



Comunicación

Efecto del sistema glucosa oxidasa/glucosa sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 en leche

Effect of glucose oxidase/glucose system on the growth of
Escherichia coli ATCC 25922 in milk

Nirza **Noguera**^{1*}, Ana **Hernández**², Aldair **Jiménez**², Dayana **Requena**¹,
Ninoska **Ramírez**¹, Luis **Ojeda**¹

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco J. Triana Alonso”, Universidad de Carabobo.
Avenida Las Delicias, Maracay, Estado Aragua, Venezuela.

²Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud, Sede Aragua, Escuela de Bioanálisis
“Omaira Figueroa”. Estado Aragua, Venezuela.

*Autora para correspondencia: nnoquera1@uc.edu.ve

Aceptado 13-Julio-2014

Resumen

La leche es uno de los alimentos de mayor importancia por ser rico en nutrientes y porque constituye la materia prima para la elaboración de una amplia gama de productos. Se ha demostrado que en leches pasteurizadas de marcas comerciales, pueden ocurrir contaminaciones postproceso, lo que representa un riesgo para la salud pública. Es por ello que en las últimas décadas, ha ganado importancia el uso de aditivos sintéticos u orgánicos como técnica complementaria durante el procesamiento de alimentos. La enzima glucosa oxidasa (GOX) tiene amplio uso en la industria de alimentos gracias a sus propiedades antioxidante y antimicrobiana. Adicionalmente, se ha demostrado su capacidad de inhibir el crecimiento de diferentes enterobacterias. Por tal motivo, en el presente trabajo se planteó adicionar la enzima GOX en la leche y evaluar su efecto sobre el crecimiento de una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922. Se estandarizó la concentración de GOX y glucosa que ocasionaba la inhibición del crecimiento bacteriano en medio Luria-Bertani y en función de los

resultados, se decidió utilizar la combinación de 2 U de GOX y 2,0 % de glucosa para agregarlos como aditivos en la leche y se establecieron dos sistemas: GOX/G sin pasteurizar y GOX/G pasteurizado. El crecimiento fue monitoreado por la técnica de conteo de colonias en placa-agar, a partir de 1 mL de cultivo a las 4, 6 y 24 h de incubación. Se encontró que los sistemas con GOX hasta las 6 horas presentaron efectos similares, inhibiendo significativamente el crecimiento de la bacteria, mientras que a las 24 h ya no se observó dicha inhibición, pero sí que el sistema con GOX pasteurizada exhibió una población menor que el sistema GOX sin pasteurizar. Estos hallazgos proyectan a la enzima GOX como una alternativa para la conservación de la leche, tanto cruda como pasteurizada.

Palabras claves: *Escherichia coli*, glucosa oxidasa, leche, pasteurización.

Abstract

Milk is one of the most important foods to be rich in nutrients and that is the raw material for the manufacture of a wide range of products. It has been shown that pasteurized milks trademarks, may have post-processing contamination, which poses a risk to public health. That is why in recent decades has gained importance the use of synthetic or organic additives as a complementary technique during food processing. Glucose oxidase (GOX) enzyme has wide application in the food industry due to its antioxidant and antimicrobial properties. Additionally, it has demonstrated its ability to inhibit the growth of different enterobacteria. Therefore, this work proposed adding the enzyme GOX in milk and evaluates its effect on the growth of a strain of *Escherichia coli* ATCC 25922. The GOX and glucose concentration that caused inhibition of bacterial growth in Luria-Bertani medium was standardized and depending on the results, it was decided to use the combination of 2 U of GOX and 2.0 % glucose as additives to add in the milk and two systems were developed: GOX/G unpasteurized and pasteurized GOX/G. Growth was monitored by the technique of colony counting on agar plate, starting from 1 mL of culture at 4, 6 and 24 h of incubation. It was found that systems with GOX to 6 hours had similar effects, significantly inhibit the growth of bacteria, while at 24 hours, this inhibition was not observed, but the system pasteurized GOX exhibited a smaller population than the GOX system unpasteurized. These findings GOX enzyme projected as an alternative to the preservation of milk, both raw and pasteurized.

Key words: *Escherichia coli*, glucose oxidase, milk, pasteurization.

INTRODUCCIÓN

Por su aporte nutricional, la leche es uno de los alimentos de mayor importancia en muchos países del mundo (Celis y Juárez, 2009). Además de ser un alimento rico en nutrientes, constituye la materia prima para la elaboración de una amplia gama de productos (Díaz, 2000). No obstante, es un alimento altamente perecedero, por lo que debe ser

manejado de manera adecuada. Las condiciones de higiene y sanidad de las explotaciones lecheras, así como a nivel de las industrias procesadoras, deben ser óptimas para garantizar la calidad microbiológica de este alimento (Valbuena *et al.*, 2004; Celis y Juárez, 2009).

