

University of Groningen

Identification and characterization of glycoside hydrolase family 32 enzymes from *Aspergillus niger*

Goosen, Coenie

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2007

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Goosen, C. (2007). *Identification and characterization of glycoside hydrolase family 32 enzymes from Aspergillus niger*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

CHAPTER 7

Samevatting en konklusies

Genomika of erflikheidsleer, die studie van totale oorferflikheidseienskappe van 'n organisme, maak dit moontlik om metaboliese weë te ontsyfer, om proteïene en hul funksies te voorspel, asook om 'n dieper insig te verkry aangaande die komplekse regulatoriese meganismes van lewende selle. Die bousteen van die genoom is DNS (Deoksiribonukleïen suur), die molekule bousteen vir die opberging van informasie. Translasie van die informasie vind plaas via boodskapper molekules, wat bekend staan as bRNS (boodskapper Ribonukleïen suur), en lei tot die sintese van proteïene. Proteïene vervul menige funksies insluitende dié van strukturele en katalitiese aard. Om dit moontlik te maak om die proteïen diversiteit van selle te ontrafel, is dit nodig om die volledige genomiese volgorde van 'n organisme te bepaal. DNA volgorde bepaling was vir die eerste keer uitgevoer deur Sanger en Coulson (1975). Tegnologiese vooruitgang in chemie en informatika het dit vir wetenskaplikes moontlik gemaak om volledige genomiese volgordebepalings van organismes uit te voer. Dit het, in later jare, ook gelei tot die ontrafeling van die menslike genoom (The IHGSC, 2001; Venter *et al.*, 2001; The IHGSC, 2004)

Genomiese volgordebepaling het vinnig uitgebrei tot alle takke van die boom van die lewe, met 'n kontinue toename in publieke toeganklike genoom volgordes (<http://www.nvbi.nlm.nih.gov/Genomes>). Fungi, organismes van patologiese en industriële belang, het dieselfde aandag geniet in die veld van genomiese volgordebepalings. Daar is huidiglik meer as 40 volledige genoom volgordes van fungi beskikbaar (Galagan *et al.*, 2005). Die Nederlandse maatskappy DSM het substansieël geïnvesteer om die genoom van *Aspergillus niger* te ontravel (Pel *et al.*, 2007). *A. niger* behoort tot die klas van *Hyphomycetes*, wat val onder die subdivisie *Deuteromycotina* (Imperfekte fungi) en het tot dusver baie aandag geniet van die industrie as 'n potente organiese-suur en ensiem produseerder (Abarca *et al.*, 2004). Op die huidige oomblik in die industrie word *A. niger* ekstensief gebruik as produseerder van sitroensuur en gesien as 'n belangrike bron van potensieel bruikbare ensieme (Olempska-Beer *et al.*, 2006; Pel *et al.*, 2007). *A. niger* geniet ook GRAS ("generally regarded as safe" of algemeen aanvaar as veilig) status, wat aandui dat produkte en ensieme wat geproduseer word deur dié fungus beskou kan word as veilig vir die gebruik in die voedsel en farmaseutiese bedryf. Om die totale diversiteit van ensieme geproduseer deur dié organisme te verstaan, is dit nodig om hulle te identifiseer asook om hulle funksies te voorspel (annotasie). Spesifieke ensiem aktiwiteit word bevestig deur die ooreenstemmende gene uit te druk in gasheer organismes, gevolg deur biochemiese karakterisering en analise. Onder die vaandel van die Nederlandse nationale befondsingsprogram (<http://www.senternovem.nl/iopgenomics/>), en in samewerking met

