



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0033576

(51)⁷ C12P 17/16; D06P 5/15; D06M 16/00; (13) B
C12P 1/04

(21) 1-2017-03989

(22) 12/05/2016

(86) PCT/GB2016/000098 12/05/2016

(87) WO2016/162657 13/10/2016

(30) GB1506018.9 09/04/2015 GB

(45) 25/10/2022 415

(43) 26/02/2018 359A

(73) COLORIFIX LIMITED (GB)

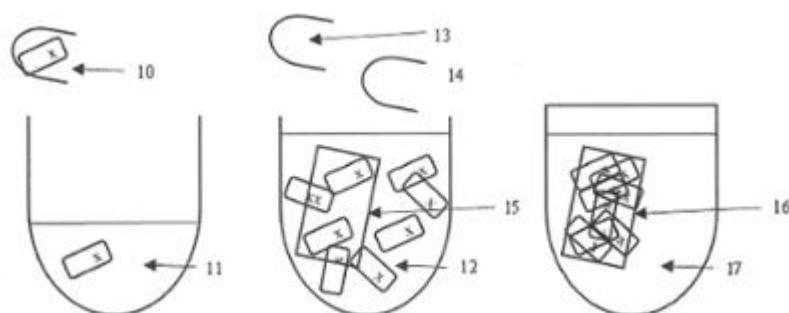
6 Dorral Dean Highfields Caldecote Cambridge CB23 7ZW, United Kingdom

(72) NUGENT, David Glen Hastie (GB); YARKONI, Orr (GB); AJIOKA, James (GB).

(74) Công ty TNHH Tư vấn Phạm Anh Nguyên (ANPHAMCO CO.,LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP NHUỘM VẬT LIỆU NỀN SỬ DỤNG VI SINH VẬT

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp nhuộm vật liệu nền sử dụng vi sinh vật, trong đó sự hấp phụ của các vi sinh vật chứa thuốc nhuộm lên sợi dệt được cải thiện bằng cách sử dụng các nguồn cacbon trên nồng độ ngưỡng. Các phân tử thuốc nhuộm chứa trong vi sinh vật được giải phóng khỏi vi sinh vật và cố định trực tiếp và cục bộ vào các sợi dệt bằng bước xử lý nhiệt. Bước xử lý nhiệt này cũng làm bất hoạt các vi sinh vật mang. Một hoặc nhiều loài vi sinh vật, và một hoặc nhiều thuốc nhuộm được sản sinh bởi một hoặc nhiều loài vi sinh vật đó có thể tạo ra nhiều màu sắc dệt khác nhau. Thuốc nhuộm tổng hợp thích hợp cũng có thể được thêm vào trước, trong hoặc sau khi các vi sinh vật đã sản sinh thuốc nhuộm nhưng trước bước xử lý nhiệt giải phóng thuốc nhuộm.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp nhuộm vật liệu nền như vải, tơ và sợi sử dụng vi sinh vật trong đó sự hấp phụ của các vi sinh vật chứa thuốc nhuộm lên sợi dệt được cải thiện sử dụng các nguồn cacbon trên nồng độ ngưỡng. Các phân tử thuốc nhuộm chứa trong vi sinh vật được giải phóng khỏi vi sinh vật và cố định trực tiếp và khu trú vào các sợi dệt bằng quá trình xử lý nhiệt. Quá trình xử lý nhiệt này cũng làm bất hoạt các vi sinh vật mang. Một hoặc nhiều loài vi sinh vật, và một hoặc nhiều loại thuốc nhuộm được sản sinh bởi một hoặc nhiều loài vi sinh vật đó có thể tạo ra nhiều màu sắc dệt khác nhau. Thuốc nhuộm tổng hợp thích hợp cũng có thể được thêm vào trước, trong hoặc sau khi các vi sinh vật đã sản sinh ra thuốc nhuộm nhưng trước bước xử lý nhiệt giải phóng thuốc nhuộm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sản xuất thuốc nhuộm

Phần lớn thuốc nhuộm vải hiện nay được tổng hợp hóa học và cần dùng đến các tiền chất và dung môi độc hại. Ước tính trên 10.000 loại thuốc nhuộm và bột màu khác nhau đã được sử dụng công nghiệp với hơn 700.000 tấn thuốc nhuộm tổng hợp được sản xuất hàng năm trên toàn thế giới (Checker và các đồng tác giả, 2013, Eco-friendly textile dyeing and finishing, tr. 151-176).

Sản xuất vi sinh bột màu đã được nghiên cứu hàng trăm năm. Đối với các bột màu như prodigiosin và violacein, các vi khuẩn tồn tại trong tự nhiên đã được nuôi cấy đặc biệt để sản sinh bột màu (JP10113169; JP55019070 A; JP55148091; JP63245666 A).

Patent Mỹ số 4,520,103 của Ensley mô tả phương pháp sản xuất bột màu chàm bằng một loại vi khuẩn tái tổ hợp trong môi trường không indol. Sử dụng các chủng cụ thể của *E. coli* tái tổ hợp để sản xuất bột màu chàm hoặc thuốc nhuộm màu chàm từ indol được mô tả cụ thể sử dụng gen mã hóa dioxygenaza thơm từ vi khuẩn khác để chuyển hóa indol.

Phương pháp điều chế indol được mô tả trong patent Mỹ số 5,112,747 của Van Grinsven và các đồng tác giả, Hart và các đồng tác giả (Microbiology 138 211-216 (1992) đã mô tả *E. coli* tái tổ hợp chứa gen *Rhodococcus* được nhân dòng để sản xuất bột màu chàm và indirubin. Indol được sản xuất sẽ được oxy hóa thành thuốc nhuộm màu chàm.

Patent Mỹ số 5, 077, 201 của Eyal và các đồng tác giả mô tả một chủng đột biến mới của nấm *Morel* đã được tìm thấy để sản xuất thuốc nhuộm màu xanh chàm bằng quá trình lên men chìm trong môi trường nuôi cấy dinh dưỡng chứa vật liệu nền cacbon và nitơ.

Nguồn cacbon đa dạng đã được đánh giá cao dùng cho việc sản xuất thuốc nhuộm vi sinh vật bao gồm glyxerol, maltoza, sucroza, xitrat, lactoza và glucoza (World Journal of Microbiology & Biotechnology (2005) 21: 969-972). Như được đề cập ở một số nơi khác trong tài liệu này, các nguồn cacbon như glyxerol có tác dụng như các chất kháng khuẩn ở nồng độ vượt quá 10% (v/v). Tương tự như vậy các hợp chất này được sử dụng để làm nguồn cacbon trong suốt quá trình sản xuất thuốc nhuộm vi sinh vật ở nồng độ vừa phải thường là <5% (thể tích/thể tích) phổ biến hơn là 1% (v/v).

Chiết xuất thuốc nhuộm

Một khi các bột màu hoạt động như thuốc nhuộm đã được tạo ra bởi vi khuẩn, quá trình chiết xuất bao gồm việc sử dụng dung môi hữu cơ như clorofom, ete, etyl axetat, dung dịch axit sulfuric dạng nước, axeton, hexan, benzen, etanol hoặc metanol (Patent Mỹ số 5, 077, 201; patent Mỹ số, 691, 171; Rettori và Duran năm 1998, World J. Microbiol. Biotech 14 : 685-688; JP10113169; JP63245666 A), hoặc đun sôi vi sinh vật trong dung dịch nước (JP2810287B2; JP10113169). Quá trình chiết xuất bằng dung môi sản xuất ra chất thải hóa học là các chất rất khó khăn và tốn kém để tái chế hoặc xử lý và gây hại lớn đến đời sống thủy sinh nếu thải ra đường nước.

Các bước chiết xuất thuốc nhuộm thứ cấp có thể bao gồm việc giảm thể tích, thay đổi dung môi, hoặc siêu âm hoặc làm đông lạnh (Patent Mỹ số 5, 834, 297; Patent Mỹ số 5, 691, 171).

Xử lý sơ bộ vải

Patent Mỹ số 6, 436, 696 bộc lộ quá trình xử lý sợi dệt bằng enzym không có chất hoạt động bề mặt, với hiệu quả tăng khả năng làm ướt và thấm hút của sợi. Các enzym là pectinaza, xenlulaza, proteaza, lipaza hoặc tổ hợp của chúng. Các đặc tính thấm ướt của sợi cotton nhận thấy sẽ được cải thiện đáng kể nhất bằng cách xử lý bằng hỗn hợp của xenlulaza và pectinaza. Như đã bộc lộ trong Patent Mỹ số 6,436, 696, các enzym đã nêu có thể được sản xuất bởi các vi sinh vật bao gồm nấm và vi khuẩn. Vi sinh vật sản xuất lipaza phù hợp bao gồm *Candida ancurdensis*, *Candida Antarctica*, *Candida atmospherica*, *Candida bombi*, *amyloliquefaciens Bacillus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* và nhiều vi sinh vật khác.

Cách xử lý sơ bộ vải đã biết được sử dụng trong quá trình nhuộm bằng thuốc nhuộm sản xuất bằng vi sinh. Các phương pháp xử lý sơ bộ bao gồm: 1) xà phòng tiêu chuẩn, natri cacbonat khan, L-histidin mono-hydroclorua mono-hydrat, NaCl và NaHPO₄ để làm trương nở vải và loại bỏ các tạp chất và 2) chất ăn màu như phèn, đồng sulfat, sắt sulfat, natri silicat, vôi tôi và chế phẩm từ me (Checker và các đồng tác giả, 2013, Eco-friendly textile dyeing and finishing, trang 151-176).

Lắng bám thuốc nhuộm

Kể từ những năm 1940 cả glyxerol và các alkylt dẫn xuất từ glyxerol đã phát hiện được ứng dụng rộng rãi trong nhiều quá trình nhuộm và in cho vật liệu dệt (*Uses of Glyxerol*, biên soạn bởi The Glyxerol Producers' Association). Chính glyxerol tạo ra bột màu nhão với khả năng làm việc cực tốt, thúc đẩy sự cố định của thuốc nhuộm trong bột màu nhão, làm tăng giá trị màu trong in ấn và hỗ trợ trong việc duy trì độ ẩm trong máy chung hấp.

