



CONTAMINACIÓN FÚNGICA DEL TÉ CAMBIOS DURANTE LA ELABORACIÓN CONTROLADA DEL TÉ NEGRO

Tonon, Sergio A. / Marucci, Raúl S. / Fontana, Jorge
Jerke, Gladis / Ferreras, Julián A.

Fungal contamination of Tea.
Changes during the controlled processing of black tea.

ABSTRACT

Standard analysis of black tea processed in the Province of Misiones, Argentina, evaluate its intrinsic characteristics -color, flavor, fragrance and stringency- acquiring a commercial classification in result of it. Biological or chemical contamination can alter the quality of the raw material. Fungal growth during processing and storage is one of the possibilities. The sub-tropical climate of the region and the mainly manual processing of tea favors it. Due to the broad variety of fungal genera able to contaminate plants and the absence of previous evaluation in the literature regarding black tea, we have analyzed the contaminant fungi present in regional tea, sowed and during processing in a pilot plant under controlled conditions of temperature and relative humidity. The total fungal count of green leaves showed an average value about 35×10^3 CFU/g. It continuously descended during processing, reaching a final value of 6×10^3 CFU/g during storage of black tea. The main contaminating genera were Cladosporium, Trichophyton, Aspergillus, Fusarium, Penicillium and Microsporum. Being Aspergillus, Fusarium and Penicillium, found in elevated percentages during storage.

KEYWORDS: Tea; contamination; processing; fungi; Misiones; Argentina.

RESUMEN

El té procesado y envasado en la Provincia de Misiones está sujeto a análisis organolépticos para la evaluación de características tales como color, sabor, aroma y astringencia, entre otros, conduciendo a su posterior clasificación comercial. Estas características deseables se ven alteradas generalmente por contaminación de la materia prima con diversas sustancias producidas por eventuales contaminaciones químicas o biológicas. Dentro de las alteraciones biológicas posibles, se encuentran aquéllas causadas por hongos contaminantes que se desarrollan durante las diversas etapas del procesamiento del té. Este tipo de contaminación se ve favorecido por el clima sub-tropical y la práctica semi-artesanal de procesamiento empleada en la región. Dada la amplia variedad de géneros y especies fúngicos contaminantes de productos vegetales y la virtual ausencia de evaluaciones previas de este sustrato en la literatura, realizamos un relevamiento de la micoflora presente en té regional cosechado y procesado en microsecadero piloto bajo condiciones de temperatura y humedad relativa ambiente controladas. El recuento general indica una contaminación promedio de 35×10^3 UFC/

g en la materia prima, con un descenso continuo durante la elaboración hasta situarse en 6×10^3 UFC/g en el almacenamiento. La identificación de los principales géneros fúngicos contaminantes destaca la presencia de *Cladosporium*, *Trichophyton*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Microsporum*. Siendo los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, los principales contaminantes presentes en el producto almacenado.

PALABRAS CLAVES: Té; contaminación; elaboración; hongos; Misiones; Argentina.

INTRODUCCIÓN

El 90 % de las 50 mil toneladas anuales de té que produce nuestro país se realiza en la Provincia de Misiones y el 10 % restante en la Provincia de Corrientes, siendo una de las actividades agrícolas de mayor relevancia económica en nuestra región. El 80 % del volumen de la producción anual, proveniente de 9.000 productores tealeros, se destina a la exportación; correspondiendo al 3,3 % del comercio mundial. De esta manera, nuestro país se posiciona en décimo lugar como productor y en el séptimo como exportador. El té elaborado se exporta a 20 países, entre los que se destacan: EE.UU. (60%), Chile (18%), Reino Unido (6%), Rusia (6%) y Holanda (3%) entre otros [1].

La *Camellia sinensis* (L) O. Kuntze es la especie más importante desde el punto de vista comercial; pertenece a la familia de las Theaceas que abarca aproximadamente 80 especies. Su principal área de distribución natural es la zona montañosa del Sudeste Asiático por sobre el paralelo de 30° Latitud Norte en una media luna que se extiende desde Japón a Nepal. En su estado natural puede alcanzar el tamaño de un arbusto, hasta un pequeño árbol de 6 a 8 m de altura [2].

