

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

3-1 はじめに

単胃家畜の飼料に植物または微生物由来のフィターゼを添加して、飼料中のフィチン態リンを無機化させる技術が今後普及すると予想される。しかし、この技術が普及すると、豚や家禽のふん尿堆肥中の無機リン含量は著しく低くなり、作物の養分源としての価値を大きく低下させると推定される。そこで、動物体内で分解されなかっ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。本章では、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どの程度分解し続け得るのかを検討した。

3-2 実験材料及び方法

3-2-1 実験材料

独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構畜産草地研究所（茨城県つくば市）において、フィターゼ添加飼料と無添加飼料によって飼養された豚のふんを供試した。ふんは体重約30~40kgのLWD種（三元交雑豚，去勢豚と雌豚）の豚12頭（フィターゼ添加6頭，フィターゼ無添加6頭）から得た。飼料組成を表3-1に示す。飼料にはフィターゼ添加の有無にかかわらず0.63%の第三リン酸カルシウムを添加した。試験に用いたフィターゼは協和発酵工業（株）産（フィターゼ協和）の*Aspergillus niger*由来のもので、至適温度は約55℃，至適pHは5.5である。

表 3-1 飼料の組成 (%)

	フィターゼ添加	
	無	有
トウモロコシ	49.747	49.647
マイロ	25.227	25.227
ダイズ粕 (CP43%)	20.027	20.027
ナタネ粕	3.027	3.027
炭酸カルシウム	0.690	0.690
第三リン酸カルシウム	0.626	0.626
食塩	0.353	0.353
V-ADE 剤* ¹	0.101	0.101
V-B 剤* ²	0.151	0.151
微量ミネラル剤* ³	0.051	0.051
フィターゼ (500 U/g) * ⁴	—	0.100
合計	100.000	100.000

*¹ 飼料 1kg 中にビタミン A 油 10,100 IU ; ビタミン D₃ 油 2,020 IU ;

ビタミン E 10.1 mg を含む。

*² 飼料 1 kg 中に硝酸チアンミン 1.51 mg ; リボフラビン 10.6 mg ; 塩酸ピリド

キシン 0.8 mg ; ニコチン酸アミド 9 mg ; D-パントテン酸カルシウム 16.5 mg ;

塩化コリン 87 mg を含む。

*³ 飼料 1kg 中に Mn 25.5 mg ; Fe 25.5 mg ; Cu 5.1 mg ; Zn 30.6 mg を含む。

*⁴ pH 5.5, 37°C, 5.1 μM フィチン酸ナトリウム条件下での値。

斎藤の好意による。

フィターゼの添加量は飼料 1 kg 当たり 500 単位 (U) とした。豚にフィターゼ添加飼料と無添加飼料を給餌し始めてから 6 日後に、ふんを採取した。それぞれ約 2 kg のふんを 3 l のプラスチックビーカーに入れ、よく混合し、豚ふんの水分を保持するために、プラスチックフィルム (サランラップ) でカバーし、フィルムのすそ (約 10 cm の長さ) 部分をビーカーに手で密着させ (輪ゴムは用いなかった)、実験室のドラフトの中に 40 日間放置した。このような条件では水分の蒸発は抑制されるものの、かなりの通気性は確保されると考えられる。放置期間中実験室では空調を行なわなかった。実験室内の室温は毎日 2 回 (0 時頃と 14 時頃) 温度計で計測し、18℃ から 26℃ の範囲にあった。この条件において、10 日間隔で 2 つのふんを良く攪拌しつつ、それぞれから 1 g ずつの 3 つのサブサンプルを採取した。各サブサンプルについて 3 連で測定を行なってサブサンプルの平均値を求めた。そして、3 つのサブサンプルでの平均値の平均値を使用した。

なお、実験手順を図 3-1 に示す。

3-2-2 リンの形態別測定

豚ふんサンプルを採った直後から 10 日おきにふん中のリンの形態別測定を行なった。無機リンと全リンの含量は APHA・AWWA・WPCF (1976) の方法に従い、分光光度計 (DR/4000, Hach 社製, USA) で測定した。試料中のフィチン態リンの含量は、武政・土黒 (1980) の方法で測定した。