Glyxerol là thành phần của nhiều thuốc nhuộm được vận chuyển ở dạng bột nhão vì nó ngăn chặn việc thuốc nhuộm khô bị khô, và dính vào các mặt của thùng. Đặc tính không gây ăn mòn và điểm đông đặc thấp là điều mong muốn trong ứng dụng này. Trong suốt quá trình nhuộm, khả năng trộn lẫn với nước của glyxerol có mặt trong bột nhuộm nhão và tác động dung môi của nó trên nhiều loại thuốc nhuộm hỗ trợ trong việc phân tán

thuốc nhuộm trong bồn nhuộm, nơi mà nhiệt độ sôi cao của glyxerol là một lợi thế khác. Thỉnh thoảng glyxerol được thêm trực tiếp vào bể nhuộm như trường hợp với các thuốc nhuộm nylon được phát triển bởi Nylon Task Commitee trong Thế chiến thứ hai để đáp ứng sự làm sạch nhanh và các yêu cầu khác của Quân đoàn sỹ quan quân nhu. Trong quá trình nhuộm naphtol, glyxerol đôi khi được sử dụng trước khi phản ứng kết hợp để cải thiện sự ổn định của dung dịch naphtol.

Nồng độ của glyxerol thường sử dụng trong các hỗn hợp thuốc nhuộm và bột nhuộm nhão còn bị hạn chế để giảm thiểu thời gian cần thiết để làm khô các loại vải sau khi nhuộm và giảm thiểu việc kiểm soát những khó khăn tương ứng ("Technicus" Rayon Textile, Mo 24, 65, Tháng Tám 1943). Trong một trường hợp, để nhuộm các sắc thái màu xanh, hỗn hợp sau đây được sử dụng: 1,7 kg Clorindantren xanh; 39,0 lít natri hydroxit; 6,4 kg hyposulfat; và 0,5 kg glyxerol (Textile Research Journal, tháng 3 năm 1944 vol. 14 số 3 69-73). Nồng độ glyxerol ở đây là 1,1% (v/v).

Theo Bennett, H., "Chemical Formulary" Tập VI, New York, Chem. Publishing Co., trang 518-9, năm 1943, thuốc nhuộm vải điển hình chứa: 20 gam màu trực tiếp; 310 gram nước nóng; 50 g glyxerol; 20 gram natri phosphat; 500 gram chất làm đặc dựa trên tinh bột; 100 gram albumin trứng. Bột màu nhão axit đương thời được quy định trực tuyến bởi Đại học Robert Gordon chứa 0,1-3 gam thuốc nhuộm axit, 5 gam glyxerol; 20 ml nước ấm; 60 gram Manutex RS; 2 gram Amoni Oxalat; và 5 ml nước nóng. Do đó có thể được quan sát thấy rằng nồng độ được khuyến cáo của glyxerol chứa trong thuốc nhuộm vải vẫn ở mức 5% (thể tích/thể tích) trong hơn 70 năm.

Phương thức nhuộm khác mà trong đó glyxerol tìm thấy ứng dụng bao gồm nhuộm hoàn nguyên cho vải axetat, nhuộm vải bông với màu trực tiếp, và việc điều chế của các hợp thuốc nhuộm để sử dụng trên len, lụa, bông, sợi tổng hợp và đặc biệt tơ nhân tạo và xơ cắt ngắn từ xenluloza. Quá trình nhuộm phun thường sử dụng glyxerol làm dung môi, chất phân tán và chất tạo huyền phù cho thuốc nhuộm hoặc bột màu. Các đặc tính không tạo bọt của các hợp chất thu được thúc đẩy sự nhuộm đồng đều. Nó cũng có thể được sử dụng để tạo ra các màu pha trộn theo hiệu ứng "umbray". Bên cạnh đó, nó có ứng dụng trong nhuộm tăng sôi, thuốc nhuộm axetat phân tán và thuốc nhuộm azoic.

Glyxerol cũng đã được sử dụng để làm chất điều hòa cho nguyên liệu dệt được sử dụng rộng rãi trong việc làm trơn, hồ vải, và làm mềm sợi hoặc vải. Hiệu quả của nó trong các ứng dụng này và các ứng dụng tương tự chủ yếu là do độ nhớt và khả năng hút ẩm, cả hai đặc tính này góp phần vào tác động làm dẻo. Chất hút ẩm, hoặc chất giữ ẩm, chất lượng cũng cần đến việc sử dụng glyxerol trong các quá trình xử lý đặc biệt, chẳng hạn như quá trình tăng khả năng dễ may mặc của vải hoặc để ngăn chặn tích điện trên sợi. Do không có khả năng thấm khí độc, đặc biệt là "mù tạt", glyxerol được tìm thấy có ứng dụng trong sản phẩm hoàn thiện chịu khí. Độ hòa tan trong nước cũng là một lợi ích khi glyxerol đóng vai trò như một chất làm trơn. Điều này bỏ qua sự cần thiết của các chất tẩy rửa mạnh, mà chúng có xu hướng gây tổn hại vải nhưng thường phải được sử dụng để loại bỏ dầu bôi trơn khác.

Để làm chất phụ gia cho các hợp chất làm trơn, chất hồ vải, các chất hoàn thiện khác nhau, glyxerol có tác dụng như chất làm dẻo, dung môi, và chất thấm. Nó ngăn ngừa sự khô và đóng bánh trên sợi, hạn chế sự tạo bụi của chất hồ vải, và có thể hỗ trợ trong việc làm phân tán dầu làm trơn không tan trong nước được cấp từ bồn nước.

Glyxerol cũng được bao gồm trong công thức pha chế mực in dựa trên dung dịch nước và dung môi. Ở đây chất này hoạt động như là một chất giữ ẩm để ức chế sự bay hơi của chất lỏng mang trong khi kiểm soát độ nhớt mực in và cũng ức chế động lực học chất lỏng trong quá trình bám lắng đọng. Quá trình lắng đọng mực in có thể bao gồm in phun, in lưới, in pad, vv. Thông thường nồng độ glyxerol với chất giữ ẩm khác trong công thức pha chế mực in là <20% (thể tích/thể tích) (Digital Imaging: Water-based Ink and HSE, Phôt Marketing Association International, 2004). Như đã giải thích trong patent Mỹ số 3, 846, 141, *Jet printing ink composition*, nồng độ cao hơn của glyxerol hoặc chất giữ ẩm khác không thể được sử dụng trong in phun vì hợp chất mực trở nên quá nhớt và hậu quả là sự đi qua của mực in qua các máy in phun bị ức chế.

Công bố đơn sáng chế quốc tế WO/2006/019.672 mô tả sự có mặt của glyxerol trong công thức pha chế mực in có thể tẩy được. Trong tài liệu này, glyxerol xuất hiện với một lượng lớn hơn hàm lượng nước, mà lượng nước là tương đối thấp, và thuốc nhuộm có thể tẩy được được cung cấp với lượng đáng kể để glyxerol và thuốc nhuộm có

thể tẩy được đem lại độ nhớt cần thiết cho mực bút bi. Trong tài liệu này, nước có mặt với lượng từ 10 đến 20% (thể tích/thể tích) và glyxerol có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 30 đến 50% (v/v).

Trong tất cả các trường hợp nêu trên, glyxerol được sử dụng để thay đổi tính chất vật lý, chủ yếu là độ nhớt và tính hút ẩm, của chất lỏng mang dựa trên nước hoặc dung môi nhưng không phải trên chính các chất màu của nó như thuốc nhuộm azo hoặc chất màu. Cụ thể hơn, glyxerol không có tương tác có ý nghĩa, có mục đích hay cố ý với các màu trực tiếp bất kể sự có mặt hay không có mặt của chất lỏng mang.

Patent Mỹ 5.872.002 mô tả một phương pháp tạo mẫu hoa văn cho nguyên liệu dệt sử dụng vi sinh vật để làm mất màu vải đã từng được nhuộm bằng thuốc nhuộm azo (mà cũng có thể chứa thuốc nhuộm không chứa azo). Kỹ thuật này được dựa trên khả năng của các chủng vi khuẩn *Xanthomonas* như NR25-2 để chuyển hóa thuốc nhuộm azo chứa nhiều loại đồng phân. Bằng cách sử dụng các chi tiết gia nhiệt tạo kiểu mẫu hoặc các bột nhão axit tạo kiểu mẫu, hoặc bột nhão kiềm tạo kiểu mẫu, hoặc chất tẩy tạo kiểu mẫu, các vùng có các chủng vi khuẩn lắng đọng lên vải bị bất hoạt do đó làm giữ màu azo. Đáng chú ý là chủng vi khuẩn này tự chúng không sản xuất hoặc lắng đọng chất màu nhưng loại bỏ thuốc nhuộm azo bằng việc chuyển hóa một phần hoặc hoàn toàn thuốc nhuộm azo đã được lắng đọng trước đó.

Thuốc nhuộm được sản xuất bằng vi khuẩn trong dung dịch có thể được kết tủa trực tiếp lên vải bằng phương pháp đã biết (JP10113169; JP2810287B2). Đối với violacein và prodigiosin, điều này đã được chứng minh làm việc trên nhiều loại vải (Yusof và các đồng tác giả, 2012, *Application of bacterial pigments as colorant: The Malaysian perspective*).

Glyxerol được báo cáo toàn cầu như một nguồn cacbon để sản xuất vi khuẩn (Biotechnology Advance 27 (2009) 30-39). Nồng độ glyxerol thông thường trong môi trường M9 là 2% (v/v). Nồng độ cao hơn của glyxerol có xu hướng ức chế sự phát triển của vi sinh vật. Thực sự là glyxerol đã được nghiên cứu để làm chất kháng khuẩn để bảo quản lâu dài các mảnh ghép da (Burns, Tập 34, Số 2, 205-211).

Cố định màu nhuộm

Đối với thuốc nhuộm được sản xuất bằng vi sinh, sự cầm màu (xem Fabric pre-treatment) đã được chứng minh là cải thiện việc chuyển thuốc nhuộm, thu được màu vải đậm hơn (Checker và các đồng tác giả, 2013, *Ecofriendly textile dyeing and finishing*, trang 151-176; Yusof và các đồng tác giả, 2012, *Application of bacrerial pigments as colorant: The Malaysian perspective*). Một số phương pháp bao gồm bổ sung thuốc ăn màu sau khi nhuộm như muối kim loại. Xử lý nhiệt để cố định thuốc nhuộm thường được sử dụng, với các phương pháp bao gồm gia nhiệt trong dung dịch ở nhiệt độ trên 80°C (JP10113169; Checker và các đồng tác giả, 2013, *Eco-friendly textile dyeing and finishing*, trang 151-176.).

