

第5章 フィチン酸分解菌の分離と利用

5-1 はじめに

今後，単胃家畜の飼料にフィターゼの添加技術が普及することに従って，飼料中のフィチン態リンの一部が家畜の消化管で分解され，吸収利用されることになるため，消化管内で分解されずに排泄されたフィチン態リンは難分解性が多いと推定される。

自然界にはフィターゼを持つ微生物が多く存在しているが，その中から難分解性のフィチン酸 Zn やフィチン酸 Cuなどを分解できる菌株を分離できれば，堆肥に直接接種して，堆肥中に残っているフィチン態リンを分解させることができるであろう。そこで，本章では，Zn や Cu と結合したフィチン態リンを強力に分解できる微生物の分離と，その豚ふん堆肥への接種によるフィチン態リンの分解促進を試みた。

5-2 実験材料及び方法

実験手順を図 5-1 に示す。具体的な方法は以下の通りである。

5-2-1 家畜ふん堆肥からのフィチン酸分解菌の分離

5-2-1-1 実験材料

a. 堆肥

牛ふん（未熟な牛ふん，市販牛ふん），豚ふん（未熟な豚ふん＋牛ふん，市販豚ふん）及び鶏ふん（未熟な鶏ふん，古い鶏ふん及び市販鶏ふん）堆肥を使用した。

未熟な牛ふん堆肥は筑波大学農林技術センターで採取した（1

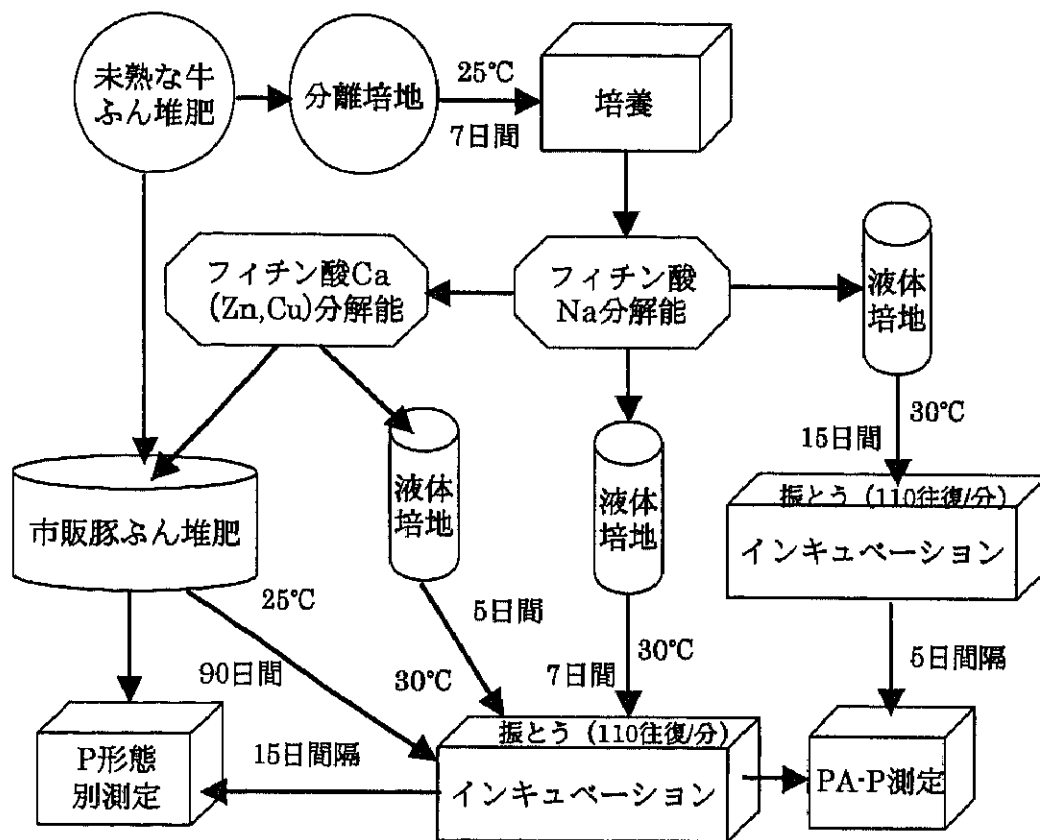
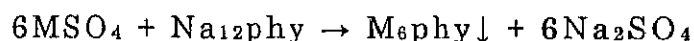


図5-1 実験手順

週間堆積したもの)。未熟な豚ふんと牛ふんの混合堆肥ならびに鶏ふん堆肥（10日間堆積したもの）、及び古い鶏ふん堆肥（1年間堆積したもの）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）で採取した。市販の家畜（牛、豚及び鶏）ふん堆肥はつくば市内のホームセンターから購入した。これらの堆肥はフィターゼ無添加の飼料で飼養した家畜のふんから堆積によって製造された。

b. フィチン酸 Zn とフィチン酸 Cu の調製

市販試薬がないため、化学反応の基礎知識に基づいて、実験室でフィチン酸 Zn とフィチン酸 Cu を調製した。反応式は下に示す。



ここで、

M : Zn または Cu

·phy : フィチン酸

具体的な手順は、0.1 M のフィチン酸 Na（コメ由来，Sigma）100 ml に対して、0.6 M の ZnSO_4 （和光純薬，化学用）または CuSO_4 （和光純薬，試薬一級）を 100 ml 加えて、よく混合し、沈殿物を 3000 rpm 10 分間遠心分離した。その後、蒸留水で洗浄して遠心分離することを 6 回行なってから、沈殿物を 80℃で 5 日間乾燥し、デシケーター中に保存した。

