

(12) PATENT APPLICATION PUBLICATION

(21) Application No.202041041632 A

(19) INDIA

(22) Date of filing of Application :25/09/2020

(43) Publication Date : 02/10/2020

(54) Title of the invention : DESIGN OF I-HEALTH USING NFC TAG FOR MONITORING, STORING AND ACCESSING PATIENT HEALTH INFORMATION IN SINGLE TAP

(51) International classification	:H04L63/102	(71)Name of Applicant :	1)DR. SUBBURAJ S. V
(31) Priority Document No	:NA	Address of Applicant :50F, Krishna Street, SRV Nagar,	Thirunagar PO Madurai Tamilnadu India 626006 Tamil Nadu India
(32) Priority Date	:NA	2)DR. C.B SENTHILKUMAR	3)DR. M. JOHN BASHA
(33) Name of priority country	:NA	4)DR. C.KRISHNA PRIYA	5)DR. B.HARI CHANDANA
(86) International Application No	:NA	6)DR. R. SHANTHI	7)DR. P. SUMALATHA
Filing Date	:NA	8)DR. S. BHARANISETHUPANDIAN	9)DR UMARANI PM
(87) International Publication No	:NA	10)DR. D. DHANYA	11)DR. J. JEYABHARATHI
(61) Patent of Addition to Application Number	:NA	12)N.G.S.PARAMESWARAN	13)NAZEER SHAIK
Filing Date	:NA	(72)Name of Inventor :	1)DR. SUBBURAJ S. V
(62) Divisional to Application Number	:NA	2)DR. C.B SENTHILKUMAR	3)DR. M. JOHN BASHA
Filing Date	:NA	4)DR. C.KRISHNA PRIYA	5)DR. B.HARI CHANDANA
		6)DR. R. SHANTHI	7)DR. P. SUMALATHA
		8)DR. S. BHARANISETHUPANDIAN	9)DR UMARANI PM
		10)DR. D. DHANYA	11)DR. J. JEYABHARATHI
		12)N.G.S.PARAMESWARAN	13)NAZEER SHAIK

(57) Abstract :

Indian population is nearly 125 Cr. In parallel the rise of disease among peoples are increased consistently among people. In India most of the people are from rural area with less educational competencies. They are unable to explain about their earlier health information when are affected by an disease. Also physician depends on paper work for getting patient information apart from few digital data™s that are available only in few hospitals. Hence worth there is an urgent need for new technology to store and retrieve patient information quickly. The launches of NFC tags are implemented at hospitals for storing and accessing individual patient health information using deputed NFC writer. This system works in a swift basis that stored huge volume of patient health information and converts are link and finally stored in NFC tag. When a patient approaches a doctor their entire health information™s are retrieved in a single tap and then parallel updated after the present diagnosis process is completed. NFC is the recent charm in technological growth and provides way for upgraded inventions in the field of medical sciences.

No. of Pages : 9 No. of Claims : 9

(12) PATENT APPLICATION PUBLICATION  
(19) INDIA

(21) Application No.202041034792 A

(22) Date of filing of Application :13/08/2020

(43) Publication Date : 28/08/2020

(54) Title of the invention : A NOVEL STACKED DESIGN FOR FABRICATING SUPERCAPACITOR DEVICE USING SPUTTERED THIN FILMS

(51) International classification :H01L27/301  
(31) Priority Document No :NA  
(32) Priority Date :NA  
(33) Name of priority country :NA  
(86) International Application No :NA  
Filing Date :NA  
(87) International Publication No :NA  
(61) Patent of Addition to Application Number :NA  
Filing Date :NA  
(62) Divisional to Application Number :NA  
Filing Date :NA

(71)Name of Applicant :

**1)Ethna Attributes Soft Technologies Pvt Ltd**

Address of Applicant :Krip IT Park, 942, Vandalur-  
Kelambakkam Road, Kizhakoottaiyur, Chennai, Tamil Nadu India  
600127. Tamil Nadu India

(72)Name of Inventor :

**1)Mr. Srinivasan M**

**2)Dr. B. Muthuraaman**

**3)Mr. Rajagopal Peri**

**4)Mr. Mathan Kumar P**

**5)Dr. Yesuraj J**

(57) Abstract :

With increasing interest in wearable sensors and electronics, there is an immense need for thin-film electrical energy storage devices. Herewith, we are reporting a novel device architecture, and fabrication process that is conceptually scalable to any size. Its a new design geometry for thin film Supercapacitors, fabricated using reactive sputtering over an altered FTO plate (fluorine doped tin oxide) followed by spin coating. The device can be fabricated by varying the layered thickness parameters over any non-conducting surface making them promising power sources for small-scale flexible microelectronic energy storage systems (e.g., next-generation smart phones and sensors). The device architecture forms a four layered stacked design on a non-conducting substrate, which consist of a layer of active material (TiAlC and CuAlN) formed with difference between high and low resistance regions, with a thickness ranging from nanometers to micrometers scale. Their unique configurations with varying high and low resistance regions over the same surface with thin and uniform thicknesses not only guarantee fast electrochemical responses during charge/discharge processes but also allow them to operate at both higher and lower voltages. The new device geometry can be applied to both miniaturized and large-scale devices.

No. of Pages : 9 No. of Claims : 10

(12) PATENT APPLICATION PUBLICATION

(21) Application No.202041047644 A

(19) INDIA

(22) Date of filing of Application :31/10/2020

(43) Publication Date : 06/11/2020

(54) Title of the invention : A DEVICE FOR CONTINUOUS MONITORING OF OXYGEN SATURATION LEVEL AND PULSE RATE AND THE METHOD INVOLVED THEREOF

(51) International classification	:A61B 5/1455	(71)Name of Applicant :
(31) Priority Document No	:NA	1)Dr. R.RAMYA
(32) Priority Date	:NA	Address of Applicant :Divinity, 1170,14TH street, Ashok
(33) Name of priority country	:NA	Nagar, Chennai- 83 Tamil Nadu India
(86) International Application No	:NA	2)Dr. K.RAJKUMAR
Filing Date	:NA	3)Dr.P.RAJASHREE
(87) International Publication No	:NA	4)Dr. S. BALAKUMAR
(61) Patent of Addition to Application Number	:NA	(72)Name of Inventor :
Filing Date	:NA	1)Dr. R.RAMYA
(62) Divisional to Application Number	:NA	2)Dr. K.RAJKUMAR
Filing Date	:NA	3)Dr.P.RAJASHREE
		4)Dr. S. BALAKUMAR

(57) Abstract :

A device for continuous monitoring of oxygen saturation level and pulse rate relates to an intra-orally wearable device(1) to detect the oxygen saturation level in blood and the pulse level, more particularly in the lingual frenulum region. The detected oxygen saturation level and pulse rate is communicated to the handheld portable unit(15) by wireless means. The oxygen saturation level is continuously monitored in the display terminal of the receiving unit, where the signal is received from the transmitting wearable unit by means of the synchronously tuned receiver(10).

No. of Pages : 20 No. of Claims : 11

(12) PATENT APPLICATION PUBLICATION

(21) Application No.202041037063 A

(19) INDIA

(22) Date of filing of Application :28/08/2020

(43) Publication Date : 11/09/2020

(54) Title of the invention : AN OXIMETER DEVICE FOR DETECTING THE ARTERIAL BLOOD GAS IN THE TRANSMUCOSAL REGION OF THE ORAL CAVITY

(51) International classification	:A61B0005000000, A61B0005145500, A61B0005024000, A61K0009000000, A61B0005150000	(71)Name of Applicant :
(31) Priority Document No	:NA	1)Dr. R.RAMYA
(32) Priority Date	:NA	Address of Applicant :Divinity, 1170,14TH street, Ashok
(33) Name of priority country	:NA	Nagar, Chennai- 83 Tamil Nadu India
(86) International Application No	:NA	2)Dr. K.RAJKUMAR
Filing Date	:NA	3)Dr. P.RAJASHREE
(87) International Publication No	:NA	4)Dr. S. BALAKUMAR
(61) Patent of Addition to Application Number	:NA	(72)Name of Inventor :
Filing Date	:NA	1)Dr. R.RAMYA
(62) Divisional to Application Number	:NA	2)Dr. K.RAJKUMAR
Filing Date	:NA	3)Dr. P.RAJASHREE
		4)Dr. S. BALAKUMAR

(57) Abstract :

AN OXIMETER DEVICE FOR DETECTING ARTERIAL BLOOD GAS IN THE TRANSMUCOSAL REGION OF THE ORAL CAVITY An oximeter device for detecting the blood gas in the trans mucosal region of the oral cavity relates to the device to detect the oxygen gas saturation and the pulse rate at the lingual frenulum region of the oral cavity. The device senses the ratio of the oxidised to reduced haemoglobin by means of transillumination and is processed and displayed in the display means(5). The device is powered by a battery or it can be charged by means of the USB port(13). Advantages of utilizing the sublingual region lies in improved accuracy without skin interference. Added advantages are for patients who are fire victims when the external surface is burnt, amputees and those with peripheral vascular disorders

No. of Pages : 20 No. of Claims : 10

[Home](#)[Quick Structured](#) [Advanced](#)

## Application Details

2021100315

: CORDIC-BASED QR DECOMPOSITION FOR MIMO

### BIBLIOGRAPHIC DATA

#### Application details

Australian application number	2021100315	Patent application type	Innovation	
Application status	ACCEPTED	Paid to date	2023-01-19	First IPC Mark
Currently under opposition	No	Proceeding type(s)		
Invention title	CORDIC-BASED QR DECOMPOSITION FOR MIMO			
Inventor(s)	Research Scholar, PREESAT BISWAS ; KIJAN, MOHAMMAD RAFIQUE ; RATI IORE, SIJANTI ; SIJARMA, NITESHI KUMAR			
Agent name	SUNDARAM, ARUN DR	Address for legal service	WA 6147 Australia	<a href="#">show full address</a>
Filing date	2021-01-19	Australian OPI date		OPI published in journal
Effective date of patent	2021-01-19	Expiry date	2029-01-19	
Additional/Divisional application number	Additional/Divisional relationship			

#### Applicant details

Applicant	RATI IORE, SIJANTI DR	Applicant address	India
Applicant	Research Scholar, PREESAT BISWAS MR	Applicant address	Chhattisgarh India
Applicant	KIJAN, MOHAMMAD RAFIQUE DR	Applicant address	India
Applicant	SIJARMA, NITESHI KUMAR MR	Applicant address	Bilaspur, Chhattisgarh India
Old name(s)			

#### IPC details

Int Cl.	Version	First Mark

#### Priority details

Earliest priority date	2021-01-19		
Type	Number	Filing date	Priority date

#### Associated provisional(s)

Provisional number	Title	Filing date

(12) PATENT APPLICATION PUBLICATION

(21) Application No.202141025238 A

(19) INDIA

(22) Date of filing of Application :07/06/2021

(43) Publication Date : 18/06/2021

(54) Title of the invention : PARALLEL ENCODER AND DECODER NETWORK FOR BRAIN TUMOR SEGMENTATION

(51) International classification	:G06N0003040000, G06K0009620000, G06K0009000000, G06T0007110000, G06T0007120000	(71)Name of Applicant : 1)Dr. PL. CHITRA Address of Applicant :DEPARTMENT OF COMPUTER SCIENCE, UNIVERSITY OF MADRAS, GUINDY CAMPUS, CHENNAI, TAMIL NADU, INDIA -600025 Tamil Nadu India 2)G. DHEEPA
(31) Priority Document No	:NA	(72)Name of Inventor :
(32) Priority Date	:NA	1) Dr. PL. CHITRA
(33) Name of priority country	:NA	2)G. DHEEPA
(86) International Application No	:NA	
Filing Date	:NA	
(87) International Publication No	: NA	
(61) Patent of Addition to Application Number	:NA	
Filing Date	:NA	
(62) Divisional to Application Number	:NA	
Filing Date	:NA	

(57) Abstract :

To automate the tumor segmentation process, we propose an effective parallel encoder and decoder network to segment brain tumor regions in Magnetic Resonance Imaging (MRI). This network contains two parallel and one downsampling block in encoding layer followed by one upsampling and one parallel block in decoding layer. All image slices from BRATS 2018 dataset are processed in the first parallel block of encoder layer. In this block, input slices are parallelly processed in four paths: hierarchy of three convolutional layers with 1 x 1 filters; hierarchy of three convolutional layers with 3x3 filters; hierarchy of three convolutional layers with 5x5 filters and hierarchy of three convolutional layers with 7x7 filters. The outcomes of four paths are cascaded to be processed in a convolution layer with 3x3 filters for extracting the aggregated feature map. These feature maps are then downsampled using max-pooling to perform dimensionality reduction. The reduced dimensions are again processed in parallel block to extract the downsampled features. These features have been processed in the hierarchy of unpooling and parallel block in decoding layer. Finally, softmax classification has been performed over the decoding layer outcome to segment complete, core and enhanced tumoral

(12) PATENT APPLICATION PUBLICATION

(21) Application No.202141025182 A

(19) INDIA

(22) Date of filing of Application :07/06/2021

(43) Publication Date : 25/06/2021

(54) Title of the invention : VOXEON: VOXEL NEURON BASED BACKPROPAGATION NEURAL NETWORK FOR 3D LIDAR AIR BORNE POINT CLOUD CODEC

(51) International classification	:G06N0003040000, G06N0003080000, G06T0017000000, G01S0017890000, G06T0007194000	(71)Name of Applicant : 1)Dr. PL. CHITHRA Address of Applicant :Department of Computer Science, University of Madras, Guindy Campus, Chennai, Tamil Nadu, India 600025. Tamil Nadu India 2)A.CHRISTOPER TAMILMATHI
(31) Priority Document No	:NA	(72)Name of Inventor :
(32) Priority Date	:NA	1)Dr. PL. CHITHRA
(33) Name of priority country	:NA	2)A.CHRISTOPER TAMILMATHI
(86) International Application No	:NA	
Filing Date	:NA	
(87) International Publication No	: NA	
(61) Patent of Addition to Application Number	:NA	
Filing Date	:NA	
(62) Divisional to Application Number	:NA	
Filing Date	:NA	

(57) Abstract :

ABSTRACT This work presents a novel Voxeon based backpropagation neural network (VBPNN) for 3D LiDAR (Light detection and ranging) airborne point cloud codec. This proposed algorithm improvises the neuron to handle the array of the voxel to increases the computation speed of point cloud big data. First, the preprocess in which the massive raw point cloud data is subsampled and standardized by using signal sampling and point-wise statistical method respectively to increase the efficiency of the learning process in the backpropagation model. Second, the quantization process in which the standardized point cloud data feed into the voxeon based backpropagation model to learn to produce the compact latent vector while producing the better-quality decompressed point cloud image. The experimental results show that the proposed VBPNN algorithm compresses the 3D point cloud image an averagely 75% with lesser time and handle a greater number of points than the existing traditional backpropagation algorithm.

(12) PATENT APPLICATION PUBLICATION

(21) Application No.202141025150 A

(19) INDIA

(22) Date of filing of Application :07/06/2021

(43) Publication Date : 18/06/2021

(54) Title of the invention : IMAGE POLARITY CAPTCHA USING GAUSSIAN BASED EDGE DETECTED IMAGE WITH DEEP NEURAL NETWORK COMPUTER

(51) International classification	:G06K0009620000, G06F0021360000, G06N0003040000, H04L0029060000, G06N0003080000	(71)Name of Applicant : <b>1)Dr.PL.Chithra</b> Address of Applicant :Department of Computer Science, University of Madras Guindy Campus, Chennai, Tamil Nadu, India 600025. Tamil Nadu India <b>2)K.Sathya</b>
(31) Priority Document No	:NA	(72)Name of Inventor : <b>1)Dr.PL.Chithra</b> <b>2)K.Sathya</b>
(32) Priority Date	:NA	
(33) Name of priority country	:NA	
(86) International Application No	:NA	
Filing Date	:NA	
(87) International Publication No	: NA	
(61) Patent of Addition to Application Number	:NA	
Filing Date	:NA	
(62) Divisional to Application Number	:NA	
Filing Date	:NA	

(57) Abstract :

ABSTRACT CAPTCHA is a reverse Turing test that a computer uses to automatically check whether or not an individual is online. This project suggested a technique for creating CAPTCHA using Gaussian-based edge detected images. In the array, a set of edge detected images appeared alongside a group of dog and cat images. When trying to distinguish the edge detected cat images from other images, the Polarity CAPTCHA achieves a higher performance than other CAPTCHA. In the second phase, clicked images are substituted with edge detected dog images which significantly lower the computer classification performance relative to previous work while increasing dog and cat identification. Furthermore, a deep neural network model (proposed polarity model) was trained with other animals and human images to identify the images in a strong way. Existing image classification algorithms such as DeepFace, FaceNet, and TBE-CNN are used to evaluate these images. This algorithm was unable to predict Gaussian-based edge detected images with any noticeable success. When using this innovative CAPTCHA model, it greatly improves web security.

No. of Pages : 6 No. of Claims : 5

(12) PATENT APPLICATION PUBLICATION

(21) Application No.202141016916 A

(19) INDIA

(22) Date of filing of Application : 10/04/2021

(43) Publication Date : 16/04/2021

(54) Title of the invention : MACHINE LEARNING BASED BREAST CANCER DETECTION IN INTEGRATION WITH FUZZY LOGIC

(51) International classification	G06K0009620000, G16B0040000000, G16B0020000000, G06N0020000000, G06N0005040000	(71) Name of Applicant : 1)P Jhansi Lakshmi,Vignan's Foundation for Science Technology and Research Address of Applicant : Assistant Professor, Vignan's Foundation for Science, Technology and Research - Ganjar Andhra Pradesh India 522213 Andhra Pradesh India 2)Mr. T CH Anil Kumar,VFSTR (Deemed To Be University) 3)N Bharath Kumar,Vignan's Foundation for Science Technology and Research 4)Dr.R.Selvan,KCG College of Technology 5)Dr.P.M.Venkatash,VFSTR (Deemed To Be University) 6)N B Prakash Tiruvosulu,Vignan's Foundation for Science Technology and Research 7)Mr. Haqqani Arshad,Yashu Industrial College 8)Mr. Syed Zainulabidin Hashmi,Blessing Health System 9)Dr Marcin Rakula Bharathi B,Aditya College of Engineering 10)Dr.T.M.Vijayalakshmi,University of Madras
(33) Priority Document No	:NA	(72) Name of Inventor : 1)P Jhansi Lakshmi,Vignan's Foundation for Science Technology and Research 2)Mr. T CH Anil Kumar,VFSTR (Deemed To Be University) 3)N Bharath Kumar,Vignan's Foundation for Science Technology and Research 4)Dr.R.Selvan,KCG College of Technology 5)Dr.P.M.Venkatash,VFSTR (Deemed To Be University) 6)N B Prakash Tiruvosulu,Vignan's Foundation for Science Technology and Research 7)Mr. Haqqani Arshad,Yashu Industrial College 8)Mr. Syed Zainulabidin Hashmi,Blessing Health System 9)Dr Marcin Rakula Bharathi B,Aditya College of Engineering 10)Dr.T.M.Vijayalakshmi,University of Madras
(32) Priority Date	:NA	
(33) Name of priority country	:NA	
(86) International Application No	:PCT/	
Filing Date	:01/01/1900	
(87) International Publication No	:NA	
(61) Patent of Addition to Application Number	:NA	
Filing Date	:NA	
(62) Divisional to Application Number	:NA	
Filing Date	:NA	

(57) Abstract

Breast cancer is generally detected by a most common laboratory method termed as Mammography but poses many side cost yet associated with high cost. This problem can be solved by the proposed invention, where Machine learning acts as alternative method to provide promising results. This invention is able to detect breast cancer based on expert system of multilayer fuzzy logic utilizing extreme learning machine classification model in integration with radial basis function. Labeling of the dataset is first done by fuzzy logic once after which extreme learning machine classification model along with SVM model is applied to classify between benign cancer and malignant cancer with minimal error rate. Confusion matrix is used for evaluating the performance of the proposed system. The proposed method outperforms the linear SVM model with the parameters RMSE, MAPE & R2 which are obtained as 0.17, 0.05 and 0.93 respectively. Better performance is achieved by the proposed algorithms such as false negative rate, true positive rate, specificity, sensitivity, accuracy, precision and validation.