Patent Mỹ 2.297.230 mô tả việc sử dụng glyxerol để làm chất phụ gia trong quá trình xử lý nhiệt ẩm trong dệt may. Ở đây, glyxerol dùng để tăng cường sự gắn kết của dầu Turkey Red, một chất tẩy rửa tổng hợp, vào vải trong quá trình xử lý nhiệt ẩm. Patent Mỹ 2.297.230 xác định thêm rằng glyxerol nên được phân phối khi kết hợp với formalin (formaldehyde trong nước) để ngăn chặn đến một mức độ đáng kể sự hình thành của nấm mốc và bào tử. Do đó Patent Mỹ 2.297.230 không liên quan đến sáng chế này vì: (a) nó không liên quan đến quá trình nhuộm cho nguyên liệu dệt, (b) sử dụng hơi nước mà không phải là dung dịch nước, và (c) bao gồm một chất sẽ rất có hại cho quá trình vi sinh trong sáng chế này.

Quản lý chất thải

Tất cả các bước trên đòi hỏi quản lý chất thải và tiết kiệm nước do nhiều loại thuốc nhuộm, tiền chất và các dung môi của chúng được sử dụng để sản xuất và chiết xuất chúng là có mối nguy hại cho sức khỏe con người và môi trường. Ngành dệt may tiêu thụ một lượng lớn nước trong quá trình sản xuất, chủ yếu là do quá trình nhuộm. Nước thải từ nhà máy dệt được phân loại là có độ ô nhiễm cao nhất trong tất cả các phương pháp công nghiệp (Checker và các đồng tác giả, 2013, *Eco-friendly textile dyeing and finishing*, trang 151-176).

Trong quá trình nhuộm, 10-50% thuốc nhuộm bị thất thoát làm thành chất thải và tồn tại trong nước thải (Checker và các đồng tác giả, 2013, Eco-friendly textile dyeing and finishing, tr. 151-176). Trên quy mô toàn cầu, điều này dẫn đến 2×10^5 tấn thuốc nhuộm được thải vào môi trường mỗi năm (Checker và các đồng tác giả, 2013, Eco-friendly textile dyeing and finishing, tr. 151-176). Trung bình, tỷ lệ khối lượng nước / vải cần thiết lên đến 100: 1 (HuntsmanTextile Effects, Singapore).

Tóm lại, các phương pháp đã biết hiện tại để sản xuất thuốc nhuộm vải và truyền màu và cố định thuốc nhuộm này lên các loại vải, sợi và sản phẩm dệt may đòi hỏi việc sản xuất và sử dụng chất độc hoá học và phát sinh chất thải độc hại. Hơn nữa việc tiêu thụ nước trong quá trình nhuộm và xử lý nước thải tiếp tục gây ra gánh nặng đáng kể đối với nhu cầu nước tại địa phương. Trong khi giá trị của glyxerol để làm chất phụ gia nhuộm và chất xử lý vải đã được thừa nhận rộng rãi, nồng độ chất này được giới hạn ở mức thấp (thường là dưới 5% (v/v)). Trong khi các quá trình sản xuất vi sinh thuốc nhuộm vải đã được thảo luận, các phương pháp này không mở rộng đến các phương pháp hoàn thiện để chiết xuất, kết tủa và cố định thuốc nhuộm vào sợi vải.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp nhuộm vật liệu nền có độ bền màu cao, giảm thiểu vấn đề tiêu thụ nước và tiêu thụ năng lượng.

Để đạt được mục đích trên, sáng chế đề xuất phương pháp nhuộm vật liệu nền bao gồm các bước:

a. Nuôi cấy vi sinh vật sản sinh thuốc nhuộm với sự có mặt của vật liệu nền cần được nhuộm, và với sự có mặt của môi trường sinh trưởng chứa nguồn cacbon ở nồng độ ngưỡng định trước nằm trong khoảng từ 10 % (thể tích/thể tích) đến 90% (thể tích/thể tích) để cho vi sinh vật được nuôi cấy tiếp xúc với vật liệu nền;

b. Phân giải các vi sinh vật đã nuôi cấy để giải phóng thuốc nhuộm tiếp xúc với vật liệu nền; và

c. Cố định thuốc nhuộm đã được giải phóng lên vật liệu nền.

Nồng độ ngưỡng định trước nêu trên của nguồn cacbon là phụ thuộc vào nguồn cacbon được chọn để tối ưu hóa tốc độ truyền của vi sinh vật chứa thuốc nhuộm vào vật liệu nền, và đặc tính của việc cố định thuốc nhuộm lên vật liệu nền sau đó.

Theo một phương án:

(a) Các bước phân giải và cố định được thực hiện trong một phương pháp duy nhất; và/ hoặc:

(b) Các bước phân giải và cố định được thực hiện bằng cách cho vật liệu nền và vi sinh vật vào xử lý gia nhiệt ở nhiệt độ trên 100 °C, tùy ý nhiệt được chọn từ nhiệt trực tiếp hoặc nhiệt gián tiếp; trong đó nhiệt trực tiếp là để cho vật liệu nền và vi sinh vật tiếp xúc trong đồ chứa phù hợp để trên ngọn lửa, tấm sưởi hoặc lò sưởi điện; hoặc trong đó nhiệt gián tiếp là gia nhiệt vật liệu nền và vi sinh vật trong nồi hấp hoặc chiếu vi sóng.

Theo một phương án, một hoặc nhiều thông số môi trường nuôi cấy được chọn từ nhiệt độ, nồng độ cacbon dioxit, pH và tần suất khuấy được chọn sao cho tối ưu hóa quá trình sản sinh thuốc nhuộm, tốc độ truyền đến vật liệu nền, và đặc tính của quá trình cố định lên vật liệu nền.

Theo một phương án, phương pháp theo sáng chế còn bao gồm bước: a. Đầu tiên nuôi cấy vi sinh vật sản sinh thuốc nhuộm với sự không có mặt của vật liệu nền cần được nhuộm, trước bước 1a; và/hoặc rửa vật liệu nền đã nhuộm để loại bỏ các chất thải nhiễm bẩn trước và sau bước 1c.

Theo một phương án, hai hoặc nhiều vi sinh vật khác nhau được sử dụng đồng thời; tùy ý trong đó hai hoặc nhiều thuốc nhuộm khác nhau được tạo ra bởi một hoặc nhiều vi sinh vật khác nhau.

Theo một phương án, các thuốc nhuộm bổ sung, kể cả thuốc nhuộm được bổ sung ngoại sinh, đều có mặt trong các bước phân giải và cố định.

Theo một phương án, vật liệu nền được chọn từ các vật liệu tự nhiên, vật liệu tổng hợp, bán tổng hợp và vật liệu pha trộn, tùy ý, trong đó: a) vật liệu nền tự nhiên là vật liệu được chọn từ lụa, bông, lanh, len, và da; (b) vật liệu nền bán tổng hợp được chọn từ tơ

nhân tạo và axetat; hoặc (c) vật liệu nền tổng hợp được chọn từ polyester, nylon, acrylic, elastin, polyvinyl và các dẫn xuất hóa chất dầu mỡ tương tự.

Theo một phương án, a) vi sinh vật sản sinh thuốc nhuộm tạo ra thuốc nhuộm được chọn từ các chất màu có nguồn gốc sinh học, protein mang màu, protein huỳnh quang và protein phát quang sinh học; và/ hoặc: (b) các vi sinh vật được biến đổi di truyền.

Theo một phương án, (A) vi sinh vật là các sinh vật nhân chuẩn, trong đó tùy ý các vi sinh vật nhân chuẩn được chọn từ thực vật, tảo và nấm; các ấu trùng và động vật chân đốt; hoặc (B) các vi sinh vật là những sinh vật nhân sơ; trong đó tùy ý (a) động vật nhân sơ được lựa chọn từ vi khuẩn cổ và vi khuẩn thật; (b) các vi sinh vật nhân sơ là vi khuẩn Gram dương được lựa chọn từ *Bacillus* spp. và *Clostridium* spp; hoặc (c) các vi sinh vật nhân sơ là vi khuẩn Gram âm được lựa chọn từ *Escherichia* spp., *Pseudomonas* spp., *Chromobacterium* spp., *Janthinobacter* spp.

Theo một phương án, bước nuôi cấy được tiến hành: (a) trong môi trường sinh trưởng được lựa chọn từ lò ủ, ủ lắc, lên men và thiết bị lên men sinh học; và/ hoặc (b) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 1°C đến 150 °C; và/ hoặc (c) ở nồng độ cacbon dioxit nằm trong khoảng từ 0% đến 10%; và/ hoặc (d) ở pH nằm trong khoảng từ 1,5 đến 9,5.

Theo một phương án, môi trường sinh trưởng được chọn từ Luria- Bertani Broth (LB), Terrific Broth (TB), Super Optimal Broth (môi trường SOB), Super Optimal Broth với chất ức chế sản phẩm dị hóa (SOC), pepton dextroza chiết xuất từ nấm men (YPD).

Theo một phương án, (a) nguồn cacbon được chọn tùy ý từ dextroza, glucoza, sucroza, tinh bột khoai tây, xitrat, lactoza, maltoza, glyxerol, xantoza, và arabinoza; trong đó nguồn cacbon là glyxerol và/hoặc (b) tốt hơn nếu nguồn cacbon có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 15% (thể tích/thể tích) đến 60% (thể tích/thể tích) tốt hơn là từ 20% (thể tích/thể tích) đến 40% (thể tích/thể tích).

Theo một phương án, nồng độ nguồn cacbon ngưỡng được chọn sao cho thúc đẩy sự sai lệch về hình dạng của vi sinh vật trong quá trình sinh trưởng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp nhuộm vật liệu nền theo các điểm 1 đến 3 sử dụng thuốc nhuộm chứa trong vi sinh vật sản sinh thuốc nhuộm.

Phương pháp này có thể đạt được bằng cách tuân thủ các điều kiện dưới đây khi nhuộm vật liệu nền (như vải) trực tiếp sử dụng các vi sinh vật hoạt động như các tác nhân xử lý sơ bộ vật liệu nền cũng như sản xuất, kết tủa và cố định thuốc nhuộm.

