茶葉ポリフェノールオキシダーゼ活性の変異 (第2報) *

酵素活性とクロロホルムテストおよび紅茶品質との関係

農林省茶業試験場 太田勇夫・鳥屋尾忠之・中田典夫・和田光正

Variation of the Polyphenol Oxidase Activity in Tea Leaves (Part 2)

The Relations Among the Enzyme Activity, the Chloroform Test, and the Qualities of Black Tea

By Isao ÔTA, Tadayuki TOYAO, Norio NAKATA, and Kosei WADA

1 ま え が き

前報¹⁾において、茶葉ポリフェノールオキシダーゼ活性の各種要因における変異について報告し、一部紅茶²⁾の品質との関係についても付言した。また、著者の一人は、いわゆる、クロロホルムテスト³⁾と紅茶品質との関係について報告し、紅茶品質はクロロホルムテストの評点と密接な関係があることを指摘した。クロロホルムテストは、茶葉細胞の原形質膜がクロロホルム処理によって変質して、透過性を増し、主としてカテキンとポリフェノールオキシダーゼが接触して引き起こされる酸化反応によって、茶葉の葉色⁴⁾が変化する現象を利用したものと考えられるが、それぞれの関係についての詳細な研究は少ない。本報ではこの酵素活性とクロロホルムテストの関係を中心として、紅茶用品種・系統の酵素活性およびタンニンと紅茶品質との関係についても調べ、茶樹の酵素活性の強弱をクロロホルムテストによって判定することの可否と、紅茶原料の良否選択のための資料を得る目的で実験を行なったので報告する。

2 実 験 方 法

2.1 供 試 材 料

農林省茶業試験場枕崎支場における紅茶の系統比較試験第13群、第14群の品種・系統、24点につき1967年二番茶期に摘採したものを試料とした。

2.2 酵素活性の測定

酵素材料の調製は茶芽第二葉を用い、前報¹⁾に従ってアセトンパウダーとした。酵素活性の測定条件は、反応温度を30°Cとしたほかは前報と同様で、ワールブルグ検圧法によって行なった。

2.3 タンニンの定量

茶芽第二葉を蒸熱乾燥し、酒石酸鉄比色法で定量した⁴⁾。

2.4 クロロホルムテスト

密閉したガラス容器内にクロロホルムで湿した口紙を敷き、クロロホルム蒸気を飽和させ、この中に針金のわくを置き、これに摘芽を懸垂させた。1.5時間および4時間放置後、それぞれ10芽ずつ取り出し、その第二葉の表と裏について、東京電色測色色差計 TC-5 D 型で白板を標準として、L, aL, bL の値を測定した。

2.5 品質の審査

茶樹第1研究室で系統比較試験として小型製茶機で造った紅茶を5点法で2回審査し、その合計値を審査評点とした。

3 実験結果と考察

3.1 酵素活性の系統間差異

系統比較試験第13群、第14群の供試材料について1967年5月31日から6月19日の間の摘採適期における茶芽の第二葉のポリフェノールオキシダーゼ活性を測定し、あわせてタンニンも定量した。その結果を表1に示す。

酵素活性の変異をN当たりの活性でみると、ANA 885の82からべにほまれ (第14群) の309と前報の同茶期に比べてその範囲が広がった。これは選抜過程の茶樹であることにもよるが、その変異を変動係数で一般化学成分と比較してみると、N当たりの活性で30.5%となり、タンニンの7.9%、さらに、全窒素の場合の6.9~8.5%と比べても大きく、茶葉内のポリフェノールオキシダーゼの活性の品種・系統間差異がきわめて大きいことを示している。なお、表中*印のものは、紅茶用品種はつもみじを片親にもった系統であるが、はつもみじを含めて、いずれも酵素活性が低い水準にあることは興味ある

