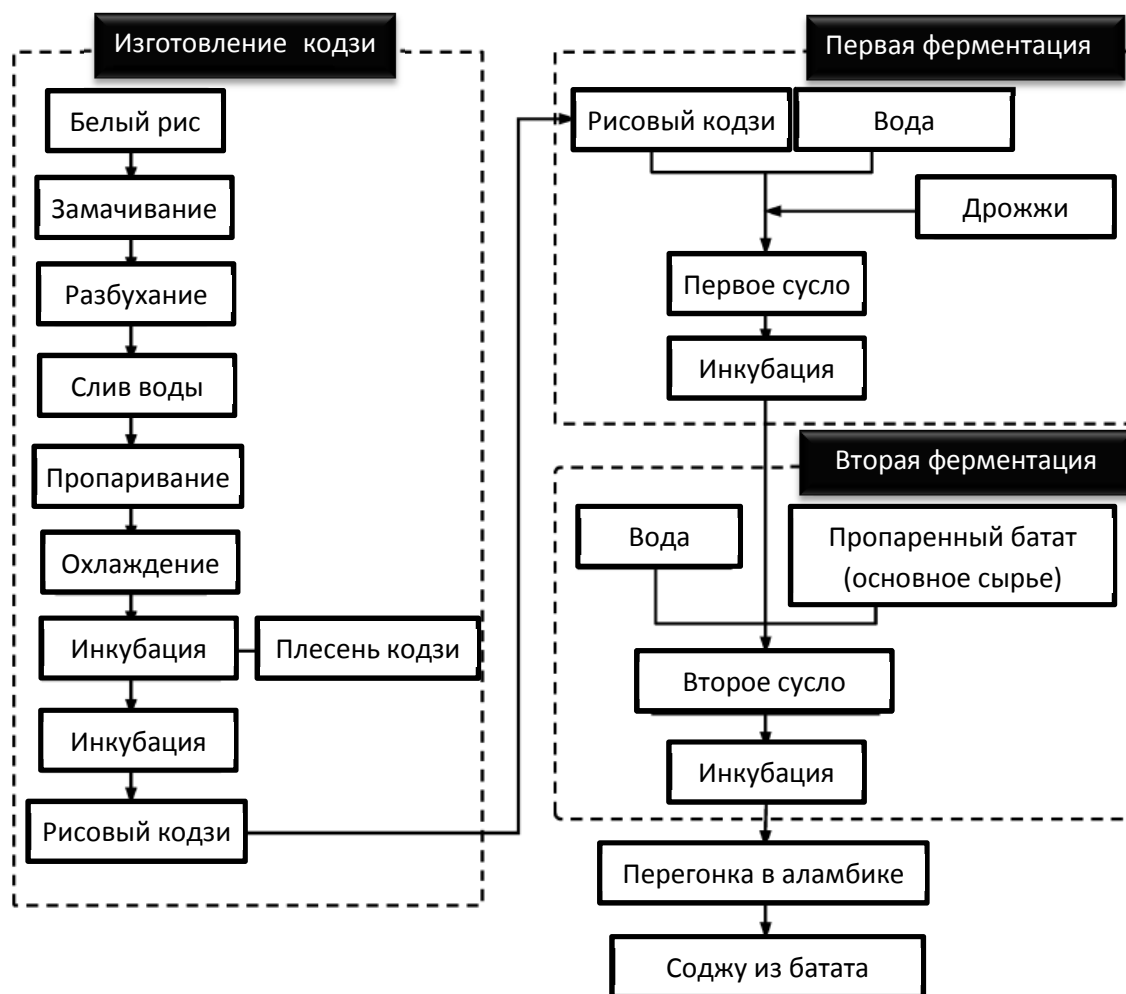


Соджу — традиционный японский дистиллированный напиток, изготавливаемый из различного крахмалистого сырья, включая рис, ячмень, батат и гречиху. Хотя этот напиток не пользуется популярностью во всем мире, его история насчитывает около 500 лет, и он является важным коммерческим продуктом в Японии. Производство соджу начинается с приготовления рисового кодзи, который представляет собой плесень кодзи (*Aspergillus* sp.), культивируемую на рисовых зернах (рис. 1). Рисовый кодзи является источником таких ферментов, как β -глюкозидаза, α -амилаза и протеаза. Смесь рисового кодзи, дрожжей и воды называется первым суслом, который инкубируется в течение 5 дней при температуре 30 °C (первая ферментация). Пропаренные крахмалистые материалы, такие как батат, добавляются к первому суслу для получения второго сусла, которое инкубируется в течение дополнительных 9 дней (вторая ферментация). Затем второе сусло перегоняется в перегонном кубе. Перегонка соджу обычно осуществляется за одну перегонку, поскольку характерный аромат исходит от крахмалистых материалов.

