クールステージ付きナチュラル走査電子顕微鏡 (チルド SEM) による蒸米並びに麴の観察

松永恒司・古川恵司・家村芳次・渡辺和彦*・和田正夫**

<菊正宗酒造(株)総合研究所・*兵庫県立中央農業技術センター・**日立計測エンジニアリング株式会社>

平成 10 年 8 月 10 日受理

View of Steamed Rice and *Koji* using a Variable Pressure Scanning Electron Microscope with a Cooling Stage

Koji MATSUNAGA, Keiji FURUKAWA, Yoshitsugu IEMURA, Kazuhiko WATANABE*, and Masao WADA**

(General Research Laboratories of Kiku-masamune Sake Brewing Co., Ltd., 1-8-6

Uozaki-nishimachi, Higashinada-ku, Kobe, Hyogo 658-0026

*Hyogo Agricultural Reserch Institute, 1553 Minaminooka-kou, Beppu-cho, Kasai, Hyogo 679-0198

**Hitachi Instruments Engineering Co., Ltd., 882 Ichige Hitachinaka, Ibaraki 312-0033)

In order to investigate the characteristics of rice for sake brewing, we examined the structure of rice grains with a variable-pressure scanning electron microscope with a cooling stage (named Chilled SEM). Chilled SEM allows microscopy of water-containing wet specimens without the need for preparation by suppressing the vaporization of water. 1. The structure of the endosperm and amyloplast of steeped rice grains looked the same as that observed before steeping, but in white-core grains, a big longitudinal crack along the central side of the rice grain was formed by steeping. 2. When the rice was steamed, the cross section of the rice grains looked like a paste. In the white-core portion of the grain, the appearance did not change for fifty hours or more, but another portion had an orderly arrangement of endosperm cells, like polished rice, when left for five hours after steaming. 3. In the *koji* making process, the mycelia of *Aspergillus oryzae* generally penetrate the rice grains from the outside surface, but in the white-core grains, it penetrated from the longitudinal crack formed along the central side of the rice grain. We confirmed that the mycelia penetrated not only along the gap of the endosperm cells, but into the endosperm of the rice while digesting starch granules.

Key words : チルド SEM, 心白, ハゼ込み

緒 言

酒造好適米には米粒の中心部に心白と呼ばれる不透明な部分が存在し、吸水や蒸米の弾性、麴のハゼ込みなどに影響を及ぼすと考えられている¹⁾²⁾³⁾。心白の構造について安藤・市川は SEM によって米粒を観察し、心白部分のデンプンは一般米と比較して複粒、単粒と

も大きさ、形状が異なり、かつ粒子間の間隙が大きく、このような構造によって光が屈折、乱反射するために心白部分が白く不透明に見えると述べている⁴⁾。また松田他も SEM 観察により心白部分はアミロプラストが小型で間隙に富む構造をとっていると報告している⁵⁾。

ところが SEM では電子を光源とするため、観察時、

試料は常に高真空中に置かれ、像形成の信号源となる高いエネルギーの電子ビーム照射を受ける。そのため、そのまま観察すると、非導電性試料は帯電現象による像障害が、また熱に弱い試料は電子ビームによる熱での試料損傷がそれぞれ起こる。さらに食品、生物などの含水試料は水分の蒸発によって表面形態が変化し、試料の実体に忠実な観察が難しくなる。そこでこのような現象をさけるため、あらかじめ試料に適した前処理を行うのが一般的である。安藤・市川⁴⁾は米粒を凍結乾燥後、金蒸着して、松田他⁶⁾はグルタルアルデヒドとオスミック酸で固定し、脱水後液体窒素で凍結切断して観察を行っている。

最近、水や油を含む試料を前処理を省き、SEM で簡便に観察する方法として1~270 Pa の低真空中で観察が可能なナチュラル SEM があるが、さらにその付属装置としてクールステージで試料を常温~-10°C の範囲で冷却しながら観察できるチルド SEM が開発された⁷⁾。チルド SEM は試料の前処理が不要だけでなく、試料を冷却して飽和蒸気圧を低くすると急激な水分蒸発の抑制効果があるため、試料中の水分蒸発を最小に抑えることができ、より自然に近い形で水分を含む試料を観察することができる。この装置を用いて我々は心白米の白米並びに一部蒸米を観察して従来とは若干異なる SEM 画像を得ている⁸⁾。

