

Proteinhydrolyse während der Kakaofermentation in Abhängigkeit von Wechselwirkungen mit Polyphenolen unter anaeroben und aeroben Bedingungen*

B. BIEHL

Mitteilung aus dem Botanischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Eingegangen am 29. Juli 1966

Einleitung

Die Proteine des fermentierten Kakaos zeichnen sich durch Schwerlöslichkeit und schlechte Verdaulichkeit (1—9) aus. Als Ursache wurde schon von älteren Autoren ihre Gerbung durch Tannine der Kakaosamen im Verlaufe der Fermentation angenommen (10, 11). In einer früheren Arbeit (12) ist untersucht worden, welcher Art die Wechselwirkungen mit Polyphenolen** sind, die zu dieser Schwerlöslichkeit der Proteine führen: In unfermentierten Samen wird bei kurzzeitiger Behandlung des Gefriertrockenpulvers in Wasser die Löslichkeit des Gesamtproteins in verdünnten Alkalilösungen durch Gerbung unter anaeroben Bedingungen nicht herabgesetzt, wohl aber unter aeroben Verhältnissen, begleitet von charakteristischen Bräunungsreaktionen. Auch das elektrolytische Verhalten der Proteine wird dadurch tiefgreifend verändert (18, 20). Aus den Befunden wurde auf eine Chinongerbung (13) als Ursache geschlossen und diskutiert, ob neben Proteinen auch Proteinabbauprodukte während der Fermentation in ähnlicher Weise wie bei der Chinongerbung reagieren.

Voraussetzung für die Chinongerbung ist die (enzymatische) Oxydation der polyphenolischen Flavonderivate der Kakaosamen zu Chinonen (14, 15). Der Kakao enthält eine aktive Polyphenoloxydase (16, 17). Sobald durch die Wirkung der „äußeren Fermentation“ (der mikrobiellen Zersetzung des Fruchtfleisches) die Samen absterben, können Enzyme und Substrate aus Cytoplasma und Zellsaftvakuolen der Cotyledonzellen miteinander in Wechselwirkung treten (18, 20). Normalerweise — abhängig von Methode und Bedingungen im einzelnen (21, 22) — verläuft die erste Phase der Fermentation anaerob. Erst in der letzten Phase und während der Trocknung dringt Sauerstoff in die Bohnen ein und gibt die Voraussetzung für eine Chinongerbung. Nach FORSYTH u. QUESNEL (17) werden die Proteine bereits in der anaeroben Phase — auf Grund des Gehaltes an Leucoanthocyanidinen in den Samen (16, 23) — vergerbt und die Enzyme weitgehend unlöslich. Zur gleichen Zeit erfolgt jedoch — offensichtlich ungehindert — die Proteinhydrolyse unter Bildung erheblicher Mengen freier Aminosäuren (24—28).

Der strengen Folge anaerober und aerober Bedingungen wird von denselben Autoren (29—31) Bedeutung für die Bildung der Aromavorstufen des Kakaos beigemessen, besonders im Hinblick auf die Veränderungen der Polyphenole. Ob diese vom Fermentationsverlauf abhängige Folge auch für die enzymatische Proteinhydrolyse und die Wechselwirkungen zwischen Polyphenolen, Proteinen und Proteinabbauprodukten Bedeutung hat, ist nicht bekannt. Diese Frage ist von Interesse, da die Fermentation Voraussetzung für die Bildung von Aroma bzw. Aromavorstufen ist und sowohl Kakaopolyphenole als auch Proteine bzw. ihre Hydrolyseprodukte an der Bildung der Aromakomponenten beteiligt sein sollen (19, 32—34).

Allgemein können ebenso wie Proteine auch Aminosäuren und Peptide nach primärer Oxydation von Polyphenolen zu Chinonen mit diesen durch Bildung gefärbter Kondensationsprodukte und ferner durch oxydative Desaminierung verschiedener Aminosäuren unter physiologischen Bedingungen reagieren (15, 35—38), vornehmlich als postmortale Erscheinungen im Zusammenhang mit enzymatischen Bräunungen in pflanzlichen Geweben. Solche Reaktionen bei der Tee- und Tabak-Fermentation sind untersucht und diskutiert worden (39—44). PURR u. Mitarb. (45) haben die Möglichkeit solcher Reaktionen im Kakaosamen eingehender untersucht. Sie fanden, daß verschiedene Aminosäuren und Peptide die O₂-Aufnahme bei der Brenzkatechin-Oxydation durch Kakaopolyphenoloxydase-Präparate steigern. Die Verfasser diskutieren darum

* Diese Arbeit wurde vom Forschungsinstitut für Kakaowirtschaft e. V., Hamburg und vom Forschungsrat der Hansestadt Hamburg finanziell unterstützt. Frau K. PRÜSER danke ich für chemisch-technische Arbeiten, Herrn Dipl.-Chem. G. MÜLLER für die Unterstützung bei Aminosäure-Analysen, Herrn Dr. Dr. BIBBER und Herrn E. MYLORD für die Beschaffung frischer Kakaofrüchte.

** „Polyphenole“ als Kurzbezeichnung für Polyhydroxyphenole.

die Beteiligung dieser Reaktionen bei der Aromabildung. Voraussetzung hierfür ist die Hydrolyse der Kakaoproteine im Verlaufe der Fermentation.

In dieser Arbeit wird untersucht, in welchem Maße die Proteine und ihre enzymatische Hydrolyse unter den anaeroben bzw. aeroben Bedingungen bei der Fermentation durch eine sauerstoffunabhängige Gerbung [durch Flavotannine (13)] einerseits oder nach enzymatischer Oxydation der Kakaopolyphenole durch Chinongerbung andererseits beeinflußt werden.

Methoden

Material

Frische, reife Kakaofrüchte konnten aus Westafrika und für einen Versuch aus der Schule für Tropische Landwirtschaft, Witzenhausen, innerhalb von wenigen Tagen nach der Ernte beschafft werden. Luftgetrocknete fermentierte und unfermentierte Kakaoproben wurden in Bahia gesammelt. Die Samen frischer Früchte wurden auf -20°C gebracht, geschält, die Cotyledonen mit Trockeneis gemischt, pulverisiert und gefriergetrocknet. Anschließend wurde das Fett mit Petroläther im Soxhletapparat teilweise (zu 50—80%) extrahiert und die Proben bei Zimmertemperatur im Vakuumexsiccator getrocknet. Unterschiede im Gesamtstickstoff-Gehalt verschiedener Proben sind vornehmlich auf Differenzen im Restfettgehalt zurückzuführen. Für die einzelnen Versuche wurde identisches Ausgangsmaterial verwendet. Für einen Versuch (Tab. 2) wurde das entfettete Gefriertrockenpulver unfermentierter Cotyledonen bei Temperaturen unter -10°C erschöpfend mit Aceton-Wasser-Gemischen (nachfolgend 100, 80, 50, 80, 100% Aceton) bis zur vollständigen Entfernung der Polyphenole extrahiert (Rückstand nach Vakuum-Trocknung: Acetontrockenpulver). Im Extrakt wurde der Gesamtstickstoff und der freie Aminostickstoff gesondert bestimmt. In diesen Trockenpulvern der unfermentierten Samen sind die Enzyme weitgehend aktiv.

