

7. 分解分析

7-1. 酸加水分解分析（中性糖）

炭水化物は土壤有機物中の 5~25%を占め、単に植物遺体中のセルロースやヘミセルロース成分を引き継いだものばかりでなく、土壤中で微生物により再合成されたものも多く含まれる。これらは土壤中の金属や粘土鉱物と結合して安定化し、腐植物質が生成する際の構造単位にもなっている¹⁾。腐植物質を酸加水分解すると、それらは中性単糖やウロン酸として検出されるが、多糖構成単糖間の結合様式の違いにより、最大収量が得られる分解条件が異なる。そのため、それぞれ成分毎に適した分解・定量条件が検討されている²⁾。

加水分解液中の糖の定量は、簡易的には比色法によって行われる。ヘキソースの定量法としては、アンスロニー-硫酸法、ペントースの定量法としては、オルシノール・鉄(III)・塩酸法、糖一般の定量法としてはフェノール-硫酸法が一般的である。ウロン酸の比色法は、カルバゾール-硫酸法²⁾によって行われる。これらの定量法については、福井ら³⁾、立川⁴⁾等を参照されたい。

糖組成の定量にはガスクロマトグラフィー (GC) による方法、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による方法等がある⁵⁾。GCによる方法は、HPLCによる方法よりも、機器が汎用的であり、感度も高いが、単糖類を揮発性の誘導体に変換しなくてはならない。誘導体化の方法としては、シリル化法と還元アセチル化法がある。シリル化法の方が揮発性誘導体を調製する際のステップ数が少ないが、1つの糖に対して2つのピークが現れる。またシリル化の生成物は不安定である。還元アセチル化法によれば、糖をまず還元して糖アルコールにしてからアセチル化するので、還元剤の除去や生成物の抽出等多くの操作を必要とするが、1成分に対し1ピークのみが対

応する。また、生成物も比較的安定である。

HPLCによる方法も多数報告されている⁵⁻⁷⁾。ただし専用カラム、グラジエント装置、特殊な検出器等が必要となる。また、検出感度を上げるため、糖成分をUVラベルあるいは蛍光ラベルしなくてはならない場合もある。しかし、操作が簡単であり、単糖類ばかりでなく、二糖類やオリゴ糖の分析も可能であること等の利点を持っている。ここでは、硫酸加水分解—還元アセチル化—GC法を紹介する⁸⁾。

方 法

- 1) 腐植物質試料 50~100 mg をまず 12 M 硫酸 2 mL に浸して 16 時間室温で静置し、蒸留水 46 mL を加えて硫酸濃度を 0.5 M に希釈した後、100 (水浴) ないし 105°C (油浴) で 8 時間加熱還流させる⁹⁾。
- 2) フルボ酸等分解液に着色物質が多く含まれている場合には、PVP (2-1.参照) 等の樹脂を充填したカラムに流すことで着色物質を除去する。樹脂は 1~2 カラム容量の希硫酸 (pH 2>) ですすぎ、洗液はカラムを通過した分解液に合わせる。
- 3) 水酸化バリウム溶液で分解液を pH 7.0 まで中和し、生成した硫酸バリウムを濾過 (ADVANTEC No.131 濾紙等) して除去する。
- 4) 内部標準としてミオイノシトール一定量 (80 mg L⁻¹ 溶液 1 mL 程度) を加え、次いで水素化ホウ素ナトリウム 50 mg を加えて還元する (2 時間~一晚)。
- 5) 酢酸 1 mL を加え、過剰の水素化ホウ素ナトリウムを分解し、ロータリーエバポレーターにより濃縮乾固する⁹⁾。
- 6) メタノール: 酢酸 (9:1) 10 mL を添加し、ロータリーエバポレーターで蒸発乾固する操作を 4 回繰り返した後、メタノール 10 mL を加えて蒸発乾固する操作を 3 回繰り返す⁹⁾。
- 7) 無水酢酸 7 mL および濃硫酸 0.5 mL を加えて 105°C で 8 時間加熱する^{8, 9)}。反応後、氷冷しながら蒸留水 20 mL を加えて過剰の

