

## **CHAPTER 5**

### **Samenvatting en conclusies**

Genomics, de studie van het erfelijke materiaal van een organisme, maakt het mogelijk om metabole routes op te helderen, de mogelijke functie van eiwitten te voorspellen en om een dieper inzicht te verkrijgen in de complexe regelmechanismen van een levende cel. De bouwsteen van het genoom is DNA (Deoxyribonucleïnezuur), die de drager is van de genetische informatie. De vertaling van deze informatie via de boodschapper molecuul mRNA (messenger Ribonucleïnezuur) leidt uiteindelijk tot synthese van een eiwit. Eiwitten spelen een belangrijke rol in allerlei structurele en katalytische processen binnen en buiten de cel. Om een zo volledig mogelijk inzicht in de diversiteit aan eiwitten in een cel te verkrijgen is het noodzakelijk om de volledige DNA volgorde van het genoom te kennen. De wetenschappers Sanger en Coulsen (1975) slaagden er als eersten in om de volgorde van een stuk DNA te bepalen. In de jaren daarna hebben technologische ontwikkelingen binnen de scheikunde en informatie technologie het mogelijk gemaakt dat wetenschappers de volledige DNA volgorde van een organisme konden bepalen. Dit heeft uiteindelijk geleid tot het in kaart brengen van het menselijke genoom (The IHGSC. 2001; Venter *et al.* 2001).

In de loop van de jaren zijn de genomen van vertegenwoordigers van alle verschillende vormen van leven bepaald. Een steeds groter aantal hele genoom sequenties komt beschikbaar (zie <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes>). Schimmels hebben door de belangrijke rol die ze spelen als mogelijke ziekteverwekkers en door het grootschalige industriële gebruik altijd al kunnen rekenen op een flinke hoeveelheid aandacht. Ook als het gaat om het in kaart brengen van de hele genoom sequentie. Er zijn nu meer dan 40 hele genoom sequenties van schimmels beschikbaar (Galagan *et al.* 2005). Het Nederlandse bedrijf DSM heeft als eerste de hele genoom sequentie van de schimmel *Aspergillus niger* in kaart gebracht (Pel *et al.* 2007).

*A. niger* behoort tot de klasse van de *Hyphomycetes*, subdivisie *Deuteromycotina* (bekend als de Imperfecte Schimmels). Deze schimmel wordt veel gebruikt bij de industriële, grootschalige productie van organische zuren zoals citroenzuur en van verschillende soorten enzymen (Abarca *et al.* 2004; Olempska-Beer *et al.*, 2006; Pel *et al.*, 2007). *A. niger* bezit de GRAS (Generally Recognized as Safe oftewel de Algemeen Beschouwd als Veilig) status wat betekent dat producten en enzymen die door deze schimmel gemaakt worden, beschouwd worden als veilig om te gebruiken in voeding en farmaceutische producten.

Om een gedetailleerd inzicht te krijgen in de diversiteit van de enzymen die dit micro-organisme maakt, is het noodzakelijk om deze enzymen te identificeren en hun mogelijke functie in kaart te brengen (annotatie). De bevestiging van de werkelijke enzym activiteit wordt bereikt door de genen die coderen voor de te onderzoeken enzymen tot overexpressie te brengen in een gastheer, gevolgd door zuiveringen en een biochemische karakterisatie. In het kader van het nationale subsidie programma IOP-Genomics van SenterNovem (zie <http://www.senternovem.nl/iopgenomics>) en in samenwerking met enkele universitaire en industriële partners (zie <http://www.biopoort.net/carbnet/carbnet.html>), hebben wij ons gericht op de identificatie en het biochemisch karakteriseren van de koolhydraat-actieve enzymen die gemaakt worden door *A. niger* CBS518.33 (de stam waarvan door DSM het genoom in kaart was gebracht) alsook de stam N402 (die gebruikt is voor expressie analyse en voor doelgerichte overexpressie). Daarbij hebben we gebruik kunnen maken van de hele genoom sequentie van de CBB518.33 stam zoals die door DSM bepaald was geworden.