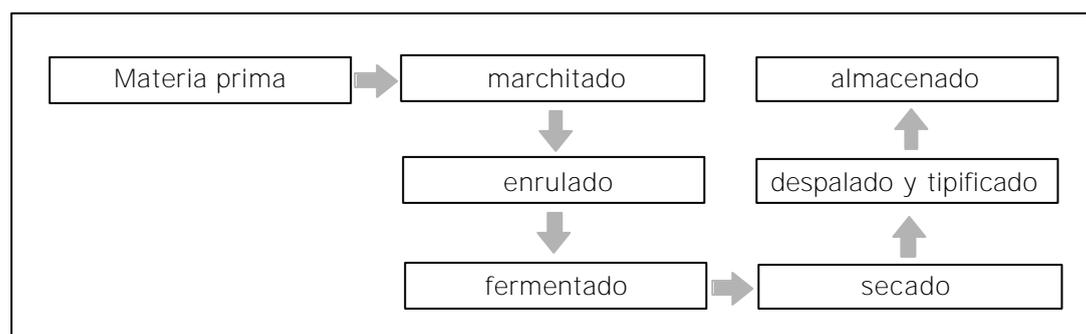
La mayoría de las plantaciones de té regionales son originarias de semillas de calidad desconocida. Como consecuencia de esto las plantaciones de té de Misiones son de variedades heterogéneas con aspectos físicos y botánicos muy diferentes entre sí: Assemicas (hoja ancha), China (hoja chica) y todos los híbridos intermedios [1; 2].

El sistema de elaboración del té negro consta de varias etapas en las que se combinan y suceden operaciones mecánicas y transformaciones fisicoquímicas; el contenido de agua se reduce y la materia seca sufre cambios en su composición [1].

Las características del licor, que se obtiene del producto final seco, son definidas en mayor medida por los componentes de la hoja, tales como polifenoles, sustancias pécticas, compuestos aromáticos y cafeína. Es así que la elaboración del té es entendida como un proceso simple, pero que debe efectuarse prestando particular atención a los numerosos factores que afectan al producto final [2].

Las distintas etapas del procesamiento incluyen los procesos de: 1) Marchitado, 2) Enrollado, 3) Fermentado, 4) Secado, 5) Despalado y Desfibrado, y 6) Tipificado.

ESQUEMA GENERAL DE ELABORACIÓN DE TÉ NEGRO



MARCHITADO

En este proceso, los brotes jóvenes del té que constituyen la materia prima, son marchitados por espacio de 12 a 16 horas, generalmente mediante circulación de aire forzado a temperatura ambiente en catres de madera, a efectos de acondicionarlos para la siguiente etapa [1].

ENRULADO

Durante esta etapa se inicia el proceso enzimático, por el cual los compuestos polifenólicos pertenecientes al grupo de las catequinas, son parcial o totalmente oxidados; originando teoflavinas amarillas o teorrubiginas rojas o marrones [1]. Para ello se hacen pasar las hojas marchitadas a través de un dispositivo de compresión rotativa. La función del mismo es romper las células vegetales para poner en contacto los jugos vegetales con las enzimas contenidas dentro de las mismas, permitiendo la oxidación de los compuestos responsables del buen aroma del té. Luego se procede al tamizado de la muestra a fin de disminuir la temperatura producida por fricción y facilitar la aireación de las células.

FERMENTADO

Luego del enrulado, el material disgregado y acondicionado, pasa a la fermentación, que consiste en una serie de oxidaciones y condensaciones que generará, en tiempos variables, un producto final de calidad relativa a la materia prima empleada. Junto con la fermentación se producen otros cambios, entre ellos el desarrollo de los compuestos aromáticos propios del té [1].

SECADO

En el momento adecuado, la fermentación se detiene completamente por medio de la remoción de la humedad durante la operación de secado. Además de los procesos de deshidratación e inactivación de la oxidación enzimática, algunas catequinas continúan sus cambios químicos. Además, los azúcares son caramelizados, con el resultado del típico aroma a caramelo del té seco. Por medio del secado, no sólo se detiene el proceso de fermentación, sino que se obtiene además un producto seco, fácil de manipular, apto para una conservación más o menos prolongada y listo para su

envasado y comercialización [1; 2].

