

## 第4章 土壤腐植酸中の窒素成分および加水分解性成分

土壤有機物中の窒素は自然界においても、また農業上においても、植物への窒素栄養の給源として重要な役割を持っている。従って、腐植酸をはじめ土壤有機物中の窒素の存在形態は、古くから多くの研究者によって研究されてきた(4)。しかし腐植酸中の窒素の存在形態を、腐植化度との関連において研究した例は少ない。その中で熊田(27)は、腐植酸の全窒素含量、加水分解性窒素含量、および非加水分解性窒素含量を、腐植化度との関連において整理しているが、Kumadaら(8)による腐植酸の分類(A, B,  $R_p$ , P型)との関連性については、まだ報告されていない。

本研究は第2章で、腐植酸の窒素含量が、 $R_p(2)$ 型から $R_p(1)$ 型にかけては増加し、 $R_p(1)$ 型から $P_0$ 型、B型を経てA型にかけては減少することを指摘したが、本章ではさらに加水分

解性および非加水分解性窒素，アミノ酸態窒素，アンモニア分解生成量，アミノ酸組成等の，腐植化の進行にともなう変化について検討する。またアミノ酸と同時に加水分解されて生成するフェニール性物質の含量，および分解条件は異なるが，同じく酸で加水分解される糖およびウロン酸含量についても検討する。

## 試料および方法

### 1) 供試腐植酸

表 1 に示した 39 点の腐植酸から，それぞれの分析項目に対し適当な数の試料を選んで分析を行なった。また，岐阜県七宗国有林内の天然林下で採取した乾性ポドソル B<sub>h</sub> 層土壤の腐植酸 1 点を追加した。この試料は室温で 0.5 N NaOH で抽出し，0.1 M ピロリン酸ナトリウムと塩酸による溶解・再沈殿を繰り返して，さらに陽イオン交換樹脂で精製した。詳しく

は次章に述べる。元素組成は C : 51.6% ,  
H : 4.89% , N : 3.35% , O : 40.2% , C/N  
: 15.4 であった。

## 2) 腐植酸中の窒素の分析

### (1) アミノ酸組成

火山性黒ぼく土の天文台 (No. 2) , 褐色  
森林土の闇苅 (No. 18) , ポドソル土 F 層の  
木曾駒 F (No. 38) , ポドソル土 B<sub>h</sub> 層の七宗  
(No. 40) の各土壌から抽出した4点の腐植  
酸を供試した。窒素として 800  $\mu$ B 相当の腐植  
酸を硬質試験管中に採り, 内部標準として,  
1  $\mu$  mol のノルロイシンを含む定沸点塩酸  
(6 N) 2 ml を加え, 減圧にして封管した。  
これを 110  $^{\circ}$ C で 20 時間加熱し, 放冷後開管し  
た。内容物を東洋ろ紙 No. 5B でろ過し, ろ液  
を 60  $^{\circ}$ C で減圧濃縮乾固した後, 蒸留水による  
再溶解と減圧濃縮乾固を 2 回繰り返した。続  
いて乾固物を 5 ml のクエン酸緩衝液 (pH 2.2)  
に溶解し, その 0.25 ml を用いて, 日立 034 型

液体クロマトグラフにより、アミノ酸分析を行なった。カラム充填剤としては、日立球状樹脂 # 2611 (塩基性アミノ酸用) および # 2612 (中酸性アミノ酸用) を用い、分析法は、「日立 034 型液体クロマトグラフ操作法」に所載の標準 4 時間分析法によった。

(2) 6 N 塩酸加水分解によるアミノ酸およびアミノニア生成量の定量

腐植化度および土壌の種類が異なる 10 点の腐植酸 (表 8) を用いた。ノルロイシンを添加しなかった以外は上述の方法と同様にして 6 N 塩酸で加水分解し、分解生成物を 5 ml のクエイン酸緩衝液 (pH 2.2) に溶解した。この溶液 0.5 ml を 2 ml の蒸留水で希釈し、2 本の小試料ビンに 1 ml ずつを分注した。その一方にはさらに 1 ml の水を添加し、他方にはアミノニアを除去するため 0.08 N NaOH 1 ml を添加して pH を 12 とし、双方とも、1 N 硫酸を入れ、たデシケータ中に一夜放置した。これらの