* 茶業技術研究 No. 38, 19~25 (1969) より転載

表 1 品種・系統の酵素活性およびタンニン含量

品 種・系 統 名	摘 採 月 日	酵 素 活 性			タ ン ニ ン %
		アセトンパウダー	生 葉	N	
AN 724	5. 31	96	163	176	26.4
CAAN 1121	5. 31	109	188	194	20.4
Ak 1510	6. 2	114	198	216	27.3
Ak 1875	6. 2	116	198	234	25.3
ANAN 1024*	6. 6	72	130	170	24.3
G ₁ NA 629	6. 6	111	196	208	21.4
Cd 71	6. 6	108	201	213	21.1
はつもみじ (13)	6. 7	56	94	104	25.6
AN 1155	6. 7	94	161	184	22.9
Cd 37	6. 7	105	174	222	25.7
べにほまれ (14)	6. 8	135	227	309	25.3
NAAN 1038	6. 8	103	171	217	26.7
G ₁ AN 619*	6. 9	70	104	135	27.2
AAN 885*	6. 9	47	73	82	28.5
べにほまれ (13)	6. 9	132	212	279	25.9
はつもみじ (14)	6. 13	53	85	95	26.1
G ₁ Ai 211	6. 13	73	126	153	23.9
ANAN 882*	6. 13	73	124	147	25.3
ANAN 999*	6. 14	80	139	180	24.7
Ak 794	6. 14	55	89	101	25.4
G ₁ Ak 399	6. 14	114	191	210	23.5
G ₁ Ak 323	6. 16	116	192	241	25.6
ANC 1141	6. 19	117	197	222	24.2
ANC 1144	6. 19	121	204	234	25.7
平 均 値		94.6	159.8	188.5	24.93
変 動 係 数		27.9%	28.9%	30.5%	7.92%

注：酵素活性……アセトンパウダー：O₂μl/15 min アセトンパウダー 10 mg

生 葉： " 生葉（水分75%換算）100 mg

N : " N 1 mg

* ……はつもみじの次代

点である。

3. 2 酵素活性とクロロホルムテスト

3. 1 と同時に摘採した茶葉についてクロロホルムテストを行ない、その葉色を測定した。その結果は表 2 のとおりである。

つぎにこの測定値と酵素活性・タンニンとの間の相関

関係を調べた結果を表 3 に示す。

この表で明らかとなっており、酵素活性と葉色の各測定値とは、正・負の差はあるが、いずれも高い相関関係が認められた。とくに生葉当たりの活性と茶葉裏面の 1.5 時間の aL の値との間に最も高い相関係数が得られた。この関係を図 1 に示す。

表 2 色差計による葉色の測定値

品種・系統名	葉						色					
	表			面			裏			面		
	1.5 時 間			4 時 間			1.5 時 間			4 時 間		
	L	aL	bL	L	aL	bL	L	aL	bL	L	aL	bL
AN 724	36.81	-1.03	14.50	38.85	2.96	12.90	39.66	4.05	17.44	36.75	6.22	15.69
CAAN 1121	33.82	0.75	10.62	33.10	2.78	10.56	36.02	5.92	12.70	35.70	6.03	12.90
Ak 1510	35.87	2.59	13.75	34.20	6.22	12.32	38.83	4.76	16.49	37.40	6.99	15.46
Ak 1875	35.21	4.62	12.96	32.78	7.82	10.74	34.30	9.26	13.30	33.21	11.39	13.04
ANAN 1024	42.65	-5.41	18.46	38.41	2.93	15.83	45.38	-1.74	19.38	42.59	2.50	18.67
G ₁ NA 629	31.60	1.70	9.34	31.65	3.48	9.57	33.62	8.46	12.13	34.23	7.61	12.53
Cd 71	33.60	1.90	10.42	32.75	3.53	10.21	37.03	7.62	14.14	35.59	6.83	14.52
はつもみじ (13)	43.68	-8.78	19.32	40.27	-1.46	17.39	48.34	-7.42	20.67	45.87	-2.22	19.92
AN 1155	37.92	-0.71	14.93	35.42	3.41	13.54	44.01	-2.48	18.68	41.22	2.21	17.99
Cd 37	35.69	2.66	13.28	33.49	5.26	11.63	42.71	3.96	19.25	39.72	7.18	17.09
べにほまれ (14)	31.02	3.14	8.65	31.11	4.47	8.76	33.33	8.73	13.01	33.33	8.76	12.64
NAAN 1038	34.81	3.62	12.63	32.70	5.33	10.81	40.97	5.21	18.16	37.32	9.64	14.95
G ₁ AN 619	36.81	-0.21	13.51	34.26	4.67	12.53	40.51	-0.72	16.55	38.71	3.07	16.36
AAN 885	40.85	-7.99	15.62	39.06	-4.23	15.03	43.99	-8.24	19.41	41.04	-3.92	17.66
べにほまれ (13)	31.19	5.29	7.09	30.49	5.94	8.35	33.54	8.82	11.86	32.72	9.38	11.02
はつもみじ (14)	45.77	-10.51	21.30	43.48	-5.17	20.17	50.81	-9.71	22.10	49.27	-5.36	21.88
G ₁ Ai 211	36.17	-2.56	12.91	34.30	1.08	12.30	43.11	-2.19	17.61	40.00	0.85	16.23
ANAN 882	39.33	-0.71	16.21	34.42	3.51	14.14	43.00	-0.08	19.00	40.32	5.31	17.77
ANAN 999	38.64	3.52	17.22	34.86	8.50	13.79	45.56	2.20	20.75	41.08	7.41	17.98
Ak 794	40.12	-3.06	17.31	37.93	0.90	15.76	46.07	-4.64	19.58	43.62	-0.05	18.98
G ₁ Ak 399	31.50	2.92	8.85	30.87	3.10	8.60	37.11	5.85	14.67	35.68	6.66	13.61
G ₁ AK 323	32.79	-0.12	10.39	31.75	2.00	9.59	36.46	1.99	13.67	35.35	4.47	13.09
ANC 1141	34.19	2.04	11.26	33.89	5.40	11.51	34.44	6.57	13.22	33.22	6.32	10.89
ANC 1144	34.72	3.64	11.99	33.20	4.80	10.41	35.83	5.43	14.24	34.70	7.15	13.15