5-2-1-2 フィチン酸 Na 分解菌の分離

Gargova ら (1997) のフィチン酸分解菌の分離培地を使用した。すなわち、1000 ml 脱イオン水にグルコース 15.0 g, フィチン酸 Na 5.0 g, NH_4NO_3 5.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g 及び KCl 0.5 g を加えた後、1 M HCl と 1 M NaOH を用いて、次に示す培地の pH を調整し、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g と $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g 及び寒天 15.0 g を添加した (以上の試薬も和光純薬, 試薬特級)。糸状菌用培地は pH5.5 に調整して、ローズベンガル溶液 (0.33%, 和光純薬, 和光特級) 10 ml を入れた。細菌・放線菌用培地は pH6.5 に調整した。両培地は 110°C で 10 分間殺菌した。なお、糸状菌用培地にはペトリ皿に分注する前にストレプトマイシン (30 mg/l, 和光純薬, 生化学用) を添加した。

各種類の堆肥それぞれ 5 g を 45 ml 殺菌水に加え、5 分間手で激しく振とうした後、希釈平板法 (土壤微生物研究会, 1992) によって上述の培地を用いて、フィチン酸 Na 分解性の糸状菌と細菌及び放線菌の計数と分離を行なった。すなわち、寒天平板培地を 25°C で 1 週間培養した後、形成されたコロニーを計数した。その後、白金耳を用いて、生育の旺盛な菌株を分離し、肉眼的に単一と考えられるコロニーだけになるまで最高 4 回の純化操作を行なった。次いで、分離純化した菌株のうち、生育旺盛な糸状菌 10 株、細菌 5 株及び放線菌 5 株を選び、それぞれに番号を付けた。

5-2-1-3 分離菌株のフィチン酸分解能の測定

分離菌株のフィチン酸 Na 分解能を次のように測定した。すなわち、分離培地上で生長の速かった糸状菌 10 株 (糸状菌-01~10)、細菌 5 株 (細菌-01~05) 及び放線菌 5 株 (放線菌-01~05) を選び、110°C、10 分間殺菌した液体培地 (分離培地から寒

天ならびにローズベンガルとストレプトマイシンを除いたもの) 30ml にそれぞれ接種し, 30°C で 7 日間往復振とう (110 往復/分) 培養した。その後, 培養液を 14,500 rpm で 20 分間遠心分離し, 上澄みを桐山ロート(ろ紙 No.5B)でろ過した。武政・村上(1995)の方法に従って, ろ液から 3 つのサブサンプルを採取し, 残存するフィチン態リン量を測定した。次いで, 対照培地のフィチン態リン量との差を, 分解菌によって分解されたフィチン態リン量とした。また, フィチン酸 Na 分解能の確認された菌株のうち, 分解能の高い糸状菌 5 株, 細菌 2 株及び放線菌 2 株を選び, 上記と同様に, フィチン酸 Na をリン源とする液体培地に接種した後, 30°C で 15 日間培養して, 5 日間ごとに分解されたフィチン態リン量を求めた。

次いで, フィチン酸 Na の代わりに, フィチン酸 Ca (5 g/l, 和光純薬), フィチン酸 Zn (5 g/l) またはフィチン酸 Cu (0.1~5 g/l) をリン源とした液体培地に分離菌株 (糸状菌 5 株, 細菌 2 株及び放線菌 2 株) を接種し, 上記と同様に, 30°C で 5 日間培養して, 分解されたフィチン態リン量を測定した。

5.2.2 分解菌株の利用

5.2.2.1 分離菌株の増殖

まず, フィチン酸 Na 分離培地をペトリ皿に分注して, 分離し保存しておいたフィチン酸 Zn 及びフィチン酸 Cu の分解能の高い糸状菌株を接種し, 25°C で 1 週間予備培養した。

次に, 20 メッシュのふるいを通した市販豚ふん堆肥 25 g ずつを 5 個の 100ml 三角フラスコに入れ, 水分含量を 55% に調製した。オートクレーブで 10 分間殺菌した後, 寒天平板培地で 1 週間予

備培養しておいた糸状菌 5 株をそれぞれ三角フラスコ中の市販豚ふん堆肥に接種し、25℃で 2 週間培養した。生育の旺盛であった糸状菌 -05 と糸状菌 -08 を含んだ豚ふん堆肥（殺菌してから糸状菌を接種した）は、市販豚ふん堆肥（殺菌せず、水分含量だけ調整した）への接種の正式な実験に使用した。また、未熟な牛ふん堆肥にはフィチン酸 Na 分解菌が多かったことから、新しい未熟な牛ふん堆肥を接種源として市販豚ふん堆肥への接種実験も行なった。

5.2.2.2 堆肥への分離菌株の接種

市販の豚ふん堆肥 40 g ずつを 8 個の 500ml ビーカーに採取し、水分含量を 55% (4 個) と 80% (4 個) に調製した。糸状菌 -05 (8.2×10^8 cfu/g) と糸状菌 -08 (6.4×10^8 cfu/g) を接種して培養した (25℃, 2 週間培養) 豚ふん堆肥または未熟な牛ふん堆肥を 4 g ずつ 500ml ビーカーに入れた市販豚ふん堆肥 (殺菌せず、水分含量だけ調整した) にそれぞれ接種した。対照区には、水分 55% の豚ふん堆肥を 4 g 添加した。堆肥の水分を保持するために、ビーカーの上部をポリ塩化ビニリデン・フィルム (サララップ, 旭化成製) で覆って、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、25℃で 90 日間培養した。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と考えられる。培養初日から 15 日間隔で堆肥中の無機リンとフィチン態リンを測定した。水分含量を一定に保持するために、測定のたびにサンプルを採取した前後、ビーカーの重量を測って、前回の重量と今回のサンプルを採取する直前の重量を比較して、その不足部分を水分が蒸発したものと考え、水を補充して、十分

