



UNIVERSIDAD  
DEL AZUAY

Universidad del Azuay

Facultad de Ciencia y Tecnología

Carrera de Biología

PRODUCCIÓN HETERÓLOGA Y  
CARACTERIZACIÓN DE UNA LACASA  
MICROBIANA

Autora:

**Gabriela Pulgarín Alvarado**

Director:

**Rodrigo Caroca Cáceres**

**Cuenca – Ecuador**

**2025**

## **DEDICATORIA**

A mis padres y hermana, Boris, Liz y Elena, que siempre estuvieron ahí con su amor incondicional, apoyo y confianza, guiándome en cada paso del camino. A mis abuelos, Tato, Ceci y Oma, por sus sabios consejos y todo su cariño. A mis amigos, Elisa, Michelle, Dome, Lua y Pancho, quienes con sus risas y momentos de desconexión, han hecho de este viaje algo mucho más llevadero. Sin cada uno de ustedes, este recorrido no habría sido lo mismo ni tan fácil de llevar. Este trabajo es también el reflejo de todo lo que he aprendido de ustedes, y me siento profundamente agradecida por tenerlos en mi vida.

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi director, Rodrigo, por su guía constante, por compartir su experiencia y visión en cada etapa y por ser un mentor que siempre me motivó a dar lo mejor de mí. A mi tutor, David, por su paciencia y apoyo, que hizo posible que este proyecto tomara forma. A Dani y Diego, por estar siempre dispuestos a ayudarme con sus consejos y orientación cada vez que los necesité. A Ari, por su valiosa ayuda en la parte experimental de este proyecto, aportando su dedicación y esfuerzo en cada paso.

A mis padres, quienes no solo han sido mi fuente de apoyo en cada paso de este proceso, sino que me han mostrado la verdadera importancia de la dedicación y el esfuerzo. Gracias por estar a mi lado en cada logro, grande o pequeño, con amor y confianza.

## **RESUMEN:**

El presente estudio se centró en la producción, purificación y caracterización de una lacasa recombinante de *Bacillus coagulans* expresada en *Escherichia coli* C41. Se evaluaron distintas fuentes y concentraciones de cobre, así como diferentes concentraciones de IPTG, identificándose que la combinación de 1 mM de IPTG y 0,25 mM de CuCl<sub>2</sub> bajo agitación generó las mayores actividades enzimáticas en las condiciones ensayadas. La proteína recombinante fue purificada mediante cromatografía de afinidad con etiqueta de histidina utilizando el sistema ÄKTA pure, obteniéndose una proteína de aproximadamente 65 kDa con alta pureza. La caracterización enzimática reveló, utilizando 2,6-DMP como sustrato, un perfil bimodal de actividad en función del pH, con máximos a pH 7 en buffer citrato/fosfato y a pH 9 en buffer fosfato de sodio. La temperatura óptima fue de 40 °C en ambos casos, con una actividad significativamente mayor que la observada a 20 °C y 30 °C. Por otro lado, el pH 5 mostró la menor actividad entre todas las condiciones evaluadas. Estos resultados destacan el potencial de esta lacasa recombinante para aplicaciones biotecnológicas, especialmente en la degradación de contaminantes fenólicos persistentes en ambientes acuáticos.

**Palabras clave:** Biorremediación, caracterización enzimática, expresión heteróloga, lacasa bacteriana, purificación enzimática.

## **ABSTRACT:**

This study focused on the production, purification, and characterization of a recombinant laccase from *Bacillus coagulans* expressed in *Escherichia coli* C41. Induction conditions were evaluated by testing different sources and concentrations of copper and IPTG. Among the conditions tested, the combination of 1 mM IPTG and 0.25 mM CuCl<sub>2</sub> under shaking yielded the highest enzymatic activity. The recombinant protein was purified using histidine-tag affinity chromatography with the ÄKTA pure system, yielding a highly pure ~65 kDa protein. Enzymatic characterization revealed, using 2,6-DMP as substrate, a bimodal activity profile in relation to pH, with peaks at pH 7 in citrate/phosphate buffer and at pH 9 in sodium phosphate buffer. For both cases, the optimal temperature was 40 °C, showing significantly higher activity compared to 20 °C and 30 °C. In contrast, pH 5 resulted in the lowest enzymatic activity among all tested conditions. These findings highlight the potential of this recombinant laccase for biotechnological applications, particularly in the degradation of persistent phenolic contaminants in aquatic environments.

**Keywords:** Bacterial laccase, bioremediation, enzymatic characterization, enzyme purification, heterologous expression.