[農化 第 48 卷, 第 4 号, p. 225~230, 1974]

蜜蜂による蜂蜜中有機酸の生成

越後多嘉志, 竹中 哲夫

(玉川大学農学部農芸化学科)

昭和 48 年 9 月 7 日 受 理

Production of Organic Acids in Honey by Honeybees

By Takashi ECHIGO and Tetuo TAKENAKA

*Department of Agricultural Chemistry, Tamagawa University,
Machida, Tokyo*

It was accounted for that lowering pH and increasing acidity in the process of honey formation were caused mainly by organic acids produced enzymically.

Gluconic acid was the principal acid and various organic acids in Krebs cycle were also contained in honey.

These organic acids may be derived from fructose, glucose and sucrose in nectar by various enzymes secreted from honey bees.

The production of gluconic acid was the chief factor for lowering pH and increasing acidity of honey.

It was postulated that, in the process of honey formation, gluconic acid may be produced by the reaction of glucose in nectar with glucose oxidase secreted by honey bees, and that it may be in an equilibrium with gluconolactone in honey.

(Received September 7, 1973)

緒 言

著者は蜜蜂が花蜜から蜂蜜を作る過程で、蜜の pH が低下することに着目し⁽¹⁾, これは花蜜成分に花蜜, 花粉あるいは蜜蜂などの酵素が関与して酸性成分が生成するためであると予想した。

蜂蜜中の酸性成分としては、脂肪酸⁽²⁾, アミノ酸⁽³⁾, それ以外のグルコン酸や、クレブスサイクルに関係する有機酸 (以下これを有機酸と称する) などが考えられるが、花蜜の主成分である糖から生成する酸性成分としては有機酸が主であると考えられ、これが蜜の pH 低下の原因と推定された。

前田ら⁽³⁾, Stinson ら⁽⁴⁾は、蜂蜜中の有機酸を調べ、その主成分はグルコン酸であると指摘し、Cocker⁽⁵⁾や White ら⁽⁶⁾は蜂蜜中の酸性成分は酵素的に生成すると述べているが、詳細な記述はない。また White ら⁽⁷⁾は蜂蜜

のグルコン酸は蜜蜂のグルコース・オキシダーゼにより生成することを示唆しているが、実際に蜂蜜生成過程でのグルコン酸生成反応に言及した報告は見当たらない。

本報は野外の花蜜や花粉の混入を防ぐように装置したケージ内に蜜蜂 (以下この蜜蜂を caged bee と呼ぶ) を飼育し、この caged bee からの分泌酵素と糖液との反応から生成する有機酸を調査し、蜂蜜生成過程における pH 低下の要因を追究したものである。

実 験 方 法

1. pH および総酸度

pH は pH 計で測定した。また試料 10 ml を 0.05 N NaOH で滴定し、pH 8.3 のときの滴定値をもって遊離酸度とし、この溶液にさらに 10 ml の 0.05 N NaOH を加え、これを pH 8.3 になるまで 0.05 N HCl で逆滴定して、NaOH 10 ml から HCl 滴定値相当量の NaOH ml 数を差

し引いてラクトン酸度とした⁽⁸⁾。総酸度は、遊離酸度とラクトン酸度の合計量で求めた。

1-1. 花蜜 採集したサルビア花蜜(フルクトース, グルコース, スクロースを含有し, 全糖濃度17%)を2倍に希釈し, トルエンを加えて35°Cに放置, 一定時間ごとにpHおよび総酸度を測定した。

1-2. 花粉混入の糖液 混入花粉の影響を調べるため, 0.5M グルコース溶液50mlにカボチャの花粉1gを入れ, トルエンを加えてときどき攪拌しながら35°Cに放置, pHおよび総酸度を上記と同様に測定した。

1-3. Caged bee 蜂蜜 既報⁽⁹⁾のごとくに行なった。すなわちcaged beeに, あらかじめpHと総酸度を測定しておいた40%フルクトース, グルコース, スクロース混合溶液(3:3:4 重量比)(以下これをF.G.S. 混液と呼ぶ)を給餌し, 貯えた蜜を採集, これを10倍に希釈してpHおよび酸度を測定した。なおF.G.S. 混液を給餌した理由は, 花蜜の糖パターンが一般にF.G.S. であることを考慮したためである。

1-3-1. 蜜蜂分泌酵素液の調製: caged beeが作った蜂蜜300mlに水50mlを加え, さらに10倍量の90%冷エタノールを加えて, 3°C, 2時間放置する。生じた沈殿を分離した後, 少量の水に溶かし, 水に対して透析し, 3°C~6°Cで濃縮して酵素液200mlを得た。本酵素はcaged bee蜂蜜からの酵素液であるから, 蜜蜂分泌酵素と考えてよい。

