

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

## Zuwendungsempfänger:

Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB, Institutsteil Straubing  
Bio-, Elektro- und Chemokatalyse BioCat  
Schulgasse 11 a  
94315 Straubing

## Titel der Förderung:

AlternateFysch - Fisch-Alternative aus Biomasse der Öl-Hefe *Yarrowia lipolytica*

## Verantwortliche Autoren:

Vanessa Wegat

## Förderkennzeichen:

IBÖ09 - 031B1325

**„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 031B1325 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin/beim Autor.“**

**Sachbericht zum Verwendungsnachweis – Teil I**

**31.03.2024**

<b>ZE:</b>  Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB Bio-, Elektro- und Chemokatalyse BioCat Schulgasse 11 a 94315 Straubing	<b>FKZ:</b>  IBÖ09 - 031B1325
---	-------------------------------------

**Vorhabenbezeichnung:**  
AlternateFysch - Fisch-Alternative aus Biomasse der Öl-Hefe *Yarrowia lipolytica*

**Laufzeit des Vorhabens:**  
01.10.2022 – 30.09.2023

**Berichtszeitraum:**  
01.10.2022 – 30.09.2023

**Unterschrift des Projektleiters des Zuwendungsempfängers**

Straubing, den 31.03.2024

\_\_\_\_\_  
Vanessa Wegat

## 1. Ursprüngliche Aufgabenstellung sowie den wissenschaftlichen und technischen Stand, an den angeknüpft wurde

Ziel des Projekts AlternateFysch, welches im Rahmen des Ideenwettbewerbs „Neue Produkte für die Bioökonomie“ (IBÖ09) seit Oktober 2022 bis zum Projektende im September 2023 gefördert wurde, war die Entwicklung einer Fisch-Alternative aus der Biomasse einer Ölhefe.

Die Zunahme der Weltbevölkerung und veränderte Konsumgewohnheiten stellen die globale Ernährungssicherheit vor Herausforderungen. Um zukünftig den Nahrungsmittelbedarf der Weltbevölkerung decken zu können, müsste die Lebensmittelproduktion um etwa 50 % gesteigert werden. Gleichzeitig nehmen die verfügbaren landwirtschaftlichen Flächen ab. Der Klimawandel verschärft dieses Problem weiter. Weltweit decken Fisch und Meeresfrüchte circa 15 % des konsumierten tierischen Proteins ab. Die Zahl der überfischten Tierarten hat sich in den letzten Jahrzehnten verdreifacht und führt zum Tod von Millionen von Meerestieren als Beifang. Wird dieses Artensterben nicht rapide gebremst, könnten die Bestände an Speisefischen und Meeresfrüchten bis Mitte des 21. Jahrhunderts vollständig erschöpft sein. Ein effizienter und nachhaltiger Umgang mit den natürlichen Ressourcen sowie neue ganzheitliche Lösungsansätze sind erforderlich, um die Ernährung der Menschheit zu gewährleisten, ohne die Lebensgrundlagen zukünftiger Generationen zu gefährden. AlternateFysch bietet eine innovative und nachhaltige Alternative zum Fischkonsum auf Grundlage von essbarer mikrobieller Biomasse (z.B. aus Ölhefen wie *Y. lipolytica*). Die traditionelle Fermentation wird seit Jahrtausenden zur Herstellung von Lebensmitteln verwendet. Im Projekt AlternateFysch wurde sie nun für die Produktion von alternativen Meeresprodukten genutzt. Durch den Einsatz erneuerbarer Rohstoffe wie (Alt)speiseöle und einem geringen Energieverbrauch bei der Herstellung soll das Produkt eine bessere Umweltbilanz als konventioneller Fisch aufweisen. In der Sondierungsphase wurden erste Formulierungsversuche von AlternateFysch im Labormaßstab durchgeführt, um Textur und Geschmack zu optimieren. Beim Extrusionsverfahren wird die mit Wasser vermischte Biomasse bei Temperaturen bis maximal 140 °C verdichtet und durch ein Ventil gedrückt. Beim anschließenden Ausscheiden der Proteinschmelze durch die Düse entsteht eine texturierte Struktur durch die Anordnung der Proteinstränge in Fließrichtung. Wie bereits bei veganen Fleischalternativen gezeigt wurde ist dieser Schritt entscheidend, um die gewünschte faserige Struktur zu erreichen. Milde Extrusionsbedingungen können zudem die ernährungsphysiologische Qualität des Produkts verbessern. Alternativ kann auch nicht hitzebehandelter Hefeextrakt hinzugefügt werden, um den Vitaminverlust aufgrund hoher Extrusionstemperaturen auszugleichen.

## 2. Ablauf des Vorhabens

Zu Beginn der Sondierungsphase wurde zunächst eine ausführliche Literatur- und Patentrecherche durchgeführt. Außerdem stand die Etablierung eines Partnernetzwerks im Vordergrund. Hierfür wurden gezielt Gespräche mit Forschungs- und Industriepartnern geführt, um den Bedarf und die Technologie zu bewerten. Zudem wurde Kontakte zu Unternehmen geknüpft, die die benötigten Altspeiseöle und -fette als Rohstoffe bereitstellen können. Hierfür wurden verschiedene Altspeiseöle unterschiedlicher Qualität und reines Rapsöl als Referenz getestet. Es konnte gezeigt werden, dass *Y. lipolytica* auf verschiedenen Ölen und Fetten wachsen kann und dabei hohe Biomasseausbeuten erzielt werden können. Als Substratquellen kommen sowohl (Alt-)speisefett als auch (Alt-)speiseöl in Betracht. Zusätzlich wurde die Zugabe von Hefeextrakt mit Fischgeschmack getestet. Die ausgewählten Hefeextrakte hatten keinen negativen Einfluss auf die Fermentation und geben der Biomasse eine fischähnliche Note. Nach erfolgreicher Kultivierung wurde die gewonnene Biomasse extrudiert. Hierfür wurde die Biomasse und natürliche Aromastoffe gleichzeitig vermischt, geknetet und unter Druck schnell erhitzt. Es wurden sowohl Nass- als auch Trockenextrusion getestet, wodurch unterschiedlichen