Het onderzoek dat in dit proefschrift beschreven wordt, was gericht op enzymen die sucrose en de fructanen inuline en levaan kunnen omzetten (**Hoofdstuk 1**). Fructanen worden gemaakt door planten, bacteriën en schimmels. Ze worden toegevoegd aan bepaalde voedingsmiddelen vanwege product verbeterende en/of gezondheidsbevorderende eigenschappen die aan fructanen worden toegeschreven (Gibson *et al.*, 1995; Kaur & Gupta, 2002). Er zijn een aantal enzymen van *A. niger* beschreven die sucrose en fructanen kunnen hydrolyseren en modificeren. Daaronder bevinden zich invertases (voornamelijk sucrose hydrolyse; Boddy *et al.*, 1993), endo-inulinase (endo-werkend, hydrolyse van inuline; Ohta *et al.*, 1998), exo-inulinase (exo-werkend, vrijmaken van fructose uit sucrose, inuline en levaan; Arand *et al.*, 2002; Moriyama *et al.*, 2003) en fructosyltransferase (FTF of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST); maakt inuline oligosacharides uit sucrose; Nguyen *et al.*, 1999; L'Hocine *et al.*, 2000).

Op basis van geconserveerde aminozuur domeinen worden deze enzymen ingedeeld bij de familie 32 van de glycoside hydrolases (GH32) (zie Carbohydrate Active Enzymes database; <http://www.cazy.org/>; Coutinho and Henrissat, 1999; **Hoofdstukken 2 en 3**). Samen met de glycoside hydrolase familie 68 (GH68) vormt de familie GH32 de enzym clan GH-J. Eiwitten in deze clan hebben een vergelijkbare driedimensionale structuur, te weten een vijf-voudige  $\alpha$ -propeller vouwing (Men &

Futterer, 2003; Nagem *et al.*, 2004). Tot de groep van de GH68 enzymen behoren inulo- en levaansucrases (inuline en levaan vormende enzymen), alsook invertases. GH68 enzymen zijn afkomstig van micro-organismen behorende tot de *Archaea* en *Bacteria*.

In **Hoofdstuk 2** wordt de diversiteit van de enzymen van *A. niger* stam CBS513.88 en N402 die actief zijn op sucrose en fructanen beschreven, alsook de kenmerken van de regulatie van de expressie van deze enzymen. De volgende hoofdstukken geven een gedetailleerde beschrijving van een nieuw intracellulair invertase (SucB, **Hoofdstuk 3**) en een extracellulair exo-inulinase (AngInuE, **Hoofdstuk 4**), waarvan de bijbehorende genen in het genoom van *A. niger* gevonden zijn. Daarnaast is aandacht besteed aan het mogelijke fructan bindingsdomein van GH32 enzymen en de mogelijke rol ervan in enzym katalyse en substraat herkenning.

#### **Database mining en transcriptie analyse van genen coderend voor inuline-modificerende enzymen van *A. niger*.**

In Hoofdstuk 2 wordt de diversiteit en transcriptie regulatie van GH32 enzymen van *A. niger* in detail beschreven. Met behulp van sequenties van bekende familie GH32 enzymen alsook van de structureel verwante familie GH68 werden database zoekprofielen (HMM profielen) opgesteld om nieuwe vertegenwoordigers van beide families op te sporen in de hele genoomsequentie van *A. niger* stam CBS513.88. Hiermee werden vijf complete open reading frames coderend voor GH32 enzymen geïdentificeerd; deze vijf enzymen bezaten alle geconserveerde regio's die kenmerkend zijn voor de familie GH32 (Yuan *et al.*, 2006; **Hoofdstuk 2, Fig. 2**). Genen coderend voor familie GH68 enzymen werden niet gevonden.

