

Khảo sát sự biến động của hệ vi sinh vật trong quá trình sản xuất trà Oolong

- Phạm Ngọc Xuân^a
- Huỳnh Ngọc Oanh^a
- Phan Phước Hiền^b

^a Trường Đại học Bách Khoa, ĐHQG-HCM

^b Trường Đại học Nông Lâm, ĐHQG-HCM

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là khảo sát vai trò của vi sinh vật trong công nghệ sản xuất trà Oolong với 2 nguyên liệu chính là trà Kim Tuyên và trà Thúy Ngọc thông qua sự biến động vi sinh vật tổng số và định danh một số chủng vi sinh đại diện xuất hiện trên lá trà trong quá trình sản xuất. Kết quả phân lập và làm thuần trên các môi trường đặc hiệu cho thấy, có sự xuất hiện của vi khuẩn, nấm men và nấm mốc trong tất cả 9 giai đoạn chế biến trà Oolong. Mật độ vi sinh vật tổng số xuất hiện trong các giai đoạn chế biến trà biến động tuân theo một

quy luật nhất định. Mật độ vi khuẩn hiếu khí đạt cực đại khoảng 1.1×10^6 CFU/g ở giai đoạn 6 (mẫu trà sau quay thơm 2) đối với trà Oolong Kim Tuyên và 6.3×10^5 CFU/g ở giai đoạn 7 (mẫu trà sau ủ 3) đối với trà Oolong Thúy Ngọc. Kết quả khảo sát sự biến động mật độ vi nấm trên môi trường PDA: mật độ nấm mốc rất thấp, mật độ nấm men vào khoảng 10^5 CFU/g. Kết quả định danh cho thấy hai chủng vi sinh vật đại diện là *Meyerozyma guilliermondii* và *Chryseobacterium taeanense*.

Từ khóa: trà Oolong, sự biến động hệ vi sinh vật, *Meyerozyma guilliermondii*, *Chryseobacterium taeanense*, PDA.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong quy trình công nghệ sản xuất một số loại trà, nhất là các loại trà phải trải qua quá trình lên men. Về bản chất của quá trình lên men lá trà, về sự chuyển hóa các hợp chất polyphenol, hiện nay các nhà khoa học đã thừa nhận vai trò quan trọng của hệ enzyme tồn tại trong lá trà mà chủ yếu là hoạt động của hệ enzyme polyphenol oxidase (PPO). Như vậy vi sinh vật không giữ vai trò chính, song căn cứ

vào thực tế sản xuất một số loại trà và qua thực nghiệm cho thấy vi sinh vật có liên quan tới việc tạo hương vị đặc biệt đối với một số loại trà truyền thống đặc sản [4, 8, 11].

Trà Oolong là loại trà lên men bán phần. Công nghệ lên men trà Oolong đã có từ rất lâu, sự biến đổi các thành phần hóa học tạo nên hương vị và màu sắc độc đáo của trà được xác nhận là do hệ enzyme nội tại có sẵn trong lá trà [6]. Một trong các yếu tố ảnh hưởng đến quá

trình lên men nhưng chưa được hiểu biết rõ ràng là hệ vi sinh vật tự nhiên tồn tại trên lá trà. Vì vậy cần thiết có một cuộc khảo sát để làm rõ vấn đề này. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát sự biến động của hệ vi sinh vật tồn tại trên lá, đồng thời phân lập và định danh một số chủng vi sinh vật đại diện, bước đầu đánh giá sự hiện diện của hệ vi sinh vật tự nhiên trong quá trình sản xuất trà Oolong.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu và hóa chất

Lá trà (1 tôm, 2 lá) – Thuộc giống trà Kim Tuyên và giống trà Thúy Ngọc được trồng tại Nhà máy trà của Công Ty Cổ Phần Chế Biến Hàng Xuất Khẩu Cầu Tre, Bảo Lâm, Lâm Đồng.