Ergebnissen in Struktur und Textur erzielt werden konnten. Darüber hinaus wurden dem Fraunhofer IMTE Verkostungsmuster zur Verfügung gestellt, wodurch sie auch als Kooperationspartner für die Machbarkeitsphase gewonnen werden konnten. Des Weiteren konnte ein Lebensmittelhersteller und ein Lieferant für Lebensmittelzusatzstoffe als Kooperationspartner für die Umsetzung der Produktidee in der Machbarkeitsphase gewonnen werden. In weiteren Gesprächsrunden wurde ein zielgerichtetes Vorgehen für die Machbarkeitsphase erarbeitet und ein Entwicklungsplan erstellt.

### 3. Wesentliche Ergebnisse sowie ggf. die Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Arbeitspaket	Ziele	Ergebnis
AP-0	Projektmanagement	Zu Beginn der Sondierungsphase wurde eine umfangreiche Literaturrecherche durchgeführt. Zudem wurden geeignete Industrie- und Forschungspartner identifiziert und eine studentische Hilfskraft betreut.
AP-1	Patentrecherche	Die Analyse der Patentsituation von Hefen und Pilzen im Lebensmittelbereich hat gezeigt, dass dieses Feld ein großes Potenzial birgt. Die bisher gefundenen Patente stehen der Entwicklung von AlternateFysch nicht im Wege.
AP-2	Etablierung eines Partnernetzwerkes	Es wurden verschiedene Lieferanten kontaktiert, welche das nötige Altspeiseöl zur Verfügung stellen können. Zudem wurde die FID GmbH & Co. KG als Lieferant für Hefeextrakte, Aromen und Nährhefen zur natürlichen Geschmacksgebung identifiziert.
AP-3	Wachstumstests der Hefe auf verschiedenen (Alt)speisefetten und –ölen	<i>Y. lipolytica</i> DSM3286 wurde erfolgreich auf verschiedenen Altspeiseölen kultiviert. Die getesteten Hefeextrakte haben keine nachteilige Wirkung auf das Wachstum und verleihen der Biomasse ein subtil fischähnliches Aroma.
AP-4	Extrusion von AlternateFysch im Labormaßstab	Die in AP-3 gewonnene Biomasse wurde sowohl nass als auch trocken extrudiert. Hierbei konnten verschiedene Strukturen erzielt werden.
AP-5	Optimierung von AlternateFysch bezüglich Aussehens und Geschmack	Die Rezeptur wurde durch Geschmacksstoffe und Gewürzmischungen (Algenextrakte, Hefeextrakte etc.) ergänzt. In der Verkostung wies AlternateFysch einen fischigen, umamiartigen Geschmack auf.
AP-6	Entwicklungsplan für die Machbarkeitsstudie	Erstellung des Konsortiums (Lebensmittelhersteller, Fraunhofer IMTE und UCO Lieferant) und Bestimmung des Wirtschaftsexperten.

#### **Zusammenarbeit mit potentiellen Partnern für die Machbarkeitsphase:**

In der Sondierungsphase wurden die Ergebnisse vorrangig am Fraunhofer IGB, Standort Straubing generiert. Die Geschmackstests wurden am Fraunhofer IMTE in Lübeck durchgeführt. Gegen Ende der Sondierungsphase wurde das Konsortium mit zwei Herstellern in der Lebensmittelbranche und dem Fraunhofer IMTE gebildet und die Strategie für die Machbarkeitsphase entwickelt.

**Sachbericht zum Verwendungsnachweis – Teil II**

**31.03.2024**

<b>ZE:</b>  Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB Bio-, Elektro- und Chemokatalyse BioCat Schulgasse 11 a 94315 Straubing	<b>FKZ:</b>  IBÖ09 - 031B1325
<b>Vorhabenbezeichnung:</b> AlternateFysch - Fisch-Alternative aus Biomasse der Öl-Hefe <i>Yarrowia lipolytica</i>	
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.10.2022 – 30.09.2023	
<b>Berichtszeitraum:</b> 01.10.2022 – 30.09.2023	

