

Wissenschaftlicher Abschlussbericht zum AIF-Vorhaben 13234 N

Veränderungen im Kohlenhydrat-Metabolismus von Kaffeesamen während der Aufbereitung und Lagerung von Arabica-Rohkaffee

Zusammenfassung

Im vorliegenden Projekt der Gemeinschaftsforschung wurde erstmals untersucht, in welcher Weise sich der Gehalt und das Spektrum der niedermolekularen Kohlenhydrate während der Rohkaffeeaufbereitung und während der nachfolgenden Lagerung unter definierten Bedingungen verändern. Besondere Beachtung fanden dabei mögliche Zusammenhänge zwischen lagerungsbedingten Verlusten der Aromaqualität der aus den Lagerungsproben hervorgegangenen Röstkaffees und deren physiologischen Ursachen. Dadurch konnte ein Beitrag zu dem Verständnis darüber erbracht werden, wie qualitätsbestimmende Prozesse durch den Keimungsstatus und die Vitalität der Kaffeesamen beeinflusst werden.

Um die Zusammensetzung der Kohlenhydrat-Fraktion in Abhängigkeit von der verwendeten Aufbereitungsmethode und der Lagerungsdauer zu analysieren, wurden zunächst in aufwändigen Arbeiten die entsprechenden Proben unter definierten Bedingungen auf einer Plantage in Brasilien erstellt. Im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes in Brasilien wurden insgesamt über 50 kg an definiertem Probenmaterial produziert. Fast die Hälfte dieses Materials wurde Herrn Prof. Speer (TU Dresden) für seine Experimente im Rahmen seines AIF-Projektes zur Verfügung gestellt. Darüber hinaus wurden Proben aus experimentellen Modell-Aufarbeitungen im Labor in unsere Untersuchungen mit einbezogen. Zusätzlich wurden einige kommerzielle Rohkaffeeproben hinsichtlich der niedermolekularen Kohlenhydrate untersucht. Die brasilianischen Proben aus den Muster-Aufbereitungen im Anbauland wurden unter definierten Bedingungen eingelagert und entsprechend eines vorab erstellten Zeitschemas einerseits für die biochemischen Analysen verwendet und andererseits den Industriepartnern zur sensorischen Beurteilung zugesandt. Letztere Proben wurden von den Industriepartnern zunächst tiefgefroren, um dann geröstet und verkostet zu werden.

Bei den Vitalitätstests zeichnete sich ein überraschendes Ergebnis ab. Wie erwartet verloren die meisten Rohkaffeeproben zwei bis drei Monate nach der Ernte ihre Vitalität. Dieses Verhalten traf allerdings nur für die geschälten und nicht für die in der Pergamentschicht gelagerten Rohkaffees („Pergaminos“) zu. Die Samenpopulationen dieser Proben waren durch nahezu unveränderte Vitalität während der ersten sechs Lagerungsmonate sowie einem

leichten Rückgang der Vitalität während der folgenden Zeit charakterisiert. Selbst nach 18 Monaten Lagerung waren noch beträchtliche Anteile der „Pergamino“-Proben vital. Offensichtlich hat diese Pergamentschicht (Hornschale =Exokarp) einen positiven Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Samen. Die ausgedehnte Erhaltung der Vitalität ist mit einem langsameren Verfall der Flavourqualität des resultierenden Röstkaffees verknüpft.

Die Analysen der niedermolekularen Kohlenhydrate erbrachten kaum signifikante Auswirkungen der Lagerung auf die Gehalte der einzelnen Zucker. Es ergaben sich allerdings deutliche Zusammenhänge zwischen der Art der Aufbereitung und den Gehalten an Glukose und vor allem an Fruktose. Während sich die Fruktose- und Glukosegehalte trocken aufbereiteter Rohkaffees kaum von denen der unbehandelten Nullprobe (frische Kaffeesamen aus reifen Früchten) unterschieden, waren parallel nass aufbereitete Proben durch drastisch verringerte Fruktose-, bzw. Glukose-Level gekennzeichnet. Es ist nicht auszuschließen, dass diese chemischen Unterschiede mittelbar für die grundlegenden Geschmacksunterschiede zwischen gewaschenen und ungewaschenen Arabicas verantwortlich sind. Die Ungleichheiten in den Konzentrationen dieser beiden Zucker blieben auch während der nachfolgenden Lagerung der Rohkaffees erhalten. Alle übrigen Zucker sind in ihren Gehalten offenbar unabhängig von der Aufbereitungsart und auch von der Lagerungsdauer. Die lagerungsbedingten Qualitätsabnahmen und insbesondere die so genannte Aromaverflachung bei überlang gelagerten Kaffees hängen daher wahrscheinlich nicht ursächlich mit den Zuckern zusammen. Um diese Fragestellung abschließend zu beleuchten, müssten allerdings weitere Untersuchungen durchgeführt werden, wobei vor allem auch aroma-intensive Hochlandkaffees mit einbezogen werden sollten.

Das Forschungsziel wurde erreicht.

Einleitung und Fragestellung

Rohkaffee ist nur begrenzt lagerfähig; überlang (mehr als 10 Monate) gelagerte Kaffees weisen häufig eigentümliche "off-notes" auf. Als Hauptursache derartiger Qualitätseinbußen gelten oxidative Veränderungen an Chlorogensäuren und Kaffeeölen, die bei längerer und besonders bei unsachgemäßer Lagerung nicht zu vermeiden sind (1-5).

Von diesen Prozessen unabhängig ist bei überlagerten Rohkaffees bzw. den daraus resultierenden Röstkaffees außerdem oft eine deutliche "Verflachung" der Tassenqualität festzustellen, d.h. die für die jeweiligen Provenienzen typischen Geschmacksmerkmale des Kaffeegetränkes - vor allem im Bereich der Spitzenqualitäten - lassen mit zunehmender Lagerung des Rohkaffees nach. Während die Ursachen für die eingangs genannten "off-notes" oder Fehl aromen prinzipiell bekannt sind, liegen diejenigen für den kontinuierlichen

"Verflachungsprozesse" weitgehend im Dunkeln. Die wenigen Hinweise über diesbezügliche Veränderungen im Rohkaffee betreffen vor allem die löslichen Kohlenhydrate (6, 7).

Bei den Mutmaßungen über die Ursachen für derartige Veränderungen ist bislang nahezu unberücksichtigt geblieben, dass es sich bei frischem Rohkaffee um vitale Samen handelt, die erst im Laufe einer mehrmonatigen Lagerung absterben. In einem bereits abgeschlossenen AIF-Projekt (FV-Nr. 12181) und einem noch laufenden Nachfolgeprojekt (FV-Nr. 13588) konnte gezeigt werden, dass der Kaffee-Samenstoffwechsel aufbereitungsspezifische Reaktionen aufweist, die sich unmittelbar auf die chemische Zusammensetzung des Rohkaffees auswirken (siehe auch (8)).

Während frischer Rohkaffee unmittelbar nach der Aufbereitung noch keimfähig ist, geht diese Fähigkeit im Verlauf von Transport und Lagerung bald verloren: der Same stirbt ab. In den noch vitalen Samen ist ein zwar gedrosselter, aber kontrollierter Metabolismus zu erwarten. Nach dem Absterben der Kaffeesamen wird dieser von weitgehend unkontrollierten *post mortem* Reaktionen in den dekompartimentierten Geweben abgelöst. Allerdings sind auch in den abgestorbenen Samen noch enzymatische und nicht-enzymatische *post mortem* Reaktionen zu erwarten. Derartige Reaktionen sind nicht nur bei Weizen, Mungbohne oder Soja (9-12) sondern auch bei Kaffee beobachtet worden (13). Fraglos verändern sowohl *prae mortem* als auch *post mortem* Reaktionen im Rohkaffee die chemische Zusammensetzung der Bohne und wirken sich somit auf deren Qualität aus. Über diese Vorgänge und deren mögliche Kontrolle liegen bislang kaum Informationen vor. Von besonderem Interesse sind die Veränderungen im Kohlenhydrat-Stoffwechsel, die während der Aufbereitung und während der Lagerung des Rohkaffees auftreten, da zu vermuten ist, dass sie zu den beschriebenen Aromaverflachungen führen. Daneben repräsentiert der Kohlenhydrat-Metabolismus ein ideales Werkzeug, um - exemplarisch für andere Stoffwechselvorgänge - die Veränderungen des physiologischen Status der Kaffeesamen zu erfassen und zu evaluieren. Dies gilt sowohl für die vitalen als auch für die abgestorbenen Samen. In Kombination mit der Analyse der sensorischen Qualität der entsprechenden Röstkaffees sollten die geplanten Untersuchungen zum Kohlenhydrat-Metabolismus erste wichtige Rückschlüsse über den Verlauf und die Ursachen der Verflachung der Tassenqualität ermöglichen. Schwerpunkt des vorliegenden Forschungsprojektes ist es, entsprechende Zusammenhänge aufzuklären, sowie Informationen über eine mögliche Kontrolle der zugrunde liegenden Prozesse zu sammeln.

Material und Methoden

Proben-Übersicht

Die meisten der für das vorliegende Forschungsprojekt untersuchten Proben entstammen den Aufbereitungen auf der Kaffeeplantage der *Ipanema Agro Industria* (Minas Gerais, Brasilien). Dazu waren zunächst umfangreiche Arbeiten auf einer Kaffeeplantage in Brasilien notwendig.

Es war ursprünglich beabsichtigt, auch Proben mit in das Projekt einzubeziehen, die bei experimentellen Aufbereitungen in Moshi, Tansania hergestellt wurden. Während der Probenumfang einer ersten erfolgreich erstellten Charge für derartige Lagerungsexperimente nicht ausreichte, ergaben sich bei einer zweiten, im großen Maßstab aufbereiteten Charge massive Qualitätsmängel aufgrund von Trocknungsproblemen vor Ort. Ein Aufbereitungsprojekt bei *Cenicafé*, Kolumbien, wie es von unserer Arbeitsgruppe bereits 2000/2001 durchgeführt worden war, kam leider aufgrund der angespannten Sicherheitslage in Kolumbien nicht zustande (Reisewarnung durch das Auswärtige Amt).

Um die Veränderungen der Kohlenhydrate während der Aufbereitung (nass/trocken) untersuchen zu können, wurden in bewährter Weise (AIF-FV Nr. 12181 und Nr. 13588) Modellaufbereitungen im Labor durchgeführt. Hierfür wurden Früchte aus Mexiko und Tansania verwendet.

Neben den selbst aufbereiteten Brasilien-Proben und im Labor Modell-aufbereiteten Proben aus Tansania und Mexiko wurden mehrere, von den Industriepartnern zur Verfügung gestellte, kommerzielle Rohkaffeeproben aus unterschiedlichen Provenienzen untersucht. Letztere entstammten einerseits trockenen Aufbereitungen (Brazil 1 - 2, Ethiopia) und andererseits nassen Aufbereitungen (Brazil 3, Mexico, Guatemala, Honduras, Salvador, Cameroon, Peru, Kenya, Colombia 1-3). Die einzelnen Varietäten sind nicht bekannt. Ebenso können keine Aussagen zur Homogenität des Materials hinsichtlich des Reifegrads gemacht werden, was insbesondere bei den ungewaschenen Arabicas eine Rolle spielen könnte. Die Modell-aufbereiteten Proben und die kommerziellen Rohkaffeeproben wurden nicht eingelagert sondern lediglich der vergleichenden Untersuchung der löslichen Kohlenhydrate in Abhängigkeit von der Aufbereitungsmethode unterworfen.

Probenmaterial aus Muster-Aufbereitungen in Brasilien

Die meisten der für das vorliegende Forschungsprojekt untersuchten Proben entstammen den Aufbereitungen auf der Kaffeeplantage der *Ipanema Agro Industria* (Minas Gerais, Brasilien). Dabei konnte identisches Ausgangsmaterial (*Coffea arabica* L. var. *Acaià*, jeweils von der gleichen Charge vollreifer, unbeschädigter Kirschen und am selben Tag verarbeitet) parallel nass, "semi-washed" bzw. trocken aufgearbeitet werden. Die fertig aufbereiteten

Rohkaffeeproben wurden in der üblichen Weise als Rohkaffee mit einer angestrebten Restfeuchte von etwa 12 % per Luftfracht nach Braunschweig verschickt.



Abbildung 1: Trocknung der Rohkaffees aus den experimentellen Aufarbeitungen.

Während trocken aufbereiteter Kaffee ausschließlich im geschälten Zustand transportiert und gelagert werden kann, stehen für nass aufbereitete Kaffees prinzipiell zwei Lagerungsformen zur Verfügung: vollständig geschält oder als Hornschalenkaffee, d.h. noch von der Pergaminschicht (dem Endokarp) umhüllt (14). In früherer Zeit wurden nicht unbeträchtliche Anteile des nass aufbereiteten Importkaffees als Hornschalenkaffee eingeführt und erst kurz vor der Röstung geschält. Im Zuge von Bestrebungen zur Kostenminimierung wird in der Praxis seit langem die Hornschale möglichst früh entfernt, da geschälter Rohkaffee wesentlich geringeren Lagerungs- und Transportraum beansprucht. Dies geschieht ungeachtet der Einschätzung vieler Experten, dass eine Lagerung in der Hornschale als günstiger anzusehen ist (15, 16). Um wissenschaftlich zu überprüfen, ob eine Lagerung in der Hornschale (= *Parchment* = Endokarp) einen anderen Einfluss auf die chemische Zusammensetzung hat als die Lagerung im geschälten Zustand, wurde ein Teil der nass aufbereiteten Rohkaffees geschält und ein weiterer ungeschält, als so genannter *Pergamino*, eingelagert. Art und Umfang der durchgeführten Aufbereitungen und der damit verbundene Aufwand können aus dem Foto (Abbildung 1) der Trocknung einiger der produzierten Kaffeechargen abgeleitet werden. Eine genaue Beschreibung und Zuordnung der erstellten Proben ist in Tabelle 1 aufgelistet.

Modell-aufbereitetes Probenmaterial aus Tansania und Mexiko

Um einen direkten Vergleich von parallel aufbereiteten Rohkaffees sowie unbehandelten Frischproben durchführen zu können, wurden neben den authentischen Musteraufbereitungen aus Brasilien Modellaufbereitungen in Braunschweig durchgeführt. Hierzu wurden reife, rote Kaffee Früchte aus Tansania (*C. arabica* var. *KP345*) und Mexiko (*C. arabica* var. *Caturai*)

nach Braunschweig überführt (jeweils etwa 2 kg) und im Labor aufgearbeitet. Die unbehandelten frischen Samen wurden manuell aus der Frucht freipräpariert, anschließend sofort in flüssigem Stickstoff schock-gefroren und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.



Abbildung 2: Trockene Modell-Aufbereitung (Trocknung im Trockenschrank).



Abbildung 3: Nasse Modell-Aufbereitung (Fermentation in Erlenmeyerkolben).

Herkunft / Charge	Varietät	Methode	Lagerung	Code	Menge
Experimentelle Aufbereitung im Anbaugebiet (Muster-Aufbereitung)					
Brasilien 1	Acaià	Wet	geschält	W1	9 x 700 g
	Acaià	Wet	ungeschält	P1	9 x 700 g
	Acaià	Semi	geschält	S1	9 x 700 g
	Acaià	Dry	geschält	D1	9 x 700 g
Brasilien 2	Acaià	Wet	geschält	W2	6 x 700 g
	Acaià	Wet	ungeschält	P2	10 x 700 g
	Acaià	Dry	geschält	D2	10 x 700 g
Brasilien 3	Acaià	Wet	geschält	W3	6 x 700 g
	Acaià	Wet	ungeschält	P3	5 x 700 g
	Acaià	Semi	geschält	S3	9 x 700 g
	Acaià	Dry	geschält	D3	6 x 700 g
Experimentelle Aufbereitung im Labor (Modell-Aufbereitung)					
Mexiko/BS	Caturai	Fresh	-	FMx	100 g
	Caturai	Wet	-	WMx	100 g
	Caturai	Dry	-	DMx	100 g
Tanzania/BS	KP345	Fresh	-	FTz	100 g
	KP345	Wet	-	WTz	100 g
	KP345	Dry	-	DTz	100 g
Kommerzielle Rohkaffeeproben					
Ethiopia	n.d.	Dry	-	Ethiopia	100 g
Brazil 1	n.d.	Dry	-	Brazil 1	100 g
Brazil 2	n.d.	Dry	-	Brazil 2	100 g
Brazil 3	n.d.	Wet	-	Brazil 3	100 g
Mexico	n.d.	Wet	-	Mexico	100 g
Honduras	n.d.	Wet	-	Honduras	100 g
Kenya	n.d.	Wet	-	Kenya	100 g
Peru	n.d.	Wet	-	Peru	100 g
Salvador	n.d.	Wet	-	Salvador	100 g
Cameroon	n.d.	Wet	-	Cameroon	100 g
Guatemala	n.d.	Wet	-	Guatemala	100 g
Colombia 1	n.d.	Wet	-	Colombia 1	100 g
Colombia 2	n.d.	Wet	-	Colombia 2	100 g
Colombia 3	n.d.	Wet	-	Colombia 3	100 g

Tabelle 1: Probenliste Rohkaffee

n.d. = nicht definiert

Die trockene Aufbereitung im Modellmaßstab wurde mit Hilfe gut gelüfteter Trockenschränke (ca. 35 °C) durchgeführt (Abbildung 2). Die nasse Modellaufbereitung erfolgte in Erlenmeyerkolben unter Leitungswasser (Abbildung 3). Dafür wurden zunächst die Kaffeekirschen manuell entpulpt. Anschließend wurden die Bohnen kurz gewaschen und insgesamt 30 Stunden bei Zimmertemperatur fermentiert. Während dieser Zeit wurde zweimal das Wasser gewechselt. Die entschleimten Kaffeeseamen wurden dann analog im Trockenschrank (ca. 35 °C) getrocknet. Nach Erreichen des gewünschten Trocknungsgrades (12 %) wurden die aus der jeweiligen Aufbereitung resultierenden Rohkaffeebohnen freipräpariert (Entfernung der Hornschale bzw. des gesamten Fruchtanteils), gleichfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 70 °C aufbewahrt.

Sensorische Überprüfung der Kaffeequalität

Kaffeecharge / Aufbereitung			Bewertung	
Portugies.	Deutsch	Code	Portugiesisch	Englisch
Despolpado 01	gewaschen, nasse Aufbereitung	W1	apenas mole,limpa, suave, doce, acideis boa, aroma bom, corpo baixo	fine cup, sweet, good acidity, low body, good aroma
Despolpado 02	dto.	W2	apenas mole, mais doce de primeiro,acideis boa, aroma bom	fine cup, more sweetness than Desp. 01, good acidity, good aroma
Cereja 01	ausschließlich reife Kirschen, trockene Aufbereitung	D1	bebida dura, adstringente, poco doce, acideis ruin,1 cup fermentado, corpo forte / bem corpado, aroma bom	good cup, adstringent, hardly sweet, slightly fermented strong body, good aroma
Cereja 02	dto.	D2	apenas mole, encorpado, mais suave de la outra (Cereja 01), doce, acideis boa	fine cup, good acidity, good body, more sweetness than Cereja 01, good acidity
Descascada 01	Nassaufber.. ohne Ferm.	S1	apenas mole, doce, acideis boa, corpo equilibrado, aroma bom	fine cup, sweet, good acidity, balanced body, good aroma

Tabelle 2: Verkostung der Rohkaffeeproben (Coffea arabica L. var. Acaiá) der experimentellen Aufbereitungen durch den Verkoster der Ipanema Agro Industria LTD.

Es ist unerlässlich den Nachweis zu führen, dass die Qualität der experimentell hergestellten Rohkaffees denen kommerziell relevanter Brasil-Kaffees entspricht; schließlich kann nicht von vorneherein ausgeschlossen werden, dass die besonderen Bedingungen der Musteraufbereitung vor Ort zu abweichenden Kaffeequalitäten führen könnten. In diesem Fall wären die Proben als Untersuchungsmaterial ungeeignet. Daher wurde vor Ort eine Verkostung des frisch hergestellten brasilianischen Rohkaffees durchgeführt. Diese ergab, dass die erstellten Rohkaffeeproben die gängige Qualität der industriell gefertigten Rohkaffees der Plantage aufwiesen und dass die Modell-aufbereiteten Kaffees somit als Probenmaterial geeignet waren. Im Einzelnen wurden die in Tabelle 2 zusammengefassten Eigenschaften und Charakteristika attestiert.

Lagerung und Probennahme

Die Langzeitlagerung erfolgte in zwei großen, für diese Zwecke umgebauten Glasaquarien bei konstant 20 °C. Um die Luftfeuchtigkeit auf die vorgesehenen 60 % einzustellen, befanden sich am Boden der Aquarien jeweils große Schalen mit je 1 L gesättigte $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ -Lösung mit reichlich Bodensatz (Abbildung 4). Hierdurch stellt sich ein nachhaltiges Gleichgewicht zwischen dem Wassergehalt der Umgebung und dem der Rohkaffees ein, der einen für die Lagerung günstigen Gehalt der Bohnen von 11% ergibt. Damit die nachfolgenden sensorischen Analysen nicht durch Fremdeinflüsse verfälscht werden (dies geschieht leicht bei Verwendung diverser Kunststoffmaterialien (15)), wurden für die Lagerung nur Gerätschaften aus Glas, Edelstahl und Naturleinen eingesetzt.



Abbildung 4: Lagerung der portionierten Kaffeeproben bei 20°C und 60 % rel. Feuchte in speziell umgerüsteten Aquarien

Um eine unproblematische Probennahme zu gewährleisten, wurden die einzelnen Rohkaffee-Chargen portioniert: Jeweils 700 g wurden in speziell dafür angefertigte Leinenbeutel abgefüllt. Nach den festgelegten Lagerzeiten wurde wie folgt verfahren: Jeweils ein Beutel der entsprechenden Charge wurde herausgenommen. Ein kleiner Teil dieses Probenmaterials wurde für die physiologischen und biochemischen Analysen benötigt, während der Großteil (etwa 600 g) einem der Industrie-Partner (Tchibo GmbH), zugesandt wurde, wo die Rohkaffeeproben umgehend geröstet wurden und zur Verkostung zur Verfügung standen.

Unmittelbar nach der Entnahme der Lager-Proben wurden die Vitalitätstests durchgeführt. Des Weiteren wurde ein Teil des Probenmaterials in Stickstoff schockgefroren und mit Hilfe einer Retsch MM 200 Kugelmühle im tiefgefrorenen Zustand zerkleinert und bei -70 °C gelagert. Diese Proben wurden sowohl für die Analysen der Kohlenhydrate als auch für die enzymologischen Untersuchungen verwendet.

Verkostung der eingelagerten Proben

Die Verkostungen wurden im Dezember 2003 vom Industriepartner TCHIBO, Frisch-Röst-Kaffee GmbH durchgeführt. Die jeweiligen Kaffeeproben wurden simultan verkostet. Die Proben waren jeweils direkt nach der Probennahme an TCHIBO geschickt worden, dort frisch geröstet und bis zur Verkostung eingefroren. Den Verkostungen lag folgendes Bewertungsschema zugrunde:

Fülle/Säure/Aroma	Code	Fülle/Säure/Aroma	Code
Sehr voll	13	mittel / voll	7
	12		6
voll / sehr voll	11	Mittel	5
	10		4
Voll	9	leicht / mittel	3
	8		2
		leicht /dünn	1

Tabelle 3: Bewertungsschema zur Verkostung der eingelagerten Kaffeeproben.

Analysen zum physiologischen Status - Vitalitätstests

Die Samen der unterschiedlich aufbereiteten Rohkaffeeproben wurden Vitalitätstests unterworfen: Die gegebenenfalls noch von der Hornschale befreiten Kaffeebohnen wurden 24 h in Wasser gequollen und anschließend über Nacht in 1 %iger Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Lösung (in 50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,6) inkubiert. Intakte, vitale Zellen nehmen das TTC auf und reduzieren es; dabei entsteht ein roter Farbstoff. Abgestorbenes Gewebe verfügt über keinerlei Reduktionskraft und weist folglich keine Rotfärbung auf. Das Auftreten der Rotfärbung wurde geprüft und so die Vitalität der Samen - getrennt für Endosperm und Embryo – ermittelt (Abbildung 5 und Abbildung 6).

Bestimmung der niedermolekularen Kohlenhydrate in Rohkaffee

Zur Quantifizierung der löslichen Kohlenhydrate wurde für dieses Projekt eine HPAE-PAD Chromatographie-Anlage der Firma *Dionex* beschafft. Die zugrunde liegende Methodik wurde bereits von zahlreichen anderen Arbeitsgruppen für Fragestellungen beim Kaffee verwendet (6, 7, 17-27) und gilt mittlerweile als Standardmethode. Ein direkter Methodenvergleich, der Gegenstand einer Dissertation an der TU-Braunschweig war (28) untermauerte diese Einschätzung zusätzlich. Bedauerlicherweise war die HPAEC-PAD-Anlage in unserem Fall aufgrund ständiger Mängel und diverser Ausfälle einzelner Bauteile kaum nutzbar. Erst zum Ende der ursprünglichen Laufzeit des Forschungsprojektes gelang es, das Gerät in der Art zu installieren, dass es die hohen Ansprüche schließlich erfüllen konnte. Dadurch wurde eine kostenneutrale Laufzeitverlängerung notwendig.