Соджу из батата считается самым вкусным. Были исследованы его летучие соединения, и было показано, что аромат является продуктом биохимических (ферментативная реакция рисового кодзи и дрожжей) и технологических процессов (дистилляция). Монотерпеноиды являются наиболее изученными летучими соединениями соджу из батата. Гераниол и нерол высвобождаются из глюкозидных предшественников в батате с помощью β -глюкозидазы рисового кодзи. Они также преобразуются в линалоол и α -терпинеол при нагревании в кислых условиях и в цитронеллол с помощью дрожжей. Однако, хотя сладкий аромат соджу из батата является одним из наиболее характерных запахов, отмеченных потребителями, до недавнего времени ключевое соединение не было идентифицировано. В исследовании летучих соединений в запеченном батате мальтол был ключевым компонентом сладости. Однако мальтол не был идентифицирован в соджу. В 2006 году Камиватари и др. впервые идентифицировали β -дамасценон в сладком картофельном соджу и предположили, что именно он является ключевым компонентом сладкого аромата напитка. Однако процесс, посредством которого образуется β -дамасценон, не был исследован.

β -Дамасценон был впервые идентифицирован как эфирное масло *Rosa damascena* Mill. Его аромат характеризуется как сладкий, цветочный и напоминающий яблоко. Это важное соединение в парфюмерной и пищевой промышленности и было обнаружено в различных продуктах питания и во многих алкогольных напитках, таких как рамбутан, мед, кофе, зеленый чай, вино, пиво, виски, бренди и ром. β -Дамасценон имеет чрезвычайно низкий порог запаха в воде: 2 нанограмма/литр. Его пороги запаха в 10% спирте и в белом сладком вине составляют 50 нг/л и 1,6 нг/л соответственно. β -Дамасценон может быть образован путем кислотно-катализируемого превращения полиолов (ениндиол или алленовый триол), полученных при ферментативном расщеплении каротиноидов, таких как неоксантин. Кроме того, предшественниками β -дамасценона также являются гликоконъюгаты с различными конъюгирующими группами и негликозидные соединения. β -Дамасценон высвобождается из этих предшественников β -глюкозидазой.

Целью данного исследования было изучение образования β -дамасценона во время производства соджу. Свободный и гидролитически освобожденный β -дамасценон определялся количественно на каждой стадии производственного процесса.



МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и сорта.

Для производства рисового кодзи плесень кодзи (*Aspergillus kawachii*) была приобретена у компании Kawachi Gen-ichiro (Кагосима, Япония). Штамм дрожжей Kagoshima-535 был предоставлен пивоваренной ассоциацией префектуры Кагосима (Кагосима, Япония). Одиннадцать сортов батата (Koganesengan, TSC 31, Okierabu 6, Akaimo, D2-12-3, Kansho Nourin 2, Konasengan, Anpouimo 1, Koukei 14, Tosabeni и Naruto Kintoki) были предоставлены Национальным институтом агробиологических наук (Ибараки, Япония). Батат был собран в начале ноября 2009 года в префектуре Кагосима в Японии. Батат (1 кг) был пропарен в течение 1 часа и измельчен. Образцы батата хранились при температуре -20°C до анализа.

Приготовление второго сусла.