Fermentationen *in vitro*

Sie wurden in 150 ml fassenden Kolben ausgeführt, die in der Art einer Waschflasche eine Vorrichtung zum Durchleiten von Gasen besaßen. Das Einleitungsrohr endete in einer feinporigen Glassinterplatte, die das einströmende, vorgereinigte und vorgewärmte (40°C) Gas in feine Blasen verteilt. Die Fermentationsflüssigkeit konnte aus einem Scheidetrichter zum abgeschlossenen System hinzugegeben werden. Etwa 2—5 g Trockenpulver der unfermentierten Cotyledonen wurden in die Kolben eingewogen, die Gefäße verschlossen, vorsichtig Gas eingeleitet (15 min) und dann aus dem Scheidetrichter 20—50 ml Fermentationsflüssigkeit zugegeben. Während der „Fermentationen“ wurde die Temperatur in den Gefäßen durch Eintauchen in einen Ultrathermostaten auf 40°C gehalten. Dauer der Behandlung: 36 bzw. 44 Std. Für anaerobe Bedingungen wurde Stickstoff, für aerobe Luft (etwa 3 ml/min) durchgeleitet. 0,05 m-Acetat-Puffer diente als Fermentationsflüssigkeit (pH im endgültigen Ansatz: 5,2—5,5). Nach Beendigung der Behandlung wurde jeder Ansatz in demselben Kolben eingeeengt und gefriergetrocknet. Pufferzusätze wurden bei Berechnung der Analysenwerte berücksichtigt. Zufallsergebnisse durch mikrobielle Infektionen wurden durch Wiederholungen möglichst ausgeschlossen, doch dürfte der Nachweis der Hemmung einer Proteinhydrolyse durch eine Infektion nicht erheblich beeinflußt werden. Der Verlust stickstoffhaltiger Substanzen durch Ausschwitzen aus den Bohnen ist bei diesen Versuchen ausgeschlossen. Verluste an flüchtigem Ammoniak sollten auf Grund der sauren Reaktion der Ansätze nicht zu erwarten sein. Scheinbare Verluste an Gesamtstickstoff von 3—6% bei diesen Behandlungen sind auf Gewichtszunahmen zurückzuführen, welche auch bei kurzzeitiger Behandlung in Wasser unter Luft auftraten.

Extraktion mit Wasser

Die Trockenpulver wurden im Kühlraum bei ca. $+5^{\circ}\text{C}$ mit der hundertfachen Menge Wasser 5 Std magnetisch gerührt, die Suspensionen auf das Endvolumen gebracht und dann zur Abtrennung des unlöslichen Rückstandes 30 min bei $50000 \times g$ in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert und anschließend filtriert. Unfermentierte, polyphenolhaltige und anaerob fermentierte Proben wurden unter N_2 mit einem Zusatz von Na-Ascorbat extrahiert.

Hydrolysate

200 mg Trockenpulver wurden mit 10 ml halbkonz. HCl im zugeschmolzenen Reagensglas 24 Std bei 110°C hydrolysiert. HCl aus dem Extrakt im Vakuum vertrieben und Extrakt und Waschwasser aufgefüllt. Der Stickstoffgehalt im Rückstand betrug unabhängig von der Dauer der Hydrolyse stets 6—8% vom Gesamtstickstoff der eingesetzten Trockensubstanz.

Gesamtstickstoff

Er wurde mit der Kjeldahl-Mikromethode nach PARNASS-WAGNER (47) bestimmt; Standardabweichung der Doppelbestimmungen (48): $\pm 2,7\%$ (relativ).

Freier α -Aminostickstoff

Er wurde nach ROSEN (49) ohne Trennung der Aminosäuren und Proteine nach Reaktion mit Ninhydrin photometrisch bestimmt: 1 ml der zu untersuchenden Lösung plus 1 ml Reaktionsgemisch [a) 3% Ninhydrin in Äthylenglycolmonomethyläther, b) 3,7 m-Acetatpuffer pH 5,2, 0,2 mmol NaCN in H₂O. a:b=1:1] wurden 15 min auf 100° C gehalten, abgekühlt, mit Isopropanol-Wasser (1:1) verdünnt und die Extinktion 12–15 min nach Abkühlen bei 570 m μ gegen den Blindversuch gemessen. Standardabweichung der Methode nach Doppel-Bestimmungen $\pm 3\%$ (relativ) bei Verwendung gleicher Ninhydrin-Lösung und konstanten Bedingungen. Prolin und Hydroxyprolin (440 m μ) wurden nicht gesondert bestimmt. Der α -Aminostickstoff wurde aus dem Vergleich mit einer Leucin-Eichkurve berechnet. Die spezifischen Extinktionen der einzelnen Aminosäuren weichen um nicht mehr als $\pm 3\%$ voneinander ab (49). Ammoniak wird miterfaßt und gibt — relativ zu den übrigen Aminosäuren — eine spezifische Extinktion von 60%. Kakaoprotein unfermentierter Samen (wäßriger, dialysierter Extrakt des Acetonrockenpulvers) gab eine Extinktion, die 3% freiem α -Aminostickstoff vom Gesamtstickstoff entspricht.

Bestimmung des Purinstickstoffes

Theobromin wurde nach HOLMES (50) bestimmt. Coffein ließ sich nach der Fällung des Theobromins mit AgNO₃, Neutralisation und Waschen des Rückstandes anschließend aus dem Filtrat nach ENGLIS u. MILES (51) mit Chloroform ausziehen und photometrisch bestimmen. Die Bestimmungen waren innerhalb von 10% (= 2% vom Gesamtstickstoff) reproduzierbar. Für Rohkakaoproben wurden die entsprechenden, nach der selben Methode an anderen Mustern ermittelten Werte (52) verwendet. In den Gefrier- und Acetonrockenpulvern der unfermentierten Samen wurde der Purinstickstoff bestimmt; diese Werte wurden auch den Proben nach Fermentation in vitro zugrunde gelegt. In den Tabellen ist der Purinstickstoff vom Gesamtstickstoff, dem wasserlöslichen Stickstoff und dem Stickstoff im Hydrolysat abgezogen worden.

Aminosäure-Analysen

Die quantitative Bestimmung der einzelnen Aminosäuren im HCl-Hydrolysat erfolgte nach MOORE und STEIN (53) im automatischen Aminosäure-Analysator der Fa. Beckman (Typ 120 B). Aus einer Doppelanalyse ergab sich eine maximale Differenz der einzelnen Aminosäuren von 7%. Zur Papierchromatographie der Aminosäuren in HCl-Hydrolysaten und wäßrigen Extrakten wurde eine früher mitgeteilte Methode angewandt (26, 28).

Ergebnisse*Wasserlöslichkeit der Proteine und freien Aminosäuren in unfermentierten Samen in Abhängigkeit von Polyphenolen bei der Extraktion*

Nach Tab. 1 lassen sich aus polyphenolhaltigem Gefriertrockenpulver unter Luftabschluß 31% des proteinogenen Stickstoffes mit Wasser extrahieren. Der freie α -Aminostickstoff ist gering. Im polyphenolfreien Acetonrockenpulver ist — auch unter aeroben Extraktionsbedingungen — die Wasserlöslichkeit wesentlich größer. Die sehr geringe Menge des freien α -Aminostickstoffes entspricht der geringen Reaktion der löslichen Proteine mit Ninhydrin (vgl. oben). Die freien Aminosäuren wurden mit Aceton-Wasser-Gemischen extrahiert (c). Die geringere Proteinlöslichkeit in Gegenwart der Polyphenole kann als Effekt einer sauerstoffunabhängigen Gerbung aufgefaßt werden. Unter aeroben Bedingungen bei der Extraktion in Gegenwart der Polyphenole werden dagegen die Proteine fast vollständig wasserunlöslich (b). Es verbleibt ein löslicher Rest von 12%, der etwa zur Hälfte von den freien Aminosäuren gebildet wird. Der freie α -Aminostickstoff ist ebenfalls reduziert. Die Proteinfällung durch oxydative Gerbung ist demnach stärker als durch sauerstoffunabhängige Gerbung.

Tabelle 1. *Abnahme der Proteine und des freien α -Aminostickstoffes im wäßrigen Extrakt unfermentierter Kakaosamen in Abhängigkeit vom Luftsauerstoff*

| Präparat | Gesamt-N | wasserlösl. N | wasserlösl. freier α -Amino-N |
|--|---|---------------|--------------------------------------|
| | bezogen auf Trockensubstanz der Cotyledonen | | |
| | in % | in % | in % |
| I. Gefriertrockenpulver (unfermentiert) | | | |
| a) ohne Vorbehandlung (H_2O -Extraktion unter N_2) | 4,13 (100)* | 1,30 (31,5) | 0,235 (5,7) |
| b) 1 Std in H_2O (40° C) der Oxydation an der Luft ausgesetzt, (H_2O -Extr. unter Luft) | 3,84 (100) | 0,45 (11,7) | 0,174 (4,5) |
| II. Acetontrockenpulver (unfermentiert) | | | |
| c) Rückstand n. Acetonextr. 1 Std in H_2O der Oxydation an Luft ausgesetzt (H_2O -Extr. unter Luft) | 3,20 (100) | 1,92 (60,0) | 0,050 (1,6) |
| Summe von Aceton-Extrakt u. Rückstand | 3,36 (100) | 2,07 (61,6) | 0,150 (4,4) |

* Werte in Klammern: In % des Gesamtstickstoffes umgerechnet. Purinstickstoff rechnerisch eliminiert (s. S. 147). Proben aus demselben, unfermentierten Ausgangsmaterial sind durch gleiche römische Ziffern gekennzeichnet.

