Gefördert durch:

Bundesministerium
für Forschung, Technologie
und Raumfahrt

Zuwendungsempfänger: Deutsches Krebsforschungszentrum

Bioökonomie International 2021: ChitoCray
Marmorkrebse als Bioreaktoren für wertvolle Biopolymere

Verantwortlicher Autor: Prof. Dr. Frank Lyko

Förderkennzeichen: **031B1277A**

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung, Technologie und Raumfahrt unter dem Förderkennzeichen 031B1277A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Eingehende Darstellung

WP1: Projektmanagement

Ein Projektmanager (Dr. Vitor Coutinho Carneiro) wurde eingestellt und interne Kommunikationswege durch Kick-off Meetings bei den Projektpartnern etabliert (VNF: Dezember 2022, IGB: März 2023). Das erste Treffen der deutschen Projektteams fand im August 2023 in Heidelberg statt. Ein zweites Projektteam-Treffen fand im Juli 2024 in Stuttgart statt, mit Schwerpunkt auf der Finalisierung der Protokolle und der industriellen Skalierbarkeit der Prozesse. Die Zusammenarbeit zwischen den deutschen Projektteams verlief eng und produktiv. Regelmäßige Videokonferenzen sorgten für einen reibungslosen Austausch. Das vietnamesische Projektteam brachte sich über eine Teilnahme per Videokonferenz ein und lieferte wichtige Rückmeldungen zu Qualitätsanforderungen und Industriestandards.

Die Kommunikation mit VNF war insgesamt nicht unproblematisch. Nach einem Wechsel der Ansprechpartnerin auf vietnamesischer Seite zu Projektbeginn manifestierten sich merkliche sprachliche Hürden. Diese Probleme konnten durch einen Besuch des DKFZ-Teams bei VNF im Dezember 2022 nicht ausgeräumt werden. Auch wurde auf vietnamesischer Seite Enttäuschung über fehlende finanzielle Unterstützung geäußert und die deutschen Teams wurden zunehmend als mögliche Konkurrenten wahrgenommen. Die Kernverpflichtungen von VNF im Projekt wurden allerdings erfüllt.

Wissenschaftliche Ergebnisse

WP2 (Fütterungsversuche, Probensammlung, molekulare Analysen)

WP2.1: Fütterungsversuche und Probensammlung

Zu Beginn des Projekts erhielten wir von einem Kooperationspartner Hinweise für eine mögliche Biofloc-Aquakultur von Marmorkrebsen. Biofloc-Aquakultursysteme basieren auf einer Belüftung des Wassers, welche das Wachstum von Bakterien und Algen im Wasser anregt. Diese Kulturen entsorgen nicht nur die Ausscheidungen der Nutztiere, sondern dienen auch als nahrhaftes und gesundes Futter. Damit entsteht ein effizientes und nachhaltiges Kreislaufsystem. Um diese biologischen Dynamiken zu integrieren und die Nachhaltigkeit der Marmorkrebs-Aquakultur weiter zu optimieren, haben wir eine auf die Bedürfnisse von Marmorkrebsen angepasste Biofloc-Kultur etabliert.

Die Entwicklung des Bioflocs wurde durch das Einbringen von zehn adulten Krebsen in ein belüftetes Aquakultursystem eingeleitet. Nach fünf Wochen bestätigten erhöhte Trübung sowie mikroskopische Analysen die Bildung von Biofloc. Sobald eine Biofloc-Konzentration von etwa 30 mg/l an suspendierten Feststoffen (TSS) und 20 ml/l an sedimentierbaren Feststoffen (SS) erreicht war, wurden die adulten Tiere entfernt und die Wasserparameter stabilisiert. Anschließend charakterisierten wir die mikrobiellen Gemeinschaften in Biofloc-Systemen unter verschiedenen Umweltbedingungen. Proben wurden aus Innentanks (21 °C) und Außentanks (28 °C) entnommen, um temperaturbedingte Variabilität abzubilden. Die DNA wurde aus zentrifugierten Wasserproben extrahiert und einer 16S- sowie 18S-rRNA-Sequenzierung unterzogen.

