteilung bestätigte die vorherigen Beobachtungen bezüglich der Bildung aromaaktiver Substanzen durch die Hefen. Es konnte vor allem eine Trennung von Saccharomyceten und Nicht-Saccharomyceten beobachtet werden. Die ersteren zeichneten sich durch fruchtige und blumige Aromakomponenten aus und könnten dahingehend einen Einfluss auf das Aromaprofil haben.

Ein Vergleich mit den volatilen Komponenten von Kakaopulpen unterschiedlicher Herkunft zeigte, dass einige aromaaktive Substanzen vorlagen, wie 2-Heptanone, 2-Heptanol und 2-Heptanol acetate, die nicht in den KPSM-Fermentationen nachgewiesen werden konnten. Allerdings wurden in der peruanischen Pulpe, bei welcher die Fermentation während des Transportes vorangeschritten war, einige Sekundärstoffwechselprodukte von Hefen identifiziert. Diese konnten mittels GC-O sensorisch wahrgenommen werden, was die Relevanz der Hefen im Einfluss auf das Kakaoaromaprofil verdeutlichte.

Die Inokulation einer Kakaofermentation mit der Reinzuchtheffe „Zymaflore® x5“ (*Saccharomyces cerevisiae*) führte zu keiner Veränderung im Hinblick auf die Zusammensetzung der volatilen Komponenten im Vergleich zu der Spontanfermentation. Es konnte beobachtet werden, dass in der inokulierten Fermentation der Ethanol- und Acetic acid-Gehalt stark in den ersten 24 h zunahm. Nach Biehl et al. (1985) geht mit einer schnelleren Ansäuerung ein schnellerer Temperaturanstieg einher und resultiert in Rohkakao mit geringerem Aromapotentiale. Zudem konnte in der inokulierten Fermentation keine vermehrte Bildung von Estern und höheren Alkoholen beobachtet werden. Falls sich die Reinzuchtheffe „Zymaflore® x5“ in der Fermentationsmasse gegen die natürlich vorliegenden Hefestämme durchsetzen konnte, scheint sie im Hinblick auf die Aromabeeinflussung für eine Starterkultur weniger geeignet.

7 Ausblick

Um die Ergebnisse statistisch abzusichern und die Unterschiede bezüglich der Gehalte an volatilen Komponenten der einzelnen Hefestämme auf Signifikanz überprüfen zu können, empfiehlt es sich mindestens eine Doppelbestimmung durchzuführen. Des Weiteren wäre der Vergleich der Ergebnisse aus den KPSM-Fermentationen mit den Ergebnissen aus Fermentation der Hefestämme auf realen Kakaosamen interessant. Dadurch könnte überprüft werden, ob das verwendete KPSM geeignet ist reale Fermentationen nachzustellen und ob die Hefen in Realmatrices, die gleichen volatilen Komponenten bilden können. Hefestämme mit Aromapotential könnten dann für Starterkulturen ausgewählt und im Labormaßstab weiteren Fermentationsversuchen unterzogen werden. Auch die Veränderungen der volatilen Komponenten während der weiteren Verarbeitungsschritte von Rohkakao zu Schokolade, wie Röstung und Conchieren, und der Verbleib der Substanzen im Endprodukt „Schokolade“ sollten in weiteren Versuchen analysiert werden.

Literaturverzeichnis

- Afoakwa, E. O. (2012) Chocolate and Cocoa, Flavor and Quality. In Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Seiten 1–19. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/0471238961.chocafoa.a01
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., Ryan, A. (2008) Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(9):840–857. doi:10.1080/10408390701719272
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., Ryan, A. (2009) Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC-mass spectrometry and GC-olfactometry. *Food Chemistry*, 113(1):208–215. doi:10.1016/j.foodchem.2008.07.088
- Ames, J. M., Elmore, J. S. (1992) Aroma components of yeast extracts. *Flavour and Fragrance Journal*, 7(2):89–103. doi:10.1002/ffj.2730070208
- Ames, J. M., Leod, G. M. (1985) Volatile Components of a Yeast Extract Composition. *Journal of Food Science*, 50(1):125–131. doi:10.1111/j.1365-2621.1985.tb13292.x
- Ascrizzi, R., Flamini, G., Tessieri, C., Pistelli, L. (2017) From the raw seed to chocolate: Volatile profile of Blanco de Criollo in different phases of the processing chain. *Microchemical Journal*, 133:474–479. doi:10.1016/j.microc.2017.04.024
- Backhaus, K., Erichson, B., Plinke, W., Weiber, R. (2016) *Multivariate Analysemethoden - Eine anwendungsorientierte Einführung - Varianzanalyse*, Band 14. doi:10.1007/3-540-29932-7
- Batista, N. N., Ramos, C. L., Dias, D. R., Pinheiro, A. C. M., Schwan, R. F. (2016) The impact of yeast starter cultures on the microbial communities and volatile compounds in cocoa fermentation and the resulting sensory attributes of chocolate. *Journal of Food Science and Technology*, 53(2):1101–1110. doi:10.1007/s13197-015-2132-5

