



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **243 046 A1**4(51) C 14 C 3/28
C 14 C 3/24
C 14 C 3/22**AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 14 C / 283 274 6	(22)	26.11.85	(44)	18.02.87
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71) VEB Lederwerke Weida, 6508 Weida, Schloßmühlenweg 3, DD

(72) Popp, Siegfried, Obering.; Just, Jürgen; Theilig, Klaus; Kunze, Hartmut, Dipl.-Chem.; Wolf, Karl-Heinz; Weisz, Edeltraud; Gabert, Kurt, Dipl.-Chem., DD

(54) Verfahren zur Nachgerbung mineralgegerbter Leder

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Nachgerbung mineralgegerbter Leder unter Anwendung von Synthananen, Harzgerbstoffen und speziellen wäßrigen Copolymeren bestehend aus dem Ammoniumsalz der Acrylsäure und vernetzender CO-Monomeren in Verbindung mit bis zu 15% Ammonsulfat. Die Besonderheit besteht darin, daß die Leder durch die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens sich durch Fülle, Weichheit, egale Färbbarkeit und besonders durch gute gleichmäßige Millfähigkeit auszeichnen.



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **243 046 A1**

4(51) **C 14 C 3/28**
C 14 C 3/24
C 14 C 3/22

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WPC 14 C / 283 274 6 (22) 26.11.85 (44) 18.02.87

(71) VEB Lederwerke Weida, 6508 Weida, Schloßmühlenweg 3, DD
(72) Popp, Siegfried, Obering.; Just, Jürgen; Theilig, Klaus; Kunze, Hartmut, Dipl.-Chem.; Wolf, Karl-Heinz; Weisz, Edeltraud; Gabert, Kurt, Dipl.-Chem., DD

(54) Verfahren zur Nachgerbung mineralgegebter Leder

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Nachgerbung mineralgegebter Leder unter Anwendung von Synthananen, Harzgerbstoffen und speziellen wäßrigen Copolymeren bestehend aus dem Ammoniumsalz der Acrylsäure und vernetzender CO-Monomeren in Verbindung mit bis zu 15% Ammonsulfat. Die Besonderheit besteht darin, daß die Leder durch die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens sich durch Fülle, Weichheit, egale Färbbarkeit und besonders durch gute gleichmäßige Millfähigkeit auszeichnen.

ISSN 0433-6461

5 Seiten

Zur PS Nr. 243.046.....

ist eine Zeitschrift erschienen.

(Teilweise bestätigt gem. § 18 Abs. 1 d. Änd.Ges.z.Pat.Ges.)

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung von hochangereicherten [¹⁵N]Aminosäuregemischen und/oder niedermolekularen [¹⁵N]Peptidgemischen auf Basis des Transfer von anorganischen [¹⁵N]Ammoniumstickstoff (97,0 At.-%) in ¹⁵N-markiertes Hefeprotein durch Kultivierung von Hefe produzierenden Mikroorganismen, vorzugsweise von Saccharomyceten, der Isolierung der Hefe vom Kulturmedium, der Zerstörung der Hefezellen in einer Zelmühle, der Trennung von Hefeprotein und Nucleinsäuren durch Säurefällung, vorzugsweise Trichloressigsäure, und der Hydrolyse des ¹⁵N-markierten Hefeproteins, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Hydrolyse der Hefeproteine im wäßrigen Medium nach pH-Einstellung im Bereich von 7 bis 8,5, vorzugsweise 7,5, und nach dem Aufkochen der Lösung bei einer Temperatur von 40 bis 60°C, vorzugsweise 55°C, mit Thermitase, einer bekannten Protease aus *thermoactinomyces vulgaris*, erfolgt, danach eine Inaktivierung durch Erhitzen auf 100°C vorgenommen wird und unerwünschte ungelöste Stoffe abgetrennt und gegebenenfalls die niedermolekularen [¹⁵N]Peptide und [¹⁵N]Aminosäuren aus der Lösung isoelektrisch ausgefällt werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Abtrennung von ungelösten Bestandteilen nach der Inaktivierung und Abkühlung eine Zentrifugation erfolgt und der ¹⁵N-Verbindungen enthaltene Überstand zur Isolierung der gewünschten markierten Verbindungen aufgearbeitet wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß nach der Hefeisolierung die Hefe bei einem pH-Wert von 8 bis 9 mit einer Kugel- oder Schwingmühle behandelt wird.
4. Verfahren nach Punkt 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß nach der Mahlbehandlung eine Zentrifugation und danach eine Ausfällung der ¹⁵N-markierten Hefeproteine mit Trichloressigsäure vorgenommen wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Gemisches markierter Aminosäuren. Der Stickstoffanteil jeder einzelnen Aminosäure ist mit mehr als 96,6 At.-% ¹⁵N gleich hoch angereichert. Das Gemisch liegt in einer durch den Intestinaltrakt vollständig absorbierbaren Form als Mischung von niedermolekularen Peptiden und freien Aminosäuren vor. Das Anwendungsgebiet dieses hochangereicherten [¹⁵N]Aminosäuregemisches erstreckt sich vorwiegend auf Proteinumsatzmessungen und Untersuchungen zur intestinalen Verdauung und Absorption an Menschen (sowohl Erwachsenen als auch Säuglingen und Frühgeborenen) und Tieren.