Процесс приготовления соджу из батата показан на рис. 1. Белый рис (1 кг) замачивали в воде в течение 1 ч, затем излишки жидкости сливали в течение 1 ч. Рис пропаривали в течение 1 ч, затем охлаждали до 40 °C перед инокуляцией конидиями *A. kawachii*. После инокуляции рис переносили в помещение для выращивания грибковой культуры в подходящих условиях температуры и влажности. Во время выращивания начальная температура рисового кодзи обычно поддерживалась на уровне 35 °C. Температура медленно повышалась по мере выращивания в течение первых 16 ч из-за роста микроорганизмов. Когда она достигала 40–42 °C, температуру

рисового кодзи поддерживали на уровне 37 °C в течение 20 ч путем проветривания помещения, после чего кодзи медленно охлаждали до комнатной температуры в течение 2 ч. К готовому рисовому кодзи (200 г) добавляли в 240 мл воды и 4 мл дрожжевого стартера и ферментировали в течение 5 дней при температуре 30°C (первая ферментация). Сладкий батат сорта Koganesengan (1 кг) пропаривали в течение 1 часа и измельчали. Измельченный батат добавляли в первое сусло с 560 мл воды (второе сусло). Второе сусло ферментировали еще 9 дней (вторая ферментация).

Дистилляция второго сусла происходила путем однократной перегонки второго сусла в стеклянном дистилляционном аппарате (стеклянный куб, соединенный со стеклянным куполом). Брагу (1 кг) перегоняли с использованием пара. Дистиллят охлаждали водой. Конец перегонки наступал, когда содержание алкоголя в дистилляте достигало около 37%. Дистиллят фильтровали и разбавляли 25% спиртом. Образцы соджу хранили при комнатной температуре до анализа ГХ-МС. Для анализа влияния pH второго сусла во время перегонки добавляли 10 М лимонной кислоты или 10 М растворов NaOH для корректировки pH до 3,5 или 7,0 соответственно перед перегонкой. При перегонке второго сусла подаваемое напряжение колбонагревателя было отрегулировано до 120 В, 90 В и 60 В, чтобы исследовать влияние периода перегонки. Для анализа профиля концентрации β -дамасцена дистиллят был фракционирован на 13 фракций по 30 мл в пробирках с завинчивающейся крышкой. Концентрация этанола в каждой фракции была проанализирована с помощью измерителя плотности/удельного веса (DA-155; Kyoto Electronics Manufacturing Co., Ltd. Япония).

Соджу, изготовленный из прочих сортов батата.

В готовый рисовый кодзи (50 г) добавляли в 60 мл воды и 1 мл дрожжевого стартера и ферментировали в течение 5 дней при 30 °C. Криоконсервированные сорта батата (300 г) размораживали при комнатной температуре и добавляли в первый затор с 90 мл воды. Второй затор ферментировали еще 9 дней и перегоняли в стеклянном дистилляционном аппарате. Второй затор (400 г) перегоняли с паром, как описано ранее.

Термическая обработка батата и второго затора.

Замороженный батат (10 г) добавляли к 40 мл деионизированной воды и гомогенизировали в течение 1 мин. Для анализа влияния pH гомогенизированные образцы доводили до pH от 2 до 7 с помощью 1 М HCl или 1 М NaOH. Объемы образцов доводили до 50 мл деионизированной водой. Образцы переносили в пробирки с завинчивающейся крышкой и кипятили в течение 1 ч. Для анализа влияния времени кипячения готовили образцы при pH 2 и кипятили в течение 15, 30, 45, 60, 75 и 90 мин. Для анализа влияния ферментации отбирали 100 мл второго затора и гомогенизировали в течение 1 мин. Свободный β -дамасценон во втором заторе измеряли путем анализа гомогената. Гомогенат кипятили в течение 1 ч перед количественным определением общего свободного и гидролитически выделенного β -дамасцена.

Термическая обработка различных видов органических кислот.

К замороженному батату (10 г) добавляли 40 мл 0,1 М лимонной кислоты или молочной кислоты и гомогенизировали в течение 1 мин. Гомогенизированные образцы доводили до pH 3,5 с помощью 1 М NaOH. Объемы образцов доводили до 50 мл с помощью деионизированной воды. Образцы переносили в пробирки с завинчивающейся крышкой и кипятили в течение 1 ч.

Биотрансформация β -дамасцена дрожжами.