溶液のニンヒドリン呈色値を、日立 034 型液体クロマトグラフのカラム部分をテフロンチューブに交換して、自動定量した。検量線は硫酸アミノニウムおよびグリシンによって作成した。アミノ酸総量は、アミノニアを除去した溶液の呈色値から求めた。またアミノニアを除去しなかった溶液と、除去した溶液との、呈色値の差からアミノニア含量を求めた。アミノニアの呈色は、グリシンの呈色の 0.77 倍であった。

### (3) 8 N 硫酸加水分解による各窒素成分の定量

34 点の腐植酸 (A 型 12 点, B 型 5 点, Rp (1) 型 7 点, Rp (2) 型 4 点, P<sub>0</sub> 型 3 点, P<sub>+</sub>~<sub>+</sub> 型 3 点) を供試した。表 1 の腐植酸のうち, Nos. 7, 16, 17, 23, 28 の腐植酸は、量的制約から、供試しなかった。

窒素として 400  $\mu$ g 相当の腐植酸を溶解した 3 ml の腐植酸 - 0.1 N NaOH 溶液を硬質試験管

中にとり、0.85 ml の濃硫酸を加えた後、減圧にして封管した。封管は  $110^{\circ}\text{C}$  で 20 時間加熱後開管し、内容物を 10 ml ヶスフラスコに移し、水で定容にした。これをガラス栓付き遠心管に移して遠心分離し、上澄液 0.5 ml を TNBS 法 (28) によるアミノ酸の定量に供試した。沈殿は希塩酸で 3 回洗浄した後、ケルダール法で非加水分解性窒素を定量した。全窒素含量もケルダール法で定量し、全窒素含量と非加水分解性窒素含量の差を、加水分解性窒素含量とした。

TNBS 法によるアミノ酸の定量は以下のように行なった。試料液 0.5 ml (硫酸濃度 2.8 N) に、リン酸緩衝液 (pH 8.0 の 0.5 M リン酸緩衝液 4 容に、試料中の硫酸中和のため 2.8 N NaOH 1 容を加えたもの) 2.5 ml, および 0.1% トリニトロベンゼンスルホニ酸ナトリウム水溶液 2.0 ml を加え、 $40^{\circ}\text{C}$  で 90 分間反応させたのち、6 N 塩酸 5.0 ml を加えて反応を止め、400 nm の吸光度を測定した。検量

線はグリシニで作成した。

### 3) 8 N 硫酸加水分解液中のフェニール性成分および全有機物含量

#### (1) 8 N 硫酸加水分解性フェニール含量

上述の 8 N 硫酸加水分解上澄液 0.5 ml を試験管中に採り、6 倍希釈したフォリンのフェニール試薬 3.0 ml、および 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  - 4%  $\text{NaOH}$  水溶液 1.0 ml を添加し、 $30^\circ\text{C}$  で 30 分以上放置した後、750 nm の吸光度を測定した。検量線はフェニールで作成した。

#### (2) 8 N 硫酸加水分解性全有機物量

上述の加水分解上澄液 1.0 ml を試験管中に採り、0.5 N 重クロム酸カリ - 濃硫酸溶液 2.0 ml を添加し、30 分以上放置後 645 nm の吸光度を測定した。検量線はグルコースによって作成した (29)。

#### (3) 8 N 硫酸加水分解上澄液の UV 吸収

上述の加水分解上澄液を蒸留水で6倍希釈し、日立124型分光光度計でUV吸収を測定した。

#### 4) 加水分解性糖類の定量

##### (1) ヘキソース含量

表1の39点の腐植酸を供試した。濃度0.2~1%の腐植酸-0.1N NaOH溶液5mlを試験管中にとり、これに6N硫酸1mlを添加し、冷却管を取り付け、沸騰水浴中で2時間加熱した。加水分解液は放冷後10mlメスフラスコに移し、水で定容にした。これを、乾燥した東洋ろ紙No. 2でろ過した。ろ液1mlを試験管中にとり、氷水中で冷却した。これに、0.2%アンスロニ-硫酸試薬(30)6mlを添加し、氷水中でよくふりませた後、沸騰水浴中で正確に10分間加熱した。これを冷水で室温まで冷却した後、625nmの吸光度を測定した。検量線はグルコースで作成した。なお、加水分解液に対しては、アンスロニを含まな



