

## 普洱茶及其原料多糖分子组成及光谱学特性研究

龚加顺<sup>1</sup>, 胡小静<sup>1</sup>, 彭春秀<sup>2</sup>, 周红杰<sup>3</sup>

1. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南 昆明 650201
2. 云南农业大学园林园艺学院, 云南 昆明 650201
3. 云南农业大学普洱茶学院, 云南 昆明 650201

**摘要** 研究了普洱茶发酵过程中多糖分子组成及光谱学特性的变化规律。结果显示, 普洱茶及其原料多糖主要组分 TPS1 和 TPS2 的分子组成及光谱学特性差异显著。TPS2 含有较高糖醛酸, 而 TPS1 含有较高的中性糖和蛋白质。TPS1 和 TPS2 均由半乳糖(Gal)、阿拉伯糖(Arb)、甘露糖(Man)、葡萄糖(Glu)、木糖(Xyl)、鼠李糖(Rha)六种单糖组成, 其分子摩尔比分别为 23.6 : 5.9 : 24.2 : 1.1 : 1.8 : 3.2 和 26.9 : 3.2 : 19.3 : 5.5 : 1.3 : 2.7。TPS2 和 TPS1 的重均分子量分别为  $1.68 \times 10^4$  和  $1.21 \times 10^4$  道尔顿。TPS1 和 TPS2 水溶液在 200~400 nm 之间无特征吸收峰。红外光谱图显示, TPS1 和 TPS2 的信息基本相同, 都是含有吡喃环的多糖。在三维 AFM 图中, TPS1 形成的聚集体高度约为 4 nm, 长宽约为 0.2~0.4  $\mu\text{m}$ , TPS2 形成的聚集体高度约为 40 nm, 长宽约为 0.5~0.8  $\mu\text{m}$ 。SEM 图片显示, TPS1 呈表面光滑的鳞片状聚集体, TPS2 呈表面粗糙的片状聚集体。引起普洱茶及其原料多糖分子组成及光谱学性质发生变化的动力主要为微生物作用和湿热作用。

**关键词** 普洱茶; 晒青绿茶; 多糖; 固态发酵; 光谱性质

**中图分类号:** S571.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)07-1960-05

## 引言

普洱茶是中国云南传统历史名茶, 产于中国云南西双版纳、思茅等地。普洱茶是以云南大叶种茶树鲜叶为原料, 经鲜叶→杀青→揉捻→太阳晒干→潮水→固态发酵→干燥→筛分→蒸揉→压制成型等特定的加工工艺制成, 具有色泽乌润或褐红, 滋味醇厚回甘, 并具有独特的陈香, 在中国、日本、韩国等国以及台湾、香港等地区深受人们喜爱<sup>[1]</sup>。研究证明, 普洱茶具有降血脂、减肥、抗突变、助消化等保健功效<sup>[2,3]</sup>。茶多糖是茶叶中重要的生物活性物质, 具有 Anti-diabetics, antioxidant, Anti-ulcer 等功能<sup>[4,5]</sup>。在普洱茶发酵过程中, 许多成分(如茶多酚)含量大幅度下降, 但水溶性茶多糖则大幅增加, 可达 3.79%, 增加近 5 倍<sup>[6]</sup>, 这说明普洱茶原料经真菌固态发酵后茶多糖发生了很大变化。但与原料多糖相比, 多糖分子组成及光谱学性质有何差异, 目前国内外鲜见报道。本文主要以云南大叶种晒青绿茶为原料, 研究其真菌(酵母菌为优势发酵菌)固态发酵过程对茶多糖分子组成及光谱特性的影响, 以期阐明普洱茶及其原料多糖的化学组

成、分子量、光谱学特性以及变化的原因, 为阐明普洱茶品质形成机理和品质调控提供一定的依据。

## 1 实验部分

### 1.1 材料及主要试剂

云南晒青绿茶(*Camelliasinensis var. assamica*(Masters) Kitamura)由中国云南西双版纳勐养国艳茶厂提供。发酵优势菌种: 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)购自湖北安琪酵母股份有限公司。DEAE-52 纤维素与 Sephadex G-150 购自北京 Solarbio 公司, 考马斯亮兰 G-250、牛血清白蛋白、半乳糖醛酸、葡聚糖(10000)、D-葡萄糖、D-甘露糖、L-鼠李糖、L-阿拉伯糖、D-木糖、D-半乳糖购自美国 Sigma 公司, 试剂均为分析纯。

