

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	<i>Aspergillus niger</i>	3
2.1.1	Wertstoffproduzent in der Biotechnologie	4
2.1.2	Morphologie und Produktbildung	6
2.1.3	Pelletkultivierung	8
2.2	Prozesscharakterisierung – vom Gen zum Produkt	11
2.2.1	Proteinsynthese	11
2.2.2	Regulationsebenen	14
2.2.3	Prozessrelevante Genexpression	17
2.2.4	Methoden der Genexpressionsanalyse	19
2.3	Modellproteine und –promotor	22
2.3.1	Glucoamylase	22
2.3.2	Glucoamylasepromotor (<i>PglA</i>)	23
2.3.3	Green Fluorescent Protein (GFP)	24
2.3.4	Glucoamylase und GFP - morphologische Aspekte	25
3	Material und Methoden	28
3.1	Verwendeter <i>Aspergillus niger</i> Stamm	28
3.1.1	Eigenschaften	28
3.1.2	Stammhaltung und Sporenanzucht	30
3.2	Kultivierungen	30

3.2.1	Medien	30
3.2.2	Bioreaktoren, Kultivierungsbedingungen und Beprobung	32
3.3	Allgemeine Analytik und Mikroskopie	33
3.3.1	Biotrockenmassebestimmung	33
3.3.2	HPLC - High Performance Liquid Chromatography	34
3.3.3	Histologie und Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	35
3.4	Molekularbiologische Analytik - Genexpression	36
3.4.1	RNA-Isolierung.....	36
3.4.2	Reverse Transkription und Real Time PCR.....	38
3.4.3	Reverse Transkription und custom made DNA-Arrays	42
3.5	Molekularbiologische Analytik - Proteinexpression	47
3.5.1	Glucoamylaseaktivitätstest.....	47
3.5.2	GFP-Intensitätsmessung.....	48
4	Ergebnisse und Diskussion.....	49
4.1	Einfluss des Leistungseintrags auf die Morphologie	49
4.2	Einfluss des Leistungseintrags auf die heterologe Produktbildung	56
4.3	Produktion homologer und heterologer Proteine	60
4.4	Homologe und heterologe Transkriptionsaktivität	62
4.5	Korrelation von Transkription und Translation	68
4.5.1	Mathematischer Zusammenhang	69
4.5.2	Glucoamylase.....	70
4.5.3	Green Fluorescent Protein (GFP).....	72
4.6	Regulation der Transkriptionsaktivität <i>PglA</i> -kontrollierter Gene	74
4.6.1	Kontrollelemente des Glucoamylasepromotors (<i>PglA</i>).....	74
4.6.2	Transkriptionsaktivität des <i>glaA</i> - und <i>gfp</i> -Gens bei Maltose- und Glucoseinduktion.....	75
4.6.3	Transkriptionsaktivität des <i>creA</i> -Gens bei Maltose- und Glucoseinduktion.....	78

4.6.4	Transkriptionsaktivität des <i>amyR</i> -Gens bei Maltose- und Glucoseinduktion	81
4.7	Prozessrelevante Genexpression	84
4.7.1	Etablierung des DNA-Array Tube Systems.....	85
4.7.2	Expression Chitin- und Glucansynthase codierender Gene.....	88
5	Zusammenfassung	97
6	Literaturverzeichnis	101