

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

200 199 B

(22) Bejelentés napja: 1987.06.22.

(21) 2827/87

(33) DE

(32) 1986.06.23.

(31) P 36 20 915.5

(51) Int Cl⁵

C 09 B 67/54

C 09 B 61/00

C 09 B 7/00

D 06 P 1/22

D 06 P 3/02

D 06 P 3/58

(41) (42) 1988.11.28.

(45) Megadás meghirdetésének dátuma
a Szabadalmi Közlönyben: 1990.04.30.

(72) Feltaláló:

dr. Koch Werner, Oberwil, CH

(71) Bejelentő:

Sandoz AG., Bazel, CH

**(54) TOVÁBBFEJLESZTETT ELJÁRÁS INDIGÓT TARTALMAZÓ BIOMASSZA
ELŐÁLLÍTÁSÁRA ÉS ANNAK KELMÉK SZÍNEZÉSÉRE
VALÓ ALKALMAZÁSÁRA**

(57) KIVONAT

A találmány indigófestési eljárásra vonatkozik, amelynél mikroorganizmusok által termelt indigót alkalmaznak oly módon, hogy a festést közvetlenül az indigót vagy indigószármazékot tartalmazó szárfiórt

biomasszával végzik. A találmány oltalmi körébe tartozik az indigó-tartalmú biomassza előállítási eljárása is.

A leírás terjedelme: 4 oldal, 0 ábra

HU 200 199 B

A találmány tárgy eljárás baktériumok által termelt, indigót tartalmazó biomassza előállítására és annak felhasználásával végzett festésre. Az ily módon, biomasszával végzett festés lehetővé teszi az indigó izolálás nélküli felhasználását.

A találmány szerinti eljárásnál a szubsztrátum festését olyan, indigót tartalmazó biomasszával végezzük, amelyben a mikroorganizmusok által termelt indigót a festés előtt nem távolítjuk el a szilárd biomasszából.

Ismeretes, hogy az indigó előállítási eljárást indolból vagy triptofánból indolon keresztül, mikrobiológiai források felhasználásával végzik. (4 520 103 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Science, 222 (1983), 167-169; és BIOTECHNOLOGY 4, 1986, 321-324.)

Az ismert eljárások szerint a képződött, vízben oldhatatlan indigót minden esetben eltávolítják a keverékből forró kloroformmal végzett többszöri extrakcióval. E művelet azonban igen idő- és költségigényes, de ez vonatkozik az egyéb elválasztási eljárásokra is. Ily módon a mikrobiológiai úton előállított és a biomasszából izolált indigó felhasználása gazdasági okok miatt nem igen valószínűsíthető meg.

A jelen találmány előnye, hogy lehetővé teszi a mikrobiológiai úton nyert indigó festék közvetlen felhasználását, anélkül, hogy azt a biomasszából el kellene választani, vagy tisztítani vagy a festés előtt töményíteni kellene.

A találmány szerinti eljárásnál úgy járunk el, hogy biomasszában mikroorganizmusok segítségével indigót állítunk elő, a biomasszát lízisnek vetjük alá, majd a kapott szilárd biomasszát alkalmazzuk festéshez anélkül, hogy az indigót belőle elválasztanánk.

A membránok lízisét bármely ismert mechanikus vagy nem mechanikus eljárás szerint végezhetjük, így például a következő módokon:

- savas vagy bázikus kezeléssel (lásd 1. Példa)
- enyhe nyomás alatt végzett reakcióval,
- ozmoflízissel vagy
- enzimatikus reakcióval.

A találmány szerinti eljárásnál előnyösen úgy járunk el, hogy függetlenül az alkalmazott lízis fajtájától, a biomasszát még további kezelésnek vetjük alá, annak érdekében, hogy a biomassza összes sejtje denaturálódjon, ami környezetvédelmi szempontból is fontos. E kezelés során a biomasszát vizes alkália oldattal kezeljük, a pH értékét lúgosra (előnyösen pH = 12 körüli értékre) beállítva, majd hidrogén-foszfáttal való kezeléssel semlegesítjük, a pH értékét 7-re beállítva.

