DELVING INTO A NOVEL EXTREMOPHILIC BACTERIAL LACCASE: PURIFICATION, CHARACTERIZATION, AND ITS APPLICATIONS IN SUSTAINABLE INDUSTRIAL PROCESSING

VARSHA PANWAR

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

JUNE, 2022

DELVING INTO A NOVEL EXTREMOPHILIC BACTERIAL LACCASE: PURIFICATION, CHARACTERIZATION, AND ITS APPLICATIONS IN SUSTAINABLE INDUSTRIAL PROCESSING

Submitted by

VARSHA PANWAR

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

in fulfillment of the requirements of the degree of Doctor of Philosophy

to the

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

JUNE, 2022

CERTIFICATE

This is to certify that the thesis entitled "***Delving into a novel extremophilic bacterial laccase: Purification, characterization and its applications in sustainable industrial processing***" being submitted by **Ms. VARSHA PANWAR** to the Indian Institute of Technology Delhi for the award of the degree of ***Doctor of Philosophy*** in chemistry is a record of bonafide research work carried out by her. Ms. Varsha Panwar has worked under my guidance and supervision and has fulfilled the requirements for the submission of the thesis, which, to my knowledge, has reached the requisite standard. The results contained in this dissertation have not been submitted in part or full to any other university or institute for the award of any degree or diploma.

Tanmay Dutta

Date: 2^{nd} June, 2023

Place: Delhi

Dr. Tanmay Dutta

Professor (Biochemistry)

Department of Chemistry

Indian Institute of Technology Delhi

Dr. TANMAY DUTTA
Associate Professor
Department of Chemistry
Indian Institute of Technology Delhi
Hauz Khas, New Delhi-110016, India

Acknowledgements

The success of any work is not solely dependent on an individual but the associated personalities play a greater role by continuous suggestions and evaluation. I take this opportunity to express my thanks to all the people who helped me in completion of this thesis.

First and foremost, I express my sincere gratitude to my Ph.D. supervisor ***Prof. Tanmay Dutta****. I am indeed fortunate to get an opportunity to work under his guidance. I am very thankful for his insightful ideas, encouragements, exemplary teaching, and unwavering support.*

I am indebted to my SRC members, ***Prof. S.K. Khare****,* ***Prof. P. K. Chowdhury*** *and* ***Prof. Bhattacharyya*** *for critically evaluating my work and providing suggestions. I am also thankful to* ***Prof. Siddharth Pandey****, Head, department of Chemistry for providing facilities. I am very grateful to* ***Prof. Javed Sheikh*** for providing important suggestions.

I am very thankful all the staff members of the **instrumentation lab**, ***chemistry office****,* ***B.Tech Lab****,* ***M.Tech lab****,* ***M.Sc. lab*** *of the* **Department of Chemistry**, ***IIT Delhi*** *for their support and all possible help. I also thank* **Central Research Facility** *and* **Nanoscale Research Facility**, *IIT Delhi for providing crucial assistance in my experimental work. I acknowledge the* ***University Grants Commission*** *for my research scholarship and* **Council of Scientific and Industrial Research, India** *for funding my research project.*

I convey my sincere thanks to all my seniors and juniors for their constant support. I am delighted to acknowledge my dear friends for all possible help. My thesis would not have completed without the blessings of my parents, grandparents, and family. They motivated me through all the ways of my life. I adore them with my all respects.

Varsha Panwar

Delhi

Abstract

The popularity of enzymes in the industrial applications is growing due to their environment-friendly catalysis. Specifically, laccases are becoming more important because of their broad substrate specificity. Laccases are multicopper oxidases that can oxidise various types of phenolic and non-phenolic compounds. Currently, industrial operations are dominated by fungal laccases by virtue of their high redox potential, but fungal laccases become non-functional under many industrial processes which require extreme reaction conditions like high temperature and pressure, extreme pHs, presence of metal ions, organic solvents, salts, etc. In view of these limitations, new studies are exploring bacterial laccases owing to their extremotolerant properties for industrial deployment.

In this study, we isolated a novel thermostable bacterial laccase (LacT) from a hot-sulphur spring water isolate *Brevibacillus agri*. LacT was characterized in terms of optimum pH and temperature, pH and thermo-stability. The enzymatic activity and stability of LacT were examined in the presence of various organic solvents, metal ions and inhibitors. Also, the halotolerance ability of LacT was evaluated in the presence of salts like NaCl and KCl. Different types of natural and synthetic substrates of laccase were used to investigate the substrate specificity of LacT.

