

茶多元酚氧化酵素之初步研究¹

陳英玲²

摘 要

陳英玲 · 1986 · 茶多元酚氧化酵素之初步研究 · 臺灣茶業研究彙報 5 : 109 - 115。
茶多元酚氧化酵素之抽出經試驗結果在抽取液中加入20%飽和度之硫酸銨及0.1% S.D.S. 為佳，不同茶樹品種所含多元酚氧化酵素之活性以適製半發酵茶品種較低，約為紅茶品種的2/5，此種差異性可應用於茶樹品種適製性之判斷。

該酵素之分子量經Sephacryl S-200膠體過濾測定為150,000，而其活性因茶芽成熟期不同而有相當大的變化，幼嫩茶芽之粗酵素液以Sephacryl S-200分離至少可得二種同功異構酵素，而在成熟之茶芽中同功異構酵素消失，且活性降低，因此製茶時，可依所製茶類對該酵素催化力大小之需求，而選擇適宜採摘時間。

關鍵字：多元酚氧化酵素，同功異構酵素，分子量。

一、前 言

茶葉依製造法可分為四類，其中以半發酵茶最為國人所喜好，製茶須經過發酵作用使其產生獨特的滋味與香氣，因此發酵作用控制是否適當，對茶的品質影響甚鉅。根據Sanderson⁽¹⁾指出茶葉發酵主要為茶葉中多元酚氧化酵素催化兒茶素類之氧化，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而產生茶葉獨特之風味，因此多元酚氧化酵素是整個發酵過程的關鍵物質。各國學者如Sneerangachar⁽¹⁾氏，Bandall氏及Gregor⁽¹⁾氏，Coggon⁽³⁾氏及Takeo⁽⁴⁾氏等對該酵素之抽取法及基本特性均有作深入之研究，但其結果互有差異，且其抽取法亦各有利弊，因此筆者再試行改進其抽出法，並詳細探討其該酵素的性質作為應用的基礎。

Tayao⁽⁷⁾曾將日本主要茶葉品系之多元酚氧化酵素活性作分析研究，發現適合製造紅茶之品種其酵素活性比適合製綠茶者為強，並將此結果應用於紅茶的育種工作上，實驗結果確有很高的相關。由於包種茶為本省大眾所喜愛，育種工作亦朝此目標努力，因此筆者試就本省已有的適製紅茶，包種茶，烏龍茶等茶樹品種之多元酚氧化酵素活性詳加分析，以期利用多元酚氧化酵素活性與茶葉適製性的相關性，作為育種初期優良品系篩選的參考。

1. 茶業改良場助理研究員。

2. 本計畫承農委會75農建7.1糧—18(1)計畫經費補助。

二、材料及方法

一試驗材料：茶葉 (*Camellia sinensis*, L.) 採用品種爲：

(一)適製半發酵茶者：臺茶5號，12號，青心大冇，青心烏龍，黃心烏龍及武夷。

(二)適製紅茶者：臺茶1號，3號及8號。

二多元酚氧化酵素活性之測定：

酵素活性以 Y S I 氧電極測定。

2.9 ml 的反應液含有下列物質：

磷酸緩衝液 (pH 5.5) 0.05 M

(+) Catechin 5×10^{-3} M

上述反應液以空氣飽和後經 30°C 恒溫水浴平衡三分鐘加入適當稀釋酵素液 100 μ l 作用十五分鐘，以氧電極測定溶液中所含氧的終值，再由反應前後溶氧量之差，換算出氧氣消耗量。

三酵素活性單位定義：

在上述條件的測定下以每分鐘消耗 1 μ mol 氧氣的酵素活性定爲 1 單位酵素活性。

四茶多元酚氧化酵素之抽取與純化：

(一)酵素抽出方法之研究：

稱取約 5 克冷凍茶菁，用液態氮處理後，以預冷過的磨鉢研碎，加入 0.05 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0 內含 2 mM β -mercaptoethanol, 1 mM E.D.T.A., 1% 異維生素 C) 180 ml，分爲六個處理，各分別加入硫酸銨 10%，20%，30%，40% 及 20% + 0.1% S.D.S. 抽取 1 小時，以紗布過濾取上層液以 10000 $\times$ g 離心 10 分鐘，其上澄液再以 Sephadex G-50 膠體過濾收集有酵素活性部份以氧電極法測定之。