A találmány szerinti eljárásnál a szilárd biomasszát a bioszintézis után, de a festési eljárás előtt megszártítjuk. A szárítást bármely ismert eljárás szerint végezhetjük, így például fémtálcákon, vákuum szárítószekrényben vagy keverő hengerrel felszerelt vákuum szárító berendezésben végzett víz-desztillációval. A szárítást előnyösen porlasztással végezzük. A porlasztva szárításnál a biomasszát először meghatározott finomságú szitán engedjük át, majd ismert porlasztó berendezés (például Büchi porlasztó) segítségével megszártítjuk. A szárítást végezhetjük fluidágyas módszerrel is, amikor granulált anyagot nyerünk. A szárítási lépést további adalékanyagok, így például szublimáló vagy stabilizáló szerek jelenlé-

tében is végzethetjük, amely anyagok a későbbi festési folyamatnál hasznosak.

A szárítás előtt a felesleges, azaz indigót nem tartalmazó folyadékfázist a szilárd biomasszától ismert eljárások szerint, így például dekantálással, centrifugálással és/vagy szűréssel elválasztjuk.

A találmány szerinti előnyös eljárásnál a bioszintézis és az elválasztás után, de a szárítás előtt a biomasszát homogenizáljuk, előnyösen pH = 7-nél. A homogenizálást végezhetjük például intenzív keveréssel, (politron keverővel), hígítással vagy őrlési folyamattal (például üveggyönggyel), adott esetben diszpergálószert, előnyösen anionos diszpergálószert, még előnyösebben olyan diszpergálószert jelenlétében, amely képes az indigónak a fűrdőben való eloszlását elősegíteni. Ezzel elősegíthető a sejteken kívül képződött szilárd indigó-agglomerátumok méretének csökkentése.

A találmány szerinti biomassza előállítási eljárásnál a szárítást megelőzően a sejteket lízisnek vetjük alá. Továbbá, a szárítást megelőzően, a folyadék és szilárd részeket az előzőekben leírtak szerint elválasztjuk, és homogenizáljuk.

A biomassza szárítása a festőfűrdőben való adagolás előtt azért is előnyös, mert így az erős átható szag eliminálható.

A találmány szerinti bioszintézis során az indigót indolból klónozott rekombináns Escherichia coli baktériumokból állítjuk elő.

A biomassza formájában a találmány szerint előállított indigót előnyösen használhatjuk hidroxilcsoportot vagy nitrogént tartalmazó szerves anyagok, úgy mint gyapjú, pamut vagy len kádban végzett, előnyösen bemelegítéssel, szellőztetés mellett végzett festésére. A nyers kádfestéket vízoldható formává redukáljuk, majd a szubsztrátumra felvive oxidálással fixáljuk. Az ily módon végzett festés tartóssága azonos az aktív anyaggal végzett festésével.

A találmány szerinti biomasszával végzett festéssel az aktív anyaghoz hasonló árnyalatok hozhatók ki, azonos tartóssággal.

Meglepetésszerűen azt tapasztaltuk, hogy az indigó mellett a biomassza törmelékét is tartalmazó anyaggal végzett festéssel tiszta színeket adó festés érhető el, és úgy tűnik, hogy magán a szubsztrátumon végbemegy egy tisztítási folyamat, amely egy korábbi képcsőben végzett tisztítást feleslegessé tesz.

A következő nem korlátozó példákkal a találmány szerinti eljárást közelebbről illusztráljuk. A példákban a megadott mennyiségek és százalékok tömeg/térfogat egységet, míg a hőmérsékleti értékek Celsius' jelentenek.

1. Példa

Indigó-biomassza előállítása

A 4 520 103 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetett módon a megadott pH, hőmérséklet, tápanyag-összetétel, levegőztetés stb. mellett fermentációval klónozott rekombináns Escherichia coli HB 101 törzshöz tartozó baktériumot tenyésztünk.

A kapott nyers fermentőről a folyadékot leöntjük és a többi folyadék eltávolítására a visszamaradó anyagot centrifugáljuk, majd ezt követően a sejteket savas vagy bázikus kezeléssel szobahőmérsékleten

híg vizes nátrium-hidroxid- vagy sósav oldat alkalmazásával 5–10 órán át lizisnek vetjük alá.