**Unterschrift des Projektleiters des Zuwendungsempfängers**

Straubing, den 31.03.2024

\_\_\_\_\_  
Vanessa Wegat

## 4. Ausführliche Darstellung der durchgeführten Arbeiten im Vergleich zur ursprünglichen Vorhabenbeschreibung

### 4.3. Planung des Vorhabens

Das Projekt AlternateFysch beschäftigte sich im Rahmen des Ideenwettbewerbs „Neue Produkte für die Bioökonomie“ (IBÖ09) seit Oktober 2022 bis zum Projektende im September 2023 mit der Entwicklung einer Fisch-Alternative aus Biomasse der Ölhefe *Yarrowia lipolytica*. Die proteinreiche Biomasse wurde durch Fermentation von Reststoffen wie (Alt)speiseöl zu einer alternativen Option für Fisch und Meeresfrüchte entwickelt. In diesem Zusammenhang wurden verschiedene (Alt)speiseöle und -fette als Kohlenstoffquellen getestet, und die Kultivierung wurde hinsichtlich des Mediums und der Fermentationsbedingungen optimiert. Weiterhin wurden Extrusionen im Labormaßstab durchgeführt, um Textur und Geschmack von AlternateFysch zu verbessern. Durch milde Extrusionsbedingungen kann die ernährungsphysiologische Qualität des Produkts verbessert werden. Alternativ kann auch nicht hitzebehandelter Hefeextrakt hinzugefügt werden, um den Vitaminverlust aufgrund hoher Extrusionstemperaturen auszugleichen. Das Ziel von AlternateFysch war die Entwicklung eines wirtschaftlich attraktiven Produkts, welches dazu beitragen soll, den ökologischen Druck auf die Ozeane zu verringern. Zusätzlich dazu sollten passende Partner identifiziert werden, um gemeinsam ein zielorientiertes Vorgehen für die Machbarkeitsphase zu entwickeln.

Die Arbeitsplanung der Sondierungsphase war in sieben Arbeitspakete unterteilt:

- **AP-0: Projektmanagement**  
Ziel: Sondierung nach geeigneten Industrie- und Forschungspartnern, begleitende Literaturrecherche und Betreuung von Studierenden.
- **AP-1: Patentrecherche zu veganen Fisch-Alternativen**  
Ziel: Analyse der Patentsituation im Bereich der veganen Fischalternativen um einen Überblick über aktuelle Produkte am Markt zu erhalten.
- **AP-2: Etablierung eines Partnernetzwerkes für die Machbarkeitsphase**  
Ziel: Identifikation von geeigneten Partnern, z.B. Altspeiseöl-Lieferanten für die Machbarkeitsphase.
- **AP-3: Wachstumstests der Hefe auf verschiedenen (Alt)speisefetten und -ölen**  
Ziel: Identifizierung einer geeigneten Kohlenstoffquelle und Optimierung der Wachstumsbedingungen.
- **AP-4: Extrusion von AlternateFysch im Labormaßstab**  
Ziel: Herstellung eines ersten Prototyps im Labormaßstab und Optimierung des Herstellungsprotokolls.
- **AP-5: Optimierung von AlternateFysch bezüglich Aussehens und Geschmack**  
Ziel: Ergänzung der Rezeptur durch Geschmacksstoffe und Gewürzmischungen.
- **AP-6: Entwicklungsplan für die Machbarkeitsstudie**  
Ziel: Evaluierung der Projektidee und Identifikation von Herausforderungen. Bildung eines Konsortiums und Entwicklung eines Konzepts für die Machbarkeitsphase.

#### 4.4. Wissenschaftlicher Stand zu Beginn des Projektes

Hefen sind vielseitige, eukaryotische Organismen, die seit Jahrtausenden zur Lebensmittelherstellung genutzt werden und auch in anderen Bereichen wie der Kraftstoffproduktion und der Bioremediation Anwendung finden. Derzeit sind mehr als 1500 Arten an Hefen bekannt [1]. Sie gehören zur Gruppe der Pilze. Je nach Art benötigen Hefen entweder Sauerstoff für die aerobe Zellatmung oder sind anaerob, verfügen aber über zusätzliche aerobe Methoden zur Energiegewinnung. Das wohl bekannteste Beispiel ist die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die nicht nur beim Backen, sondern auch in der Brau- und Weinindustrie zur Herstellung von Alkohol verwendet wird.

Ein entscheidender Nachteil von *S. cerevisiae* ist, dass sie hauptsächlich auf Glucose kultiviert wird und somit von einer nahrungsrelevanten Quelle abhängig ist. Im Gegensatz dazu kann die Ölhefe *Yarrowia lipolytica* auch andere Kohlenstoffquellen wie Stärke, Glycerin, Öle und Fette für ihr Wachstum nutzen [2,3]. *Y. lipolytica* ist eine der bedeutendsten „nicht-konventionellen“ Hefen und zeichnet sich durch einen hohen Fettanteil von über 20 % aus. Die meisten Lipide werden als Triacylglyceride (TAGs) gespeichert. Diese physiologische Eigenschaft macht *Y. lipolytica* besonders interessant für die Herstellung von Lipidderivaten.

Fermentationsprozesse von *Y. lipolytica* haben den GRAS-Status ("generally recognized as safe") [4] und die Biomasse wurde im Jahr 2019 von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit als neuartiges Lebens- und Nahrungsergänzungsmittel zugelassen [5]. Die Ölhefe ist in der Natur weit verbreitet und kommt beispielsweise auch auf Käse oder Fleisch vor. Für die Produktion der Biomasse, die als Basis für AlternateFysch dient, wird *Y. lipolytica* auf (Alt)speiseölen und -fetten kultiviert. Weltweit werden täglich große Mengen an Speiseölen weggeworfen, die oft über einen langen Zeitraum hohen Temperaturen ausgesetzt waren und daher schwer wiederverwertet werden können [6]. Allein in der Gastronomie fallen jährlich etwa 13 Milliarden Liter an, von denen nur ein Bruchteil ordnungsgemäß recycelt wird und somit eine große Belastung für Mensch und Natur darstellen. Die durch Fermentation gewonnene Biomasse wird geerntet, mit Wasser versetzt und extrudiert. Bei der Technik der Nass-Extrusion, die auch bei der Herstellung von Fleischimitaten zum Einsatz kommt, werden Biomasse und natürliche Aromastoffe gleichzeitig mit Wasser erhitzt und unter hohem Druck durch eine gekühlte Düse gepresst.

