

## スギ落葉有機組成分特にクチンの生分解について

川上日出國<sup>\*</sup>, 草島すなお<sup>\*</sup>, 杵名重明<sup>\*</sup>

### On the biodegradation of organic components especially cutin of Japanese cedar leaf litter.

Hidekuni KAWAKAMI<sup>\*</sup>, Sunao KUSAJIMA<sup>\*</sup>, and Sigeaki KUTSUNA<sup>\*</sup>

最近の筆者らの研究によると針葉有機組成分中真のリグニンはかなり少量である。従来分析法によると針葉クチクラ層の主成分クチンが Klason リグニンとして定量され見かけのリグニン量を過大にしていることが明らかにされている。

本報告では本学演習林におけるスギ針葉リター分解過程における有機組成分特に Klason リグニンおよびクチンの変化を調べた。リターバッグに入れ林床上に設置した試料を隔月に採取し各有機組成分の分析を行った。針葉リターの分解ははじめセルロース非晶部分とヘミセルロースの一部で起り、それ以降ヘミセルロース部分は比較的安定化する。他方、セルロースは徐々に分解が進行し分解後期には結晶化度の高い領域が残存する。

リターの Klason リグニン量は分解の進行と共に増加する。しかし、この値は真のリグニン量を示すものではない。濃硫酸および熱希硫酸に不溶のクチンや腐植物質、タンパク質、および核酸変質物の一部を分解の進行にしたがい、さまざまな割合で含有するものと考えられる。

一方、クチンは土壤微生物により比較的容易に分解され林床上14か月でほぼ半減する。クチン構成モノマーのうち10(9), 16-ジヒドロキシヘキサデカン酸は容易に分解するが、16-ヒドロキシヘキサデカン酸は難分解性である。

リター生分解の末期には腐植物質はかなり生成していると考えられる。

It has recently become apparent that true lignin is rather minor component in several needle-leaves, and cutin in the cuticle of needle-leaves is analysed as Klason lignin by the conventional analytical method. In this report, change of the organic components especially Klason lignin and cutin during the decomposition of leaf litter of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don) in the Inabu forest of Nagoya University was studied. The samples in litter bag put on the forest floor were gathered bimonthly and their organic components were analysed. When the leaf litter decomposed on the forest floor, some parts of cellulose in the amorphous region and hemicellulose of the leaf were easily degraded in the early periods of the biodegradation. After that, residual hemicellulose was relatively stabilised. Cellulose, on the other hand, seemed to be gradually degraded and remained a region of the higher crystallinity index at the final period. Klason lignin in the litter increased with the progress of biodegradation. However, the value of the Klason lignin did not represent that of the true lignin in the litter. It seemed that the Klason lignin might contain cutin, humic substance, protein, and nucleic acid in various ratios at each period. Cutin seemed to be easily degradable by

<sup>\*</sup>名古屋大学農学部 School of Agriculture, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464

soil microorganisms, it decreased to one half for 14 months of biodegradation on the forest floor. In constituent monomers of the cutin, 10 (9), 16-dihydroxyhexadecanoic acid was easily decomposed, while almost 16-hydroxyhexadecanoic acid was remained in the litter for 14 months of biodegradation. In the final period of biodegradation, it seemed that humic substance was produced considerably in the litter.

Key words : Leaf litter Klason lignin Cutin 10,16-Dihydroxyhexadecanoic acid 16-Hydroxyhexadecanoic acid

## 1. 緒言

森林生態系では動物体量に比べ植物体量が圧倒的に多く、土壌への有機物供給源の大部分が植物によるものとされている<sup>1)</sup>。一方、主要樹種の年間落葉量はヘクタール当り約3トン、スギの場合は4~6トンという莫大な量であり<sup>2)</sup>、森林土壌への有機物供給源の主体である。したがって、落葉の有機物組成はその後の生分解の過程に大きい影響を与えているものと考えられる。従来、林木落葉有機組成の経時変化については多くの研究が行われている。<sup>3~10)</sup>しかし、その際、落葉の主成分については、すべてセルロースおよびヘミセルロースの炭水化物部分とリグニンという木材主成分の図式で考察が進められている。

著者らは先に針葉リグニンの研究を行い、針葉中の真のリグニンは極めて少量であり、Klason リグニン定量操作では針葉表面を覆うクチクラに基づくクチンが分離できずリグニン部分に混入し定量値を高くしていることを報告した。そのクチンは針葉重量の10数% (スギ) から20% (ヒノキ) にも及び針葉の主成分を問題にするときクチンの存在は無視しえないことを明らかにした<sup>11)</sup>。

