

第1章 緒論

1-1 はじめに

1-1-1 リンの重要性

リンは生物の生命現象に不可欠であり、「リンが無ければ生命も無い」ということもできる。作物の生産には、炭素、酸素、水素、窒素、リン、カリウム、カルシウム、硫黄など、さまざまな元素の供給が不可欠である。炭素、酸素及び水素は、空気と水に存在し、問題になることはないが、窒素、カリウム及びリンは、肥料の三大要素と呼ばれ、有機質肥料や化学肥料として耕地に投入しなければならない。また、畜産分野においては、飼料中の無機リン含量は少ないため、単胃家畜の成長と生産を促進するために、リンの栄養素要求量を満たすことを目的として、飼料に無機リン酸塩を添加している。このように、リンは農業生産、畜産などの分野で大切な元素である。

1-1-2 リンの循環とリン源の有限性

リンは他の元素と同様に循環するが、重要なリンの貯蔵庫は大気ではなく、過去の地質時代につくられた岩石やほかの堆積物である。図 1-1 に見られるように、これらの岩石や堆積物は、徐々に浸食され、一部、生態系にリン酸塩を放出するが、かなりのリン酸塩は海に流入する。海中では、一部のリン酸が浅いところの沈積物中に残存するが、大部分は深いところの堆積物となって再利用されず損失と見なされる。この損失を補うためには、循環系へのリンの復活の手段だけでは、明らかに不十分である。現在、

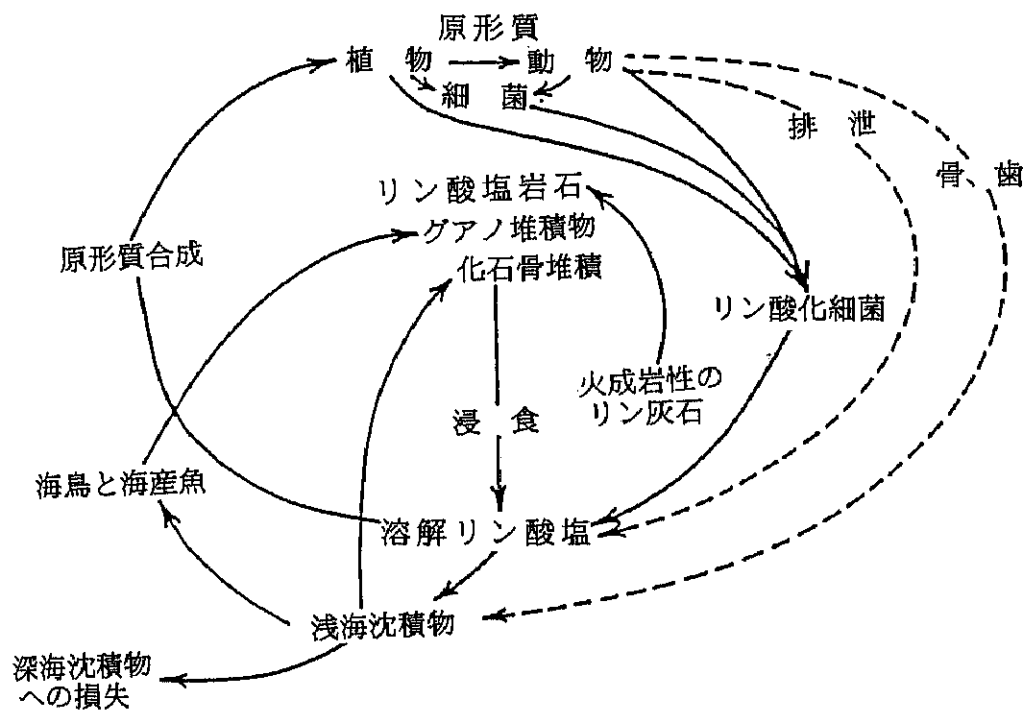


図 1-1 リンの循環

大陸に有望なリンの沈積は見られず，海の鳥類や魚類によって陸上に運ばれるリンの循環は不十分である。つまり，人類は陸上からのリン流失の度合いを速め，その結果，その循環を不完全なものにしているようである (Odum, 1974)。