Môi trường PDA, Pepton, cao nấm men, hóa chất nhuộm gram: Merk

2.2. Phương pháp

2.2.1- Phương pháp lấy mẫu

Quy trình chế biến trà Oolong được thực hiện tại Nhà máy Trà Cầu Tre. Lá trà tươi trải qua lần lượt các công đoạn chính sau: làm héo → ủ lần 1 → quay thơm lần 1 → ủ lần 2 → quay thơm lần 2 → ủ lần 3 → xào bắt hoạt enzyme → thành phẩm (quy trình chế biến được cung cấp bởi Công Ty Cổ Phần Chế Biến Hàng Xuất Khẩu Cầu Tre). Các mẫu trà sau từng giai đoạn chế biến được thu thập tại nhà máy, bảo quản và tiến hành phân tích trong vòng 24 giờ. Thời gian

lấy mẫu từ tháng 7 – 11/2013. Các mẫu được lấy theo tiêu chuẩn QCVN 01-28:2010/BNNPTNT [2].

2.2.2. Khảo sát sự biến động vi sinh vật tổng số

Phương pháp khảo sát sự biến động tổng số vi sinh vật qua các giai đoạn chính trong công nghệ sản xuất trà Oolong được thực hiện theo tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 4884:2005 [1].

2.2.3. Phương pháp phân lập và làm thuần vi sinh vật

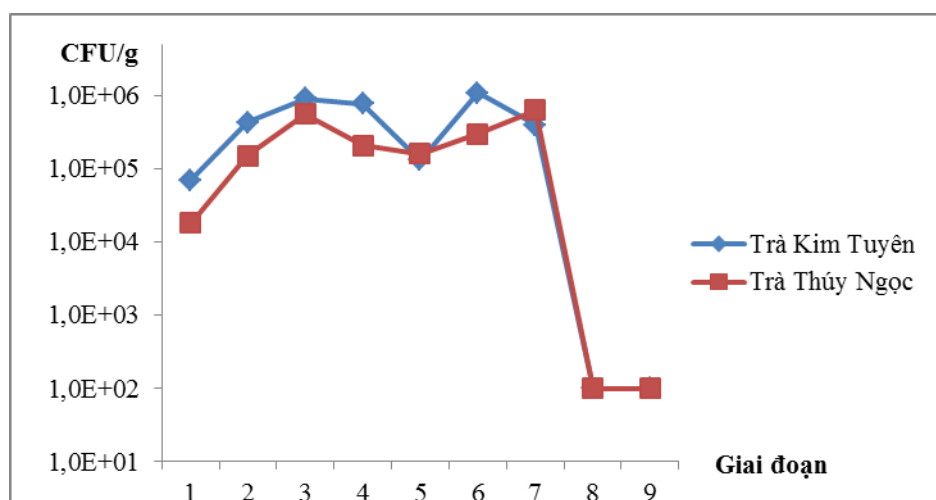
Các mẫu lá trà ở các giai đoạn chế biến khác nhau từ trà Thúy Ngọc, được đồng hóa thành mẫu lỏng. Lấy 100 µl mỗi dịch lỏng cấy trang trên các đĩa petri chứa sẵn môi trường phân lập vi khuẩn (PCA) phân lập nấm mốc (PDA), nấm men (Hansen), môi trường phân lập xạ khuẩn (Gause 1). Ủ ở nhiệt độ phòng từ 1 - 3 ngày. Làm thuần: từ một khuẩn lạc riêng rẽ trên các môi trường đặc trưng, cấy ria nhiều lần đến khi thu được các khuẩn lạc đồng đều, có màu sắc giống nhau, soi dưới kính hiển vi đều có một dạng tế bào chứng tỏ giống phân lập đã thuần khiết.

2.2.4. Định danh vi sinh vật bằng phương pháp sinh học phân tử

Các mẫu vi sinh vật thuần được gửi và phân tích tại công ty Nam Khoa.

3. Kết quả và biện luận

3.1. Sự biến động vi sinh vật tổng số



Hình 1. Sự biến động vi sinh vật tổng số trong quá trình lên men trà Oolong

Chú thích:

Giai đoạn 1 – Trà tươi	Giai đoạn 4 – Trà sau quay thơm lần 1	Giai đoạn 7 – Trà sau ủ lần 3
Giai đoạn 2 – Trà sau làm héo	Giai đoạn 5 – Trà sau ủ lần 2	Giai đoạn 8 – Trà bất hoạt enzyme
Giai đoạn 3 – Trà sau ủ lần 1	Giai đoạn 6 – Trà sau quay thơm lần 2	Giai đoạn 9 – Trà thành phẩm

