

不同茶樹品種多酚酶活性及其在製茶過程中之變化

陳 英 玲

臺灣省茶葉改良場

摘要：臺灣重要茶樹品種(系)所含多酚酶活性經調查顯示一般適於製造半發酵茶之品種(系)，其所含該酶活性明顯低於紅茶品種(系)。該酶對(+)-Catechin之 K_m 值為 $2.0 \times 10^{-3} M$ ；平均分子量為 1.5×10^5 。在包種茶製造過程中多酚酶在日光萎凋過程活性明顯升高，但在其後的發酵過程該酶因攪拌作用的刺激酶活性隨之呈現波狀起伏的現象。兒茶素類則隨攪拌次數之增加及加重而加速氧化(約氧化6%~10%)。在對照組因缺少攪拌過程，故酶活性變化起伏不大。且兒茶素類的氧化亦不明顯，即茶葉幾乎未發酵，由此推知攪拌的次數及輕重與茶葉發酵時酶的活化與兒茶素類氧化有密切關係。而在紅茶的製造過程中該酶活性從萎凋時即逐漸升高至揉捻時達到最高。約高出茶菁二倍以上，但在隨後的發酵過程中逐次降低，並在乾燥後消失。

關鍵字：多酚酶、茶、製茶過程

前 言

茶葉發酵簡單的說為茶葉中多酚酶催化兒茶素類的氧化，此種作用又帶動游離胺基酸、脂質及類胡蘿蔔素等物質之氧化⁽¹⁾，產生茶葉獨特的風味。因此多酚酶是整個發酵過程的關鍵物質，其存在於細胞膜內面及粒腺體膜表面，屬於一種附著於膜的蛋白質⁽⁹⁾(membrane protein)，較難萃取純化。本試驗的主要目的在於探討該酶的性質，以及在茶葉製造過程中該酶活性消長與兒茶素類變化的關係，以了解茶葉製造時的生化反應，進一步作為控制製茶各步驟的理論基礎。

本篇系綜合筆者多年來有關茶多酚酶^(2,3,10)之研究報告。

材料與方法

一、試驗材料

(一)各試驗品種均為本場手採茶菁

(二)製造包種茶者為青心大冇品種，依圖1所示流程於製造過程中分別取樣，茶菁經日光萎凋後，於萎凋室內進行靜置及攪拌，萎凋室之溫度保持於23~25°C，相對濕度65%~70%。日光萎凋後靜置90分鐘，行第一次攪拌，攪拌後靜置90分鐘，再進行第二次攪拌，如此反覆靜置攪拌四次。第四次攪拌後經120分鐘，進行炒菁。依圖1流程做各種樣品的處理。一部份經冷凍乾燥後以粉碎機粉碎，以供化學成分分析之用。另一部份以液態氮冷凍，作為多酚酶活性分析之用。

(三)紅茶之製造同樣為青心大冇茶菁，依圖2所示流程製造。茶菁進入萎凋室萎凋12小時後，即重複進行揉捻及解塊2小時，再將茶菁攤開在發酵室內發酵3小時，最後進行乾燥，依圖2流程做各樣品多酚酶活性測定。