En Venezuela, la norma 798:1994 de la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN), define la leche pasteurizada como "...la leche cruda homogeneizada o no, que ha

sido sometida a un proceso térmico aprobado por la autoridad competente, en condiciones tales que garanticen la destrucción de microorganismos patógenos y la casi totalidad de los microorganismos banales que pudiesen estar presentes, sin que se alteren sensiblemente las características organolépticas y físico-químicas de la misma.” (COVENIN, 1994). Esto implica que el proceso de pasteurización debería mejorar la calidad microbiológica de la leche cruda, lo que contribuiría a alargar su vida de anaquel y minimizar riesgos de enfermedades de transmisión alimentarias. Sin embargo, hallazgos como los realizados por Valbuena *et al.* (2004) y Luigi *et al.* (2013), en leches pasteurizadas de marcas comerciales, demostraron que pueden ocurrir contaminaciones postproceso, probablemente por aplicación deficiente de buenas prácticas de procesamiento, limpieza y saneamiento de las plantas procesadoras. En el estudio conducido por Valbuena *et al.* (2004) en Maracaibo (Estado Zulia, Venezuela), se encontró que el 50,93 % de las muestras analizadas de 5 marcas de leche pasteurizada tenían niveles de coliformes totales mayores al valor máximo de $1,0 \times 10^2$ UFC/mL, utilizado como referencia para comparación en el estudio. En la investigación realizada por Luigi *et al.* (2013) en el Municipio Valencia del Estado Carabobo (Venezuela), se obtuvo que el 45 % de las muestras analizadas presentaron contajes de coliformes totales elevados que superaron el recuento de $1,0 \times 10^2$ UFC/mL. Además, realizaron la determinación de coliformes fecales y encontraron que el 72 % de las muestras estaban por encima de lo permitido (3 UFC/mL). Dentro de las enterobacterias aisladas en algunas muestras destacan: *Enterobacter cloacae* (38 %), *Escherichia coli* (45 %), *Klebsiella pneumoniae* (27 %), *Pseudomonas aeruginosa* (10 %) y *Pseudomonas putida* (7 %).

Estos problemas de contaminación a nivel de la industria alimentaria representan no

solo un riesgo importante para la salud, sino también un riesgo significativo desde el punto de vista económico. La producción industrial de alimentos es un proceso que se desarrolla a gran escala, razón por la cual las consecuencias de pérdidas por contaminación microbiana son altamente costosas (Orberá-Ratón, 2004). Es por ello, que en las últimas décadas la alternativa de combinar técnicas de conservación durante el procesamiento de muchos alimentos, ha ganado importancia. En este sentido, los aditivos sintéticos y orgánicos con actividad antimicrobiana se están implementando como técnica complementaria para extender la vida útil de los alimentos. En especial, los aditivos orgánicos o de origen natural, dadas las ventajas que tienen frente a los sintéticos, tal como lo destaca Rodríguez-Sauceda (2011).

Dentro de este grupo de aditivos orgánicos, las enzimas han tenido una gran aceptación. La enzima peroxidasa (EC 1.11.1.7), también llamada lactoperoxidasa (NC-IUBMB, 2011), es empleada a nivel de la leche cruda, como un conservante natural recomendado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), considerado seguro cuando se usa en correspondencia con las directrices del Codex (FAO/WHO, 2006). La enzima cataliza la oxidación de los iones de tiocianato en presencia del peróxido de hidrógeno. Esta reacción convierte el tiocianato en ácido hipotiocianoso (HOSCN) que al pH de la leche, se disocia en forma de iones de hipotiocianato (OSCN⁻) los cuales reaccionan con los grupos de sulfhidrilos libres, inactivando así varias enzimas vitales para el metabolismo de la célula bacteriana, lo que a su vez imposibilita su reproducción. Como las proteínas de la leche contienen muy pocos grupos de sulfhidrilos y los que se hallan presentes son relativamente inaccesibles al OSCN⁻ (enmascarado), la reacción de este compuesto en la leche es bastante específica y

combate las bacterias presentes en la leche. El efecto antibacteriano del sistema lactoperoxidasa/tiocianato/peróxido de hidrógeno depende de la especie y la cepa. Cuando la leche cruda tiene una flora mixta en la que predominan las bacterias mesófilas, el efecto es bacteriostático, (es decir, principalmente inhibidor). En presencia de algunas bacterias Gram-negativas, por ejemplo, *Pseudomonas* o *Escherichia coli*, el efecto es bactericida (FAO/OMS, 1991). Este sistema es recomendado cuando no existe posibilidad de refrigerar la leche cruda previo a su procesamiento, ya que puede mantener la calidad microbiológica inicial de la misma por 8 horas sin refrigeración. La activación de este sistema previo al proceso de pasteurización es beneficioso, puesto que incrementa la eficiencia del tratamiento térmico, eliminando la contaminación por bacterias coliformes y termorresistentes post-tratamiento (Ponce, 2010).

La glucosa oxidasa (GOX) (EC 1.1.3.4) es una flavoproteína (NC-IUBMB, 1961) que cataliza la oxidación de la β -D-glucosa hacia ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, usando el oxígeno molecular como aceptor final de electrones (Hatzinikolaou *et al.*, 1996; Pluschkell *et al.*, 1996; Fiedurek y Gromada, 2000). Es producida comercialmente a partir de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, siendo *A. niger* la especie usada con mayor frecuencia para este fin (Hatzinikolaou y Macris, 1995; Wong *et al.*, 2008). La enzima GOX ha demostrado su capacidad de suprimir o inhibir el crecimiento de especies como *Pseudomonas fragi* en caldo nutritivo y medio de extracto de pescado (Yoo y Rand, 1995); *Staphylococcus aureus*, *Salmonella infantis*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica* en medio de carne cruda y desnaturalizada con calor (Tiina y Sandholm, 1989); *Escherichia coli* y *Salmonella derby* en caldo nutritivo (Massa *et al.*, 2001). Este efecto

antimicrobiano, ha sido asociado a los productos de la reacción que la enzima cataliza. Específicamente, el peróxido de hidrógeno es capaz de oxidar los grupos sulfhidrilos de las enzimas bacterianas, formando puentes disulfuro lo que genera cambios conformacionales, pérdida de funcionalidad y muerte celular (Rojas-Valencia *et al.*, 2008; Tormo-Maicas y Julián-Rochina, 2009).