Probenextraktion

Ein besonderes Problem bei der Bestimmung der niedermolekularen Kohlenhydrate in Rohkaffees besteht in der sehr komplexen Matrix der wässrigen Extrakte der Rohkaffeeproben. Im Gegensatz zu Röstkaffees oder gar löslichen Kaffees enthalten die Extrakte von Rohkaffees eine hohe Konzentration an phenolischen Komponenten, die bei der Detektion mittels gepulster Amperometrie stören. Die vom Hersteller versprochene hohe Selektivität bei der Trennung und Detektion konnte nicht bestätigt werden. Deshalb war es notwendig, diese störenden Substanzen abzutrennen, bevor die Proben mittels HPAEC-PAD analysiert werden. Unter Verwendung von PVPP, anschließender Zentrifugation gefolgt von einer Festphasenextraktion mittels RP-18-Kartuschen konnten nun Extrakte hergestellt werden, die eine zuverlässige Bestimmung der löslichen Kohlenhydrate mittels HPAEC-PAD zuließen.

Es wurden etwa 50 mg gefriergetrocknetes und unter flüssigem N₂ gemörstertes Rohkaffee-Pulver genau in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen. Nach Zugabe von 5 ml Ethanol (80 °C, 80 %ig) plus 100 µl einer Lactose-Lösung (7 mmol/l) als internen Standard und direkt anschließender Homogenisation im Ultra Turrax (20 s) wurde das Homogenat 10 min.

in einem 80 °C heißen Ultraschallbad behandelt. Dann wurde es bei 4000 U/min 5 min. zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Mit dem Pellet wurde die Extraktion ein weiteres Mal wie beschrieben durchgeführt, woran sich eine zweimalige Extraktion mit 60 %igem Ethanol (20 °C) anschloss. Alle Extrakte wurden vereinigt und bei 80 °C im Evaporator zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit 5 ml Wasser (Reinstwasseranlage: ELGA Maxima, Widerstand > 18 MΩ*cm) sowie einer Spatelspitze PVPP versetzt und zum Lösen auf einen Vortexer gestellt. Anschließend wurden weitere 5 ml Wasser zugegeben und die Probe für 5 min. in ein Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurde die Lösung quantitativ in einen 50 ml Messkolben überführt. Nach dem Auffüllen wurde ein Aliquot abgenommen, das PVPP durch Zentrifugation (10 min. 4000 U/min) abgetrennt und der Überstand über eine C18-Säule gereinigt. Das klare Eluat wurde für die HPAEC-PAD-Bestimmung eingesetzt. Für die Bestimmung der in hoher Konzentration vorliegenden Saccharose wurde das Eluat 1: 10 mit Reinstwasser verdünnt. Die Quantifizierung erfolgte über die *Dionex Chromeleon*-Software mit internem Standard und externer Kalibrierung.

HPAEC-PAD-Bestimmungsparameter:

Gerät:	DIONEX [®] BIO-LC
Pumpe:	DIONEX [®] GS 50 Gradient Pump
Säule:	DIONEX [®] PA20
Autosampler:	DIONEX [®] AS 50 Autosampler mit AS 50 Thermal Compartment (Säulen-Temperatur: 30°C)
Detektor:	Säule: DIONEX [®] ED 50 Elektrochemical Detector mit Goldelektrode
Detektionsart:	gepulste Amperometrie
Waveform:	Waveform Time = 0.00, Potential = 0.10 Waveform Time = 0.20, Potential = 0.10, Integration = Begin Waveform Time = 0.40, Potential = 0.10, Integration = End Waveform Time = 0.41, Potential = -2.00

Waveform Time = 0.42, Potential = -2.00

Waveform Time = 0.43, Potential = 0.60

Waveform Time = 0.44, Potential = -0.10

Waveform Time = 0.50, Potential = -0.10

Injektionsvolumen: 20 µl

Fluss: 0,5 ml/min

Fließmittelgradient:

Zeit [min]	NaOH [mmol/L]
0	17
9,5	12,5
9,51	28
17,5	28
17,51	108
29,01	108

Steuerung und Datenaufnahme: Chromeleon® Software

Extraktion und Bestimmung von Enzymaktivitäten in Rohkaffeeproben

a) Erstellung von Enzymextrakten

Die Extraktion der Rohkaffeeproben erfolgte mit einem sauren hypotonischen Phosphatpuffer (pH 5,5). Um die Oxidation phenolischer Inhaltsstoffe zu unterbinden und zur Vermeidung einer Enzym-Denaturierung durch Vergerbungsreaktionen wurden zum einen 2 mM Ascorbinsäure und zum anderen ausreichend PVPP zugesetzt. Zur Homogenisation wurden Aliquots (200 mg) der tiefgefrorenen Rohkaffee-Pulver mit Hilfe eines Ultra Thurrax-Homogenisators suspendiert. Nach Filtration wurde bei 30.000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer PD10 Entsalzungs-Säule von störenden niedermolekularen Substanzen - und damit auch von endogenen Substraten - befreit und stand anschließend für die Aktivitätsbestimmungen der unterschiedlichen Enzyme zur Verfügung.

b) Bestimmung der Enzymaktivitäten

1) Endo- β -mannanase

Die Bestimmung von Endo- β -mannanasen erfolgte bislang standardmäßig über Viskosimetrie. Als Substrat wird das (Galakto-) Mannan aus Guarkernmehl oder aus Carobsamen verwendet; die Aktivität wird über die Abnahme der Viskosität des Substratgemisches ermittelt. Diese Methode erwies sich allerdings als wenig praktikabel und als nicht sensitiv genug, um die erwarteten Änderungen der Endomannanase zu erfassen.

Da es schwierig ist, die Aktivität von Endoenzymen durch Standardtests zur Enzymaktivität zu erfassen, erfolgte die Bestimmung der Endo- β -Mannanaseaktivität durch einen Geldiffusionstest (29, 30). Im Bereich der Endo- β -Mannanaseaktivität kommt es im Medium zu einer pH-Veränderung, die durch Zugabe eines geeigneten Indikators sichtbar gemacht werden kann. Die Enzymaktivität ist dann proportional zum Bereich im Medium, in dem die pH-Veränderung festgestellt werden kann. Zur Herstellung der Platten wurden 0,05 % (w/v) Galaktomannan-Substrat (Guar) in Inkubationspuffer (0,1 M Zitronensäure, 0,5 M Natriumphosphat, pH 5.0) gelöst, auf 95 °C erhitzt, 20 min. gerührt und dann 15 min. bei 4°C und 15.000 x g zum Klären zentrifugiert. Zu dieser Lösung wurden 0,8 % (w/v) Agarose gegeben und aufgeköcht. Nach Abkühlen auf 60 °C wurden jeweils 30 ml zum Gießen der einzelnen Platten in den Petrischalen verwendet. Nach dem Verfestigen der Platten wurden je 10 Proben-Löcher mit 3 mm Durchmesser in die Platten gestanzt. Für die einzelnen Bestimmungen wurden je 10 μ l des Rohhomogenates eingesetzt.

2) α -Galaktosidase

Die Bestimmung der Aktivität der α -Galaktosidase erfolgt über Spaltung des synthetischen Substrates p-Nitrophenyl- α -Galaktosid und der anschließenden photometrischen Messung der p-Nitrophenol-Konzentration (400 nm). Als Enzymprobe fungiert - wie bei der Bestimmung der β -Mannosidase - die entsprechend der oben dargestellten Beschreibung erstellte Enzymprobe.

3) β -Mannosidase

Die Bestimmung der β -Mannosidase-Aktivität erfolgte analog jedoch mit p-Nitrophenyl- β -mannosid als Substrat.

Ergebnisse

Im vorliegenden Forschungsvorhaben wurden erstmals in einer vergleichenden Studie und unter Verwendung identischen Ausgangsmaterials die Auswirkungen der Aufbereitung und insbesondere der nachfolgenden Lagerung auf die chemische Zusammensetzung von Rohkaffees untersucht. Dabei wurden nicht nur umfangreiche Untersuchungen zum Verlauf der Vitalität der Samen sondern auch zur Veränderung der niedermolekularen Kohlenhydrate und der Aktivität relevanter Enzyme durchgeführt. Schließlich wurden die unter definierten Bedingungen gelagerten Proben von den Industriepartnern geröstet und vergleichend verkostet.

Überprüfung der Vitalität der Kaffeesamen

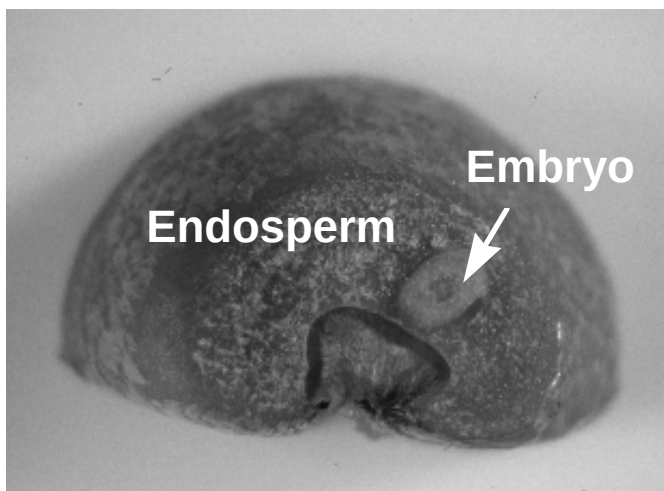


Abbildung 5:

Voll vitaler Kaffeesame (Pergamino P3, 4 Monate gelagert). Endosperm und Embryo sind nach Inkubation mit TTC vollständig rot angefärbt.

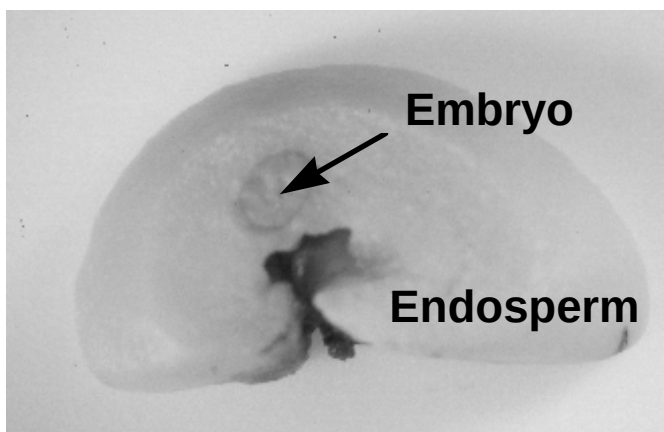


Abbildung 6:

Abgestorbener Kaffeesame

("semi-dry" S1, 4 Monate gelagert). Endosperm und Embryo werden nach Inkubation mit TTC überhaupt nicht rot angefärbt.

Nach Meinung namhafter Experten gibt es einen fast direkten Zusammenhang zwischen Vitalität der Bohne und der späteren Tassenqualität (14). Weder wurde bisher wissenschaftlich untersucht, wie sich die Methode der Aufbereitung auf die Vitalität der Samen auswirkt, noch sind Unterschiede zwischen gewaschenen Rohkaffees dokumentiert, die einerseits in der Hornschale als *Pergamino* und andererseits im geschälten Zustand gelagert wurden. Die Auswirkungen von technologisch unterschiedlichen Aufbereitungen

sowie den zwei unterschiedlichen Lagerungsformen von nass aufbereiteten Rohkaffees wurden in diesem Projekt erstmals untersucht.

Der TTC-Test zeigte, dass zu Beginn der Versuchsreihe noch in allen Rohkaffee-Proben die Samen voll vital waren (siehe Abbildung 7). Im weiteren Verlauf der Lagerung nahm die Vitalität der Kaffeesamen drastisch ab. Nach fünfmonatiger Lagerung (etwa 6,5 Monate nach der Ernte) sind nur noch etwa 10 bis 20 % der gelagerten Kaffeesamen vital. Im Gegensatz dazu blieb die Vitalität bei den in der Hornschale gelagerten Kaffees (*Pergaminos*) über einen weitaus längeren Zeitraum erhalten.

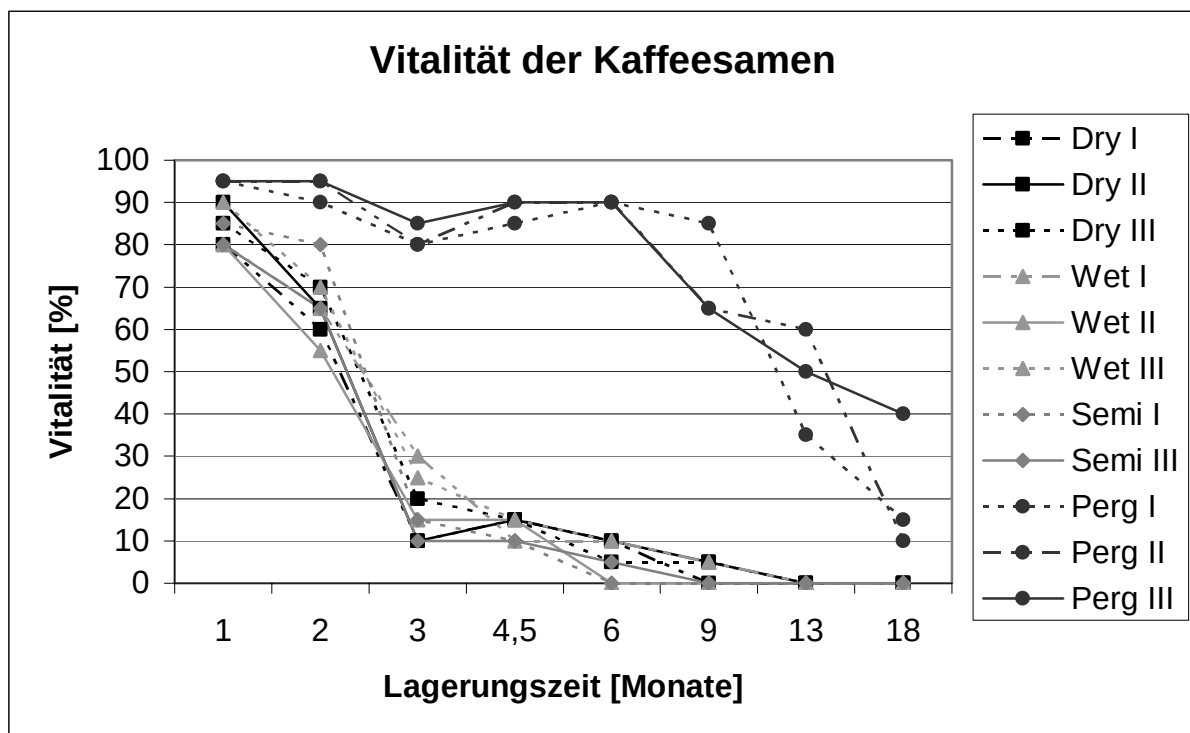


Abbildung 7: Abnahme der Vitalität der Kaffeesamen im Zuge der Lagerung der Rohkaffeeproben

Analyse der löslichen Kohlenhydrate

Niedermolekulare Kohlenhydrate in Rohkaffee: Einfluss der Aufbereitung

Rohkaffee enthält verschiedene niedermolekulare Kohlenhydrate in variierenden Konzentrationen. Da ihnen als Vorstufen für das Flavour und das Aroma des resultierenden Röstkaffees und des daraus zubereiteten Kaffeegetränks große Bedeutung zukommt (31, 32), waren sie wiederholt Gegenstand wissenschaftlicher Analysen (7, 21, 27, 28, 33-42). Unter den niedermolekularen Kohlenhydraten ist Saccharose mengenmäßig am bedeutendsten: die meisten Literaturwerte für Saccharose in Arabicas liegen etwa im Bereich 5-8,5 % (43). Sowohl die Oligosaccharide Rhamnose und Stachyose als auch die freien Monosaccharide, v.a. Fruktose und Glukose, kommen in weitaus geringeren Mengen vor. Allerdings weichen die diversen Autoren bei den in Rohkaffees gefundenen Zuckerspektren voneinander ab. So konnten einige Autoren die Oligozucker Raffinose, Stachyose oder Maltose nicht fassen (z.B. (38, 44)), andere wiederum fanden keine Galaktose (siehe (43)), und auch die Monozucker Ribose, Mannose und Xylose wurden häufig nicht in ihrem Vorkommen bestätigt.

Im Gegensatz dazu gelang uns bei der Analyse der niedermolekularen Kohlenhydrate in Arabica-Rohkaffees mittels HPAEC-PAD der Nachweis und die Quantifizierung von Saccharose, Raffinose, Stachyose, Fruktose, Glukose, Galaktose, Mannose, Arabinose und Rhamnose. Maltose konnte nur in einzelnen Arabica-Proben nachgewiesen werden. In der Literatur wird ein Nachweis lediglich für einzelne Robusta-Rohkaffees erwähnt, während desgleichen nicht für Arabica-Proben gelang (40). Das angebliche Vorkommen von Ribose (44, 45) konnte in keiner Probe bestätigt werden. Abbildung 8 zeigt die typische Verteilung für die niedermolekularen Zucker in einem Arabica Rohkaffee. Das Verhalten der löslichen Zucker in Arabica-Rohkaffees in Abhängigkeit von der Aufbereitung und der Lagerung soll im Folgenden getrennt nach den Gruppen: 1) Saccharose, 2) Raffinose und Stachyose, 3) Fruktose und Glukose, 4) Minorzucker, dargestellt werden.

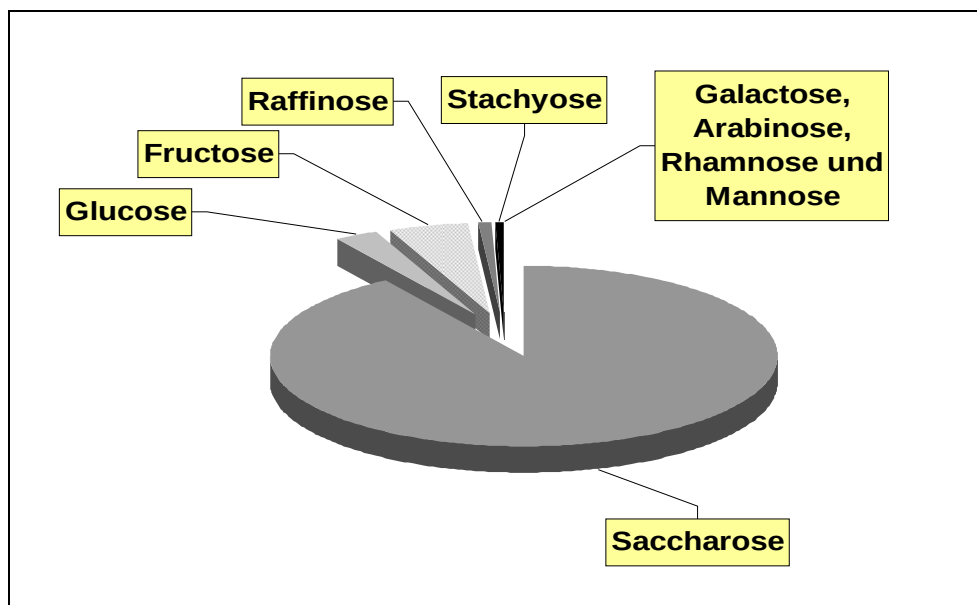


Abbildung 8: Niedermolekulare Kohlenhydrate in Rohkaffee: Anteile der einzelnen Vertreter der Fraktion der Mono- und Oligozucker.

1) Saccharose

Saccharose ist der Hauptzucker in allen Rohkaffeeproben, wobei die Gehalte in den verschiedenen Rohkaffeeproben in der Regel großen Schwankungen unterworfen sind (43). Die Ursachen hierfür sind bisher nicht bekannt. Guyot *et al.* (1996) weisen auf den Zusammenhang zwischen Anbaubedingungen und Saccharosegehalt hin (46). So wurde festgestellt, dass bei *Coffea arabica* var. *Catua* und var. *Bourbon* die Wuchsbedingungen, d.h. eine Beschattung der Kaffeebäume einerseits und eine erhöhte Anbaulage andererseits, für eine langsamere Fruchtentwicklung und offenbar in der Konsequenz für erhöhte Saccharosegehalte verantwortlich seien. Des Weiteren zeigten Mazzafera *et al.* (1999), dass beim Saccharosegehalt von Rohkaffees einerseits Frucht- und Samenreife und andererseits Pathogenbefall wichtige Einflussgrößen sind (42). Diese Erkenntnisse unterstreichen die dringende Notwendigkeit von kontrollierten Aufbereitungsversuchen mit vorsortiertem Ausgangsmaterial, wie sie für das vorliegende Forschungsprojekt durchgeführt worden sind, da bei der bloßen Verwendung kommerzieller Rohkaffeeproben die oben genannten Einflüsse nicht ohne Weiteres ausgeschlossen werden können.

Als weitere Einflussgröße wird in der Literatur die Methode der Aufbereitung genannt: Wootton (1973) beobachtete, dass während der Fermentation von Arabicakaffee in Kenia signifikante Trockengewichtsverluste auftraten, wobei er den Großteil den löslichen Zuckern zuschrieb (47). Allerdings erscheinen aus heutiger Sicht die methodischen Ansätze nicht ausreichend, um diese Aussagen aufrechtzuerhalten. Aufbereitungsspezifische Unterschiede im Gehalt der löslichen Kohlenhydrate wurden allerdings auch für Robusta-Rohkaffees gemeldet (41).

Die bereits in der Literatur mehrfach beschriebenen starken Abweichungen zwischen den einzelnen Saccharosegehalten, konnten auch bei den im vorliegenden Projekt untersuchten Proben festgestellt werden. Abbildung 9 zeigt die Saccharosegehalte in kommerziellen Rohkaffees aus verschiedenen Provenienzen. Die Saccharosegehalte schwanken demzufolge nicht nur zwischen den verschiedenen Provenienzen, sondern auch innerhalb einer Provenienz (Brasil 1-3; Colombia 1-3). Die Gehalte scheinen dabei unabhängig von der Art der eingesetzten Nacherntebehandlung zu sein (trockene Aufbereitung: Ethiopia, Brasil 1+2; nasse Aufbereitung: alle übrigen).

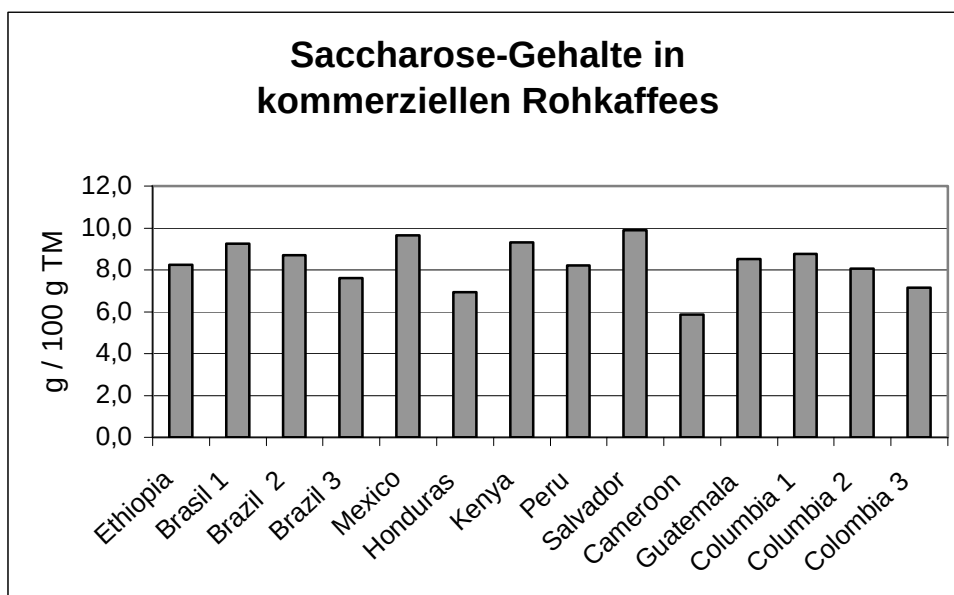


Abbildung 9: Saccharosegehalte in kommerziellen Rohkaffees.