Op basis van meervoudige sequentie vergelijkingen, gecombineerd met een fylogenetische analyse en de constructie van een fylogenetische boom, werden de volgende vijf GH32 leden gevonden: een endo-inulinase (AgnInuA), een exo-inulinase (AgnInuE) en een drietal invertases (AgnSucAp; AgnSucBp, AgnSucCp) (Yuan *et al.* 2006; **Hoofdstuk 2, Fig. 1**). Deze analyse bracht drie opvallende kenmerken aan het licht. Ten eerste, genen coderend voor specifieke FTF-type enzymen werden niet gevonden in de hele genoom sequentie, terwijl een dergelijk enzym toch al eerder gezuiverd was uit een andere *A. niger* stam (L'Hocine *et al.*, 2000). Wel is tijdens het onderzoek een exo-inulinase met FTF activiteit gevonden,

namelijk AgnInuEp. Dit exo-inulinase was qua aminozuur volgorde volledig identiek aan het FTF van *A. foetidus* (Rehm *et al.*, 1998). Het had ook een zeer hoge identiteit met een exo-inulinase van *A. niger* 12 en *Aspergillus awamori* (Arand *et al.*, 2002, Moriyama *et al.*, 2003). Ten tweede, er werd slechts één endo-inulinase (AngInuAp) gevonden in de genoom sequentie terwijl voor *A. niger* 12 twee van dergelijke enzymen, InuA en InuB, gevonden zijn (Ohta *et al.*, 1998). De *A. niger* CBS513.88 en N402 endo-inulinases vertoonden qua aminozuur volgorde een grotere gelijkenis met InuA dan met InuB en daarom zijn deze InuA genoemd (**Hoofdstuk 2**). Ten derde, twee nieuwe, waarschijnlijk intracellulaire, invertases AgnSucB en AgnSucC werden geïdentificeerd (**Hoofdstuk 2 en 3**). Deze enzymen hebben geen N-terminaal signaal peptide en zijn daarom zeer waarschijnlijk in de cel aanwezig. Een fylogenetische analyse toonde aan dat al deze familie GH32 enzymen voorkomen in verschillende schimmels behorende tot de *Ascomycetes* (Yuan *et al.* 2006; **Hoofdstuk 2, Tabel 1 en Fig. S1; Hoofdstuk 3, Fig. 1 en Tabel 1**).

Analyse van de genen coderend voor familie GH32 enzymen van *A. niger* N402 liet zien dat *AngInuE*, *AngSucA* en *AngInuA* alleen tot expressie komen in aanwezigheid van sucrose of inuline in het groeimedium. Het gen coderend voor *AngSucB* kwam bij alle gebruikte koolstofbronnen tot expressie, zij het op een laag niveau, terwijl voor *AngSucC* geen expressie gevonden werd bij de gebruikte koolstofbronnen (Yuan *et al.*, 2006; **Hoofdstuk 2, Fig. 3, 4 en 5**). Expressie analyse van genen coderend voor familie GH32 bij groei van *A. niger* in een medium met inuline, sucrose of maltose liet zien dat alleen bij sucrose en inuline, maar niet bij maltose deze genen tot expressie kwamen (**Hoofdstuk 2, Fig. 4**). Ook in aanwezigheid van fructose kon geen expressie van de genen coderend voor familie GH32 enzymen gevonden worden. Deze waarneming sluit goed aan bij een eerder gemaakte waarneming over het invertase van *A. nidulans* (Vainstein & Peberdy, 1991) en geeft aan dat genen coderend voor de fructan modifierende enzymen in beide soorten op een vergelijkbare wijze gereguleerd wordt. Voor de expressie van dergelijke genen zijn zeer waarschijnlijk additionele factoren nodig die niet aanwezig zijn als er alleen xylose, maltose of fructose als koolstofbron aanwezig is. Expressie analyse is ook uitgevoerd voor een *A. niger* stam waarbij de kataboliet repressie was uitgeschakeld (*A. niger*  $\Delta creA$ ). De resultaten die daarmee verkregen werden toonden aan dat de expressie van de genen die coderen voor *AngInuE* en *AngSucB*, maar niet die voor *AngSucA* en *AngInuA*, onder de directe controle staan van kataboliet

