

# Transfer von Inhaltsstoffen während der alkoholischen Mazeration von grünen Walnüssen (*Juglans regia* L.)

MATTHIAS KARLIN<sup>1</sup>, MIRJAM HEY<sup>1</sup> und FRANK WILL<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Hochschule RheinMain, Fachbereich Geisenheim, Getränketechnologie

<sup>2</sup> Forschungsanstalt Geisenheim, Fachgebiet Weinanalytik und Getränkeforschung

D-65366 Geisenheim, Von-Lade-Straße 1

E-Mail: Will@fa-gm.de

Grüne Walnüsse wurden mit 60- bzw. 80%igem Neutralalkohol mazeriert, um aus den Extrakten Walnussliköre herzustellen. Der Übergang von primären und sekundären Inhaltsstoffen wurde während der viermonatigen Mazeration analytisch verfolgt. Die Extrakte enthielten 9 bis 9,5 g/l Gesamtzucker und 2,7 g/l Gesamtsäure. Die 60%ige Variante löste deutlich mehr Mineralien aus den Früchten. Der maximale Transfer von Gesamtpolyphenolen in die alkoholische Phase war nach etwa sechs Wochen mit ca. 8,3 g/l erreicht. Zwischen den beiden Alkoholstärken bestanden dabei keine signifikanten Unterschiede. Die Farbentwicklung der Mazerate verlief von leuchtend grün bis nahezu schwarz. Ellagittannine gehören zu den wichtigsten bioaktiven Sekundärstoffen in Walnüssen. Mittels direkter RP-HPLC/UV wurden 550 bis 570 mg/l Ellagsäureäquivalente in den Extrakten gefunden. Einige Ellagittannine konnten nach direkter RP-HPLC der Mazerate mittels massenspektrometrischer Detektion und Fragmentierung (neg. ESI-MS<sup>n</sup>) identifiziert werden. Die hergestellten Mazerate zeigten beide ein intensives und typisches Walnussaroma, wobei der 80%ige Extrakt sensorisch besser bewertet wurde. In der Aromastoffanalytik wurde bestätigt, dass in der 60%igen Variante mehr grasige und grüne Noten extrahiert wurden.

**Schlagwörter:** Walnuss, Likör, Polyphenole, Ellagittannine, LCMS, Aroma, GCMS

## ***Transfer of substances during the alcoholic maceration of green walnuts (*Juglans regia* L.).***

Green walnuts were extracted with 60 and 80 % ethanol respectively to produce walnut liqueurs. The transfer of primary and secondary metabolites was analytically monitored for four months. The extracts contained 9 to 9.5 g/l total sugar and 2.7 g/l total acidity. The 60 % variant released distinctly more minerals from the fruits. The maximum transfer of total polyphenols reached 8.3 g/l after six weeks. In this case no impact of the alcoholic strength was detectable. The colour of the extracts developed from light green to nearly black. Ellagitannins belong to the most important secondary metabolites of walnuts. The extracts contained 550 to 570 mg/l ellagitannins expressed as ellagic acid equivalents determined by RP-HPLC/UV. Some ellagitannins could be determined by direct RP-HPLC combined with mass spectrometric detection and fragmentation (neg. ESI-MS<sup>n</sup>). Both extracts showed an intensive and typical walnut flavour, but the 80 % variant received a better sensory evaluation. Flavour analysis confirmed the stronger extraction of grassy and green compounds in the 60 % variant.

**Keywords:** walnut, liqueur, polyphenols, ellagitannins, LCMS, aroma, GCMS

## ***Le transfert de composants au cours de la macération alcoolique de noix vertes (*Juglans regia* L.)***

Les noix vertes ont été macérées avec de l'alcool neutre à 60 ou 80 degrés afin de fabriquer des liqueurs de noix à partir des extraits. La transition des composants primaires et secondaires a été observée de manière analytique au cours des quatre mois de macération. La teneur totale en sucre des extraits se situait entre 9 et 9,5 g/l, l'acidité totale s'élevait à 2,7 g/l. La variante à 60 degrés a extrait des fruits beaucoup plus de minéraux. Le taux maximum du transfert des polyphénols totaux dans la phase alcoolique a été atteint après six semaines environ avec près de 8,3 g/l. Il n'y avait aucune différence significative entre les deux degrés d'alcool. Les couleurs des macérats ont évolué du vert vif à une teinte presque noire. Les ellagittannins font partie des substances secondaires bioactives les plus importantes des noix. La méth-

*ode RP-HPLC/UV directe a permis de trouver entre 550 et 570 mg/l d'équivalents d'acide ellagique dans les extraits. Quelques ellagitannins ont pu être identifiés après l'analyse des macérats par RP-HPLC direct au moyen de la spectrométrie de masse et de la fragmentation (ESI-MS<sup>n</sup> nég.). Les deux macérats produits présentaient un arôme de noix intense et typique, l'extrait à 80 degrés ayant obtenu une meilleure évaluation sensorielle. L'analyse des substances aromatiques a attesté qu'un plus grand nombre de notes herbacées et vertes a été extrait dans la variante à 60 degrés.*