- Belitz, H. Z., Grosch, W., Schlieberle, P. (2009) Aroma Compounds. In Food Chemistry, Seiten 340–402. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-540-69934-7_6
- Biehl, B., Brunner, E., Passern, D., Quesnel, V. C., Adomako, D. (1985) Acidification, proteolysis and flavour potential in fermenting cocoa beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(7):583–598. doi:10.1002/jsfa.2740360710
- Bonvehí, J. S. (2005) Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. *European Food Research and Technology*, 221(1-2):19–29. doi:10.1007/s00217-005-1147-y
- Chambers IV, E., Koppel, K. (2013) Associations of volatile compounds with sensory aroma and flavor: The complex nature of flavor. 18(5):4887–4905. doi:10.3390/molecules18054887
- Chetschik, I., Kneubühl, M., Chatelain, K., Schlüter, A., Bernath, K., Hühn, T. (2018) Investigations on the Aroma of Cocoa Pulp (*Theobroma cacao* L.) and Its Influence on the Odor of Fermented Cocoa Beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(10):2467–2472. doi:10.1021/acs.jafc.6b05008
- Comuzzo, P., Tat, L., Tonizzo, A., Battistutta, F. (2006) Yeast derivatives (extracts and autolysates) in winemaking: Release of volatile compounds and effects on wine aroma volatility. *Food Chemistry*, 99(2):217–230. doi:10.1016/j.foodchem.2005.06.049
- Cordsen, L. M. (2018) Isolierung, Charakterisierung und Untersuchungen zu Wachstum und Primärstoffwechsel von Mikroorganismen aus Kakaofermentationen. Diplomarbeit
- Crafack, M., Keul, H., Eskildsen, C. E., Petersen, M. A., Saerens, S., Blennow, A., Skovmand-Larsen, M., Swiegers, J. H., Petersen, G. B., Heimdal, H., Nielsen, D. S. (2014) Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Research International*, 63:306–316. doi:10.1016/j.foodres.2014.04.032
- Crafack, M., Mikkelsen, M. B., Saerens, S., Knudsen, M., Blennow, A., Lowor, S., Takrama, J., Swiegers, J. H., Petersen, G. B., Heimdal, H., Nielsen, D. S. (2013) Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 167(1):103–116. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.024
- De Vuyst, L., Weckx, S. (2016) The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1):5–17. doi:10.1111/jam.13045

LITERATURVERZEICHNIS

- Delahunty, C. M., Eyres, G., Dufour, J. P. (2006) Gas chromatography-olfactometry. *Journal of Separation Science*, 29(14):2107–2125. doi:10.1002/jssc.200500509
- Delfini, C., Gaia, P., Bardi, L., Mariscalco, G. (1991) Production of benzaldehyde, benzyl alcohol and benzoic acid by yeasts and *Botrytis cinerea* isolated from grape musts and wines. *Vitis*, 30(4):253–263
- Fahrurrozi (2015) Microbiological and Biochemical Investigations of Cocoa Bean Fermentation. Dissertation
- Frommann, L. J. (2017) Untersuchungen zu Wachstum und Produktbildung bei Hefen aus Kakaofermentationen. Masterarbeit
- Gottzein, A.-K. (2012) Methodenentwicklung und Qualitätssicherung bei forensisch- toxikologischen Übersichtsanalysen unter Anwendung statistischer Versuchsplanung. Dissertation
- Gross, J. H. (2013) Einleitung. In *Massenspektrometrie*, Seiten 1–22. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-8274-2981-0_1
- Harris, D. C., Werner, T., Werner, G. (2014) *Lehrbuch der Quantitativen Analyse*. Springer Spektrum. doi:10.1007/978-3-642-37788-4_24
- Hegmann, E. C. (2015) Qualitätsbedingende Eigenschaften neuer Kakao-Genotypen und deren Verhalten im Nachernteverfahren – eine Analyse neuer Kakao-Selektionen aus Costa Rica. Dissertation
- Ho, V. T. T., Zhao, J., Fleet, G. (2014) Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174:72–87. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.014
- ICCO (International Cocoa Organization) (2013) Growing Cocoa. URL <https://www.icco.org/about-cocoa/growing-cocoa.html>. Abgerufen am: 07.03.2018
- ICCO (International Cocoa Organization) (2017) Fine or Flavour cocoa. URL <https://www.icco.org/about-cocoa/fine-or-flavour-cocoa.html>. Abgerufen am: 07.03.2018
- Kadow, D., Bohlmann, J., Phillips, W., Lieberei, R. (2013) Identification of main fine or flavour components in two genotypes of the cocoa tree (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 86:90–98. doi:10.5073/JABFQ.2013.086.013