akademiese en industriële vennote (<http://www.biopoort.net/carbnet/carbnet.html>), het ons gepoog om die koolhidraat aktiewe ensieme in die genoom van *A.niger* CBS518.33 (die stam waarvan die genoom volgorde bepaal is deur DSM) asook die stam N402 (gebruik vir ekspressie analise en as bron vir geteikende ekspressie analises) te identifiseer en analiseer. Die werk wat beskryf word in hierdie tesis fokus op ensieme wat aktief is op sukrose sowel as die fruktane inulien en lewaan (**Hoofstuk 1**). Fruktane word deur plante, bakterieë en fungi geproduseer en word in die voedselindustrie gebruik na aanleiding van hulle verbeterings- en gesondheids eienskappe (Gibson *et al.*, 1995; Kaur & Gupta, 2002). Huidiglik is daar 'n aantal ensieme van *A. niger* geïdentifiseer wat in staat is om sukrose en fruktane te hidroliseer of te modifiseer. Dit sluit in invertases (primer sukrose hidroliserend; Boddy *et al.*, 1993), endo-inulinase (endo-aktief, hidroliseer inuline; Ohta *et al.*, 1998), exo-inulinase (ekso-aktief, stel fruktose vry vanaf sukrose, inuline en levan; Arand *et al.*, 2002; Moriyama *et al.*, 2003) en fruktosieltransferase (FTF of sukrose:sukrose 1- fruktosieltransferase (1-SST); maak kort oligomeriese kettings vanaf sukrose; Nguyen *et al.*, 1999; L'Hocine *et al.*, 2000). Hierdie ensieme behoort tot die glikosied-hidrolase familie 32 (GH32) gebaseer op die teenwoordigheid van gekonserveerde aminosuur domeine (Carbohydrate Active Enzymes database; <http://www.cazy.org/>; Coutinho and Henrissat, 1999; **Hoofstukke 2 and 3**). Tesame met die glikosied-hidrolase familie 68 (GH68), behoort die twee families tot die kliek GH-J, waar hulle 'n ooreenstemmende drie-dimensionele struktuur deel (vyf-lemmige β -propeller vouing; Meng and Frutterer, 2003; Nagem *et al.*, 2004). GH68 ensieme sluit inulo- en levansukrases (inulien en lewaan vorming respektiewelik) asook invertases in waarvan al die ensieme uit die familie tot dusver slegs in *Archaea* en *Bacteria* geïdentifiseer is.

In Hoofstuk 2 word die diversiteit en ekspressie-regulerings karakteristieke van sukrose en fruktaan aktiewe ensieme van *A.niger* stamme CBS513.88 en N402 beskryf. Latere hoofstukke gee 'n indiepte beskrywing van 'n nuwe intrasellulêre invertase (SucB, **Hoofstuk 3**) en 'n ekstrasellulêre ekso-inulinase (AngInuE, **Hoofstuk 4**), beide geïdentifiseer in die genoom van *A. niger*. Klem word ook geplaas op die moontlike fruktaan bindings-domein van GH32, en sy rol in katalise en substraat herkenning.

Databasis ontginning en transkripsionele analise van inulien-modifiserende ensieme van *A. niger*.

Die diversiteit en transkripsionele regulering van GH32 ensieme in *A. niger* was die fokus van verdere ondersoek in Hoofstuk 2. Geen DNS-volgordes van bekende GH32 proteïene, asook

struktureel verwante GH68 proteïene, was gebruik om die databasis soekprofiel op te stel nie (HMM profiel) om sodoende nuwe ensieme in die genoom van die *A. niger* stam CBS513.88 te identifiseer. Deur gebruik te maak van dié soekprofiel is vyf nuwe GH32 proteïene geïdentifiseer gebaseer op die teenwoordigheid van beide vollengte leesrame en gekonserveerde familie GH32 domeine (Yuan *et al.*, 2006; **Hoofstuk 2, Fig. 2**). Geen enkele lid van die familie GH68 proteïene was geïdentifiseer in die genoom van *A. niger* nie.