落葉生分解の過程は極めて複雑なものでありその研究は容易なものではない。従来の落葉有機組成研究のうち特にリグニン分解に関する研究の結果には食い違いがある場合もある。例えばより易分解性と考えられる炭水化物部分よりもむしろリグニン (Klason リグニン) が或る程度までは速やかに分解する場合などである。これは果してそのリグニン部分が芳香族性の高い真のリグニンのみで占められていたのか否か、更にクチン――

脂肪族 $\omega$ -ヒドロキシカルボン酸のポリエステルドールの寄与の程度は如何ほどであったかなどを吟味してみる必要がある。

今回はスギ針葉有機組成の天然条件下における生分解を14カ月にわたって行った結果を調べ、特にクチンおよびその構成モノマーの経時変化や Klason リグニンの内容について検討を加えた。

## 2. 実験

### 2.1 試料

1984年9月、名古屋大学農学部附属演習林で採取したスギ成熟葉を用いた。針葉それぞれ約50grをポリ塩化ビニリデン樹脂製ネットの袋につめ、同演習林スギ林の林床上に密着するように設置した。ここの土壤型はB<sub>D</sub>型である。試料は1984年11月、1985年3月、5月、7月、9月および11月の6回、3袋ずつ採取し各種分析に供した。本研究では1984年9月に採取した成熟葉を試料Ⅰとし、11月以降に採取した試料をそれぞれⅡ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵさらに1985年11月に採取した試料をⅦとした。

### 2.2 リターの微生物活性の測定

リターの微生物活性の測定は Schnürer らの方法<sup>12)</sup>を若干修正して行った。60mM リン酸緩衝液 (pH7.6) 50mlに0.2%フルオレッセインジアセテート (シグマ製) アセトン溶液0.25mlを加えた溶液にスギ針葉またはリター約1.5gを精秤して加え、24℃で4時間まで培養した。生成するフルオレッセインの490nmにおける吸光度を測定した。

### 2.3 クチン構成モノマーの測定

針葉またはリターの Klason リグニン0.3g を小型ステンレススチール製耐圧管にとり、8%水酸化ナトリウム水溶液10ml を加え密栓し、170℃で2時間加熱した。内容物を酸性化し、分液漏斗を用いエチルエーテルで3回抽出し脱水、溶媒を去しジアゾメタンメチル化後ガスクロマトグラフ法で分析を行った。装置は日本電子製 JGC-750型を用い測定条件は次の通りである。カラム：1.5%OV-17、クロモソープ G (Aw-DMSC)、内径3mm、2mmステンレススチール管、カラム温度：240°、キャリアガス：窒素、流速：25ml/min、水素炎イオン化検出器。

針葉およびリターの一般分析、元素分析、セルロース結晶化度の測定は著者らの既報の方法<sup>13)</sup>に従った。

### 3. 結果および考察

スギ林林床に設置したリターバッグ中のリターは14カ月経過後も一応の原形を留めていた。しかし、黒変し分解はかなり進行しているようであった。リターの含水率および微生物の活性は設置時間の経過と共に増加していた (Table 1)。以下、リター各成分の分解について記述する。

### 3. 1 抽出成分の経時的变化

新鮮落葉の温水抽出物は Table 2 に示したように乾燥試料に対し約20%という値を示したが、2カ月経過後すると急減し、8カ月経過後の昭和60年5月には6%にまで減少した。しかし、夏季以降には徐々に増加する傾向を示した。温水抽出物の内容はデンプン、ガラクトン、マンナン、ペントザンなどの炭水化物や色素、タンニン、アルカロイドなどである。従来<sup>5)</sup>の報告によれば植物遺体<sup>5)</sup>やスギ落葉<sup>6)</sup>は分解の初期にヘミセルロース特

Table 1. Changes in total microbial activity in the leaf litter samples of Japanese cedar.

Sample	Month of sampling	Incubation time		
		1 hr.	2 hrs.	3 hrs.
I	Sep. 1984	—	—	—
II	Nov. "	—	—	0.5
III	Mar. 1985	—	1.3	2.1
IV	May "	—	1.1	2.0
V	Jul. "	1.4	2.1	2.5
VI	Sep. "	2.1	3.4	4.3
VII	Nov. "	0.9	2.6	4.0

Total microbial activity was expressed by the activity of hydrolysis of fluorescein diacetate.

All values are the absorbance of free fluorescein at 490 nm.

