

**Título:** OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS IMPLICADAS EN LA DETERMINACIÓN DE COLESTEROL: COLESTEROL OXIDASA Y NADH PEROXIDASA

**Nombre:** SARABIA MESEGUER, M<sup>a</sup> DESAMPARADOS

**Universidad:** Universidad de Murcia

**Departamento:** BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

**Fecha de lectura:** 31/05/2002

**Programa de doctorado:** BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Dirección:**

> **Director:** FRANCISCO GARCÍA CARMONA

> **Codirector:** ALVARO SÁNCHEZ FERRER

**Tribunal:**

> **presidente:** ROMUALDO MUÑOZ GIRÓN

> **secretario:** CATALINA EGEA GILABERT

> **vocal:** JUANA CABANES ROS

> **vocal:** JOSÉ MANUEL LÓPEZ NICOLAS

> **vocal:** ANTONIA MURCIA MARIA

**Descriptores:**

> QUIMICA

> ENZIMOLOGIA

> BIOQUIMICA

**El fichero de tesis** no ha sido incorporado al sistema.

**Localización:** BIBLIOTECA GENERAL DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

**Resumen:** Desde la perspectiva de búsqueda de fuentes alternativas para determinar la concentración de colesterol, tanto en suero como en alimentos, han sido estudiadas dos enzimas oxidativas, colesterol oxidasa y NADH peroxidasa.

La enzima colesterol oxidasa fue aislada de *Streptomyces lividans* 1326 pCO-3. En primer lugar fue realizada la optimización del cultivo del microorganismo siendo los valores 2 vvm de aireación y 600 rpm de agitación los óptimos encontrados para la producción de la enzima. Colesterol oxidasa fue posteriormente purificada a homogeneidad en un solo paso cromatográfico, utilizando una columna de afinidad con colesterol consiguiéndose una purificación de 8,91 veces y una actividad específica de 28,6.

Por último, el gen *choA* productor de la enzima colesterol oxidasa fue clonado en *Pichia pastoris* GS115, lográndose la integración de este heterólogo en el genoma de la levadura. La producción máxima de la enzima fue conseguida tras añadir al medio de cultivo una concentración de metanol del 3% y mantener las condiciones de aireación y agitación respectivamente en 2.5 vvm y 250 rpm mediante la utilización de un fermentador.

Por otro lado, la enzima NADH peroxidasa fue aislada de la bacteria *Aerococcus viridans* ATCC 11563. Las condiciones óptimas de producción de la enzima fueron obtenidas en medios con glucosa como fuente de carbono y catalasa, coincidiendo con un valor nulo de peróxido de hidrógeno en el medio extracelular. Posteriormente, la enzima fue purificada a homogeneidad mediante un protocolo que combinó la extracción con lisozima, precipitación con sulfato amónico, una columna de interacción hidrofóbica y una columna de hidroxipatilo, de tal forma que la actividad específica encontrada fue de 114 con un purificación de 21,8. Tras la realización del análisis molecular de la enzima, el peso molecular hallado mediante la técnica de filtración en gel fue de 215.000 Da. Debido a que en