(二)不同品種茶菁所含多元酚氧化酵素活性之研究：

利用適製紅茶品種 (臺茶一號，三號及八號)，製造包種茶優良品種 (青心烏龍，臺茶十二號，武夷) 及一般適製包種茶品種 (青心大冇，臺茶五號及黃心烏龍等) 茶菁，同 (一) 法加入硫酸銨 20% 及 0.1% S.D.S. 進行抽取並以氧電極法測定酵素之活性。

(三)異構酵素之分離：

由 (二) 製備的粗酵素液中慢慢加入固體硫酸銨，收集 30% ~ 70% 飽和度的沉澱蛋白質，溶於 2 ml 的 0.05 M pH 7.0 磷酸緩衝液中 (含 0.1 M 醋酸鈉)，於 15000 $\times$ g 下離心 10 分鐘，除去不溶物質。將上澄液注入預先用 0.05 M 磷酸緩衝液 (含 0.1 M 醋酸鈉) 平衡過的 Sephacryl S-200 管柱上層，以磷酸緩衝液進行流洗速率爲每小時 30 ml，收集有酵素活性部份。

(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，洗液爲 0.05 M pH 7.0 磷酸緩衝液，測定各蛋白質的流洗體積 (V_e)；分別以 Log. M. W. 對蛋白質的流洗體積作圖，作成標準曲線，在同一條件下，進行多元酚氧化酵素之流洗，其流洗體積比照標準曲線之分子量，求出酵素分子量。

三、結 果

一茶多元酚氧化酵素之抽出研究：

該酵素附著於細胞皮膜表面⁽⁶⁾在抽取試驗中，發現加入中性鹽及陰離子介面活性劑能增加酵素的抽取量，而以加入硫酸銨 20% 及 0.1% S.D.S. 之效果最佳，可增加約 3.7 倍之抽取率 (表一)，本試驗中多元酚氧化酵素之抽出，皆採用此方法。

二、不同品種茶菁所含多元酚氧化酵素之研究：

參試品種中，對一心二葉所含多元酚氧化酵素分析發現適製紅茶的品種所含之該粗酵素活性約為適製半發酵茶品種的 1.5 倍而適製半發酵茶的一般品種，其活性比優良包種茶的酵素活性略高，最優之半發酵茶品種，其酵素活性根據七十四年春季的分析，均不超過 40 units/5g 茶菁（表二）。至目前為止發現所有適製高級半包種茶均屬低酵素活性（低發酵力），這與包種茶屬於輕發酵茶可能有密切的關係。

三、異構酵素之分離：

以臺茶八號一心二葉及對口葉之茶芽，分別進行異構酵素的分離，其結果發現較嫩之一心二葉茶芽，具有較高的酵素活性且經 Sephacryl S—200 之分離，至少可分離二種同功異構酵素消失（圖二）。

四、酵素分子量之估計：

以 Sephacry S—200 膠體過濾法，估計茶多元酚氧化酵素之分子量為 150,000（表三，圖三）與 Bendall⁽²⁾ 氏發表之結果相同。

四、討 論

Goggon⁽³⁾ 氏及 Takeo⁽⁴⁾ 氏曾分別發表茶多元酚氧化酵素的抽取方法，筆者在試驗時曾重複其抽出法，二者各有利弊不盡理想，並同時發現適當濃度之鹽類，能增加酵素的溶出，因此乃綜合二氏之抽出法並加以改良，另以陰性之介面活性劑 S.D.S. 代替 Takeo 氏所使用中性之 Tween 80，溶出效果大為提高（表一）。

Takeo⁽⁵⁾ 氏認為適製紅茶的品種其多元酚氧化酵素之活性較綠茶品種為高，本試驗結果與 Takeo 氏相符合，由於半發酵茶品種所含之酵素活性普遍很低，故進一步之試驗擬以酵素活性配合個別兒茶素及胺基酸含量，作為育種工作初步選種的依據。

由於不同成熟度茶芽，酵素活性差異很大，故在比較不同品種之酵素活性時，應採以同一成熟度之茶芽。目前尚在進行的分離工作發現不同品種間的異構酵素分佈型式（pattern）不盡相同，其分佈型式之差異或許亦可作為品種判別的參考。目前正做進一步之探討。

表一：鹽類濃度及介面活性劑對多元酚氧化酵素抽取之影響。

Table 1 : Effect of salt saturation and detergent contents in homogenizing media on the extraction of polyphenol oxidase from tea leaves.