Kết quả phân tích cho thấy, khuẩn lạc vi khuẩn hiếu khí xuất hiện trong suốt quá trình lên men. Mật độ vi sinh vật ban đầu khoảng 10^4 CFU/g cho thấy các nguyên liệu ban đầu cũng đã có sự hiện diện của vi sinh vật và mật độ này tăng dần theo thời gian lên men. Nhìn chung mật độ vi sinh vật trên mẫu trà Kim Tuyên cao hơn trên các mẫu trà được sản xuất bằng giống trà Thúy Ngọc. Sự biến động vi sinh vật tổng số trong quá trình sản xuất có tính quy luật: mật độ vi sinh vật tăng khá nhanh từ giai đoạn trà tươi đến giai đoạn sau ủ lần thứ nhất, sau đó mật độ vi sinh vật giảm ở giai đoạn sau quay thơm lần thứ nhất và sau ủ lần thứ hai rồi lại tăng nhanh ở các giai đoạn sau quay thơm lần thứ hai và sau ủ lần thứ ba. Mật độ vi sinh vật đạt cao nhất vào

các giai đoạn cuối của quá trình lên men: 1.1×10^6 CFU/g giai đoạn sau quay thơm hai đối với trà Oolong Kim Tuyên và 6.3×10^5 CFU/g giai đoạn sau ủ ba đối với trà Oolong Thúy Ngọc.

Sự giảm nhẹ mật độ vi sinh vật ở giai đoạn sau quay thơm lần thứ nhất và sau ủ lần thứ hai có thể giải thích là do trong quá trình quay thơm, các tế bào lá trà bị vỡ ra, có sự tiếp xúc giữa enzyme nội bào với cơ chất và oxi không khí, sự biến đổi các hợp chất polyphenol xảy ra trên bề mặt lá trà, đồng thời tinh dầu và một số các hợp chất có khả năng kháng khuẩn được tiết ra trên bề mặt lá, dẫn đến sự giảm mật độ vi sinh vật [5,10]. Các vi sinh vật không bị ảnh hưởng bởi các hợp chất này tiếp tục sinh trưởng và phát

triển ở các giai đoạn tiếp theo. Đối với cả hai mẫu trà, hầu hết các giá trị cực trị của mật độ vi sinh vật tổng số đều rơi vào các mẫu giai đoạn ủ. Như vậy, mẫu giai đoạn ủ trong quy trình công nghệ sản xuất trà Oolong không chỉ có vai trò quan trọng trong việc ổn định hương vị và cấu trúc của lá trà đồng thời cũng là quá trình ổn định hệ vi sinh vật tự nhiên xuất hiện trên lá trà. Với nhiệt độ xào diệt men vào khoảng 250-

270°C, vi sinh vật bị tiêu diệt hoàn toàn. Tuy nhiên, trên cả hai mẫu trà giai đoạn thành phần vẫn có sự hiện diện của vi sinh vật với mật độ thấp hơn 10^2 CFU/g điều này là do điều kiện chế biến và đóng gói không hoàn toàn vô trùng và do đó các vi sinh vật có thể nhiễm trở lại, tuy nhiên vẫn nằm trong giới hạn cho phép về đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm theo quyết định 46/2007/QĐ-BYT.

3.2. Sự biến động vi nấm

Bảng 1: Sự biến động tổng số vi nấm qua các giai đoạn chế biến

Mẫu	Mật độ vi nấm (CFU/g)	
	Trà Kim Tuyên	Trà Thúy Ngọc
1 – Trà tươi	Ít hơn 10^2	Ít hơn 10^2
2 – Trà sau làm héo	6.60×10^4	Ít hơn 10^2
3 – Trà sau ủ 1	Ít hơn 10^2	4×10^4
4 – Trà sau quay thơm 1	1.50×10^4	6×10^3
5 – Trà sau ủ 2	8.00×10^4	Ít hơn 10^2
6 – Trà sau quay thơm 2	5.80×10^5	7×10^3
7 – Trà sau ủ 3	3.8×10^5	3.6×10^5
8 – Sau diệt men	Ít hơn 10^2	Ít hơn 10^2
9 – Trà thành phẩm	Ít hơn 10^2	Ít hơn 10^2