Deur gebruik te maak van multi-DNS-volgorde vergelykings, saamgestel in 'n filogenetiese boom, was dit duidelik sigbaar dat die vyf GH32 lede die endo-inulinase (AngInuA), exo-inulase (AngInuE) en die die filamentagtige fungus invertase (AngSucAp, AngSucBp, AngSucCp) ensieme verteenwoordig (Yuan *et al.*, 2006; **Hoofstuk 2, Fig. 1**). Die analise het drie noemenswaardige eienskappe aan die lig gebring. Eerstens, geen spesifieke FTF-tipe ensiem kon geïdentifiseer word in die genoom-volgorde nie, alhoewel so 'n tipe ensiem voorheen gesuiwer kon word vanaf 'n andere *A. niger* stam (L' Hocine *et al.*, 2000). 'n Enkele exo-inulinase met FTF-aktiwiteit kon wel geïdentifiseer word. Dié exo-inulinase toon volledige volgorde homologie met die FTF van *A. foetidus* (Rehm *et al.*, 1998), en hoë volgorde homologie met die exo-inulinases van *A. niger* 12 en *Aspergillus awamori* (Arand *et al.*, 2002; Moriyama *et al.*, 2003). Tweedens, slegs 'n enkele endo-inulinase (AngInuAp) kon geïdentifiseer word in die genoom-volgorde, in teenstelling met die twee endo-inulinases (InuA en InuB) in *A. niger* 12 (Ohta *et al.*, 1998). Die endo-inulinase van *A. niger* CBS513.88 en N402 vertoon beide 'n hoër afgeleide aminosuur-volgorde homologie met InA in teenstelling tot InuB, en was gevolglik dienooreenkomstig InuA benoem (**Hoofstuk 2**). Derdens, twee moontlike intrasellulêre invertases, AngSucB en AngSucC (**Hoofstukke 2 en 3**) was ook geïdentifiseer. Beide dié proteïene besit geen N-terminale sein-volgordes nie, en word dus waarskynlik gelokaliseer in die intrasellulêre spasie. Filogenetiese analise wys daarop dat die bogenoemde familie GH32 ensieme gekonserveerd voorkom in verskeie *ascomycete* fungi, wat verder aanduidend is van hulle belangrike rol in fruktaan metabolisme (Yuan *et al.*, 2006; **Hoofstuk 2, Tabel 1 en Fig. S1; Hoofstuk 3, Fig. 1 en Tabel 2**).

Protein biosintetiese analise van gene wat vir GH32 ensieme van *A. niger* N402 kodeer dui daarop dat *AngInuE*, *AngSucA*, en *AngInuA* alleen uitgedruk word wanneer sukrose of inulien as koolstofbron aangebied word. *AngSucB* was uitgedruk (op 'n lae vlak) op alle getoetste koolstofbronne, waar geen ekspresie van *AngSucC* waargeneem kon word onder dieselfde toestande nie (Yuan *et al.*, 2006; **Hoofstuk 2, Figure 3, 4 en 5**). Oordrag van *A. niger* van groeimedium wat alleen xylose bevat as koolstofbron, na 'n groeimedium wat inulien, sukrose of maltose bevat, het aangedui dat ekspresie opgereguleer word aleen as

sukrose of inulien, maar nie maltose nie, gebruik word (**Hoofstuk 2, Fig. 4**). Selfs in die teenwoordigheid van verhoogde konsentrasies fruktose kon geen ekspressie van enige van die GH32 ensieme waargeneem word nie. Die waarneming kom goed ooreen met 'n vroeëre waarneming vir *A. nidulans* invertase (Vainstein & Peberdy, 1991) wat aanduidend is van vergelykbare regulasie vir fruktaan-modifiserende ensieme in die twee spesies. Die ekspressie van gene wat kodeer vir dié ensieme benodig moontlik faktore wat nie tot ekspressie kom wanneer alleen xylose of fruktose as koolstofbronne gebruik word nie. Ekspressie-analise was ook uitgevoer in 'n *A. niger* stam met defektiewe kataboliet repressie (*A. niger* $\Delta creA$). Die resultate dui daarop dat ekspressie van *AngInuE* en *AngSucB*, maar nie *AngSucA* en *AngInuA* nie, direk beheer word deur kataboliet repressie (**Hoofstuk 2, Fig. 3**). Die bevindinge lei tot die voorstel dat sukrose, as hoof induserende molekule, oor die plasma membraan getranspoteer kan word. Sukrose, of 'n derivaat daarvan, kan dan in die intrasellulêre omgewing optree as 'n induseerder van GH32 geen ekspressie (**Hoofstuk 2**).