Die Sequenzdaten wurden mit Kraken2 verarbeitet und in fünf Kategorien klassifiziert (Archaea, Bacteria, Eukaryota, Virus und Unklassifiziert). Unsere Datenanalyse (Abb. 1) zeigte, dass 99,9 % der klassifizierbaren Sequenzen bakteriellen und eukaryotischen Ursprungs waren. Gammaproteobacteria und Bacillariophyceae dominierten, wobei auch Cryptophyceae nachgewiesen wurden. Ein Vergleich der Biofloc-Systeme ergab eine höhere Häufigkeit von Mikroalgen und eine Abnahme bakterieller Gemeinschaften in Außentanks. Diese Ergebnisse

liefern die erste detaillierte Charakterisierung der mikrobiellen Biofloc-Gemeinschaften von Marmorkrebsen und verdeutlichen den Einfluss von Umweltfaktoren auf die Systemzusammensetzung.

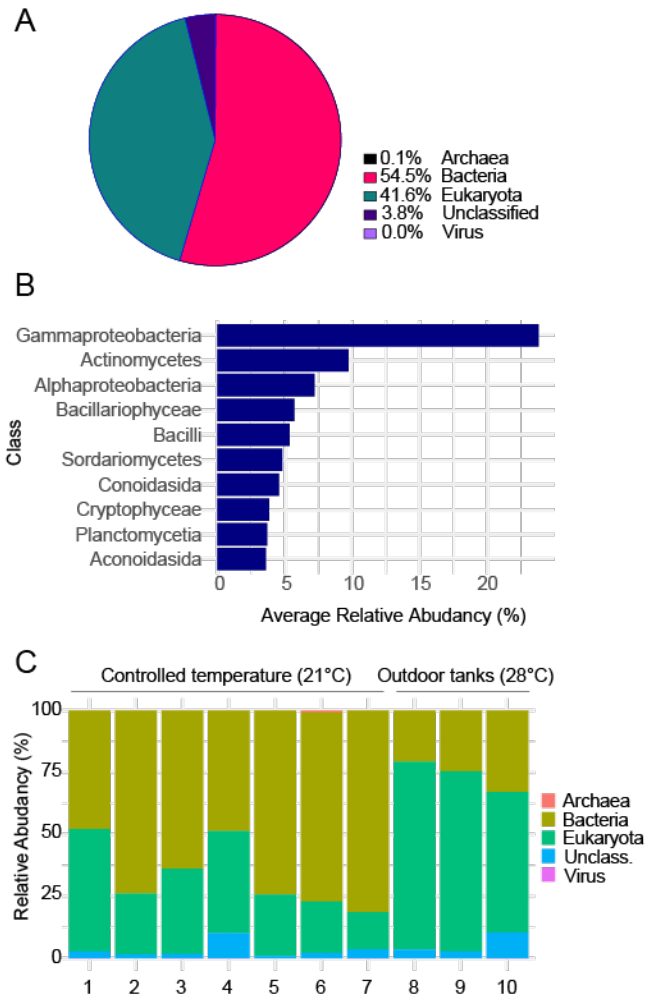

Abb. 1. Metagenomische Analyse der Biofloc-Gemeinschaften. (A) Kreisdiagramm zur durchschnittlichen taxonomischen Zusammensetzung der Biofloc-Proben aller Systeme, kategorisiert in fünf Hauptgruppen. (B) Balkendiagramm der zehn häufigsten taxonomischen Klassen. (C) Gestapeltes Balkendiagramm zum Vergleich der relativen Häufigkeiten der Hauptgruppen (Archaea, Bacteria, Eukaryota, Virus und Unklassifiziert) zwischen Proben aus temperaturkontrollierten Innentanks (21 °C) und Außentanks (28 °C).