- Kataoka, H., Lord, H. L., Pawliszyn, J. (2000) Applications of solid - phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880(1-2):35–62. doi:10.1016/S0021-9673(00)00309-5
- Koné, M. K., Guéhi, S. T., Durand, N., Ban-Koffi, L., Berthiot, L., Tachon, A. F., Brou, K., Boulanger, R., Montet, D. (2016) Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. *Food Research International*, 89:910–917. doi:10.1016/j.foodres.2016.04.010
- Lee, A. H., Neilson, A. P., O’Keefe, S. F., Ogejo, J. A., Huang, H., Ponder, M., Chu, H. S. S., Jin, Q., Pilot, G., Stewart, A. C. (2018) A laboratory-scale model cocoa fermentation using dried, unfermented beans and artificial pulp can simulate the microbial and chemical changes of on-farm cocoa fermentation. *European Food Research and Technology*. doi:10.1007/s00217-018-3171-8
- Lefeber, T., Janssens, M., Camu, N., De Vuyst, L. (2010) Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23):7708–7716. doi:10.1128/AEM.01206-10
- Lefeber, T., Janssens, M., Moens, F., Gobert, W., De Vuyst, L. (2011) Interesting starter culture strains for controlled cocoa bean fermentation revealed by simulated cocoa pulp fermentations of cocoa-specific lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18):6694–6698. doi:10.1128/AEM.00594-11
- Legrum, W. (2011) *Riechstoffe, zwischen Gestank und Duft*. Vieweg + Teubner
- Matissek, R., Steiner, G., Fischer, M. (2014) *Instrumentelle Techniken*. Seiten 45–155. doi:10.1007/978-3-642-34829-7_5
- Mayo, B., Aleksandrak - Piekarczyk, T., Fernandez, M., Kowalczyk, M., Alvarez-Martin, P., Bardowski, J. (2010) Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. In Mozzi, F., Raya R., R., Vignolo M., G., Herausgeber, *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, Kapitel 1, Seiten 3–33. Blackwell Publishing
- Meersman, E., Steensels, J., Struyf, N., Paulus, T., Saels, V., Mathawan, M., Allegaert, L., Vrancken, G., Verstrepen, K. J. (2016) Tuning chocolate flavor through development of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* starter cultures with increased acetate ester

- production. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(2):732–746. doi:10.1128/AEM.02556-15
- Miedaner, T. (2018) Schokolade – Speise der Götter. In *Genusspflanzen*, Seiten 179–201. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-662-56602-2_9
- Ozturk, G., Young, G. M. (2017) Food Evolution: The Impact of Society and Science on the Fermentation of Cocoa Beans. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(3):431–455. doi:10.1111/1541-4337.12264
- Pawliszyn, J. (2012) Theory of Solid-Phase Microextraction. In *Handbook of Solid Phase Microextraction*, Seiten 13–59. doi:10.1016/B978-0-12-416017-0.00002-4
- Pettipher, G. L. (1986) Analysis of cocoa pulp and the formulation of a standardised artificial cocoa pulp medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37(3):297–309. doi:10.1002/jsfa.2740370315
- Pino, J. A., Ceballos, L., Quijano, C. E. (2010) Headspace volatiles of *Theobroma cacao* L. Pulp from Colombia. *Journal of Essential Oil Research*, 22(2):113–115. doi:10.1080/10412905.2010.9700276
- Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., Vicente, A. A. (2014) Yeast: The soul of beer's aroma - A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(5):1937–1949. doi:10.1007/s00253-013-5470-0
- Qin, X.-W., Lai, J.-X., Tan, L.-H., Hao, C.-Y., Li, F.-P., He, S.-Z., Song, Y.-H. (2017) Characterization of volatile compounds in Criollo, Forastero, and Trinitario cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) in China. *International Journal of Food Properties*, 20(10):2261–2275. doi:10.1080/10942912.2016.1236270
- Ramos, C. L., Dias, D. R., Miguel, M. G. d. C. P., Schwan, R. F. (2014) Impact of different cocoa hybrids (*Theobroma cacao* L.) and *S. cerevisiae* UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. *Food Research International*, 64:908–918. doi:10.1016/j.foodres.2014.08.033
- Resources.schoolscience.co.uk (o.J.) The sense of smell. Analysis of fragrances. URL <http://resources.schoolscience.co.uk/ICI/16plus/smells/smellsch3pg2.html>. Abgerufen am: 13.04.2018