Trên môi trường PDA, xuất hiện cả khuẩn lạc nấm men và nấm mốc. Số liệu bảng 2 cho thấy mật độ vi nấm trên mẫu trà Kim Tuyên cao hơn trên mẫu trà Thúy Ngọc. Bằng việc quan sát đại thể và phân loại, chúng tôi nhận thấy: mật độ nấm mốc rất thấp, ít hơn 1×10^1 CFU/g, số lượng tế bào nấm men trên lá trà Kim Tuyên cao nhất khoảng 5.8×10^5 CFU/g trà nguyên liệu, số lượng tế bào nấm men trên lá trà Thúy Ngọc vào khoảng 3.6×10^5 CFU/g trà nguyên liệu. Tuy

nhiên, sự biến động tổng số vi nấm không tuân theo một quy luật nhất định nào.

3.3. Kết quả phân lập và làm thuần

Từ kết quả nghiên cứu trên cho thấy trong quá trình ủ chè có sự tham gia của nhiều nhóm vi sinh vật khác nhau: vi khuẩn, nấm men và nấm mốc. Sự xuất hiện của các nhóm vi sinh vật ở các giai đoạn khác nhau, có vai trò khác nhau trong quá trình ủ chè vì vậy cần tìm hiểu sâu hơn tới sự biến đổi của các nhóm vi sinh vật này trong quá trình lên men. Chúng tôi tiến hành

ngiên cứu tỷ lệ các nhóm vi sinh vật trong quá trình ủ với nguồn nguyên liệu là mẫu trà Thúy Ngọc ở giai đoạn sau ủ 3. Kết quả, chúng tôi thu được 21 chủng vi sinh vật chia làm 7 nhóm

(việc phân nhóm dựa trên hình thái khuẩn lạc đơn trên các môi trường đặc hiệu) và tỉ lệ khuẩn lạc của từng nhóm được trình bày cụ thể ở bảng 2.

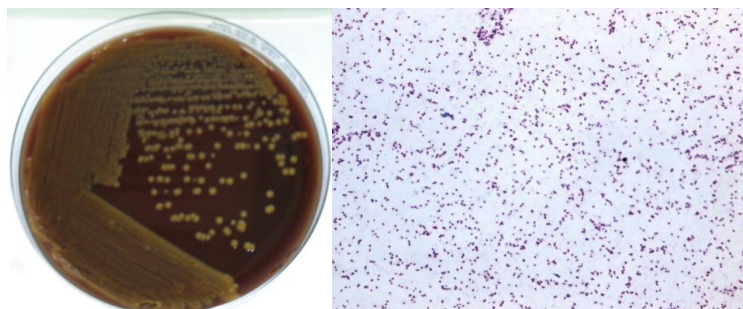
Bảng 2. Kết quả phân lập và làm thuần

Môi trường phân lập	stt	Hình thái khuẩn lạc	Tỉ lệ
Môi trường phân lập vi khuẩn	Nhóm 1 Kí hiệu từ K1 đến K7	Khuẩn lạc tròn lồi, trơn nhẵn, có màu từ vàng nhạt đến vàng cam đậm	52.02%
	Nhóm 2 Kí hiệu từ K8 đến K13	Khuẩn lạc nhỏ, tròn lồi, trơn nhẵn có màu từ hồng nhạt đến hồng đậm	3.01%
Môi trường phân lập nấm men	Nhóm 3 Từ KM1 đến KM3	Khuẩn lạc tròn, có chóp nhọn, màu trắng đục	41.7%
Môi trường phân lập nấm mốc	Nhóm 4 Kí hiệu: M1	Nấm mốc tròn, màu đen, viền trắng, lồi ở tâm tạo thành khía	≈ 1%
	Nhóm 5 Kí hiệu: M2	Nấm mốc tròn, màu xanh, viền trắng, sinh sắc tố đỏ vào môi trường	≈ 1%
	Nhóm 6 Kí hiệu M5, M6	Nấm mốc tròn, hệ sợi màu trắng sợi bào tử màu hồng, không sinh sắc tố	≈ 1%
	Nhóm 7 Kí hiệu M7	Nấm mốc tròn, màu xanh đen, viền trắng, lồi ở tâm tạo thành khía, sinh sắc tố vàng vào môi trường	0.3%

