

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

Schlussbericht

23.03.2023

ZE: Koordinator: Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik Department BioCat Schulgasse 11 94315 Straubing <i>Technische Universität München TUM School of Natural Sciences Werner Siemens-Lehrstuhl für Synthetische Biotechnologie Lichtenbergstraße 4 85748 Garching</i> Kanadische Partner: University of Prince Edward Island Atlantic Veterinary College 550 University Avenue Charlottetown, PEI, C1A 4P3 University of Prince Edward Island Atlantic Biofabrication Laboratory 550 University Avenue Charlottetown, PEI, C1A 4P3 Ausgeschieden: CigalaTech Ltd. 141 Kent Street Charlottetown, PEI, C1A 1N3	FKZ: 031B0838B
Vorhabenbezeichnung: Holistic chitin conversion to materials for 3D printing application and performance animal feed additives (ChitoMat)	
Laufzeit des Vorhabens: 01.07.2019 bis 30.06.2022, verlängert bis 30.09.2022	
Berichtszeitraum: 01.07.2019 bis 30.09.2022	

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem genannten Förderkennzeichen gefördert.

Unterschrift des Projektleiters des Zuwendungsempfängers Technische Universität München

Garching, 21.03.2023

Prof. Dr. Thomas Brück

Inhaltsverzeichnis

1.	Kurzbericht.....	4
1.1	Aufgabenstellung	4
1.2	Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde.....	4
1.3	Planung und Ablauf des Vorhabens	4
1.4	Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn des Projektes.....	5
1.5	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	6
2.	Eingehende Darstellung.....	8
2.1	Darstellung der Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse im Einzelnen ..	8
2.2	Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	8
2.3	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	9
2.4	Verwertungsplan.....	9
2.5	Während der Projektlaufzeit bekannt gewordener Fortschritt Dritter	10
2.6	Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse	10
3.	Literatur	11

1. Kurzbericht

1.1 Aufgabenstellung

Mit dem Ziel einer vertieften Vernetzung zwischen kanadischen und deutschen Partnern hat sich das Projekt ChitoMat der Aufgabe gewidmet basierend auf Chitin extrahiert aus Fischereiabfällen (aus dem kanadischen Raum) eine Wertschöpfungskette hin zu 3D-Druck-Anwendungen im Medizinbereich und Antibiotikaersatz in der Tiermast zu entwickeln.

Im Konkreten können unter dieser Prämisse vier Hauptziele formuliert werden:

- Thermoplast-Herstellung aus Chitin (IGB)
 - Suche nach Katalysatoren, Reaktionen und Seitengruppen zur Umwandlung von Chitin in einen Thermoplast
 - Reaktionshochskalierung und Herstellung von Mengen im Grammbereich für Anwendungstests
- Chitooligosaccharid-Produktion (TUM)
 - Suche nach einem nachhaltigen Chitooligosaccharid (COS) Herstellungsverfahren
 - Evaluation von COS als Leistungsfutterzusatz, um die Gabe von Antibiotika auf nahezu null zu reduzieren (UPEI, AVC)
- Chitinmischungen/-Komposite für den 3D-Druck (UPEI, ABL)
 - Entwicklung von chitinbasierten Mischungen für den 3D-Druck
 - Entwicklung sogenannter „Bioinks“ zum Druck in Zellkulturen
- Entwicklung einer strategischen Partnerschaft zwischen den beteiligten Projektteilnehmern IGB, UPEI und TUM

1.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

TUM:

Der Werner Siemens-Lehrstuhl für Synthetische Biotechnologie (WSSB) des Partners TUM konnte während des Projektes auf die eigene Ausstattung an HPLC- und hochmodernen LC/MS-Systemen zurückgreifen, um Chitooligosaccharide (COS) und an der Hydrolyse beteiligte Enzyme zu analysieren.