に攪拌した。その後、それぞれ3つのサンプルを採取して、無機リンの増加率とフィチン態リンの減少率を求めた。

5.3 結果及び考察

5.3.1 家畜ふん堆肥からのフィチン酸分解菌の分離

5.3.1.1 フィチン酸 Na 分解菌の分離

表 5.1 はフィチン酸 Na を唯一のリン源とする分離培地を用いて、各種家畜ふん堆肥中のフィチン酸 Na 分解菌数を調べたものである。この結果、市販の家畜（牛，豚及び鶏）ふん堆肥，未熟な豚ふんと牛ふんの混合堆肥及び未熟な鶏ふん堆肥ではわずかにフィチン酸分解菌が分離されたが，古い鶏ふん堆肥ではほとんど分離されなかった。未熟な牛ふん堆肥のみから多くの糸状菌，細菌及び放線菌のフィチン酸分解菌が分離された。牛のルーメンにはフィチン酸分解菌が生息しているため，牛ふん堆肥には豚ふん堆肥や鶏ふん堆肥に比べてフィチン酸分解菌が多く生息していると推定される。以下の実験では，牛ふん堆肥から分離されたフィチン酸 Na 分解菌を用いた。

5.3.1.2 分離菌株のフィチン酸の分解能

フィチン酸 Na をリン源とする分離培地で生育の旺盛であった糸状菌 10 株，細菌 5 株，放線菌 5 株を，フィチン酸 Na をリン源とする液体培地に接種し，7 日間振とう培養し，フィチン態リンの分解量を測定した（図 5.2）。いずれもフィチン酸 Na 分解能を有することが確認された。この中から，フィチン態リンの分解量の高い糸状菌 5 株，細菌 2 株，放線菌 2 株を選び，フィチン酸 Na からのフィチン態リンの分解経過を調べた（図 5.3）。これらの

表 5・1 各種家畜ふん堆肥中のフィチン酸 Na 分解菌数

堆肥の種類	微生物	cfu/乾物 g		
		糸状菌	細菌	放線菌
未熟な牛ふん		0.21×10^7	28×10^7	0.35×10^7
市販牛ふん		$< 1 \times 10^5$	$< 1 \times 10^6$	$< 1 \times 10^4$
未熟な豚ふん + 牛ふん		$< 1 \times 10^6$	$< 1 \times 10^7$	$< 1 \times 10^5$
市販豚ふん		$< 1 \times 10^4$	$< 1 \times 10^5$	$< 1 \times 10^4$
未熟な鶏ふん		$< 1 \times 10^4$	$< 1 \times 10^6$	$< 1 \times 10^4$
古い鶏ふん		$< 1 \times 10^3$	$< 1 \times 10^4$	$< 1 \times 10^4$
市販鶏ふん		$< 1 \times 10^4$	$< 1 \times 10^4$	$< 1 \times 10^4$