こうした状況から，リンは地殻中に普遍的に分散して存在するのではなく，ところどころにリン鉱床として地球上で偏在している。加えて毎年 1.3 億トンもの大量の消費が続いているため，経済的に採掘可能な鉱床の次第に少なくなってきた。それゆえ，リン源が不足しつつあるといわれる。リン酸塩の不足対策として，低品位のリン鉱石の開発も進められているが，精鉱，輸送ともに経費がかかる上に肥料価値も低いため，成分当たりにして非常に高価となる。今後，ますます高品質のリン鉱石が乏しくなり，遅かれ早かれ地球上で枯渇の傾向がみられ，このため，省資源化や低コスト化などがリンの有効利用の開発で重要な課題となってきた (藤原, 1988)。

リン酸を組み込んだフィチン酸は，作物の種子に多く含まれている。この物質は難分解性であるため，単胃動物及び作物はほとんど直接に吸収・利用されない。従って，フィチン酸の分解はリンの効率的な循環において重要な課題と考えられる。

1-1-3 フィチン酸とフィターゼ

フィチン酸 ($C_6H_{18}O_{24}P_6$) は，*myo*-イノシトール六リン酸エステル (*myo*-inositol hexaphosphate) とも呼ばれている。フィチン酸の構造の模式を図 1-2 に示す。この物質はカルシウム-マグネシウム混合塩 (フィチンとよばれ，ふつうは $(C_6H_{12}O_{24}P_6 \cdot 3H_2O)_2Ca_5Mg$ 組成をもつ (大木ら, 1989)) として広く植物体に

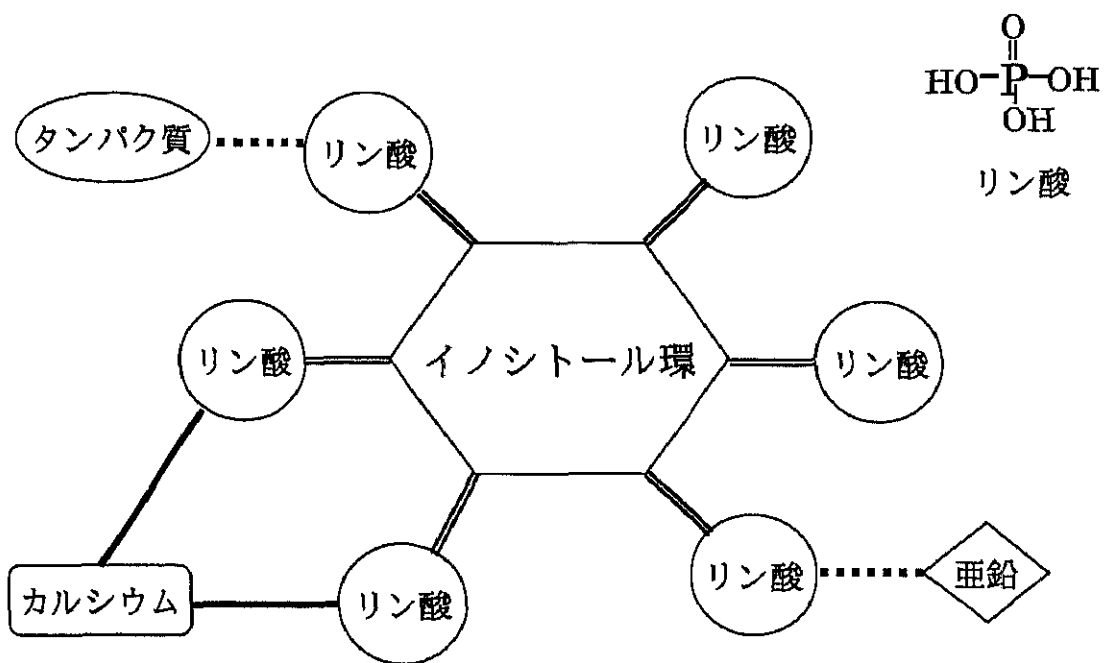


図 1-2 フィチン酸の模式図

存在し、とくに穀類や豆類ではフィチン態リンは全リンの 50~80% を占めている (清水, 1998)。また、イノシトール六リン酸(フィチン酸: IP₆)以外の一リン酸 (IP₁)、二リン酸 (IP₂)、三リン酸 (IP₃)、五リン酸 (IP₅) 等のエステル型も土壌や動物に存在している。