Molekulêre and biochemiese karakterisasie van 'n nuwe intrasellulêre invertase van *Aspergillus niger* met 'n trans-fruktosilerende aktiwiteit

Analise van die *A. niger* genoom-volgorde het die teenwoordigheid van *sucA*, wat kodeer vir die gekarakteriseerde ekstrasellulêre invertase, asook twee nuwe invertase gene, *sucB* en *sucC*, opgelewer. Analise van die databasis het ook verder die teenwoordigheid van SucB ortoloë gene in verskeie ander fungi spesies aangetoon. *In silico* analise het verder aantoon dat geen van die nuwe, potensiele invertases sein-peptied volgordes bevat nie. Filogeneties gesien groepeer die nuwe intrasellulêre invertases almal saam in 'n nuwe groep (**Hoofstuk 3, Fig. 1**). Alhoewel al agt van die gekonserveerde domeine, wat karakteristiek is van GH32, teenwoordig is, is daar duidelike volgorde verskille in die SucB subfamilie (**Hoofstuk 3, Tabel 2**). Ten spyte van die feit dat intrasellulêre invertases al voorheen in fungi aangetoon is (Gascon & Lampen, 1968; Maramatsu & Nakakuki, 1995; Nguyen *et al.*, 1999), is daar nog steeds weinig bekend oor hulle biochemiese eienskappe en hul funksies in die intrasellulêre omgewing. Die moontlike intrasellulêre invertase (SucB) van *A. niger* was heteroloog geproduseer in beide *Escherichia coli* en die gis *Saccharomyces cerevisiae* (**Hoofstuk 3**). Gesuiwerde SucB na ekspressie in *E. coli* is verder biochemies gekarakteriseer. SucB vertoon tipiese invertase karakteristieke: dit hidroliseer sukrose en kort inulien-tipe oligosakkariede, maar nie hoë-molekulêre massa inulien en lewaan nie. Afgesien van hidrolise,

vertoon SucB ook transfruktosilerende eienskappe deur respektiewelik 1-kestose en nistose vanaf sukrose en 1-kestose te produseer. Transfruktosilerende aktiwiteit was direk proporsioneel tot die substraat konsentrasie (tussen 20 – 50 % deur 'n sukrose konsentrasie reeks van 2.5 mM tot 1 M te gebruik; **Hoofstuk 3**, Fig. 3). SucB vertoon ook tipiese Michaelis-Menten kinetika met substraat inhibisie op sukrose, met waarskynlike K_m , K_i en V_{max} waardes van 2.0 (± 0.2) mM, 268.1 (± 18.1) mM and 6.6 (± 0.2) $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteïen (totale aktiwiteit). Beide die K_m en V_{max} waardes is beduidend laer as waardes wat voorheen beskryf was vir ander invertases van fungi en bakteriëe (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 het dus 'n hoër affiniteit vir sukrose, maar in vergelyking met die eerder beskrewende invertase ensieme, 'n relatief lae aktiwiteit. SucB het ook 'n beperkte pH bereik waarin hy aktief was (pH 4-7; **Hoofstuk 3, Fig. 2A**), seker in vergelyking met die ekstrasellulêre invertase Suc1 van *A. niger* (pH 3-10) (Boddy *et al.*, 1993; Wallis *et al.*, 1997). By sukrose konsentrasies tot 400 mM bedra die transfruktosilerende (FTF) aktiwiteit ongeveer 20 tot 30% van die totale aktiwiteit. By hoër sukrose konsentrasies het die FTF aktiwiteit toegeneem tot 50% van die totale aktiwiteit. Hierin verskil SucB sterk van SucA, die ekstrasellulêre *A. niger* invertase. Die laasgenoemde ensiem besit geen meetbare FTF aktiwiteit, self nie by sukrose konsentrasies van 2.2 M nie (L'Hocine *et al.*, 2000).