本報告では、さらにチルド SEM によって前処理なしで心白米の浸漬後の白米、蒸米、並びに麴の観察を試み、心白米の特徴について2, 3の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 供試原料米

供試品種は山田錦、日本晴、祝で、精米歩合70%のものをを用いたが、山田錦では心白を有するもの（以後心白粒という）と、外観上心白の認められないもの（以後無白粒という）を選別して用いた。祝は心白を有するものをを用いた。

2. 蒸米の調製

白米を15°Cで一晩浸漬した後、45分間蒸きょうした。

3. 蒸米の放置

蒸米をチャック付きポリ袋に密閉し、35°Cで放置した。

4. 製麴

蒸米に種麴（今野もやし）を所定量散布し、恒温恒湿器にて35°C、相対湿度98%一定で製麴した。植菌後12, 24, 32, 46時間目に出麴した。

5. チルド SEM 観察

蒸米並びに麴の中心付近で長軸に垂直（背腹径に平行）な方向にかみそりの刃を軽くあて、割れ目を作りつつ割って、横断面を得た。切断した断片は木工用ボンドで試料ホルダに固定し、あらかじめ冷却（-10°Cに設定）した試料ステージに装着し、一切の前処理を行わず圧力30 Paの試料室で観察した。加速電圧は15 kV、観察倍率は、50, 100, 200, 300, 500, 1000倍とした。これらの一連の操作はS-3200 N型ナチュラル SEM にクールステージを装着した、日立チルド SEM を用いて行った。

実験結果

1. 浸漬後の白米

米の胚乳細胞は通常、中心部から放射線状に整然と並んで観察されるが、浸漬後もこの放射線状の配列は確認された。胚乳細胞内のアミロプラストはその多くで包膜が破れ、デンプン小粒が露出して観察されたが、小粒の形状自体は浸漬前と大差なかった。これらの構造的な変化は心白部分でもそれ以外の部分でも同様に観察され、両方で吸水や膨潤の特性に大きな違いはないと思われた。但し、山田錦の心白粒並びに祝では米の背腹径に沿って、即ち心白面に沿って必ず大きな亀裂が入っているのが特徴的であった¹⁾。この亀裂はそ

Fig.1 a Photograph of cross section of steeped rice grains, white-core grain of Yamadanishiki.

Fig.1 b *Nipponbarei*.

Fig.2 b *Yamadanishiki* without white-core.

Fig.1 c white-core grain of *Iwai*.

Fig.2 c *Nipponbare*.

Fig.2 a Photograph of the cross section of steamed rice grains, white-core grain of *Yamadanishiki*.

のまま蒸米並びに麴においても観察された (fig.1 a, b, c)。三品種とも心白面に沿った大きなもの以外にも、大小の亀裂が観察されたが、これらは白米や蒸米では見られなかったことから、多くは試料を割断する際の

物理的な衝撃や、乾燥によって生じたアーティファクトであると思われる。

2. 蒸米

蒸米は蒸した直後には心白粒、無白粒、日本晴とも白米で見られた胚乳細胞の配列が観察されにくく、全体になだらかな感じであった (fig.2 a, b, c)。しかし日本晴、並びに無白粒は放置後5時間目には白米で見られるような胚乳細胞の配列がはっきりと観察された⁹⁾ (fig.3 a, b)。これに対して心白粒は蒸米の周囲（白米において透明に見えていた部分）で胚乳細胞の配列が観察されたが、白米の背腹径に沿った部分（白米において白く見えていた部分、心白部分）では胚乳細胞の配列が認められなかった (fig.3 c)。これは山田錦の中心部では再結晶化が起こらないとする荒巻他の報告¹⁰⁾と一致した。この状態は放置後50時間目においても観察された (Fig.4)。祝は、放置5時間目では蒸米断面全体で胚乳細胞の配列が観察されなかった (fig.5)。

Fig.3 a Photograph of the cross section of steamed rice grains, left for 5 hours after steaming at 35°C, *Nipponbare*.

Fig.3 b *Yamadanishiki* without white-core.

Fig.3 c white-core portion of *Yamadanishiki* along the longitudinal crack.

3. 麴

製麴 12, 24, 32, 46 時間目に観察したところ、12 時間目には麴表層部でのみ菌糸の伸張が見られたが

Fig.4 Photograph of the cross section of the white-core portion of a steamed rice grain of *Yamadanishiki*, left for 50 hours after steaming at 35°C.