No. of Pages : 11, No. of Claims : 6





(10) **DE 20 2021 106 656 U1** 2022.03.10

(12) **Gebrauchsmusterschrift**

(21) Aktenzeichen: **20 2021 106 656.3**

(22) Anmeldetag: **07.12.2021**

(47) Eintragungstag: **01.02.2022**

(45) Bekanntmachungstag im Patentblatt: **10.03.2022**

(51) Int Cl.: **C12M 1/24 (2006.01)**

**C12M 1/26 (2006.01)**

(73) Name und Wohnsitz des Inhabers:  
**Javee, Anand, Dr., Chennai, Tamil Nadu, IN;**  
**Karuppan, Ramamoorthy, Dr., Ramanathapuram,**  
**Tamil Nadu, IN; Kattusamy, Karuppasamy, Dr.,**  
**Madurai, Tamil Nadu, IN; Malairaj, Sathuvan, Dr.,**  
**Pudukkottai, Tamil Nadu, IN; Narayanan,**  
**Vijayanand, Dr., Sivaganga, Tamil Nadu, IN;**  
**Pathmanapan, Arulmurugan, Dr., Nagapattinam,**  
**Tamil Nadu, IN; Ramasamy, Rengasamy, Prof.,**  
**Chennai, Tamil Nadu, IN; Subramani, Nagaraj, Dr.,**  
**Chennai, Tamil Nadu, IN**

(74) Name und Wohnsitz des Vertreters:  
**Hohendorf Kierdorf Patentanwälte PartGmbH,**  
**50672 Köln, DE**

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.**

(54) Bezeichnung: **Ein System zur Steigerung des Zellwachstums und der Astaxanthinproduktion in *H. pluvialis* Flotow**

(57) Hauptanspruch: Ein System zur Steigerung des Zellwachstums und des Gehalts an Astaxanthinproduktion in *H. pluvialis* Flotow, wobei das System umfasst:

eine Eingabeeinheit zum Sammeln eines neuen Stammes von *H. pluvialis* HPI-001 und einer *Haematococcus pluvialis*-Kultur;

eine Mischkammer, in der die Kulturen zweimal täglich gleichmäßig gemischt werden, um *Haematococcus pluvialis* zu isolieren und durch serielle Verdünnung, gefolgt von einer separaten Plattentechnik auf 2% Agar in 3N-BBM+V-Medium, Unialgenkulturen herzustellen;

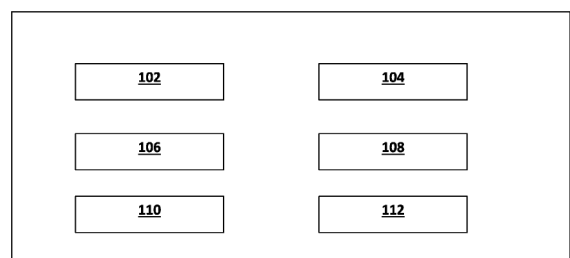
eine Behandlungseinheit für die autotrophe Aufzucht von zwei Stämmen von *Haematococcus pluvialis* Flotow in einem flüssigen Bold-Basalmedium bei einer Temperatur von  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , einer Lichtintensität von  $30 \mu\text{Em}\cdot 2\text{s}^{-1}$  und einem 12/12 Licht/Dunkel-Zyklus;

eine Inokulationseinheit zum Beimpfen von 10 ml einer grünen vegetativen Kultur vom siebten Tag in 90 ml eines sterilisierten 3N-BBM+V-Mediums in einem 100-mL-Erlenmeyerkolben und zur Aufbewahrung für einen Zeitraum von 30 Tagen;

eine Zentrifuge zum Zentrifugieren von mindestens fünf Millilitern der Kultur bei 5000 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten, um den Überstand zu verwerfen; dabei wird das Algenpellet mit 5 ml 100%igem Aceton versetzt und mit einem Stößel und Mörser zerkleinert, mit schwarzem Papier eingewickelt und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt; und

eine Steuereinheit zur Berechnung des Chlorophyll- und des Gesamtcarotinoidgehalts unter Verwendung einer Lichtenthaler-Gleichung und zur Bestimmung ...

100 →



**Beschreibung**

## BEREICH DER ERFINDUNG

**[0001]** Die vorliegende Offenbarung bezieht sich auf ein System zur Steigerung des Zellwachstums und des Gehalts an Astaxanthinproduktion in *H. pluvialis* Flotow. In mehr Details, Einfluss der Landwirtschaft Dünger auf die Verbesserung des Wachstums und Astaxanthin-Produktion in zwei Isolate von *Haematococcus pluvialis* Flotow.

## HINTERGRUND DER ERFINDUNG

**[0002]** Mikroalgen sind industriell wichtige Mikroorganismen, die weitgehend auf Bioprodukte wie Proteine, Kohlenhydrate, Lipide, Carotinoide und Astaxanthin untersucht wurden, die für Biokraftstoff- und Nahrungsergänzungsmittelanwendungen wertvoll sind. Astaxanthin ist ein äußerst wertvolles Carotinoid, das derzeit in der Lebensmittel-, Futtermittel-, Nutrazeutika- und Pharmaindustrie verwendet wird. Derzeit werden mehr als 95 % des in der Aquakultur verwendeten Astaxanthins künstlich hergestellt. Die Nachfrage nach natürlichem Astaxanthin steigt aufgrund der wachsenden Nachfrage nach natürlichen Inhaltsstoffen. Verschiedene Mikroorganismen wie *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella zofingiensis*, die rote Hefe *Phaffia rhodozyma* und das Meeresbakterium *Agrobacterium aurantiacum* können Astaxanthin produzieren. Eine der wichtigsten Quellen für natürliches Astaxanthin ist die Mikroalge *Haematococcus pluvialis*. Zu den anderen natürlichen Astaxanthinquellen gehören wild lebender pazifischer Sockeye-Lachs, Hummer, arktische Garnelen, Krabben, Langusten, Rotforellen, Algen und Krill. Das Potenzial der derzeitigen Quellen ist jedoch begrenzt und reicht nicht aus, um den weltweiten Astaxanthinmarkt zu versorgen. *Haematococcus pluvialis* synthetisiert und akkumuliert hohe Konzentrationen von Astaxanthin (4 Gew.-%) in extra-plastidialen Lipidkörpern.

**[0003]** *H. pluvialis* gehört zur Ordnung der Volvocales und zur Klasse der Chlorophyceae und lebt als einzelliger, beweglicher und biflagellater Organismus im Süßwasser. Der Lebenszyklus besteht aus vier Stadien: Makrozooiden oder Zoospore, Mikrozooiden, Palmella und Aplanospore. Das Makrozooidenstadium ist eine elliptische Zelle mit zwei 8 bis 20 µm langen Fäden, einer dünnen Zellwand und einer extrazellulären gelatinösen Matrix. *H. pluvialis* ist in kleinen, vorübergehenden Süßwasserkörpern häufig und in vielen Lebensräumen weltweit weit verbreitet. Sie kommt vor allem in temporären Gewässern wie ephemeren Regenbecken, künstlichen Tümpeln, natürlichen und künstlichen Teichen und Vogeltränken vor. Diese Mikroalge ist normalerweise in den gemäßigten Regionen der Welt zu finden und wurde aus Europa, Afrika, Nordamerika und Himachal Pradesh in Indien isoliert. Wie die meisten einzelligen Organismen kann *H. pluvialis* in vielen Phasen seines Lebenszyklus eine starre Zellwand aufweisen, die aus einer Mischung von Proteinen und Polysacchariden besteht und den Zellkörper umgibt und schützt. Die hochkomplexe und dynamische Zusammensetzung der Zellwand ermöglicht es *H. pluvialis*, in einer feindlichen Umgebung zu überleben, stellt aber andererseits ein Problem dar, wenn die Biomasse von *H. pluvialis* verarbeitet werden muss, um wertvolle intrazelluläre Verbindungen wie Astaxanthin zu gewinnen.

**[0004]** Nährstoffe sind für das Wachstum und die Entwicklung von Mikroalgen von entscheidender Bedeutung und beeinflussen die physiologische Anpassung und die biochemische Zusammensetzung von Mikroalgen. Stickstoff und Phosphor sind die Hauptelemente, die das Wachstum von Mikroalgen begrenzen, das in der Regel von den physiologischen Anforderungen der einzelnen Nährstoffe abhängt. Es gibt mehrere andere Grundnährstoffe für das Wachstum von Mikroalgen wie Kalzium, Magnesium, Eisen, Schwefel und Spurenelemente. Kalium ist ein Makronährstoff, der für wachstumsbezogene Stoffwechselaktivitäten benötigt wird. Es gibt Berichte über die Verwendung einiger organischer und anorganischer Quellen als Nährstoffquellen für das Wachstum von Mikroalgen. Zuckerrohrmelasse mit einem hohen Kohlenstoffgehalt und niedrigen Kosten ist eine solche optionale Quelle, die insbesondere in Ländern wie Brasilien verwendet wird. Anorganischer N:P:K-Dünger ist ebenfalls eine kostengünstige Alternative mit einer hohen Verfügbarkeit von Stickstoff, Phosphor und Kalium, die für die Entwicklung von Algen wichtig sind.

**[0005]** Anorganische Düngemittel sind einfach und können mit alternativen Nährböden für Mikroalgen verwendet werden, da sie weithin verfügbar sind, sich leicht auflösen, eine bestimmte Zusammensetzung haben, einen hohen Stickstoff- und Phosphorgehalt aufweisen und einen moderaten pH-Wert im Nährboden aufrechterhalten. In der Aquakultur entnimmt die im Wasser schwimmende Makrophyte *Eichhornia crassipes* dem Wasser anorganische Nährstoffe, vor allem Stickstoff und Phosphor, über ihre Wurzeln und speichert sie in ihrer Biomasse. In Verbindung mit anorganischen Düngemitteln wie N:P:K stellt sie ein effizientes Alternativmedium für Chlorophyceae dar.

**[0006]** Astaxanthin (C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>O<sub>4</sub>, 3,3'-Dihydroxy-β,β-carotin-4,4'-dion) ist ein zur Gruppe der Xanthophylle gehörendes Carotinoid, das aufgrund seiner interessanten Eigenschaften, wie z. B. als Lebensmittel, Farbstoff und Antioxidationsmittel, für eine Vielzahl von Industriemärkten sehr attraktiv ist. In der Aquakultur wird es als Futterzusatz für Lachse, Forellen und Krustentiere verwendet, um ihnen die charakteristische rosa oder rote Farbe zu verleihen. Astaxanthin wird auch wegen seiner antioxidativen und positiven Wirkung auf die Fortpflanzung und das Immunsystem gezüchteter Arten sowie wegen seiner Anti-Aging-Wirkung in der Kosmetikbranche geschätzt. Seine Hauptverwendung ist jedoch nach wie vor die Verwendung als Futtermittelzusatz in der Aquakultur zur Förderung des Fischwachstums und zur Ernährung von Ziervögeln. In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise auf seine entzündungshemmenden, kardioprotektiven, neuroprotektiven, gastroprotektiven, nephroprotektiven, antidiabetischen, krebshemmenden, antiasthmatischen und immunprotektiven Eigenschaften. Aus diesen Gründen wird Astaxanthin auch zur Vorbeugung und Kontrolle vieler oxidativer und entzündlicher Erkrankungen eingesetzt.

**[0007]** In Anbetracht der vorstehenden Ausführungen wird deutlich, dass ein System zur Steigerung des Zellwachstums und der Astaxanthinproduktion in *H. pluvialis* Flotow erforderlich ist.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0008]** Die vorliegende Offenlegung zielt darauf ab, ein System zur Verbesserung des Zellwachstums und des Gehalts an Astaxanthin-Produktion von zwei Isolaten von *H. pluvialis* durch die Verwendung von handelsüblichen anorganischen landwirtschaftlichen Düngemitteln bereitzustellen.

**[0009]** In einer Ausführungsform wird ein System zur Steigerung des Zellwachstums und des Gehalts der Astaxanthinproduktion in *H. pluvialis* Flotow offenbart. Das System umfasst eine Eingabeeinheit zum Sammeln eines neuen Stammes von *H. pluvialis* HPI-001 und einer *Haematococcus pluvialis*-Kultur. Das System umfasst ferner eine Mischkammer, in der die Kulturen zweimal täglich gleichmäßig gemischt werden, wodurch *Haematococcus pluvialis* isoliert und unialgische Kulturen durch serielle Verdünnung, gefolgt von einer separaten Plattentechnik auf 2% Agar in 3N-BBM+V-Medium, hergestellt werden. Das System umfasst ferner eine Behandlungseinheit für die autotrophe Aufzucht von zwei Stämmen von *Haematococcus pluvialis* Flotow in einem flüssigen Bold-Basalmedium, wobei die Temperatur bei 25±1°C, 30 µEm-2s-1 Lichtintensität und 12/12 Licht/Dunkel-Zyklus gehalten wird. Das System umfasst ferner eine Inokulationseinheit, mit der 10 ml einer grünen vegetativen Kultur vom siebten Tag in 90 ml eines sterilisierten 3N-BBM+V-Mediums in einem 100-ml-Erlenmeyerkolben beimpft und für einen Zeitraum von 30 Tagen aufbewahrt werden. Das System umfasst ferner eine Zentrifuge zum Zentrifugieren von mindestens fünf Millilitern der Kultur bei 5000 U/min für 10 Minuten, um den Überstand zu verwerfen, wobei das Algenpellet mit 5 ml 100%igem Aceton versetzt und mit einem Stößel und Mörser mazeriert, mit schwarzem Papier umwickelt und über Nacht bei 4° C aufbewahrt wird. Das System umfasst ferner eine Steuereinheit zur Berechnung des Chlorophyll- und Gesamtcarotinoidgehalts unter Verwendung einer Lichtenthaler-Gleichung und zur Bestimmung der Menge an Astaxanthin aus dem Aceton-Extrakt der Algenprobe bei 480 nm unter Verwendung eines Absorptionskoeffizienten zur Steigerung des Zellwachstums und des Gehalts der Astaxanthinproduktion in *H. pluvialis* Flotow.

**[0010]** In einer anderen Ausführungsform werden die beiden Isolate von *H. pluvialis* in dem Basalmedium (3N-BBM+V) kultiviert, in dem die Komponenten Natriumnitrat (NaNO<sub>3</sub>), Dikaliumphosphat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O) und Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) durch unterschiedliche Konzentrationen von Handelsdüngern ersetzt werden, wobei die Handelsdünger aus einer Gruppe von N: P: K (17:17:17), Harnstoff und DAP + Kali ausgewählt sind.

**[0011]** In einer anderen Ausführungsform werden die verschiedenen Wachstumsparameter des Testorganismus in dem Basalmedium aufgezeichnet, dem verschiedene Konzentrationen von Natriumbicarbonat zugesetzt wurden, wobei die Konzentrationen aus 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 und 1.8 mM ausgewählt sind.

**[0012]** In einer anderen Ausführungsform wird eine Reihe von Wachstumsparametern von zwei Stämmen von *Haematococcus pluvialis* Flotow ausgewählt aus Zellzahl, Pigmenten wie Chlorophyll a (Chl a) und Chlorophyll b (Chl b), Gesamtcarotinoiden und Astaxanthin-Gehalt, die im Abstand von 5 Tagen während des Untersuchungszeitraums aufgezeichnet werden.

**[0013]** In einer anderen Ausführungsform ist das vegetative Wachstumsstadium der Zellen von *H. pluvialis* Flotow kugelförmig, ellipsoidisch oder birnenförmig, mit zwei gleich langen Geißeln, die aus dem vorderen Ende austreten, und einem becherförmigen Chloroplasten mit zahlreichen, verstreuten Pyrenoiden.

**[0014]** In einer anderen Ausführungsform wird eine axenische Kultur der Algen zur Bestimmung der Zellzahl, der Wachstumskurve, der spezifischen Wachstumsrate, der Teilung pro Tag und der Generationszeit verwendet.

**[0015]** In einer anderen Ausführungsform wird eine Gruppe von Tochterzellen aus den zystischen Zellen freigesetzt, aus denen dann unter optimalen Wachstumsbedingungen vegetative Zellen regeneriert werden.

**[0016]** In einer anderen Ausführungsform wird die Astaxanthinproduktion aus *H. pluvialis* durch einen zweistufigen Kultivierungsprozess erreicht, der ein vegetatives (grünes) und ein aplanosporenartiges (rotes) Stadium umfasst, wobei die Akkumulation von Astaxanthin durch Umweltfaktoren wie Licht, Temperatur, pH-Wert, Salzkonzentration und Nährstoffbelastung beeinflusst wird.

**[0017]** In einer anderen Ausführungsform wird eine hohe Astaxanthin-Akkumulation durch Ernährung induziert, um die Produktion im Freien zu optimieren.

**[0018]** In einer anderen Ausführungsform wird das Basalmedium durch die Zugabe von handelsüblichem  $\text{NaHCO}_3$  ergänzt, wobei das maximale Wachstum und der maximale Gehalt an Astaxanthin im einheimischen Isolat bei 0.6 mM und 1.5 mM  $\text{NaHCO}_3$  liegt.

**[0019]** Ein Ziel der vorliegenden Offenlegung ist es, das Wachstum und die Astaxanthinproduktion von zwei Isolaten von *H. pluvialis* durch die Verwendung von handelsüblichen anorganischen Düngemitteln zu steigern.

**[0020]** Ein weiteres Ziel der vorliegenden Offenbarung ist es, das Basalmedium durch die Zugabe von handelsüblichem  $\text{NaHCO}_3$  zu ergänzen.

**[0021]** Ein weiteres Ziel der vorliegenden Offenlegung ist die Herstellung von kommerziellen Düngemitteln als billigere und leicht verfügbare alternative Medienkomponenten für die großtechnische Produktion von *Haematococcus pluvialis*-Kulturen zur Erzielung einer höheren Astaxanthin-Produktion.

**[0022]** Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, ein schnelles und kostengünstiges System zur Steigerung des Zellwachstums und der Astaxanthinproduktion in *H. pluvialis* Flotow bereitzustellen.

**[0023]** Zur weiteren Verdeutlichung der Vorteile und Merkmale der vorliegenden Offenbarung wird eine genauere Beschreibung der Erfindung durch Bezugnahme auf bestimmte Ausführungsformen gegeben, die in den beigefügten Figuren dargestellt sind. Es wird davon ausgegangen, dass diese Figuren nur typische Ausführungsformen der Erfindung darstellen und daher nicht als Einschränkung des Umfangs der Erfindung zu betrachten sind. Die Erfindung wird mit zusätzlicher Spezifität und Detail mit den beigefügten Figuren beschrieben und erläutert werden.

#### Figurenliste

**[0024]** Diese und andere Merkmale, Aspekte und Vorteile der vorliegenden Offenbarung werden besser verstanden, wenn die folgende detaillierte Beschreibung mit Bezug auf die beigefügten Figuren gelesen wird, in denen gleiche Zeichen gleiche Teile in den Figuren darstellen, wobei:

**Fig. 1** zeigt ein Blockdiagramm eines Systems zur Steigerung des Zellwachstums und des Gehalts der Astaxanthinproduktion in *H. pluvialis* Flotow gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Offenbarung;

**Fig. 2** zeigt verschiedene Stadien von einheimischen Isolaten von *Haematococcus pluvialis* Flotow HPI-001 unter mikroskopischer Beobachtung unter Laborbedingungen gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Offenbarung;

**Fig. 3** veranschaulicht die in Tabelle 1 dargestellte chemische Zusammensetzung und die Zusammensetzung des Mediums gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Offenbarung;

**Fig. 4** veranschaulicht Tabelle 2 die eine vergleichende Studie zur Zellzahl und zum Astaxanthingehalt der einheimischen und der Göttinger Kultur von *H. pluvialis* Flotow unter Verwendung von landwirtschaftlichen Düngemitteln gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Offenbarung zeigt; und

**Fig. 5** veranschaulicht Tabelle 3 die Auswirkungen auf die Zellzahl, Chlorophyll a, Gesamtcarotinoide und den Astaxanthin-Gehalt von Kontroll-Göttinger Isolaten von *H. pluvialis* Flotow unter Verwendung

von landwirtschaftlichen Düngemitteln gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Offenbarung zeigt.

**[0025]** Der Fachmann wird verstehen, dass die Elemente in den Figuren der Einfachheit halber dargestellt sind und nicht unbedingt maßstabsgetreu gezeichnet wurden. Die Flussdiagramme veranschaulichen beispielsweise das Verfahren anhand der wichtigsten Schritte, um das Verständnis der Aspekte der vorliegenden Offenbarung zu verbessern. Darüber hinaus kann es sein, dass eine oder mehrere Komponenten der Vorrichtung in den Figuren durch herkömmliche Symbole dargestellt sind, und dass die Figuren nur die spezifischen Details zeigen, die für das Verständnis der Ausführungsformen der vorliegenden Offenbarung relevant sind, um die Figuren nicht mit Details zu überfrachten, die für Fachleute, die mit der vorliegenden Beschreibung vertraut sind, leicht erkennbar sind.

#### AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG

**[0026]** Um das Verständnis der Erfindung zu fördern, wird nun auf die in den Figuren dargestellte Ausführungsform Bezug genommen und diese mit bestimmten Worten beschrieben. Es versteht sich jedoch von selbst, dass damit keine Einschränkung des Umfangs der Erfindung beabsichtigt ist, wobei solche Änderungen und weitere Modifikationen des dargestellten Systems und solche weiteren Anwendungen der darin dargestellten Erfindungsprinzipien in Betracht gezogen werden, die einem Fachmann auf dem Gebiet der Erfindung normalerweise einfallen würden.

**[0027]** Der Fachmann wird verstehen, dass die vorstehende allgemeine Beschreibung und die folgende detaillierte Beschreibung beispielhaft und erläuternd für die Erfindung sind und diese nicht einschränken sollen.

**[0028]** Wenn in dieser Beschreibung von „einem Aspekt“, „einem anderen Aspekt“ oder ähnlichem die Rede ist, bedeutet dies, dass ein bestimmtes Merkmal, eine bestimmte Struktur oder eine bestimmte Eigenschaft, die im Zusammenhang mit der Ausführungsform beschrieben wird, in mindestens einer Ausführungsform der vorliegenden Offenbarung enthalten ist. Daher können sich die Ausdrücke „in einer Ausführungsform“, „in einer anderen Ausführungsform“ und ähnliche Ausdrücke in dieser Beschreibung alle auf dieselbe Ausführungsform beziehen, müssen es aber nicht.

**[0029]** Die Ausdrücke „umfasst“, „enthaltend“ oder andere Variationen davon sollen eine nicht ausschließliche Einbeziehung abdecken, so dass ein Verfahren oder eine Methode, die eine Liste von Schritten umfasst, nicht nur diese Schritte umfasst, sondern auch andere Schritte enthalten kann, die nicht ausdrücklich aufgeführt sind oder zu einem solchen Verfahren oder einer solchen Methode gehören. Ebenso schließen eine oder mehrere Vorrichtungen oder Teilsysteme oder Elemente oder Strukturen oder Komponenten, die mit „umfasst...a“ eingeleitet werden, nicht ohne weitere Einschränkungen die Existenz anderer Vorrichtungen oder anderer Teilsysteme oder anderer Elemente oder anderer Strukturen oder anderer Komponenten oder zusätzlicher Vorrichtungen oder zusätzlicher Teilsysteme oder zusätzlicher Elemente oder zusätzlicher Strukturen oder zusätzlicher Komponenten aus.

**[0030]** Sofern nicht anders definiert, haben alle hierin verwendeten technischen und wissenschaftlichen Begriffe die gleiche Bedeutung, wie sie von einem Fachmann auf dem Gebiet, zu dem diese Erfindung gehört, allgemein verstanden wird. Das System, die Methoden und die Beispiele, die hier angegeben werden, dienen nur der Veranschaulichung und sind nicht als Einschränkung gedacht.

**[0031]** Ausführungsformen der vorliegenden Offenbarung werden im Folgenden unter Bezugnahme auf die beigefügten Figuren im Detail beschrieben.

**[0032]** In **Fig. 1** ist ein Blockdiagramm eines Systems zur Verbesserung des Zellwachstums und des Gehalts der Astaxanthinproduktion in *H. pluvialis* Flotow gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Offenbarung dargestellt. Das System 100 umfasst eine Eingabeeinheit 102 zum Sammeln eines neuen Stammes von *H. pluvialis* HPI-001 und einer *Haematococcus pluvialis*-Kultur.

**[0033]** In einer Ausführungsform ist eine Mischkammer 104 mit der Eingabeeinheit 102 verbunden, um die Kulturen zweimal täglich gleichmäßig zu mischen und so *Haematococcus pluvialis* zu isolieren und unialgische Kulturen durch serielle Verdünnung mit anschließender separater Plattentechnik auf 2% Agar in 3N-BBM+V-Medium herzustellen.

**[0034]** In einer Ausführungsform ist eine Behandlungseinheit 106 mechanisch mit der Mischkammer 104 gekoppelt, um zwei Stämme von *Haematococcus pluvialis* Flotow autotroph in einem flüssigen Bold-Basalmedium zu züchten und dabei eine Temperatur von  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , eine Lichtintensität von  $30\ \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  und einen 12/12-Licht/Dunkel-Zyklus beizubehalten.

**[0035]** In einer Ausführungsform ist eine Inokulationseinheit 108 mit der Behandlungseinheit 106 gekoppelt, um 10 ml einer grünen vegetativen Kultur vom siebten Tag in 90 ml eines sterilisierten 3N-BBM+V-Mediums in einem 100-ml-Erlenmeyerkolben zu inokulieren und für einen Zeitraum von 30 Tagen aufzubewahren.

**[0036]** In einer Ausführungsform wird eine Zentrifuge 110 an die Impfeinheit 108 gekoppelt, um mindestens fünf Milliliter der Kultur bei 5000 U/min 10 Minuten lang zu zentrifugieren und den Überstand zu verwerfen, wobei das Algenpellet mit 5 ml 100%igem Aceton versetzt und mit einem Stößel und Mörser mazeriert, mit schwarzem Papier umwickelt und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt wird.

**[0037]** In einer Ausführungsform ist eine Steuereinheit 112 so konfiguriert, dass sie den Chlorophyll- und Gesamtcarotinoidgehalt unter Verwendung einer Lichtenthaler-Gleichung berechnet und die Menge an Astaxanthin aus dem Acetonextrakt der Algenprobe bei 480 nm unter Verwendung eines Absorptionskoeffizienten bestimmt, um das Zellwachstum und den Gehalt an Astaxanthinproduktion in *H. pluvialis* Flotow zu steigern.

**[0038]** In einer anderen Ausführungsform werden die beiden Isolate von *H. pluvialis* in dem Basalmedium (3N-BBM+V) kultiviert, in dem die Komponenten Natriumnitrat ( $\text{NaNO}_3$ ), Dikaliumphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) und Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) durch unterschiedliche Konzentrationen von Handelsdüngern ersetzt werden, wobei die Handelsdünger aus einer Gruppe von N: P: K (17:17:17), Harnstoff und DAP + Kali ausgewählt sind.

**[0039]** In einer anderen Ausführungsform werden die verschiedenen Wachstumsparameter des Testorganismus in dem Basalmedium aufgezeichnet, dem verschiedene Konzentrationen von Natriumbicarbonat zugesetzt wurden, wobei die Konzentrationen aus 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 und 1.8 mM ausgewählt sind.

**[0040]** In einer anderen Ausführungsform wird eine Reihe von Wachstumsparametern von zwei Stämmen von *Haematococcus pluvialis* Flotow ausgewählt aus Zellzahl, Pigmenten wie Chlorophyll a (Chl a) und Chlorophyll b (Chl b), Gesamtcarotinoiden und Astaxanthin-Gehalt, die im Abstand von 5 Tagen während des Untersuchungszeitraums aufgezeichnet werden.

**[0041]** In einer anderen Ausführungsform ist das vegetative Wachstumsstadium der Zellen von *H. pluvialis* Flotow kugelförmig, ellipsoidisch oder birnenförmig, mit zwei gleich langen Geißeln, die aus dem vorderen Ende austreten, und einem becherförmigen Chloroplasten mit zahlreichen, verstreuten Pyrenoiden.

**[0042]** In einer anderen Ausführungsform wird eine axenische Kultur der Algen zur Bestimmung der Zellzahl, der Wachstumskurve, der spezifischen Wachstumsrate, der Teilung pro Tag und der Generationszeit verwendet.

**[0043]** In einer anderen Ausführungsform wird eine Gruppe von Tochterzellen aus den zystischen Zellen freigesetzt, aus denen dann unter optimalen Wachstumsbedingungen vegetative Zellen regeneriert werden.

**[0044]** In einer anderen Ausführungsform wird die Astaxanthinproduktion aus *H. pluvialis* durch einen zweistufigen Kultivierungsprozess erreicht, der ein vegetatives (grünes) und ein aplanosporenartiges (rotes) Stadium umfasst, wobei die Akkumulation von Astaxanthin durch Umweltfaktoren wie Licht, Temperatur, pH-Wert, Salzkonzentration und Nährstoffbelastung beeinflusst wird.

**[0045]** In einer anderen Ausführungsform wird eine hohe Astaxanthin-Akkumulation durch Ernährung induziert, um die Produktion im Freien zu optimieren.

**[0046]** In einer anderen Ausführungsform wird das Basalmedium durch die Zugabe von handelsüblichem  $\text{NaHCO}_3$  ergänzt, wobei das maximale Wachstum und der maximale Gehalt an Astaxanthin im einheimischen Isolat bei 0.6 mM und 1.5 mM  $\text{NaHCO}_3$  liegt.

Isolierung von *Haematococcus pluvialis* Flotow:

**[0047]** Die Wasserproben wurden im März 2013 in Palampur entnommen. Palampur (32° nördlicher Breite; 76° östlicher Länge) ist eine Stadt im indischen Bundesstaat Himachal Pradesh und liegt auf einer Höhe von 1325 Fuß über dem Meeresspiegel mit einer Jahrestemperatur von 19 °C und jährlichen Niederschlägen von 250 cm und mehr. Die Wasserproben aus den einzelnen Gewässern werden in Plastikflaschen gesammelt und aufbewahrt. Die Proben wurden in Bold-Basalmedium bei 25±1°C, unter 30µEm-2s-1 Lichtbestrahlung und einer Photoperiode von 12/12 (hell/dunkel) beimpft. Die Kulturen wurden zweimal täglich von Hand gründlich durchmischt und unter Laborbedingungen untersucht. Die Zellen von *Haematococcus pluvialis* wurden isoliert und unialgische Kulturen durch serielle Verdünnung und anschließende separate Plattentechnik auf 2% Agar in 3N-BBM+V-Medium hergestellt. Die Zellen wurden anhand der morphologischen Merkmale identifiziert. Die Unialgenkulturen wurden zweimal täglich von Hand gründlich gemischt und weiter untersucht. Die zweite *Haematococcus pluvialis*-Kultur wurde aus der Göttinger Kultursammlung, Deutschland, entnommen und in allen Studien als Kontrolle verwendet.

## Zusammensetzung des Kulturmediums:

**[0048]** Die beiden Isolate von *H. pluvialis* wurden in einem Basalmedium (3N-BBM+V) kultiviert, in dem die Komponenten Natriumnitrat (NaNO<sub>3</sub>), Dikaliumphosphat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O) und Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) durch unterschiedliche Konzentrationen von Handelsdüngern in folgender Weise ersetzt wurden:

1. N:P:K (17:17:17) : 0,3, 0,6, 0,9, 1,2, 1,5 und 1,8 mM
2. Harnstoff: 1,6, 3,3, 4,3 (Kontrolle), 4,9, 6,6 und 8,3 mM
3. DAP (Diammoniumphosphat) + Pottasche: 100 + 50, 150 + 100, 200 + 150 (Kontrolle),

250 + 200 und 300 + 250 mg/L

**[0049]** Die verschiedenen Wachstumsparameter des Testorganismus wurden auch in Basismedium mit verschiedenen Konzentrationen (0,3, 0,6, 0,9, 1,2, 1,5 und 1,8 mM) von Natriumbicarbonat aufgezeichnet (Tabelle 1). Das Wachstum des einheimischen Isolats von *Haematococcus pluvialis* Flotow HPI-001 und des *Haematococcus pluvialis* aus der Göttinger Kultursammlung, Deutschland (Kontrolle) in modifiziertem 3N-BBM+V-Medium und modifiziertem HPI-001-Medium wurde für verschiedene Parameter aufgezeichnet.

## Pflege und Untersuchung der Algenkultur:

**[0050]** Die beiden Stämme von *Haematococcus pluvialis* Flotow wurden autotroph in flüssigem Bold-Basalmedium gezüchtet und bei 25±1°C, 30 µEm-2s-1 Lichtintensität und 12/12 Licht/Dunkel-Zyklus gehalten. 10 mL der grünen vegetativen Kultur vom siebten Tag werden in 90 mL sterilisiertes 3N-BBM+V-Medium in 100 mL Erlenmeyerkolben beimpft und für einen Zeitraum von 30 Tagen aufbewahrt. Die Wachstumsparameter wie Zellzahl, Pigmente wie Chlorophyll a (Chl a) und Chlorophyll b (Chl b), Gesamtcarotinoide und Astaxanthingehalt wurden während des Untersuchungszeitraums alle 5 Tage aufgezeichnet. Für die folgenden Experimente wurde eine axenische Kultur der Algen verwendet.

## Zellzählung:

**[0051]** Zu diesem Zweck wird ein Neubauer-Hämozytometer verwendet. Der Mittelwert der in vier Kammern gemessenen Zellzahlen wird berechnet und als Vielfaches von 10<sup>4</sup> Zellen/ml ausgedrückt.

## Wachstumskurve:

**[0052]** Die Wachstumskurven wurden mit den Zellzahlwerten (Vielfache von 10<sup>4</sup> Zellen/ml) gegen die jeweiligen Tage, an denen die Zellzahl gemessen wurde, aufgetragen.

## Spezifische Wachstumsrate, Teilung pro Tag und Generationszeit:

**[0053]** Anhand der Daten zur Zellwachstumswahl wurden die Werte für die spezifische Wachstumsrate, die Teilung pro Tag und die Generationszeit nach folgender Formel berechnet:

Spezifische Wachstumsrate:  $K' = \ln(N_2/N_1) / (t_2 - t_1)$

Teilung pro Tag: Div.Tag-1 =  $K'/Ln2$   
 Generationszeit: Gen't =  $1/ \text{Div.Tag-1}$

dabei sind N1 und N2 = Zellzahl zum Zeitpunkt 1 (t1) bzw. zum Zeitpunkt 2 (t2).

#### Extraktion und Schätzung der Pigmente:

**[0054]** Fünf Milliliter der Kultur wurden 10 Minuten lang bei 5000 U/min zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Das Algenpellet wird mit 5 ml 100%igem Aceton versetzt und mit Stößel und Mörser zerkleinert, in schwarzes Papier eingewickelt und über Nacht bei 4° C aufbewahrt. Die Probe wird 10 Minuten lang bei 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, der Überstand wird aufgefangen und die optische Dichte bei 661,6 nm, 644,8 nm, 470 nm und 480 nm im Ultrospec 1100 Spektrophotometer gemessen. Der Chlorophyll- und der Gesamtcarotinoidgehalt wurden anhand der Lichtenthaler-Gleichungen berechnet. Die Menge an Astaxanthin wird aus dem Aceton-Extrakt der Algenprobe bei 480 nm mit einem Absorptionskoeffizienten A% von 2500 bestimmt, der nach der beschriebenen Methode analysiert wird.

$$\text{Chl a (mg/L)} = 11.24 \times A_{661.6} - 2.404 \times A_{644.8}$$

$$\text{Chl b (mg/L)} = 20.13 \times A_{644.8} - 4.19 \times A_{661.6}$$

$$\text{Carotinoide insgesamt (mg/L)} = 1000 \times A_{470} - 1.9 \times \text{Chl a} - 63.14$$

× Chl b

214

$$\text{Astaxanthin (mg/L)} = A_{480} \times \text{Volumen der Probe} \times$$

Verdünnungsfaktor × 10

2500

dabei ist A = Absorptionsgrad

**[0055] Fig. 2** zeigt verschiedene Stadien von einheimischen Isolaten von *Haematococcus pluvialis* Flotow HPI-001 unter mikroskopischer Beobachtung unter Laborbedingungen gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Offenbarung. Das vegetative Wachstumsstadium der Zellen von *H. pluvialis* Flotow ist kugelförmig, ellipsoidisch oder birnenförmig, mit zwei gleich langen Geißeln, die aus dem vorderen Ende austreten, und einem becherförmigen Chloroplasten mit zahlreichen, verstreuten Pyrenoiden. Diese gegeißelten, schnell wachsenden vegetativen Zellen überwogen unter günstigen Kulturbedingungen im frühen vegetativen Wachstumsstadium. Die 10µm großen Makrozooiden teilten sich durch Mitose in 2-32 Tochterzellen. Unter ungünstigen Bedingungen begannen die Makrozooiden, ihre Geißeln zu verlieren, und vergrößerten ihren Zellwanddurchmesser bei Betrachtung unter dem Lichtmikroskop (CXL PLUS LABOMED Mikroskop, 40-fache Vergrößerung). Mit der Zunahme der Stressbedingungen vergrößerte sich das Volumen der Zellen bis zu einem Durchmesser von 40 µm und die Zellwand wurde widerstandsfähiger.

**[0056]** Unter optimalen Wachstumsbedingungen wurden die Tochterzellen aus den zystischen Zellen freigesetzt, und aus den Tochterzellen regenerierten sich vegetative Zellen. Aufgrund dieser morphologischen Merkmale wird das identifizierte Isolat als *H. pluvialis* Flotow HPI-001 bezeichnet, in der GenBank (KT285940) hinterlegt und in die Algenkultursammlung des Centre for Advanced Studies in Botany, University of Madras, Tamil Nadu, Indien, unter der Referenz (ACC CAS UNOM- *H. pluvialis* HPI-001) aufgenommen.

**[0057]** Die beiden Isolate von *Haematococcus pluvialis* wurden in verschiedenen Konzentrationen von kommerziellem N:P:K (17:17:17) gezüchtet. *H. pluvialis* HPI-001 zeigte ein maximales Wachstum von 43x10<sup>4</sup> Zellen/ml in 1.2 mM kommerziellem N:P:K am 15. Bei 1,2 mM wird eine spezifische Wachstumsrate von 0,116, eine Teilungsrate von 0,167 und eine Generationszeit von 5,998 beobachtet. Die maximale Konzentration von Chl a (7.13 mg/L) und Chi b (3.57 mg/L) wurde am 20. Tag bei 1.2 mM N:P:K festgestellt. Die Kontrolle (Gottingen) *H. pluvialis* zeigte eine maximale Zellzahl von 47x10<sup>4</sup> Zellen/mL und eine maximale Konzentration von Chl a (6.25 mg/L) und Chi b (3.13 mg/L) am 20. Tag bei 1.5 mM N:P:K. Die Abnahme des Wachstums beträgt 9 %, und die Zunahme der Pigmente Chi a 14 % und Chi b 14 %, was mehr ist als bei



der Kontrolle. Die Alge *H. pluvialis* HPI-001 akkumulierte am 30. Tag der Kultur in 0.6 mM N:P:K den höchsten Gesamtgehalt an Carotinoiden (22.33 mg/L) und Astaxanthin (17.94 mg/L). Die Kontrollisolate zeigten eine maximale Synthese von Gesamtcarotinoiden (20.60 mg/L) und Astaxanthin (15.37 mg/L) in 0.6 mM kommerziellem N:P:K nach 30 Tagen Kultur (Tab. 3). Der Anstieg der Gesamtcarotinoide (8 %) und des Astaxanthin-Gehalts (16 %) ist höher als bei der Kontrolle.

**[0058]** Die Alge *H. pluvialis* HPI-001 wies am 15. Tag in 3.3 mM kommerziellen Harnstoffs eine maximale Zellzahl von  $41 \times 10^4$  Zellen/ml auf. Bei 3.3 mM kommerziellem Harnstoff betragen die spezifische Wachstumsrate, die Teilungsrate und die Generationszeit jeweils 0.197, 0.284 und 3.515. Die maximale Synthese der Pigmente Chi a (8.26 mg/L) und Chi b (4.13 mg/L) ist am 15. Tag der Kultur in 3.3 mM Harnstoff. Die Kontrolle wies am 15. Tag ein maximales Wachstum von  $32 \times 10^4$  Zellen/ml in 3.3 mM Harnstoff auf. Die Zunahme des Wachstums (28%), der Pigmente Chi a (14%) und Chi b (13%) ist höher als bei der Kontrolle. Die maximale Akkumulation der gesamten Carotinoide in *H. pluvialis* HPI-001 beträgt 18.49 mg/L und der Astaxanthin-Gehalt 15.19 mg/mL bei 4.9 mM Harnstoff am 25. Der Kontrollorganismus wies am 25. Tag bei 6.6 mM Harnstoff eine maximale Konzentration von 15.97 mg/L Gesamtcarotinoiden und 12.84 mg/L Astaxanthin auf (Tab. 3). Die Zunahme der Gesamtcarotinoide (15 %) und des Astaxanthingehalts (18 %) ist höher als bei der Kontrolle.

