

# 土壤有機態窒素の塩酸加水分解分画法に関する若干の知見

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者	浅見, 輝男 原, 征彦
巻/号	41巻12号
掲載ページ	p. 487-490
発行年月	1970年12月

# 土壤有機態窒素の塩酸加水分解分画法に関する若干の知見\*

浅見輝男\*\*・原 征彦\*\*\*

水稻の生育にとって最も重要な養分である無機態窒素は、そのかなりの部分が土壤有機態窒素の分解により供給されると考えられている。そのために土壤有機態窒素の存在形態などについての研究がかなり行なわれている。その場合塩酸加水分解分画法がしばしば用いられている。本報告は水田土壤を塩酸で加水分解し、各種有機態窒素画分に分画する場合における若干の問題点について述べる。

## I. 試料および実験方法

### 1. 試料

有機物含有量のみを異にし、その他の化学的性質が比較的等しいと考えられる農林省農事試験場(鴻巣)の水田圃場のうち、無肥料区、無機質肥料連用区、有機質肥料連用区を供試した。土壤は 37°C の恒温室で風乾後、粉碎して 2mm の篩を通過させた。供試土壤の若干の性質は第 1 表に示した。

第 1 表 土壤の性質

土 壤	全炭素 %	全窒素 %	C/N
鴻 巣 無 肥 料 区	2.06	0.207	9.94
〃 無機質肥料区	2.86	0.262	10.91
〃 有機質肥料区	3.50	0.361	9.97

### 2. 実験方法

#### 1) 1 N 塩酸による完全加水分解法

BREMNER の方法<sup>1)</sup>を用いた。方法の概略は別報<sup>2)</sup>を参照されたい。

#### 2) 6 N 塩酸による部分加水分解法

6 N 塩酸で 12 時間加熱分解する完全加水分解法よりも弱い条件での加水分解法である。土壤有機態窒素 30 mg に相当する風乾細土を 200 ml 三角フラスコに秤取し、6 N 塩酸を 60 ml 添加し、時々振盪しながら 37°C に 6 日間放置した。処理後減圧濾過し、濾液 20 ml については直ちに BREMNER の方法<sup>1)</sup>に準じて窒素の分画定量を実施し、別の 20 ml についてはさらに 12 時間砂皿上で加水分解を実施したあとで窒素の分画定量を BREMNER の方法<sup>1)</sup>によって行なった。

\* 本報告の一部は日本土壤肥料学会昭和 42 年度秋季臨時大会(松山)において発表した。

\*\* 東京大学農学部(東京都文京区弥生 1-1-1)

\*\*\* 東京大学農学部(現三井農林 KK)  
昭和 45 年 1 月 20 日受理  
日本土壤肥料学雑誌 第 41 巻 第 12 号 p.487~490 (1970)

## II. 結果および考察

1. 有機物含有量のみを異にする互いに隣接した水田土壤作土の土壤有機態窒素の分画  
鴻巣水田土壤無肥料区、無機質肥料連用区および有機質肥料連用区について、6 N 塩酸による完全加水分解の結果について、百分率と乾土 100 g 当たりの窒素 mg で表示したのが第 2 表である。第 2 表から明らかなように、いずれの土壤においても加水分解される窒素の割合は約 80% であるが、有機物含有量の多い土壤の方が若干加水分解率が低いことが認められた。値の低いこともあって hexosamine-N と  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino-N の値の土壤による差はほとんど認められなかったけれども、約 25% を占める加水分解 NH<sub>4</sub>-N と約 40% を占める  $\alpha$ -amino-N の百分率は有機物含有量の多い土壤の方がかなり低く、他方未知窒素は逆に有機物含有量の多い土壤の方がかなり高かった。

第 2 表 土壤有機態窒素の分画

窒素画分	N %			Nmg/100g土壤		
	無肥	無機	有機	無肥	無機	有機
全 N	100.0	100.0	100.0	207	262	361
非加水分解 N	18.2	19.2	20.1	37	50	80
加水分解 N	81.8	80.8	79.9	170	212	281
NH <sub>4</sub> -N	26.0	24.7	23.0	54	65	81
hexosamine-N	5.4	4.6	5.1	11	12	18
$\alpha$ -amino-N	43.5	42.1	37.4	90	110	131
( $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino-N)	5.8	6.2	6.1	12	16	21
未 知 N	6.9	9.4	14.4	15	25	51