硫酸溶液で同一の呈色操作を行ない、得られた対照値を差し引いて真の呈色値とした。

## (2) ウロコ酸含量

あらかじめ氷水で冷却した 0.95% ホウ酸ナトリウム - 濃硫酸溶液 5 ml の上に、上述のろ液 1 ml を静かに重層させた。これを、室温以上にならないように、十分冷却しながら混合した後、沸騰水浴中で正確に 10 分間加熱した。流水で室温にまで冷却した後、0.125% カルバゾール - 無水エタノール溶液 0.2 ml を加えて振りませ、再び正確に 15 分間沸騰水浴中で加熱した。これを流水で室温にまで冷却した後、530 nm の吸光度を測定した。カルバゾールを含まない無水エタノールで同一の呈色操作を行ない、得られた対照値を差し引いて、真の呈色値とした。検量線はグルクロン酸で作成した (31)。

# 結果および考察

## 1) 腐植酸のアミノ酸組成

表6に4点の腐植酸のアミノ酸組成を比較した。個々のアミノ酸中では、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、アラニンは、いずれもアミノ酸総モル数の約10%かそれ以上を占めた。また、これらの腐植酸が腐植化度および土壌の種類において非常に異なつて

Table 6. Relative molar distribution of amino acids in humic acids (%).

Name RF Type	Humic acid				Average	Standard deviation
	Temmondai	Kiragari	Hichiso	Kisokoma (F)		
	A	B	B <sub>1</sub>	Rp (2)		
<b>Acidic</b>						
Aspartic acid	14.6	14.3	13.4	13.3	13.9	0.64
Glutamic acid	11.5	9.59	10.6	10.5	10.5	0.78
<b>Neutral (non-polar)</b>						
Glycine	12.6	12.8	11.6	12.3	12.4	0.51
Alanine	11.9	10.6	10.9	10.4	10.9	0.65
Valine	7.76	8.36	5.86	7.63	7.40	1.08
Isoleucine	4.13	4.16	4.66	4.86	4.45	0.37
Leucine	5.59	6.32	7.14	7.87	6.73	0.99
Phenyl alanine	3.45	3.76	3.87	4.08	3.79	0.26
Proline	4.87	6.28	6.51	5.80	5.87	0.73
<b>Neutral (polar)</b>						
Serine	5.28	5.81	6.09	5.54	5.68	0.35
Threonine	6.60	5.36	7.18	5.57	6.18	0.86
Methionine	0.00	0.71	1.14	0.81	0.67	0.48
Tyrosine	0.89	1.40	1.77	2.17	1.56	0.55
Cystine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Basic</b>						
Lysine	5.89	5.57	3.84	4.16	4.87	1.02
Histidine	1.67	1.55	2.66	2.68	2.14	0.61
Arginine	3.31	3.48	2.82	2.27	2.97	0.54

いるにもかかわらず、これらのアミノ酸の構成比は非常に類似していた。

バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、リジンは、それぞれアミノ酸総モル数の4から8%を占めた。リジンを除いて、各種腐植酸の間でのこれらの値の変動は非常に小さく、標準偏差と平均値の比率は5%から15%であった。

メチオニン、チロシン、ヒスチジン、アルギニンは、いずれもアミノ酸総モル数の3%以下であった。定量値自身が高いこととあって、リジンも含めこれらの値の変動は多少大きく、標準偏差と平均値の比率は18%から70% (メチオニン) であった。

以上の結果は、腐植酸中のアミノ酸組成、すなわちタンパク質様構造部分の性質が、腐植化度や土壌の種類の違いにかかわらず、非常に類似していることを示している。

表7には、アミノ酸分析によって検出され

るアミノ酸総量, アミノ糖, アミノア生成量を示した。アミノ酸は腐植酸の全窒素の28から57%, 全炭素の6から12%を占め, アミノア生成量は全窒素の8.5から15%を占めた。これらに比してアミノ糖生成量は少なく, 全窒素の0.9から2.2%, 全炭素の0.4から0.7%であった。アミノ糖は, 細菌や菌類の細胞壁の重要な構成成分であるが, 細胞壁成分の腐植酸画分に対する寄与は, あまり大きくはないものと推察される。