Um das Potenzial des Biofloc-Systems für die Marmorkrebs-Produktion zu evaluieren, wurden das Wachstum und die Biomasseentwicklung juveniler Marmorkrebse analysiert (Abb. 2 A-C). Dabei wurde die Wasserqualität regelmäßig kontrolliert, um optimale Bedingungen sicherzustellen. Anschließend wurden 100 juvenile Krebse (Durchschnittsgewicht 0,5 g) in das System eingebracht und monatlich in drei unabhängigen Experimenten beobachtet, gemessen und gewogen. Über den Beobachtungszeitraum von drei Monaten verzeichneten die Tiere eine sechsfach erhöhte Gewichtszunahme sowie eine Verdreifachung der Gesamtbiomasse. Sie er-

reichten dabei eine durchschnittliche Länge von etwa 5 cm und ein Gewicht von etwa 4 g. Der Abdominalmuskel dieser Tiere war vergleichbar mit dem einer ausgewachsenen Nordseekrabbe und ist damit grundsätzlich für den Lebensmittelmarkt relevant.

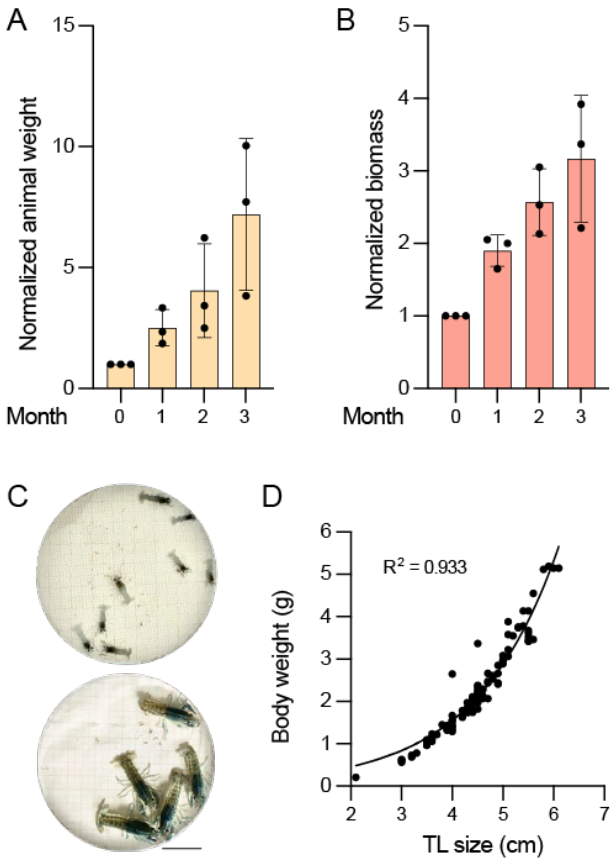

Abb. 2. Wachstum von Marmorkrebsen in Biofloc-Kultur. (A) Normalisiertes Durchschnittsgewicht der Marmorkrebse über den dreimonatigen Versuch. (B) Normalisierte Gesamtbiomasse der Marmorkrebse im Biofloc-System. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei unabhängigen Ansätzen. (C) Repräsentative Bilder juveniler Marmorkrebse zu Beginn des Versuchs (oben) und nach drei Monaten Wachstum in der Biofloc-Kultur (unten). Maßstab = 3 cm. (D) Korrelation zwischen Gesamtlänge (cm) und Körpergewicht (g) der Marmorkrebse.

Darüber hinaus wurde auch eine exponentielle Korrelation (Spearman ρ = 0,93) zwischen Gesamtlänge und Körpergewicht festgestellt (Abb. 2D). Dies ist ein Hinweis darauf, dass das Wachstum von Marmorkrebs-Kulturen auch mit automatisierten, videobasierten Systemen überwacht werden könnte.

