IADP
An-Institut für angewandte Dermatopharmazie
an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg e.V.

Projektbericht

„Entwicklung neuartiger SoftPatches als fokale Ceramid-Booster zur Behandlung von Falten – CeraPatch“

Vorgangsnummer: ZS/2020/11/153007
Projektnummer: 2104/00042

Institut für angewandte Dermatopharmazie
An der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg e.V.
Weinbergweg 23, 06120 Halle (Saale)

SACHSEN-ANHALT
EUROPÄISCHE UNION
EFRE
Europäischer Fonds für regionale Entwicklung

1 Einleitung

Das Stratum corneum (SC) der Epidermis besteht aus mehreren Schichten von keratinisierten Korneozyten, die vom cornified envelope ummantelt und durch korneodesmosomale Strukturen verbunden in eine komplexe Lipidmatrix aus flüssigkristallinen, lamellaren Strukturen eingebettet sind. Die Lipidfraktion besteht im Wesentlichen aus Ceramiden, langkettigen freien Fettsäuren, Cholesterol und Triglyceriden. Diese bilden in der Interaktion mit Wasser ein komplexes Membrannetzwerk, welches als morphologisches Äquivalent zur Barrierefunktion verstanden wird. Ceramide bilden dabei, wegen ihrer anisotropen Molekülstruktur und den dadurch begründeten besonderen physiochemischen Eigenschaften, das Rückgrat des Membrannetzwerks, während die anderen lipophilen Bestandteile die Membraneigenschaften, wie Fluidität, Permeabilität und Stabilität modulieren.
Eine Vielzahl von pathologischen (z.B. atopische Dermatitis, Psoriasis, Diabetes mellitus) oder physiologischen Prozessen (Hautalterung) reduziert das Vorhandensein und die Anordnung von Ceramiden oder anderen Phospholipiden und kann die Zusammensetzung des SC beträchtlich beeinflussen. Innerhalb der Lipidmatrix führen diese Ursachen zur Änderung der molekularen Ordnung, wodurch es zu einer Wasserbindungsabnahme sowie Steigerung der Permeabilität kommt und charakterisiert sich phänotypisch in einer Barrierestörung mit Ausbildung von trockener, schuppiger Haut.
Eine klassische Strategie das Irritationspotential der Haut zu behandeln sind topische Applikationen von halbfesten oder flüssigen Zubereitungen. Die Entwicklung des Soft-Patch-Systems soll das Innovationspotential von halbfesten Formulierungen nutzen und dieses mit einem biologischen Matrixbildner vereinigen, um damit die fokale Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen effizient zu ermöglichen. Als Grundlage der technologischen Plattform sollen pflanzliche Proteine dienen, die mithilfe einer Transglutaminase quervernetzt und zur Ausbildung eines Soft-Patch-Systems führen.
Zur Quervernetzung von Proteinen mittels Transglutaminasen eigenen sich pflanzliche Quellen mit hohem Proteingehalt, wie Erbse, Bohne oder Lupine, aber auch Getreide und Pseudogetreide aus beispielsweise Reis. Besonders nachhaltige Proteinquellen wie die Erbse, die gut an das Klima in Zentraleuropa angepasst sind (Tanger et al. 2020) und gewinnen aufgrund des gestiegenen ökologischen Bewusstseins der Bevölkerung immer mehr an Bedeutung. Je nach Wachstum der Pflanze beträgt der Erbsenproteingehalt zwischen 20 % und 30 %. Erbsenprotein besitzen einen hohen Anteil der Aminosäuren Arginin, Phenylalanin, Leucin, Isoleucin, Tryptophan, Lysin und Threonin. Der hohe Gehalt an Lysin unterscheidet das Erbsenprotein wesentlich von anderen pflanzlichen Proteinquellen (Tömösközi et al. 2001, Tanger et al. 2020), wodurch das Protein gut für eine enzymatische Quervernetzung mittels einer Transglutaminase geeignet ist. Transglutaminasen, auch Protein-Glutamin-γ-Glutamyltransferase genannt, zählt zu den Transferasen (Wang et al. 2018). Eukaryotische Transglutaminasen sind Calcium-abhängig und kommen in Organen wie der Leber und im Blut vor. Seit den 1980er-Jahren ist das Interesse an der technischen Nutzung von Transglutaminasen, vor allem im Lebensmittelbereich, gestiegen. Die Gewinnung der mikrobiellen Transglutaminase (MTG) aus dem Bakterium Streptomyces mobaraensis war eine wichtige Entdeckung hinsichtlich der industriellen Nutzung des Enzyms (Ando et al. 1989). Das aus einer einzigen Polypeptidkette und 331 Aminosäuren bestehende Enzym weist ein Molekulargewicht von 38 kDa auf (Kashiwagi et al. 2002). Im Gegensatz zu den eukaryotischen Vertretern ist die Aktivität der MTG von Calcium-Ionen unabhängig, weniger substratspezifisch und wird von Metallionen beeinflusst (Ando et al. 1989). Die Aktivität des Enzyms ist an einen pH-Bereich von 4 bis 9 gebunden, wobei das

Optimum zwischen 5 und 8 liegt. Weiterhin besitzt die MTG eine breite Aktivitätstoleranz, mit einem Temperaturoptimum von 55 °C, einem vollen Aktivitätsumfang bei 40 °C und sogar nachgewiesenen abgeschwächten Aktivität bei 10 °C (zusammengefasst in Yokoyama et al. 2004). Die MTG benutzt zum Quervernetzen der Proteine eine Acyltransferasereaktion, wobei die γ-Carboxyamid-Gruppe des Glutamin-Rests der Proteine und Peptide als Acyldonator und die ε-Aminogruppe eines primären Amins als Acylakzeptor dient (Abb. 1.1 a). Das primäre Amin wird meistens in Form der Aminosäure Lysin bereitgestellt. Zur Ausbildung einer inter- oder intramolekularen Isopeptidbindung kommt es, wenn die Aminosäure Lysin beteiligt und eine Vernetzung des Proteins stattfindet (Abb. 1.1 b). Ebenso können kleinere glutaminhaltige Peptide mit den Lysin-Resten eines Proteins verknüpft werden. Im Rahmen einer Deamidierung, bei der Wasser als Akzeptor agiert, kann Glutamin in ein Glutaminsäure-Produkt umgewandelt werden (Abb. 1.1 c) (Nieuwenhuizen et al. 2003, Kieliszek und Misiewicz 2014). Die Quervernetzung von Proteinen mittels MTG erfordert demnach einen hohen Gehalt an Glutamin- und Lysin-Resten in den pflanzlichen Proteinquellen, um eine ausreichende Bildung zu erzielen. Eine enzymatische Quervernetzung des Erbsenproteins mit der mikrobiellen Transglutaminase ist bereits in der Literatur beschrieben (Marco et al. 2007), wobei die hohen Anteile der Aminosäuren Glutamin- und Lysin ausschlaggebend sind (Tömösközi et al. 2001).

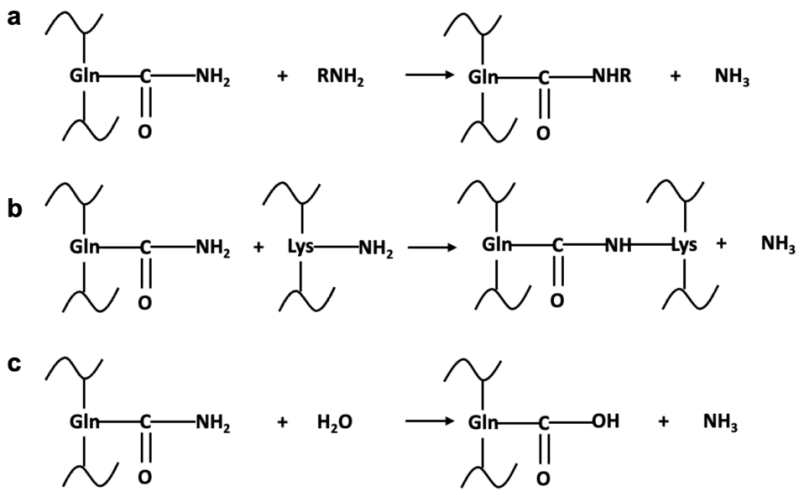

Abbildung 1.1: Quervernetzungsreaktionswege die durch Transglutaminasen katalysiert werden können. a – Acyltransferasereaktion von Acyl-Resten an eine primäre Aminogruppe. b – Isopeptidbindung zwischen ε-Aminogruppe eines Lysin-Rests und γ-Carboxyamidgruppe eines Glutamin-Rests. c – Deamidierung, Wasser dient als Acyl-Akzeptor. (Modifizierte Abbildung nach Kieliszek und Misiewicz 2014)

Das Hauptziel des Projekts ist die Entwicklung eines Soft-Patch-Systems auf der Grundlage einer pflanzlichen Proteinquelle, das als technologische Plattform zur Applikation von Wirkstoffen in spezifischen Körperregionen, wie beispielsweise dem Gesichtsbereich, zur Steigerung der Effizienz und Effektivität von kosmetischen und pharmazeutischen Behandlungsansätzen dienen soll. Kosmetische Mittel wie Ceramide oder andere Phospholipide lassen sich in eine solche technologischen Plattform integrieren und deren Effekt auf die physikochemische Barriere der Haut kann gezielt angewendet werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

In Tabelle 1 sind die verwendeten Chemikalien aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller
Ackerbohnenproteinpulver (Ackerbohnen Protein)	Raab Vitalfood GmbH (Rohrbach, Deutschland)
Basiscreme	Caesar & Loretz GmbH (Hilden, Deutschland)
Erbsen, grün	Müller`s Mühle GmbH
Erbsenproteinpulver (Bio Erbsen Protein)	Alpenpower (eine Marke der Indigo GmbH) (Schärding, Österreich)
Erbsenproteinpulver	Raab Vitalfood GmbH (Rohrbach, Deutschland)
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Hanfproteinpulver (Bio Hanf Protein)	Alpenpower (eine Marke der Indigo GmbH) (Schärding, Österreich)
Kürbiskernproteinpulver (Bio Kürbiskern Protein)	Alpenpower (eine Marke der Indigo GmbH) (Schärding, Österreich)
Lupinenproteinpulver (Lupinen Protein)	Raab Vitalfood GmbH (Rohrbach, Deutschland)
Mikrobielle Transglutaminase (TG Activa® WM)	Ajinomoto Co., Inc. (Hamburg, Deutschland)
Na-Caseinat	BMI eG Landshut
Reisproteinpulver (Bio Reisprotein)	Nurafit GmbH (Bremen, Deutschland)
Rotisol (Ethanol vergällt)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Sonnenblumenpulver (Bio Sonnenblumen Protein)	Alpenpower® (eine Marke der Indigo GmbH) (Schärding, Österreich)
TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Xantural 180 (Xanthan gum)	CP Kelco U.S., Inc. (Atlanta, USA)

2.1.2 Geräte

In Tabelle 2 sind die verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Geräte.

Gerät	Typ	Hersteller
Feinwaage	BP 211S	Satorius (Göttingen, Deutschland)
Geteidemühle	FIDIBUS 21	KOMO GmbH & Co. KG (Itter, Deutschland)
Klimaschrank	Klimaschrank ICH 110	Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland)
pH-Meter	FE20/EL20	Mettler Toledo (Gießen, Deutschland)
Texture Analyzer	CT3-Texture Analyzer	AMETEK GmbH/B.U.Brookfield (Hadamar- Steinbach, Deutschland)
Waagen	BL310 BP211S	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Zentrifugen	AvantiTM J-30I (Rotor JA 10)	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
	5415 R 5424 R 5810 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
	LYNX 6000 Sorvall (Rotor: F9-6x 1000 LEX)	Thermo Scientific (Waltham, U.S.A)
Zentrifugal-Filter-Einheiten	Amicon® Ultra – 15 Centrifugal Filter	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

1.

2.1.3 Puffer und Lösungen

In Tabelle 3 sind die verwendeten Puffer und Lösungen aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Stoffe	Molarität [mol/L]	pH-Wert	Bemerkungen
Substrat-Lösung	Tris Essigsäure Hydroxalammoniumchlorid Reduziertes Glutathion CBZ-Gln-Gly-OH ad DI-Wasser	0,2 1 0,1 0,01 0,01	6	Lagerung bei -20 °C
STOP-Lösung	Chlorwasserstoffsäure Trichloressigsäure Eisen (III)-chlorid-Hexahydrat	3 12 % 5 %		Lagerung bei RT
Tris-HCl Puffer	Tris	0,02	7	

2.2 Methoden

2.2.1 Quervernetzungsuntersuchungen von kommerziell erhältlichen Pflanzenproteinen

Im Rahmen der Untersuchungen wurde die Quervernetzungsfähigkeit von kommerziell erhältlichen Pflanzenproteinpulvern verschiedener Hersteller mittels mikrobieller Transglutaminase getestet.

2.2.1.1 Quervernetzungsversuche von kommerziellen pflanzlichen Proteinen mittels MTG

Für die Quervernetzungsuntersuchungen dienten verschiedene kommerziell erhältliche pflanzliche Proteine, die einen hohen Glutamin- sowie Lysin-Anteil besaßen (Tab. 2.4). Die ausgewählten pflanzlichen Proteinpulver wurden sowohl als Reinsubstanz sowie in Kombination auf ihre Quervernetzungseigenschaften getestet (Tab. 2.4). Zur Testung wurden jeweils 4 g des Proteinpulvers und 1 g MTG mit 50 ml destilliertem Wasser versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde das entstandene Sediment visuell erfasst und auf seine Gelausbildung überprüft.

Tabelle 4: Verwendete kommerziell erhältlichen Proteinpulver. (kA – keine Angaben seitens der Hersteller).

Proteinquelle	Hersteller	Glutamin-Anteil	Lysin-Anteil	Protein-Anteil [%]
Ackerbohne	Raab Vitalfood	kA	9	60
Erbse	Alpenpower	16,7	7,1	85
Erbse	Raab Vitalfood	kA	5,7	80
Hanf	Alpenpower	8,7	2,5	20
Kürbiskern	Alpenpower	10,3	2,1	65
Lupine	Raab Vitalfood	kA	4,6	43
Na-Caseinat (Positivkontrolle)	BMI eG Landshut	17	6,2	kA
Reis	Nur.Fit	15,9	2,4	86
Sonnenblume	Alpenpower	9,5	1,9	52
Erbse + Ackerbohne	-	-	-	-
Erbse + Lupine	-	-	-	-
Erbse + Sonnenblume	-	-	-	-

2.2.1.2 Versuche zur Folienausbildung von kommerziellen pflanzlichen Proteinen mittel MTG

Zur Folienausbildung wurden kommerzielle pflanzliche Proteinpulver mit einem nachweislich hohen Glutamin- und Lysin-Anteil oder insgesamten Proteingehalt ausgewählt. Die in Tabelle 2.5 aufgeführten Zusammensetzungen wurden dabei getestet. Für jede Folie

wurden 6 g Proteinpulver, 3 g Glycerin und 1,5 g MTG in 100 ml DI-Wasser gelöst und in einer 20 cm x 20 cm großen Teflon-Form ausgegossen. Die Folien wurden anschließend für 48 h bei 23 °C unter ständiger Luftzirkulation getrocknet und je nach ihrer Folienausbildungsverhalten aus der Form mit Hilfe eines Spatels gelöst.