なお, この酵素液中には α -グルコシダーゼ, アミラーゼ, グルコース・オキシダーゼ(以下G.O.D.と略称)⁽¹⁰⁾などの酵素のほか, 各種の酸を生成する酵素群も含まれていると考えられる。

本報では, この酵素液中の酸生成酵素系(acid-producing enzyme system)に着目した。

1-3-2. 酸生成酵素系の活性度: 酸生成酵素系の活性度は酵素液1mlが30°C, 10時間に生成した酸を0.05N NaOHで滴定し, その滴定値(ml数)で表示した。すなわち, 下記1-4に示した酵素反応液10mlを0.05N NaOHで滴定し, 初めの10時間におけるNaOH滴定値の増加量を求めた。なお, たんぱく質量はフォーリン・チオカルト法によって求めた。

1-4. 酵素反応液 酵素液5mlを25%フルクトース, グルコース, スクロースおよびF.G.S. 混液, それぞれ45mlに加え, さらにトルエンを加えて30°Cに放置, この反応液のpH, 総酸度を一定時間ごとに測定し

た。なお, 加熱失活した酵素液5mlと25%グルコース45mlとの反応液についても同様測定した。

2. G.O.D. 画分液によるグルコン酸の生成

2-1. 酵素液のゲルろ過 方法1-3-1のように調製した酵素液5mlをセファデックス G-200 カラム(1.9×40.0 cm)で処理した。たんぱく質は280m μ の吸光度を測定して求め, G.O.D.はSchepartzら⁽¹¹⁾の方法を応用して検出した。その活性単位はpH 5.5, 37°Cで1分間に10⁻⁸ μ moleのグルコースを酸化する酵素量を1単位(u)とし, 酵素液1ml当りに換算して表示した。

2-2. 酵素反応液の調製 酵素液をゲルろ過して, G.O.D. 活性区を集め, 水に対して透析して脱塩した画分液50mlを, 25%グルコース150mlに加え, 30°Cに放置してpHがもはや低下しない反応液を以下の実験試料とした。

2-3. グルコン酸の検出 上記反応液のpHおよび総酸度を方法1にしたがって測定したのち, 反応液中のグルコン酸をガスクロマトグラフィー(G.C.)で検出した。G.C.はClark⁽¹²⁾の方法を参考にし, 反応液を乾燥後, ピリジンに溶解, シリル化剤を加えてトリメチルシリル誘導体にした。またG.C.のグルコン酸とグルコノラクトンのピークは, 標準グルコン酸の減圧濃縮によるラクトンへの変化, あるいは標準グルコノラクトンの室温放置によるグルコン酸への変化と, それに伴って変動するピーク面積の大小関係から判定した。

2-4. グルコン酸とグルコノラクトンの平衡量比の測定 0.05Mグルコノラクトン水溶液を1時間煮沸し, グルコン酸への変旋光を示さなくなるまで放置した溶液をラクトンとグルコン酸との平衡溶液として, 方法1にしたがって遊離酸度とラクトン酸度を測定し, 平衡量比を算出した。

3. G.C. による有機酸の定量

3-1. 分析試料 有機酸定量のための試料は, 次の5種類である。すなわち1971年に入手の鳥取県産れんげ草蜂蜜, 方法1-3のようにして得たcaged bee蜂蜜, さらに25%フルクトース, 25%グルコース, あるいは25%F.G.S. 混液のそれぞれ150mlに酵素液50mlを加え, 30°Cで反応させ, pHがもはや低下しない各反応液である。

3-2. G.C. 試料の調製 上記試料(蜂蜜試料は水で5倍に希釈し, 酵素反応液は2倍に希釈する)をそれぞれDowex 50 (H⁺型)およびDowex 3 (OH⁻型)カラ

ム (1.0×20cm) に順次通過させる。よく水洗した後、Dowex 3 に吸着している有機酸を 2N アンモニア-50% エタノール溶液 250ml で溶出する。この溶出液を減圧濃縮し、再度、Dowex 50 (H⁺ 型) カラムで処理してアンモニアを除去する⁽⁸⁾。次にこの溶液を濃縮乾固した後、方法 2-3 同様に、ピリジンに溶解、シリル化剤を加えて有機酸のトリメチルシリル誘導体として、G.C. 用試料とした。