Đối với quá trình sản xuất thuốc nhuộm, cả vi sinh vật tự nhiên (không tái tổ hợp) có khả năng sản xuất cả thuốc nhuộm trung gian và các thuốc nhuộm cuối giống như vi sinh vật tái tổ hợp đã được làm biến đổi để có thể sản xuất các thuốc nhuộm trung gian hoặc thuốc nhuộm cuối có thể được sử dụng trong phương pháp này.

Xử lý sơ bộ (kể cả làm biến đổi vật liệu nền thuộc loại bất kỳ) xảy ra thông qua quá trình trao đổi chất được thực hiện bởi các vi sinh vật xâm nhập vào vật liệu nền và bởi các chất trung gian tạo thuận lợi cho các quá trình này. Xử lý sơ bộ cho phép thấm/thẩm thấu/cố định thuốc nhuộm hiệu quả hơn trong vật liệu nền. Sự kết tủa của thuốc nhuộm đạt được thông qua quá trình sản xuất cục bộ và giải phóng thuốc nhuộm bởi vi sinh vật đã thấm thấu vào vật liệu nền. Nồng độ khu trú gia tăng dẫn đến sự hấp thụ thuốc nhuộm cao hơn và giảm đáng kể một lượng lớn thuốc nhuộm tự do trong dung dịch dẫn đến sự giảm đáng kể lượng chất thải. Trong bước cố định thuốc nhuộm, phần lớn thuốc nhuộm xuất hiện trong vi sinh vật bị bất hoạt được chuyển tới vật liệu nền do sự phân giải.

Sự cố định thuốc nhuộm đạt được thông qua việc để vật liệu nền đã được xử lý ở nhiệt độ trên 121°C. Điều này có mục đích kép là bất hoạt tất cả các vi sinh vật có mặt trên vật liệu nền cũng như cố định thuốc nhuộm lên vật liệu. Nồi hấp tự động công nghiệp, chế tạo bởi Sparrow Tex Engineering Works and Bluemoon Machines Manufacturing Company, có thể sử dụng để thiết lập nhiệt và điều hòa sợi trong phạm vi công suất khác nhau.

Bước rửa cuối cùng loại bỏ phần lớn các vi sinh vật bất hoạt và mảnh vụn vi sinh vật ra khỏi vật liệu nền. Vật liệu nền thành phẩm sau đó được tiệt trùng và làm sạch để đạt được các yêu cầu gần với các yêu cầu quy định chuẩn của thiết bị y tế.

Có lợi là phương pháp được mô tả vượt trội hơn các phương pháp sản xuất thuốc nhuộm, chuyển thuốc nhuộm và cố định thuốc nhuộm truyền thống liên quan đến việc tạo ra chất thải, tiêu thụ nước, và tiêu thụ năng lượng. Chất thải phát sinh sử dụng phương pháp được mô tả không bao gồm thành phần bất kỳ sau đây: dung môi hữu cơ, các sản phẩm có tính axit hoặc kiềm, như chất tẩy trắng. Quá trình xử lý, bất hoạt và thải các chất thải phát sinh từ phương pháp này trở nên an toàn và không tốn kém so với các phương pháp truyền thống. Tất cả các chất thải phát sinh từ phương pháp này là các chất phân hủy sinh học. Một số sản phẩm chất thải phát sinh từ quá trình này có thể có giá trị thương mại, ví dụ như làm phân bón cho cây trồng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 minh họa phương pháp gia tăng và kết tủa thuốc nhuộm được sản sinh bởi vi sinh vật theo JP2810287B2. Hình 1A minh họa bước thứ nhất trong đó loài vi sinh vật sản sinh thuốc nhuộm đơn (1) được nuôi cấy trong dung dịch môi chất (2).

Hình 1B thể hiện bước thứ hai trong đó vi sinh vật được nuôi cấy trong môi chất thứ hai (3) trong vòng 18 giờ ở 30 °C. Hình 1C thể hiện bước thứ ba trong đó một sản phẩm phân hủy len (4) được thêm vào dung dịch môi chất và lắc trong năm ngày ở 30°C.

Hình 1D thể hiện bước thứ tư trong đó các sợi (5) được thêm vào dung dịch môi chất trong khi một số thuốc nhuộm chứa trong các vi sinh vật được giải phóng vào các dung dịch môi chất (6) bằng cách đun sôi các dung dịch môi chất ở 100°C trong 20 phút.

Hình 1E thể hiện bước thứ sáu trong đó các sợi được đưa ra khỏi bể nhuộm sau khi làm sôi và rửa sạch dưới dòng nước chảy để loại bỏ dung dịch môi chất còn lại và chất màu không bám. Một số lượng không xác định của thuốc nhuộm sẽ vẫn còn trong dung dịch môi chất (7) và bám vào sản phẩm phân hủy len (8).

Hình 2 minh họa phương pháp nhuộm vật liệu dệt theo sáng chế.

Hình 3 minh họa sự sinh trưởng của vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy lỏng ở đây là E. coli, ở nồng độ 1% (thể tích/thể tích) glyxerol trong 50% (thể tích/thể tích) môi trường LB và nước.

Hình 4 và hình 5 minh họa sự sinh trưởng của vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy lỏng ở đây là *E. coli*, ở nồng độ 5% (thể tích/thể tích) glyxerol trong 50% (thể tích/thể tích) môi trường LB và nước.

Hình 6 minh họa sự sinh trưởng của vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy lỏng ở đây là *E. coli*, ở nồng độ 10% (thể tích/thể tích) glyxerol trong 50% (thể tích/thể tích) môi trường LB và nước.

Hình 7 và hình 8 minh họa sự sinh trưởng của vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy lỏng, ở đây là *E. coli*, ở nồng độ 20% (thể tích/thể tích) glyxerol trong 50% (thể tích/thể tích) môi trường LB và nước.

Hình 9 đến Hình 11 minh họa sự phát triển một vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy lỏng ở đây là *E. coli*, ở nồng độ 50% (thể tích/thể tích) glyxerol trong 50% (thể tích/thể tích) môi trường LB và nước.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các dấu hiệu kỹ thuật và ưu điểm của sáng chế này sẽ dễ hiểu hơn, bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, sau khi đọc phần mô tả chi tiết sau. Nó thừa nhận rằng những dấu hiệu kỹ thuật nhất định của sáng chế, nhằm mục đích rõ ràng, được mô tả ở trên và dưới đây trong bối cảnh của các phương án riêng biệt, cũng có thể được cung cấp trong sự kết hợp trong một phương án duy nhất. Ngược lại, các dấu hiệu kỹ thuật khác nhau của sáng chế được nhằm mục đích ngắn gọn, được mô tả trong ngữ cảnh của một phương án duy nhất, cũng có thể được đề xuất riêng biệt hoặc trong sự kết hợp bất kỳ nào. Ngoài ra, các chỉ dẫn dùng số ít cũng có thể bao gồm số nhiều (cho ví dụ, "một" có thể cập đến là một, hoặc nhiều hơn) trừ khi bối cảnh cụ thể nói khác.

Việc sử dụng các giá trị số trong các phạm vi khác nhau được mô tả trong đơn sáng chế này, trừ khi được nêu chính xác, dùng để chỉ giá trị xấp xỉ như giá trị tối thiểu và cực đại trong phạm vi được chỉ ra đều bằng từ "khoảng". Theo phương thức này, các biến thể nhỏ trên và dưới các khoảng giá trị được nêu có thể được sử dụng để đạt được kết quả gần như tương tự với các giá trị nằm trong phạm vi. Ngoài ra, việc bộc lộ

những phạm vi này nhằm mục đích như là một phạm vi liên tục bao gồm mọi giá trị giữa mức tối thiểu và cực đại.

Tất cả các tài liệu sáng chế, các đơn sáng chế và các đơn công bố sáng chế được đề cập đến ở đây đều được kết hợp bằng cách viện dẫn.

Phương pháp này nhằm mục đích kết hợp các bước xử lý sơ bộ vật liệu nền và sản xuất, kết tủa và cố định theo từng vị trí của các vật liệu nền (như vải). Vải có thể là tự nhiên (bông, lụa, len và các vật liệu khác có bản chất tương tự) hoặc tổng hợp (polyeste, rayon, elastan và một số vật liệu khác có bản chất tương tự) về thành phần.

Sản xuất thuốc nhuộm đạt được nhờ sử dụng vi sinh vật có khả năng sản sinh thuốc nhuộm với các tính chất mong muốn trong thuốc nhuộm. Cả vi sinh vật tự nhiên (không tái tổ hợp) có khả năng sản xuất thuốc nhuộm trung gian và thành phẩm và cả các vi sinh vật tái tổ hợp đã được biến đổi để có thể sản xuất thuốc nhuộm trung gian và thành phẩm có thể được sử dụng trong phương pháp này. Các ví dụ bao gồm nhưng không chỉ hạn chế ở: *Serratia* spp, *Janthinobacter* spp., *Chromobacterium* spp., *Bacillus* spp., *Escherichia* spp., *Vi khuẩn cyanobacteria* spp., *Pseudomonas* spp. Ví dụ, một dạng dẫn xuất K12 của *E. coli* được biến tính để sản xuất với số lượng lớn violacein bằng cách nạp plasmid mang violacein operon đã được cải biến. Quá trình cải biến bao gồm việc sắp xếp lại thứ tự của trình tự mã hóa enzym, việc bổ sung các vị trí gắn ribosome trước mỗi trình tự mã hóa và sự tối ưu hóa codon của các trình tự mã hóa để biểu hiện ở *E. coli*.

Hầu như vi sinh vật bất kỳ mà có thể biến đổi di truyền đều có thể được dùng cho phương pháp này. Tính sáng tạo liên quan đến phương pháp này là áp dụng trực tiếp vi sinh vật lên vật liệu nền để tạo thuận lợi cho quá trình nhuộm cục bộ vật liệu nền.

Xử lý sơ bộ (bao gồm cả quá trình biến đổi vật liệu nền dưới bất kỳ hình thức nào) xảy ra thông qua quá trình trao đổi chất được tiến hành bởi các vi sinh vật thấm vào vật liệu nền và bởi các chất trung gian tạo thuận lợi cho các phương pháp này. Quá trình xử lý sơ bộ cho phép hiệu quả hơn trong sự thâm nhập, thấm và cố định thuốc nhuộm trong vật liệu nền.