Treatment		Polyphenol oxidase
Saturation of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%)	detergent (%)	Total activity (units)
0	0	8.2
10	0	18.5
20	0	22.4
30	0	15.5
40	0	12.7
20	5 V Tween 80	23.0
20	0.1 S.D.S.	30.6

S.D.S.: Sodium dodecyl sulfate

Variety : T.T.E. No.5

Tea leaves weight: 5g

表二：不同品種間酵素活性之差異。

Table 2 : Variation of enzyme activity in the tea leaves among the varieties.

Varieties	Volume (ml)	Total activity
1. T.T.E. No.1	60	53.5
2. T.T.E. No.3	60	54.8
3. T.T.E. No.8	60	70.2
4. Chin-shin Da Pung	60	34.0
5. Hwang-shin Oolong	80	34.8
6. T.T.E. No.5	60	30.2
7. T.T.E. No.12	60	28.3
8. Chin-shin Oolong	60	30.6
9. Wuu Yi	80	25.4

Season : Spring
Tea leaf weight : 5g

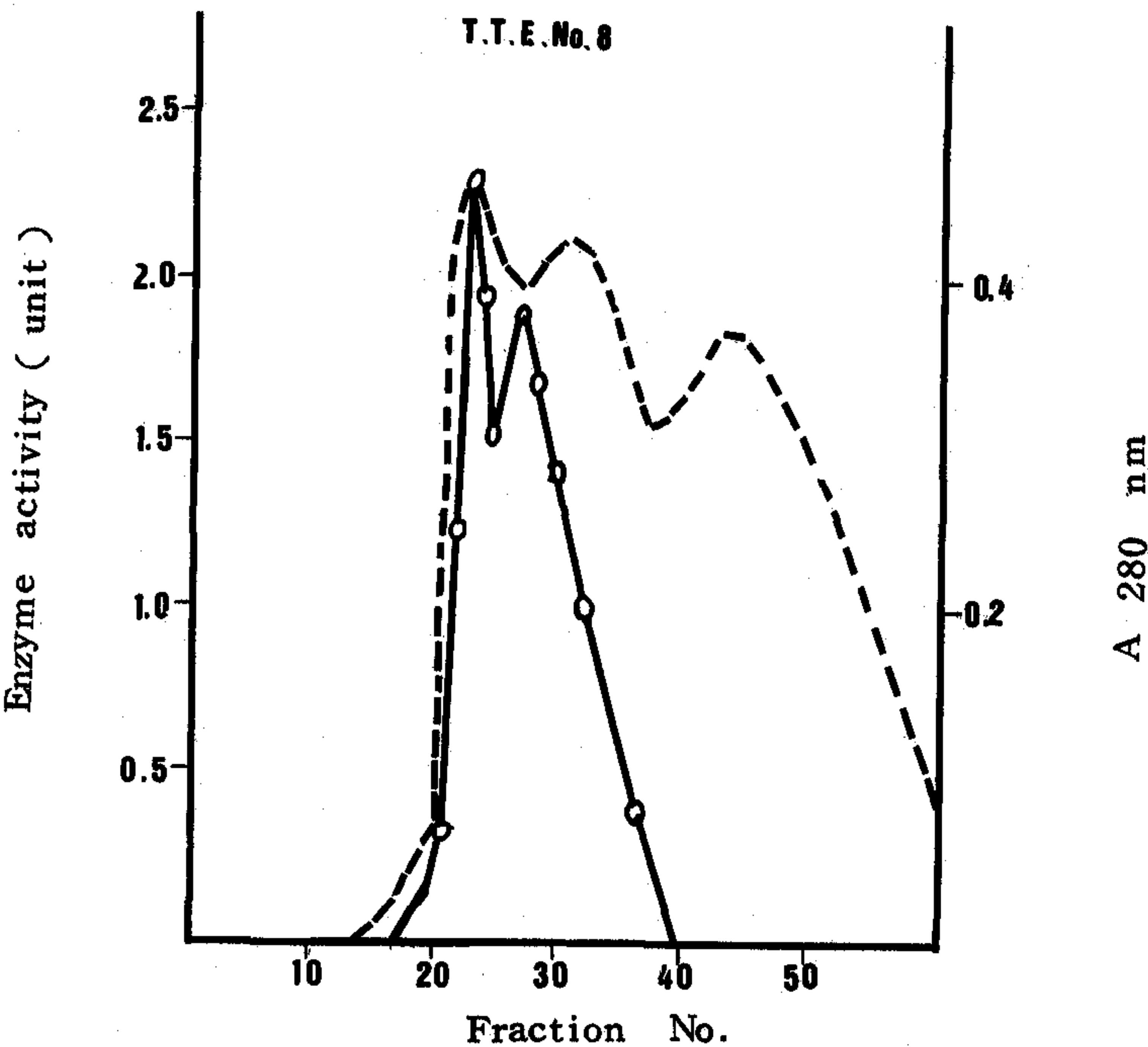


Fig. 1. Gel filtration pattern on Sephacryl S-200 column.
Column size: 2.6 × 70 cm
Bed volume: 2.6 × 64 cm
Elution buffer: 0.05M phosphate buffer, pH7.0
Flow rate: 30 ml/hr
Fraction volume: 2.5 ml/fraction