cfu : コロニー形成数

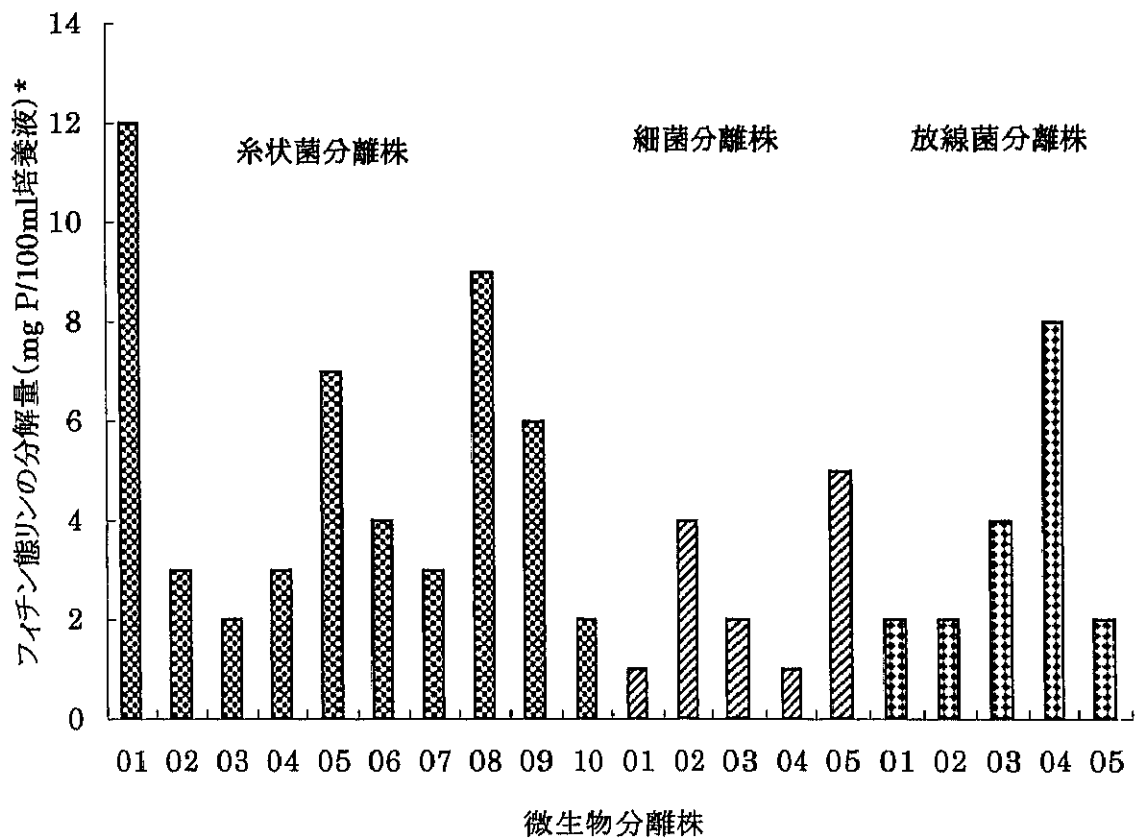


図 5-2 分離菌株によるフィチン酸 Na の分解

* 100 ml 液体培地に対するフィチン態リンの分解量 (mg P/ml)

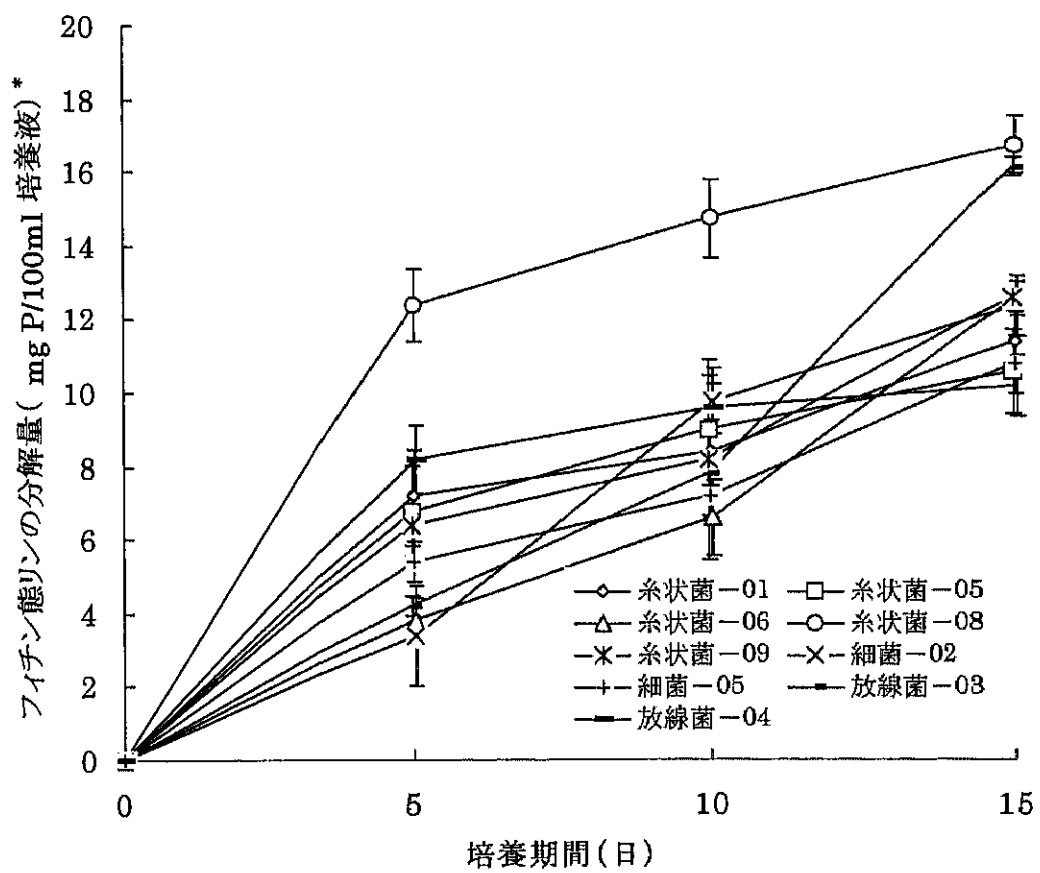


図 5-3 培養に伴う分離菌株によるフィチン酸 Na の分解の推移

* 100 ml 液体培地に対するフィチン態リンの分解量 (mg P/ml)

分離菌株はいずれ生育初期からフィチン酸 Na を分解することができたことから、フィターゼを生成していると推定される。

飼料に Ca, Zn や Cu が添加されているため、実際の家畜ふん、特に豚ふんや鶏ふんなどでは、これらのミネラルと結合したフィチン酸が多いと考えられる。そこで、分離株がリン源としてフィチン酸 Ca, フィチン酸 Zn 及びフィチン酸 Cu を利用できるかが問題になる。この3種の形態のフィチン酸を唯一のリン源とする液体培地（フィチン酸 Na の液体培地にフィチン酸 Na の代わりに、フィチン酸 Ca, フィチン酸 Zn またはフィチン酸 Cu をリン源とした）で分離株（糸状菌 5 株、細菌 2 株及び放線菌 2 株）を 5 日間培養して、これら形態のフィチン酸リンの分解量を調べたところ、いずれの分離菌株もフィチン酸 Ca を分解することができたが、フィチン酸 Zn を分解できたのは糸状菌だけであった（表 5・2）。

写真 5・1 は、フィチン酸 Zn 培地で分離した糸状菌菌株である。白い部分はフィチン酸 Zn の沈殿物であり、糸状菌による分解して透明になった。写真 5・2 は、フィチン酸 Zn をリン源とした液体培地に接種したフィチン酸 Na の分解能の高い菌株である。5 株の糸状菌は良好に生育して、細菌と放線菌は全く生育できなかった。