**Mots clés :** noix, liqueur, polyphénols, ellagitannins, LCMS, arôme, GCMS

Die Walnuss (*Juglans regia* L., Familie *Juglandaceae*) stammt vorwiegend aus den warmen Gebieten Südosteuropas bis Mittelasien. Laut CORDES und SOMMER (2006) benötigt der meist hochstämmige Baum einen tiefgründigen, nährstoffreichen Boden. Der Baum wird bis zu 30 m hoch und kann bis zu 160 Jahre alt werden. Die kugeligen bis eiförmigen Früchte haben außen eine glatte, grüne Schale, die mehr oder weniger stark gefleckt ist. Während der Reife verholzt die Schale. Die Nüsse unterscheiden sich je nach Varietät in der Größe und der Dicke der Schale. Die Blätter und die grüne Schale enthalten Juglon, das phyto- und fungitoxisch auf zahlreiche Pflanzenarten und Pilze wirkt (SCHAARSCHMIDT, 1999). Walnüsse gelten auf Grund ihrer Gehalte an ernährungsphysiologisch positiven Inhaltsstoffen als gesund. Dazu gehören vor allem ungesättigte Fettsäuren,  $\alpha$ -Tocopherol, Mineralien und Polyphenole (FUKUDA et al., 2003). Unter den Polyphenolen sind besonders die antioxidativ wirksamen Ellagatannine hervorzuheben (SHIMODA et al., 2009).

Walnüsse werden lose oder geschält gehandelt; sie werden überwiegend als Snack und als Back-, Koch- oder Lebensmittelzutat verwendet. Eine getränketechnologische Verarbeitungsmöglichkeit ist die Likörherstellung, deren chemische Grundlage hier beschrieben wird. Walnusslikör stammt ursprünglich aus der italienischen Provinz Emilia-Romagna ("Nocino"), er wird aber auch in anderen Regionen Europas hergestellt. Es ist ein braun-schwarzer Likör, der auf der Basis eines alkoholischen Mazerates der unreifen Früchte ausgemischt wird. Durch den starken Übergang von pflanzlichen Polyphenolen während der Mazeration ist er in die Kategorie der Bitterliköre einzuordnen. Besonders in Norditalien sind verschiedene kommerzielle Produkte mit typischen Alkoholgehalten von 30 bis 40 %vol. im Lebensmitteleinzelhandel erhältlich; beliebt ist aber auch die haushaltsmäßige Herstellung. Die Kennzeichnung "Nocino" setzt einen Mindestalkoholgehalt von 30 %vol. voraus (EU-Verordnung 110/2008, Anhang II Nr. 40). Das klassische Rezept beschreibt ausschließlich die Verwendung der grünen Nüsse und eventuell einiger Blätter. Weiterhin

existieren Varianten, bei denen Kaffeebohnen, Zimtstangen, Nelken, Vanilleschoten oder sonstige Gewürze co-extrahiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Ansätze von grünen Walnüssen analytisch verfolgt. Bei den Untersuchungen wurden sowohl primäre Inhaltsstoffe (Zucker, Säuren, Mineralien) als auch sekundäre Inhaltsstoffe, wie Polyphenole und Aromastoffe, bestimmt.

## Material und Methoden

### Alkoholische Mazeration

Die unreifen, grünen Walnüsse (Sortengemisch) wurden traditionsgemäß am 24. Juni 2010 (Johannistag) an verschiedenen Standorten auf dem Gelände der Forschungsanstalt Geisenheim ausgebrochen. Zu dem Zeitpunkt war das typische Walnussaroma stark präsent, und es war noch keine Verholzung der unreifen Früchte erkennbar. Die noch weichen Früchte waren glattschalig und ungestippt. Sie wurden gewaschen, gespitzt und zur schnelleren Extrahierbarkeit maximal halbiert. Es wurde jeweils ein Ansatz mit 60- und mit 80%igem Primasprit (N60, N80) ohne weitere Zutaten hergestellt. Die Ansätze wurden in 100 l-Edelstahltanks mit Boden- und Klarablauf durchgeführt. Das Ansatzverhältnis war ca. 12 kg Nüsse auf 60 l Alkohol (1:5, w/v). Der Tankboden wurde vor der Befüllung mit einem Edelstahlsieb ausgelegt; anschließend wurden die Nüsse durch das Mannloch eingefüllt. Auf diese Weise konnten keine Abläufe verblocken, und der Extraktionsalkohol konnte abgepumpt und von oben wieder überschwallt werden. Dies wurde in der ersten Woche alle zwei Tage, anschließend nur noch einmal pro Woche durchgeführt. Die Probenahme (ca. 100 ml) erfolgte mittels Edelstahlkelle, anschließend wurde die Probe scharf zentrifugiert und der Überstand bis zur Analyse bei -18 °C dunkel gelagert. Am Ende der Mazerationszeit von vier Monaten wurden die Walnussextrakte auf eine 40 x 40 cm Wahler Packpresse gegeben (KARLIN, 2011;

Abb. 1). Zur Likörbereitung wurde nur der frei und der unter leichtem Andruck ablaufende Extrakt verwendet; aus dieser Fraktion stammen auch die Analyswerte. Die unter dem Enddruck von 100 bis 150 bar gewonnene Restfraktion war ölhaltig und wurde hier nicht verwendet.