La Estación Experimental Agropecuaria Cerro Azul del INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) ha implementado una planta piloto a escala, para el procesamiento del té, estableciéndose condiciones controlables a lo largo de todo el proceso, con el propósito de optimizar las diversas etapas con vista a la obtención de un producto de excelencia.

Las muestras de té elaboradas en esta planta provienen, generalmente, de cultivos experimentales propios de la Estación y en el marco del presente estudio, dada la ausencia de estudios detallados acerca de la micoflora contaminante de té y subproductos en la Provincia, se determinó la necesidad de conocer el tipo y cambios de la contaminación fúngica del sustrato durante las distintas etapas de su procesamiento.

Si bien existen descripciones técnicas precisas acerca de las operaciones involucradas en el procesamiento del té, por lo general el rango de humedad, temperatura e higiene empleados en el mismo varían ampliamente. Esta situación, conduce a la generación de condiciones favorables para la proliferación de diversos géneros de hongos contaminantes; los cuales mediante su crecimiento en el sustrato en distintas etapas de su procesamiento y posterior almacenamiento, pueden modificar mediante acción directa o indirecta su calidad bromatológica y comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

El sustrato analizado provino de la plantación de té clonal de la Estación Experimental INTA Cerro Azul, Clon/semilla Policlonal 3-18, sembrada en Nazareno, INTA, Cerro Azul, cosechado de manera mecánica-manual.

Se analizaron 7 muestras en total, obtenidas aleatoriamente durante las diversas etapas de procesamiento en planta piloto, mediante sonda muestreadora cilíndrica: 1) muestra verde, 2-5) etapas de marchitado, enrulado, fermentado y secado, respectivamente, y 6-7) té negro elaborado y almacenado en latas, cosecha 91 y 93, tipificación BOP y BOPF, respectivamente (Tabla I).

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS ANALÍTICAS

De cada muestra general se tomaron aleatoriamente y por duplicado, 50 g como muestras

TABLA I: Características generales de las muestras analizadas

MUESTRA	Peso Total	Humedad Relativa muestra	Tiempo de Proceso	Características de la Muestra
Muestra verde	2,430 Kg	80 %	—	Color verde Hojas en buen estado
Marchitado	1,880 Kg	77 %	120 min.	Color verde Hojas apenas marchitas
Enrulado	800 g	70 %	50 minutos	Color verde-cobrizo Aroma fuerte
Fermentado	810 g	65 %	45 minutos	Color cobrizo Aroma suave
Secado (a 98°C)	800 g	3 %	45 minutos	Color cobrizo-fuerte. Aroma a caramelo fuerte
BOP/ '91	500 g	5 %	5 años almacenado	Té negro elaborado cosecha 1991
BOPF/ '93	500 g	4 %	3 años almacenado	Té negro elaborado cosecha 1993

analíticas; se homogeneizaron en licuadora con cantidad suficiente de agua peptonada estéril, obteniéndose diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} de cada muestra, adecuadas al posterior proceso de recuento e identificación fúngica. Luego de filtrar los homogenatos por gasa estéril, fueron mantenidos en tubos plásticos con tapa a rosca estériles, a 4°C hasta su siembra [3; 4; 8].

SIEMBRA DE LAS MUESTRAS

En el secadero piloto de la Estación Experimental se sembraron las diversas diluciones con espátula de Drigalski, por dispersión en superficie. Se utilizaron placas de petri de 100 mm. de diámetro conteniendo medio OGYE (Agar Glucosa Extracto de levadura con Oxitetraciclina) o DRBC (Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol). Una vez sembradas, rotuladas y secas, las placas se recubrieron con polietileno y se guardaron en heladera portátil a 4°C para ser transportadas hasta el laboratorio, en donde se incubaron en estufa a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 7 a 14 días [4; 7; 8; 10].

RECUESTO DE CEPAS FÚNGICAS

Como técnica de recuento se empleó la técnica de dilución en placas; procediéndose a contar las colonias desarrolladas en las siembras a diversas diluciones y promediando los duplicados. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de

colonias/gramo de muestra analizada (UFC/g) [4-7].

IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS CEPAS CONTAMINANTES

Una vez realizado el recuento fúngico general, se sembraron en placas de OGYE y DRBC homogenatos representativos de 5 gramos de cada muestra analítica; utilizando espátula de Drigalski e incubándose en estufa a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 7 a 14 días. Durante este tiempo se llevó a cabo el aislamiento de las cepas de crecimiento independiente, repicándolas a picos de flauta conteniendo PDA (Agar papa-dextrosa), Agar papa zanahoria y/o Agar jugo V8. La identificación a nivel de género de las cepas aisladas se realizó por observación de sus características macroscópicas generales y bajo lupa estereoscópica, además de sus características microscópicas mediante las técnicas de la cinta engomada y de microcultivo. Se utilizó diversa bibliografía descriptiva de los principales géneros fúngicos [7; 9; 11-14].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RECUESTO GENERAL DE LA MICOFLORA CONTAMINANTE

La materia prima, hojas y palos de té verde, presenta un grado importante de contaminación

fúngica inicial con 35×10^3 UFC/g en promedio. Se observó un descenso de la misma luego del marchitado a 20×10^3 UFC/g en promedio, alcanzando sus valores más bajos luego del secado, 6×10^3 UFC/g. Las muestras provenientes de lotes almacenados presentaron un grado de contaminación similar a la procesada en el secadero piloto, entre 6 y 8×10^3 UFC/g. Los datos generales del recuento se presentan en la tabla II.

El relevamiento de la flora fúngica contaminante del té regional, nos permite evaluar la calidad microbiológica inicial del sustrato y su susceptibilidad al ataque fúngico durante su procesa-

miento y posterior almacenamiento. Debido a la inexistencia de datos bibliográficos sobre esta temática, los resultados obtenidos clarifican puntos previamente estimados por comparación a otros productos similares.

Así observamos que debido al tipo de cosecha preferentemente manual y contacto directo con el suelo regional, la materia prima posee niveles apreciables de contaminación fúngica inicial. Sin embargo, ésta decrece rápidamente durante las diferentes etapas involucradas en el proceso de elaboración, manteniéndose en niveles bajos durante el almacenamiento.

TABLA II: Recuento de la micoflora total contaminante del té durante su procesamiento en planta piloto y almacenamiento ($\times 10^3$ UFC/g)			
Etapas	Medio DRBC	Medio OGYE	Promedio
Muestra Verde	30 ; 33 ; 35 ; 29	38 ; 41 ; 37 ; 35	35
Marchitado	28 ; 30 ; 31 ; 33	37 ; 34 ; 29 ; 32	32
Enrolado	22 ; 24 ; 22 ; 20	26 ; 24 ; 23 ; 24	23
Fermentado	15 ; 16 ; 13 ; 16	18 ; 16 ; 15 ; 18	16
Secado	6 ; 4 ; 4 ; 5	8 ; 6 ; 7 ; 7	6
Almacenado'91	8 ; 7 ; 5 ; 8	9 ; 10 ; 12 ; 7	8
Almacenado'93	7 ; 5 ; 5 ; 6	6 ; 4 ; 7 ; 9	6