Es gelingt damit, Proteinstoffwechselfparameter sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin exakter als mit der konventionellen Applikation von [¹⁵N]Glycin, kostengünstiger als mit einem Gemisch synthetisch gewonnener [¹⁵N]Aminosäuren und verlustloser als mit einem [¹⁵N]Hefeprotein bzw. dessen Pepsin-Trypsin-Hydrolysat zu bestimmen. ¹⁵N-markierte Oligopeptidgemische können außerdem als Substrat für intestinale Digestions- und Absorptionsversuche dienen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Bisher werden Informationen über die Dynamik einzelner Proteinstoffwechselfparameter durch computergestützte Auswertung von ¹⁵N-Tracerdaten gewonnen. Als ambivalente Tracersubstanzen kamen bisher [¹⁵N]Glycin oder andere ¹⁵N-markierte Aminosäuren, [¹⁵N]Aminosäuregemische und [¹⁵N]Hefeprotein in Frage, die jedoch von Fall zu Fall mit erheblichen Nachteilen verknüpft waren.

Um Resorptionsverluste bei der Applikation von [¹⁵N]Hefeprotein zu verringern, bietet sich eine partielle Hydrolyse des Proteins mit Pepsin und Trypsin (Isotopenpraxis: 21; 1985, 99) oder eine Total-Hydrolyse mit anorganischen Säuren an. Obwohl die peptisch-tryptische Behandlung des ¹⁵N-markierten Hefeproteins einen relativ hohen Aminosäuren-Freisetzungsgrad liefert, sind die verbleibenden ungespaltenen längerkettigen Oligopeptide Ursache von bis zu 20%igen faecalen Verlusten. Eine Total-Hydrolyse des markierten Proteins scheidet aufgrund der weitgehenden Zerstörung einer Reihe von Aminosäuren aus.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Darstellung eines ¹⁵N-markierten, kurzkettigen Peptidgemisches als Tracer zur Ermittlung von Ganzkörperprotein-Stoffwechselfparametern in der Human- und Veterinärmedizin, das sowohl aus physiologischer als auch aus ökonomischer Sicht den bisher als Tracersubstanzen genutzten [¹⁵N]Aminosäuren, [¹⁵N]Aminosäuregemischen, [¹⁵N]Proteinen und [¹⁵N]Pepsin-Trypsin-Protein-Hydrolysaten überlegen ist.

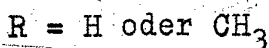
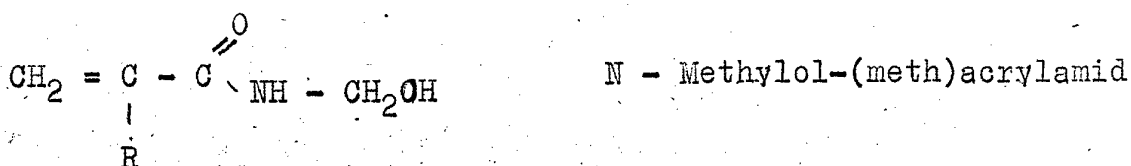
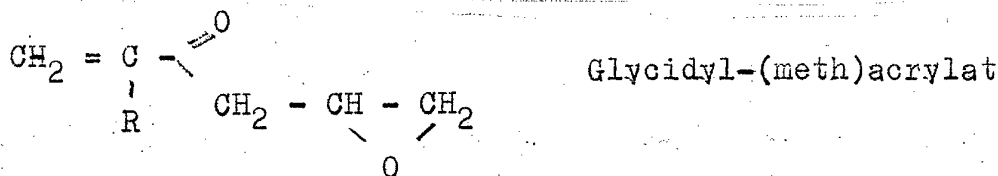
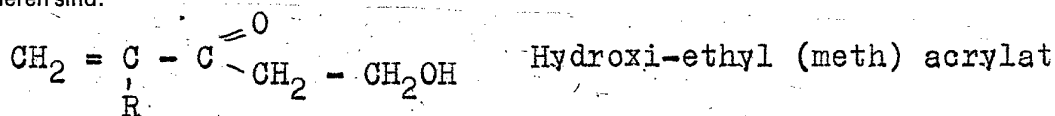
Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Verfahrensbedingungen, bei denen ein hochangereichertes, ¹⁵N-markiertes Protein hergestellt, isoliert und enzymatisch gespalten wird. ¹⁵N-markierte Hefe wird nach der von uns beschriebenen Weise aus 97,0 At.-%igem [¹⁵N]H₄Cl als alleiniger N-Quelle hergestellt. Nach dem Zerstören der Zellwände durch eine Zelmühle wird das Protein von den Nucleinsäuren durch möglichst schonende Behandlung getrennt (DD-WP 207004, C12 C21/00, Isotopenpraxis: 20; 1984, 90).