包種茶之製造：

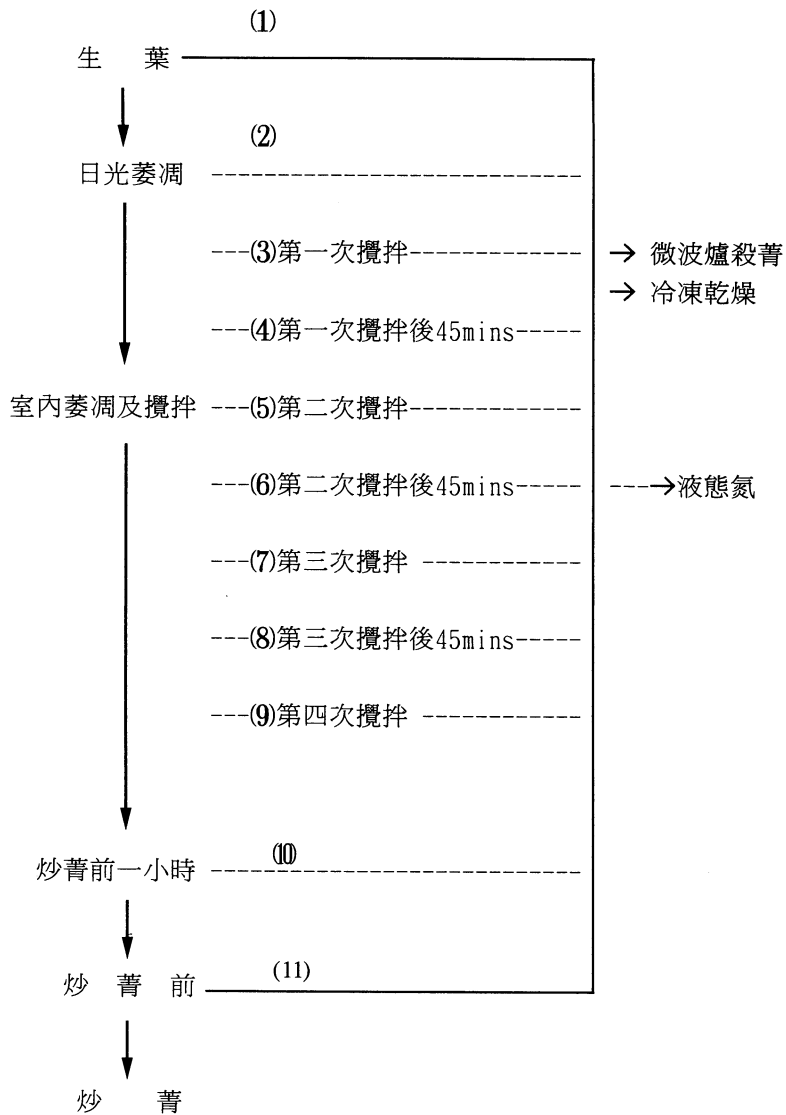


圖 1. 試樣製備流程圖

Fig 1. The flow sheet for preparation of Paochung tea samples

紅茶之製造：

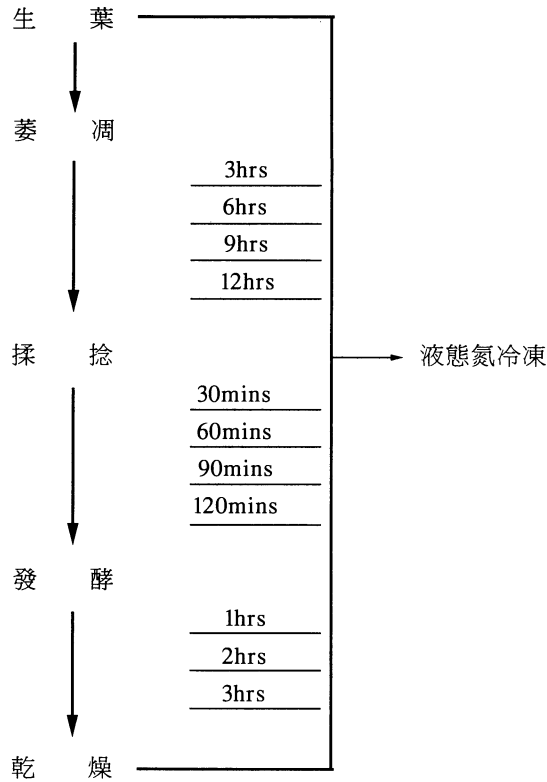


圖 2. 紅茶試樣製備流程

Fig 2. The flow sheet for preparation black tea samples

二、試驗方法

(一)多元酶的抽取與製備

五克丙酮粉末置於 30ml, 0.05M 磷酸緩衝液 (pH7.0, 內含 1M NaCl, 三克 isoascorbate 及 2mM 硫醇) 中攪拌二小時然後以 10,000 × g 離心二十分鐘取上層液以 whatman No.41 濾紙過濾, 再經預濾膜 (whatman glass microfiber filter GF/β) 過濾後以 SephadexG-50 流洗, 收集酶活性部份 (粗酶液)。

