

土壤腐植酸の化学的研究

筒 木 潔*

腐植酸は、土壤有機物の主要画分であり、土壤固有の有機物としての特性を顕著に示すこと、また、試料としての調製がフルボ酸やヒューミンと比較して容易なことなどから最もよく研究されてきた。しかし、腐植酸は、暗色無定形の高分子物質を主成分とする多種多様な物質の混合物であるため、その構造の解明は困難をきわめている。また、土壤ごとの腐植酸の性質の変動も大きい。

筆者らは、各種の土壤から得られた約 40 点の腐植酸を試料として、元素組成、官能基組成、窒素成分、酸・アルカリ分解生成物や分子量分布を調べ、それらと腐植酸の腐植化度や腐植酸の型あるいは土壤の種類との関係について研究した。また、腐植酸の腐植物質としての性質を最もよく反映する可視部および紫外部吸収の発現に対する、フェノール性水酸基、カルボキシル基、キノン、キノン以外のカルボニル基等の寄与について検討した。

複雑でかつ偏差の大きい腐植酸の性質を統一的に理解するためには、何らかの基準にもとづいた系列付けあるいは分類が必要である。筆者らの研究では、熊田らによる腐植酸の分類法を継承し、その発展を意図した。熊田らの分類による R_p 型は、土壤の無機層位から得られた腐植酸と、腐朽植物遺体や森林土壌 A_0 層から得られた腐植酸とでは、その性質に大きな違いが認められたので、これらを $R_p(1)$ 型と $R_p(2)$ 型に細区分し、A型、B型、 P_0 型、 $R_p(1)$ 型、 $R_p(2)$ 型の間で腐植酸の諸性質の変動を比較した。また、相対色度 RF を腐植化度の尺度とし、 RF 値と諸性質との間にみられる傾向、および各種土壤ごとの特徴を検討した。

1. 腐植酸の化学的組成^{1,2,4)}

腐植酸の化学的組成を、A層土壤から得られた $R_p(1)$ 型と森林土壌 A_0 層から得られた $R_p(2)$ 型の間で比較すると、 $R_p(1)$ 型は全窒素含量、加水分解性窒素含量、加水分解性ヘキソース収量等の値が $R_p(2)$ 型よりも高く、これに対し、 $R_p(2)$ 型はフェノール性水酸基、カルボキシル基、アルカリ加水分解の際のプロログルシンの収量等が高かった。炭素、水素、酸素含量から見積もった腐植酸の酸化状態や、アルカリ加水分解の際のフェノール性酸の収量やメトキシル基含量による腐植酸中のリグニン構造の量のめやすは、両型腐植酸の間で大差がなかった。 $R_p(2)$ 型から $R_p(1)$ 型への変化を想定すると、この過程では、植物遺体中のリグニン以外の易分解性成分が分解され、菌体タンパク質等の形態で窒素成分が濃縮されるものと考えられる。腐植酸の暗色化すなわち腐植化の進行は、 $R_p(1)$ 型以後、B型ないしA型への変化の過程をまっけて行なわれるものと思われる。

$R_p(1)$ 型、 P_0 型、B型、A型腐植酸の間では、腐植化度 RF の増大と並行して、腐植酸の各種の化学的性質に規則的な変化が認められた。元素組成としては、 RF の増大とともに、水素含量および窒素含量は著しく減少し、元素組成から計算される腐植酸の不飽和度は増大した。官能基としては、 RF の増大とともにカルボキシル基、カルボニル基、フェノール性水酸基の含量が増加し、メトキシル基、アルコール性水酸基の含量は減少した。カルボキシル基含量とカルボニル基含量の間には高い正の相関が認められた。酸加水分解によるアミノ酸、ヘキソース、ウロン酸等の収量、およびアルカリ分解によるフェノール性酸の収量等も、 RF の増大とともに減少した。これらの官能基や加水分解性の諸成分によって、腐植酸中の炭素や酸素がかなりの程度説明された。これらの結果から、腐植化の進行とともに、リグニン、タンパク質、多糖類等の構造部分が徐々に変質ないし消失して、酸性解離基とカルボニル基に富む暗色高分子が生成することが推定された。

また、腐植酸のアルカリ加水分解生成物として、プロトカテキ酸、バニリン酸等のリグニン構造に由来するフェノール酸以外に、コハク酸、グルタル酸、フロログルシン、没食子酸等が検出されたことから、糖の褐変物、縮合型タンニン、加水分解性タンニン等の成分も腐植酸の構造に寄与していることが推察された。縮合型タンニンやフラボノイドに由来するフロログルシンの収量は、土壤植生の影響を受け、森林土壌由来の腐植酸で高い傾向があった。

2. 腐植酸の分子量分布^{4,5)}

腐植酸の化学構造や成分組成は非常に複雑であるが、これに加えて、その分子量は非常に多分散性であり、広い範囲にひろがって分布している。それゆえ、腐植化の

* つつきよし；昭和54年名古屋大学大学院農学研究科(博士)卒。

国際稲研究所をへて、現在ハンブルグ大学客員研究員

進行にともなう分子量の変化や、分子量とその他の物理的、化学的性質との関係を調べることは、腐植酸の生成過程を解明するうえで有効な手段になると思われる。このような理由から、高速液体クロマトグラフィーによる分子量測定用に開発されたゲル（商品名マイクロボンダゲル、シラノール基をマスクした微粒多孔性シリカ）および多孔性ガラスビーズ（CPG）を用いて、腐植酸の浸透クロマトグラフィーを行なった。