Table 2. Chemical composition of the original and decomposed leaf litter samples of Japanese cedar.

Sample	I	II	III	IV	V	VI	VII	
Solubility in	Hot water	19.0%	8.9%	7.2%	5.6%	6.8%	10.5%	8.0%
	EtOH-benzene	14.6	8.0	9.7	10.6	8.5	7.0	6.0
	1% NaOH	42.7	46.3	47.8	57.4	56.5	52.7	56.7
Holocellulose**	51.9	49.7	49.1	49.9	48.5	45.9	43.1	
α-cellulose**	37.7	33.7	33.5	33.9	31.5	24.1	23.2	
β-cellulose**	0.1	0.2	0.5	1.1	2.6	5.9	2.6	
Klason lignin**	43.7	49.2	51.0	55.3	55.0	55.0	56.7	
Cutin acid**	11.0	6.3	5.7	8.2	7.1	6.8	6.1	
Ash*	5.2	5.3	6.6	6.9	6.1	8.0	8.7	

\* in percent of dry sample

\*\* in percent of extractive-free sample

にペントザンが容易に分解されることが明らかにされている。したがって、今回の初期の温水抽出物の急激な減少も針葉のヘミセルロース特にペントザンやセルロースの分解に起因するものと考えられる。また、夏季以降の温水抽出物増加は生分解過程に再合成された温水可溶の微生物菌体構成物質や、やはり温水可溶性の腐植様物質の生成など<sup>5)</sup>に基づくものと考えられる。更にそれ自身は比較的難分解性でありながら、ヘミセルロースの低分子化により可溶化してくるガラクトン、マンナンなどの寄与も考えられる。

有機溶媒抽出物は経時的に漸減しており、新鮮落葉では約15%であったものが14カ月後の試料Ⅶでは6%にまで減少している。エタノール・ベンゼン抽出では主に油脂、ろう、樹脂、精油などが抽出されるが、スギリターの場合は針葉の表面に分布するワックス成分が土壤微生物などにより分解され抽出物量の減少を示すものと考えられる。なお、このワックス成分は物理的な原因による表面からの剝離脱落の可能性も考えられる。また、微生物によって比較的容易に分解されるといわれるスギ針葉精油成分<sup>14)</sup>は初期に消失するものと考えられる。

希アルカリ抽出物は上記の各抽出物と異なり経時的に増加してくる。希アルカリ処理によって抽出されるものは温水中に溶出する成分がより多量に抽出されてくるほか、エタノール・ベンゼン抽出物やリグニンの一部なども抽出される。希アルカリ抽出物の経時的な増加はスギ針葉中の真のリグニン量は少量であるので、むしろ、温水では抽出されない低分子化セルロースに基づくものと考えられる。また、一部には微生物作用により解重合されエステル結合が希アルカリによって加水分解され易くなったクチンの寄与もあるであろう。一般に木材のような植物細胞壁成分が担子菌<sup>15)</sup>や担子菌以外の木材腐朽性真菌類<sup>16)</sup>によって分解される場合にも希アルカリ抽出物は常に増加することは周知のところでありその際も低分子化セルロースおよび低分子化リグニンがその主体を占めることが明らかにされている<sup>15)</sup>。

### 3. 2 炭水化物成分の経時的变化

林床上で針葉のホロセルロースおよび $\alpha$ -セルロースは経時的に減少してゆく (Table 1)。ホロセルロースははじめ52%であったが14カ月後の試料Ⅶでは43%にゆるやかに低下している。 $\alpha$ -セルロースでは減少の程度が大きく、試料Ⅰでは38%であったものが試料Ⅶでは23%にまで減少している。一方 $\beta$ -セルロースは健全針葉にはほとんど存在していないが12カ月後の試料では2.7%に増加している。これら針葉炭水化物の経時的变化の傾向は組織構造は異なっても材部の生分解の状況<sup>15)</sup>に類似している。ホロセルロースと $\alpha$ -セルロースの差はヘミセルロースのおおよその値と見なされるが、この数値は経時的に増加している。 $\beta$ -セルロースの増加分を考慮に入れてもなお Waksman らの結果<sup>6)</sup>のように難分解性のヘミセルロース成分の或る部分の蓄積が推定される。

セルロースの結晶化度は生分解の進行にしたがい増加する傾向を示している (Table 3)。特に生分解の初期に急増しておりホロセルロースの非晶領域の激しい分解が推定される。なお、生分解の進行に伴い $\alpha$ -セルロース/ホロセルロースの比は減少するので生分解後期のリターのセルロースは結晶化度の高いものが残留していることを示唆する。

### 3. 3 Klason リグニンおよびクチンの経時的变化

正常な木材のリグニン定量法として Klason 法

Table 3. Crystallinity index of the litter samples.