Bước xử lý sơ bộ được thực hiện bởi vi sinh vật trong một phạm vi các điều kiện rộng mà điều khiển sự trao đổi chất vi sinh vật thông qua các thông số khác nhau, như hàm lượng chất dinh dưỡng, pH và độ muối. Chúng vi sinh vật được sử dụng trong quá trình này sẽ quyết định thành phần tối ưu của môi trường trung gian. Ví dụ, *Chromobacterium violaceum* đòi hỏi một môi trường tối ưu rất khác so với *Escherichia coli*.

Như một ví dụ về phương án của sáng chế này, một dạng dẫn xuất K12 của *E. coli* mà đã được biến đổi để tạo ra một số lượng lớn violacein được sử dụng để xử lý sơ bộ các vật liệu nền sau: lụa, len, tơ nhân tạo, polyeste, elastan, bông và lanh. Chất trung gian được sử dụng để xử lý sơ bộ các vật liệu nền bằng chủng nêu trên của *E. coli* bao gồm các thành phần cơ bản sau: nguồn cacbon, nguồn nitơ, nguồn axit amin, nguồn muối kim loại và nước.

Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, chúng tôi cho rằng khả năng hấp phụ cải tiến của vi sinh vật chứa thuốc nhuộm vào vải dệt là do sự thay đổi trong hình thái của các vi sinh vật khi tiếp xúc với nguồn cacbon khi nguồn cacbon này là vượt quá nồng độ ngưỡng. Cụ thể hơn, vượt quá nồng độ cụ thể của nguồn cacbon thì các vi sinh vật trở nên dài hơn đáng kể và bị sai lệch hình dạng. Vi sinh vật dài hơn nhiều khả năng vướng vào sợi vải trong khi vận hành dọc theo chiều dài của chúng có nghĩa là chúng khó khăn hơn để rời ra khỏi các chỗ neo của sợi vải. Ngưỡng hàm lượng chính xác sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố như loài vi sinh vật, nguồn cacbon được sử dụng, và điều kiện hoạt động như nhiệt độ và độ pH. Nói chung chúng tôi đã tìm thấy nồng độ ngưỡng nằm trong khoảng từ 10% (thể tích/thể tích) đến 60% (thể tích/thể tích) thông thường là từ 20% (thể tích/thể tích) đến 40% (v/v).

Hình 1 minh họa phương pháp gia tăng và kết tủa thuốc nhuộm được sản sinh bởi vi sinh vật theo JP2810287B2. Hình 1A minh họa bước thứ nhất trong đó loài vi sinh vật sản sinh thuốc nhuộm đơn (1) được nuôi cấy trong dung dịch môi chất (2).

Hình 1B thể hiện bước thứ hai trong đó vi sinh vật được nuôi cấy trong môi chất thứ hai (3) trong vòng 18 giờ ở 30 °C. Hình 1C thể hiện bước thứ ba trong đó một

sản phẩm phân hủy len (4) được thêm vào dung dịch môi chất và lắc trong năm ngày ở 30°C.

Hình 1D thể hiện bước thứ tư trong đó các sợi (5) được thêm vào dung dịch môi chất trong khi một số thuốc nhuộm chứa trong các vi sinh vật được giải phóng vào các dung dịch môi chất (6) bằng cách đun sôi các dung dịch môi chất ở 100°C trong 20 phút.

Hình 1E thể hiện bước thứ sáu trong đó các sợi được đưa ra khỏi bể nhuộm sau khi làm sôi và rửa sạch dưới dòng nước chảy để loại bỏ dung dịch môi chất còn lại và chất màu không bám. Một số lượng không xác định các chất màu sẽ vẫn còn trong dung dịch môi chất (7) và bám vào sản phẩm phân hủy len (8).

Hình 2 minh họa phương pháp nhuộm vải dệt theo sáng chế. Trước bước nhuộm thứ nhất, vi sinh vật sản sinh thuốc nhuộm (10) được sản xuất theo các phương pháp vi sinh học tiêu chuẩn. Những phương pháp này có thể bao gồm các kỹ thuật như sinh học tổng hợp và kỹ thuật di truyền. Khuẩn lạc đơn của vi sinh vật được nuôi cấy trong dung dịch môi chất theo phương pháp chuẩn.

Trong bước nhuộm đầu tiên, vi sinh vật sản sinh thuốc nhuộm (10) được nuôi cấy trong dung dịch môi chất (11) và để sinh trưởng qua đêm theo kỹ thuật vi sinh học tiêu chuẩn. Môi trường nuôi cấy thu được chứa nồng độ cao các vi sinh vật chứa thuốc nhuộm (12) sau đó được bổ sung một lượng lớn dung dịch môi chất (13) và một lượng thứ hai của nguồn cacbon (14). Nồng độ nguồn cacbon thu được phải nằm trong phạm vi từ 10% (thể tích/thể tích) đến 90% (thể tích/thể tích) tốt nhất là từ 15% (thể tích/thể tích) đến 60% (thể tích/thể tích) tốt hơn nữa là từ 20% (v/v) đến 40% (v/v). Vật liệu nền (15), ví dụ vải hoặc sợi, được cho vào môi trường nuôi cấy và ủ qua đêm theo phương pháp chuẩn.

Sau khi nuôi cấy qua đêm, đại đa số các vi sinh vật chứa thuốc nhuộm sẽ được hấp thụ vào vật liệu nền (16) bao gồm các khoảng trống giữa các sợi gần nhau. Tương tự như vậy môi trường nuôi cấy và nguồn cacbon (17) sẽ bị tiêu hao đáng kể bởi vi sinh vật.

Trong bước nhuộm thứ hai, vật liệu nền đã được nhuộm (18) được lấy ra khỏi môi trường nuôi cấy và rửa sạch trong bể nước (19) để loại bỏ nguồn cacbon còn sót

lại và mảnh vụn vi sinh vật ra khỏi vật liệu nền. Nước rửa thải, có thể chứa một lượng dư thừa của các vi sinh vật tự do, có thể được tái sử dụng trong các mẻ nhuộm tiếp theo hoặc tiệt trùng trong chất tẩy trắng nhẹ hoặc nồi hấp hơi nước. Vật liệu nền đã được nhuộm được xử lý nhiệt như là khô (không được minh họa) hoặc hấp hơi nước (20) hoặc chiếu vi sóng (không được minh họa). Trong mọi trường hợp, nhiệt độ áp dụng phải cao hơn 100°C, tốt nhất là 121°C. Bước nhuộm thứ hai này thực hiện vai trò kép (a) là giải phóng thuốc nhuộm từ các vi sinh vật trực tiếp lên vật liệu nền mà trên đó các vi sinh vật được hấp phụ thông qua quá trình phân giải, và (b) cố định thuốc nhuộm giải phóng cùng với chất phân giải lên vật liệu nền. Sự cố định thuốc nhuộm và khử trùng nước rửa thải có thể được thực hiện trong cùng một chu kỳ nồi hấp.

Máy làm sạch (21) hoạt động sử dụng các giá trị thiết lập tiêu chuẩn (ví dụ rửa ở 40°C bằng chất tẩy sinh học) loại bỏ vi sinh vật đã bị phân giải (22) ra khỏi vật liệu nền (23) cùng với các phân tử thuốc nhuộm (24) đã được cố định vào các sợi của nó. Vật liệu nền đã làm sạch được sấy khô bằng phương pháp chuẩn (không được minh họa).

Hình 3 minh họa sự sinh trưởng của vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy lỏng, ở đây là *E. coli*, ở nồng độ 1% (thể tích/thể tích) glyxerol trong 50% (thể tích/thể tích) môi trường LB và nước. *E. coli* được nuôi cấy trong 24 giờ ở 50% (thể tích/thể tích) môi trường LB (10g NaCl, 5g chiết xuất nấm men, 1g Pepton, 1L nước) và 1% (thể tích/thể tích) glyxerol. Vi sinh vật được phát triển tốt và độ dài trung bình của vi khuẩn đo được là khoảng 3,5 micron.

Hình 4 và hình 5 minh họa sự sinh trưởng của vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy lỏng, ở đây là *E. coli*, ở nồng độ 5% (thể tích/thể tích) glyxerol trong 50% (thể tích/thể tích) môi trường LB và nước. *E. coli* được sinh trưởng trong 24 giờ ở 50% (thể tích/thể tích) môi trường LB (10g NaCl, 5g chiết xuất nấm men, 1g Pepton, 1L nước) và 5% (thể tích/thể tích) glyxerol. Vi sinh vật đã sinh trưởng tốt mặc dù không nhiều như nồng độ 1% (v/v). Độ dài trung bình của vi khuẩn đo được nằm trong khoảng từ 4 micron đến 5 micron.

Hình 6 minh họa sự sinh trưởng của vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy lỏng, ở đây là *E. coli*, ở nồng độ 10% (thể tích/thể tích) glyxerol trong 50% (thể tích/thể tích) môi trường LB và nước. *E. coli* đã được nuôi trong 24 giờ ở 50% (thể tích/thể tích) môi trường LB (10g NaCl, 5g chiết xuất nấm men, 1g Pepton, 1L nước) và 1 0% (thể tích/thể tích) glyxerol. Sự sinh trưởng của vi sinh vật thấp hơn đáng kể so với trường hợp 1 % (v/v). Độ dài trung bình của vi sinh vật đo được là 11 micron. Vi sinh vật trở nên bị cong theo chiều dài của chúng.

Hình 7 và hình 8 minh họa sự sinh trưởng của vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy lỏng, ở đây là *E. coli*, ở nồng độ 20% (thể tích/thể tích) glyxerol trong 50% (thể tích/thể tích) môi trường LB và nước. *E. coli* được nuôi trong 24 giờ ở 50% (thể tích/thể tích) môi trường LB (10g NaCl, 5g chiết xuất nấm men, 1g Pepton, 1L nước) và 20% (thể tích/thể tích) glyxerol. Sự sinh trưởng của vi sinh vật thấp hơn rất đáng kể so với trường hợp 1% (v/v). Độ dài vi khuẩn đo được nằm trong khoảng từ 15 micron đến 20 micron. Các vi sinh vật trở nên cong đáng kể dọc theo chiều dài của chúng.