3-2-3 フィターゼ活性の測定

フィターゼ活性の 1 単位 (U) の定義は研究者によって異なっ

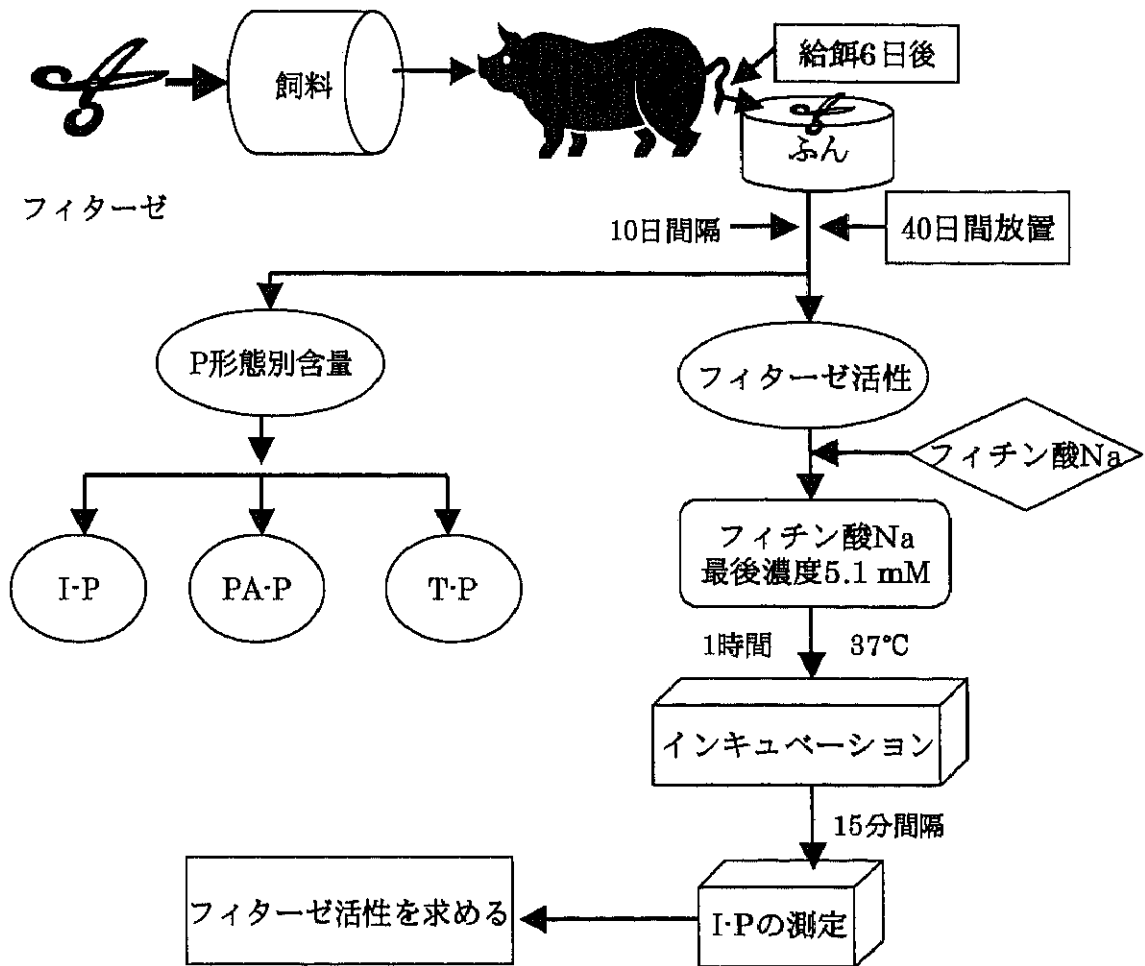


図 3-1 実験手順

ているが、よく使われているのは以下の二つである。その第一は、pH5.15, 55°Cで 1.5 mM フィチン酸 Na から 1 分間に 1 μ mol の無機リンを遊離する酵素の量と定義されている（武政・村上, 1995）。他は、pH5.5, 37°Cで 5.1 mM フィチン酸 Na から 1 分間に 1 μ mol の無機リンを遊離する酵素の量と定義されている（Qian ら, 1997）。本実験に供した飼料に添加したフィターゼの至適温度は約 55°Cで、至適 pH は 5.5 であったので、排泄されたふんに残ったフィターゼの活性単位を第一の定義に従って測定した。すなわち、pH5.15 の 0.5 M 酢酸緩衝液 5 ml に 1 g の豚ふん試料を加え、さらにフィチン酸 Na ($C_6H_6O_{24}P_6Na_{12}$, Sigma) を加え、その最終濃度を 1.5 mM とした。55°Cで 1 時間インキュベートし、経時的に 6%トリクロル酢酸 (TCA) 溶液を用いて反応を停止させ、遊離した無機リン量を測定した。この値からフィチン酸 Na 無添加の豚ふんから生成された無機リン量を差し引いた正味の無機リン生成速度によりフィターゼ活性単位を求めた。

飼料に添加したフィターゼの活性単位は第二の定義 (pH5.5, 37°C) によって得られた (協和発酵工業の測定条件) ので、飼料添加フィターゼの活性単位とふんに残ったフィターゼの活性単位とを比較するために、協和発酵工業産のフィターゼ (フィターゼ協和, 飼料へ添加したフィターゼと同じもの) を 0.5 M 酢酸緩衝液に溶解し (0.05 U/ml), フィチン酸 Na を 1.5 mM, pH を 5.15, 温度を 55°C とする条件と, フィチン酸 Na を 5.1 mM, pH を 5.5, 温度を 37°C とする条件でフィターゼの活性を測定した。その結果, 用いたフィターゼは第一の定義 (pH5.15, 55°C) で 943 U/g, 第二の定義 (pH5.5, 37°C) で 533 U/g となった (図 3-2)。この関係を利用して, 第一の定義で得た排泄されたふんに残ったフィター

