



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Chitin in the fungal cell wall: Towards valorization of spent biomass of *Aspergillus niger***

Leeuwe, T.M. van

### **Citation**

Leeuwe, T. M. van. (2020, November 4). *Chitin in the fungal cell wall: Towards valorization of spent biomass of *Aspergillus niger**. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/138011>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/138011>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/138011> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Leeuwe, T.M. van

**Title:** Chitin in the fungal cell wall: Towards valorization of spent biomass of *Aspergillus niger*

**Issue date:** 2020-11-04

## Nederlandse Samenvatting

Het gebruik van filamenteuze schimmels voor het maken van voedingsmiddelen is terug te vinden in de historie van de beschaafde wereld; bekende voorbeelden hiervan zijn de fermentatie van sojasaus en melk. Naast het feit dat deze technieken nog steeds worden toegepast, zijn de toepassingen van schimmels alleen nog maar verder gegroeid. Zo worden schimmels tegenwoordig gebruikt om een verscheidenheid aan producten te maken zoals antibiotica, enzymen en organische zuren, zoals citroenzuur. Deze producten worden op grote schaal geproduceerd wat inhoudt dat schimmels worden gekweekt in een (meestal) vloeibare voedingsbron. Containers die deze voedingsbron (meestal medium genoemd) en de schimmel bevatten, worden fermentoren genoemd en zijn bedoeld om de schimmelgroei zo optimaal mogelijk te maken. Deze fermentoren kunnen zeer omvangrijk zijn en bevatten soms wel tienduizenden liters medium. Nadat het benodigde product dat de schimmel produceert is geoogst, wordt de schimmelbiomassa na fermentatie als afval beschouwd; vanuit dit perspectief heeft de biomassa enkel als middel gediend om een doel te bereiken. Echter, omdat veel van de energie uit het medium wordt geïnvesteerd in de productie van biomassa, kan het weggooiën van die biomassa worden beschouwd als een gemiste kans om waardevolle componenten terug te winnen.

Het Fungal Chitosan (FunChi)-project, waar dit promotieonderzoek een onderdeel van uitmaakt, is opgezet om te onderzoeken of de gebruikte biomassa nuttig kan worden gebruikt in plaats van weggegooid. Hierbij is onderzocht of bepaalde componenten van deze biomassa toe te passen zijn als natuurlijke gewassenbeschermingsmiddelen. De gebruikte biomassa bestaat voor een aanzienlijk deel uit de schimmelcelwand die tot wel 80% van het drooggewicht van de biomassa uitmaakt. Een belangrijk component van de celwand is chitine en zijn derivaat chitosan, twee polymeren die van bijzonder belang zijn vanwege toepassing om het immuunsysteem van planten te stimuleren. Chitine en chitosan komen van nature in celwanden voor van veel verschillende schimmels, en uit onderzoek is gebleken dat planten de aanwezigheid van schimmels detecteren via deze polymeren. Wanneer planten blootgesteld worden aan deze polymeren, reageren ze door hun immuunsysteem te activeren om zo een dreigende schimmelinfectie te bestrijden. Extracten van de celwanden uit gebruikte biomassa van filamenteuze schimmels zouden dus kunnen worden toegepast als activator om op een natuurlijke manier resistentie tegen schimmelinfecties op te roepen. Om het gebruik van celwanden van schimmels voor dit doel economisch haalbaar te maken, moeten twee hoofdpunten worden bekeken: (i) wat is de chitine-opbrengst uit schimmelbiomassa en kan deze worden verhoogd? (ii) Kan de extraheerbaarheid van chitine uit de schimmelcelwand worden verbeterd (of goedkoper gemaakt) door natuurlijke chitine-celwandverbindingen te verwijderen? Het werk dat in dit proefschrift wordt beschreven, heeft een fundamentele benadering gekozen om beide problemen afzonderlijk aan te pakken. Voor deze studie is het organisme *Aspergillus niger* gebruikt; een filamenteuze schimmel die veel wordt gebruikt in industriële omgevingen voor de productie van talrijke enzymen en citroenzuur;

maar ook in fundamenteel onderzoek van universitaire laboratoriumomgevingen wordt gebruikt.