一般に糸状菌の至適 pH は 4.0~6.0 であるため、糸状菌株のフィチン酸 Na の分解能を pH5.5 で測定したが、酸性側ではフィチン酸から Zn や Cu が解離しやすいため、糸状菌株の分解能が高かった可能性がある。また、普通家畜ふん堆肥の pH は弱アルカリ性（約 pH8）であるので、そこで、当初の pH を 7.5（家畜ふん堆肥の pH に近い）に調整した条件での実験も行なった（写真

表 5-2 分離菌株の難分解性のフィチン態リンに対する分解能

培地		菌株		糸状菌					細菌		放線菌	
		01	05	06	08	09	02	05	03	04		
フィチン酸	添加量 (g/l)	pH	フィチン態リンの分解量 mg P/100 ml 培養液									
Ca	5	5.5	10.4	6.80	2.40	2.40	1.20	×	×	×	×	
		6.5	*	*	*	*	*	2.00	2.80	0.80	3.20	
Zn	5	5.5	6.93	6.67	2.13	1.07	3.20	—	—	—	—	
		7.5	3.73	2.13	1.07	4.00	1.87	×	×	×	×	
Cu	5	5.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	0.1	7.5	0.20	0.43	0.87	1.07	0.63	×	×	×	×	

培養期間は 25°C で 5 日間。

— : 菌株の生育が見られない。

* : 糸状菌の最適 pH は 4~6 と考えて、菌株の接種実験を行なわなかった。

× : 細菌と放線菌は糸状菌より分解能が弱いと考えられるので、菌株の接種実験を行なわなかった。

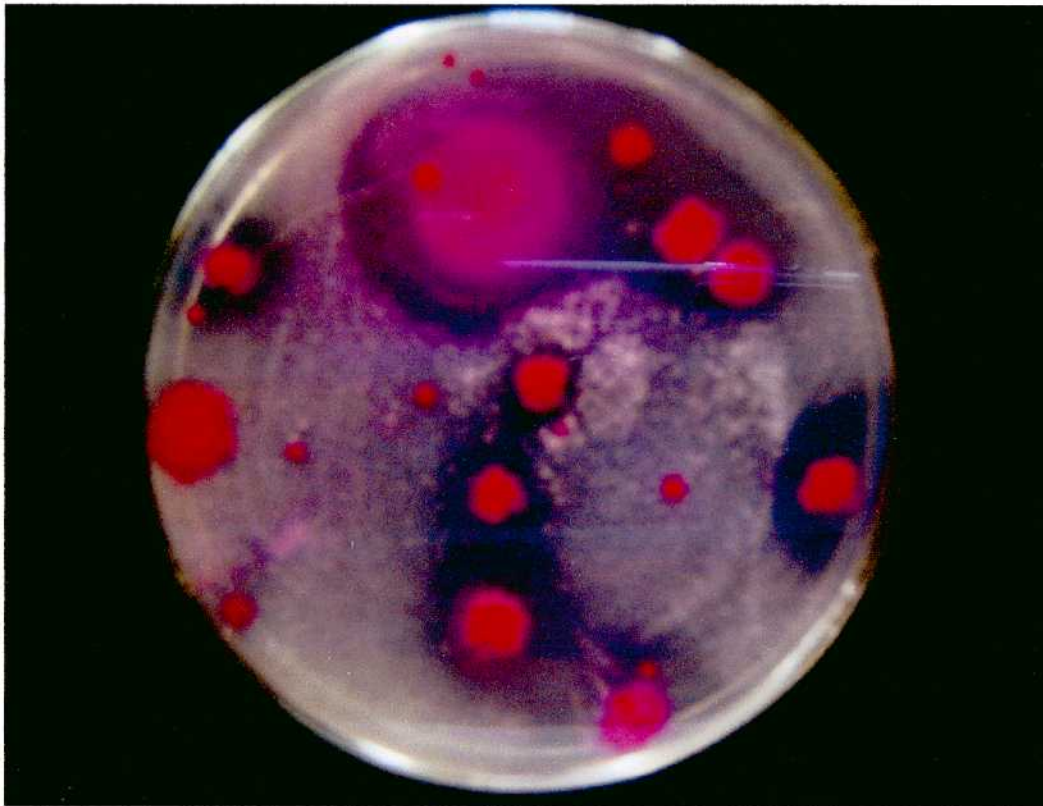


写真 5-1 フィチン酸Zn分解糸状菌



写真 5-2 分離菌株のフィチン酸Zn分解能



写真 5-3 フィチン酸Zn (pH7.5) 分解糸状菌

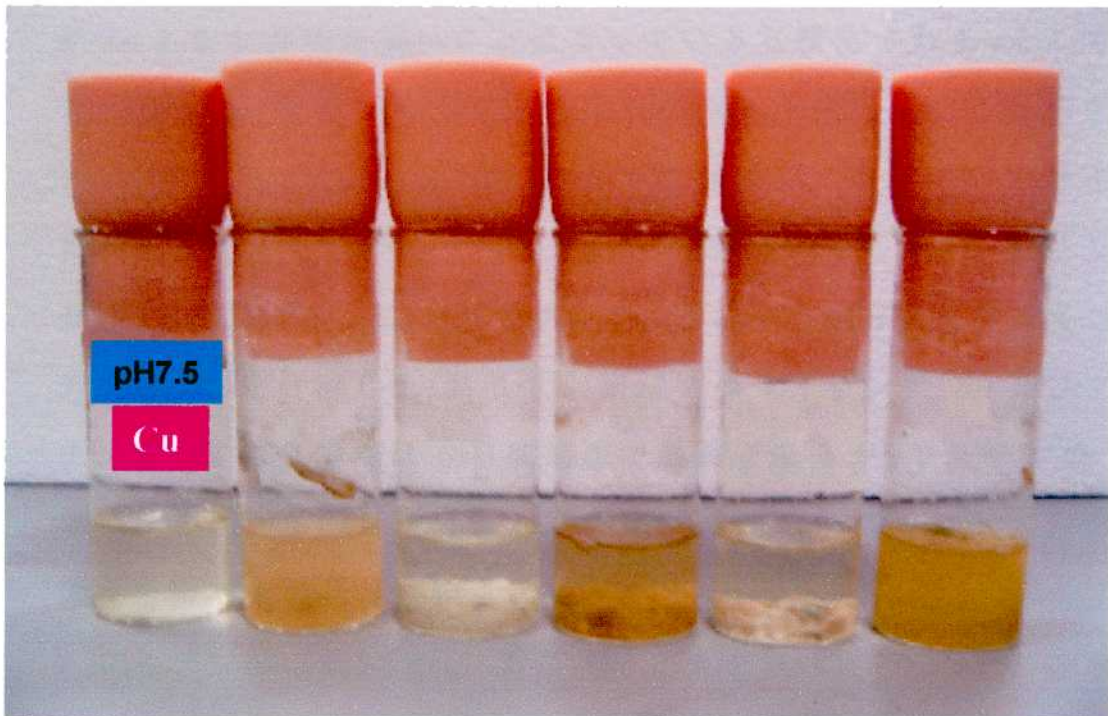


写真 5-4 フィチン酸Cu (0.1 g/ℓ , pH7.5) 分解糸状菌

5・3~4), なお, 細菌と放線菌はフィチン酸 Zn をリン源とした培地で全く生育できなかつたため, フィチン酸 Zn の分解能力が糸状菌より弱いと考えて, 実験を行なわなかつた。その結果, pH7.5 でもフィチン酸 Zn が分解されることが確認された (表 5・2)。

フィチン酸 Cu を 5 g/l (Cu の濃度は約 29 mM) 添加した培地では, いずれの糸状菌株も全く生育できなかつた。このことは Cu が Zn よりも毒性が高いことによつていと推定される。そこで, フィチン酸 Cu の添加量を減らして分解能を調べた。その結果, フィチン酸 Cu が 0.3 g/l では糸状菌の 5 菌株のうち 3 株がわずかに生育でき, 0.2 g/l では 4 株が良好に生育し (フィチン態リンの分解を測定せず), 0.1 g/l では 5 株いずれもが良好に生育してフィチン酸 Cu を分解した (表 5・2)。表 5・2 のフィチン酸 Zn 及びフィチン酸 Cu の分解量は 5 日間培養での値であるが, フィチン酸 Na での結果 (図 5・3) を踏まえれば, 培養期間の延長によつて分解量はさらに増加すると推定される。