フィターゼ (Phytase, 正式には *myo*-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase など) はフィチン酸を加水分解する酵素である。フィターゼによるフィチン酸の加水分解の模式を図 1-3 に示し、フィチン酸の分解経路を図 1-4 に示す。図 1-4 にみると、この加水分解反応はミオイノシトール核からリン酸基が一つずつ遊離する 6 段階の反応を経て完結する (赤堀, 1974)。しかし、フィチン酸のリン酸基は、タンパク質やミネラルと結合しやすく、フィターゼによる分解を受けにくくなる。

フィターゼは高等植物 (小麦, 米ヌカなど) に存在し、種子中の糊粉粒に結合している。発芽につれてフィターゼ活性が上昇し、フィチン酸からリン酸が遊離して生長に利用される。多くの微生物もフィターゼを持つ。例えば、細菌 (*Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., ほか), 糸状菌 (*Aspergillus ficuum*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. versicolor*, *A. terreus*, *A. awamori*, *Rhizopus oligosporus* ほか) 及び酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schwanniomyces castellii* ほか) によるフィターゼの生産が報告されている。分離株 *Aspergillus ficuum* NRRL3135 によるフィターゼの生産量が最も高いといわれる (清水, 1998)。

図 1-5 に示すように、豚, 家禽などの単胃動物の濃厚飼料は、穀類や豆類などを主原料として配合している。単胃動物の消化管

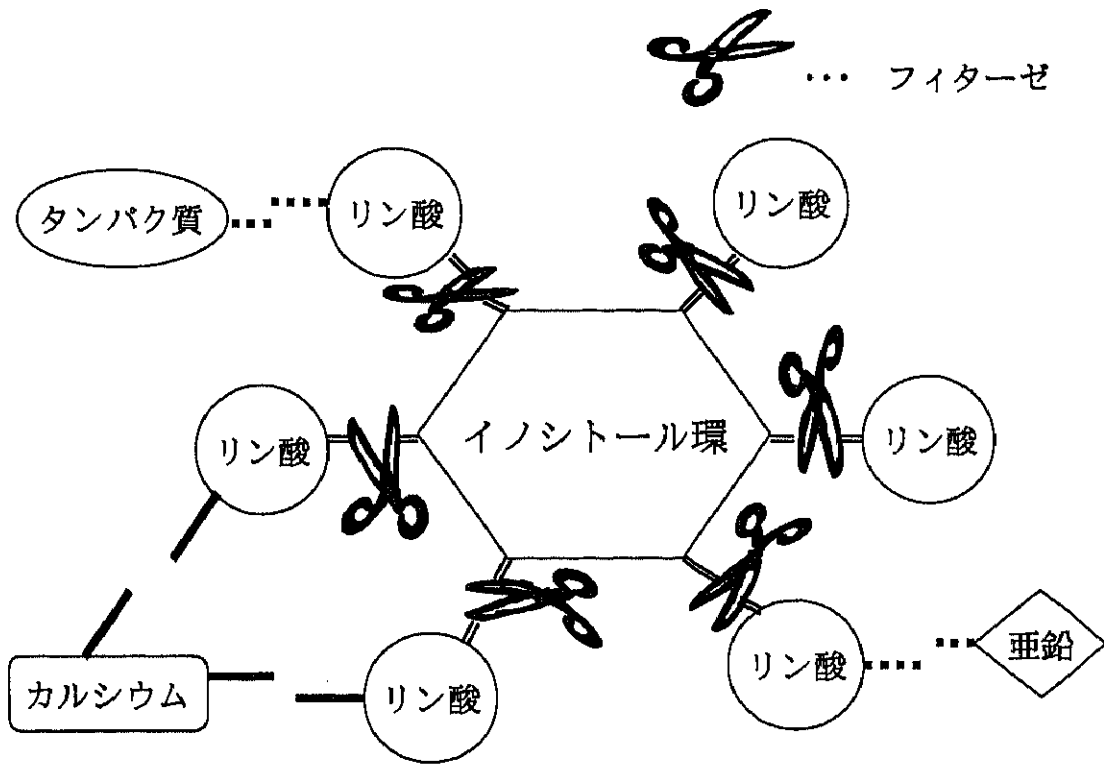


図 1-3 フィチン酸の加水分解の模式図

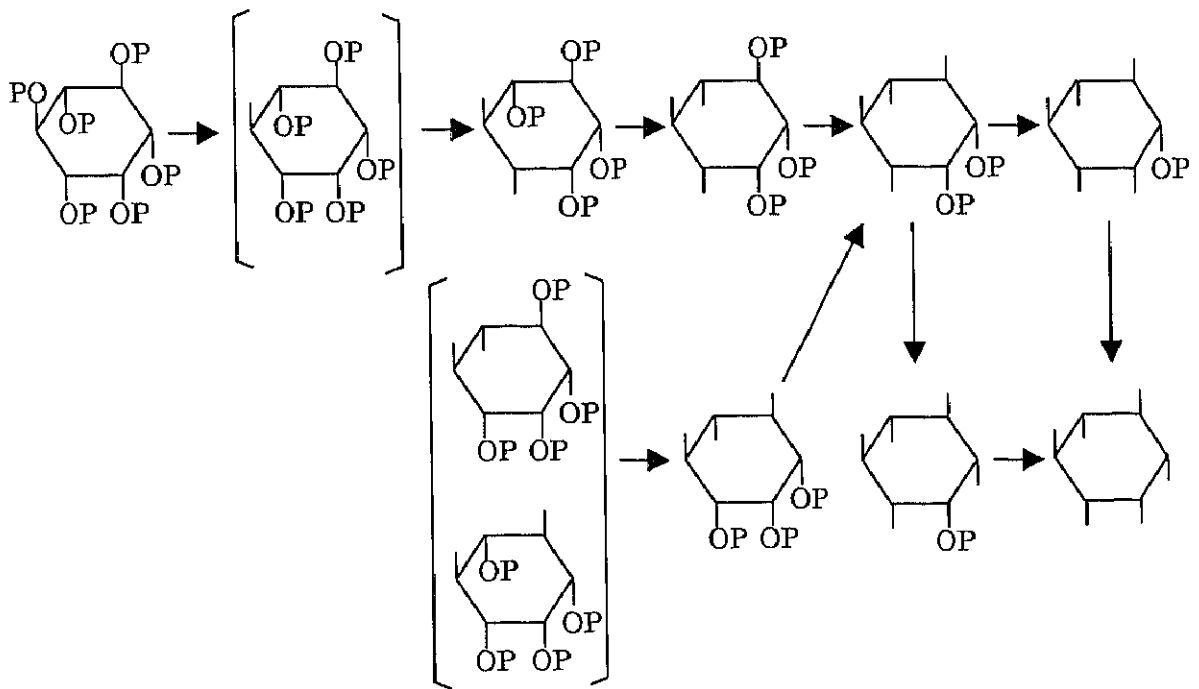


図 1-4 フィターゼによるフィチン酸の分解経路

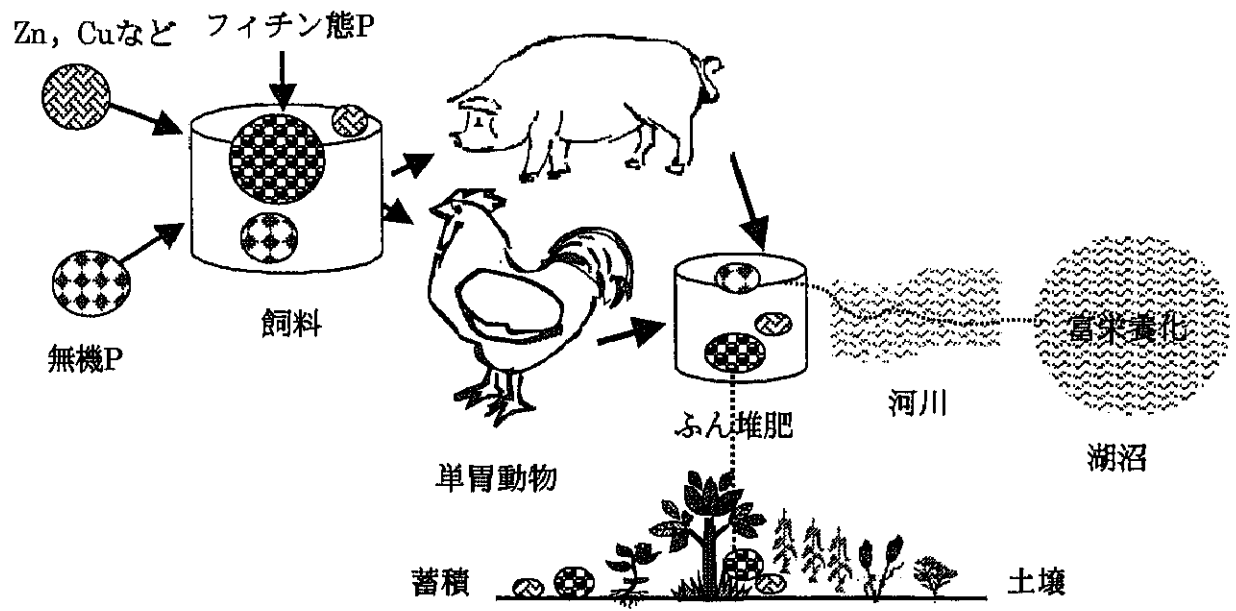


図 1-5 単胃動物のふん堆肥による環境への影響

内にフィターゼ酵素はほとんど持たないので、飼料中のフィチン酸は消化管を通過する間にほとんど利用されず、大部分がふん中に排泄されることになる。日本では、1994年度の全家畜の排泄物量は、およそ9700万トン、その中のリンは12万トンと推定された（築城・原田，1997）。