蜜蜂インベルターゼによるエルロースの消長

越後多嘉志, 竹中哲夫

(玉川大学農学部農芸化学科)

昭和 47 年 8 月 7 日 受理

Changes in Erlöse Contents by Honeybee Invertase

By Takashi ECHIGO and Tetuo TAKENAKA

Department of Agricultural Chemistry, Tamagawa University, Machida, Tokyo

Honeybees were bred in a cage which was so designed as to prevent admixture with the nectar and pollen in the fields, and were fed exclusively upon 40% sucrose solution.

Enzymic reaction on sucrose was carried out with the invertase extracted from the honey which was produced by the caged bees. The resulting trisaccharide was isolated for examination and was found to be erlose.

The extracted invertase was an α -glucosidase with maltase activity and indicated the activity of transglucosidase.

Erlöse is formed presumably by transglucosidation with invertase of bees in which the α -D-glucosyl group of one sucrose is transferred to the fourth carbon in glucose moiety of other sucrose.

The optimum conditions of enzyme for the transferring action were: pH, 6.0; temperature, 30°C; and sucrose concentration, 0.25 M.

Hydrolysis of sucrose and formation of erlose by honeybees took place mostly in earlier period (within 6 hr) of honey formation, and no substantial changes in sugar contents were observed in the ripening period (after 24 hr). (Received August 7, 1972)

緒 言

著者⁽¹⁾は先に、野外の花蜜や花粉の混入を防ぐ目的で設置したケージ内に、蜜蜂を飼育（以下この蜜蜂を caged bee と呼ぶ）してショ糖のみを与え、その結果得られた蜂蜜には、ショ糖が分解したグルコースとフルクトースを主成分とし、他に数種のオリゴ糖を含むことを知った。このうち薄層クロマトグラムに著明なスポットとして認められた一つのオリゴ糖に着目して検討した結果、これは三糖類で蜜蜂のインベルターゼによって生成したエルロースと予測された。

蜜蜂のインベルターゼは、グルコシドインベルターゼ⁽²⁾であって、ショ糖のほか、麦芽糖などの α -グルコシドをも分解することが知られている。

Goldschmidt ら⁽³⁾や Maurizio⁽⁴⁾ は、著者らと同様にショ糖を給餌して得た蜂蜜中から、ペーパークロマト

グラフィーによりエルロースと推定される糖を検出しているが、その単離および構造については触れていない。

最近 Siddiqui ら⁽⁵⁾は、天然の蜂蜜中から、他の三糖類とともにエルロースを単離同定している。エルロースの酵素的生成研究では、White ら⁽⁶⁾が蜂蜜中のインベルターゼによって、ショ糖からこの糖を生成し、その構造を明らかにしているが、White らのように天然の蜂蜜中から抽出したインベルターゼでは、花蜜あるいは花粉に起源をもつインベルターゼの存在が考えられるので、これらの混在しない純粋に蜜蜂が分泌したインベルターゼによっては、どうかを調査した。すなわち、蜂蜜生成過程における caged bee のインベルターゼによるエルロース生成反応の検討である。

なお、蜂蜜生成時のエルロースの消長、およびその生成反応機構に言及した報告は、これまでほとんど見当たらない。

実 験 方 法

1. れんげ草蜂蜜インペルターゼの調製 インペルターゼは, Nelson ら⁽¹⁾の方法により調製した。1971年, 鳥取県産のれんげ草蜂蜜 400 g に水 50 ml を加え, 次に 10 倍量の 90% 冷エタノールを加えて 3°C, 2 hr 放置する。生じた沈殿物を遠心分離して水に溶かし, ビスキングチューブで 48 hr 水に対して透析する。これを冷温濃縮して, インペルターゼ試料液 200 ml を得た。なお本酵素液は, 111 U/ml (pH 5.5, 30°C, 1 分間に 1 μ mole のショ糖を分解する酵素量を 1 単位 (U) とした) 収率 45.9%, たんぱく質として 0.79 mg/ml であった。

2. Caged bee 蜂蜜インペルターゼの調製 2 m 立方の金網を張って作ったケージ内に巣箱を置いて, 蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) が野外の蜜源より花蜜, 花粉を採集するのを防ぐようにした。

ケージ内の蜜蜂に 40% ショ糖のみの給餌を繰り返して, 蜜蜂体内にある既存の蜜をできるだけ除いた。除かれたかどうかは, 既存の着色蜜が白色になることによって判断した。次に新しい巣板を巣箱に入れ, 40% ショ糖を給餌してこの巣板に貯えられた蜜を採集し, 上記 (1) と同様にインペルターゼ試料液を調製した。また, ここに得た酵素液の活性は, 上記 (1) と同様に測定して 125 U/ml, 収率 46.8%, たんぱく質として 0.83 mg/ml であった。