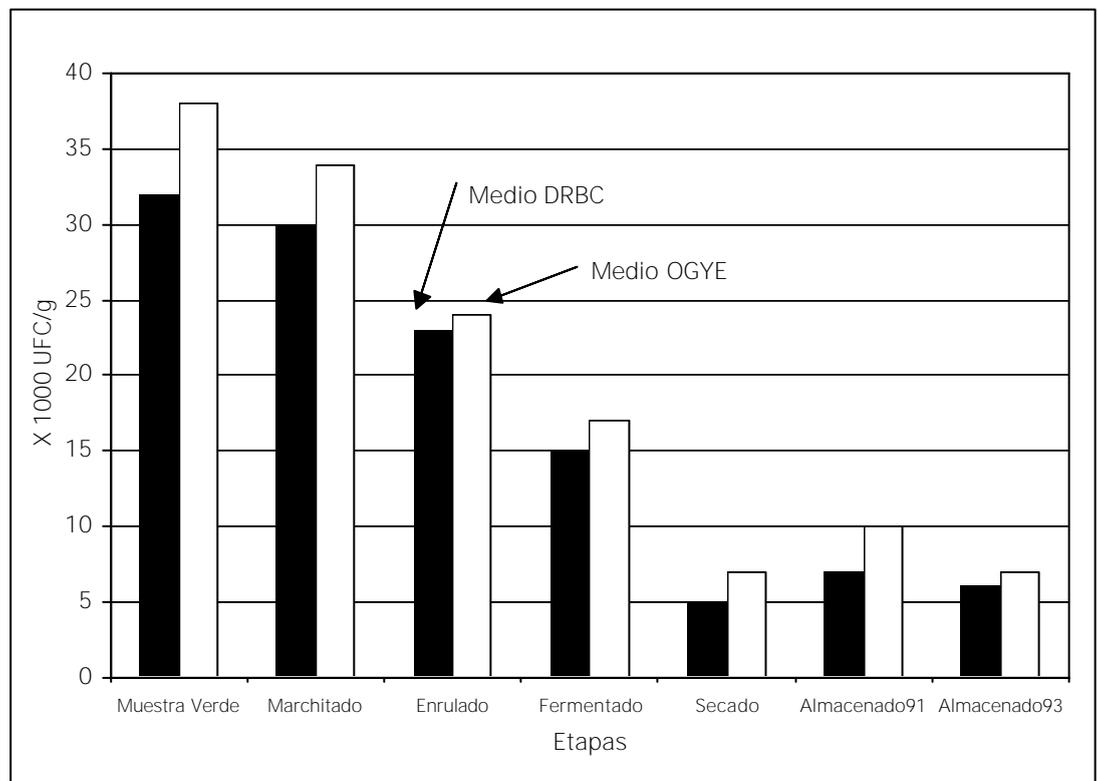


GRÁFICO I: Evolución de la contaminación fúngica durante el procesamiento piloto y almacenamiento de té regional

La naturaleza de los procesos involucrados en la elaboración del té -tratamientos térmicos elevados y macerados- afectan directamente el grado de contaminación fúngica presente en cada una de las distintas etapas. Se establecen dos mesetas en el descenso de la contaminación; el inóculo inicial de $30-35 \times 10^3$ UFC/g se reduce a 20×10^3 UFC/g luego del proceso de enrollado, posiblemente por el calor generado por fricción mecánica, para finalmente llegar a valores de 6×10^3 UFC/g luego del secado en horno con aire caliente forzado. El análisis de las muestras almacenadas demuestra que el bajo contenido de humedad relativa y por consiguiente el bajo a_w del té negro seco, contribuye como barrera físico-química a la colonización y contaminación fúngica, detectándose niveles similares a los de la muestra recientemente procesada y secada ($6-8 \times 10^3$ UFC/g).

IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS PRINCIPALES GÉNEROS FÚNGICOS CONTAMINANTES

La identificación a nivel de género de la flora fúngica contaminante presente en el procesamiento piloto del té y su almacenamiento, se detalla en la Tabla III.

Se observó una alta incidencia de hongos de los géneros *Cladosporium* (18-38%) y *Trichophyton*, (15-22%) en las muestras tomadas durante el procesamiento; siguiendo en importancia los géneros *Aspergillus* (10-21%), *Fusarium* (9-18%), *Penicillium* (6-11%) y *Microsporum* (4-8%).

En las muestras almacenadas, la distribución relativa de géneros fue diferente, teniendo preponderancia los *Aspergillus* (31-37%), *Fusarium* (15-24%) y *Penicillium* (17-18%) sobre el género *Cladosporium* (9-11%).

Los principales géneros fúngicos contaminantes representan una muestra típica de los presentes en el suelo regional, con predominio de Deuteromicetes. El inóculo inicial presente en la hoja verde muestra una limitada variedad de géneros, destacándose *Cladosporium* (31%), *Trichophyton* (15%), *Aspergillus* (14%) y *Fusarium* (12%).

La evolución de cada uno de estos géneros durante el procesamiento muestra un comportamiento diferencial; mientras el género predominante *Cladosporium* disminuye del 37% en muestra verde al 18% en el secado, los demás mantienen o incluso aumentan su porcentaje relativo. Esto podría relacionarse con una menor resistencia térmica del género mencionado frente a los demás contaminantes presentes (Gráfico II).

