Isolation and characterization of bacterial strains and their enzymes with lignolytic potential

SUPREET KAUR

CENTREFOR RURAL DEVELOPMENT AND TECHNOLOGY

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

AUGUST 2020

Isolation and characterization of bacterial strains and their enzymes with lignolytic potential

by

SUPREET KAUR

Centre for Rural Development and Technology

Submitted

In fulfilment of the requirements of the degree of Doctor of Philosophy

to the

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

AUGUST 2020

Certificate

This is to certify that the thesis entitled "**Isolation and characterization of bacterial strains and their enzymes with lignolytic potential**" submitted by **Ms. Supreet Kaur** to the Centre for Rural Development and Technology, Indian Institute of Technology Delhi for the award of **DOCTOR OF PHYLOSOPHY** is a record of the bonafide research work carried out by her. Ms. Supreet Kaur has worked under our supervision for submission of this thesis which to our knowledge has reached requisite standard. To the best of our knowledge the results in this thesis have not been submitted for any degree or diploma in any other Institute or University. She has fulfilled all the requirements for submission of her thesis.

Dr. Hariprasad P.
Centre For Rural Development
and Technology
Indian Institute of Technology Delhi
New Delhi

Prof. V. K. Vijay
Centre For Rural Development
and Technology
Indian Institute of Technology Delhi
New Delhi

Acknowledgements

It is an honor for me to be in the academic system of Indian Institute of Technology Delhi and choosing the area of research "Environmental Biotechnology". This subject of research is becoming more interdisciplinary and challenging for many environmentalists as well as biologists. From the beginning of my research, I have been in a continuous learning process and have successfully carried out the planned experiments from which significant results have been incorporated in this thesis, "**Isolation and Characterization of Bacteria and Their Enzymes with Lignolytic Potential**".

I would like to thank **DST-SERB** for providing funding for DST Young Scientist Project entitled "**Isolation and characterization of bacterial strains and their enzymes with lignolytic potential"**. I sincerely thank the **Indian Institute of Technology Delhi** for financial support and providing necessary research space and facilities for the chosen work. I am grateful to my PhD supervisors **Dr. Hariprasad P.** and **Prof. V. K. Vijay** for their constant encouragement and guidance to think beyond conventional experimentation. I sincerely thank the **Head of the Center, all faculty members and Prof. S. N. Naik, Prof. Anushree Malik, Prof. Zia Sheikh** for their timely suggestions and moral support. It has been a valuable experience at Centre for Rural Development and Technology where I got constant support and co-operation of **all my lab mates, and Pratibha and Hridayaram** and all other students of the center. I wish them all success in their life and I wish the center to achieve its glory through modern scientific temperaments. All of them have given me a platform to enhance my knowledge and cope with growing scientific arena.

I would also like to acknowledge **Nano-Research Facility**, Indian Institute of Technology Delhi and **SAIF,** Indian Institute of Technology Bombay and **SAIF**, Centre for Drug Research Institute, Lucknow for processing GC-MS/MS samples and LC-MS/MS samples.

I am grateful to **my family** and **Almighty** for their blessings and support throughout my research for this duration.

Supreet Kaur

Abstract

The Western Ghats region of Karnataka, India, is an unhabituated area where native micro-organisms have been known to degrade lignin. Among such micro-organisms, white-rot fungi are well reported for their ability to degrade lignin by the production of extracellular laccases and peroxidases. Brown rot fungi partially modify the lignin. Also, bacteria are well reported to degrade lignin. In the current study, the ability of the "native bacteria" has been explored to degrade lignin via the production of extracellular enzymes and to explore the genomics of the best-known lignin degrader.