なお本実験は, 1971 年 5 月から 7 月までに実施されたものである。

3. インペルターゼ試料液のゲルクロマトグラフィー 上記 (1) および (2) の方法で調製されたインペルターゼ試料液, それぞれ 5 ml をセファデックス G-200 カラム (1.9×40.0 cm) を用いて, クロマトグラフィーした。

なお, たんぱく質量は 280 m μ の吸光度を測定し, インペルターゼ活性は 10% ショ糖・酵素反応液 (pH 5.5) を 30°C, 30 min 反応させ, 1 分間に分解したショ糖量を求めて, 酵素液 1 ml あたりに換算して表示した。

4. エルロースの同定 れんげ草蜂蜜および caged bee 蜂蜜のインペルターゼ試料液, また上記 (3) のようにして得られた 2 種類のインペルターゼ画分溶液を酵素液とした。

ショ糖 20 g に酵素液 130 ml と酢酸緩衝液 (pH 5.7) 20 ml を加え 160 ml にし, 25°C, 3 hr 反応させた。ただし, インペルターゼ画分溶液では調製中の活性低下が

あるので, 適宜反応条件を変える必要がある。

反応液を加熱して酵素反応を止めた後, 活性炭カラムクロマトグラフィー (5.5×30 cm) で水, 5% エタノールおよび 40% エタノール各溶出の 3 区分にした。

糖の同定は, 次の方法によった。

a) ペーパークロマトグラフィー (P. C.): 展開剤はブタノール:ピリジン:水 (6:4:3), 発色剤は硝酸銀試薬, ジフェニールアミン・アニリン試薬, 尿素リン酸試薬 (U. P.), およびアニリン水素フタレート試薬 (A. H. P.) である。

b) 薄層クロマトグラフィー (T. L. C.): 展開剤はギ酸:メチルエチルケトン:第 3 級ブタノール:水 (15:30:40:15), 発色剤はジフェニールアミン・アニリン試薬である。

c) ガスクロマトグラフィー (G. L. C.): カラムはクロモソルプ W を固定相とし, 4% SE-52 を液相として, カラム温度 180°C あるいは 280°C の恒温運転により行なった。なお糖は, トリメチルシリル誘導体にした。

d) 酵素加水分解: 市販の酵母インペルターゼによって pH 5.0, 25°C, 2 hr の分解。また上記 caged bee 蜂蜜のインペルターゼ試料液によって pH 5.7, 25°C, 25 hr の分解。基質濃度は, いずれも 10% である。

e) 酸加水分解: 完全加水分解は 2 N HCl で 120°C, 1 hr の分解。部分加水分解は, 0.1 N HCl で 100°C, 1 hr の分解を行なった。

f) 比旋光度: 柳本製旋光計 OR-50 型によって測定した。

5. Caged bee 蜂蜜のインペルターゼによるエルロースの経時変化 ショ糖 5 g に caged bee 蜂蜜のインペルターゼ試料液 20 ml, 酢酸緩衝液 (pH 5.7) 5 ml を加え, 全量 50 ml にする。25°C で反応を行ない, 経時的に反応液中の糖を P. C. (3 回展開, 上昇法) によって分離し, スポットに相当する部分を切り抜いて, アンシロン法によりエルロースなど各糖量を測定した。なお比較のため緩衝液を用いない反応液や, 蜂蜜の pH 値に近い 3.6 で緩衝化した反応液についても, 同様に測定した。

6. 蜂蜜生成過程におけるエルロースの経時変化 方法 (2) のようにして作った蜜を, 巣板に印をつけた一定区画の場所 (印をつけたのは一定区画内の蜜が, 経時的に採集順序に従っているか区別するためである) から 24 hr ごとに採集し, 96 hr までの蜜中の糖量を上記 (5)

に従って測定し、蜂蜜生成過程におけるエルロースなどの各糖量変化とした。

7. Caged bee 蜂蜜のインベルターゼによる糖転移反応 インベルターゼによる糖転移作用の活性測定は、Bacon⁽⁸⁾ による一定時間内の生成糖量を測定する方法を応用した。すなわち、ショ糖 1g に caged bee 蜂蜜のインベルターゼ試料液 4ml、酢酸緩衝液 1ml を加え、全量 10ml にする。これを Fig. 8, 9 および 10 に示す反応条件で、それぞれ反応を行なわせ、生成したエルロース量を T. L. C. (3 回展開, 上昇法) で分離した後、スポット部分を削り取ってフェノール硫酸法で測定した。なお定量のための標準曲線は、方法 (4) に従って単離同定されたエルロースを用いて作製した。