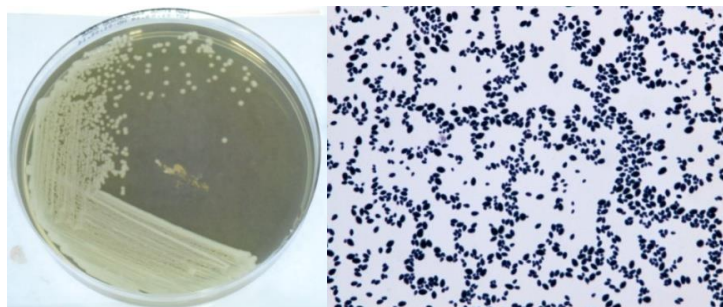
Kết quả khảo sát cho thấy, mật độ men mốc chiếm 45% tổng số vi khuẩn hiếu khí xuất hiện trong quá trình ủ. Là nhóm vi khuẩn có khả năng sử dụng nhiều nguồn cơ chất cacbon khác nhau, khả năng sinh trưởng và phát triển mạnh mẽ, vai trò của nhóm vi khuẩn này trong việc

chuyển hóa một số một số hợp chất để làm tăng chất lượng trà lên men cần phải được tìm hiểu rõ ràng hơn nữa [3]. Ngoài ra khi phân lập xạ khuẩn trên môi trường Gause 1, chúng tôi không phát hiện được khuẩn lạc xạ khuẩn nào.

Một số hình ảnh khuẩn lạc đặc trưng:



Hình 2. Khuẩn lạc đơn và kết quả nhuộm gram của vi khuẩn K4 nhóm 1



Hình 3. Khuẩn lạc đơn và kết quả nhuộm gram của nấm men KM2 nhóm 3

3.4. Kết quả định danh

Từ kết quả bảng 2 chúng tôi tiến hành định danh hai chủng vi sinh vật có mật độ tế bào lớn nhất hiện diện qua tất cả các công đoạn chế biến. Thí nghiệm được thực hiện tại trung tâm phân tích Nam Khoa Biotek.

Để định tên vi khuẩn K4 phân lập được, chúng tôi sử dụng trình tự đoạn 16S rRNA. So sánh bằng chương trình BLAST/NCBI (online) đã xác định vi khuẩn K4 tương đồng 98% với chủng *Chryseobacterium taeanense* ARB-2 16S ribosomal RNA gene (KC572559.1).

Để định tên nấm men KM2 chúng tôi sử dụng trình tự đoạn 28S rRNA. So sánh bằng chương trình BLAST/NCBI (online) đã xác định được nấm men KM2 có phần trăm tương đồng là 99% với chủng *Meyerozyma guilliermondii* KAML05 28S ribosomal RNA gene (KC119207.1).

Trong đó một số chủng thuộc giống *Chryseobacterium* đã được Moo Chang Kook

phân lập ở lá trà tươi và được xác nhận đóng một vai trò nhất định trong việc chuyển hóa một số cơ chất góp phần hình thành chất lượng trà [7]. Chủng *Meyerozyma guilliermondii* được biết đến như là một chủng nấm men có khả năng sinh trưởng và phát triển mạnh có thể đồng hóa nhiều nguồn cơ chất cacbon như: maltose; cellobiose; galacturonic acid; xylose,...[9]. Trong hoạt động sinh trưởng chủng *Meyerozyma guilliermondii* có thể tiết ra nhiều loại enzyme ngoại bào thuộc nhóm enzyme thủy phân như: cellulase; pectinase; xylanase; protease...[9].

Như vậy, với mật độ tế bào lớn và khả năng tiết ra enzyme ngoại bào hai chủng vi sinh vật trên rất có thể đã đóng góp một phần vào việc hình thành chất lượng và hương vị đặc trưng của trà Oolong.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cung cấp thông tin tổng quan về sự biến động vi sinh vật trong công nghệ

chế biến trà Oolong, mật độ vi khuẩn hiếu khí hiện diện trong quá trình sản xuất dao động trong khoảng từ 10^4 - 10^6 CFU/g và biến động theo một quy luật nhất định. Nghiên cứu cũng chỉ ra sự đa dạng và tỉ lệ giữa các chủng vi sinh vật xuất hiện trên lá trà trong quá trình ủ trà là tiền đề để nghiên cứu, đánh giá tác động của các chủng vi sinh vật khác nhau đến quá trình biến đổi các hợp chất tannin trà, góp phần hình thành chất lượng trà Oolong.