Erfindungsgemäß wird zur Partialhydrolyse der Hefeproteinisolate die gegenüber Peptidbindungen sehr unspezifische Endopeptidase „Thermitase“ eingesetzt. Thermitase spaltet Proteine in ein Gemisch, das überwiegend aus wasserlöslichen Di- und Tripeptiden sowie zu geringen Anteilen aus freien Aminosäuren besteht. Die Hydrolyse der Hefeproteine erfolgt im wäßrigen

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß bei der Nachgerbung neben Synthanen und Harzgerbstoffen wäßrige Copolymerisate, bestehend aus dem Ammoniumsalz der Acrylsäure und vernetzenden Comonomeren in Verbindung mit bis zu 15% Ammoniumsulfat, zur Anwendung kommen.

Die wäßrigen Copolymere bestehen aus Acrylsäure und vernetzenden hydroxi- oder epoxi-gruppenhaltigen Acrylatmonomeren mit Anteilen von 0,2 bis 10, vorzugsweise 0,5 bis 4 Gew.-%. Typische Vertreter der hydroxi- oder epoxi-gruppenhaltigen Comonomeren sind:



Ferner enthält das wäßrige Copolymerisat 10 bis 15, vorzugsweise 12 bis 14% Ammoniumsulfat (bezogen auf den Festkörpergehalt der Lösung).

Durch den Einsatz von vernetzbaren hydroxi-gruppenhaltigen Monomeren in verschiedener Form in wäßrigen Copolymerisaten des Ammoniumsalzes der Acrylsäure wird eine erfindungsgemäße Verbesserung der nachgegerbten Leder erreicht, besonders eine spezielle Narbenbeschaffenheit für gute Millfähigkeit. Es ist festzustellen, daß einerseits durch den Einsatz der vernetzenden Comonomeren die gute Millfähigkeit erreicht, daß andererseits aber die Weichheit und Fülle des Leders nicht negativ beeinflusst wird.

Durch das Einbringen reaktiver Gruppen innerhalb der Nachgerbung bei Temperaturen zwischen 20 und 80°C wird eine bessere Verfestigung und Verankerung im Ledernarben erzielt sowie eine geringere Wasseraufnahme des Leders erreicht. Auch diese Effekte wirken sich schließlich günstig auf die Endqualität des Leders aus.

Überraschend wurde festgestellt, daß die spezielle Anwesenheit von Ammoniumsulfat in der Copolymerisatlösung die obengenannten guten Ledereigenschaften noch verstärkt. Diese Wirkung wird durch andere Salze ähnlicher Zusammensetzung nicht erzielt, so nicht durch Natriumsulfat oder durch Ammoniumchlorid.

Eine eindeutige Aussage über die Wirkungsweise kann noch nicht gemacht werden, aber es ist anzurechnen, daß das Ammoniumsulfat günstig die Reaktion des Copolymerisats mit dem Leder beeinflusst. Dabei ist die günstige Wirkung nur zu erzielen, wenn das Ammoniumsulfat bereits während des Polymerisationsprozesses der Herstellung der wäßrigen Copolymerisatlösung vorhanden ist.

Eine nachträgliche Zugabe des Sulfats in das Nachgerbbad führt zu keiner weiteren Verbesserung. Das Copolymerisat wird als wäßrige Lösung mit einem Festkörpergehalt von 40% bis 60% eingesetzt, der pH-Wert der Lösung ist auf 6 bis 8, vorzugsweise 6,5 bis 7,5 eingestellt.

Das Verfahren der Nachgerbung kann in der üblichen Gefäßtechnik der chemischen Naßzurichtung, wie in Fässern und Färbemaschinen, durchgeführt werden.