### 1.2 主要仪器与设备

755B 紫外-可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司); 电子天平(沈阳龙腾电子有限公司, 感量为 0.0001 g); 红外光谱仪 FTS-40(美国伯乐公司); 气质联用仪(Agilent 6890GC/5973MS); 扫描电镜(Philips XL30ESEM-TMP); 原

收稿日期: 2009-10-09, 修订日期: 2010-01-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(30760152, 30960241)和国家科技支撑计划项目(2007BAD58B00)资助

作者简介: 龚加顺, 1971 年生, 云南农业大学食品科学技术学院教授 e-mail: gong199@163.com

子力显微镜(日本精工 SPA-400)和凝胶色谱(WATERS 515型)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 普洱茶的真菌固态发酵制备

预先将 400 g 酿酒高活性干酵母溶于去离子水中,再将水喷洒到 3 t 晒青绿茶原料(9%含水量,预先紫外照射 1 h 灭菌)上至其水分含量达 35%,控制堆高 1~1.5 m,置于干净的发室内发酵,初始环境温度 25 °C,初始空气相对湿度 55%。发酵茶堆内的温度维持在 40~60 °C 的范围。每间隔 10 d,翻一次堆,共发酵 40 d 后出堆(即得普洱茶)。

#### 1.3.2 粗茶多糖的提取流程

磨碎茶叶(60 目, 300.0 g)→加 70%乙醇水溶液(1:5,  $\rho$ ), 30 °C, 浸提 24 h(去部分色素)→过滤→茶渣→加入 80 °C 蒸馏水(1:30,  $\rho$ )浸提 1.5 h→过滤→滤液, 真空浓缩→加无水乙醇(1:4,  $\varphi$ )进行醇沉 12 h→离心(10 000 g, 10 min)→收集沉淀→蒸馏水溶解→重复醇沉 2 次→离心→真空干燥→粗茶多糖。

#### 1.3.3 茶多糖的分离纯化

取晒青绿茶粗多糖(1.00 g)溶解于 250 mL 蒸馏水中,加无水乙醇(1:4,  $\varphi$ )进行醇沉 12 h, 离心(10 000 g, 10 min)收集沉淀, 此沉淀溶于蒸馏水后采用 seavage 法除蛋白。除蛋白后的多糖溶液上 DEAE-52 纤维素柱, 用 NaCl 水溶液(0.05, 0.1, 0.2 mol·L<sup>-1</sup>)梯度冲洗, 流速 0.5 mL·min<sup>-1</sup>。收集 0.1 mol·L<sup>-1</sup>洗脱液进行无水乙醇(1:4,  $\varphi$ )醇沉 12 h, 离心收集沉淀, 冻干。取冻干粉溶于蒸馏水, 上 Sephadex G-150 柱, 用 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 洗脱, 收集含糖部分, 再用无水乙醇(1:4,  $\varphi$ )醇沉 12 h, 离心收集沉淀, 冻干(115 mg), 得到的纯化多糖命名为茶多糖 2(tea polysaccharide 2, TPS2)。

取普洱茶的粗多糖(1.00 g)溶解于 250 mL 蒸馏水中, 用氨水调节 pH 值至 8.0, 再加入 25 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(30%) 在 85 °C 保温 2 h 脱色。脱色液装入透析袋(MW 8000~14400, Beijing Xiasi Biotechnology Co., LTD)对流动蒸馏水透析 12 h, 然后将透析液再次加无水乙醇(1:4,  $\varphi$ )进行醇沉 12 h, 离心(10 000 g, 10 min)收集沉淀, 此沉淀溶于蒸馏水后采用 seavage 法除蛋白。除蛋白后的多糖溶液上 DEAE-52 纤维素柱, 用 NaCl 水溶液(0.05, 0.1, 0.2 mol·L<sup>-1</sup>)梯度冲洗, 流速 0.5 mL·min<sup>-1</sup>。收集 0.1 mol·L<sup>-1</sup>洗脱液进行无水乙醇(1:4,  $\varphi$ )醇沉 12 h, 离心收集沉淀, 冻干。取冻干粉溶于蒸馏水, 上 Sephadex G-150 柱, 用 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 洗脱, 收集含糖部分, 再用无水乙醇(1:4,  $\varphi$ )醇沉 12 h, 离心收集沉淀, 冻干(85 mg), 得到的纯化多糖命名为茶多糖 1(tea polysaccharide 1, TPS1)。