Định danh được 2 chủng vi sinh vật hiện diện với mật độ lớn trong quá trình ủ trà là

Meyerozyma guilliermondii và *Chryseobacterium taeanense*, là hai chủng vi sinh vật có khả năng sinh trưởng và phát triển mạnh, có khả năng tiết ra một số enzyme ngoại bào trong quá trình sinh trưởng, là cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo về ảnh hưởng của hệ vi sinh vật trong quá trình chế biến trà.

LỜI CẢM ƠN: Xin gửi lời cảm ơn chân thành đến Công ty Cổ Phần Chế Biến Hàng Xuất Khẩu Cầu Tre đã hỗ trợ cho nghiên cứu. Cảm ơn các Thầy Cô ở Trường Đại học Bách Khoa và Trường Đại học Nông Lâm đã tạo điều kiện cho chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

A survey of the fluctuation of microorganisms in process of manufacturing Oolong tea

- **Pham Ngoc Xuan^a**
- **Huynh Ngoc Oanh^a**
- **Phan Phuoc Hien^b**

^a Ho Chi Minh city University of Technology, VNU

^b Nong Lam University

ABSTRACT

The manufacturing process of Oolong tea was divided into 9 stages. The role of microorganisms in Kim Tuyen and Thuy Ngoc Oolong tea manufacturing was examined and the fluctuation of the total microbial volume was considered as indicators for assessment. Some of the representative microorganisms were identified. The results showed that some kinds of the bacteria, yeast and mold were detected in the whole stages. The density of the total microorganisms in each stage changed according to a certain rule. In Kim

*Tuyen's tea leaves, the density of bacteria increased to its peak of 1.1×10^6 CFU/g in the 6th stage (after the 2nd aromatic spin), whereas, in Thuy Ngoc's tea leaves, the density of bacteria increased to 6.3×10^5 CFU/g in the 7th stage (after the 3rd time of incubation). In PDA medium, the density of yeast was about 10^5 CFU/g while the density of filamentous fungi was too low. The identification results showed that two strains of yeast and bacterium were named *Meyerozyma guilliermondii* and *Chryseobacterium taeanense*.*

Key words: (Oolong tea, microorganism fluctuation, *Meyerozyma guilliermondii*, *Chryseobacterium taeanense*, PDA).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Bộ khoa học và công nghệ, Tiêu chuẩn Việt Nam 4884:2005, *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng vi sinh vật trên đĩa thạch - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30°C*, Hà Nội, 2006.
- [2]. Bộ nông nghiệp và phát triển nông thôn, QCVN 01-28:2010/BNNPTNT, I, Hà Nội, 2010.
- [3]. Nguyễn Lâm Dũng, et al, *Giáo trình vi sinh vật học*, NXB Đại học và THCN, 1980.
- [4]. Đại Học Bách Khoa Hà Nội, *Hóa sinh chè*, Nhà Xuất Bản Đại Học Bách Khoa Hà Nội, 1984.
- [5]. JM Hamilton-Miller, Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis L.*), *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2375–2377, 1995.
- [6]. Li jun, Y. U., et al, Activity Variations of Polyphenol Oxidase and Peroxidase during Zuoqing Process of Oolong Tea, *Journal of Tea Science*, 2001.
- [7]. Moo Chang Kook, et al, *Chryseobacterium camelliae* sp. nov., a bacterium isolated from green tea, *International journal of systematic and Evolutionary Microbiology*, 851-857, 2013.
- [8]. Teoh, Ai Leng, et al, Yeast ecology of Kombucha fermentation, *International journal of food microbiology*, 119-126, 2004.
- [9]. Thais D. Mendes, André Rodrigues, et al, Generation of Nutrients and Detoxification: Possible Roles of Yeasts in Leaf-Cutting Ant Nests, *Insects*, 228-245, 2012.
- [10]. Yi Wang, Felicia FL Chung, et al, Inhibition of attachment of oral bacteria to immortalized human gingival fibroblasts (HGF-1) by tea extracts and tea components, *BMC Research Notes*, 2013.
- [11]. ZHOU, Hong-jie, et al, Study on Main Microbes on Quality Formation of Yunnan Puer Tea during Pile-fermentation Process, *Journal of Tea Science* 3, 2004.