Wasserlöslichkeit und Hydrolyse der Proteine in Abhängigkeit von verschiedenen Fermentationen in vitro

Gegenüber der unfermentierten Ausgangssubstanz wird die Wasserlöslichkeit des Proteins im Acetontrockenpulver durch künstliche Fermentation nicht weiter erhöht (Tab. 2). Es kommt jedoch zu einer starken Proteinhydrolyse: Aus dem hohen Gehalt an wasserlöslichem freien α -Aminostickstoff ergibt sich unter Verwendung des Faktors aus Tab. 6 eine Hydrolyse von 44% des löslichen Proteins zu freien Aminosäuren.

Tabelle 2. *Proteinhydrolyse bei in-vitro-Fermentationen der Acetontrockenpulver aus frischen Samen (polyphenolfreier Rückstand nach Extraktion mit Aceton-Wassergemisch)**

| Präparat | Gesamt-N | wasserlösl. N | wasserlösl. freier α -Amino-N |
|--|---|---------------|--------------------------------------|
| | bezogen auf Trockensubstanz der Cotyledonen | | |
| | in % | in % | in % |
| II. Acetontrockenpulver (unfermentiert) | | | |
| a) 1 Std in H_2O der Oxydation an der Luft ausgesetzt. | 3,20 (100) | 1,92 (60,0) | 0,050 (1,6) |
| a') a) einschl. des N des Acetonextraktes | 3,36 (100) | 2,07 (61,6) | 0,150 (4,4) |
| b) 36 Std in-vitro-Ferm. 40° C, pH 5,2 unter Luft | 3,00 (100) | 1,85 (61,7) | 0,65 (21,7) |
| b') b) einschl. des N des Acetonextraktes | 3,19 (100) | 2,04 (63,4) | 0,73 (22,8) |

* Vgl. Fußnote Tab. 1.

Im Gegensatz dazu ist die Proteinhydrolyse bei Fermentation in Gegenwart der Polyphenole geringer und entscheidend vom Luftsauerstoff abhängig (Tab. 3):

Unter Luftabschluss (b) kommt es zu einer geringen Vermehrung des löslichen Stickstoffes gegenüber der unfermentierten Probe (a). Der freie α -Aminostickstoff

wird deutlich erhöht. Der Gehalt an freiem Aminostickstoff entspricht einer Hydrolyse von 29% des löslichen Proteins zu Aminosäuren. Die Hydrolyse ist aber geringer als in Abwesenheit der Polyphenole (Tab. 2). Die geringere Löslichkeit des Proteins allein ist dafür nicht verantwortlich: Nicht nur das Verhältnis von freiem α -Aminostickstoff zum Gesamtstickstoff der Trockensubstanz, sondern auch zum wasserlöslichen Stickstoff ist geringer. In diesem Zusammenhang muß berücksichtigt werden, daß auch die Proteinase-Aktivität durch Gerbung vermindert wird (17, 45).

Tabelle 3. *Der Einfluß der Polyphenole in Abhängigkeit vom Luftsauerstoff auf die Proteinhydrolyse bei in-vitro-Fermentation der (polyphenolhaltigen) frischen Samen**

| Präparat | Gesamt-N | wasserlösl. N | wasserlösl. freier α -Amino-N |
|--|---|---------------|--------------------------------------|
| | bezogen auf Trockensubstanz der Cotyledonen | | |
| | in % | in % | in % |
| I. Gefriertrockenpulver (unfermentiert) | | | |
| a) ohne Vorbehandlung (H ₂ O-Extr. unter N ₂) | 4,14 (100) | 1,53 (36,9) | 0,228 (5,5) |
| b) in-vitro-Ferm. 40° C, pH 5,2, 36 Std unter N ₂ (H ₂ O-Extraktion unter N ₂) | 4,10 (100) | 1,75 (42,7) | 0,425 (10,4) |
| c) in-vitro-Ferm. 40° C, pH 5,2, 36 Std unter Luft (H ₂ O-Extraktion unter Luft) | 3,86 (100) | 0,45 (11,6) | 0,155 (4,0) |
| d) in-vitro-Ferm. 40° C, pH 5,2, 24 Std unter N ₂ , 12 Std unter Luft | 4,02 (100) | 0,89 (22,1) | 0,343 (8,5) |

* Vgl. Fußnote Tab. 1.

Unter *aeroben Bedingungen* (c) wird im Gegensatz dazu der wasserlösliche Stickstoff entscheidend vermindert. Die löslichen Proteine der unfermentierten Samen werden fast vollständig unlöslich. Der verbleibende lösliche Rest wird zum größten Teil von den freien Aminosäuren gebildet: der freie α -Aminostickstoff ist gegenüber dem unfermentierten Material nicht erhöht, sondern vermindert. Grundsätzlich unterscheidet sich in dieser Analyse eine aerobe Fermentation (c) nicht von einer aeroben Vorbehandlung (Tab. 1, b). Daraus kann geschlossen werden, daß unter diesen Bedingungen auf Grund spontaner Chinon-Gerbung eine Proteinhydrolyse im Verlauf der Fermentation nicht erfolgen konnte.

Bei einer Folge von erst anaeroben und dann aeroben Bedingungen wird ein anderes Ergebnis erreicht (d): Der freie α -Aminostickstoff wird deutlich erhöht und zeigt eine Proteinhydrolyse an. Der wasserlösliche Stickstoff wird dagegen analog der aeroben Fermentation reduziert. Das läßt sich so deuten, daß es in der anaeroben Phase in gleichem Maße wie bei der anaeroben Fermentation (b) zur Proteinhydrolyse gekommen ist, das nicht hydrolysierte Restprotein aber in der aeroben Phase dann durch oxydative Wechselwirkungen mit Polyphenolen unlöslich wurde. Der gegenüber der aeroben Fermentation höhere wasserlösliche Stickstoff resultiert aus den Proteinabbauprodukten nach der Hydrolyse. Der geringere Wert des freien Aminostickstoffes gegenüber der anaeroben Fermentation läßt sich nur zum Teil (vgl. S. 147, 155) auf die Proteinfällung zurückführen.

Wasserlöslichkeit und Hydrolyse im Rohkakao nach üblicher Fermentation

Die Gehalte an Gesamtstickstoff und α -Aminostickstoff in wäßrigen Extrakten verschiedener Rohkakaoproben sind unterschiedlich, vgl. Tab. 4 (30–40% bzw. 8 bis

14%) und liegen im Bereich der Werte nach künstlicher Fermentation unter anaeroben oder anaerob-aeroben Bedingungen (Tab. 3). Bei der üblichen Fermentation kann in der normalerweise anaeroben ersten Phase eine Hydrolyse erfolgen. Je nach Methode und Verlauf sind dann in der zweiten Phase oder während der Trocknung aerobe Bedingungen gegeben, unter denen oxydative Wechselwirkungen mit den restlichen Proteinen möglich sind.

Tabelle 4. *Proteinhydrolyse bei der üblichen Fermentation**

| Kakaopräparat | Gesamt-N | wasserlös. N | wasserlös. freier α -Amino-N |
|---|---|--------------|-------------------------------------|
| | bezogen auf Trockensubstanz der Cotyledonen | | |
| | in % | in % | in % |
| III. Bahia-Kakao | | | |
| a) unfermentiert (Extr. nicht unter Luftabschluß) | 3,75 (100) | 0,26 (6,9) | 0,134 (3,6) |
| b) fermentiert [übl. Kastenferm. (22)] | 3,64 (100) | 1,18 (32,4) | 0,518 (14,2) |
| IV. Bahia-Kakao | | | |
| c) fermentiert [übl. Kastenferm. (22)] | 3,31 (100) | 1,34 (40,4) | 0,406 (12,3) |
| d) fermentiert [Ferm.-Trommel n. Halifax(22)] | 3,55 (100) | 1,31 (36,9) | 0,366 (10,3) |
| V. Ghana-Kakao | | | |
| e) fermentiert (Handelsmuster) | 3,75 (100) | 1,15 (30,6) | 0,318 (8,5) [0,783 (20,9)]** |

* Vgl. Fußnote Tab. 1. H₂O-Extraktion der luftgetrockneten, entfetteten Proben unter Luft.