Abb. 1: Waschen der grünen Früchte, Befüllen des Tanks, Farbe des Ansatzes nach zwei Wochen Mazerationszeit, Abpressen der extrahierten Walnüsse nach vier Monaten auf der Packpresse

## Analytik

Der Alkoholgehalt wurde destillativ nach Dichtemessung bestimmt (Gerhardt Vapodest, Paar DMA 5000 Biegeschwinger). Die Konzentrationen an Glucose und Fructose wurden enzymatisch mit einem Analysenautomat (Konelab 20 XTi, ThermoFisher) gemessen. Die Bestimmung der Gesamtphenole erfolgte mit dem gleichen Automat photometrisch mit dem Folin-Reagenz (SINGLETON und ROSSI, 1965). Die Gesamtsäure wurde titriert (pH-Wert 8,1 als Citronensäure), zusätzlich geschah die Analyse der L-Äpfelsäure und Citronensäure mittels HPLC/UV (230 nm, Dionex Summit) an einer Säulenschaltung (Phenomenex Luna, 250 x 4,6 mm + Rezex Fast Fruit 100 x 7,8 mm) und 1%iger Phosphorsäure als Laufmittel (0,7 ml/min). Ausgewählte Mineralstoffe wurden mittels cAAS (contrAA 300, Fa. Analytik Jena) analysiert. Die Farbe der Ansätze wurde mittels Reflektionsmessung im L\*a\*b\*-Farbraum nach HUNTER bestimmt (Minolta CR A70). Die sensorische Beurteilung erfolgte nach Aufzuckerung der Mazerate auf Likörstärke innerhalb einer deskriptiven Kleinverkostung (Farbe, Geruch, Geschmack, Harmonie) durch die Autoren.

Die Hydrolyse von Ellagttanninen zur HPLC-Bestimmung der potenziellen Ellagsäuregehalte erfolgte nach

der modifizierten Methode von HÄKKINEN et al. (2000) folgendermaßen: 1 ml-Aliquote der Liköransätze werden mit 5 ml methanolischer Salzsäure (Bidest. Wasser/Methanol/6 M HCl; 30/50/20, v/v/v) versetzt und in einem druckfest verschlossenen Reaktionsglas 7 h bei 80 °C im Thermoblock hydrolysiert. Anschließend wird die Lösung auf 10,0 ml aufgefüllt und Aliquote in HPLC-Vials überführt (Whatman

Mini-Uniprep, syringeless, 0,45 µm).

HPLC/PDA (Surveyor, ThermoFisher): Säule Luna C18, 150 x 2 mm, 3 µm Material (Phenomenex) und entsprechende Vorsäule im Kartuschenhalter; Gradientenelution bei 40 °C und einer Flussrate von 250 µl/min mit A = 5 % Ameisensäure und B = Methanol; Injektionsvolumen 4 bis 10 µl, Detektionswellenlänge 254 nm; lineare Gradiententrennung innerhalb von 25 min mit einem Anstieg von 10 auf 55 % B. Die Ellagsäure in dem Hydrolysat wird anhand einer externen Mehrpunktkalibrierung quantifiziert und als Mittelwert aus Doppelbestimmung angegeben.

LCMS-Bestimmung von Ellagttanninen nach direkter HPLC der Mazerate ohne Hydrolyse: Verdünnung 1:10 mit bidest. Wasser, HPLC/PDA ThermoFisher ACCELA gekoppelt mit einem LXQ Massenspektrometer, chromatographische Bedingungen wie oben, negative Ionisation bei -3 kV, FullScan-Massenbereich 150 bis 2000 amu, MS<sup>n</sup> mit Helium als Kollisionsgas.

Die Aromastoffe wurden mittels GC-MS nach Festphasenextraktion in Anlehnung an die Methode von LOPEZ et al. (2002) wie folgt analysiert: Konditionierung der SPE-Kartuschen (LiChrolut EN 200 mg, Merck) mit jeweils 4 ml Dichlormethan, Methanol und Wasser/Ethanol (82 %/12 %, v/v). Anschließend 50 ml Aliquote der Mazerate mit ethanolischer 1%iger Butylhydroxytoluollösung und internem Standard versetzen, auf die Kartusche aufgeben und durchziehen. Elution der adsorbierten Aromastoffe mit 1,3 ml Dichlormethan; gaschromatographische Trennung

(GC 6890N, Agilent) mit massenselektiver Detektion (MSD 5973N, Agilent) unter folgenden Bedingungen: Injektionsvolumen 1 µl, Temperaturprogramm 40 °C 2 min, 4 °C/min auf 240 °C 5 min; Säule: Zebtron ZB-WAX 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Fa. Phenomenex). Temperatur des Transferliners 250 °C, Trägergas Helium mit 1,3 ml/min (const. Flow), Quadrupol 150 °C, EI-Quelle 230 °C. Quantifiziert wurde über die Peakfläche des internen Standards 2-Octanol unter Verwendung entsprechender Responsefaktoren.