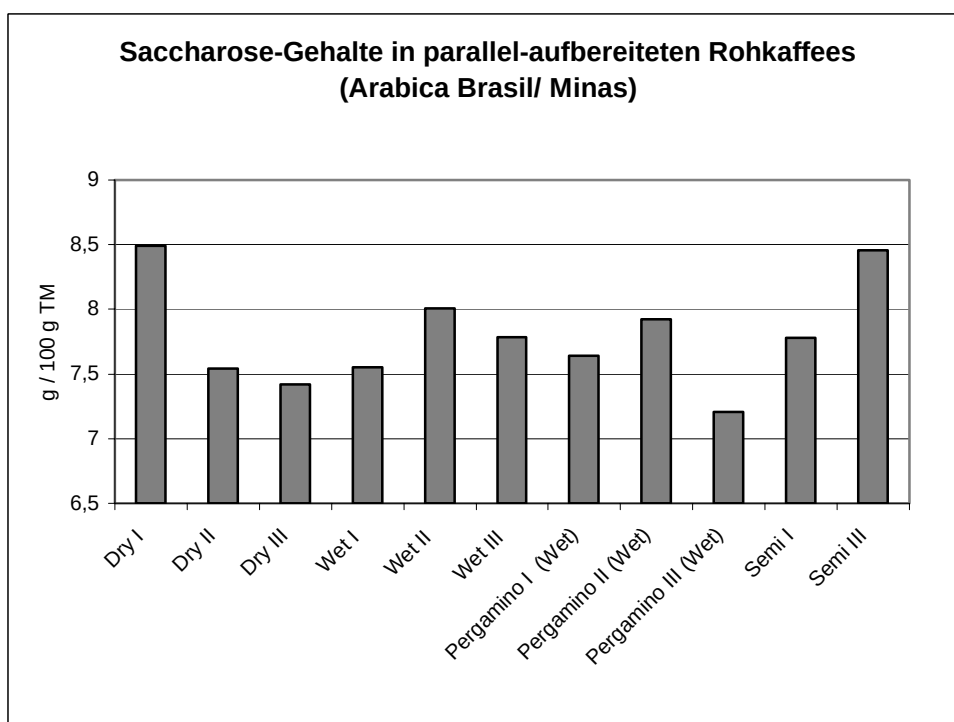
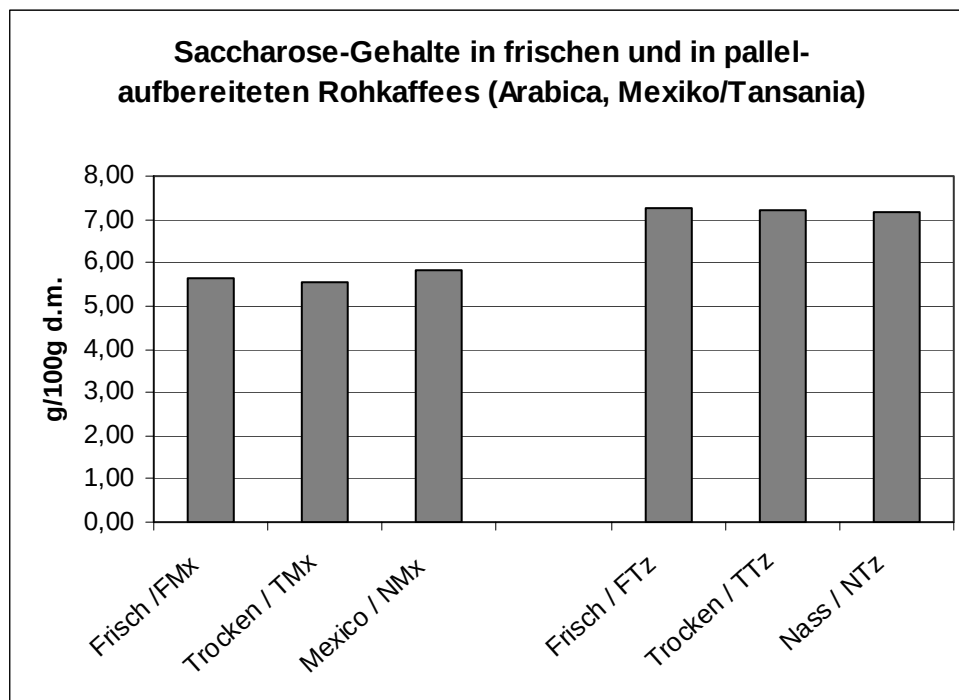


Abbildung 10: Saccharose-Gehalte in parallel Muster-aufbereiteten Brasil-Kaffees.**Abbildung 11: Saccharose-Gehalte in frischen bzw. in parallel im Labor Modell-aufbereiteten Kaffees (Mexiko, Tansania).**

Auch die kontrollierte Parallelaufbereitung von Kaffees in Brasilien konnte keinen Beleg für einen Einfluss der Nacherntebehandlung auf den Saccharosegehalt erbringen. Wie Abbildung 10 zeigt, unterscheiden sich die Saccharosegehalte zwar beträchtlich, doch ist weder durch Gruppierung der Aufbereitungsmethoden (Dry / Wet / Semi-washed) noch durch einen Vergleich der Aufbereitungsversuche (I-III) ein einheitliches Muster erkennbar. So entfällt beispielsweise auf die Gruppe der trocken aufbereiteten Kaffees sowohl die Probe mit dem höchsten (Dry I) als auch die mit dem zweitniedrigsten Saccharosegehalt (Dry III).

Die Saccharose-Daten aus den Modellaufbereitungen im Labor (Abbildung 11) erscheinen wesentlich gleichförmiger als diejenigen aus den Muster-Aufbereitungen (Abbildung 10). Diese Unterschiede zwischen den Muster-aufbereiteten Proben einerseits und den Modell-aufbereiteten Proben andererseits haben möglicherweise ihren Ursprung in der etwa vierwöchigen Phase des Transports der Brasil-Rohkaffeeproben nach Deutschland, denn im Gegensatz zu jenen konnten die im Labor aufbereiteten Proben (Mexiko, Tansania) unmittelbar nach der Behandlung schock-gefroren und analysiert werden.

Der hier (Abbildung 11) durchgeführte direkte Vergleich nicht nur von unterschiedlich aufbereiteten Rohkaffees sondern auch mit der unbehandelten Kontrollprobe (frisch) zeigt nochmals sehr deutlich, dass die Saccharosegehalte in den Kaffeebohnen nicht durch die Aufbereitung berührt werden.

Folglich wird mit den vorliegenden Daten die Interpretation von Bucheli *et al.* (1998) (6) unterstützt, der keinen spezifischen Einfluss der Aufbereitungsmethode auf den Gehalt an Saccharose feststellen konnte. Hingegen widersprechen die Ergebnisse klar der im Gegensatz hierzu stehenden Sichtweise von Guyot *et al.* (1995) (41).

2) Raffinose und Stachyose

In sämtlichen untersuchten Proben konnten sowohl Raffinose als auch Stachyose nachgewiesen werden. Ihr absoluter Gehalt wurde allerdings nur in den selbst aufbereiteten Proben und nicht in den kommerziellen Proben bestimmt (siehe Abbildung 12 und Abbildung 13).

Beide Oligosaccharide treten in ihrer mengenmäßigen Bedeutung weit hinter Saccharose zurück. Die sehr geringen Konzentrationen sind wahrscheinlich ein wichtiger Grund dafür, dass sie nicht von allen Autoren in Rohkaffees festgestellt werden konnten.

In den Brasil-Kaffees wurden mit der Ausnahme von Pergamino III, bei dem die Raffinosekonzentration von der Stachyosekonzentration übertroffen wird – allerdings auf vergleichsweise geringem Niveau –, fast überall höhere Raffinose- und im Vergleich dazu niedrigere Stachyosewerte festgestellt (Abbildung 12). Dagegen fanden sich in den Modell-aufbereiteten Proben stets nahezu gleiche Level an Stachyose und Raffinose (Abbildung 13), wobei für Stachyose in etwa ähnliche Konzentrationen detektiert wurden, wie in den Brasil-Proben, die Werte für Raffinose hingegen bedeutend niedriger waren. Weder bei den brasilianischen Proben noch bei den im Labor Modell-aufbereiteten Kaffees lässt sich ein Einfluss der Aufbereitung auf die Konzentration der beiden Oligozucker in Rohkaffees ableiten. Bemerkenswert hingegen ist die Diskrepanz in den Stachyosewerten zwischen Muster- und Modell-aufbereiteten Proben. Wie bereits im Abschnitt über den Saccharosegehalt ausgeführt, unterscheiden sich die Probengruppe im Wesentlichen durch die vierwöchige Transportphase bei den Brasil-Proben gegenüber der sofortigen Verarbeitung bei den Mexiko- bzw. Tansania-Proben.

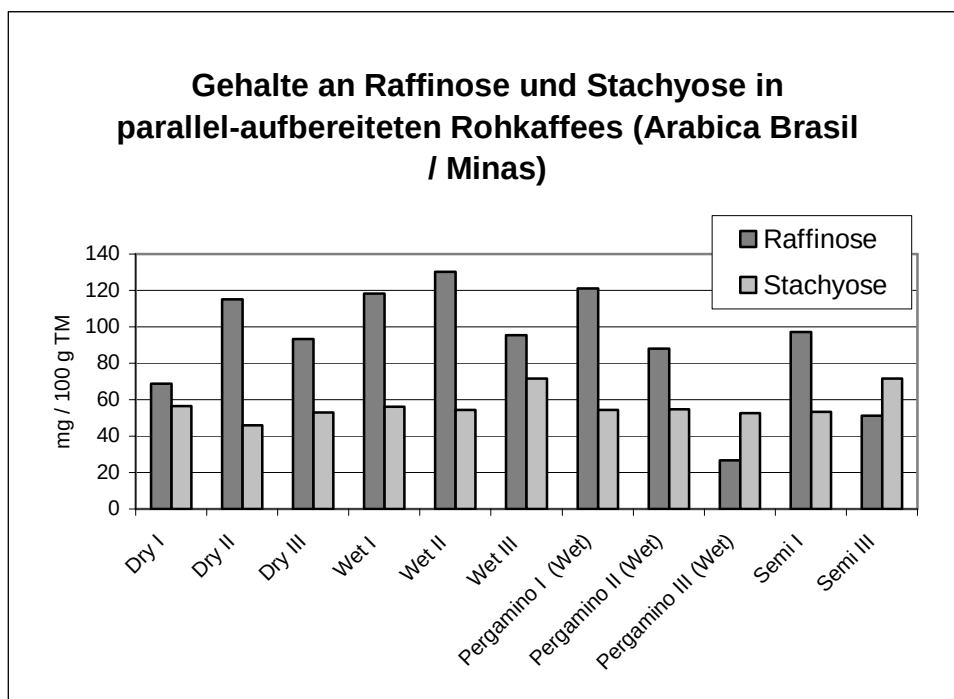


Abbildung 12: Gehalte an Raffinose und Stachyose in parallel Muster-aufbereiteten Rohkaffees aus Brasilien.

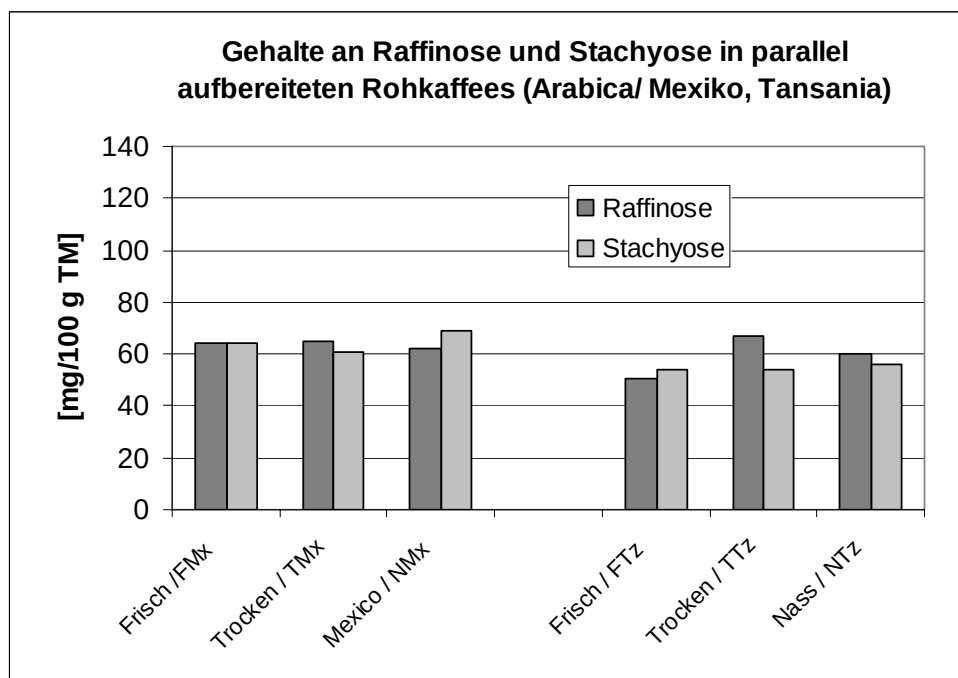


Abbildung 13: Gehalte an Raffinose und Stachyose in parallel im Labor Modell-aufbereiteten Rohkaffees aus Mexiko und Tansania.

Die beiden Oligozucker Stachyose und Raffinose unterscheiden sich um einen Galaktosylrest. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass – etwa durch Aktivität einer α -Galaktosidase und entsprechend durch Abspaltung des Galaktosylrestes gewisse Anteile an Stachyose in Raffinose, und sogar in einem weiteren Schritt Raffinose in Saccharose umgewandelt werden. Ein entsprechender Abbau von Raffinose und Stachyose durch α -Galaktosidasen wurde während der Keimung und Sämlingsentwicklung von Kaffeesamen beobachtet (48). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass im Falle der Brasil-Proben während der Transportphase gewisse Anteile an Stachyose zu Raffinose abgebaut worden sind. Zumindest würde dies die Diskrepanzen in den Gehalten dieser Zucker erklären. Das Vorkommen von α -Galaktosidasen an sich in Kaffeesamen ist seit langem bekannt und Gegenstand verschiedener Forschungsansätze (z.B. (49-53)). Ein interessanter Hinweis auf die nicht unbeträchtliche Aktivität des Enzyms ist, dass α -Galaktosidase aus Rohkaffee bei der Fa. Sigma-Aldrich kommerziell zu erwerben ist (G 8507). Die Affinität von α -Galaktosidasen gegenüber den Substraten Stachyose bzw. Raffinose kann sehr unterschiedlich sein (54). Folglich muss ein Abbau von Stachyose nicht notwendigerweise mit einem Abbau von Raffinose zu Saccharose einhergehen. Über die näheren Substratpräferenzen der α -Galaktosidase aus *Coffea* ist nichts bekannt.

3) Glukose und Fruktose

Die Gehalte an Monosacchariden in Arabica- und Robusta-Rohkaffees sind vergleichsweise gering (43). Während Maier *et al.* (1982) Glukose als das mengenmäßig überwiegende Monosaccharid identifizierte (55), wurde bei anderen Untersuchungen in der Regel mehr Fruktose als Glukose gefunden (39, 44). Eigene Untersuchungen an Rohkaffees aus unterschiedlichen Provenienzen (vergleiche Abbildung 14) zeigten, dass die Gehalte an Fruktose und Glukose in den verschiedenen Rohkaffees wesentlich stärker voneinander abweichen, als dies bei den übrigen Zuckern beobachtet werden konnte. Es konnte dabei keine Korrelation zum Saccharosegehalt (vergleiche Abbildung 9) festgestellt werden. In allen Fällen wurde Fruktose in höheren Konzentrationen gefunden als Glukose (Abbildung 14). Die Abweichungen in den Gehalten zwischen den einzelnen kommerziellen Rohkaffeeproben fielen im Fall von Fruktose weitaus extremer aus als bei Glukose. Anders als bei den übrigen Zuckern lässt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Fruktosegehalt und der Aufbereitungsmethode feststellen. Mit der Ausnahme von Columbia III enthalten alle nass aufbereiteten Rohkaffees (Brasil III, Mexico, Honduras, Kenya, Peru, Salvador, Cameroon, Guatemala, Colombia 1+2) geringere Fruktosekonzentrationen als die trocken aufbereiteten Rohkaffees (Ethiopia, Brasil 1+2). Bei Glukose ist für die kommerziellen Rohkaffeeproben keine vergleichbare Korrelation zwischen dem Gehalt und der Aufbereitungsmethode herstellbar (Abbildung 14).

Auch Guyot *et al.* (1995) berichten von einer Korrelation zwischen der Aufbereitungsmethode und dem Fruktosegehalt (41), wobei allerdings Robustakaffees untersucht worden waren. Anders als bei den hier vorliegenden Daten für Arabica wurden

erhöhte Fruktosegehalte von den Autoren mit nasser statt mit trockener Aufbereitung der Robustakaffees korreliert. Die von den Autoren genannten Unterschiede im Fruktosegehalt waren allerdings wesentlich geringer: 260-270 mg / 100 g bei nass aufbereitetem Robusta gegenüber 150-190 mg/ 100 g bei trocken aufbereitetem.

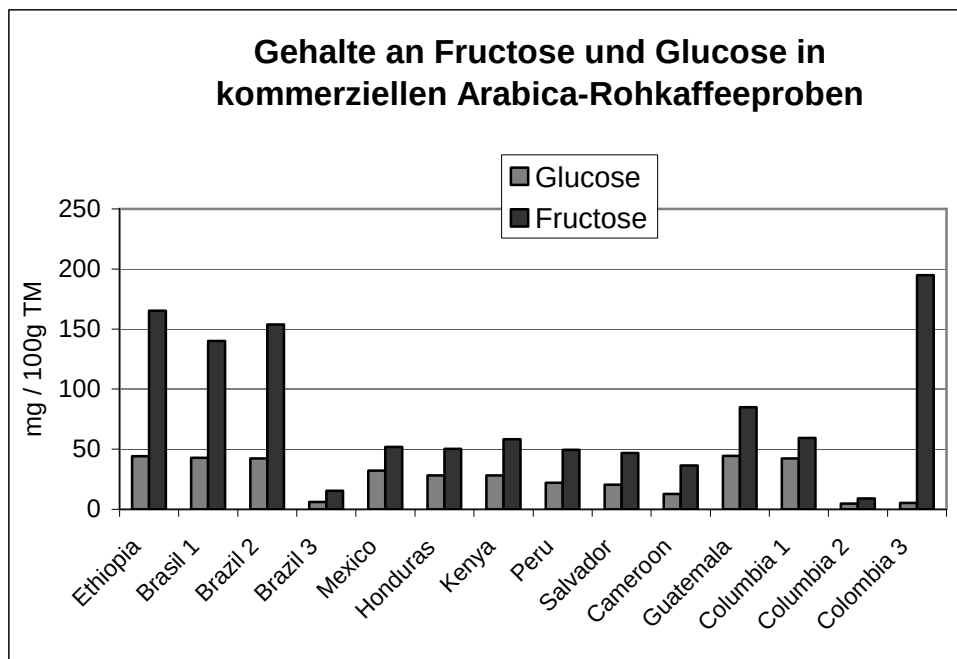


Abbildung 14: Gehalte an Fruktose und Glukose in kommerziellen Arabica-Rohkaffeeproben.

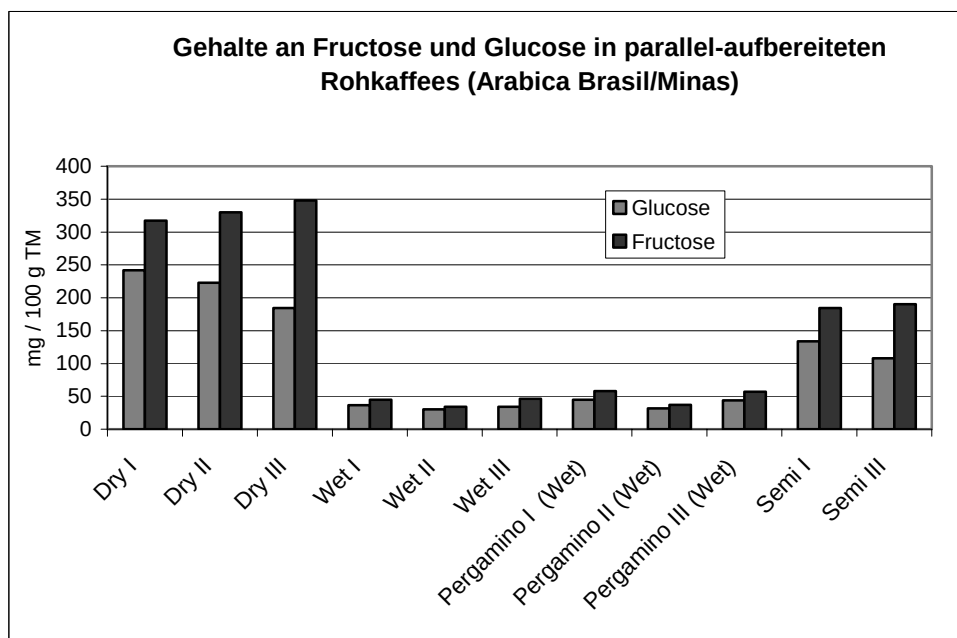


Abbildung 15: Gehalte an Fruktose und Glukose in parallel Muster-aufbereiteten Brasil-Kaffees.

Die Daten zu den Rohkaffeeproben aus den experimentellen Muster-Aufbereitungen (siehe Abbildung 15) bestätigen allerdings die von uns beobachtete Korrelation und stehen

gleichzeitig im Gegensatz zu den für Robusta gezogenen Schlussfolgerungen von Guyot *et al.* (1995): In allen nass aufbereiteten Proben (Wet I-III, Pergamino I-III) sind die Fruktosegehalte bedeutend geringer als in den trocken aufbereiteten Vergleichsproben. Die beiden Proben, die mit der quasi intermediären Aufbereitungsmethode „Semi-washed“ behandelt wurden, weisen interessanterweise auch intermediäre Fruktosegehalte auf. Anders als bei den kommerziellen Rohkaffeeproben lassen sich auch die Glukosewerte in entsprechender Weise mit der Art der Aufbereitung in Zusammenhang bringen. Ohne einen Vergleich mit der frischen Ausgangsprobe lässt sich zunächst jedoch nicht sagen, ob die Konzentrationsdifferenzen Folge eines Konzentrationsrückgangs in nass aufbereiteten Kaffees oder aber eines Konzentrationsanstiegs in trocken aufbereiteten Kaffeesamen ist – es könnten sogar beide Möglichkeiten zutreffen.

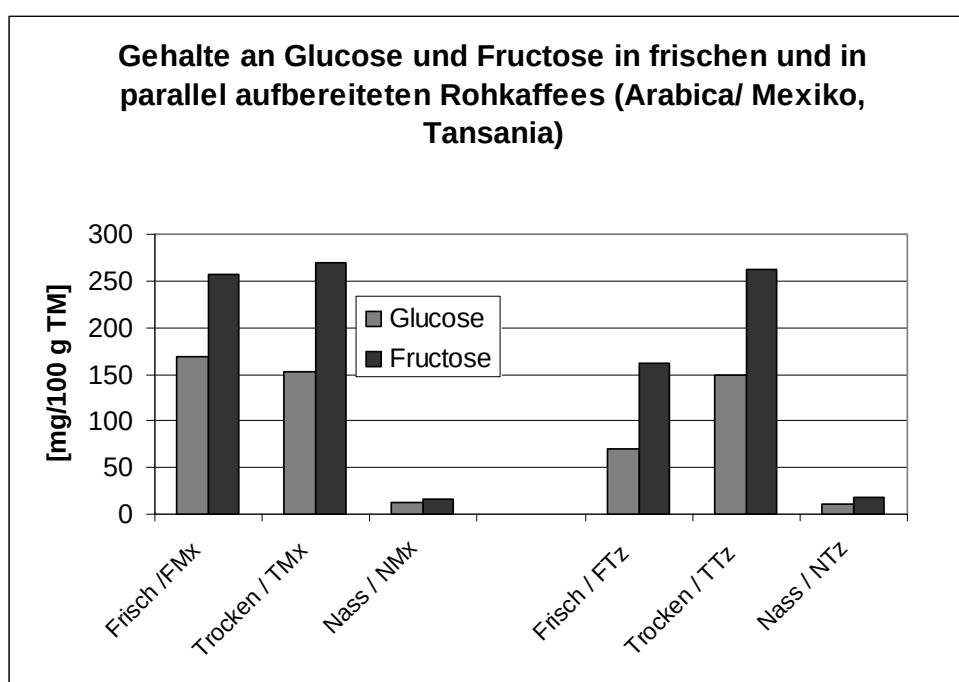


Abbildung 16: Gehalte an Glukose und Fruktose in frischen und in parallel im Labor Modell-aufbereiteten Rohkaffees (Mexiko und Tansania).

Die Korrelation zwischen einer nassen Aufbereitung und einem niedrigen Gehalt an Fruktose und an Glukose wurde auf Grundlage der Ergebnisse aus den Modellaufbereitungen im Labor klar bestätigt (Abbildung 16). Darüber hinaus wird durch den Vergleich mit der frischen Vergleichsprobe deutlich, dass die niedrigen Gehalte an Glukose und Fruktose in nass aufbereiteten Rohkaffees Folge einer Konzentrationsabnahme waren, wohingegen die Gehalte an beiden Zuckern durch die trockene Aufbereitung im Falle des Mexiko-Kaffees nicht berührt wurden. Andererseits kann auf Grundlage der Daten des Tansania-Kaffees auch eine parallele Konzentrationszunahme nicht ausgeschlossen werden.

Während in einer früheren Arbeit gemutmaßt wurde, dass bestimmte Mengen an niedermolekularen Substanzen, darunter auch Zucker, im Verlauf der Kaffeefermentation aus den Kaffeesamen ausgewaschen werden könnten (47), wird dies heute als eher unwahrscheinlich angesehen, da sich bei Extraktionsversuchen an ganzen Samen, abgesehen von Bestandteilen der Cuticula, kaum Substanzen aus dem Innern der Bohne im Extrakt fanden (56). Die in der gleichen Arbeit (47) geäußerte Vermutung, dass Stoffwechselprozesse eine wichtige Rolle bei der Aufbereitung spielen könnten, konnte durch unsere jüngsten Arbeiten eindeutig belegt werden (8, 57-61). Während Wootton (1973) insbesondere Respirationsvorgänge zur Diskussion stellte (47), scheinen bei genauerer Betrachtung der Umstände einer Nassaufbereitung anaerobe Prozesse im Kaffee-Endosperm und –Embryo wahrscheinlicher zu sein. Wie seit langem bekannt ist (62, 63) und wie eigene Messungen in Mexiko bestätigten (AIF-FV Nr. 13588) sinkt der Sauerstoffpartialdruck im Gemenge des Fermentationstanks innerhalb weniger Stunden auf nahezu Null ab. Unter solchen anaeroben Bedingungen sind pflanzliche Gewebe in der Lage, sowohl die alkoholische Gärung als auch die Milchsäuregärung durchzuführen (64-66). Der bei der Gärung im Vergleich zur Atmung erhöhte Bedarf an Glukose/Fruktose könnte die deutlichen Diskrepanzen im Glukose-/Fruktose-Gehalt parallel nass bzw. trocken aufbereiteter Kaffeesamen erklären; denn auch die der trockenen Aufbereitung unterworfenen Kaffees treiben weiter Stoffwechsel – allerdings unter aeroben Bedingungen – und folglich sollte hier vorwiegend die energetisch effizientere Atmung (und nicht Gärung) eine Rolle spielen.