(二)多酚酶活性測定⁽⁷⁾

多元酚氧化酶活性以氧電極 (Oxygen monitor) 測定, 以 30°C 下一克乾重之酶液每分鐘所消耗氧之 μl 表示之。反應液為 2.9ml 含下列物質：

藥 品	濃 度
磷酸緩衝液 pH5.5	0.05M
(+)Catechin	10 ⁻² M
適當酶稀釋液	0.1ml

(三)多元酚類總量測定法

本測定法是依據Iwasa⁽⁴⁾氏所定之方法。茶葉中多元酚類以熱水回流萃取1小時,過濾後經適當稀釋,以酒石酸鐵溶液呈色,測其在540nm的吸光度,再以下述方程式計算其在茶葉中的含量。

$$Y=361.98x^2-0.132$$

式中：Y=Concentration of polyphenol in extract (μ g/ml)

X=Absorbance at 540 nm

(四)分子量的測定

將 Blue dextran(2,000,000), Thyroglobulin(669,000), Ferritin(440,000), Catalase(232,000) Aldolase(158,000), Serum albumin(67,000), Ovalbumin (43,000), Ribonuclease A(137,000)溶液, 分次通入Sephacryl S-200管柱,流洗液為0.05M pH7.0磷酸緩衝液,測定各蛋白質的流洗體積(Ve);分別以Log.M.W.對蛋白質流洗體積作圖,在同一條件下,進行多酚酶之流洗,其流洗體積比較標準曲線之分子量,求出酶分子量。

結果與討論

一、多酚酶動力學之特性

(一)部份純化之多酚酶對於不同基質的Km值如表1所示。結果顯示該酶對於茶黃烷醇類(Flavanols,又稱兒茶素類)如(-)Epicatechin及(+)-Catechin之含有鄰二羥基(o-dihydroxyl)有專一性,其Km值與其他報告比較,則與Sanderson⁽⁵⁾氏較相近。此外該酶對於不存在茶葉中的多元酚類如Catechol, Pyrogall及Phloroglucinol等物質亦有反應發生,但 Gallic acid 及 Tyrosine 在本試驗處理中並無反應發生。

(二)以 Sephacryl S-200 膠體過濾法,估計茶多酚酶平均分子量為150,000(表2),與 Benda II⁽⁶⁾氏發表之結果相同。

二、臺灣主要茶樹品種所含多酚酶之活性調查

根據製茶性質將茶樹品種區分為適製紅茶之臺茶一號、三號及八號,適製烏龍茶之黃心烏龍、臺茶五號及青心大冇以及適製包種茶之青心烏龍、武夷及臺茶十二號、十三號等。其各品種所含多酚酶活性分析結果由表3可知適製紅茶品種其酶活性明顯高於適製半發酵茶品種(包括烏龍茶及包種茶),而適製烏龍茶品種之酶活性又微高於適製包種茶品種,又在一年四季中,夏茶所含酶之活性又高於其他各季節所產之茶菁。

三、包種茶發酵過程中多酚酶活性與兒茶素類含量之變化

(一)茶菁在日光萎凋過程(約10~20分鐘視天氣情況而定)中除了蒸散水分外,多酚酶活性亦明顯升高,(圖3)如用其他熱源替代如紅外線或熱風等亦有類似效果。

(二)茶葉發酵期間多酚酶活性在每一次攪拌後酶活性會上升,然後逐漸減少,在下次攪拌時活性再度上升(圖4)。酶活性因受攪拌作用之刺激而呈現波狀起伏的現象,但在對照組中因缺乏攪拌過程,故酶活性起伏不大兒茶素類的變化亦不明顯,即表示茶葉未發酵。因此推測兒茶素類的氧化物能抑制該酶活性,而攪拌作用能促進兒茶素類由茶葉細胞之液胞中滲透出來,並活化該酶,以進行發酵作用。

表 1. 茶多元酚氧化酶對不同酚類基質之Km值

Table 1. Km value of tea polyphenol oxidase for phenolic substrates

Km for	Substrate concentration (mM)	Reaction rate : Vmax (-O ₂ μ 11 ⁻¹ min ⁻¹)	Km value (M)
(-) Epicatechin	0-5	275	2.4 × 10 ⁻³
(+) Catechin	0-5	290	2.0 × 10 ⁻³
Catechol	0-5	250	5.0 × 10 ⁻⁴
Pyrogall	0-5	250	4.4 × 10 ⁻⁴
Phloroglucinol	0-5	264	4.5 × 10 ⁻⁴
Tyrosine	4	0	No reaction
Gallic acid	4	0	No reaction

表 2：以膠體過濾測定分子量

Table 2 : Molecular weight estimation by gel filtration.

