

森林土壌における二段階加水分解法および ワックスマン法による中性糖量の比較

伊月亜有子

Comparison the Amount of Neutral Sugar between by Two Stage Hydrolysis Method
and by Waksman's Proximate Analysis in the Forest Soil

Ayuko Itsuki

The soil (L and A horizons) under the Laurel-leaved forest (B_{B,1}) and Natural *Cryptomeria japonica* forest (B_{B,2}) in Kasuga-yama Hill Primeval Forest were selected to examine the amount of neutral sugar by two stage hydrolysis method and by Waksman's proximate analysis, and to compare those method. In the L horizon where a fresh plant residue was supplied voluminously, the amount of glucose and xylose by two stage hydrolysis method was larger than that of by Waksman's proximate analysis. On the other hand, a small amount of neutral sugars by Waksman's proximate analysis was larger than that of by two stage hydrolysis method. From the above-mentioned result, Waksman's proximate analysis was guessed to be excellent in the extraction of a small amount of neutral sugar.

1. はじめに

土壌糖類は土壌有機物の5～25%を占め、土壌微生物の基質やエネルギー源として重要である^[1]。森林において、土壌の糖組成および微生物バイオマスとの関係を検討することにより、土壌微生物による土壌有機物の分解・集積過程についての情報を得ることができると考えられる^[2]。

ところで、土壌中の炭水化物は存在形態が複雑であるため、土壌糖類を分析する際にその抽出方法が重要な意味を持つ^[3,4]。森林土壌中の糖類は植物遺体に代表されるように高分子化合物の状態が存在するため、加水分解が有効であると考えられる。一方、Waksmanの近似分析法^[5,6]は木材の分析法^[7,8]を参考に考案された方法で、ベンゼン・エタノール抽出、熱水抽出、塩酸加水分解および硫酸加水分解へと進む逐次分画法である。この方法は脂質（ベンゼン・エタノール抽出画分）、熱水可溶有機物（熱水抽出画分）、植物遺体構成成分であるヘミセルロース（塩酸加水分解画分）およびセルロース（硫酸加水分解画分）を分画することができる。そのためそれぞれの画分に含まれる中性糖組成を検討するのに適していると考えられる。

本報告では、森林土壌について加水分解法のうち、簡便で比較的満足した結果が得られる二段階加水分解法およびワックスマン法により抽出した画分の中性糖量を測定し、それぞれの特徴を比較検討した。

2. 供試土壌および実験方法

2.1 供試土壌

実験は前報^[9,10]と同じく、春日山天然林内の代表的な2地点で行った。すなわち、タブノキ (*Machilus thunbergii*) およびイヌガシ (*Neolitsea aciculata*) などの高木林からなる乾性褐色森林土（照葉樹林と称する）および高木スギ (*Cryptomeria japonica*) 林からなる乾性褐色森林土（天然杉林と称する）について、新鮮な植物遺体が多量に含まれる有機物層のL層および鉍質土層のA層を平成13年4月に採取した。各地点ともに数面断面観察を行い、様相が最も平均的であるところを選定した。土壌は直ちに実験室に持ち帰り、2mm以下に調整した。風乾した土壌を粉碎（WB-1, 大阪ケミカル）し、0.5mmの篩を通して風乾微細土試料とした。各土壌の理化学的性質を表1に示した。

表1 供試土壌の理化学性

植生	土壌型	層位	深さ (cm)	含水率 (%)	pH (H ₂ O)	全炭素量 (g kg ⁻¹)	全窒素量 (g kg ⁻¹)	炭素率 (C/N)
照葉樹林	乾性褐色森林土	L	0-0.5	13.7	4.52	467.3	12.6	37.1
		A	4-9	42.5	3.88	189.1	10.5	18.0
天然杉林	乾性褐色森林土	L	0-1	13.7	5.04	498.7	5.8	89.1
		A	8-13	42.0	3.81	106.0	5.8	18.3

2.2 実験方法

1) 二段階加水分解法^[3]

風乾微細土試料 1g に 12M 硫酸 2.5mL を加え、室温で 16 時間静置後、硫酸を 0.5M 相当に希釈し、100℃の砂浴上で 5 時間加水分解した。

2) Waksman の近似分析法

Waksman の近似分析法^[5,6]を改変した和田らの方法^[11]に従い、熱水抽出、塩酸および硫酸加水分解画分に逐次分画した。熱水抽出画分は 0.5M になるように 5M 硫酸を加えて 100℃の砂浴上で 5 時間加水分解した^[12]。

3) 中性糖の分析 (リン酸-フェニルヒドラジン法)^[13,14]