実験結果

1. インベルターゼ試料液のゲルクロマトグラフィー

れんげ草蜂蜜および caged bee 蜂蜜のインベルターゼ試料液のゲルクロマトグラムを、Fig. 1 および Fig. 2 に示した。両図は、ほぼ同じピークパターンを示している。この結果は、また White ら⁽⁹⁾ による数種蜂蜜のインベルターゼ標品のゲルクロマトグラムとも類似している。次に、各フラクションについてインベルターゼ活性を調査した結果、Fig. 1 では fraction No. 15 付近、Fig. 2 では fraction No. 18 付近の溶出区分に、最大活性が認められた。さらに 2 種類のインベルターゼ画分に

Fig. 1. Gel Filtration of Sephadex Column of Enzyme Preparation from Honey: G-200 in 0.01M Phosphate Buffer (pH 5.5).

Fraction volume: 5ml, flow rate: 6ml/hr,
— protein, ---- invertase.

ついて、それぞれ *p*-ニトロフェニル α -グルコシド、メチル β -フルクトシド、ショ糖、麦芽糖、メレチトース、ラフィノースに対する基質特異性を検討した結果、この区分はマルターゼ活性を示す α -グルコシダーゼであって、 β -フルクトフラノシダーゼの作用をほとんど認めなかった。また、方法 (1) および (2) のごとくして得たインベルターゼ試料液でも、同様の結果を得たので、インベルターゼ試料液が示す性質は、図示したごとくの区分に集められていることを知った。

2. エルロースの単離同定

Caged bee 蜂蜜のインベルターゼ試料液を用い、方法 (4) のように処理した酵素反応液を活性炭カラムに通し、各溶出区分の糖を P. C. で分離して、各スポットを調査した結果が Table I である。

40% エタノール溶出区分に、ケトースを含むオリゴ糖のスポットとケトース反応が判然としないスポット 2 つを得た。後者の 2 つのオリゴ糖が、いかなるものか全く不明であるが、 R_f 0.41 のスポットは、その呈色反応や R_f 値などから目的物質と推測されたので、このスポットに着目し、これを No. 514 のろ紙で再クロマトを行なって精製した後、このスポット部分を採取して目的物質 (E) 約 860 mg を得た。これを G. L. C., T. L. C.

Fig. 2. Gel Filtration on Sephadex Column of Enzyme Preparation from Caged Bees Honey: G-200 in 0.01M Phosphate Buffer (pH 5.5).

Fraction volume: 5ml, flow rate: 8ml/hr,
— protein, ---- invertase.

Table I. Carbon-column Chromatography of Sucrose Hydrolyzate by Honey Invertase from Caged Bees

Fraction No.	Vol. of eluent (liter)	Eluting solvent	Identification by paper chromatography (R_S ,* U. P.,** A. H. P.***)
1~4	2	water	G, F
5~12	4	water	G, F, S
13~14	1	5% ethanol	G, F, S, oligo 1 (R_S : 0.58, U. P.: -, A. H. P.: +)
15~16	1	5% ethanol	S, oligo 1
17~18	1	40% ethanol	S, E (R_S : 0.41, U. P.: +, A. H. P.: -)
19~20	1	40% ethanol	S, E, oligo 2 (R_S : 0.23, U. P.: ?, A. H. P.: -) oligo 3 (R_S : 0.11, U. P.: ?, A. H. P.: -)

G=glucose, F=fructose, S=sucrose, oligo=oligosaccharide, E=unidentified sugar.

* Ratio of distance moved by spot to distance moved by sucrose. solvent; *n*-butanol: pyridine: water (6:4:3). ** reaction with U. P. spray reagent, *** reaction with A. H. P. spray reagent.