**[0059]** Unter verschiedenen Konzentrationen von DAP+Kali wies die Alge *H. pluvialis* HPI-001 im Medium mit 250+200 mg/L DAP+Kali am 20. Kulturtag die maximale Zellzahl von  $29 \times 10^4$  Zellen/ml auf. Bei 250+200 mg/L kommerziellem DAP + Pottasche wird eine spezifische Wachstumsrate von 0.164, eine Teilungsrate von 0.236 und eine Generationszeit von 4,230 beobachtet. Die maximale Pigmentsynthese wurde mit 7.11 mg/L Chi a und 3.56 mg/L Chi b am 20. Tag von 250+200 mg/L DAP + Potash beobachtet. Das maximale Wachstum des Göttingen-Isolats wurde mit  $35 \times 10^4$  Zellen/ml im Medium mit 200+150 mg/L DAP + Pottasche am 20. Tag festgestellt. Die maximale Konzentration von Chi a liegt bei 6.76 mg/L und Chi b bei 3.39 mg/L von DAP + Potash am 20. Die Abnahme des Wachstums (17 %) und die Zunahme der Pigmente Chi a (5 %) und Chi b (5 %) ist höher als bei der Kontrolle. *H. pluvialis* HPI-001 akkumulierte am 25. Tag der Kultur ein Maximum an Gesamtcarotinoiden von 15.99 mg/L und einen Astaxanthingehalt von 12.69 mg/L bei 150+100 mg/L DAP + Pottasche, während das Kontrollisolat ein Maximum an Gesamtcarotinoiden von 13.88 mg/L und einen Astaxanthingehalt von 11.99 mg/L bei 150+100 mg/L DAP + Pottasche am 30. Der Anstieg der Gesamtcarotinoide (15 %) und des Astaxanthingehalts (6 %) ist höher als bei den Kontrollisolaten von *H. pluvialis*.

**[0060]** Die Kulturen von *H. pluvialis* HPI-001 wiesen eine maximale Zellzahl von  $51 \times 10^4$  Zellen/ml bei 0.6 mM kommerziellem  $\text{NaHCO}_3$  am 20. Bei 0.6 mM  $\text{NaHCO}_3$  wird eine spezifische Wachstumsrate von 0.184, eine Teilungsrate von 0.266 und eine Generationszeit von 3.759 beobachtet.

**[0061]** Die maximale Synthese der Pigmente Chi a (9.52 mg/L) und Chi b (4.76 mg/L) wurde am 20. Tag der Kultur in 0.6 mM  $\text{NaHCO}_3$  erreicht. Die Kontrollisolate zeigten am 20. Tag ein maximales Wachstum von  $45 \times 10^4$  Zellen/ml bei 1.5 mM  $\text{NaHCO}_3$ . Die maximale Konzentration von Chi a (8.81 mg/L) und Chi b (4.40 mg/L) wurde am 20. Tag in 0.6 mM  $\text{NaHCO}_3$  erreicht. Die Zunahme des Wachstums (13%) und der Pigmente Chi a (8%) und Chi b (8%) ist höher als bei der Kontrolle. Die maximale Akkumulation der gesamten Carotinoide in den einheimischen Isolaten von *H. pluvialis* HPI-001 beträgt 19.24 mg/L und der Astaxanthin-Gehalt 15.53 mg/L in 1.5 mM kommerziellem  $\text{NaHCO}_3$  am 25. Tag der Kultur. Die Kontrollkultur von *H. pluvialis* synthetisierte am 30. Tag in 0.6 mM  $\text{NaHCO}_3$  ein Maximum an Gesamtcarotinoiden von 16.89 mg/L und einen Astaxanthingehalt von 10.31 mg/L (Tabelle 3). Der Anstieg der Gesamtcarotinoide (13 %) und des Gesamtastaxanthins (50 %) ist höher als bei der Kontrolle.

**[0062]** Die einheimische *H. pluvialis* HPI-001, die in zwei verschiedenen getesteten Medien gezüchtet wurde, zeigte ein maximales Wachstum von  $43 \times 10^4$  Zellen/ml in formuliertem, kommerziellem, modifiziertem HPI-001-Medium am zwanzigsten Tag der Kultur. Die Alge, die in formuliertem, kommerziellem, modifiziertem HPI-001-Medium wuchs, zeigte eine spezifische Wachstumsrate von 0.162, eine Teilungsrate von 0.233 und eine Generationszeit von 4.284. Die Alge synthetisierte am 20. Tag 8.68 mg/L Chi a und 5.12 mg/L Chi b und am 30. Tag 25.51 mg/L Gesamtcarotinoide und 22.21 mg/L Astaxanthin in formuliertem kommerziellen modifiziertem HPI-001-Medium. *H. pluvialis* HPI-001 zeigte am 20. Tag ein maximales Wachstum von  $37 \times 10^4$  Zellen/ml in modifiziertem 3N-BBM+V-Medium. Die maximale Synthese der Pigmente Chi a (7.44 mg/L), Chi b (3.72 mg/L), der gesamten Carotinoide (22.88 mg/L) und des Astaxanthin-Gehalts (20.45 mg/L) wurde am 20. und 30. Tag im modifizierten 3N-BBM+V-Medium erreicht. Im Falle der Kontrollisolate von *H. pluvialis* beträgt die maximale Zellzahl  $40 \times 10^4$  Zellen/ml in formuliertem, kommerziellem, modifiziertem HPI-001-Medium am 20. Tag der Kultur. Die Alge, die in formuliertem, kommerziellem, modifiziertem

HPI-001-Medium gezüchtet wurde, zeigte eine spezifische Wachstumsrate von 0.184, eine Teilungsrate von 0.266 und eine Generationszeit von 3.763. Die maximale Konzentration der Pigmente Chi a (7.22 mg/L) und Chi b (4.36 mg/L) wurde am 20. Tag erreicht, und die maximale Anhäufung der gesamten Carotinoide (23.59 mg/L) und des Astaxanthin-Gehalts (20.10 mg/L) wurde am 30. Tag in formuliertem, kommerziellem, modifiziertem HPI-001-Medium erreicht (Tabelle 2). Die Kontrollisolate von *H. pluvialis* zeigten am 20. Tag des modifizierten 3N-BBM+ V-Mediums ein maximales Wachstum von 35x10<sup>4</sup> Zellen/ml. Die maximale Synthese von Chi a (6.50 mg/L), Chi b (3.25 mg/L), Gesamtcarotinoiden (20.55 mg/L) und Astaxanthin (18.25 mg/L) wurde am 20. und 30. Tag in modifiziertem 3N-BBM+V-Medium erreicht (Tabelle 2). Die Zunahme von Wachstum (8 %), Chi a (20 %), Chi b (17 %), Gesamtcarotinoiden (8 %) und Astaxanthingehalt (10 %) ist höher als bei den Kontrollisolaten von *H. pluvialis*.

**[0063]** Die Steigerung des Wachstums und der Astaxanthinproduktion von zwei Isolaten von *H. pluvialis* wird durch die Verwendung von handelsüblichen anorganischen Düngemitteln erreicht. Die einheimischen Isolate von *H. pluvialis* wiesen in allen Studien ein höheres Wachstum und einen höheren Astaxanthingehalt auf als die Göttinger Kontrollisolate. Der optimale Gehalt an verschiedenen Düngemitteln, die hier verwendet wurden, um das maximale Wachstum von *Haematococcus pluvialis* HPI-001 zu erreichen, liegt bei 1.8 mM N:P:K, 1.6 mM Harnstoff, 250+200 mg/L DAP + Pottasche und 0,6 mM Natriumbikarbonat. Andererseits liegt die optimale Menge an Düngemitteln, die erforderlich ist, um die maximale Astaxanthinproduktion zu erreichen, bei 0.6 mM N:P:K, 4.9 mM Harnstoff, 150+100 mg/L DAP + Pottasche und 1.5 mM Natriumbikarbonat. In den meisten Tests wurde das maximale Zellwachstum zwischen dem 15. und 20. Tag der Kultur erreicht, während die Anreicherung des Pigments Astaxanthin im 25. bis 30. Diese Ergebnisse legen nahe, kommerzielle Düngemittel als billigere und leicht verfügbare alternative Mediumkomponenten für die großtechnische Produktion von *Haematococcus pluvialis*-Kulturen zu nutzen, um eine höhere Astaxanthin-Produktion zu erzielen.

**[0064]** Fig. 3 veranschaulicht die in Tabelle 1 dargestellte chemische Zusammensetzung und die Zusammensetzung des Mediums gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Offenbarung.

**[0065]** Fig. 4 veranschaulicht Tabelle 2 die eine vergleichende Studie über die Zellzahl und den Astaxanthingehalt der einheimischen und der Göttinger Kultur von *H. pluvialis* Flotow unter Verwendung von landwirtschaftlichen Düngemitteln gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Offenbarung zeigt.

**[0066]** Fig. 5 veranschaulicht Tabelle 3 die Auswirkungen auf die Zellzahl, Chlorophyll a, Gesamtcarotinoide und den Astaxanthin-Gehalt von Kontroll-Göttinger Isolaten von *H. pluvialis* Flotow unter Verwendung von landwirtschaftlichen Düngemitteln gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Offenbarung zeigt.

**[0067]** Die Figuren und die vorangehende Beschreibung geben Beispiele für Ausführungsformen. Der Fachmann wird verstehen, dass eines oder mehrere der beschriebenen Elemente durchaus zu einem einzigen Funktionselement kombiniert werden können. Alternativ dazu können bestimmte Elemente in mehrere Funktionselemente aufgeteilt werden. Elemente aus einer Ausführungsform können einer anderen Ausführungsform hinzugefügt werden. Die Reihenfolge der hier beschriebenen Prozesse kann beispielsweise geändert werden und ist nicht auf die hier beschriebene Weise beschränkt. Darüber hinaus müssen die Aktionen eines Flussdiagramms nicht in der gezeigten Reihenfolge ausgeführt werden; auch müssen nicht unbedingt alle Aktionen durchgeführt werden. Auch können die Handlungen, die nicht von anderen Handlungen abhängig sind, parallel zu den anderen Handlungen ausgeführt werden. Der Umfang der Ausführungsformen ist durch diese spezifischen Beispiele keineswegs begrenzt. Zahlreiche Variationen sind möglich, unabhängig davon, ob sie in der Beschreibung explizit aufgeführt sind oder nicht, wie z. B. Unterschiede in der Struktur, den Abmessungen und der Verwendung von Materialien. Der Umfang der Ausführungsformen ist mindestens so groß wie in den folgenden Ansprüchen angegeben.

**[0068]** Vorteile, andere Vorzüge und Problemlösungen wurden oben im Hinblick auf bestimmte Ausführungsformen beschrieben. Die Vorteile, Vorzüge, Problemlösungen und Komponenten, die dazu führen können, dass ein Vorteil, ein Nutzen oder eine Lösung auftritt oder ausgeprägter wird, sind jedoch nicht als kritisches, erforderliches oder wesentliches Merkmal oder Komponente eines oder aller Ansprüche zu verstehen.

#### Bezugszeichenliste

100	System zur Steigerung des Zellwachstums und der Astaxanthinproduktion in <i>H. pluvialis</i> Flotow
102	Eingabeeinheit

104	Mischkammer
106	Behandlungseinheit
108	Beimpfungseinheit
110	Zentrifuge
112	Kontrolleinheit

### Schutzansprüche

- Ein System zur Steigerung des Zellwachstums und des Gehalts an Astaxanthinproduktion in *H. pluvialis* Flotow, wobei das System umfasst:  
eine Eingabeeinheit zum Sammeln eines neuen Stammes von *H. pluvialis* HPI-001 und einer *Haematococcus pluvialis*-Kultur;  
eine Mischkammer, in der die Kulturen zweimal täglich gleichmäßig gemischt werden, um *Haematococcus pluvialis* zu isolieren und durch serielle Verdünnung, gefolgt von einer separaten Plattentechnik auf 2% Agar in 3N-BBM+V-Medium, Unialgenkulturen herzustellen;  
eine Behandlungseinheit für die autotrophe Aufzucht von zwei Stämmen von *Haematococcus pluvialis* Flotow in einem flüssigen Bold-Basalmedium bei einer Temperatur von  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , einer Lichtintensität von  $30\ \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  und einem 12/12 Licht/Dunkel-Zyklus;  
eine Inokulationseinheit zum Beimpfen von 10 ml einer grünen vegetativen Kultur vom siebten Tag in 90 ml eines sterilisierten 3N-BBM+V-Mediums in einem 100-mL-Erlenmeyerkolben und zur Aufbewahrung für einen Zeitraum von 30 Tagen;  
eine Zentrifuge zum Zentrifugieren von mindestens fünf Millilitern der Kultur bei 5000 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten, um den Überstand zu verwerfen; dabei wird das Algenpellet mit 5 ml 100%igem Aceton versetzt und mit einem Stößel und Mörser zerkleinert, mit schwarzem Papier eingewickelt und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt; und  
eine Steuereinheit zur Berechnung des Chlorophyll- und des Gesamtcarotinoidgehalts unter Verwendung einer Lichtenthaler-Gleichung und zur Bestimmung der Menge an Astaxanthin aus dem Aceton-Extrakt der Algenprobe bei 480 nm unter Verwendung eines Absorptionskoeffizienten zur Steigerung des Zellwachstums und des Gehalts der Astaxanthinproduktion in *H. pluvialis* Flotow.
- System nach Anspruch 1, wobei die beiden Isolate von *H. pluvialis* in dem Basalmedium (3N-BBM+V) kultiviert werden, in dem die Komponenten Natriumnitrat ( $\text{NaNO}_3$ ), Dikaliumphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) und Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) durch unterschiedliche Konzentrationen von Handelsdüngern ersetzt werden, wobei die Handelsdünger aus einer Gruppe von N: P: K (17:17:17), Harnstoff und DAP + Kali ausgewählt sind.
- System nach Anspruch 1, wobei die verschiedenen Wachstumsparameter des Testorganismus in dem Basalmedium aufgezeichnet werden, dem verschiedene Konzentrationen von Natriumbicarbonat zugesetzt sind, wobei die Konzentrationen aus 0,3, 0,6, 0,9, 1,2, 1,5 und 1,8 mM ausgewählt sind.
- System nach Anspruch 1, wobei eine Reihe von Wachstumsparametern von zwei Stämmen von *Haematococcus pluvialis* Flotow aus Zellzahl, Pigmenten wie Chlorophyll a (Chl a) und Chlorophyll b (Chl b), Gesamtcarotinoiden und Astaxanthin-Gehalt in einem Abstand von 5 Tagen während des Untersuchungszeitraums aufgezeichnet werden.
- System nach Anspruch 4, wobei das vegetative Wachstumsstadium der Zellen von *H. pluvialis* Flotow kugelförmig, ellipsoidisch oder birnenförmig ist, mit zwei gleich langen Geißeln, die aus dem vorderen Ende austreten, und einem becherförmigen Chloroplasten mit zahlreichen, verstreuten Pyrenoiden.
- System nach Anspruch 1, wobei die axenische Kultur der Algen zur Bestimmung von Zellzahl, Wachstumskurve, spezifischer Wachstumsrate, Teilung pro Tag und Generationszeit verwendet wird.
- System nach Anspruch 4, wobei eine Gruppe von Tochterzellen aus den zystischen Zellen freigesetzt wird und dann unter optimalen Wachstumsbedingungen vegetative Zellen aus den Tochterzellen regeneriert werden.
- System nach Anspruch 1, wobei die Astaxanthin-Produktion aus *H. pluvialis* durch einen zweistufigen Kultivierungsprozess erreicht wird, der vegetative (grüne) und aplanospore (rote) Stadien einschließt, wobei

die Akkumulation von Astaxanthin durch Umweltfaktoren wie Licht, Temperatur, pH-Wert, Salzkonzentration und Nährstoffbelastungen beeinflusst wird.

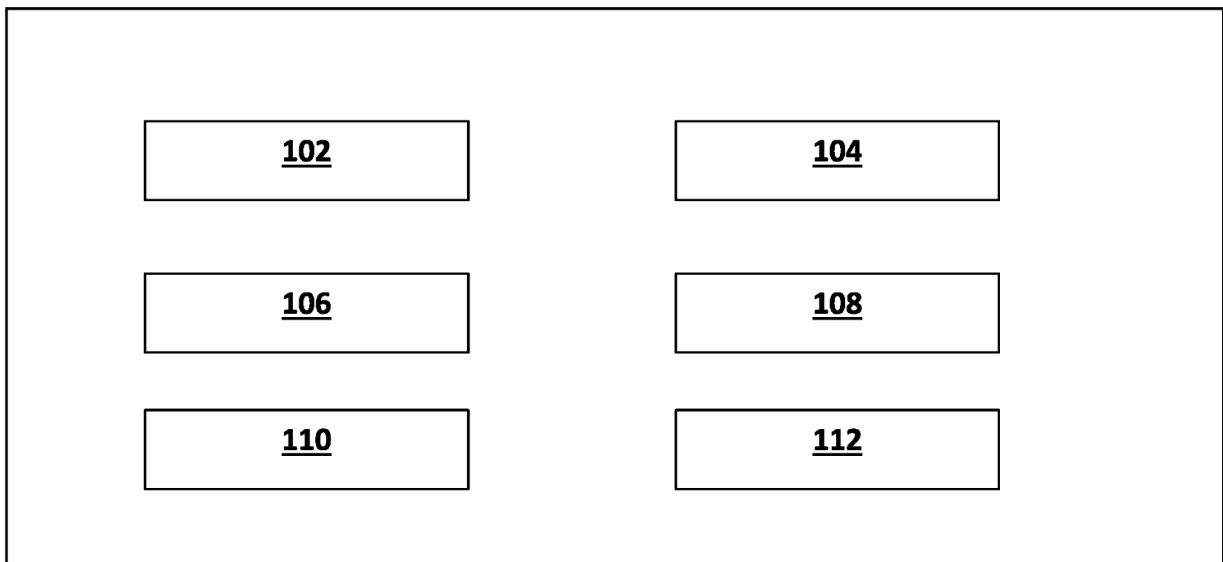

9. System nach Anspruch 8, wobei die Induktion einer hohen Astaxanthin-Akkumulation mit Nahrung durchgeführt wird, um die Produktion im Freien zu optimieren.

10. System nach Anspruch 1, wobei das Basalmedium durch Zugabe von kommerziellem  $\text{NaHCO}_3$  ergänzt wird, wobei das maximale Wachstum und der maximale Gehalt an Astaxanthin im einheimischen Isolat bei 0,6 mM und 1,5 mM  $\text{NaHCO}_3$  liegt.