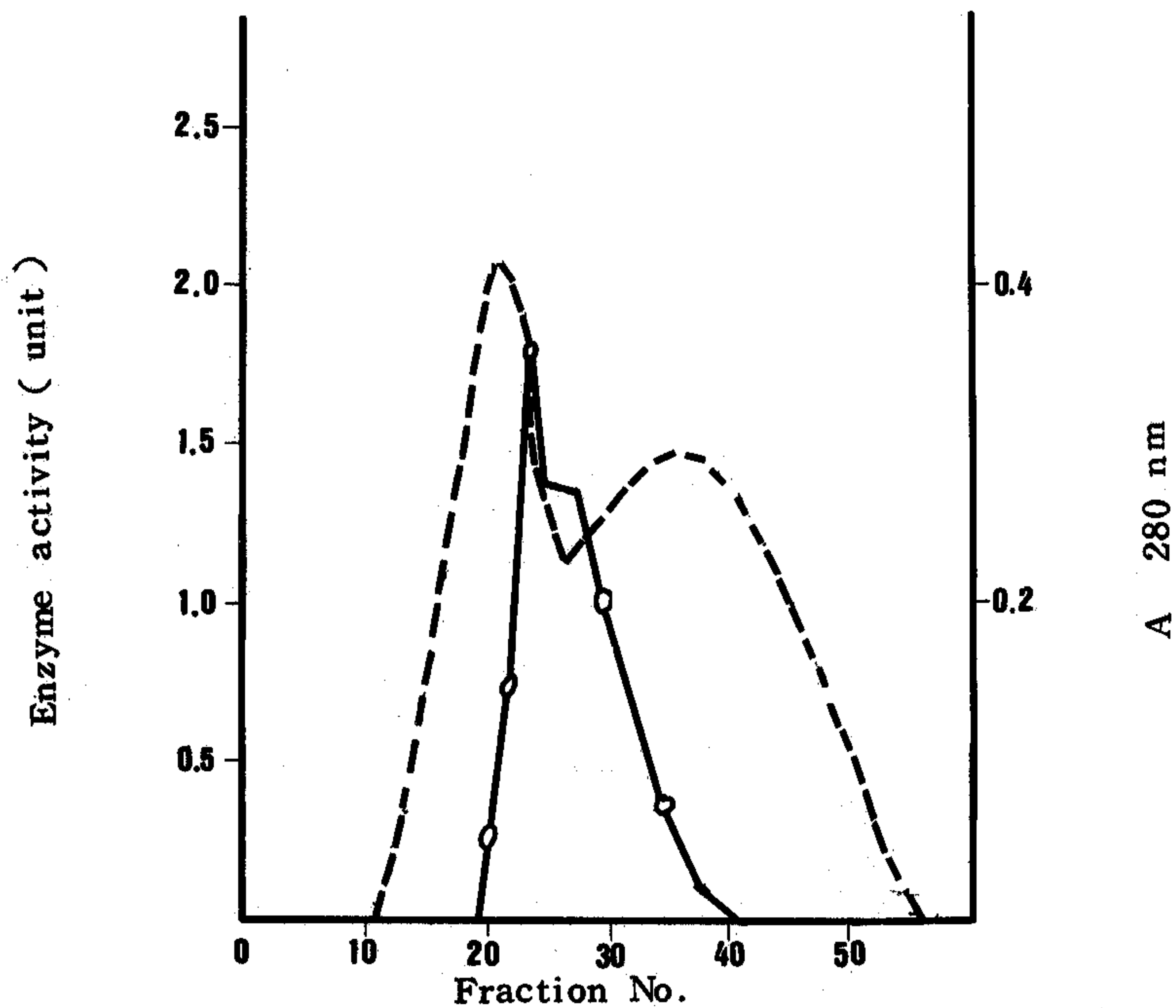


Fig. 2. Gel filtration pattern on Sephacryl S-200 column.

Column size: 2.6×70 cm
 Bed volume: 2.6×64 cm
 Elution buffer: 0.05 M phosphate buffer, pH7.0
 Flow rate: 30 ml/hr