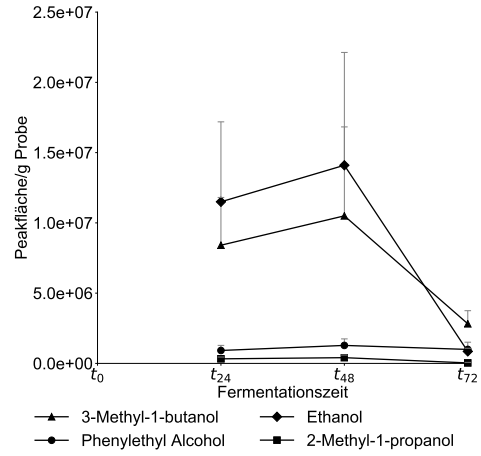
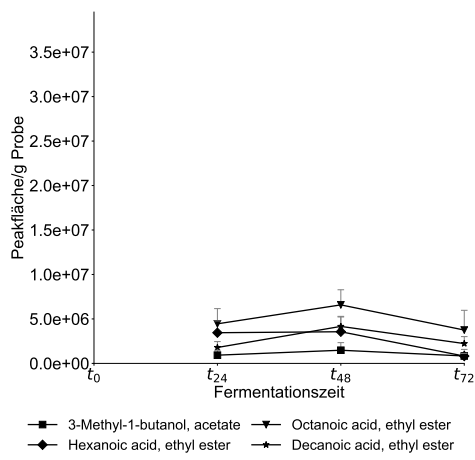
- Rimbach, G., Nagursky, J., Erbersdobler, H. F. (2015) Kaffee, Tee, Kakao. In Lebensmittel-Warenkunde für Einsteiger, Seiten 283–312. doi:10.1007/978-3-662-46280-5_12
- Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H., Orozco-Avila, I., Lugo-Cervantes, E., Jaramillo-Flores, M. (2011) Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International*, 44(1):250–258. doi:10.1016/j.foodres.2010.10.028
- Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H. B., Contreras-Ramos, S. M., Orozco-Avila, I., Jaramillo-Flores, E., Lugo-Cervantes, E. (2012) Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. *Food Chemistry*, 132(1):277–288. doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.078
- Romano, P., Suzzi, G. (1996) Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2):309–315
- Rüffer, R. (2017) Untersuchungen über das Wachstum der Hefen in einem Kakaopulpesimulationsmedium und über die Veränderung des Mediums während der Fermentation. Masterarbeit
- Schwan, R. F., Wheals, A. E. (2004) The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4):205–221. doi:10.1080/10408690490464104
- Sevinc, G. (2018) Untersuchungen zum Primär- und Sekundärstoffwechsel unterschiedlicher Hefen aus Fermentation von *Theobroma Cacao* L. Diplomarbeit
- Sobotta, F. (2017) Precursors of chocolate aroma – flavour profile comparisons of traditionally fermented cocoa and cocoa beans from fermentation-like incubation by means of HS-SPME-GC-MS-O. Masterarbeit
- Steensels, J., Meersman, E., Snoek, T., Saels, V., Verstrepen, K. J. (2014) Large-scale selection and breeding to generate industrial yeasts with superior aroma production. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(22):6965–6975. doi:10.1128/AEM.02235-14
- Stoll, L. (2010) Biochemische Indikatoren für Keimung und Fermentation in Samen von Kakao (*Theobroma cacao* L.). Dissertation