#### 1.3.4 茶多糖含量测定: 蒽酮-硫酸法<sup>[7]</sup>

葡聚糖(Dextran)为标准品, 分子量 10 000。绘制标准曲线得到茶多糖计算方程  $y=0.0077x-0.0048$ ,  $R^2=0.9981$ (其中  $x$  为葡聚糖浓度, 单位  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $y$  为吸光值)。

#### 1.3.5 蛋白质含量测定: 采用考马斯亮蓝染色法测定<sup>[8]</sup>

以牛血清白蛋白作标准蛋白, 绘制标准曲线, 得到蛋白质计算方程  $y=0.609x-0.001$ ,  $R^2=0.9960$ (其中  $x$  为牛血

清蛋白浓度, 单位  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $y$  为吸光值)。

#### 1.3.6 糖醛酸测定: 硫酸-咔唑法<sup>[9]</sup>

以半乳糖醛酸为标准品, 绘制标准曲线, 得到半乳糖醛酸计算方程  $y=0.0076x-0.0017$ ,  $R^2=0.9977$ (其中  $x$  为半乳糖醛酸浓度, 单位  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $y$  为吸光值)。

#### 1.3.7 分子量的测定<sup>[10]</sup>

采用凝胶色谱法(GPC)测定茶多糖的分子量。Ultra-hydrogel Linear Column 7.8 mm×300 mm 柱, 柱温为室温; 以 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 盐水溶液为流动相; 对照品溶液进样 50  $\mu\text{L}$ , 供试品溶液进样 10  $\mu\text{L}$ , 流速 0.08 mL·min<sup>-1</sup>, 以右旋糖酐(180~200 万)为标样进行测定, 结果用凝胶色谱软件处理。

#### 1.3.8 单糖组成分析<sup>[11]</sup>

采用 GC-MS 气质联用仪测定茶多糖的单糖组成。DB-5 柱(0.2 mm×35 m×0.25  $\mu\text{m}$ ); 载气为高纯氮气。流速 20 mL·min<sup>-1</sup>; 色谱进样口温度 280 °C; 柱程序升温: 初始温度 60 °C, 保持 2 min, 以 30 °C·min<sup>-1</sup> 升温到 120 °C, 保持 1 min, 再以 25 °C·min<sup>-1</sup> 升温到 250 °C, 保持 10 min。质谱采用 EI 离子源, 电子能量 70 eV。

#### 1.3.9 茶多糖的光谱学性质

##### (1) 紫外扫描

将 TPS1 和 TPS2 配制成 1.0 mg·mL<sup>-1</sup> 溶液, 于 200~400 nm 波长范围扫描。分析 TPS1 和 TPS2 紫外光谱特征。

##### (2) 红外光谱分析

TPS1 和 TPS2 经 KBr 压片, 于红外光谱仪上扫描分析, 扫描波数范围 400~4 000 cm<sup>-1</sup>, 分辨率 8 cm<sup>-1</sup>, 扫描次数 16。

##### (3) 原子力显微镜观察<sup>[12]</sup>

取干净的云母片, 用胶带纸将其表面剥离, 得到新鲜的云母表面, 然后吹净云母上由于剥离而可能产生的碎片, 备用。取少量样品用去离子水溶解于 EP 管中, 使其最终的浓度为  $1.0\times 10^{-2}$  mg·mL<sup>-1</sup>。用移液枪吸取 20  $\mu\text{L}$  样品稀释液迅速滴在新鲜云母表面, 待样品在空气中干燥后即可进行 AFM(atomic force microscopy)测量。采用日本精工原子力显微镜, 扫描范围为  $1.000\times 1.000$   $\mu\text{m}$ , 扫描频率为 1.00 Hz, 图像均在轻敲模式下获得, 接触作用力控制在 3~4 nN 量级以内。