## Ergebnisse und Diskussion

### Primäre Inhaltsstoffe

In Tabelle 1 sind die Alkohol-, Säure-, Mineralien- und Zuckergehalte der Rohextrakte nach viermonatiger Extraktionszeit dargestellt. Bedingt durch den Wassergehalt der Früchte stellten sich in den Mazerationen entsprechend geringere Alkoholgehalte ein. Zwischen den beiden Varianten bestanden außer in den Alkoholgehalten kaum Unterschiede. Aus den grünen Nüssen wurden mit 9 bis 9,5 g/l vergleichbar hohe Zuckermengen extrahiert. Das Glucose/Fructose-Verhältnis betrug unabhängig vom Ansatz konstant 1,75; Saccharose wurde nicht gefunden. Die Gesamtsäuregehalte in beiden Extrakten wurde von der Äpfelsäure dominiert, gefolgt von geringen Mengen an Citronensäure. Die Walnüsse wurden 60- bzw. 80%ig extrahiert, wobei die wässrigere Variante N60 deutlich mehr Mineralien aus den Früchten löste. In alkoholischen Getränken sind insbesondere Kupfer, Eisen, Calcium und Magnesium häufiger an Nachtrübungen beteiligt. Die hier gemessenen Konzentrationen sind vermutlich nicht nachtrübungsrelevant.

Die hohen Messwerte für die primären Inhaltsstoffe zeigen bereits einen guten Stofftransfer während der Mazeration. Eine feinere Zerkleinerung der Früchte, beispielsweise mit einer Rätzmühle, war nicht notwendig. Dies führte in vorausgegangenen Ansätzen zu erhöhten Ölgehalten im Mazerat, da Walnüsse ölhaltig sind. Die Lipidfraktion von Walnüssen besteht größtenteils aus ungesättigten Fettsäuren (AMARAL et al., 2004), die auf Grund ablaufender Peroxidationsreaktionen zu ranzigen Off-Flavours führen können. Die Lipidfraktion führte auch zu Nachtrübungen im fertigen Likör, die in der Vergangenheit häufiger als

aufgerahmter Ring an der Oberfläche des gefüllten Fertigprodukts beobachtet wurden. Dieser Nachtrübung kann durch weitere Maßnahmen (ausgedehnte Lagerzeit, Kühlung und Filtration) vorgebeugt werden.

Tab. 1: Konzentrationen an Alkohol, Zucker, Gesamtsäure, organischen Säuren und Mineralien in den Rohextrakten

	N60	N80
Alkohol (%vol.)	37,8	52,4
Zucker (g/l)	9,5	9,0
Gesamtsäure (g/l)	2,76	2,77
Äpfelsäure (g/l)	2,34	2,45
Citronensäure (g/l)	0,23	0,25
Cu (mg/l)	0,1	< 0,1
Fe (mg/l)	0,4	0,2
Zn (mg/l)	1,3	0,6
Na (mg/l)	6	5
Ca (mg/l)	18	10
K (mg/l)	797	692
Mg (mg/l)	45	38

### Sekundäre Inhaltsstoffe

In den Walnussextrakten wurde der maximale Transfer der Gesamtpolyphenole in die alkoholische Phase nach etwa sechs Wochen mit ca. 8,3 g/l erreicht (Abb. 2). Im weiteren Verlauf kam es zu einer leichten Abnahme der Polyphenole. Möglicherweise war ein Teil der Substanzen hier bereits durch Oxidations- und Polymerisationsreaktionen ausgefallen. Die Endkonzentrationen von 7,6 bis 7,8 g/l Gesamtpolyphenolen führte – wie bei Bitterlikören gewünscht – zu einer extrem gerbigen und bitteren Sensorik. Üblicherweise werden bei der Mazeration grüner Pflanzenteile mit niedrigeren Alkoholkonzentrationen mehr Bitterstoffe extrahiert (WÜSTENFELD und HAESLER, 1964). Zwischen den beiden Alkoholstärken bestanden aber in Hinsicht auf die Gesamtpolyphenole keine signifikanten Unterschiede. Die Farbentwicklung der Mazerate verlief innerhalb von zwei Wochen über ein helles zu einem dunklen, leuchtenden Grün. Nach der Zerstörung des Chlorophylls aus der Schale der grünen Nüsse durch Sauerstoffeinfluss während häufiger Umpumpvorgänge veränderte sich die Farbe des Extrakts und der Nüsse später von braun nach schwarz. Trotzdem war nach vier Monaten immer noch ein schwacher Grünschimmer erkennbar. In früheren Ver-



suchen wurde beobachtet, dass bei der Mazeration der Nüsse in Glasballons unter Sonneneinstrahlung das Grün in der gleichen Zeit komplett verschwindet. Die UV-Strahlung trägt eventuell zum kompletten Chlorophyllabbau bei. In Abbildung 1 sind die grüne Farbe und die beginnende Dunkelfärbung am ablaufenden Strahl aus dem Mazerationstank erkennbar. Wie aus Abbildung 3 am Beispiel der N80-Variante erkennbar, konnte die beschriebene Farbentwicklung anhand der  $a^*$ -Werte (Grün-Rot-Achse im  $L^*a^*b^*$ -Farbraum) durch eine Veränderung von 0,2 nach -0,04 nachvollzogen werden. Die teilweise auftretenden starken Schwankungen der Messwerte sind möglicherweise auf das Umpumpen vor der Probenahme zurückzuführen. Das Gesamtpolyphenolmaximum (42 Tage; Abb. 2) fiel nicht mit dem Ende der Farbentwicklung nach 120 Tagen zusammen. Bei den  $L^*$ - (Helligkeit) und den  $b^*$ -Werten (Blau-Gelb-Achse) waren keine Tendenzen erkennbar.