無水酢酸を分解する。

- 8) 分液ロートに移し、ジエチルエーテルまたはジクロロメタン 10 mL を加え、アセチル化糖をジクロロメタンに転溶する。この操作を 3 回繰り返し、有機溶媒相を脱水、濃縮乾固後、1 mL のジクロロメタンに再溶解して、GC 分析に供試する。
- 9) GC カラムにはクロムパック社製 CP-Sil 43CB (長さ 25 m×内径 0.25 mm×膜厚 0.2 μm)、Alltec 社の AT-Silar、J&W 社の DB-225 等の熔融シリカキャピラリーカラムが適している。ここでは、Supelco 社製 SP-2380 (長さ 30 m×内径 0.25 mm×膜厚 0.20 μm) を用い、試料溶液 1 μL を注入し、水素炎イオン化検出器 (FID) で検出した。カラム温度等は図 7-1-1 の脚注に示してある。
- 10) 各ピークの同定は同様にアセチル化した各単糖のピーク保持時間との比較から、濃度は内部標準とのピーク面積の比較からそれぞれ推定する。なお、各糖の純品についても同様の操作でアセチル化を行い、内部標準との重量比と GC のピーク面積比との関係を求めておく。

留意点

- a) ヒューミンの場合、Oades ら⁹⁾ の土壤中の全糖分析法に従うと、まず 2.5 M 硫酸で 20 分加水分解を行い、次にその残渣を 13 M 硫酸に 16 時間浸漬させ、これを 0.5 M 硫酸となるように希釈した後、5 時間加熱する。最近、Martens・Loeffelman⁷⁾ は土壌および植物体中の糖の加水分解法について再び詳しく研究し、ヘミセルロースの分解には 12 M 硫酸に 0.5 時間濡らした後、硫酸濃度を 1 M に希釈しオートクレーブで 0.5 時間加熱するとよいとし、セルロース型糖の分解には、その残渣を 18 M 硫酸に 0.5 時間濡らした後、硫酸濃度を 1 M に希釈してオートクレーブで 0.5 時間加熱するとよいとしている。ウロン酸については、0.25 M 硫酸中で 121°C、30 分加熱を提案している。
- b) ウロン酸組成の分析にはイオンクロマトグラフィー⁷⁾ や GC¹⁰⁾

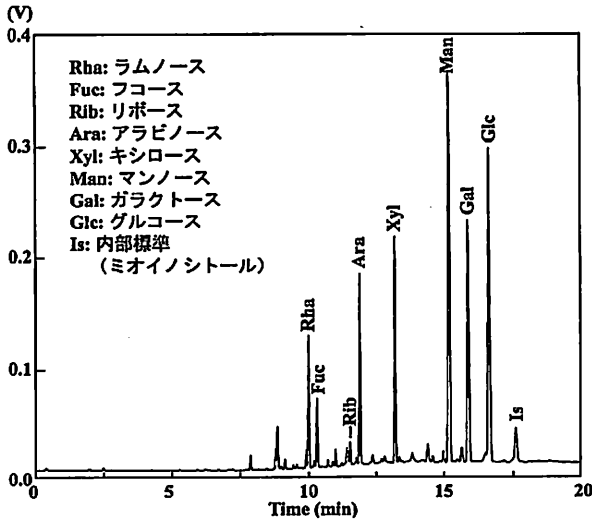


図 7-1-1. 猪之頭フミン酸硫酸加水分解生成物のガスクロマトグラム。
 使用機器, Carlo Erba 社製 HRGC 5160; カラム, Supelco 社製 SP-2380 (長さ
 30 m×内径 0.25 mm×膜厚 0.20 μm); 検出器, FID; 注入法, スプリット法
 (40:1); 注入量, 1 μL; キャリヤーガス, He; カラムオープン温度, 初期温度
 150°C (5 分)—昇温 7.5°C min⁻¹—最終温度 250°C (15 分)。