Am Ende des Versuchs wurde eine Untersuchung der Fleischausbeute durchgeführt. Siebenunddreißig Tiere wurden in einem Lebensmitteltestlabor hinsichtlich ihres Proteingehalts (DIN 300 EN ISO 937:1978) und Fettgehalts (DIN EN ISO 1444:1996) analysiert. Die Fleischaus-

beute betrug im Durchschnitt 18 % des Gesamtgewichts und war weitgehend unabhängig von der Körpergröße (Abb. 3A, B). Die Nährwertanalyse zeigte ein hohes Protein-zu-Fett-Verhältnis, vergleichbar oder sogar überlegen im Vergleich zu Garnelen. Insbesondere zeigten die Proben aus dem Biofloc System nur sehr geringe Fettanteile (Abb. 3C, D). Die visuelle und haptische Qualität des Fleisches ähnelte ebenfalls stark der von Garnelen (Abb. 3E), was auf ein vielversprechendes Marktpotenzial hinweist.

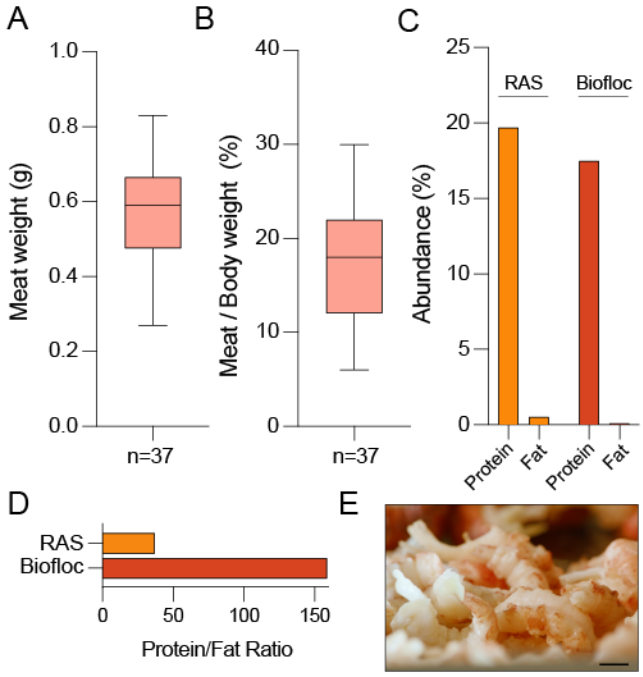

Abb. 3. Analyse des in Biofloc-Systemen produzierten Marmorkrebsfleisches. (A) Boxplot der individuellen Bauchmuskelgewichte von in Biofloc aufgezogenen Marmorkrebsen (n=37). (B) Boxplot der Fleischausbeuten (Prozent des Körpergewichts) der Marmorkrebse aus der Biofloc-Kultur. (C) Vergleich des Protein- und Fettgehalts (%) im Fleisch aus Biofloc- und RAS-Systemen. (D) Protein-zu-Fett-Verhältnis des Marmorkrebsfleisches aus Biofloc- und RAS-Systemen. (E) Fleisch von in Biofloc aufgezogenen Marmorkrebsen. Maßstab: 1 cm.

WP2.2: Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung erfolgte in Einklang mit institutionellen Genehmigungen und über etablierte Arbeitsabläufe. Gewebe für RNA-, DNA- und Schalenanalysen wurden auf Eis manuell präpariert und mit Standardprotokollen verarbeitet.

WP2.3: Metabolom-Analyse

Wir führten eine gezielte metabolomische Analyse des Kutikula-Gewebes von Marmorkrebsen durch, die im Kreislauf-Aquakultursystem (RAS) oder im Biofloc-System aufgezogen wurden. Die Untersuchung konzentrierte sich auf wichtige Zwischenprodukte des Chitin-Biosynthesewegs: Glucosamin, N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc). Die Kutikula wurde nach qPCR-Untersuchungen als Zielgewebe für diese Analyse ausgewählt, da diese eine hohe Expression von Genen für die Chitinsynthese und den Chitinabbau zeigte (siehe Abb. 6 unten). Die Aufarbeitung dieses Gewebes stellte angesichts der starren, stark mineralisierten Beschaffenheit des Exoskeletts der Flusskrebse eine besondere technische Herausforderung dar. Die Etablierung einer neuartigen, spezialisierten Extraktions- und Analysemethode erfolgte in enger Zusammenarbeit mit der Metabolomics Core Facility der Universität Heidelberg. Aufgrund der für diese komplexe Matrix erforderlichen Optimierung, wurde hier eine geringere Gesamtzahl an nachgelagerten Metaboliten nachgewiesen als bei weicheren, standardmäßigen Gewebetypen, was die hohe Spezifität des neu entwickelten Protokolls widerspiegelt.