3-3. 有機酸の検出定量 G.C. により検出された有機酸の種類は、それらの標準物質の保持時間と対比して判定した。特にグルコン酸は方法 2-3 による検出結果とも比較して確認した。また各有機酸の定量は、著者⁽¹³⁾が糖の定量に応用した内部標準法によった。すなわちソルビットを内部標準物質 (I.S.) とし、有機酸の各ピーク面積を測定して酸量を算出し、全検出有機酸量に対する百分率で示した。

3-4. 酵素反応液の有機酸組成変化 25% F.G.S. 混液 150ml に方法 1-3-1 のように調製した酵素液 25ml を加え、30°C で反応させ、一定時間ごとに反応液の一部を採取して pH、総酸度および有機酸組成を調べた。

実験結果および考察

方法 1-1 のようにして、花蜜を 10 日間放置しても初めの花蜜の pH 5.2、総酸度 0.23/10ml はほとんど変化せず、方法 1-2 のように花粉粒を混入させたグルコース溶液の pH 5.0、総酸度 0.25/10ml もまた時間の経過によって変化しなかった。しかし方法 1-3 のごとく、花蜜や花粉粒の作用を除くようにして、caged bee に 40% F.G.S. 混液を給餌して得た蜂蜜では、初めの F.G.S. 混液の pH 6.2 から pH 3.1 に変化した。したがって蜂蜜の生成過程で、蜜の pH を低下させたものは花蜜や花粉成分ではなく、蜜蜂の分泌酵素の作用にあると考えられた。

Caged bee 蜂蜜から酵素液を調製し、各種の基質に作用させて pH と総酸度を測定した (Fig. 1)。酵素液を加熱失活させると pH や総酸度に変化を認めないが、加熱しない酵素液では変化が認められた。

Table I は加熱しない酵素液を用いグルコース、フルクトースなどの各種基質に作用させたときの酸度の増加、すなわち各種基質に対する酸生成酵素系の活性度を比較した結果である。グルコースを基質にすると酸度増加は大きい、フルクトースでは小さい。またスクロー

Fig. 1. Changes in pH and Acidity of Reaction Mixture Containing Various Substrates by Honey Enzyme from Caged Bees.

() total acidity (ml of 0.05N NaOH/10 ml reaction mixture), ×—× glucose and heated enzyme, ●—● fructose, △—△ sucrose, □—□ F.G.S. mixture, * ○—○ glucose.

* See experimental 1-3.

Table I. Activities of Acid-producing Enzyme* on Various Substrates

Substrate	Activity**
Fructose	0.026
Glucose	0.085
Sucrose	0.053
F.G.S. Mixture	0.059

* See experimental 1-3-1. ** ml of 0.05N NaOH/1 ml enzyme soln. after 10hr incubation. Protein content of enzyme soln.: 0.24 mg/ml.

スや F.G.S. 混液を基質にするとグルコースよりやや小さい。スクロースが小さいのは酵素液中に α -グルコシダーゼが存在し、スクロースを分解⁽¹⁴⁾した後、生成したグルコースが初めて酸生成酵素の基質になるため、また分解されたグルコース量はグルコースだけの溶液にくらべて約半分であるためと考えられる。したがって酸度の増加、すなわち pH 低下の主原因になっている酵素の基質はグルコースである。

次にいかなる有機酸が生成したかを知るため、酵素反応液中の有機酸を検出した。Fig. 2, Fig. 3 にグルコースからの生成有機酸と caged bee 蜂蜜中の有機酸の検出結果を示した。グルコノラクトンのピークがグルコン酸にくらべて大きいのは、G.C. 用試料調製の際に試料が濃縮乾固されるのでグルコン酸がラクトンに変化するためであり、試料調製前とは異なる。

次に各有機酸を検出・定量した結果を Table II にまとめた。フルクトースを基質にした場合は、ごく微量の数種有機酸を検出したが、グルコースと F.G.S. 混液で

Fig. 2. Gas Chromatogram of Organic Acids in Caged Bees Honey.

Column: 3mm×3m glass, 5% SE-30 on Chromosorb W(AW-HMDS), column oven temp.: 200°C isothermal, sample: trimethylsilyl derivative.

Fig. 3. Gas Chromatogram of Organic Acids Produced from Glucose by Acid Producing Enzymes.

Column, column oven temp. and sample: the same conditions as those in Fig. 2.