Sample	Crystallinity index	
	vs. litter	vs. Holocellulose
I	11.2	21.6
II	18.2	36.6
III	16.0	32.6
IV	16.7	33.5
V	12.9	26.6
VI	19.3	42.0
VII	21.1	49.0

は優れたものであり古くからよく用いられ現在に至っている。しかし、クチン含量の高い針葉試料のリグニン定量に本法を用いると極めて過大な定量値を与えることは前述の通りである。クチンのエステル結合は濃硫酸および熱希硫酸に抵抗性が高く未分解のまま Klason リグニンとして定量されるからである。同様な傾向は樹皮の Klason リグニンを定量する際にも見いだされる。この場合はクチンに類似のポリエステル、スベリンに基づくものである<sup>17)</sup>。

スギ針葉およびその生分解試料の Klason リグニンは Table 2 のように健全試料で43%であり生分解の経過と共にその値は上昇し、14カ月後には56%に達している。針葉の生分解の進行に伴い Klason リグニン量が增大する現象は現在までの研究<sup>3-10)</sup> でよく知られているところである。この現象には針葉主成分のホロセルロースの易分解性による相対的なリグニン量の増加も寄与しているであろう。

一方、健全針葉の Klason リグニン値を過大なものとしているひとつの成分クチンは Fig. 1 のように針葉試料の11%にも及ぶ。しかし、生分解の進行と共にその値は減少し14カ月後にはリター乾物量に対し6%に減少している。すなわちクチンは健全針葉にあっては Klason リグニン定量値の25%も占めているが14カ月経過後には Klason リグニン値の約10%を占めるに過ぎない。したがってクチンは比較的易分解性の成分と考えられる。

クチンを構成するクチン酸モノマーのガスクロマトグラム (Fig. 2) から明らかなように健全な成熟スギ針葉クチンの主成分は B の10 (9), 16-ジヒドロキシヘキサデカン酸と A の16-ヒドロキシヘキサデカン酸である。これらの成分のうち B 成分が経時的に減少が著しいことがわかる。これらの成分の経時変化を Fig. 3 に示す。試料置床14カ月後の試料Ⅶでは B 成分は健全試料の3割程度に減少している。これに対し A 成分は相対的に倍増している。全クチン量は14カ月後には半減しているのでクチンの生分解は、ほとんど B 成分の減少に基づくものと考えられる。ク

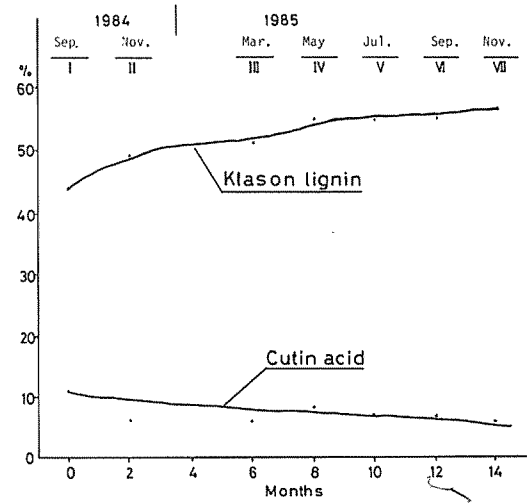


Fig. 1. Changes in content of Klason lignin and cutin during the decomposition of Japanese cedar leaf litter.

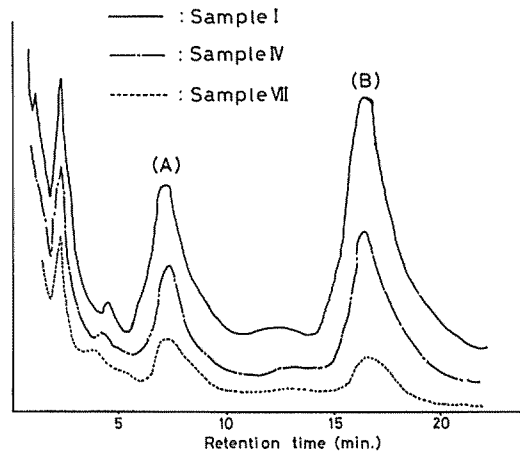


Fig. 2. Gas chromatograms of cutin acids in the original and decomposed leaf litter samples of Japanese cedar.