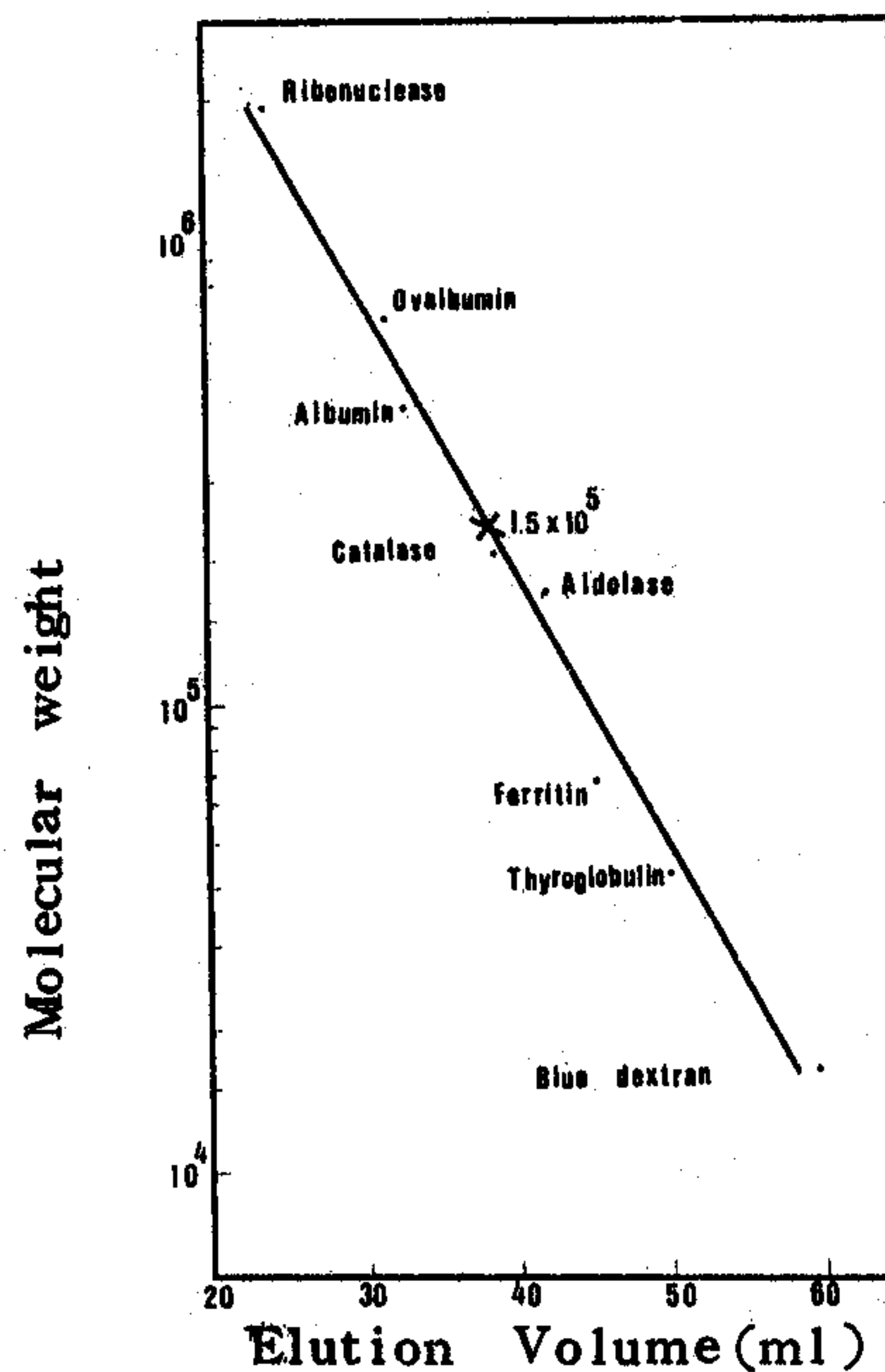


Fig 3 Estimation of molecular weight of tea leaf polyphenol oxidase by gel filtration. see Table 3

Gel type Sephacryl S-200 Column size: 2.6×70 cm
 Bed size: 2.6×64 cm Flow rate: 30 ml/hr
 Elution buffer: 0.05 M phosphate buffer pH7.0

表三：以膠體過濾測定分子量。

Table 3 : Molecular weight estimation by gel filtration.

	Amount	Detection	Ve	Molecular
	(mg)		(ml)	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
Ribonunclease	2	A 230 mn	60	13,700
Polyphenol oxidase	5	Enzyme activity	40	15,000

參 考 文 獻

1. 甘子能・1984・茶葉化學入門。

2. Mayer, A. L. and Harel, E. 1979 Review polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, 18:193-215.

3. Coggon, P., Moss, G. A. and Sanderson, G. W. 1973. Tea catechal oxidase: isolation, purification and Kinetic characterization, *phytochemistry*-12:1947-1955.

4. Takeo, T. 1965. Tea leaf polyphenol oxidase. Isolubilization and properties of the structually bound polyphenol oxidase in tea leares *Agr. Biol. Chem.* 29(6): 558-563.

5. Takeo, T. 1966: Tea leaf polyphenol oxidase. III Studies on the change of polyphenol oxidase actioity during black tea manufacture *Agr. Biol. Chem.* 30(6): 529-536.

6. Takeo, T. 1966, Tea leaf polyphenol oxidase IV, The locatization of polyphenol oxidase in tea leaf cell. *Agr. Biol. Chem.* 30(9):931-934.