##### (4) 茶多糖扫描电镜观察<sup>[13]</sup>

采用 Philips 公司的 XL30ESEM-TMP 型扫描电镜下观察、记载(工作电压 250 kV), 并选有代表性的视野分 2 000×, 5 000× 两种类型照相记录。

## 2 结果与讨论

### 2.1 普洱茶真菌固态发酵阶段样粗多糖中性糖含量及分子量变化

晒青绿茶的真菌固态发酵试验表明, 随发酵时间的延长, 水溶性茶多糖含量递增, 原料中多糖为(0.45±0.09)%, 发酵 20 d 后增至(0.80±0.12)%, 而普洱茶(发酵 40 d)样中达到了(1.68±0.23)%, 增幅极显著。从表 1 可知, 发酵 20

d后, 茶多糖重均分子量、数均分子量以及 Z 均分子量均较原料多糖显著减小, 发酵 20 与 40 d 的粗多糖分子量相比原料而言两者变化不显著, 但粗多糖中的中性糖含量随发酵时间延长而递增。

**Table 1** Contents of polysaccharide and its molecule weight in different raw polysaccharide extracts(RTPS)

样品	粗多糖 中性糖 /%	重均 分子量 /Mw	数均 分子量 /Mn	Z 均 分子量 /Mz	聚合度
RTPS-0 d	40.78±0.37	104 347	6 308	483 801	16.54
RTPS-20 d	43.20±0.27	40 970	5 024	184 428	8.16
RTPS-40 d	50.17±0.43	37 333	3 447	223 762	10.83

## 2.2 真菌固态发酵对普洱茶及其原料多糖分子特性的影响

为了明确普洱茶多糖与其原料多糖的化学组成、分子量、光谱学特征等方面是否也发生了变化。对得到的粗多糖进行了分离纯化和分子特性分析。在相同条件下得到了原料及普洱茶多糖主要组分 TPS2(晒青绿茶)和 TPS1(普洱茶)。纯度经琼脂糖凝胶电泳检验为均一条带, 详细方法见文献[14]。

### 2.2.1 TPS1 和 TPS2 中性糖、糖醛酸、蛋白质含量分析

采用蒽酮-硫酸法、考马斯亮蓝法和硫酸-吡唑法测定这两种多糖的糖基、糖醛酸、蛋白质含量。TPS1 的中性糖、糖醛酸和蛋白质含量分别为(73.77±1.31%), (20.08±0.32)%和(1.09±0.11)%; TPS2 的中性糖、糖醛酸和蛋白质含量分别为(65.88±1.25%), (27.41±0.55)%和(0.90±0.09)%。结果说明, TPS1 和 TPS2 均为含有蛋白质和糖醛酸残基的多糖, 其中, TPS1 含较高的中性糖和蛋白质, 而 TPS2 则含较多的糖醛酸。

### 2.2.2 TPS1 和 TPS2 的单糖组成分析

多糖是由很多个单糖通过糖苷键连接在一起的大分子物质, TPS1 和 TPS2 经水解、衍生化后通过 GC-MS 测定其单糖组成, 结果 TPS1 和 TPS2 的单糖组成种类相同, 都是由半乳糖(Gal)、阿拉伯糖(Arb)、甘露糖(Man)、葡萄糖(Glu)、木糖(Xyl)、鼠李糖(Rha)六种单糖组成, 其分子摩尔比分别为 23.6:5.9:24.2:1.1:1.8:3.2 和 26.9:3.2:19.3:5.5:1.3:2.7。GPC 法测定结果表明, TPS2 和 TPS1 的重均分子量分别为  $1.68 \times 10^4$  和  $1.21 \times 10^4$  Daltons。

### 2.2.3 TPS1 和 TPS2 的光谱学特性分析

#### (1) 紫外扫描

在 200~400 nm 波长下扫描两种茶多糖溶液, 结果表明 TPS1 和 TPS2 在 200~400 nm 之间并无特征吸收峰, 说明两种茶多糖含微量蛋白。