チンは化学的に極めて安定なものであり2%  $N_2O$  溶液中で130℃, 1時間加熱してもほとんど加水分解されない。また、種々のリパーゼによってもそのエステル結合はほとんど分解を受けない<sup>11)</sup>。わずかに極微量のモノカルボン酸, モノヒドロキシカルボン酸が得られるのみである。クチ

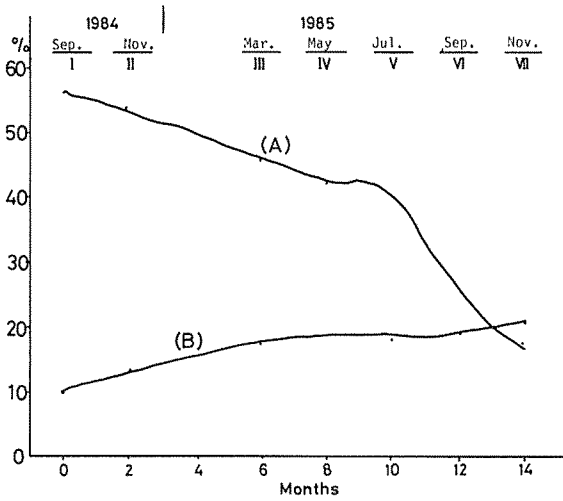


Fig. 3. Changes in content of cutin acids during the 14-months- decomposition period.

ン分子中では10 ( 9) , 16-ジヒドロキシヘキサデカン酸は分子相互のエステル結合を通して三次元網目状の骨格を形成しており、A成分の16-ヒドロキシヘキサデカン酸よりもむしろ安定に存在していると考えられる。このような安定な物質も土壌微生物によって比較的容易に分解を受けることは上記の通りである。特にB成分が優先的に分解されることについては次のように推定される。まず、クチンの針葉中における存在部位による優先性である。クチンが針葉表面に生合成される場合、はじめB成分が比較的大量に葉部表皮細胞から供給され、細胞の外に三次元網目状の骨格を形成する<sup>17)</sup>。A成分ははじめには比較的微量供給されるに過ぎないが、生合成の中～後期には多量に供給される<sup>17)</sup>。したがって針葉表面に沈着するワックス成分を別にすれば、B成分に富む部分は針葉の最も外部に存在すると考えられるので土壌微生物による生分解あるいは物理的な剝離を受け易いであろうと考えられる。次にスギリターに生育する微生物が生成するクチン分解酵素の基質特異性の存在も推定される。クチン分解酵素の一種で糖タンパク質のクチナーゼは不完全菌 *Fusarium solani* から単離されている<sup>18)</sup>。今回のリター試料に生息した微生物のなかにもある種の

クチン分解酵素を生成するものがあり、その特異性はクチン構成モノマーメチレン鎖中間の第2級アルコール基をもつ単位を選択的に分解するものと考えられる。スギ針葉のクチンは主にこの型の10 ( 9) , 16-ジヒドロキシヘキサデカン酸のエステル結合を通じて三次元構造が形成されている。したがってこの単位が分解することは三次元構造のクチンの本体が崩壊することを意味し極めて重要な意義を有する。

Klason リグニンからクチンを差し引いた値は健全針葉では31%であるが14カ月経過後の試料Ⅶでは50%に増加している。一般にタンパク質や核酸を豊富に含む幼植物、植物培養細胞および腐朽植物試料などの Klason リグニンを測定するとそのリグニンはほとんど常に窒素を含有しており、そのリグニン量は予想される値より大きい値を与えることは良く知られているところである<sup>19, 20)</sup>。おそらく定量操作中に植物体または微生物に基づくタンパク質、アミノ酸さらに核酸が植物体炭水化物起源の還元糖<sup>21)</sup> やリグニン起源のフェノール類<sup>22)</sup> などと重合し不溶化するためと考えられる。今回の試料の Klason リグニンも Table 4 のように窒素が見いだされている。各試料の窒素含量は生分解の中期 (1985年7月) の試料Ⅴまでは減少し、それ以後は増加している。このような Klason リグニンの窒素含量の増減については次のように考えられる。生分解の初期には針葉中に存在する窒素含量の高いタンパク質 (平均窒素含

Table 4. Changes in the value of elemental analysis of Klason lignin during the decomposition.