Hình 9 đến hình 11 minh họa sự phát triển vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy lỏng, ở đây là *E. coli*, ở nồng độ 50% (thể tích/thể tích) glyxerol trong 50% (thể tích/thể tích) môi trường LB và nước. *E. coli* được nuôi trong 24 giờ ở 50% (thể tích/thể tích) môi trường LB (10g NaCl, 5g chiết xuất nấm men, 1g Pepton, 1L nước) và 50% (thể tích/thể tích) glyxerol. Sự sinh trưởng của vi sinh vật thấp hơn rất đáng kể so với trường hợp 1% (v/v). Độ dài vi khuẩn đo được nằm trong khoảng từ 10 micron đến 15 micron. Các vi sinh vật đã bị biến dạng đáng kể dọc theo chiều dài của chúng.

Các chất phụ gia cho môi trường có thể sử dụng:

Các môi trường được bổ sung thêm muối ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂, ZnCl₂, dạng đơn lẻ hoặc kết hợp. Các môi trường được bổ sung nguồn axit amin, ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: Tryptone, Pepton, Bacto -Pepton, axit Casein-amino, ở dạng đơn lẻ hoặc kết hợp. Môi chất được bổ sung thêm nguồn cacbon, ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: chiết xuất men, Sucroza, glucose, Glyxerol, Fructose, Xylose, Lactoza, arabinose, ở dạng đơn

lê hoặc kết hợp. Môi trường được bổ sung nguồn nitơ, ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: chiết xuất nấm men, Tryptone, Pepton, Bacto -Pepton, Casein - axit amin, dạng đơn lẻ hoặc kết hợp. Tất cả các chất phụ gia cho môi trường nêu trên có thể được sử dụng với kết quả khác nhau, tùy thuộc vào vi sinh vật được sử dụng cho quá trình xử lý sơ bộ.

Điều kiện sinh trưởng:

Điều kiện sinh trưởng tối ưu thay đổi phụ thuộc vào các vi sinh vật được sử dụng cho quá trình xử lý sơ bộ. Các thông số mà ảnh hưởng rất nhiều đến kết quả cuối cùng bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: pH, độ muối và nhiệt độ.

Như một ví dụ của sáng chế, dẫn xuất K12 của *E. coli* đã được biến đổi để sản xuất với số lượng lớn violacein được sử dụng để xử lý sơ bộ các vật liệu nền sau: lụa, len, tơ nhân tạo, polyeste, elastan và bông. Các điều kiện sinh trưởng khác nhau đã được thử nghiệm, với phạm vi độ pH nằm trong khoảng 5-9, phạm vi độ muối nằm trong khoảng từ 0,1% đến 3%, và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 42°C. Phạm vi tối ưu cho các thông số này đã được tìm thấy là: pH 5,8-8,2, độ muối 0,5% -1,5% và nhiệt độ: 30°C đến 40°C.

quá trình xử lý sơ bộ tạo điều kiện cho sự tương tác giữa các thể chứa thuốc nhuộm (vi sinh vật) và vật liệu nền (vải). Để đạt được hiệu quả này, vi sinh vật được sinh trưởng trong môi trường thích hợp (xem thành phần môi trường ở trên) trong khoảng thời gian 12-48 giờ tùy thuộc vào tỷ lệ mầm cấy – và chất gây mầm, thành phần môi chất được sử dụng và điều kiện sinh trưởng được sử dụng. Sau đó, toàn bộ môi trường nuôi cấy được bổ sung thêm môi trường bổ sung (xem thành phần môi trường ở trên) và vật liệu nền được bổ sung vào thời điểm này. Quá trình xử lý sơ bộ diễn ra trong khung thời gian tương tự như giai đoạn sinh trưởng.

Quá trình kết lắng thuốc nhuộm đạt được thông qua quá trình sản xuất và giải phóng cục bộ thuốc nhuộm bởi các vi sinh vật đã thấm vào vật liệu nền. Nồng độ cục bộ gia tăng dẫn đến sự hấp thu thuốc nhuộm cao hơn và thiếu hụt một lượng lớn thuốc nhuộm tự do trong dung dịch dẫn đến giảm một số lượng đáng kể các sản phẩm thải. Tỷ

lệ kết lắng thuốc nhuộm sẽ khác nhau tùy thuộc vào thuốc nhuộm được sản xuất cũng như vi sinh vật được sử dụng.

Các thông số này sẽ thay đổi theo sự gây độc tế bào của thuốc nhuộm được sản xuất bởi vi sinh vật, độ hòa tan trong nước của thuốc nhuộm, ái lực thuốc nhuộm với vật liệu nền và các điều kiện phát triển được sử dụng (xem điều kiện sinh trưởng ở trên).

Như một ví dụ của sáng chế này, dẫn xuất K12 của *E. coli* đã được biến đổi để sản xuất với số lượng lớn violacein được sử dụng để kết lắng thuốc nhuộm trên/trong các vật liệu nền sau: lụa, len, tơ nhân tạo, polyester, elastan, bông và lanh.

Sự thấm gần như hoàn toàn và sự kết hợp của *E. coli* sản xuất/chứa violacein với vật liệu nền được quan sát thấy sau hai giờ bổ sung vật liệu nền vào môi chất bổ sung và tiếp tục trong suốt thời gian ủ vật liệu nền.

Bước hoàn thiện:

Bước hoàn thiện cuối đạt được thông qua việc để vật liệu nền đã được xử lý ở nhiệt độ trên 121 °C. Điều này có hai mục đích là làm bất hoạt tất cả các vi sinh vật có mặt trên vật liệu nền cũng như cố định thuốc nhuộm lên vật liệu nền.

Phần lớn thuốc nhuộm có mặt trong vi sinh vật đã bất hoạt được chuyển đến vật liệu nền do quá trình phân giải. Bước hoàn thiện sau đó bao gồm làm sạch lần cuối, để loại bỏ phần lớn các vi sinh vật đã bị bất hoạt và hợp chất liên quan đến vi sinh vật ra khỏi vật liệu nền. Vật liệu nền thành phẩm sau đó được khử trùng và làm sạch đến mức yêu cầu đối với thiết bị y tế chuẩn.

Các chất thải:

Thuốc nhuộm không bám (chất thải nhuộm) thấp hơn tiêu chuẩn công nghiệp là 3% và mức độ kết hợp đạt được bởi quá trình theo sáng chế vượt quá hiệu suất 99,997%. Môi chất đã dùng như các muối hòa tan, axit amin và các nguồn cacbon, còn sót lại sau quá trình nhuộm có thể được tái chế và tái sử dụng cho các quá trình nhuộm tiếp theo bằng cách sử dụng thuốc nhuộm vi sinh cùng loại hoặc khác loại. Như vậy thông qua ít nhất hai cách – trước hết là sử dụng ít nước trong quá trình nhuộm ban đầu

và thứ hai là khả năng tái sử dụng dung dịch môi chất đã dùng mà không cần sử dụng nước xử lý là được giảm trong các phương pháp được mô tả ở đây so với các phương pháp truyền thống.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp nhuộm vật liệu nền bao gồm các bước:

a. nuôi cấy vi sinh vật sản sinh thuốc nhuộm với sự có mặt của vật liệu nền cần được nhuộm, và với sự có mặt của môi trường sinh trưởng chứa nguồn cacbon ở nồng độ ngưỡng định trước nằm trong khoảng từ 10 % (thể tích/thể tích) đến 90% (thể tích/thể tích) để cho vi sinh vật được nuôi cấy tiếp xúc với vật liệu nền;

b. phân giải các vi sinh vật đã nuôi cấy để giải phóng thuốc nhuộm tiếp xúc với vật liệu nền; và

c. cố định thuốc nhuộm đã được giải phóng lên vật liệu nền.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nồng độ ngưỡng định trước của nguồn cacbon là phụ thuộc vào nguồn cacbon được lựa chọn để tối ưu hóa tốc độ truyền của vi sinh vật chứa thuốc nhuộm vào vật liệu nền, và đặc tính của việc cố định thuốc nhuộm lên vật liệu nền sau đó.

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó:

(a) các bước phân giải và cố định được thực hiện trong một phương pháp duy nhất; và/ hoặc:

(b) các bước phân giải và cố định được thực hiện bằng cách cho vật liệu nền và vi sinh vật vào xử lý gia nhiệt ở nhiệt độ trên 100 °C.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó một hoặc nhiều thông số môi trường nuôi cấy lựa chọn từ nhiệt độ, nồng độ cacbon đioxit, pH và tần số khuấy được lựa chọn để tối ưu hóa quá trình sản xuất thuốc nhuộm, tốc độ truyền vào vật liệu nền, và đặc tính cố định lên vật liệu nền.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó phương pháp này còn bao gồm thêm bước:

(a) đầu tiên nuôi cấy vi sinh vật sản sinh thuốc nhuộm với sự không có mặt của vật liệu nền cần được nhuộm, trước bước 1a; và/ hoặc:

(b) làm sạch vật liệu nền đã nhuộm để loại bỏ các tạp chất thải trước và sau bước 1c.

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó hai hay nhiều loài vi sinh vật sản sinh thuốc nhuộm khác nhau được sử dụng đồng thời.

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó thuốc nhuộm bổ sung, kể cả thuốc nhuộm được thêm ngoại sinh, đều có mặt trong các bước phân giải và cố định.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó vật liệu nền được chọn từ:

(a) vật liệu nền tự nhiên được chọn từ lụa, bông, lanh, len, và da;

(b) vật liệu nền bán tổng hợp được chọn từ tơ nhân tạo và axetat; hoặc

(c) vật liệu nền tổng hợp được chọn từ polyeste, nylon, acrylic, elastin, polyvinyl và các dẫn xuất hóa chất dầu mỏ tương tự.

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó:

(a) vi sinh vật sản sinh thuốc nhuộm tạo ra thuốc nhuộm được lựa chọn từ các chất màu có nguồn gốc sinh học, protein mang màu, protein huỳnh quang và protein phát quang sinh học; và/ hoặc:

(b) các vi sinh vật được biến đổi di truyền.