En consecuencia, como los principales microorganismos responsables de la contaminación de la leche son enterobacterias y está demostrado el potencial que tiene la GOX para inhibir su crecimiento, se planteó en el presente trabajo adicionar la enzima en la leche y evaluar su efecto sobre el crecimiento de una población bacteriana definida de *Escherichia coli* ATCC 25922.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales biológicos

Microorganismo y medio de cultivo

Se trabajó con la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, certificada por el Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” (Caracas, Venezuela).

El medio Luria-Bertani (LB) se usó como medio estándar para el cultivo de la cepa, compuesto por: triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 10 g/L; para ajustar el pH a 7,0 se utilizó NaOH 1,0 N. Los componentes fueron mezclados en solución y sometidos a esterilización húmeda en un autoclave Market Forge, Sterilmatic (Market Forge Industries, Inc., Burlington, VT, USA) a 121 °C, 15 psi, previo a su uso.

Enzima glucosa oxidasa (GOX)

Se utilizó GOX comercial Sigma® G6641, de 10.000 U, lote 070K38131 (Sigma-Aldrich® Co. LLC., Saint Louis, MO, USA), a

partir de la cual se preparó una solución madre de 1000 U/mL, almacenada a -20 °C en un congelador horizontal marca FRIGIDAIRE.

Leche

Se trabajó con leche completa pasteurizada de marca comercial, producida por Lácteos Los Andes, C. A. (Venezuela). Muestras de 250 mL de esta leche fueron sometidas a esterilización húmeda a 121 °C, 15 psi, en autoclave Market Forge, Sterilmatic (Market Forge Industries, Inc., USA); para garantizar una población bacteriana definida durante la ejecución de los experimentos.

Procedimientos

Estandarización de la concentración de glucosa oxidasa (GOX) y glucosa que afectan el crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 25922 en medio Luria-Bertani (LB)

El primer experimento consistió en estandarizar la concentración de enzima GOX y de glucosa, capaces de ejercer el mayor retraso en el crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 25922. Para ello, se hizo crecer el mencionado microorganismo en medio LB con adición de diferentes concentraciones de la enzima y de su sustrato, siguiendo un procedimiento similar al realizado por Tiina y Sandholm (1989), Yoo y Rand (1995) y Massa *et al.* (2001). Se escogió el medio LB como medio de referencia para el crecimiento de la bacteria, puesto que estudios previos han demostrado que es óptimo para el crecimiento de muchas especies bacterianas, entre ellas *E. coli* (Sezonov *et al.*, 2007); por lo que la incorporación de algún aditivo que afecte negativamente su crecimiento resultaría evidente. La enzima GOX se usó en concentraciones de 0,5; 1 y 2 U/mL similares a las utilizadas por Yoo y Rand (1995) y Massa *et al.* (2001). Las unidades de actividad enzimática del extracto se determinaron por el

método colorimétrico descrito por Trinder (1969), con la sustitución de la *o*-dianisidina por 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), tal como lo describió Ojeda *et al.* (2011). En el caso de la glucosa a razón de 0,5; 1,0 y 2,0 %; tomando como referencia los valores a los cuales Yoo y Rand (1995) y Massa *et al.* (2001) encontraron la mejor respuesta de inhibición o retardo del crecimiento, correspondientes a 8,0 y 16,0 mg/mL (equivalentes a 0,8 y 1,6 %) para *P. fragi* y 4,0 mg/mL (equivalente a 0,4 %) para *E. coli*, respectivamente. Sobre esta base, se diseñaron 9 tratamientos (Cuadro 1) y fueron comparados con un control (bacteria inoculada en medio LB estándar sin aditivos).

Para el desarrollo del ensayo se usaron 10 fiolas de 125 mL de capacidad, con 25 mL de medio correspondientes a los tratamientos y control, las cuales fueron inoculados con 400 µL de un pre-inóculo equivalente a una carga promedio de $4,5 \times 10^4$ UFC/mL \pm $0,5 \times 10^4$ UFC/mL. Se incubaron a 37 °C bajo agitación continua a 200 rpm durante 300 min, en un incubador New Brunswick Scientific, Controlled Environment Incubator Shaker (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, New Jersey, USA). El crecimiento fue monitoreado por el cambio de turbidez a 600 nm, en un espectrofotómetro BECKMAN, modelo DU® 650 (Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA, USA), mediante la toma de muestras de 1 mL a intervalos de tiempo de 60 min y transformados a UFC/mL. El ensayo se repitió 3 veces, bajo un arreglo completamente al azar.

Efecto del sistema glucosa oxidasa/glucosa (GOX/G) sobre el crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 25922 en leche

El segundo experimento se diseñó para evaluar el efecto que el sistema GOX/G tuvo sobre una población definida de la cepa *E. coli* ATCC 25922 crecida en leche, antes y después

Cuadro 1.- Tratamientos formulados para la estandarización de las concentraciones de glucosa oxidasa (GOX) y glucosa capaces de incidir sobre el crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 25922 en medio Luria-Bertani (LB).