4) Minorzucker

Wie eingangs bereits erwähnt, sind unter den Minorzuckern, die von verschiedenen Autoren in Rohkaffees gefunden wurden, Galaktose, Arabinose, Rhamnose, Mannose, Xylose und Ribose zu nennen. Im vorliegenden Projekt konnte Xylose nicht und Ribose nur in wenigen Proben nachgewiesen werden. Die in Abbildung 17 und Abbildung 18 gezeigten Daten beschränken sich folglich auf die Monozucker Rhamnose, Arabinose, Galaktose und Mannose. Bradbury (2001) vermutete, dass kaffee-eigene Hydrolasen während der Aufbereitung das primäre Speicherpolysaccharid des Kaffee-Endosperms, ein Mannan mit einer vergleichsweise geringen Anzahl von Galaktosyl-Seitenketten (67-70) angreifen könnten (43). Die vom gleichen Autor in der Konsequenz vermisste freie Galaktose in Rohkaffees konnte sowohl im Rahmen des vorliegenden Forschungsvorhabens (s.u.) als auch in anderen Untersuchungen von anderen Autoren nachgewiesen werden (7, 44). Die Tatsache, dass freie Mannose stets eher in geringen Mengen festgestellt wurde, sollte nicht verwundern, da der Monozucker auch nach Freisetzung aus Speicherpolymeren in Pflanzengewebe umgehend umgewandelt wird; denn erhöhte Mengen an freier Mannose sind für die Zellen toxisch (71, 72). Wie die übrigen Zucker auch steht Mannose daher im Fluss mit den anderen Hexosen, insbesondere mit Glukose und Fruktose.

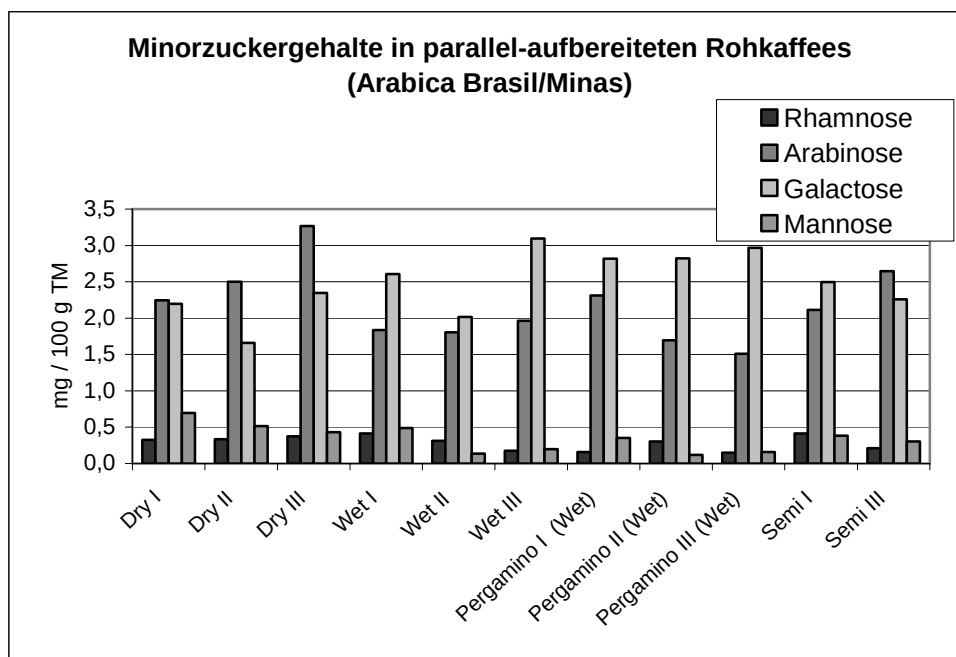


Abbildung 17: Minorzucker in parallel Muster-aufbereiteten Rohkaffees aus Brasilien.

In den Muster-aufbereiteten Proben aus Brasilien sind bei den Minorzuckern zwischen den Werten der einzelnen Proben mitunter sehr große Abweichungen festzustellen (Abbildung 17). So war in der Gruppe der Minorzucker bei einigen Proben Arabinose am stärksten vertreten, gefolgt von Galaktose. Bei anderen Proben war es umgekehrt, d.h. Arabinose wurde mengenmäßig von Galaktose übertroffen. Lediglich in sehr geringen Mengen waren Mannose und Rhamnose zu finden. Im direkten Vergleich der Parallelansätze (Dry I-III und Wet I-III) lassen sich keine Zusammenhänge zwischen dem Gehalt eines Minorzuckers und der Art der Aufbereitung feststellen.

In den im Labor Modell-aufbereiteten Proben liegen die Ergebnisse für Minorzuckern in den Rohkaffees auf einem ähnlichen Konzentrationslevel und sind ähnlich variabel (Abbildung 18). Allerdings wird sofort deutlich, dass die Gehalte an freier Galaktose und an freier Arabinose in den frischen, unbehandelten Kontrollproben stets wesentlich höher waren als in den Proben, die einer nassen oder trockenen Aufbereitung unterzogen worden sind. Anders als von Bradbury (2001) vermutet (43), führt der Aufbereitungsprozess also anscheinend nicht zu einer zusätzlichen Mobilisierung freier Minorzucker, sondern zu einer Reduzierung derselben. Verantwortlich hierfür sind vermutlich Stoffwechselreaktionen im Kaffeesamen, die in ihrer Einzelheit jedoch nicht bekannt sind.

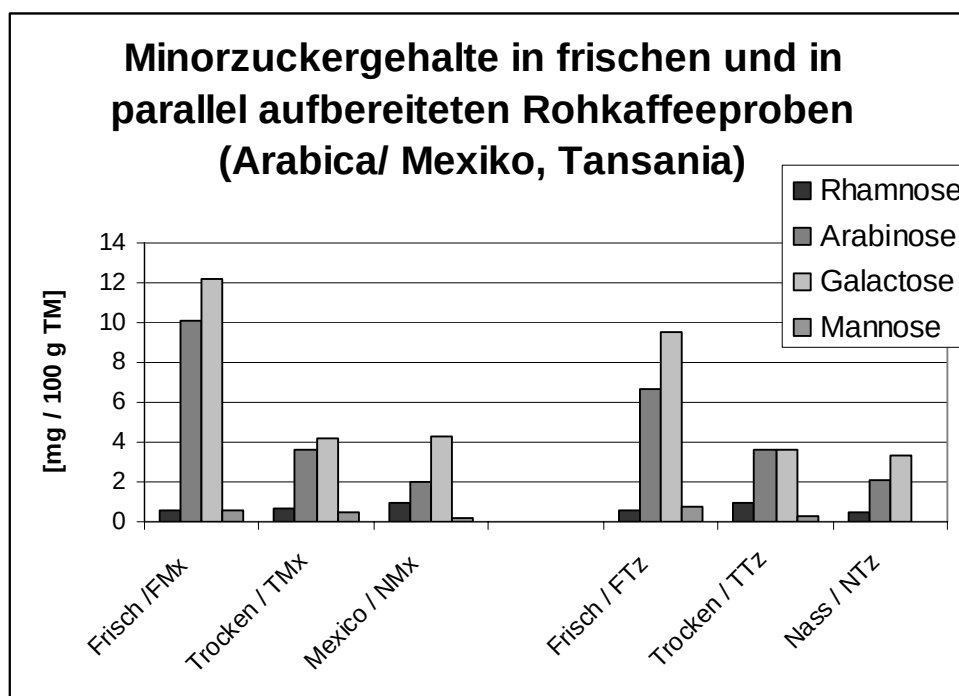


Abbildung 18: Minorzucker in parallel im Labor Modell-aufbereiteten Rohkaffees aus Mexiko und Tansania.

Niedermolekulare Kohlenhydrate in Rohkaffee: Einfluss der Lagerung

Es ist seit längerem bekannt, dass sich die Konzentration an lösliche Kohlenhydraten in gelagerten Pflanzensamen verändern (73, 74). Bucheli *et al.* (1998) wiesen nach, dass auch die löslichen Kohlenhydrate in Rohkaffees während der Lagerung beträchtlichen Veränderungen unterworfen sein können (6). Während Bucheli *et al.* (1998) vor allem Stoffwechselreaktionen für diese Veränderungen im gelagerten Rohkaffee verantwortlich machten, nannten Pokorny *et al.* (1975) darüber hinaus nicht-enzymatische Bräunungsreaktionen, durch welche postmortal die löslichen Kohlenhydrate (und auch die freien Aminosäuren) verändert werden könnten (13).

Dieser Problematik wurde im vorliegenden Forschungsprojekt nachgegangen, wobei als zusätzlicher Aspekt die Art der Aufbereitung sowie – im Falle der Nassaufbereitung – die Lagerung in der Hornschale bzw. im geschälten Zustand mit einbezogen wurde. Dabei sollen die einzelnen Zucker nacheinander behandelt werden, wobei die verschiedenen Aufbereitungsarten (trocken, semi-washed, nass) sowie die bei nasser Aufbereitung

möglichen Lagerungsformen (nass/geschält, nass/Pergamino) jeweils zusätzlich betrachtet werden.

1) Saccharose

Die Abbildungen 19-22 zeigen die Veränderungen der Saccharosegehalte in Rohkaffees unter dem Einfluss der Lagerung. Die Gehalte einer Charge sind jeweils gewissen Schwankungen unterworfen, die wir jedoch nicht für signifikant halten. Davon abgesehen erscheint das Verhalten der Saccharose in den verschiedenen Rohkaffees während der Lagerung recht gleichförmig, so dass weder die ursprünglich angewandte Aufbereitungsmethode (trocken, semi-washed, nass) noch die Lagerungsform (nass/geschält, nass/Pergamino) eine erkennbare Auswirkung auf den Saccharosegehalt zu haben scheinen. Die in einigen Graphiken leicht absinkende Tendenz im Saccharosegehalt (z.B. Abbildung 19) bestätigte sich nach vorläufigen Ergebnissen zur Situation in 24 Monate gelagerten Kaffees nicht (Daten nicht gezeigt). Auch sind keinerlei Korrelationen zwischen der Vitalität einer Probenpopulation und deren Gehalt an Saccharose herleitbar.

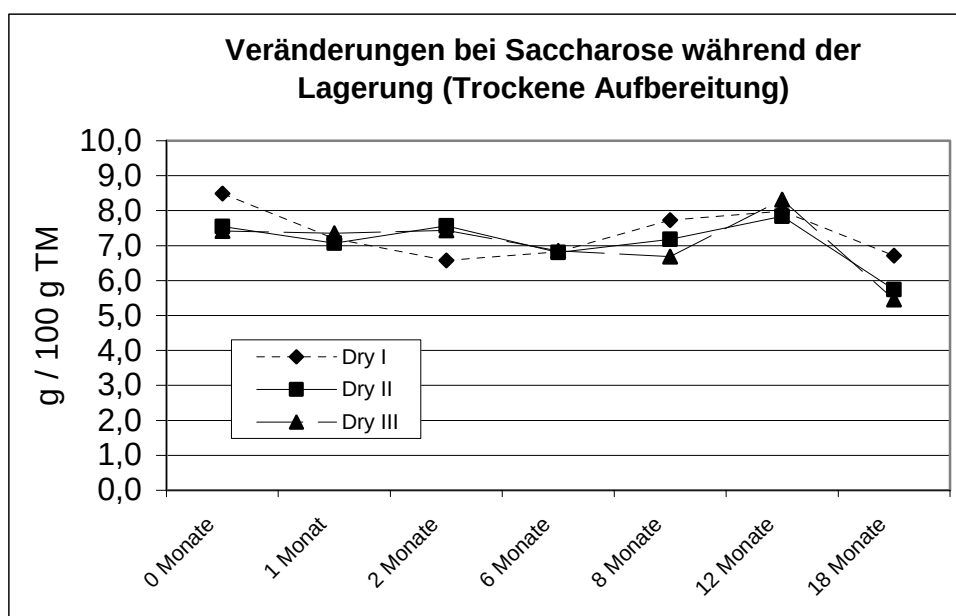


Abbildung 19: Veränderungen bei Saccharose während der Lagerung (Trockene Aufbereitung Brasilien).

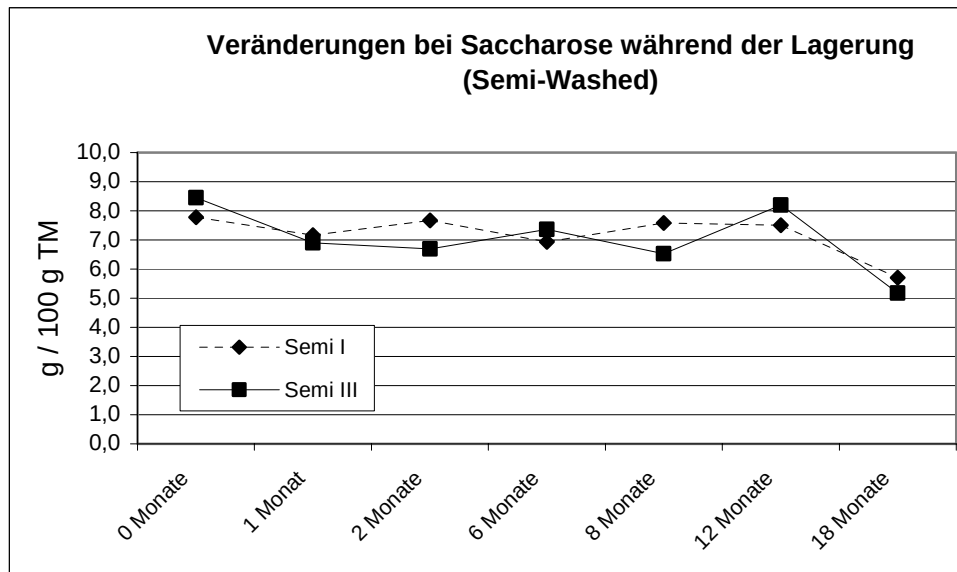


Abbildung 20: Veränderungen bei Saccharose während der Lagerung (Semi-Washed-Aufbereitung Brasilien).

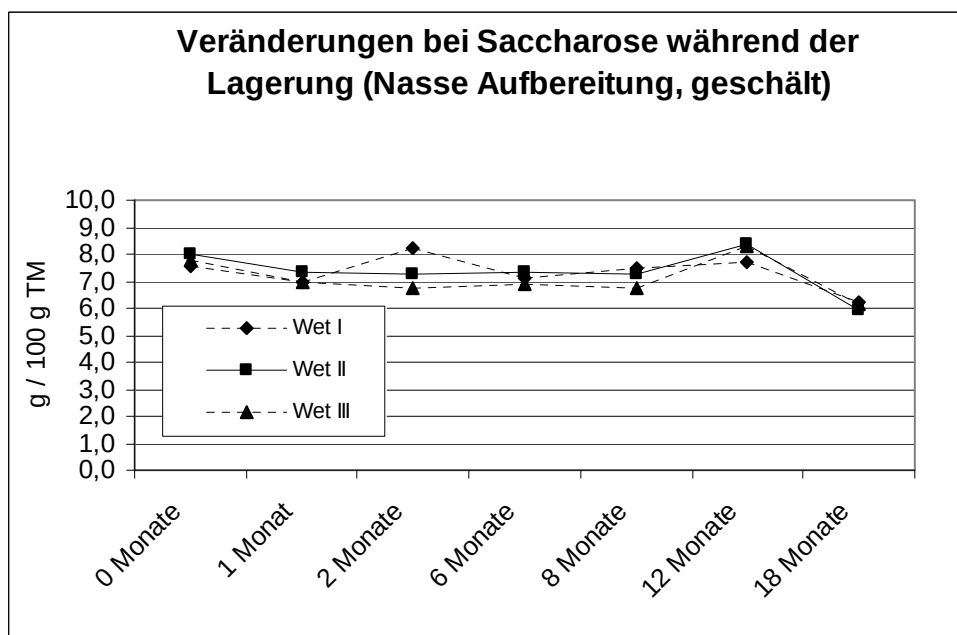


Abbildung 21: Veränderungen bei Saccharose während der Lagerung (Nasse Aufbereitung, Brasilien Lagerung im geschälten Zustand).

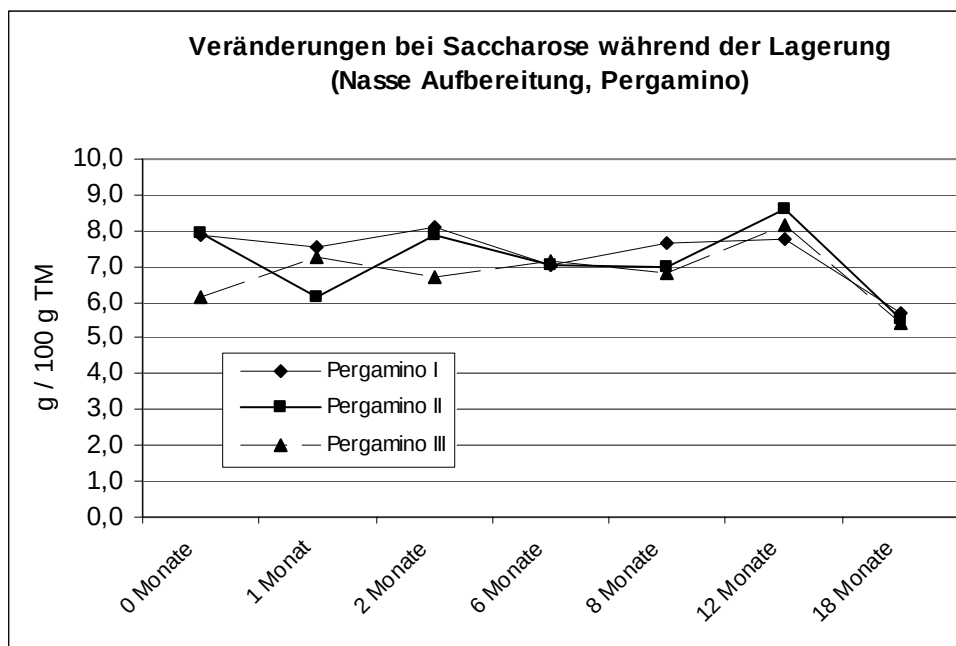


Abbildung 22: Veränderungen bei Saccharose während der Lagerung (Nasse Aufbereitung, Brasilien Lagerung im Pergamino).

2) Stachyose

Die Abbildungen 23-26 zeigen die Veränderungen der Stachyosegehalte in Rohkaffees unter dem Einfluss der Lagerung. Die Gehalte der einzelnen Chargen sind vergleichsweise geringen Schwankungen unterworfen. Als einzig herausragendes Ereignis ist ein Anstieg in der Stachyosekonzentration bei geschältem, gewaschenem Rohkaffee im Zeitraum 8-12 Monaten festgestellt worden; eine Erklärung hierzu ist bisher nicht möglich. Abgesehen davon erscheint das Verhalten der Stachyose in den verschiedenen Rohkaffees während der Lagerung recht gleichförmig, so dass weder die ursprünglich angewandte Aufbereitungsmethode (trocken, semi-washed, nass) noch die Lagerungsform (nass/geschält, nass/Pergamino) eine erkennbare Auswirkung auf den Stachyosegehalt zu haben scheinen. Eine Korrelation der Stachyosegehalte zu den Vitalitätsdaten der Rohkaffees ist gleichfalls nicht herstellbar.

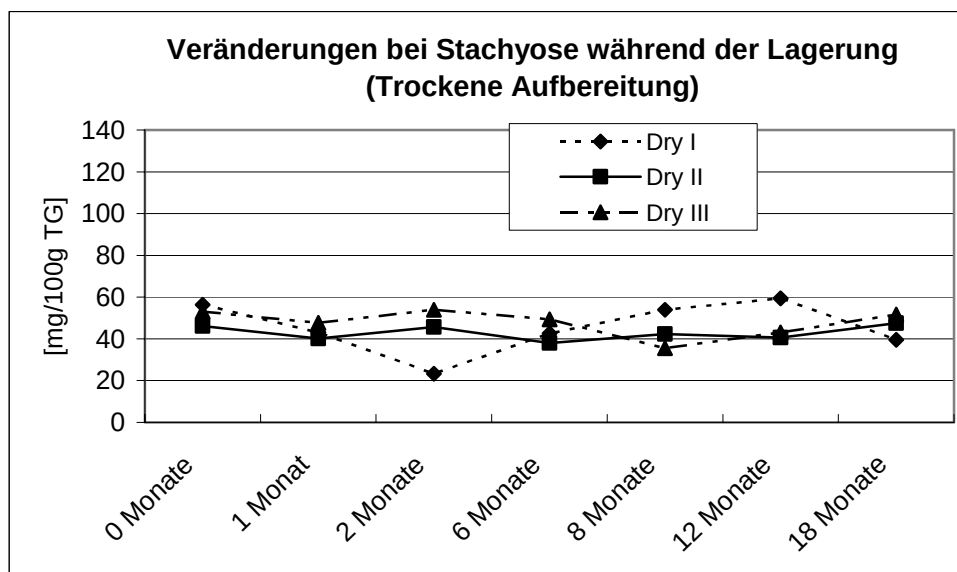


Abbildung 23: Veränderungen bei Stachyose während der Lagerung (Trockene Aufbereitung Brasilien).

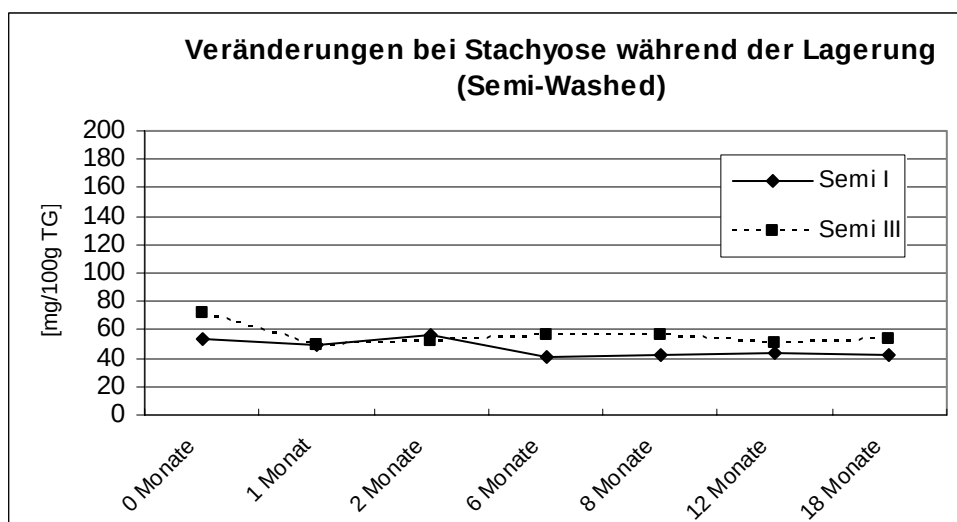


Abbildung 24: : Veränderungen bei Stachyose während der Lagerung (Semi-Washed-Aufbereitung Brasilien).

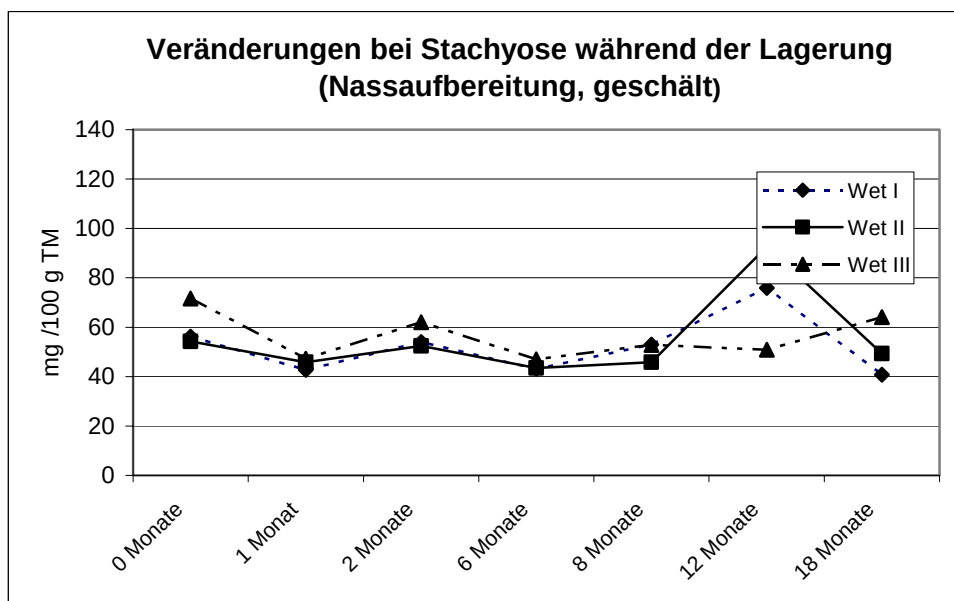


Abbildung 25: Veränderungen bei Stachyose während der Lagerung (Nasse Aufbereitung, Brasilien Lagerung im geschälten Zustand).