10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó:

(A) các vi sinh vật là sinh vật nhân chuẩn được lựa chọn từ tảo và nấm; hoặc:

(B) các vi sinh vật là những sinh vật nhân sơ được lựa chọn từ:

(a) vi khuẩn cổ và vi khuẩn thật;

(b) vi khuẩn Gram dương được lựa chọn từ *Bacillus* spp. và *Clostridium* spp;

(c) vi khuẩn Gram âm được lựa chọn từ *Escherichia* spp., *Pseudomonas* spp., *Chromobacterium* spp., *Janthinobacter* spp.

11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó bước nuôi cấy được thực hiện:

(a) trong môi trường sinh trưởng được chọn từ lò ủ, ủ lắc, lên men và thiết bị lên men sinh học; và/ hoặc:

(b) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 1°C đến 150 °C; và/ hoặc:

(c) ở nồng độ cacbon dioxit nằm trong khoảng từ 0% đến 10%; và/ hoặc:

(d) ở pH nằm trong khoảng từ 1,5 đến 9,5.

12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó môi trường sinh trưởng được chọn từ Luria- Bertani Broth (LB), Terrific Broth (TB), Super Optimal Broth (môi trường SOB), Super Optimal Broth với chất ức chế sản phẩm dị hóa (SOC), pepton dextroza chiết xuất từ nấm men (YPD).

13. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó nguồn cacbon được chọn từ dextroza, glucoza, sucroza, tinh bột khoai tây, xitrat, lactoza, maltoza, glyxerol, xantoza , và arabinoza.

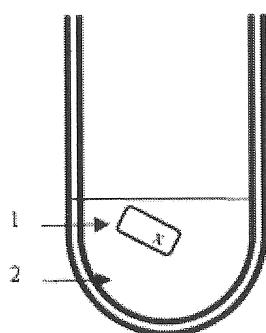
14 . Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó nguồn cacbon có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 15% (thể tích/thể tích) đến 60% (v/v).

15. Phương pháp nhuộm vật liệu nền theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó phương pháp này sử dụng thuốc nhuộm chứa bên trong vi sinh vật sản sinh thuốc nhuộm.

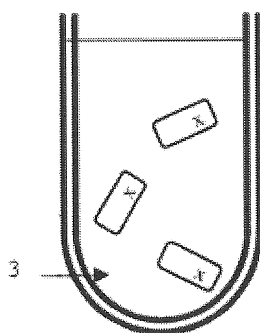
16. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó ngưỡng nồng độ của nguồn cacbon được chọn để thúc đẩy sự biến dạng hình dạng của các vi sinh vật trong quá trình sinh trưởng.

GIẢI PHÁP KỸ THUẬT ĐÃ BIẾT

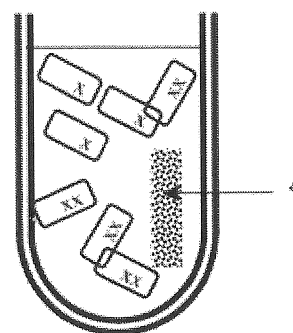
Hình 1A



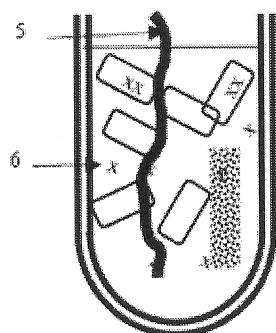
Hình 1B



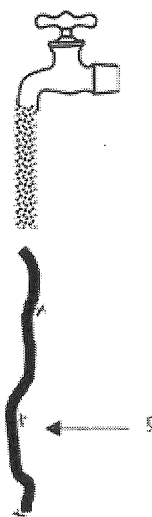
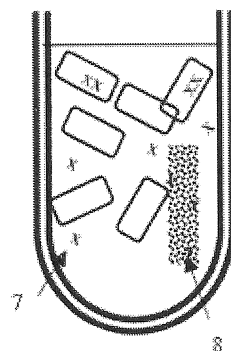
Hình 1C