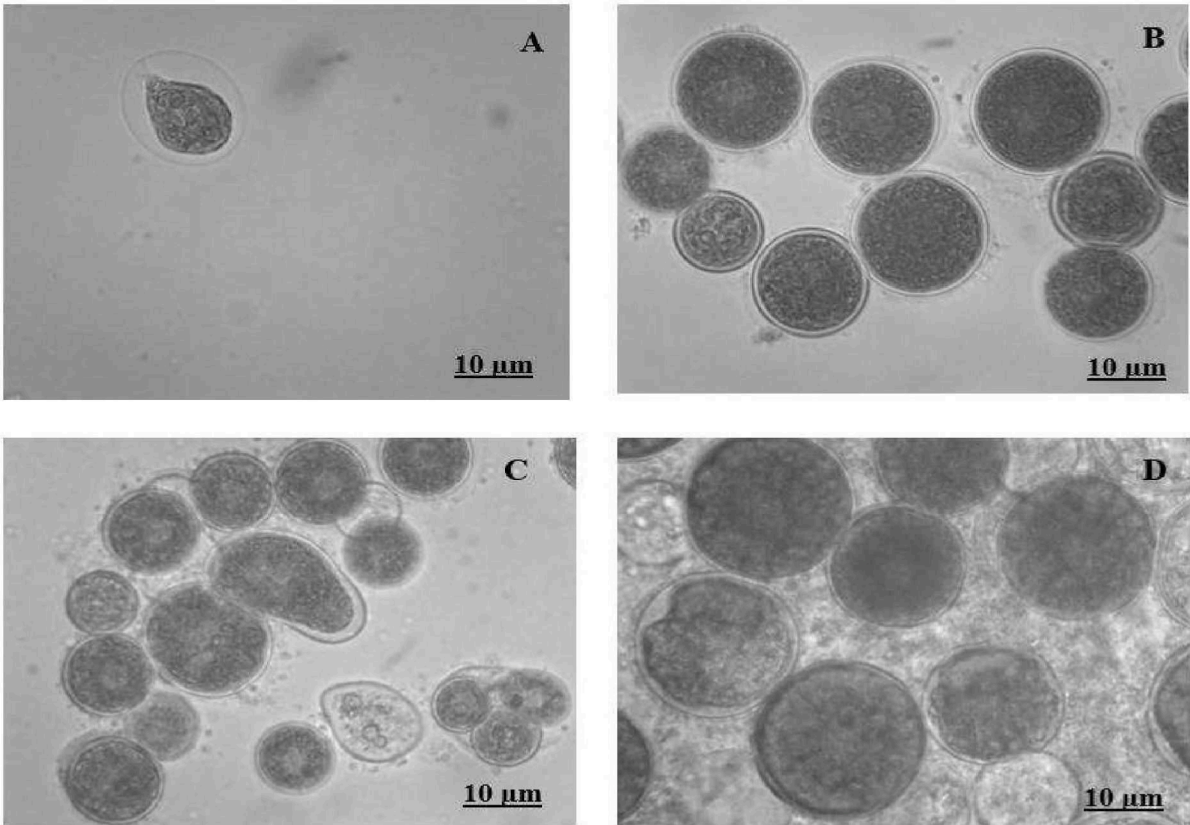
Es folgen 5 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

100



**Figur 1**



**Figur 2**

<b>Chemische Bestandteile</b>	<b>mg/L</b>
N:P:K (17:17:17)	2500
Harnstoff	13000
CaCl <sub>2</sub> · 3H <sub>2</sub> O	2500
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2500
NaHCO <sub>3</sub>	2500
DAP ( Diammoniumphosphat )	5000
Potash	7500
NaCl	2500
EDTA (mit Na <sub>2</sub> )	750
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	97
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	41
ZnCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	5
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	4
Glas destilliertes H <sub>2</sub> O	1000 mL
pH	7.5-7.8

**Figur 3**

Unterschiedliche Parameter Bedingungen	Einheimische Kultur von <i>H. pluvialis</i> HPI-001 Zellzahl ( $10^4$ cells/mL)	Göttinger Kultur von <i>H. pluvialis</i> Zellzahl ( $10^4$ cells/mL)	Einheimische Kultur von <i>H. pluvialis</i> HPI-001 Astaxanthin (mg/L)	Göttinger Kultur von <i>H. pluvialis</i> Astaxanthin (mg/L)
N:P:K (17:17:17) (mM)				
0.3	32 ± 0.644	35 ± 0.444	17.49 ± 0.414	14.66 ± 0.410
0.6	38 ± 0.420	37 ± 0.650	17.94 ± 0.509	15.37 ± 0.455
0.9	39 ± 0.727	40 ± 0.325	17.57 ± 0.503	15.02 ± 0.626
1.2	43 ± 0.824	44 ± 0.515	17.15 ± 0.303	14.72 ± 0.710
1.5	34 ± 0.722	47 ± 0.820	16.81 ± 0.719	14.50 ± 0.720
1.8	29 ± 0.624	39 ± 0.710	16.36 ± 0.686	14.16 ± 0.622
Harnstoff (mM) 1.6				
3.3	37 ± 0.525	25 ± 0.447	13.20 ± 0.407	11.35 ± 0.467
4.3 (Control)	41 ± 0.638	32 ± 0.557	13.85 ± 0.481	13.83 ± 0.648
4.9	35 ± 0.520	29 ± 0.407	14.11 ± 0.532	12.13 ± 0.435
6.6	31 ± 0.544	27 ± 0.648	15.19 ± 0.509	12.47 ± 0.539
8.3	28 ± 0.644	24 ± 0.532	14.74 ± 0.409	12.84 ± 0.685
DAP und Pottasche (mg)	25 ± 0.543	22 ± 0.546	14.53 ± 0.307	12.81 ± 0.572
100+50				
150+100	23 ± 0.819	29 ± 0.510	12.21 ± 0.528	11.54 ± 0.450
200+150 ( Kontrolle )	25 ± 0.533	30 ± 0.425	12.69 ± 0.307	11.99 ± 0.525
250+200	27 ± 0.700	35 ± 0.520	12.28 ± 0.206	11.76 ± 0.610
300+250	29 ± 0.867	33 ± 0.710	11.96 ± 0.406	11.51 ± 0.520
Natriumbikarbonat (mM)	21 ± 0.464	26 ± 0.655	11.67 ± 0.553	11.33 ± 0.425
0.3				
0.6	37 ± 0.644	31 ± 0.515	13.93 ± 0.374	9.85 ± 0.455
0.9	51 ± 0.742	34 ± 0.625	14.37 ± 0.521	10.31 ± 0.420
1.2	46 ± 0.536	36 ± 0.510	14.73 ± 0.345	10.10 ± 0.510
1.5	35 ± 0.633	41 ± 0.615	14.91 ± 0.463	9.84 ± 0.525
1.8	33 ± 0.544	45 ± 0.720	15.53 ± 0.370	9.73 ± 0.420
30 ± 0.443	30 ± 0.443	39 ± 0.443	15.07 ± 0.455	9.51 ± 0.510
Modifiziertes HPI-001 Medium				
	43 ± 0.651	40 ± 0.525	22.21 ± 0.757	20.10 ± 0.629
3N-BBM+V-Medium (Kontrolle)				
	37 ± 0.220	35 ± 0.042	20.45 ± 0.749	18.25 ± 0.625

**Figur 4**



Unterschiedliche Parameter Bedingungen	Anzahl der Zellen (104 Zellen/ml)	Chl a (mg/L)	Carotinoide insgesamt (mg/L)	Astaxanthin-Gehalt (mg/L)
N:P:K (17:17:17) (mM)				
0.3	35 ± 0.444	5.33 ± 0.447	19.66 ± 0.658	14.66 ± 0.410
0.6	37 ± 0.650	5.59 ± 0.542	20.60 ± 0.574	15.37 ± 0.455
0.9	40 ± 0.325	5.71 ± 0.559	20.13 ± 0.676	15.02 ± 0.626
1.2	44 ± 0.515	5.91 ± 0.653	19.60 ± 0.448	14.72 ± 0.710
1.5	47 ± 0.820	6.25 ± 0.337	19.20 ± 0.583	14.50 ± 0.720
1.8	39 ± 0.710	5.73 ± 0.549	18.80 ± 0.436	14.16 ± 0.622
Harnstoff (mM)				
1.6	25 ± 0.447	6.89 ± 0.444	14.60 ± 0.538	11.35 ± 0.467
3.3	32 ± 0.557	7.24 ± 0.555	14.94 ± 0.636	13.83 ± 0.648
4.3 (Control)	29 ± 0.407	7.01 ± 0.640	15.27 ± 0.441	12.13 ± 0.435
4.9	27 ± 0.648	6.86 ± 0.448	15.55 ± 0.544	12.47 ± 0.539
6.6	24 ± 0.532	6.63 ± 0.532	15.97 ± 0.538	12.84 ± 0.685
8.3	22 ± 0.546	6.51 ± 0.346	15.41 ± 0.558	12.81 ± 0.572
DAP und Kali (mg)				
100+50	29 ± 0.510	6.39 ± 0.436	13.25 ± 0.549	11.54 ± 0.450
150+100	30 ± 0.425	6.58 ± 0.556	13.88 ± 0.437	11.99 ± 0.525
200+150 (Kontrolle)	35 ± 0.520	6.76 ± 0.660	13.59 ± 0.642	11.76 ± 0.610
250+200	33 ± 0.710	6.54 ± 0.446	13.24 ± 0.546	11.51 ± 0.520
300+250	26 ± 0.655	6.40 ± 0.552	13.02 ± 0.757	11.33 ± 0.425
Natriumbikarbonat (mM)				
0.3	31 ± 0.515	8.47 ± 0.473	16.27 ± 0.574	9.85 ± 0.455
0.6	34 ± 0.625	8.81 ± 0.567	16.89 ± 0.707	10.31 ± 0.420
0.9	36 ± 0.510	8.58 ± 0.428	16.43 ± 0.591	10.10 ± 0.510
1.2	41 ± 0.615	8.37 ± 0.364	16.13 ± 0.631	9.84 ± 0.525
1.5	45 ± 0.720	8.21 ± 0.512	15.80 ± 0.422	9.73 ± 0.420
1.8	39 ± 0.443	8.10 ± 0.590	15.48 ± 0.488	9.51 ± 0.510
Modifiziertes HPI-001 Medium	40 ± 0.525	7.22 ± 0.578	23.59 ± 0.657	20.10 ± 0.629
3N-BBM+V-Medium (Kontrolle)	30 ± 0.420	6.44 ± 0.542	20.25 ± 0.649	18.55 ± 0.523

**Figur 5**



(10) **DE 20 2022 100 908 U1** 2022.04.07

(12) **Gebrauchsmusterschrift**

(21) Aktenzeichen: **20 2022 100 908.2**  
(22) Anmeldetag: **17.02.2022**  
(47) Eintragungstag: **28.02.2022**  
(45) Bekanntmachungstag im Patentblatt: **07.04.2022**

(51) Int Cl.: **C12M 1/00** (2006.01)  
**C12M 1/34** (2006.01)  
**C12N 1/00** (2006.01)  
**C12Q 1/6853** (2018.01)

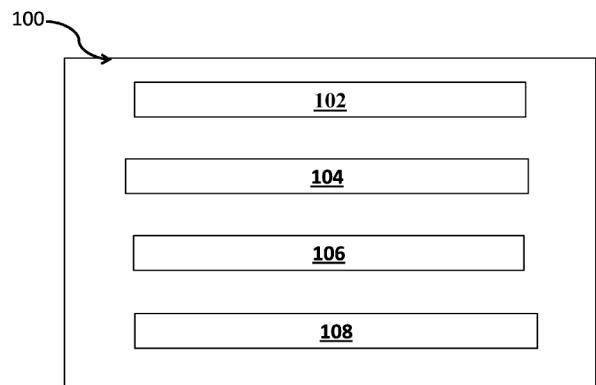
(73) Name und Wohnsitz des Inhabers:  
**Javee, Anand, Dr., Chennai, Tamil Nadu, IN;**  
**Karuppan, Ramamoorthy, Dr., Ramanathapuram,**  
**Tamil Nadu, IN; Kattusamy, Karuppasamy, Dr.,**  
**Madurai, Tamil Nadu, IN; Malairaj, Sathuvan, Dr.,**  
**Pudukkottai, Tamil Nadu, IN; Paul, J. Sagaya John,**  
**Chennai, Tamil Nadu, IN; Subramani, Nagaraj, Dr.,**  
**Chennai, Tamil Nadu, IN**

(74) Name und Wohnsitz des Vertreters:  
**Hohendorf Kierdorf Patentanwälte PartGmbH,**  
**50672 Köln, DE**

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.**

(54) Bezeichnung: **Ein System zur Biosynthese, Optimierung und Reinigung von alkalischer Serinprotease aus Shewanella-Algen**

(57) Hauptanspruch: System zur Durchführung der Biosynthese, Optimierung und Reinigung von alkalischer Serinprotease aus Shewanella-Algen, wobei das System umfasst: eine Sammelstelle und zum Sammeln von Algenproben von Sargassummyriocystum, die in wasserdichten sterilen Polyäthylenbeuteln gesammelt und auf Eis ins Labor gebracht werden;  
eine Isoliereinheit zur Isolierung der Bakterien aus den gesammelten Proben, wobei die Oberfläche der ins Labor gebrachten Proben vorsichtig mit sterilem Meerwasser abgespült wird und die Bakterien isoliert werden, indem die Mikroorganismen mit einem sterilen Wattestäbchen von der Oberfläche der Thalli abgekratzt werden, woraufhin die isolierten Bakterien auf Zobell-Marine-Agar-Platten getupft und diese versiegelten Platten dann 24-48 Stunden bei 37°C bebrütet werden, bis viele Bakterienkolonien auftreten;  
eine Identifizierungseinheit für die mikroskopische Identifizierung und biochemische Charakterisierung von Shewanella-Algen unter Verwendung von Bergeys Handbuch, wobei ein 16S rRNA-Bakteriengen-Sequenzierungsansatz zur Bestimmung des Stammes SNJASM8 verwendet wird und die gDNA von Shewanella-Algen unter Verwendung der CTAB-Methode für eine 12-Stunden-Kulturbrühe und durch Durchführung einer PCR-Amplifikation unter Verwendung der Primer FC-519 (5'-CAGCAGCCGCGGTAA-TAC-3') und RC-1492 (5'-TACGGCTACCTTGTTAC-GACTT-3') isoliert wird; und  
eine Optimierungseinheit zum Testen von Protease-Ausgangsparametern auf die Ausbeute von Protease, die aus Shewanella-Algen ...



**Beschreibung**

## BEREICH DER ERFINDUNG

**[0001]** Die vorliegende Offenlegung bezieht sich auf ein System zur Durchführung der Biosynthese, Optimierung und Reinigung von alkalischer Serinprotease aus Shewanella-Algen.

## HINTERGRUND DER ERFINDUNG

**[0002]** Die Nachfrage nach mikrobieller Protease ist auf dem Markt aufgrund ihrer Bedeutung für den Zellinhalt und aus wirtschaftlicher Sicht gestiegen. Sie wird im Bereich der Biotechnologie in hohem Maße genutzt. Die mikrobiellen Proteasen haben verschiedene Anwendungen wie bioaktive Peptidsynthese, Proteinverarbeitung, mikrobielle Verarbeitung unter Verwendung von Röntgenfilmen, Lederenthaarung und Milch- und Waschmittelindustrie.

**[0003]** Die wichtigsten Industrieenzyme wie alkalische und mikrobielle Serinproteasen spielen weltweit eine große Rolle auf dem Markt für Proteasen. Eine alkalische Serinprotease wird auf dem Markt hauptsächlich in Branchen wie der Waschmittel-, Leder-, Pharma- und Lebensmittelindustrie verwendet.

**[0004]** Das derzeitige Rückgrat der Industrie sind die Mikroorganismen mit ihren enzymatischen Reaktionen, wobei die potenten Mikroben ihre eigene Fähigkeit zur Produktion bioaktiver proteolytischer Enzyme haben.

**[0005]** Einige der wichtigsten handelsüblichen Enzyme, die auf dem Markt erhältlich sind, zeigen in Gegenwart von Oxidationsmitteln und hohen Temperaturen eine deutlich geringere Aktivität als diese. Diese wichtigen bioaktiven enzymproduzierenden Mikroben stammen aus schwierigen geografischen Umgebungen wie Meereslebensräumen, Meeressedimenten, Algen, Schwämmen und Seen mit hohem Salzgehalt. Aus der Literatur geht hervor, dass die Bakterienstämme mit einer hohen Resistenz, die von solchen Orten extrahiert werden, ihre eigene proteolytische Aktivität, Temperatur-, Salz- und Lösungsmittelstabilität haben.

**[0006]** In Anbetracht der vorstehenden Ausführungen wird deutlich, dass ein System zur Durchführung der Biosynthese, Optimierung und Reinigung der alkalischen Serinprotease aus Shewanella-Algen benötigt wird.

## ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0007]** Die vorliegende Offenlegung bezieht sich auf ein System zur Durchführung der Biosynthese, Optimierung und Reinigung von alkalischer Serinprotease aus Shewanella-Algen. Das vorgeschlagene System hat eine potenzielle Anwendung bei der Silberrückgewinnung aus Röntgenfilmen und kann als Ersatz für die herkömmliche Methode verwendet werden, die kostspielig und unsicher für die Umwelt ist. In dieser Offenlegung wird die 16 rRNA-GenSequenzierung zur taxonomischen Identifizierung des isolierten Bakteriums, der Shewanella-Alge, durchgeführt, wobei die alkalische Serinprotease der Shewanella-Alge effektiv für den Silberrückgewinnungsprozess verwendet werden kann. Die Protease-Ausgangsparameter wie Gelatine, Temperatur des Rindfleischextrakts und pH-Wert werden mit Hilfe eines vierfaktoriellen Box-Behnken-Versuchsplans optimiert, und es wird auch eine Reaktionsoberfläche (RSM) gezeichnet. Ein polynomiales Regressionsmodell wird eingesetzt, um die Auswirkungen der Interaktion zwischen den Protease-Ausgangsparametern zu untersuchen. Die Protease-Aktivitäten werden mittels Response Surface Plot (RSM) bewertet, wobei der vorhergesagte Wert und die tatsächlichen Werte aufgezeichnet werden und 162% bzw. 152% betragen. Nach der Reinigung zeigten die gereinigten bakteriellen 45KDa-Enzyme Stabilität in einem pH-Bereich von 7.0-10.0 und einem Temperaturbereich von 40-60°C mit einer Proteaseaktivität bei einem pH von 9.0 und einer Temperatur von 50°C. Es wurde festgestellt, dass das gereinigte proteolytische Enzym in Gegenwart von Lösungsmitteln, Tensiden und Metallionen überlebt. Die Ergebnisse zeigten, dass die gereinigte Protease ein Inhibitor von PMSF ist und die Shewanella-Algenalkaliprotease hemmen kann. In dieser Offenlegung hat die Protease von 150 U/ml die Gelatineschicht innerhalb von 60 Minuten effektiv hydrolysiert.

**[0008]** Die vorliegende Offenlegung zielt darauf ab, ein System zur Durchführung der Biosynthese, Optimierung und Reinigung von alkalischer Serinprotease aus Shewanella-Algen bereitzustellen. Das System umfasst: eine Sammeleinheit zum Sammeln von Algenproben von Sargassumyriocystum, die in wasserdichten sterilen Polyäthylenbeuteln gesammelt und auf Eis ins Labor gebracht werden; eine Isoliereinheit zur Isolierung der Bakterien aus den gesammelten Proben, bei der die Oberfläche der ins Labor gebrachten Proben vorsichtig mit sterilem Meerwasser gespült wird und die Bakterien isoliert werden, indem die Mikroorganismen mit einem sterilen Wattestäbchen von der Thalli-Oberfläche abgeschabt werden, woraufhin die iso-

lierten Bakterien auf Zobell-Marine-Agar-Platten getupft werden und diese versiegelten Platten dann 24-48 Stunden bei 37°C bebrütet werden, bis viele Bakterienkolonien erscheinen; eine Identifizierungseinheit zur mikroskopischen Identifizierung und biochemischen Charakterisierung von Shewanella-Algen unter Verwendung von Bergeys Handbuch, wobei ein 16S rRNA-Bakteriengen-Sequenzierungsansatz zur Bestimmung des Stammes SNJASM8 verwendet wird und die gDNA der Shewanella-Algen unter Verwendung der CTAB-Methode für eine 12-stündige Kulturbrühe und durch Durchführung einer PCR-Amplifikation unter Verwendung der Primer FC-519 (5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3') und RC-1492 (5'-TACGGCTACCTTGTTAC-GACTT-3') isoliert wird; und eine Optimierungseinheit zum Testen von Protease-Ausgangsparametern auf die Ausbeute an Protease, die aus Shewanella-Algen erhalten wird, wobei ein statistischer Box-Behnken-Entwurf für die Optimierung eines potenten Organismusprodukts verwendet wird und eine signifikante Auswirkung auf jeden der bestimmten Parameter auf die Ausbeute an Protease anzeigt, wobei eine multivariate Formel unter Verwendung der Reaktionsoberflächenmethodik (RSM) berechnet wird und wobei eine Reihe von 29 BBD-Versuchstests mit Mittelpunkt zur Bestimmung der Faktoren durchgeführt wird, die zur Maximierung der Protease-Ausbeute verwendet werden.

**[0009]** Ein Ziel der vorliegenden Offenlegung ist die Bereitstellung eines Systems zur Durchführung der Biosynthese, Optimierung und Reinigung von alkalischer Serinprotease aus Shewanella-Algen.

**[0010]** Ein weiteres Ziel der vorliegenden Offenbarung ist es, die vorliegende Methode zur Silberrückgewinnung aus Röntgenfilmen zu ersetzen, da die derzeitigen Methoden negative Auswirkungen auf die Umwelt haben.

**[0011]** Ein weiteres Ziel der vorliegenden Offenlegung ist die taxonomische Identifizierung des isolierten Bakteriums durch eine 16rRNA-Gen-Sequenzierungsanalyse.

**[0012]** Ein weiteres Ziel der vorliegenden Offenlegung ist die Optimierung der Faktoren, die für die Proteaseproduktion verantwortlich sind.