および P. C. によって調査して、単品であることを確認した。なお、この物質は 80% エタノール溶液から結晶せず、グルコースに似た甘味をもっている。

この糖を T. L. C. により調べると、メレチトースとラフィノースの中間の R_f 値をもち、G. L. C. でも t_R が両糖の中間にある (Fig. 3)。これを酸により完全加水分解を行なったところ、その分解物がグルコースとフルクトースであり、そのモル比が 2:1 であることから、グルコースとフルクトースからなる三糖類であると判断した。また酸による部分分解や、酵母インベルターゼによる分解では、フルクトースと麦芽糖が得られた。これは、本糖 (E) の末端がフルクトースであり、その C-2 が麦芽糖の還元性グルコース残基の C-1 に結合してい

ることを示している。

Barker ら⁽¹⁰⁾ は、ショ糖と麦芽糖の混合物を反応基質として、エルロースと類似の構造をもつ O- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-O- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fructofuranoside を *Asp. niger* からの抽出液を作用させて得ているが、著者らは本糖 (E) の部分分解物の 1 つが麦芽糖であって、イソマルトースではないことを、T. L. C. の R_f 値およびスポット呈色反応から確認した (Fig. 4)。従って本糖 (E) は O- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fructofuranoside, すなわち White ら⁽⁶⁾ によって

Fig. 3. Thin-layer and Gas Chromatogram of Unidentified Sugar, E.

Raff.: raffinose, Mele.: melezitose, Mal.: maltose, Suc.: sucrose, T. L. C.: formic acid: methyl ethyl ketone: *tert*-butyl alcohol: water (15:30:40:15), G. L. C.: 4% SE-52 on Chromosorb W 280°C isothermal.

Fig. 4. Thin-layer Chromatogram of Sugar (E) Hydrolyzed by Mild Acid or Yeast Invertase.

F.: fructose, Mal.: maltose, Isomal.: isomaltose, hy.: hydrolyzate, st.: standard sample, spot color: (Y); yellow, (Bl); blue, (Br); brown, solvent: formic acid: methyl-ethylketone: *tert*-butyl alcohol: water (15:30:40:15), spray reagent: diphenylamine-aniline-phosphoric acid.

名付けられたエルロースと同一構造である。なお本糖は $[\alpha]_D^{25} + 123.1^\circ$ ($c=1.1$, H_2O) で, White らの $[\alpha]_D^{25} + 121.8^\circ$ ($c=2.3$, H_2O) とほぼ一致している。

次に caged bee 蜂蜜のインペルターゼ試料液を, ここに認定したエルロースに方法 (4-d) に従って作用させたところ, グルコース, フルクトース, ショ糖のほか, 未分解のエルロースのスポットを T. L. C. によって認めた。これは, インペルターゼがショ糖からエルロースを生成するが, またこれを分解することを示している。なお, インペルターゼによるエルロースの分解反応 (基質濃度 10%, pH 5.7, $25^\circ C$ の反応) を T. L. C. で経時的に調査した結果では, エルロースの分解は最初の 6 hr 以内にすでに始まり, この糖の最終分解産物は, グルコースとフルクトースであることを知った。

次に, れんげ草蜂蜜のインペルターゼ試料液を用いたショ糖反応液からも, 上記と全く同様にして (E) を単離し, エルロースであることを確認した。しかし, ゲルろ過して採取したインペルターゼ画分溶液を用いたショ糖反応液からは, 単離同定するほどの量が得られず, 上記のごとく P. C. で R_f 0.41 のスポットを認めたことと, T. L. C. の R_f 値とスポット呈色反応から, エルロースと認定した。

3. Caged bee 蜂蜜のインペルターゼによるエルロースの経時変化

インペルターゼによってエルロースが生成されることを知ったので, 方法 (5) に従って生成エルロース量を経時的に調査した結果が Fig. 5 である。

蜂蜜インペルターゼの最適 pH 付近である pH 5.7 で

Fig. 5. Changes of Sugar Content by Invertase Preparation in Buffer Sol. (pH 5.7).

x fructose, Δ glucose, □ sucrose, ○ erlose.

緩衝化した反応液では, 最初の 0.5 hr で全ショ糖量の 18% 程度が分解され, それ以後の変動は少ない。一方エルロース量は, 最初の 0.5 hr で全糖量の 6~7% を占めるが, それ以後はほとんど変化しない。これを緩衝溶液を用いないで反応させた場合と比較すると, その変化状態には大差ない。しかし, pH 3.6 の緩衝液中では分解速度は非常に遅く, ショ糖分解量, エルロース生成量とも, 最初の 0.5 hr でわずかに変化, それ以降はほとんど変わらない。

実際の蜂蜜生成過程では, pH 低下が起きている関係で, 蜂蜜がいったん生成した後の各糖量の変化は, 非常に小さいことが示唆される。

4. 蜂蜜生成過程におけるエルロースの経時変化

直接的に蜜蜂が関与して生じる各糖量変化を明らかにするため, 巣箱内でショ糖給餌の caged bee が作った蜂蜜を, 方法 (6) のように経時的に採取して調査した。