** Freier α -Amino-N im HCl-Hydrolysat des wäßrigen Extraktes.

Papierchromatographischer Vergleich der freien Aminosäuren nach Fermentation in vitro

Die Reduktion des α -Aminostickstoffs in den wäßrigen Extrakten nach aerober Fermentation in vitro (Tab. 3, c, d) läßt sich nur zum Teil mit der gleichzeitigen Verminderung des wasserlöslichen Proteins in Zusammenhang bringen (vgl. S. 147, 155). Sehr wahrscheinlich kommt darin auch eine Verminderung der freien Aminosäuren zum Ausdruck. Quantitative Aminosäurebestimmungen konnten an diesem Material nicht ausgeführt werden (Probe I in Tab. 1 u. 3). Einige papierchromatographische Vergleiche lassen sich nur unter Berücksichtigung der Grenzen für die quantitative Auswertbarkeit der Papierchromatogramme beurteilen: Gleiche Mengen der wäßrigen Extrakte (entspr. 1,8 mg Trockensubst. pro Chromatogr.) der laut Tab. 1, a, b und 3, a–d behandelten Proben wurden 1. in Butanol-Eisessig-Wasser (9:1:1) und 2. in Pyridin-Amylalkohol-Wasser (7:7:6) entwickelt und mit Ninhydrin angefärbt (26, 28). Bei dieser Konzentration wurden in der unfermentierten Probe nur Alanin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Valin und Leucin nachgewiesen. Bei wesentlich stärkeren Konzentrationen wurden auch die übrigen Aminosäuren des Kakaos (26, 28) mit Ausnahme von Methionin, Tryptophan, Hydroxyprolin, Cystein als schwache Flecken gefunden. Bei durchgehend anaerober Fermentation in vitro wurden die freien Aminosäuren wie bei der üblichen Fermentation (26, 28) in Anzahl und Konzentration stark vermehrt. Bei aerober Fermentation wurden sie dagegen — gegenüber der unfermentierten Ausgangsprobe — vermindert: Bei der gewählten Konzentration waren nur Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin nachweisbar. Unter anaeroben und nachfolgend aeroben Bedingungen wurde im Aminosäurenchromatogramm kein Unterschied zur anaeroben Fermentation in vitro festgestellt.

Weder in diesen Proben (I aus Tab. 3) noch in fermentiertem Rohkakao (IV aus Tab. 4) konnten bei den gewählten Konzentrationen der wäßrigen Extrakte auf dem Chromatogramm Flecken nachgewiesen werden, welche sowohl mit Turnbolls' Blau als auch mit Amidoschwarz färbbar sind (46). In allen Fällen gab Amidoschwarz nur eine Färbung am Startpunkt.

Reduktion des freien Aminostickstoffes im HCl-Hydrolysat durch die Fermentation

Nach DEWITT (27) wird im Verlaufe der üblichen Fermentation der freie α -Aminostickstoff im Hydrolysat des Proteins (des Äthanolunlöslichen) reduziert. Es sollte geprüft werden, ob diese Reduktion sauerstoffabhängig ist. Werden dabei Proteine in Substanzen überführt, die nach Säurehydrolyse löslich aber ninhydrin-negativ sind, sollte die Reduktion des freien α -Aminostickstoffes (aus der Ninhydrinbestimmung) auch aus dem Verhältnis von freiem α -Aminostickstoff zum Gesamtstickstoff im Hydrolysat der gesamten Cotyledonensubstanz zum Ausdruck kommen. Solche Werte sind in Tab. 5 zusammengestellt. Bei Fermentation *in vitro* ergab sich eine derartige Reduktion (10–25%) sowohl aus den Aminostickstoffbestimmungen als auch aus den Aminosäureanalysen (Tab. 5, VIa–d), aber nicht nur unter aeroben Bedingungen, sondern auch unter Luftabschluß. Sie ist demnach nicht auf eine oxydative Wirkung zurückzuführen. Eine gleiche Reduktion durch die übliche Fermentation ergibt sich aus Tab. 5, I–V. Die relativ stärkere Reduktion im HCl-Hydrolysat des Äthanolunlöslichen bei DEWITT (27) läßt sich darauf zurückführen, daß die bei

Tabelle 5. *Reduktion des freien α -Aminostickstoffes in HCl-Hydrolysaten der Cotyledonen durch die übliche und durch in-vitro-Fermentation**

| Präparate | Gesamt-N | N im HCl-Hydrolysat | freier α -Amino-N im HCl-Hydrolysat (Best. n. ROSEN) | freier α -Amino-N im HCl-Hydrolysat aus quantitativer Aminosäure-Best. nach MOORE + STEIN |
|--|---|---------------------|---|--|
| | bezogen auf Trockensubstanz der Cotyledonen | | | |
| | in % | in % | in % | in % |
| <i>unfermentierte Proben</i> | | | | |
| Ia) unfermentiert | 4,14 (100) | 3,86 (93,2) | 2,91 (70,2) | — |
| IIb) unfermentiert | 3,20 (100) | — | 2,43 (75,9) | — |
| <i>üblich fermentierter Rohkakao</i> | | | | |
| IVc) Bahia fermentiert (übl. Kastenferm.) (22) | 3,31 (100) | 3,09 (93,3) | 2,16 (65,2) | — |
| IVd) Bahia fermentiert (Ferm.-Trommel n. Halifax) (22) | 3,55 (100) | 3,00 (84,5) | 2,22 (62,5) | — |
| Ve) Ghana ferm. (Handelsmuster) | 3,75 (100) | 3,57 (95,2) | 2,22 (59,2) | — |
| <i>Gefriertrockenpulver (unfermentiert)</i> | | | | |
| VIa) unvorbehandelt | 3,19 (100) | — | 2,47 (77,4) | 2,59 (81,1) |
| b) in-vitro-Ferm. 40° C, pH 5,2, 44 Std unter Luft | 2,94 (100) | — | 2,08 (70,7) | — |
| c) in-vitro-Ferm. 40° C, pH 5,2, 44 Std unter N ₂ | 3,12 (100) | — | 1,92 (61,5) | 2,03 (65,0) |
| d) in-vitro-Ferm. 40° C, pH 5,2, 24 Std unt. N ₂ , 20 Std unt. Luft | 3,01 (100) | — | 2,16 (71,7) | 2,10 (69,7) |

* Vgl. Fußnote Tab. 1.

der Fermentation freiwerdenden und von den Bohnen ausgeschwitzten Aminosäuren und Peptide bei der Bestimmung im HCl-Hydrolysat des Äthanolunlöslichen nicht miterfaßt werden.

Sowohl unter Luft als auch bei Luftabschluß betrifft die Verminderung des α -Aminostickstoffes alle Aminosäuren nahezu gleichmäßig (Tab. 6). Lediglich Ammoniak wird nicht vermindert und ist darum nach den Fermentationen *in vitro* relativ erhöht. Nur die Reduktion von Cystein, Tyrosin und Histidin war auf die Fermentation mit aerober Phase beschränkt. Auch aus ein- und zweidimensionalen Papierchromatogrammen der HCl-Hydrolysate aller Proben der Tab. 3 und 4 ergaben sich weder quantitative noch qualitative Unterschiede der Gesamt-Aminosäuren in Abhängigkeit vom Luftsauerstoff oder durch verschiedene Fermentationsverfahren.