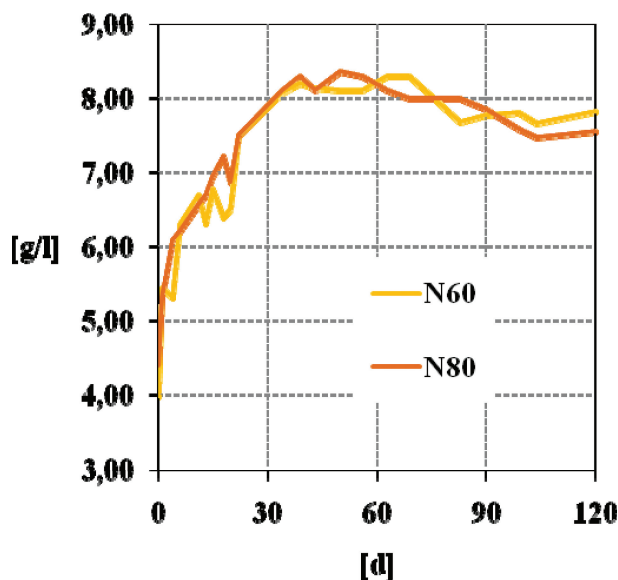


Abb. 2: Entwicklung der Gesamtphenolgehalte in den beiden Mazeraten

Ellagtannine gehören zu den wichtigsten bioaktiven Sekundärstoffen in Walnüssen. Niedermolekulare Ellagtannine sind im Wesentlichen aus Glucose als zentralem glycosidischen Bindungspartner, der Gallussäure und der Hexahydroxydiphenoylsäure (HHDP, Dimer der Gallussäure) aufgebaut. Sie können weiterhin höhermolekulare Aggregate mit Molekulargewichten bis nahezu 4000 g/mol bilden (HAGER et al., 2008). Während der Tanninhydrolyse wird die

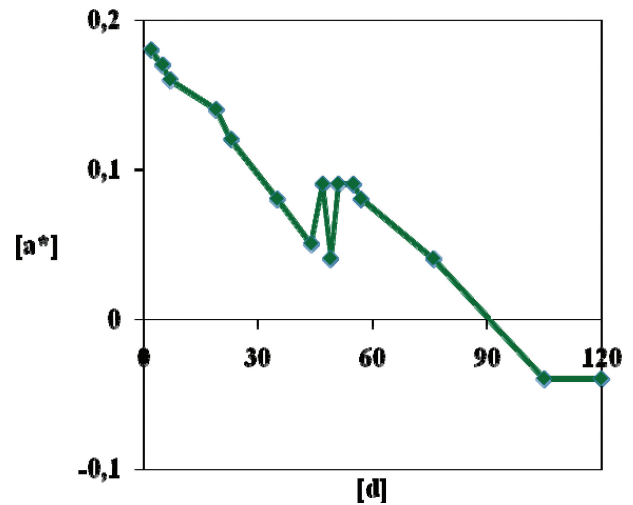


Abb. 3: Farbentwicklung ( $a^*$ , grün-rot) des 80%igen Extrakts

Hexahydroxydiphenoylsäure freigesetzt, aus der nach Lactonisierung die Ellagsäure entsteht. Auf Grund der schwierigen Zuordnung und fehlender Standardsubstanzen werden Ellagtannine meist summarisch nach methanolisch-salzsaurer Hydrolyse der Probenmatrix mittels RP-HPLC/UV als Ellagsäure bestimmt (HÄKKINEN et al., 2000). Ausgedrückt als Ellagsäureäquivalente wurden hier 550 bis 570 mg/l in den Extrakten gefunden, wobei das Maximum bei der 80%igen Variante bereits nach 60 Tagen und bei der 60%igen Variante erst nach 120 Tagen erreicht wurde (Abb. 4). Probemessungen zeigten, dass anschließend keine Veränderungen mehr stattfanden.

Abbildung 5 zeigt die chromatographische Trennung der Walnussmazerate vor und nach Hydrolyse mit methanolischer Salzsäure. Ohne Hydrolyse kommt keine "freie" Ellagsäure in den Mazeraten vor. Nach der Hydrolyse (unteres Chromatogramm) bleibt von den Ellagtanninen fast ausschließlich die Ellagsäure ( $RT = 16,92$  min) zurück. Die Lactonisierung von HHDP zur Ellagsäure scheint dabei spontan abzulaufen. Sie ist in der MS durch den Verlust von zwei Molekülen Wasser erkennbar. Einige Ellagtannine konnten nach Direkteinspritzung der Mazerate ohne weitere Probenvorbereitung mit einfacher RP-HPLC mittels massenspektrometrischer Detektion und Fragmentierung (neg. ESI- $MS^n$ ) und durch Literaturdaten (FUKUDA et al., 2003) zugeordnet werden. Die wichtigsten Vertreter waren das Casuarictin ( $RT = 7,18$  min,  $[M-H] 935$ ), das in das Isostrictinin ( $[M-H] 633$ ) und in Ellagsäure ( $[M-H] 301$ ) fragmentierte (siehe Massenspektrum in Abbildung 6) sowie das Tel-

limagrandin II (RT = 9,25 min). Letzteres besteht aus HHDP, Glucose und drei Einheiten Gallussäure. Das Fragmentierungsmuster [M-H] 937-767-465-301 bestätigte diese Zusammensetzung. Bei der Retentionszeit von 10,40 min konnte das Casuarinin zugeordnet werden, welches sich vom Casuarictin durch einen offenen Glucosering unterscheidet.