Tratamientos	Volumen de solución enzimática y cantidad de glucosa adicionada a 25 mL de medio LB
1. GOX 0,5 U/glucosa 0,5 %	12,5 µL de enzima y 0,125 g de glucosa
2. GOX 0,5 U/glucosa 1,0 %	12,5 µL de enzima y 0,25 g de glucosa
3. GOX 0,5 U/glucosa 2,0 %	12,5 µL de enzima y 0,50 g de glucosa
4. GOX 1 U/glucosa 0,5 %	25 µL de enzima y 0,125 g de glucosa
5. GOX 1 U/glucosa 1,0 %	25 µL de enzima y 0,25 g de glucosa
6. GOX 1 U/glucosa 2,0 %	25 µL de enzima y 0,50 g de glucosa
7. GOX 2 U/glucosa 0,5 %	50 µL de enzima y 0,125 g de glucosa
8. GOX 2 U/glucosa 1,0 %	50 µL de enzima y 0,25 g de glucosa
9. GOX 2 U/glucosa 2,0 %	50 µL de enzima y 0,50 g de glucosa

de ser sometido a un proceso térmico típico usado en la industria láctea. Para establecer las condiciones de pasteurización, se tomaron en consideración los hallazgos obtenidos por Noguera *et al.* (2013), quienes encontraron que la menor pérdida de actividad ocurría en el proceso con la menor temperatura y el mayor tiempo, específicamente a 63 °C por 30 min, también conocida como pasteurización lenta (LTLT, ‘low temperatura long time’).

El primer paso fue someter la leche pasteurizada comercial a un proceso de esterilización en autoclave Market Forge, Sterilmatic (Market Forge Industries, Inc., USA) a 121 °C, 15 psi, previo a su uso, a fin de garantizar que los resultados correspondieran a la población y especie bacteriana en estudio. La enzima fue pasteurizada en un incubador de bloque seco (Dry-block Thermostat, Cat. # SLTDB-120) de Seoulin Bioscience (Seoulin Bioscience Co., Ltd., Corea del Sur) a 63 °C por 30 min. Las unidades de muestra se constituyeron en fiolas con 25 mL de leche estéril. Se establecieron 2 tratamientos: 1)

L/GOX/G, constituido de leche inoculada con la bacteria, GOX y glucosa como aditivos; 2) L/GOXp/G, constituido de leche inoculada con la bacteria, GOX pasteurizada y glucosa como aditivos. Los controles del ensayo fueron: Control I, leche inoculada con la bacteria; Control II, leche inoculada y glucosa como aditivo.

Para la inoculación, similar a lo explicado en el ensayo anterior, se realizó un pre-inóculo de la bacteria en medio LB durante 24 h y a partir de este se tomaron volúmenes de 400 ± 50 µL para incorporarlos en las unidades de muestra. La incubación se hizo a 37 °C bajo agitación continua a 200 rpm durante 24 h, en incubador New Brunswick Scientific, Controlled Environment Incubator Shaker (New Brunswick Scientific Co., Inc., USA). El crecimiento fue monitoreado por la técnica de conteo de colonia en placa-agar. Para ello, se tomaron muestras de 1 mL a las 4, 6 y 24 h de incubación, las cuales fueron diluidas de manera seriada e inoculadas en placas de agar medio LB y colocadas en estufa Labnet, modelo

211DS (Labnet International, Inc., Edison, NJ, USA) a 37 °C durante 24 h, para luego realizar el conteo de las colonias. También se midió el pH de las muestras en un pHmetro dual de IQ Scientific Instruments, Inc. (Carlsbad, CA, USA), con el fin de determinar la acidificación del alimento. Este ensayo se hizo bajo un diseño completamente al azar con 4 repeticiones.

Los resultados se expresaron en función de un índice de crecimiento calculado como la expresión matemática que cuantifica el número de veces que *E. coli* fue capaz de multiplicarse en el tiempo, con respecto a su población inicial. Para determinarlo se dividió el número de colonias cuantificadas para un tiempo determinado (4, 6 y 24 h) entre el número de colonias cuantificadas para el tiempo cero. Este índice se utilizó con la finalidad de homogeneizar los resultados de las repeticiones realizadas del ensayo y poder analizar con mayor objetividad y exactitud el comportamiento observado.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se hizo con el programa Microsoft® Office Excel, versión 2007 (Microsoft® Corporation, Redmond, WA, USA) para calcular medias, desviaciones estándares, índices de crecimiento, construir curvas de crecimiento y realizar el análisis de varianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

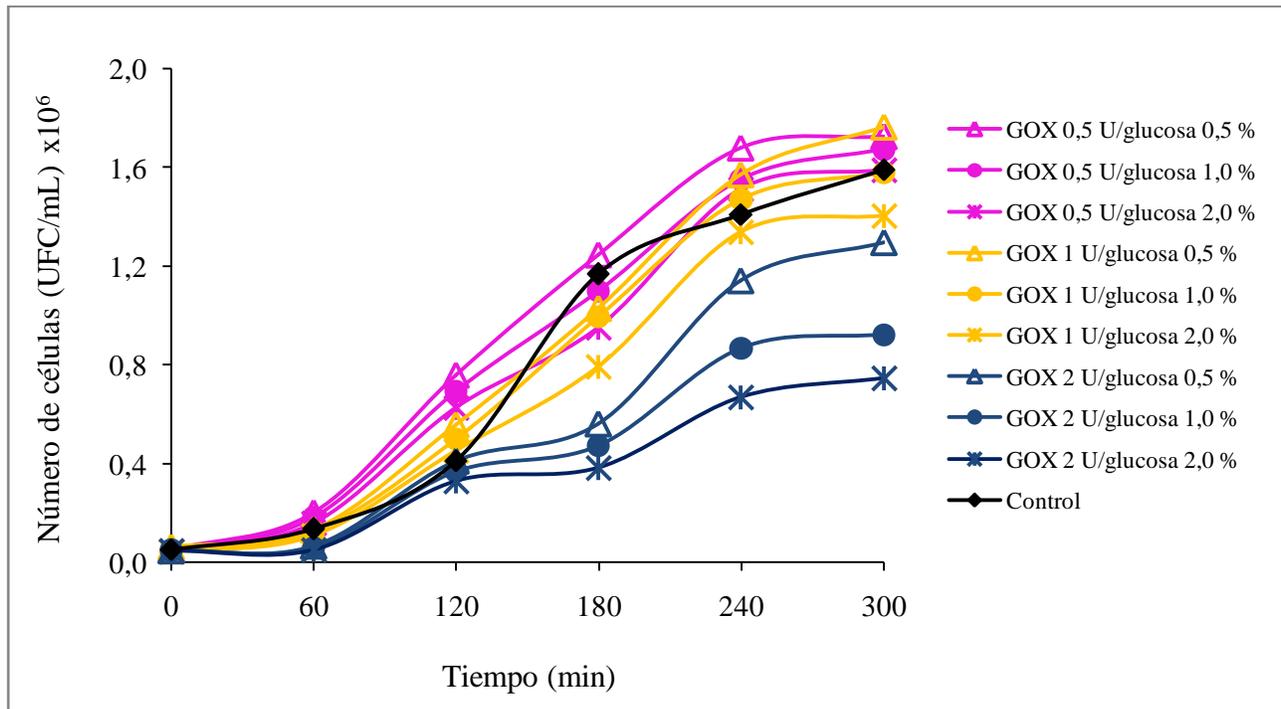
Concentraciones de glucosa oxidasa (GOX) y glucosa capaces de retardar el crecimiento de la cepa en estudio