Der Projektleiter auf Seiten des TUM-WSSB, Prof. Brück, kannte Projektverantwortliche/-Mitarbeiter auf deutscher (Dr. Richter, Dr. Hofer und Dr. Strittmatter) und kanadischer (Dr. Reisse) bereits aus Zusammenarbeiten in anderen Projekten bzw. als Promotionsstudent an seinem Lehrstuhl. Zudem gab es auch schon in der Vergangenheit im Rahmen des Förderprogramms Bioökonomie International des BMBF mit der kanadischen University of Prince Edward Island (UPEI) Kooperationsprojekte, welche u.a. aufgrund Prof. Brücks Zeiten als Assistenzprofessor an der Florida Atlantic University zustande kamen. Aus diesen Kooperationsprojekten entwickelte sich auch eine bilaterale Übereinkunft zwischen der UPEI und der TUM zur Zusammenarbeit und dem verstärkten Austausch von Studenten.

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

TUM:

Planung:

- Identifizierung von chitinolytischer Aktivität in Umweltproben verschiedener Naturräume
- Sequenzierung des Genoms isolierter Stämme (falls noch nicht in der Literatur vorhanden), um Aufschluss über potentielle katalytische Proteine und deren mögliche rekombinante Expression zu erhalten
- Gleichzeitig sollen sekretierte Chitinase-haltige Kulturüberstände proteomisch untersucht, aufkonzentriert und chromatographisch für biochemische Charakterisierung fraktioniert werden
- Vergleich von COS aus zeitlich aufgelösten Hydrolyseexperimenten mit einem COS-Standard
- Präparative Produktion von COS mit gewünschter Wiederholungsanzahl zur Weitergabe an Partner

Ablauf:

- Screening auf Chitin-abbauende Proteine in AP 2.1:
 - Bodenproben mit kolloidalem Chitin versetzt, um Anreicherung geeigneter Organismen zu erzielen (Jacquiod et al. 2013)
 - Bakterienstämme *Streptomyces griseus*, *Paenibacillus chitinolyticus*, *Paenibacillus elgii* und *Bacillus licheniformis* als Positivkontrollen aus der deutschen Stammsammlung (DSMZ) erworben
 - Zwei aussichtsreiche Bakterienstämme mit hohen Aktivitäten auf kolloidalen Chitin-Agarplatten und -Flüssigmedium isoliert & mittels 16S rRNA-Analyse identifiziert
 - In den Kulturüberstand sekretierte, lösliche Chitinasen aufkonzentriert und als Rohenzym-Mischung charakterisiert
- Zeitabhängige Hydrolyseexperimente mit Chitinsubstrat und Rohextrakten
 - Analyse des Polymerisationsgrades mit Dünnschichtchromatographie und mittels HPLC über eine NH₂-Säule
 - Hauptbestandteil: Chitobiose; nach einigen Stunden Auftreten von Tetra- bzw. Pentameren; nach 24h durch enthaltene Exochitinasen vorwiegend Monomere
- Aufreinigung von Endochitinasen, um Muster besser zu steuern
 - Ansatz 1: Fraktionierte Fällung der nativen Enzymmischung
 - Zeitabhängige Chitinhydrolyse-Versuche zeigten zwar Tendenzen zu langkettigeren COS (IT-TOF MS-Analysen), aber Chitobiose weiterhin Hauptbestandteil
 - Ansatz 2: De-novo-Sequenzierung und Annotation der bakteriellen Genome zur Identifikation von Chitinasen, die rekombinant exprimiert werden sollen
 - Genom mit PacBio-System erhalten; Proteomanalyse der sekretierten Enzyme
 - Identifizierung von potentiell Chitin-abbauenden Proteinen
 - Bis Ende der Projektlaufzeit konnte keine rekombinante Expression aktiver Proteine erreicht werden
- Transkriptomanalyse zur Ergänzung der systembiologischen Daten
 - Kultivierung sowohl in Chitin- als auch Glukose-haltigem Medium
 - Analyse der hierbei hoch- bzw. herunterregulierten Bildung von RNA-Sequenzen
 - Vergleich der Veränderungen der Proteinexpression bei Metabolisierung von Chitin als Kohlenstoffquelle an Stelle von Glukose in einem Volcano-Plot