Tabelle 5: Ansätze der Folienausbildungsversuche mittels kommerzieller pflanzlicher Proteinpulvern.

Proteinquelle	Protein [g]	Glycerin [g]	MTG [g]	DI-Wasser [ml]
Ackerbohnenprotein	6	3	1,5	100
Erbsenprotein	6	3	1,5	100
Erbsenprotein + Ackerbohnenprotein	3 + 3	3	1,5	100
Na-Caseinat + Erbsenprotein	2 + 4	3	1,5	100
Na-Caseinat (Positivkontrolle)	6	3	1,5	100

2.2.2 Extraktion von Erbsenproteinen aus Trockenerbsen

Für die Extraktion des Erbsenproteins wurden grüne Trockenerbsen in der Getreidemühle gemahlen (Abb. 2.1 A). Die festen Erbsenbestandteile wurden anschließend durch einen Siebvorgang entfernt (Abb. 2.1 B). Zur Fällung des Erbsenproteins wurden 30 g des gemahlenen Trockenerbsenpulvers (Abb. 2.1 C) für 50 min in 500 ml dH_2O quellen gelassen. Anschließend wurden jeweils 150 g der Suspension in ein Zentrifugationsgefäß gegeben und für 5 min bei 5000 g zentrifugiert (Abb. 2.1 D). Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. Zur Vorbereitung der Proteinfällung wurden die insgesamt 450 ml Erbsenüberstandsuspension und 900 ml Ethanol bei -20 °C für 1 h gelagert. Die Fällung des Proteins erfolgte anschließend, indem die gekühlten Lösungen miteinander homogenisiert (Abb. 2.1 E) und im Anschluss für 3 min bei 5000 g zentrifugiert wurden. Der Überstand pro Zentrifugationsgefäß wurde verworfen und das entstandene Pellet in 50 ml Aceton aufgenommen. Die Suspensionen wurden in 20 cm x 20 cm große Teflon-Formen gegossen und das Aceton bei RT unter dem Abzug verdampft (Abb. 2.1 F). Die getrockneten Rückstände konnten anschließend als extrahiertes Erbsenprotein eingesetzt werden.

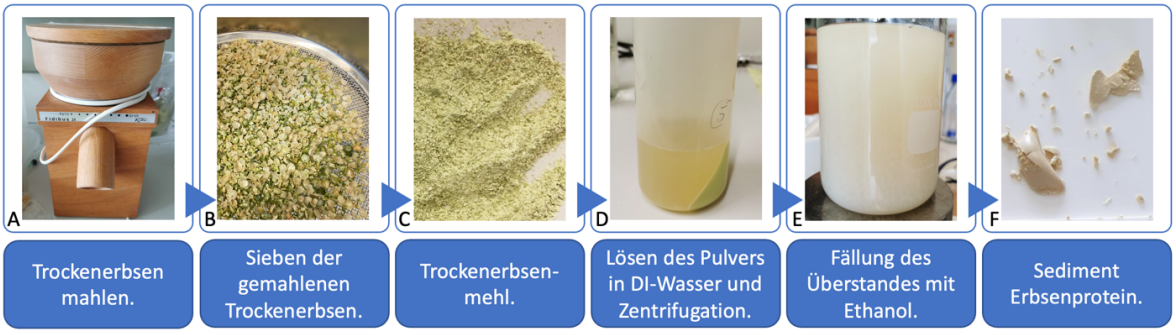

Abbildung 1: Extraktion des Erbsenproteins aus Trockenerbsen.

2.2.3 Quervernetzungsuntersuchungen von Proteinextrakten zur Folienausbildung

Die Quervernetzung des extrahierten Erbsenproteins mittels mikrobieller Transglutaminase zur Ausbildung einer Folie wurde als Reinsubstanz sowie in Mischungen bestehend aus kommerziellen Erbsen- und Lupinenprotein oder Trockenerbsenmehl getestet. Dazu wurden jeweils 6 g Proteinpulver, 5 g 50%iges Glycerin und 1,5 g MTG mit DI-Wasser auf einen Ansatz von 100 g ergänzt (Tabelle 6). Die Proteinsuspension des jeweilen Ansatzes wurde in eine 20 cm x 20 cm große Teflon-Form ausgegossen und anschließend für 48 h bis 96 h bei 23 °C unter ständiger Luftzirkulation getrocknet. Je nach Quervernetzungseigenschaft der Protein-zusammensetzung mittels MTG konnte die Folie danach aus der Form mithilfe eines Spatels gelöst werden.

Tabelle 6: Ansätze für Folienzusammensetzungen aus Proteinextrakten.

Bestandteile	Folie A	Folie B	Folie C	Folie D	Folie E	Folie F	Folie G
Extrahiertes Erbsenprotein [g]	6	-	3	3	3	2	1
Kommerzielles Erbsenprotein [g]	-	-	3	-	-	-	-
Kommerzielles Lupinenprotein [g]	-	-	-	3	-	-	-
Na-Caseinat (Positivkontrolle) [g]	-	6	-	-	-	-	-
Trockenerbsenmehl [g]	-	-	-	-	3	4	5
MTG [g]	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
50%iges Glycerin [g]	5,05	5,02	5,01	5,07	5,04	5	5,04
Destilliertes Wasser [g]	89,05	87,53	87,51	87,64	87,58	87,52	88
Gesamtmasse [g]	**101,6**	**100,05**	**100,02**	**100,21**	**100,12**	**100,02**	**100,54**

2.2.4 Überprüfung der Lagerstabilität der MTG

Zur Überprüfung der Lagerstabilität der mikrobiellen Transglutaminase wurde diese in verschiedenen Darstellungsformen (als Pulver, in Lösung sowie in pastöser Formulierung) charakterisiert. Mit Hilfe des Hydroxamat-Tests, einer kolorimetrischen Methode wurde die Aktivität der MTG zu verschiedenen Zeitpunkten während der Lagerung bestimmt.

2.2.4.1 Hydroxamat-Test

Die Aktivität der mikrobiellen Transglutaminase Activa WM wurde mittels der kolorimetrischen Methode nach Folk und Cole (Folk und Cole 1966) bestimmt. Benzyloxycarbonyl-L-Glutaminglycin, ein artifizielles Dipeptid, dient bei dem Test als Glutaminsubstrat, dass beim Einbau von Hydroxylamin zu Z- g-Glutamyl-Hydroxamat-Glycin umgesetzt wird. Zusammen mit Eisen-(III)-Ionen bildet das entstandene Produkt einen bräunlich-rötlichen Farbkomplex aus, welcher bei einer Wellenlänge von 525 nm photometrisch detektiert werden kann. Die Menge des ausgebildeten Farbkomplexes ist

proportional zur umgesetzten Menge des Dipeptides, welches über eine Kalibrierungskurve quantifiziert werden kann. Äquivalent zur Bildung von 1 µmol Produkt pro Minute steht eine Aktivität von 1 U.
Zur Durchführung des Hydroxamat-Tests wurden jeweils 455 µl Substratlösung (Tabelle 2.3) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 70 µl der zu testenden Enzymlösung zugegeben (2.2.4.2, 2.2.4.3, 2.2.4.4). Die enzymatische Reaktion wurde nach 10 min durch die Zugabe von 525 µl STOP-Lösung beendet. Danach wurde der Reaktionsansatz für 2 min bei 16100 g zentrifugiert und der Überstand in eine Halbmikroküvette überführt. Die Absorption des Reaktionsansatzes und der Referenzprobe wurde bei einer Wellenlänge von 525 nm photometrisch bestimmt. Jede Probe wurde als dreifach Ansatz angefertigt. Als Referenz diente pro Messeinheit eine Probe der ausschließlich 70 µl Tris/HCl-Puffer ohne Enzym zugesetzt wurden. Für jeden Versuchszeitpunkt sowie für jede zu testende Lagerform wurde aus den drei Absorptionswerten ein arithmetischer Mittelwert gebildet, das zur Berechnung der spezifischen Enzymaktivität (A_{spez}) in folgende Gleichung eingesetzt wurde:

$$A_{spez}\left[\frac{U}{mg}\right] = \frac{A_{525\,nm} \times V_{Test}}{\varepsilon \times d \times t \times m_{Enzym}}$$

2.2.4.2 Lagerstabilität der MTG in Lösung

Zur Überprüfung der Lagerstabilität in Lösung, wurde die pulverförmig vorliegende mikrobiellen Transglutaminase in ein Tris-HCl Puffer (pH-Wert: 7,0) aufgenommen. Dazu wurden 500 mg MTG in 100 ml Puffer gelöst. Nach Herstellerangaben besteht das kommerziell erhältliche Enzym zu 99 % aus Maltodextrin und zu 1 % aus einer gereinigten MTG, damit lag das Enzym in Lösung in einer Endkonzentration von 0,05 mg/ml vor. Die Enzymlösung wurde über den gesamten Versuchszeitraum von 22 Tagen bei RT gelagert und dessen initiale Aktivität je Messzeitpunkt mittels Hydroxamat-Tests (Folk und Cole 1966) bestimmt.

2.2.4.3 Lagerstabilität der MTG in Pulverform

Für die Analyse der Lagerstabilität der MTG in Pulverform wurde eine Teilmenge abgefüllt und über den Versuchszeitraum von 61 Tagen bei RT gelagert. Zur Bestimmung der initialen Enzymaktivität nach Folk und Cole (1966) wurde je Messzeitpunkt eine Enzymlösung, nach der unter 2.2.4.2 beschriebenen Methode, mit einer Endkonzentration von 0,05 mg/ml hergestellt.

2.2.4.4 Lagerstabilität der MTG in pastösen Formulierungen

Die Lagerstabilität der mikrobiellen Transglutaminase in pastösen Formulierungen wurde an drei verschiedenen Konzeptionen untersucht: Formulierung I, MTG in 100 % Glycerin; Formulierung II, MTG in einem 1:1 Gemisch aus 50 % Glycerin und 50 % Tris-HCl Puffer (20 mM, pH 7); Formulierung III, MTG in 100 % Polyethylenglykol 300. Für die Herstellung der

drei halbfesten Formulierungen dienten jeweils 1 g MTG und die in Tabelle 7 dargestellten Mengen an Dispersionsmittel. Die hergestellten pastösen Formulierungen wurden über den gesamten Versuchszeitraum von 31 Tagen bei RT gelagert. Mithilfe der unter 2.2.4.2 beschriebenen Methode wurde eine Enzymlösung mit einer Endkonzentration von 0,05 mg/ml hergestellt und dessen Aktivitätsniveau nach Folk und Cole (1966) ermittelt.

Tabelle 7: Zusammensetzungen der pastösen Formulierungen zur Überprüfung der MTG-Enzymaktivität. (Formulierung I - MTG in 100 % Glycerin; Formulierung II - MTG in 1:1 Gemisch aus Glycerin und Tris-HCl Puffer (20 mM, pH 7); Formulierung III - MTG in 100 % PEG 300).

Bestandteile/Pastöse Formulierungen	**I**	**II**	**III**
Glycerin [g]	1,0808		
1:1 Gemisch Glycerin/Tris-HCl Puffer [g]		0,6328	
MTG *Activa* WM [g]	1,0005	1,0004	1,0005
PEG 300 [g]			0,967

2.2.5 Untersuchungen zur pastösen Formulierung von pflanzlichen Proteinen

Ziel der Untersuchungen war die Ermittlung von geeigneten pflanzlichen Proteinextrakten, die sich in eine pastöse Formulierung einbringen und unter Wirkung der mikrobiellen Transglutaminase zu einem Protein-Patch-System entwickeln lassen.

2.2.5.1.1 Pastöse Verarbeitung von pflanzlichen Proteinen und deren enzymatischer Quervernetzung mittels MTG

Die enzymatische Quervernetzung mittels MTG von pflanzlichen Proteinextrakte in pastösen Verarbeitungen wurde anhand von 11 verschiedenen Ansätzen untersucht. Hierfür wurden die Proteinextrakte des extrahierten Erbenproteins, der kommerziellen Erbsen- und Lupinenproteine und des Trockenerbenmehls als Reinsubstanz als auch in Mischungen getestet nach den in Tabelle 8 angegebenen Mengenverhältnissen. Zur Testung der enzymatischen Proteinquervernetzung wurde jeweils 1 g des reinen Proteinextraktes/ der Proteinmischung/ des Proteinmehls, in der in Tabelle 8 angegeben Menge, in Tris-HCl Puffer dispergiert, bis eine halbfeste Konsistenz erreicht war. Die Protein-Tris-HCl Puffer Ansätze wurden für 10 min bei RT quellen gelassen. Auch die MTG wurde in einer entsprechenden Tris-HCl Puffer Menge (Tabelle 8) dispergiert, bis eine viskose Konsistenz vorlag. Anschließend wurden die Ansätze zusammengeführt und für eine Stunde bei RT beobachtet. Im Folgenden wurde Ansatz A bis E für 24 h bei RT und Ansatz F bis K für 96 h bei 4 ° C gelagert. Um die Beständigkeit der Quervernetzung zu testen, wurden alle ausgebildeten Prüfkörper für 15 min bei ca. 45 °C im Wasserbad inkubiert und deren Stabilität dokumentiert.

Tabelle 8: Zusammensetzungen der pastösen Formulierungen zur Überprüfung der Stabilitätseigenschaften der Proteinextrakte. Die Formulierungen bestehend aus: Ansatz A – Extrahierten Erbsenprotein; Ansatz B – Kommerziellen Erbsenprotein; Ansatz C – Kommerziellen Lupinenprotein; Ansatz D – Trockenerbsenmehl; Ansatz E – 1:1 Gemisch aus extrahierten und kommerziellen Erbsenprotein; Ansatz F – 1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein und kommerziellen Lupinenprotein; Ansatz G – 1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein und Trockenerbsenmehl; Ansatz H – 1:2 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein und Trockenerbsenmehl; Ansatz I – 1:1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein, kommerziellen Lupinenprotein und Trockenerbsenmehl; Ansatz J – 1:1:1 Gemisch aus extrahierten und kommerziellen Erbsenprotein und Trockenerbsenmehl; Ansatz K – 1:1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein, kommerziellen Erbsen- und Lupinenprotein wurden jeweils mit MTG sowie einem Tris-HCl Puffer, indem die Proteinextrakte und MTG dispergiert wurden, versetzt.

Bestandteile/Ansatz	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Extrahiertes Erbsenprotein [g]	1				0,5	0,5	0,5	0,33	0,33	0,33	0,33
Kom. Erbsenprotein [g]		1			0,5					0,33	0,33
Kom. Lupinenprotein [g]			1			0,5			0,33		0,33
Trockenerbsenmehl [g]				1			0,5	0,66	0,33	0,33	
MTG [g]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tris-HCl Puffer Proteine [g]	0,87	2,98	1,4	0,99	1,58	1,21	0,88	0,97	1,13	1,4	2
Tris-HCl Puffer MTG [g]	0,23	0,39	0,26	0,38	0,38	0,24	0,21	0,22	0,26	0,25	0,26

2.2.5.2 Formulierungsuntersuchungen zur Ausbildung von pastösen Protein-Patches

Im Rahmen der Formulierungsuntersuchungen wurden pflanzliche Proteinextrakte getestet, die aufgrund ihrer Stabilitätseigenschaften, zur Ausbildung eines pastösen Protein-Patches als geeignet erschienen. Die pastösen Formulierungssysteme bestanden dabei aus rein pflanzlichen Proteinextrakten, die im Weiteren unter Zusatz des Hydrogels Xanthan gum sowie von Basiscreme analysiert wurden.