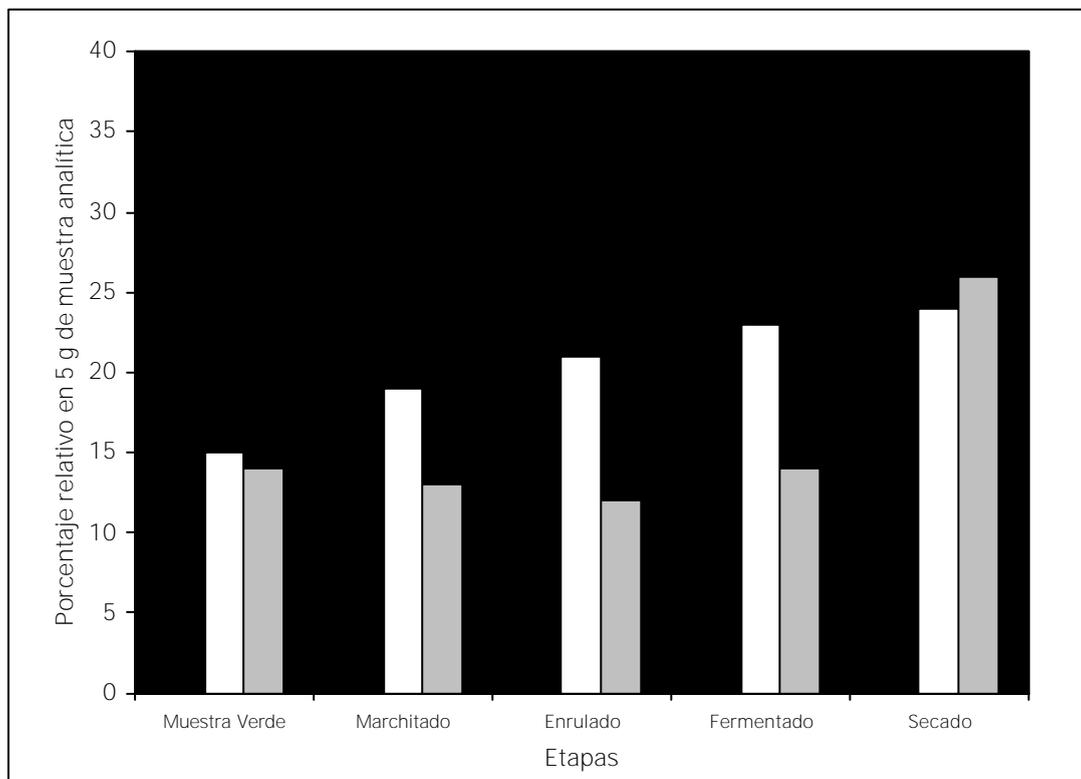


GRÁFICO II: Evolución de los principales géneros fúngicos durante el procesamiento piloto de té regional

Tabla III: Recuento e identificación de los principales géneros fúngicos contaminantes de las distintas etapas del procesamiento piloto y el almacenamiento del té

Géneros	Muestra Verde	Marchitado	Enrolado	Fermentado	Secado	Almacenado 91	Almacenado 93
Cladosporium	50 ^a (30,7%) ^b	45 (37,8%)	22 (24,7%)	14 (26%)	7 (18,4%)	6 (11%)	5 (9,2%)
Trichophyton	25 (15%)	23 (19,3%)	19 (21,3%)	12 (22%)	7 (18,4%)	4 (6,9%)	1 (1,8%)
Aspergillus	23 (14%)	15 (12,6%)	10 (11,4%)	7 (13%)	8 (21%)	18 (31%)	20 (37%)
Penicillium	10 (6%)	8 (6,9%)	5 (5,6%)	5 (9,3%)	4 (10,5%)	10 (18%)	9 (17%)
Fusarium	20 (12,3%)	10 (8,4%)	10 (11,4%)	9 (16,7%)	7 (18,4%)	9 (15%)	13 (24%)
Microsporium	8 (5%)	5 (4,2%)	5 (5,6%)	3 (5,5%)	3 (7,8%)	1 (1,7%)	1 (1,8%)
Curvularia	5 (3,3%)	3 (2,5%)	2 (2,2%)	1 (2%)	0	2 (3%)	0
Gliocladium	3 (0,5%)	1 (0,8%)	1 (1,1%)	0	0	1 (1,7%)	0
Pseudoallescheria	3 (1,8%)	1 (0,8%)	0	0	0	2 (3%)	0
Levaduras	8 (5%)	1 (0,8%)	0	1 (2%)	0	3 (4%)	2 (3,7%)
Sin identificar	3 (1,8%)	3 (2,5%)	6 (6,7%)	0	0	1 (1,7%)	1 (1,8%)
Otros	5 (3,3%)	4 (3,4%)	9 (10%)	1 (2%)	2 (5,5%)	1 (1,7%)	2 (3,7%)
TOTAL	163	119	89	54	38	58	54