A sejt-lizis után a biomasszát vizes nátrium-hidroxiddal pH = 12-nél kezeljük, majd a pH-t dinátrium-hidrogén-foszfát adagolásával 7-es értékre beállítjuk. A kapott anyag kellemetlen szagú, indigót, sejt-fragmenseket, nátrium-foszfátot, különböző fermentációs melléktermékeket, valamint tápoldatokat tartalmazó szuszpenzió.

2. Példa

Por előállítása az indigó-szuszenzió szárításával
Porlasztva szárításhoz a következő eljárások valamelyikével készítjük elő az anyagot:

a) Az 1. példa szerint nyert vizes szuszpenziót politron keverővel homogenizáljuk 0,1 mm lyukbőségű szitán átengedjük. A visszamaradó anyag mennyisége minimális.

b) Az agglomerálódott részecskéket tartalmazó vizes szuszpenziót nagysebességű, forgó-fogas léces berendezésben kezeljük, amikor is a szuszpenzió durvább részecskéi felapróznak.

c) Az 1. példa szerint nyert szuszpenziót minden további adalék nélkül golyókkal őröljük.

d) Az 1. példa szerint nyert szuszpenziót anionos diszpergálószer jelenlétében golyók segítségével őröljük. Diszpergálószerként előnyösen β-naftilszulfonsav/formaldehid kondenzációs termék nátrium-sóját alkalmazzuk.

3. Példa

a) Büchi porlasztóban végzünk szárítást a következőképpen:

Valamely, az előző 2a) vagy 2b) módszer szerint előkezelt szuszpenziót meleg levegő segítségével 130 °C-on kettős fűvőkán át porlasztjuk, majd a meleg levegő hőmérsékletét körülbelül 75 °C-ra lecsökkentjük. A kapott sötét színű poranyag kellemetlen szagú összetevőktől mentes.

b) Granulátum-szemcsék előállításával végzett szárítást a következőképpen kivitelezünk:

A valamely a 2. példa szerint előkezelt indigó-szuszenziót ismert módon fluidágyas granulálóba porlasztjuk. A kapott sötétszínű granulálóba porlasztjuk. A kapott sötétszínű granulátum kellemetlen szagú összetevőket nem tartalmaz.

A fentiekben leírták szerint bármely találmány szerinti eljárást nyert, (I) általános képletnek megfelelő indigót tartalmazó szuszpenzió por- vagy granulátum készítménnyé alakítható.

4. Példa

Immerziós indigó-festési eljárást végzünk a következőképpen:

a) Festékfolyadék készítése

A festéket a kádfestés törzsoldatának előírásai szerint feloldjuk, azaz, ez esetben 100 rész 3a vagy 3b példa szerint nyert port vagy granulátumot, 20 rész nátrium-szulforicinoleátot (80%-os szulfonálás), kereskedelmi forgalomban lévő anionos diszpergálószerrel, jól összekeverünk, a kapott pasztaszerű anyaghoz 60 °C-on vizet adunk, a térfogatot 100-ra kiegészítve. Ezután 0,75 rész 36 °C-os nátrium-hidroxidot és 0,6 rész koncentrált vizes nátrium-hidroszulfit oldatot adagolunk, és a kapott keveréket 15 percen át

60 °C-on tartjuk, majd a kapott sárga színű fűrdőt 25 °C-ra lehűtve alkalmazzuk a következő festési műveletben.

b) Festési művelet:

5 Az a) pont szerint nyert fűrdőt forrásig melegítjük, és 10 másodpercre könnyen nedvesedő pamutszövetet merítünk bele, majd kiemeljük, két henger között átengedve kicsavarjuk, a festékvérvétel 60%-os (a száraztömeg emelkedése alapján meghatározva). A szöveten abszorbeálódott festéket 3 perces levegőn végzett oxidálással alakítjuk kék színűre. A fentiek szerinti művelettel egyrétegű festést végzünk, a kívánt háromrétegű festékvérvétel érdekében a műveletet még kétszer meg kell ismételni.

