

遊離アミノ酸量を指標とする豚ふん堆肥の腐熟度判定と ペーパークロマトグラフィーによる簡易評価法*

原 正之**・広瀬和久**・石川裕一**

キーワード 腐熟度、遊離アミノ酸、ペーパークロマトグラフィー、豚ふん堆肥

1. はじめに

畜産農家から発生する家畜ふん尿は年間9100万tと試算されており、わが国最大の有機性廃棄物となっている¹⁾。家畜ふん尿は古くから堆肥化され土壤改良資材や肥料として農地へ還元利用されてきたが、環境保全が今日的課題となる中で、家畜ふん堆肥の流通利用の促進が求められており、良質堆肥生産の意義は大きくなってきている。家畜ふんの堆肥化处理においては、製品堆肥を植物や土壌に対して安全な状態にまで腐熟させておく必要があり、腐熟度を的確に評価することが重要である。堆肥の腐熟度判定法については、微生物活動からの判定、コマツナ発芽試験²⁾や花粉管生長テスト³⁾など生物を用いた判定、微細形態観察⁴⁾など物理性からの判定、還元糖割合⁵⁾や陽イオン交換容量の変化⁶⁾など化学性からの判定、円形濾紙クロマト法⁷⁾による腐植物質による判定、および総合判定として評点法⁸⁾など多くの評価法が報告されてきている。しかし、これらの方法の中には、畜種や副資材の種類および混合比によっては判定できなかつたり、高度な分析手法や機器を要するもの、判定に時間を要するものなどが含まれており、畜産農家などの現場で簡易にかつ迅速に腐熟度を判定できる手法は少ない。著者らは、堆肥施用時の障害発生が多く見られる豚ふん堆肥を対象に、簡易かつ迅速な腐熟度判定法の開発を目的として、遊離アミノ酸を腐熟度評価の指標とすることの妥当性と簡易評価法としてのペーパークロマトグラフィーの利用について検討した。

2. 材料および方法

1) 供試豚ふん堆肥と有機成分組成

市販の配合飼料で飼育中の育成豚舎から採取した新鮮豚ふんを用い、副資材としてもみがあるいはオガクズを混合した2種類の堆肥を作成した。両区とも豚ふん1000kgに副資材500kgとあらかじめ1カ月間堆肥化した豚ふんもみガラ堆肥250kgを混合し、水分を65%に調整したのち底部に通気パイプを設置した木製発酵槽(180cm×180cm×90cm)に堆積し、通気条件下で2カ月間堆肥化を行った。期間中、中心温度の変化を測定するとともに、経時的に堆肥を採取し、風乾後微粉碎し試験試料とした。なお、堆肥の有機成分分析は堆きゅう肥等有機物分析法⁹⁾により行った。

2) 実験1 遊離アミノ酸を指標とする豚ふん堆肥の腐熟度判定の妥当性

(1) HPLCによる遊離アミノ酸の定量

微粉碎試料1gを共栓付き遠沈管に採り、蒸留水を10mL加え、30分振とうした後室温(20°C)で一晩静置した。これを12000rpm、5分間遠心分離し、得られた上澄液をメンブランフィルター(東洋濾紙DISMIC 25CS)を用いて濾過し、濾液5mLをロータリーエバポレーターを用いて40°Cで濃縮乾固した。これをpH2.2クエン酸ナトリウム緩衝液1mLに溶解し、HPLCサンプルとした。HPLCは日立655型を用い、Spackmanの方法¹⁰⁾に従い、スルホン酸系陽イオン交換樹脂(#2619F)を充填したφ4mm×150mmのカラムを用い、ニンヒドリン法による遊離アミノ酸量を定量した。なお、サンプル注入量は20μLとした。

(2) 堆肥中の遊離アミノ酸量と易分解性窒素量との関係

杉原らのオートクレービング法を用いて、腐熟度判定の重要な指標の一つである低分子の易分解性窒素量の変化と遊離アミノ酸量の変化の関係について検討するとともに、G-15ゲルクロマトグラフィーによる水溶性タン

*本報告の一部は1991年4月の日本土壌肥料学会名古屋大会において発表した。

**三重県科学技術振興センター農業技術センター(515-2316 三重県一志郡嬉野町川北530)
1998年8月13日受付・1998年11月19日受理
日本土壌肥料学雑誌 第70巻 第3号 p.306~314(1999)

バク分子の分子量別分布パターンの変化とも比較した。

①オートクレービング可溶化窒素の定量

分析は杉原・金野の報告¹¹⁾に従って行った。すなわち、堆肥微粉末 500 mg に 1 M 塩化カリウム溶液を 100 mL 加え、3 時間のオートクレービング処理 (105°C, 1.1 気圧) を行った。冷却した後遠心分離して得られた抽出液を硫酸分解後水蒸気蒸留し、可溶化した全窒素量を定量した。この全窒素量から堆きゅう肥等有機物分析法⁹⁾に拠り定量した原料堆肥中のアンモニア態窒素量を差し引き、オートクレービング可溶化窒素とした。

②水溶性タンパク質の定量

堆肥微粉末に 10 倍量の蒸留水を加え 1 時間振とう抽出し、得られた上澄液をメンブランフィルター（東洋濾紙 DISMIC 25 CS）で濾過した液を試料とした。分析は平井・久保田の方法¹²⁾に従い、セファデックス G 15 を充填したカラム（カラム：φ 13 mm×300 mm, 試料量：300 μL, 溶出液：0.1 M アンモニア 40 mL h⁻¹）で分離し、280 nm における吸光度を連続的に測定した。