#### 4.5. Durchführung und wissenschaftlich-technische Ergebnisse des Vorhabens

Zu Beginn der Sondierungsphase wurde eine umfassende Literatur- und Patentrecherche durchgeführt. Diese hat ergeben, dass es bereits verschiedene Bestrebungen zur Herstellung von veganen und vegetarischen Fisch-Alternativen gibt. In Konkurrenz zu AlternateFysch stehen vor allem Verfahren, die pflanzliche (z.B. Soja- oder Erbsenprotein) oder pilzbasierter Biomasse nutzen. In den letzten zehn Jahren wurde ein signifikanter Anstieg der Anzahl an Patenten im Bereich veganer und vegetarischer Fisch- und Fleischalternativen verzeichnet. Sowohl Unternehmen als auch Institutionen haben vermehrt Patente in diesem Bereich angemeldet, vor allem in den Vereinigten Staaten und der Europäischen Union. Nach aktuellem Wissensstand gibt es jedoch keine bestehenden Patente, welche die Biomasse der hier verwendeten Hefe als Fisch-Alternative nutzen. Daher wird derzeit eine Erfindungsmeldung hinsichtlich des AlternateFysch-Ansatzes zur Herstellung einer Fisch-Alternative auf Basis von Hefebiomasse (insbesondere der von *Y. lipolytica*) erarbeitet.

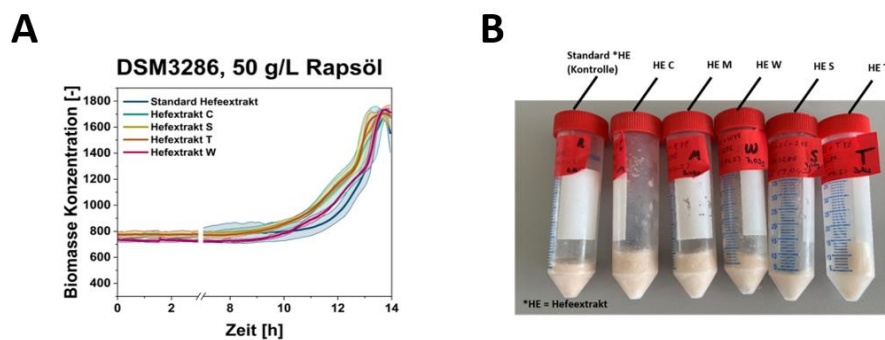
Für die Etablierung des Partnernetzwerks wurden sowohl Lieferanten im Bereich der Lebensmittelherstellung als auch Recyclingfirmen kontaktiert, welche das nötige AltSpeiseöl zur Verfügung stellen können. Dabei konnte die FID GmbH & Co. KG, welche Hefeextrakte, Aromen und Nährhefen zur natürlichen Geschmacksgebung der Fischalternative bereitstellen können, als

Wirtschaftsexperte für die Machbarkeitsphase gewonnen werden. Die Fa. FID unterstütze die Sondierungsphase bereits als Lieferant von Hefeextrakten. Zunächst wurden fünf Arten von Hefeextrakten mit unterschiedlichen Geschmacksprofilen und ein Standard-Hefeextrakt als Referenz beschafft.

**Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Hefeextraktquellen.**

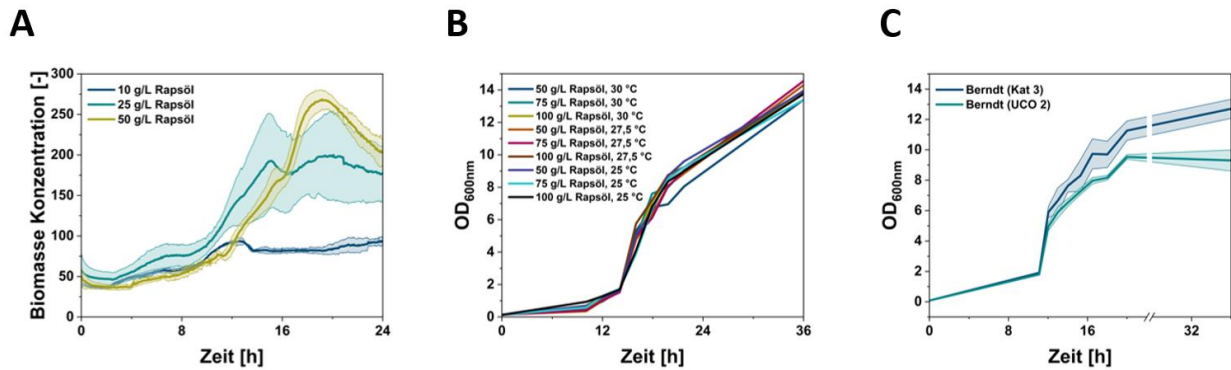
	Herkunft	Beschreibung des Geschmacks
1	Maxavor® Fish C YE, FID GmbH & Co. KG	Krabbe, weißer Fisch, leicht süßlich
2	Maxavor® Fish M YE, FID GmbH & Co. KG	Fisch, nicht genauer spezifiziert
3	Maxavor® Fish T YE, FID GmbH & Co. KG	Mildes, öliges, gekochtes Thunfischprofil mit leicht cremigen Noten
4	Maxavor® Fish S YE, FID GmbH & Co. KG	Ausgeprägtes gebackenes Lachsprofil
5	Maxavor® Fish W YE, FID GmbH & Co. KG	Fisch, nicht genauer spezifiziert
6	Hefeextrakt, Carl Roth GmbH + Co. KG	Standard Hefeextrakt, Referenz