repressie (**Hoofdstuk 2, Fig. 3**). Op basis van deze resultaten wordt aangenomen dat sucrose de cel in wordt getransporteerd en daar direct, of na conversie in een derivaat, zorgt voor inductie van expressie van genen coderend voor GH32 enzymen (**Hoofdstuk 2**).

### **Moleculaire en biochemische karakterisatie van een nieuw intracellulair invertase van *Aspergillus niger* met een transfructosylerende activiteit.**

Analyse van de complete genoom sequentie van *A. niger* gaf aan dat naast *sucA*, dat codeert voor een reeds eerder beschreven extracellulair invertase, er twee onbekende genen aanwezig zijn die zeer waarschijnlijk coderen voor invertases, te weten het *sucB* en *sucC*. Na bestudering van sequenties uit databases werd de conclusie getrokken dat ortologen van *sucB* in verschillende andere schimmels voorkomen. *In-silico* analyse gaf aan dat deze nieuwe invertases geen herkenbare signaal peptide sequentie bevatten. Een fylogenetische analyse liet zien dat deze schimmel invertases tot een nieuwe, aparte, groep behoren (**Hoofdstuk 3, Fig. 1**). Ondanks de aanwezigheid van alle acht geconserveerde domeinen die karakteristiek zijn voor de familie GH32 enzymen, werden er een aantal interessante sequentie variaties gevonden bij de SucB familie. (**Hoofdstuk 3, Tabel 2**). Hoewel intracellulaire invertases eerder gevonden zijn bij schimmels (Gascon & Lampen, 1968; Maramatsu & Nakakuki, 1995; Ngyuen *et al.*, 1999) is er weinig bekend over de biochemische kenmerken en de functies die deze enzymen in de cel vervullen.

Het *A. niger* werd gen coderend voor SucB werd tot overexpressie gebracht in *Escherichia coli* en in de gist *Saccharomyces cerevisiae* (**Hoofdstuk 3**). Het uit *E. coli* cellen gezuiverde SucB werd biochemisch gekarakteriseerd. Het enzym liet duidelijke kenmerken van een invertase zien: het hydrolyseerde sucrose en kort-ketige inuline type oligosacharides, maar niet hoog molecuulair inuline of levan. Naast hydrolyse vertoonde het SucB ook transfructosylerende activiteit met sucrose en 1-kestose resulterend in 1-kestose en nystose als producten respectievelijk. De transfructosylerende activiteit was direct proportioneel met de substraat concentratie (tussen 20 en 50% bij een sucrose concentratie van 2.5 mM tot 1 M) (**Hoofdstuk 3, Fig. 3**). Het enzym vertoonde ook duidelijke Michaelis-Menten kinetiek met sucrose waarbij ook nog substraat inhibitie optreedt. De geschatte  $K_m$ ,  $K_i$  en  $V_{max}$  waarden bedroegen 2.0 ( $\pm$  0.2) mM, 268.1 ( $\pm$  18.1) mM en 6.6 ( $\pm$ 0.2)  $\mu$ mol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> eiwit