Table 7. Nitrogen and carbon distribution in humic acids\*

	Humic acid			
	Temmondai Kuragari		Hichiso Kisokoma (F)	
Nitrogen distribution				
Amino acid-N	28.1	36.4	46.6	56.8
Amino sugar-N	1.99	1.24	0.92	2.19
Ammonia-N	15.3	13.7	8.51	15.3
Carbon distribution				
Amino acid-C	6.29	11.3	11.6	11.9
Amino sugar-C	0.73	0.60	0.36	0.71

\* Values are expressed as percentage to total N or total C.

## 2) 腐植酸中の各種形態の窒素成分の量と腐植化度または腐植酸の型との関係

### (1) 加水分解性窒素

図 15 に、腐植酸の加水分解性窒素含量と RF の関係を示した。第 2 章において、腐植酸の全窒素含量は Rp (2) 型から Rp (1) 型にかけて増加し、Rp (1)、P<sub>o</sub>、B、および A 型の間では、腐植化度が高くなるほど減少することを示したが、加水分解性窒素含量もまた、全く同様な傾向を示した。また Rp (1)、P<sub>o</sub>、B、および A 型腐植酸の間では、加水分解性窒素含量と RF の間に高い負の相関 ( $r = -0.769^{***}$ ) が認められた。

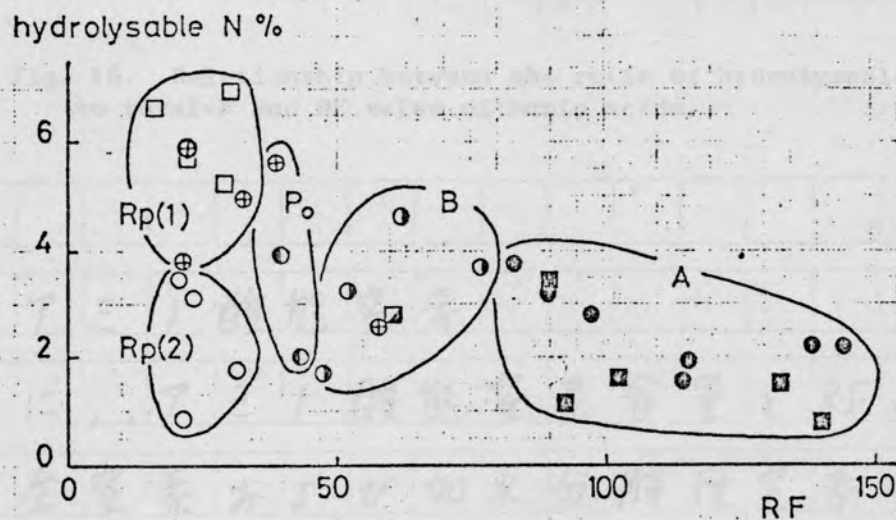


Fig. 15. Relationship between hydrolysable-N % and RF value of humic acids.

図 16 に、加水分解性窒素が全窒素に占める割合と RF の関係を示した。この割合は Rp 型、Po 型、B 型の間ではあまり差がなかったが、A 型腐植酸の間では RF 値が高くなるほど減少した。