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob durch Zugabe verschiedener Hefeextrakte (vgl. **Tabelle 1**) die Biomasse bereits während der Fermentation einen Geschmack/Geruch erhält, der die herkömmlichen Meeresfrüchte nahekommt. Hierfür wurden Wachstumskurven aufgenommen (**Abbildung 1A**), um auszuschließen, dass sich der Hefeextrakt negativ auf das Wachstum auswirkt. Zudem wurde *Y. lipolytica* DSM3286 auf 50 g/L Rapsöl und jeweils 1 g/L der verschiedenen Hefeextrakte im 2 Liter Schüttelkolben kultiviert und anschließend die feuchte Biomasse geerntet (**Abbildung 1B**). Es konnte gezeigt werden, dass sich die verschiedenen Hefeextrakte im Vergleich zur Referenz leicht positiv auf das Wachstum auswirken aber die Biomasse ihre natürliche, helle Farbe behält. Eine Färbung der Biomasse, etwa durch braunen Hefeextrakt, wäre nachteilig für den weiteren Prozess gewesen. Bei allen getesteten Chargen (außer der Referenz) war ein leichter Fischgeruch der Biomasse wahrnehmbar.



**Abbildung 1: Wachstumstests von *Y. lipolytica* Stamm DSM3286 im Mineralsalzmedium mit verschiedenen Hefeextrakten.** (A) Kultivierung auf 50 g/L Rapsöl bei 25 °C und Zugabe von verschiedenen Hefeextrakten mit Fischgeschmack oder handelsüblichem Hefeextrakt (blau) als Referenz. Das Experiment wurde im Mikrotitermaßstab im BioLector XT in drei biologischen Replikaten durchgeführt, die Fehlerbereiche, dargestellt in der jeweils helleren Farbe, stellen die Standardabweichung dar. (B) Geerntete Biomasse nach Kultivierung auf 50 g/L Speiseöl bei 25 °C und Zugabe von verschiedenen Hefeextrakten (1 g/L) im 2-Liter Schüttelkolben.

Darüber hinaus wurden mehrere Recyclingfirmen kontaktiert, die gebrauchtes Speiseöl und -fett vertreiben und für Vortests zur Verfügung stellten. Zunächst wurde *Y. lipolytica* auf (gebrauchtem) Speiseöl/ -fett verschiedener Hersteller kultiviert und die Biomasse zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Zentrifugation aus dem Medium geerntet. Reines Rapsöl diente dabei als Referenz. **Abbildung 2** fasst die wichtigsten Ergebnisse der Wachstumstests von *Y. lipolytica* auf verschiedenen (Alt)speisefetten und -ölen zusammen.



**Abbildung 2: Wachstum von *Y. lipolytica* Stamm DSM3286 in Mineralsalzmedium supplementiert mit Speiseöl (Hauptbestandteil Rapsöl).** (A) Kultivierung auf 10 g/L, 25 g/L oder 50 g/L Substrat bei 30 °C und Messung des Streulichts als Referenz für die Biomasse Konzentration. Das Experiment wurde im Mikrotitermaßstab im BioLector XT in drei biologischen Replikaten durchgeführt, die Fehlerbereiche, dargestellt in der jeweils helleren Farbe, stellen die Standardabweichung dar. (B) Kultivierung auf 50 g/L, 75 g/L oder 100 g/L Substrat bei 30 °C, 27,5 °C oder 25 °C und Messung der optischen Dichte (OD) bei 600 nm. Das Experiment wurde im Schüttelkolben durchgeführt. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert von zwei biologischen Replikaten. (C) Kultivierung auf verschiedenen Altspeiseölquellen (50 g/L) und Messung der optischen Dichte (OD) bei 600 nm. Das Experiment wurde im Schüttelkolben durchgeführt. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert von drei biologischen Replikaten und die Standardabweichung.

*Y. lipolytica* DSM3286 kann Speiseöl hervorragend verwerten und dabei hohe Biomasseausbeuten produzieren. Das Optimum wurde mit 50 g/L Rapsöl erzielt (**Abbildung 2A**, gelb), wobei höhere Konzentrationen an Rapsöl nicht zu einer höheren Biomasseausbeute führen (**Abbildung 2B**). Anders als bei Zuckern oder Glycerin hat die Fermentation von *Y. lipolytica* auf Speiseöl kein Temperaturoptimum bei 30 °C, sodass auch bei niedrigeren Temperaturen gleichbleibend hohe Biomasseausbeuten erzielt werden können (**Abbildung 2B**). Dies bietet insbesondere für die spätere Skalierung Vorteile, da so Kosten eingespart werden können. Außerdem wurden verschiedene Altspeiseölquellen getestet. Insbesondere mit dem Muster „Kat 3“ der Recyclingfirma Berndt GmbH konnten hohe Biomasseausbeuten erzielt werden (**Abbildung 2C**). Die Fa. Berndt GmbH wurde daher auch als Partner und Lieferant für den weiteren Verlauf des Projekts identifiziert.