(3) 堆肥中の遊離アミノ酸と植物を用いた腐熟度判定法との相関

ふんや副資材に含まれる低級脂肪酸やフェノール性酸などの生育阻害物質の影響も含め総合的に検討するため、コマツナ発芽試験法および花粉管生長テストによる腐熟度判定法と遊離アミノ酸量の変化の関係について検討した。

発芽試験および花粉管生長テストの被検液は、小西らの方法⁹⁾により、発芽試験は堆肥微粉末に 3 倍量の、花粉管生長テストでは 2 倍量の蒸留水を加え、アミノ酸の抽出と同条件で調製した。発芽試験は 2 連で行い、ろ紙（東洋濾紙 No. 2）を 2 枚敷いたシャーレに堆肥抽出液 10 mL をとり、コマツナの種子 20 粒を播種して 4 日間 20°C の恒温器で培養し、発芽率および主根長を測定した。花粉管生長テストは、ウェル法で蒸留水を対照として 3 連で行った。茶の花粉を直線上に 18 mm 置床し、25°C で 20 時間培養後、花粉管の伸長が阻害された部分の長さ（ウェルからの距離、阻害長）を程度別（完全阻害・不完全阻害）に測定した（第 7 図参照）。

3) 実験 2 ペーパークロマトグラフィーによる遊離アミノ酸の検出と簡易腐熟度判定法

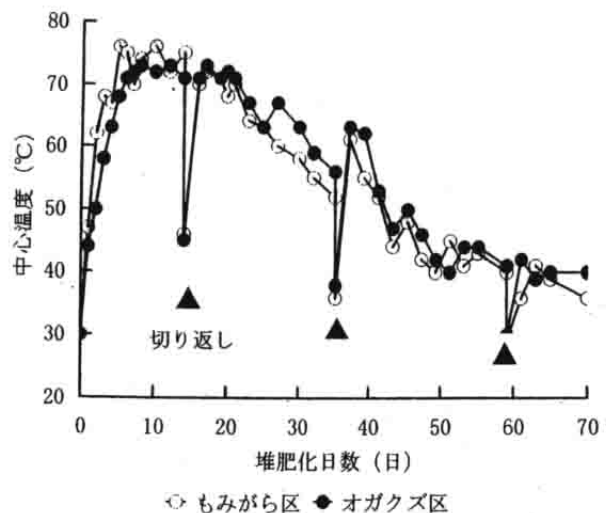
微粉碎試料 1 g を共栓付き遠沈管に採り、蒸留水を 5 mL 加え、30 分振とうした後室温で一晩静置し、12000 rpm, 5 分間遠心分離して得られた上澄液を試料液とした。試料液 25 μL をクロマト用ろ紙（東洋濾紙 51 B）に、スポットが大きくなるようにドライヤーで乾燥しながら塗布した後、*n*-ブタノール：氷酢酸：水＝

12：3：5 を展開溶媒（BuA）として展開槽中で約 5 時間展開した。展開液が 20 cm 程度まで上昇したろ紙を取り出し、風乾後、ニンヒドリン溶液（0.2 g L⁻¹ アセトン溶液）に噴霧し、暗所で発色させた。約 5 時間後発色が安定した後、デンストメーター（東洋濾紙社製 DMU-33 C）を用いて 570 nm の吸収を連続的に測定した。ペーパークロマトグラフィーによるアミノ酸の定量は、既知濃度の標準アミノ酸を同様に展開し、得られたピーク面積から定量するのが一般的であるが、堆肥抽出液のように多数のアミノ酸が存在し、ピークの分離が明確でないクロマトグラムでは個々のアミノ酸の定量値の合計から総アミノ酸量を定量することが困難である。そこで吸光曲線で得られた吸光度の積算値（以下 TOD 値と呼ぶ）を総アミノ酸値とした。

3. 結果

1) 堆肥化時の温度変化等について

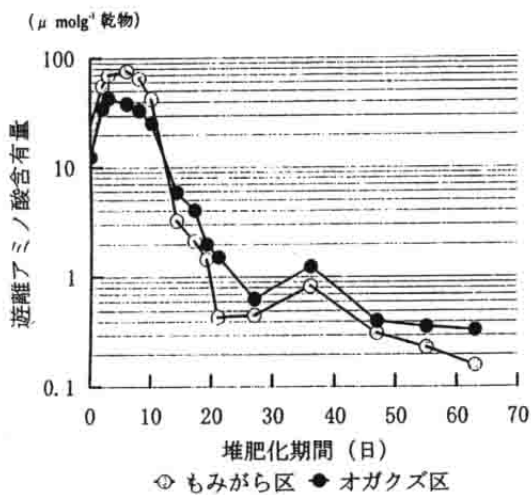
供試した豚ふん堆肥の堆積期間中の温度変化を第 1 図に示した。堆積直後の温度の上昇は、もみがら添加区の方がオガクズ区より 2 日程度早く 70°C 以上の最高温度に達した。しかし、その後の温度変化は両区に大きな差は認められず、両区とも徐々に温度が低下し、堆積後 60 日目の第 3 回切り返し後には温度の再上昇が 40°C 以下となった。この堆積物から経時的に採取した試料の化学的諸性質を第 1 表に示した。両区とも堆肥化に伴い pH は上昇し、2 カ月後には 8 以上となった。また、粗灰分は増加し、全炭素は低下したが、両項目の期間中の変化はもみがら区の方が大きい傾向を示した。