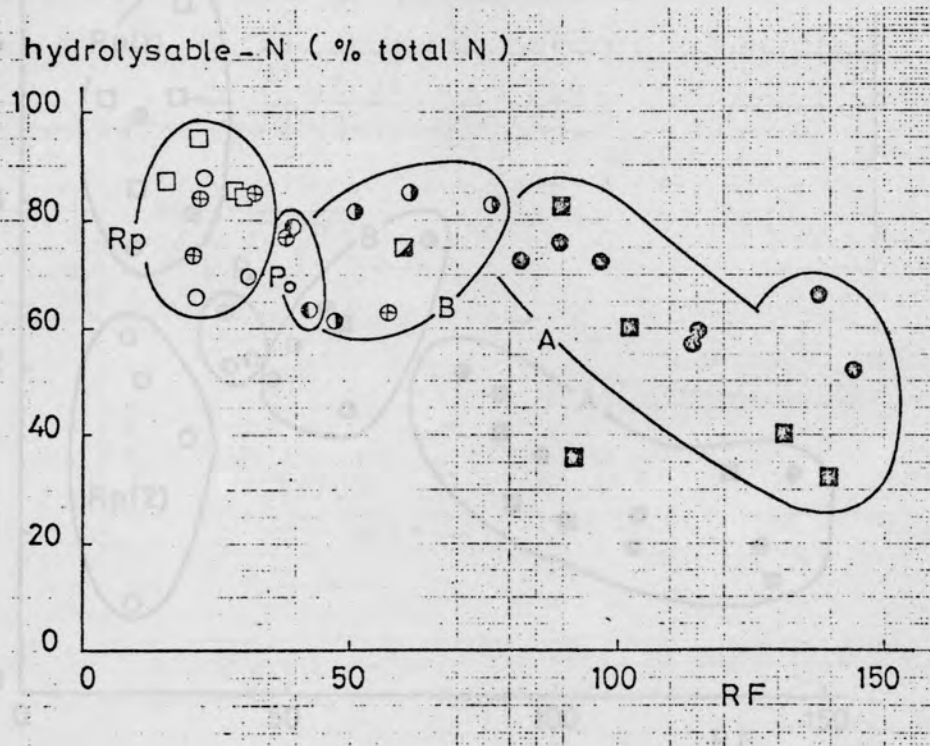


Fig. 16. Relationship between the ratio of hydrolysable-N to total-N and RF value of humic acids.

(2) アミノ酸態窒素

図 17 に、アミノ酸態窒素含量と RF の関係を示す。全窒素および加水分解性窒素含量と同様、アミノ酸態窒素も、Rp (2) 型から Rp (1) 型に

かけて増加し,  $R_p(1)$ ,  $P_0$ ,  $B$ , および  $A$  型腐植酸の間では,  $RF$  の増大とともに減少し,  $RF$  に対して極めて高い負の相関 ( $r = -0.861$  \*\*\* ) を示した。