The industrial relevance of LacT was scrutinized by employing it in the bleaching and dye decolourization processes. In the textile industries, fabric bleaching and dyeing are considered as the major polluting steps. Commercial bleaching uses pernicious chemicals like chlorine, sodium hypochlorite, etc., which are highly detrimental to environment and human health. In our study, we have performed LacT-mediated bio-bleaching that eliminates the requirement of hazardous bleaching agents. On the other hand, dyes are recalcitrant complexes that are highly resistant to decomposition. They are well-proven mutagens or carcinogens. The

potential of LacT to decolourize hazardous textile dyes viz. Malachite Green, Reactive Black 5, Bromophenol Blue and Direct Red dye was comprehensively studied.

The high input cost for the production and purification of enzymes forestalls their usage in the industrial applications. In order to produce low-cost purified LacT on the larger scale, we optimised both the media for LacT production and its purification strategy. Moreover, the extracellular nature of LacT made its purification fast and less costly. Purified LacT was characterized through biophysical studies such as fluorescence spectroscopy and circular dichroism spectroscopy. Thermo-gravimetric analysis of LacT and a fungal laccase from *Trametes versicolor* was conducted to understand their thermal denaturation profiles at high temperatures.

The final part of the thesis covers the application of LacT in sustainable dyeing. In the commercial dyeing, harmful aromatic amines like phenylenediamines are employed as dye precursors. The American Contact Dermatitis Society classified these precursors as severe allergens. Additionally, harmful organic solvents and highly reactive chemical bleaching agents namely H_2O_2, $KMnO_4$ are used as oxidants. They may cause eczema, allergy, hypersensitivity and dermatitis. In this study, we have developed an alternative laccase-based sustainable dyeing. LacT-mediated dyes/colourants were developed by using natural plant phenols namely, gallic acid, ferulic acid, syringaldehyde and catechol as dye precursors. Moreover, there was no use of precarious organic solvents and strong bleaching agents especially H_2O_2 in LacT-driven dyeing.

सार

औद्योगिक अनुप्रयोगों में एंजाइमों की लोकप्रियता उनके पर्यावरण के अनुकूल कटैलिसीस के कारण बढ़ रही है। विशेष रूप से, उनकी व्यापक सब्सट्रेट विशिष्टता के कारण लैककेस अधिक महत्वपूर्ण होते जा रहे हैं। लैककेस मल्टीकॉपर ऑक्सीडेज हैं जो विभिन्न प्रकार के फेनोलिक और गैर-फेनोलिक यौगिकों का ऑक्सीकरण कर सकते हैं। वर्तमान में, औद्योगिक संचालन में उनकी उच्च रेडॉक्स क्षमता के आधार पर फंगल लैकेस का प्रभुत्व है, लेकिन कई औद्योगिक प्रक्रियाओं के तहत फंगल लैकेस गैर-कार्यात्मक हो जाते हैं, जिसके लिए उच्च तापमान और दबाव, चरम पीएच, धातु आयनों की उपस्थिति, कार्बनिक सॉल्वैंट्स जैसी अत्यधिक प्रतिक्रिया की स्थिति की आवश्यकता होती है। इन सीमाओं को ध्यान में रखते हुए, नए अध्ययन औद्योगिक तैनाती के लिए उनके चरम-सहिष्णु गुणों के कारण बैक्टीरिया की कमी की खोज कर रहे हैं।

इस अध्ययन में, हमने एक गर्म-सल्फर स्प्रिंग वाटर आइसोलेट ब्रेविबैसिलस एग्री से एक उपन्यास थर्मोस्टेबल बैक्टीरियल लैकेस (LacT) को अलग किया। इष्टतम पीएच और तापमान, पीएच और थर्मो-स्थिरता के संदर्भ में एलएसीटी की विशेषता थी। विभिन्न कार्बनिक सॉल्वैंट्स, धातु आयनों और अवरोधकों की उपस्थिति में लैक्ट की एंजाइमैटिक गतिविधि और स्थिरता की जांच की गई। साथ ही, सोडियम क्लोराइड और पोटेशियम क्लोराइड जैसे लवणों की उपस्थिति में LacT की हेलोटोलेरेंस क्षमता का मूल्यांकन किया गया। लैकेस के विभिन्न प्रकार के प्राकृतिक और सिंथेटिक सबस्ट्रेट्स का उपयोग लैक्ट की सब्सट्रेट विशिष्टता की जांच के लिए किया गया था।

एलएसीटी की औद्योगिक प्रासंगिकता को ब्लीचिंग और डाई डीकोलराइजेशन प्रक्रियाओं में नियोजित करके इसकी जांच की गई। कपड़ा उद्योगों में कपड़े की ब्लीचिंग और रंगाई को प्रमुख प्रदूषणकारी कदम माना जाता है। व्यावसायिक विरंजन में क्लोरीन, सोडियम हाइपोक्लोराइट आदि हानिकारक रसायनों का उपयोग होता है, जो पर्यावरण और मानव स्वास्थ्य के लिए अत्यधिक हानिकारक हैं। हमारे अध्ययन में,