Zusammenfassend ist *Y. lipolytica* und insbesondere der Wildtyp-Stamm DSM3286 gut geeignet für das Vorhaben AlternateFysch. Es wurde darauf geachtet, dass die verwendeten Altspeisefette und -öle kein Mineralöl enthalten, um eine Verunreinigung des finalen Produkts zu vermeiden. Die getesteten Hefeextrakte, die von der Firma Fa. FID (Deutsche Vertriebsgesellschaft der Fa. DSM) bezogen wurden, beeinträchtigen das Wachstum von *Y. lipolytica* nicht und verleihen der Biomasse ein leicht fischähnliches Aroma.

Nach der Kultivierung wurden mit der gewonnenen Biomasse die ersten Formulierungsversuche von AlternateFysch im Labormaßstab durchgeführt. Die genutzten Zusatzstoffe sind in **Tabelle 2** zusammengefasst.

**Tabelle 2: Übersicht über die bei der Extrusion verwendeten Zusatzstoffe.**

	Herkunft	Name	Beschreibung
1	Th. Geyer	E170	Natürliche Lebensmittelfarbe, Pulver, elfenbeinfarben
2	Th. Geyer	Paprika	Färbendes Lebensmittel, flüssig, orange-rot
3	Th. Geyer	Süßkartoffel	Färbendes Lebensmittel, flüssig, helles pink
4	Th. Geyer	Erbsenprotein-Mehl	Pulver zur Strukturierung, Reich an essentiellen Aminosäuren, circa 80 % Protein
5	Fraunhofer IGB, Algenbiotechnologie	Algenpulver	Grünes Pulver aus <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , pflanzliche Alternative zu Fischöl, Herstellung In-house
6	Supermarkt	Zitrusfaser	Natürliche Pflanzenfaser gewonnen aus Zitronen, relativ geschmacksneutral
7	FID Werne/DSM	Maxavor® Hefeextrakt	Siehe <b>Tabelle 1</b>

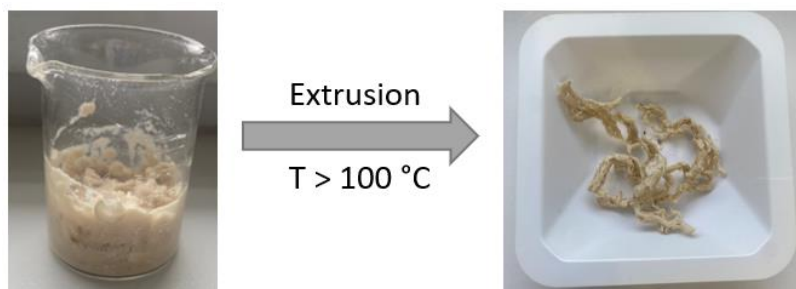
Zunächst wurde die Biomasse mit verschiedenen Lebensmittelfarben eingefärbt. Es ist allgemein bekannt, dass die optische Erscheinung eines Produktes maßgeblich die Kaufentscheidung des Verbrauchers beeinflusst und unterbewusst Erwartungen an den Geschmack weckt. Es wurde daher versucht die Farben von verschiedenen Fischarten nachzustellen. **Abbildung 3** fasst die wichtigsten Ergebnisse zusammen.



**Abbildung 3: Eingefärbte *Y. lipolytica* Biomasse.** 5 g lyophilisierte Biomasse wurde zunächst mit Wasser vermengt (Verhältnis 1:2) und anschließend mit verschiedenen Lebensmittelfarben eingefärbt. **(A)** Zugabe von 200 mg E170 (Elfenbein). **(B)** Zugabe von 10  $\mu$ L Süßkartoffelextrakt (rosa). **(C)** Zugabe von 10  $\mu$ L Paprikaextrakt (lachsfarben). **(D)** Zugabe von 200  $\mu$ L Paprikaextrakt (rot-orange). **(E)** Zugabe von je 200  $\mu$ L Paprikaextrakt (rot) und Süßkartoffelextrakt (lila).

Insgesamt lief die Einfärbung der Biomasse sehr erfolgreich. Mit nur wenig Lebensmittelfarbe konnte die Farbgebung von Weißfisch oder Lachs (**Abbildung 3A-C**) imitiert werden, ohne dabei den Geschmack oder Geruch der Biomasse abzuändern. Durch die Zugabe von Paprikaextrakt könnte beispielsweise Tunfisch optisch nachgeahmt werden (**Abbildung 3D**), wobei zu viel Lebensmittelfarbe jedoch zu unnatürlichen Ergebnissen führt (**Abbildung 4E**). Zudem war bei hohen Konzentrationen ein subtiler Geschmack von Paprika wahrnehmbar.

Für die Extrusion wurde die in AP-3 erhaltene Biomasse und natürliche Aromastoffe gleichzeitig vermischt, geknetet und unter Druck schnell erhitzt. Zu Beginn wurde die Biomasse ohne Zusatzstoffe trocken extrudiert, wobei der Wassergehalt unter 30 % lag (**Abbildung 4**). Es wurden Temperaturen zwischen 100-140 °C und Rührgeschwindigkeiten von 100-300 rpm getestet.