(totale activiteit), respectievelijk. Zowel de  $K_m$  als de  $V_{max}$  waarde zijn beduidend lager dan de waarden die beschreven zijn voor andere invertases van schimmels en bacteriën (Gascon & Lampen, 1968; Boddy *et al.*, 1993; Reddy *et al.*, 1996; Wallis *et al.*, 1997; Liebl *et al.*, 1998; L'Hocine *et al.*, 2000). SucB heeft dus weliswaar een hoge affiniteit voor sucrose maar, vergeleken met eerder beschreven invertase enzymen, een relatief lage activiteit. SucB had ook een beperkt pH bereik waarbij het actief was (pH 4-7; **Hoofdstuk 3, Fig. 2A**), zeker in vergelijking met het extracellulaire invertase Suc1 van *A. niger* (pH 3-10) (Boddy *et al.*, 1993; Wallis *et al.*, 1997). Bij sucrose concentraties tot 400 mM bedroeg de transfructosylerende (FTF) activiteit ongeveer 20 tot 30% van de totale activiteit. Bij hogere sucrose concentraties nam de FTF activiteit toe tot 50% van de totale activiteit. Hierin verschilt SucB sterk van SucA, het extracellulaire *A. niger* invertase. Dit enzym heeft geen meetbare FTF activiteit, zelfs niet bij sucrose concentraties van 2.2 M (L'Hocine *et al.*, 2000).

In vergelijking met wild type *A. niger* vertoonde een mutant met een disruptie van het *SucB* (*A. niger*  $\Delta$ *sucB*) een eerder begin van de sporevorming bij groei op een vast medium. Dit was onafhankelijk van de koolstofbron die was gebruikt. Echter, bij groei in vloeibaar medium werd er geen verschil gevonden tussen de groei van het wild type *A. niger* en de *A. niger*  $\Delta$ *sucB* stam.

Op basis van de hierboven beschreven resultaten en waarnemingen wordt aangenomen dat SucB een vertegenwoordiger is van een nieuwe groep van intracellulaire invertases van schimmels (Goosen *et al.*, 2007; **Hoofdstuk 3; Fig. 1**). Deze intracellulaire invertases hydrolyseren sucrose, kestose en nystose en maken daaruit vrije glucose en fructose die in het centrale metabolisme van de schimmel gebruikt worden. Vanwege de transfructosylerende activiteit kan SucB ook nog een rol hebben bij het opslaan van energie, de regulatie van de osmolariteit, of bij de synthese van een inducer van fructan en sucrose modificerende enzymen. Verder liet de analyse van de disruptie mutant zien dat het SucB enzym geen essentiële rol speelt in het metabolisme van sucrose, maar dat het wel mogelijk een (in)directe rol speelt bij het proces van sporulatie van *A. niger*.

### **Exo-inulinase van *Aspergillus niger* N402: een hydrolytisch enzym met een significante transfructosylerende activiteit**

Op basis van de analyse van het hele genoom was een enkel exo-inulinase (*AngInuE*) gevonden in *A. niger* CBS513.88 (Yuan *et al.*, 2006; Pel *et al.*, 2007; **Hoofdstuk 2**). Een fylogenetische analyse had laten zien dat AngInuE identiek is aan het FTF van *A. foetidus*, een geglycosyleerd dimeer enzym dat geen enkele inuline en levaan hydrolyserende activiteit bezit (Rehm *et al.*, 1998). Tevens was het AgnInuE respectievelijk 99% en 91% identiek aan de monomere exo-inulinases van *A. niger* stam 12 (InuE; Moriyama *et al.*, 2003) en *A. awamori* (Inu1; Arand *et al.*, 2002) (**Hoofdstuk 2**). Zowel InuE als Inu1 zijn typische exo-inulinases die inuline hydrolyseren maar hebben geen aantoonbare FTF activiteit (Moriyama *et al.*, 2003; Kulminkaya *et al.*, 2003). Echter, in tegenstelling tot InuE, is Inu1 wel in staat om levaan te hydrolyseren.

Om de werkelijke kenmerken van AngInuE te achterhalen, is het enzym via heterologe expressie van het bijbehorende gen in *E. coli* geproduceerd en vervolgens opgezuiverd. De resultaten lieten zien dat AngInuE een monomeer enzym is van 57 kDa met pH en temperatuur optima die sterk vergelijkbaar zijn met die van InuE en Inu1. Echter, AngInuE heeft ook een duidelijke transfructosylerende activiteit in aanwezigheid van sucrose, 1-kestose en nystose, waarbij oligosacharides van het inuline, levaan alsook het neoserien inuline type geproduceerd werden (voor chemische structuren zie **Hoofdstuk 1**; Goosen *et al.*, in druk; **Hoofdstuk 4**).