	Amount (mg)	Detection	Ve (ml)	Molecular weight
Blue dextran 2000		A 625 mn	24	2, 000, 000
Thyroglobulin	3	A 230 mn	31	669, 000
Ferritin	2	A 280 mn	32.5	440, 000
Catalase	2	A 230 mn	38	232, 000
Aldolase	2	A 230 mn	42	158, 000
Serum albumin		A 230 mn	45	67, 000
Ovalbumin	2	A 230 mn	50	43, 000
Ribonuclease A	2	A 230 mn	60	13, 700
Polyphenol oxidase	5	Enzyme activity	40	150, 000

(三)茶葉在炒菁過程中，多酚酶活性在250°C下約2.5分鐘即無法測出而在200°C下約3.5分鐘，亦可達到同樣效果(圖 5)。

(四)兒茶素類的氧化分析是利用Ferrous tartrate反應後之吸光度測定，該法對所有含o-di hydroxyl的酚類皆反應，但對酚類的氧化物如聚合性越高，則反應吸光度越低，由表 4結果可知在茶葉發酵的四次攪拌過程中，兒茶素類在後兩次攪拌比前兩次攪拌氧化較多，這主要由於兩種因素促成，一為水份的散失，另一為較重的攪拌力促使兒茶類與酶結合，進行氧化聚合。因此在茶葉發酵時攪拌的次數與輕重對多酚酶的活化及兒茶素類的氧化均有密切的關係。

表 3. 台灣主要茶樹品種，多元酚氧化酶活性之調查

Table 3. The investigation of polyphenol oxidase activities in the main tea varieties of Taiwan ($-O_2$ μ l/min/lg dry wt.)

Varieties	Spring crop	Summer crop	Autumn crop	Average
Varieties suitable for black tea manufacture				
T.T.E.S.NO.8	65.3 ^(a)	70.2 ^(a)	62.5 ^(a)	66.0 ^a
T.T.E.S.NO.1	42.1 ^(b)	53.5 ^(a)	48.7 ^(a)	48.1 ^b
T.T.E.S.NO.3	39.0 ^(b)	54.8 ^(a)	39.9 ^(b)	44.5 ^b
Varieties suitable for Oolong tea manufacture				
Chin-Shin Ta Pom	24.0 ^(b)	34.0 ^(a)	24.4 ^(b)	27.4 ^d
Hwang-Shin.Oolong	33.2 ^(a)	34.8 ^(a)	34.0 ^(a)	34.0 ^c
T.T.E.S.NO.5	30.0 ^(b)	38.0 ^(a)	30.5 ^(b)	32.8 ^c
Varieties suitable for Pauchong tea manufacture				
T.T.E.S.NO.12	26.7 ^(ab)	28.3 ^(a)	24.5 ^(b)	26.5 ^d
T.T.E.S.NO.13	18.4 ^(b)	24.5 ^(a)	14.7 ^(b)	19.2 ^e
Chin-Shin Oolong	24.2 ^(b)	30.6 ^(a)	25.6 ^(b)	26.8 ^d
Wuu-Yi	22.9 ^(b)	32.7 ^(a)	25.4 ^(b)	27.0 ^d

The mean values followed by the same alphabet are not significantly different at 5% level with Duncan's multiple range test, alphabet in parenthesis are those horizontal at 5% level.