フィチン酸 Zn (5 g/l) またはフィチン酸 Cu (0.1 g/l) の培地に含まれる Zn または Cu の濃度は, それぞれ約 29 mM と 0.58 mM であるが, 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結果に基づいて (表 4・3), 堆肥の水分含量を 60% とした場合について計算すると (堆肥 1 kg を 1 l としたときのモル濃度), 各家畜ふん堆肥の Zn の平均濃度は, 牛ふん堆肥で 1.59 mM (103.2 mg/kg), 豚ふん堆肥で 3.88 mM (252 mg/kg), 鶏ふん堆肥で 2.33 mM (151.6 mg/kg) であり, Cu の平均濃度は, 牛ふん堆肥で 0.45 mM (29.04 mg/kg), 豚ふん堆肥で 1.16 mM (74 mg/kg), 鶏ふん堆肥で 0.27 mM (17.2 mg/kg) となる。これらの堆肥中の Zn 及び Cu の濃度から判断すると, 堆肥化

過程において、フィチン酸分解菌の生育は、Znの影響をあまり受けないが、豚ふん堆肥の場合、Cuによってかなり阻害されると懸念される。また、第4章でフィターゼによるフィチン酸 Na 及び飼料原料中のフィチン態リンの分解を50%阻害するZn及びCuの濃度は、pH7のとき、それぞれ0.98~2.50と1.12~4.58 mMであることを認めた。このように、堆肥化過程において特にCuがフィターゼの活性ならびにフィチン酸分解菌の生育を阻害することが懸念される。これゆえ、家畜ふん堆肥中のフィチン態リンの微生物による分解を促進するには、飼料への特にCuの必要以上の添加を抑制させることが重要になる。

5-3-1-3 フィチン酸分解菌の同定

分離菌株のうち、フィチン酸 Zn とフィチン酸 Cu を分解できる菌株は糸状菌だけであった。これらの菌株は25℃、6日間培養したコロニーの形態、色、大きさ及び顕微鏡で観察した結果から、糸状菌-01は、濃緑色胞子の *Trichoderma sp.*、糸状菌-05と糸状菌-08は、濃緑色胞子の *Penicillium sp.*(同一と考えられる)、糸状菌-06と糸状菌-09は、黄緑色胞子の *Penicillium sp.*(同一と考えられる)であった。

5-3-2 分離菌株の利用

図5-4と図5-5は糸状菌-05と08または未熟な牛ふん堆肥を市販豚ふん堆肥に接種し90日間水分を55%及び80%に維持して培養した結果である。糸状菌株(糸状菌-05と08)を接種した後30~45日目における当初含量に比した無機リンの増加率(15~20%)またはフィチン態リンの減少率(16~23%)は90日目