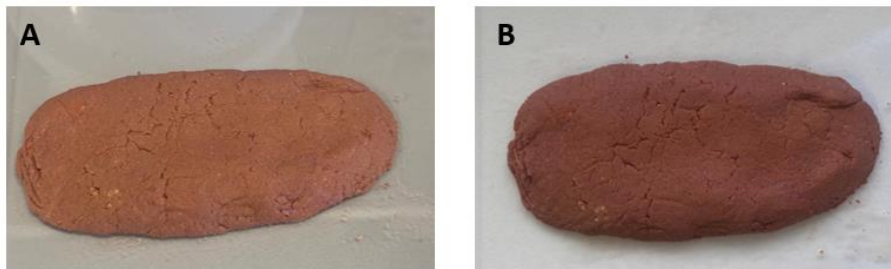


**Abbildung 4: Bildung von texturiertem Protein mittels Trockenextrusion von *Y. lipolytica* Biomasse.**

Mit 120 °C und 200 rpm konnte eine trockene, spröde und poröse Struktur erzielt werden, welche zu einer zu einer faserigen, fleischähnlichen Textur rehydriert.

Des Weiteren konnte mittels Nassextrusion (Wassergehalt circa 50 %, T = 75 °C, 200 rpm) eine weiche, faserige Textur erzielt werden. In **Abbildung 5A** ist beispielhaft eine AlternateFysch-

Formulierung dargestellt. Hierfür wurde die Biomasse mit Wasser und Paprikaextrakt als Färbemittel vermischt und geformt. Das erhaltene Muster wurde anschließend für 20 Minuten bei 100°C im Ofen erhitzt. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Struktur spröder und dunkler wird, vermutlich aufgrund von Maillard-Reaktionen (**Abbildung 5B**).



**Abbildung 5: Musterextrusion von AlternateFysch mit anschließender Verarbeitung.** (A) Nassextrusion von *Y. lipolytica* Biomasse versetzt mit 0.02 % (w/w) Paprikaextrakt. (B) Biomasse nach Erhitzen im Ofen für 20 min bei 100 °C.

Zuletzt fand zusammen mit der Arbeitsgruppe Lebensmitteltechnologie vom Fraunhofer IMTE eine Verkostung der Biomasse statt. Die Probanden charakterisierten den Geruch und Geschmack als „fischig“, „hefeartig“ und „umami“. Durch Zugabe von etwa 1 % Algenextrakt oder 0.1 % Hefeextrakt konnte der fischartige Geschmack noch verstärkt werden. Das Fraunhofer IMTE konnte zudem als Partner für die angestrebte Machbarkeitsphase gewonnen werden. Auch die ein Lebensmittelhersteller wurde als Partner und potenzieller Vertriebspartner gewonnen.

Zusammenfassend konnte in der Sondierungsphase des Projekts AlternateFysch ein erster Prototyp einer Fischalternative auf Basis von Hefebiomasse hergestellt werden. Die Biomasse wurde durch Kultivierung von *Y. lipolytica* auf (Alt)speiseöl hergestellt. Mittels Extrusion (nass oder trocken) konnte verschiedene Produkteigenschaften erzielt werden. Durch Zugabe von Lebensmittelfarben und Aromastoffen (z.B. Algenextrakt) wurde die Formulierung weiter optimiert. Je nach Bedarf können verschiedene Farben und Geschmacksnoten wie bei Lachs, Tunfisch oder weißem Fisch erzielt werden. Die genaue Produktformulierung muss je nach Anwendungsbeispiel angepasst werden. Nach ersten Untersuchungen zeigt AlternateFysch vielversprechende Eigenschaften, es besteht jedoch noch Entwicklungspotenzial. Insbesondere die Struktur erfordert weitere Prozessentwicklung und Anwendungstests. Mit dem Fraunhofer IMTE und zwei Lebensmittelunternehmen wurden wertvolle Kontakte geknüpft, welche auch als Konsortium für zukünftige Projekte fungieren können.

## 5. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Der zahlenmäßige Verwendungsnachweis geht gesondert zu. Die Position 0838 (Reisekosten) wurden verwendet für eine Reise zur Evaluierung der Projektidee in Jülich.

## 6. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Die geleisteten Arbeiten innerhalb Sondierungsphase waren notwendig zur Evaluierung der Projektidee. So konnte gezeigt werden, dass die Biomasse einer Ölhefe als nachhaltige Quelle für Fischalternativen genutzt werden kann. Die Herstellung eines ersten Prototyps im Labormaßstab lief dabei vielversprechend. Das für die Fermentation nötige Altspeiseöl sowie die Hefeextrakte wurde von Lieferanten bezogen, welcher großes Interesse an der Fortsetzung des Projekts haben. In Gesprächen mit weiteren Partnern (zwei Lebensmittelherstellern) wurde ein Entwicklungsplan für die Machbarkeitsphase erarbeitet. Die geleisteten Arbeiten waren angemessen, um ein überzeugendes Konzept für die weitere Entwicklung von AlternateFysch zu erarbeiten. Die vielversprechenden Ergebnisse aus der Sondierungsphase führten zur Bildung eines Konsortiums

aus akademischen und industriellen Partnern, die sich weiterhin für die Entwicklung einer veganen Fischalternative engagieren.

## **7. Voraussichtliche Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses - auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft - im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans**

Die Herstellung wirtschaftlich relevanter Produkte aus nachwachsenden Rohstoffen mit Hilfe von Mikroorganismen wird als ein wichtiger Meilenstein auf dem Weg zu einer nachhaltigen Kreislaufwirtschaft angesehen [7]. In diesem Sinne liefert AlternateFysch eine innovative und nachhaltige Fisch-Alternative, welche die Zielvorgaben der NFS2030 auf vielfältige Weise umsetzt: Die für die Fermentation verwendete Kohlenstoffquelle fällt als industrieller Reststoff in großen Mengen an und ist ungenutzt eine Belastung für Mensch und Natur (Upcycling). Die Herstellung von AlternateFysch ist ressourcenschonend und reduziert den Druck auf das Ökosystem Meer. Zudem enthält die Hefebiomasse wertvolle Nährstoffe und ist bereits als Lebensmittel zugelassen (Novel Food).