Fig.5 Photograph of the cross section of a steamed rice grain of *Iwai*, left for 5 hours after steaming at 35°C.

(fig.6), 24 時間目には蒸米内部へも菌糸が伸長していた (fig.7)。麴菌の菌糸は胚乳細胞間隙だけでなく、デンプンをとかしながら胚乳細胞内部へも伸長するのが認められた¹⁰⁾ (fig.8 a)。心白粒では浸漬時に生じる心白面に沿った亀裂が残存するため、亀裂表面でも蒸米表面と同様に菌糸が伸長し、米粒内部へ破精込むものが観察された (fig.8 b)。

考 察

従来の SEM 観察では水分を含む生物系試料の場合には、固定・脱水・乾燥・蒸着等の化学固定プロセスが必要であった。また凍結による試料作成法として、急速凍結乾燥法や緩慢凍結乾燥法があるが、前者によ

Fig. 6 Photograph of spores and mycelia of *Aspergillus oryzae* on the surface of steamed rice. Cultivation time was 12 hours. A : spore ; B : mycelia.

Fig.7 Photograph of *koji* prepared from Yamadanishiki. Cultivation time was 24 hours. A : the cross section ; B : the longitudinal crack face along the central side of the rice grain.

る飯米の観察では胚乳細胞の境界に存在した水が凍結したときに多くのクラックが生じる。また、後者の緩慢凍結乾燥法で観察すると、凍結時に生じた氷晶の成長による凍結濃縮により生じる網目構造が観察されるなど、氷晶に起因するアーティファクトの生成物を観察してしまう危険性があった¹¹⁾。しかし本研究で用いたチルド SEM は一切の前処理を行わず試料を直接観察でき、また長時間の観察においても試料の収縮や微細構造の変化がほとんどなく、試料を生に近い状態で観察できた。

我々は以前このチルド SEM で酒造好適米である山田錦の心白部分を観察した⁸⁾。その結果、山田錦の心白以外の部分や一般米である日本晴ではアミロプラス

Fig. 8 a Photograph of the cross section of *koji* prepared from Yamadanishiki, outside surface portion.

Fig. 8 b white-core portion.

トが五角錐台形型の結晶が密着しているのに比べると、じゃがいも様のため若干の間隙は認められるものの、従来の電子顕微鏡による観察で見られた様なデンプン粒子間の極めて大きい間隙は認められなかった。そのため心白部分などが白く見える原因はアミロプラスト間の間隙ではなく、アミロプラストのじゃがいも様の形状やそれらに起因する密度の違いによるのではないかと報告した。

このような形状や密度の違いは浸漬時の吸水や膨潤の様子に何らかの影響を及ぼすのではないかと予想された。しかし米粒全体としてみると心白粒では無白粒や日本晴と異なり、浸漬時に心白面に沿って大きな亀裂が生じるという違いが見られたものの、胚乳細胞やアミロプラスト等の微細な構造を見ると、心白部分も日本晴を含むそれ以外の部分も、浸漬前後で外観上の変化は特に認められなかった。

これに対して蒸米では心白部分とそれ以外の部分で

その状態に大きな差が認められた。蒸米の断面は蒸きょう直後には心白の有無に関わり無く糊状でなだらかに見えるが、心白以外の部分では蒸米放置後5時間目には、白米で見られたような胚乳細胞の放射線状の配列構造が再び観察されるようになった。ところが山田錦の心白部分ではそのような配列構造が観察されず、蒸米放置50時間目でも同様であったことから、心白部分では心白以外の部分とは異なり、蒸米を放置しても再び胚乳細胞の配列構造をとらないと思われた。また、山田錦と同じ心白米である祝は、蒸米放置後5時間目でも蒸米断面全体がなだらかなままであったが、これは祝が心白部分の非常に大きな品種で、精米歩合70%ではほぼ白米全体が心白構造を有しているためと考えられた。このことから心白と放置後の蒸米の構造との関係は米の品種に関わりなく見られると推察された。