Otros: Rhizopus, Alternaria, Trichoderma, Trichotecium, Botritis, Aerobasidium, Scopulariopsis, Epidermophyton.

(a) Número de cepas independientes aisladas, (b) Porcentaje relativo en las muestras de dicha etapa.

En las muestras almacenadas, se observa una preponderancia de los géneros denominados “de almacén” Aspergillus, Fusarium y Penicillium. La presencia relativa de estos contaminantes va tomando paulatina importancia a medida que la

materia prima va siendo procesada y por consiguiente perdiendo humedad relativa, hasta alcanzar porcentajes importantes (34-17%) en el producto almacenado (Gráfico III).

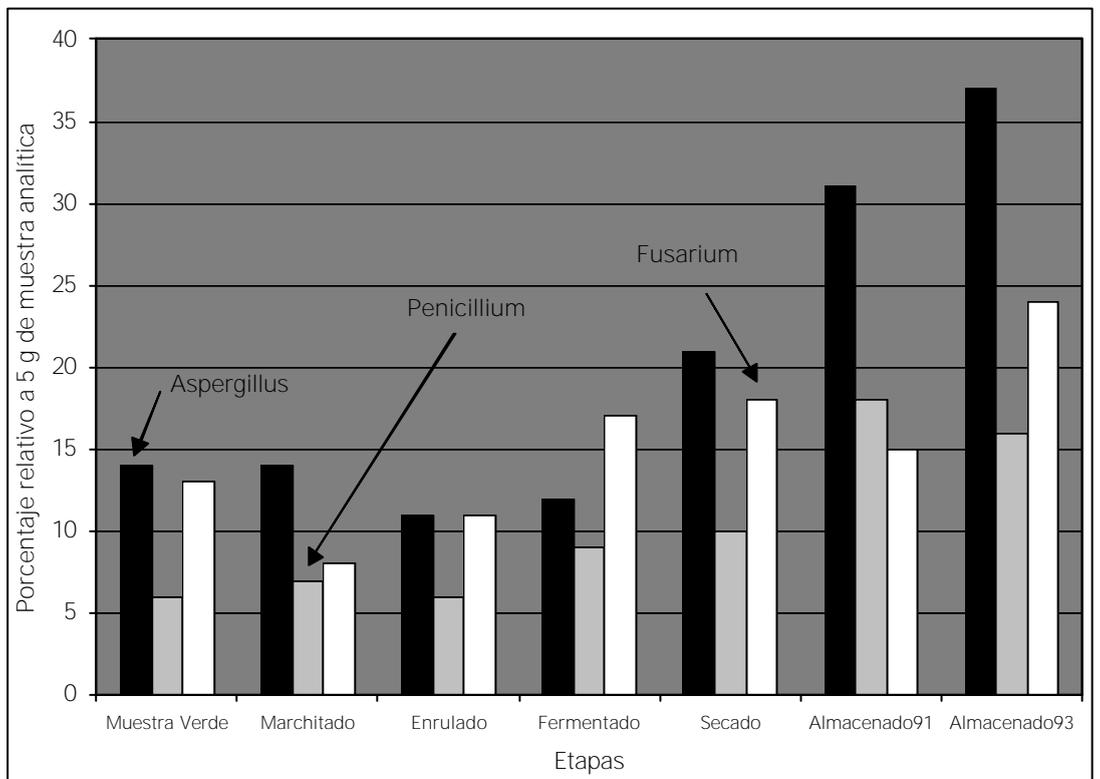


GRÁFICO III: Evolución de los géneros Aspergillus, Penicillium y Fusarium durante el procesamiento piloto y almacenamiento de té regional