Tabelle 6. *Veränderung der relativen Aminosäurezusammensetzung im HCl-Hydrolysat von Gefrier-trockenpulver unfermentierter Cotyledonen nach in-vitro-Fermentation unter anaeroben Bedingungen bzw. erst anaeroben und dann aeroben Bedingungen. Angaben in μ Molen Aminosäuren in % der gesamten Aminosäuren (vgl. Tab. 5, VI). (Bestimmungen nach MOORE und STEIN)*

| Aminosäuren | Menge d. Aminosäuren bez. a. d. Gesamtmenge der Aminosäuren im Hydrolysat der | | |
|---|---|--|---------------------------------------|
| | unvor-behandelten | in-vitro-fermentierten (pH 5,2, 40° C) | |
| | | 44 Std N ₂ | 24 Std N ₂ und 20 Std Luft |
| | Cotyledonen | | |
| | in % | in % | in % |
| Lysin | 5,53 | 4,89 | 4,99 |
| Histidin | 1,50 | 1,45 | 1,35 |
| NH ₃ | 9,68 | 12,96 | 12,93 |
| Arginin | 4,78 | 4,65 | 4,64 |
| Hydroxyprolin | — | — | — |
| Asparaginsäure | 10,08 | 9,51 | 9,61 |
| Threonin | 4,29 | 4,15 | 4,15 |
| Serin | 6,51 | 6,00 | 6,32 |
| Glutaminsäure | 15,39 | 14,27 | 14,91 |
| Prolin | 4,58 | 4,40 | 4,85 |
| Glycin | 7,40 | 7,24 | 7,08 |
| Alanin | 6,29 | 6,16 | 6,07 |
| Cystein | 1,73 | 1,82 | 1,34 |
| Valin | 5,72 | 5,79 | 5,62 |
| Methionin | 0,77 | 0,75 | 0,75 |
| Isoleucin | 3,14 | 3,16 | 3,26 |
| Leucin | 6,32 | 6,13 | 6,13 |
| Tyrosin | 2,20 | 2,24 | 1,88 |
| Phenylalanin | 4,05 | 4,36 | 4,07 |
| α -Aminostickstoff (+ Ammoniak-N) in % vom Gesamt-Aminosäure-N | 81 | 82 | 82 |

Diskussion

Proteinhydrolyse und -Gerbung

Das Protein wird durch Hydrolyse während der Fermentation vermindert (24). Eindimensionale Papierchromatographie wäßriger Extrakte zeigte, daß in fermentiertem Kakao im Gegensatz zu unfermentiertem Aminosäuren freigesetzt sind (25). Durch vollständige Aminosäure-trennungen im zweidimensionalen Papierchromatogramm und durch Aminostickstoff-Bestimmungen ließ sich die Proteinhydrolyse näher beschreiben (26): Von allen 20 im Kakaoprotein

nachgewiesenen Aminosäuren liegen in den unfermentierten Samen nur einige und mit Ausnahme von Alanin, Glutaminsäure, Asparaginsäure in sehr geringer Konzentration vor. Fermentierter Kakao enthält dagegen — ohne prinzipielle Unterschiede einzelner Provenienzen — alle Aminosäuren in freier Form und in einer Menge, die einer Proteinhydrolyse von mehr als 10% entspricht. Ihr Mengenverhältnis gleicht dem der Aminosäuren im Proteinhydrolysat. Im Verlaufe der in Bahia üblichen Kastenfermentation (21) beginnt die Hydrolyse nach dem Aufschluß des Cotyledonengewebes. Obgleich sie bis zum Fermentationsende andauert, ist sie im wesentlichen kurze Zeit nach dem Absterben der Samen in der anaeroben Phase der Fermentation erfolgt (28). Aseptische Fermentation in Pufferlösungen ergaben ferner, daß die Hydrolyse durch die eigenen Enzyme der Samen einsetzt, sobald durch Erhöhung der Temperatur auf 45° C und mehr das Cotyledonengewebe aufgeschlossen wird. Prinzipiell gleiche Ergebnisse brachten Aminosäure-, Peptid- und Protein-Stickstoffbestimmungen im Verlaufe von Fermentationen in Trinidad (27). Auch von anderen Autoren wurde die Kakaoprotein-Hydrolyse mit ähnlichen Ergebnissen untersucht (9, 55, 56, 57). Aus seinen Untersuchungen schloß DEWITT (27), daß die Hydrolyse zum Fermentationsgrad in einer engeren Beziehung steht, indem vollfermentierter Kakao im Gegensatz zu unfermentiertem nur wenig unverändertes, ursprüngliches Protein enthält. HARDY und RODRIGUES (54) sahen solche Unterschiede im Zusammenhang mit Sortenunterschieden.

Dieser für die übliche Fermentation kennzeichnenden Proteinhydrolyse steht die Annahme gegenüber, daß im selben Prozeß auch eine Gerbung der Proteine durch die Polyphenole der Samen erfolgt (17, 10, 11). Seit mehr als 50 Jahren ist die Unlöslichkeit und Schwerkverdaulichkeit der Kakaoproteine wiederholt beschrieben und untersucht worden (1—9, 58). Danach sollen nur 40—60% der Rohkakaoproteine verdaulich sein. HOHMANN (8) und auch NIEPAGE (9) gelang es nicht, die Proteine mit konventionellen Proteinlösungsmitteln oder durch Enzyme in Lösung zu bringen. Im unfermentierten Kakao (allerdings ohne Berücksichtigung von oxydativen Wirkungen bei der Präparation) war der unlösliche Rest (70%) sogar noch wesentlich höher als in fermentiertem (40%). Das lösliche Protein war von braunen phenolischen Begleitsubstanzen nicht zu trennen. HOHMANN schloß daraus auf „Polyphenol-Protein-Symplexe“. SCHORMÜLLER u. WINTER (55) erreichten eine vollständige Lösung des Kakaoproteins nur in Ameisensäure. Auf Grund des Stickstoffgehalts und der Färbung war jedoch nicht auf ein reines Protein zu schließen. Daß das in 0,2%iger KOH lösliche Protein des Rohkakaos stark verändert ist, ließ sich durch elektrophoretische Trennungen nachweisen (12): Es bildet im Gegensatz zu dem unfermentierter Kakaobohnen (3 getrennte Fraktionen) nur eine bräunliche, unscharfe Zone.

Nach FORSYTH u. QUESNEL (17) ist die Abnahme des wasserlöslichen, mit Trichloressigsäure fällbaren Proteins und die Inaktivierung der Enzyme auf eine Gerbung bereits in der anaeroben Phase der Fermentation zurückzuführen. Das bedeutet aber, daß sie gleichzeitig mit der Proteinhydrolyse erfolgt. Daraus ergibt sich die Frage, wie die selbst in verdünnten Alkali- oder Enzymlösungen unlöslichen Proteingerbstoffkomplexe des Rohkakaos gebildet werden können, ohne die enzymatische Proteinhydrolyse zu verhindern. Aus früheren Untersuchungen (12) und den vorliegenden Ergebnissen ergibt sich eine Erklärung für die unterschiedliche Wirkung einer sauerstoff-unabhängigen Gerbung (durch Flavotannine) und einer sauerstoffabhängigen Gerbung (Chinongerbung): Beide kommen bei normalem Verlauf der Kakaoaufbereitung zur Wirkung, jedoch nicht gleichzeitig, sondern wegen der Folge anaerober und aerober Bedingungen nacheinander. Die Chinongerbung unterbindet die Proteinhydrolyse gänzlich unter aeroben Bedingungen und führt zu Protein-Gerbstoffkomplexen, die sich durch ihre Unlöslichkeit in 0,2 %iger KOH auszeichnen. Vor dem Eindringen von Sauerstoff in die Kakaobohnen kann jedoch eine Proteinhydrolyse unter anaeroben Bedingungen erfolgen.