β-дамасценон добавляли в конечной концентрации 400 мкг/л в 50 мл среды YPD. Дрожжевую посевную среду (1 мл) инокулировали в среду YPD, содержащую β-дамасценон. Контрольные образцы не инокулировали дрожжами. Обе серии образцов (по три каждого) инкубировали при 30 °C, и ежедневно анализировали концентрацию β-дамасценона.

Отбор проб большого объема статического парофазного пространства (LVSH).

Летучие компоненты парофазного пространства собирали в системе LVSH (серия Entech 7100A; Entech Instruments Inc., Simi Valley, CA). Образцы батата и второго затора (10 мл) переносили в бутылку для образцов объемом 450 мл. Образцы дистиллята и соджу (10 мл) переносили в бутылку для образцов объемом 250 мл. Для количественного определения в образцы добавляли 1 мл 1-пентанола (10 мг/л) в качестве внутреннего стандарта. После инкубации при 30 °C 200 мл парофазного газа извлекали вакуумом из бутылки для образцов объемом 450 мл. 100 мл парофазного газа извлекали вакуумом из бутылки для образцов объемом 200 мл. Летучие соединения адсорбировались на 2 tandemно расположенных ловушках (Entech Instruments Inc.), которые были заполнены различными неподвижными фазами: ловушка 1, стеклянные шарики/смола Tenax; ловушка 2, смола Tenax. Летучие соединения десорбировались термодесорбцией с использованием предварительного концентратора Entech 7100A и подавались в систему ГХ-МС.

Газовая хроматография-масс-спектрометрия (ГХ-МС).

Количественное определение летучих соединений проводилось с использованием газового хроматографа серии Agilent 6890 (Agilent Technologies Inc., Пало-Альто, Калифорния), оснащенного масс-селективным детектором Agilent 5975B. Все масс-спектры были получены в режиме электронного удара (ЭУ). Система ГХ-МС была оснащена колонкой DB-WAX (60 м × 0,25 мм внутр. диам., толщина пленки 0,25 мкм; Agilent Technologies Inc.). Условия работы ГХ были следующими: температура инжектора 220 °C; линия передачи 250 °C; температура квадрупольной ионной ловушки 150 °C; температура источника ионов 250 °C. Анализы проводились с использованием гелия в качестве газа-носителя при скорости потока 1,0 мл/мин со следующей температурной программой: 40 °C в течение 5 мин, 7 °C в минуту до 240 °C. Инжектор и детектор поддерживались при 250 °C и 300 °C соответственно. Количественные определения были получены с использованием 1-пентанола (m/z 55) в качестве внутреннего стандарта. Содержание летучих соединений рассчитывалось из соотношения площадей пиков ГХ и площади пиков ГХ внутреннего стандарта. Калибровочные кривые для β-дамасценона (m/z 121), фурфурола (m/z 96) и изобутанола (m/z 74) были получены с использованием оптимизированного метода отбора проб LSVH.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

β-Дамасценон, высвобождаемый кислотным гидролизом из батата.

Было исследовано образование β-дамасценона на каждом этапе производственного процесса. Сорт батата Коганесенган используется более чем 90% производителей соджу из-за его высокого содержания крахмала и приятного запаха при перегонке в соджу. Поэтому для этого эксперимента использовался Коганесенган. Свободный β-дамасценон в образцах пропаренного батата был количественно определен с помощью анализа газа в свободном пространстве методом ГХ-МС. Свободный β-дамасценон присутствовал в количестве около 0,02 мкг/г в пропаренном батате. β-дамасценон образуется путем кислотного гидролиза из нескольких прекурсоров в вине Рислинг.

Во-первых, чтобы исследовать надлежащие условия pH для высвобождения β -дамасцена из его прекурсора, батат кипятили при pH от 2 до 7. Эффективность кислотного гидролиза увеличивалась с уменьшением pH (рис. 2). Таким образом, pH 2 лучше всего подходил для кислотного гидролиза батата. Во-вторых, было исследовано время, необходимое для высвобождения β -дамасцена из его предшественников при pH 2. Кислотный гидролиз соединений-предшественников достигал равновесия через 30 мин и был завершен через 60 мин (рис. 3). Таким образом, все образцы подвергались кислотному гидролизу в течение 60 мин. Общие уровни свободного и гидролитически высвобожденного β -дамасцена в батате (1,16 мкг/г) были в 58 раз выше, чем в пропаренном батате. Таким образом, большая часть β -дамасцена в соджу образуется во время ферментации и/или дистилляции, а не во время первоначальной пропарки батата.