Die Analyse basierte auf einer Gesamtprobengröße von n=22 biologischen Replikaten, bestehend aus 12 Proben für die RAS-Gruppe und 10 Proben für die Biofloc-Gruppe. Das Kutikula-Gewebe wurde sorgfältig aus dem Thoraxbereich präpariert, wobei die durchschnittliche Extraktionsmasse über alle Gruppen hinweg bei etwa 25 mg pro Probe lag. Unmittelbar nach der Präparation wurden die Gewebe mit sterilem PBS (1X) gespült, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und vor der Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden die Proben homogenisiert und mit einem Extraktionsvolumen von 1000 µl aufbereitet sowie mittels Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) analysiert.

Die Endkonzentrationen der Zielmetaboliten zeigten über die Gruppen hinweg unterschiedliche Profile, gemessen in Femtomol pro Milligramm (fmol/mg) Kutikula-Gewebe (Abb. 4A):

1. Glucosamin: Wies die niedrigste Konzentration der drei Zielsubstanzen auf, wobei die Werte der einzelnen Proben zwischen 44,11 fmol/mg und 406,53 fmol/mg lagen. Die durchschnittlichen Konzentrationen schienen im Biofloc im Vergleich zu RAS niedriger zu sein, wobei der Unterschied fast statistische Signifikanz erreichte (p-Wert = 0,06).
2. N-Acetylglucosamin: Wies mittlere Konzentrationswerte auf und zeigte innerhalb der RAS-Gruppe eine größere biologische Varianz, die von 651,09 fmol/mg bis zu 69.548,23 fmol/mg reichte. Der Unterschied zwischen Biofloc- und RAS-Gruppen war statistisch nicht signifikant (p = 0,42).

3. UDP-GlcNAc: Wurde als der um mehrere Größenordnungen häufigste Metabolit in allen Proben identifiziert. Die Konzentrationen erreichten einen Spitzenwert von 1.708.603,64 fmol/mg, was seine Rolle als primäres aktiviertes Donorsubstrat für die Chitinsynthase untermauerte. Der Unterschied zwischen Biofloc- und RAS-Gruppen war statistisch nicht signifikant (p = 0,42).