2.2.5.2.1 Formulierungsversuche von Proteinextrakten zur Ausbildung von pastösen Protein-Patches

Die Ausbildung von pastösen Protein-Patches wurde anhand von geeigneten pflanzlichen Proteinextrakten bzw. Proteinmischungen getestet, die bedingt durch ihre Stabilitätseigenschaften als beständig in pastösen Formulierungsansätzen definiert wurden. In die Untersuchungen miteinbezogen wurden das extrahierte sowie kommerzielle Erbsenprotein als reine Proteinsubstanz und extrahiertes Erbsenprotein in Mischung mit kommerziellen Erbsen- oder Lupinenprotein (Tabelle 9). Als Positivkontrolle wurde Na-Caseinat in das bestehende pastöse Formulierungssystem eingesetzt. Für die Negativkontrolle wurde die mikrobielle Transferase thermisch inaktiviert, um den Einfluss

des enthaltenen Maltodextrins auf die Ausbildung des Protein-Patches zu analysieren. In Tabelle 9 sind die Zusammensetzungen der vier Protein-Patches sowie der Positiv- und Negativkontrolle aufgeführt. Zur Herstellung des Patches wurden die Proteinextrakte bzw. Proteinmischungen in der dafür jeweils angegebenen Menge an Tris-HCl Puffer dispergiert (Tabelle 9) und für 10 min bei RT quellen gelassen. Die MTG wurde parallel dazu in ein 1:1 Gemisch aus Tris-HCl Puffer und Glycerin aufgenommen, bis eine halbfeste Konsistenz vorlag. Im Folgenden wurden beide Ansätze miteinander vermengt und homogenisiert. Die entstandene Proteinmasse wurde in eine Teflon-Form überführt und mittels Rakel glattgestrichen, um eine einheitliche Schichtdicke von 4,8 mm zu erzielen. Zur Ausbildung des Patches wurden die Ansätze für 15 min bei 32 °C und einer 65 % relativen Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach der Entwicklungszeit wurden die Protein-Patches aus der Teflon-Form entnommen und auf eine einheitliche Breite von 25 mm x 25 mm gebracht. Die Stabilität und Bruchfestigkeit der Protein-Patches A bis E wurde mittels Texture Analyzer (Krupa et al. 2010) untersucht. Für die Analyse der Protein-Patch wurde an drei beliebigen Stellen jeweils 2 mm und 3,5 mm tief in die Probe gefahren und die benötigte Kraft aufgezeichnet.

Tabelle 9: Zusammensetzungen der pastösen Protein-Patches. Die Patches bestehend aus: Patch A – Extrahierten Erbsenprotein; Patch B – Kommerziellen Erbsenprotein; Patch C – 1:1 Gemisch aus extrahierten und kommerziellen Erbsenprotein; Patch D – Extrahierten Erbsenprotein und kommerziellen Lupinenprotein; Patch E – Na-Caseinat (Positivkontrolle) und Patch F – Extrahierten Erbsenprotein unter Verwendung einer thermisch inaktiven MTG (Negativkontrolle) wurden jeweils mit MTG (außer Patch F) sowie Tris-HCl Puffer, indem die Proteinextrakte dispergiert, und einem 1:1 Gemisch Tris-HCl Puffer/Glycerin, in welchem die MTG aufgenommen wurde, versetzt.

Bestandteile	Patch A	Patch B	Patch C	Patch D	Patch E	Patch F
Extrahiertes Erbsenprotein [g]	2,5		1,5	1,5		2,5
Kom. Erbsenprotein [g]		1,5	1,5			
Kom. Lupinenprotein [g]				1,5		
Na-Caseinat (Positivkontrolle) [g]					2,5	
MTG [g]	1,25	0,75	1,5	1,5	1,25	1,25
Tris-HCl Puffer Protein [g]	3,28	4,47	5,99	3,93	9,39	3,28
1:1 Tris-HCl Puffer/Glycerin MTG [g]	0,93	0,59	1,12	1,12	0,93	0,93

2.2.5.2.2 Formulierungsversuche von Proteinextrakten zu pastösen Protein-Patches unter Einsatz von Xanthan gum

Die Beständigkeit des pastösen Erbsenprotein-Patch (aus extrahierten Erbsenprotein) wurde unter Verwendung des Hilfsstoffes Xanthan gum getestet. Hierfür wurde ein 3%iges Xanthangel (nach Angaben von Li 2020) in den Formulierungsansätzen bestehend aus 60 % Proteinextrakt und 40 % Xanthan-Anteil sowie 75 % Proteinextrakt und 25 % Xanthan-Anteil begutachtet. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz aus 75 % Na-Caseinat mit 25 % Xanthan-Anteil. Zur Herstellung der Patches wurden zunächst die in Tabelle 10 angegebene Menge an Proteinextrakt in Tris-HCl Puffer dispergiert, wozu anschließend entsprechend der Formulierung Xanthan beigefügt wurde. Die Protein-Xanthan Ansätze wurden für 10 min bei RT quellen gelassen. Parallel dazu wurde die MTG in einem 1:1 Gemisch aus Tris-HCl und Glycerin dispergiert (Tabelle 10). Beide Ansätze wurden miteinander homogenisiert, bevor

diese in eine Teflon-Form überführt und mittels Rakel glattgestrichen wurden, um eine einheitliche Schichtdicke von 4,8 mm zu erzielen. Im Weiteren wurden die Ansätze für 15 min bei 32 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 65 % inkubiert. Die Stabilität und Konsistenz der Patches wurde im Anschluss visuell erfasst und dokumentiert.

Tabelle 10: Zusammensetzungen der pastösen Protein-Patches in Formulierung mit Xanthan gum. Die Patches bestehend aus: Patch X-A – 60 % extrahierten Erbsenprotein und 40 % Xanthan gum; Patch X-B – 75 % extrahierten Erbsenprotein und 25 % Xanthan gum und Patch X-C – 75 % Na-Caseinat (Positivkontrolle) und 25 % Xanthan gum wurden jeweils mit MTG sowie Tris-HCl Puffer, indem die Proteinextrakte dispergiert, und einem 1:1 Gemisch Tris-HCl Puffer/Glycerin, in welchem die MTG aufgenommen wurde, versetzt.

Bestandteile	Patch X-A	Patch X-B	Patch X-C
Extrahiertes Erbsenprotein [g]	1,5	1,5	
Na-Caseinat (Positivkontrolle) [g]			1,5
Xanthan gum [g]	1	0,5	0,5
MTG [g]	1,25	1	1
Tris-HCl Puffer Protein [g]	1,97	1,97	5,64
1:1 Tris-HCl Puffer/Glycerin MTG [g]	0,93	0,75	0,75

2.2.5.2.3 Formulierungsversuche von Proteinextrakten zu pastösen Protein-Patches unter Einsatz von Basiscreme

Die Ausbildung eines pastösen Protein-Patch unter Verwendung von Basiscreme wurde an Formulierungen getestet, die aufgrund ihrer Quervernetzungseigenschaft als beständig definiert wurden. In Tabelle 11 sind die Zusammensetzungen der pastösen Protein-Patches in Formulierung mit Basiscreme aufgeführt. Untersucht wurden Formulierungszusammensetzungen mit 75 % Protein- und 25 % Basiscreme-Anteil. Na-Caseinat wurde als Positivkontrolle in die Untersuchungen miteinbezogen. Extrahiertes und kommerzielles Erbsenprotein wurden als reine Protein-Patch-System in Formulierung mit Basiscreme analysiert. Des Weiteren wurden Proteinmischungen bestehend aus extrahierten Erbsenprotein und kommerziellen Erbsen- oder Lupinenprotein untersucht. Hierfür wurden die eingesetzten Proteinmengen zunächst im einem Tris-HCl Puffer dispergiert und anschließend mit Basiscreme homogenisiert (Tabelle 11), bevor die Protein-Basiscreme-Ansätze für 10 min bei RT quellen gelassen wurden. Die mikrobielle Transferase wurde in einem 4:1 Gemisch aus Tris-HCl Puffer und Glycerin dispergiert (Tabelle 11), bis eine halbfeste Konsistenz vorlag. Beide Ansätze wurden im Anschluss miteinander homogenisiert und die entstandene Proteinmasse zur Aushärtung in eine Teflon-Form überführt. Mittels Rakel wurde die Proteinmasse glattgezogen, sodass eine einheitliche Schichtdicke von 4,8 mm vorlag. Die Protein-Patch-Formulierungen wurden danach für 15 min bei 32 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 65 % inkubiert. Nach der Aushärtung der Protein-Patches wurden diese aus der Teflon-Form und in 25 mm x 25 mm große Stücke geschnitten. Die Bruchfestigkeit und Stabilität der Patches konnte im Anschluss mittels des Texture Analyzers (Krupa et al. 2010) getestet werden. Hierfür wurde in jede Probe jeweils dreimal 2 mm und 3,5 mm tief gefahren und die benötigte Kraft in Newton aufgezeichnet.

Tabelle 11: Zusammensetzung der pastösen Protein-Patches in Formulierung mit Basiscreme. Die Patches bestehend aus: Patch BC-A – Extrahierten Erbsenprotein; Patch BC-B – Kommerziellen Erbsenprotein; Patch BC-C – 1:1 Gemisch aus extrahierten und kommerziellen Erbsenprotein; Patch BC-D – 1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein und kommerziellen Lupinenprotein und Patch BC-E – Na-Caseinat (Positivkontrolle) wurden jeweils mit Basiscreme, MTG sowie Tris-HCl Puffer, indem die Proteinextrakte dispergiert, und einem 4:1 Gemisch Tris-HCl Puffer/Glycerin, in welchem die MTG aufgenommen wurde, versetzt.

Bestandteile	Patch BC-A	Patch BC-B	Patch BC-C	Patch BC-D	Patch BC-E
Extrahiertes Erbsenprotein [g]	1,5	-	0,9	0,9	-
Kom. Erbsenprotein [g]	-	0,9	0,9	-	-
Kom. Lupinenprotein [g]	-	-	-	0,9	-
Na-Caseinat (Positivkontrolle) [g]	-	-	-	-	1,5
Basiscreme [g]	0,5	0,3	0,6	0,6	0,5
MTG [g]	1,25	0,75	1,5	1,5	1,25
Tris-HCl Puffer Proteine [g]	1,97	2,68	3,59	2,36	5,64
4:1 Tris-HCl Puffer/Glycerin MTG [g]	0,79	0,48	0,95	0,95	0,79

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1. Quervernetzungsversuche von pflanzlichen Proteinen mittels MTG

Im Rahmen der Quervernetzungsversuche wurde zum einen die Fähigkeit der Quervernetzung von kommerziell erhältlichen Proteinextrakten (Pulvern) mittels der mikrobiellen Transglutaminase untersucht. Aufgrund ihres hohen Glutamin- und Lysin-Anteil wurden Ackerbohnen-, Erbsen-, Hanf-, Kürbiskern-, Lupinen-, Reis- und Sonnenblumenprotein als Proteinquellen ausgewählt und als Reinsubstanz sowie in Proteinmischungen getestet. In Tabelle 12 sind die Ergebnisse zur Quervernetzungsfähigkeit der kommerziell erhältlichen Proteinextrakte (Pulver) mittels MTG zusammengefasst. Dazu wurden jeweils 4 g des Proteinpulvers und 1 g MTG mit 50 ml DI-Wasser versetzt. Pflanzliche Proteinquellen aus Hanf, Kürbiskern und Reis ließen sich durch die MTG nicht vernetzen und lagen auch nach einer Inkubationszeit von 30 min noch als lösliches Extrakt vor (Tabelle 12). Ein überwiegend lösliches Extrakt bildete das Ackerbohnenproteinpulver und die 1:1 Proteinmischung aus Erbse und Ackerbohne aus (Tabelle 12). Kleinere Gelstücke waren bei dem reinen Einsatz von Lupinen- oder Sonnenblumenprotein sowie der Mischung bestehend aus Erbsen- und Sonnenblumenprotein erkennbar (Tabelle 12). Vollständige Gelstücke, die leicht zu zerkleinern waren, konnten bei beiden getesteten Erbsenproteinpulvern und der 1:1 Proteinmischung aus Erbsen- und Lupinenprotein verzeichnet werden (Tabelle 12). Das eingesetzte Na-Caseinat diente als Positivkontrolle, aufgrund der bereits bekannten Quervernetzungsfähigkeit mithilfe der MTG (Patzsch, 2010), und bildete in dem getesteten Versuchsansatz ein festes Gel aus (Tabelle 12). Zusammenfassend stellen die Erbsen- (beider getesteten Hersteller), Lupinen- und Sonnenblumenproteine sowie die Proteinmischungen bestehend aus Erbsen-, Lupinen- und Sonnenblumenprotein geeignete pflanzliche Proteinquellen dar, die sich unter Verwendung der MTG quervernetzen lassen (Tabelle 12).
Im Weiteren wurde die Folienausbildungseigenschaften von kommerziell erhältlichen Proteinextrakten unter Verwendung der MTG überprüft. Dazu wurde reines Erbsenprotein (der Firma Raab Vitalfood) und Ackerbohnenprotein sowie eine 1:1 Proteinmischung aus Erbsen- und Ackerbohnenprotein getestet. Als Kontrolle wurde Na-Caseinat in einer 1:2 Mischung mit Erbsenprotein eingesetzt, um die Relevanz des vorhandenen Glutamin- und Lysin-Gehaltes zu testen. Des Weiteren wurde reines Na-Caseinat eingesetzt, um den Versuchsansatz zur Folienausbildung zu untersuchen. Die Versuchsansätze bestehend aus 6 g Protein, 3 g Glycerin und 1,5 g MTG wurden in 100 ml DI-Wasser gelöst und in einer Teflon-Form ausgegossen. Nach einer Aushärtungszeit von 48 h konnte eine zusammenhängende Folie nur bei Ansätzen verzeichnet werden die Na-Caseinat enthielten (Abbildung. 2). Reines Erbsen- und Ackerbohnenprotein sowie eine Mischung aus beiden Proteinen führten hingegen zu keinem zusammenhangenden Verband im Sinne einer Folie (Abbildung 2). Demnach benötigt die MTG zur Quervernetzung einen hohen Glutamin- und Lysin-Anteil in der Proteinquelle.

Tabelle 12: Quervernetzungsfähigkeit von kommerziellen pflanzlichen Proteinextrakten (Pulver) mittels MTG. Zur Überprüfung der Gelausbildungseigenschaft wurden 50 g des Proteinpulvers in dH_2O unter Zugabe der MTG gelöst und für 30 min bei RT inkubiert.