pH второго затора был ниже (около pH 3,5), чем у гомогенатов пропаренного батата (pH 5,9), поскольку *Aspergillus* spp., используемые в производстве соджу, генерируют лимонную кислоту. Кроме того, молочная кислота обычно используется в качестве ингибитора загрязнения в производстве японского саке. Было исследовано влияние различных видов органических кислот на образование β -дамасцена (рис. 4). Образец, обработанный HCl для подкисления pH, использовался в качестве контроля. Уровни β -дамасцена существенно не различались между разными видами органических кислот и HCl. Таким образом, на образование β -дамасцена из батата в основном влияет pH второго затора.

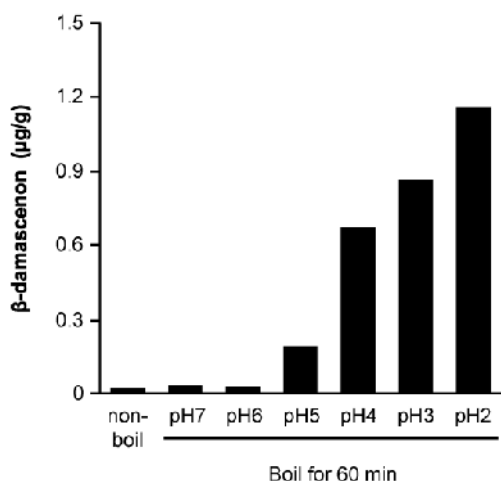


Рис. 2

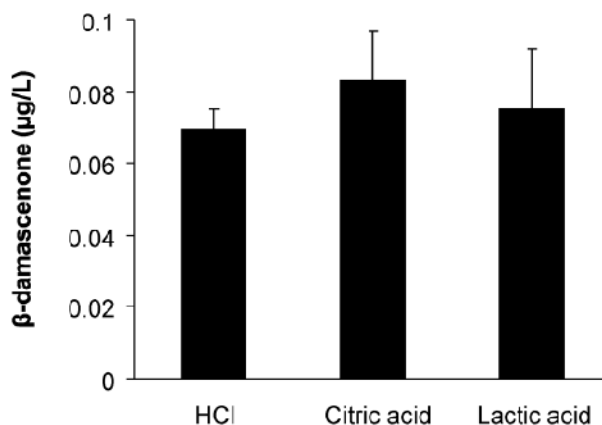


Рис. 4

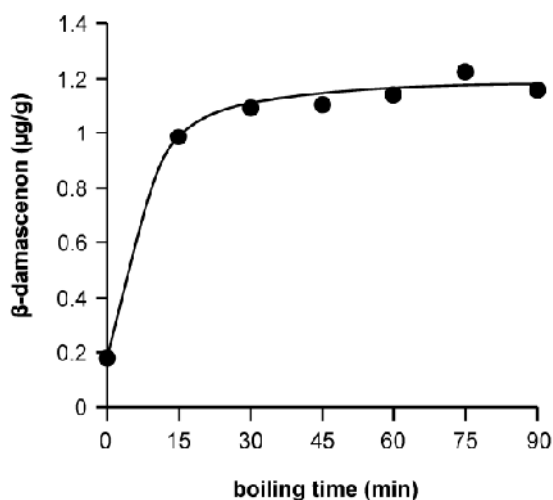


Рис. 3

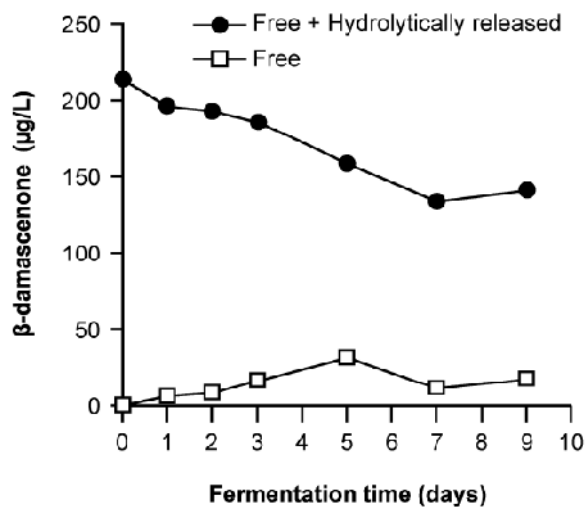


Рис. 5

Влияние ферментации на уровень β -дамасцена во втором заторе.