LITERATURVERZEICHNIS

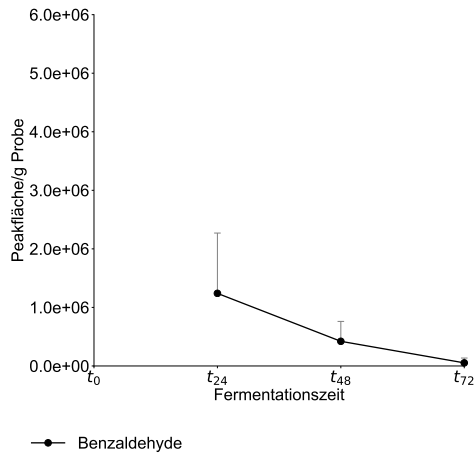
- Szymanski, N., Petersen, K. D., Fritsche, J. (2013) Einfluss des Paneltrainings auf die Panel Performance in der Gaschromatographie-Olfaktometrie von Mayonnaisen. Technischer Bericht
- TheGoodScentsCompany (o.J.) The Good Scents Company Information System. URL <http://www.thegoodscentscopy.com/index.html>. Abgerufen am: 02.01.2019
- Tran, P. D., Van de Walle, D., De Clercq, N., De Winne, A., Kadow, D., Lieberei, R., Messens, K., Tran, D. N., Dewettinck, K., Van Durme, J. (2015) Assessing cocoa aroma quality by multiple analytical approaches. *Food Research International*, 77:657–669. doi:10.1016/j.foodres.2015.09.019
- Ugliano, M., Henschke, P. A. (2009) Yeasts and wine flavour. In *Wine Chemistry and Biochemistry*, Seiten 313–392. Springer New York, New York, NY. doi:10.1007/978-0-387-74118-5_17
- Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D., Vanderhaegen, B. M., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Pretorius, I. S., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Delvaux, F. R. (2003) Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes *ATF1*, *Lg-ATF1*, and *ATF2* control the formation of a broad range of volatile esters. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9):5228–5237. doi:10.1128/AEM.69.9.5228-5237.2003
- Zak, D., Ostovar, K., Keeney, P. (1972) Implication of *Bacillus subtilis* in the synthesis of tetramethylpyrazine during fermentation of cocoa beans. *Journal of food science: an official publication of the Institute of Food Technologists*, 37:967–968

Anhang

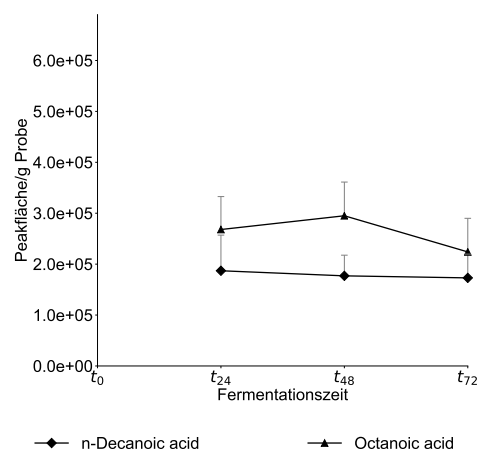
Anhang 1 Darstellung der Fermentationsverläufe der *S. cerevisiae*-Isolate aus Indonesien Gruppe 2



a) Ester



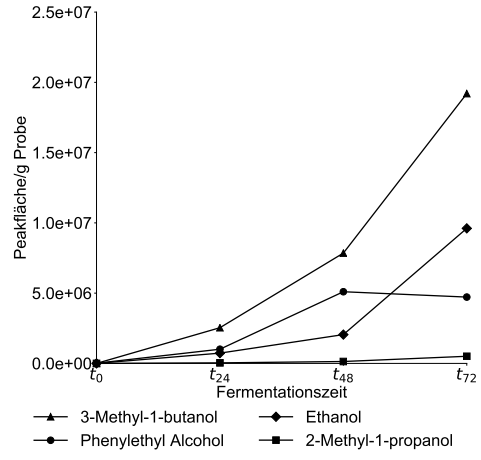
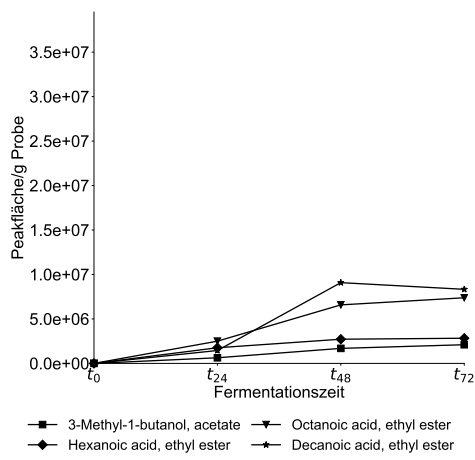
b) Alkohole