Proteinquelle	Hersteller	Glutamin-Anteil	Lysin-Anteil	Quervernetzung mit MTG
Ackerbohne	Raab Vitalfood	kA	9	Überwiegend lösliches Extrakt
Erbse	Alpenpower	16,7	7,1	Gelstücke, leicht zu zerkleinern
Erbse	Raab Vitalfood	kA	5,7	Gelstücke, leicht zu zerkleinern
Hanf	Alpenpower	8,7	2,5	Lösliches Extrakt
Kürbiskern	Alpenpower	10,3	2,1	Lösliches Extrakt
Lupine	Raab Vitalfood	kA	4,6	Kleinere Gelstücke
Na-Caseinat (Positivkontrolle)	BMI eG Landshut	17	6,2	Festes Gel
Reis	Nur.Fit	15,9	2,4	Lösliches Extrakt
Sonnenblume	Alpenpower	9,5	1,9	Kleinere Gelstücke
Erbse + Ackerbohne	-	-	-	Überwiegend lösliches Extrakt
Erbse + Lupine	-	-	-	Gelstücke, leicht zu zerkleinern
Erbse + Sonnenblume	-	-	-	Kleinere Gelstücke

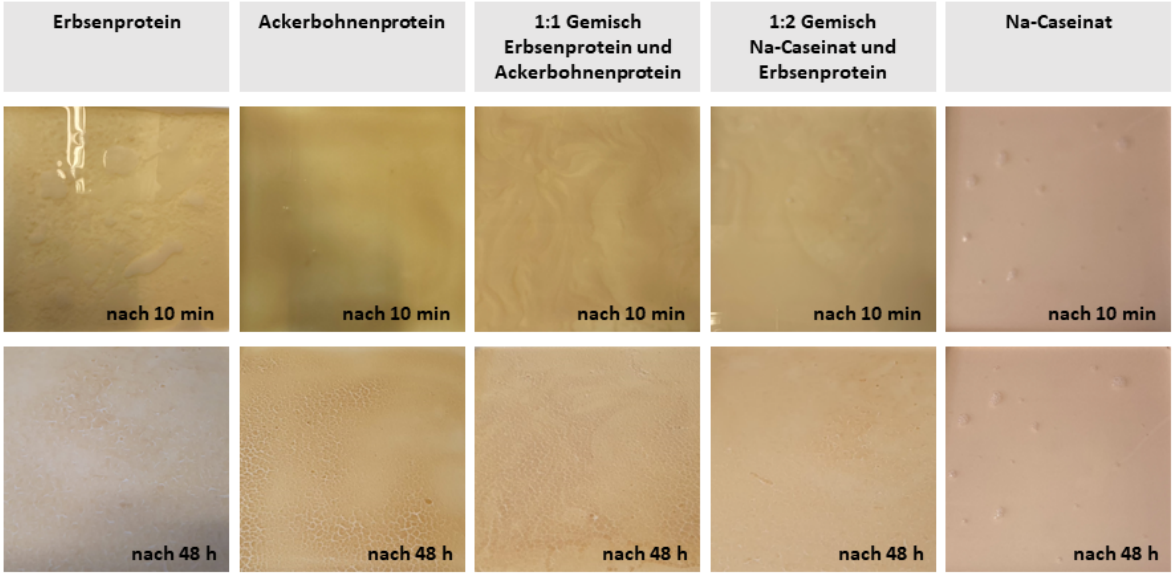

Abbildung 2: Quervernetzungsuntersuchungen zur Ausbildung einer Folie von kommerziell erhältlichen Proteinextrakten mittels MTG. Pflanzliche Proteinfolien bestehend aus: Erbsenprotein, Ackerbohnenprotein, 1:1 Gemisch aus Erbsenprotein und Ackerbohnenprotein, 1:2 Gemisch aus Na-Caseinat und Erbsenprotein und Na-Caseinat (Positivkontrolle) wurden mit Glycerin und MTG in DI-Wasser dispergiert und zur Aushärtung (48 h unter Luftzirkulation) in eine Teflon-Form gegossen. Die Folienbildungseigenschaft wurde anschließend dokumentiert.

Um den Proteingehalt und damit den Glutamin- und Lysin-Anteil im Proteinextrakt zu erhöhen, wurden Erbsenprotein aus Trockenerbsen extrahiert. Aus 50 g Trockenerbsenmehl konnten durchschnittlich 9 g Erbsenprotein gefällt werden. In einem erneuten Folienbildungsversuch wurde das extrahierte Erbsenprotein als Reinsubstanz und in Kombination mit kommerziellen Erbsen- und Lupinenprotein sowie Trockenerbsenmehl eingesetzt. Na-Caseinat fungierte als Positivkontrolle zur Testung des Versuchsansatzes. Alle Versuchsansätze bestanden aus 6 g Protein, 5 g 50%iges Glycerin, 1,5 g MTG die in 87,5 ml DI-Wasser gelöst wurden. In diesem Folienbildungsversuch wurde der Glycerin-Gehalt reduziert, da die zuvor gegossenen, Na-Caseinat enthaltenen, Folien eine starke Klebrigkeit aufwiesen. Bei alle Versuchsansätze konnten Folien ausgebildet werden, die sich jedoch in ihrer Konsistenz und Beschaffenheit unterschieden. Folien, die einen Anteil an Trockenerbsenmehl enthielten, waren sehr dünn in ihrer Ausprägung und ließen sich nur stückweise aus der Teflon-Form lösen (Abbildung 3 Folie E-G). Im Gegensatz dazu, besaßen Folien die aus reinen extrahierten Erbsenprotein (Folie A) sowie Proteinmischungen aus kommerziellen Erbsen- (Folie C) und Lupinenprotein (Folie D) bestanden, eine dicke Ausprägung, feste Konsistenz und ließen sich im gesamten aus der Teflon-Form entnehmen (Abbildung 3). Auch die Positivkontrolle bestehend aus Na-Casein erzielte eine dicke Ausprägung mit fester Konsistenz (Abbildung 3, Folie B).

Die Quervernetzungsuntersuchungen haben gezeigt, dass kommerziell erhältliche pflanzliche Proteinextrakte (Pulver) einen zu geringen Anteil der Aminosäuren Glutamin- und Lysin aufweisen und nur in Kombination mit gefällten Erbsenprotein oder dem industriell gewonnenen Na-Caseinat durch die MTG quervernetzt werden können. Versuchsansätze aus reinen extrahierten Erbsenprotein bildeten stabile zusammenhangende Folie mit fester Konsistenz aus (Abbildung 3). In Proteinmischungen erwiesen sich kommerzielles Erbsen- und Lupinenprotein, aufgrund ihrer guten Gelbildungseigenschaften (Tabelle 12), als geeignete Proteinzusätze zum extrahierten Erbsenprotein zur Ausbildung einer Proteinfolie.

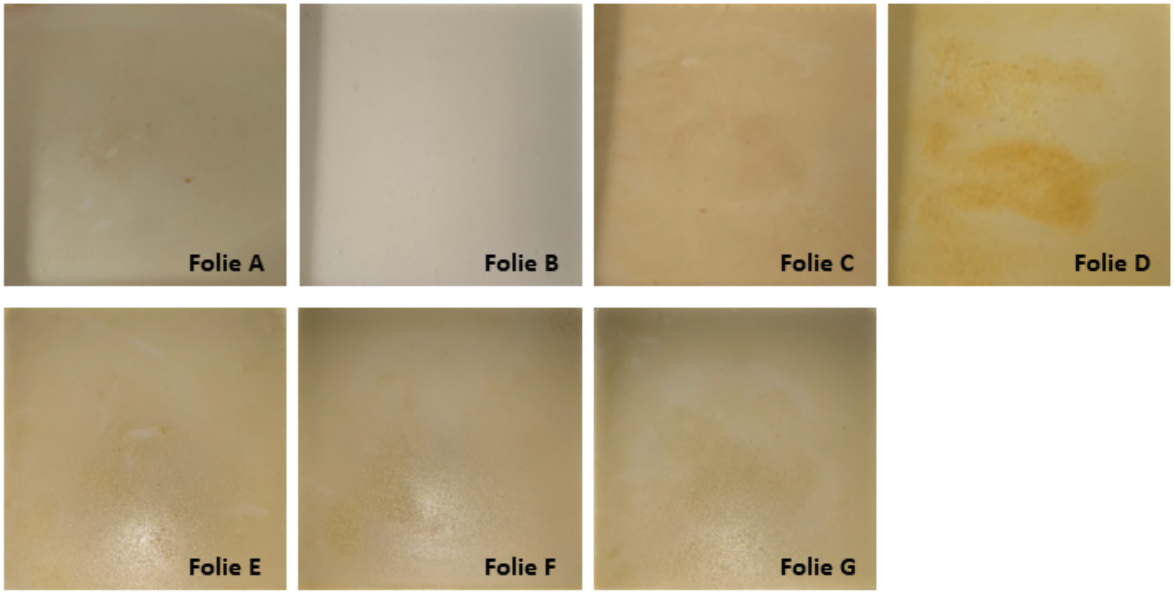

Abbildung 3: Quervernetzungsuntersuchungen zur Ausbildung einer pflanzlichen Proteinfolie mittels MTG. Pflanzlichen Proteinfolien bestehend aus: Folie A – Extrahierten Erbsenprotein; Folie B – Na-Caseinat (Positivkontrolle); Folie C – 1:1 Gemisch aus extrahierten und kommerziellen Erbsenprotein; Folie D – 1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein und kommerziellen Lupinenprotein; Folie E – 1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein und Trockenerbsenmehl; Folie F – 1:2 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein und Trockenerbsenmehl; Folie G – 1:5 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein und Trockenerbsenmehl wurden mit 50%igen Glycerin und MTG in DI-Wasser dispergiert und zur Aushärtung (48 h unter Luftzirkulation) in eine Teflon-Form gegossen. Die Folienbildungseigenschaft wurde anschließend dokumentiert.

3.2 Lagerstabilität der MTG Activa WM

Die Stabilität der mikrobiellen Transglutaminase Activa WM wurde in verschiedenen Lagerformen untersucht, um eine geeignete Einsatzweise zu finden, in der die MTG eine zielgerichtete Quervernetzung der Proteine erbringt. Getestet wurde die Aktivität der MTG in Lösung, als Pulver und in drei verschiedenen pastösen Formulierungen über einen definierten Zeitraum.
Für die Aktivitätsbestimmung der MTG in Lösung wurden das Enzympulver in einen Tris-HCl Puffer aufgenommen und über 22 Tage bei RT gelagert. Pro Messzeitpunkt wurde eine Probe aus der Stammlösung entnommen und das Aktivitätsniveau des Enzyms bestimmt. Zum Zeitpunkt 0 lag eine Enzymaktivität von 17,1 U/mg vor (Abbildung 4). Die Hälfte der Enzymaktivität war nach 8 Tagen erreicht und betrug rund 8 U/mg (Abbildung 4). Bis zum Messzeitpunkt an Tag 15 nahm das Aktivitätsniveau kontinuierlich ab (Abbildung 4). Zwischen den Messtagen 15 und 18 stagnierte die Enzymaktivität im Bereich zwischen 3 und 4 U/mg (Abbildung 4). Nach 22 Tagen war ein Aktivitätsniveau von 2,2 U/mg erreicht (Abbildung 4). Daraus ergibt sich ein Aktivitätsverlust der MTG in Lösung von 87,3 % über einen Lagerzeitraum von 22 Tagen.

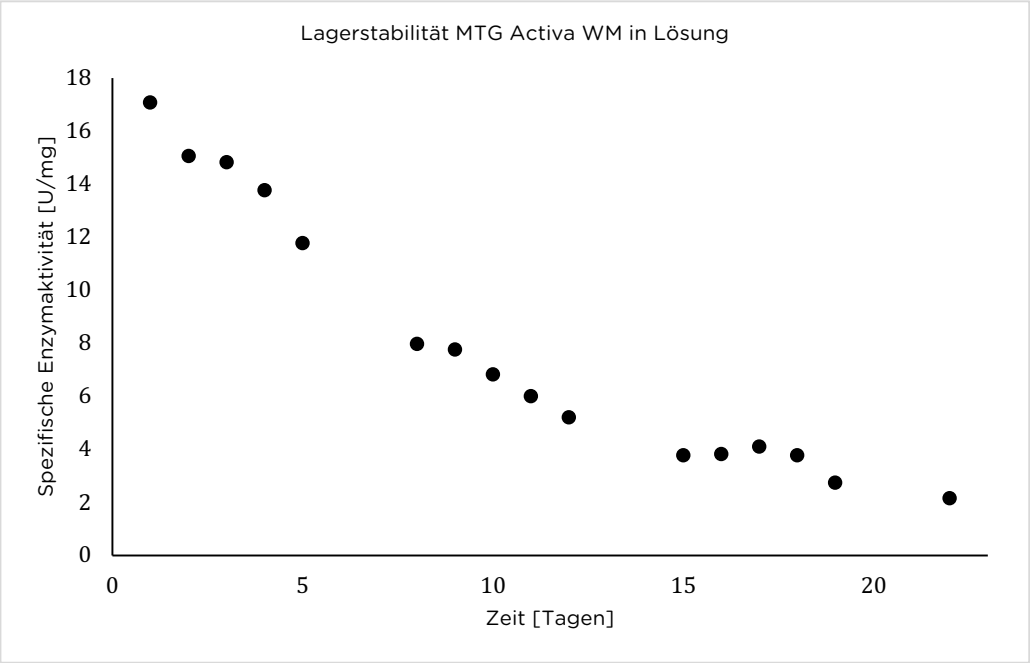

Abbildung 4: Lagerstabilität der MTG Activa WM in Lösung bei Raumtemperatur. Mittels des Hydroxamat-Tests nach Folk und Cole (1966) wurde die spezifische Enzymaktivität der MTG in Lösung (gelöst ein Tris HCl-Puffer) ermittelt. Über einen Versuchszeitraum von 22 Tagen wurde die Lösung bei RT gelagert und dessen spezifische Aktivität zu definierten Zeitpunkten bestimmt. Zur Durchführung des Hydroxamat-Tests wurde die Lösung in einen Tris-HCl Puffer aufgenommen und zu einer Endkonzentration von 0,05 mg Enzym je ml verdünnt.