こうした家畜ふんから調製した堆肥を施用すると、その中のフィチン態リンが土壤中で鉄やアルミニウムなどと結合するので、微生物に分解されず、土壤に蓄積されている。このため、土壤中の有機態リンは全リンの30~80%を占めているが、有機態リンの50%がフィチン態リンの形で存在するといわれている（Dalal，1978）。これらの観点から、堆肥や土壤に蓄積しているフィチン態リンの有効利用化が重要課題となる。

一方、家畜の成長・生産を向上するために、飼料に無機リン酸塩やZn、Cuなどのミネラルは多量に添加されている。添加した無機リン酸塩は比較的よく吸収されるものの、最終的にフィチン態リンと同時にかなりの量の無機リン酸塩が排泄されて（竹内ら，1988）、河川、湖沼などの富栄養化の一因になっている。また、ZnやCuなどの添加量が多ければ、飼料中のフィチン酸と結合して、ふんに排泄され、堆肥の施用による土壤に蓄積される。

リン資源の節減とリン酸塩による富栄養化を防止するために、畜産分野において、豚、家禽などの単胃動物の餌に植物または微生物由来のフィターゼを添加し、飼料中のフィチン態リンを無機化させる技術が開発されている。これによって、家畜はフィチン酸から遊離した無機リンを栄養源として利用できるため、飼料への無機リン酸塩の添加量が大幅に減少でき、さらにリンの排泄量も30~50%減少できることになる（図1-6）。この技術が普及すると、家畜生産及び環境上の問題を解決する上で有効である一方