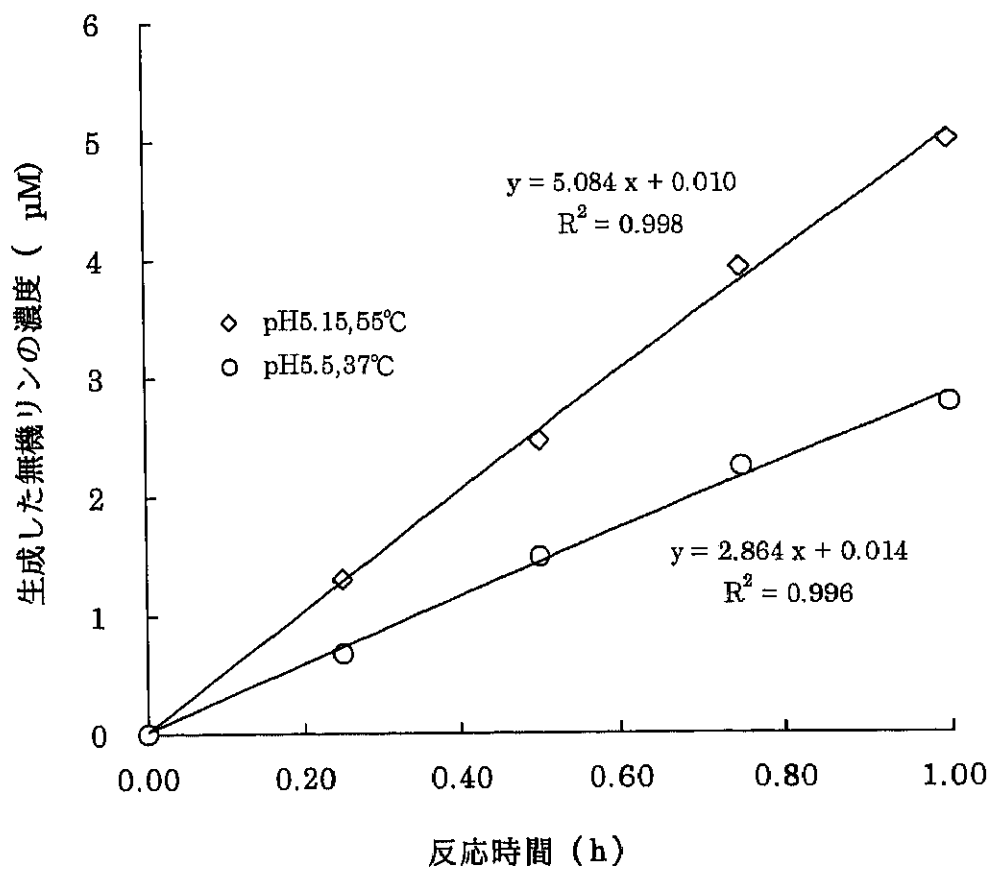


図 3-2 二つの条件下で測定したフィターゼによる
フィチン酸 Na からの無機リン放出量の推移

ゼの活性単位を第二の定義でのフィターゼの活性単位に換算した。

3.3 結果及び考察

表 3.2 に，フィターゼ添加および無添加の飼料で飼養した豚の排泄直後のふんにおけるリンの形態別含量を示す。フィターゼ添加飼料で飼養した豚ふん中の無機リン含量は無添加飼料のものよりやや高く，それぞれ 6.57 と 5.05 mg P/g ふん乾物であった。これは，双方の飼料に同量の無機リン酸塩を添加したため，フィターゼ添加飼料ではフィチン態リンの分解によって，ふん中の無機リンが増加したためと推定される。そして，フィターゼの添加によって，ふん中のフィチン態リン含量は無添加飼料の約 46% に減少し，全リン含量は約 70% に減少した。これも，飼料中のフィチン態リンがフィターゼによって分解されたためと推定される。

排泄直後における第二の定義によって換算した豚ふんのフィターゼ活性は豚ふん乾物 1 kg 当たり 1,070 U (図 3-3) であった。飼料の主成分であるトウモロコシ，マイロおよびダイズ粕中に含まれるフィターゼの活性は，0~120 U/kg と極めて低い (Weremko ら，1997)。飼料に添加したフィターゼは飼料 (含水量約 12%) 1 kg 当たり 500 U (飼料乾物 1 kg 当たり 568 U) であったので，豚ふん中のフィターゼ濃度は乾物あたりの比較では飼料中の 2 倍弱に増加したことになる。このことは豚の消化管内でフィターゼがあまり吸収されずに，栄養物が吸収された結果，相対的にフィターゼの濃度が上昇した結果と推定される。Jongbloed ら (1992) は *A. niger* (*var. ficuum*) 由来のフィターゼを用いた実験で，飼料 1 kg 当たり 1,500 U (この実験では，pH5.5，40°C で 1 mM フィ

表 3-2 フィターゼ添加及び無添加の飼料で飼養した豚の排泄
直後のふんにおけるリンの形態別含量（乾物当たり）

P の形態	試料	
	フィターゼ添加	
	無	有
T-P (mg P/g)	24.30	17.00
I-P (mg P/g)	5.05	6.57
PA-P (mg P/g)	5.48	2.50
O-P (mg P/g)	13.77	7.93
I-P/T-P (%)	20.78	38.65
PA-P/T-P (%)	22.55	14.71