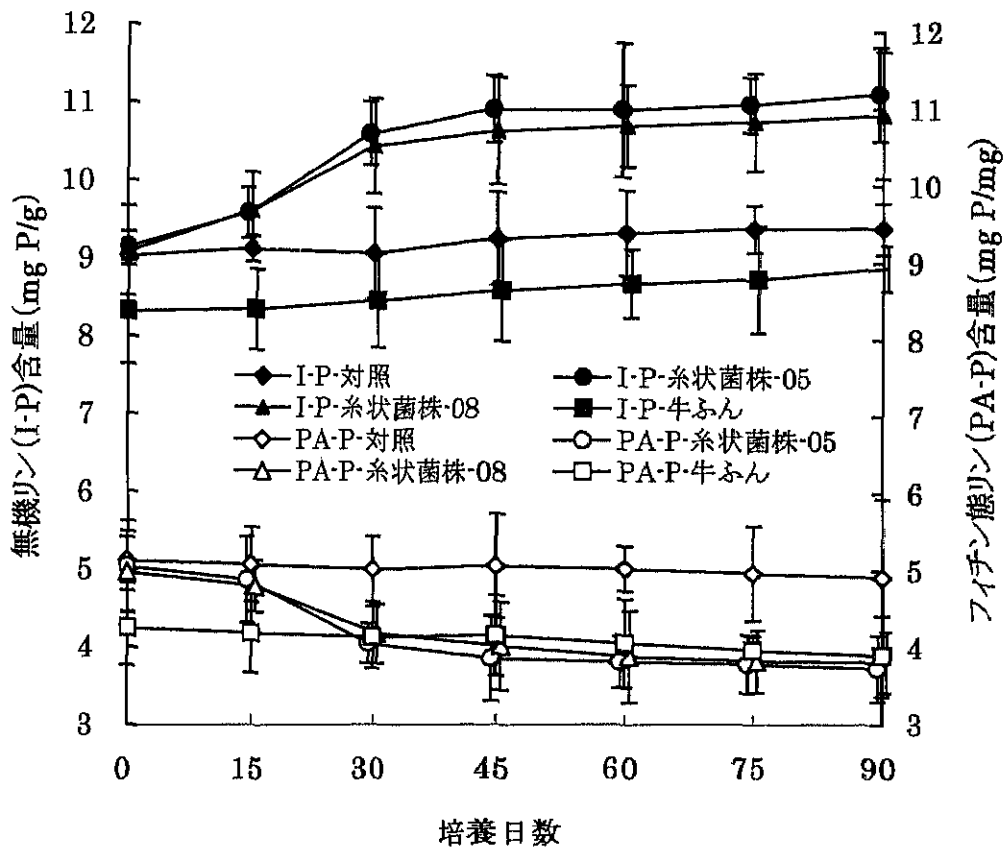


図 5-4 糸状菌と牛ふん堆肥の接種による水分 55%の市販豚ふん堆肥の無機リンとフィチン態リン含量の変化 (mg P/g 乾物)

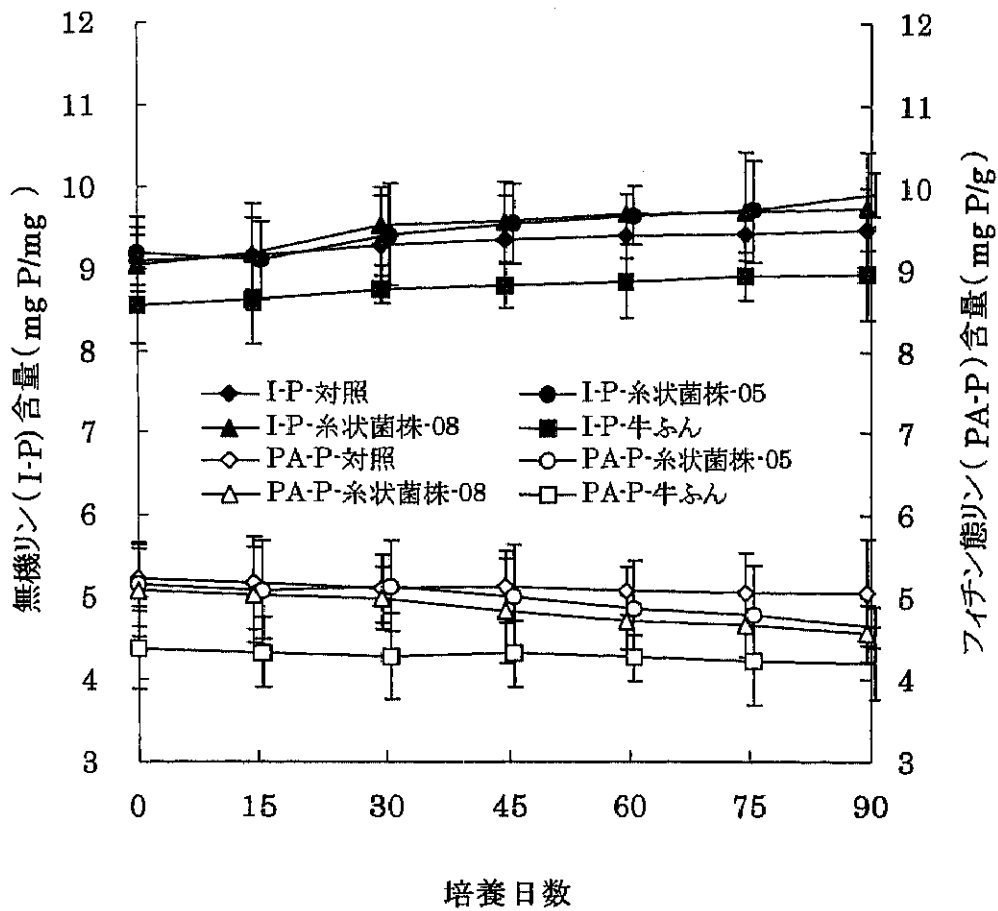


図 5-5 糸状菌と牛ふん堆肥の接種による水分 80%の市販豚ふん堆肥の無機リンとフィチン態リン含量の変化 (mg P/g 乾物)