Table II. Organic Acid Composition of Various Sample*

Organic acid (%)	Honey	Caged bee honey	Enzymic product from glucose	Enzymic product from F.G.S. mixture	Enzymic product from fructose
Oxalic	trace	0.03	0.46	0.33	trace
Malonic	0.62	trace	0.16	0.44	trace
Succinic	0.45	trace	0.24	0.53	0
Fumaric	0.02	0.87	0.40	0.24	trace
Malic	0.17	0.80	0.22	0.82	trace
α-Ketoglutaric	6.89	3.55	0.54	3.18	0
Tartaric	0.87	3.78	3.83	2.53	trace
cis-Aconitic	1.70	0.87	1.83	0.64	trace
Citric	3.93	5.09	6.17	2.58	0
Gluconic (lactone)	68.14	66.54	63.96	66.40	0
Unknown	17.21	18.47	22.82	22.31	0
pH	3.7	3.1	3.6	3.8	5.6
Total acidity (ml of 0.05N NaOH/10ml sample)	3.24	5.37	0.44	0.34	0.20

* See experimental 3-1.

は、いずれも蜂蜜とほぼ類似の有機酸組成を示した。しかし総酸度において蜂蜜と酵素反応液とでは、その数値にかなりの相違がある。これは酵素反応液と蜂蜜とでは、試料濃度が異なるためである。

前田ら⁽⁸⁾、Stinson ら⁽⁴⁾の結果と同様に、蜂蜜はグルコン酸（グルコノラクトンを含む）が主要酸であり、全有機酸の70% ぐらいを占めている。また蜂蜜中に少量であるが、クレブスサイクル中の各種の酸も検出された。なお、ガスクロマトグラムに認められた一つの未知ピークは同定できなかった。

F. G. S. 混液を基質にした酵素反応液の有機酸組成変化を調査した結果が Table III である。最初の10時間の有機酸組成は蜂蜜のそれに類似するが、pH は5.4で蜂蜜のpH よりも高い。しかし40時間以内の反応でようやく蜂蜜のpH に近くなる。したがって花蜜から蜂蜜が生成する過程で、有機酸は初期の40時間以内の反応でほぼ生成し終わると考えられる。

著者らは酸生成酵素系の実体を調査していないが、グルコースからグルコン酸以外にクレブスサイクル中の酸を生成していることや、Subers ら⁽¹⁵⁾ が蜂蜜中に glucose-6-phosphate や 2-,あるいは3-phosphoglyceric acid などを検出していることを考えると、蜂蜜生成過程にはグルコースからクレブスサイクル中の酸を生成する酵素系が存在していることが推測される。これらの酵素によって生成した有機酸が pH 低下や酸度増加の要因になっているが、主要因はそのうちのグルコン酸である。

グルコン酸生成に関与する酵素として glucose dehydrogenase が考

Table III. Changes in Organic Acid Composition of Reaction Mixture*

Organic acid(%)	Reaction time (hr)	0	10	20	30	40
Oxalic	0	trace	trace	0.23	trace	
Malonic	0	trace	trace	0.06	trace	
Succinic	0	2.72	4.36	1.80	7.21	
Fumaric	0	2.36	2.53	1.07	2.22	
Malic	0	1.58	4.87	1.52	2.10	
α -Ketoglutaric	0	0.95	1.67	1.17	1.60	
Tartaric	0	4.50	5.24	4.02	5.72	
cis-Aconitic	0	trace	0.27	0.67	0.91	
Citric	0	3.89	3.37	2.17	2.94	
Gluconic (lactone)	0	74.53	66.76	68.04	68.42	
Unknown	0	9.47	10.93	19.25	8.88	
pH	6.2	5.4	4.3	3.8	3.7	
Total acidity (ml of 0.05N NaOH/10ml reaction mixture)	0.10	0.18	0.26	0.33	0.34	

* F. G. S. Mixture incubated with acid-producing enzyme.

えられたので, Strecker⁽¹⁶⁾ の方法によってこれを酵素液中から検出しようとしたが, 認められなかったので, 次に G. O. D. の検出を試みた。すなわち, Fig. 4 に示すように蜜蜂分泌酵素液をゲルろ過したところ, fraction No. 4~15 に G. O. D. 活性が認められた。よって方法 2-2, 2-3 にしたが, グルコースの酵素反応液からグルコン酸の検出をした。その結果は Fig. 5 である。ガスクロマトグラムにはグルコン酸 (グルコノラクトン) のピーク以外にきわめて微量の数ピークが認められたが, これはここに得られた G. O. D. 画分に, 他の酵素が混存しているためであろう。なお酵素反応液の pH は 4.3, 総酸度は 0.38/10 ml であった。グルコン酸生成は次の反応系によるとされている。

グルコノラクトンはラクトナーゼにより, または自然にグルコン酸に変化するといわれるが, 方法 2-4 にしたがってグルコノラクトンとグルコン酸の平衡量比を測定した。その結果は 1:12 であった (Table IV)。蜂蜜中のグルコン酸は, この平衡量比で存在しているかもしれない。しかし蜂蜜中にはグルコン酸以外の各種の酸も存在するので, 蜂蜜の遊離酸度とラクトン酸度の比は必ず

Fig. 4. Gel Filtration 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, ---- glucose oxidase activity.