Des Weiteren wurde die Enzymaktivität der MTG in Pulverform bestimmt. Hierfür wurde das Enzympulver über einen Zeitraum von 61 Tagen bei RT gelagert und dessen Aktivitätsniveau zu den entsprechenden Messzeitpunkten ermittelt. Als Ausgangswert wurde eine Enzymaktivität von 17,1 U/mg bestimmt (Abbildung 5). In den ersten 20 Tagen des Versuchszeitraums nahm die Aktivität des Enzyms, mit Abweichungen von 1 bis 2 U/mg, kontinuierlich ab und lag zum an Tag 19 bei 14,1 U/mg (Abbildung 5). Zwischen den Messtagen 22 und 32 kam es zum Abfall des Aktivitätsniveaus auf durchschnittlich 9 U/mg (Abbildung 5). Wie die eingezeichnete Trendlinie in Abbildung 5 aufzeigt, wäre ein Enzymaktivität von rund 12 U/mg nach der Hälfte der Versuchszeit (Tag 32) zu erwarten gewesen. Zum Messzeitpunkt an Tag 33 stabilisierte sich die nachgewiesene Aktivität wieder auf ein Niveau von 12,1 U/mg (Abbildung 5). Im weiteren Verlauf des Versuchs sank die Aktivität des Enzyms langsam auf einen Wert von 9,7 U/mg (Tag 61, Abbildung 5). Ohne Einschließung der Messergebnisse zwischen Tag 22 und 32 konnte eine Aktivitätsabnahme des Enzyms bei einer Lagerung als Pulver von 43,6 % im Rahmen der Versuchsdurchführung ermittelt werden. Die Messergebnisse im Zeitraum zwischen Tag 22 und 32 beruhen möglicherweise auf einen Fehler in der Durchführung des Nachweisversuchs, da sich das Aktivitätsniveau des Enzyms ab Tag 33 wieder entlang der aufgeführten Trendlinie bewegte (Abbildung 5).

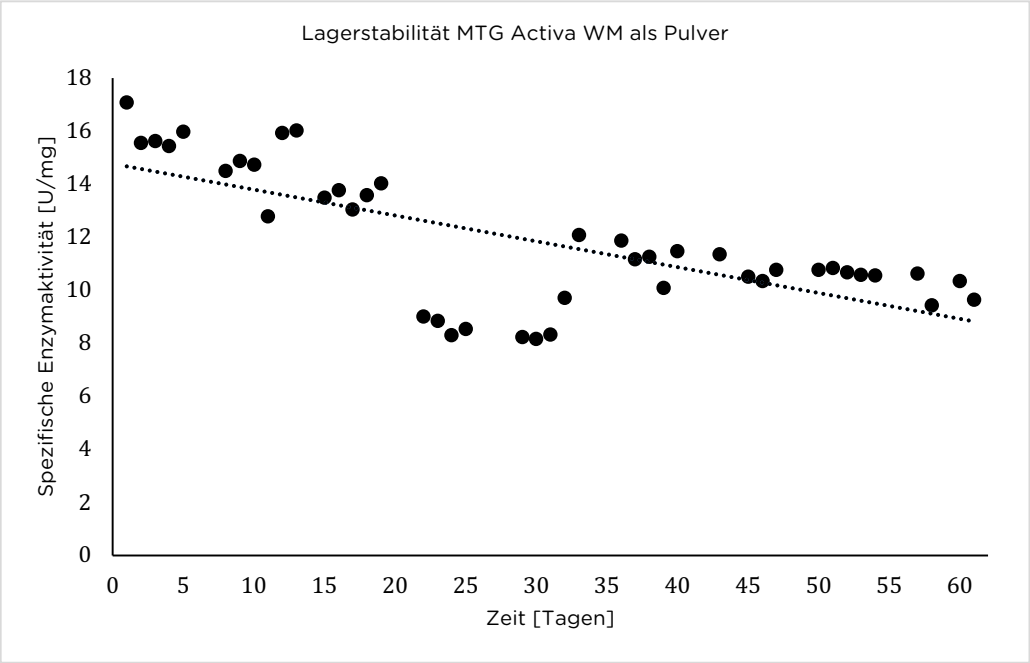

Abbildung 5: Lagerstabilität der MTG Activa WM als Pulverform bei Raumtemperatur. Mittels des Hydroxamat-Tests nach Folk und Cole (1966) wurde die spezifische Enzymaktivität der MTG in Pulverform ermittelt. Über einen Versuchszeitraum von 61 Tage wurde das Pulver bei RT gelagert und dessen spezifische Aktivität zu definierten Zeitpunkten bestimmt. Zur Durchführung des Hydroxamat-Tests wurde das Pulver in einen Tris-HCl Puffer aufgenommen und zu einer Endkonzentration von 0,05 mg Enzym je ml verdünnt.

Die Lagerstabilität der MTG in pastösen Formulierungen wurde anhand von drei verschiedenen Konzeptionen getestet. Hierzu wurde jeweils 1 g MTG mit 100 % Glycerin, einem 1:1 Gemisch aus Tris-HCl Puffer und Glycerin und 100 % Polyethylenglykol (PEG 300) versetzt, bis eine pastöse Formulierung vorlag. Im Weiteren wurden die zubereiteten Formulierungen für 31 Tage bei RT gelagert und dessen Aktivitätsniveau zu definierten Zeitpunkten erfasst.
Die in 100 % Glycerin aufgenommene MTG wies zum Zeitpunkt 0 ein Aktivitätsniveau von 13,5 U/mg aus (Abbildung 6). Wie aus Abbildung 6 zu entnehmen ist, sank die Enzymaktivität bis zur Hälfte des Versuchszeitraums (Tag 15 und 16) auf durchschnittlich 8,7 U/mg in einer pastösen Formulierung aus 100 % Glycerin (Abbildung 6). Im Folgenden Verlauf nahm die Enzymaktivität der MTG nicht kontinuierlich bis zum Ende des Messintervalls ab, sondern bewegte sich im Bereich zwischen 8,4 U/mg (Tag 24) und 10,6 U/mg (Tag 21) (Abbildung 6). Am Ende des Versuchszeitraums an Tag 31 lag ein Aktivitätsniveau der MTG in 100 % Glycerin von 7,8 U/mg vor, sodass insgesamt ein Aktivitätsverlust von 41,9 % verzeichnet werden konnte (Abbildung 6).
Eine weitere pastöse Formulierung bestand aus einem 1:1 Gemisch aus Tris-HCl und Glycerin, in welchem die MTG über 31 Tage lang gelagert wurde. Die Messungen starteten mit einem Aktivitätsniveau der MTG von 14,3 U/mg (Abbildung 6) Bis zur Hälfte der Messaufzeichnungen nahm die Aktivität der MTG um durchschnittlich 21 %, auf einem Wert von 11,27 U/mg, ab (Abbildung 6). Nach 31 Tagen besaß die MTG eine Enzymaktivität von 9,4 U/mg (Abbildung 6). Insgesamt nahm die Aktivität des Enzyms in dem Puffer-Glycerin Gemisch über den gesamten Versuchszeitraum um 34,5 % ab (Abbildung 6). Die einzelnen

Messergebnisse zeigen jedoch auf, dass die Aktivität des Enzyms im Puffer-Glycerin Gemisch nicht kontinuierlich mit fortlaufender Versuchszeit abnimmt (Abbildung 6).
Die Aktivität der MTG wurde auch bei einer Lagerung in dem Konservierungsstoff PEG 300 bestimmt. Diese wies ein anfängliches Niveau von 13,7 U/mg auf und nahm danach bis zum Messtag 6, auf einen Wert von 10,5 U/mg, kontinuierlich ab (Abbildung 6). Für die in PEG gelagerte MTG konnten zwischen den Messtagen 7 und 16 erhöhte Aktivitätsniveaus von bis zu 13,7 U/mg (Tag 8) ermittelt werden (Abbildung 6). An Tag 16, der Hälfte der Versuchszeit, besaß die MTG eine nachgewiesene Aktivität von 10,6 U/mg (Abbildung 6). Im weiteren Verlauf bewegten sich die ermittelten Enzymaktivitätswerte im Bereich zwischen 8,9 U/mg (Tag 27) und 11,2 U/mg (Tag 23) (Abb. 3.5). Zum Ende des Versuchszeitraums wies die in PEG 300 gelagerte MTG noch eine Aktivität von 8,9 U/mg auf (Abbildung 6), sodass folglich über den gesamten Messzeitraum ein Aktivitätsverlust von 35,4 % bestimmt werden konnten.
Die drei pastösen Formulierungen wiesen zu Messbeginn eine durchschnittliche Enzymaktivität von 13,8 U/mg (Abbildung 6). Ebenso zeigte die MTG in allen Formulierungen ein Endaktivitätsniveau von rund 8,6 U/mg, wobei die im Gemisch aus Tris-HCl Puffer und Glycerin gelagerte MTG die höchste Endaktivität von 9,3 U/mg aufwies (Abbildung 6). Demnach zeigte die in dem Puffer-Glycerin Gemisch gelagerte MTG mit 34,5 % den geringsten Aktivitätsabfall über den gesamten Versuchszeitraum hinweg und die in reinem Glycerin aufgenommene MTG mit 41,9 % den stärksten Aktivitätsverlust (Abbildung 6), sodass eine durchschnittliche Aktivitätsminderung in pastösen Formulierungen von 37,3 % in 31 Tagen Lagerzeit bei RT verzeichnet werden konnte. Auffällig bei allen pastösen Formulierungen waren die mitunter starken Abweichungen zwischen den einzelnen Messergebnissen, die wahrscheinlich auf die Herstellung der pastösen Zusammensetzungen zurückzuführen sind. Es muss davon ausgegangen werden, dass sich die MTG nicht gleichmäßig in der entsprechenden Formulierung verteilen ließ.
Insgesamt betrachtet zeigten die Lagerstabilitätsversuche der MTG in Lösung, als Pulver und in pastösen Formulierungen, dass eine Lagerung der MTG in Pulverform aufgrund der geringen Aktivitätsabnahme über einen langen Zeitraum hinweg als geeignet erscheint für die Einbringung in spätere Produkte. In der Kosmetikindustrie wird Glycerin standartmäßig in Formulierungen verwendet (Steinberner et al. 1987), weshalb ein Einsatz der MTG in einer pastösen Formulierung aus Glycerin ebenso in Betracht kommen könnte. Auch Polyethylenglykole (PEGs), wie das in dieser Studie verwendete PEG 300, und ihre anionischen oder nichtionischen Derivate werden in der Kosmetik als Tenside, Reinigungsmittel, Emulgatoren, Hautpflegemittel und Feuchthaltemittel eingesetzt. Zudem zeigte die in PEG gelagerte MTG nur einen Aktivitätsverlust von 35,4 % im Zeitraum von 31 Tagen, sodass ein kommerzieller Einsatz des Enzyms in dem Koservierungsstoff ebenfalls vorteilhalft wäre.

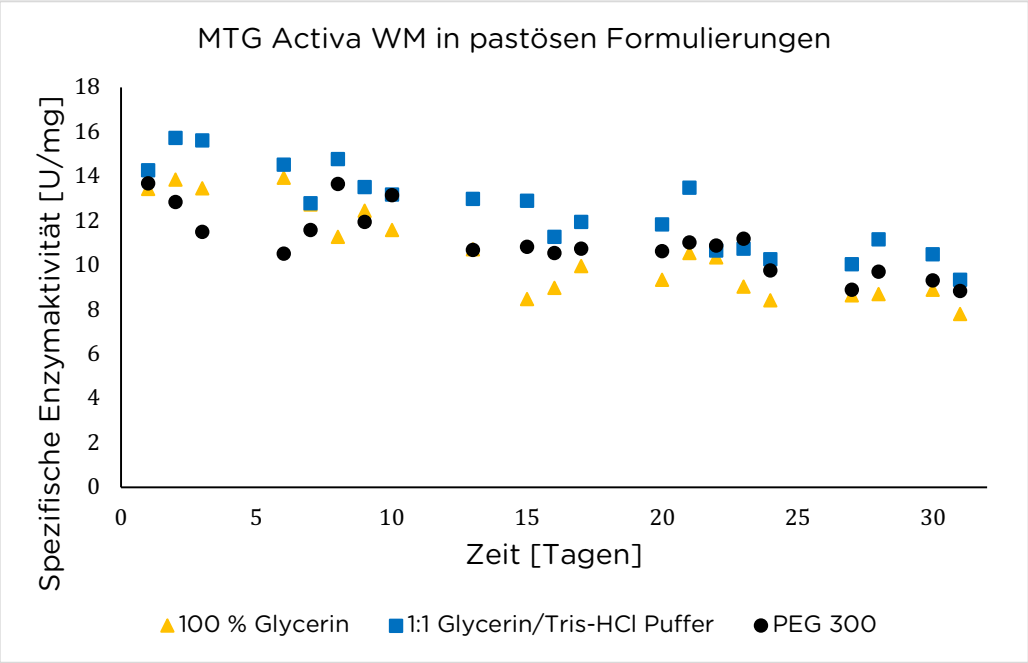

Abbildung 6: Lagerstabilität der MTG Activa WM in pastösen Formulierungen bei Raumtemperatur. Mittels des Hydroxamat-Tests nach Folk und Cole (1966) wurde die spezifische Enzymaktivität der MTG in pastösen Formulierungen bestehend aus 100 % Glycerin, einem 1:1 Gemisch aus Glycerin und Tris-HCl Puffer und PEG 300 ermittelt. Über einen Versuchszeitraum von 31 Tage wurden die pastösen Formulierungen bei RT gelagert und die spezifische Aktivität zu definierten Zeitpunkten bestimmt. Zur Durchführung des Hydroxamat-Tests wurden die pastösen Formulierungen in einen Tris-HCl Puffer aufgenommen und zu einer Endkonzentration von 0,05 mg Enzym je ml verdünnt.