**[0013]** Ein weiteres Ziel der vorliegenden Offenbarung ist die Verwendung der RSM zur Bewertung der Werte der Proteaseaktivität.

**[0014]** Zur weiteren Verdeutlichung der Vorteile und Merkmale der vorliegenden Offenbarung wird eine genauere Beschreibung der Erfindung durch Bezugnahme auf bestimmte Ausführungsformen gegeben, die in den beigefügten Figuren dargestellt sind. Es wird davon ausgegangen, dass diese Figuren nur typische Ausführungsformen der Erfindung darstellen und daher nicht als Einschränkung des Umfangs der Erfindung zu betrachten sind. Die Erfindung wird mit zusätzlicher Spezifität und Detail mit den beigefügten Figuren beschrieben und erläutert werden.

#### Figurenliste

**[0015]** Diese und andere Merkmale, Aspekte und Vorteile der vorliegenden Offenbarung werden besser verstanden, wenn die folgende detaillierte Beschreibung mit Bezug auf die beigefügten Figuren gelesen wird, in denen gleiche Zeichen gleiche Teile in den Figuren darstellen, wobei:

**Fig. 1** ein Blockdiagramm eines Systems zur Durchführung der Biosynthese, Optimierung und Reinigung von alkalischer Serinprotease aus Shewanella-Algen in Übereinstimmung mit einer Ausführungsform der vorliegenden Offenbarung zeigt;

**Fig. 2** eine Tabelle mit biochemischen Tests des Protease produzierenden Bakteriums, das aus der Braunalge Sargassumyriocystum isoliert wurde, in Übereinstimmung mit einer Ausführungsform der vorliegenden Offenbarung zeigt;

**Fig. 3** eine Tabelle für die Varianzanalyse (ANOVA) für ein quadratisches Reaktionsflächenmodell der Proteaseproduktion in Übereinstimmung mit einer Ausführungsform der vorliegenden Offenbarung zeigt; und

**Fig. 4** die Röntgenbeugungsanalyse der mit Proteaseenzymen behandelten Röntgenfilme gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Offenbarung zeigt.

**[0016]** Der Fachmann wird verstehen, dass die Elemente in den Figuren der Einfachheit halber dargestellt sind und nicht unbedingt maßstabsgetreu gezeichnet wurden. Die Flussdiagramme veranschaulichen beispielsweise das Verfahren anhand der wichtigsten Schritte, um das Verständnis der Aspekte der vorliegen-

den Offenbarung zu verbessern. Darüber hinaus können ein oder mehrere Komponenten der Vorrichtung in den Figuren durch herkömmliche Symbole dargestellt sein, und die Figuren können nur die spezifischen Details zeigen, die für das Verständnis der Ausführungsformen der vorliegenden Offenbarung von Bedeutung sind, um die Figuren nicht mit Details zu verdecken, die für Fachleute mit normalen Kenntnissen, die von der vorliegenden Beschreibung profitieren, ohne weiteres erkennbar sind.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG

**[0017]** Um das Verständnis der Erfindung zu fördern, wird nun auf die in den Figuren dargestellte Ausführungsform Bezug genommen und diese mit bestimmten Worten beschrieben. Es versteht sich jedoch von selbst, dass damit keine Einschränkung des Umfangs der Erfindung beabsichtigt ist, wobei solche Änderungen und weitere Modifikationen des dargestellten Systems und solche weiteren Anwendungen der darin dargestellten Grundsätze der Erfindung in Betracht gezogen werden, wie sie einem Fachmann auf dem Gebiet der Erfindung normalerweise einfallen würden auf die sich die Erfindung bezieht.

**[0018]** Der Fachmann wird verstehen, dass die vorstehende allgemeine Beschreibung und die folgende detaillierte Beschreibung beispielhaft und erläuternd für die Erfindung sind und nicht als einschränkend angesehen werden.

**[0019]** Wenn in dieser Beschreibung von „einem Aspekt“, „einem anderen Aspekt“ oder ähnlichem die Rede ist, bedeutet dies, dass ein bestimmtes Merkmal, eine bestimmte Struktur oder eine bestimmte Eigenschaft, die im Zusammenhang mit der Ausführungsform beschrieben wird, in mindestens einer Ausführungsform der vorliegenden Offenbarung enthalten ist. Daher können sich die Ausdrücke „in einer Ausführungsform“, „in einer anderen Ausführungsform“ und ähnliche Ausdrücke in dieser Beschreibung alle auf dieselbe Ausführungsform beziehen, müssen es aber nicht.

**[0020]** Die Ausdrücke „umfasst“, „enthaltend“ oder andere Variationen davon sollen eine nicht ausschließliche Einbeziehung abdecken, so dass ein Verfahren oder eine Methode, die eine Liste von Schritten umfasst, nicht nur diese Schritte einschließt, sondern auch andere Schritte enthalten kann, die nicht ausdrücklich aufgeführt sind oder zu einem solchen Verfahren oder einer solchen Methode gehören. Ebenso schließen eine oder mehrere Vorrichtungen oder Teilsysteme oder Elemente oder Strukturen oder Komponenten, die mit „umfasst...a“ eingeleitet werden, nicht ohne weitere Einschränkungen die Existenz anderer Vorrichtungen oder anderer Teilsysteme oder anderer Elemente oder anderer Strukturen oder anderer Komponenten oder zusätzlicher Vorrichtungen oder zusätzlicher Teilsysteme oder zusätzlicher Elemente oder zusätzlicher Strukturen oder zusätzlicher Komponenten aus.

**[0021]** Sofern nicht anders definiert, haben alle hierin verwendeten technischen und wissenschaftlichen Begriffe die gleiche Bedeutung, wie sie von einem Fachmann auf dem Gebiet, zu dem diese Erfindung gehört, allgemein verstanden wird. Das System, die Methoden und die Beispiele, die hier angegeben werden, dienen nur der Veranschaulichung und sind nicht als Einschränkung gedacht.

**[0022]** Ausführungsformen der vorliegenden Offenbarung werden im Folgenden unter Bezugnahme auf die beigefügten Figuren im Detail beschrieben.

**[0023]** **Fig. 1** zeigt ein Blockdiagramm eines Systems zur Durchführung der Biosynthese, Optimierung und Reinigung von alkalischer Serinprotease aus *Shewanella*-Algen gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Offenbarung, eine Sammeleinheit 102 zum Sammeln von Algenproben von *Sargassummyricostum*, die in wasserdichten, sterilen Polyäthylenbeuteln gesammelt und auf Eis ins Labor gebracht werden.

**[0024]** In einer Ausführungsform wird eine Isoliereinheit 104 zur Isolierung der Bakterien aus den gesammelten Proben verwendet, bei der die Oberfläche der ins Labor gebrachten Proben vorsichtig mit sterilem Meerwasser gespült wird und die Bakterien isoliert werden, indem die Mikroorganismen mit einem sterilen Wattestäbchen von der Thalli-Oberfläche abgeschabt werden, woraufhin die isolierten Bakterien auf Zobell-Marine-Agar-Platten getupft werden und diese versiegelten Platten dann 24-48 Stunden bei 37°C bebrütet werden, bis viele Bakterienkolonien erscheinen.

**[0025]** In einer Ausführungsform wird eine Identifizierungseinheit 106 zur mikroskopischen Identifizierung und biochemischen Charakterisierung von *Shewanella*-Algen unter Verwendung von Bergeys Handbuch verwendet, wobei ein 16S rRNA-Bakteriengen-Sequenzierungsansatz zur Bestimmung des Stammes SNJASM8 verwendet wird und die gDNA von *Shewanella*-Algen unter Verwendung der CTAB-Methode für eine 12-stün-

dige Kulturbrühe und durch Durchführung einer PCR-Amplifikation unter Verwendung der Primer FC-519 (5'-CAGCAGCCGCGTAATAC-3') und RC-1492 (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') isoliert wird.

**[0026]** In einer Ausführungsform wird eine Optimierungseinheit 108 zum Testen von Protease-Ausgangsparametern auf die Ausbeute von Protease, die aus Shewanella-Algen gewonnen wird, verwendet, wobei ein statistischer Box-Behnken-Entwurf zur Optimierung eines potenten Organismusprodukts verwendet wird und eine signifikante Auswirkung auf jeden der bestimmten Parameter auf die Ausbeute von Protease anzeigt, wobei eine multivariate Formel unter Verwendung der Response Surface Methodology (RSM) berechnet wird und wobei eine Reihe von 29 BBD-Experimenten mit Mittelpunkten zur Bestimmung der Faktoren, die zur Maximierung der Protease-Ausbeute verwendet werden, durchgeführt wird.

**[0027]** In einer Ausführungsform werden die isolierten Bakterienkolonien wiederholt aufgestreut, bis eine einzige Kolonie auf der Agarplatte mit Zobell-Medium (0.5 % (w/v) Pepton, 0.1 % (w/v) Hefeextrakt, 0.18 % (w/v)  $\text{CaCO}_3$ , 0.010 % (w/v)  $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.324 %  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0.055 %  $\text{KCl}_2$ , 0.016 %  $\text{NaHCO}_3$ , 0.008 %  $\text{KBr}$ , 0.88 %  $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.95 %  $\text{NaCl}$ , 1.5 % (w/v) Agar-Pulver und destilliertes Wasser. Nach dem erneuten Aufbrechen werden die gereinigten einzelnen Bakterienkolonien bei einer Temperatur von 4°C aufbewahrt, und es wird ein Protease-Plattentest mit einem mit Kasein 0.5 % (w/v) angereicherten Medium durchgeführt, um einzelne Bakterienkolonien zu untersuchen.

**[0028]** In einer Ausführungsform wird ein anfängliches Inokulum einer Bakterienkultur mit einem Zobell-Meeresmedium zur Förderung des Bakterienwachstums aufrechterhalten, wobei das anfängliche Inokulum von 3 % in dem gesamten Satz von Bakterien aufrechterhalten wird, und wobei ein primäres Bakterieninokulum von 3 % von 30 ml in 1 L sterilisiertes Zobell-Meeresmedium bei einem pH-Wert von 8.0 beimpft wird und das beimpfte Medium für 5 Tage in einer sanften Rotation bei 120 U/min bei einer Temperatur von  $37 \pm 2$  °C wachsen gelassen wird.

**[0029]** In einer Ausführungsform werden die Gruppentests mit verschiedenen Quellen wie Gelatine, Rindfleischextrakt, pH-Wert und Temperatur für verschiedene Variablen getestet und jede der Variablen wird auf die Proteaseausbeute getestet.

**[0030]** In einer Ausführungsform wird ein Protease-Enzymbestimmungstest durchgeführt und anschließend die Protease durch Ammoniumsulfatfällung gereinigt.

**[0031]** In einer Ausführungsform werden verschiedene Bewertungen und Aktivitäten durchgeführt, wie z. B. Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Zymogramm-Aktivitätsanalyse, Aminosäuresequenzierung und Erstellung eines 3D-Modells der Serinprotease unter Verwendung bioinformatischer Werkzeuge, eine Bewertung des optimalen und stabilen pH-Werts und der thermischen Stabilität der gereinigten Shewanella-Algen-Protease sowie eine Bewertung der Protein- und kinetischen Parameter der Serinprotease.

**[0032]** In einer Ausführungsform werden die Auswirkungen der Kohlenstoffquelle, der Stickstoffquelle, verschiedener Metallionen und Inhibitoren sowie verschiedener Tenside und Lösungsmittel auf die gereinigte Protease von Shewanella-Algen untersucht.

**[0033]** In einer Ausführungsform wird das Silber aus Röntgenfilmen gewonnen, wobei eine Röntgenbeugungsanalyse des Röntgenfilmrestes und eine Rasterelektronenmikroskopie des mit Protease behandelten Röntgenfilms durchgeführt wird.

**[0034]** In einer Ausführungsform umfasst der Assay zur Bestimmung der Protease: Aufbringen von 100 µL experimentellem Protease-Enzym auf 1 ml einer 1%igen (w/v) Kaseinlösung, die 30 Minuten lang bei einer Temperatur von 37°C inkubiert wird; Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 3 ml 10%iger (w/v) Trichloressigsäure (TCA) und anschließendes Zentrifugieren für 5 Minuten bei 10,000 U/min; Neutralisieren des Überstands von 500 µL mit 2.5 mL 0.5 N Natriumcarbonat nach der Zentrifugation; und Auftragen des Folin-Phenol-Reagens auf 500 µL des Überstands und anschließende Inkubation für 20 Minuten bei einer Temperatur von 37°C, wobei die Absorption bei 660 nm abgelesen wird und wobei eine Einheit der Proteaseaktivität als die Summe der Tyrosinäquivalente (µM) bewertet wird und die Standardkurve für Tyrosin für die Berechnung der proteolytischen Aktivität erstellt wird.

**[0035]** In einer Ausführungsform wird eine geeignete Nährstoffquelle aus Kohlenstoff und Stickstoff ausgewählt, um die Produktion von Protease aus isolierten Bakterienarten zu überprüfen, wobei dieses Experiment in einem definierten Produktionsmedium in konischen 250-mL-Kolben durchgeführt wird, der 50 mL Medium

enthält. Die Kulturinokulum werden nach dem Autoklavieren des mit dem Medium geimpften Kolbens hinzugefügt und unter verschiedenen Bedingungen mit verschiedenen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen in einer Konzentration von 5 g/L bzw. 2 g/L gehalten, wobei die Kohlenstoffquellen Fruktose, Gelatine, Galaktose, Glukose, Stärke, Saccharose und Maltose und die Stickstoffquellen Hefeextrakt, Fleischextrakt, Rindfleischextrakt, Pepton, Kasein,  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , KCl,  $\text{KNO}_3$  und  $\text{CaCl}_2$  sind. Die bei 660 nm gemessene anfängliche Protease-OD wird für das definierte Produktionsmedium in konischen 250-mL-Kolben verwendet.

**[0036]** In einer Ausführungsform werden die kinetischen Konstanten, die Michaelismen-Konstante ( $K_m$ ) und die maximale Enzymgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) unter Verwendung der Lineweaver-Burk-Karte bestimmt, wobei die Auswirkung der Substratkonzentration auf die Reaktion von 0.25 % bis 1.0 % untersucht wird. Die Gesamtproteinkonzentration wird mit Rinderserumalbumin bestimmt.

**[0037]** In einer Ausführungsform umfasst die Reinigung der Protease unter Verwendung von Ammoniumsulfid: Durchführung einer Zentrifugation der erhaltenen Protease für 10 Minuten bei 10000 U/min, um einen Bakterienüberstand zu erhalten; langsame Zugabe von Ammoniumsulfid-Salz zu dem erhaltenen Bakterienüberstand, um eine 80%ige Sättigung zu erreichen, wonach das Gemisch 1 Stunde lang gerührt und über Nacht bei einer Temperatur von 4°C leicht gerührt wird; Extrahieren des erhaltenen Proteinpräzipitats aus der Mischung für 10 Minuten bei 10000 U/min per Zentrifugation und anschließendes Auflösen in einem Puffer von 50 mMTris-HCL und anschließendes Dialysieren für 12 Stunden bei 4°C; Anpassen der gefälltten Proteinprobe auf Proteaseaktivität und Proteingehalt in der dialysierten bakteriellen Proteinprobe; Laden der dialysierten Proteaseenzyme auf eine vorbalancierte DEAE-Cellulosesäule (1.5 cm x 10 cm) in 10 mMTris-HCl-Puffer (pH 8.5); und Durchführung der Protein-elution mit einer Durchflussrate von 0.4 ml<sup>-1</sup> min unter Verwendung von 10 mMTris-HCl-Puffer, der Natriumchlorid enthält, wobei die UV-Absorption bei 280 nm abgelesen und der beobachtete OD-Wert auf Proteasefunktion untersucht wird.

**[0038]** In einer Ausführungsform werden die Polyacrylamid-Gelelektrophorese und die Zymogramm-Aktivität unter Verwendung eines vernetzten 10%igen Polymerisationsgels durchgeführt, wobei eine Silberfärbung zur Darstellung der Proteinbanden erreicht wird. Ein Gelatine-Zymogramm wird unter Verwendung von 10% SDS-haltigen Plattengelen und 0.5% Gelatine im Trenngel bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt. Zur Durchführung der Gelelektrophorese wird das Gel dreimal bei Raumtemperatur für 30 Minuten in 2 % (v/v) Triton X-100 eingeweicht, um das überschüssige SDS zu entfernen. Das Zymogramm-Gel wird in Methanol-GAA-Wasser (30:7:70,v/v/v) mit 0.1 % Coomassie Brilliant Blue (CBB) Blendblau R-250 gefärbt, gefolgt von Methanol-GAA-Wasser (30:7:70,v/v/v), und das Verhalten der Enzyme wird durch Inkubation des Gels in einem Wasserbad bei einer Temperatur von 40 °C über einen Zeitraum von 5 Stunden in einem Puffer aus 0.05 M Glycin-NaOH bei einem pH-Wert von 9.0 sichtbar gemacht.

**[0039]** In einer Ausführungsform werden die gereinigten Proteasebanden, die auf SDS-Gelen isoliert wurden, auf eine ProBlott-Membran übertragen, woraufhin die N-terminale Sequenz unter Verwendung einer automatisierten Edman-Abbaumethode und eines Proteinsequenzierers, der mit einem HPLC-System ausgestattet ist, bei 140 °C analysiert wird, wobei einzigartige Aminosäurereste als Signale identifiziert werden. Ein 3D-Modell der Serinprotease wird auf der Grundlage der Proteindatenbank und unter Verwendung des SWISS-MODEL-Servers erstellt, der die vergleichende Proteinstruktur-Homologiesimulation automatisiert, wobei PyMOL für die 3D-Modellvorhersage und -Analyse verwendet wird.

**[0040]** In einer Ausführungsform wird der optimale und stabile pH-Wert für die gereinigte Protease von Shewanella-Algen in verschiedenen Bereichen wie 5-12 unter Verwendung von Gelatine als 0.05 mol<sup>-1</sup> Substrat, Succinatpuffer, pH-5, Phosphatpuffer und andere Puffersysteme für pH 5.0-7.5, Tris-HCl als pH 8.0-9.0, Glycin-NaOH als pH 9.5-11.0, Natriumphosphat als pH 11.5-12.0 untersucht. Die Tests zur Untersuchung der Stabilität werden durchgeführt, indem jeweils 1 ml der isolierten Enzyme zusammen mit 3 ml des gewählten pH-Puffers bei 37°C für 1 h und 24 h inkubiert und die Restaktivitäten analysiert und überwacht werden.

**[0041]** In einer Ausführungsform wird eine optimale Temperatur für Proteaseenzyme bestimmt, indem das Reaktionsgemisch des Enzyms bei verschiedenen Temperaturen im TrisHCl-Puffer (pH 8.5) inkubiert und die Proteaseaktivität gemessen wird, wobei die Enzyme zur Bewertung der thermischen Stabilität eine Stunde lang bei verschiedenen Temperaturen inkubiert werden und die Restaktivität unter den Bedingungen des Proteasetests berechnet wird.

**[0042]** In einer Ausführungsform werden die Auswirkungen verschiedener Metallionen und Inhibitoren auf die Proteaseaktivität sowie die Auswirkungen von Oberflächen und Lösungsmitteln auf die Proteaseaktivität von Shewanella-Algen untersucht. Die Auswirkungen von Metallionen wie  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{K}^2$

+, Hg<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup> auf die katalytische Wirkung des Enzyms werden untersucht, indem eine Vorinkubation einer bestimmten Ionenlösung, die einen Puffer bei Raumtemperatur enthält, mit gereinigten Enzymen durchgeführt und nach einer Stunde Inkubation Gelatine zugesetzt wird und die Restaktivitäten bewertet werden. Die Auswirkungen verschiedener Proteaseinhibitoren wie Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Dithiothreitol (DTT), β-Mercaptoethanol, Dithiobis (2-Nitrobenzoesäure) (DTNB) Cysteinproteaseinhibitoren werden untersucht, die eine Konzentration von 1-5 mM in der proteolytischen Aktivität melden. Um die Auswirkungen von Tensiden und Lösungsmitteln zu untersuchen, werden die Folgen einer festen Konzentration von 1% verschiedener Tenside wie (SDS in (w/v), Tween-20, Tween-80, Xylene, Triton X-100 in (v/v) auf die proteolytische Aktivität durch Vorinkubation bei einer Temperatur von 37°C für 4 Stunden getestet. Es wird eine gleichzeitige Regelung mit Enzym- und Substratpuffer entwickelt, und der Wert der Kontrollmethode wird als 100 % wahrgenommen. Die Stabilität der Lösungsmittel auf die Proteaseaktivität wird in dieser Offenlegung verwendet, wobei die Lösungsmittel DMSO, Ethanol, Aceton, Hexan, Chloroform und Benzol (5 %) sind.