T-P: 全リン I-P: 無機リン PA-P: フィチン態リン

O-P: 有機リン

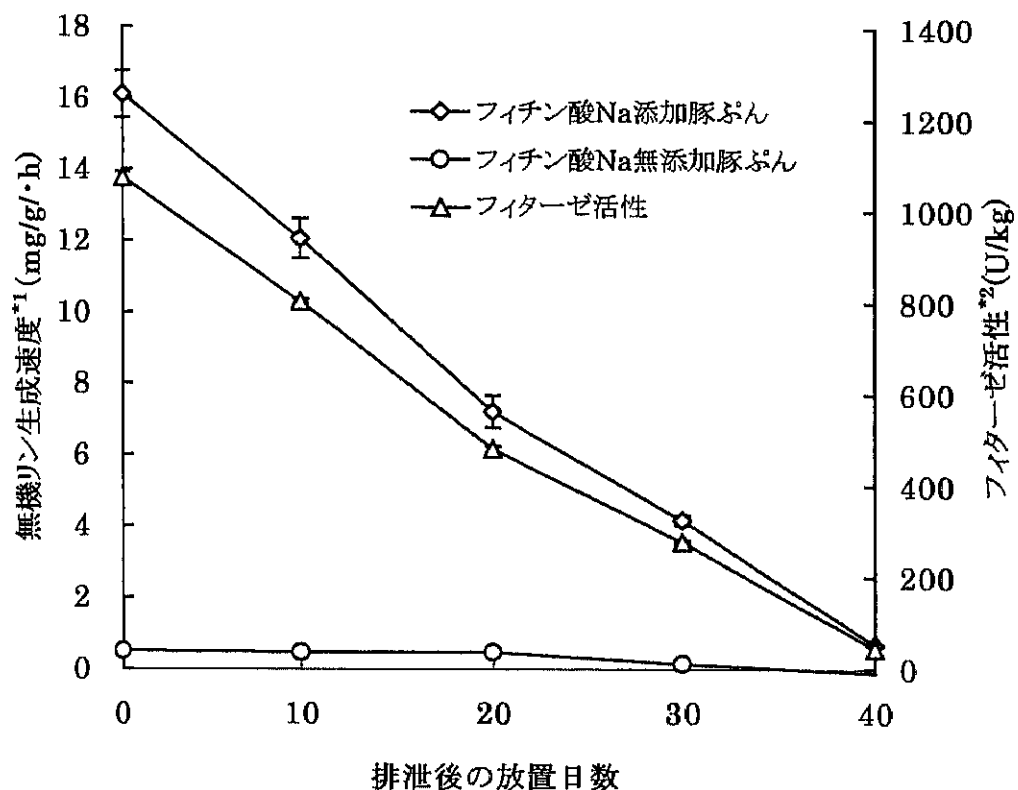


図 3-3 豚ふん放置に伴うふんに排泄された飼料添加フィターゼ活性の減衰

*1 無機リン生成速度は pH5.15, 55°Cで 10 mM フィチン酸 Na 添加の条件下で測定した。

*2 フィターゼ活性は pH5.5, 37°Cで 5.1 mM フィチン酸 Na 添加の条件に換算した。

チン酸から 1 分間に 1 μmol のリン酸塩を遊離する酵素の量を 1 単位と定義した) のフィターゼを飼料に添加した場合，回腸に到達するまでにフィターゼの活性は飼料乾物 1 kg 当たり 50 U 以下という結果を報告している。また，Yi ら (1996) も同様の結果を報告している。本実験では，排泄直後の豚ふん中のフィターゼ活性はふん乾物 1 kg あたり 1,070 U であった (配合飼料の乾物の消化率は 75~80%)。これらの差の原因としては本試験で供試した *A. niger* 由来のフィターゼは消化管内安定性が高いことにありと推定される。

室内に放置したとき，無機リン含量は，フィターゼ無添加飼料由来のふんでは 0 日目の 5.05 mg P/g ふん乾物から 40 日目には 5.35 mg P/g ふん乾物とやや増加しただけであったが，フィターゼ添加飼料由来のふんでは 0 日目の 6.57 mg P/g ふん乾物から 40 日目には 7.89 mg P/g ふん乾物となり 1.32 mg P/g ふん乾物増加した。フィチン態リン含量は，フィターゼ無添加飼料由来のふんでは 0 日目の 5.48 mg P/g ふん乾物から 40 日目には 5.27 mg P/g ふん乾物とやや減少したが，フィターゼ添加飼料由来のふんでは，0 日目の 2.50 mg P/g ふん乾物から 40 日目には 1.24 mg P/g ふん乾物と約 50% も減少した (表 3-3)。すなわち，フィチン態リンは 40 日間で 1.26 mg P/g ふん乾物減少し，この減少量にほぼ相当する 1.32 mg P/g ふん乾物の無機リンが増加したことから，無機リンの増加はフィチン態リンの分解に由来すると推定される。

本実験では，豚ふんを室内に 40 日間放置した間に，排泄されたフィターゼによって，無機リン含量が 20% 増加した。これは，前章の実験 (豚ふん堆肥に 1,250 U/kg のフィターゼを添加したときの無機リン増加率は 13.6% であった) よりやや高かった。こ

表 3-3 放置時間に伴う豚ふん中の無機リンとフィチン態リン含量の変化 (mg P/g 乾物)