Die Kakaosamen enthalten Leucoanthocyanidine (16, 23), welche wirksame Gerbstoffe bilden (59, 60). In der anaeroben Phase der Fermentation nach dem Absterben der Samen sind Reaktionsbedingungen gegeben, unter denen diese mit den Proteinen reagieren können. Eine solche Gerbung wird im wesentlichen auf die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Ketoimidbindungen der Proteine und den phenolischen OH-Gruppen der Gerbstoffe zurückgeführt, die aber in polaren Lösungsmitteln, in verdünnten Alkali- oder Enzymlösungen weitgehend aufgehoben werden (13, 61). Aufgrund dieser Eigenschaften ist bei der Fermentation zu erwarten, daß anaerobe

Gerbung 1. die Wasserlöslichkeit der Proteine beschränkt (Tab. 1 a, c), nicht aber nach Vorbehandlung mit Aceton oder bei alkalischer Extraktion (12), 2. die Proteinhydrolyse in Gegenwart der Polyphenole verringert, aber nicht verhindert (Tab. 2 und 3 a, b). Ob die beobachtete Reduktion der Hydrolyse unter Luftabschluß in Gegenwart der Polyphenole (Tab. 3 b) auf Inaktivierung der Proteinasen (17, 45) oder Fällung der Substrat-Proteine zurückzuführen ist, bleibt offen. Die Verminderung an wasserlöslichem Protein im Verlaufe der anaeroben Fermentation, welche nach Extraktion mit Aceton bestimmt wird (17), ist jedoch vornehmlich auf die Hydrolyse zurückzuführen.

Ausschließlich unter aeroben Bedingungen, in Gegenwart der Polyphenole und der Polyphenoloxydase werden, — von enzymatischen Bräunungen begleitet — die Proteine in eine Form überführt, deren Verhalten und Schwerlöslichkeit oben dargestellt worden ist. Eine Chinongerbung ist darum anzunehmen (12). Sie beruht auf der Bildung kovalenter Bindungen zwischen den Chinonen und den freien, endständigen Amino- bzw. Iminogruppen der Proteine (13, 15), die evtl. weitere Kondensationsprodukte bilden. Die wesentlich stärkere Resistenz dieser Verbindungen gegen Proteinasen und stark polare Lösungsmittel (13, 62) erklärt die Schwerlöslichkeit der Kakaoproteine und ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber Proteinasen nach Gerbung in Gegenwart von Sauerstoff. Diese Gerbung verhindert — im Gegensatz zur sauerstoffunabhängigen — die Proteinhydrolyse vollständig (Tab. 3, c). Bei normalem Verlauf der Kakaofermentation ist jedoch die Hydrolyse in der ersten, anaeroben Phase im wesentlichen abgeschlossen (28). Erst in der letzten, aeroben Phase wird eine Chinongerbung erfolgen können, und von ihr wird nur das restliche, nicht-hydrolysierte Protein erfaßt. In dieser Phase ist die Polyphenoloxydase in den Kakao-samen noch aktiv (17) und kann die Flavon-Derivate zu Chinonen oxydieren. Grundsätzlich können diese mit Proteinen und Aminosäuren genauso reagieren (35, 43) wie andere Chinone (13, 15, 40, 62, 63) unter physiologischen Bedingungen. In gleicher Weise werden die Proteinanteile in den Bräunungsprodukten und die Unlöslichkeit des Proteins in fermentierten Tabakblättern auf diese Bindung zurückgeführt (41, 42). Im fermentierten Rohkakao, nach einer Folge anaerober und aerober Bedingungen, ist das durch Chinongerbung unlösliche (in 0,2% KOH) Protein auf Grund der vorangegangenen Hydrolyse wesentlich geringer als bei direkter Oxydation an unfermentierten Samen (12). Der höhere, lösliche Anteil im fermentierten Kakao setzt sich jedoch nicht nur aus unveränderten Aminosäuren und Peptiden des Proteinhydrolysates zusammen. Seine Löslichkeit und Nicht-Abtrennbarkeit von Polyphenolen (8, 12) sprechen für eine Beteiligung des Hydrolysates an den Reaktionen mit den enzymatisch oxydierten Polyphenolen.

Die Proteinhydrolyse ist also zeitlich begrenzt auf die Dauer zwischen dem Absterben der Samen und dem Eindringen von Sauerstoff; in Abhängigkeit von Methode und Verlauf der Fermentation kann darum mit unterschiedlichem Gehalt an unlöslichem Protein und freien Aminosäuren im Rohkakao gerechnet werden (27).

Reduktion freier Aminogruppen der Proteine und Aminosäuren

Bei einer Chinongerbung während der Kakaoaufbereitung muß es zu einer Reduktion der freien Aminogruppen der Proteine kommen. Nach DEWITT (27) „zeigt der Abfall im Verhältnis von α -Aminostickstoff zum Gesamtstickstoff im Hydrolysat der äthanolunlöslichen Fraktion der Bohnen von 0,58 auf 0,13 während der Fermentation, daß Proteine zumindest auf zwei Wegen entfernt werden — durch Proteolyse mit der Bildung von Aminosäuren und Peptiden und auch durch Transformation in eine äthanolunlösliche Nicht-Protein-Form, welche durch Säure in lösliches (HCl-Hydrolyse), aber ninhydrin-negatives Material hydrolysiert wird“. „Eine

Kombination von Oxydation und Gerbung in Gegenwart von Polyphenolen und Polyphenol-oxydase bietet sich selbst als ein Mechanismus für den letzteren Prozeß an⁴⁴. — Auch NIEPAGE (9) fand eine derartige Reduktion der Aminosäuren im HCl-Hydrolysat des fermentierten Kakaos durch quantitative Aminosäurebestimmungen, die durch Aminostickstoffbestimmungen mit Ninhydrin bestätigt werden konnte. Die Verstärkung dieser Reduktion nach langsamer Trocknung der Bohnen an der Luft würde ebenso für eine oxydative Wirkung sprechen wie der Befund DEWITTS, daß sie in der letzten, meist aeroben Fermentationsphase erfolgt (27). Aminostickstoffbestimmungen nach VAN SLYKE im Hydrolysat brachten jedoch keine Unterschiede zwischen fermentierten und unfermentierten Proben (eigene, unveröffentlichte Versuche). Wenn die Annahme zuträfe, daß die bei der oxydativen Wechselwirkung mit Polyphenolen blockierten Aminogruppen auch nach salzsaurer Hydrolyse nicht frei werden und keine Reaktion mit Ninhydrin geben, sollte die Aminostickstoffreduktion im HCl-Hydrolysat nach aerober, nicht aber anaerober Fermentation zu finden sein.

Die Versuche dieser Arbeit (Tab. 5) zeigen, daß es sich bei dieser Reduktion des freien Aminostickstoffs im HCl-Hydrolysat um einen sauerstoffunabhängigen Prozeß handelt. (So führt etwa eine Decarboxylierung von Aminosäureresten ebenfalls zur Verminderung ninhydrinpositiver Substanzen, nicht aber zur Reduktion der nach VAN SLYKE faßbaren Aminogruppen.) Überdies reagieren Chinone nur mit den freien, endständigen Aminogruppen der Proteine (13, 15, 64), so daß mit einer derartig starken Reduktion der Aminogruppen im Proteinhydrolysat wie DEWITT sie fand durch Chinongerbung auch nicht gerechnet werden darf.

Die in dieser Arbeit auf indirektem Wege nachgewiesene Reaktion zwischen Proteinen und enzymatisch oxydierten Polyphenolen während der Kakaofermentation läßt sich durch vergleichende Aminostickstoffbestimmungen in HCl-Hydrolysaten nicht erfassen. Es steht in Frage, ob die Bindung zwischen Chinon und endständigen NH₂-Gruppen der Proteine nach HCl-Hydrolyse erhalten bleibt. Chinongegerbte Proteine der Küchenschaben widerstehen Lösungsversuchen in konz. HCl-Ootheca (13). Andererseits findet man Angaben über die Unstabilität von Reaktionsprodukten aus Aminosäuren bzw. Aminen und Chinonen gegenüber Säuren (15, 35, 38, 63, 65).