Las células de *E. coli* ATCC 25922 inoculadas en medio LB con adición del sistema GOX/G, exhibieron crecimientos y poblaciones finales distintas dependiendo de la concentración de enzima y glucosa incorporadas.

En la Fig. 1, se puede observar que la adición de 0,5 y 1 U de enzima por mL de medio, en la mayoría de los casos, no afectó el crecimiento de la bacteria, alcanzando un número de células totales similares o superiores a las crecidas en el medio control (LB sin aditivos), entre $1,5$ y $1,7 \times 10^6$ UFC/mL. Solamente la combinación de 1 U y 2,0 % de glucosa, ocasionó un crecimiento ligeramente inferior al control ($1,4 \times 10^6$ UFC/mL). Cuando se aumentó la concentración de la enzima a 2 U/mL, el crecimiento resultó significativamente menor al control ($p < 0,05$), disminuyendo el número total de células a medida que se adicionó mayor cantidad de glucosa ($1,2 \times 10^6$ a $9,2 \times 10^5$ y $7,4 \times 10^5$ UFC/mL, respectivamente).

Estos resultados tienen cierta similitud con las curvas de crecimiento publicadas por Massa *et al.* (2001), para la cepa *E. coli* expuesta a combinaciones de 0,5 y 1 U/mL de GOX con 1,0 y 2,0 mg/mL de glucosa, durante las primeras 12 h de cultivo. En esas curvas no se observaron diferencias entre el valor en log UFC/mL alcanzado por el control y el de los tratamientos; solo el incremento de la concentración de glucosa a 4,0 mg/mL, generó un retardo sobre el crecimiento hasta lograr la completa inhibición a las 48 h.

Por otra parte, como la GOX cumple con una cinética tipo Michaelis-Menten (Bankar *et al.*, 2009), existe una dependencia entre la velocidad de reacción y la concentración de sustrato cuando la enzima no está saturada, comportándose como una reacción de primer orden. Esto explica los resultados observados al combinar 2 U/mL de GOX con diferentes cantidades de glucosa, a medida que se incrementó la concentración del sustrato fue mayor el retardo en el crecimiento de la cepa en estudio. La velocidad de formación de los productos generados por la oxidación de la glucosa con actividad antimicrobiana, tales como el ácido glucónico y el peróxido de hidrógeno (Fresl *et al.*, 1984; Field *et al.*, 1986; Massa *et al.*, 2001), aumentó



$n = 30$.

Los puntos de coordenadas representan el valor promedio de 3 repeticiones.

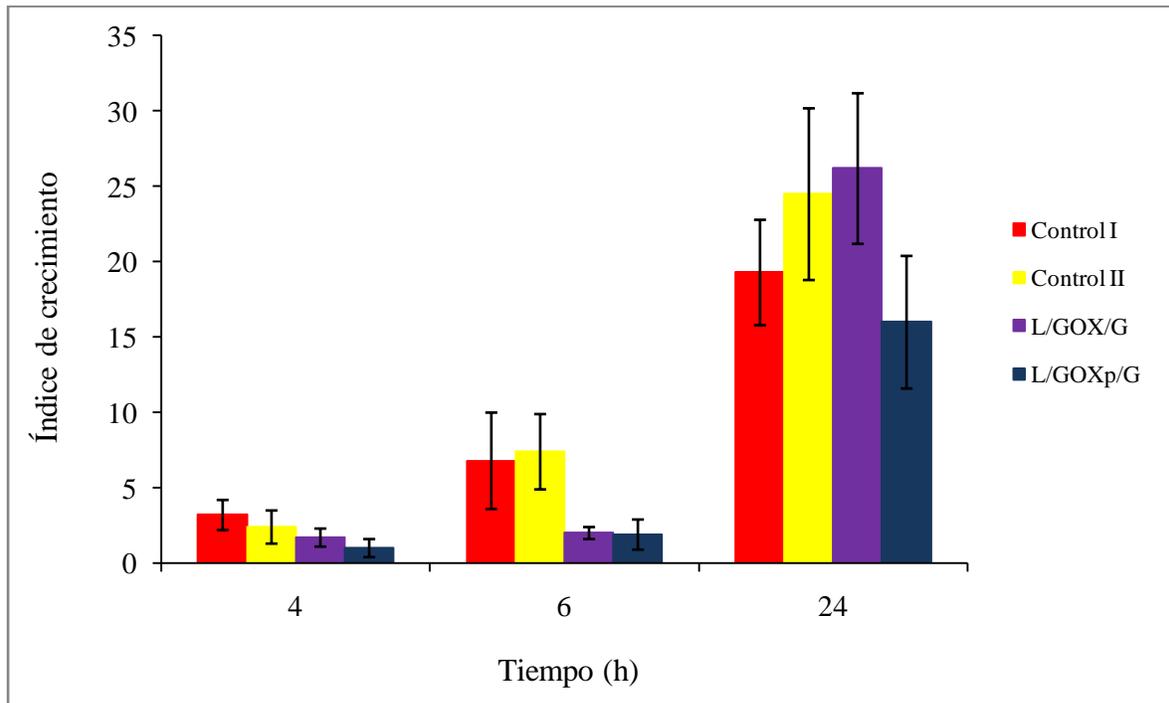
Figura 1.- Curvas de crecimiento de la cepa de *E. coli* ATCC 25922 en medio Luria-Bertani, en presencia de glucosa oxidasa (GOX) y glucosa en diferentes concentraciones.