Lignin, a complex heteropolymer, is one of the renewable organic sources present on the earth that plays a vital role for the growth and survival of the plants. On the other hand, when it comes to the application of the lignocellulosic biomass, the whole fraction of lignin is considered as waste. In most of the cases, lignin which is obtained as a by-product via various industrial processes is burnt as a source of energy or released into water bodies creating an unfavorable condition to aquatic life. Though several researchers had made efforts to valorize the lignin to value-added chemicals but its adoption at the industrial level is awaited. In nature, microbial depolymerization and degradation of lignin is a common process through which they convert lignin to various intermediates, finally to acetyl CoA as a feeding molecule of the Tri Carboxylic Acid cycle. The most common lignin-degrading microbes are white-rot basidiomycetes, brown-rot basidiomycetes, and bacteria. During the processes of lignin depolymerization, degradation and assimilation, several intermediates are produced which are of economic importance such as vanillin, catechol, and propionic acid, etc. Though the fungal biodegradation of lignin is extensively studied, but only a small population of lignin-degrading bacteria are explored. There is always a scope to determine new pathways of lignin degradation and intermediate compounds of high value. Hence, the ambition of the authors through this

study is to focus on the bacterial lignin depolymerization and degradation pathways and further possible route of high-value chemicals.

In chapter 3, 24 soil samples were collected from the Western Ghats, Karnataka region, and brought to the Environmental biotechnology laboratory for further processing. 112 suspected lignolytic bacteria were isolated from those 24 samples based on their ability to grow on Kraft Lignin (KL). These bacteria were also checked for their growth on different carbon sources where they showed good growth on paddy straw powder followed by popular wood powder and KL (with/without glucose and peptone). Bacteria were able to decolorize or adsorb lignolytic indicator dyes to various extents showing their ability to break different bonds of lignin. Lignin degradation studies also revealed that 24 bacteria were potential lignin degraders, capable of degrading KL > 50 %. Morphological, biochemical characterization along with 16S rRNA sequencing of these isolates revealed the presence of *Bacillus* sp. majorly, with four actinomycetes viz, *Streptomyces mangrovi* CRDT-EB-18.4, Streptomyces sp. CRDT-EB-19.7, *Streptomyces griseorubens* CRDT-EB-21.6, and *Streptomyces* sp. CRDT-EB-21.12. The bacteria were also found to be non-pathogenic.

In chapter 4, all the 24 selected bacteria were found to be significant lignin degraders, as they recorded growth in media amended with 200 to 800 ppm KL and follow a particular pattern of lignin degradation as analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) and gel permeation chromatography (GPC). The decrease in the absorbance and shift in the major peak towards later retention time and appearance of additional minor peaks indicated the degradation of high molecular weight lignin and the formation of lower molecular weight lignin. Analysis of bacterial degraded products of lignin through gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS/MS) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) in culture supernatant revealed that they majorly follow ortho cleavage pathway in addition to meta cleavage pathway, which was deduced using the compounds identified such as vanillic acid, protocatechuic acid, gentisic acid, coniferyl alcohol, and cinnamic acid, etc. Further, the above results were supported by aromatic monomer utilization experiments which also indicated that these lignin-degrading bacteria have the ability to assimilate these monomers as a carbon source by up taking and degrading them by using the intercellular enzymes. The dominant bacterial enzyme responsible for lignin degradation was identified as a peroxidase in most efficient lignin-degrading bacteria *Streptomyces griseorubens* CRDT-EB-21.6, which was further purified and characterized.

In chapter 5, it was found that the isolate *Streptomyces griseorubens* CRDT-EB-21.6 was showing the highest enzyme activity in the presence of H_2O_2, thereby showing the possible involvement of a peroxidase in lignin degradation. The enzyme was further purified to nine fold using the size exclusion chromatography and the activity was increased to 3.09 U from 0.34 U. The purified enzyme was stable over a wide range of temperatures. However, the enzyme was stable only for a pH of 3.0. The enzyme activity was found to be inhibited by Cu^{2+}, and Hg^{+}, but increased by K^{+}, Mg^{2+}, Li^{+}, and Ca^{2+}. Also, the enzyme was found to be stable over a greater range of salt concentration with maximum activity around 60-80 mM NaCl concentration. This clearly shows the stability of the peroxidase enzyme from the isolate CRDT-EB-21.6 over a large spectrum of environmental conditions and thereby proves its capability to match the needs of industrial applications.