AngInuE hydrolyseerde inuline en levaan waarbij vrije fructose geproduceerd werd (Goosen *et al.*, opgestuurd voor publicatie; **Hoofdstuk 4**). Opvallend is dat dat er slechts drie aminozuren (niet geconserveerd in GH32) verschillend zijn tussen AngInuE en InuE (Gln199His, Ser476Gly en Ser499Thr), maar dat de twee enzymen duidelijk verschillende substraat en product profielen hebben. Echter, toen de drie aminozuren specifiek voor AngInuE via site-specifiek mutagenese veranderd waren in de drie aminozuren zoals die in InuE aanwezig zijn, trad er geen verandering in de inuline en levaan hydrolyserende activiteit, alsook FTF activiteit op.

Een in de familie GH32 wijd verspreid structureel kenmerk is het C-terminale  $\beta$ -sandwich domein. Dit domein bezit het geconserveerde sequentie motief SVEVF (GH32 domein G). Het lijkt erop dat dit domein essentieel is voor de activiteit van het enzym, hoewel de precieze functie nog onbekend is. Site-directed mutagenese van het



Ser469 residue, dat in het geconserveerde familie GH32 domein G aanwezig is, resulteerde in een significante reductie van de activiteit op sucrose, inuline en levaan (Goosen *et al.*, opgestuurd voor publicatie; **Hoofdstuk 4**). Diezelfde mutatie resulteerde tevens in een verminderde transfructosylerende activiteit. De sequentie SVEVF is zeer geconserveerd in de groep van schimmel enzymen die polymere fructanen hydrolyseren. In de groep van de invertases is dit niet het geval (Yuan *et al.*, 2006). Mogelijk heeft deze specifieke sequentie een rol in het binden van het polymere substraten (Burne *et al.*, 1992; Ohta *et al.*, 1998; Moriyama *et al.*, 2003).

De resultaten beschreven in dit proefschrift laten zien dat AngInuE, na productie in *E. coli* en opzuivering, actief is als een monomeer, niet geglycosyleerd exo-inulinase, dat sucrose, inuline en levaan hydrolyseert. Daarnaast heeft het enzym een duidelijke transfructosylerende activiteit bij hogere sucrose concentraties. De verschillen in het molecuul gewicht en de biochemische karakteristieken tussen 1-SST, InuE and Inu1 zouden veroorzaakt kunnen worden door (1) verschillen in de gebruikte analytische methoden, (2) de gebruikte gastheren *E. coli* (niet glycosylend) en *A. niger* of (3) de mogelijke productie van verschillende iso vormen van het enzym door *A. niger*. Onze resultaten laten verder zien dat het geconserveerde motief SVEVF in het domein G van de familie GH32  $\beta$ -sandwich regio significant is voor de totale enzym activiteit. Zeer waarschijnlijk is dit motief ook betrokken bij de binding van het polymeer.

### **Het GH32 enzym netwerk van *Aspergillus niger*.**

Op basis van resultaten die behaald zijn met behulp van *in-silico* genoom mining en de karakteristieken die in dit proefschrift (Yuan *et al.*, 2006; Goosen *et al.*, 2007; Goosen *et al.*, opgestuurd voor publicatie; **Hoofdstuk 2-4**) of in de literatuur beschreven zijn, kan een model voor het netwerk van de sucrose en fructan modificerende enzymen van *A. niger* CBS513.88 worden opgesteld (Fig. 1). Bij de groei in de natuurlijke habitat komt *A. niger* sucrose en fructanen afkomstig uit afgestorven plantenmateriaal tegen. Daardoor wordt het sucrose en fructan modificerende enzym netwerk geïnduceerd (Yuan *et al.*, 2006; **Hoofdstuk 2**). Een specifieke importer zorgt ervoor dat sucrose, en niet inuline, de schimmel hyfe binnenkomt waarna de transcriptie van sucrose en fructan modificerende enzymen wordt geïnduceerd. Hydrolytische enzymen die een signaal sequentie bezitten worden