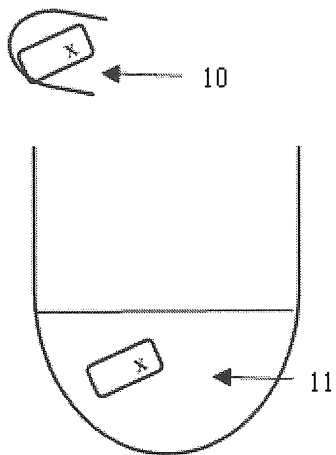
Hình 1D



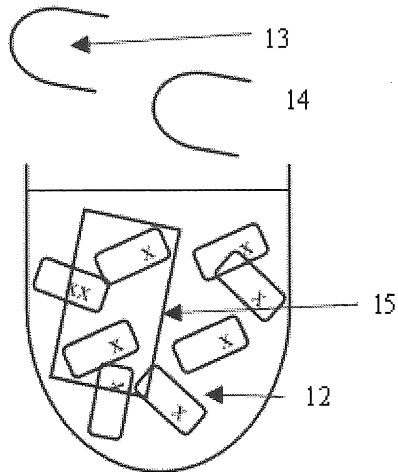
Hình 1E



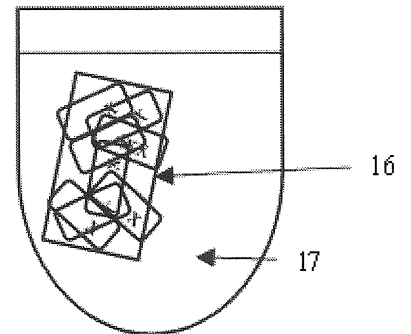
Hình 2A



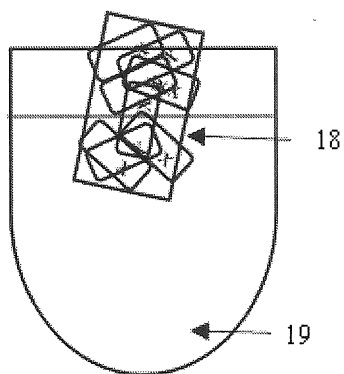
Hình 2B



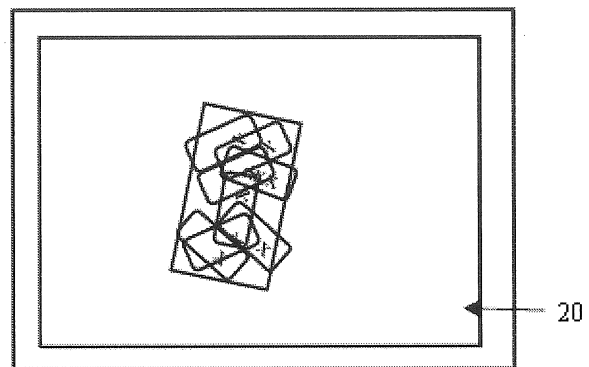
Hình 2C



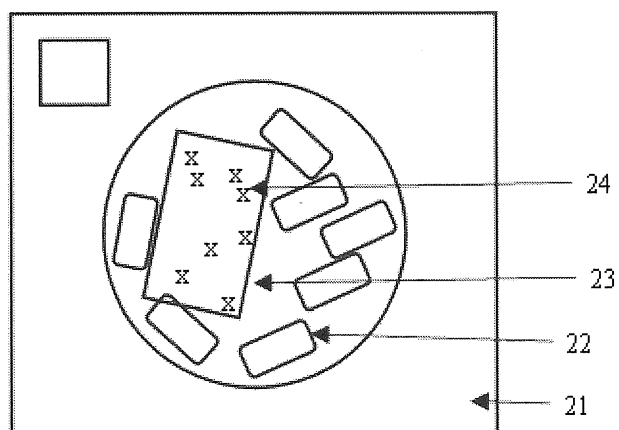
Hình 2D



Hình 2E

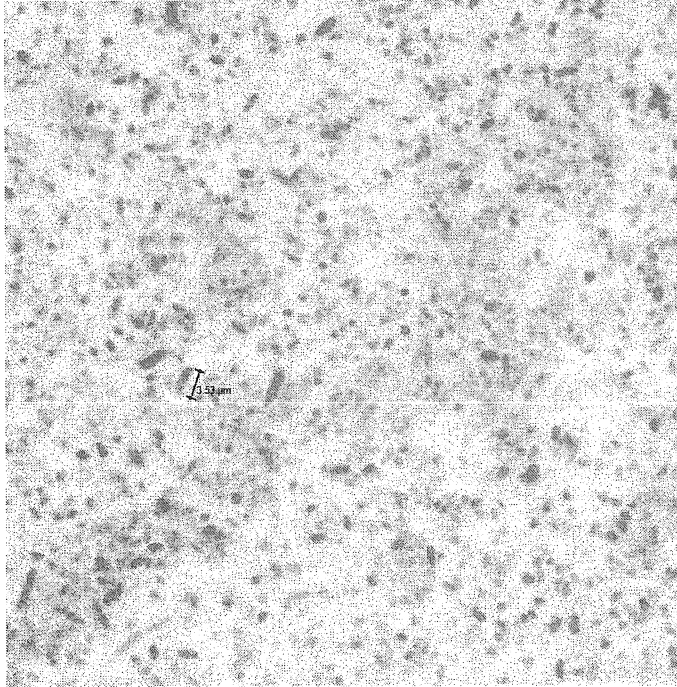


Hình 2F



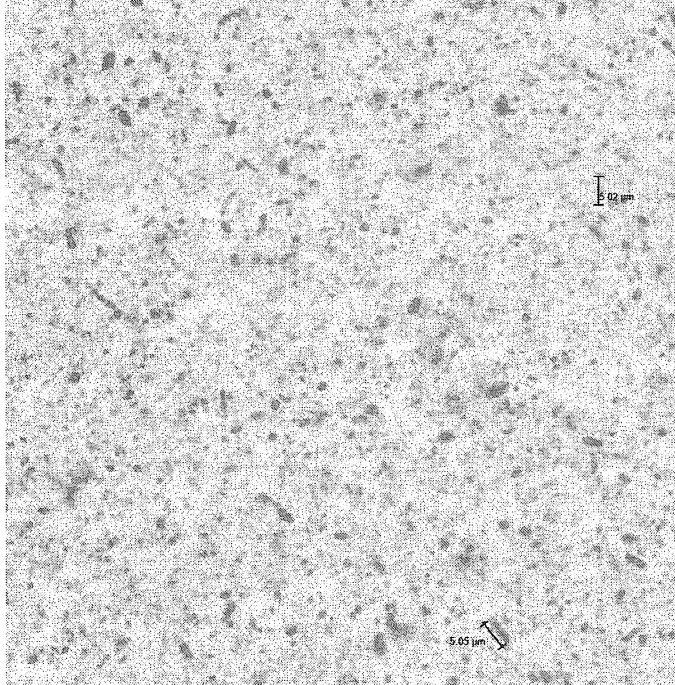
Hình 3

E. coli sinh trưởng trong glyxerol 1% thể tích



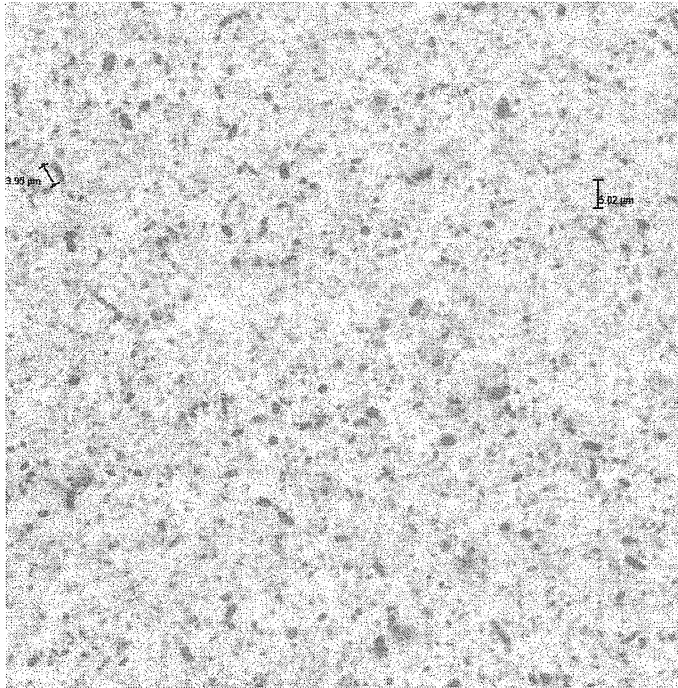
Hình 4

E. coli sinh trưởng trong glyxerol 5% thể tích



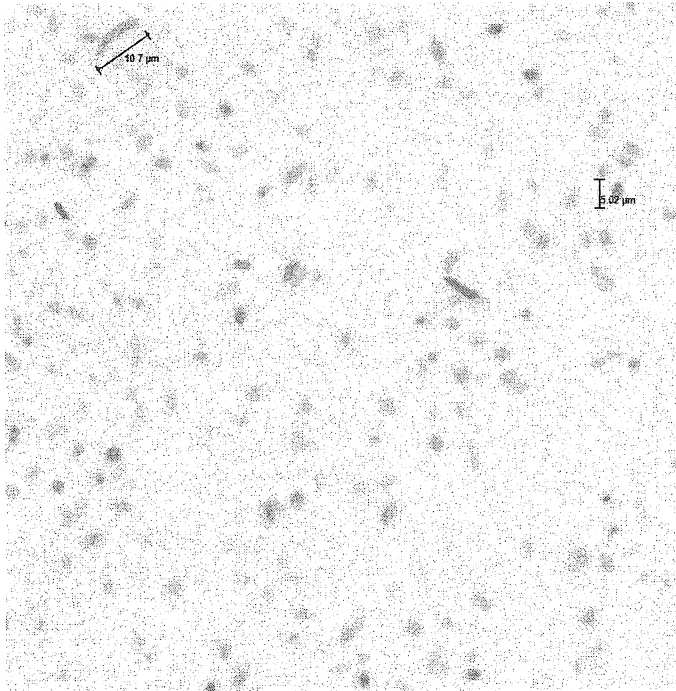
Hình 5

E. coli sinh trưởng trong glyxerol 5% thể tích



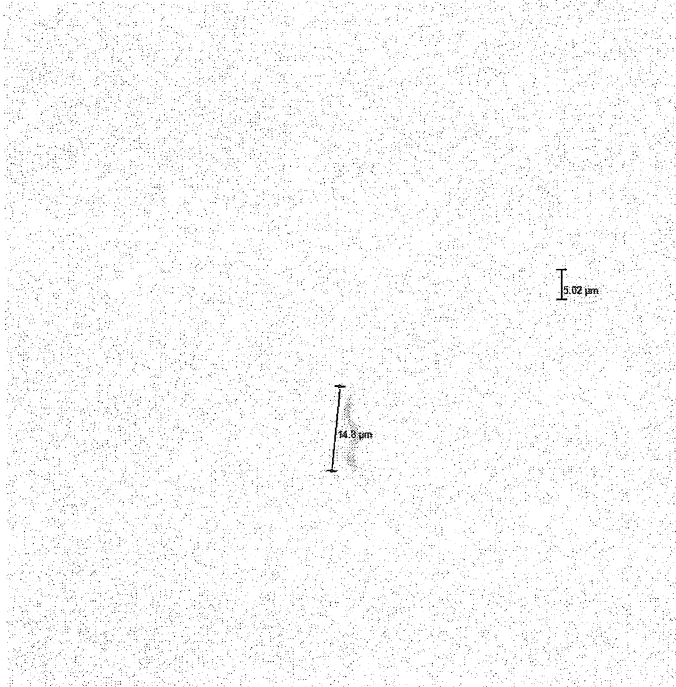
Hình 6

E. coli sinh trưởng trong glyxerol 10% trọng lượng



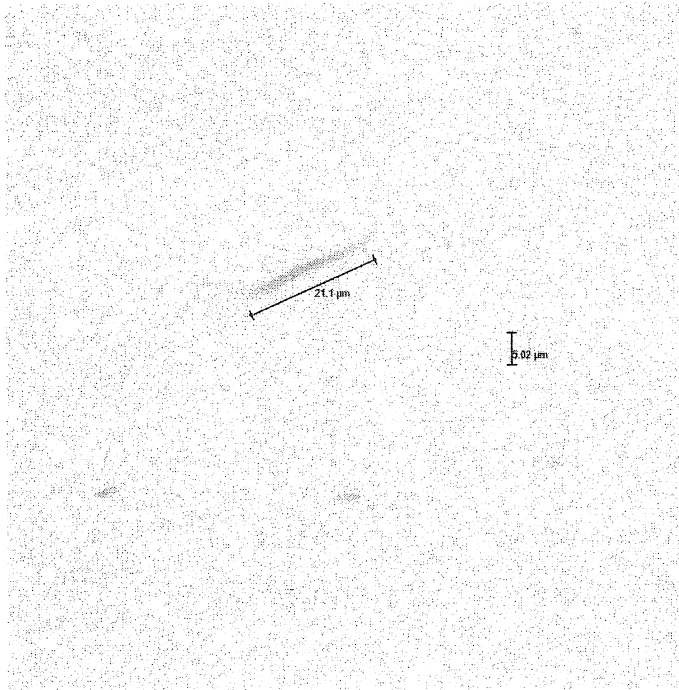
Hình 7

E. coli sinh trưởng trong glyxerol 20 % trọng lượng



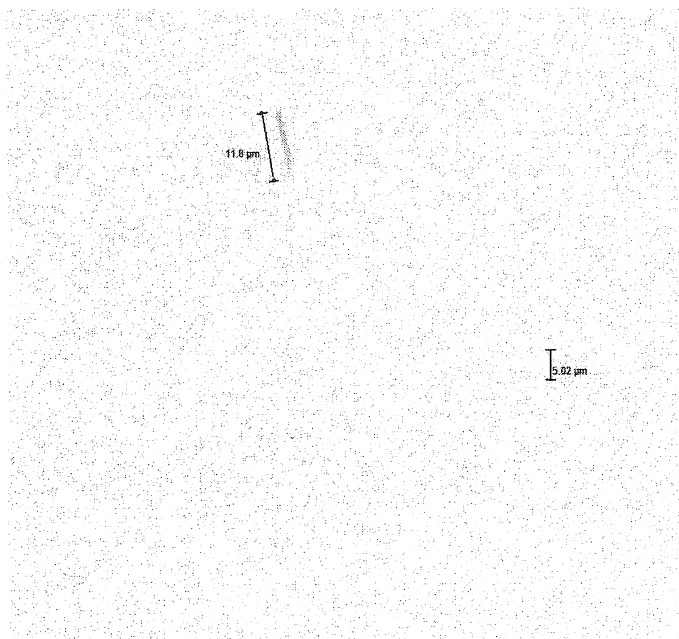
Hình 8

E. coli sinh trưởng trong glyxerol 20 % trọng lượng



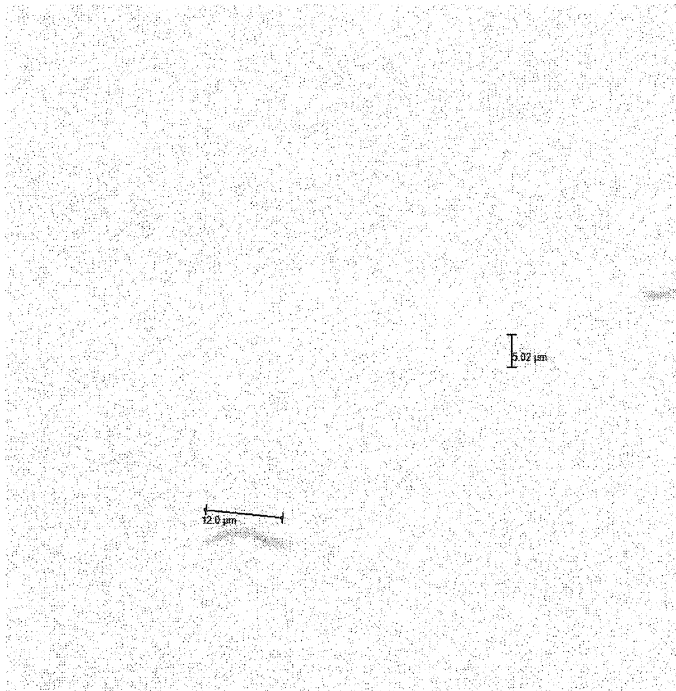
Hình 9

E. coli sinh trưởng trong glyxerol 50% trọng lượng



Hình 10

E. coli sinh trưởng trong glyxerol 50% trọng lượng



Hình 11

E. coli sinh trưởng trong glyxerol 50% trọng lượng