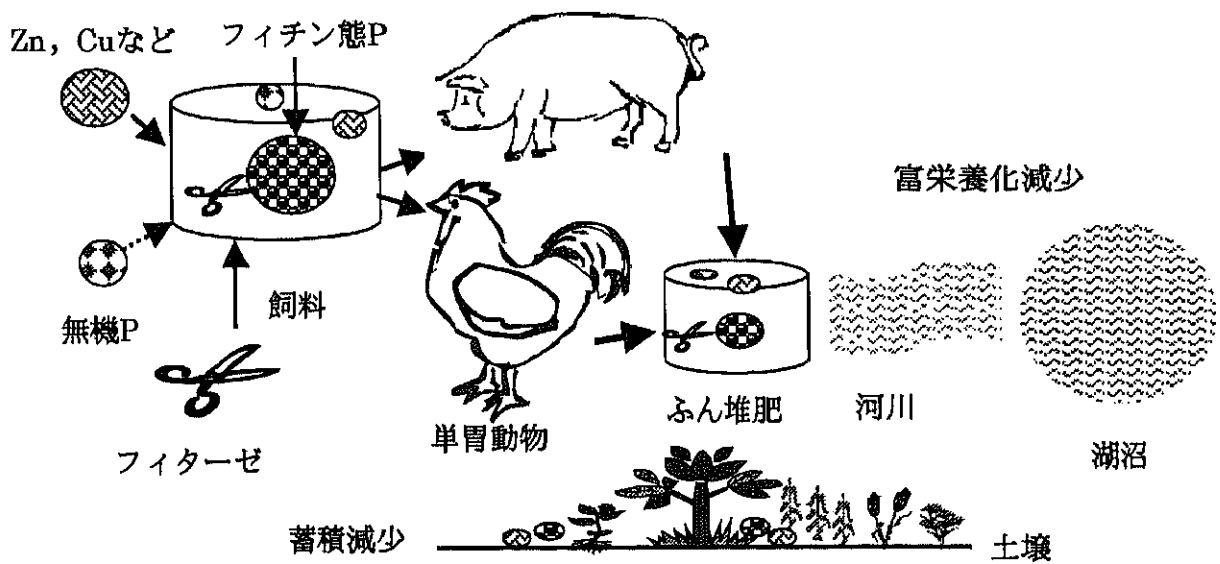


図 1-6 フィターゼ添加による環境への改善

で、無機リン酸塩をほとんど添加しない飼料で飼養した豚や家禽などの排泄物中のリン量が大きく低下され、堆肥のリン酸肥料効果が激減すると予想される。表 1-1 は豚ふん堆肥の養分効果を示す。現在の堆肥は窒素、リン酸及びカリ三要素のバランスで、リン酸が一番高くなっている。リン酸含量を 50% 減少した堆肥の場合は、無機リン含量が減らし、相対的にフィチン態リン含量が高くなるため、肥効率は 60% 以下になる。その結果、リン酸肥料効果が低減され、三要素のバランスが現在より大きくくずれることになる。そこで、排泄されたフィチン態リンの無機化を堆肥化過程で促進させることが重要になると考えられる。

1-2 既往の研究

以上の背景から、リン資源の節減とフィチン態リンの有効利用を図るために、フィターゼを含んでいる微生物製剤をプロイラー飼料に添加し、フィチン態リンの利用を向上させる試みは Nelson ら (1968) によって初めて報告された。その後、Simons ら (1990) は、微生物由来のフィターゼを 3 週齢のプロイラーの飼料に添加した結果、飼料中の有効態リンを 65% 増加させ、リンの排泄を 50% まで軽減できることを証明した。オランダでは、環境負荷軽減対策として、フィターゼを餌に混ぜることによって、鶏で 42%、豚で 35% のリン排泄の削減に成功している (長田, 1996)。Lei ら (1993) は微生物 (*Aspergillus niger*) 由来のフィターゼを離乳子豚の飼料に添加することにより、リンの排泄量を 42% 減少できたことを示している。日本でも、家禽や豚の飼料にフィターゼを添加し、家禽や豚のリン栄養が改善されると同時に、リンの排出量を削減できることが確認されている (武政ら, 1994; 斎藤,

表 1-1 豚ふん堆肥の養分効果

	養分含有率%	肥効率%	化学肥料相当養分含有率%
現在の堆肥			
T・N	3.0	50	1.5
P ₂ O ₅	5.8	60	3.5
K ₂ O	2.6	90	2.3
リン酸含有率が50%減少した堆肥			
T・N	3.0	50	1.5
P ₂ O ₅	2.9	≪60	≪1.7
K ₂ O	2.6	90	2.3

1998, 2001)。日本においては、微生物由来のフィターゼが、1996年に飼料添加物として認可されており（斎藤，2001）、飼料へのフィターゼ添加技術はさらに普及すると予想される。

また、フィターゼを持つ微生物の分離や利用などについての研究も多くなされている（Howson and Davis, 1983；Gargovaら，1997；Bolingら，2000）。食品発酵の間にダイズのフィチン酸含量がカビによる減少する報告がある（Wangら，1980）。また、*Aspergillus. niger* の菌糸体粉をブロイラーの飼料に添加して、1日から8週令まで給餌した雛の体重、リン蓄積率など明らかに増加したことが報告されている（Zylaら，1989）。Hirabayashiら（1998）は *A. usamii* の胞子を接種し、60時間発酵させた市販ダイズ粕を給餌した鶏の増体量、PやCa、Mgの蓄積率が増加し、リンの排泄量が減少することを指摘した。さらに、土壌からフィチン酸分解菌、特に難溶性のフィチン酸の鉄塩とアルミニウム塩を分解できる糸状菌が分離されたことが報告されている（農業環境技術研究所，1988）。これらの研究によって、豚、家禽では、無機リンを添加しなくても、家畜の成長を確保し、リンの排泄量も削減されることになる上で、環境汚染の軽減でも有意義であろう。

しかしながら、フィチン酸のリン酸基には、Ca、Mg、ZnやCuなどのミネラルが結合しやすい（斎藤，1998）。Cheryan（1980）は、フィチン酸とミネラルのキレート結合に関する過去の研究を整理し、その複合体の相対的な安定性は、Zn>Cu>Ni>Co>Mn>Ca>Feの順であるとした。これらのキレートはフィターゼによって分解されにくくなるため、ミネラル添加量が多ければ、飼料に高レベルのフィターゼを添加したとしても、フィチン態リンの分解が不