Второе сусло содержало β -глюкозидазу, полученную из рисового кодзи, и инкубировалось при комнатной температуре в течение 9 дней¹³. Во время ферментации второго сусла β -дамасценон может высвобождаться из гликоконъюгированных предшественников ферментативной активностью β -глюкозидазы. Кроме того, pH второго сусла был ниже (около pH 3,5), чем у пропаренных гомогенатов батата (pH 5,9), поскольку *Aspergillus* spp., используемые в производстве соджу, производят лимонную кислоту. Таким образом, дистилляция проводилась при низком pH и является еще одним процессом, который дает β -дамасценон.

Для анализа эффекта ферментации с течением времени, во втором заторе количественно определяли свободный и гидролитически высвобожденный β -дамасценон (рис. 5). Свободный β -дамасценон постепенно увеличивался, пока не достиг пика на 5-й день; он начал уменьшаться на 7-й день. Общие уровни свободного и гидролитически высвобожденного β -дамасцена снижались по мере ферментации; в конце ферментации было потеряно около 35%. Более того, свободный β -дамасценон был намного ниже общего β -дамасцена от начала до конца. На конечной стадии ферментации свободный β -дамасценон (приблизительно 17 мкг/л) составлял одну восьмую от общего уровня β -дамасцена, что указывает на то, что свободный β -дамасценон образовывался во время ферментации, но одновременно деградировал. Свободный β -дамасценон во втором заторе не накапливался.

Было исследовано влияние дрожжей на свободный β -дамасценон. Конечная концентрация 400 мкг/л β -дамасцена была добавлена вместе с дрожжами в среду YPD и культивирована. Образцы без дрожжей использовались в качестве контроля. Уровни β -дамасцена измерялись ежедневно. В среде, обработанной дрожжами, β -дамасценон снизился с 1-го дня по сравнению с контролем и упал до 52 мкг/л к 4-му дню (13%) (рис. 6). β -дамасценон экспоненциально снижается в браге при ферментации. Эти результаты показывают, что подавление β -глюкозидазы и деградация дрожжами могут увеличить свободный β -дамасценон в соджу.

Образование β -дамасцена при перегонке.

Мы проанализировали профиль концентрации β -дамасцена в дистилляте, чтобы исследовать влияние нагревания во время дистилляции. Приготовленный второй затор содержал 14,4% этанола. Для дистилляции 1 л второго затора потребовалось около 1 ч 30 мин. Дистиллят был фракционирован на 13 образцов по 30 мл. β -дамасценон во фракциях был проанализирован с помощью ГХ-МС. В качестве эталонов также были проанализированы этанол, изобутанол и фурфурол. Изобутанол является одним из высших спиртов, а высшие спирты являются наиболее важной группой летучих соединений в жидкости. Высшие спирты образуются по пути Эрлиха в дрожжах. Поэтому изобутанол присутствовал во втором заторе до дистилляции. Фурфурол является одним из альдегидов, содержащихся в соджу. Он образуется в результате деградации сбраживаемых сахаров (пентозы), вызванной нагреванием в кислых условиях и/или реакцией Майяра. Таким образом, фурфурол образуется во время дистилляции и наиболее распространен в последней фракции. Концентрации этанола и изобутанола снизились с примерно 60% и 310–340 мкг/л в первой фракции до примерно 39% и 115 мкг/л в середине дистилляции, а затем медленно снижались до конца процесса (рис. 7). Между тем, фурфурол увеличился, как и ожидалось. Профиль концентрации β -дамасцена увеличился с фурфуролом в последних фракциях. В то время как свободный β -дамасценон присутствовал в количестве 17 мкг в 1 л второго затора (рис. 5), 76 мкг было получено путем перегонки 1 л второго затора, что указывает на то, что большая часть β -дамасцена в соджу образуется путем кислотного гидролиза во время перегонки.