2. 土壤有機物含有量の少ない無肥料区土壤の塩酸加水分解時におけるグルコース添加が土壤有機態窒素の分画におよぼす影響  
先に述べたように有機物含有量のみを異にし、その他の化学的性質が比較的等しいと考えられる互いに隣接した水田土壤作土の有機態窒素画分は、有機物含有量の多い土壤の方が、加水分解 NH<sub>4</sub>-N および  $\alpha$ -amino-N の土壤有機態窒素中に占める割合が低く、未知窒素と非加水分解窒素の割合が高いことがわかった。有機態窒素画分の百分率がこのようになるひとつの理由は、人為的なものすなわち土壤の炭水化物などとアミノ酸とが反応して反応生成物が生じ、 $\alpha$ -amino-N などの値が低くなるためであろうと考えた。

そこで有機物含有量の最も少ない無肥料区土壤を用い、

第 3 表 加水分解時におけるグルコース添加が土壤有機態窒素の分画におよぼす影響  
(無肥料区, グルコース添加量は 1%)

窒素分画	グルコース無添加区 N %	グルコース添加区 N %	差	差 %
全 N	100.0	100.0	—	—
非加水分解 N	18.2	26.0	+7.9	+30.3
加水分解 N	81.8	73.9	-7.9	-10.7
NH <sub>4</sub> -N	26.0	23.1	-2.7	-12.6
hexosamine-N	5.4	5.4	±0.0	±0.0
α-amino-N	43.5	33.4	-10.0	-29.9
(β-hydroxy-α-amino-N)	5.8	4.6	-1.2	-26.1
未知 N	6.9	11.9	+5.0	+42.0

塩酸加水分解に際してグルコースを土壤当たり 1% の割合で添加し, 土壤有機態窒素の加水分解および分画を行なった。結果は第 3 表に示した。第 3 表から明らかなように非加水分解窒素分画と未知窒素分画のみが増加し, 加水分解 NH<sub>4</sub>-N 分画と α-amino-N 分画は減少し, hexosamine-N 分画には変化が認められなかった。加水分解 NH<sub>4</sub>-N 分画と α-amino-N 分画における減少量を比較すると α-amino-N 分画における減少量の方が著しく多かった。以上の結果から有機物含有量の多い土壤を塩酸で加水分解する際に, 加水分解 NH<sub>4</sub>-N 分画および α-amino-N 分画として定量さるべき窒素が, 土壤有機物と反応して未知窒素分画あるいは非加水分解分画として定量されたものと推定できる。

### 3. 土壤有機物含有量の多い有機質肥料連用区土壤の塩酸加水分解時に添加されたグリシン態窒素の各種土壤有機態窒素分画への分配

土壤有機物含有量の多い有機質肥料連用区土壤にグリシン態窒素を土壤窒素 100 mg に対し 20 mg の割合で添加し, 塩酸加水分解を実施し, 添加グリシン態窒素の行くえを差し引き法により検討した。第 4 表より明らかなように添加グリセリン態窒素は α-amino-N 分画には 20 mg 中 11.7 mg しかこず, 残りは非加水分解窒素分画と未知窒素分画にあらわれた。

α-amino-N 分画として約半分しか定量されなかった理由は, やはり土壤中の炭水化物などと反応して, 非加水分解窒素および未知窒素として定量されたものであろう。なお添加グリシン態窒素のうち土壤中の炭水化物などと反応し α-amino-N として定量されなかった窒素の比率は, 土壤中に元来存在していた α-amino-N のうち土壤中の炭水化物などと反応し α-amino-N として定量されなかった窒素の比率よりも高いものと考えられる。

第 4 表 加水分解時に添加されたグリシン態窒素の土壤有機態窒素分画への分配  
(有機質肥料区, グリシン態窒素添加量は 20.0 mg/100 mg 土壤 N)

N 分画	グリシン無添加区 N mg/ 100 mg N	グリシン添加区 N mg/ 120 mg N	差
全 N	100.0	120.0	+20.0
非加水分解 N	20.1	25.8	+5.7
加水分解 N	79.9	94.2	+14.3
NH <sub>4</sub> -N	23.0	20.8	-2.2
hexosamine-N	5.1	4.9	-0.2
α-amino-N	37.4	49.1	+11.7
(β-hydroxy-α-amino-N)	6.1	5.9	-0.2
未知 N	14.4	19.3	+4.9