In vergelyking met die wilde-tipe *A. niger* vertoon 'n mutant met 'n onderbreking in *SucB* (*A. niger* ΔsucB) vroeëre spoorvorming wanneer dit op vaste medium gegroei word. Dit was onafhanklik van die koolstofbron wat gebruik was. Daar was egter geen verskil in groei waargeneem tussen die wild-tipe *A. niger* en die *A. niger* ΔsucB stam op vloeibare medium nie.

Na aanleiding van die bogenoemde resultate en waarnemings word aangeneem dat SucB 'n verteenwoordiger is van 'n nuwe groep van intrasellulêre invertases van fungi (Goosen *et al.*, 2007; **Hoofstuk 3; Fig. 1**). Dié intrasellulêre invertases hidroliseer sukrose, kestose en nistose en stel dan rye glukose en fruktose vry wat weer in die sentrale metabolisme van die fungus gebruik kan word. Vanweë sy transfruktosilerende aktiwiteit kan SucB ook verder 'n rol speel by die berging van energie, die regulasie van osmolariteit, of by die sintese van 'n induseerder vir 'n fruktaan- en sukrose-modifiserende ensiem. Verder wys die analise van 'n SucB mutant dat dié ensiem geen essensiële rol speel in die metabolisme van sukrose nie, maar wel 'n moontlike (in)direkte rol in die proses van sporulasie van *A. niger*.

Ekso-inulinase van *Aspergillus niger* N402: 'n hidrolitiese ensiem met noemenswaardige transfruktosilerende aktiwiteit

Op grond van die analise van die hele genoom was slegs 'n enkele ekso-inulinase (*AngInuE*) gevind in *A. niger* CBS513.88 (Yuan *et al.*, 2006; Pel *et al.*, 2007; **Hoofstuk 2**). 'n Filogenetiese analise wys daarop dat *AngInuE* identies is aan die FTF van *A. foetidus*, 'n geglikosileerde dimeriese ensiem wat nie in staat is om inulien en lewaan te hidroliseer nie (Rehm *et al.*, 1998). *AngInuE* vertoon ook 99% en 91% identiteit (respektiewelik) aan die monomeer ekso-inulinases van *A. niger* 12 (*InuE*; Moriyama *et al.*, 2003) en *A. awamori* (*Inu1*; Arand *et al.*, 2002) (**Hoofstuk 2**). *InuE* sowel as *Inu1* is tipiese ekso-inulinases wat inulien kan hidroliseer, maar geen aantoonbare FTF aktiwiteit besit nie (Moriyama *et al.*, 2003; Kulminskaya *et al.*, 2003). In teenstelling tot *InuE*, is *Inu1* egter wel in staat om lewaan te hidroliseer.

Om die daadwerklike eienskappe van *AngInuE* te bepaal, is die ensiem via heterologe ekspressie in *E. coli* geproduseer en vervolgens gesuiwer. Uit die resultate blyk dit dat *AngInuE* 'n monomeer ensiem van 57 kDa is, met pH en temperatuur optima hoogs vergelykbaar met die van *InuE* en *Inu1*. *AngInuE* besit egter ook duidelike transfruktosilerende aktiwiteit in die aanwesigheid van sukrose, 1-kestose en nistose, waarby oligo-sakkariedes van inulien, lewaan asook die neo-series tipe inulien geproduseer word (vir chemiese strukture sien **Hoofstuk 1**; Goosen *et al.*, gestuur vir publikasie; **Hoofstuk 4**).