1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn des Projektes

Der Klimawandel und die zunehmende Umweltverschmutzung, nicht zuletzt der Ozeane, erfordern innovative Lösungsansätze um fossile Brennstoffe zu ersetzen. Daher steigt der Bedarf von nachhaltigen, biobasierten Polymeren in der Chemieindustrie stetig an.

Ein interessantes Rohmaterial hierfür stellt Chitin dar, Grundbestandteil von Insekten- und Schalentierpanzern, als auch Pilzzellwänden. Als zweithäufigstes Biopolymer weltweit, hinter Cellulose, werden schätzungsweise pro Jahr 10^{10} - 10^{11} Tonnen global produziert (Park and Kim 2010), wobei 10^6 Tonnen alleine von der Fischerei-Industrie stammen (Tharanathan and Kittur 2003). Dabei produzierte nur der kanadische Fischereisektor schätzungsweise 250.000 t Schalenabfälle im Jahr 2019, was einer potentiellen Menge von 75.000 - 150.000 t Chitin entspricht (Department of Fishery; Kobelke 1990; Yen et al. 2009; Saima et al. 2013). Wenn dieser Bioabfallstrom vorschriftsgemäß entsorgt wird, kostet das ca. 7500\$/t, jedoch wird er häufig verbrannt, verrotten gelassen oder wieder ins Meer geschüttet, was empfindliche Küsten-Ökosysteme aus dem Gleichgewicht bringen kann (Healy et al. 2003; Xu et al. 2013). Das entspricht also weder einer ökonomischen noch nachhaltigen Strategie.

Industriell wird Chitin primär durch chemische Demineralisierung und Deproteinierung der Schalenabfälle anhand eines zwei-Schritt-Verfahrens bestehend aus Salzsäure (HCl) und Natronlauge (NaOH) Behandlung gewonnen (Younes and Rinaudo 2015). Der Hauptvorteil ist vor allem die Simplizität und Geschwindigkeit des Prozesses, Nachteile inkludieren einen hohen Energiebedarf des Prozesses, große Abwassermengen, welche mit anorganischen Salzen und organischem Material kontaminiert sind, als auch ungerichtete Depolymerisierung und Deacetylierung des entstehenden Chitins (Kaczmarek et al. 2019). Dadurch entsteht ein komplexes Produktgemisch, welches schwierig zu fraktionieren ist. Aufgrund der aggressiven Chemikalien kann es ebenfalls

zu einer Racemisierung von L- zu D-Aminosäuren des proteinogenen Reststoffstroms kommen, wodurch letztere unbrauchbar als Futtermittelzusatz und somit für die Verfolgung eines zero Waste-Ansatzes werden.

Biotechnologische Ansätze beinhalten Fermentation der Schalenreste mit Milchsäurebakterien, welche das organische Restmaterial als Nährstoffgrundlage verwerten können und durch die natürliche Ansäuerung eine Hydrolyse der anorganischen Salze bewirken (Castro et al. 2018). Einen ähnlichen Weg geht auch der Projektpartner BBSI/CigalaTech, um nachhaltig gewonnenes Chitin für die beteiligten Kooperationspartner bereit zu stellen.

Interessante Anwendungsbereiche wurden primär für die funktionalisierte Form von Chitin, dem deacetylierten Chitosan, erschlossen. Die Ausprägung der Polymereigenschaften sind dabei abhängig von der molekularen Masse, der Kettenlänge und dem Deacetylierungsgrad und -Muster, umfassen jedoch antitumorale, entzündungshemmende als auch antimikrobielle Wirkung (Jeon et al. 2000; Huang et al. 2006).