3.3 Formulierungsuntersuchungen zur Ausbildung eines pastösen Protein-Patches

Ziel der Untersuchungen war die Ermittlung von geeigneten pflanzlichen Proteinextrakten, die sich in eine pastöse Formulierung einbringen und unter Wirkung der mikrobiellen Transglutaminase zu einem Protein-Patch-System quervernetzen lassen.
Zunächst wurden verschiedene Prüfkörper-Ansätze getestet, um die pastöse Verarbeitung von pflanzlichen Proteinen und deren enzymatischer Vernetzung mittels MTG zu testen. Zur Herstellung eines Prüfkörpers wurde jeweils 1 g eines reinen Proteinextraktes, einer Proteinmischung oder des Proteinmehls in einem Tris-HCl Puffer dispergiert, bis eine halbfeste Konsistenz vorlag. Anschließend wurden der Ansatz mit einer in Tris-HCl dispergierten MTG homogenisiert und je nach Zusammensetzung für 24 h bis 96 h bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert. Die Beständigkeit der Proteinvernetzung in einer pastösen Grundlage wurde danach im Wasserbad überprüft. In Abbildung 7 sind die Prüfkörper der einzelnen Untersuchungsansätze zusammengefasst dargestellt. Alle Prüfpräparate wiesen eine unterschiedliche Struktur, Konsistenz, Farbe und Stabilität auf. Prüfkörper die im Wasserbad beständig blieben bestanden aus: extrahierten Erbsenprotein, kommerziellen Erbsenprotein sowie einem 1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein und kommerziellen Erbsen- oder Lupinenprotein (Abbildung 7). Der Prüfkörper aus reinem extrahierten Erbsenprotein (Ansatz A) wies eine inhomogene Konsistenz und bröcklige Struktur auf, sodass einzelne Gelstücke erkennbar waren. Er besaß eine leicht gelbliche Färbung und sein Volumenanteil gegenüber dem der anderen Prüfkörper war größer. Bei

Druckbelastung trat Flüssigkeit aus, weshalb der Prüfkörper insgesamt nicht sehr beständig war (Abbildung 7, Ansatz A). Prüfkörper aus reinem kommerziellen Erbsenprotein (Ansatz B) verfügten über eine homogene Konsistent und wiesen eine beige Farbe auf. Bei Druckbelastung bot der Prüfkörper mehr Stabilität (Abbildung 7, Ansatz B) als der Körper aus reinen extrahierten Erbsenprotein (Abbildung 7, Ansatz A). Ähnliche Eigenschaften in Konsistenz, Farbe und Stabilität konnte auch für den Prüfkörper bestehend aus einem 1:1 Gemisch von extrahierten und kommerziellen Erbsenprotein dokumentiert werden (Abbildung 7, Ansatz E). Das 1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein und kommerziellen Lupinenprotein setzte einen Prüfkörper zusammen, der eine krümligere Konsistenz aufwies und auch weniger stabil bei Druckbelastung war (Abbildung 7, Ansatz F). Die Farbe des Prüfpräparates war bedingt durch das eingesetzte Lupinenprotein gelblich (Ansatz F). Prüfkörper die im Wasserbad zerfielen und aufgrund dessen als nicht stabil eingestuft wurden bestanden aus kommerziellen Lupinenprotein, Trockenerbsenmehl, einem 1:1 oder 1:2 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein und Trockenerbsenmehl, einen 1:1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein und Trockenerbsenmehl versetzt mit kommerziellen Erbsen- oder Lupinenprotein sowie einem 1:1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein, kommerziellen Erbsen- und Lupinenprotein (Abbildung 7). Der Prüfkörper aus reinem kommerziellen Lupinenprotein besaß eine krümlige Konsistenz, gelbe Farbe und war instabil bei Druckausübung (Abbildung 7, Ansatz C). Alle Prüfpräparate die reines Trockenerbsenmehl enthielten waren instabil bei Druckbelastung und wiesen eine klebrige Grundkonsistenz auf (Abbildung 7, Ansatz D, G, H, I, J). Das 1:1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein, kommerziellen Lupinenprotein und Trockenerbsenmehl zeigte zudem eine krümlige Gesamtstruktur, die wahrscheinlich auf das enthaltene Lupinenprotein zurückzuführen ist (Abbildung 7, Ansatz I). Alle Trockenerbsenmehl enthaltenen Prüfkörper besaßen eine grüne (Ansatz D) bis leicht grünliche (Ansatz G, H) und sogar grün-gelblich (Ansatz I, J) Farbgebung (Abbildung 7). Das Prüfpräparat des 1:1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein und kommerziellen Erbsen- und Lupinenprotein war ebenso instabil bei Druckausübung, gelblich in seiner Farbgebung und zeigte eine klebrige und krümlige Grundkonsistenz ähnlich wie Ansatz I (Abbildung 7, Ansatz K).
Zur Ausbildung eines Soft-Patch-Systems konnten nur Prüfkörper-Ansätze verwendet werden die in ihrer Grundkonsistenz stabil, druckunempfindlich und auch unter Warmwasser Inkubation beständig blieben. Folglich schieden alle anderen Untersuchungsansätze aus den weiteren Versuchen aus.

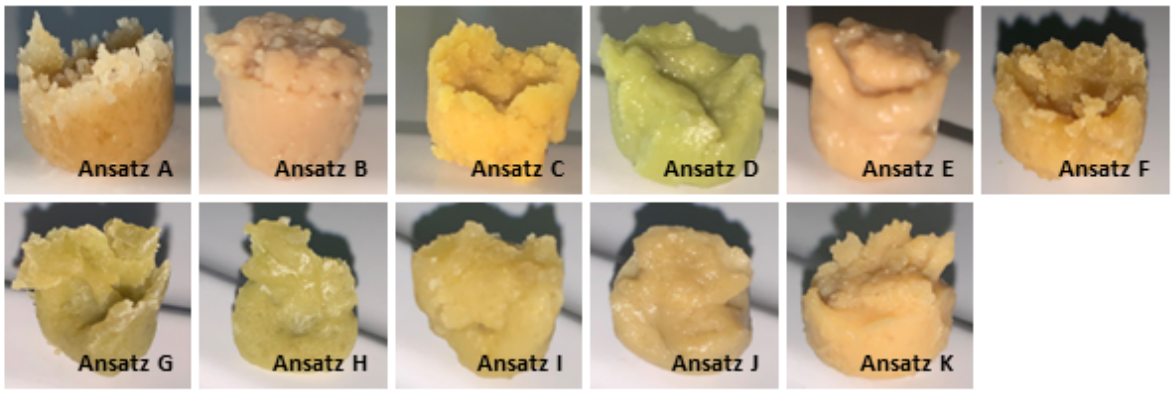

Abbildung 7: Prüfkörper aus pflanzlichen Proteinextrakten in pastösen Formulierungen. Die Formulierungen bestehend aus: Ansatz A – Extrahierten Erbsenprotein; Ansatz B – Kommerziellen Erbsenprotein; Ansatz C – Kommerziellen Lupinenprotein; Ansatz D – Trockenerbsenmehl; Ansatz E – 1:1 Gemisch aus extrahierten und kommerziellen Erbsenprotein; Ansatz F – 1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein und kommerziellen Lupinenprotein; Ansatz G – 1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein und Trockenerbsenmehl; Ansatz H – 1:2 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein und Trockenerbsenmehl; Ansatz I – 1:1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein, kommerziellen Lupinenprotein und Trockenerbsenmehl; Ansatz J – 1:1:1 Gemisch aus extrahierten und kommerziellen Erbsenprotein und Trockenerbsenmehl; Ansatz K – 1:1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein, kommerziellen Erbsen- und Lupinenprotein wurden jeweils mit MTG sowie einem Tris-HCl Puffer, indem die Proteinextrakte und MTG dispergiert wurde, versetzt. Beständigkeit der Stabilitätseigenschaften aller Prüfkörper wurden nach Lagerung von Ansatz A bis E für 24 h bei RT und Ansatz F bis K für 96 h bei 4 °C überprüft und dokumentiert.

Die pastösen Formulierungsansätze bestehend aus extrahierten Erbsenprotein, kommerziellen Erbsenprotein sowie extrahierten Erbsenprotein in einem 1:1 Gemisch mit kommerziellen Erbsen- oder Lupinenprotein wurden zur Protein-Soft-Patch Ausbildung eingesetzt. Hierfür wurden der Proteinextrakt bzw. die Proteinmischung in einem Tris-HCl Puffer dispergiert, bis eine halbfeste Konsistenz vorlag und zusammen mit der in einem 1:1 Gemisch aus Tris-HCl Puffer und Glycerin aufgenommen MTG homogenisiert und in einer Teflon-Form ausgegossen. Als Positivkontrolle der Soft-Patch-Bildungsversuche wurde Na-Caseinat verwendet. Um die Bedeutung des in dem Pulver der mikrobiellen Transglutaminase enthaltenen Maltodextrins zu untersuchen, wurde das einzusetzende Pulver thermisch inaktiviert und fungierte somit als Negativkontrolle. Alle Soft-Patches wurden anschließend in Bezug auf ihre Struktur, Elastizität und Farbgebung subjektiv begutachtet und deren Bruchfestigkeit und Stabilität mittel des Texture Analyzers (Krupa et al. 2010) bestimmt. Das aus reinem extrahierten Erbsenprotein gebildete Patch A war druckstabil, elastisch, bruchfest und verformte sich nicht bei händischen Krafteinwirkungen (Abbildung 9, Patch A). Es besaß eine beige Farbe und wies eine klebrige Konsistenz auf (Abbildung 9, Patch A). Mittels der Texture Analyzer Analyse konnte bei einer Eindringtiefe von 2 mm eine maximale Kraft von ca. 2,5 N ermittelt werden (Tabelle 13). Wie die drei Messungen aufzeigten, stieg die Krafteinwirkung proportional zur Eindringtiefe an, was auf eine volle Elastizität und Stabilität der Probe A schließen ließ (Abbildung 9, Patch A). Auch beim Herausziehen des Druckbeils fielen die Verläufe aller drei Kurven proportional zur Eindringtiefe ab (Abbildung 9, Patch A). Bei einer Eindringtiefe von 3,5 mm wurde eine maximale Krafteinwirkung von 3,5 N bis 4,0 N festgestellt (Tabelle 13). Anhand der Kurvenverläufe aller drei Messstellen wurde deutlich, dass bei einer Eindringtiefe von 2,5 mm

bis 3 mm und einer Krafteinwirkung von 3,5 N bis 4,0 N das Patch A brach, da danach alle Kurvenverläufe abfielen (Abbildung 9, Patch A). Das Protein-Patch B bestehend aus kommerziellen Erbsenprotein wies eine bröcklige, klebrige und inhomogene Konsistenz auf (Abbildung 8, Patch B). Bei händischer Krafteinwirkung trat Flüssigkeit aus dem beigen Soft-Patch B aus, dass jedoch in Form blieb (Abbildung 8, Patch B). Die maximale Kraft konnte bei einer Eindringtiefe von 2 mm zwischen 1,25 N und 1,5 N erzielt werden (Tabelle 13). Anhand der Kurvenverläufe wurde deutlich, dass die Graphen aller drei Messstellen nicht vollständig bis zum Erreichen einer Eindringtiefe von 2 mm anstiegen, sondern bereits im Bereich zwischen 1,25 N und 1,75 N stagnierten (Abbildung 9, Patch B). An diesem Punkt verlor die Probe ihre Stabilität und der Bruch des Patches begann. Die Elastizität der Probe blieb jedoch bestehen, da beim Herausziehen des Druckbeil die Kurvenverläufe der Messstellen rückläufig zum Ausgangswert abfielen (Abbildung 9, Patch B). Wie die Analyse bei einer Eindringtiefe von 3,5 mm zeigte, brach das Patch B bei einer Krafteinwirkung von 1,5 N und einer Eindringtiefe von 2 mm bis 2,5 mm (Tabelle 13). Die abfallenden Kurvenverläufe nach Erreichen der maximalen Kraft (1,5 N) der drei Messstellen zeigten an, dass die Elastizität verloren ging, wodurch der Druck beim Eindringen in die Probe geringer wurde (Abbildung 9, Patch B). Das Soft-Patch C zusammengesetzt aus einem 1:1 Gemisch aus extrahierten und kommerziellen Erbsenprotein besaß eine homogene Struktur, eine beige Farbgebung und klebrige Konsistenz (Abbildung 8, Patch C). Bei händischer Druckeinwirkung brach der Patch C schnell. Mittels der Texture Analyzer Untersuchungen wurde eine maximale Kraft von 1,5 N bei einer Eindringtiefe von 2 mm ermittelt (Tabelle 13). Anhand der Kurvenverläufe wurde deutlich, dass eine Kraft zwischen 1 N bis 1,5 N benötigt wurde bis der Patch C seine Elastizität verlor und anfing zu brechen (Abbildung 9, Patch C). Ab einer Eindringtiefe von 1,5 mm stagnierte der Verlauf der Graphen bis zum Erreichen der Eindringtiefe von 2 mm (Abbildung 9, Patch C). Beim Herausziehen des Druckbeils verliefen die Graphen wieder rückläufig zur einwirkenden Kraft (Abbildung 9, Patch C). Eine maximale Krafteinwirkung von 1,5 N bis 1,75 N konnte beim Erlangen einer Eindringtiefe von 3,5 mm erzielt werden, wobei der Patch C im Bereich zwischen 1,5 bis 2 mm begann zu brechen (Abbildung 9, Patch C). Bei einer Eindringtiefe von 3 mm war der Patch C vollständig gebrochen, wie anhand der abfallenden Kurvenverläufe erkennbar wurde (Abbildung 9, Patch C). Der aus einem 1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein und kommerziellen Lupinenprotein bestehende gelbe Protein-Patch D charakterisierte sich durch eine homogene Struktur (Abbildung 8, Patch D). Dieser Patch D wies eine krümlige und klebrige Konsistenz auf und war sehr druckempfindlich, wodurch das Patch schnell brach. Ebenso führten händische Druckeinwirkungen zur Verformung des Patches D. Die Messaufzeichnungen der Texture Analyzer Analysen zeigten eine durchschnittliche maximale Kraft von 1 N bei einer Eindringtiefe von 2mm (Tabelle 13). Wie anhand der Kurvenverläufe ersichtlich wurde, stieg die Kraft an zwei Messtellen bis zum Erlangen einer Eindringtiefe von 2 mm kontinuierlich an (Abbildung 9, Patch D), was auf eine stabile Elastizität des Patches D rückschließen ließ. Nur an Messtelle 1 begann das Patch D bereits ab einer Eindringtiefe von ca. 1,25 mm zu brechen (Abb. 3.8, Patch D). Für die Analyse bei einer Eindringtiefe von 3,5 mm konnte eine maximale angewendete Kraft von 1 N bis 1,2 N bei einer Eindringtiefe von 2 mm ermittelt werden (Tabelle 13). Alle drei Graphen fielen nach dem Erlangen der maximalen Krafteinwirkung ab, woraus sich der Verlust der Elastizität und der damit verbundene Bruch des Soft-Patches D ergaben (Abbildung 9, Patch D). Als Positivkontrolle diente Patch E aus Na-Caseinat, welcher eine inhomogene Konsistenz aufwies, da sich das Na-Casein nur schwer in dem Tris-HCl Puffer zu einer halbfesten Formulierung verarbeiten ließ (Abbildung 8, Patch E). Aufgrund dessen war die Schichtdicke des Patches ungleichmäßig. Das weiß-gelbliche Soft-Patch E war druck- und fromstabil

sowie elastisch und bruchfest (Abbildung 8, Patch E). Bei einer Eindringtiefe von 2 mm konnte mittels Texture Analyzer eine maximale benötigte Kraft von 0,5 N bis 1,25 N ermittelt werden (Tabelle 13). Anhand der in Abbildung 9 dargestellten Kurvenverläufe der drei Messstellen wurde deutlich, dass die Elastizität des Patches E vollständig erhalten blieb, da die Graphen bis zum Erreichen der maximalen Eindringtiefe von 2 mm kontinuierlich anstiegen. Weiterhin bewegten sich die Graphen nach dem Herausziehen des Druckbeils wieder zum Ausgangswert zurück, was verdeutlich das der Patch E nicht gebrochen war (Abbildung 9, Patch E). Wie die Untersuchungen bei einer Eindringtiefe von 3,5 mm aufzeigten, brach der Patch E bei einer Eindringtiefe von 3 mm und einer Kraft von 1,5 N bis 2,25 N (Abbildung 9, Patch E). An dieser Stelle verlor die Probe ihre Elastizität und die plastische Verformung des Patches E begann, was die abfallenden Kurvenverläufe verdeutlichten (Abb. 3.8, Patch E). Die unterschiedlichen Kurvenverläufe des Patches E, bei einer Eindringtiefe von 3,5 mm wiesen auf inhomogene Konsistenz der Probe hin, da die maximal benötigte Kraft der drei Kurvenverläufe zwischen 1,5 N bis 2,25 N lag (Abbildung 9, Patch E). Der Versuchsansatz des Patches F bestand aus extrahierten Erbsenprotein und einer thermisch inaktiven MTG, um die Bedeutung des im MTG Pulver enthaltenen Maltodextrins zu ermitteln. Die beige pastöse Versuchsansatzmasse F (Abbildung 8, Patch F) konnte mit der präparierten MTG nicht quervernetzt werden, sodass das Maltodextrin keinen Einfluss auf die Quervernetzungseigenschaften des Enzyms besaß. Das Vorhandensein des aktiven Enzyms ist demnach der essentielle Bestandteil zur Ausbildung eines Soft-Patch.