De totale opbrengst aan chitine en chitosan in de celwand van het wildtype *A. niger* bleek ~15% van het celwanddrooggewicht te zijn. Om een *A. niger* stam te vinden die meer celwand chitine kan aanmaken, werden *A. niger* celwandmutanten—afkomstig uit eerder uitgevoerd onderzoek met een zogenaamde ‘forward genetics screen’—met een constitutieve toestand van celwandstress nader onderzocht. Wanneer een stam een toestand van celwandstress ervaart, kunnen er veel celwandveranderingen optreden, waaronder de activatie van de chitineproductie. Een verzameling celwandmutanten werd zodanig gescreend op een toename van het celwandchitinegehalte. Twee van deze celwandmutanten, RD15.4#55 en RD15.8#16, vertoonden een toename van het chitinegehalte vergeleken met wildtype van respectievelijk ~35% en ~60% (zie **Hoofdstuk 4** en **Hoofdstuk 5**). De verantwoordelijke mutaties voor dit fenotype zijn geïdentificeerd met behulp van genoomsequencing, parasexuele kruisingen en co-segregatieanalyse.

De stam RD15.4#55 bleek een C-terminaal deel te missen van een voorheen onbekende transcriptionele repressor, *cwcA*. Een complete deletie van deze vermeende transcriptionele repressor *cwcA* resulteerde in hetzelfde celwand-chitinefenotype als de C-terminaal ingekorte versie de transcriptionele repressor in RD15.4#55. Deze vondst wijst er dan ook op dat het missen van het C-terminale deel van *cwcA* leidt tot volledig functieverlies. Er zijn geen eerdere studies gerapporteerd over deze repressor in *A. niger* en wij hebben dit gen *cwcA* (cell wall chitin A) genoemd naar het celwand-chitinefenotype (**Hoofdstuk 4**). Van mutant RD15.8#16, met ~60% verhoogd chitinegehalte in de celwand werd vastgesteld dat het om een mutatie in de Rab GDP dissociation inhibitor A (*gdiA*) gaat. De gevonden mutatie, in het tweede intron van het *gdiA* gen, resulteerde zowel in lagere hoeveelheden van het correct geprocesste transcript als incorrecte transripten (**Hoofdstuk 5**). Ook hebben wij gevonden dat een complete knock-out van *gdiA* niet levensvatbaar was. Uit deze resultaten concludeerden wij dat de mutatie in het tweede intron van *gdiA* waarschijnlijk leidt tot een te lage hoeveelheid actieve Rab GDP dissociation inhibitor. Dit heeft als gevolg dat er een onbalans is in de Rab GTPase GTP/GDP-cyclus die, ofwel direct ofwel indirect, leidt tot extra chitine-afzetting in de celwand.

Naast het gebruik van een forward genetics screen, werd ook een *kexB*-deletiestam meegenomen voor celwandonderzoek. Het gen *kexB* codeert voor het protease dat als functie dient om eiwitten in de cellulaire secretieroute te activeren. Verlies van dit eiwit resulteert bovendien in een fenotype met dikkere celwanden en prominente hyper-vertakking van de hyphen. Hyper-vertakking van hyphen kan de viscositeit verlagen bij hoge biomassadichtheden in fermentoren. Hoge viscositeit is normaliter onlosmakelijk verbonden aan de manier van filamenteuze groei en kan leiden tot zowel een hoger energieverbruik als inconsistente productieopbrengsten in schimmelfermentaties. Analyse van het transcriptoom van de *kexB*-deletie stam vertoonde sterke signalen van celwandstress, maar ook positieve activatie van genen die betrokken zijn bij de chitinesynthese. Deze toename in genexpressie was terug te vinden in de ~20% verhoging van het chitinegehalte in de celwand. Een verrassende vondst daarbij was dat de toename in celwand chitine onafhankelijk bleek van het hyper-vertakte fenotype. Dit hyper-vertakte fenotype van de

*kexB*-deletie stam was overigens alleen zichtbaar bij pH 6 en vertoonde fenotypische plasticiteit tussen pH 5 en pH 6. Bij pH 5 was het fenotype vrijwel identiek aan de wild type *A. niger* stam, terwijl bij pH 6 het hyper-vertakte fenotype duidelijk zichtbaar was (**Hoofdstuk 6**).