In chapter 6, in order to establish the lignin degradation ability of *Streptomyces griseorubens* CRDT-EB-21.6, whole-genome sequencing was performed and analyzed. A total of ~2.11 Gb HQ data of the sample used for de-novo assembly resulting in 343 scaffolds having an assembly size of ~7.2 Mb with an N50 of 36,329 bp. A total of 6471 CDS were predicted from 343 scaffolds. In total, 6441 CDS in NR, 3903 in UniProt, 1471 in KOG, and 3224 CDS in Pfam database were annotated. It was found that the majority of the hits were against the species S*treptomyces griseorubens* followed by *Streptomyces* sp. 4F in the sample. A total of

2410 GO terms were assigned to the CDS wherein, 1634, 999, and 948 GO terms, were assigned to Biological Process, Cellular Component, and Molecular Function, respectively. The pathway analysis was carried out using KAAS server (KEGG Automatic Annotation Server). The CDS were enriched in different functional pathway categories which were predominantly categorized into Metabolism, Genetic Information Processing, Environmental Information Processing, and Cellular Processes. Presence of CDS encoding the xenobiotic biodegradation terpenoids and polyketides metabolic pathways, along with the presence of genes coding for β-ketoadipate, Phenol catabolism, and Gentisate pathway, clearly indicated that the bacteria, *Streptomyces griseorubens* CRDT-EB-21.6 is a potential lignin degrader, and a dynamic research material for future studies as well.

आब्स्ट्रॅक्ट

पश्चिमी घाट क्षेत्र, कर्नाटक, भारत का एक अप्रभावित क्षेत्र है, जो लिग्निन को तोड़ने के लिए देशी सूक्ष्म जीवों के लिए जाना जाता है। ऐसे सूक्ष्म जीवों में, सफेद-सड़न कवक बाह्य कोशिकीय लैकेसिस और पेरोक्सीडेस के उत्पादन द्वारा लिग्निन को तोड़ने की उनकी क्षमता के लिए रिपोर्ट किया गया है। ब्राउन रोट कवक आंशिक रूप से लिग्निन को संशोधित करता है। इसके अलावा, बैक्टीरिया अच्छी तरह से लिग्निन को तोड़ने के लिए रिपोर्ट किया गया है। इस अध्ययन में, "देशी जीवाणुओं" की क्षमता का पता लगाने के लिए बाह्य कोशिकीय एंजाइमों के उत्पादन के माध्यम से लिग्निन को कम करने और सबसे प्रसिद्ध लिग्निन डीजेंडर के जीनोमिक्स की तलाश की गई है।

लिग्निन, एक जटिल हेटरोपॉलीमर, पृथ्वी पर मौजूद अक्षय कार्बनिक स्रोतों में से एक है जो पौधों की वृद्धि और अस्तित्व के लिए महत्वपूर्ण भूमिका निभाता है। दूसरी ओर, जब लिग्नोसेल्युलोसिक बायोमास के आवेदन की बात आती है, लिग्निन के पूरे अंश को बेकार माना जाता है। अधिकांश मामलों में, लिग्निन जिसे विभिन्न औद्योगिक प्रक्रियाओं के माध्यम से उप-उत्पाद के रूप में प्राप्त किया जाता है, ऊर्जा के स्रोत के रूप में जलाया जाता है या जलीय जीवन के लिए प्रतिकूल स्थिति पैदा करने वाले जल निकायों में जारी किया जाता है। हालांकि कई शोधकर्ताओं ने लिग्निन को मूल्य वर्धित रसायनों के लिए वैध बनाने के प्रयास किए थे, लेकिन औद्योगिक स्तर पर इसके अपनाने का इंतजार किया जा रहा है। प्रकृति में, लिग्निन के माइक्रोबियल डेपोलाइमरिज़ेशन और डिग्रेडेशन एक सामान्य प्रक्रिया है जिसके माध्यम से वे लिग्निन को विभिन्न इंटरमीडिएट में परिवर्तित करते हैं, अंत में एसिटाइल सीओए को ट्राई कार्बोक्सिलिक एसिड चक्र के एक खिला अणु के रूप में। सबसे आम लिग्निन-डिग्रेडिंग रोगाणु सफेद-सड़ांध वाले बेसिडिओमाइसेट्स, ब्राउन-रोट बेसिडिओमाइसीस और बैक्टीरिया होते हैं। लिग्निन डेपोलाइराइजेशन, डिग्रेडेशन और अस्मिताकरण की प्रक्रियाओं के दौरान, कई मध्यवर्ती उत्पन्न होते हैं जो आर्थिक महत्व के होते हैं जैसे कि वैनिलिन, कैटेचोल और प्रोपियोनिक एसिड, आदि। हालांकि लिग्निन के फंगल बायोडिग्रेडेशन का बड़े पैमाने पर अध्ययन किया गया है, लेकिन लिग्निन-डिग्रेडिंग बैक्टीरिया की केवल एक छोटी आबादी का पता लगाया गया है। लिग्निन क्षरण और उच्च मूल्य के मध्यवर्ती यौगिकों के नए मार्गों को निर्धारित करने के लिए हमेशा एक गुंजाइश है। इसलिए, इस अध्ययन के माध्यम से लेखकों की महत्वाकांक्षा बैक्टीरिया लिग्निन डेपोलाइराइजेशन और डिग्रेडेशन मार्ग और उच्च मूल्य वाले रसायनों के आगे संभावित मार्ग पर ध्यान केंद्रित करना है।