#### (2) 红外光谱分析

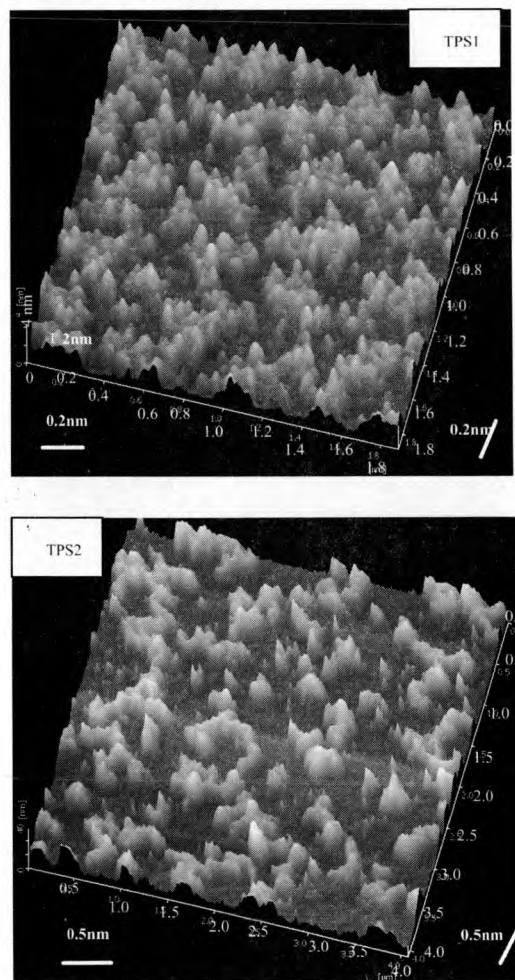
从 TPS1 和 TPS2 的红外光谱图看, 两种茶多糖的信息基本相同, 均在  $894 \text{ cm}^{-1}$  处有吸收峰, 据此推断为含有吡喃环的多糖, 但更确切的基团情况, 如有无分枝、连接方式、糖苷键类型等尚需进一步做其他相关的分析来确定。

#### (3) 原子力显微镜观察

TPS1 和 TPS2 的 AFM 图(图 1)中显示多糖分子大小不一, 呈现密集的岛屿状或棒状聚集物。TPS1 所形成的聚集体比 TPS2 形成的聚集体要密集而且小。TPS1 形成的聚集体高度约为 4 nm, 长宽约为 0.2~0.4  $\mu\text{m}$ , TPS2 形成的聚集体高度约为 40 nm, 长宽约为 0.5~0.8  $\mu\text{m}$ , 显示两种茶多糖存在不同程度的聚集。多糖分子聚集成岛屿状, 一方面可能与多糖分子间和分子内的氢键缔合作用有关, 另一方面由于多糖分子中含有大量的糖醛酸而带有负电荷, 云母片本身也带有负电荷, 在较高浓度下云母片与多糖的排斥力较大, 从而使多糖分子聚集紧密成团, 形成大小不一的无规则岛屿状。

#### (4) 扫描电镜观察

TPS1 和 TPS2 的 SEM 如图 2 所示。在高倍镜下, TPS2 呈现表面粗糙的片状聚集体, TPS1 则呈现表面光滑的鳞片状聚集体, 且聚集体规整性不强, 这说明 TPS1 和 TPS2 为无定形结构。通过两组图的比较, 说明 TPS1 比 TPS2 结合更紧密, 这可能与 TPS1 和 TPS2 的化学组成、来源不同有密切的关系, 晒青绿茶经真菌发酵和长时间的湿热作用后, 茶叶多糖发生了显著变化。