AngInuE hidroliseer inulien en lewaan waarby fruktose vrygestel word (Goosen *et al.*, gestuur vir publikasie; **Hoofstuk 4**). Dit is opvallend dat daar slegs drie aminosure (nie gekonserveerd in GH32) verskil tussen *AngInuE* en *InuE* (Gln199His, Ser476Gly en Ser499Thr), maar dat die twee ensieme duidelik verskillende substraat en produk profiele toon. Nadat die drie aminosure spesifiek tot *AngInuE* gemodifiseer was deur teiken-spesifieke mutagenese (site-spesific mutagenesis) tot die aminosure soos wat dit voorkom in *InuE*, was daar geen verskille gemerk in die hidroliserende aktiwiteit (inulien en lewaan) asook die FTF aktiwiteit nie.

'n Wydverspreide strukturele kenmerk in familie GH32 is die "β-sandwich" domein. Die domein besit die gekonserveerde volgorde motief SVEVF (GH32 domein G). Dit wil voorkom asof die domein essentieel is vir die aktiwiteit van ensieme in die groep, alhoewel die presiese funksie nog onbekend is. Teiken-spesifieke mutagenese van die Ser469 residu, wat gekonserveerd voorkom in die domein G van familie GH32, bring 'n noemenswaardige

verlaging in die aktiwiteit op sukrose, inulien en lewaan (Goosen *et al.*, gestuur vir publikasie; **Hoofstuk 4**). Dieselfde mutasie bring ook 'n verlaagde transfructosilerende aktiwiteit toe. Die volgorde SVEVF is streng gekonserveerd in die groep van fungus ensieme wat polimeer fruktane hidroliseer. In die groep van invertases is dit nie die geval nie (Yuan *et al.*, 2006). Die moontlikheid bestaan dat die spesifieke volgorde 'n rol speel in die binding van polimeer substrate (Burne *et al.*, 1992; Ohta *et al.*, 1998; Moriyama *et al.*, 2003).

Die resultate soos beskryf in dié proefskrif laat die leser sien dat AngInuE, na produksie in *E. coli* gevolg deur suiwering, aktief is as 'n monomeriese, nie-geglikosileerde ekso-inulinase wat sukrose, inulien en lewaan hidroliseer. Naas hidrolise, vertoon AngInuE ook duidelike transfruktosilerende aktiwiteit by hoë sukrose konsentrasies. Die verskille in molekulêre gewig en biochemiese karakteristieke tussen I-SST, InuE en Inu1 kan veroorsaak word deur (1) verskille in die gebruikte analitiese metode, (2) die gebruikte gashere *E. coli* (nie -glikosilerend) en *A. niger* of (3) die moontlike produksie van verskillende iso-vorme van die ensiem deur *A. niger*. Ons resultate wys verder daarop dat die gekonserveerde motief SVEVF in domein G van familie GH32 “ β -sandwich” regio essensieël is vir totale ensiem aktiwiteit. Die moontlikheid bestaan ook dat die motief betrokke kan wees by die binding van polimere substrate.

Die GH32 Ensiem Netwerk van *Aspergillus niger*.