7. Toyao, T. 1984. Varietal differevce and breeding behavior of fermentation alrility (polyphenol oxidase actirity) in tea plants. *J. A. R. O.*, 18(1):37-42.

THE PRILIMINARY STUDY OF TEA POLYPHENOL OXIDASE

Ying-Ling Chen¹

To add 20% saturation of ammonium sulfate and 0.1% S. D. S. in the homogenizing media was the best extractive method. The crude extract of polyphenol oxidase from tea leaves, the varieties of suitable semi-fermented tea manufacture is at least 1.5 times activity lower than that of black tea. This large variety may be used to identify how the best kind of tea was made.

This enzyme by Sephacryl S-200 gel filtration employing 0.05M pH 7.0 phosphate buffer as an eluant, the molecular weight of about 150,000 was found. There are some changes of polyphenol oxidase activity during the maturation of tea leaves. The results of Sephacryl S-200 gel filtration have shown that there are at least two isozyme peaks. It was found that the more mature the tea bud, the smaller the activity of isozyme peak. According to the difference in manufacture, it is necessary to choose suitable mature tea buds that have abundant enzyme activity to promote tea fermentation.

Key words: polyphenol oxidase, isozyme, molecular weight.

1. Assistant Chemist, Department of Tea Manufacture, Taiwan Tea Experiment Station, Yangmei, Taoyuan Hsien, Taiwan, 326, R. O. C.