給餌 24 hr 後に, 初めに給餌したショ糖は一部グルコースとフルクトースに分解されるが, R_f 0.41 のエルロースと推定されるスポットが得られた。これを前記結果 (2) のごとくして単離同定し, エルロースと同一物質であることを確認した。

蜂蜜はその生成過程において巣箱内で濃縮されるが, このときの糖濃度変化を Fig. 6 に示した。蜜の濃縮速度は, 蜜蜂の生理状態, 環境条件によって異なるようである。Park⁽¹¹⁾ は, 蜜蜂を自然状態で飼育して得られた蜂蜜では, 96 hr 以内ですでに 80% 糖濃度になると報告しているが, 著者らの場合では濃縮にかなりの時間を要している。

一般に, 80% 糖濃度の蜜は完全熟成蜜といい, 60% 糖濃度では半熟成蜜である。Fig. 7 は, 半熟成蜜の生成過程における糖量変化である。ショ糖は 24 hr 以内に

Fig. 6. Change of Sugar Concentration during the Process of Honey Formation.

Fig. 7. Changes of Sugar Content during the Process of Honey Formation.

x fructose, Δ glucose, □ sucrose, ○ erlose.

55% ほど分解し, 96 hr では 75% 以上が分解する。一方エルロースは, 24 hr で全糖量の約 8% が生成し, その後の変化は少ない。

次に Fig. 5 と Fig. 7 の両図からわかることは, ショ糖分解, エルロース生成とも最初の 6 hr 以内に行なわれ, 24 hr 以後の熟成過程での変化は小さい。ただし, Fig. 5 は *in vitro* における実験結果であるので, これを Fig. 7 の結果と合わせて論議することには問題があるとしても, 一応蜂蜜生成時のおおよその糖量変化を知り得た。

5. Caged bee 蜂蜜のインベルターゼによる糖転移反応

エルロースの性質や構造から判断して, 蜜蜂のインベルターゼはショ糖からグルコースを, 他のショ糖に転移してエルロースを生成していると考えられるが, この転移反応の作用最適条件を求めるため, 方法 (7) に従って実施した結果が, Fig. 8, 9 および 10 である。

エルロース生成量が最大の反応条件を最適条件として求めた結果, pH は 6.0, 温度は 30°C, また基質のショ糖量に対して, 生成エルロース量の割合が最大のショ糖濃度は, 0.25 M であることを知った。

この結果は, ショ糖の加水分解量から測定した caged bee 蜂蜜のインベルターゼ試料液の最適 pH 6.0 に一致しているが, 最適温度 30~35°C に比べて, やや低かった。

ショ糖の加水分解作用と, 糖転移作用によるエルロース生成反応とが, 同一酵素によるかどうか未だ明らかでないが, 上記のごとく作用最適 pH が一致していること

Fig. 8. Effect of pH on the Enzyme Activity.

Incubation time : 2 hr, incubation temp. : 25°C, sucrose concentration : 10%.

Fig. 9. Effect of Incubation Temperature on the Enzyme Activity.

pH in acetate buffer : 6.0, incubation time : 2 hr, sucrose concentration : 10%.

Fig. 10. Effect of Substrate Concentration on the Enzyme Activity.

pH in acetate buffer : 6.0, incubation time : 2 hr, incubation temp. : 25°C.

を考へて, 一応同一酵素によるという見解をとりたい。

考 察

れんげ草蜂蜜と caged bee 蜂蜜 (蜜蜂) のインベルターゼ試料液は, α-グルコシダーゼ活性を示し, β-フルクトフラノシダーゼの活性をほとんど認めなかったが, White ら⁽²⁾ は蜂蜜のインベルターゼ標品に非常に弱い β-フルクトフラノシダーゼ活性を認めている。著者

ら⁽¹²⁾は、蜂蜜中のインベルターゼの起源は花蜜と蜜蜂にあり、蜂蜜中に認められる β -フルクトフラノシダーゼは花蜜に由来するもので、花蜜の種類によって、その活性が異なると推測している。従って、蜂蜜中インベルターゼと蜜蜂のインベルターゼとは多少異なるとしても、両インベルターゼ試料液は、ショ糖からエルロースを生成するので、糖転移酵素の作用を示す α -グルコシダーゼであると考えられる。