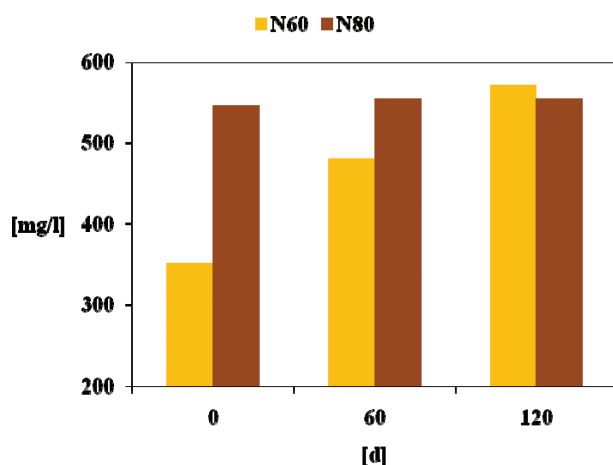
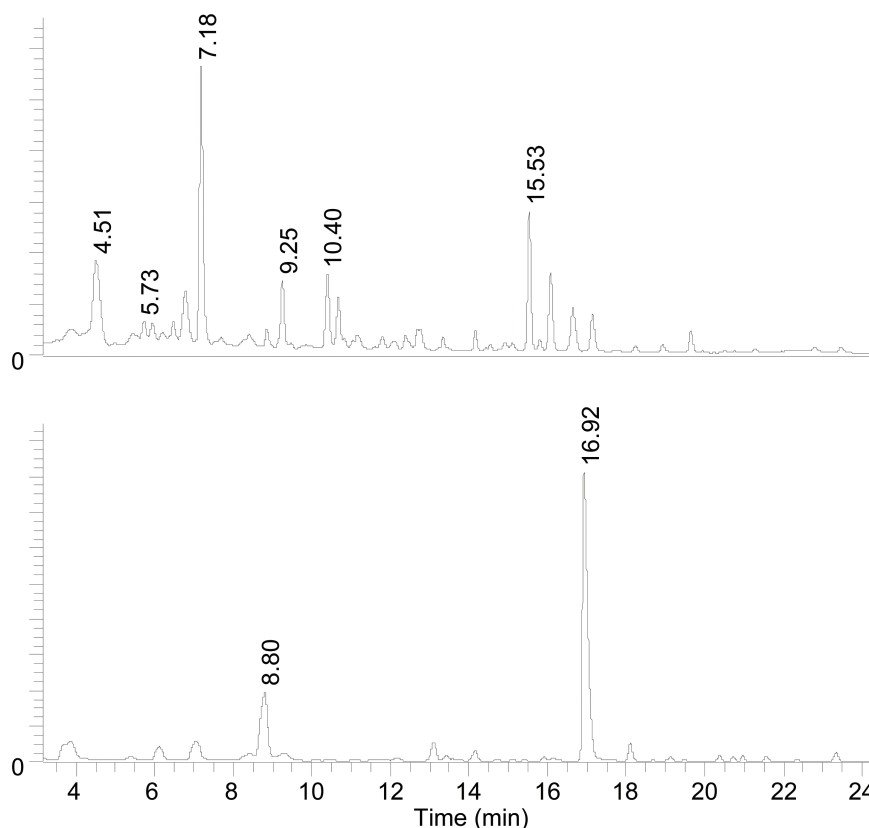


Abb. 4: Entwicklung der potenziell vorhandenen Ellagsäure in den Mazeraten (siehe oben)

## Sensorik und Aroma

Die hergestellten Mazerate zeigten beide ein intensives und typisches Walnussaroma, wobei der 80%ige Extrakt sensorisch zwar etwas verhalten, aber als angenehmer, reifer und harmonischer bewertet wurde. Dem 60%igen Mazerat wurden u. a. die Attribute unreif, grasig und grün zugeordnet. Nach gaschromatographischer Trennung und massenselektiver Detektion der SPE-Aromaextrakte der beiden Ansatzvarianten wurden 15 Aromastoffe identifiziert (Tab. 2). Neben Aromastoffen aus der Gruppe der Terpene (Limonen, Eucalyptol, Linalool, Terpinen-4-ol,  $\alpha$ -Terpineol und Eugenol), die wahrscheinlich direkt aus der Walnuss stammen, wurden auch sekundäre Aromastoffe identifiziert, und zwar C6-Verbindungen (Hexanal, 3-Hexen-1-ol), o-Guaiacol, p-Vinylguaiacol, außerdem Phenylethylalkohol und Isoamylalkohol. Bei allen Substanzgruppen wurden höhere Konzentrationen in der wässrigeren Variante N60 (Gesamtkonzentration 1503  $\mu\text{g/l}$ ) nachgewiesen, hier werden

Abb. 5: Chromatogramm N80-Extrakt vor/nach Hydrolyse (254 nm) (siehe unten)