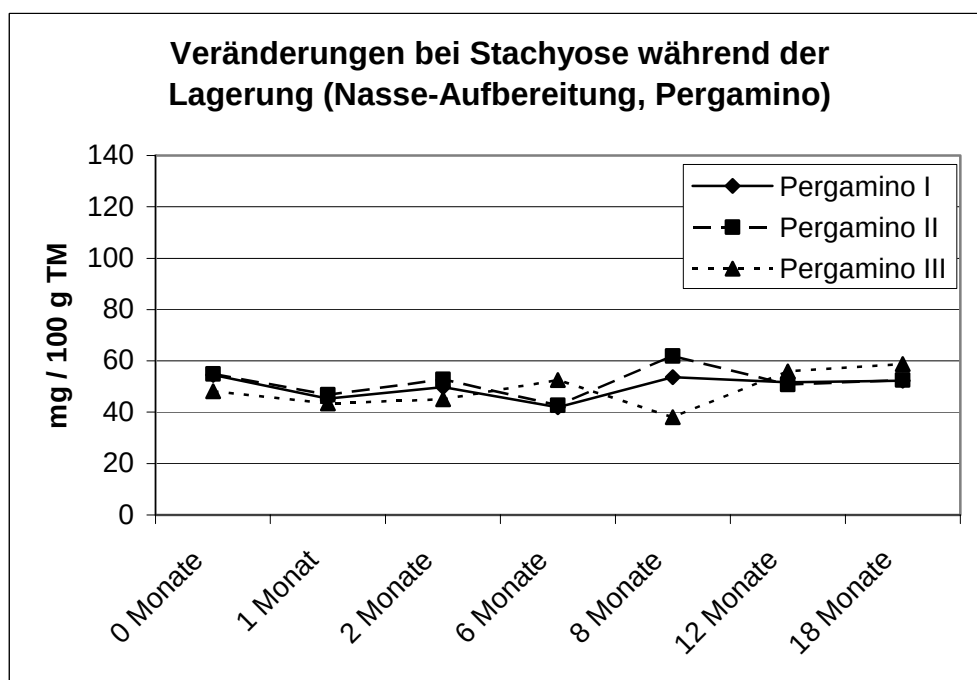


Abbildung 26: Veränderungen bei Stachyose während der Lagerung (Nasse Aufbereitung, Brasilien Lagerung im Pergamino).

3) Raffinose

Die Abbildungen 27-30 zeigen die Veränderungen der Raffinosegehalte in Rohkaffees unter dem Einfluss der Lagerung. Die Gehalte der einzelnen Chargen sind äußerst starken Schwankungen unterworfen, deren Ursachen nicht bekannt sind. Konzentrationszunahmen durch enzymatischen Abbau von Stachyose müssten sich in entsprechenden Konzentrationsabnahmen bei Stachyose widerspiegeln. Derartige Entwicklungen konnten jedoch nicht beobachtet werden (vergleiche Abbildungen 23-26). Darüber hinaus verhalten sich die Parallelproben in Bezug auf ihre Raffinosegehalte wiederholt gegensätzlich: während der Raffinosegehalt in der einen Charge innerhalb eines bestimmten Lagerungszeitraums anstieg, sank er in der Parallelprobe und umgekehrt. Auch bei Raffinose lassen sich folglich weder in Bezug auf die ursprünglich angewandte Aufbereitungsmethode (trocken, semi-washed, nass) noch auf die Lagerungsform (nass/geschält, nass/Pergamino) irgendwelche Auswirkungen auf den Raffinosegehalt ableiten. Eine Korrelation zu den Vitalitätsdaten ist gleichfalls nicht herstellbar.

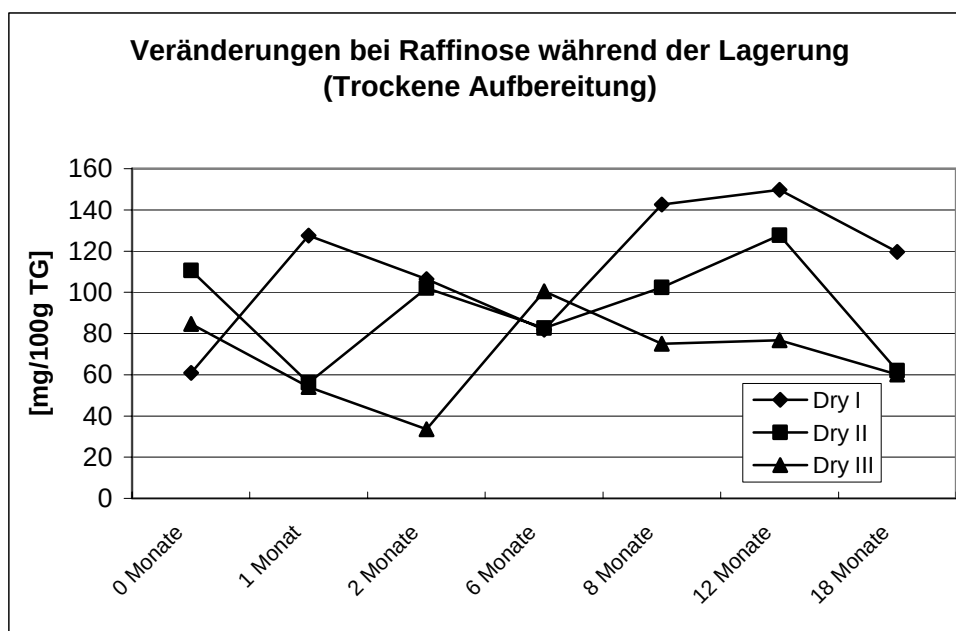


Abbildung 27: Veränderungen bei Raffinose während der Lagerung (Trockene Aufbereitung Brasilien).

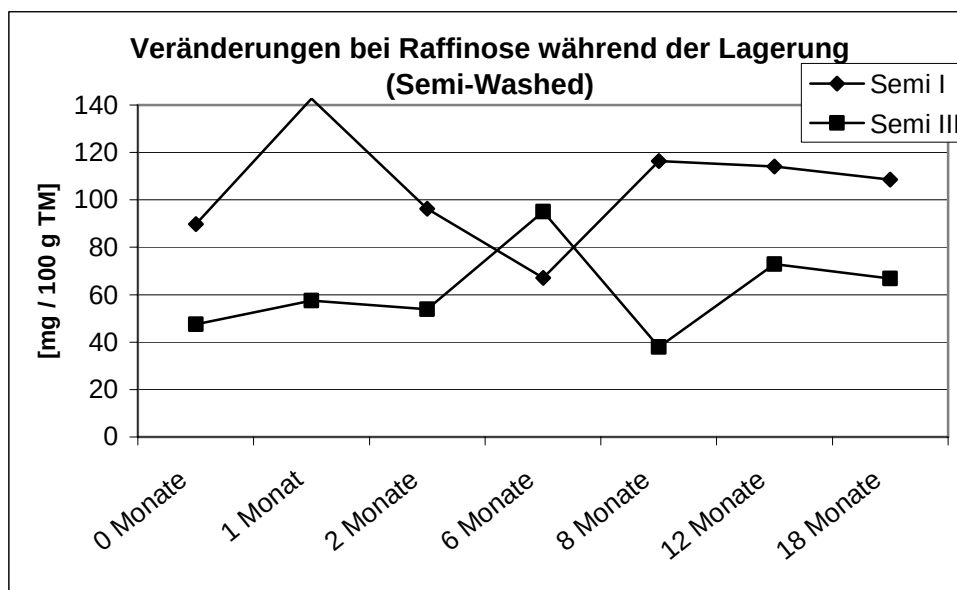


Abbildung 28: Veränderungen bei Raffinose während der Lagerung (Semi-Washed-Aufbereitung Brasilien).

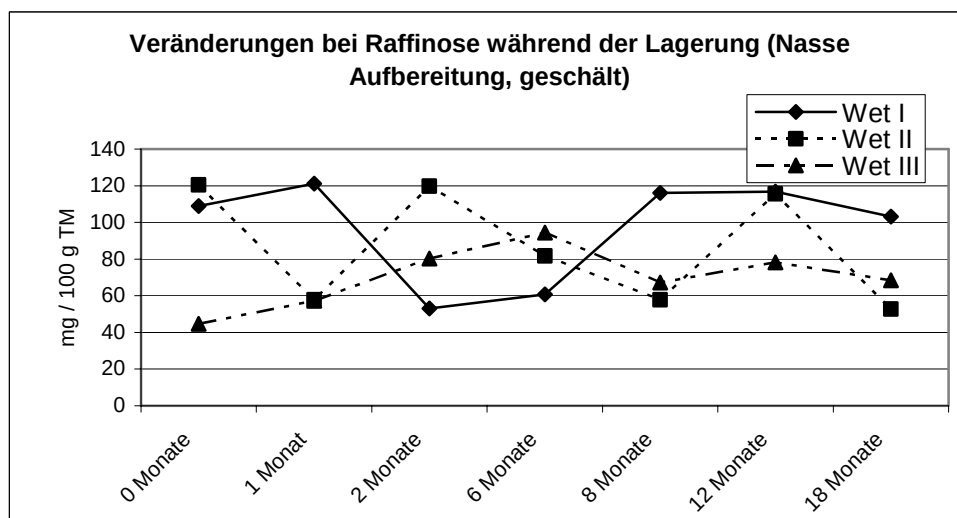


Abbildung 29: Veränderungen bei Raffinose während der Lagerung (Nasse Aufbereitung, Brasilien Lagerung im geschälten Zustand).

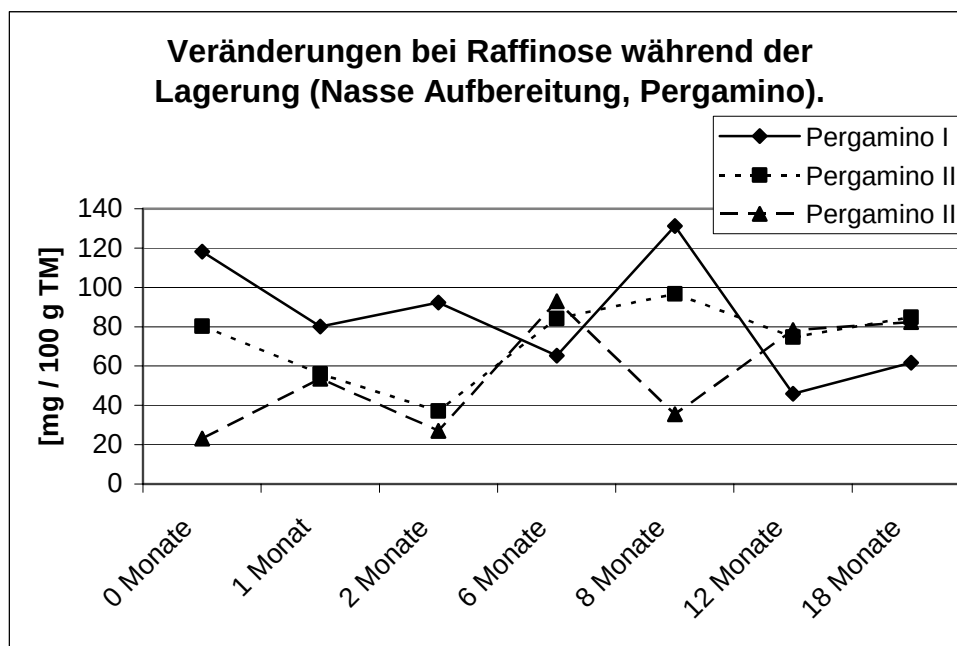


Abbildung 30: Veränderungen bei Raffinose während der Lagerung (Nasse Aufbereitung, Brasilien Lagerung im Pergamino).

4) Fruktose

Die Abbildungen 31-34 zeigen die Veränderungen der Fruktosegehalte in Rohkaffees unter dem Einfluss der Lagerung. Während die Gehalte der trocken bzw. *semi-dry* aufbereiteten Rohkaffees starken Schwankungen unterworfen sind, erscheinen die Werte bei den nass aufbereiteten Proben vergleichsweise gleichförmig. Grundsätzlich lässt sich feststellen, dass der Fruktosegehalt in den nass aufbereiteten Rohkaffees auf dem ursprünglichen, niedrigen Niveau verbleibt (Abbildung 33 und Abbildung 34), wie es bereits direkt nach der Aufbereitung festgestellt worden war (vergleiche Abbildung 15 und Abbildung 16); dagegen bewegen sich während der gesamten Lagerungszeit in allen trocken aufbereiteten Rohkaffees die Fruktosegehalte auf erhöhtem (Abbildung 31) und bei Semi-Washed-Kaffee auf intermediärem Niveau (Abbildung 32). Anders als bei den anderen Zuckern lassen sich demnach selbst noch bei gelagertem Rohkaffee anhand der Fruktosegehalte (und auch bei Glukose, siehe unten) noch Bezüge zu den ursprünglich angewandten Aufbereitungsmethoden (trocken, semi-washed, nass) herstellen. Es sind jedoch keine Korrelationen zur Lagerungsform (nass/geschält, nass/Pergamino) oder zu den Vitalitätsdaten (Abbildung 7) herzustellen.

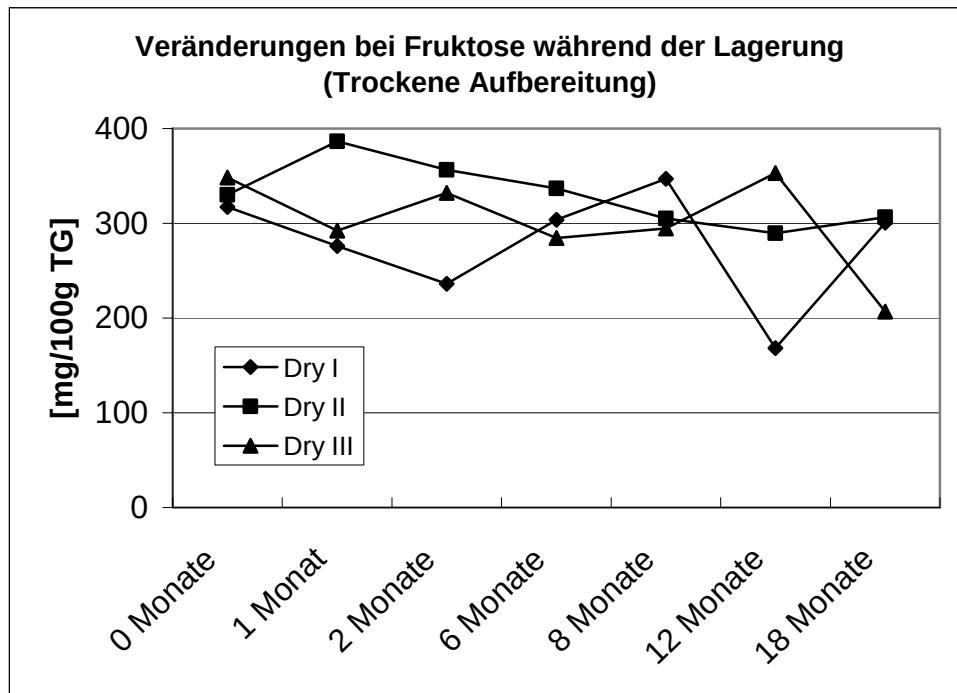


Abbildung 31: Veränderungen bei Fruktose während der Lagerung (Trockene Aufbereitung Brasilien).

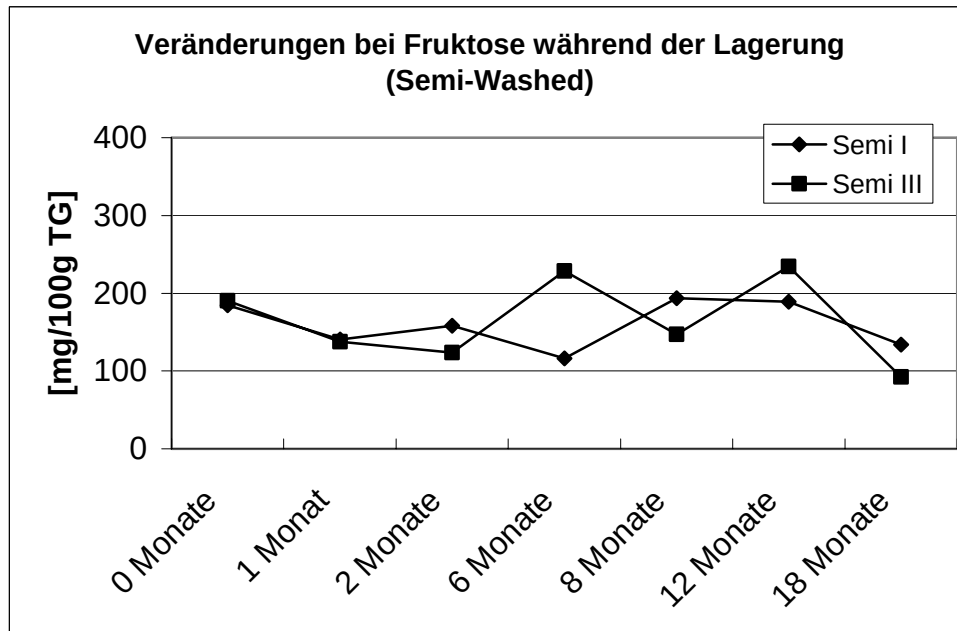


Abbildung 32: Veränderungen bei Fruktose während der Lagerung (Semi-Washed-Aufbereitung Brasilien).

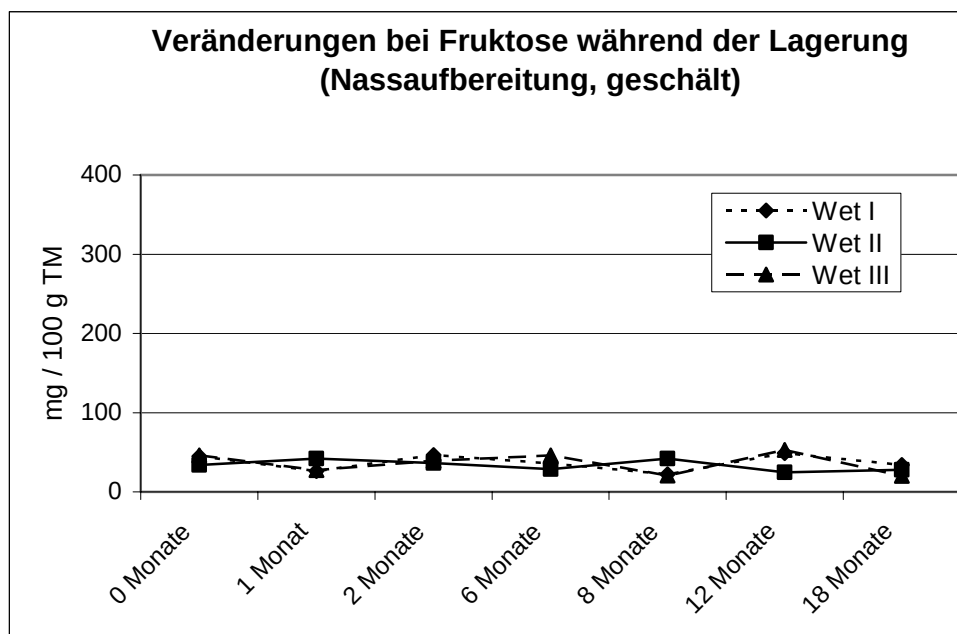


Abbildung 33: Veränderungen bei Fruktose während der Lagerung (Nasse Aufbereitung, Brasilien Lagerung im geschälten Zustand).

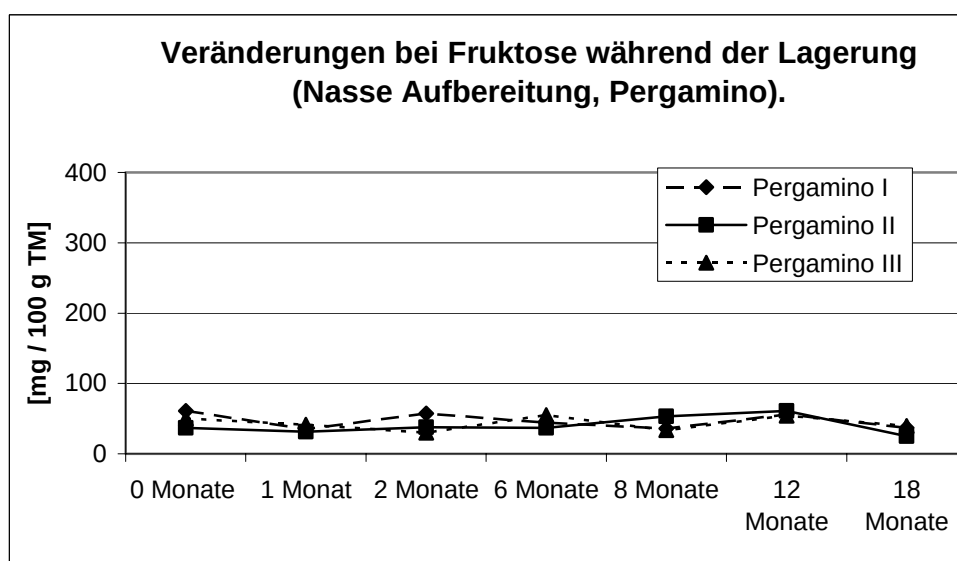


Abbildung 34: Veränderungen bei Fruktose während der Lagerung (Nasse Aufbereitung, Brasilien Lagerung im Pergamino).

5) Glukose

Die Abbildungen 35-38 zeigen die Veränderungen der Glukosegehalte in Rohkaffees unter dem Einfluss der Lagerung. Während wiederum die Gehalte der trocken aufbereiteten Rohkaffees gewissen Schwankungen unterworfen sind, erscheinen die Werte bei den nass aufbereiteten und hier auch bei den Semi-Washed-Proben relativ gleichförmig. Auch bei den Glukosewerten lässt sich feststellen, dass der Gehalt in den nass aufbereiteten Rohkaffees auf dem ursprünglichen, niedrigen Niveau verbleibt (Abbildung 37 und Abbildung 38), wie es bereits direkt nach der Aufbereitung festgestellt worden war (vergleiche Abbildung 15 und Abbildung 16); dagegen bewegen sich während der gesamten Lagerungszeit in allen trocken aufbereiteten Rohkaffees auch die Glukosegehalte auf erhöhtem (Abbildung 31) und bei Semi-Washed-Kaffee auf intermediärem Niveau (Abbildung 32). Anders als bei den anderen Zuckern lassen sich demnach selbst noch bei gelagertem Rohkaffee anhand der Glukosegehalte (und auch bei Fruktose, siehe oben) noch Bezüge zu den ursprünglich angewandten Aufbereitungsmethoden (trocken, semi-washed, nass) herstellen. Es sind jedoch keine Korrelationen zur Lagerungsform (nass/geschält, nass/Pergamino) oder zu den Vitalitätsdaten (Abbildung 7) herzustellen.

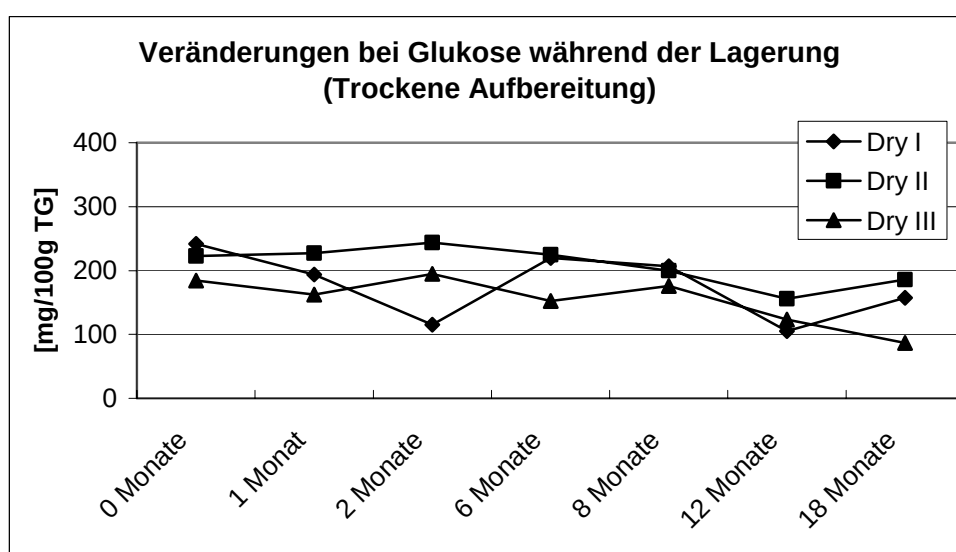


Abbildung 35: Veränderungen bei Glukose während der Lagerung (Trockene Aufbereitung Brasilien).

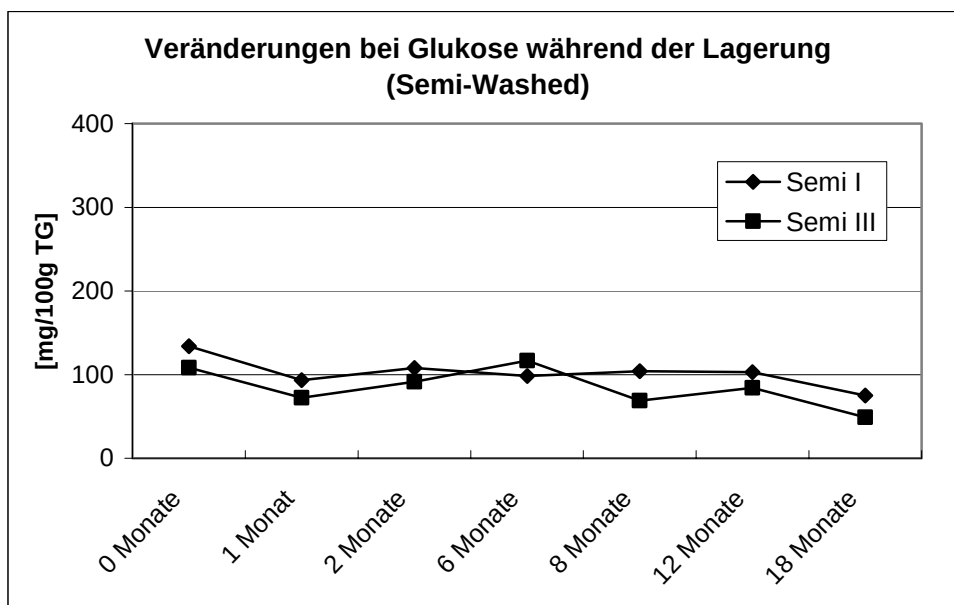


Abbildung 36: Veränderungen bei Glukose während der Lagerung (Semi-Washed-Aufbereitung Brasilien).