Im Rahmen der Untersuchungen konnte ermittelt werden, dass der aus reinen extrahierten Erbsenprotein angefertigte Soft-Patch A die höchste maximale Kraft bei beiden Eindringtiefen und die höchste benötigte Kraft bis zum Bruch aufwies (Tabelle 13). Des Weiteren deuteten die sehr ähnlichen Kurvenverläufe bei einer Eindringtiefe von 2 mm auf eine hohe Elastizität des Patches A hin (Abbildung 9), was auf eine homogene Konsistenz rückschließen lässt. Die hohen Glutamin- und Lysin-Anteil im extrahierten Erbenproteinextrakt schienen essenziell, für eine optimale Quervernetzung der Proteinstrukturen mittels MTG zu sein und bedingten eine die hohe Elastizität, Widerstandskraft und Stabilität des Patches. Alle weiteren getesteten Proteinextrakte bzw. Proteinmischungen (Patch B – D) führten ebenso zur Ausbildung eines Soft-Patches, jedoch mit geringerer Elastizität, Widerstandkraft und Bruchfestigkeit (Abbildung 9).

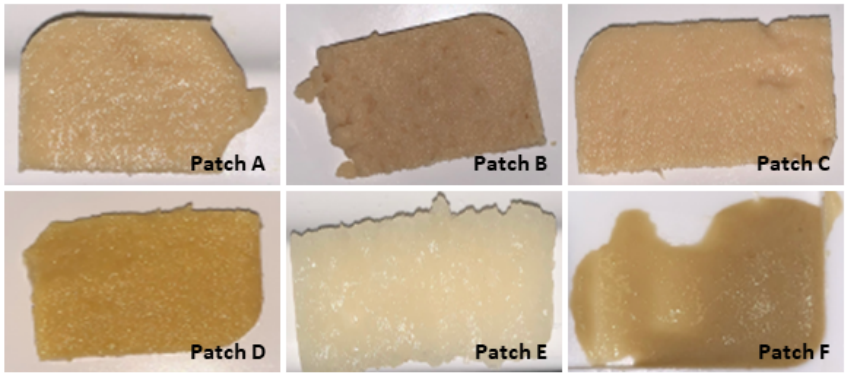

Abbildung 8: Soft-Patches aus pflanzlichen Proteinextrakten in pastöser Formulierung. Die Patches bestehend aus: Patch A – Extrahierten Erbsenprotein; Patch B – Kommerziellen Erbsenprotein; Patch C – 1:1 Gemisch aus extrahierten und kommerziellen Erbsenprotein; Patch D – 1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein und kommerziellen Lupinenprotein; Patch E – Na-Caseinat (Positivkontrolle) und Patch F – Extrahierten Erbsenprotein unter Verwendung einer thermisch

inaktiven MTG (Negativkontrolle) wurden jeweils mit MTG (außer Patch F) sowie Tris-HCl Puffer, indem die Proteinextrakte dispergiert, und einem 1:1 Gemisch Tris-HCl Puffer/Glycerin, in welchem die MTG aufgenommen wurde, versetzt.

Tabelle 13: Bestimmung der Stabilität und Bruchfestigkeit der pastösen Protein-Patches mittels Texture Analyzer. Die Stabilität der Patches bestehend aus: Patch A – Extrahierten Erbsenprotein; Patch B – Kommerziellen Erbsenprotein; Patch C – 1:1 Gemisch aus extrahierten und kommerziellen Erbsenprotein; Patch D – 1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein und kommerziellen Lupinenprotein und Patch E – Na-Caseinat (Positivkontrolle) wurde bei den Eindringtiefen 2 mm und 3,5 mm getestet. Dabei wurde die maximale Kraft für die Eindringtiefen von 2 mm und 3,5 mm, die Kraftaufwendung bis zum Bruch des Patches sowie die Eindringtiefe, bei der der Bruch des Patches beginnt, in Newton [N] dokumentiert.

Patch	Maximale Kraft Eindringtiefe 2 mm [N]	Maximale Kraft Eindringtiefe 3,5 mm [N]	Benötigte Kraft bis zum Bruch [N]	Eindringtiefe, bei dem Bruch beginnt [mm]
A	2,5	3,5 – 4	3,5 – 4	2,5 – 3
B	1,25 – 1,5	1,5	1,5	2 – 2,5
C	1 – 1,5	1,5 – 1,75	1,5 – 1,75	1,5 – 2
D	1	1 – 1,2	1 – 1,2	2
E	0,5 – 1,25	1,5 – 2,25	1,5 – 2,25	3

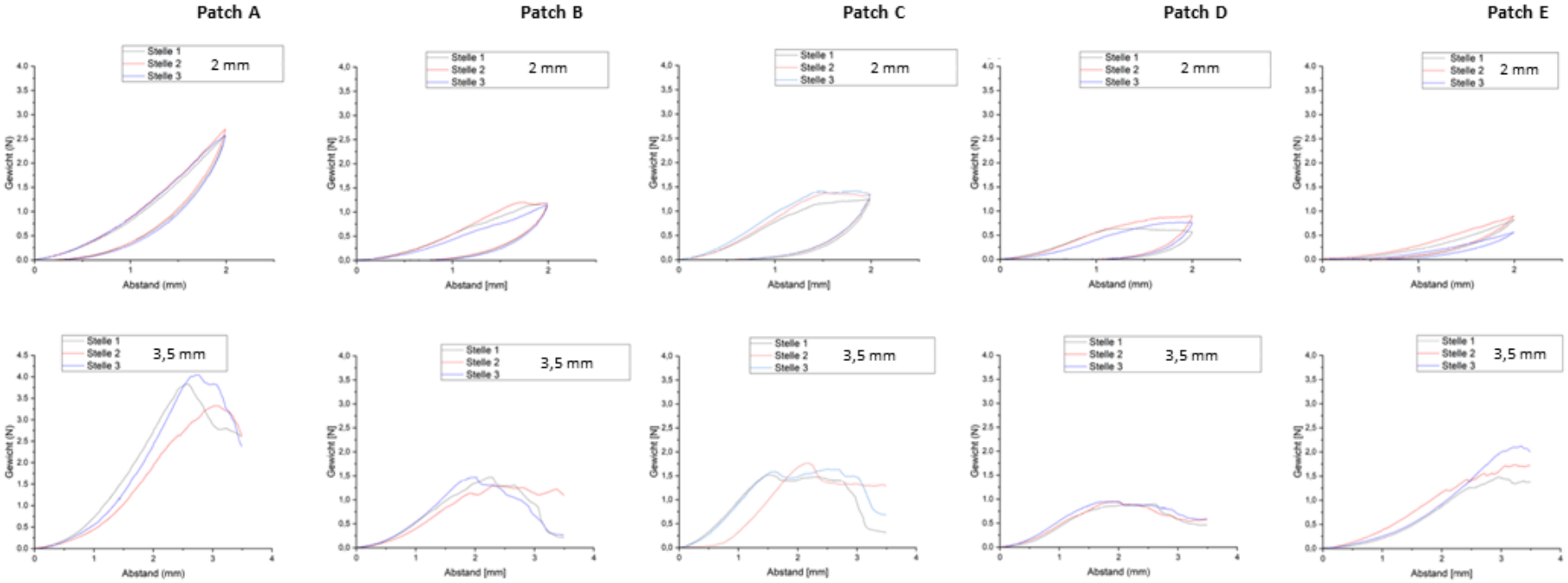

Abbildung 9: Graphen der Messaufzeichnungen des Texture Analyzers für die Patches bestehend aus: Patch A – Extrahierten Erbsenprotein; Patch B – Kommerziellen Erbsenprotein; Patch C – 1:1 Gemisch aus extrahierten und kommerziellen Erbsenprotein; Patch D – 1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein und kommerziellen Lupinenprotein und Patch E – Na-Caseinat (Positivkontrolle). Messungen erfolgten jeweils an drei unterschiedlichen Punkten (Graphen: Stelle 1-3) bei den Eindringtiefen von 2 mm und 3 mm.

Im letzten Schritt der Formulierungsuntersuchungen zur Ausbildung eines pastösen Protein-Patch wurden verschiedene Komponenten wie beispielweise die Zugabe des Konsistenzgebers Xanthan gum oder von Basiscreme getestet.
Die Verwendung des Konsistenzgebers Xanthan gum wurde anhand von zwei unterschiedlichen Formulierungsansätzen getestet. Es wurden 60 % extrahiertes Erbsenprotein mit 40 % Xanthan gum und 75 % Proteinextrakt mit 25 % Konsistenzgeber in einem pastösen Ansatz zusammengesetzt. Beide Ansätze konnten mithilfe der MTG nicht vollständig quervernetzt werden. Die Massen blieben größtenteils pastös, konnten nicht aus der Teflon-Form als zusammenhängender Patch entnommen werden und wiesen bei händischer Druckeinwirkung eine starke plastische Verformung auf. Der zugegebene Konsistenzgeber Xanthan gum schien eine starke Auswirkung auf die Quervernetzung der Aminosäuren mittels MTG zu haben. Demnach ist der Zusatz von Xanthan gum in einer pastösen Formulierung, die zur Ausbildung eines Soft-Patches dienen soll, ungeeignet.
Der Einsatz von Basiscreme in ein pastöses Soft-Patch-System wurde ebenso unter Verwendung von 60 % extrahierten Erbenprotein und 40 % Basiscreme sowie 75 % Proteinextrakt und 25 % Basiscreme getestet. Für diese Untersuchungen wurde der Anteil an Glycerin in dem MTG-Dispersionsgemisch aus Tris-HCl Puffer und Glycerin auf ein 4:1 Verhältnis reduziert, da Basiscreme bereits Glycerin als Komponente enthält. Der Protein-Patch bestehend aus Erbsenprotein mit 40 % Basiscreme-Anteil war sehr instabil. Bei händischer Druckeinwirkung war der Patch plastisch stark verformbar, zudem brach dieser schnell. Aufgrund dessen schied diese Zusammensetzung für die weiteren Untersuchungen aus. Der Ansatz bestehend aus 75 % Erbsenprotein und 25 % Basiscreme hingegen, setzte einen Protein-Patch mit hoher Stabilität und Bruchfestigkeit zusammen. Ausgehend von dieser Grundlage, wurden die zur Ausbildung eines Soft-Patches geeigneten Proteinextrakte und Proteinmischungen im 3:1 Verhältnis mit Basiscreme versetzt. Die entstandenen Soft-Patches wurden anschließend mittels des Texture Analyzers auf ihre Stabilität und Bruchfestigkeit überprüft. Alle hergestellten Soft-Patches ließen sich aus der Teflon-Form als zusammenhängender Patch entnehmen (Abbildung 10), waren jedoch nicht so stabil und elastisch wie Patches aus reinem Proteinextrakt oder einer Proteinmischung ohne Zusatz von Basiscreme. Die Patches besaßen eine grüne (Patch BC-A), beige (Patch BC-B und Patch BC-C), gelbe (Patch BC-D) und weiß-gelblich Farbgebung (Abbildung 10) und wiesen eine weiche, klebrige (Patch A bis D) sowie krümlige Konsistenz auf. Bei händischer Druckausübung waren die Patches verformbar und brachen schnell. Im Rahmen der Texture Analyzer Untersuchungen konnte für den Soft-Patch BC-A aus extrahierten Erbsenprotein eine maximale Kraft von 0,2 N bis 0,3 N beim Erreichen einer Eindringtiefe von 2 mm bestimmt werden (Tabelle 14). Wie die Verläufe der Graphen für Patch BC-A in Abbildung 11 aufzeigen, stiegen die Graphen bis zum Erlangen einer Eindringtiefe von 1 mm auf ca. 0,2 N an und stagnierten anschließend bis zur Eindringtiefe von 2 mm. Der Patch BC-A verlor nach dem Erreichen einer Eindringtiefe von 1 mm seine Elastizität und fing an zu brechen (Abbildung 11, Patch BC-A). Hierbei kam es jedoch nicht zum vollständigen Bruch des Patches, da beim Herausziehen des Druckbeil die einwirkende Kraft proportional zur Eindringtiefe abnahm (Abbildung 11, Patch BC-A). Die Untersuchungen bei einer Eindringtiefe von 3,5 mm zeigten, dass der vollständige Bruch der Probe erst bei einer Eindringtiefe von 3 mm und einer benötigten Kraft von 0,3 N bis 0,4 N erzielt wurde (Tabelle 14). Danach fielen die Kurvenverläufe der drei Messtellen bis zum Erreichen einer Eindringtiefe von 3,5 mm ab (Abbildung 11, Patch BC-A). Patch BC-B bestehend aus reinem kommerziellen Erbsenprotein wies eine maximale Kraft von 0,2 N, bei der Texture Analyzer Untersuchung zur Eindringtiefe von 2 mm, auf (Tabelle 14). Die in Abbildung 11 dargestellten Kurvenverläufe der Messstellen 1 bis 3 zeigen an, dass der Bruch des Patches BC-B bereits