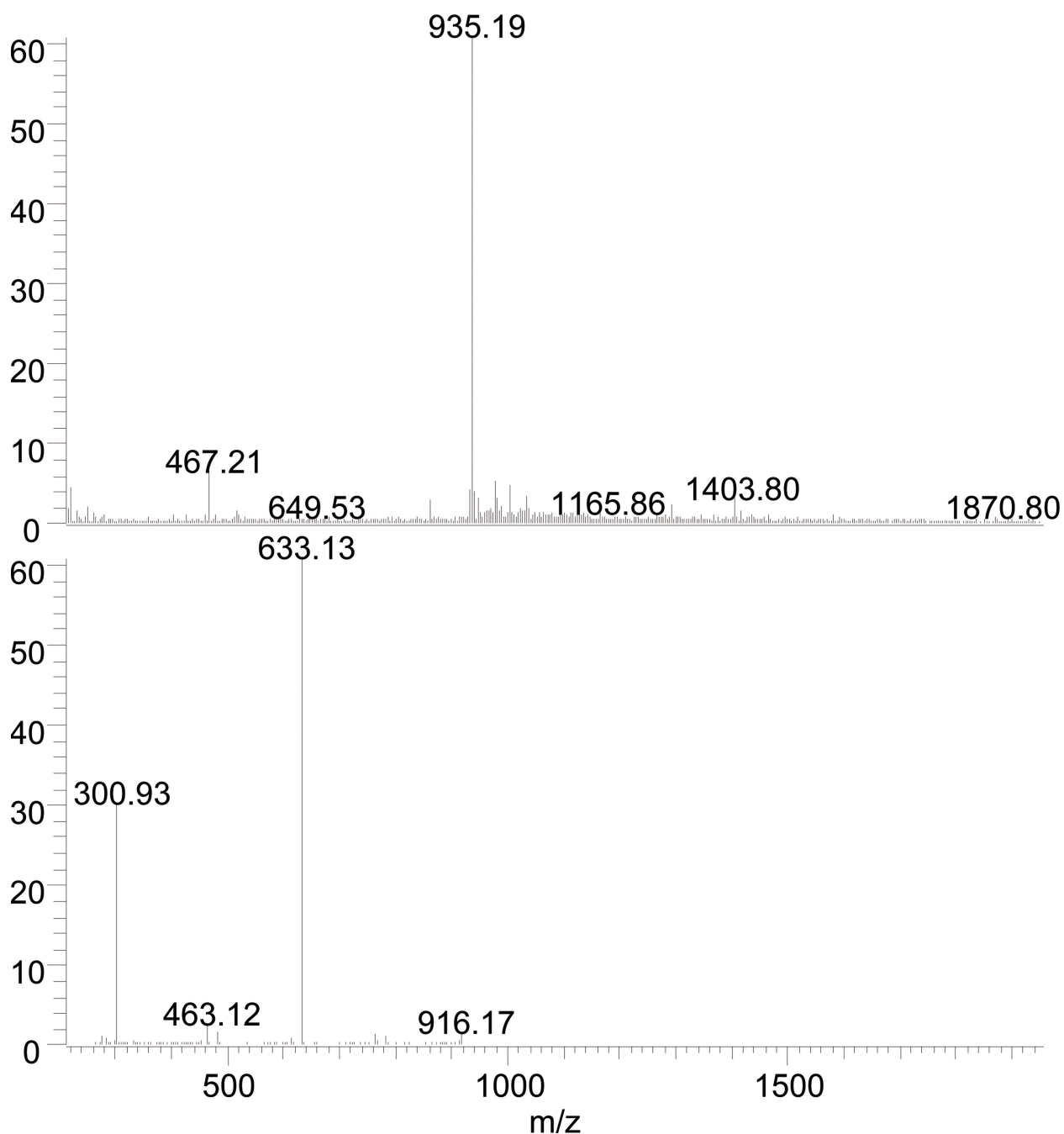


Abb. 6: Massenspektrum und Fragmentierung des Casuarictins (oben Full Scan [M-H] 935, unten MS<sup>2</sup> mit Isostrictinin [M-H] 633 und der Ellagsäure [M-H] 301)

offensichtlich Aromastoffe stärker extrahiert. Die Gesamtkonzentration der Variante N80 lag im Vergleich dazu bei 450 µg/l. Die Geruchsschwellen der Aromastoffe Eugenol (Schwellenwert 6 µg/l in Wasser, Geruch: Nelke) und p-Vinylguaiacol (Schwellenwert

5 µg/l in Wasser, Geruch: rauchig) wurde in beiden Liköransätzen deutlich überschritten. Diese Verbindungen tragen direkt zum Gesamteindruck des Aromas bei. Andere nachgewiesene Aromastoffe, wie Limonen (Schwellenwert 600 µg/l in Wasser, Geruch:

orangenartig) und Eucalyptol (Schwellenwert 100 µg/l in Wasser, Geruch: eucalyptusartig), wurden in Konzentrationen deutlich unterhalb der Geruchsschwelle identifiziert. C6-Verbindungen wie 3-Hexen-1-ol (bekannt auch als Blätteralkohol) und Hexanal (Schwellenwert in Wasser 4,5 µg/l, Geruch: grasig) tragen zu unreifen/grünen/grasigen Noten bei. In der wässrigeren Variante N60 wurde im Vergleich zu N80 mehr als das Doppelte der Konzentration an C6-Verbindungen nachgewiesen. Dies wird auch durch den sensorischen Eindruck der Ansätze bestätigt, denn der N60-Extrakt wurde sensorisch als wesentlich intensiver, aber auch grasiger und unangenehmer in der Nase beschrieben. Die Variante N80 ist weniger intensiv und eher verhalten, aber harmonischer und walnussty-pischer. Aus sensorischer Sicht führt also eine Extraktion mit höheren Alkoholkonzentrationen zu einem typischeren, weniger grasigen/unreifen Produkt.