हमने एलएसीटी-मध्यस्थता वाले जैव-विरंजन का प्रदर्शन किया है जो खतरनाक विरंजन एजेंटों की आवश्यकता को समाप्त करता है। दूसरी ओर, रंजक पुनर्गठित परिसर होते हैं जो अपघटन के लिए अत्यधिक प्रतिरोधी होते हैं। वे अच्छी तरह से सिद्ध उत्परिवर्तजन या कार्सिनोजेन्स हैं। एलएसीटी की खतरनाक कपड़ा रंगों को रंगहीन करने की क्षमता। मैलाकाइट ग्रीन, रिएक्टिव ब्लैक 5, ब्रोमोफेनोल ब्लू और डायरेक्ट रेड डाई का व्यापक अध्ययन किया गया।

एंजाइमों के उत्पादन और शुद्धिकरण के लिए उच्च निवेश लागत औद्योगिक अनुप्रयोगों में उनके उपयोग को रोकता है। बड़े पैमाने पर कम लागत वाले शुद्ध LacT का उत्पादन करने के लिए, हमने LacT उत्पादन और इसकी शुद्धि रणनीति दोनों के लिए मीडिया को अनुकूलित किया। इसके अलावा, LacT की बाह्य प्रकृति ने इसके शुद्धिकरण को तेज और कम खर्चीला बना दिया। प्यूरीफाइड लैकटी को फ्लोरेसेंस स्पेक्ट्रोस्कोपी और सर्कुलर डाइक्रोइज्म स्पेक्ट्रोस्कोपी जैसे बायोफिजिकल अध्ययनों के माध्यम से चित्रित किया गया था। उच्च तापमान पर उनके थर्मल विकृतीकरण प्रोफाइल को समझने के लिए एलएसीटी का थर्मो-ग्रेविमेट्रिक विश्लेषण और ट्रामेट्स वर्सीकोलर से एक फंगल लैकेस आयोजित किया गया था।

थीसिस के अंतिम भाग में टिकाऊ रंगाई में एलएसीटी के आवेदन को शामिल किया गया है। वाणिज्यिक रंगाई में, फेनिलीनडायमाइन्स जैसे हानिकारक सुगंधित अमाइन डाई अग्रदूतों के रूप में कार्यरत हैं। अमेरिकन कॉन्टैक्ट डर्मेटाइटिस सोसाइटी ने इन अग्रदूतों को गंभीर एलर्जी के रूप में वर्गीकृत किया है। इसके अतिरिक्त, हानिकारक कार्बनिक सॉल्वेंट्स और अत्यधिक प्रतिक्रियाशील रासायनिक विरंजन एजेंट जैसे H_2O_2, $KMnO_4$ का उपयोग ऑक्सीडेंट के रूप में किया जाता है। वे एक्जिमा, एलर्जी, अतिसंवेदनशीलता और जिल्द की सूजन का कारण बन सकते हैं। इस अध्ययन में, हमने एक वैकल्पिक लैकेस-आधारित टिकाऊ रंगाई विकसित की है। एलएसीटी-मध्यस्थ रंगों/रंगकों को प्राकृतिक पौधों के फिनोल नामत: गैलिक एसिड, फेरुलिक एसिड, सीरिंजल्डिहाइड और कैटेकोल को डाई अग्रदूतों के रूप में उपयोग करके विकसित किया गया था। इसके अलावा, लैक्टी-संचालित रंगाई में अनिश्चित कार्बनिक सॉल्वेंट्स और मजबूत विरंजन एजेंटों विशेष रूप से H_2O_2 का कोई उपयोग नहीं था।

Table of Contents

List of Figures

List of Tables

List of Abbreviations

ABTS	2,2′-azino-*bis*(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)
BSA	Bovine Serum Albumin
BeStSel	Beta Structure Selection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CD	Circular Dichroism
DEAE	Diethylaminoethyl
DTT	Dithiothreitol
EDX	Energy Dispersive X–Ray
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
HBT	1-hydroxybenzotriazole
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy
kDa	Kilo Dalton
KCl	Potassium chloride
LB	Luria-Bertani medium
LMS	Laccase Mediator System
MTCC	Microbial Type Culture Collection
NaCl	Sodium chloride
PAMPS	poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid)
PPD	*para*-phenylenediamine
RPM	Revolutions Per Minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEM	Scanning Electron Microscopy
SE	Standard error
SGZ	Syringaldehyde
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxy
TEMED	(N, N, N', N'–tetramethyl ethylenediamine)
TGA	Thermogravimetric analysis
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UV	Ultra-Violet