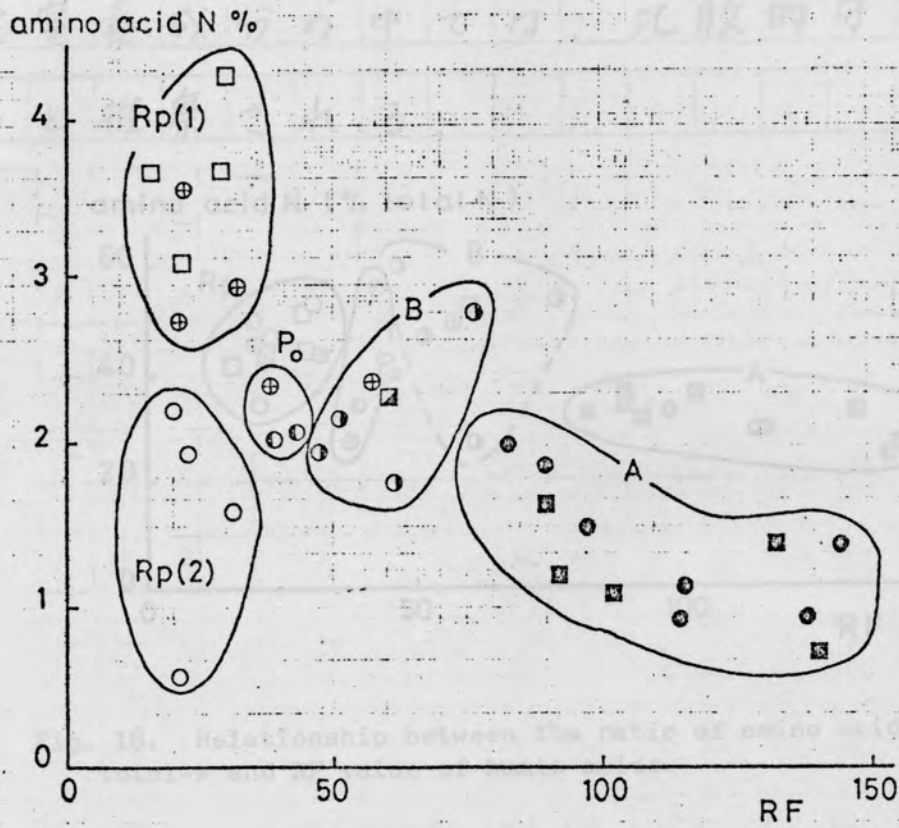


Fig. 17. Relationship between amino acid-N % and RF value of humic acids.

図 18 に, アミノ酸態窒素が全窒素中に占める割合と  $RF$  の関係を示した。この割合は 25% から 60% の間に分布し,  $RF$  の増大とともに減少し,  $R_p(1)$ ,  $P_0$ ,  $B$ ,  $A$  型の間で,  $RF$  に対し

て高い負の相関 ( $r = -0.597^{***}$ ) を示した。しかし減少の割合は、A型腐植酸においても、加水分解性窒素割合ほど著しくはなかった。すなわち、タンパク質態窒素は腐植酸の加水分解性窒素成分の中では、比較的安定な成分であると推察される。

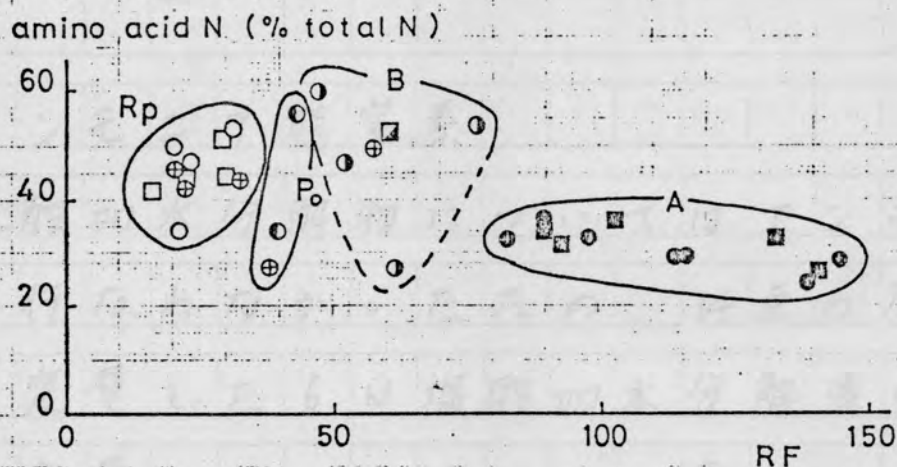


Fig. 18. Relationship between the ratio of amino acid-N to total-N and RF value of humic acids.

以上の結果は、Rp(2)からRp(1)型にかけての腐植酸中の窒素含量の増加が、主として加水分解性窒素、なかでもタンパク質を構成するアミノ酸態窒素の増加によることを示している。このことは、Rp(2)型腐植酸の給源としての腐朽植物遺体は、多糖類、リグニン等の無



窒素化合物に比較的富んでいるのに対し、  
Rp (1) 型腐植酸の給源としての A 層または作土  
層の腐植においては、無窒素化合物のうちの  
易分解性部分が資化され、微生物菌体やその  
代謝物等の、窒素に富んだ有機物の含有量が  
高いことによるものと推定される。

### (3) アンモニア態窒素

8 N 硫酸加水分解物についてはアンモニア  
の定量を行なわなかったため、14 点の腐植酸  
について定量した 6 N 塩酸加水分解液中のア  
ンモニア含量について述べる。表 8 に、この  
14 点の試料について、8 N 硫酸加水分解およ  
び 6 N 塩酸加水分解の結果を示した。アミノ  
酸態窒素生成量は両分解法でほぼ等しく、従  
って両方法は腐植酸に対してほぼ同じ効果をも  
持つものと推定される。

加水分解によるアンモニア生成量と RF の間  
には有意な相関は存在しなかった ( $r =$   
 $-0.563$  N.S.)。またアンモニア生成量の全