が用いられ、後者の場合には前処理として水素化ホウ素ナトリウム
 による還元、ホウ酸の除去、濃塩酸によるラクトン化、トリメチル
 シリル化を行う。

c) スケールは試薬/試料比を一定にして変えてもよい。また、
 Tsutsuki・Kuwatsuka¹¹⁾ は、フミン酸 10~50 mg を 0.5 M 硫酸 6 mL
 中に分散させ、沸騰水浴中で 2 時間加熱還流させ、分解を行った。
 フミン酸、フルボ酸、水溶性有機物等に含まれる溶存性の非セルロ
 ース型糖を分析する場合、塩酸、トリフルオロ酢酸、トリクロロ酢
 酸、H 型陽イオン交換樹脂—塩酸などを使用して加水分解を行って
 もよい。これらの酸はロータリーエバポレーターにより容易に除去
 できるという利点がある。

d) 濃縮乾固前の試料を H 型陽イオン交換樹脂 (Dowex HCR-W2 等)

で処理するとよい。

e) この方法では水素化ホウ素ナトリウムから生成するホウ酸の除去に手間を要しているが、Blakeney ら¹²⁾は、加水分解液中の硫酸を除去せずにアンモニアで中和し、また水素化ホウ素ナトリウムの分解によって生ずるホウ酸も除去しないで、糖の還元アセチル化を行う方法を提案している。アセチル化は1-メチルイミダゾールを触媒として行われており、反応は室温で進行する。1-メチルイミダゾールは強力で、しかもホウ酸の影響を受けにくい触媒であり、今後ピリジンや硫酸等のアセチル化触媒の代りに用いられると考えられる。

f) 筒木・近藤¹³⁾は、ピリジン 1 mL と無水酢酸 1 mL を加えて、密栓し、100°C で 20 分加熱している。

g) Yoshida・Kumada¹⁵⁾は、無水酢酸 7.5 mL と濃硫酸 0.5 mL を加え、50~60°C で 30 分加熱している。

データおよび解説

日本腐植物質学会標準試料の酸加水分解で生成した 8 種の中性糖の収量と各糖の存在比 (%) を表 7-1-1 に示す。各糖の収量および総量はフルボ酸よりもフミン酸で高く、また猪之頭フミン酸と段戸フミン酸の間にはほとんど差はない。Tsutsuki・Kuwatsuka¹¹⁾は、フミン酸中のヘキソースおよびウロン酸含量が腐植化度と高い負の相関を示し、石灰質土壌のフミン酸で特に相関係数が高いこと、同程度の腐植化度のフミン酸でも黒ボク土由来のフミン酸の方が石灰質土壌由来のフミン酸よりも糖およびウロン酸含量が高い傾向を示すことを見出している。猪之頭フミン酸は A 型であるにも関わらずヘキソース含量が高いが、他の同程度の腐植化度の黒ボク土フミン酸と比較しても高いと考えてよい。

土壌中の糖はキシロース、アラビノースが主に植物（ヘミセルロース）由来、グルコースは植物・微生物の両方に由来し、他の 5 種は主に微生物由来とされている¹⁴⁾。両土壌のフミン酸は中性糖組成

表 7-1-2 日本腐植物質学会標準試料の中性糖組成 (mg g⁻¹)*

画面	土壌	グルコース	ガラクトース	マンノース	キシロース	アラビノース	リボース	フコース	ラムノース	計
フミン酸	猪之頭	17.7 (22.8)**	11.3 (14.5)	14.5 (18.7)	11.8 (18.2)	7.6 (11.8)	1.6 (2.5)	2.0 (2.8)	6.1 (8.7)	72.6
	段戸	15.3 (20.6)	10.7 (14.5)	14.2 (19.1)	11.4 (18.5)	7.3 (11.8)	1.5 (2.5)	2.3 (3.4)	6.5 (9.6)	69.1
フルボ酸	猪之頭	7.5 (20.1)	4.9 (13.3)	5.7 (15.2)	9.3 (30.0)	3.8 (12.4)	0.1 (0.3)	1.1 (3.3)	1.8 (5.5)	34.2
	段戸	4.4 (24.9)	2.7 (15.0)	2.7 (15.4)	2.5 (16.8)	2.3 (15.6)	0.1 (0.7)	0.4 (2.6)	1.5 (9.1)	16.6