**Fig. 1** AFM image of TPS1 and TPS2

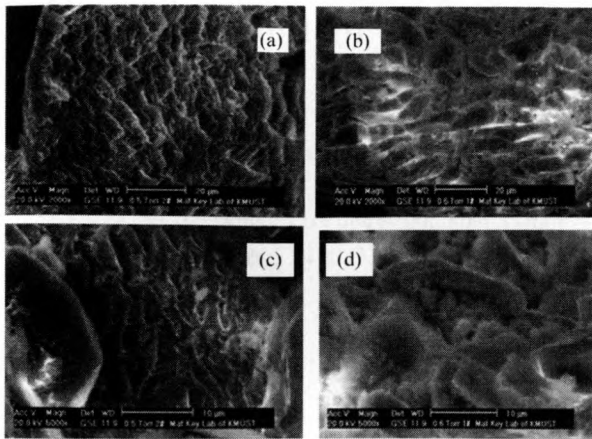


Fig. 2 Scanning electron microscope (SEM) image of TPS1 and TPS2

(a): TPS1( $\times 2000$ ); (b): TPS2( $\times 2000$ );  
(c): TPS1( $\times 5000$ ); (d): TPS2( $\times 5000$ )

#### 2.2.4 普洱茶及其原料多糖分子组成及光谱学特性变化原因探讨

晒青绿茶原料经酵母菌等微生物的固态发酵后水溶性多糖含量、分子量以及多糖主要组分分子组成、分子量、光谱学特性等均发生了显著变化,这些变化可能与发酵过程中酵母菌等的作用密切相关。发酵过程中微生物随发酵时间的变

化结果见表2。由表2分析可知,除原料(未接种酵母菌)外,在整个发酵过程中酵母菌总数远远高于其他真菌类,表现为酵母菌>米曲霉>灰绿曲霉>根霉>黑曲霉。这些微生物的大量滋生也增强了多糖变化的相关酶活。在发酵40 d的普洱茶样中,果胶酶活性( $2.8 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ )和糖化酶活性( $17.56 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ )约为发酵20 d的6.5倍和4.54倍。淀粉酶活性以发酵30 d最强,达 $239.19 \text{ u} \cdot \text{g}^{-1}$ 。不同发酵阶段样中纤维素酶活性总体呈上升趋势。这些水解酶可将不溶性茶叶多糖、天然纤维、半纤维和果胶质等转化为水溶性多糖。

Table 2 Variation of fungi during solid state fermentation of pu-erh tea (Unit:  $\times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ )

样品	酵母菌	米曲霉	灰绿曲霉	黑曲霉	根霉
SSF(0 d)	0.89	0.45	0.30	3.30	0.16
SSF(10 d)	4 622.8	527.4	40.69	2.04	22.36
SSF(20 d)	3 133.33	10.27	8.25	22.67	22.67
SSF(30 d)	3 310.56	413.27	41.29	20.67	ND
SSF(40 d)	58.96	ND	ND	2.92	ND
总数	11 125.6	950.24	90.23	48.3	45.03

同时,长达40 d的湿热作用(35%的茶叶含水量和 $40 \sim 60 \text{ }^\circ\text{C}$ 的发酵温度)也加速了茶叶多糖的转化。由此推测,微生物作用和湿热作用是引起普洱茶及其原料多糖分子组成及光谱学性质发生变化的重要动力。