a medida que se adicionó mayor cantidad de glucosa. Esto también demostró que, aun cuando se establecieron concentraciones superiores a las informadas por otros autores (Tiina y Sandholm, 1989; Yoo y Rand, 1995; Massa *et al.*, 2001), ninguna alcanzó la saturación de la enzima. Estudios como el conducido por Zoghbi *et al.* (2008), determinaron que la velocidad máxima de una GOX producida a partir de una cepa de *A. niger*, fue de 150 mM equivalente a una concentración de 27 mg/mL o 2,7 % de glucosa.

A partir de estos resultados se decidió utilizar la combinación de 2 U de GOX y 2,0 % de glucosa para agregarlos como aditivos en la leche.

Efecto del sistema glucosa oxidasa/glucosa (GOX/G) sobre el crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 25922 en leche

Al comparar los índices de crecimiento de la bacteria en presencia de los sistemas ensayados versus los controles, se evidenció el efecto negativo que tiene el sistema GOX/G para la proliferación de la población bacteriana, durante las primeras 6 horas de cultivo, independientemente del tratamiento térmico (Fig. 2). A las 4 horas se observó una pequeña diferencia en el crecimiento de las muestras que contenían los sistemas enzimáticos con respecto a los controles. Esta diferencia que se hizo significativa a las 6 horas ($p < 0,05$), tiempo en que el índice de crecimiento de las muestras con el sistema GOX/G sin pasteurizar y



$n = 16$.

Los valores son el promedio de 4 repeticiones.

■ Control I: leche inoculada con la bacteria.

■ Control II: leche inoculada y glucosa como aditivo.

■ L/GOX/G: leche inoculada con la bacteria, GOX y glucosa como aditivos.

■ L/GOXp/G: leche inoculada con la bacteria, GOX pasteurizada y glucosa como aditivos.

Figura 2.- Índices de crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 en leche.

pasteurizado, alcanzaron valores promedios alrededor de 2, mientras que los índices de los controles superaron las 5 unidades. Este efecto no se prolongó para las 24 h, los índices resultaron superiores a 15 unidades y no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos. Sin embargo, se observó que el índice promedio de las células crecidas en el sistema con la GOX pasteurizada resultó menor que el de las crecidas con la enzima sin pasteurizar, aunque esta diferencia no fue significativa ($p > 0,05$), debido a la variabilidad de los datos para este tiempo.

En lo que respecta al pH, se observó que las muestras a las cuales se les incorporó el

sistema GOX/G mantuvieron valores por encima de 6 durante las primeras 6 h, mientras que en los controles se encontraron pH menores a 6, más bajos que el pH inicial. Para las 24 h, todas las muestras exhibieron pH bajos inferiores a 5, demostrando la acidificación de la leche (Cuadro 2). En general, la reducción del pH en todas las muestras se asoció con el crecimiento celular, a medida que se incrementó la actividad metabólica de las células bacterianas la leche se fue acidificando. Por ello, en el caso de los controles, donde el índice de crecimiento fue mayor durante las primeras 6 h, la reducción del pH fue más evidente.

Cuadro 2.- Variación del pH de las muestras de leche inoculadas con la bacteria *E. coli* ATCC 25922, con y sin adición del sistema GOX/G.

Tratamiento	Tiempo	pH			
		0 h	4 h	6 h	24 h
Control I		6,53 ± 0,12	5,87 ± 0,13	5,16 ± 0,11	4,27 ± 0,15
Control II		6,55 ± 0,13	5,63 ± 0,15	5,13 ± 0,09	4,22 ± 0,18
L/GOX/G		6,48 ± 0,16	6,40 ± 0,12	6,19 ± 0,15	4,78 ± 0,17
L/GOXp/G		6,58 ± 0,10	6,48 ± 0,15	6,25 ± 0,12	4,86 ± 0,16

Control I: leche inoculada con la bacteria.

Control II: leche inoculada y glucosa como aditivo.

L/GOX/G: leche inoculada con la bacteria, GOX y glucosa como aditivos.

L/GOXp/G: leche inoculada con la bacteria, GOX pasteurizada y glucosa como aditivos.