*無灰分当たり。**括弧内は全中性糖に占める各単糖の Mol%。

も類似しており、グルコースの存在比が最も大きく、ついでマンノースまたはキシロースが多い。これらにガラクトースを加えた4種の糖の相対含量が一般的に高い。一方、段戸フルボ酸ではアラビノースの割合がフミン酸を上回り、猪之頭フルボ酸ではグルコースよりもキシロースの方が多。また、両土壌ともフルボ酸の方がフミン酸よりもマンノース、リボースの存在比が小さい。これらのことから、2土壌に関してはフルボ酸の方がより植物由来糖の寄与が大きいと推察できる。

引用文献

- 1) Stevenson, F.J. : Humus Chemistry — Genesis, Composition, Reactions. Second edition. p. 212-235, Wiley, New York (1994)
- 2) Bitter, T. and H.M. Muir : A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, **4**, 330-334 (1962)
- 3) 福井作蔵 : 還元糖の定量法 第2版. p. 52-59, 62-64, 88-94, 学会出版センター, 東京 (1990)
- 4) 立川 涼 : 土壌および液体試料中の有機物の迅速定量法ならびに糖類に関する二、三の定量法. *土肥誌*, **37**, 28 - 33 (1966)
- 5) 菅家文左衛門, 田中治夫 : 高速液体クロマトグラフィーによる土壌糖の分析. 日本土壌肥料学会編「土壌構成成分解析法—新しい手法・新しい考え方」, p. 37-70, 博友社, 東京 (1992)
- 6) Campo, G.M., S. Campo, A.M. Ferlazzo, R. Vinci, and A. Calatroni : Improved high performance liquid chromatographic method to estimate aminosugars and its application to glycosaminoglycan determination in plasma and serum. *J. Chromatogr. B*, **765**, 151-160 (2001)
- 7) Martens, D.A. and K.L. Loeffelman : Improved accounting of carbohydrate carbon from plants and soils. *Soil Biol. Biochem.*, **34**, 1393-1399 (2002)
- 8) Watanabe, A., N. Maie, A. Hepburn, D. McPhail, T. Abe, K. Ikeya, Y.

- Ishida, and H. Ohtani : Chemical characterization of Japanese Humic Substances Society standard soil humic and fulvic acids by spectroscopic and degradative analyses. *Humic Sub. Res.*, **1**, 18-28 (2004)
- 9) Oades, J.M., M.A. Kirkman, and G.H. Wagner : The use of gas-liquid chromatography for the determination of sugars extracted from soils by sulfuric acid. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **34**, 230-235 (1970)
- 10) Benzing-Purdue, L.M. and J.H. Nikiforuk : Determination of glucuronic and galacturonic acids in soils by high-performance gas chromatography. *Soil Sci.*, **145**, 264-269 (1988)
- 11) Tsutsuki, K. and S. Kuwatsuka : Chemical studies on soil humic acids. IV. Amino acid, phenol, and sugar composition in the acid hydrolysable fraction of humic acids. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **25**, 29-38 (1979)
- 12) Blakeney, A.B., P.J. Harris, R.J. Henry, and B.A. Stone : A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydr. Res.*, **113**, 291-299 (1983)
- 13) 筒木 潔, 近藤錬三 : 泥炭地植物の加水分解性中性糖組成. *土肥誌*, **68**, 45-51 (1997)
- 14) Murayama, S. : Microbial synthesis of saccharides in soils incubated with ^{13}C -labelled glucose. *Soil Biol. Biochem.*, **20**, 193-199 (1988)
- 15) Yoshida, M. and K. Kumada : Studies on the properties of organic matter in buried organic horizon derived from volcanic ash. III. Sugars in hydrolysates of buried humic horizon. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **25**, 209-216 (1979)

(筒木 潔・渡辺 彰)

7-2. 酸加水分解分析 (アミノ酸, アミノ糖)

タンパク質様物質も土壤中に多く含まれ、腐植物質と結合形態にあると考えられている。その一部は、酸で加水分解できないほど強い結合を形成している。また、微生物細胞壁には、アミノ糖、ムラミン酸、ジアミノピメリン酸等の特徴的な窒素化合物が含まれ、これらが土壤中の腐植物質との結合によって安定化されることも考えられる。土壤中から最も多く検出されるのは、グルコサミンとガラクトサミンであり、微量のマンノサミンやムラミン酸も検出される。腐植物質の酸加水分解はアミノ酸、アミノ糖などを遊離させる。アミノ酸の加水分解には 6 M HCl が多く用いられてきた。