表 4. 包種茶發酵過程多酚類(兒茶素類)含量變化分析

Table 4. The analysis of variance of the polyphenols content in tea leaves during the fermentation process of Pauchong tea manufacture (DW%)

Treatment*	Polyphenol content	Check
1.Fresh leaves	20.130 ^a	20.025 ^a
2.Solar withering	19.915 ^a	19.155 ^a
3.First shaking	19.935 ^a	19.270 ^a
5.2nd shaking	19.515 ^b	19.750 ^a
7.3rd shaking	19.290 ^b	19.265 ^a
9.4th shaking	18.580 ^c	19.450 ^a
11.Before panning	18.080 ^c	19.195 ^a

The mean values followed by the same alphabet are not significantly different at 5% level with Duncan's multiple range test.

*Refer to the details of the sample preparation during the manufacture of Pauchong tea.

四、紅茶製造過程中多酚酶活之變化

紅茶在製造過程中多酚酶活性在12小時之萎凋過程中活性不斷升高，並在接下來的揉捻過程中達到最高點，高於茶菁兩倍以上。但在發酵過程中活性逐漸下降到最後乾燥活性完全消失(圖6)。此試驗結果與Takeo⁽⁸⁾年所發表符合。

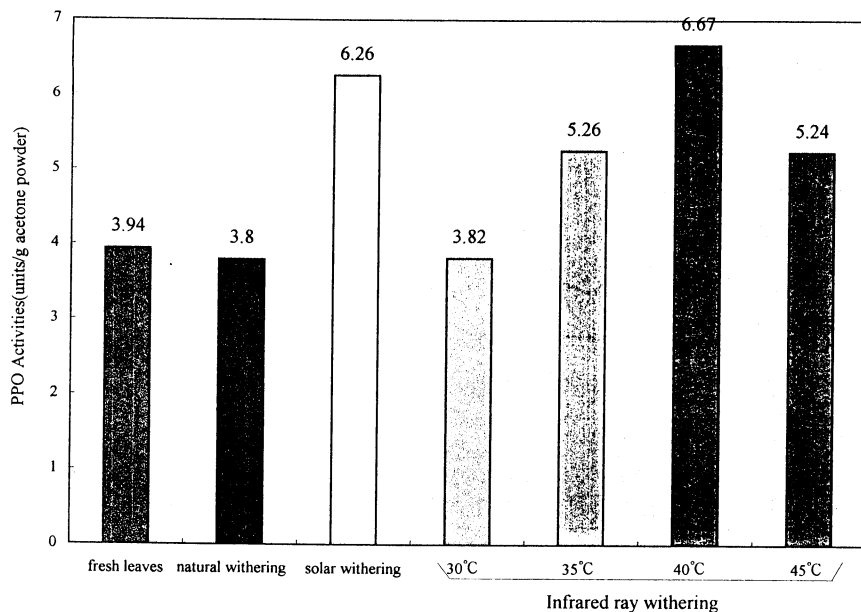


圖 3. 不同熱源萎凋對茶菁多酚酵素活性的影響

Fig 3. The effects of withering by different heating sources on the activities of polyphenol