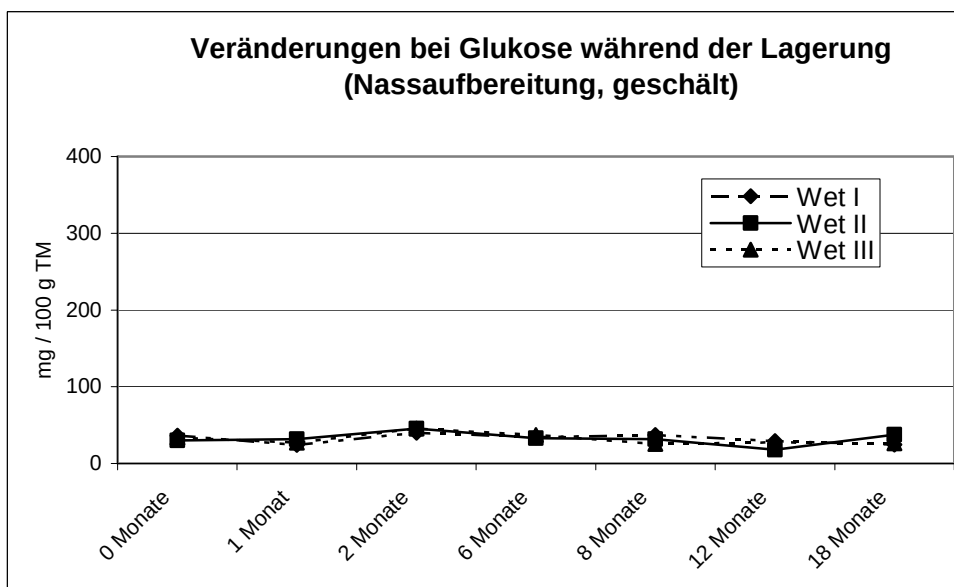


Abbildung 37: Veränderungen bei Glukose während der Lagerung (Nasse Aufbereitung Brasilien, Lagerung im geschälten Zustand).

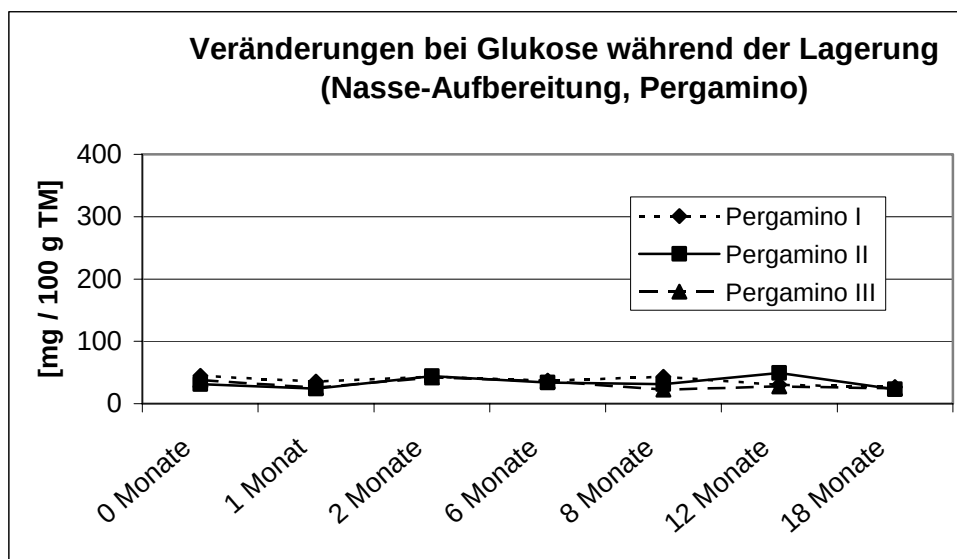


Abbildung 38: Veränderungen bei Glukose während der Lagerung (Nasse Aufbereitung, Brasilien Lagerung im Pergamino).

6) Galaktose

Die Abbildungen 39-42 zeigen die Veränderungen der Galaktosegehalte in Rohkaffees unter dem Einfluss der Lagerung. Die Gehalte der einzelnen Chargen sind vergleichsweise geringen Schwankungen unterworfen. Als einzig herausragendes Ereignis ist ein Anstieg in der Galaktosekonzentration bei trocken aufbereitetem, ungewaschenem Rohkaffees im Zeitraum 2-3 Monate Lagerung festgestellt worden (Abbildung 39), der jedoch mit keinen parallel auftretenden Ereignissen erklärt werden könnte. Abgesehen davon erscheint das Verhalten der Galaktose in den verschiedenen Rohkaffees während der Lagerung recht gleichförmig, wobei weder die ursprünglich angewandte Aufbereitungsmethode (trocken, semi-washed, nass) noch die Lagerungsform (nass/geschält, nass/Pergamino) eine erkennbare Auswirkung auf den Galaktosegehalt zu haben scheinen. Eine Korrelation der Galaktosegehalte zu den Vitalitätsdaten (Abbildung 7) der Rohkaffees lässt sich nicht herstellen. Zwar geht ein Anstieg der Galaktosekonzentrationen etwa im Zeitraum 4-6 Monate Lagerung mit dem Verlust der Vitalität der meisten Rohkaffeeproben-Populationen einher, doch zeigen auch die Pergamino-Kaffeeproben einen ähnlichen Anstieg, verlieren jedoch ihre Vitalität wesentlich später, d.h. erst nach > 9 Monaten. Für den in allen Proben auftretenden Konzentrationsanstieg (und dem nachfolgenden Rückgang) gibt es bisher keine schlüssige Erklärung.

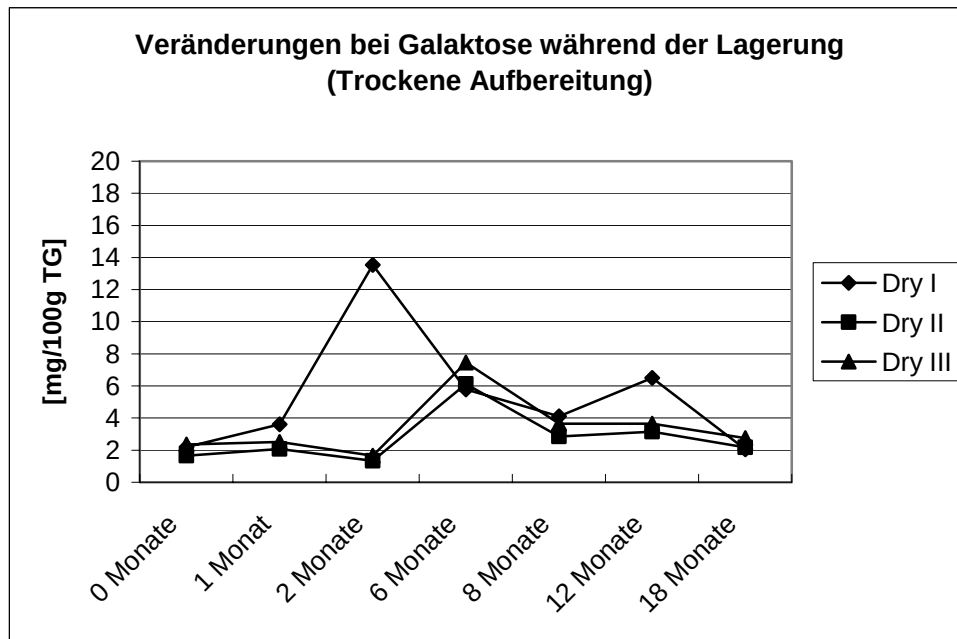


Abbildung 39: Veränderungen bei Galaktose während der Lagerung (Trockene Aufbereitung Brasilien).

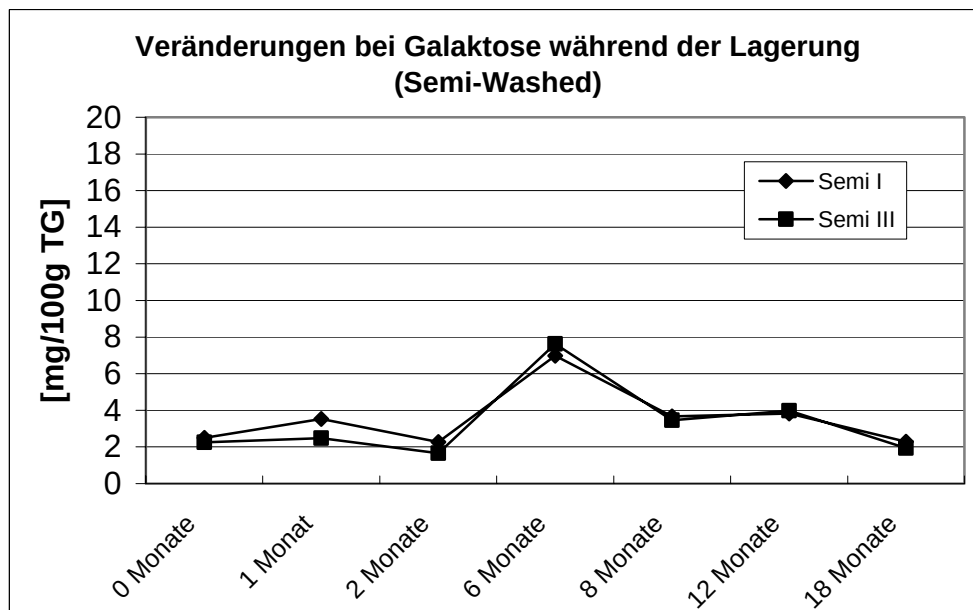


Abbildung 40: Veränderungen bei Galaktose während der Lagerung (Semi-Washed-Aufbereitung Brasilien).

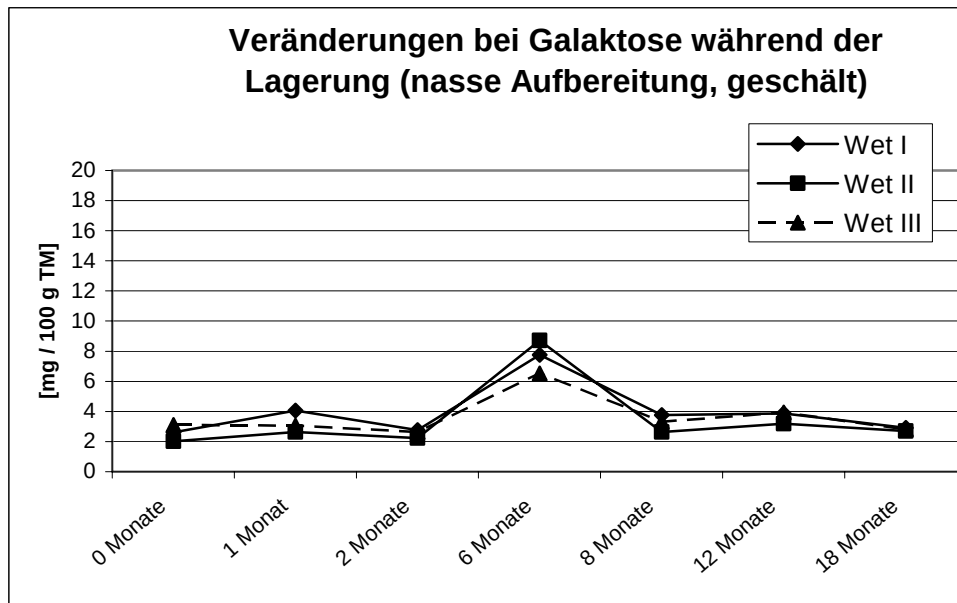


Abbildung 41: Veränderungen bei Galaktose während der Lagerung (Nasse Aufbereitung Brasilien, Lagerung im geschälten Zustand).

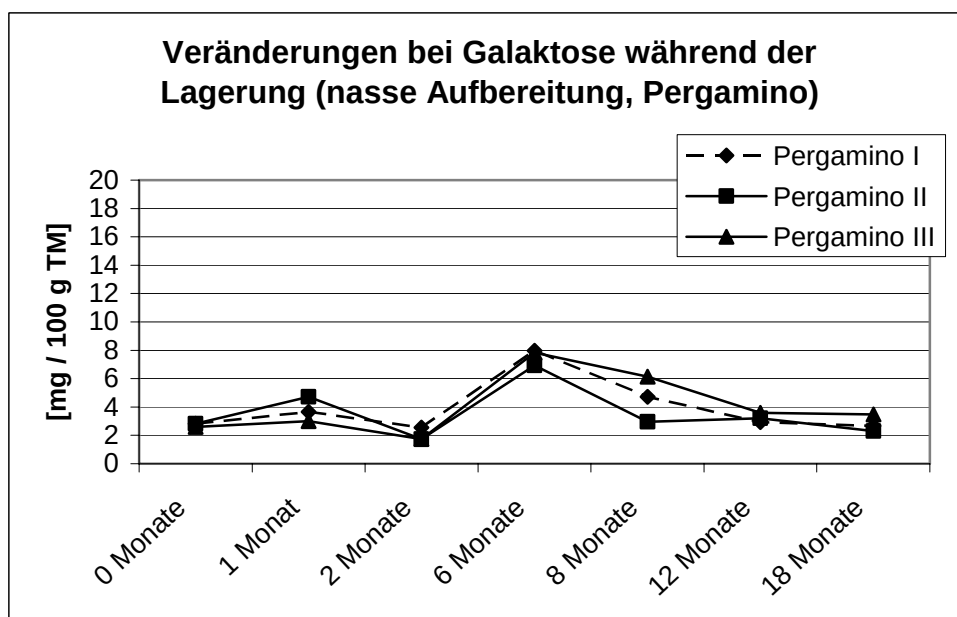


Abbildung 42: Veränderungen bei Galaktose während der Lagerung (Nasse Aufbereitung, Brasilien Lagerung im Pergamino).

7) Arabinose

Die Abbildungen 43-46 zeigen die Veränderungen der Arabinosegehalte in Rohkaffees unter dem Einfluss der Lagerung. Die Gehalte der einzelnen Chargen sind vergleichsweise geringen Schwankungen unterworfen. Auch bei Arabinose lassen sich weder in Bezug auf die ursprünglich angewandte Aufbereitungsmethode (trocken, semi-washed, nass) noch auf die Lagerungsform (nass/geschält, nass/Pergamino) irgendwelche Auswirkungen auf den Raffinosegehalt ableiten. Eine Korrelation zu den Vitalitätsdaten ist gleichfalls nicht herstellbar.

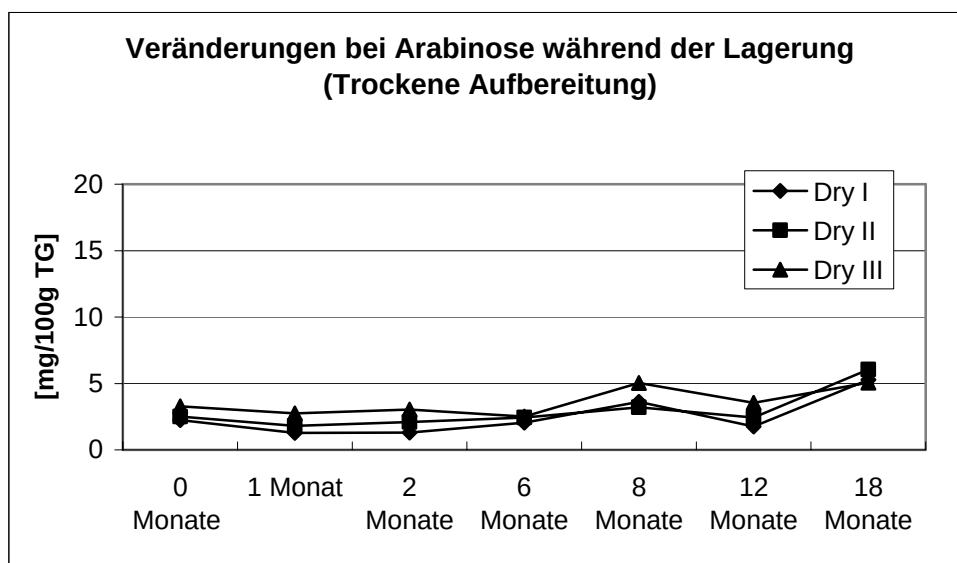


Abbildung 43: Veränderungen bei Arabinose während der Lagerung (Trockene Aufbereitung Brasilien).

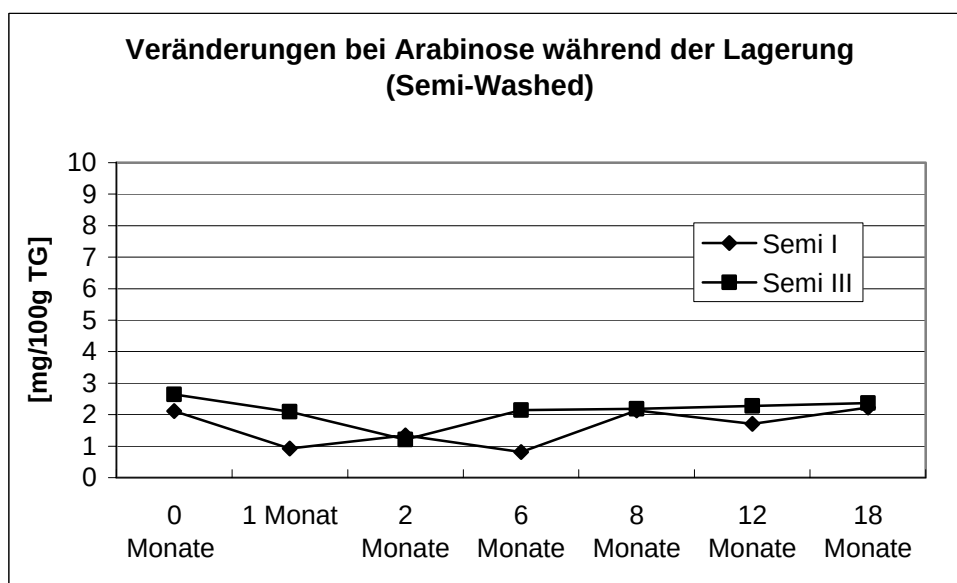


Abbildung 44: Veränderungen bei Arabinose während der Lagerung (Semi-Washed-Aufbereitung Brasilien).

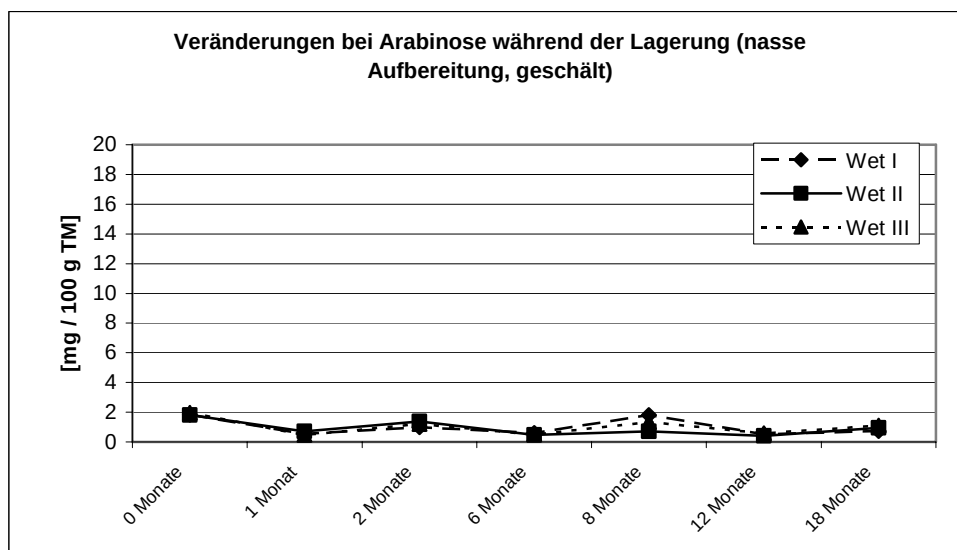


Abbildung 45: Veränderungen bei Arabinose während der Lagerung (Nasse Aufbereitung Brasilien, Lagerung im geschälten Zustand).

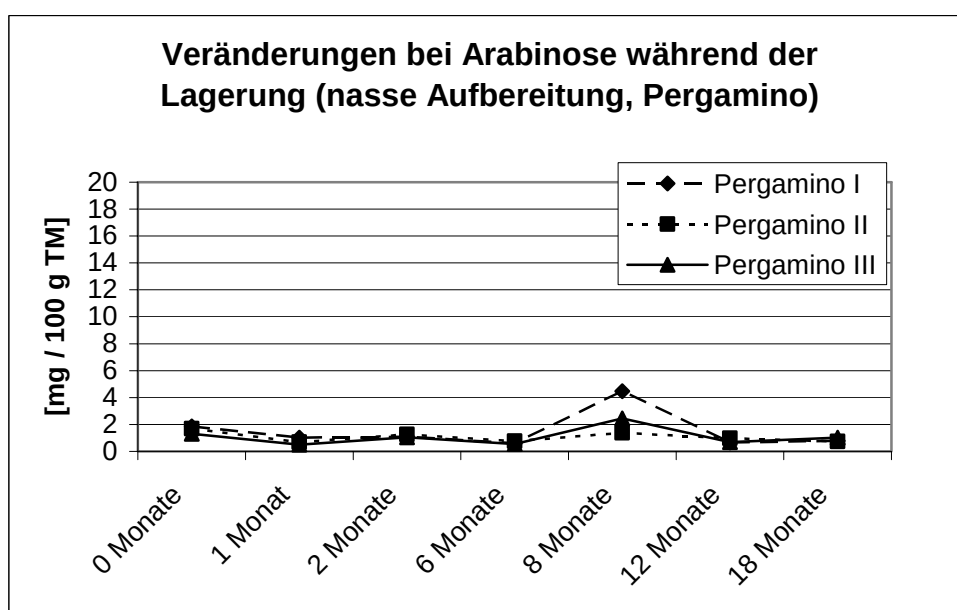


Abbildung 46: Veränderungen bei Arabinose während der Lagerung (Nasse Aufbereitung, Brasilien Lagerung im Pergamino).

8) Rhamnose

Die Abbildungen 47-50 zeigen die Veränderungen der Rhamnosegehalte in Rohkaffees unter dem Einfluss der Lagerung. Die Gehalte der einzelnen Chargen sind vergleichsweise geringen Schwankungen unterworfen. Auch bei Rhamnose lassen sich weder in Bezug auf die ursprünglich angewandte Aufbereitungsmethode (trocken, semi-washed, nass) noch auf die

Lagerungsform (nass/geschält, nass/Pergamino) irgendwelche Auswirkungen auf den Raffinosegehalt ableiten. Eine Korrelation zu den Vitalitätsdaten ist gleichfalls nicht herstellbar.

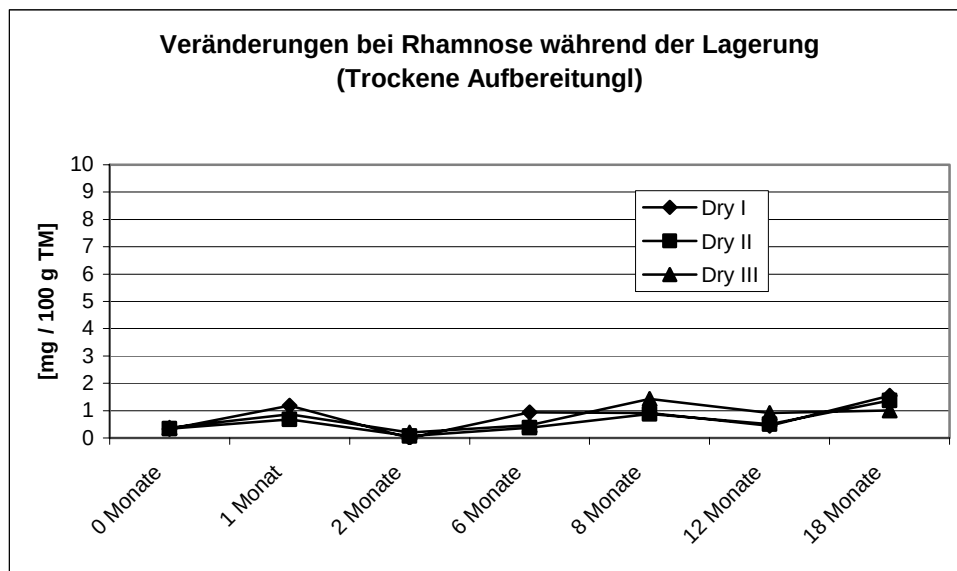


Abbildung 47: Veränderungen bei Rhamnose während der Lagerung (Trockene Aufbereitung Brasilien).