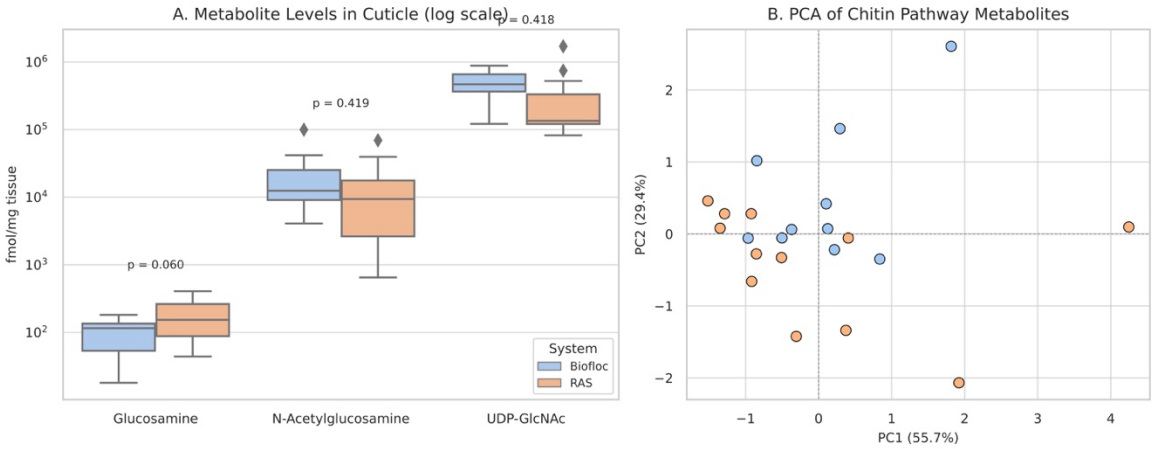

Abb. 4. Metabolom-Analyse von Marmorkrebsen aus Biofloc- und RAS-Systemen. (A, links) Boxplot der individuellen Metabolit-Konzentrationen in der Kutikula von Tieren, die in einem Biofloc-System (hellblau) oder einem RAS-System (hellrot) aufgezogen wurden. (B, rechts) Hauptkomponentenanalyse (PCA) basierend auf den Konzentrationen von 3 Metaboliten. Biofloc-Proben und RAS-Proben bilden teilweise getrennte Cluster, was auf unterschiedliche metabolische Muster in den beiden Kultursystemen hinweist.

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Metaboliten des Chitin-Stoffwechselwegs (Abb. 4B) zeigte, dass PC1 55,7 % der Gesamtvarianz ausmachte, während PC2 29,4 % ausmachte. Die Kennzeichnung der Gruppen in den Plots zeigte eine ansatzweise Clusterbildung bei der Mehrheit der Proben, wobei einzelne Ausreißer aufgrund ihrer erhöhten N-Acetylglucosamin- und UDP-GlcNAc-Profile entlang der Hauptachsen verschoben sind. Bestimmte Werte mit geringer Konzentration lagen nahe oder unterhalb der formalen Quantifizierungsgrenzen, was einen weiteren Unsicherheitsfaktor in der Analyse darstellt.

WP2.4: Epigenomische Analysen

Der Einfluss der Biofloc-Umgebung auf das Epigenom von Marmorkrebsen wurde durch DNA-Methylierungsprofilierung untersucht. Dazu wurde Abdominalmuskelgewebe von Tieren gesammelt, die unter Biofloc- (N=7) und RAS-Bedingungen (N=6) aufgezogen worden waren. Mit Hilfe der Illumina Infinium Methylierungsplattform wurden 6.127 CpG-Stellen aus dem Marmorkrebs-Genom gezielt analysiert.

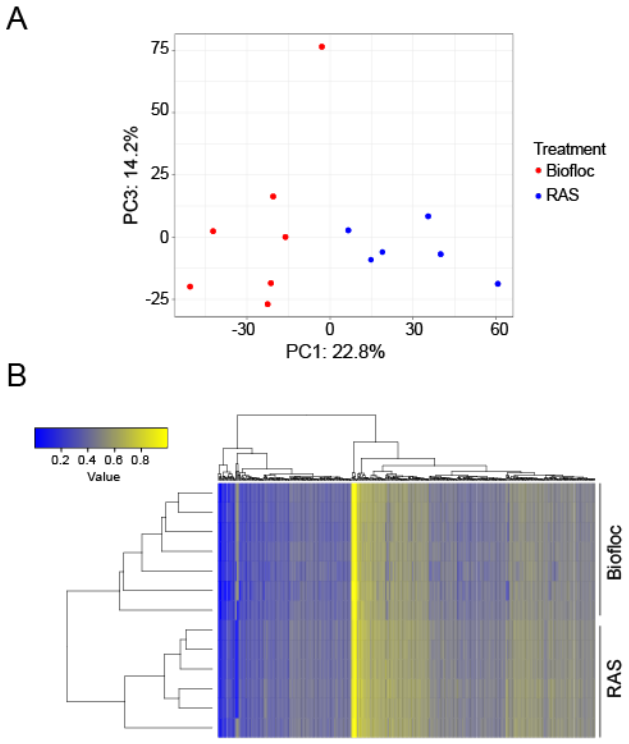

Abb. 5. DNA-Methylierungsanalyse von Marmorkrebsen aus Biofloc- und RAS-Systemen. (A) Hauptkomponentenanalyse (PCA) basierend auf den Methylierungsgraden von 4.474 CpG-Stellen. Biofloc-Proben (rot) und RAS-Proben (blau) bilden klar getrennte Cluster, was auf unterschiedliche Methylierungsmuster der beiden Kultursysteme hinweist. (B) Hierarchisches Clustering der Methylierungsgrade der 500 am stärksten differentiell methylierten CpG-Stellen. Biofloc- und RAS-Proben zeigen auch hier eine eindeutige Gruppierung. Farben repräsentieren normalisierte Methylierungsgrade, wobei Gelb hohe und Blau niedrige Methylierungsgrade anzeigt.