In der Praxis wird Chitosan hauptsächlich zur Wasserklärung (z.B. Papier-, Textilindustrie) oder als Antioxidant mit antimikrobieller Wirkung in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie eingesetzt. Erfolgreiche Forschungsprojekte demonstrierten zusätzlichen Nutzen als Vehikel in der Gentherapie, als Wundheilungswirkstoff, Biofungizid oder Immunstimulant in der Tumorthherapie (Köping-Höggård et al. 2003; You et al. 2004; Eweis et al. 2006; Rinaudo 2006; Goy et al. 2009; Li et al. 2013; Casadidio et al. 2019).

Auch die Chitooligosaccharidproduktion, sprich die Depolymerisation oder Hydrolyse von Chitin bzw. Chitosan wird chemisch durch konzentrierte Säuren, z.B. 12 M HCl, oder oxidative Stoffe wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) erreicht (Trombetta 2008, Xia 2013). Der Einfachheit und Effizienz geschuldet, sind sie die Methoden der Wahl, mit relativ engen Polymerisierungsspektren (2-12) der Produkte. Jedoch schwanken die Acetylierungsgrade stark, wodurch sich das komplexe Produktgemisch, das potentiell verschiedene Eigenschaften aufweist, schwer voneinander trennen lässt.

All dies macht klar, dass biotechnologische, sprich enzymatische, Ansätze notwendig sind, um zielgerichteter COS-Produkte auf nachhaltigere Weise herstellen zu können. Enzyme haben den Vorteil, dass sie in der Regel hoch Substrat- und Reaktionsspezifisch agieren, wodurch ungewollte Nebenprodukte weitestgehend vermieden werden können. Bei Chitin handelt es sich um Enzyme der Glycosidhydrolasen Familien 18, 19 und 23 (Henrissat et al.), wobei aber auch lytische Polysaccharid- Monooxygenasen aus der Helferenzymfamilie 10 (AA10, CAZy) besonders hervorzuheben sind. Von letzteren ist bekannt, dass sie auch unbehandeltes Chitin-haltiges Material mittels Oxidation hydrolysieren können, während erstere mindestens eine mechanische Zerkleinerung zur Oberflächenvergrößerung voraussetzen. Man unterscheidet weiterhin zwischen Exo- und Endochitinasen, welche prozessiv von einer Seite Mono- oder Dimere bzw. durch zufälliges Schneiden innerhalb der Polymerkette Oligomere verschiedener Länge erzeugen (Jung et al. 2014). Somit bieten Exochitinasen für viele industrielle Anwendungen ein zu kurzes Produktspektrum, während Endochitinasen primär zeitlich, durch rechtzeitigen Abbruch der Reaktion, steuerbar sind und eine statistische Mischung von COS liefern (Kaczmarek et al. 2019). Dies stellt den Ansatzpunkt von ChitoMat auf Seiten des Partners TUM dar, nach neuartigen, effizienten chitinolytischen Enzymen zu suchen, mit denen vom Polymerisationsgrad eng eingeschränkte COS produziert werden sollen.

