

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät

Institut für Biowissenschaften

Fachgebiet: Mikrobiologie

Betreuer: Prof. Dr. Mirko Basen

Laura Sofie Nissen

(e-mail: laura.nissen@uni-rostock.de)

Biochemical characterization of aldehyde:ferredoxin oxidoreductase from the thermophilic bacterium *Thermoanaerobacter* sp. strain X514

With declining reserves of fossil fuels, the demand for alternative biofuels is rising. The aldehyde:ferredoxin oxidoreductase (AOR) alcohol dehydrogenase (ADH) pathway, used for alcohol production in certain anaerobic microorganisms, is of interest in this regard.

This study focussed on the versatile AOR from *Thermoanaerobacter* sp. strain X514 (AOR_{X514}), which was biochemically characterized by producing a His-tagged version in *Thermoanaerobacter kivui*. The function of the enzyme was confirmed, as aldehyde-oxidation activity with the native redox partner ferredoxin, as well as with artificial redox partners. Optimization of the medium did increase specific activity of the heterologous protein, which is active over a wide temperature (10 to 95 °C) and pH (pH 5.5 to pH 11.5) range, and is able to oxidize a wide variety of aldehydes to their corresponding acids. The study also explored alcohol tolerance and oxidation in strain X514, suggesting AOR's role in alcohol detoxification by resting cells with thiosulfate as an electron acceptor.

The *T. kivui* protein production system enables thorough protein characterization of oxygen-sensitive iron-sulfur or tungsten containing proteins, offering insights for enzyme enhancement and metabolic engineering towards alcohol production from autotrophic substrates like syngas.

Biochemische Charakterisierung der Aldehyd:Ferredoxin Oxidoreduktase aus dem thermophilen Bakterium *Thermoanaerobacter* sp. Stamm X514

Da die Reserven an fossilen Brennstoffen abnehmen, steigt die Nachfrage nach alternativen Biokraftstoffen. Der Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase (AOR)-Alkoholdehydrogenase (ADH)-Stoffwechselweg, der in bestimmten anaeroben Mikroorganismen zur Alkoholproduktion genutzt wird, ist in diesem Zusammenhang von Interesse.

Diese Studie konzentrierte sich auf die vielseitige AOR von *Thermoanaerobacter* sp. Stamm X514 (AOR_{X514}), die durch Produktion einer His-markierten Version in *Thermoanaerobacter kivui* biochemisch charakterisiert wurde. Die Funktion des Enzyms wurde bestätigt, da die Aldehyd-Oxidationsaktivität sowohl mit dem nativen Redoxpartner Ferredoxin als auch mit künstlichen Redoxpartnern nachgewiesen wurde. Die Optimierung des Mediums erhöhte die spezifische Aktivität des heterologen Proteins, welches über eine weite Temperatur (10 bis 95 °C) und pH (pH 5.5 bis pH 11.5) Spanne aktiv war und eine Vielfalt von Aldehyden zu den entsprechenden organischen Säuren oxidierte. Die Studie untersuchte auch die Alkoholtoleranz und -oxidation in Stamm X514 und die Rolle von AOR bei der Alkoholentgiftung durch ruhende Zellen mit Thiosulfat als Elektronenakzeptor.

Das Proteinproduktionssystem von *T. kivui* ermöglicht eine gründliche Proteincharakterisierung von sauerstoff-empfindlichen Eisen-Schwefel oder Wolfram beinhaltenden Proteinen, möglicherweise Enzymverbesserung und metabolische Entwicklungen zur Alkohol-Produktion aus autotrophen Substraten wie Synthesegas.