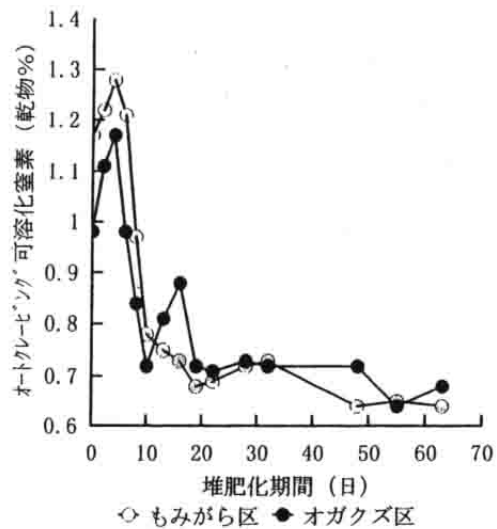
第 1 図 供試堆肥の堆肥化時の温度変化

第1表 堆肥化過程での有機成分組成の変化 (乾物当たり g kg⁻¹)

試料		pH	粗灰分	全炭素	全窒素	C/N比	ヘミセルロース	セルロース	還元糖割合(%)
もみがら	堆積直後	6.51	165	404	22.1	18.3	199	192	38.7
	1ヵ月後	7.80	230	344	18.2	18.9	165	205	43.0
	2ヵ月後	8.10	255	338	17.2	19.7	145	186	39.1
オガクズ	堆積直後	6.44	153	406	20.2	20.1	185	167	34.7
	1ヵ月後	7.56	183	382	20.2	18.9	215	133	36.4
	2ヵ月後	8.02	217	366	19.2	18.9	186	125	34.2



第2図 堆肥化過程における遊離アミノ酸含有量 (HPLC法) の変化



第3図 堆肥化過程におけるオートクレーピング可溶性窒素量の変化

2) 実験1 遊離アミノ酸を指標とする豚ふん堆肥の腐熟度判定法の妥当性

(1) 堆肥化過程における遊離アミノ酸量の変化

HPLCを用いて定量した総遊離アミノ酸含有量の堆肥化過程での変化を第2図に示した。総アミノ酸含有量は堆積後6日目まで急増し、堆積開始時の含有量の2~3倍量となったが、その後急激に減少し、堆積後3~4週間目で堆積開始時の約1/20倍量で平衡となった。

(2) 堆肥中の遊離アミノ酸と易分解性窒素との関係

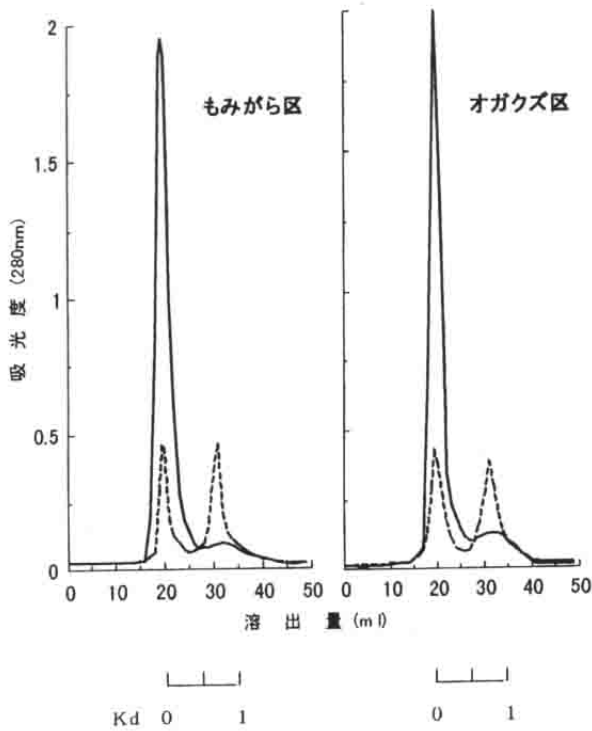
①オートクレーピング可溶性窒素量の変化

堆肥化に伴うオートクレーピング可溶性窒素量の変化を第3図に示した。両区とも堆積後4日目までは開始時の窒素量の10%程度増加した後10日目まで急速に減少した。10日目以降、オガクズ区では一時的に増加が認められたが、両区とも緩やかな減少傾向を示し、20日目ではほぼ平衡に達した。オートクレーピング可溶性窒素量の堆積初期の急激な減少はアミノ酸の減少時期(第2図)に比べて4日程度早かったが、全体的にはアミノ酸の変化とはほぼ一致した。オートクレーピングによって可

溶性窒素は易分解性の有機態窒素であると報告されており¹¹⁾、堆肥化過程での遊離アミノ酸量の変化は堆肥中の易分解性窒素量の変化を反映していると考えられる。

②水溶性タンパク質の変化

セファデックスG-15を用いて分子ふるいにかけた堆積開始時および2ヵ月後の堆肥抽出液のクロマトグラムを第4図に示した。両区とも堆積開始時には低分子側(MW 1500以下)と高分子側(排出限界MW 1500以上)に吸光度0.5程度の2本のピークを持つクロマトグラムを示したが、堆肥化に伴って低分子側のピークが低下し、2ヵ月後の終了時には高分子側に高い1本のピークを持つ単純なクロマトグラムに変化した。汚泥コンポストや家畜ふん堆肥では腐熟化に伴って低分子側成分が減少すること、またクロマトグラムはペプチド結合鎖を持つ有機態窒素化合物(タンパク、ペプチド等)の変化を示すことが報告されている¹²⁾。そこでアミノ酸の分子量に近い低分子側の分配係数(Kd) 0.9の成分の堆肥化に伴う変化を第5図に示した。低分子側ピークの吸光



第4図 堆肥水抽出液のゲルクロマトグラムの変化
 ---- 堆積開始時, — 2ヵ月後(終了時).
 Kdはカラムの分配係数を示す.