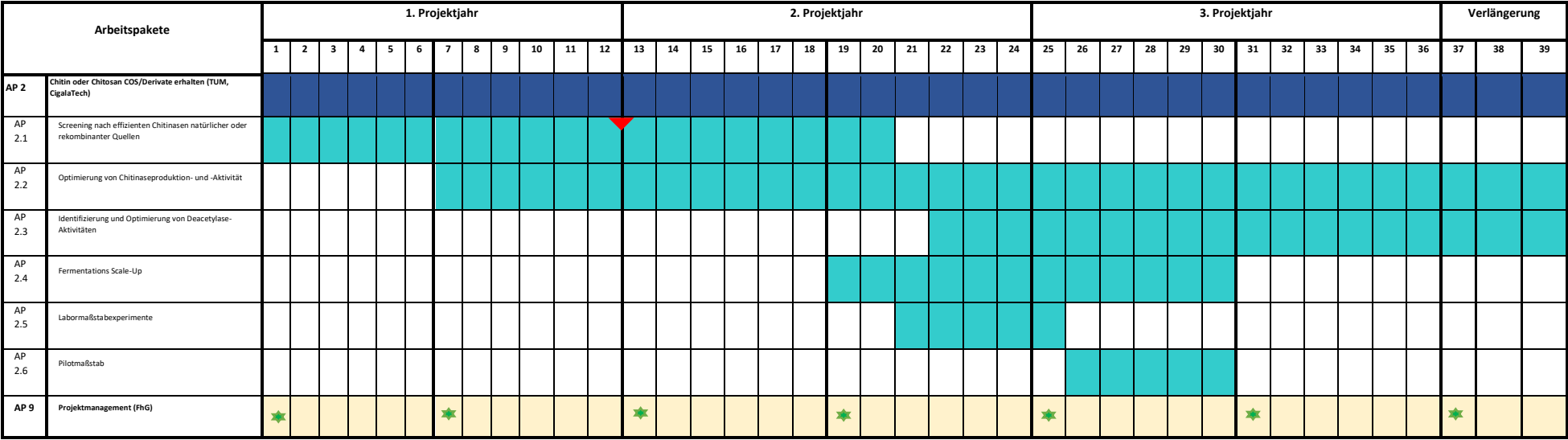
1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

TUM:

Der Partner TUM erhielt von BBSI/CigalaTech zu Projektbeginn ausreichende Mengen an groben Chitinflocken, welche aus Krabbenschalen kanadischen Ursprungs chemisch gewonnen wurden. Außerdem fand ein enger Wissensaustausch mit FhG statt, welche etablierte MALDI-TOF MS- und Dünnschichtchromatographie-Methoden zur COS-Analytik bereitstellten.

Die angestrebte weitere Zusammenarbeit mit dem kanadischen Partner BBSI/CigalaTech konnte aufgrund der Insolvenz des Partners nicht realisiert werden. Mit den weiteren Partnern, den Forschungseinrichtungen der UPEI, konnte zwar im Rahmen der virtuellen Projekttreffen ein reger Diskurs geführt werden, jedoch erlaubten die selbst in der Endphase von ChitoMat durch TUM nur herstellbaren geringen COS-Mengen, die in der Regel keinen hohen Polymerisationsgrad aufwiesen, keine anwendungsorientierten Experimente der kanadischen Partner.

GANTT Schaubild. (Dargestellt sind die APs mit unmittelbarer und mittelbarer Beteiligung von TUM-WSSB.)