なぜならば土壤中に元来存在していた α-amino-N は徐々に加水分解されて溶液中に出てくるが, 添加グリシン態窒素は最初から α-amino-N として存在し, 土壤中に元来存在していた α-amino-N よりも早期に炭水化物と反応するものと考えられるからである。以上 2 および 3 の実験から, 塩酸加水分解分画法により得られる α-amino-N 量は現実に土壤中に存在しているそれよりも低い値を示すこと, 特に有機物含有量の多い土壤においては特に低い値が得られることがわかる。したがって性質を異にする土壤の塩酸加水分解法による窒素分画中の有機態窒素の分布を比較する場合には, 以上の点につき十分に注意する必要がある。

### 4. 部分加水分解による土壤有機態窒素の分画

以上の実験は 6 N 塩酸により砂皿上で沸騰させて加水分解する方法, いわば完全加水分解であったが, つぎにはより弱い条件である 6 N 塩酸—37°C, 6 日目放置, いわば部分加水分解を実施した。なお実験方法の項においてすでに述べたように, 部分加水分解を実施し, 土壤を濾別した加水分解液をさらに完全加水分解する方法をもあわせ実施した。結果は第 5 表に示した。第 5 表より明らかなように完全加水分解の場合と異なり, この部分加水分解法においては加水分解窒素の割合は有機物含有量の多い土壤ほど多く, 有機的含有量の多い土壤の方が弱い加水分解条件で分解される窒素の割合が多いことがわかる。なお加水分解窒素中の各分画の比率はいずれも有機物含有量の多い土壤の方が高い。しかし完全加水分解の場合に比べて α-amino-N が非常に少なく, 未知窒素分画が非常に多い。しかしながら部分加水分解液をさらに完全分解した結果が示しているように, 未知窒素の大部分は完全加水分解により α-amino-N と加水分解 NH<sub>4</sub>-

第5表 部分加水分解による土壤有機態窒素の分画

窒素画分	A. 6 N HCl 37°C 6日			B. Aを12時間沸騰			B-A		
	無肥	無機	有機	無肥	無機	有機	無肥	無機	有機
N %									
全 N	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	—	—	—
非加水分解N	63.5	59.8	57.0	63.5	59.8	57.0	—	—	—
加水分解N	36.5	40.2	43.0	36.5	40.2	43.0	—	—	—
NH <sub>4</sub> -N	6.2	6.5	6.9	11.3	11.6	12.6	5.1	5.1	5.7
hexosamine-N	2.2	2.7	3.1	2.9	3.5	3.3	0.7	0.8	0.2
α-amino-N	7.3	8.4	8.8	17.5	21.0	22.0	10.2	12.6	13.2
(β-hydroxy-α-amino-N)	2.3	2.4	3.2	n. d.	n. d.	n. d.	—	—	—
未知 N	20.8	22.6	24.2	4.8	4.1	5.1	-16.0	-18.5	-19.1
N mg/100g 土壤									
全 N	207	262	361	207	262	361	—	—	—
非加水分解N	134	161	216	134	161	216	—	—	—
加水分解N	73	101	145	73	101	145	—	—	—
NH <sub>4</sub> -N	12	16	23	22	29	42	10	13	19
hexosamine-N	4	7	10	6	9	11	2	2	1
α-amino-N	14	21	29	35	53	74	21	32	45
(β-hydroxy-α-amino-N)	5	6	11	n. d.	n. d.	n. d.	—	—	—
未知 N	43	57	83	10	10	18	-33	-47	-65

Nとして定量された。このことは部分加水分解液中においてα-amino-Nが結合して、おそらくペプチッドとして存在していたことを示唆しているものと考えられる。

5. 部分加水分解によるβ-hydroxy-α-amino-Nとその他のα-amino-Nの分解率の相違について

蛋白質を塩酸で加水分解する際に、部分加水分解による分解率はβ-hydroxy-α-amino-Nの方がその他のα-amino-Nよりも大きいことはすでに明らかにされている<sup>3,4)</sup>。

したがって土壤有機態窒素の部分加水分解に際して、β-hydroxy-α-amino-Nの方がその他のα-amino-Nよりも加水分解率が高いとするならば、土壤中においてアミノ酸がペプチッド結合をしているものと推定できるであろう。第6表に完全加水分解によるβ-hydroxy-α-

amino-Nおよびその他のα-amino-Nの値、部分加水分解によるそれぞれの値およびβ-hydroxy-α-amino-Nとその他のα-amino-Nの部分加水分解率ならびにそれらの比を示した。第6表より明らかなように本実験条件の下では部分加水分解率はいずれの土壤の場合もβ-hydroxy-α-amino-Nの方がはるかに大であり、その値はその他のα-amino-Nの2.4~3.5倍にも達していた。したがって土壤中のアミノ酸のかなりの部分がペプチッド結合として存在しているものと推定できる。