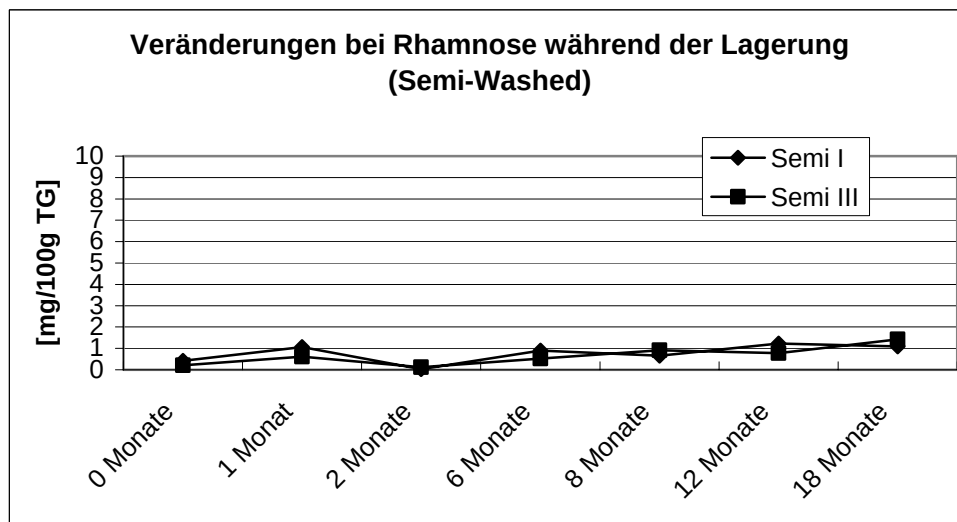


Abbildung 48: Veränderungen bei Rhamnose während der Lagerung (Semi-Washed-Aufbereitung Brasilien).

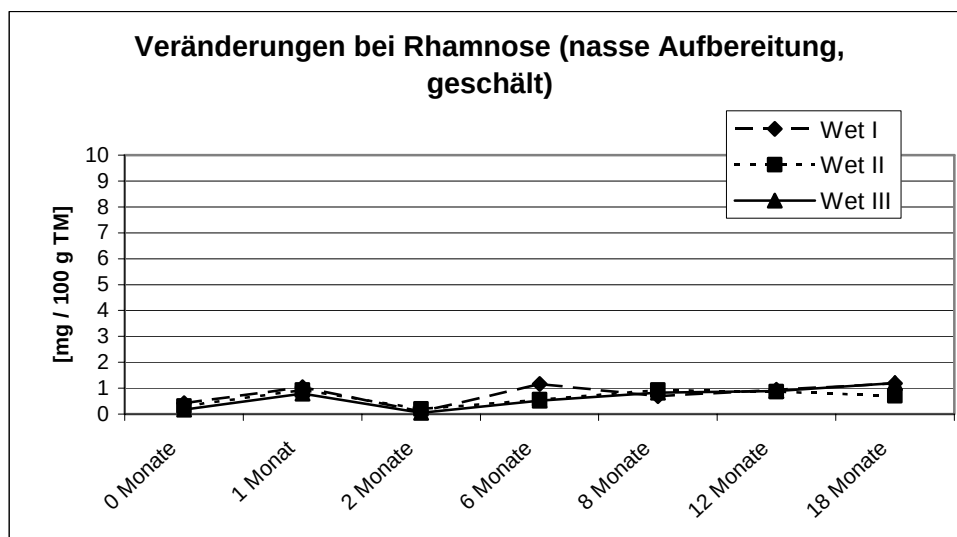


Abbildung 49: Veränderungen bei Rhamnose während der Lagerung (Nasse Aufbereitung Brasilien, Lagerung im geschälten Zustand).

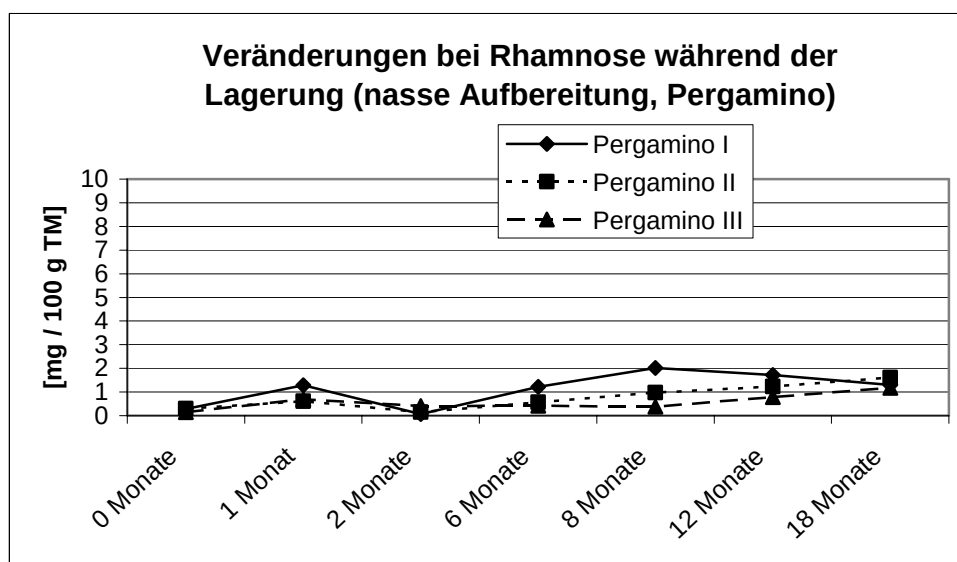


Abbildung 50: Veränderungen bei Rhamnose während der Lagerung (Nasse Aufbereitung, Brasilien Lagerung im Pergamino).

9) Mannose

Die Abbildungen 51-54 zeigen die Veränderungen der Mannosegehalte in Rohkaffees unter dem Einfluss der Lagerung. Die Gehalte der einzelnen Chargen sind vergleichsweise geringen Schwankungen unterworfen. Auch bei Mannose lassen sich weder in Bezug auf die ursprünglich angewandte Aufbereitungsmethode (trocken, semi-washed, nass) noch auf die Lagerungsform (nass/geschält, nass/Pergamino) irgendwelche Auswirkungen auf den

Raffinosegehalt ableiten. Eine Korrelation zu den Vitalitätsdaten ist gleichfalls nicht herstellbar.

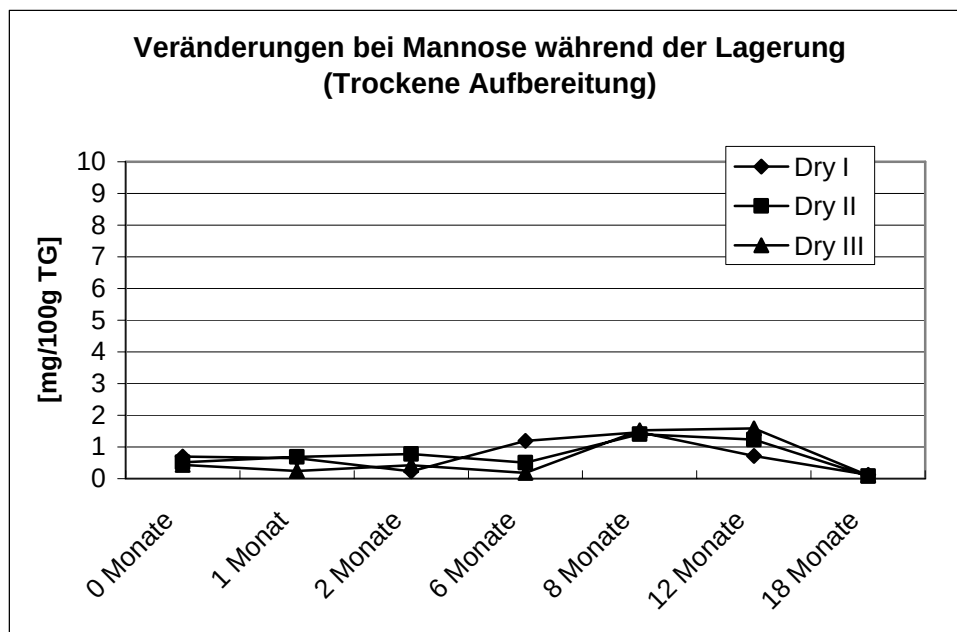


Abbildung 51: Veränderungen bei Mannose während der Lagerung (Trockene Aufbereitung Brasilien).

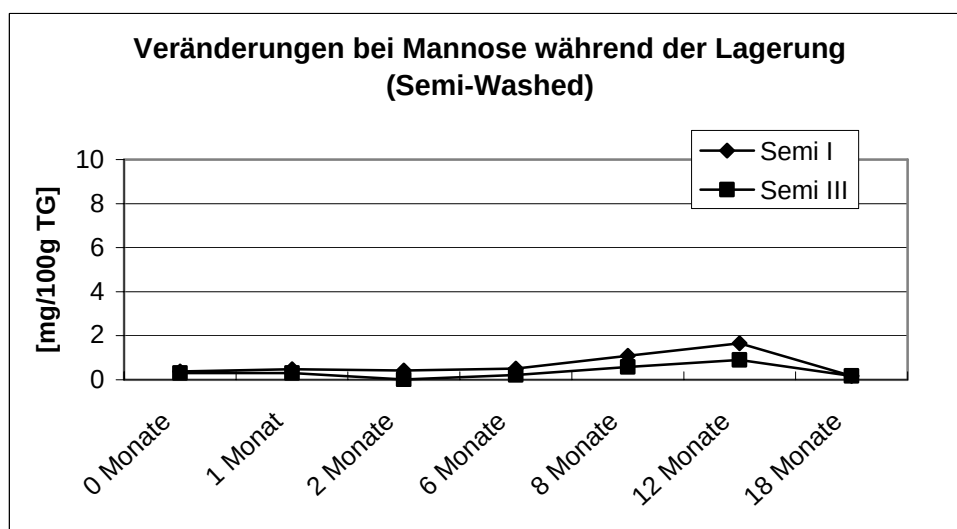


Abbildung 52: Veränderungen bei Mannose während der Lagerung (Semi-Washed-Aufbereitung Brasilien).

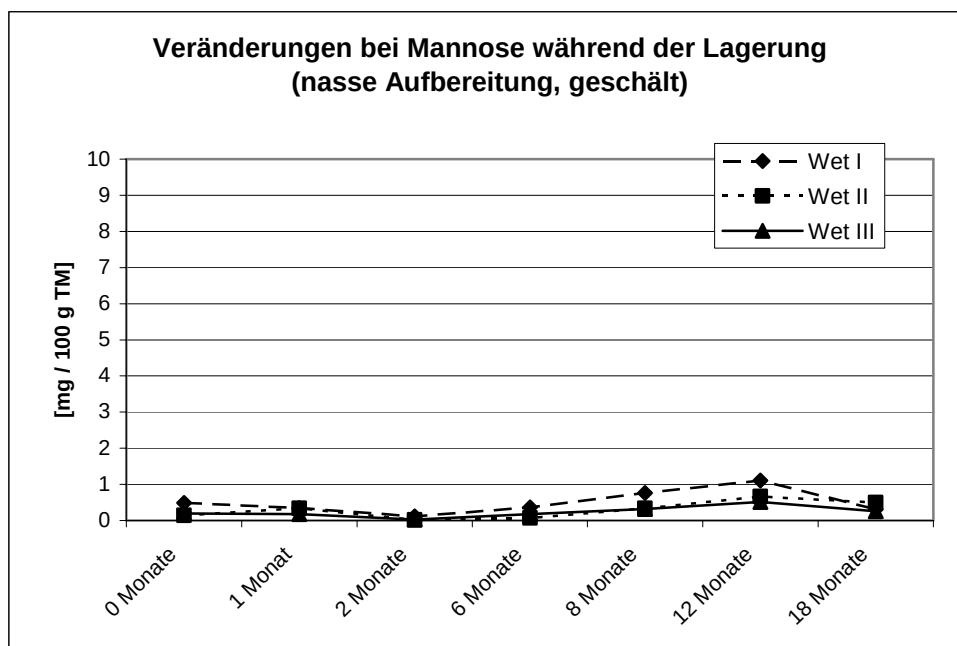


Abbildung 53: Veränderungen bei Mannose während der Lagerung (Nasse Aufbereitung Brasilien, Lagerung im geschälten Zustand).

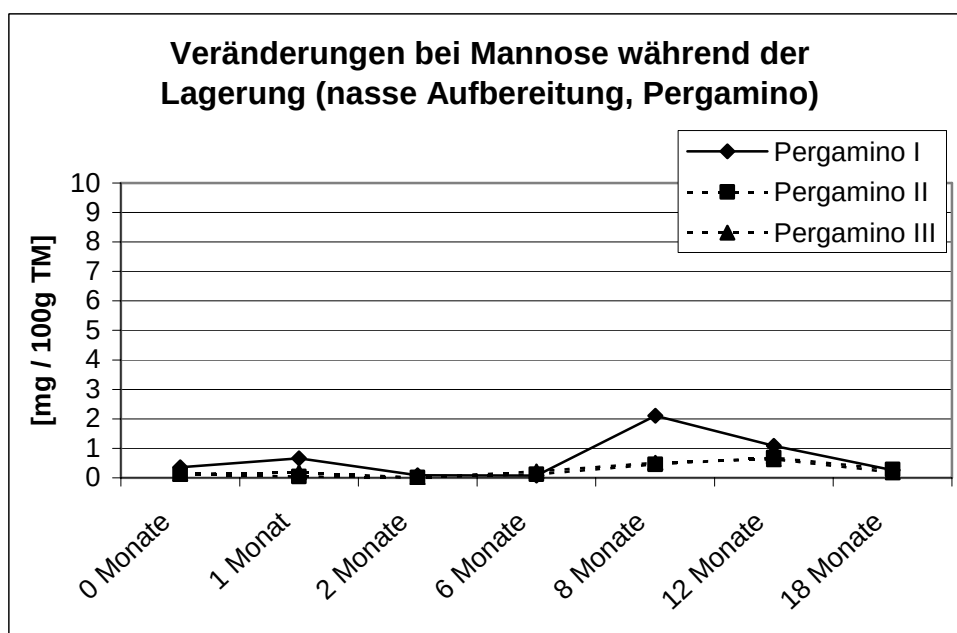


Abbildung 54: Veränderungen bei Mannose während der Lagerung (Nasse Aufbereitung, Brasilien Lagerung im Pergamino).

Enzymologische Untersuchungen

Wie bereits dargestellt, erfolgt die Mobilisierung des (Galakto-)Mannans der Kaffeesamen (Reservekohlenhydrat) im Wesentlichen durch eine oder mehrere Endo- β -mannanase(n) gefolgt von der Hydrolyse der Oligomannane durch eine (Exo-) β -Mannosidase und eine α -Galaktosidase. Alle drei Enzyme sind *in vivo* apoplasmatisch lokalisiert und so aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften im Zuge von Enzymextraktionen relativ stabil, besonders bei Einsatz leicht saurer Extraktionsmedien. So ist es möglich, auch aus den sehr phenolreichen Kaffeesamen diese Hydrolasen in aktiver Form zu isolieren. Während die Aktivitätsbestimmungen von Endo-Glycosidasen recht aufwändig sind, können die Aktivitäten der (Exo)-Glycosidasen in der Regel sehr einfach über Spaltung synthetischer Substrate (*p*-Nitrophenylglykoside) und anschließender photometrischer Bestimmung der Produktkonzentration ermittelt werden.

Endo- β -mannanase

Die Analysen der im Rahmen dieses Projektes anfallenden Proben wurden mit Hilfe der relativ neuen Methode eines Gel-Diffusionstests, der auf der Diffusion des Enzyms in einem mit Kongo-Rot angefärbten Substrat-Gel-Gemisch basiert, durchgeführt.



Abbildung 55: Gel-Diffusionstest zur Bestimmung der Endo- β -mannanase-Aktivität in Kaffeekeimlingen (gequollen) und in Kaffeesämlingen. Legende siehe Tabelle 4.

Spot	Platte 5	
	Hälfte 1	Hälfte 2
1	Gequollen	Gequollen (1:100)
2	Gekeimt	Gekeimt
3	Gekeimt	Gekeimt (1:100)
4	Blindprobe	Gekeimt
5	Gequollen	Gekeimt (1:100)

Tabelle 4: Legende zu Abbildung 55. Extrakte wurden aus frischen Kaffeekeimlingen und –sämlingen hergestellt. Die Angaben in Klammern beziehen sich auf den Verdünnungsfaktor gegenüber dem unverdünnten Extrakt. Als Blindprobe wurde der reine Puffer eingesetzt.

Der Radius des Hofes, der infolge der Hydrolysen konzentrisch um die zentrale Diffusionsquelle im Gel gebildet wird, ist proportional zur Enzymaktivität. Um die Eignung des Enzymtests zu überprüfen und um ein Maß für die Aktivität zu erhalten, wurden die Tests zunächst an frischen Kaffeekeimlingen durchgeführt. Die in Abbildung 55 gezeigten Gel-Diffusionstests (das Bild zeigt eine von insgesamt zwölf angefertigten Platten) demonstrieren, dass die Methode geeignet ist, um die Zunahme der Endo- β -mannanase-Aktivitäten im Verlauf von Keimung und Sämlingsentwicklung zu verfolgen. Die in Abbildung 56 dargestellten Tests hingegen zeigen, dass der Gel-Diffusionstest nicht geeignet ist, um die Endo- β -mannanase-Aktivitäten in gelagerten Rohkaffees zu ermitteln. Lediglich in *Spot 1* (unverdünnt) waren beträchtliche Enzymaktivitäten festgestellt worden, alle übrigen unterschieden sich nicht von der Blindprobe (reiner Puffer). Auch die in *Spot 1* (unverdünnt) festgestellten Aktivitäten halten wir für nicht signifikant, sondern halten eher kontaminierende Schimmelpilze für verantwortlich. Endo- β -mannanase-Aktivität ist in diversen Vertretern der *Fungi* nachgewiesen worden (z.B. (75)); der semi-washed Prozess wird als problematisch angesehen, weil die direkte Trocknung des entpulpten Pergaminkaffees die Gefahr derartiger Kontaminationen birgt.

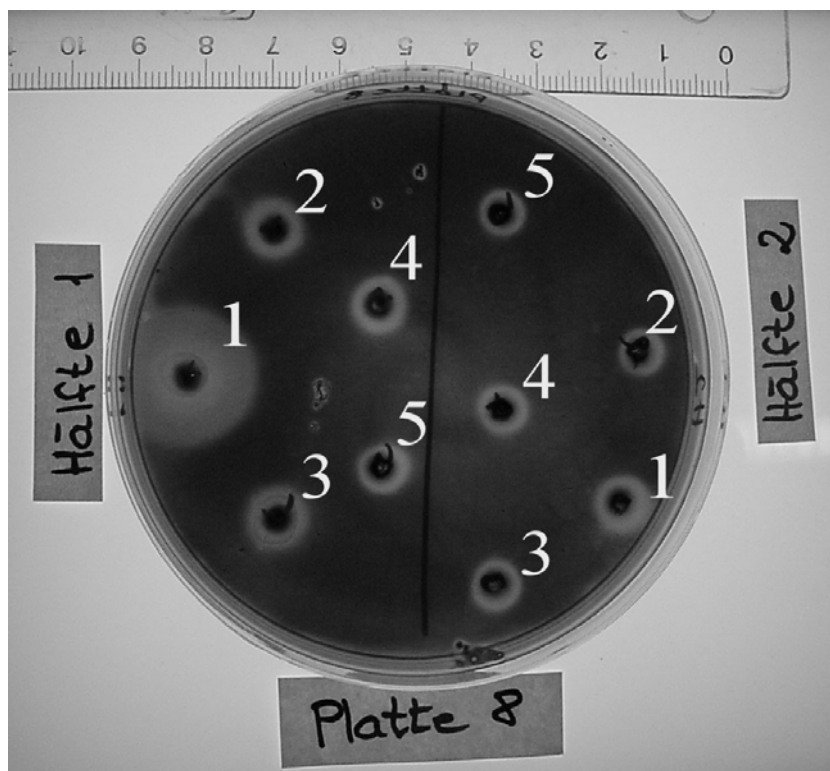


Abbildung 56: Gel-Diffusionstest zur Bestimmung der Endo- β -mannanase-Aktivität in ungelagerten Rohkaffeeproben („0 Monate“). Legende siehe Tabelle 5.

Spot	Platte 8	
	Hälfte 1	Hälfte 2
1	Semi-washed (SI)	SI (1:100)
2	Nass (WI)	WI (1:100)
3	Trocken (DI)	DI (1:100)
4	Nass/Pergamino (PI)	PI (1:100)
5	Blindprobe	Blindprobe

Tabelle 5: Legende zu Abbildung 56. Extrakte wurden aus den ungelagerten Brasil-Proben („0 Monate“) hergestellt. Die Angaben in Klammern beziehen sich auf den Verdünnungsfaktor gegenüber dem unverdünnten Extrakt. Als Blindprobe wurde der reine Puffer eingesetzt.

β -Mannosidase

Die Aktivität der β -Mannosidase wird anhand der Freisetzung von *p*-Nitrophenol aus *p*-Nitrophenyl- β -mannosid bestimmt. Zunächst wurde mit Hilfe der partiell aufgereinigten Enzymprobe das pH-Optimum zwischen pH 5 und pH 5,5 ermittelt (Abbildung 57). Es wurden folglich alle für die anstehenden Untersuchungen notwendigen Inkubationen bei pH 5,5 durchgeführt.

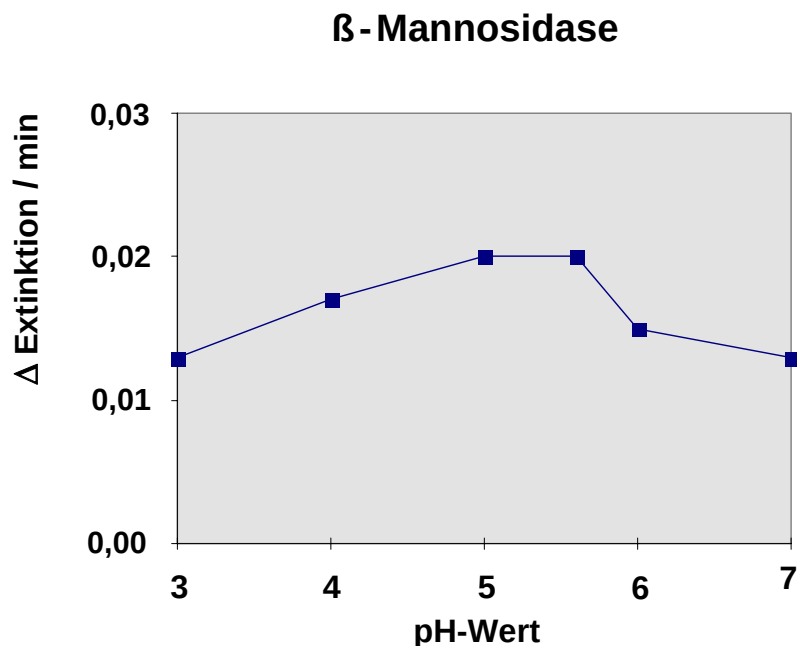


Abbildung 57: pH-Abhängigkeit der β -Mannosidase aus Rohkaffee

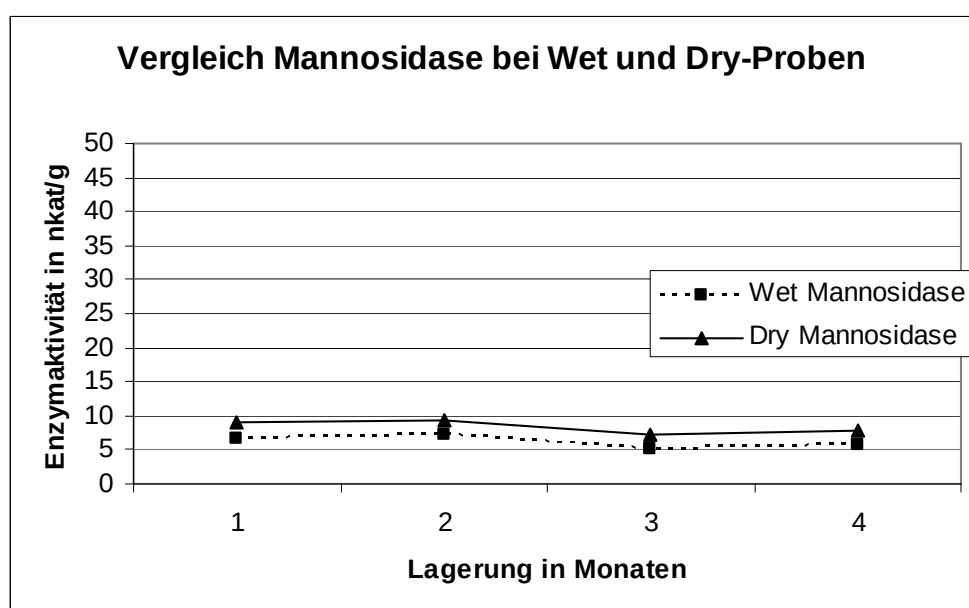


Abbildung 58: Veränderung der Mannosidase-Aktivität in gelagerten Rohkaffees

Die Analyse der gelagerten Kaffeeproben ergab, dass in diesen Proben im Mittel eine β -Mannosidase-Aktivität von etwa 10,5 nkat/g Rohkaffee vorliegt, die im Zuge der Lagerung (Abbildung 58) keine signifikanten Veränderungen zeigt. Auf eine weitere Untersuchung der Enzymaktivität wurde daher verzichtet. Die Aktivität ist unabhängig von der Vitalität der Kaffeesamen (vergleiche Abbildung 7).

α -Galaktosidase

Zunächst wurde mit Hilfe der partiell aufgereinigten Enzymprobe das pH-Optimum bei etwa pH 5,5 ermittelt (Abbildung 59). Somit wurden alle für die anstehenden Untersuchungen notwendigen Inkubationen bei diesem pH-Wert durchgeführt. Die Analysen hinsichtlich möglicher Aktivitätsveränderungen im Zuge der Lagerung zeigten keine signifikanten Veränderungen.

Die Analyse der gelagerten Kaffeeproben ergab, dass in diesen Proben im Mittel eine α -Galaktosidase-Aktivität von etwa 45,5 nkat/g Rohkaffee vorliegt, die im Zuge der Lagerung (Abbildung 60) nur geringe Veränderungen zeigt. Auf eine weitere Untersuchung der Enzymaktivität wurde daher verzichtet. Die Aktivität ist unabhängig von der Vitalität der Kaffeesamen (vergleiche Abbildung 7).