अध्याय 3 में, पश्चिमी घाट, कर्नाटक क्षेत्र से 24 मिट्टी के नमूने एकत्र किए गए, और आगे की प्रक्रिया के लिए पर्यावरण जैव प्रौद्योगिकी प्रयोगशाला में लाया गया। क्राफ्ट लिग्निन (केएल) पर

बढ़ने की उनकी क्षमता के आधार पर उन 24 नमूनों में से 112 सस्पेक्टेड लिग्नोलिटिक बैक्टीरिया को अलग किया गया था। इन जीवाणुओं को विभिन्न कार्बन स्रोतों पर उनकी वृद्धि के लिए भी जांचा गया जहां उन्होंने धान के पुआल पाउडर पर अच्छी वृद्धि दिखाई और इसके बाद लोकप्रिय लकड़ी के पाउडर और केएल (ग्लूकोज और पेप्टोन के साथ) के साथ। बैक्टीरिया लिग्निन के विभिन्न बंधनों को तोड़ने की क्षमता दिखाते हुए विभिन्न विलुप्त होने वाले रंगों की नकल करने वाले लिग्नलिटिक इंडिकेटर डाइज़ को हटाने या विज्ञापन करने में सक्षम थे। लिग्निन की डिग्रेडेशन के अध्ययन से यह भी पता चला है कि 24 बैक्टीरिया संभावित लिग्निन डिग्रेडर्स थे, जो केएल> 50% को क्षीण करने में सक्षम थे। इन आइसोलेट्स के 16S rRNA अनुक्रमण के साथ रूपात्मक, जैव रासायनिक लक्षण वर्णन बेसिलस स्पीशीस की उपस्थिति का पता चला। प्रमुख रूप से, चार एक्टिनोमाइसेट्स अर्थात स्ट्रेप्टोमाइसेस मैंग्रोवी CRDT-EB-18.4, स्ट्रेप्टोमी स्पीशीस CRDT-EB-19.7, स्ट्रेप्टोमीस ग्रिसेओरुबेन्स CRDT-EB-21.6, और स्ट्रेप्टोमी स्पीशीस CRDT- EB-21.12। बैक्टीरिया गैर-रोगजनक भी पाए गए। अध्याय 4 में, सभी 24 चयनित बैक्टीरिया महत्वपूर्ण लिग्निन डिग्रेडर्स पाए गए, क्योंकि उन्होंने 200 से 800 पीपीएम केएल के साथ मीडिया में वृद्धि दर्ज की और हाइ पर्फ़ॉर्मेन्स लिक्विड क्रोमेटोग्रफी (एचपीएलसी) और जेल पमयेशन क्रोमेटोग्रफी (GPC) द्वारा विश्लेषण के रूप में लिग्निन डिग्रेडेशन के एक विशेष पैटर्न का पालन किया। बाद की अवधारण समय और अतिरिक्त मामूली चोटियों की उपस्थिति के लिए प्रमुख शिखर में अवशोषण और बदलाव में कमी ने उच्च आणविक भार लिग्निन के क्षरण और कम आणविक भार लिग्निन के गठन का संकेत दिया। गैस क्रोमैटोग्राफी-मास स्पेक्ट्रोमेट्री (जीसी-एमएस / एमएस) और तरल क्रोमैटोग्राफी-मास स्पेक्ट्रोमेट्री (एलसी-एमएस / एमएस) के माध्यम से बॅक्टीरियल कल्चर सुपरनैटेंट के विश्लेषण से पता चला कि मेटा क्लीवेज पाथवे के अलावा ऑर्थो क्लीवेज पाथवे का प्रमुख रूप से पालन किया जाता है , जो कि वैनिलिक एसिड, प्रोटोकैटेचिक एसिड, जेंटिसिक एसिड, कॉनफेरील अल्कोहल और सिन्नमीक एसिड, आदि जैसे यौगिकों का उपयोग के माध्यम से ज्ञात किया गया था। इसके अलावा, उपरोक्त परिणामों को सुगंधित मोनोमर उपयोग द्वारा समर्थित किया गया था, जो यह भी संकेत देता था कि लिग्निन-डिग्रेडिंग बैक्टीरिया इन मोनोमर्स को एक कार्बन स्रोत के रूप में आत्मसात करने और अंतरकोशिकीय एंजाइमों का उपयोग करके उन्हें डिग्रेड करने की क्षमता रखते हैं। लिगिन डिग्रेडेशन के लिए जिम्मेदार प्रमुख बैक्टीरियल एंजाइम की पहचान सबसे कुशल लिग्निन-डिग्रेडिंग बैक्टीरिया स्ट्रेप्टोमीस ग्रिसेओरुबेन्स CRDT-EB-21.6 में पेरोक्सीडेस के रूप में की गई थी, जिसे और अधिक शुद्ध और विशेषता बनाया गया था।