Die Datenverarbeitung erfolgte mithilfe der SeSAMe-Pipeline. Nach Qualitätsfilterung verblieb ein Satz von 4.797 CpG-Stellen, der in allen 13 Proben ein Signal lieferten. Eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) und hierarchisches Clustering zeigten deutliche Unterschiede in den Methylierungsmustern zwischen Biofloc- und RAS-Proben (Abb. 5). Die 500 am stärksten differentiell methylierten CpGs ermöglichten eine klare Zuordnung der Proben. Diese Ergebnisse un-

terstreichen die umweltbedingte epigenetische Reaktion und das Potenzial der DNA-Methylierungsanalyse als Monitoring-Instrument in der Aquakultur.

WP3.1 bis WP3.5: Entwicklung und Optimierung der Chitin- und Chitosanextraktion

Das IGB-Team optimierte chemische Extraktionsprotokolle für Marmorkrebs-Schalen, indem Säurekonzentrationen, Behandlungsdauern und Temperaturen variiert wurden, um eine effiziente Entfernung von Proteinen und Mineralstoffen sicherzustellen. Die Protokolle wurden an Unterschiede im Ursprung des Schalenmaterials angepasst. Der Chitingehalt wurde durch Messung der sauren Detergenzfaser (ADF) und des sauren Detergenzlignin (ADL) gemäß DIN ISO 13906:2008 quantifiziert. Der Unterschied zwischen ADF- und ADL-Werten entsprach dem Chitingehalt.

Um die Auswirkungen der Biofloc-Kultur auf den Chitinmetabolismus (Abb. 6A) zu bewerten, wurde RNA aus Cuticula-, Kiemen- und Muskelgewebe isoliert und mittels qPCR analysiert. Tiere, die unter Biofloc-Bedingungen aufgezogen wurden, zeigten eine moderate, aber konsistente Herunterregulation (Abb. 6B) von Genen der Chitinbiosynthese und -abbauwege (z.B. Chitinase, N-Acetylglucosaminidase). Trotz dieser Veränderungen in der Genexpression zeigte die Faseranalyse nur einen moderaten Rückgang des Chitingehalts in Schalen von Biofloc-Tieren im Vergleich zu RAS-Kontrollen (Abb. 6C).