**[0043]** In einer Ausführungsform erfolgt die Silberrückgewinnung aus dem Röntgenfilm durch Mischen des quantifizierten und beschnittenen Films von 500 mg mit 150 U/ml Protease-Enzymlösung in einem sterilen Kolben, der in einem Wasserbad gehalten wird, um die Temperatur der Lösung aufrechtzuerhalten. Die Filmprobe wird bei verschiedenen Temperaturen und Zeiten unter ständigem Rühren und mit verschiedenen Säuren und pH-Werten behandelt, wobei die Filme zu einem beliebigen Zeitpunkt aus der Enzymlösung entfernt und die Rückstände zentrifugiert werden. Der isolierte Rückstand enthält schwarze Partikel, die gereinigt, getrocknet und gewogen werden. Das nach der Behandlung erhaltene Silber wird mit Natriumkarbonat und Borax im Verhältnis 2:1 gemischt und das Gemisch wird mit Hilfe eines Graphittiegels in einem Ofen aufbewahrt und dann für eine Zeitspanne von 1:30 Stunden bei einer Temperatur von 550°C in den Ofen gestellt. Das erhaltene Produkt wird mit einem Röntgenbeugungsanalysator (XRD) gemessen und charakterisiert, wobei das erhaltene Produkt mit einem Bruker D-8 bei 40 kV und 30 mA berechnet und beschrieben wird und die Daten gemäß dem Protokoll aufgezeichnet werden. Die Röntgenabfälle werden in den Gesundheitszentren gesammelt und dann mit sterilem Wasser gewaschen und mit steriler, in Desinfektionsmittel getränkter Baumwolle abgewischt. Die gesammelten Filme werden mit einer sterilen Schere in 1 cm x 1 cm große Stücke geschnitten und dann 20 Minuten lang bei 40 °C im Ofen gelagert. Ein Stück der gesammelten Filme wird mit einer Simulation mit 150 U/ml Protease-Enzym imprägniert und dann mit sterilem Wasser gewaschen und 20 Minuten lang bei 40 °C im Ofen gelagert. Die Rasterelektronenmikroskopie der mit Protease behandelten und unbehandelten Röntgenfilme wird mit dem leistungsstarken analytischen REM-System TESCAN VEGA3 durchgeführt, das bei 30 keV arbeitet.

**[0044]** In einer Ausführungsform können die kodierten Wertparameter von Gruppentests mit verschiedenen Quellen auf verschiedene Variablen getestet werden, indem die unten angegebene Gleichung (1) berechnet wird:

$$xi = Xi - Xo/\Delta X \quad (1)$$

**[0045]** Dabei stehen xi für die kodierten Werte des i-ten Parameters und Xi für den unverschlüsselten Wert des i-ten Prüfparameters und Xo für den unverschlüsselten Wert des i-ten Prüfparameters am zentralen Punkt.

**[0046]** In einer Ausführungsform wird ein Regressionsmodell zur Bewertung der Reaktionskurve als Polynom zweiter Ordnung verwendet, wobei das Regressionsmodell in der nachstehenden Gleichung (2) dargestellt ist:

	k	K	k-1 k
Y=	$\beta_0 + \sum \beta_i X_i^2 +$	$\sum \beta_{ij} X_i^2 +$	$\sum \sum \beta_{ij} X_i X_j$
	i=1	i=1	i=1 j=2

(2)

wobei Y und β<sub>0</sub>, β<sub>i</sub>, β<sub>ii</sub>, und β<sub>ij</sub> die erwartete Antwort bzw. den Regressionskoeffizienten darstellen. Für die Berechnung der Regression und des Regressionsfaktorkoeffizienten werden die gesammelten Daten verwendet und die Gleichungen mit Hilfe von ANOVA validiert, wobei die Berechnung des Anpassungswertes das Hauptziel jedes Ausdrucks in der Gleichung ist. Die Oberflächendiagramme und Konturdiagramme werden zur Bewertung der Einzel- und Interaktionsauswirkungen jedes Testdatensatzes auf die Proteaseausbeute verwendet, und um die besten Testvariablen zu ermitteln, werden inkodierte Einheiten ermittelt und



anschließend in uncodierte Einheiten umgewandelt.

**[0047] Fig. 2** zeigt eine Tabelle der biochemischen Tests des Protease produzierenden Bakteriums, das aus der Braunalge *Sargassummyriocystum* gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Offenbarung isoliert wurde. Das Wachstum des Stammes SNJASM8 wird auf einem Wachstumsmedium bei einer Temperatur von  $37 \pm 2$  °C für 2 Tage beobachtet und auf der Grundlage von physiochemischen und Eigenschaften wird der Stamm als *Shewanella* Sp. identifiziert und bei der Bestätigung mit der Gensequenzierung wird bestätigt, dass der Stamm zu 99% mit *Shewanella*-Algen übereinstimmt. Die Gensequenzierung wurde bereits in das Genebank gestellt, und das NCBI vergab die Zugangsnummer für die partielle Gensequenzierung, MT067583. Von den insgesamt neun Isolaten weisen nur vier Stämme auf 1%igen Gelatine-Zobell-Agar-Platten eine aktive Hydrolysezone auf, wobei eine maximale Hydrolysezone mit einem Durchmesser von 25 mm beobachtet wird, wenn sie mit gesättigtem Ammoniumsulfat geflutet wird, und bei den anderen drei Isolaten werden relativ geringe proteolytische Zonen mit einem Durchmesser von 17, 13 und 11 mm beobachtet.

**[0048]** In einer Ausführungsform werden die verschiedenen Kohlenstoffquellen bei einer Konzentration von 1 % auf die Proteaseproduktion in *Shewanella*-Algen getestet, die am fünften Tag der Inkubation in dem mit Glukose geänderten Medium eine relative Aktivität von bis zu 152 % erreicht. Die Stärke als Kohlenstoffquelle hat die niedrigste relative Proteaseaktivität, die 34 % beträgt, und Glukose als Kohlenstoffquelle hat die maximale extrazelluläre Proteaseproduktion in *Shewanella*-Algen mit einer Konzentration von 10 g/L mit einer höchsten relativen Aktivität von 126 % im Vergleich zum Rest der Konzentration gezeigt. Die niedrigste relative Proteaseaktivität von 30 % wird im Fall von Glukose mit einer Konzentration von 2 g/L festgestellt.

**[0049]** In einer Ausführungsform werden verschiedene Stickstoffquellen mit einem Prozentsatz von 0.25 % für die Proteaseproduktion in *Shewanella*-Algen getestet. Die Testergebnisse zeigten, dass der Blatt-Extrakt die maximale extrazelluläre Protease-Produktion mit einer relativen Aktivität von 76% unterstützt, während die niedrigste relative Aktivität bei 28% lag und im Falle von Kaliumnitrat aufgezeichnet wurde. Der mit 2 g/L getestete Blatt-Extrakt zeigte die maximale Protease-Produktion in *Shewanella*-Algen mit einer relativen Aktivität von 72 % und die niedrigste bei 0.5 g/L mit einer relativen Aktivität von 18 %.

**[0050] Fig. 3** zeigt eine Tabelle für die Varianzanalyse (ANOVA) für ein quadratisches Reaktionsflächenmodell der Proteaseproduktion in Übereinstimmung mit einer Ausführungsform der vorliegenden Offenbarung. Eine Response-Surface-Methode (RSM) wird in Kombination mit BBD eingesetzt, um die Auswirkungen von Verfahrensvariablen wie Gelatine, Rindfleischextrakt, pH-Wert und Temperatur auf die Proteaseproduktion zu bewerten, wobei die Gleichung aus der multiplen Regressionsanalyse gewonnen wird und unten dargestellt ist:

Gleichung Kodierte Faktoren:

$$\begin{aligned} \text{Protease} = & -4621.665 + 34.233x_A + 347.185x_B + 757.850x_C + 82.138x_D - 7.333x \\ & Ax_B + 2.250x_Ax_C - 0.016x_Ax_D - 17.333x_Bx_C - 1.022x_Bx_D - 0.6333x_Cx_D - 7.441x_A^2 - 60.474B^2 - \\ & 44.266x_C^2 - 1.018x_D^2 \end{aligned}$$

**[0051]** Der Wert des Bestimmungskoeffizienten und des Durchgangskoeffizienten beträgt 12.64 bzw. 0.7397. Zur Bewertung der Signifikanz der einzelnen Koeffizienten werden die P-Werte 0.002 verwendet. Ein niedriger p-Wert weist auf einen entsprechend wichtigen Koeffizienten hin. Die korrelierenden p-Werte sind klein ( $P < 0.05$ ), wobei der lineare Koeffizient (D) und die Koeffizienten des quadratischen Terms ( $A^2$ ,  $B^2$ ,  $C^2$ ) signifikant waren. Die anderen Koeffizienten für den Term ( $P > 0.05$ ) sind nicht relevant.

**[0052]** Die Auswirkungen von Rindfleischextrakt und Gelatine auf die Proteaseproduktion wurden untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass der Rindfleischextrakt in der Kombination mit einem niedrigen Gelatinegehalt zu einer geringen Proteaseproduktion von 85.2 U/ml führt. Die optimale RSM-Kombination aus niedrigem Rindfleischextrakt und hohem Gelatinegehalt führt zu einer maximalen Proteaseproduktion von 162 U/mL, wobei zu erkennen ist, dass die Zunahme des Gelatinegehalts direkt proportional zur Zunahme der Proteaseproduktion ist. Als Gelatine als Stickstoffquelle verwendet wurde, produzierte das Halobacterium sp. LBU50301 in der nichtstatistischen Methodik die höchste Proteaseproduktion (43.07 U/mL).

**[0053]** Die Auswirkungen von Gelatine und pH-Werten auf die Proteaseproduktion werden bewertet, wobei die Ergebnisse dieser Bewertung zeigen, dass die Kombination aus verschiedenen Gelatinegehalten und moderaten pH-Werten eine hohe Proteaseproduktion von 141.8 U/ml ergibt, wobei festgestellt wird, dass die

Abnahme des Endproduktwerts mit der Abnahme der pH- und Gelatinewerte zusammenhängt, wobei ein hoher pH-Wert, der einem niedrigen Gelatinegehalt entspricht, zu einem niedrigeren Proteasewert von 80 U/ml führt. Die mittlere Kombination aus pH-Wert und Gelatine führt zu einer maximalen Proteaseproduktion von 138.6 U/ml.

**[0054]** Die Wirkung verschiedener Temperaturen und Gelatine auf die Proteaseproduktion wurde untersucht, und die Versuchsergebnisse zeigten, dass der Wert der Proteaseproduktion mit zunehmender Temperatur und abnehmender Gelatinekonzentration zunimmt, aber wenn der Temperaturwert über einen Schwellenwert steigt, nimmt der Wert der Proteaseproduktion ab.

**[0055]** Die Wirkung von Rindfleischextrakt und pH-Wert auf die Proteaseproduktion wurde untersucht, und die Ergebnisse zeigten, dass ein Höchstwert von 146.2 U/ml Proteaseproduktion durch die Kombination von 1.25 g/L Rindfleischextrakt als Stickstoffquelle und moderaten pH-Werten erreicht wird. Die Erhöhung des pH-Wertes und des Rindfleischextraktes führt zu einem Rückgang der Proteaseproduktion, wobei der Wert 91 U/mL beträgt.

**[0056]** Die Wirkung von Rindfleisch-Extrakt und Temperatur auf die Protease-Produktion Ebene ist Studien, wobei die Ergebnisse zeigten, dass die ein niedriges Niveau der Protease-Produktion mit einem Wert von 86 U/mL ist ein Ergebnis der hohen Gehalt an Rindfleisch-Extrakt und niedriger Temperatur, wobei der mittlere Beitrag der Rindfleisch-Extrakte Wert und Temperatur zeigt, dass die maximale Protease-Produktion.

**[0057]** Die Auswirkungen von Temperatur und pH-Wert auf die Proteaseproduktion wurden untersucht, wobei die Ergebnisse zeigten, dass bei niedriger Temperatur und niedrigem pH-Wert der Wert des Endprodukts mit 102.2 U/ml vergleichsweise niedrig ist. Bei einer Erhöhung des pH-Werts und der Temperatur auf einen optimalen Wert wurde festgestellt, dass der Wert des Endprodukts vergleichsweise höher ist, aber jenseits dieser Werte von Temperatur und pH-Wert nimmt der Wert der Proteaseproduktion drastisch ab.

**[0058]** Die Ergebnisse zeigten, dass das RSM ein effektives Modell für die Analyse der Interaktion der Parameter und deren Auswirkungen auf die Proteaseproduktion in Shewanella-Algen ist.

**[0059]** Die Experimente, die zur Analyse der Auswirkungen der Parameter durchgeführt werden, werden 5 Tage lang durchgeführt, und alle 6 Stunden wird das Wachstum des Bakteriums bei 600 nm aufgezeichnet und die Proteaseproduktion bei 660 nm bestimmt.

**[0060]** In einer Ausführungsform wird eine Bewertung der gereinigten Protease mit SDS-PAGE durchgeführt, wobei das Kulturfiltrat von Shewanella-Algen einer unterschiedlichen Fraktionierung unter Verwendung von 80 % Ammoniumsulfat-Fällung (ASP) unterzogen und dann dialysiert wird, um die überschüssige Salzkonzentration aus der ausfallenden Probe zu entfernen, und nach der Dialyse wird die Probe der DEAE-Cellulose-Ionenaustausch-Säulenchromatographie unterzogen, von wo aus die gesammelten Fraktionen für den Protease-Plattentest verwendet werden, und die aktiven Proteasefraktionen werden zur weiteren Verwendung lyophilisiert. Zur Charakterisierung der gereinigten Protease wurden UV-Spektroskopie und SDS-PAGE durchgeführt. Die Ergebnisse der Charakterisierung zeigten, dass die gereinigte Protease im UV-Spektrophotometer bei 280 nm einen einzelnen Peak aufwies. Die SDS-PAGE-Charakterisierung mit der Silberfärbung zeigte eine klare einzelne Monomerbande mit einer erwarteten Molekularmasse von 45 KDa im reinen Protein, wobei die meisten der alkalischen Protease eine Molekularmasse von weniger als 130 kDa aufwiesen. Eine Proteaseaktivität auf dem Zymogramm-Gel wird auch durch eine einzelne Bande in der SDS-PAGE gezeigt, die durch die säulengereinigte Fraktion angezeigt wird. Der Km- und Vmax-Wert der gereinigten Protease beträgt 2.5 mg/ml bzw. 140 U/ml.

**[0061]** Die Sequenz der NH<sub>2</sub>-terminalen Aminosäuren der Serinprotease aus Shewanella-Algen erweist sich als einheitlich und in ihrer reinsten Form, wobei die Sequenz zu 89%, 36% und 45% identische Werte mit denen aufweist, die für andere Serinproteasen ermittelt wurden.

**[0062]** In einer Ausführungsform hat die Shewanella-Algenprotease ihre Aktivitäten im pH-Bereich von 7 bis 11 gezeigt, wobei sich herausstellte, dass die Protease bei einem pH-Wert von 8 bis 10 eine optimale Aktivität zeigt, aber mit der Erhöhung des pH-Werts von 10 nimmt die Aktivität ab, was auch bei saurer Natur, d. h. bei einem pH-Wert von 5, geschieht. Die alkalische Serinprotease hält den Aktivitätsbereich von 8-11 und die Enzyme haben auch bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden keine vibrierende Aktivität bei einem Bereich unter pH-6 gezeigt. Die Shewanella-Algenprotease zeigte ihre Aktivitäten in einem Temperaturbereich von 20-80°C, wobei die Enzyme ein Optimum bei einer Temperatur von 50°C aufwiesen und 56% bzw. 48% der

hohen Aktivität bei einer Temperatur von 40°C bzw. 50°C erreichten. Wenn die Temperatur über den Wert von 60°C ansteigt, nimmt die Aktivität ab. Die Serinprotease zeigte eine Aktivität von 68 % bei einer Temperatur von 50 °C, aber oberhalb von 60 °C sank das Aktivitätsniveau drastisch.

**[0063]** In einer Ausführungsform werden die Auswirkungen verschiedener NaCl-Konzentrationen auf die Proteaseproduktion untersucht, wobei die Versuchsergebnisse zeigen, dass die alkalische Serinprotease aus *Shewanella*-Algen bei einer Konzentration von 2-4% NaCl hochaktiv ist. Es wurde auch festgestellt, dass die Protease in der Lage ist, eine Aktivität von 40 % bei niedrigeren NaCl-Konzentrationen wie 1-2 % NaCl-Konzentration aufrechtzuerhalten, wobei auch festgestellt wurde, dass die Serinprotease bei einer NaCl-Konzentration von 3-4 % stabiler ist und ebenfalls eine Aktivität von 40 % aufrechterhält. Aufgrund dieser guten Stabilität bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen wird das *Shewanella*-Algenenzym in vielen industriellen Anwendungen eingesetzt.

**[0064]** In einer Ausführungsform werden die Auswirkungen von Oxidationsmitteln und Reduktionsmitteln auf die Protease-Stabilität untersucht, wobei die experimentellen Ergebnisse zeigten, dass die Protease aus *Shewanella*-Algen stabil ist und über 40% Aktivität in der Existenz SDS wie Tween-20, Tween-80 und die im Falle von TritonX-100, Harnstoff-Substanzen, die Protease haben niedrigere Aktivität von 35% gezeigt.

**[0065]** In einer Ausführungsform werden die Auswirkungen von Kationen und Inhibitoren auf die Proteaseproduktion untersucht, wobei die Ergebnisse gezeigt haben, dass die *Shewanella*-Alge eine stabile Aktivität von 42 %, 52 %, 44 %, 39 % und 40 % gegenüber Kationen wie  $Mg^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $MgCl^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  und  $Cu^{+2}$  aufweist. Die Protease zeigte eine geringere Aktivität von 32 % für das Schwermetall  $HgCl_2$ , wobei die meisten  $Mg^{+2}$ -Ionen als Stimulanzien für die Proteaseaktivität wirken. Es wird auch beobachtet, dass die  $Mg^{+2}$ -Ionen auf die 44%ige Aktivität der *Shewanella*-Algen-Protease reagieren. Die Beobachtung zeigte, dass die Protease stabiler ist und die aktive Form der 5mM-Konzentration bei 52% mit  $Zn^{+2}$ -Ionen zeigte. Eine Aktivität von 40 % wird mit 5 mM  $Ca^{+2}$ -Ionen beibehalten. Aus all diesen Gründen kann man leicht zu dem Schluss kommen, dass die *Shewanella*-Alge in verschiedenen Metallionen stabiler ist und in vielen industriellen Prozessen ausgiebig verwendet werden kann. Die gereinigte Form der *Shewanella*-Algen-Protease wird durch Phenylmethansulfonylfluorid verhindert und diese Form zeigt ihre Serinform.

**[0066]** In einer Ausführungsform werden die Auswirkungen verschiedener Puffer und unterschiedlicher Lösungsmittel auf die Aktivität der gereinigten Protease untersucht, wobei die Ergebnisse zeigen, dass Puffersysteme wie Tris-HCl, Glycin-NaOH und Natriumphosphatpuffer eine höhere Enzymaktivität von über 44 %, 32 % bzw. 22 % aufweisen. Bei Puffersystemen mit saurem pH-Wert, wie Citrat-, Succinat- und Phosphatpuffer, lag die relative Proteaseaktivität bei 4 %, 6 % bzw. 16 %. Die Behandlung der gereinigten Protease mit Lösungsmitteln wie Aceton, Ethanol, Benzol, DMSO, Chloroform und Hexan führte zu einer Verringerung der relativen Proteaseaktivität. Die relative Proteaseaktivität im Falle von Ethanol, Chloroform und Aceton beträgt 28 %, 24 % bzw. 16 %. Die Protease-Aktivitäten für niedrig polare Lösungsmittel wie DMSO, Benzol und Hexan liegen bei 30 %, 32 % bzw. 35 %.

**[0067]** In einer Ausführungsform haben die experimentellen Ergebnisse der Silberrückgewinnung aus Röntgenfilmen unter Verwendung des Serinprotease-Enzyms gezeigt, dass die Serinprotease eine Gelatinaseaktivität und die Fähigkeit zur Hydrolyse der Gelatineschicht aufweist, was zur Entfernung von Silber auf dem Röntgenfilm führt, wobei dieser Schritt ein erster Schritt in der Silbersalzrückgewinnung aus Röntgenfilmen auf umweltfreundliche und umweltfreundliche Weise ist.