Sample	N	C	H	O
I	1.15%	61.54%	5.79%	31.52%
II	1.13	61.02	5.31	33.54
III	1.04	61.10	5.47	32.39
IV	1.14	59.75	5.26	33.85
V	0.71	51.54	4.46	43.40
VI	1.06	58.92	4.91	35.11
VII	1.35	58.12	4.70	35.83

量16%)の一部がKlason処理の過程でリグニン中に取り込まれて比較的高い窒素含量を示すものと考えられる。生分解の進行と共に植物体のタンパク質は土壤微生物によって分解され減少してゆく。一方、Klasonリグニンの一部として定量される可能性のある窒素含量の低い腐植物質が形成されてゆきKlasonリグニン量は増加するが窒素含量はむしろ減少する。しかし、リターの腐植化はその後も急速に進むので後期にはKlasonリグニン量は更に増加する。しかもリターに附着する微生物の生菌体はTable 1の微生物活性の増加でも明らかなように増殖し死滅菌体も蓄積すると考えられるので菌体タンパク質や核酸に基づく窒素もリグニン中にとり込まれ比較的高い窒素含量を示すのであろう。

このようにスギ針葉およびその生分解試料のKlasonリグニン測定値からは真のリグニンについての情報は極めて得にくいものと考えられる。これらの試料のKlasonリグニンにはそれぞれの段階でかなりのクチン、タンパク質、核酸および腐植物質などがさまざまな割合で夾雑するものとして把握すべきであらう。

#### 4. 結 論

スギ針葉が林床上で生分解を受ける場合、その初期段階では非晶領域のセルロースやヘミセルロースの一部が分解される。それ以後ヘミセルロースは分解に対して比較的安定であるがセルロースは徐々に分解され後期には結晶化度の高いものが存在する。

Klasonリグニンは生分解の進行と共に増加するが真のリグニンを代表するものではなく、生分解の各段階でさまざまな割合にクチン、腐植物質あるいはタンパク質、核酸を含むものと考えられる。クチンは比較的分解され易く生分解14か月でほぼ半減する。クチン構成モノマーのうち10(9), 16-ジヒドロキシヘキサデカン酸の分解が著しい。生分解の後期には腐植物質はかなり生成しているものと考えられる。

この研究を進めるにあたり種々ご助言をいただいた名古屋大学農学部林産化学講座、寺島典二教

授はじめ教官各位に深謝いたします。また、演習林使用に際し種々便宜をはかれた名古屋大学農学部附属演習林の皆様へ感謝いたします。さらに実験の一部にご協力いただいた北村繁幸技官に謝意を表します。

#### 文 献

- 1) 依田恭二：“森林の生態学”，共立，1971，p. 218-247.
- 2) 河田 弘：森林立地，**13**(1)，1-16(1971)
- 3) 堤 利夫：京大演報，No.26，59-87(1956)
- 4) Saito, T: Ecol. Rev., **14**, 209-217(1957)
- 5) 河田 弘：林試研報，No. 128, 115-138(1961)
- 6) 堤 利夫，岡林 巖，四手井綱英：京大演報，No. 33, 187-198(1961)
- 7) Minderman, G: J. Ecol., **56**, 355-362(1968)
- 8) 中島幸雄：愛媛大演報，No. 7, 3-12(1970)
- 9) Fogel, R.; Cromack, Jr. K: Can. J. Bot., **55**, 1632-1640(1977)
- 10) Meentemeyer, V: Ecology, **59**, 465-472(1978)
- 11) 川上日出國，西野優治：木材学会誌，投稿中
- 12) Schnürer, J.; Rosswall, T: Appl. Environ. Microbiol., **43**, 1256-1261(1982)
- 13) 川上日出國：防菌防黴，**6**, 433-437(1978)
- 14) 桜井孝一，谷田貝光克：94回日林講，201-204(1983)
- 15) 川瀬 清：北大演報，No.19(2)，131-133(1958)
- 16) 川上日出國：防菌防黴，**9**, 509-513(1981)
- 17) 川上日出國：未発表
- 18) Kolattukudy, P. E: Science, **208**, 990-1000(1980)
- 19) 樋口隆昌，石川広隆，長谷川正男：木材学会誌，**6**, 229-232(1960)
- 20) Wolter, K. E.; Harkin, J. M.; Kirk, T. K: Physiol. Planta., **31**, 140-143(1974)
- 21) Hodge, J.E: J. Agric. Food Chem., **1**, 128-132(1953)
- 22) McManus, J. P.; Davis, K. G.; Lilley, T. H.; Haslam, E: J. Chem. Soc. Chem. Comm., **1981**, 309-311