フィターゼ添加	排泄後の放置日数					I-P 増加率%	PA-P 減少率%	
	P の形態	0	10	20	30			40
無	I-P	5.05	5.13	5.24	5.29	5.35	5.9	-
	PA-P	5.48	5.43	5.41	5.35	5.27	-	3.8
有	I-P	6.57	7.06	7.76	7.82	7.89	20	-
	PA-P	2.50	2.03	1.35	1.32	1.24	-	50

の増加は，本実験で使用した豚ふん中に含まれるフィチン態リン含量が前の実験より高かったためであると理解される。

図 3-3 は，フィチン酸 Na を 10 mM とし，pH5.15，55°C で測定した豚ふん中のフィターゼによる無機リン生成速度の変化と，pH5.5，37°C，5.1 mM フィチン酸 Na 添加の条件に換算したフィターゼの活性を示したものである。フィチン酸 Na 無添加では無機リンの生成量はごくわずかであり，大部分の無機リンは添加したフィチン酸 Na に由来した。正味の無機リン生成速度は 0 日目の 16.1 mg P/g・h から，40 日目の 0.68 mg P/g・h とほぼ直線的に減衰した。排泄されたフィターゼの活性は 0 日目の 1,070 U/kg から，40 日目の 45 U/kg までほぼ直線的に減衰した。

本実験で用いた飼料にはフィターゼ添加の有無にかかわらず第三リン酸カルシウムが 0.63% 添加されていたので，フィターゼ添加飼料で飼養した豚のふん中の無機リン含量は，フィターゼの作用によって，フィターゼ無添加飼料のものよりやや高くなった。実際の場合ではフィターゼ添加飼料には無機リン酸塩を従来より減少させるか，全く添加しないので，ふん中の無機リン含量は低下して，その肥料価値は減少するはずである。例えば，フィターゼ添加飼料に無機リン酸塩を全く添加しなかった場合について，表 3-3 の結果から次の推定ができる。すなわち，排泄直後の豚ふん中の無機リン量はフィターゼ無添加豚ふんで 5.05 mg P/g ふん乾物であるが，フィターゼ添加豚ふんでは 1.52 mg P/g ふん乾物（0 日目のフィターゼ添加豚ふんと無添加豚ふんとの無機リン量の差）に減少することになる。そして，40 日間放置中に排泄された豚ふんのフィターゼによって，フィチン態リンから分解された 1.26 mg P/g ふん乾物の無機リンが加算されるので，合計

2.78 mg P/g ふん乾物になると推定される。40 日後でもまだ 1.24 mg P/g ふん乾物のフィチン態リンが残っている。これも無機化できれば、豚ふん中の無機リン量をその分高めることができるが、豚ふん放置期間中にフィターゼの活性が直線的に減衰して、40 日後にはほとんど活性を有していなかったことから、フィターゼによるさらなる無機化は期待できない。

飼料中の Zn, Cu および Ca などのミネラルはフィチン酸のリン酸基と結合して、不溶解性の錯体となり、フィターゼによって分解されにくくなると報告されている (Maenz ら, 1999; Lei ら, 1994; Qian ら, 1996, 1997; Sandberg ら, 1993)。飼料に高濃度の Zn や Cu および Ca など添加の場合は、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及ぼすかが今後の課題となる。

3-4 まとめ

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40日間放置し、10日間おきにリンの形態別含量及びフィターゼ活性を測定した。排泄されたふん中のフィターゼの活性は、豚ふんの放置に伴い、0日目の1,070 U/kgから40日目の45 U/kgへと直線的に減衰した。この間にフィチン態リンの約半分(1.26 mg P/g ふん乾物)が分解された。そして、40日目以降においては排泄されたフィターゼによるふん中のフィチン態リンのさらなる分解は期待できないことが判明した。

このように、排泄されたフィターゼでは豚ふんに残ったフィチン態リンを完全に加水分解することができないことが明らかにした。これは、フィターゼの活性が弱くなり、残ったフィチン態リンがZnやCuなどのミネラルと結合したものが多いかと推定される。次章においては、飼料原料を用いて、Zn及びCuがフィターゼによる飼料中のフィチン態リンの分解にどの程度影響を及ぼすかを試みる。