Zur Frage, ob bei der Kakaofermentation auch Proteinabbauprodukte (Peptide, Aminosäuren) mit oxydierten Polyphenolen ebenso wie Proteine reagieren, brachten die vorliegenden Ergebnisse keinen eindeutigen Befund. Betrifft die Reduktion des wasserlöslichen, freien α -Aminostickstoffes unter aeroben Bedingungen die freien Aminosäuren (Tab. 3), so sollten sie bei Versuchen unter Luft im Vergleich zu entsprechenden Versuchen unter Luftabschluß stets vermindert sein. Eine Aminosäureverminderung ließ sich jedoch nur bei durchgehend aerober Fermentation in vitro papierchromatographisch fassen, nicht bei einer Folge anaerober und aerober Bedingungen. Allerdings sind nur große Konzentrationsunterschiede papierchromatographisch faßbar, und die Anwendung empfindlicher Methoden wäre wünschenswert. Die Messung der Absorptionsspektren von Kondensationsprodukten aus Proteinhydrolysat und Chinonen (15; 62, 64) im komplexen Stoffgemisch des Rohkakaos dürfte auf grundsätzliche Schwierigkeiten stoßen. Eine Verminderung des freien, wasserlöslichen α -Aminostickstoffes ohne gleichzeitiges Verschwinden freier Aminosäuren (Ferm. d, Tab. 3) kann allerdings auch als Reaktion von Peptiden verstanden werden, die mit Chinonen leichter reagieren und stabilere Verbindungen liefern als Aminosäuren (15). Ein direkter Hinweis auf die Bildung solcher Produkte während der Kakaofermentation sind die von SCHUBIGER u. Mitarb. (46) gefundenen, zum Teil dialysierbaren „Peptido-Phenole“. (Papierchromatographisch getrennte Substanzen, die sowohl mit Amidoschwarz als auch mit Turnbells' Blau anfärbbar sind.) Dieser Nachweis gelang aber weder an Rohkakaoproben noch nach Fermentationen in vitro bei den Versuchen zu dieser Arbeit. In einer ähnlich gelagerten Problemstellung bei der Teefermentation (43) gelang der Nachweis oxydativer Aminosäure-

Desaminierungen (durch Chinone) nur durch empfindlichere Methoden, nicht durch Bestimmung von Veränderungen in der Aminosäurezusammensetzung. Die Untersuchungen von PURR, SPRINGER und MORCINEK (45) haben gezeigt, daß diese Reaktion im Kakao erfolgen kann.

Die nicht-enzymatische Bindung der Aminogruppen von Aminosäuren und Aminen an die Chinone der enzymatisch oxydierten Polyphenole ist pH-abhängig (15, 35, 37); Optimum bei pH 7,0–8,0, Verminderung der Reaktivität bei pH < 6,0. Allgemein herrscht während der Fermentation in den Samen pH 4,5–5,5. Unter Umständen, z. B. bei Überfermentation, können höhere pH-Werte am Fermentationsende und während der Trocknung in den Bohnen gefunden werden (28). Möglicherweise werden die oxydativen Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Proteinabbauprodukten mit den Kakaopolyphenolen in Abhängigkeit vom Fermentationsverlauf durch diese pH-Unterschiede beeinflußt.

Nußartige Aromen entstehen nach BROWN (32) bei der Kakaofermentation aus einer Kombination oxydierter Tannine und teilweise peptonisierter Proteine. BROWN meint, daß die Proteinhydrolyse gehemmt wird, sobald Polyphenole beim Absterben der Zellen austreten. Er nimmt darum an, daß die Proteinhydrolyse vor dem Absterben der Samen erfolgt, und daß eine keimungsähnliche Periode bei tiefen Temperaturen zu Beginn der Fermentation erforderlich ist. Die Bedeutung einer keimungsähnlichen Phase für die Veränderungen während der Fermentation wird heute nicht mehr diskutiert. ROELOFSEN (18, daselbst S. 281) hat angenommen, daß die anaeroben Bedingungen in den fermentierenden Samen, die für die Bildung von Aroma-Vorstufen Bedeutung haben sollen, für die Proteinhydrolyse erforderlich sind, weil Proteinasen allgemein unter reduzierenden Bedingungen aktiviert werden. Die vorliegende Arbeit zeigt, daß nicht nur für die Polyphenole als solche, sondern auch für die Proteinhydrolyse anaerobe Bedingungen erforderlich sind, weil Chinongerbung, nicht aber sauerstoffunabhängige Gerbung durch Flavotannine die Proteinhydrolyse unterbindet. Die Hydrolyse erfolgt nach dem Absterben der Samen in der anaeroben Fermentationsphase in Gegenwart gerbungswirksamer Polyphenole.

Zusammenfassung

Fermentationsversuche in vitro mit Gefrier- und Acetontrockenpulvern unfermentierter Kakaosamen brachten als Ergebnis, daß unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart der Polyphenole Wasserlöslichkeit und Hydrolyse des Kakaoproteins durch sauerstoffunabhängige Gerbung herabgesetzt, aber nicht grundsätzlich unterbunden wird. Durch Wechselwirkungen mit Polyphenolen unter aeroben Bedingungen (Chinongerbung) werden jedoch die Proteine nahezu vollständig wasserunlöslich, und eine Hydrolyse wird gänzlich unterbunden. Bei einer strengen Folge von anaeroben und aeroben Bedingungen kommt es zu einer Hydrolyse in der ersten Phase. In der folgenden aeroben Phase wird das restliche, unhydrolysierte Protein wasserunlöslich und wahrscheinlich reagieren auch Peptide und Aminosäuren mit Chinonen. Die im Verlaufe der Fermentation nachweisbare Reduktion des freien α -Aminostickstoffes im HCl-Hydrolysat ist sauerstoffunabhängig. Eine chemische Reaktion freier α -Aminogruppen der Proteine mit oxydierten Polyphenolen läßt sich durch Veränderungen des freien α -Aminostickstoffes im HCl-Hydrolysat des Kakaosamens nicht erfassen. Die Reduktion des wasserlöslichen, freien α -Aminostickstoffes bei Fermentierung unter Luft spricht für eine oxydative Wechselwirkung freier Aminosäuren oder Peptide mit den Polyphenolen der Kakaosamen.

Literatur

1. MITTSCHERLICH, A.: (1859), zit. bei COHN (6).
2. NEUMANN, R. O.: Die Bewertung des Kakaos als Nahrungs- und Genußmittel. München: R. Oldenbourg 1906.
3. FORSTER, I.: Hyg. Rdsch. **10**, 305 (1900).