度はもみがら区、オガクズ区ともに堆積開始後およそ10日目まで増加したのち減少した。この腐熟化に伴う低分子側成分の変化は、アミノ酸量の変化とはほぼ一致した。

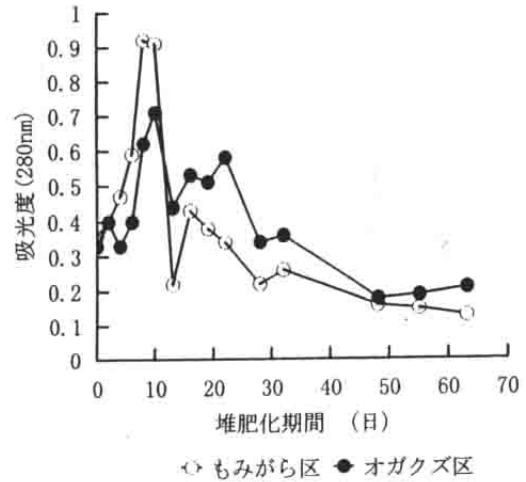
(3) 植物を用いた判定法と遊離アミノ酸との関係

①コマツナ発芽試験

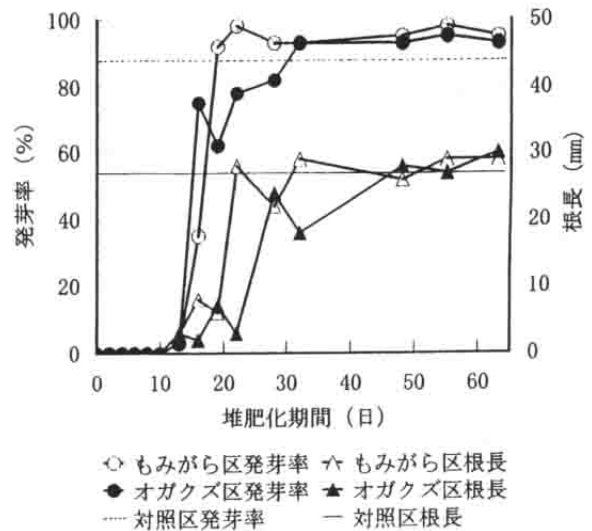
経時的に採取した堆肥のコマツナを用いたバイオアッセイ(発芽率および根伸長量)の結果を第6図に示した。両区とも堆積開始後13日目まで強い発芽阻害を示したが、もみがら区では19日目に、オガクズ区では28日目には対照区(蒸留水)の発芽率にまで回復した。根伸長も13日目までは両区とも強い阻害が見られたが、もみがら区では22日目に、オガクズ区では28日目には対照区の伸長量にまで回復した。こうした根伸長阻害および発芽阻害が無くなる時期はアミノ酸量の急激な減少が終わり、堆積開始濃度の約1/20倍量で平衡となる時期(第2図)と一致した。

②花粉管生長テスト

ウェル法で行った花粉管生長テストの結果を第7図に示した。両区とも堆積後6日目までは完全阻害長が10mmを越える強い阻害が認められたが、完全阻害は、その後急速に減少し、およそ3週間目以降はほぼ無くなっ