各加水分解液を 1M 水酸化カリウム水溶液で pH8.0 に調整し、デイスパーザブルメンブレンフィルターユニット (DISMIC-25CS045AN, ADVANTEC) を用いてろ過した。ろ液を高速液体クロマトグラフィー (L-7100, 日立) に供し、糖をカラム (Asahipak NH2P-50 4E, Shodex) で分離 (移動相: 0.5% リン酸含有 75% アセトニトリルおよび 0.5% リン酸含有 90% アセトニトリル) 後、リン酸-酢酸-フェニルヒドラジン試薬 (110: 90: 3) と反応させて蛍光検出 (励起波長 (Ex) 330nm、蛍光波長 (Em) 470nm) した。

酸加水分解画分の各中性糖の含量を全糖量とした。全糖量を二段階加水分解法とワックスマン法で比較すると、照葉樹林および天然杉林ともに L 層は二段階加水分解法によって得られた全糖量の方が、A 層では逆にワックスマン法の方が多かった。少量の中性糖の抽出は二段

3. 結果および考察

二段階加水分解法およびワックスマン法によって得られた全糖量を図 1 に示した。二段階加水分解法は各中性糖の含量を、ワックスマン法は熱水抽出、塩酸および硫

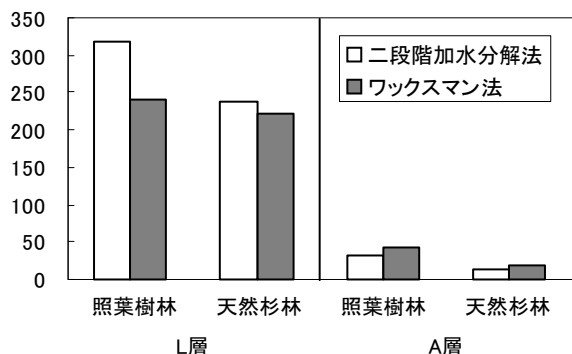


図1 二段階加水分解法およびワックスマン法によって得られた全糖量

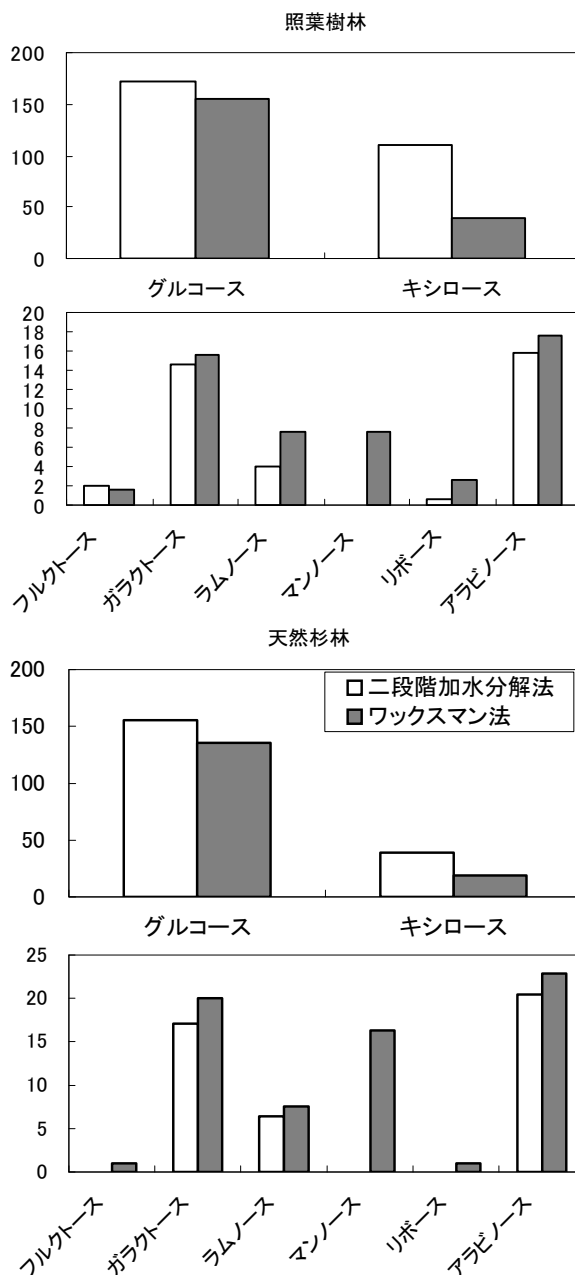


図2 二段階加水分解法およびワックスマン法によって得られた各中性糖量 (L層)