以上のように心白部分とそれ以外の部分で蒸米の状態に差が生じることが明らかになったが、この原因は放置後の蒸米胚乳細胞内の構造的な差にあると考えた。

すなわち日本晴や山田錦の心白以外の部分でも蒸し直後には胚乳細胞の配列が見えにくくなったが、これは蒸し直後にはまだ胚乳細胞内のアミロプラストが膨潤、糊化して柔らかい状態になっているので、蒸米の断面を作る際に胚乳細胞に沿ってではなく、多くが胚乳細胞内で割られるためだと考えた。しかし時間が経過し、胚乳細胞内の糊化デンプンが老化に伴って強固な構造をとるようになると、相対的に結合力の弱い胚乳細胞に沿ってきれいに割れるようになってくると考えた。

これに対して心白部分では胚乳組織がアミロプラストの形状に起因して密度が小さく構造的にもろいため、蒸米放置後も胚乳細胞内で心白部分以外のような強い構造をとることができず、その結果、断面を作る際に胚乳細胞に沿ってではなく細胞内で割れてしまうものと考えた。

麴菌の発芽並びに菌糸の伸張について荒巻他¹⁰⁾はナチュラル SEM を用いた観察の結果、発芽は植菌後3～4時間で起こっており、菌糸の伸長は発芽後8～10時間は蒸米の表面および表層部のみで見られ、発芽後8時間をすぎた頃から蒸米の中心部への破精込みが始まると報告している。我々は今回、植菌後12, 24, 32, 46時間目の観察しか行っていないが、荒巻他の報告

の通り12時間目（発芽後8～9時間程度）にはまだ麴表層部でしか菌糸の伸張がみられなかったのに対して、24時間目には既に蒸米内部へも菌糸が盛んに伸張しているのが確認できた。菌糸の蒸米内部への伸張は時間を経るに従って深く広がっていたが、山田錦の心白米では背腹系に沿って、即ち心白面に沿って亀裂が入っているため、亀裂面でも蒸米表面と同様蒸米内部へ向かって菌糸が盛んに伸張する様子が観察された。これが心白があるとハゼ込みが良くなると言われる原因の一つであると考えられた。

以上のように心白の有無によって蒸米や麴の形状が異なることが観察されたが、一般米でも腹白部分は心白部分とアミロプラストの形状が似ているのが確認されているので⁸⁾。腹白部分は蒸きょうによって心白部分と類似の状態になると予想される。また、今回祝から調製した麴は観察していないが、祝のように心白の巨大な品種では麴のハゼ込みの様子がどのようなものか興味のもたれるところである。

要 約

クールステージ付きのナチュラル SEM（チルド SEM）による心白米などの浸漬後の白米、蒸米、麴の断面の観察を行なった。浸漬によって心白粒は心白面に沿って大きな亀裂を生じたが、胚乳細胞やアミロプラストなどの微細構造は心白部分か否かに関わり無く、浸漬前後で大きな変化は見られなかった。蒸米は蒸し直後には胚乳細胞の配列が観察できなかったが、心白部分以外では老化が進むに従って配列が再び明瞭に観察できるようになった。これに対して心白部分では再配列が認められなかった。麴では麴菌糸が胚乳細胞間隙以外でもデンプンを溶かしながら伸長するのが明瞭に観察できた。心白粒では浸漬、蒸きょう時に生じた心白面に沿った亀裂面においても麴菌がよく生育し、且つハゼ込んでいるのが認められた。

文 献

- 1) 曾我英介, 花本秀生, 永田興四郎, 高岡祥夫, 米崎治男: 醸協, 71, 464 (1976)
- 2) 家村芳次, 藤田栄信: 醸協, 77, 260 (1982)
- 3) 柳内敏晴, 山本弘美, 宮崎紀子, 長野智子, 岩井芳則: 生物工学, 74, 97 (1996)
- 4) 安藤孝雄, 市川邦介: 発酵工学, 52, 46

- (1974)
- 5) 松田智明, 山本芳範, 長南信雄: 日作紀, 58 (別 1), 214 (1989)
- 6) 松田智明, 山本芳範, 長南信雄: 日作紀, 57 (別 2), 293 (1989)
- 7) 日立テクニカルデータ SEM, No.75, 1 (1994)
- 8) 渡辺和彦, 松永恒司, 家村芳次, 吉田晋弥, 和田正夫: 近畿中国農研, 94, 29 (1997)
- 9) 秋山裕一, 北島恭一: 醸協, 61, 931 (1966)
- 10) 荒巻功, 吉井美華, 伊藤伸一, 佐無田隆: 平成 9 年日本醸造学会大会講演要旨集 P 5
- 11) 日立テクニカルデータ SEM, No.80, 1 (1994)
-