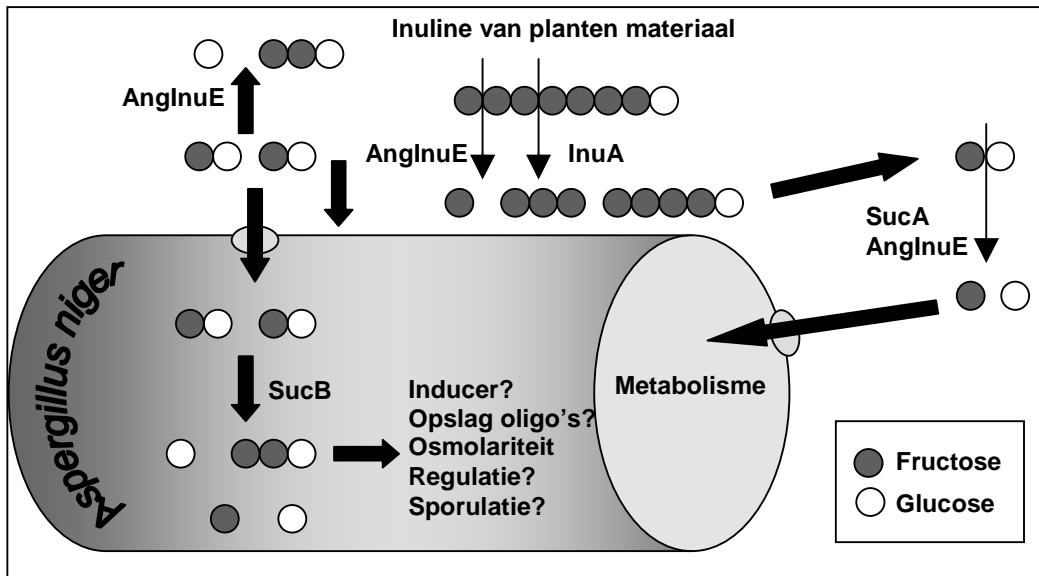
via een eiwit secretie route geëxporteerd naar buiten (zie Pel *et al.*, 2007). Daardoor komen deze enzymen in direct contact met sucrose en fructanen. De schimmel *A. niger* is in staat om met het extracellulaire invertase SucA, het exo-inulinase AngInuE en het endo-inulinase InuA sucrose en fructanen te hydrolyseren. SucA maakt glucose en fructose vrij uit sucrose. InuA hydrolyseert specifiek inuline in kleinere inulo-oligosacharides waardoor meer terminale niet-reducerende uiteinden vrijkomen die als substraat dienen voor het exo-inulinase AngInuE. Dit laatste enzym hydrolyseert deze inulo-oligosacharides evenals sucrose volledig tot vrije fructose en glucose. Naast de hydrolyserende activiteit bezit AngInuE een transfructosylerende activiteit waardoor kleine hoeveelheden inuline, levaan en neo-series inulo-oligosacharide geproduceerd worden (**Hoofdstuk 4**). Deze oligosacharides kunnen de cel in getransporteerd worden, maar het is meer waarschijnlijk dat ze afgebroken worden naar vrije fructose en glucose.