以上4および5の実験結果は土壤中においてα-amino-Nは単独でポリフェノールなどと結合して存在しているとする考え方<sup>5)</sup>よりも、ペプチッド、ポリペプチッドおよび多分蛋白質として存在し、それらが他の土壤成分おそらくポリフェノールとN-terminal groupで結合しているとする考え方<sup>6)</sup>を支持しているものと考え

第6表 アミノ酸の加水分解の難易

条件 α-amino-N の種類 土壤の種類	完全分解 (6 N HCl 12 hr 沸騰)		部分分解 (6 N HCl 6日間 37°C)		部分分解 %		E/F
	A	B	C	D	E	F	
	β-OH- α-amino-N mg/100g	その他の α-amino-N mg/100g	β-OH- α-amino-N mg/100g	その他の α-amino-N mg/100g	β-OH- α-amino-N	その他の α-amino-N	
無肥料区	12	78	5	9	42	12	3.5
無機質肥料区	16	94	6	15	38	16	2.4
有機質肥料区	21	110	11	18	52	16	3.1

られる。

### III. 要 約

有機物含有量を異にする互いに隣接した3種の水田土壌を用いて、塩酸加水分解分画法により土壌有機態窒素の分画を試み、若干の知見を得た。結果は以下のとおりである。

1. 6N 塩酸による加熱 12 時間加水分解 (完全加水分解) によって、いずれの土壌においても全窒素の約 80% が加水分解される。全窒素のうち約 25% を占める加水分解  $\text{NH}_4\text{-N}$  と約 40% を占める  $\alpha\text{-amino-N}$  の百分率は土壌有機物含有量の多い土壌の方が低く、他方加水分解液中の未知窒素は土壌有機物含有量の多い土壌の方が高かった。

2. 完全加水分解に際して土壌にグルコースを 1% の割合で加えると、加水分解  $\text{NH}_4\text{-N}$  および  $\alpha\text{-amino-N}$  画分は減少し、非加水分解窒素と加水分解液中の未知窒素が増加した。また完全加水分解に際して土壌にグリシンを添加すると、グリシン態窒素のかなりの部分は、非加水分解窒素および加水分解未知窒素として定量された。これらの事実は土壌を完全加水分解するに際して、 $\alpha\text{-amino-N}$  の一部は土壌中の炭水化物などと反応して、 $\alpha\text{-amino-N}$  として低い値が得られるものと考えられる。

3. 6N 塩酸による 37°C 6 日間保温処理 (部分加水分解) の場合に、塩酸加水分解液中の未知窒素は異常に

高い値を示すが、塩酸部分加水分解液をさらに加熱分解することによりこれらの未知窒素のかなりの部分が  $\alpha\text{-amino-N}$  であることがわかった。また  $\beta\text{-hydroxy-}\alpha\text{-amino-N}$  とその他の  $\alpha\text{-amino-N}$  について部分加水分解率を比較すると、 $\beta\text{-hydroxy-}\alpha\text{-amino-N}$  の方がその他の  $\alpha\text{-amino-N}$  よりも 2.4~3.5 倍程度高かった。これらの事実は土壌中においてアミノ酸がペプチド結合をして存在していることを示唆しているものと考えられる。

謝 辞 本研究を行なうにあたり種々御助言下さった東京大学土壤学研究室高井康雄教授、研究室員の各位および試料採取に御協力下さった農林省農事試験場の各位に対して感謝の意を表します。

### 文 献

- 1) BREMNER, J. M. : C. A. BLACK (ed.) Method of soil analysis, Part 2, p. 1238, Amer. Soc. Agronomy, Madison, Wis., U. S. A. (1965)
- 2) 浅見輝男 : 土肥誌 41, 433 (1970)
- 3) DESNUELLE, P. et CASAL, A. : *Biochim. Biophys. Acta*, 2, 64 (1948)
- 4) DESNUELLE, P. et BONJOUR, G. : *Biochim. Biophys. Acta*, 7, 451 (1951)
- 5) SWABY, R. J. and LADD, J. N. : *Trans. Commissions IV and V, Intern. Soc. Soil Sci. (New Zealand)* p. 197 (1962)
- 6) SOWDEN, F. J. : *Soil Sci.*, 102, 264 (1966)