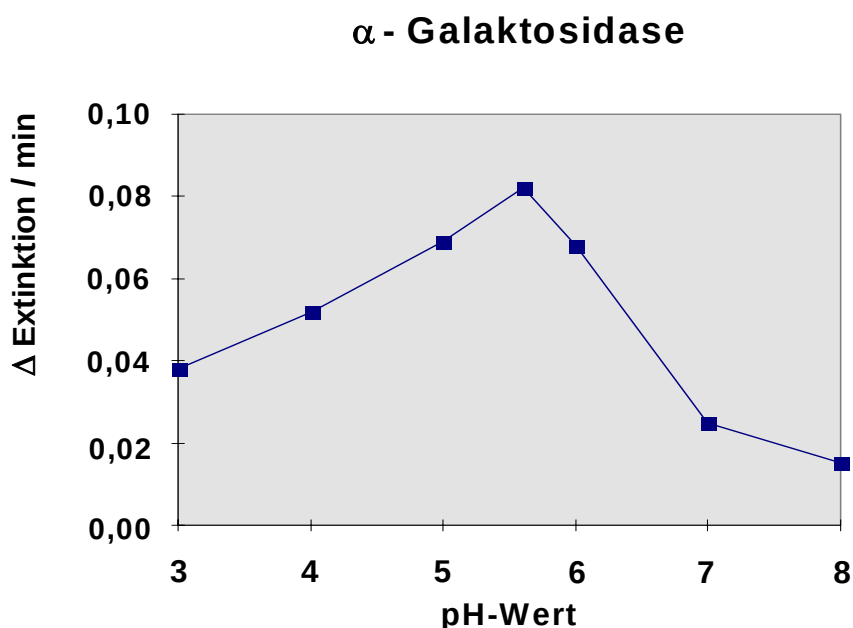


Abbildung 59: pH-Abhängigkeit der α -Galaktosidase aus Rohkaffee

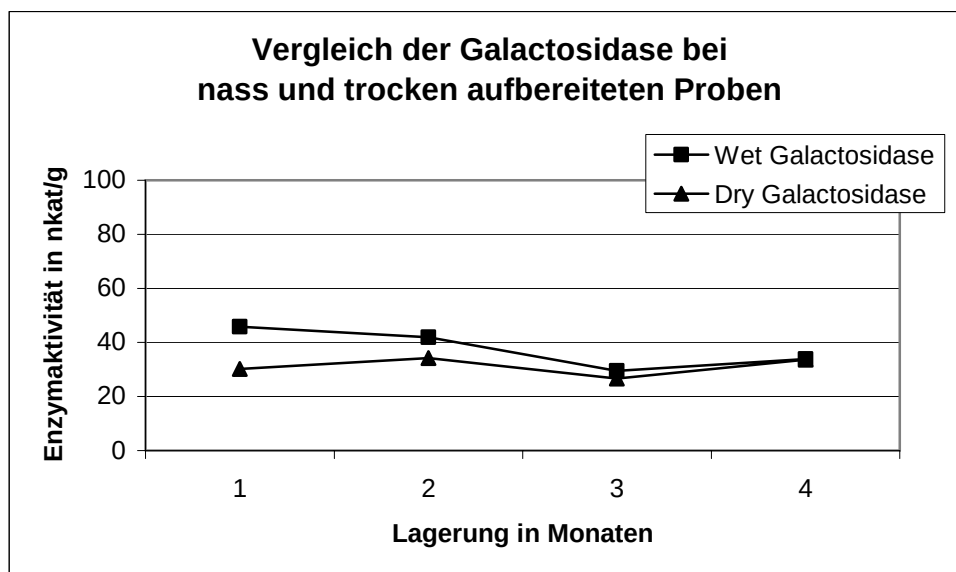


Abbildung 60: Veränderung der α -Galaktosidase-Aktivität in gelagerten Rohkaffeeproben.

Kaffeeverkostungsergebnisse:

Die Werte für Säure und Aroma der Röstkaffees aus den brasilianischen Einlagerungsproben sind, wie es laut Industriepartner für Brasilianischen Kaffee zu erwarten ist, eher am Ende der Intensitätsskala zu finden. Wie unter dem Kapitel Probenbeschreibung ausgeführt, konnten leider keine hochwertigen Hochlandkaffees in ähnlicher Weise aufbereitet und gelagert werden. Dennoch sind Unterschiede klar zu erkennen, die insbesondere mit der Aufbereitungsmethode (nass/trocken etc.) aber auch mit der Lagerungsdauer zusammenhängen. Allerdings sind die Ergebnisse mit starken Schwankungen innerhalb der Chargen verbunden.

Die geschmacklichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Aufbereitungsarten traten weniger deutlich zu Tage als bei den Verkostungsergebnissen bei der Ipanema (Tabelle 2). Während die brasilianischen Verkoster vor Ort stets nur die Kaffees der Plantage miteinander vergleichen, stellen die deutschen Verkoster stets die gesamte Palette an importierten Provenienzen einander gegenüber. Dabei werden Nuancen innerhalb einer einzigen Provenienz möglicherweise nicht so deutlich unterschieden, insbesondere wenn die Kaffees generell nicht den Spitzenbereichen zugeordnet werden können.

Da sich aus den Daten der Zuckeranalysen nur wenige lagerungsbedingte Änderungen ableiten ließen, kann eine Korrelation zwischen den festgestellten Flavourqualitäts-Abnahmen und den Gehalten an niedermolekularen Kohlenhydraten weitgehend

ausgeschlossen werden. Andere chemische Veränderungen, wie Oxidation von Chlorogensäuren und Lipidoxidation sind im vorliegenden Projekt explizit nicht untersucht worden, dürften aber zweifellos ihre Auswirkung auf die Verkostungsergebnisse gehabt haben.

Proben	Lagerungsdaue	1D	2D	3D	1W	2W	3W	1S	3S	1P	2P
Fülle	0	9	7	8	7	5	9	9	7	9	7
	1	5	7	9	5	9	7	9	7	9	7
	6	7	7	7	9	5	9	7	7	9	5
	8	7	5	9	5	9	5	5	5	5	7
	12	7	7	9	5	5	9	9	7	9	5
Säure	0	1	4	1	3	1	1	1	3	1	4
	1	1	3	1	3	1	1	1	4	2	1
	6	1	3	1	3	1	3	1	3	2	1
	8	2	3	1	2	1	2	2	1	2	1
	12	1	2	1	3	1	3	1	3	1	3
Aroma	0	3	5	1	4	1	3	1	3	3	4
	1	1	1	1	3	1	3	3	5	3	3
	6	1	3	1	3	1	3	1	3	2	1
	8	1	1	1	3	1	3	1	3	3	1
	12	1	3	1	1	1	1	1	1	1	3
Weich	0		SS		SS		SS		SS		SS+
	1		SS		SS		SS	SS			
	6		SS		SS		SS		SS	SS	
	8				SS			SS	SS	SS	
	12		SS		SS		SS		SS		SS

Tabelle 6: Übersicht zu den Verkostungsergebnissen (zur Aufschlüsselung vergleiche Tabelle 3)

Proben:	Lagerungsdauer	1D	2D	3D
2. Serie	0	leicht rauh		rauh, kratzig
3. Serie	1	Gewürznote	Gewürznote	leicht rauh
4. Serie	6	rauh, kratzig		rauh
5. Serie	8	Fremdn., muffig	Fremdn., muffig	leicht rauh
6. Serie	12	sehr rauh	leicht rohalt	leicht rauh

Tabelle 7: Anmerkungen zu den trocken aufbereiteten Brasils.

Proben:	Lagerungsdauer	1W	2W	3W
2. Serie	0	breit	leicht rauh,	breit
3. Serie	1		leicht rauh,	leichte
4. Serie	6	rohalt	rohalt, rauh	rohalt
5. Serie	8	leicht rohalt	Gewürznote	
6. Serie	12	rohalt	rohalt	rohalt

Tabelle 8: Anmerkungen zu den nass aufbereiteten Brasils (im geschälten Zustand gelagert).

Proben:	Lagerungsdauer		1S	3S
2. Serie	0	2. Serie	rauh, kratzig	
3. Serie	1	3. Serie		gut
4. Serie	6	4. Serie	rauh, kratzig	
5. Serie	8	5. Serie	leicht rohalt	
6. Serie	12	6. Serie	leicht rauh,	rohalt

Tabelle 9: Anmerkungen zu den Semi-Washed Brasils.

Proben:	Lagerungsdauer	1P	2P	3P
2. Serie	0	leicht rauh		rauh, leicht rohalt
3. Serie	1	leicht rauh,	leicht rauh	
4. Serie	6		rauh	rauh, leicht rohalt
5. Serie	8		leicht rauh	rauh, leicht rohalt
6. Serie	12	rauh, kratzig	rohalt	ranzig

Tabelle 10: Anmerkungen zu den nass aufbereiteten Brasils (als Pergamino gelagert).

Hingegen lassen sich durchaus Korrelationen zwischen den Vitalitätsdaten (Abbildung 7) mit den Verkostungsergebnissen (Tabelle 6) herstellen. So fällt auf, dass der Qualitätsverlust bei gewaschenem Kaffee, der im Pergamino (P) gelagert wurde, wesentlich geringer ausfällt, als bei den im geschälten Zustand gelagerten Parallelproben (W). Wesentliches Merkmal der Lagerung im Pergamino ist aber zweifellos die längere Erhaltung der Vitalität (Abbildung 7).

Darstellung der wirtschaftlichen Verwertbarkeit der Ergebnisse und ihr Nutzen für kleine und mittlere Unternehmen (kmU)

Unter allen nach Deutschland importierten Waren nimmt Rohkaffee wertmäßig die zweite Stelle ein. In Deutschland werden pro Kopf etwa 7 kg Rohkaffee verbraucht; dies entspricht einem Gesamt-Import von über einer halben Million Tonnen Rohkaffee. Der deutsche Kaffeemarkt ist von besonders hohen Qualitätsanforderungen gekennzeichnet. Bei den speziellen Kaffeeprodukten, auf die sich insbesondere kleinere Röstbetriebe spezialisiert haben, wie auch bei den bekannteren Markenprodukten, geht es vor allem darum, konstante Qualität anbieten zu können. Dabei stehen neben den großen Röstbetrieben zahlreiche mittelständische und kleinere Betriebe im Wettbewerb um die Gunst des Verbrauchers. Dessen Vorlieben gehen in Deutschland vor allem in Richtung aromaintensiver (gewaschener) Arabicas.

Das abgeschlossene Forschungsvorhaben soll dazu beitragen, die für die deutschen Kaffeeröster erforderliche Qualität der Rohkaffees sicherzustellen. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag bei der Erfassung der Einflüsse der Aufarbeitung und Lagerung des Rohkaffees.

Einfluss der Aufbereitung

Die in diesem Forschungsprojekt erzielten Ergebnisse zum Einfluss der Aufbereitung auf die Rohkaffeequalität ergänzen die Ergebnisse unseres ersten AIF-Forschungsvorhabens (AIF 12181N). Es steht nunmehr außer Frage, dass – entgegen der bis dato etablierten Lehrmeinung, die Qualitätsunterschiede zwischen nass und trocken aufbereiteten Rohkaffees seien auf verschiedene Ausgangsqualitäten und unterschiedliche Sorgfalt bei den beiden Methoden zurückzuführen – die Kaffeequalität durch Veränderungen der Randbedingungen der Aufbereitung deutlich moduliert werden kann. Offensichtlich sind hierfür biochemische Prozesse verantwortlich, die während der Aufarbeitung in den Kaffeebohnen ablaufen. Dieses Wissen erlaubt, im Zuge der Nacherntebehandlung gezielt Einfluss auf die Qualität der produzierten Kaffees zu nehmen. Eine entsprechende Darstellung dieser Thematik wurde im Rahmen der diesjährigen ASIC-Konferenz in Bangalore (2004) den Kaffee-Fachleuten aus Wissenschaft, Anbau und Handel präsentiert. In diesem Kontext ist es sehr wichtig, dass alle Beteiligten - vom Rohkaffee-Erzeuger bis zu den beratenden Wissenschaftler - realisiert haben, dass die aufzuarbeitenden Kaffeebohnen keine leblose Handelsware darstellen, sondern dass sie lebende Organismen repräsentieren, die ganz typische und letztlich vorhersehbare Reaktionen zeigen, die genutzt werden können, um die positiven Eigenschaften eines Rohkaffees zu erhalten und zu fördern bzw. negative Einflüsse zu minimieren.

Im Übrigen könnte der Gehalt an freier Glukose und vor allem freier Fruktose als Marker für die Aufbereitung dienen. Dabei empfiehlt sich unter Umständen eine Kombination mit einer Analyse der beiden Aminosäuren Glutaminsäure und γ -Aminobuttersäure (57).

Einfluss der Lagerung

Für diesen Themenkomplex hat das abgeschlossene Forschungsprojekt einen grundsätzlich bekannten, aber über lange Zeit vernachlässigten Aspekt neu aufgezeigt: eine Lagerung des Rohkaffees in der Pergamentschicht (als „Pergamino“) hat einen positiven Einfluss auf die Qualität. Die Ursache hierfür liegt offensichtlich in der viel länger erhaltenen Vitalität der entsprechenden Rohkaffeebohnen. Während eine Lagerung von geschältem Rohkaffee bereits nach wenigen Monaten zum Verlust der Vitalität führt, ist diese in Kaffeebohnen, die im *Pergamino* gelagert wurden, selbst nach über einem Jahr noch nachweisbar. Aus dem dargelegten Zusammenhang zwischen dem Verlust an Vitalität und dem Verlust an Flavourqualität lassen sich zwei wichtige, praxisrelevante Anwendungen ableiten. Zum einen, sollten hochwertige Kaffees – wie in der Regel ja bereits üblich – kurzfristig nach der Ernte veredelt und in den Handel gelangen, um so Spitzenkaffee anbieten zu können. Zum anderen

sollten die Kaffeeimporteure darauf dringen, dass eine Lagerung von gewaschenem Rohkaffee über einen möglichst langen Zeitraum als „Pergamino“ durchgeführt wird. Eine entsprechende Vorgehensweise ist bei ungewaschenen Kaffees naturgemäß nicht möglich.

Es wäre zwar auch wünschenswert, wenn der Versand der gewaschenen Arabicas als Pergamino erfolgt, allerdings sprechen hier die deutlich höheren Transportkosten aufgrund der deutlich ungünstigeren Transportvolumina dagegen. Allerdings sollte auch hier überlegt werden, ob es nicht sinnvoll wäre – zumindest für hochwertige Spezialitäten- und Nischenprodukte – dieses Vorgehen zu übernehmen und eventuell mit dieser schonenden Art der Lagerung und des Transportes zu werben.

Zusammenstellung der Arbeiten, die im Zusammenhang mit dem Vorhaben veröffentlicht wurden oder in Kürze veröffentlicht werden sollen

Selmar D (2004) New insights in coffee processing: Quality and nature of green coffees are interconnected with an active seed metabolism. Auf der *Botanikertagung*, Braunschweig, Sept. 5.-10. 2004

Knopp S-E, Bytof G, Selmar D (2004) Changes of low molecular carbohydrates during the storage of coffee beans (*Coffea arabica* L.). Auf der *Botanikertagung*, Braunschweig, Sept. 5.-10. 2004

Selmar D, Bytof G, Knopp S-E, Bradbury AGW, Wilkens J, Becker R (2004)

Biochemical insights into coffee processing : Quality and nature of green coffees are interconnected with an active seed metabolism. 20^{ème} *Colloque Scientifique International sur le Café*. ASIC, Paris, Bangalore, India, Oct. 10-15

Knopp, S-E. (2005) Dissertation TU Braunschweig.

Literatur

1. R. Wilbaux, D. Hahn, *Café, Cacao, Thé* **10**, 342-367 (1966).
2. A. Walkowski, *Lebensmittelindustrie* **28**, 75-76 (1981).
3. J. Wurziger, R. Drews, B. Suche, *Kaffee und Tee Markt* **32**, 3-5 (1982).
4. J. Wurziger, R. Drews, B. Suche, paper presented at the Dixième Colloque Scientifique Internationale sur le Café, Salvador-Bahia, 11-14 octobre 1982 1983.
5. G. Fourny, E. Cros, J.-C. Vincent, paper presented at the Dixième Colloque Scientifique Internationale sur le Café, Salvador-Bahia, 11-14 octobre 1982 1983.
6. P. Bucheli, I. Meyer, A. Pittet, G. Vuataz, R. Viani, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 4507-4511 (1998).
7. P. Bucheli, I. Meyer, M. Pasquier, R. Locher, *Plant Physiology and Biochemistry* Special Issue 10th FESPP Congress, Florence, Italy, Sept 9-13, L-12 p.325 (1996).
8. G. Bytof, Dissertation, Technische Universität (2003).
9. W. Q. Sun, A. C. Leopold, *Physiologia Plantarum* **94**, 94-104 (1995).
10. I. Bernal-Lugo, A. C. Leopold, *Journal of Experimental Botany* **49**, 1455-1461 (1998).
11. U. M. N. Murthy, W. Q. Sun, *Journal of Experimental Botany* **51**, 1221-1228 (2000).
12. S. H. Wettlaufer, A. C. Leopold, *Plant Physiology* **97**, 165-169 (1991).
13. J. Pokorny, N.-H. Con, E. Smidrkalova, G. Janicek, *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung* **158**, 87-92 (1975).
14. M. Sivetz, N. W. Desrosier, in *Coffee Technology* M. Sivetz, N. W. Desrosier, Eds. (The Avi Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, 1979) pp. 117-169.
15. A. E. Wootton, *Kenya Coffee* **35**, 144-147 (1970).

16. H. Stirling, paper presented at the Neuvième Colloque Scientifique International sur le Café, London, 16-20 juin 1980 1981.
17. C. Milo *et al.*, paper presented at the Dix-neuvième Colloque Scientifique International sur le Café, Trieste, 14 - 18 mai 2001 2002.
18. J. Prodolliet, M. B. Blanc, M. Brülhart, L. Obert, J.-M. Parchet, paper presented at the Quatorzième Colloque Scientifique International sur le Café, San Francisco, 14-19 juillet 1991 1992.
19. J. Prodolliet *et al.*, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **78**, 749-761 (1995).
20. J. Prodolliet *et al.*, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **78**, 761-767 (1995).
21. W. J. Rogers, S. Michaux, M. Bastin, P. Bucheli, *Plant Science* **149**, 115-123 (1999).
22. P. Stöber, S. Bénet, C. Hischenhuber, M. Fischer, L. B. Fay, paper presented at the Dix-neuvième Colloque Scientifique International sur le Café, Trieste, 14 - 18 mai 2001 2002.
23. V. Leloup, J. H. De Michieli, R. Liardon, paper presented at the Dix-septième Colloque Scientifique International sur le Café, Nairobi, 20-25 juillet 1997 1998.
24. V. Leloup, R. Liardon, paper presented at the Quinzième Colloque Scientifique International sur le Café, Montpellier, 6-11 juin 1993 1993.
25. C. L. Ky *et al.*, *Theoretical and Applied Genetic* **101**, 669-676 (2000).
26. C. L. Ky *et al.*, *Plant Breeding* **119**, 165-168 (2000).
27. N. Chabrillange, S. Dussert, F. Engelmann, S. Doulebeau, S. Hamon, *Seed Science Research* **10**, 393-396 (2000).
28. D. Hirsch, Dissertation, TU Braunschweig (2000).
29. B. Downie, H. W. M. Hilhorst, J. D. Bewley, *Phytochemistry* **36**, 829-835 (1994).
30. D. W. Still, P. Dahal, K. J. Bradford, *Plant Physiology* **113**, 13-20 (1997).

31. R. Silwar, C. Lüllmann, paper presented at the Quinzième Colloque Scientifique International sur le Café, Montpellier, 6-11 juin 1993 1993.
32. M. Ginz, H. H. Balzer, A. G. W. Bradbury, H. G. Maier, *European Food Research and Technology* **211**, 404-410 (2000).
33. M. L. Wolfrom, R. A. Plunkett, M. L. Laver, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **8**, 58-65 (1960).
34. J. E. Courtois, F. Percheron, J. C. Glomaud, *Café, Cacao, Thé* **7**, 231-236 (1963).
35. G. Barbiroli, *Rassegna Chimica* **17**, 261-263 (1965).
36. U. Kröplien, paper presented at the Cinquième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Lisbonne, 14-19 juin 1971 1973.
37. L. C. Trugo, R. Macrae, paper presented at the Dixième Colloque Scientifique Internationale sur le Café, Salvador-Bahia, 11-14 octobre 1982 1983.
38. R. Tressl, M. Holzer, H. Kamperschröer, paper presented at the Dixième Colloque Scientifique Internationale sur le Café, Salvador-Bahia, 11-14 octobre 1982 1983.
39. R. Silwar, C. Lüllmann, *Café, Cacao, Thé* **32**, 319-322 (1988).
40. C. Lüllmann, R. Silwar, *Lebensmittelchemie und Gerichtliche Chemie* **43**, 42-43 (1989).
41. B. Guyot, D. Guelle, S. Assemat, E. Tchana, L. Pomathios, paper presented at the Seizième Colloque Scientifique International sur le Café, Kyoto, 9-14 avril 1995 1995.
42. P. Mazzafera, *Food Chemistry* **64**, 547-554 (1999).
43. A. G. W. Bradbury, in *Coffee. Recent Developments* R. J. Clarke, O. G. Vitzthum, Eds. (Blackwell Science, Oxford, 2001) pp. 1-17.
44. A. Luger, Dissertation, Universität Hamburg (1996).
45. L. C. Trugo, in *Coffee* R. J. Clarke, R. Macrae, Eds. (Elsevier Applied Science, London, New York, 1986), vol. 1. Chemistry, pp. 83-114.

46. B. Guyot *et al.*, *Plantations, Recherche, Développement* **3**, 272-280 (1996).
47. A. E. Wootton, paper presented at the Cinquième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Lisbonne, 14-19 juin 1971 1973.
48. M. Shadaksharaswamy, G. Ramachandra, *Phytochemistry* **7**, 715-719 (1968).
49. F. Petek, T. Dong, *Enzymologia* **23**, 133-142 (1961).
50. N. Harpaz, H. M. Flowers, N. Sharon, *Biochimica et Biophysica Acta* **341**, 213-221 (1974).
51. A. Zhu, J. Goldstein, *Gene* **140**, 227-231 (1994).
52. P. Marraccini *et al.*, *Planta* **213**, 296-308 (2001).
53. H. D. Ly *et al.*, *Carbohydrate Research*, **3** (2000).
54. Z. Gao, A. Schaffer, *Plant Physiology* **119**, 979-987 (1999).
55. H. G. Maier, I. Ollroge, C. Balcke, *Kaffee und Tee Markt* **32**, 3-7 (1982).
56. H. Cammenga. (2004).
57. G. Bytof, S.-E. Knopp, P. Schieberle, I. Teutsch, D. Selmar, *European Food Research and Technology* **in press** (2004).
58. G. Bytof, S.-E. Knopp, P. Schieberle, I. Teutsch, D. Selmar, paper presented at the 20^{ème} Colloque Scientifique International sur le Café, Bangalore, India 2004.
59. D. Selmar *et al.*, paper presented at the 20^{ème} Colloque Scientifique International sur le Café, Bangalore, India 2004.
60. D. Selmar *et al.*, paper presented at the 20^{ème} Colloque Scientifique International sur le Café, Bangalore, India 2004.
61. D. Selmar, G. Bytof, S.-E. Knopp, paper presented at the Dix-neuvième Colloque Scientifique International sur le Café, Trieste, 14 - 18 mai 2001 2002.
62. J. F. Menchú, C. Rolz, *Café Cacao Thé* **17**, 53-61 (1973).

63. C. Rolz, J. F. Menchù, R. Espinosa, G.-P. A., paper presented at the Cinquième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Lisbonne, 14-19 juin 1971 1973.
64. J. K. M. Roberts, J. Callis, D. Wemmer, V. Walbot, O. Jaretsky, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 3379-3383 (1984).
65. F. Menegus, L. Cattaruzza, A. Chersi, G. Fronza, *Plant Physiology* **90**, 29-32 (1989).
66. J. E. Summers, R. G. Ratcliffe, M. B. Jackson, *Journal of Experimental Botany* **51**, 1413-1422 (2000).
67. A. G. W. Bradbury, D. J. Halliday, paper presented at the Douzième Colloque Scientifique International sur le Café, Montreux, 29 juin - 3 juillet 1987 1988.
68. A. G. W. Bradbury, D. J. Halliday, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**, 389-392 (1990).
69. M. Fischer, R. J. Redgwell, S. Reimann, V. Trovato, D. Curti, paper presented at the Dix-neuvième Colloque Scientifique International sur le Café, Trieste, 14 - 18 mai 2001 2002.
70. M. Fischer, S. Reimann, V. Trovato, R. J. Redgwell, *Carbohydrate Research* **330**, 93-101 (2001).
71. G. Stenlid, *Physiologia Plantarum* **7**, 173-181 (1954).
72. J. C. Stein, G. Hansen, *Plant Physiology* **121**, 71-79 (1999).
73. I. Bernal-Lugo, A. C. Leopold, *Plant Physiology* **98**, 1207-1210 (1992).
74. W. Q. Sun, A. C. Leopold, *Physiologia Plantarum* **89**, 767-774 (1993).
75. A. Sachslehner, G. Foidl, N. Foidl, G. Gübitz, D. Haltrich, *Journal of Biotechnology* **80**, 127-134 (2000).