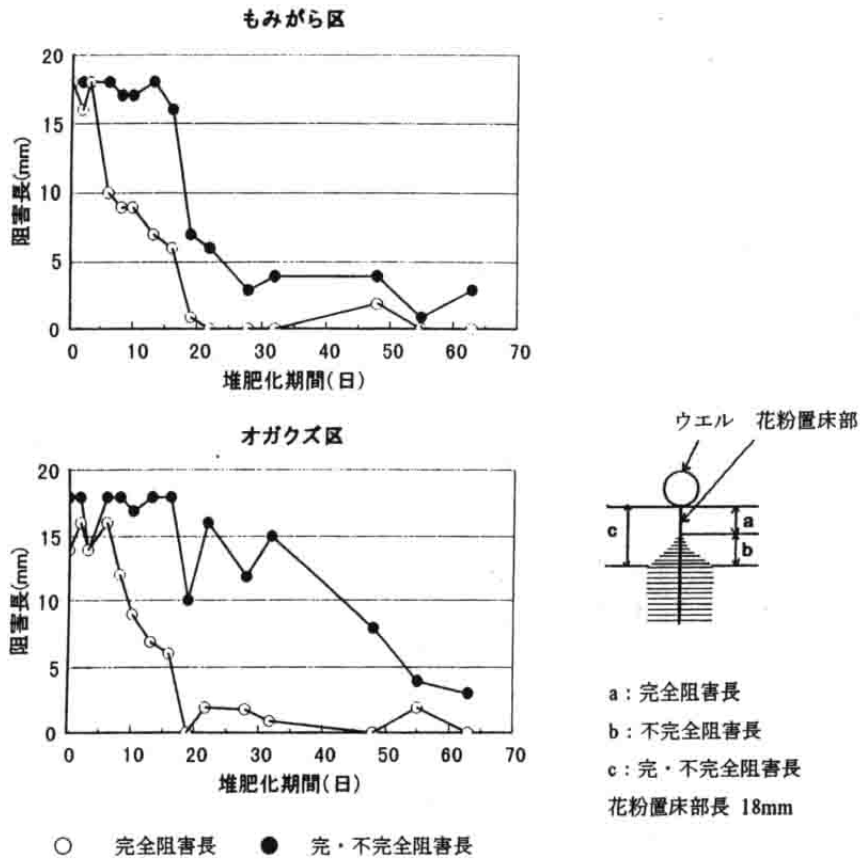


第5図 ゲルクロマトグラフィーによって分離される堆肥水抽出液中の低分子側成分の堆肥化過程での変化

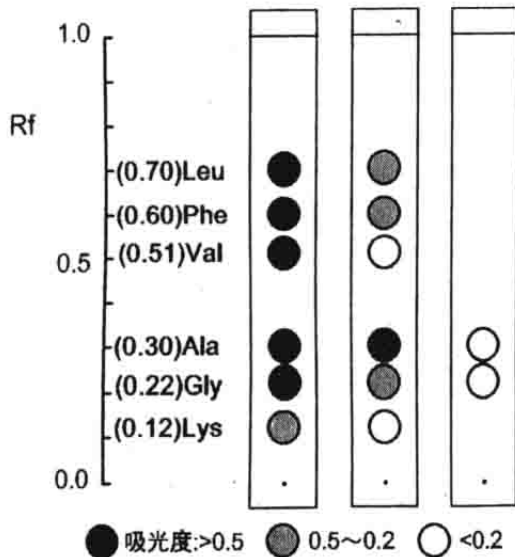


第6図 経時的に採取した堆肥のコマツナを用いたバイオアッセイ(発芽率および根伸長量)

た。完全阻害長と不完全阻害長を合わせた完・不完全阻害長は、もみがら区では19日目までは10mm以上となったが、その後急速に減少し、堆積後28日目以降は5mm以下となった。一方、オガクズ区では、36日目まで10mm以上の阻害長があり、阻害長が5mm以下となったのは、55日目以降であった。小西らは原液での完・不完全阻害長が10mm以上を強い阻害とし、5mm以下を植物に対する安全の目安としており³⁾、本結果はもみがら区ではコマツナ発芽試験および遊離アミノ酸の変化と一致したが、オガクズ区では、完熟の判定時期は一致しなかった。



	ステージ I	ステージ II	ステージ III
アミノ酸量 ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	> 10	10~1	1)
堆肥化日数 (もみがら区)	0~10日	13~19日	22日以降
(オガクズ区)	0~10日	13~22日	28日以降



第8図 腐熟化に伴うペーパークロマトグラムパターンの変化
ステージIIはアミノ酸の変化量が大きいため、両区の13日目の
クロマトグラムを代表として示した。

3) 実験2 ペーパークロマトグラフィーによる遊離アミノ酸の検出と簡易腐熟度判定法

(1) 堆肥化に伴うペーパークロマトグラムの変化

両堆肥中の遊離アミノ酸の堆肥化過程での変化をペーパークロマトグラフィーを用いて測定したところ、両区とも第8図に模式的に示すクロマトグラムの変化(ステージI, II, III)を示した。堆積直後の未熟な堆肥(ステージI)ではクロマトグラム上に6本の濃いアミノ酸バンドが認められた。各アミノ酸バンドのピークと吸光度をデンストメーター(570mm)を用いて測定した結果、各々のピークの分離は不十分であったが、肉眼で認められた6本のバンドのRf値は、それぞれ0.70, 0.60, 0.51, 0.30, 0.22, 0.12であり、Rf値0.12以外の5本のバンドは0.5以上の吸光度を示した。HPLCによる分析で $10\mu\text{mol g}^{-1}$ 以上のアミノ酸量を示した堆積後10日目までは、両区とも同じクロマトグラムを示した(ステージI)。クロマトグラム上の6本のアミノ酸バンドは、HPLCのアミノ酸組成とBuAを展開溶媒とした場合のRf文献値¹³⁾からRf値0.70のアミノ酸はロイシン(Leu)、0.60フェニルアラニン(Phe)、0.51

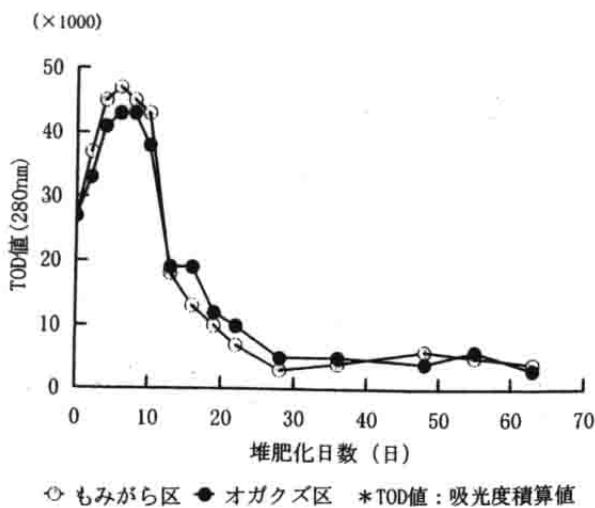
バリン (Val), 0.30 アラニン (Ala), 0.22 グリシン (Gly), 0.12 リジン (Lys) であると推定された。以降, 便宜的に Rf 値で区分したバンドは, 推定されるアミノ酸名として表す。