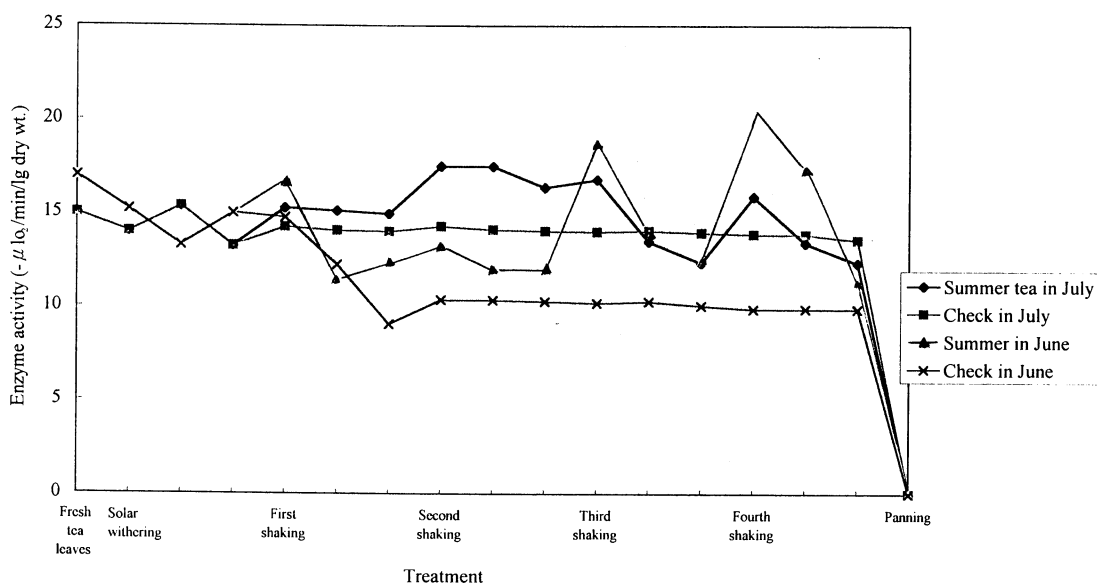


圖 4. 包種茶製造過程中多酚酵素活性之變化

Fig 4. The activities of PPO in tea manufacturing process.

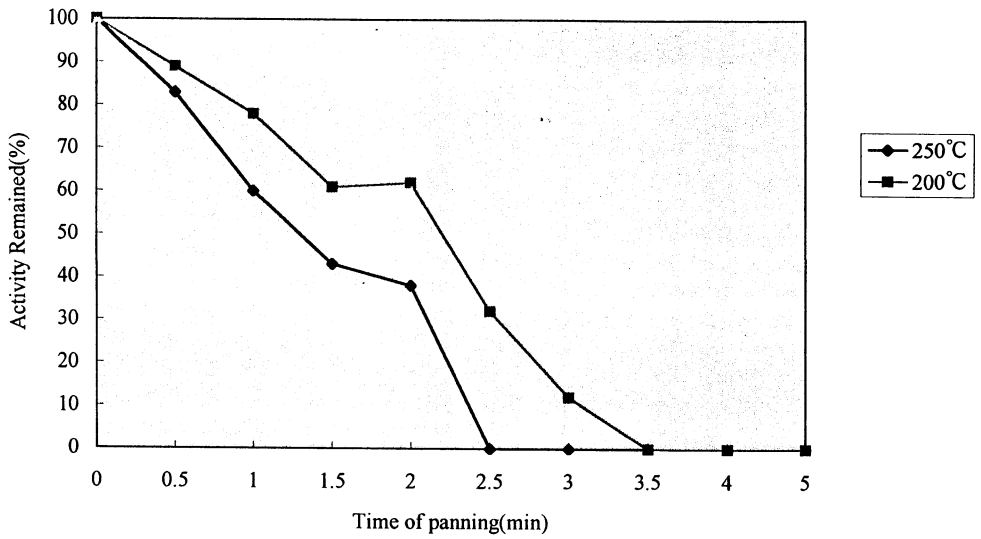


圖 5. 多酚酵素炒菁時之熱穩定性

Fig 5. Thermal stability of PPO in tea Panning.