Na aanleiding van verkrygte resultate met behulp van *in-silico* genoom-volgorde analise, die karakteristieke soos beskryf in die proefskrif (Yuan *et al.*, 2006; Goosen *et al.*, 2007; Goosen *et al.*, gestuur vir publikasie; **Hoofstukke 2-4**) asook wat in die literatuur bekend is, kan 'n model vir die netwerk van sukrose en fruktaan modifiserende ensieme van *A. niger* CBS513.88 voorgestel word (Fig. 1). In sy natuurlike habitat kom *A. niger* sukrose en fruktaan van dooie plantmateriaal teë. Daardeur word die sukrose en fruktaan modifiserende netwerk geïnduseer (Yuan *et al.*, 2006; **Hoofstuk 2**). 'n Spesifieke invoerder (“importer”) sorg daarvoor dat sukrose, maar nie inulien nie, die fungus hife binnekom waarna transkripsie van sukrose en fruktaan modifiserende ensieme geïnduseer word. Hidrolitiese ensieme wat 'n sein-peptied volgorde besit word *via* 'n proteïen sekresie roete na buite ge-eksporteer (sien Pel *et al.*, 2007). Sodoende kom dié ensieme direk in kontak met sukrose en fruktane. *A. niger* is in staat om met die ekstrasellulêre invertase SucA, die ekso-inulinase AngInuE en die endo-inulinase InuA sukrose en fruktaan te hidroliseer. SucA stel glukose en fruktose vry vanuit sucrose. InuA hidroliseer inulien tot kleinere inulo-oligo-sakkariedes waardeur meer nie-

reducerende terminale vrykom wat die ekso-inulinase in staat stel om dit verder af te breek. Die laasgenoemde ensiem hidroliseer dié inulo-oligo-sakkariedes asook sukrose volledig tot vrye fruktose en glukose. Naas hidroliserende aktiwiteit, besit AngInuE ook transfruktosilerende aktiwiteit waardeur klein hoeveelhede inulien, lewaan en neo-series inulo-oligo-sakkariedes geproduseer word (**Hoofstuk 4**). Dié oligo-sakkariedes kan moontlik in die sel ge-importeer word, maar dis meer waarskynlik dat hulle afgebreek word na vrye fruktose en glukose.

Die fungus *A. niger* (en ook *A. oryzae*) word op groot skaal deur die fermentasie industrie gebruik om groot hoeveelhede proteïene en ensieme te produseer. Die filamentagtige fungi besit 'n relatief groot diversiteit van ekstrasellulêre koolhidraat hidroliserende ensieme, waarvan 'n aantal op groot skaal geproduseer word vir diverse toepassings (Abarca *et al.*, 2004; Pel *et al.*, 2007). 'n Uitgebreide filogenetiese analise dui daarop dat naas dié ekstrasellulêre ensieme, die Aspergilli groep 'n aansienlike *repertoire* van glikosied hidrolases besit met geen herkenbare signaalpeptied volgordes nie (Pel *et al.*, 2007). Ondanks dat daar weinig bekend is aangaande die biochemiese kenmerke van dié “intracellulêre” glikosied-hidrolases, is dit duidelik dat hulle weidverspreide voorkoms in verskeie Aspergilli daarop dui dat hulle moontlik 'n vergelykbare rol kan speel. Moontlike funksies sluit in die intracellulêre metabolisme van di- of klein oligo-sakkariede; die regulasie van die ekspressie van gene deur die vorming van spesifieke induseer-molekules; die omskakeling van sellulêre koolhidrate wat vrykom vanaf lise van die mycelium, of by die regulasie van die osmolariteit deur die vorming van oligo-sakkariede uit sukrose. 'n Rol by differensiasie prosesse soos sporulasie, (soos in die geval van SucB), kan ook nie uitgesluit word nie.

Die geen wat kodeer vir SucB, hoogs waarskynlik 'n intracellulêre invertase, lê op die genoom van *A. niger* reg naas 'n waarskynlike heksose importer (An15g00310; Pel *et al.*, 2007) wat 'n rol kan speel by die invoer van klein hoeveelhede sukrose vanuit die ekstrasellulêre omgewing. Sodra dit in die sel is kan die sukrose deur SucB gehidroliseer word tot glukose en fruktose wat verder in katabolisme gebruik kan word. SucB kan ook transfruktosilering uitvoer om soedoeende klein hoeveelhede inulien, lewaan en die neo-series oligo-sakkariede te produseer. Die onderbreking van die *sucB* geen in *A. niger* lei nie tot enige verskil in groei in vloeibare medium nie, wat aanduidend is dat dit nie 'n essensiële rol in sukrose en fruktaan metabolisme speel nie. Op soliede media vertoon die *SucB* onderbreekte mutant vroeër sporulasie in vergelyking met die wilde-tipe *A. niger*. SucB speel dus 'n (in)direkte rol in die begin van sporulasie, hetsy deur die opheffing van stres, deur die regulasie van die osmolariteit, deur die storting van energie, of deur die verwydering van vrye fruktose deur