三輪⁽¹³⁾によると、糖転移作用は水解酵素自身の作用によるものと考えているようであるが、著者らも前述のごとく糖転移酵素として、および水解酵素としての作用最適条件が一致していることから、同一酵素による作用であるという見解をもっている。従って蜜蜂の α -グルコシダーゼは、次の反応系でエルロースを生成していると想定した。

Pazur⁽¹⁴⁾は *Asp. oryzae* の糖転移酵素によって、グルコースが麦芽糖に転移する場合に、麦芽糖の非還元性グルコース部の C-4 の位置ではなく、C-6 への位置に転移すると報告しているが、蜜蜂の糖転移酵素によると、ショ糖へのグルコース転移は、上記のごとくショ糖のグルコース部の C-4 の位置へである。この相違は注目すべきで、今後基質や酵素起源の相違などを中心に検討する必要がある。

蜂蜜生成過程の 96 hr 以降の各糖量変化を明らかにしていないが、エルロースが蜜蜂のインベルターゼによって分解されることや、Maurizio⁽⁴⁾ の報告を参照して考察すると、エルロースは一時的生成物であって、蜂蜜中ではショ糖量と関連しながら変化し、最終的にはグルコースとフルクトースに分解すると考えられる。

要 約

野外の花蜜や花粉の混入を防ぐように設置したケージ内に蜜蜂を飼育し、40% ショ糖のみを給餌して得た蜂蜜からインベルターゼ試料液を調製し、この酵素液による、ショ糖からの、一つの三糖類生成反応を調査した。

(1) 酵素の基質特異性やゲルクロマトグラフィーにより、インベルターゼ試料液の性質や活性区分を、蜂蜜からのインベルターゼ試料液と比較して明らかにした。

(2) 酵素反応の結果生成した一つの三糖類を単離し、

性質、構造を調べて、エルロースであることが確認された。本糖は、非結晶性の甘味物質である。

(3) 蜜蜂のインベルターゼはマルターゼ活性を示す α -グルコシダーゼであり、グルコース転移酵素の作用がある。エルロースはこの転移反応によって、ショ糖のグルコース部分が、他のショ糖のグルコース部の C-4 に転移して生成したものと考えられる。糖転移反応における酵素作用最適条件は pH 6.0、温度 30°C、ショ糖濃度 0.25 M である。

(4) 蜂蜜生成過程において、蜜蜂によるショ糖分解反応とエルロース生成反応は、蜂蜜生成の比較的初期(6 hr 以内)に大部分行なわれ、熟成期の 24 hr 以降の糖量変化は少ない。エルロースは、インベルターゼによって生成されるが、それ自身また分解される一時的生成物と考えられる。

本研究に対し、ご懇篤なるご指導ならびにご校閲を賜りました北海道大学下村得治教授に深甚なる謝意を表します。また、ご協力をいただきました本学市村真氏に深謝します。

なお本報告の一部は昭和 46 年 10 月、日本農芸化学大会関東支部会において講演発表した。

- (1) 越後多嘉志：玉川大農研報，11, 37 (1971)。
- (2) J. W. White, Jr. and J. Maher : *Arch. Biochem. Biophys.*, 42, 360 (1953)。
- (3) S. Goldschmidt und H. Burkert : *Z. Physiol. Chem.*, 300, 188 (1955)。
- (4) A. Maurizio : *Ann. Abeille*, 8 (2), 113 (1965)。
- (5) R. Siddiqui and B. Furgala : *J. Apicul. Res.*, 7 (1), 51 (1968)。
- (6) J. W. White, Jr. and J. Maher : *J. Amer. Chem. Soc.*, 75, 1259 (1953)。
- (7) J. M. Nelson and D. J. Cohn : *J. Biol. Chem.*, 61, 193 (1924)。
- (8) J. S. D. Bacon : "Methods in Enzymology," Vol. I, ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1955, p. 258。
- (9) J. W. White, Jr. and I. Kushnir : *J. Apicul. Res.*, 6 (2), 69 (1967)。
- (10) S. A. Barker, E. J. Bourne and O. Theander : *J. Chem. Soc.*, 1957, 2064。
- (11) O. W. Park : *J. Econ. Entom.*, 26 (1), 188 (1933)。
- (12) T. Echigo, T. Takenaka and M. Ichimura : *Bull. of Faculty of Agri. Tamagawa*, 12, 17 (1972)。
- (13) 三輪知雄：酵素化学シンポジウム，8, 57 (1953)。
- (14) J. H. Pazur and D. French : *J. Biol. Chem.*, 196, 265 (1952)。