De schimmel *A. niger* (en ook *A. oryzae*) wordt op grote schaal door de fermentatie industrie gebruikt om grote hoeveelheden van een eiwit/enzym te produceren. Deze filamenteuze schimmels bezitten een relatief grote diversiteit aan extracellulaire koolhydraat hydrolyserende enzymen, waarvan een aantal op grote schaal geproduceerd wordt voor diverse toepassingen (Abarca *et al.*, 2004; Pel *et al.*, 2007). Een uitgebreide fylogenetische analyse liet zien dat naast deze extracellulaire enzymen, de groep van de Aspergilli een aanzienlijk repertoire van glycoside hydrolases bezit die geen herkenbare secretie signaal sequentie hebben (Pel *et al.*, 2007). Ondanks dat slechts zeer weinig bekend is over de biochemische kenmerken van deze “intracellulaire” glycoside hydrolases lijkt het erop dat door de wijdverspreide aanwezigheid in verschillende soorten Aspergilli deze enzymen een vergelijkbare rol spelen in al deze schimmels. Mogelijke functies voor deze nieuwe enzymen zijn in het intracellulaire metabolisme van geïmporteerde di- of kleine oligosacharides, in de regulatie van de expressie van genen door de vorming van specifieke inducer moleculen, in het omzetten van cellulaire koolhydraten die vrijkomen door lysis van mycelium, of bij de regulatie van de osmolariteit door de vorming van oligosacharides uit sucrose. Een rol bij differentiatie processen zoals bijvoorbeeld sporulatie, zoals gevonden voor SucB, is ook niet uit te sluiten.

Het gen coderend voor SucB, zeer waarschijnlijk een intracellulair invertase, ligt op het genoom van *A. niger* naast een waarschijnlijke hexose importer (An15g00310; Pel *et al.*, 2007), die een rol kan spelen bij de import van kleine

hoeveelheden sucrose uit de extracellulaire omgeving. Eenmaal in de cel kan deze sucrose door SucB gehydrolyseerd worden tot glucose en fructose die in het katabolisme gebruikt kunnen worden. SucB kan ook een transfructosylering uitvoeren hetgeen resulteert in de vorming kleine hoeveelheden inuline, levaan, en neo-series oligosacharides. De disruptie van het *sucB* gen in *A. niger* gaf geen significante verandering van de groei in vloeibaar medium. Dit is een aanwijzing dat het enzym geen belangrijke rol speelt in het sucrose of fructan metabolisme. Echter, op vast medium was bij de *SucB* disruptie stam in vergelijking met de wild type stam een eerdere aanzet tot sporulatie te zien. SucB zou dus (in)direct een rol kunnen spelen bij de aanzet tot sporulatie, hetzij door het opheffen van stress, door regulatie van de osmolariteit, of door de opslag van energie, of door het verwijderen van vrije fructose door transfructosylering. De aanwezigheid van SucB homologen in andere schimmel soorten geeft aan dat deze enzymen mogelijk een belangrijke, doch niet essentiële, rol spelen in het intracellulaire metabolisme van sucrose (Yuan *et al.* 2006; Goosen *et al.* 2007; **Hoofdstukken 2 en 3**).

Samengevat kan gesteld worden dat *A. niger* een aantal enzymen gebruikt voor de hydrolyse van sucrose en fructanen. De genen coderend voor deze enzymen worden specifiek geïnduceerd door hun eigen substraten, of van de substraten afgeleide verbindingen, zoals bijvoorbeeld het geval is bij de inductie van *inuA* door het van inuline afgeleide sucrose. Tenslotte dient opgemerkt te worden dat de exacte rol die de intracellulaire enzymen spelen in het metabolisme van sucrose niet bekend is. Het ophelderen van de specifieke functie/rol van deze nieuwe groep enzymen in het metabolisme van *A. niger* is een interessant en uitdagend onderwerp voor toekomstig onderzoek.



**Figuur 1.** Schematische weergave van het sucrose en fructan modificerende enzym netwerk van *Aspergillus niger* cellen (zie tekst voor details), met de extracellulaire enzymen (AngInuE, InuA, SucA) en het intracellulaire enzym (SucB).