加水分解液中のアミノ酸の比色定量法としては、ニンヒドリン比色法およびトリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム比色法がある¹⁾。トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムによる方法は、アミノ酸相互間の発色率の差が少ない、アンモニアの発色率がアミノ酸の 15%程度と低い、発色が安定である等の利点が報告されている¹⁾。ここでは著者が用いている方法を紹介し²⁾、トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムによる日本腐植物質学会標準試料の分析結果³⁾を示す。

アミノ糖を得るための加水分解にも、アミノ酸と同様 6 M HCl が用いられるが、加水分解時間はアミノ酸の場合よりも短い。Zhang ら⁴⁾は、105°C、6 時間の加水分解を行っている。定量には、キャピラリガスクロ⁴⁾、HPLC⁵⁾、アミノ酸分析計²⁾、比色法等が用いられる。標準試料の分析結果はないが Elson-Morgan 法の変法である Svennerholm 比色法を紹介する¹⁾。

方 法²⁾

7-2-1. アミノ酸組成

1) 窒素として 800 μg の腐植物質試料を硬質試験管にとり、内部標

準として 1 μmol のノルロイシンを含む定沸点 HCl (6 M) 2 mL を加え、凍結後減圧して封管する。

- 2) 110°C で 20 時間加熱し、放冷後開管する¹⁾。
- 3) 内容物を濾過 (例えば ADVANTEC No. 5B) し、60°C で減圧濃縮乾固した後、蒸留水による再溶解と濃縮乾固を 2 回繰り返す。
- 4) 乾固物を 5 mL のクエン酸緩衝液 (pH 2.2) に溶かし、その 0.25 mL をイオン交換アミノ酸分析計にインジェクトし、各アミノ酸濃度を定量する。

7-2-2. 比色法によるアミノ酸の定量 (ニンヒドリン法)²⁾

- 1) 窒素として 400 μg 相当の腐植物質試料を硬質試験管にとり、4 M H_2SO_4 4 mL あるいは 6 M HCl 4 mL を加え、凍結後減圧して封管する。
- 2) 110°C で 20 時間加熱し、放冷後開管し、内容物を濾過、水洗する。
- 3) 加水分解液をロータリーエバポレーターで濃縮乾固した後、蒸留水を加え、薄い NaOH 溶液で中和して、再び濾過し、濾液を定容する。
- 4) 試料溶液 2 mL をネジ栓付試験管にとり、ニンヒドリン発色液 2 mL を加える。発色液には、ニンヒドリン 4.0 g、ヒドリンダンチン 0.6 g、メチルセロソルブ 150 mL を混合溶解した後、4 M 酢酸緩衝液 (pH 5.51) 50 mL を加えて N_2 ガスで置換した後保存しておいたものを用いる。
- 5) 密栓して沸騰水浴中で 15 分加熱した後、流水中で冷却し、50% エタノール 3 mL を添加し、570 nm の吸光度を測定する。検量線はグリシン 0~20 μg の範囲で作成する。

7-2-3. 比色法によるアミノ酸の定量 (トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム法)²⁾

- 1) 7-2-2. と同様にして加水分解を行い、試料溶液を得る。
- 2) 加水分解後の試料溶液全量の水で希釈し、遠心分離する。

- 3) 希釈試料溶液 0.5 mL に対し、1.4 M NaOH 0.5 mL、pH 8.0 の 0.5 M リン酸緩衝液 2.0 mL および 1 g L^{-1} トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム水溶液 2 mL を加え、40°C で 90 分間反応させた後、6 M HCl 5.0 mL を加えて反応を止め、416 nm の吸光度を測定する。検量線はグリシン 0~10 μg の範囲で作成する。この方法は塩酸加水分解液に対しても適用可能である。