階加水分解法よりもワックスマン法の方が優れていることが推察された。

次に、二段階加水分解法およびワックスマン法によって得られたLおよびA層の各中性糖量を図2および3に示した。L層において、各中性糖量を二段階加水分解法とワックスマン法で比較すると、照葉樹林および天然杉林ともにグルコースおよびキシロース量は二段階加水分解法の方が多かったが、その他の中性糖はワックスマン法の方が多かった。特に、マンノースおよびリボースは二段階加水分解法ではほとんど検出できなかった。一方、A層において、各中性糖量を二段階加水分解法とワックスマン法で比較すると、各中性糖ともに両抽出法で同程度かワックスマン法の方が多い傾向が認められた。特に、フルクトースおよびリボースは二段階加水分解法ではほとんど検出できなかった。これらの理由として、二段階加水分解法ではヘミセルロースおよびセルロース画分を同時に抽出するため、新鮮な植物遺体が多量に供給されるL層に含有するグルコースおよびキシロース量が他の中性糖量に比べて著しく多いため、フルクトースおよびリボースなどの量が少ない中性糖はピークとして検出されないことが考えられる。

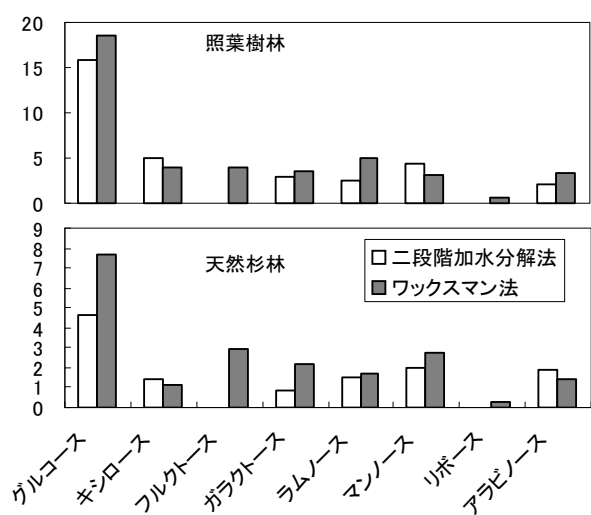


図3 二段階加水分解法およびワックスマン法によって得られた各中性糖量 (A層)

4. おわりに

春日山天然林の土壌有機物を構成する中性糖量を明らかにするために、土壌糖類の抽出方法について検討するために、本天然林を代表する照葉樹林 (B_B型) および天然杉林 (B_B型) 下土壌のLおよびA層について二段階加水分解法およびワックスマン法による中性糖量を比較した。新鮮な植物遺体が多量に供給されるL層

において、二段階加水分解法によって得られたグルコースおよびキシロース量はワックスマン法よりも多かったが、量の少ない中性糖は逆にワックスマン法の方が多く抽出された。

以上の結果から、ワックスマン法は少量の中性糖の抽出に優れていることが推察された。

参考文献

- [1] 村田智吉・田中治夫・坂上寛一・安積大治・浜田龍之介 (1997) 麦かん・堆肥の連用が土壌微生物バイオマス量・可給態窒素量および中性糖組成に及ぼす影響, 土肥誌, 68: 249-256.
- [2] 村山重俊 (1984) 土壌糖の起原, 分解性, 糖組成と土壌微生物.(土壌のバイオマス, 博友社, 東京). 65-114.
- [3] 菅家文左衛門 (1990) 土壌炭水化物の分析方法, 福島農短大報, 1: 42-48.
- [4] 菅家文左衛門 (1987) ワックスマン分画の土壌糖類の分析への応用, 土肥誌, 58: 556-560.
- [5] Stevenson, F.J. (1965) Gross chemical fraction of organic matter, Methods of soil analysis. Part 2, American Society of Agronomy Inc., Publisher, Magison, USA, 1409-1414.
- [6] Waksman, S.A. and Stevens, K.R. (1930) A critical study of the methods for determining the nature and abundance of soil organic matter, *Soil Sci.*, 30: 97-116.
- [7] Dore, W.H. (1920a) The proximate analysis of coniferous woods., *J. indus. Engin Chem.*, 12: 476-480.
- [8] Dore, W.H. (1920b) The proximate analysis of hard woods., *J. indus. Engin Chem.*, 12: 984-480.
- [9] 金澤晋二郎・伊月亜有子・河越幹男 (2005) 世界遺産奈良県春日山における天然林土壌の特性解明 (第1報) 天然林土壌における培養法および直接検鏡法による微生物数量, 土肥誌, 76: 459-470.
- [10] 伊月亜有子 (2008) 森林土壌 A0層およびA層における中性糖組成. 奈良高専紀要, 44: 57-60.
- [11] 和田秀徳・金沢晋二郎・高井康雄 (1971) 土壌有機物の物理的分画法 (第3報), 土肥誌, 42: 109-117.
- [12] 村山重俊 (1997) 中性糖. (土壌環境分析法, 博友社, 東京). 104-109.
- [13] 浜野吉政・百目鬼秀子・鷹野重成・阿部修三 (1990) リン酸フェニルヒドラジンを用いた HPLC による糖の分析, 第7回液体クロマトグラフィ 春季討議会要旨集, 25.
- [14] 日立製作所 (1999) 糖類の分析方法および分析装置, 特許公報 (B2), 第2846059号.