十分になる (Maenz, 1999)。それゆえ、フィターゼを添加すれば、飼料中のフィチン態リンの一部が分解されるものの、なお多くのフィチン態リンがふん中にそのまま排泄されることが考えられる。

一方、Zn 及び Cu は家畜の成長促進、飼料効率の改善のために、多量に飼料へ添加されていることが多い。日本飼養標準・豚 (農林水産技術会議事務局, 1998) では、豚の風乾飼料中の微量無機物含量は、発育ステージで異なるが、Zn で 50~100 mg/kg, Cu で 3~6 mg/kg (風乾飼料) とされている。しかし、若澤ら (1984) が実際に静岡県で流通している飼料を調べたところ、平均値で Zn 148 mg/kg, Cu 110 mg/kg であった。また、磯部ら (1999) が栃木県における豚用飼料を調査した結果では、平均値で Zn 122 mg/kg, Cu 32 mg/kg であった。

飼料への高濃度の Zn や Cu の添加は、フィターゼによるフィチン態リンの分解を抑制するとともに、多量の Zn や Cu をふんに排泄させると推定される。折原らが (2002) 神奈川県内で生産されている家畜ふん堆肥の重金属含有量を調査したところ、各家畜ふん堆肥の Zn 含有量の平均値は、牛ふん堆肥で 258 mg/kg, 豚ふん堆肥で 630 mg/kg, 鶏ふん堆肥で 379 mg/kg で、Cu 含有量の平均値は、牛ふん堆肥で 73 mg/kg, 豚ふん堆肥で 185 mg/kg, 鶏ふん堆肥で 43 mg/kg であった。Zn 及び Cu の濃度が高い場合には、ふんの堆肥化過程においても、フィターゼによるフィチン態リンの分解が強く阻害されることが懸念される。そして、こうした堆肥を施用した土壌でも Zn や Cu が蓄積して、土壌汚染を助長する点で問題になろう。

1-3 研究目的

前述したように，リン酸は窒素，カリウムとともに作物の肥料の三大必須元素の一つであり，化学肥料の形で作物栽培に大量に使用されている。また，化学肥料以外に作物生産には堆肥も大量に使用されるが，堆肥中リンの一部はフィチン態として存在している。大雨などによって土壌とともにリン資源が耕作地から流出する確立は大きくなる。このような事態を避けるには，耕作地に施用する前の堆肥中のフィチン酸から無機リンを遊離させることである。それにより，作物もリン酸を迅速に吸収することができ，雨水などによる耕作地からのリンの流出を減少させることが可能であろう。

今までの研究報告を整理してみると，動物の飼料中や人間の食物中のフィチン態リンを分解する研究は多くなされているが，作物の養分源として投入される堆肥中のフィチン態リンの分解に関する研究は，あまり行なわれていない。

そこで，本研究では，リン酸化学肥料が耕地への投入量を減らすし，堆肥のリン酸肥料効果を促進するために，まず，市販のフィターゼを家畜（豚，鶏及び牛）ふん堆肥及び稲わらに添加し，これら資材中のフィチン態リンの分解に対する市販フィターゼの効果を検討する。次に，フィターゼを直接堆肥に添加しなくて，飼料に添加したフィターゼが排泄された後にも，ふんに残ったフィチン態リンを堆肥化過程でどの程度分解し続け得るかを試みる。その次，Zn及びCuがフィターゼによるフィチン態リンの分解にどの程度影響を与えるかを調べる。さらに，家畜未熟なふん堆肥からフィチン酸分解菌を分離し，分解能の高い菌株を堆肥に接種して，家畜ふん中に残ったフィチン態リンから無機リンの放