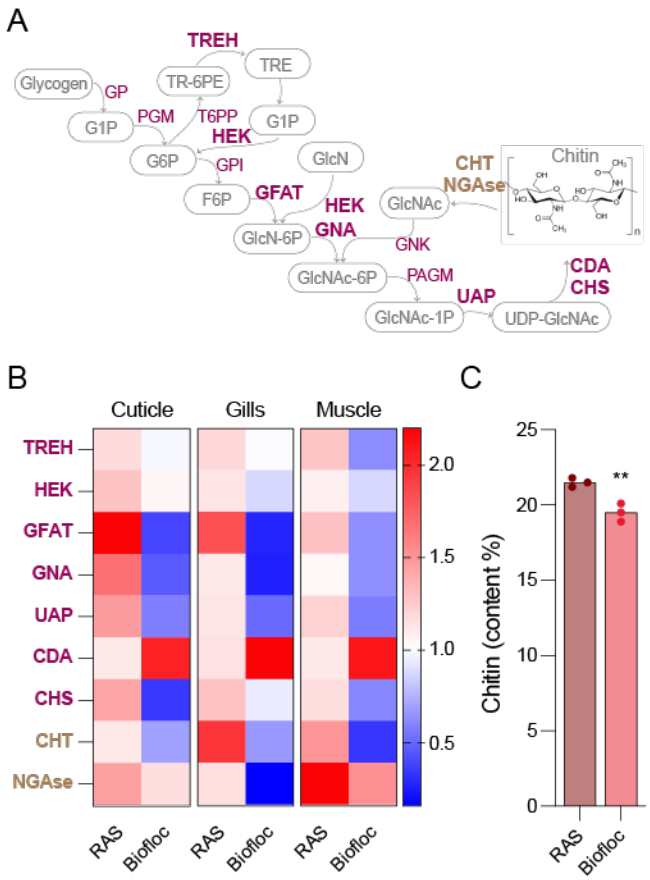

Abb. 6. Analyse der Chitinbiosynthese bei Marmorkrebsen. (A) Schematische Darstellung des Chitinmetabolismus mit den an der Synthese (purpur) und am Abbau (braun) beteiligten Genen. Die in Panel B analysierten Gene sind fett hervorgehoben. Zu den Biosynthesegenen gehören TREH (Trehalase), GP (Glykogen-Phosphorylase), PGM (Phosphoglucomutase), T6PP (Trehalose-6-Phosphat-Phosphatase), HEK (Hexokinase), GPI (Glucose-6-Phosphat-Isomerase), GFAT (Glutamin-Fructose-6-Phosphat-Amidotransferase), GNA (Glucosamin-6-Phosphat-N-Acetyltransferase), GNK (Glucosamin-Kinase), PAGM (Phosphoacetyl-glucosamin-Mutase), UAP (UDP-N-Acetylglucosamin-Pyrophosphorylase) und CHS (Chitin-Synthase). Abbau-Gene umfassen CHT (Chitinase) und NGase (N-Acetylglucosaminidase). (B) Heatmap zum Vergleich der relativen mRNA-Expressionsniveaus ausgewählter Chitinbiosynthesegene in Biofloc- und RAS-Kulturen (n = 4 pro Gruppe) in drei verschiedenen Geweben. Expressionswerte wurden auf TBP (TATA-binding Protein) normalisiert; Blau zeigt Herunterregulation, Rot zeigt Hochregulation an. (C) Chitingehalt (% des Trockengewichts der Schale) bei Marmorkrebsen aus Biofloc- und RAS-Kulturen. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt; Sternchen kennzeichnen statistische Signifikanz (**p < 0,01, ungepaarter t-Test).

Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Aufwendungen für Personal sind die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises. Die Kapazitäten wurden vorwiegend für die nachfolgenden Arbeiten aufgewendet:

- Projektkoordination: Abstimmung der Projektteams nach innen und nach außen, Recherche und Beauftragung externer Analysen, Anfertigung von Berichten.
- Tierpflege, Durchführung der Fütterungsstudien, Präparation von Schalen und Gewebe.
- Wissenschaftliche Arbeiten: Datenanalyse, Aufarbeitung der Resultate, Visualisierung für Präsentationen.

Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Alle Arbeitspakete wurden wie geplant abgeschlossen und begründen einen erheblichen wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn, wie durch die wissenschaftliche Publikation (s. u.) dokumentiert.

Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses – auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft - im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Wir planen, mit unserem Partner Merall Bioproducts die Forschung an Marmorkrebsen als besonders nachhaltige Produktionsorganismen für Nahrungsproteine und Biopolymere weiter voranzutreiben und prüfen aktuell Möglichkeiten zur kommerziellen Verwertung von Marmorkrebsfleisch und -chitin.

Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordenen Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Nicht bekannt/nicht zutreffend.

Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NKBF/NABF

Carneiro, V.C., Schäfer, I. Diaz-Larrosa, J.J., Böhl, E., Hahn, T., Hempelmann, J., Venkatesh, G., Nagarajan, S., Roy, S., Ng, Y.L., Böhl, B., Zibek, S., and Lyko, F. (2025). Establishment and characterization of biofloc culture for marbled crayfish. Front. Aquac. 4: 1580560. doi: 10.3389/faquc.2025.1580560