Tab. 2: Aromastoffkonzentrationen in den Walnussmazeraten (µg/l; Mittelwerte aus Doppelbestimmungen)

	N60	N80
Hexanal	17	15
3-Penten-2-ol	9	11
3-Octanon	44	3
Limonen	7	17
Eucalyptol	51	18
Isoamylalkohol	11	5
3-Hexen-1-ol	56	15
Benzaldehyd	29	9
Linalool	31	10
Terpinen-4-ol	21	8
α-Terpineol	40	3
o-Guaiacol	28	21
Phenylethylalkohol	122	20
Eugenol	730	192
p-Vinylguaiacol	307	103

Bei der Fertigstellung der Walnussmazerate zu trinkfertigen Likören wurde der Zuckergehalt auf 300 g/l eingestellt, um eine sensorische Harmonie gegenüber der natürlichen Bitterkeit zu erreichen. Zur Zuckeringung wurde handelsübliche Invertzuckerlösung eingesetzt ("ATL-Sirup", 1 kg/l Zucker). Die Verwendung von Kristallzucker ist nicht empfehlenswert. Dieser löst sich auch unter ständigem Rühren nur sehr langsam und führt durch den Eintrag mechanischer Energie und durch den Sauerstoffkontakt zu unvermeidlichen Qualitätsverlusten. Oft reicht eine Zuckeringung mit 300 g/l nicht aus, um eine Harmonie zur Bitterkeit herzustellen. Abhängig von den Polyphenolgehalten der verschiedenen Jahrgänge wurden die Liköre

teilweise mit Zuckerzusätzen von 400-450g/l fertiggestellt. In Hinsicht auf Marketingzwecke eignet sich der italienische Ausdruck "Nocino" besser als "Walnusslikör". Diese Kennzeichnung setzt einen Mindestalkoholgehalt von 30 %vol. voraus (EU-Verordnung 110/2008, Anhang II Nr. 40), der mit dem 60%igen Ansatz durch die Volumenmehrung während der Zuckerzugabe unterschritten wurde. In diesem Fall muss die Kennzeichnung "Walnusslikör" verwendet werden. Auf Grund der sensorischen Eigenschaften und der Kennzeichnungsfrage eignete sich insgesamt die Mazeration mit der höhergradigen Alkoholvariante besser zur Likörherstellung.

## Literatur

- AMARAL, J.S., CUNHA, A.C., ALVES, M.R., PEREIRA, J.A., SEABRA, R.M. AND OLIVEIRA, P.P. 2004: Triacylglycerol composition of Walnut (*Juglans regia* L.) cultivars: characterization by HPLC-ELSD and chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* 52(26): 7964-7969
- CORDES, J.H. und SOMMER, N. (2006): Obstgehölze. (BdB-Handbuch; 6). – Wien: Ö. Agrarverl., 2006
- FUKUDA, T., ITO, H. and YOSHIDA, T. 2003: Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.). *Phytochemistry* 63: 795-801
- HAGER, T.J., HOWARD, L.R., LIYANAGE, R., LAY, J.O. and PRIOR, R.L. 2008: Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. *J. Agric. Food Chem.* 56: 661-669
- HÄKKINEN, S.H., KÄRENLAMP, S.O., MYKÄNEN, H. M., HEINONEN, I.M. and TÖRRÖNEN, A. R. 2000: Ellagic acid content in berries: Influence of domestic processing and storage. *Eur. Food Res. Technol.* 212: 75-80
- KARLIN, M. (2011): Bereitung von Ansatzlikören aus Erdbeeren, Sauerkirschen und Walnüssen. Bachelor Thesis, Hochschule RheinMain, Fachbereich Geisenheim, Getränketechnologie
- LOPEZ, R., AZNAR, M., CACHO, J. and FERREIRA, V. 2002: Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 966: 167-177
- SCHAARSCHMIDT, H. (1999): Die Walnussgewächse, 2. Aufl. – Hohenwarsleben: Westarp-Wiss., 1999
- SHIMODA, H., TANAKA, J., KIKUCHI, M., FUKUDA, T., ITO, H., HATANO, T. and YOSHIDA, T. 2009: Effect of polyphenol-rich extract from walnut on diet-induced hypertriglyceridemia in mice via enhancement of fatty acid oxidation in the liver. *J. Agric. Food Chem.* 57(5): 1786-1992
- SINGLETON, V.L. and ROSSI, J.A. 1965: Colorimetry of total phenolics with phosphoric acid reagents. *Amer. J. Enol. Vitic.* 37: 144-158
- WÜSTENFELD, H. und HAESLER, G. (1964): Trinkbranntweine und Liköre. – Berlin: Parey, 1964

Manuskript eingelangt am 29. März 2011