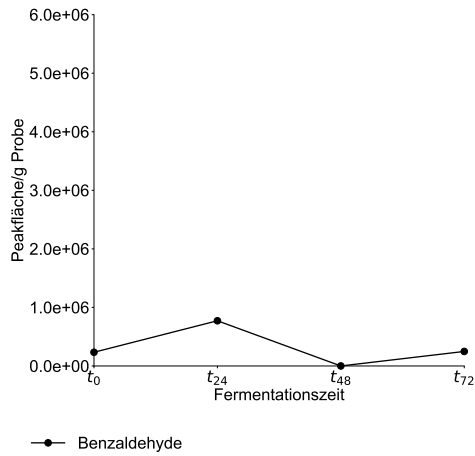
c) Aldehyde/Ketone

d) Säuren

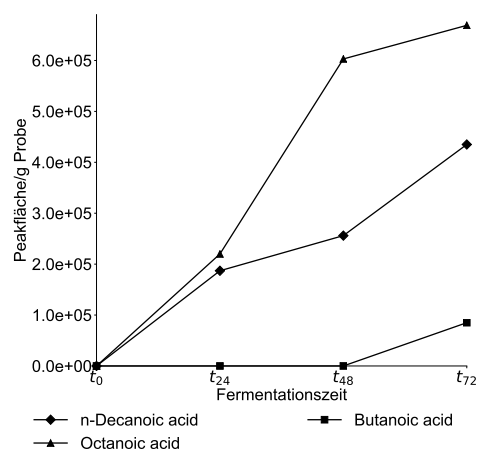
Anhang 2 Darstellung des Fermentationsverlaufes des *S. cerevisiae*-Isolats aus Ecuador (IDE-Y096)



a) Ester



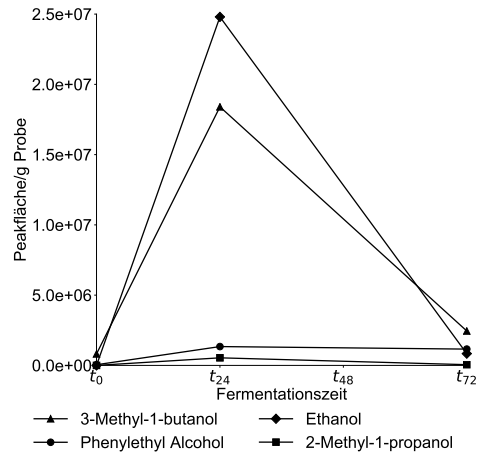
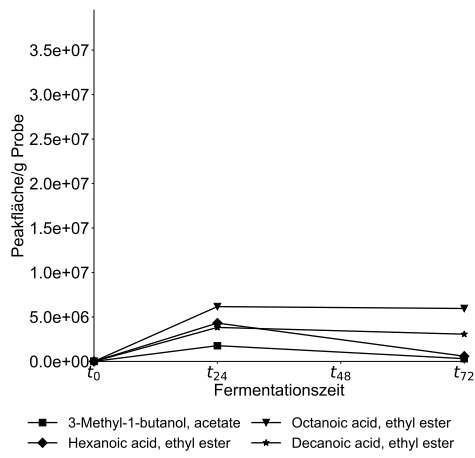
b) Alkohole