腐熟化に伴って, クロマトグラム上の各アミノ酸バンドの吸光度は低くなり, 肉眼での確認ができなくなっていったが, 腐熟化に伴う吸光度の低下速度はアミノ酸の種類によって差が認められた。堆積物の温度が下がり始め, アミノ酸量が急速に減少する ($10\sim 1\mu\text{mol g}^{-1}$) もみがら区で13~19日目, オガクズ区で13~22日目には(ステージII), Rf 値0.3以下の Ala, Gly, Lys に比べて Rf 値0.3以上の Leu, Phe, Val の吸光度の低下は大きく, 急速に薄くなった。なお, ステージIIはクロマトグラムの変化が大きいため, 模式図では両区の13日目のクロマトグラムを代表として示した。

さらに腐熟化が進み, アミノ酸量が $1\mu\text{mol g}^{-1}$ 以下で平衡となった, もみがら区で22日目以降, オガクズ区で28日目以降には Rf 値0.3以上の Leu, Phe, Val のバンドは無くなり, Rf 値0.3以下に薄い発色が認められるのみとなった(ステージIII)。Rf 値0.3以下の Ala, Gly については堆肥化終了時(2ヵ月後)でも痕跡が認められた。

(2) ペーパークロマトグラフィーの定量性

堆肥化過程における両区の TOD 値の変化を第9図に示した。TOD 値は両区とも堆積後6日目までは開始時より1.3~1.4倍に増加した後, 減少し始め, 10日目から14日目には急速に減少した。14日目以降は, 両区とも緩やかに減少し, もみがら区では21日目以降, オガクズ区では27日目以降, 5000程度で平衡となった。こ

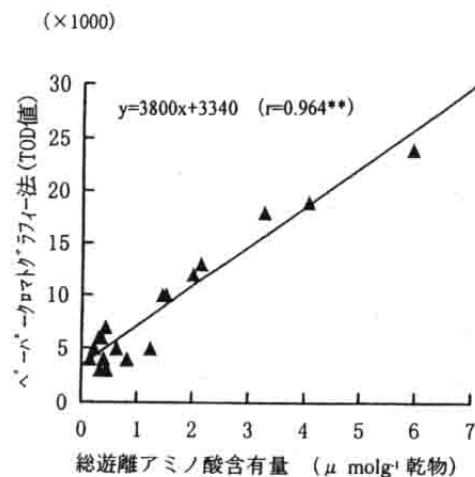


第9図 ペーパークロマトグラフィー法で測定した遊離アミノ酸量 (TOD 値) の堆肥化に伴う変化

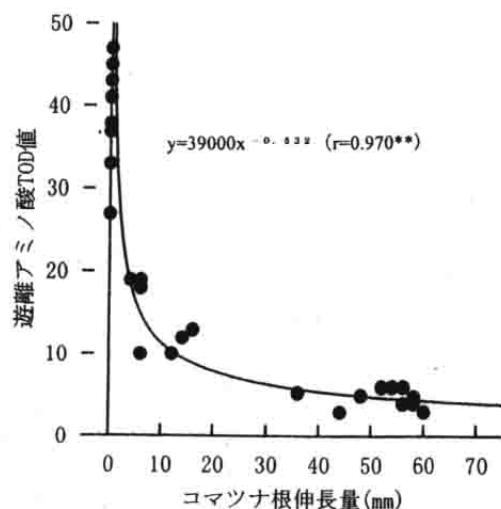
の TOD 値の変化は HPLC を用いて定量した総遊離アミノ酸含有量の変化 (第2図) とほぼ一致し, 腐熟度判定上重要な低濃度領域 ($6\mu\text{mol g}^{-1}$ 以下) において, TOD 値は総遊離アミノ酸含有量と $r=0.964^{**}$ の高い相関が得られた (第10図)。

(3) コマツナの根伸長量とアミノ酸 TOD 値との関係

ペーパークロマトグラフィーにおけるアミノ酸の TOD 値とコマツナ発芽試験における根伸長量との関係を第11図に示した。コマツナの根伸長量と TOD 値の間には負の相関 ($y=39000x^{-0.532}$, $r=0.970^{**}$) が認められ, TOD 値が5000以下, 即ちクロマトグラム上に Rf 0.30 以上のバンドが認められない段階の堆肥で



第10図 HPLC 法とペーパークロマトグラフィー法 (TOD 値) の相関



第11図 コマツナ根伸長量とペーパークロマトグラフィー法による遊離アミノ酸の TOD 値との関係

は、根伸長阻害は認められなかった。

4. 考 察

1) 遊離アミノ酸を腐熟度指標とすることの意義と妥当性

家畜ふん堆肥の施用に伴う作物に対する生育障害の発生原因は、ふん中の易分解性有機物の急激な分解に起因する土壌の異常還元や高濃度の無機態窒素による場合、ふんや副資材中の生育阻害物質による場合、C/N比が高い場合の窒素飢餓に大別され、混合される副資材の種類と量によって発生原因が異なることが知られている¹⁴⁾。豚ふん堆肥の場合、生ふんにオガクズやもみがらなどを混合し水分を70%以下に調整して堆積するのが一般的であるが、近年、戻し堆肥による水分調整や、連続式発酵装置の導入が進んでおり、副資材を含まないふんのみ堆肥やふんの混合比率の高い木質系混合堆肥の割合が高くなってきている。こうした堆肥での障害発生は、ふん中の易分解性有機物の急激な分解が主たる要因であり、生育阻害物質は副次的要因である¹⁵⁾と考えられる。このため、こうした副資材の混合割合の低い家畜ふん堆肥の腐熟の目的は、易分解性有機物を分解することであり、その分解程度を腐熟指標とすることが望ましい。