の無機リンの増加率（20~22%）またはフィチン態リンの減少率（23~26%）に比べて、90日目の70~90%に達した。この間に糸状菌株が活発に生育したと推定される。

ただし、水分80%でのフィチン分解は55%のときに比べて低く、堆肥の水分含量は実際の堆肥の最大水分含量よりも低くすることが必要であることが認められた。

水分含量を55%とした豚ふん堆肥の場合、90日経過後、無機リンが対照区で4.5%、牛ふん堆肥接種区で7.3%増加した。対照区および牛ふん堆肥接種区での増加率を差し引いた糸状菌株接種区の無機リンの増加率は、それぞれ17%と14%高かった。一方、フィチン態リンの当初含量と比較した減少率は、糸状菌株接種区では25%（23~26%）であったが、90日間における対照区での4.1%および牛ふん堆肥接種区での8.5%の減少率を差し引いた糸状菌株接種区のフィチン態リンの減少率は、それぞれ21%と16%高かった。糸状菌株接種区におけるフィチン態リンの減少量は（1.16~1.31 mg/g）、無機リン増加量（1.83~2.04 mg/g）の64%に達していることから、増加した無機リンの約2/3はフィチン態リンに由来すると考えられる。

水分含量を80%とした場合、90日経過後の無機リンの当初含量に比した増加率は、糸状菌株接種区では8%であり、対照区よりも4%、牛ふん堆肥接種区よりも3%高いだけであった。また、フィチン態リンの当初含量に比した減少率は、糸状菌株接種区では10%であり、対照区よりも7%、牛ふん堆肥接種区よりも6%高いだけであった。水分含量80%では通気性が悪く、好気性の糸状菌株の生育が抑制されたために、無機リンの増加やフィチン態リンの減少は水分55%のときよりも低かったと推定される。

牛ふん堆肥を接種源として直接に接種した市販豚ふん堆肥の無機リンの増加率とフィチン態リンの減少率は、水分含量を 55% の場合で、対照区よりもやや高く、糸状菌株接種区よりも低くなった。牛ふん堆肥に含まれたフィチン酸分解菌の数は分離菌株（糸状菌-05 と 08）の数より少ないためと考えられる。しかし、経費・人力などから考えれば、牛ふん堆肥接種源として豚や家禽などの単胃動物のふんに接種して、堆肥中のフィチン態リンの一部が分解できる方法と考えられる。堆肥のフィチン態リンの分解をもっと促進するには、フィチン酸 Zn 及びフィチン酸 Cu のような難分解性のフィチン酸を強力に分解できる菌株を多量に堆肥に接種することが必要であろう。

こうした結果は、フィチン態リン分解糸状菌株を家畜ふん堆肥に接種して、その中のフィチン態リンの分解を促進できる可能性を示している。ただし、実用技術とするためには、(1) 家畜ふん堆肥でより旺盛に増殖して、より強力にフィチン態リンを分解できる菌株のスクリーニング、(2) 菌株の増殖を促進させる強制通気など培養条件の検討、(3) 飼料への Cu 添加量の削減などが必要である。接種菌株の増殖させた堆肥が調製できれば、それを戻し堆肥として利用することによって毎回の菌株の接種は不要となる。従って、上記の問題点が克服されれば、フィチン酸分解菌の堆肥への添加は実用技術となりうると期待される。

5.4 まとめ

フィチン酸 Na をリン源として加えた培地を用いて、家畜ふん堆肥からフィチン酸 Na 分解菌の分離を試みるとともに、分離した分解菌を豚ふん堆肥に接種して、堆肥中のフィチン態リンの分解促進を試み、次の結果をえた。

- 1) 未熟な牛ふん堆肥から多数のフィチン酸 Na 分解菌がえられ、その中で糸状菌には高い分解能を持つものが多かった。
- 2) フィチン酸 Na 分解能の高い菌株を用いて、フィチン酸 Ca、フィチン酸 Zn 及びフィチン酸 Cu の分解能を調べた。その結果、糸状菌、細菌及び放線菌のいずれのフィチン酸 Na 分解菌株もフィチン酸 Ca を分解できた。しかし、フィチン酸 Zn 及びフィチン酸 Cu を分解できたのは糸状菌株だけであった。
- 3) 分離したフィチン酸 Zn 及びフィチン酸 Cu の分解能の高い糸状菌株を豚ふん堆肥に接種して、25℃で90日間培養した。その結果、無接種の対照区に比べて、無機リンの増加率は17%、フィチン態リンの減少率は21%高かったことが認められた。

このように、フィチン酸 Zn やフィチン酸 Cu のような難分解のフィチン態リンを分解できるフィターゼをもつ微生物を直接堆肥に接種して、微生物が生息している間に産生したフィターゼの作用で、堆肥中の難分解性のフィチン態リンを分解ことができ、堆肥の肥料効果を確保できる上で、フィチン態リンをリン源として利用されることが期待できる。