★ Meetings

▼ Meilensteine

2. Eingehende Darstellung

2.1 Darstellung der Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse im Einzelnen

Arbeitspaket	Ziele	Ergebnis
AP 2.1	Screening nach effizienten natürlichen oder rekombinanten Chitinasesystemen	Effiziente Chitinasesysteme in Form der Bakterien <i>Chitinolyticbacter meiyuanensis</i> , <i>Jeongeupia naejangsanensis</i> & <i>Jeongeupia sp.</i> konnten aus mit Chitin angereicherten Bodenproben isoliert und identifiziert werden (Meilenstein nach 12 Monaten). Da <i>C. meiyuanensis</i> bereits hinreichend in der Literatur bekannt und diskutiert war, wurde der Fokus auf die neuartigen Chitinasen der Familie <i>Jeongeupia</i> gelegt. Eine rekombinante Expression der ermittelten Glycosidhydrolasen steht noch aus.
AP 2.2	Optimierung der Chitinaseproduktion und -Aktivität durch Anpassung der Bedingungen	Temperatur und pH-Optimierungsversuche lieferten verbesserte Aktivitäten der aufkonzentrierten, sekretierten Rohchitinase-mischungen. Außerdem wurden Medienkomposition und Kultivierungsbedingungen angepasst, um höhere Enzymausbeuten zu erzielen. Die Untersuchung verschiedener Puffersysteme und Hydrolysezeiten lieferte COS zwischen Mono- und Pentameren, mit Chitobiose als vorherrschendem Produkt.
AP 2.3	Identifizierung und Optimierung von Deacetylaseaktivitäten für Chitinmodifikation	In den Genomen der mittels PacBio sequenzierten Bakterienspezies <i>J. naejangsanensis</i> & <i>J. sp.</i> wurden putative Chitin-Deacetylasen identifiziert, welche Sequenzhomologien zu bekannten Enzymen aus der Literatur aufweisen.
AP 2.4	Fermentationshochskalierung und Wahl der Fermentationsart (Batch/kontinuierlich) für definierte COS-Produktion	Aufgrund der Insolvenz des für die Fermentationshochskalierung hauptverantwortlichen Projektpartners BBSI/ CigalaTech konnte dieses AP nicht realisiert werden.
AP 2.5	Labormaßstab-Experimente	Da keine der untersuchten Reaktionsbedingungen zu ausreichend langen COS-Produkten führte, wurde der Fokus auf die Reaktionsoptimierung und Aufreinigungsversuche der Endochitinasen gelegt, bevor Ansätze im größeren Maßstab durchgeführt werden konnten.
AP 2.6	Pilotmaßstab	Siehe AP 2.4

2.2 Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Der Kooperationspartner BBSI/CigalaTech musste aufgrund der strikten Abschottung des kanadischen Staates im ersten Jahr der Coronapandemie während des Projektverlaufs Insolvenz anmelden. Dadurch ging ein zentraler Projektpartner mit Expertise auf den Gebieten Fermentationsskalierung, Chitinherstellung vom Pilot- in den industriellen Maßstab und begleitender Qualitätssicherung dem Projektkonsortium verloren. Dies verhinderte im Projektverlauf die Durchführung der Arbeitspakete 2.4 - 2.6, welche in enger Zusammenarbeit mit dem Partner TUM-WSSB geplant waren.

Außerdem wurde im Frühjahr 2020 aufgrund der globalen Coronapandemie ein vollständiger Lockdown von ca. 1,5 Monaten über die TUM verhängt und danach nur unter sehr erschwerten Bedingungen halbtätig

Laborarbeiten im Rahmen des Hygiene-Konzeptes erlaubt, was den wissenschaftlichen Projektfortschritt nachhaltig negativ beeinflusste und verzögerte. Damit zusammenhängend fielen auch das geplante Projekttreffen aller beteiligten Projektpartner in Kanada sowie eine in Mexiko City angedachte Chitinkonferenz aus, weshalb es zu Minderausgaben kam, die innerhalb der genehmigten kostenneutralen Verlängerung für die Vorbereitung und Durchführung der Proteomikanalyse des chitinolytischen Bakteriums *J. naejangsanensis* verausgabt werden konnten.

Teile des Projektbudgets wurden außerdem für die Beschaffung spezieller HPLC-Säulen verausgabt. Für die qualitative Bestimmung von COS per analytischer HPLC wurde eine NH₂-Säule gekauft. Des Weiteren wurde eine präparative HPLC Säule geordert, welche die von chromatographische Differenzierung und Auftrennung von COS mit unterschiedlichem Polymerisationsgrad technisch ermöglicht.

2.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Der käufliche Erwerb der analytischen NH₂-Säule erlaubte die Untersuchung des durch die enzymatische Hydrolyse entstandene COS-Musters, wodurch die qualitative Einschätzung der Chitinaseaktivitäten aus AP 2.1 und deren Optimierung in AP 2.2 überhaupt erst ermöglicht wurden.