अध्याय 5 में, यह पाया गया कि पृथक स्ट्रेप्टोमीस ग्रिसोरूबेंस CRDT-EB-21.6 H_2O_2 की उपस्थिति में उच्चतम एंजाइम गतिविधि दिखा रहा था, जिससे लिग्निन डिग्रेडेशन में पेरोक्सीडेज की

संभावित भागीदारी दिखाई दे रही थी। आकार अपवर्जन क्रोमैटोग्राफी का उपयोग करके एंजाइम को नौ गुना तक शुद्ध किया गया था और गतिविधि को 0.34 यू से 3.09 यू तक बढ़ाया गया था। शुद्ध एंजाइम तापमान की एक विस्तृत श्रृंखला पर स्थिर था। हालांकि, एंजाइम केवल 3.0 के पीएच के लिए स्थिर था। एंजाइम गतिविधि Cu^{2+}, और Hg^{+} द्वारा बाधित पाई गई, लेकिन K^{+}, Mg^{2+}, Li^{+} और Ca^{2+} द्वारा बढ़ी गई। इसके अलावा, एंजाइम को 60-80 मिमी NaCl एकाग्रता के साथ अधिकतम गतिविधि के साथ नमक एकाग्रता की एक बड़ी रेंज पर स्थिर पाया गया था। यह स्पष्ट रूप से पर्यावरण की स्थिति के एक बड़े स्पेक्ट्रम पर अलग CRDT-EB-21.6 से पेरोक्सीडेज एंजाइम की स्थिरता को दर्शाता है और जिससे औद्योगिक अनुप्रयोगों की जरूरतों को पूरा करने की क्षमता साबित होती है।