En función de estos resultados, se presume que el retardo en el crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 25922 en leche con el sistema GOX/G y GOXp/G, durante las primeras horas, fue ocasionado por la acción del peróxido de hidrógeno producido por el sistema y no por el ácido glucónico, a diferencia de lo descrito por Massa *et al.* (2001). Las razones de esta discrepancia radican en que, en primer lugar, el tiempo de incubación fue menor al descrito por los autores, con mediciones a las 0, 4, 6 y 24 h. En segundo lugar, el pH de las muestras de leche se mantuvo entre $\approx 6,5$ y $\approx 6,2$ durante las primeras 6 h, por lo que no hubo un descenso importante que se pudiera asociar a una alta producción de ácido capaz de afectar el crecimiento celular.

En cuanto a la diferencia observada a las 24 h, entre los índices promedios de crecimiento de las bacterias en presencia de GOX pasteurizada y GOX sin tratamiento térmico, se consideró pudo estar asociada a la presencia de trazas de la enzima catalasa (CAT) en el extracto de GOX, tal como lo indica el fabricante. La catalasa (EC 1.11.1.6) es una hemoproteína que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno

(NC-IUBMB, 2013). Cuando GOX actúa en presencia de CAT, el peróxido de hidrógeno producido es descompuesto, lo que disminuye el efecto antimicrobiano tal como lo demostraron (Massa *et al.*, 2001). La enzima GOX es termorresistente y mantiene buenos niveles de actividad catalítica y antimicrobiana, después de una pasteurización a 63 °C por 30 min (Noguera *et al.*, 2013). A diferencia, se ha documentado que la enzima CAT, pierde un alto porcentaje de su poder catalítico al ser expuesta a una temperatura de 60 °C, exhibiendo una actividad remanente de 20 % tal como lo demostraron Castro-Rivero *et al.* (2006), en un extracto enzimático aislado de una fuente vegetal (*Acanthocereus pitajaya*). En consecuencia, se presume que el tratamiento térmico pudo eliminar la actividad de las trazas de CAT, lo que permitió prolongar el efecto del peróxido producido por el sistema GOX pasteurizada/glucosa por mayor tiempo. Sin embargo, no se puede precisar este lapso de tiempo, ya que no se hicieron mediciones intermedias entre los tiempos de 6 y las 24 h.

Adicionalmente, la alta variabilidad de los datos tampoco permitió establecer de manera concluyente si la enzima pasteurizada fue capaz de retrasar por mayor tiempo el crecimiento celular.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El sistema glucosa oxidasa/glucosa (GOX/G) incorporado en leche a razón de 2 U/mL de la enzima y 2,0 % de glucosa, ocasionó un retraso en el crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 25922 durante las primeras horas de incubación, más no ocasionó su total inhibición. Este resultado proyecta a la enzima glucosa oxidasa (GOX) como un aditivo natural que pudiese mantener la calidad microbiológica de la leche, durante las primeras horas postproceso de pasteurización.

También podría utilizarse como aditivo natural en leche cruda y potenciar la acción del sistema lactoperoxidasa. La incorporación de GOX y glucosa en la leche cruda favorecería la producción del peróxido de hidrógeno, el cual cumpliría una doble función, primero como agente antimicrobiano *per se* y en segundo lugar, serviría como sustrato para el sistema lactoperoxidasa y formar así el ácido hipotiocianoso, el cual a su vez también tienen efecto antimicrobiano. Esto le brindaría una mayor protección a la leche cruda durante etapas como la de transporte desde las fincas productoras y las fábricas, o en ocasiones cuando las condiciones de refrigeración no estén garantizadas para el almacenamiento, previo al procesamiento. Futuras investigaciones pueden enfocarse en evaluar este potencial sobre bacterias nativas de la leche y cepas asociadas a enfermedades de transmisión alimentaria.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue desarrollado gracias al financiamiento del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC). Los hallazgos aquí descritos son parte de los resultados del proyecto 2011-003 aprobado y financiado por este organismo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bankar, Sandip B.; Bule, Mahesh V.; Singhal, Rekha S. and Ananthanarayan, Laxmi. 2009. Glucose oxidase - an overview. *Biotechnology Advances*. 27(4):489-501.
- Castro-Rivero, Jhon Alexander; Baquero-Duarte, Lucía Eestrella y Narváez-Cuenca, Carlos Eduardo. 2006. Catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasas de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*). *Revista Colombiana de Química*. 35(1):91-101.
- Celis, Mauricio y Juárez, Daniel. 2009. *Microbiología de la leche. Seminario de Procesos Fundamentales Físico-Químicos y Microbiológicos. Especialización y Maestría en Medio Ambiente, Universidad Tecnológica Nacional. Argentina: Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional (edUTecNe)*. http://www.edutecne.utn.edu.ar/sem_fi_qui_microb_09/microbiologia_leche.pdf
- COVENIN. 1994. Comisión Venezolana de Normas Industriales. *Leche pasteurizada (2da. revisión)*. Norma Venezolana COVENIN 798:1994. Caracas, Venezuela.
- Díaz, C. 2000. *Microbiología de la leche y de los productos lácteos*. Mérida, Venezuela: Editorial Venezolana, C. A.
- FAO/OMS. 1991. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura-Organización Mundial de la Salud. *Directrices para la conservación de la leche cruda mediante la aplicación del sistema de la lactoperoxidasa*. CAC/GL 13-1991.
- FAO/WHO. 2006. Food and Agriculture Organization of the United Nations-World Health Organization. *Benefits and potential risks of the lactoperoxidase system of raw milk preservation. Report of an FAO/WHO technical meeting*. 28 November-2 December, 2005. Rome, Italy.