腐植酸分子のひろがりや溶離液のイオン強度に著しく依存し、分子がイオン強度の増大とともに収縮することを示した。結果として、浸透クロマトグラフィーは、腐植酸の分子量決定の一義的な方法にはなりえないことが判明した。たとえば、マイクロボンダゲルを用いた実験では、溶離液のイオン強度が0.03から0.5へ増大する間に、 R_p 型腐植酸のみかけの分子量（デキストラン対照）は、320,000から4500まで小さくなった。このような現象は解離基を多く持つ鎖状高分子に一般的に認められるものであり、したがって腐植酸は、鎖状高分子的で、かなり伸縮自在の構造を持つものと考えられた。

腐植酸分子の大きさは、 R_p 型、B型、A型の順に、腐植化度の増大とともに減少した。多孔質ガラスCPGを用いた分画実験では、腐植酸中の最も腐植化度の高い画分は、全体の中位の分子サイズ画分に存在した。最も腐植化度の高い画分よりも分子サイズが大きくなることもない、 RF 値は著しく減少したが、 $\Delta \log K$ 値はほとんど不変化のままどまった。このことは、高分子サイズ画分ほど、暗色高分子と共存する低腐植化度の高分子の存在割合が高くなることを示すものと考えられた。

3. 腐植酸の紫外部および可視部吸収^{3,4)}

腐植酸の可視部吸収から導かれた腐植化度および分類法が腐植酸の各種の性質の遷移を示すうえで有効であることは、筆者らの研究においても明らかであった。しかし、腐植酸の可視部吸収の本体である暗色高分子の構造、または可視部吸収の発現機構については、まだ不明な点が多い。そこで、腐植酸中の解離性官能基やカルボニル基が、腐植酸の紫外部および可視部吸収にどのように寄与しているかを検討した。

各種の波長で、腐植酸溶液のpHと吸光度の関係を調べた。腐植酸の吸光度はpHの上昇にともなって小刻みな階段状に増大した。全体としては酸性域とアルカリ性域にそれぞれ変曲点が存在した。この実験は、腐植酸の可視部および紫外部吸収に、 pK 値の異なる多種類のカルボキシル基やフェノール性水酸基が寄与していること

を示した。また、これらの解離基の解離は高分子電解質としての解離様式に従っていることも示された。

各型の腐植酸について、アルカリ性溶液と中性溶液の差スペクトルおよび中性溶液と酸性溶液の差スペクトルを測定した。これらのスペクトルは R_p 型およびB型腐植酸ではリグニンと共通の波長にピークを持ったが、A型腐植酸ではリグニンと共通のピークはブロードになり、A型腐植酸に特有の示差吸収が増大した。この差スペクトルの変化は、腐植化の進行とともに腐植酸中のリグニン構造が減少ないし変化し、他方で土壌に固有の暗色高分子が生成増加する様子を示している。また、差スペクトルには P_g 色素の影響が顕著にあらわれ、A型腐植酸や一部のB型腐植酸の構造には、 P_g 色素に類似した縮合多環キノロンが関与していることが示唆された。

さらに、腐植酸の紫外部および可視部吸収に対するカルボニル基およびキノンの寄与を検討するため、カルボニル基の選択的還元剤である水素化ホウ素ナトリウムおよびキノンの還元剤ハイドロサルファイトを用いて腐植酸を還元し、吸収スペクトルの変化を調べた。

カルボニル基の還元により腐植酸の600nmでの吸収は30%から90%減少し、減少の程度には土壌の種類や腐植酸の型による違いが認められた。還元による差スペクトルは、pHによる差スペクトルと同様、 R_p 型およびB型腐植酸の構造にはリグニン様構造が寄与し、A型腐植酸では縮合多環構造が寄与していることを示した。キノンの可視部吸収に対する寄与はいずれの型の腐植酸でも大きかったが、腐植化の進行とともに、長い共役系を持った縮合多環キノロンの増加することが推定された。

おもな業績

- 1) KUWATSUKA, S., TSUTSUKI, K. and KUMADA, K.: Chemical Studies on Soil Humic Acids. I. Elementary Composition of Humic Acids. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 24, 337~347 (1978)
- 2) TSUTSUKI, K. and KUWATSUKA, S.: Degradation of Humic Acids with Potassium Hydroxide. *ibid.*, 25, 183~195 (1979)
- 3) TSUTSUKI, K. and KUWATSUKA, S.: pH-Dependent Nature of the Ultraviolet and Visible Absorption Spectra of Humic Acids. *ibid.*, 25, 373~384 (1979)
- 4) 筒木 潔・熊田 恭一: 腐植酸の化学, 肥料科学, 3, 93~131 (1980)
- 5) TSUTSUKI, K. and KUWATSUKA, S.: Molecular Size Distribution of Humic Acids as Affected by the Ionic Strength and the Degree of Humification. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 30 (1984) in press