堆肥中の遊離アミノ酸量の変化は、オートクレービングによって可溶化する易分解性窒素化合物の変化とはほぼ一致し、セファデックスG-15で分画されるペプチド結合鎖を持つ低分子成分の減少パターンの変化とも同様であった。このことから、堆肥中の遊離アミノ酸量は、堆肥化過程における易分解性有機物量の変化を示す腐熟指標として活用できると考えられる。この場合、堆肥化初期の急速な分解を受けたのち遊離アミノ酸量が低濃度で平衡に達した段階の堆肥であれば、易分解性有機物の急激な分解に伴う障害は発生しないと考えられる。

また、堆肥中の遊離アミノ酸量はコマツナ発芽試験における根伸長量と高い負の相関が認められ、堆肥化初期の遊離アミノ酸量の急激な減少が終わり低濃度で平衡に達した時期とコマツナ発芽試験において根伸長阻害が認められなくなった時期は一致した。これは、豚ふん堆肥中のフェノール性酸や低級脂肪酸などの生育阻害物質が易分解性有機物と同時に分解減少したためであると考えられる。岡田ら¹⁶⁾はこうした豚ふん堆肥中の易分解性窒素と植物の生育阻害との関係について、本結果と同様に堆肥中の低分子量窒素化合物の減少とコマツナの生長の回復との関連性が高いことを報告している。易分解性有機物量の変化の指標であるアミノ酸量が低濃度で平衡

に達した時期においては、堆肥中の生育阻害物質による植物への障害発生の危険性は低いと考えられる。

2) ペーパークロマトグラフィーの定量性と腐熟度判定

ペーパークロマトグラフィーにおけるTOD値は、腐熟度の判定上重要な低濃度領域 ($6 \mu\text{mol g}^{-1}$ 以下)において、HPLCで測定した総遊離アミノ酸含有量と高い正の相関が得られることから、ペーパークロマトグラフィーによるアミノ酸の検出は、簡易分析法として有効である。なお、腐熟度判定の基準は、クロマトグラムにRf値0.3以上のバンド (Leu, Phe, Val) が認められず、Rf0.3 (Ala, Gly, Lys) 以下の薄い呈色のみとなった段階であり、この段階になると易分解性有機物の分解および生育阻害物質による障害発生の危険性が無い安全な堆肥 (完熟堆肥) になったと判断できると考えられる。

3) 遊離アミノ酸を指標とするペーパークロマトグラフィーの利点と問題点

本法における完熟と判断できる時期のアミノ酸量は堆積開始時の約1/20以下であり、アミノ酸は量的に大きな変化をする指標である。アミノ酸のように堆肥化に伴って量的に顕著に変化する成分を指標とすることは、サンプリング時や操作時の誤差によって多少の変化があっても判定に影響しないという利点がある。また、ニンヒドリンによるアミノ酸の発色は、副資材の種類や量による影響は受けにくいこと。本法は、比較的用いた腐熟度判定法に比べて分析操作が簡単であり、高度な分析機器を必要としないため、農業改良普及センターや堆肥センター等の現場に近い施設での実施が可能であること、藤原らの円形ろ紙クロマトグラフィー⁷⁾と同様に、ニンヒドリンで発色させたクロマトグラムは、暗所で保存すれば数日間は退色が防げるため、判定結果を農家に対して視覚的に示せることなどの利点もある。

しかし、指標成分である遊離アミノ酸は、ほぼ豚ふん由来のものであり、本法は、ふん中の易分解性有機物量を評価しているに過ぎない。木質系副資材の混合割合が高い堆肥では副資材の分解が遅いため、例えばオガクズなどに含まれるフェノール系物質などは比較的長期間残存すると考えられるので、アミノ酸量が十分に低下し、完熟と判定される堆肥であっても、植物への障害発生の危険性が残ると思われる。本試験では、生育阻害物質による評価と本試験の結果がほぼ一致したが、花粉管生長テストではオガクズ区で50日まで障害が認められたように、特に木質系副資材の割合が高い堆肥の場合には、遊離アミノ酸法の判定結果は植物への安全性を完全に保

証し得ない可能性がある。したがって、木質系副資材の混合割合が高い堆肥の腐熟度評価に当たっては、コマツナ発芽試験を併用することが望ましい。なお、本法の牛ふん堆肥、鶏ふん堆肥およびその他の有機物を原料とするコンポストへの適用については、今後検討を要する。

5. 要 約

家畜ふん堆肥の簡易腐熟度判定を行うため、豚ふん堆肥を対象として遊離アミノ酸を腐熟度の指標とすることの妥当性と簡易判定法としてのペーパークロマトグラフィーの利用と判定基準について検討した。

1) 堆肥化に伴い、遊離アミノ酸量は堆積初期に上昇した後、急激に減少し、堆積後約4週間目には堆積直後濃度の約1/20で平衡となった。この遊離アミノ酸量の変化は、オートクレービングによって可溶化される易分解性窒素量の変化とほぼ一致することから遊離アミノ酸は易分解部分（ふん）の腐熟度指標として利用できる。

2) 遊離アミノ酸量とコマツナ発芽試験における根伸長量とは負の相関を示し、アミノ酸量が減少して平衡に達する時期と根の伸長阻害が無くなる時期がほぼ一致することからこの時期を完熟の目安とできる。