注：茶芽第二葉10枚の平均値

表 3 酵素活性・タンニンと葉色との相関係数

葉 色		表			面			裏			面		
		1.5 時 間			4 時 間			1.5 時 間			4 時 間		
		L	aL	bL	L	aL	bL	L	aL	bL	L	aL	bL
酵 素 活 性	ア セ ト ン	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
	ウ デ	-0.892	0.843	-0.845	-0.818	0.666	-0.878	-0.886	0.920	-0.833	-0.883	0.849	-0.875
	生 葉	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
酵 素 活 性	N	-0.864	0.830	-0.820	-0.837	0.668	-0.860	-0.871	0.928	-0.821	-0.868	0.851	-0.852
		**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
タ ニ ン		-0.835	0.833	-0.729	-0.816	0.702	-0.909	-0.816	0.815	-0.752	-0.828	0.853	-0.807
タ ニ ン		0.334	-0.080	-0.327	0.300	-0.140	-0.300	0.285	-0.351	0.395	0.234	-0.219	0.279

注：**……有意水準1%

図 1 酵素活性と葉色との関係

この回帰直線に関する検定の結果はつぎのとおりであった。

回帰直線の検定 (F) 136.6***

回帰直線式 $y = 143.7 + 7.53x$

回帰直線の信頼限界

$(143.7 + 7.53x) \pm 2.07 \sqrt{12.88 + 0.415(x - 2.151)^2}$

相関係数 0.928

このように酵素活性とクロロホルムテストによる葉色の測定値とは密接な関係があること、および基質となるタンニンの影響も考えられるにもかかわらず、この試験の結果からはタンニンと葉色との間には相関関係が認められなかったことなどから、クロロホルムテストによる葉色の変化が、もっぱら、茶葉のポリフェノールオキシダーゼの作用の強弱によって引き起こされていることが推察された。

それ故、クロロホルムテストは紅茶品質の簡易検定に役立つばかりでなく、茶葉ポリフェノールオキシダーゼ活性の検定にも有効であると考えられる。しかし、クロロホルムテストの葉色の測定値は表4、5のように比較的変動が大きい。この原因は茶葉の測定位置によるずれ

もあり、また、鳥井⁵⁾の報告にあるように、一般分析でも葉位別に分けた場合の分析値の変動が、摘芽全体の分析値の変動よりも大きいということとも考え合わせれば、酵素活性が個々の葉によって差があると考えるのが妥当であろう。

したがって、酵素活性の測定、クロロホルムテストともに摘芽について行なうことが望ましい。しかし、クロロホルムテストの葉色の測定は摘芽として表現することが困難で、茶葉1枚ずつしか測定できないので、試料の平均的な値として表わすためには、表5の結果から、葉数を $nl(v) = 1$ 、位置を n_p とすれば、

$$n_p = \sqrt{\frac{S_p^2}{S^2 I(v)}} = \sqrt{\frac{0.70}{2.29}} = \sqrt{0.306} = 0.554$$

すなわち、 $\frac{n_p}{nl(v)} = \frac{1}{2}$ となり、葉数と葉内測定箇所の比率を2:1の割合で測定するのが適当である。このような方法をとれば、ポリフェノールオキシダーゼ活性に基因する発酵性の判定の精度をより高めることができると考えられる。