Die chemische Naßzurichtung beginnt zweckmäßigerweise mit einem Waschvorgang zum Entfernen ungebundener Gerbstoffe aus dem mineralgegerbten Leder. Danach erfolgt die Neutralisation bei 100–200% Flotte unter Einsatz von 0,5–2% Formiaten und 1–1,5% alkalisches Neutralisationsmittel z. B. Carbonate oder Hydrogencarbonate, vorzugsweise unter Mitverwendung eines üblichen elektrolytbeständigen anionischen Fettungsmittels. Im Anschluß erfolgt ein Zwischenwaschvorgang bei 50–70°C zur Vorbereitung auf die Färbung. Danach werden die mineralgegerbten Leder mit einer Wassermenge von 50–250% (bezogen auf das Falzgewicht) bei 30–70°C unter Einsatz von 1:2 Metallkomplexfarbstoffe oder anderen üblichen Lederfarbstoffen in 20–40 Minuten gefärbt. Im gleichen Bad erfolgt der Zusatz gemeinsam oder stufenweise von Nachgerbstoffen unter Einsatz von 4–8% Synthanen, 1–4% Harzgerbstoffe und 2–4% des beschriebenen speziellen Copolymerisats.

Unter Einwirkung der beschriebenen Kombination wird das Leder im Faß oder in der Färbemaschine 20–50 Minuten gewalkt. Durch die Kombinationsnachgerbung mit dem beschriebenen Copolymer erreicht man eine sehr anspruchsvolle Lederqualität, die sich besonders durch ihre ausgezeichnete Millfähigkeit darstellt. Dem Nachgerbbad kann sich unmittelbar oder nach einem Zwischenabsäuern zur Farbtonfixierung und Waschen oder Spülen eine übliche anionische Fettung anschließen, die dem gewünschten Sortimentstyp entsprechend eingestellt wird. Zweckmäßigerweise wird durch die Fettung mit einer organischen Säurebehandlung oder einem nochmaligen geringen Synthanaufsatz fixiert. Die der chemischen Naßzurichtung nachgeordneten Arbeitsgänge mechanischer-physikalischer Natur, wie Trocknen, Weichmachen sowie die gesamte Deckfarbzurichtung können nach bekannten Arbeitsweisen erfolgen, wobei speziell der Arbeitsgang des Millens Bedeutung hinsichtlich der Heraushebung des mit dem erfindungsgemäßen Verfahrens erzielten Narbenbild erlangt.

Ausführungsbeispiel

Beispiel 1:

Ausgangsmaterial: Chromgegerbte Bullenhäute, Falzdicke: 1,3 mm
 Behandlungsgefäß: Faß oder Färbemaschine
 Waschen: 200 % Wasser, 40 °C, 10'
 Entflotten: 10'
 Neutralisation: 200 % Wasser 40 °C 30'
 2 % eines neutralisierend wirkenden synthetischen Gerbstoffs
 1,0 % elektrolytbeständiges Fettungsmittel
 Entflotten: 10'
 Waschen: 200 % Wasser, 50 °C, 10'
 Entflotten: 10'
 Färbung: 150 % Wasser, 50 °C, 20'
 + % anionischer Farbstoff
 Nachgerbung im gleichen Bad
 4 % pflanzlicher Gerbstoff eff. 30'
 4 % synthetischer Gerbstoff eff. 30'
 + 3 % synthetischer Gerbstoff eff. 30'
 Entflotten: 10'
 Waschen: 200 % Wasser, 50 °C, 10'
 Entflotten: 10'
 Fettung: 150 % Wasser, 50 °C, 40'
 8 % Fettungsmittelgemisch aus natürlichen und synthetischen Fettstoffen
 Nachsatz: 0,5 % eines kationischen Harzgerbstoffes 10'
 Spülen: 30 °C, 10'
 Alle Prozentangaben beziehen sich auf das Falzgewicht der Leder.

Beispiel 2:

Ausgangsmaterial: Chromgegerbte Bullenhäute, Falzdicke: 1,3 mm
 Behandlungsgefäß: Faß oder Färbemaschine
 Waschen: 200 % Wasser, 35 °C, 10 min bewegen
 Entflotten:
 Neutralisation: 150 % Wasser, 35 °C
 1 % Ca-Formiat, 10 min. bewegen
 1 % NH₄-Hydrogencarbonat) 30 min
 1 % elektrolytbeständiges Fettungsmittel) bewegen
 Entflotten:
 Waschen: 200 % Wasser, 50 °C, 10 min. bewegen
 Entflotten:
 Färbung: 150 % Wasser, 50 °C
 x % anion. Lederfarbstoff
 25 min. Färbedauer
 Nachgerbung: im gleichen Bad
 3 % einer 40%igen wäßrigen Lösung eines Copolymerisats aus 96 Gewichtsteilen Acrylsäure und
 4 Gewichtsteilen Hydroxiethylacrylat (eingestellt mit Ammoniak auf pH = 7,5) sowie
 14 Gewichtsteilen Ammoniumsulfat (bezogen auf den Festkörpergehalt der Lösung)
 20 min. bewegen
 Nachsatz von 6 % Synthan
 3 % Harzgerbstoff
 30 min. bewegen
 Absäubern: im ausgezehrten Bad
 0,2 % Ameisensäure 1:10 verdünnt, 10 min. bewegen
 Entflotten:
 Waschen: 200 % Wasser, 60 °C, 10 min. bewegen
 Entflotten:
 Fettung: 200 % Wasser, 60 °C
 0,2 % Emulgator anionisch/nichtionogen
 7 % Fettungsmittelgemisch aus natürlichen und synthetischen Fettstoffen
 45 min. bewegen
 Absäuern: im ausgezehrten Bad
 0,3 % Ameisensäure, 1:10 verdünnt
 10 min. bewegen
 Spülen: 10 min., 35 °C
 Anschließend erfolgt ein Abwelken, Ausrecken, Trocknen, Stollen, Millen und Nachtrocknen.

Beispiel 3:

Wie Beispiel 2 mit veränderter Zusammensetzung in der Nachgerbung.

Nachgerbung: im gleichen Bad
3 % eines 45%igen Copolymerisates wie Beispiel 2, bestehend aus 98 Gewichtsteile Acrylsäure und
Gewichtsteile N-Methylacrylamid sowie 12 Gewichtsteile Ammoniumsulfat.

20 min. bewegen.

Nachsatz von 6 % Synthan
3 % Harzgerbstoff
30 min. bewegen

Weitere Behandlung wie Beispiel 2.

Beispiel 4:

Wie Beispiel 2 und 3 mit veränderter Zusammensetzung in der Nachgerbung.

Nachgerbung: im gleichen Bad
3 % eines 45%igen Copolymerisates wie Beispiel 2, bestehend aus 99,6 Gewichtsteile Acrylsäure und
0,4 Gewichtsteile Glycidylmethacrylat sowie 14 Gewichtsteile Ammoniumsulfat
20 min. bewegen

Nachsatz von 6 % Synthan
3 % Harzgerbstoff
30 min. bewegen

Weitere Behandlung wie Beispiel 2, 3.

Beispiel 5:

Wie Beispiel 2, 3 und 4 unter Wegfall des Absäuerns, Entflottens, Waschens und nochmaligen Entflottens nach der Nachgerbung.

Beispiel 6:

Wie Beispiel 2, 3, 4 oder 5 mit der veränderten Nachgerbrezeptur von: 2 % des wäßrigen Copolymerisates

Nachsatz von: 8 % Synthan
1,5 % Harzgerbstoff

Beispiel 7:

Wie Beispiel 2, 3, 4 und 5 mit gleichzeitiger Zugabe des wäßrigen Copolymerisates mit dem Synthan und dem Harzgerbstoff,
Bewegungszeiten: 45 min.

Beispiel 8:

Ausgangsmaterial: Chromgegerbte Blößen- oder Chromspalte
Falzstärke: 1,5 mm

Neutralisation: 3 % Ammoniumhydrogen
1 % Kalziumformiat
1 % Fett

Nachgerbung: 4 % einer 40%igen wäßrigen Lösung eines Copolymerisats aus 96 Gewichtsteilen Acrylsäure und
4 Gewichtsteilen Hydroxiethylacrylat (eingestellt mit Ammoniak auf pH = 7,5) sowie
14 Gewichtsteilen Ammoniumsulfat (bezogen auf den Festkörpergehalt der Lösung)
20 min bewegen

Nachsatz von 4 % synthetischer Gerbstoff (Kunstharzgerbstoff)

Fettung: 6 % Fettungsmittelgemisch
0,2 % Emulgator

Nachgerbung: 2 % eines synthetischen Gerbstoffes 10'

Die Leder, nach Beispiel 2 bis 7 nachgegerbt, zeichnen sich gegenüber den Ledern nach Beispiel 1 nachgegerbt, über die gesamte Lederfläche durch ein besonders gleichmäßiges, feines und elegantwirkendes Millkorn und Weichheit sowie durch eine gute Farbbrillanz aus.

Die mit der speziellen Nachgerbstoffformulierung nachgegerbten Spaltleder, wie im Beispiel 8 beschrieben, besitzen eine sehr gute Schleifbarkeit.