Каждый литр второго затора содержал около 500 г батата, и было подсчитано, что общее количество свободного и гидролитически высвобожденного β -дамасцена составил около 600 мкг (рис. 2 и рис. 3). Таким образом, эти результаты показали, что значительное количество β -дамасцена и его предшественников осталось во втором заторе после перегонки.

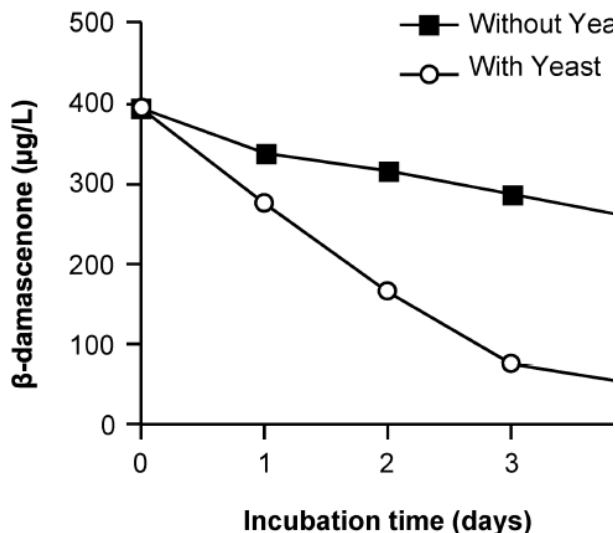


Рис. 6

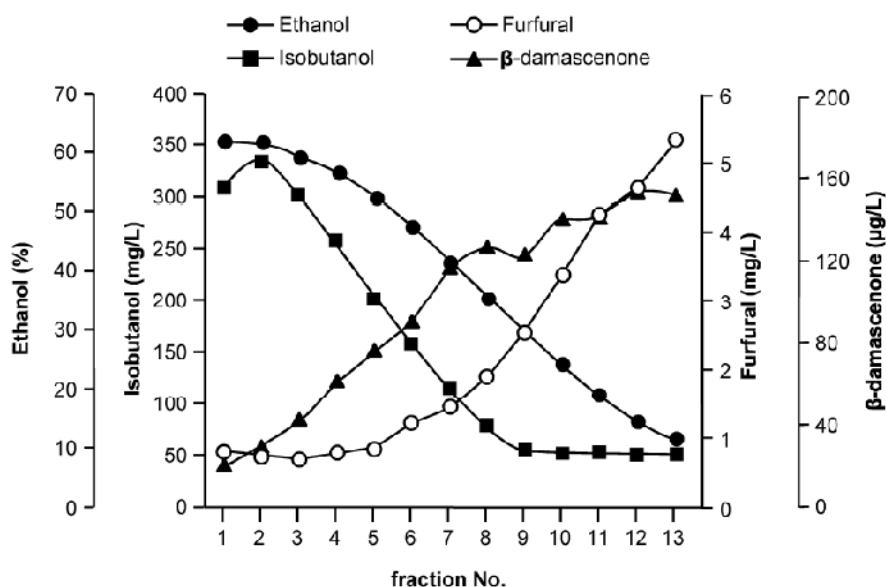


Рис. 7

Предполагается, что содержание β -дамасцена в соджу может быть увеличено путем улучшения условий дистилляции и/или оборудования. Было изучено влияние периода дистилляции на уровень β -дамасцена в соджу (таблица 1). Для трех дистилляций по 1 л второго было затрачено около 40, 80 и 300 мин. Было подтверждено, что содержание алкоголя в дистилляте составило около 37%. Дистилляты, полученные в каждом периоде, составили 390, 395 и 375 мл. По мере удлинения периода дистилляции уровни β -дамасцена умеренно увеличивались, что позволяет предположить, что удлинение периода дистилляции является одним из методов, который можно использовать для увеличения β -дамасцена в соджу. Кроме того, было исследовано, влиял ли pH второго затора во время дистилляции на уровень β -дамасцена в соджу (таблица II). Уровень β -дамасцена во втором заторе при pH 3,5 был выше, чем во втором заторе при pH 4,0 и pH 7,0. Этот результат предполагает, что содержание лимонной кислоты в рисовом кодзи является одним из ключевых факторов, определяющих уровень β -дамасцена в соджу.