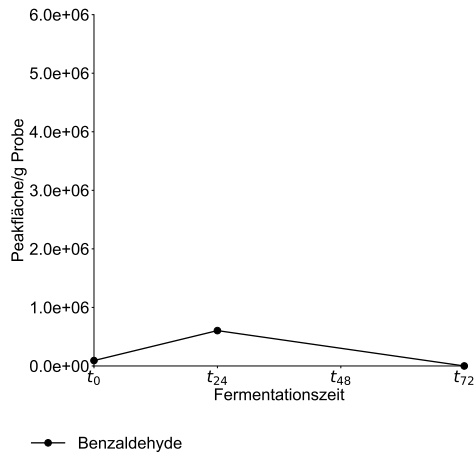
c) Aldehyde/Ketone

d) Säuren

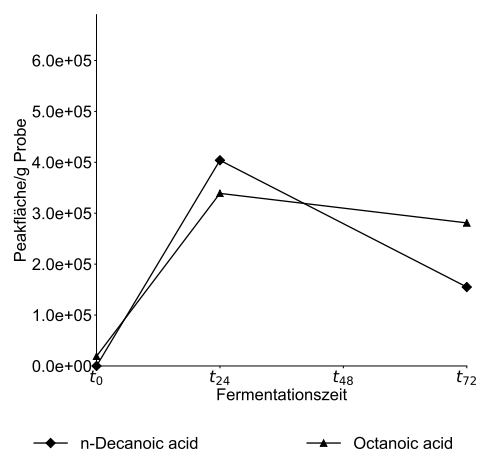
Anhang 3 Darstellung des Fermentationsverlaufes des *S. cerevisiae*-Isolats aus Trinidad und Tobago (IDT-Y15)



a) Ester



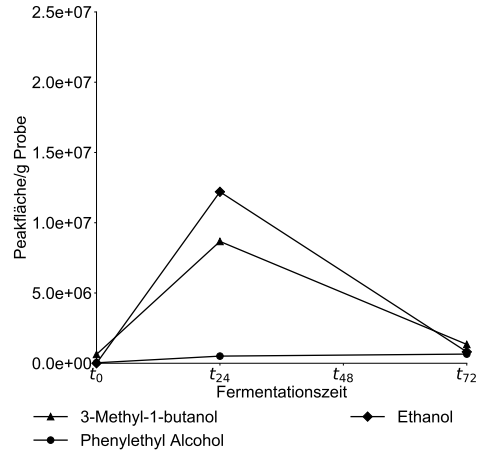
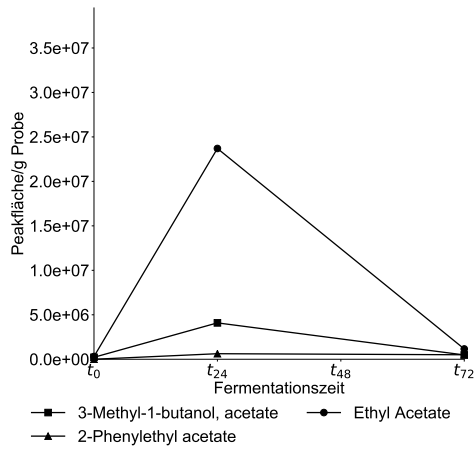
b) Alkohole



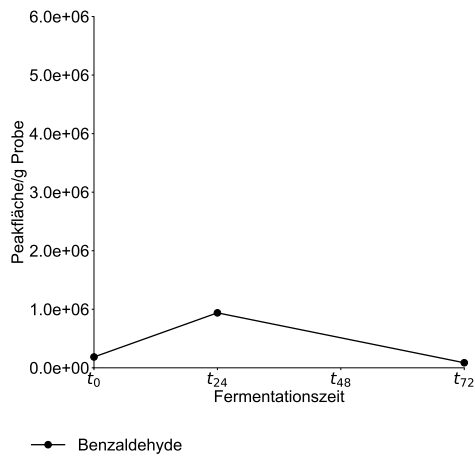
c) Aldehyde/Ketone

d) Säuren

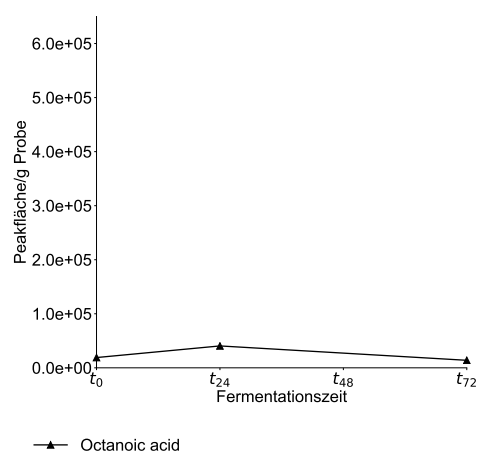
Anhang 4 Darstellung des Fermentationsverlaufes des *H. guilliermondii*-Isolats aus Trinidad und Tobago (IDT-Y11)