Om de extraheerbaarheid van chitine en chitosan uit de celwand van *A. niger* te verbeteren, hebben we ook onderzoek gedaan naar de rol van een familie van genen wordt verantwoordelijk geacht voor het faciliteren van de cross-link tussen chitine en  $\beta$ -1,3-glucaan in de celwand, de zogenaamde *crh*-genfamilie. Omdat *A. niger* zeven *crh*-genfamilieleden bezit, vormde het uitschakelen van alle genen een praktisch probleem. De oplossing diende zich aan door voor *A. niger* een methode van gen-editing op de zetten met behulp van CRISPR/Cas9. Deze methode is onafhankelijk van het gebruik van selectiemarkers om genen te inactiveren en wij hebben laten zien dat nauwkeurige en efficiënte uitschakeling van alle zeven gen-leden van de *crh*-familie mogelijk was (**Hoofdstuk 2**). Naast het aantonen van de efficiëntie van dit systeem, toonde parallel uitgevoerde uitschakeling van de *crh* genen aan—met behulp van bestaande auxotrofe markerselectierecycling—dat gebruik van de selectiemarker gebaseerde methode regelmatig vals-positieve fenotypen opleverden. Dit negatieve effect is hoogstwaarschijnlijk toe te wijzen aan locus-afhankelijke effecten van ontoereikende expressie van het auxotrofe selectiemarker gen (**Hoofdstuk 2**).

De impact van het verwijderen van de complete *crh*-genfamilie had verrassend genoeg geen noemenswaardig effect op de celwandsamenstelling en ook niet op de celwandintegriteit. In contrast met wat bekend is uit de literatuur voor (de aan schimmels verwante) gisten, veroorzaakten verschillende celwand-verstorende verbindingen geen ander effect op de groei van de mutant in vergelijking met het wildtype. De groeisnelheid voor zowel wildtype als de zevenvoudige *crh*-mutant was hetzelfde bij gecontroleerde batch-fermentaties en ook de mRNA transcriptiepatronen waren bijna identiek. Celwand fracties vertoonden geen verschillen in polymeer samenstelling zoals glucanen en chitine (**Hoofdstuk 2** en **Hoofdstuk 3**). Als zodanig lijken de *crh* genen dus verwerpelijk te zijn, maar we hebben toch kunnen laten zien dat de *crh* genen belangrijk zijn wanneer andere celwandcomponenten, zoals galactomannaan of  $\alpha$ -glucaan afwezig zijn. Aangezien  $\alpha$ -glucaan van nature afwezig is in gisten, zou de discrepantie in het effect van het verwijderen van de *crh* genen in gist en *A. niger* dus kunnen worden verklaard door de aan/afwezigheid van  $\alpha$ -glucanen. Het ontbreken aan effect op de celwand bij het verwijderen van alle *crh* genen is ook waargenomen voor een andere schimmel, *A. fumigatus*. Dit ondersteunt onze resultaten verder dat er een verschil is tussen filamenteuze schimmels en gist wat betreft het belang van de *crh* genen voor celwandintegriteit. We veronderstellen dus dat in filamenteuze schimmels naast de chitine- $\beta$ -1,3-glucaan-crosslinks ook de interactie tussen chitine en  $\alpha$ -glucaan een cruciale rol kan spelen bij het verankeren van chitine aan de celwand.

Naast een overzicht van resultaten die we in ons onderzoek hebben verkregen, bespreken we in **Hoofdstuk 7** ook alternatieve benaderingen om de chitineproductie in schimmelcelwanden te verhogen. Met betrekking tot het FunChi-project worden de belangrijkste resultaten en conclusies besproken en worden ideeën voor toekomstige implementatie voorgesteld.