Nachdem die prinzipielle COS-Analysemethode im WSSB etabliert wurde, wurde frühzeitig ebenfalls eine präparative NH₂-Chromatographiesäule akquiriert, um Verzögerungen durch Lieferschwierigkeiten zu umgehen, welche während der Coronapandemie nicht unüblich waren. Diese kam während der Projektlaufzeit nicht mehr zum Einsatz, war aber als Grundbedingung notwendig, um AP 2.6 überhaupt erfüllen zu können.

Die durch den externen Dienstleister erfolgten Genom- bzw. Transkriptomsequenzierungen waren elementar, um Informationen zu den (bis dato) unbekannten Gensequenzen der neuartigen, chitinolytischen Bakterienstämme zu erhalten. Basierend auf diesen Daten konnte erst eine rekombinante Expression technisch ermöglicht werden.

2.4 Verwertungsplan

Projekttitel:	Holistic chitin conversion to materials for 3D printing application and performance animal feed additives
Zuwendungsempfänger:	Technische Universität München
Projektleitung:	Prof. Dr. Thomas Brück

1. Wirtschaftliche Verwertung		
Lfd. Nr.	Konkrete Verwertung	Zeithorizont
1	Skalierung und Aktivitäts Validierung der neuen chitinolytischen Enzyme in Bezug auf biogene Chitin Quellen tierischen (Krabbenschalen) und pilzlichen Ursprungs	5 Jahre
2	Ausgründung zur Herstellung von Chitinoligomeren als Probiotika in der Humanernährung	8 Jahre

2. Wissenschaftlich-technische Verwertung		
Lfd. Nr.	Konkrete Verwertung	Zeithorizont
1	Promotionsarbeit von Hr. Nathanael Arnold	Juli 2019 bis vorauss. Juli 2023
2	Bachelorarbeit	Dez. - März. 2020
3	Publikation: Arnold, N. D., Brück, W. M., Garbe, D., & Brück, T. B. (2020). Enzymatic modification of native chitin and conversion to specialty chemical products. <i>Marine drugs</i> , 18(2), 93.	Jan. 2019

4	Publikation in Marine drugs: „Omics guided characterization of the chitinolytic machinery of two <i>Jeongeupia</i> bacteria“	Einreichung für Mai 2023 geplant
---	--	----------------------------------

3. Wissenschaftliche und wirtschaftliche Folgeentwicklungen/-projekte		
Lfd. Nr.	Nächste Schritte	Zeithorizont
1	Einfließen der gewonnenen Expertise in 2022 gestartetes EU-Projekt VALUABLE	2022-2025

2.5 Während der Projektlaufzeit bekannt gewordener Fortschritt Dritter

Das Genom des in der Anfangsphase des Projektes aus Bodenproben isolierten Bakteriums *Jeongeupia naejangsanensis*, welches vielversprechende Chitin-hydrolysierende Eigenschaften besitzt, wurde 2021 von Turrini et. al auf Basis von Illuminasequenzierungen publiziert (Turrini et al. 2021).

2.6 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

TUM:

Publikation:

Arnold, N. D., Brück, W. M., Garbe, D., & Brück, T. B. (2020). Enzymatic modification of native chitin and conversion to specialty chemical products. Marine drugs, 18(2), 93.

Bis Mai 2023 ist eine Publikation in Marine Drugs mit dem vorläufigen Titel „Omics guided characterization of the chitinolytic machinery of two *Jeongeupia* bacteria“ geplant.