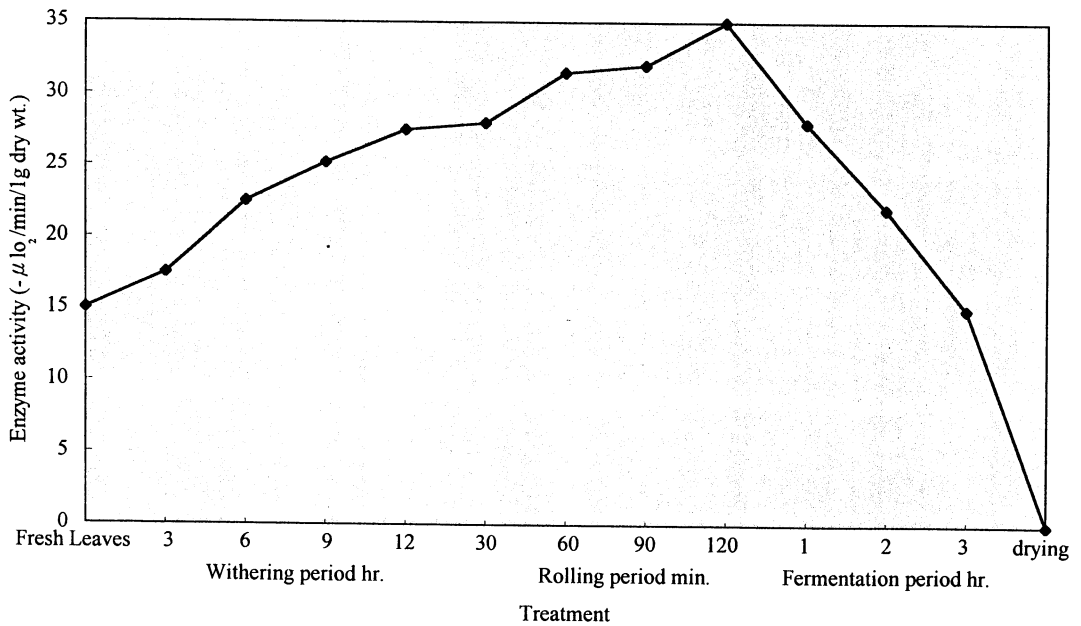


圖 6. 紅茶製造過程中多酚酵素活性之變化

Fig 6. Changes in PPO activity during black tea manufacturing process.

參考文獻

1. 甘子能。1984。茶葉化學入門。
2. 陳英玲。1986。茶葉中多元酚氧化酵素之初步研究。臺灣茶業研究彙報 5:109-115。
3. 陳英玲。1989。茶多元酚氧化酶之研究(一)。臺灣茶業研究彙報 8:83-90。

4. Iwasa, K. 1975. Methods of Chemical analysis of green tea, JARQ. 9:161-164.
5. Coggon, P., G.A. Moss and G.W. Sanderson. 1973. Tea catechol oxidase: isolation, purification and Kinetic characterization. *Phytochemistry* 12:1947-1955.
6. Mayer, A.L. and Harel, E. 1979 Review polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 18:193-215.
7. Takeo, T. 1965. Tea leaf polyphenol oxidase. Part I. solubilization and properties of the structurally bound polyphenol oxidase in tea leaves. *Agr. Biol. Chem.* 29: 588-563.
8. Takeo, T. 1966. Tea leaf polyphenol oxidase Part III Studies on the changes of polyphenol oxidase activity during black tea manufacture. *Agr. Biol. Chem.* 30: 529-535.
9. Takeo, T. 1966. Tea leaf Polyphenol oxidase Part IV. The localization of polyphenol oxidase in tea leaf cell. *Agr. Biol. Chem.* 30: 931-934.
10. Ying-L, Chen. 1988. The polyphenol oxidase of tea. Proceeding of the international symposium. 273-279.

Varietal Difference in Tea Polyphenol Oxidase Activities and Its Changes During Tea Manufacturing Process

Ying-Ling Chen

Taiwan Tea Experiment Station
Yangmei, Taoyuan, Taiwan, R.O.C.

Abstract

The investigation of the main tea varieties (clones) in Taiwan has shown that activities of polyphenol oxidase in the varieties (clones) suitable for semifermented tea manufacture are evidently lower than those for black tea manufacture. This enzyme was found to show a K_m of $2.0 \times 10^{-3} M$ (at $30^\circ C$) for (+) catechin. The activities of polyphenol oxidase can be promoted by shaking the fermentation process of Paochung tea manufacture. The activities of this enzyme were found to fluctuate with the shakings. Oxidation of catechins (about 6%-10% oxidation) increased with times and physical strength of shakings. Little change in the activities of polyphenol oxidase was observed in the check treatment because of lack of shaking suggesting that the oxidation of catechins was not evident. This indicated that obvious fermentation of tea did not take place during the processing.

It can be inferred from the results that the times and physical strength of shakings were closely related with the activation of polyphenol oxidase and oxidation of catechins in tea fermentation.

The enzyme activity during the process of black tea manufacturing in tea leaves was found to increase continually in the withering period and reached the highest point by rolling, about 2 times more than that in the fresh leaves and decrease along with the fermentation process after rolling, then disappear after drying.

Key words: Polyphenol oxidase, Tea, Manufacturing process