4. PULVER, H.: Arch. Verdauungskr. **4**, 114 (1928).
5. MITCHELL, H. H., J. R. BEADLES u. H. MEITH: J. biol. Chem. **71**, 15 (1926).
6. COHN, H.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **20**, 1 (1895).
7. BIEHL, B.: Untersuchungen über Aminosäuren im Kakao. Dipl.-Arb. Math. Naturw. Fak. Univ. Hamburg 1955.
8. HOHMANN, E.: Über die Proteine der Kakaobohne. Dissertation Univ. Hamburg 1955.
9. NIEPAGE, N.: Gordian **61**, H. 1445 13 (1961).
10. ZIPPERER, P.: Die Schokoladenfabrikation. 4. Aufl. Berlin: M. Krayn 1924.
11. FINCKE, H.: Handbuch der Kakaoerzeugnisse. 1. Aufl. Berlin: Springer 1936.
12. BIEHL, B.: Diese Z. **119**, 105 (1963).
13. GUSTAVSON, K. H.: The chemistry of tanning processes. New York: Acad. Press Inc. 1956.
14. PUGH, C. E. M., u. M. ST. RAPEL: Biochem. J. **21**, 1370 (1927).
15. MASON, H. S.: Advanc. Enzymol. **16**, 105 (1955).
16. FORSYTH, W. G. C.: Biochem. J. **51**, 516 (1952).
17. FORSYTH, W. G. C., V. C. QUESNEL u. J. B. ROBERTS: J. Sci. Food Agric. **9**, 181 (1958).
18. ROELOFSEN, P. A.: Advanc. Food Res. **8**, 225 (1958).
19. ROHAN, T. A.: Processing of raw cocoa for the market. FAO Agric. Studies No. 60, Rom 1963.
20. FORSYTH, W. G. C., u. V. C. QUESNEL: Advanc. Enzymol. **25**, 457 (1963).
21. BIEHL, B.: Gordian **61**, H. 1443, 26 (1961).
22. BIEHL, B.: Süßwaren **9**, 358 (1965).
23. FORSYTH, W. G. C.: Biochem. J. **60**, 108 (1955).
24. BIRCH, H. F.: 10th Ann. Rep. Cacao Res. **22** (1941).
25. BECKER, E., u. O. STELLING: Gordian **52** (1953).
26. BIEHL, B.: Gordian **55**, H. 1321, 17 und **55**, H. 1322, 13 (1955).
27. DEWITT, K. W.: Rep. Cacao Res., ICTH, Trinidad 1955/56, 54 (1957).
28. BIEHL, B.: Gordian **61**, H. 1444, 14 (1961).
29. FORSYTH, W. G. C.: Rep. Cocoa Conf., London **1957**, S. 145.
30. QUESNEL, V. C.: Chem. and Industr. **1960**, S. 101.
31. ROBERTS, J. B.: Chem. and Industr. **1959**, S. 1410.
32. BROWN, H. B.: Rep. Cocoa Conf., London **1957**, S. 165.
33. ROHAN, T. A.: J. Sci. Food Agric. **14**, 799 (1963).
34. QUESNEL, V. C.: Rep. Cocoa Conf., London **1957**, S. 150.
35. TRAUTNER, E. M., u. E. A. H. ROBERTS: Austral. J. sci. Res. **3**, 356 (1950).
36. WEURMAN, C.: Chem. and Industr. **1957**, S. 652.
37. JAMES, W. O., E. A. H. ROBERTS, H. BEEVERS u. P. C. DE KOCK: Biochem. J. **43**, 626 (1948).
38. JACKSON, H., u. P. KENDAL: Biochem. J. **44**, 477 (1949).
39. ZEEHUSEN, J. J.: Hemera Zoa **63**, 155 (1956).
40. HESS, E. H.: Arch. Biochem. Biophys. **74**, 198 (1958).
41. WRIGHT, H. E., W. W. BARTON u. R. C. BERRY: Arch. Biochem. Biophys. **86**, 94 (1960).
42. JACOBSON, J. S.: Arch. Biochem. Biophys. **93**, 580 (1961).
43. ROBERTS, E. A. H.: The chemistry of flavonoid compounds. Hrsg. von T. A. GEISSMAN. S. 499. Oxford-London-New York: Pergamon Press 1962.
44. KURSANOW, A. L.: Die Kulturpflanze, Beiheft I: Biochemie der Kulturpflanze. S. 29 (1956).
45. PURR, A., R. SPRINGER u. H. MORCINEK: Diese Z. **112**, 40 (1960); **123**, 341 (1963).
46. SCHUBIGER, G. F., E. ROESCH u. R. H. EGLI: Die Ernährungsindustr. **59**, 631 (1957).
47. KLEIN, I.: Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. I, S. 110. Berlin: Springer 1931.
48. DOERFFEL, K.: Beurteilung von Analysenverfahren und -Ergebnissen. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1962.
49. ROSEN, H.: Arch. Biochem. Biophys. **67**, 10 (1957).
50. HOLMES, K. E.: Analyst **75**, 457 (1950).
51. ENGLIS, D. T., u. J. W. MILES: Analytic. Chem. **26**, 1217 (1954).
52. BIEHL, B.: Kakaobohnenprüfung 1961/62. Hamburg: Gordian 1962.
53. SPACKMAN, D. H., W. H. STEIN u. S. MOORE: Analytic. Chem. **30**, 1190 (1958).
54. HARDY, F., u. G. RODRIGUES: Rep. Cacao Res. Trin. 1945/51, S. 89 (1953).
55. SCHORMÜLLER, J., u. H. WINTER: Nahrung **3**, 187 (1959).
56. DE BORGER, R.: Rev. Fermentat. Industr. aliment. **16**, 10 (1961).
57. MALY, A.: Prumysl. Potravin **6**, 133 (1955).
58. M.-COUTINHO, E.: Gordian **57**, H. 1378, 24 (1958).
59. HERRMANN, K.: Diese Z. **109**, 487 (1959).
60. BATE-SMITH, E. C., u. T. SWAIN: Chem. and Industr. **1953**, S. 377.

61. GRASSMANN, W., H. ENDRES, M. OPELT u. H. E. SISSI: Das Leder **10**, 149 (1959).
 62. HACKMAN, R. H., u. A. R. TODD: Biochem. J. **55**, 631 (1953).
 63. PIERPOINT, W. S.: Biochem. J. **98**, 567 (1966).
 64. MASON, H. S., u. E. W. PETERSON: J. biol. Chem. **212**, 485 (1955).
 65. FISCHER, E., u. H. SCHRADER: Ber. dtsh. chem. Ges. **43** (1), 525 (1910).

Zusammenfassende Übersichtsberichte Über Hydroxy-zimtsäuren und ihre Bedeutung in Lebensmitteln

K. HERRMANN*

Eingegangen am 28. April 1966

Hydroxy-zimtsäuren werden wie die Flavonole und Flavone fast in jeder höheren Pflanze aufgefunden, wenn nach ihnen — z. B. unter Einsatz der Papierchromatographie — gezielt gesucht wird. Selbst in niederen Pflanzen wurden Hydroxy-zimtsäuren aufgefunden, z. B. p-Cumarsäure und Ferulasäure in Lycopodium-Arten (1) und Chlorogensäure neben anderen Hydroxy-zimtsäuren in Pilzen, z. B. Champignons (2).

Bis 1950 waren dagegen nur in einer recht bescheidenen Zahl von Pflanzen Hydroxy-zimtsäuren, vor allem Kaffeesäure und Chlorogensäure einwandfrei nachgewiesen worden, wenn auch bereits 1910 CHARAUX (3) auf Grund von Farbreaktionen eine weite Verbreitung der Kaffeesäure bzw. ihrer Derivate vermutet hatte.

A. Chemie und Vorkommen der Hydroxy-zimtsäuren und ihrer Derivate

I. Hydroxy-zimtsäuren

Die Hydroxy-zimtsäuren (bisherige Übersichtsarbeiten: 4, 5, 6, 7), vgl. auch das Werk von HARBORNE (8), stehen als phenolische Phenylpropane (C_6C_3) in enger chemischer Beziehung zur großen Gruppe der Flavonoide, die das Grundgerüst des Diphenylpropane ($C_6C_3C_6$) besitzen und zu denen Catechine (9), „Leukoanthocyanidine“ (Flavandiole) (10), Anthocyanidine, Flavone, Flavonole, Flavanone, Flavanonole, Isoflavone, Chalkone und Aurone zählen (vgl. auch 11). Häufig werden die Hydroxy-zimtsäuren mit zu den Flavonoiden gerechnet, was auf Grund ihrer biochemischen Zugehörigkeit und ihrer ähnlichen Verbreitung in den höheren Pflanzen einige Berechtigung hat. Auch in der wirtschaftlichen Bedeutung ergeben sich klare Parallelen.

Die in der Natur vorkommenden Hydroxy-zimtsäuren umfassen im wesentlichen die

p-Cumarsäure (4-Hydroxy-zimtsäure), Smp. 210—213° C,

Ferulasäure (3-Methoxy-4-hydroxy-zimtsäure), Smp. 169° C,

Kaffeesäure (3,4-Dihydroxy-zimtsäure), Smp. 195—198° C,

Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-zimtsäure), Smp. 192° C.

Andere, z. B. Isoferulasäure, o-Cumarsäure, p-Methoxyzimtsäure, sind bisher nur vereinzelt aufgefunden worden (5).

Die ersten zuverlässigen Hinweise über ihre weite Verbreitung im Pflanzenreich verdanken wir u. a. BATE-SMITH (12), der feststellen konnte, daß von 467 untersuchten Dicotylen-Species 66% Kaffee-, 48% p-Cumar-, 33% Ferula- und 26% Sinapinsäure enthielten. Für 94 geprüfte Monocotylen-Species ergab sich der Anteil der genannten Säuren zu 50, 55, 67 und 57%.

Die *3,4,5-Trihydroxy-zimtsäure* ist bisher in der Natur noch nicht aufgefunden worden, obwohl unabhängig voneinander BATE-SMITH (13) und HERRMANN (5) intensiv nach dieser Verbindung im Pflanzenreich gesucht haben. Es ist dies bei der weiten

* 7012 Fellbach, Drosselweg 24