a) Ester



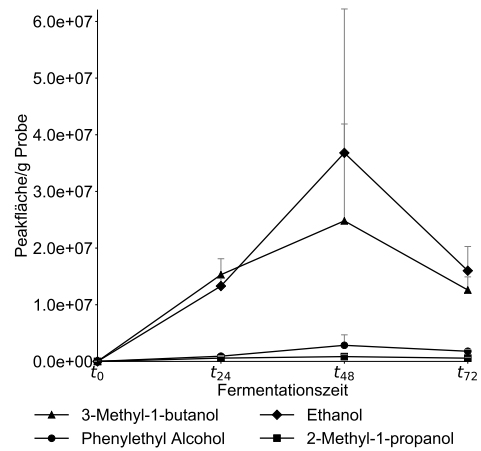
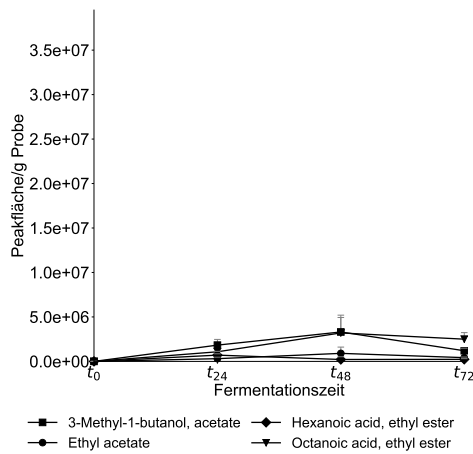
b) Alkohole



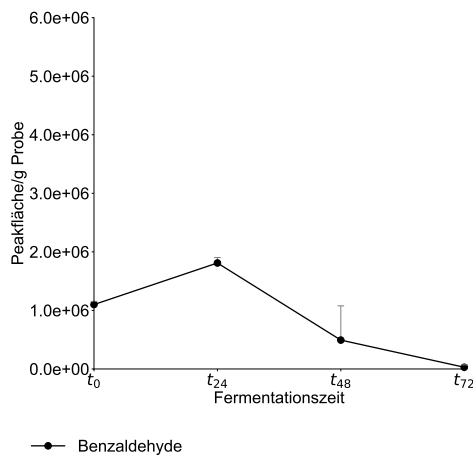
c) Aldehyde/Ketone

d) Säuren

Anhang 5 Darstellung des Fermentationsverlaufes der *S. cerevisiae*-Weinhefen GHM und CY3079

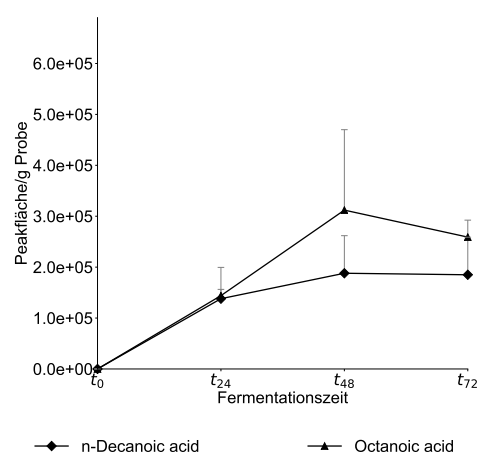


a) Ester



c) Aldehyde/Ketone

b) Alkohole



d) Säuren

Aufgrund des großen Datenumfanges sind die weiteren Dateien des Anhanges auf der beige-fügten CD gesammelt. Dies umfasst folgende Ordner:

6. Ergebnisse der GC-MS-Analytik gegliedert nach KPSM, Hefestämme, Kakaopulpe und Rohkakao
7. Ergebnisse der Sniffing-Analysen gegliedert nach KPSM-Fermentationen und Kakaopulpe
8. XLSTAT-Ausgaben der Clusteranalyse
9. Rohdaten GC-MS-Messungen

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Masterarbeit mit dem o.a. formulierten Thema ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Ort

Datum

Unterschrift im Original

Diese Arbeit wurde an der Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg (HAW) - Fakultät Life Sciences unter der wissenschaftlichen Anleitung von Frau Prof. Dr. med. vet. Katharina Riehn (HAW) und Herrn Prof. Dr. Bernward Bisping (Universität Hamburg, UHH) und der technischen Anleitung von Herrn Matthieu Nourrisson (Lebensmittelchemiker mit Diplom in Lebensmittelchemie, UHH) selbstständig durchgeführt.