出を促進させることを試みる。

本論文の構成は次のとおりである。第2章「フィターゼによる堆肥中のフィチン酸の分解」では、まず、フィチン酸 Na を基質としてフィターゼによるフィチン酸分解の反応条件を検討する。次に、フィチン酸分解の最良反応条件を用いて、フィターゼによる試料中のフィチン酸の分解促進効果を調べる。第3章「豚ふんに含まれるフィターゼのフィチン態リンの無機化に対する残留効果」では、フィターゼ添加と無添加の飼料で飼養した豚のふんを室内に放置し、10日間おきにふん中のリンの形態別及びフィターゼ活性を測定し、排泄された後のフィターゼの残留効果を調べる。飼料に添加して排泄されたフィターゼが、ふん中のフィチン態リンを堆肥化過程でどの程度分解できるかを検討する。第4章「フィターゼによる家畜飼料中のフィチン態リンの分解に及ぼす Zn 及び Cu の影響」では、飼料中に高濃度の Zn や Cu を添加する場合は、飼料中のフィチン態リンの分解にどの程度影響を与えるかを調べて、フィターゼの一層の効果的な活用条件を検討し、高濃度の Zn 及び Cu を含む堆肥へのフィチン態リンの分解に及ぼす影響を考察する。第5章「フィチン酸分解菌の分離と利用」では、まず、家畜未熟なふん堆肥から強力なフィチン酸分解菌を分離して、分解能の高い菌株を用いて、培養期間の延長に伴って、フィチン酸 Na 中のフィチン態リン量を求める。次に、フィチン酸分解能の高い菌株を堆肥に接種して、堆肥中のフィチン態リンの減少率と無機リンの増加率を測定して、フィチン酸分解菌を堆肥に接種することにより、堆肥のリン酸肥効を向上させるかを検討する。第6章「総合考察」では、第2~5章での研究結果を考察し、その応用性を述べる。第7章「結論及び今後の課題」では、本論文

の主な結果と今後の課題を整理する。

なお，研究内容と方法を図 1-7 に示す。

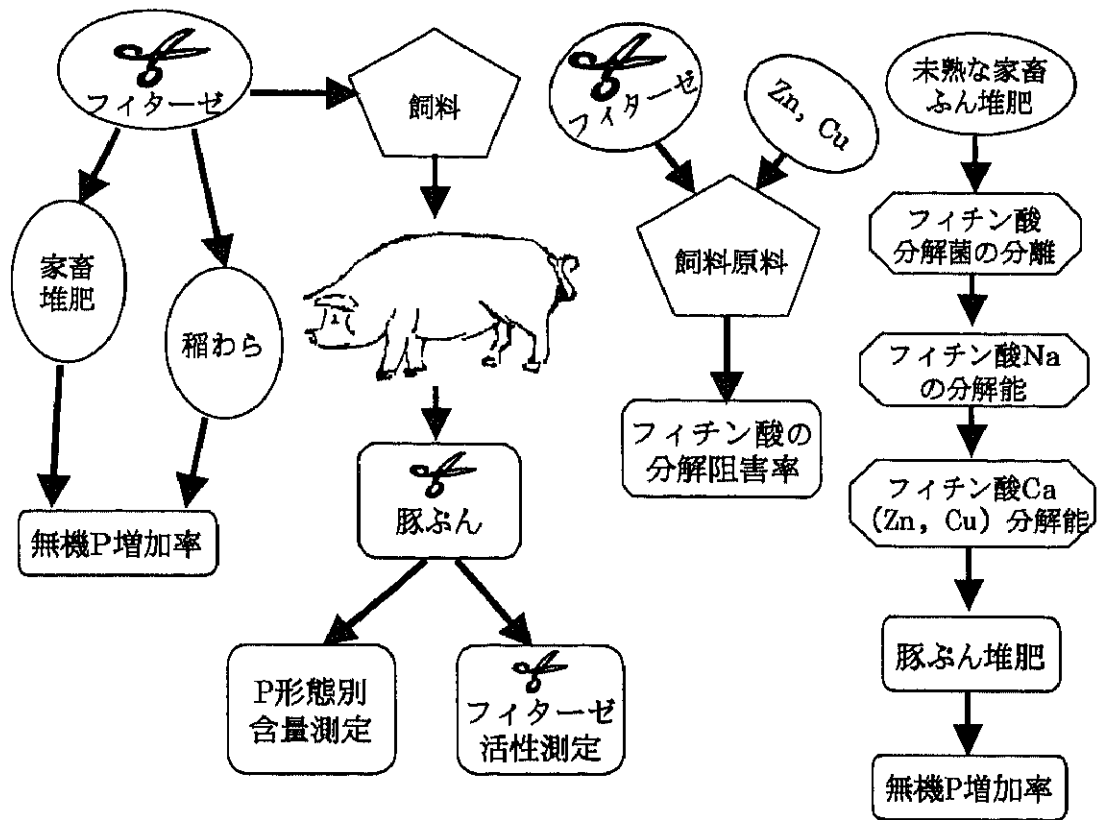


図 1-7 研究内容と方法