7-2-4. アミノ糖

- 1) アセチルアセトン 1 mL を 0.625 M 炭酸ナトリウムで 25 mL とする (アセチルアセトン試薬)。
- 2) ジメチルアミノベンズアルデヒド 1.6 g を 96% (v/v) エタノール 30 mL に溶かし、濃 HCl 30 mL を加える。この溶液 3.85 mL を水で希釈して 10 mL とする (Ehrlich 試薬)。
- 3) 7-2-1.と同様にして塩酸加水分解液を得、フェノールフタレイン 5 g をエタノール 1 L に溶かした溶液 1 滴を加え、1 M NaOH 溶液でピンク色になるまで中和する。
- 4) 2 M HCl を 1~2 滴加えて指示薬の色を消し、定容する。
- 5) この溶液 2 mL (グルコサミン 2~15 μg 相当) を試験管にとり、アセチルアセトン試薬 1 mL を加えて密栓し、90°C で 1 時間加熱する。
- 6) 水冷後、99%エタノール 8 mL を加えてよく振り混ぜ、Ehrlich 試薬 1.0 mL を加え、1 時間 15~20°C に放置した後、530 nm の吸光度を測定する。検量線はグルコサミンを用いて作成する。

データおよび解説

日本腐植物質学会標準試料のトリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム比色法によるアミノ酸含量を表 7-2-1 に示す。土壌フミン酸の場合、加水分解によって生成するアミノ酸はフミン酸重量の 2~10%を占める (表 7-2-1)。糖含量が、腐植物質の精製によってか

表 7-2-1 日本腐植物質学会標準試料のトリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム比色法によるアミノ酸含量

	フミン酸		フルボ酸	
	猪之頭	段戸	猪之頭	段戸
アミノ酸含量* (mg g ⁻¹)	56.0	88.0	35.5	23.8

*無灰分当たり。

表 7-2-2 フミン酸中のアミノ酸の相対モル分布 (%)

試料名	天文台	閩荊	七宗	木曾駒(F)	平均	標準偏差
A ₆₀₀ /C	9.3	4.0	3.3	1.3		
型	A	B	B	Rp(2)		
酸性アミノ酸						
Asp	14.6	14.3	13.4	13.3	13.9	0.65
Glu	11.5	9.59	10.6	10.5	10.5	0.78
中性アミノ酸 (非極性)						
Gly	12.6	12.8	11.6	12.3	12.3	0.53
Ala	11.9	10.6	10.9	10.4	11.0	0.67
Val	7.76	8.36	5.86	7.63	7.40	1.08
Ile	4.13	4.16	4.66	4.86	4.45	0.36
Leu	5.59	6.32	7.14	7.87	6.73	0.99
Phe	3.45	3.76	3.87	4.08	3.79	0.26
Pro	4.87	6.28	6.51	5.80	5.87	0.73
中性アミノ酸 (極性)						
Ser	5.28	5.81	6.09	5.54	5.68	0.35
Thr	6.6	5.36	7.18	5.57	6.18	0.86
Met	0	0.71	1.14	0.81	0.67	0.48
Tyr	0.89	1.40	1.77	2.17	1.56	0.54
Cys	0	0	0	0	0.00	0.00
塩基性アミノ酸						
Lys	5.89	5.57	3.84	4.16	4.87	1.02
His	1.67	1.55	2.66	2.68	2.14	0.61
Arg	3.31	3.48	2.82	2.27	2.97	0.54

表 7-2-3 フミン酸中のアミノ酸およびアミノ糖の窒素・炭素分布

試料名 A ₆₀₀ /C 型	天文台	閣苺	七宗	木曾駒(F)
	9.3	4.0	3.3	1.3
	A	B	B	Rp(2)
窒素分布 (全窒素に占める%)				
アミノ酸態 N	28.1	36.4	46.6	56.8
アミノ糖態 N	1.99	1.24	0.92	2.19
アンモニア態 N	15.3	13.7	8.51	15.3
炭素分布 (全炭素に占める%)				
アミノ酸態 C	6.29	11.3	11.6	11.9
アミノ糖態 C	0.73	0.60	0.36	0.71

なり減少するのに対して、アミノ酸含量はあまり減少しない。このことから、アミノ酸が由来するタンパク質様物質は腐植物質と共有結合によって結合し、腐植物質の構造の一部分を形成しているものと考えられる。