La presencia de esporas de estos hongos en el té almacenado puede representar un problema desde el punto de vista bromatológico. La mayoría de las especies pertenecientes a los mencionados géneros tienen la capacidad de sintetizar metabolitos secundarios tóxicos, denominados micotoxinas [15]. Las mismas representan un riesgo potencial a la salud humana y animal, por lo que diferentes países han implementado programas de control de micotoxinas en diferentes alimentos, preferentemente cereales y oleaginosas. Diversos estudios en nuestro laboratorio continúan analizando las especies contaminantes aisladas y su potencialidad micotoxigénica; teniendo en cuenta que la mayoría de las micotoxinas son termo-resistentes, pudiendo resistir los procesos de elaboración y encontrarse presentes de manera inalterada en el producto final.

Dada la amplia variedad de esquemas de procesamiento del té empleados en nuestra región, estamos, además, realizando un estudio micológico comparativo entre establecimientos productores y el microsecadero piloto, para poder generar un esquema regional de la contaminación fúngica de este producto.

TONON, Sergio A.; MARUCCI, Raúl S.; JERKE, Gladis; FERRERAS, Julián A. / Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CIDeT), Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales.
FONTANA, Jorge / Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental INTA Cerro Azul.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado con aportes del Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CIDeT) de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales.

REFERENCIAS

1. PRAT KRICUN, S.D., PICCOLO, G.A., y RIVERA FLORES, S.E. Té, cultivo y elaboración. Catálogo tecnológico. Miscelánea N° 6, INTA Cerro Azul. p. 1-43. 1988.
2. PRAT KRICUN, S.D. Descripciones y características del cultivo de té, en Primer curso de capacitación en producción de té. INTA, Cerro Azul, Pcia. de Misiones. 1994.
3. SAMSON, R. y REEMEN-HOEKSTRA V. Introduction to Food-Borne Fungi. Institute of the Royal Netherlands. 1988.
4. PITT, J., et al. Recommended methods for mycological examination of foods. 1992, en Modern methods in food mycology, R. Samson, et al., Editor. Elsevier: Amsterdam-London-New York-Tokyo. p. 365-368. 1992.
5. CÁTEDRA DE MICOBIOLOGÍA. Guías Prácticas del Curso de Micología de Alimentos. Córdoba. Editorial Universitaria de Córdoba. 1994.
6. VAAMONDE, G. y CABRAL, D. Micología de Alimentos. Universidad de Buenos Aires: Buenos Aires. 1995.
7. KING, A.D.J., et al. Methods for the Mycological Examination of Food. Plenum Press, Editor. Plenum Press & NATO Scientific Affairs Division: New York and London. 1986.
8. KING, A.D.J.; HOCKING, A.D. y PITT, J.I. A novel selective medium for the enumeration of yeasts and moulds associated with food spoilage. J. Appl. Environ. Microbiol. 37: p. 959-964. 1979.
9. BETTUCCI, L. y ROQUEBERT, M.F. Curso sobre biología e identificación de hongos contaminantes de Alimentos. Micotoxinas. Universidad de la República. Facultad de Ciencias. PEDECIBA. Montevideo, Uruguay. 1995.
10. KING, A.D.J.; HOCKING, A.D. y PITT, J.I. Dichloran-Rose Bengal Medium for enumeration and isolation of molds from foods. J. Appl. Environ. Microbiol. 37(5): p. 959-964. 1979.
11. KONEMAN, E.W. y ROBERTS, G.D. Prácticas de Laboratorio. 3° ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S. A. 1987.
12. PIONTELLI, E.L. Bases y conceptos para la clasificación de los hongos de importancia Médico-Veterinaria, en Curso: Criterios taxonómicos básicos para las disciplinas microbiológicas. 1995. Posadas, Misiones: UNaM.
13. ALEXOPOULOS, C.J. Introducción a la Micología. 3° ed., Buenos Aires: Editorial Universitaria de Buenos Aires. 1979.
14. WEBSTER, J. Introduction to Fungi. 2° ed., C.U. Press. Vol. 1. Londres, Inglaterra. 1991.
15. TONON, S. A. y MARUCCI, R. S. Flora fúngica contaminante de Yerba Mate estacionada. Presencia de hongos productores de aflatoxinas. La Alimentación Latinoamericana, 206 p. 23-32. 1994.