Fig. 5. Gas Chromatogram of Gluconic Acid Produced from Glucose by G. O. D. Fraction.

G. C.: 5% SE-30 on Chromosorb W, 200°C isothermal, sample; trimethyldiyl derivative.

Table IV. Free and Lactone Acidity in Equilibrium Solution from Glucono- δ -lactone

	pH	Free acidity (ml)	Lactone acidity (ml)	Lactone acidity / Free acidity
Equilibrium soln.	2.8	9.60	0.81	1/12

しも上記と一致しないであろう。

要 約

蜂蜜生成過程における蜜の pH 低下の要因を明らかにした。

(1) 生成過程において酸度が増加するのは, おもにグルコン酸やクレブスサイクルに関する有機酸が生成

するためである。

(2) 花蜜自体, あるいは生成時に混入する花粉粒によつては pH 低下や酸度増加は起こらず, 蜜蜂の分泌酵素によつて起こる。

(3) 分泌酵素中にはグルコース・オキシダーゼを初め, 酸を生成する数多くの酵素が混在し, これらの酵素が花蜜中のフルクトースやスクロースよりも優先的にグルコースに作用して, グルコン酸やクレブスサイクル中の各種有機酸を生成すると考えられる。

(4) フルクトース, グルコース, スクロースの25%混合溶液と分泌酵素液との10時間以内の反応で, 蜂蜜とほぼ類似の有機酸組成を有する糖液が得られた。

(5) グルコン酸は蜂蜜中有機酸の約70%を占めるが, この酸が pH 低下, 酸度増加の主要因である。

蜂蜜生成過程では蜜蜂のグルコース・オキシダーゼが花蜜のグルコースと反応して, グルコノラクトンを生成し, この大部分がグルコン酸に変化して平衡状態になっていると考えられた。なおグルコン酸とグルコノラクトンの平衡量比は, ほぼ12:1であった。

本研究に対し, ご懇篤なる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。なお本報告の一部は昭和47年4月, 日本農芸化学会大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) M. R. Smith and W. F. McCaughey: *J. Food*

Sci., **31**, 902 (1966)。

(3) 前田清一, 向井 明, 小林直輝, 岡田勇三: 日食工, **9**(7), 270 (1962)。

(4) E. E. Stinson, M. H. Subers, J. Petty and J. W. White, Jr.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **89**, 6 (1960)。

(5) L. Cocker: *J. Sci. Food Agr.*, **2**, 411 (1951)。

(6) J. W. White, Jr., M. L. Reithof, M. H. Subers and I. Kushnir: *Tech. Bull. U. S. Dep. Agric.* No. 1261, p. 35 (1962)。

(7) J. W. White, Jr., M. H. Subers and A. I. Schepartz: *Biochim. Biophys. Acta*, **73**, 57 (1963)。

(8) J. W. White, Jr., J. Petty and R. B. Hager: *J. of A. O. A. C.*, **41**(1), 194 (1958)。

(9) T. Echigo, T. Takenaka and M. Ichimura: *Bull. of Faculty of Agri. Tamagawa Univ.*, **12**, 17 (1972)。

(10) 竹中哲夫, 越後多嘉志: 日農化大会講演要旨, p. 189 (1973)。

(11) A. I. Schepartz and M. H. Subers: *Biochim. Biophys. Acta*, **85**, 228 (1964)。

(12) R. B. Clark: *Crop Science*, **9**, 341 (1969)。

(13) T. Echigo: *Bull. of Faculty of Agri. Tamagawa Univ.*, **10**, 3 (1970)。

(14) 越後多嘉志, 竹中哲夫: 農化, **47**(3), 177 (1973)。

(15) M. H. Subers, A. I. Schepartz and R. P. Koob: *J. Apicul. Res.*, **5**(1), 49 (1966)。

(16) H. J. Strecker: "Methods in Enzymology," Vol. I, ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1955, p. 335。