**[0068]** Fig. 4 zeigt die Röntgenbeugungsanalyse der mit Protease-Enzymen behandelten Röntgenfilme gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Offenbarung. Die Röntgenbeugungsanalyse zeigt scharfe und solide Beugungsspitzen, die bei  $2\theta = 37.52^\circ$ ,  $45.19^\circ$  und  $65.32^\circ$  gefunden werden und den Reflektionen der (110)-, (210)- und (200)-Ebenen der Ag-Partikel ähneln. Die Intensität der XRD-Spitzen zeigt die hohe Kristallinität des Ag-Pulvers. Die Tatsache, dass kein Peak beobachtet wird, der auf das Vorhandensein von Ag-Partikel wie metallisches Silber und Silberpartikel zurückzuführen ist, zeigt, dass nur reines Ag-Pulver das Endprodukt nach der Wärmebehandlung ist.

**[0069]** In einer Ausführungsform wird die Rasterelektronenmikroskopie (REM) der mit enzymatischer Serinprotease behandelten Röntgenfilme durchgeführt, wobei der Filmrest für die Wärmebehandlung verwendet wird und Ag-Mikropartikel erhalten werden. Die Ag-Mikropartikel sind kugelförmig und befinden sich in der Gelatineschicht der veredelten Röntgenfilme. Die Ergebnisse zeigen, dass die Partikel ihre Form während des enzymatischen Extraktionsprozesses beibehalten haben, wobei auch festgestellt wurde, dass das meiste Silber aus weniger saurem Medium gewonnen wird, was auf die langsame enzymatische Aktivität bei nied-

rigem pH-Wert hinweist und es nicht möglich ist, Ag aus Röntgenfilmabfällen zu gewinnen. In der Zeitspanne von 30 bis 60 Minuten stieg die Rückgewinnung von Silber auf 300 µg, 350 µg und 425 µg, während die Masse des Films auf 500.8 mg, 500.6 mg und 500.3 mg abnahm. Ein Anstieg ist auch bei der Strippzeit von 60 min und 120 min zu beobachten, was jedoch keinen Einfluss auf die Silberrückgewinnung von 425 µg und die Masse des Films von 500.6 mg hatte.

**[0070]** In einer Ausführungsform zeigt das Modul-Docking der Serinprotease, dass sie eine Trypsin-ähnliche Struktur mit einer aktiven Stelle zwischen zwei parallelen Beta-Strukturen aufweist, wobei sie eine typische katalytische Traid aufweist, die für die Peptidhydrolyse verantwortlich ist. Zu den aktiven Stellen gehören HIS 220, ASP 249 und SER 340 sowie SER 245, HIS 373 und ASP 387. Das Vorhandensein von HIS und ASP an der aktiven Stelle fungiert als katalytische Base und Säure, die auch für die Peptidhydrolyse verantwortlich ist. Die Amidbindung des Rückgrats hat eine Resonanzstruktur, die für die katalytische Lyse anfällig ist, wobei die katalytische Hydrolyse von der Unterstützung durch den umgebenden Hohlraum abhängig ist. Amidbindungen in der Nähe von Lysin und Arginin sind anfällig für Hydrolyse. Das molekulare Docking der Serinprotease zeigt, dass sie eine homotrimere Struktur besitzt.

**[0071]** Die Figuren und die vorangehende Beschreibung geben Beispiele für Ausführungsformen. Der Fachmann wird verstehen, dass eines oder mehrere der beschriebenen Elemente durchaus zu einem einzigen Funktionselement kombiniert werden können. Alternativ dazu können bestimmte Elemente in mehrere Funktionselemente aufgeteilt werden. Elemente aus einer Ausführungsform können einer anderen Ausführungsform hinzugefügt werden. Die Reihenfolge der hier beschriebenen Prozesse kann beispielsweise geändert werden und ist nicht auf die hier beschriebene Weise beschränkt. Außerdem müssen die Handlungen eines Flussdiagramms nicht in der dargestellten Reihenfolge ausgeführt werden; auch müssen nicht unbedingt alle Handlungen durchgeführt werden. Auch können die Handlungen, die nicht von anderen Handlungen abhängig sind, parallel zu den anderen Handlungen ausgeführt werden. Der Umfang der Ausführungsformen ist durch diese spezifischen Beispiele keineswegs begrenzt. Zahlreiche Variationen sind möglich, unabhängig davon, ob sie in der Beschreibung explizit aufgeführt sind oder nicht, wie z. B. Unterschiede in der Struktur, den Abmessungen und der Verwendung von Materialien. Der Umfang der Ausführungsformen ist mindestens so groß wie in den folgenden Ansprüchen angegeben.

**[0072]** Vorteile, andere Vorzüge und Problemlösungen wurden oben im Hinblick auf bestimmte Ausführungsformen beschrieben. Die Vorteile, Vorzüge, Problemlösungen und Komponenten, die dazu führen können, dass ein Vorteil, ein Nutzen oder eine Lösung auftritt oder ausgeprägter wird, sind jedoch nicht als kritisches, erforderliches oder wesentliches Merkmal oder Komponente eines oder aller Ansprüche zu verstehen.

#### Bezugszeichenliste

100	Ein System zur Durchführung der Biosynthese, Optimierung und Reinigung von alkalischer Serinprotease aus Shewanella-Algen
102	Eine Sammlungseinheit
104	Eine Isoliereinheit
106	Eine Identifikationseinheit
108	Eine Optimierungseinheit

#### Schutzansprüche

1. System zur Durchführung der Biosynthese, Optimierung und Reinigung von alkalischer Serinprotease aus Shewanella-Algen, wobei das System umfasst:  
 eine Sammelstelle und zum Sammeln von Algenproben von Sargassumyriocystum, die in wasserdichten sterilen Polyäthylenbeuteln gesammelt und auf Eis ins Labor gebracht werden;  
 eine Isoliereinheit zur Isolierung der Bakterien aus den gesammelten Proben, wobei die Oberfläche der ins Labor gebrachten Proben vorsichtig mit sterilem Meerwasser abgespült wird und die Bakterien isoliert werden, indem die Mikroorganismen mit einem sterilen Wattestäbchen von der Oberfläche der Thalli abgekratzt werden, woraufhin die isolierten Bakterien auf Zobell-Marine-Agar-Platten getupft und diese versiegelten Platten dann 24-48 Stunden bei 37°C bebrütet werden, bis viele Bakterienkolonien auftreten;  
 eine Identifizierungseinheit für die mikroskopische Identifizierung und biochemische Charakterisierung von Shewanella-Algen unter Verwendung von Bergeys Handbuch, wobei ein 16S rRNA-Bakteriengen-Sequenzierungsansatz zur Bestimmung des Stammes SNJASM8 verwendet wird und die gDNA von Shewanella-

la-Algen unter Verwendung der CTAB-Methode für eine 12-Stunden-Kulturbrühe und durch Durchführung einer PCR-Amplifikation unter Verwendung der Primer FC-519 (5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3') und RC-1492 (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') isoliert wird; und eine Optimierungseinheit zum Testen von Protease-Ausgangsparametern auf die Ausbeute von Protease, die aus Shewanella-Algen erhalten wird, wobei ein statistischer Box-Behnken-Entwurf zur Optimierung eines potenten Organismusprodukts verwendet wird und eine signifikante Auswirkung auf jeden der bestimmten Parameter auf die Ausbeute von Protease anzeigt, wobei eine multivariate Formel unter Verwendung von Response Surface Methodology (RSM) berechnet wird und wobei eine Reihe von 29 BBD-Versuchstests mit Mittelpunkt zur Bestimmung der Faktoren durchgeführt wird, die zur Maximierung der Protease-Ausbeute verwendet werden.

2. System nach Anspruch 1, wobei die isolierten Bakterienkolonien wiederholt aufgestreut werden, bis eine einzelne Kolonie auf der Zobell-Medium-Agarplatte (0.5 % (w/v) Pepton, 0.1 % (w/v) Hefeextrakt, 0.18 % (w/v)  $\text{CaCO}_3$ , 0.010 % (w/v)  $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.324 %  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0.055 %  $\text{KCl}_2$ , 0.016 %  $\text{NaHCO}_3$ , 0.008 %  $\text{KBr}$ , 0.88 %  $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.95 %  $\text{NaCl}$ , 1.5 % (w/v) Agar-Pulver und destilliertes Wasser, wobei nach dem Ausstreuen die gereinigten einzelnen Bakterienkolonien bei einer Temperatur von 4°C aufbewahrt werden, und ein Protease-Plattentest mit einem mit Casein 0.5 % (w/v) angereicherten Medium zum Screening einzelner Bakterienkolonien durchgeführt wird.

3. System nach Anspruch 1, wobei ein anfängliches Bakterienkultur-Inokulum mit einem Zobell-Meeressmedium zur Förderung des Bakterienwachstums aufrechterhalten wird, wobei das anfängliche Inokulum von 3 % in dem gesamten Satz von Bakterien aufrechterhalten wird, und wobei ein primäres Bakterien-Inokulum von 3 % von 30 ml in 1 L sterilisiertes Zobell-Meeressmedium bei einem pH-Wert von 8.0 beimpft wird und das beimpfte Medium für 5 Tage in einer sanften Rotation bei 120 U/min bei einer Temperatur von  $37 \pm 2$  °C wachsen gelassen wird.

4. System nach Anspruch 1, wobei die Gruppentests mit verschiedenen Quellen wie Gelatine, Rindfleischextrakt, pH-Wert und Temperatur auf verschiedene Variablen getestet werden und jede der Variablen auf Proteaseausbeute getestet wird.

5. System nach Anspruch 1, bei dem ein Protease-Enzymbestimmungstest durchgeführt und die Protease anschließend durch Ammoniumsulfatfällung gereinigt wird.

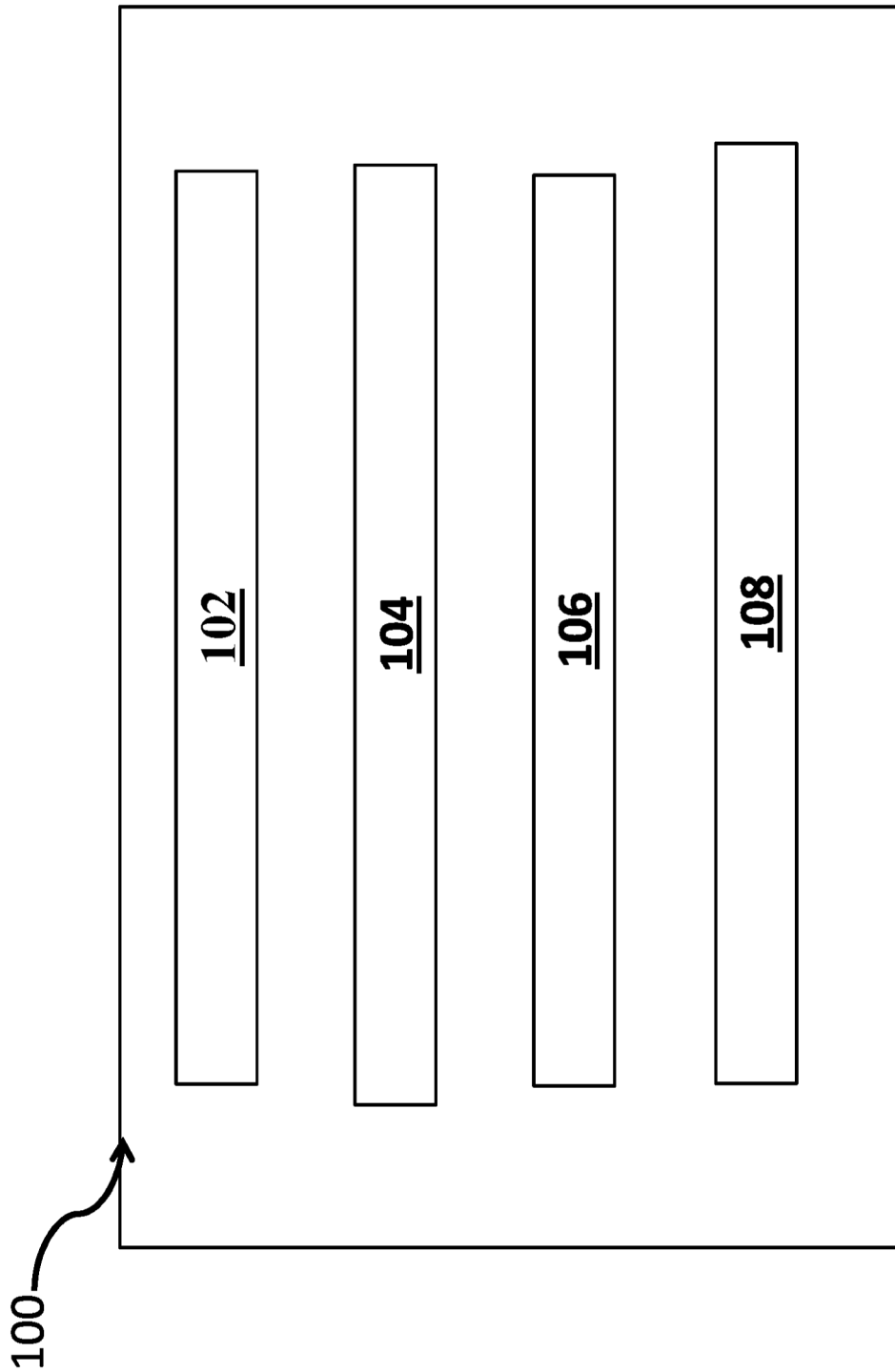
6. System nach Anspruch 1, bei dem verschiedene Auswertungen und Aktivitäten durchgeführt werden, wie z.B. Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Zymogramm-Aktivitätsanalyse, Aminosäuresequenzierung und Erstellung eines 3D-Modells der Serinprotease unter Verwendung bioinformatischer Werkzeuge, eine Auswertung des optimalen und stabilen pH-Werts und der thermischen Stabilität der gereinigten Shewanella-Algen-Protease sowie eine Auswertung der Protein- und kinetischen Parameter der Serinprotease.

7. System nach Anspruch 1, bei dem die Auswirkungen einer Kohlenstoffquelle, einer Stickstoffquelle, verschiedener Metallionen und eines Inhibitors sowie verschiedener Tenside und Lösungsmittel auf die gereinigte Shewanella-Algen-Protease bewertet werden.

8. System nach Anspruch 1, wobei das Silber aus Röntgenfilmen gewonnen wird, wobei eine Röntgenbeugungsanalyse an dem Röntgenfilmrest und ein Rasterelektronenmikroskop des proteasebehandelten Röntgenfilms durchgeführt wird.

Es folgen 4 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



**Figur 1**

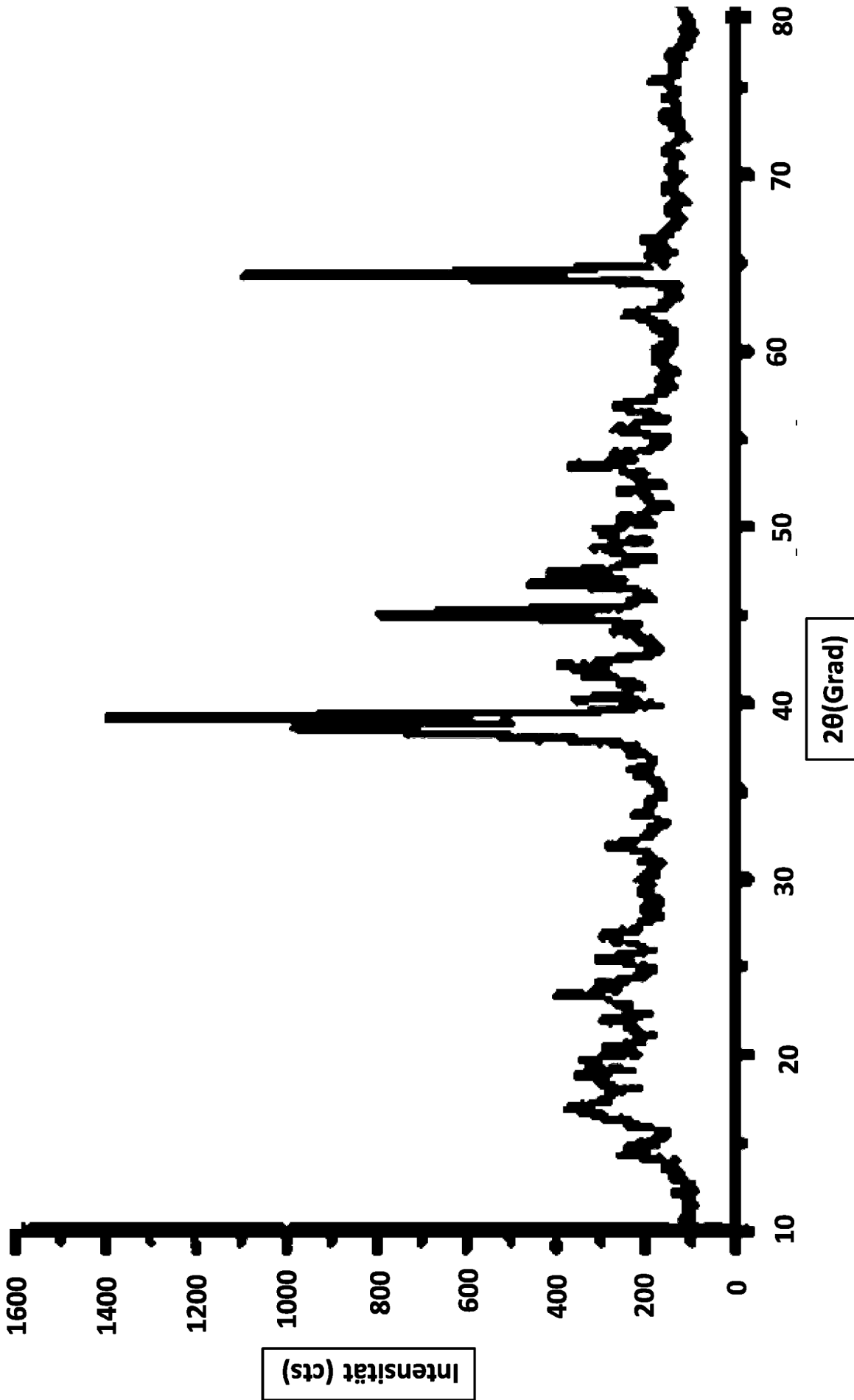
Namen der Organismen	Gram-Färbung	Motilität	M R	V P	Oxidase	Indol	Katalase	Zitrat	Hydrolyse von Gelatine
SNJASM1	Negativ	+	-	-	+	-	-	-	13mm
SNJASM2	Negativ	+	-	-	+	-	-	-	-
SNJASM3	Negativ	+	+	-	+	+	+	+	17mm
SNJASM4	Negativ	+	-	-	+	-	+	-	11mm
SNJASM5	Positiv	+	-	-	+	-	+	-	-
SNJASM6	Negativ	-	-	-	+	-	-	-	-
SNJASM7	Negativ	-	+	-	+	-	-	+	-
SNJASM8	Negativ	+	-	-	+	-	-	-	25mm
SNJASM9	Negativ	-	+	+	-	+	+	-	-

Figur 2

Quelle	Summe der Quadrate	df	Mittleres Quadrat	F-Wert	p-Wert
A- Gelatine	234.08	1	234.08	0.4685	0.5049
B-Beef ext	60.75	1	60.75	0.1216	0.7325
C-pH	1430.08	1	1430.08	2.86	0.1128
D-Temperatur	252.08	1	252.08	0.5045	0.4892
AB	484.00	1	484.00	0.9686	0.3417
AC	81.00	1	81.00	0.1621	0.6933
AD	0.2500	1	0.2500	0.0005	0.9825
BC	676.00	1	676.00	1.35	0.2642
BD	132.25	1	132.25	0.2647	0.6150
CD	90.25	1	90.25	0.1806	0.6773
A <sup>2</sup>	5747.38	1	5747.38	11.50	0.0044
B <sup>2</sup>	7505.73	1	7505.73	15.02	0.0017
C <sup>2</sup>	12710.52	1	12710.52	25.44	0.0002
D <sup>2</sup>	21272.25	1	21272.25	42.57	< 0.0001

**Figur 3**





**Figur 4**