- Fiedurek, J. and Gromada, A. 2000. Production of catalase and glucose oxidase by *Aspergillus niger* using unconventional oxygenation of culture. *Journal of Applied Microbiology*. 89(1):85-89.
- Field, Cynthia E.; Pivarnik, Lori F.; Barnett, Stanley M. and Rand Jr., Arthur G. 1986. Utilization of glucose oxidase for extending the shelf-life of fish. *Journal Food Science*. 51(1):66-70.
- Fresl, J.M.; Samuelson, K.J.; Froning, G.W. and Rupnow, J.H. 1984. Evaluation of glucose oxidase-catalase treatment to improve the microbiological quality of poultry meat. *Poultry Science*. 63(4):841-843.
- Hatzinikolaou, D.G.; Hansen, O.C.; Macris, B.J.; Tingey, A.; Kekos, D.; Goodenough, P. and Stougaard, P. 1996. A new glucose oxidase from *Aspergillus niger*: characterization and regulation studies of enzyme and gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 46(4):371-381.
- Hatzinikolaou, D.G. and Macris, B.J. 1995. Factors regulating production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*. 17(6):530-534.
- Luigi, Teresita; Rojas, Legna y Valbuena, Oscar. 2013. Evaluación de la calidad higiénico-sanitaria de leche cruda y pasteurizada expendida en el estado Carabobo, Venezuela. *Salus*. 17(1):25-33.
- Massa, S.; Petruccioli, M.; Brocchi, Giada F.; Atieri, Clelia; Sinigaglia, Milena and Spano, G. 2001. Growth inhibition by glucose oxidase system of enterotoxic *Escherichia coli* and *Salmonella derby*: *in vitro* studies. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 17(3):287-291.
- NC-IUBMB. 1961. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Enzyme nomenclature. Recommendations. EC 1.1.3.4. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/3/4.html>
- NC-IUBMB. 2011. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Enzyme nomenclature. Recommendations. EC 1.11.1.7. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/11/1/7.html>
- NC-IUBMB. 2013. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Enzyme nomenclature. Recommendations. EC 1.11.1.6. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/11/1/6.html>
- Noguera, Nirza; Ojeda, Luis; Velásquez, Ingrid; Ramírez, Ninoska y Yépez, Antonio. 2013. Efecto de tres condiciones de pasteurización sobre la actividad enzimática y antimicrobiana de un extracto de glucosa oxidasa. *BioTecnología*. 17(2):31-40.
- Ojeda, Luis; Noguera, Nirza; Triana, Juana Ledia y Triana-Alonso, Francisco. 2011. Obtención de un extracto enzimático de glucosa oxidasa y catalasa con potencial antioxidante en alimentos, en un medio de cultivo no convencional. *BioTecnología*. 15(2):48-58.
- Orberá-Ratón, Teresa de los Milagros. 2004. Acción perjudicial de las levaduras sobre los alimentos. *Revista Cubana de Salud Pública*. 30(3). http://www.bvs.sld.cu/revistas/spu/vol30_3_04/spu16304.htm
- Pluschkell, Stefanie; Hellmuth, Karsten and Rinas, Ursula. 1996. Kinetics of glucose oxidase excretion by recombinant *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Bioengineering*. 51(2):215-220.
- Ponce, P. 2010. Lactoperoxidase system under tropical conditions: use, advantages and limitations in conservation of raw milk and potential applications. *Revista de Salud Animal*. 32(3):146-154.
- Rodríguez-Sauceda, Elvia Nereyda. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*. 7(1):153-170.

- Rojas-Valencia, Ma. Neftalí; Orta de Velásquez, Ma. Teresa y Franco, Víctor. 2008. Comparación de mecanismos de acción de desinfectantes aplicados en aguas residuales. *Aquaforum*. 12(49):19-22.
- Sezonov, Guennadi; Joseleau-Petit, Danièle and D'Ari, Richard. 2007. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology*. 189(23):8746-8749.
- Tiina, Mattila and Sandholm, M. 1989. Antibacterial effect of the glucose oxidase-glucose system on food-poisoning organisms. *International Journal of Food Microbiology*. 8(2):165-174.
- Tormo-Maicas, Vicente y Julián-Rochina, Iván. 2009. Antisépticos. Fundamentos de uso en la práctica clínica. Valencia, España: Ediciones M.C. (Fotocopias "La Escuela". Facultat d'Infermeria i Podologia, Universitat de València). Libro muestra Web. http://www.uv.es/curafisiologica/documentos/publicaciones/muestra_web_antisepticos.pdf
- Trinder, P. 1969. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *Journal of Clinical Pathology*. 22(2):158-161.
- Valbuena, Emiro; Castro, Gustavo; Lima, Keidy; Acosta, Wendy; Bríñez, Wilfrido y Tovar, Armando. 2004. Calidad microbiológica de las principales marcas de leche pasteurizada distribuidas en la ciudad de Maracaibo, Venezuela. *Revista Científica (FCV-LUZ)*. XIV(1):59-67.
- Wong, Chun Ming; Wong, Kwun Hei and Chen, Xiao Dong. 2008. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 78(6):927-938.
- Yoo, W. and Rand., A.G. 1995. Antibacterial effect of glucose oxidase on growth of *Pseudomonas fragi* as 8 related to pH. *Journal Food Science*. 60(4):868-871.
- Zoghbi, Normig; Ojeda, Luis; Noguera, Nirza; Yépez, Antonio; Camargo, Hendricka y Triana-Alonso, Francisco. 2008. Extracción y purificación de glucosa oxidasa para fines diagnósticos producida en medios a base de fertilizantes y azúcar industrial. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 28(1):31-37.