参考として Tsutsuki・Kuwatsuka²⁾ による土壤フミン酸のアミノ酸組成の例を表 7-2-2 に、各種土壤フミン酸中のアミノ糖含量を表 7-2-3 にそれぞれ示す。フミン酸中のアミノ酸含量およびアミノ酸窒素がフミン酸中の全窒素に占める割合²⁾ は、腐植化度が高くなるほど減少する傾向を示したが、アミノ酸組成には土壤の種類や腐植化度が異なってもほとんど差異は認められなかった。Trubetskaya ら⁶⁾ が 5 種類の非常に異なった起源の土壤から得たフミン酸のアミノ酸組成も表 7-2-2 と非常に良く似ており、さらに、フミン酸をゲル濾過により分子サイズ分画した場合も、画分間のアミノ酸組成の差は小さかった。ただし、分子サイズの大きなフミン酸画分ほどアミノ酸の含量が高かった。これらの結果から、土壤フミン酸中に含まれるタンパク質様物質は、世界的にかなり均一な組成を持っていることが推察される。

各種土壤フミン酸中のアミノ糖含量²⁾ は、全窒素の 0.9~2.2%、

なり減少するのに対して、アミノ酸含量はあまり減少しない。このことから、アミノ酸が由来するタンパク質様物質は腐植物質と共有結合によって結合し、腐植物質の構造の一部分を形成しているものと考えられる。

参考として Tsutsuki・Kuwatsuka²⁾ による土壤フミン酸のアミノ酸組成の例を表 7-2-2 に、各種土壤フミン酸中のアミノ糖含量を表 7-2-3 にそれぞれ示す。フミン酸中のアミノ酸含量およびアミノ酸窒素がフミン酸中の全窒素に占める割合²⁾ は、腐植化度が高くなるほど減少する傾向を示したが、アミノ酸組成には土壤の種類や腐植化度が異なってもほとんど差異は認められなかった。Trubetskaya ら⁶⁾ が 5 種類の非常に異なった起源の土壤から得たフミン酸のアミノ酸組成も表 7-2-2 と非常に良く似ており、さらに、フミン酸をゲル濾過により分子サイズ分画した場合も、画分間のアミノ酸組成の差は小さかった。ただし、分子サイズの大きなフミン酸画分ほどアミノ酸の含量が高かった。これらの結果から、土壤フミン酸中に含まれるタンパク質様物質は、世界的にかなり均一な組成を持っていることが推察される。

各種土壤フミン酸中のアミノ糖含量²⁾ は、全窒素の 0.9~2.2%、

全炭素の 0.3~0.7%に相当し (表 7-2-3)、アミノ酸含量との対応は認められないが、腐植化度の低い Rp(2)型フミン酸と腐植化度の高い A 型フミン酸で高くなる傾向があり、これらのフミン酸の構造中に微生物菌体由来の成分の貢献が大きいことが推察される。

引用文献

- 1) 菅原 潔, 副島正美 : 蛋白質の定量法 第3版, p. 177-183, 学会出版センター, 東京 (1990)
- 2) Tsutsuki, K. and S. Kuwatsuka : Chemical studies on soil humic acids. IV. Aminoacid, phenol, and sugar composition in the acid hydrolysable fraction of humic acids. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **25**, 29-38 (1979).
- 3) Watanabe, A., K. Itoh, S. Arai, and S. Kuwatsuka : Comparison of the composition of humic and fulvic acids prepared by the IHSS method and NAGOYA method. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **40**, 601-608 (1994)
- 4) Zhang, X. and W. Amelung : Gas chromatographic determination of muramic acid, glucosamine, mannosamine, and galactosamine in soils. *Soil Biol. Biochem.*, **28**, 1201 - 1206 (1996)
- 5) Campo, G.M., S. Campo, A.M. Ferlazzo, R. Vinci, and A. Calatroni : Improved high performance liquid chromatographic method to estimate aminosugars and its application to glycosaminoglycan determination in plasma and serum. *J. Chromatogr. B*, **765**, 151 - 160 (2001)
- 6) Trubetskaya, O.E., O.I. Reznikova, G.V. Afanaseva, L.F. Markova, and T.A. Muranova : Amino acid distribution in soil humic acids fractionated by tandem size exclusion chromatography polyacrylamide gel electrophoresis. *Environ. Int.*, **24**, 573 - 581 (1998)

(筒木 潔)