अध्याय 6 में, स्ट्रेप्टोमाइसेस ग्रिसोरूबेंस CRDT-EB-21.6 की लिग्निन डिग्रेडेशन क्षमता को स्थापित करने के लिए, पूरे जीनोम अनुक्रमण का प्रदर्शन और विश्लेषण किया गया था। डी-नोवो असेंबली के लिए उपयोग किए गए नमूने के कुल ~ 2.11 जीबी मुख्यालय डेटा के परिणामस्वरूप 36332 बीपी के एन 50 के साथ 343 स्कैफोल्ड का एक विधानसभा आकार ~ 7.2 एमबी है। 343 मचानों से कुल 6471 सीडीएस की भविष्यवाणी की गई थी। कुल मिलाकर NR में 6441 CDS, UniProt में 3903, KOG में 1471 और Pfam डेटाबेस में 3224 CDS एनोटेट किए गए। नमूने में यह पाया गया कि हिट्स की अधिकांश प्रजातियाँ स्ट्रेप्टॉमीज़ ग्रिज़ोरूबेंस थीं, इसके बाद स्ट्रेप्टोमी स्पीशीस 4F। कुल 2410 GO की शर्तें CDS को सौंपी गई थीं, जिसमें 1634, 999 और 948 GO की शर्तें क्रमशः बायोलॉजिकल प्रोसेस, सेलुलर कंपोनेंट और मॉलिक्यूलर फंक्शन को सौंपी गई थीं। पाथवे विश्लेषण KAAS सर्वर (KEGG स्वचालित एनोटेशन सर्वर) का उपयोग करके किया गया था। सीडीएस को विभिन्न कार्यात्मक मार्ग श्रेणियों में समृद्ध किया गया था, जिन्हें मुख्य रूप से चयापचय, आनुवंशिक सूचना प्रसंस्करण, पर्यावरण सूचना प्रसंस्करण और सेलुलर प्रक्रियाओं में वर्गीकृत किया गया था। सीडीएस की उपस्थिति जीनोबायोटिक बायोडिग्रेडेशन टेरेपीनोइड्स और पॉलीकेटाइड्स मेटाबॉलिक पथ एन्कोडिंग की उपस्थिति के साथ-साथ बीटा-केटआदिपते, फिनोल अपचय और जेंटेट मार्ग के लिए जीन कोडिंग की उपस्थिति से स्पष्ट रूप से संकेत मिलता है कि बैक्टीरिया, स्ट्रेप्टोमाइसेज ग्रिसेओरुबेन्स CRDT-EB-21.6 एक पोटेन्षियल लिग्निन एक पोटेन्षियल लिग्निनडेगराडर है, और भविष्य के अध्ययन के लिए एक गतिशील अनुसंधान सामग्री भी।

Table of contents

4.2 Material and methods

4.3 Results and discussion

4.3.2 Lignin degrading pattern analysis

degrading enzyme

List of figures

List of tables

List of abbreviations

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
DMP	2,6-Dimethoxyphenol
ANOVA	Analysis of Variance
approx.	Approximately
AB	Azure B
BSA	Bovine Serum Albumin
cm	Centimetre
CR	Congo Red
Da	Dalton
°C	Degree Celsius
DEAE	Diethylaminoethyl
DyP	Dye-decolourising Peroxidase
eV	Electron Volt
GC-MS/MS	Gas Chromatography coupled with Mass Spectroscopy/ Mass Spectroscopy
GPC	Gel Permeation Chromatography
g	Gram
GU	Guaiacol
HSD	Highest Significant Difference
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
h	Hour
H_2O_2	Hydrogen peroxide
kD	Kilo Dalton

KL	Kraft lignin
Lac	Laccase
LiP	Lignin Peroxidase
LC-MS/MS	Liquid Chromatography coupled with Mass Spectroscopy/ Mass Spectroscopy
L	Litre
MnP	Manganese Peroxidase
m/z	Mass by charge ratio
λ_{max}	Maximum wavelength
MHz	Megahertz
MeOH-MeCN	Methanol-acetonitrile
MB	Methylene Blue
µL	Microlitre
µm	Micrometre
µ	Micron
Mg	Milligram
mL	Millilitre
Mm	Millimetre
mM	Millimolar
Min	Minutes
M	Molar
MW	Molecular weight
MWCO	Molecular weight cut off
BSTFA	N, O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
Ng	Nanogram

Nm	Nanometre
N	Normal
OD	Optical Density
Ppm	Parts per million
%	Percentage
PBS	Phosphate Buffer Saline
Pmol	Picomolar
RBBR	Remazol Brilliant Blue R
rpm	Revolutions per minute
S	Seconds
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TB	Toluidine Blue O
TCA	Tri-Carboxylic Acid
TMCS	Trimethylchlorosilane
TE	Tris-EDTA
VA	Veratryl Alcohol
VP	Versatile Peroxidase
v/v	Volume by volume
H_2O	Water
w/v	Weight by volume