10 A fentiek szerint festett anyagot ezután hideg vízzel alkálimentesre mossuk, majd 1,5 ml/liter mennyiségű 40%-os hidrogén-peroxiddal kezeljük 60 °C hőmérsékleten az oxidáció tökéletesítésére, majd az anyagot meleg vízzel öblítjük. Ezután 5 percen át 80 °C hőmérsékleten 1 ml/liter mennyiségű alifás poliglikol-éterrel öblítjük, majd ezután először meleg, majd hideg vizes öblítést végzünk.

20 A fentiek szerint erős, tiszta árnyalatú indigó-kék színt nyerünk, a festés tartósságga megfelelő az ismert módon előállított indigóval festett pamutanyag szintartósságának.

Színtartóssági vizsgálatok

30 Vizsgálatokat végeztünk ismert módon előállított (a) és a találmány szerinti eljárással előállított (b) indigóval festett pamut kelmén, a festés tartósságának összehasonlítására. A kapott eredményeket a következő táblázatban foglaljuk össze:

	Érték		Osztályozás fajtája*
	a)	b)	
35 Fényállóság	5	5	BS
Mosásállóság			
40 színváltozás	3	3	GS
foltosodás	3-4	3-4	GS
Kopásállóság	3	3	GS
Savállóság (40% ecetsav)	5	5	GS
45 Izzadságállóság (sav, lúg)	5	5	GS
Dörzsállóság	3	3	GS

* BS: „Blue Scale (kék osztályozás) 1–8-ig
GS: „Gray Scale (szürke osztályozás) 1–5-ig

55 A fenti vizsgálati adatokból kitűnik, hogy a festés tartóssága megfelel az ismert módon nyert indigóval végzett festés tartósságának. Az összehasonlításakor alkalmazott indigót a következő irodalmi helyen leírt eljárás szerint állítottuk elő: „The Chemistry of Synthetic Dyes, K. Venkataraman, 1952, II. kötet, 1013-1016.

Szabadalmi igénypontok

60 1. Eljárás indigót tartalmazó, pamut-, gyapjú- vagy len-kelmék festésére alkalmas biomassza előállítására, amelyet indolból nyerünk klónozott rekombináns

Escherichia coli sejtekkel végzett fermentációval, *azzal jellemezve*, hogy a kelmék festésére közvetlenül alkalmazott, indigó-festéket tartalmazó fermentumot a következő műveletek szerint kezeljük:

- lízisz, előnyösen savas vagy bázikus kezeléssel,
- híg vizes nátrium-hidroxid vagy sósav-oldat jelenlétében, előnyösen 5–10 órán át szobahőmérsékleten,
- további denaturálás, előnyösen nátrium-hidroxid oldattal, előnyösen pH = 12-ig végzett lúgosítással,
- semlegesítés, előnyösen nátrium-hidrogén-foszfáttal,
- a folyadékfázis elválasztása a festéktartalmú szilárd masszától, előnyösen centrifugálással, dekantálással és/vagy durva szűréssel,
- homogenizálás, előnyösen pH = 7-nél hígítóanyag jelenlétében végzett intenzív keveréssel, vagy adott esetben diszpergáló szer jelenlétében végzett őrléssel,
- szárítás, előnyösen
- fémtálcán, vákuum szárítószekrényben, vagy

5

10

15

20

- keverőhengerrel felszerelt vákuum szárítóban vízgőzdesztillációval, vagy
- fluidizációval.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a szárítást porszerű anyag előállítására porlasztással vagy granulátum előállítására fluidizációval végezzük.

3. Eljárás pamut-, gyapjú- vagy lenkelmek festésére, amelynél ismert módon elkészítjük a festőfűdőt, a kelmét a fűdőbe merítjük, a festett kelmét kicsavarjuk, oxidáljuk, majd öblítjük, *azzal jellemezve*, hogy festékként közvetlenül, az 1. igénypont szerint előállított, indigó-festéket tartalmazó biomasszát alkalmazunk.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az indigó-festéket tartalmazó biomasszát pamutkelmek festésére alkalmazunk.

5. A 3. vagy 4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a biomasszát kádfestésnél alkalmazunk.