#### 参 考 文 献

- [1] ZHOU Hong-jie, GONG Jia-shun, WANG Xing-yin, et al(周红杰, 龚加顺, 王星银, 等). Yunnan Pu-erh Tea(云南普洱茶). Kunming: Yunnan Science and Technoloy Press(昆明: 云南科技出版社), 2004. 50.
- [2] Duh P D, Yen G C, Yen W J, et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52: 8169.
- [3] Wu She-Ching, Yen Gow-Chin, Wang Bor-Sen, et al. LWT -Food Science and Technology, 2007, 40: 506.
- [4] Thales R, Caroline G, Lauro ML. American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy, 2006, 69(7): 1018.
- [5] CHEN Xiao-qiang, YE Yang, CHENG Hao, et al(陈小强, 叶阳, 成浩, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2009, 29(4): 1083.
- [6] GONG Jia-shun, ZHOU Hong-jie, ZHANG Xin-fu, et al(龚加顺, 周红杰, 张新富, 等). Journal of Tea Science(茶叶科学), 2005, 25(4): 300.
- [7] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Analytical Chemistry, 1956, 28: 350.
- [8] LI Jian-wu(李建武). Experimental Principle and Method of Biochemistry(生物化学实验原理和方法). Beijing: Peking University Press(北京: 北京大学出版社), 2001. 181.
- [9] Dische Z. Journal of Biological Chem., 1997, 272: 189.
- [10] Rong L, Takashi Y. Carbohydrate Polymers, 2003, 54: 419.
- [11] ZHOU Peng, SHEN Jin-can, XIE Ming-yong(周鹏, 沈金灿, 谢明勇). Journal of Xiamen University(Natural Science)(厦门大学学报·自然科学版), 2003, 42(2): 213.
- [12] Kumar S, Chaudhury K, Sen P, et al. J. Nanobiotechnology, 2005, 27: 3.
- [13] QU Ping, CHEN Guan-hua, WU Guo-jiang, et al(屈平, 陈冠华, 吴国江, 等). Journal of Chinese Electron Microscopy Society(电子显微学报), 2006, 25: 175.
- [14] NI De-jiang, CHEN Yu-qiong, XIE Bi-jun, et al(倪德江, 陈玉琼, 谢笔钧, 等). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报), 2004, 25(12): 2263.

## The Molecular Composition and Spectral Properties of Polysaccharide Isolated from Pu-Erh Tea and Its Material

GONG Jia-shun<sup>1</sup>, HU Xiao-jing<sup>1</sup>, PENG Chun-xiu<sup>2</sup>, ZHOU Hong-jie<sup>3</sup>

1. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

2. College of Horticulture and Landscape, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

3. College of Pu-erh Tea, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

**Abstract** Pu-erh tea, a kind of well-known tea from the ancient time, is originally produced in the Yunnan Lanchan River basin through a special solid state fermentation by fungi. It uses sun-dried green tea as its starting materials. To investigate the variation of composition and spectral properties of polysaccharide during solid state fermentation of pu-erh tea by using *Saccharomyces cerevisiae* as preponderant starter and using sun-dried green tea as materials in the present study. The results showed that the content of water soluble polysaccharide was increased, and the activity of hydrolase such as cellulase, pectinase and glucomylase were also enhanced. The content of neutral sugar increased with the ferment time increasing and the  $M_w$  of raw polysaccharide showed significant difference during fermentation. The main polysaccharide TPS2 and TPS1 were isolated and purified from pu-erh tea and its materials by DEAE-52 and Sephadex G-150 column chromatography. TPS2 contains the higher content of uronic acid, but TPS1 contains the higher contents of neutral sugar and protein. Monosaccharide analysis by GC-MS revealed that TPS1 and TPS2 were composed of arabinose, galactose, glucose, rhamnose, xylose and mannose with molar ratios of 24.2 : 23.6 : 5.9 : 3.2 : 1.8 : 1.1 and 19.3 : 26.9 : 3.2 : 2.7 : 1.3 : 5.5, respectively. The average molecular weight of TPS1 and TPS2 was  $1.68 \times 10^4$  and  $1.21 \times 10^4$  Daltons, respectively. UV scanning spectrum showed that TPS1 and TPS2 had no characteristic absorption between 200 and 400 nm wavelength, it suggested that they contain trace protein. IR spectrum of TPS1 and TPS2 demonstrated that pyranoid rings were contained in them. As shown in the image of atomic force microscope, the molecular appearance of TPS1 and TPS2 resembled islands and apparently consisted of conglomerations. The height of conglomerations of TPS2 was about 40nm and the length or width was 0.5-0.8  $\mu\text{m}$ , while the height of conglomerations of TPS1 was about 4nm and the length or width was 0.2-0.4  $\mu\text{m}$ . TPS2 shows sheet conglomerations with rough surface, but TPS1 shows squama conglomerations with smooth surface in the image of scanning electron micrograph. The experimental data suggested that the variation of composition and spectral properties of polysaccharide isolated from pu-erh tea and its materials owed to the action of microorganism and humid and thermal action for long time process.

**Keywords** Pu-erh tea; Sun-dried green tea; Polysaccharide; Solid state fermentation; Spectral properties

(Received Oct. 9, 2009; accepted Jan. 12, 2010)