3) 腐熟度判定上、重要な低濃度領域においてもペーパークロマトグラフィーで定量できる遊離アミノ酸量とHPLCによる定量値とは高い相関があった。このため、ペーパークロマトグラフィー法は遊離アミノ酸の量的変化も検出できる簡易測定法である。

4) ペーパークロマトグラフィーによる腐熟度判定法は、次の通りである。乾燥堆肥微粉末に5倍量の蒸留水を加え攪拌後1夜静置し、濾過して得られた濾液25 μ Lを展開用濾紙にスポットする。これをn-ブタノール：氷酢酸：水=12：3：5を展開溶媒として展開後ニンヒドリン溶液で発色させる。約5時間後発色が安定した時点でクロマトグラムのバンドを観察する。この時Rf値0.3以上のバンドが認められない堆肥についてはほぼ完熟であると判定できる。

謝 辞 本研究を行うにあたり、多くの御助言と御指導を頂いた九州農業試験場生産環境部長 原田靖生博士、

草地試験場 杉原 進博士に厚く御礼申し上げます。また、アミノ酸分析をご指導頂くとともに論文の御校閲を頂いた三重大学生物資源学部 古市幸生教授、小畑 仁教授に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 築城幹典・原田靖生：我が国における家畜排泄物発生の実態と今後の課題，環境保全と新しい畜産，p.15～29，農林水産技術情報協会，東京（1997）
- 2) 藤原俊六郎：シャーレを使った堆肥の簡易腐熟度検定法，土肥誌，56，251～252（1985）
- 3) 小西茂毅・若澤秀幸・青山仁子・中村元弘・山下春吉：花粉管生長テストによる堆肥の腐熟度判定とその特徴，同上，57，456～461（1986）
- 4) 藤原俊六郎・鎌田春海・井ノ子昭夫：おが屑混合鶏ふん堆積物の腐熟に伴うおが屑の分解，同上，51，203～209（1980）
- 5) 原田靖生・井ノ子昭夫：都市ごみコンポストの有機成分組成の特徴と腐熟度の判定，同上，53，116～121（1982）
- 6) Harada, Y. and Inoko, A.: Relationship between cation-exchange capacity and degree of maturity of city refuse composts. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 26, 353～362（1980）
- 7) 藤原俊六郎・井ノ子昭夫・松崎敏英・鎌田春海：家畜ふんの堆積に伴う有機成分組成の変化と円形濾紙クロマトグラフィーによる腐熟度判定，土肥誌，52，311～315（1981）
- 8) 原田靖生：家畜ふん尿堆肥の品質基準及びその判定法と残された問題点，総合農業研究叢書，第7号，p.142～163（1985）
- 9) 農林水産省農蚕園芸局農産課編：堆きゅう肥等有機物分析法，土壤保全資料，第56号，p.32～52（1979）
- 10) Moore, S., Spackman, D. H. and Stein, W. H.: Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *Anal. Chem.*, 30, 1185～1190（1958）
- 11) 杉原 進・金野隆光：汚泥中の有機態窒素の形態と肥効について，農技研肥料化学科資料，p.249（1983）
- 12) 平井光代・久保田宏：ゲルクロマトグラフィーを用いた下水汚泥コンポスト腐熟度判定法，下水道協会誌，35，13～20（1986）
- 13) 成田耕造・村上孝夫：クロマトグラフィーの実際Ⅰ，p.78～83，廣川書店，東京（1964）
- 14) 井ノ子昭夫：有機資材の品質とその検定法，農及園，57，235～242（1982）
- 15) 原田靖生：堆肥化技術の現状と課題，農林水産レポート，行政時報，p.24～32（1993）
- 16) 岡田憲三・宮崎英二・神前 健・椎葉 究：高速液体クロマトグラフィーによる畜ふんのコンポスト熟度の評価，土肥誌，68，175～177（1997）

**Detection of Free Amino Acids Using Paper Chromatography
for Evaluating Degree of Compost Maturity**

Masayuki Hara, Kazuhisa Hirose and Hirokazu Ishikawa
(*Mie Sci. Tech. Prom. Cent., Agric. Res. Cent.*)

In order to evaluate the maturity of swine waste compost, we have developed a convenient method for measuring free amino acid levels by paper chromatography.

1) The change of free amino acid in swine waste content with composting was studied using HPLC. The free amino acid content increased for the first several days, and thereafter decreased rapidly to 1/20 of the initial content after four weeks. The change in free amino acid content corresponded to that of easily decomposable nitrogen mineralized by autoclaving.

2) A negative correlation was observed between free amino acid content and the length of Komatsuna (*Brassica campestris* L.) root in a germination test. The growth inhibition disappeared when the free amino acids decreased and were in equilibria. Free amino acid content can be regarded as an index of compost maturity.

3) Using paper chromatography, the change in free amino acid content could be detected even at a low concentration level. Paper chromatography can be used as a simple method for evaluating free amino acid, reflecting the compost maturity.

4) The evaluation method for compost maturity by paper chromatography is as follows: The milled compost sample is suspended in water (1:5 w/v) and left to stand overnight. After filtration, 25 μ L of the water extract of the compost is spotted on filter paper, developed with *n*-butanol:acetic acid:water (12:3:5), and dried. It is then sprayed with ninhydrin solution, and the bands of amino acids are checked after 5 h when the color becomes stable. When the bands over Rf 0.3 cannot be detected, we can regard it as a matured compost.

Key words compost maturity, free amino acids, paper chromatography, swine waste compost

(*Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr.*, 70, 306-314, 1999)