表 4 測定位置による aL 値の差

品種 位置 葉No.	は つ も み じ			べ に か お り			べ に ほ ま れ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	-9.5	-11.9	-7.3	1.6	0.0	0.5	3.2	3.0	6.0
2	-4.8	-13.3	-8.9	1.8	-0.2	0.0	1.8	1.5	4.0
3	-9.1	-13.8	-7.4	4.7	1.3	3.6	4.0	6.2	5.9
4	-8.4	-8.9	-9.5	-0.6	0.7	5.3	3.7	0.6	6.1
5	-5.5	-9.3	-10.1	0.0	0.0	-3.0	3.7	1.6	4.4
6	-7.2	-7.2	-2.9	2.0	1.0	-0.2	2.7	3.4	3.1
7	0.0	-3.9	-4.7	1.6	0.0	1.2	1.2	0.0	1.4
8	-6.0	-8.2	-6.1	-0.2	-0.1	0.0	3.9	4.1	3.7
9	-6.4	-2.7	-7.3	-0.8	-1.7	-0.3	3.5	1.6	6.0
10	-6.4	-9.9	-6.4	0.0	0.0	0.0	6.0	2.7	2.1
11	-1.0	-1.9	0.0	1.2	1.2	0.7	2.7	2.3	2.3
12	-8.3	-12.5	-9.5	2.4	0.0	-1.3	2.3	1.4	1.4
13	-3.3	-7.6	-5.4	-0.4	0.0	-0.5	5.1	4.4	6.2
14	-7.0	-13.7	-8.3	0.3	2.5	3.2	3.2	4.5	4.8
15	-0.9	-6.3	-3.4	-0.8	0.3	0.0	2.3	2.3	3.2
16	-1.0	-4.7	-5.3	0.0	-0.7	-1.5	4.3	0.7	5.9
17	-4.5	-6.7	-6.9	0.0	0.9	2.0	4.2	2.6	8.2
18	-4.1	-9.1	-6.2	0.0	1.3	1.7	0.9	0.9	6.1
19	-1.4	-11.2	-6.7	0.1	-0.7	-0.7	2.8	1.1	0.4
20	-5.5	-9.8	-5.3	0.8	0.8	0.8	4.6	6.7	4.7
平均 値	-4.995	-8.63	-6.38	0.69	0.33	0.58	3.31	2.58	4.30
標準 偏差	±2.93	3.56	2.45	1.35	0.91	1.89	1.27	1.84	2.06

注：測定位置

表 5 分 散 分 析

要 因	自由度	平 方 和	平均平方	F	分散の期待値	推 定 値
全 体	179	4203.670				
品 種 (V)	2	3225.036	1612.518	172.92**	$\sigma^2 + 3\sigma^2 l_{(v)} + 60\sigma^2_v$	$S^2_v = 26.72$
葉 (L _(v))	57	531.530	9.325	3.77**	$\sigma^2 + 3\sigma^2 l_{(v)}$	$S^2_{l(v)} = 2.29$
位 置 (P)	2	89.356	44.678	18.09**	$\sigma^2 + 60\sigma^2_p$	$S^2_p = 0.70$
品種×位置(V×P)	4	76.238	19.059	7.71**	$\sigma^2 + 20\sigma^2_{vp}$	$S^2_{vp} = 0.829$
誤 差	114	281.510	2.469		σ^2	$S^2 = 2.47$

茶 業 研 究 報 告

表 6 紅 茶 の 審 査 評 点

品 種 ・ 系 統 名	審 査 評 点				
	香 気	水 色	滋 味	殻 色	合 計 点
AN 724	6.5	6.0	5.5	7.0	25.0
CAAN 1121	6.5	7.5	7.0	7.0	28.0
Ak 1510	9.0	6.0	8.0	5.5	28.5
Ak 1875	8.0	5.5	6.5	6.0	26.5
ANAN 1024	6.0	3.5	3.5	6.5	19.5
G ₁ NA 629	9.0	7.5	8.0	8.0	32.5
Cd 71	4.0	4.0	3.5	5.5	17.0
はつもみじ (13)	6.0	4.5	4.5	5.5	20.5
AN 1155	6.0	6.0	6.0	5.5	23.5
Cd 37	6.0	5.0	6.5	5.0	22.5
べにほまれ (14)	9.5	9.0	9.0	8.5	36.0
NAAN 1038	6.0	8.5	8.0	9.0	31.5
G ₁ AN 619	7.0	5.5	7.0	7.0	26.5
AAN 885	7.0	4.0	4.5	3.5	19.0
べにほまれ (13)	9.0	9.5	8.0	9.5	36.0
はつもみじ (14)	5.5	5.0	5.0	6.0	21.5
G ₁ Ai 211	6.5	6.0	6.0	5.5	24.0
ANAN 882	6.5	7.5	7.0	7.0	28.0
ANAN 999	5.5	5.0	5.5	6.5	22.5
Ak 794	6.0	2.5	3.0	3.5	15.0
G ₁ Ak 399	7.0	6.5	7.5	5.0	26.0
G ₁ Ak 323	9.5	7.0	8.5	5.0	30.0
ANC 1141	10.0	9.5	10.0	9.5	39.0
ANC 1144	10.0	9.5	10.0	8.0	37.5