beim Erlangen einer Eindringtiefe von 1 mm erlangt wurde, da bis zu diesem Zeitpunkt die Graphen kontinuierlich anstiegen, wohingegen sie anschließend bis zum Erreichen einer Eindringtiefe von 2 mm nur noch konstant verliefen. An dieser Stelle ging die Elastizität des Patches BC-B verloren und die plastische Verformung begann. Beim Zurückfahren des Druckbeils nahm die einwirkende Kraft parallel zur Eindringtiefe ab, woraus sich ableiten ließ, dass der Patch BC-B seine Elastizität nicht verloren hatte (Abbildung 11, Patch BC-B). Zum vollständigen Bruch des Patches BC-B kam es erst bei einer Eindringtiefe des Druckbeils von 2,5 mm bis 3 mm und einer einwirkenden Kraft von 0,2 N, wie anhand der abfallenden Graphen in Abbildung 11 deutlich wird. Der Patch BC-C bestehend aus extrahierten und kommerziellen Erbsenprotein zeigte eine maximale Krafteinwirkung von 0,2 N bis 0,3 N bei einer Eindringtiefe von 0,5 mm bis 1 mm, bis der Patch anfing zu brechen. Anschließend stiegen die Graphen aller drei Messstellen nur noch gering bis zum Erreichen der Eindringtiefe von 2 mm an (Abbildung 11, Patch BC-C). Wie anhand der Kurvenverläufe in Abbildung 11 (Patch BC-C) sichtbar wird, fiel die einwirkende Kraft proportional zur Eindringtiefe beim Zurückfahren des Druckbeils, was auf einen unvollständigen Bruch der Probe hindeutete. Ein vollständiger Bruch des Patches konnte erst bei einer Eindringtiefe von 3 mm und wirkenden Kraft von 0,3 N erzielt werden (Tabelle 14). Die abfallenden Graphen zwischen den Eindringtiefen von 3 mm und 3,5 mm verdeutlichen, dass die Elastizität des Patches BC-C verloren und dieser vollständig gebrochen war (Abbildung 11, Patch BC-C). Patch BC-D aus extrahierten Erbsenprotein und kommerziellen Lupinenprotein zeigte eine maximale Kraft von 0,1 N bis zum Beginn der plastischen Verformung bei einer Eindringtiefe von 1 mm auf (Tabelle 14). Bis zum Erreichen der maximalen Eindringtiefe von 2 mm stieg die einwirkende Kraft nur noch langsam auf ein Niveau von 0,2 N bis 0,25 N an (Abbildung 11, Patch BC-D). Wie anhand der Kurvenverläufe der drei Messstellen deutlich wird, nahm die einwirkende Kraft verhältnismäßig zur Eindringtiefe, beim Zurückfahren des Druckbeils, ab . Der Patch BC-D war demnach bei einer Eindringtiefe von 2 mm unvollständig gebrochen. Zum vollständigen Bruch des Patches BC-D kam es erst bei einer Eindringtiefe von 2,5 mm bis 3 mm und einer einwirkenden Kraft von 0,3 N (Tabelle 14). Die Graphen der drei Messtellen fielen zwischen einer Eindringtiefe von 3,0 mm und 3,5 mm ab, was den vollständigen Bruch des Patches BC-D widerspiegelte (Abbildung 11, Patch BC-D). Die Positivkontrolle, Na-Caseinat, zeigte während der Untersuchung die stärksten Unterschiede zwischen den einzelnen Messstellen. Alle drei Kurvenverläufe stiegen bis zum Erlangen einer Eindringtiefe von 2 mm kontinuierlich an, jedoch mit unterschiedlichen maximalen Krafteinwirkungen im Bereich zwischen 0,6 N und 1,1 N (Tabelle 14). Die Probe behielt ihre volle Elastizität und Stabilität, da der Kurvenverlauf bis zum Erlangen der Eindringtiefe von 2 mm anstieg und danach kontinuierlich zur Eindringtiefe auf ihren Ausgangswert zurückfiel (Abbildung 11, Patch BC-E). Der Beginn der plastischen Verformung des Patchs BC-E wurde bei einer Eindringtiefe von 1,5 mm und einer vorliegenden Kraft von 0,5 N bis 1 N aufgezeichnet (Tabelle 14). Wie die Kurvenverläufe darstellen, bricht das Patch BC-E vollständig bei einer Eindringtiefe von 2,5 mm bis 3 mm mit einer anzuwendenden Kraft von 0,65 N bis 1,15 N (Abb. 3.10, Patch BC-E). Anschließend fielen die Kurvenverläufe bis zum Erlangen einer Eindringtiefe von 3,5 mm ab, was den Bruch des Patches anzeigte (Abbildung 11, Patch BC-E). In beiden Messuntersuchungen des Na-Caseinat Patches unterschieden sich die ermittelten Werte der einzelnen Messstellen stark voneinander, die auf eine inhomogene Struktur des Patches BC-E hinweisen. Ebenso wie der Na-Caseinat Patch ohne Zusatz von Basiscreme ließ sich das Proteinpulver schlecht in dem Tris-HCl Puffer zu einer pastösen Formulierung dispergieren, sodass die Schichtdicke und Konsistenz des Patches nicht an allen Stellen äquivalent waren. Demnach könnten die starken Schwankungen der einzelnen Messwerte auf der ungleichmäßigen Konsistenz und Struktur des Patches basieren.

Die Untersuchungen zur Verarbeitung von Basiscreme in ein pastöses Soft-Patch-System ermittelten, dass der Protein-Patch bestehend aus extrahierten Erbsenprotein (Patch BC-A) die höchste maximale Krafteinwirkung bei beiden Eindringtiefen und die höchste benötigte Kraft bis zum Bruch aufwies, ausgenommen von der Positivkontrolle (Patch BC-E) (Tabelle 14). Protein-Patches aus kommerziellen Erbsenprotein (Patch BC-B) und aus Proteinmischungen mit extrahierten Erbsenprotein und kommerziellen Erbsen- (Patch BC-C) oder Lupinenprotein (Patch BC-D) besaßen ähnliche maximale Krafteinwirkungen bei beiden Eindringtiefen sowie benötigte Krafteinwirkungen bis zum Bruch des Patches (Abbildung 11). Die bereits beschriebene hohe Verfügbarkeit der Glutamin- und Lysin-Anteile im extrahierten Erbsenproteinextrakt scheint maßgeblich für die bessere Vernetzungsfähigkeit der Aminosäuren durch die MTG zu sein. Der Zusatz von Basiscreme in einer pastösen Formulierung, die zur Ausbildung eines Soft-Patches dienen soll, benötigt demnach Proteinextrakte/Proteinmischungen mit hohem Protein-Anteil, um eine optimale Quervernetzung mittel mikrobieller Transglutaminase zu gewährleiten. In die Grundlage Basiscreme lassen sich kosmetische Mittel wie Ceramide oder andere Phospholipide einarbeiten, die nach Ausbildung des Soft-Patches beispielsweise auf der Haut freigesetzt werden können.

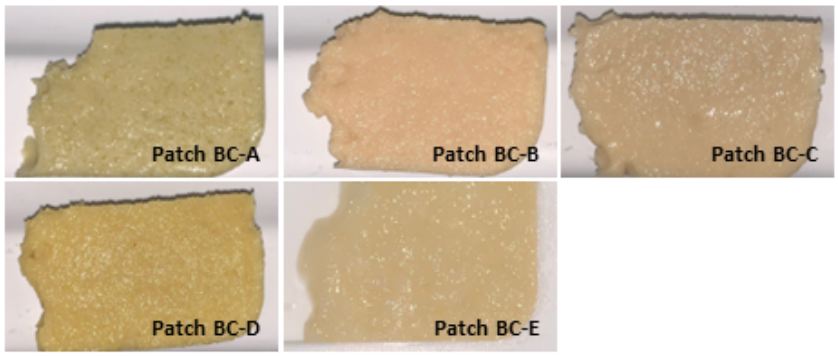

Abbildung 10: Soft-Patches aus pflanzlichen Proteinextrakten in pastöser Formulierung mit Basiscreme. Die Patches bestehend aus: Patch BC-A – Extrahierten Erbsenprotein; Patch BC-B – Kommerziellen Erbsenprotein; Patch BC-C – 1:1 Gemisch aus extrahierten und kommerziellen Erbsenprotein; Patch BC-D – 1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein und kommerziellen Lupinenprotein und Patch BC-E – Na-Caseinat (Positivkontrolle) wurden jeweils mit Basiscreme, MTG sowie Tris-HCl Puffer, indem die Proteinextrakte dispergiert, und einem 4:1 Gemisch Tris-HCl Puffer/Glycerin, in welchem die MTG aufgenommen wurde, versetzt.

Tabelle. 14: Bestimmung der Stabilität und Bruchfestigkeit der pastösen Protein-Patches mit Basiscreme mittels Texture Analyzer. Die Stabilität der Patches bestehend aus: Patch A – Extrahierten Erbsenprotein; Patch B – Kommerziellen Erbsenprotein; Patch C – 1:1 Gemisch aus extrahierten und kommerziellen Erbsenprotein; Patch D – 1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein und kommerziellen Lupinenprotein; Patch E – Na-Caseinat (Positivkontrolle) wurde bei den Eindringtiefen 2 mm und 3,5 mm getestet. Dabei wurde die maximale Kraft für die Eindringtiefen von 2 mm und 3,5 mm, die Kraftaufwendung bis zum Bruch des Patches sowie die Eindringtiefe, bei der der Bruch des Patches beginnt, in Newton [N] dokumentiert.

Patch	Maximale Kraft Eindringtiefe 2 mm [N]	Maximale Kraft Eindringtiefe 3,5 mm [N]	Benötigte Kraft bis zum Bruch [N]	Eindringtiefe, bei dem Bruch beginnt [mm]
BC-A	0,2 – 0,3	0,3 – 0,4	0,2 – 0,3	1
BC-B	0,2	0,2	0,2	1
BC-C	0,2 – 0,3	0,3	0,2 – 0,3	0,5 – 1
BC-D	0,2	0,3	0,1	1
BC-E	0,6– 1,1	0,625 – 1,125	0,5 – 1	1,5

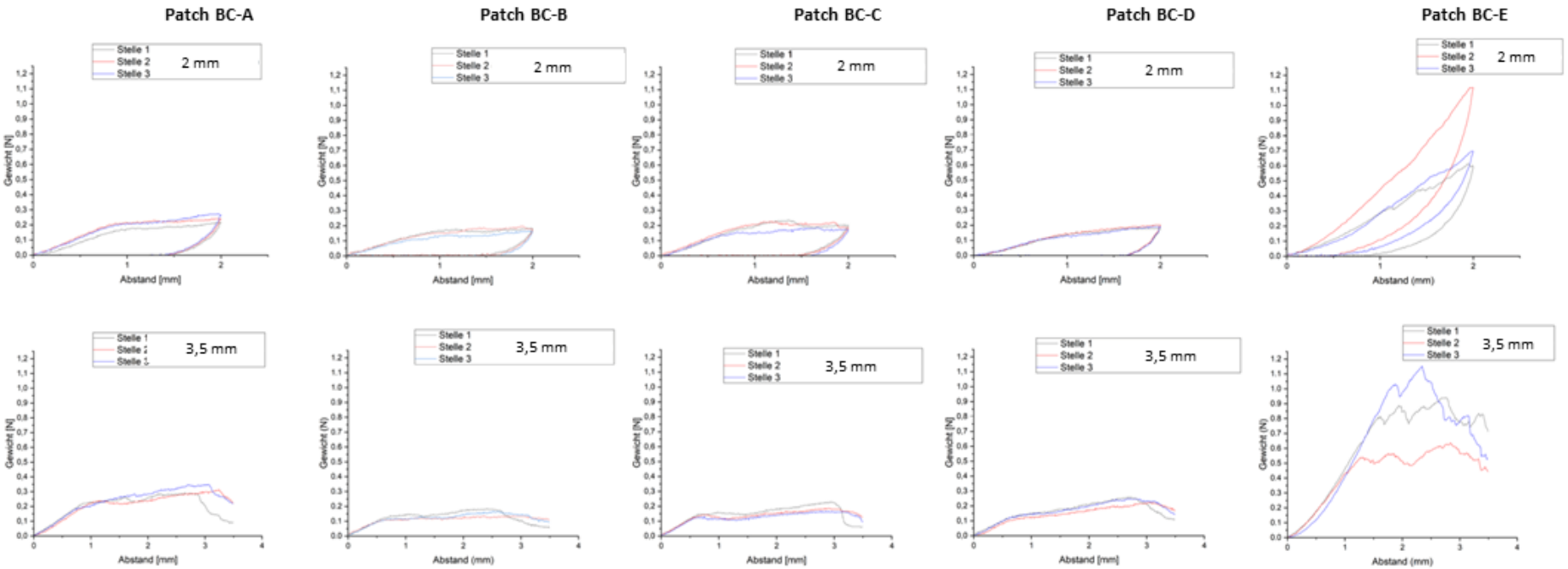

Abbildung 11: Graphen der Messaufzeichnungen des Texture Analyzers für die Patches bestehend aus: Patch BC-A – Extrahierten Erbsenprotein; Patch BC-B – Kommerziellen Erbsenprotein; Patch BC-C – 1:1 Gemisch aus extrahierten und kommerziellen Erbsenprotein; Patch BC-D – 1:1 Gemisch aus extrahierten Erbsenprotein und kommerziellen Lupinenprotein und Patch PC-E – Na-Caseinat (Positivkontrolle). Messungen erfolgten jeweils an drei unterschiedlichen Punkten (Graphen: Stelle 1-3) bei den Eindringtiefen von 2 mm und 3 mm.

Literatur

Ando H, Adachi M, Umeda K, Matsuura A, Nonaka M, Uchio R, et al. 1989. Purification and Characteristics of a Novel Transglutaminase Derived from Microorganisms. Agricultural and Biological Chemistry 53 (10), pp 2613–2617. DOI: 10.1080/00021369.1989.10869735.

Folk JE, Cole PW. 1966. Transglutaminase: Mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation 122 (2), pp 244–264. DOI: 10.1016/0926- 6593(66)90066-X.

Kashiwagi T, Yokoyama K-I, Ishikawa K, Ono K, Ejima D, Matsui H, Suzuki E-I. 2002. Crystal structure of microbial transglutaminase from Streptoverticillium mobaraense. The Journal of biological chemistry 277 (46), pp 44252– 44260. DOI: 10.1074/jbc.M203933200.

Kieliszek M, Misiewicz A. 2014. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. Folia microbiologica 59 (3), pp 241–250. DOI: 10.1007/s12223- 013-0287-x.

Krupa I, Nedelčev T, Račko D, Lacík I. 2010. Mechanical properties of silica hydrogels prepared and aged at physiological conditions: testing in the compression mode. J Sol-Gel Sci Technol 53 (1), pp 107–114. DOI: 10.1007/s10971-009-2064-5.

Marco, Cristina; Pérez, Gabriela; Ribotta, Pablo; Rosell, Cristina M. (2007): Effect of microbial transglutaminase on the protein fractions of rice, pea and their blends. In Journal of the Science of Food and Agriculture 87 (14), pp 2576–2582. DOI: 10.1002/jsfa.3006.

Nieuwenhuizen WF, Dekker HL, de Koning LJ, Groneveld T, de Koster CG, de Jong GAH 2003. Modification of glutamine and lysine residues in holo and apo alpha-lactalbumin with microbial transglutaminase. Journal of agricultural and food chemistry 51 (24), pp 7132–7139. DOI: 10.1021/jf0300644.

Patzsch K. 2010. Untersuchungen zur Herstellung von Biokunststoffen durch enzymatische Vernetzung von Proteinen aus nachwachsenden Rohstoffen. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Steinberner U, Preuss W. 1987. Glycerin - Ein fettchemischer Grundstoff im Wandel der Zeit. Lipid/Fett 89 (8), pp. 297–303. DOI: 10.1002/lipi.19870890802.

Tanger C, Engel Julia, Kulozik U. 2020. Influence of extraction conditions on the conformational alteration of pea protein extracted from pea flour. Food Hydrocolloids 107, p 105949. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2020.105949.

Tömösközi S, Lásztity R, Haraszi R, Baticz O. 2001. Isolation and study of the functional properties of pea proteins. Food/Nahrung 45 (6), p 399. DOI: 10.1002/1521- 3803(20011001)45:6<399: AID-FOOD399>3.0.CO;2-0.

Wang L, Yu B, Wang R, Xie J. 2018. Biotechnological routes for transglutaminase production: Recent achievements, perspectives and limits. Trends in Food Science & Technology 81, pp 116–120. DOI: 10.1016/j.tifs.2018.09.015.

Yokoyama K, Nio N, Kikuchi Y. 2004. Properties and applications of microbial transglutaminase. Applied microbiology and biotechnology 64 (4), pp 447–454. DOI: 10.1007/s00253-003-1539-5.