transfruktosilering. Die aanwesigheid van SucB homoloë in ander fungi wys daarop dat dit 'n belangrike, dog nie-essensiële rol kan speel in die intrasellulêre metabolisme van sukrose (Yuan *et al.* 2006; Goosen *et al.* 2007; **Hoofstukke 2 en 3**).

In samevatting, *A. niger* kan 'n aantal ensieme gebruik vir die hidrolise van sukrose en fruktane. Die gene wat kodeer vir die ensieme word spesifiek geïnduseer deur hulle eie substrate, of verbindings afgelei uit die substrate, soos in die geval van die induksie van *inuA* deur die inulien-afgeleide sukrose. Ten slotte moet dit beklemtoon word dat die eksakte rol wat die intrasellulêre ensieme speel in die metabolisme van sukrose nog onbekend is. Die opheldering van die spesifieke funksie/rol van die nuwe groep ensieme in die metabolisme van *A. niger* is wel 'n interessante en uitdagende onderwerp vir toekomstige navorsing.

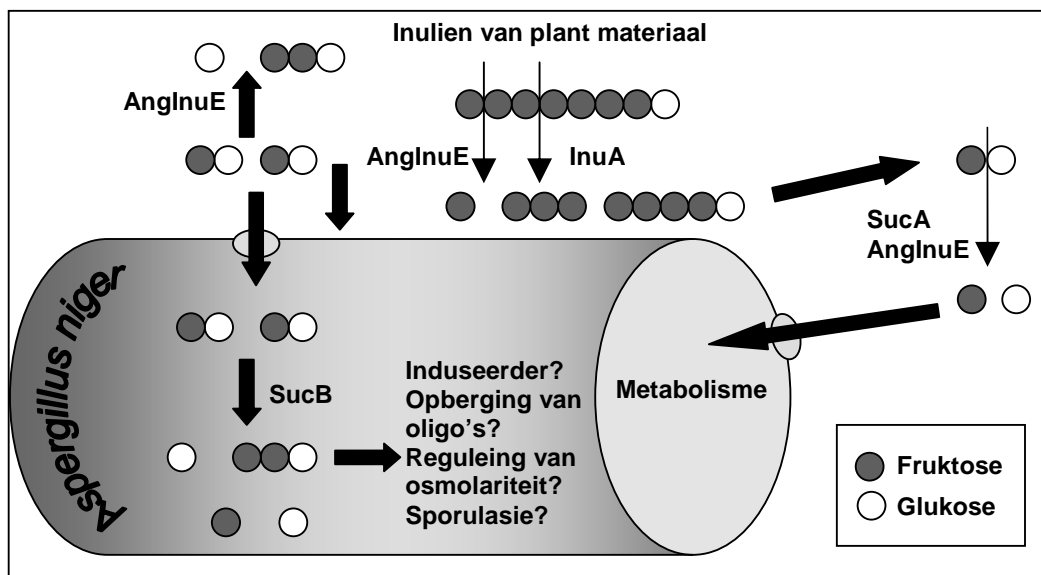


Figure 1. Skematiese voorstelling van die sukrose en fruktaan modifiserende ensiem netwerk van *Aspergillus niger* (sien teks vir besonderhede), aanduidend van beide die extrasellulêre (AngInuE, InuA, SucA), asook intrasellulêre (SucB) sukrose en fruktaan modifiserende ensieme.