表 7 酵素活性・タンニンと審査評点との相関係数

葉 色		審 査 評 点				
		香 気	水 色	滋 味	殻 色	合 計 点
酵 素 活 性	アセトンパウダー	0.604**	0.755**	0.728**	0.645**	0.728**
	生 葉	0.546**	0.700**	0.668**	0.517**	0.673**
	N	0.566**	0.719**	0.679**	0.566**	0.699**
タ ニ ン		0.181	-0.191	0.047	-0.099	0.014

注：** 有意水準 1%

3.3 酵素活性と品質との関係

酵素活性の測定およびクロロホルムテストと同時に製造した紅茶の品質の審査評点は表6のとおりである。また、審査評点と酵素活性・タンニンとの相関係数を求めると表7のようになった。

表で明らかのように、酵素活性と茶の品質とはどの審査項目においても有意な相関関係を示すが、タンニンと

茶の品質との関係はきわめて低かった。そこで前報と同様に⁶⁾径路係数分析によって、茶の品質に対するタンニンと酵素活性の効果について検討したところ(表8)、この試験においても前報と同様¹⁾、茶の品質に対する酵素活性の役割りがタンニンのそれを大きく上回っていることが認められた。

表 8 紅茶品質と酵素活性・タンニン含量との経路係数分析

区 分	香 気		水 色		滋 味		殻 色		合 計 点	
	酵素活性	タンニン	酵素活性	タンニン	酵素活性	タンニン	酵素活性	タンニン	酵素活性	タンニン
審査点との相関係数	0.604	0.181	0.755	-0.191	0.728	0.047	0.645	-0.099	0.728	0.014
直接的効果	0.712	0.382	0.762	0.025	0.806	0.275	0.671	0.091	0.796	0.239
間接的効果	-0.112	-0.201	-0.007	-0.216	-0.078	-0.228	-0.026	-0.190	-0.068	-0.225
残余の決定係数	0.501		0.429		0.399		0.576		0.418	

注：酵素活性はアセトンパウダー当たり

タンニンと茶の品質との関係を切り離して考えることはできないが、取り扱う材料や時期が異なってもクロロホルムテストの判定が茶の品質といつも有意な関係をもつ¹⁾のに対して、タンニンは有意な関係が認められる場合と認められない場合がある事実から、前報および本報の場合のように、タンニン含量の高い水準の材料においてはクロロホルムテスト(酵素活性)による茶の品質の判定がより有効であると考えられる。

4 要 約

紅茶用品種・系統のポリフェノールオキシダーゼ活性をワールブルグ検圧法によって測定したところ、その変動は一般化学成分の変動に比べて大きく、系統間で酵素活性の強さに大きな差があることが認められた。また、酵素活性とクロロホルムテストによる葉色の測定値との間には高い相関関係があることが認められ、クロロホルムテストは茶葉酵素活性の強弱の判定に有効であることがわかった。さらに、酵素活性は紅茶の品質を決定する大きな要因であることを確認した。

5 参 考 文 献

- 1) 太田勇夫, 中田典夫, 和田光正: 茶技研, No. 36, 57~63 (1968).
- 2) 勝尾 清, 鳥屋尾忠之, 家弓実行, 安間 舜, 松下 繁: 茶技研, No. 31, 1~5 (1965).
- 3) SANDERSON, G. W.: *Tea Quart.* 34 (4), 193~196 (1963).
- 4) 岩浅 潔, 鳥井秀一: 茶技研, No. 26, 87~91

(1962).

- 5) 鳥井秀一, 鳥山裕厚: 茶技研, No. 17, 30~35 (1957).

- 6) DEWEY, D. R. and K. H. LU: *Agronomy J.* 51, 515~518 (1959).

- 7) 勝尾 清, 鳥屋尾忠之: 育種学雑誌, 17, 別冊 2, 第32回講要, 67~68 (1967).

Summary

The variation of polyphenol oxidase activity and the tannin content in tea leaves were examined, relating to the chloroform test and the qualities of black tea.

The clonal variation of the enzyme activity was wider than that of the other chemical constituents in the tea leaves.

High correlations were observed among the enzyme activity, the colour of leaves, especially the aL value of the colour with the chloroform test, and the qualities of black tea.

As a result, it was suggested that the chloroform test was an effective method of judging the enzyme activity, and then it was also confirmed that the enzyme activity was one of the important factors deciding the qualities of black tea.

(Jan., 9, 1969)