In den vergangenen Jahren wurde ein deutlicher Anstieg der Patentanzahl im Bereich veganer und vegetarischer Fisch- und Fleischalternativen verzeichnet. Sowohl Unternehmen als auch Institutionen haben vermehrt Patente in diesem Bereich angemeldet. Es gibt jedoch derzeit keine bekannten Patente, die die Verwendung von *Y. lipolytica*-Biomasse als Fischalternative abdecken. Daher wird derzeit eine Erfindungsmeldung für den AlternateFysch-Ansatz angestrebt. Neben dem Schutz des generierten geistigen Eigentums wird langfristig auch über eine Lizenzierung der Idee nachgedacht.

Die Verwendung von Hefebiomasse als Proteinquelle bietet den Vorteil, dass es sich um eine vollständig erneuerbare Ressource handelt. Die Produktion der Hefebiomasse erfolgt ausschließlich aus Reststoffen wie Altspeiseölen, wodurch kein zusätzlicher Druck auf landwirtschaftliche Flächen oder Gewässer entsteht. Dies ist sowohl für Hersteller in der Lebensmittelindustrie und Gastronomie als auch für die Forschung von großem Interesse. AlternateFysch kann sowohl in Form von gefriergetrockneter Biomasse angeboten werden, die noch weiterverarbeitet werden muss (z.B. über Extrusion), als auch als bereits formuliertes Produkt. Diese Vielseitigkeit macht die Produkte attraktiv für ein breites Publikum.

Darüber hinaus ist geplant, die gewonnenen Ergebnisse der Öffentlichkeit zugänglich zu machen, um eine wissenschaftliche Diskussion zu ermöglichen. Dies wird durch die Veröffentlichung von Fachartikeln sowie durch Präsentationen auf Messen und Kongressen (z.B. Vortrag auf dem Lebensmittelforum Bremerhaven, Mai 2024) realisiert. Die erzielten Ergebnisse ermöglichen es dem Fraunhofer IGB, seine Fachkompetenz im Bereich der Hefefermentation weiter auszubauen und neue Kenntnisse im Bereich der Lebensmitteltechnologie zu erwerben. Dies stärkt mittelfristig die wissenschaftliche Expertise des Instituts auf diesem Gebiet. Im Rahmen der Sondierungsphase lief eine HiWi-Tätigkeit auf dem Projekt. Die Beteiligung von Studierenden an Projekten wie AlternateFysch trägt zur Förderung der Ausbildung des wissenschaftlichen Nachwuchses am Fraunhofer IGB bei und steigert langfristig die Attraktivität des Standorts für Studierende. Das bereits erlangte Fachwissen soll in möglichen Folgeprojekten entsprechend des Geschäftsmodells der Fraunhofer-Gesellschaft verwertet werden. Die geknüpften Kontakte stellen wertvolle Partner für zukünftige Kooperationen, auch in anderen Projekten, dar.

## **8. Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordenen Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen**

Während der Durchführung der Sondierungsphase sind keine Veröffentlichungen bekannt geworden, weder in der Fachliteratur noch auf Patentebene, die für das Projekt relevant wären.

## 9. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse nach Nr. 5 der NKBF

Die Veröffentlichung der im Rahmen des Projekts erzielten Ergebnisse ist nach weiterer Erforschung und Optimierung der in der Sondierungsphase extrudierten Biomasse geplant. Diese Arbeiten werden intern am Fraunhofer IGB in Straubing durchgeführt. Außerdem ist geplant, die Projektidee im Rahmen eines Vortrags auf dem Lebensmittelforum Bremerhaven im Mai 2024 zu präsentieren.

## 10. Literatur

1. Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2024, March 26). yeast. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/yeast-fungus>
2. Babu, P.R. and V.V. Sarma, *Chapter 11 - Fungi as Promising Biofuel Resource*, in *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, J.S. Singh and D.P. Singh, Editors. 2019, Elsevier. p. 149-164.
3. Lubuta, P., et al., *Investigating the Influence of Glycerol on the Utilization of Glucose in Yarrowia lipolytica; Using RNA-Seq-Based Transcriptomics*. G3: Genes|Genomes|Genetics, 2019. 9(12): p. 4059.
4. Zieniuk, B. and A. Fabiszewska, *Yarrowia lipolytica: a beneficial yeast in biotechnology as a rare opportunistic fungal pathogen: a minireview*. World journal of microbiology & biotechnology, 2018. 35(1): p. 10-10.
5. EFSA Panel on Nutrition, N.F., et al., *Safety of Yarrowia lipolytica yeast biomass as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283*. EFSA Journal, 2019. 17(2): p. e05594.
6. Azahar, W., et al., *The potential of waste cooking oil as bio-asphalt for alternative binder – An overview*. Jurnal Teknologi, 2016. 78.
7. Forschung, B.f.B.u. *Nationale Forschungsstrategie BioÖkonomie 2030*. 13.02.2021]; Available from: [https://www.bmbf.de/upload\\_filestore/pub/Nationale\\_Forschungsstrategie\\_Biooekonomie\\_2030.pdf](https://www.bmbf.de/upload_filestore/pub/Nationale_Forschungsstrategie_Biooekonomie_2030.pdf)