Зависимость концентрации β -дамасцена и его предшественников от сорта батата.

Существует множество сортов батата с различным цветом мякоти, вкусом и ароматом. Нами были использованы выборка из этих сортов батата для производства соджу с характерным ароматом. Была выдвинута гипотеза, что содержание β -дамасцена зависит от сорта используемого батата, этот вопрос ранее не рассматривался. Было проанализировано содержание β -дамасцена и его предшественников в 11 сортах батата и соджу, изготовленных из этих сортов батата (таблица III). Свободный β -дамасценон был очень низким в протестированных сортах (эти данные не показаны). Среднее содержание β -дамасцена в батате составило 3,2 мкг/г. Сорт с самым высоким содержанием был Наруто Кинтоки (4,3 мкг/г), а сорт с самым низким содержанием был Тосабени (1,3 мкг/г), разница составила 3,3 раза. Соджу был изготовлен с использованием 11 сортов батата. Для перегонки 400 мл второго сусла затрачивалось около 30 минут. Сорт с самым высоким содержанием был Kopasengan (156,2 мкг/л), а сорт с самым низким

содержанием был Tosabeni (40,3 мкг/л). Была обнаружена сильная связь между содержанием β -дамасценона в батате и в соджу. Предполагается, что выбор сортов и/или улучшение этих сортов важны для производства соджу. Поэтому предполагается, что важно идентифицировать маркерные соединения или ферменты для оценки содержания β -дамасценона в батате. Хотя каротиноидный пигмент был предложен в качестве индикатора содержания β -дамасценона, содержание пигмента не коррелировало с общим содержанием β -дамасценона и его предшественников (данные не показаны). В томате фермент расщепления каротиноидов способствует содержанию летучих соединений, таких как β -ионон. Поэтому следует также изучить такие ферменты, как фермент расщепления каротиноидов.

ВЫВОДЫ

В этом исследовании был проведен количественный анализ свободного и гидролитически высвобожденного β -дамасценона во время производства соджу для изучения механизма образования β -дамасценона в соджу. Пропаренный батат и второе сусло не содержали свободного β -дамасценона, и большая часть β -дамасценона в соджу образовалась во время дистилляции путем кислотного гидролиза. Однако значительное количество β -дамасценона и его предшественников остается в барде после дистилляции. Было показано, что уровень β -дамасценона в соджу можно повысить, снизив pH второго сусла и увеличив период дистилляции. Общее содержание β -дамасценона и его предшественников различалось среди сортов батата. Предполагается, что выбор сорта важен для увеличения количества β -дамасценона в соджу.

Table I. Total β -damascenone level in *shochu* after different distillation periods.

Distillation period (min)	β -damascenone level in <i>shochu</i> (mg)
40	25.9
80	57.3
300	89.5

Table II. The effect of second mash pH on the total β -damascenone level in *shochu*.

pH of second mash	β -damascenone level in <i>shochu</i> (mg)
3.5	39.3
4	23.2
7	N.D. ^a

^aNot detected.

Table III. The β -damascenone level in sweet potato and *shochu* from different cultivars.

Cultivar	Flesh color	β -damascenone content	
		Sweet potato ($\mu\text{g/g}$)	<i>Shochu</i> ($\mu\text{g/L}$)
Koganesengan	Pale yellow–white	2.0	54.6
TSC 31	Pale yellow	3.0	141.4
Okierabu 6	Yellow–light yellow	1.8	55.7
Akaimo	Light yellow	3.5	89.4
D2-12-3	Pale yellow	2.8	119.3
Kansho Nourin 2	Pale yellow	3.2	94.6
Konasengan	Pale yellow	4.0	156.2
Annouimo	Light yellow	3.2	99.4
Koukei 14	Pale yellow–light pale yellow	3.8	113.2
Tosabeni	Light yellow	1.3	40.3
Naruto Kintoki	Light yellow	4.3	142.7

Таблица 3.