3. Literatur

- Casadidio C, Peregrina DV, Gigliobianco MR, et al (2019) Chitin and chitosans: Characteristics, eco-friendly processes, and applications in cosmetic science. *Mar Drugs* 17:. <https://doi.org/10.3390/md17060369>
- Castro R, Guerrero-Legarreta I, Bórquez R (2018) Chitin extraction from *Allopetrolisthes punctatus* crab using lactic fermentation. *Biotechnol Reports* 20:e00287. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00287>
- Eweis M, Elkholy SS, Elsabee MZ (2006) Antifungal efficacy of chitosan and its thiourea derivatives upon the growth of some sugar-beet pathogens. *Int J Biol Macromol* 38:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.12.009>
- Goy RC, De Britto D, Assis OBG (2009) A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polimeros* 19:241–247. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013>
- Healy M, Green A, Healy A (2003) Bioprocessing of Marine Crustacean Shell Waste. *Acta Biotechnol* 23:151–160. <https://doi.org/10.1002/abio.200390023>
- Henrissat B, Terrapon N, Coutinho PM, et al Carbohydrate-Active enZymes. <http://www.cazy.org/>
- Huang R, Mendis E, Rajapakse N, Kim S-K (2006) Strong electronic charge as an important factor for anticancer activity of chitooligosaccharides (COS). *Life Sci* 78:2399–2408. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.039>
- Jacquioud S, Franqueville L, Cécillon S, et al (2013) Soil bacterial community shifts after Chitin enrichment: An integrative metagenomic approach. *PLoS One* 8:1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079699>
- Jeon YJ, Shahidi F, Kim SK (2000) Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods. *Food Rev Int* 16:159–176. <https://doi.org/10.1081/FRI-100100286>
- Jung W, Park R, Sashiwa H (2014) Bioproduction of Chitooligosaccharides: Present and Perspectives. *Mar Drugs* 12:5328–5356. <https://doi.org/10.3390/md12105328>
- Kaczmarek MB, Struszczyk-Swita K, Li X, et al (2019) Enzymatic Modifications of Chitin, Chitosan, and Chitooligosaccharides. *Front Bioeng Biotechnol* 7:. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00243>
- Kobelke DN (1990) By-products from crustacean wastes--chitin production. 42:18–19
- Köping-Höggård M, Mel'nikova YS, Vårum KM, et al (2003) Relationship between the physical shape and the efficiency of oligomeric chitosan as a gene delivery system in vitro and in vivo. *J Gene Med* 5:130–141. <https://doi.org/10.1002/jgm.327>
- Li X, Min M, Du N, et al (2013) Chitin, chitosan, and glycosylated chitosan regulate immune responses: The novel adjuvants for cancer vaccine. *Clin Dev Immunol* 2013:. <https://doi.org/10.1155/2013/387023>
- Park BK, Kim MM (2010) Applications of chitin and its derivatives in biological medicine. *Int J Mol Sci* 11:5152–5164. <https://doi.org/10.3390/ijms11125152>
- Rinaudo M (2006) Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci* 31:603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Saima, Kuddus M, Roohi, Ahmad IZ (2013) Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. *J Genet Eng Biotechnol* 11:39–46. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2013.03.001>
- Tharanathan RN, Kittur FS (2003) Chitin — The Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Crit Rev Food Sci Nutr* 43:61–87

- Turrini P, Artuso I, Lugli GA, et al (2021) Draft Genome Sequence and Polyhydroxyalkanoate Biosynthetic Potential of *Jeongeupia naejangsanensis* Type Strain DSM 24253. *Microbiol Resour Announc* 10:. <https://doi.org/10.1128/mra.00167-21>
- Xu Y, Bajaj M, Schneider R, et al (2013) Transformation of the matrix structure of shrimp shells during bacterial deproteination and demineralization. *Microb Cell Fact* 12:1. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-90>
- Yen MT, Yang JH, Mau JL (2009) Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydr Polym* 75:15–21. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.06.006>
- You Y, Park WH, Ko BM, Min BM (2004) Effects of PVA sponge containing chitooligosaccharide in the early stage of wound healing. *J Mater Sci Mater Med* 15:297–301. <https://doi.org/10.1023/B:JMSM.0000015491.91918.64>
- Younes I, Rinaudo M (2015) Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar Drugs* 13:1133–1174. <https://doi.org/10.3390/md13031133>