



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99816367.8

[45] 授权公告日 2005 年 6 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 1204209C

[22] 申请日 1999.2.26 [21] 申请号 99816367.8

[86] 国际申请 PCT/US1999/004193 1999.2.26

[87] 国际公布 WO2000/050521 英 2000.8.31

[85] 进入国家阶段日期 2001.8.24

[71] 专利权人 W·P·保尔斯公司

地址 美国佛罗里达州

共同专利权人 W·P·保尔斯

T·A·塞尔维格

[72] 发明人 W·P·保尔斯 T·A·塞尔维格

R·I·莱维特

审查员 叶楠

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 余颖

权利要求书 3 页 说明书 19 页 附图 3 页

[54] 发明名称 抗海洋附生的方法和组合物

[57] 摘要

本发明提供了一种抗海洋附生的组合物和/或涂料，其中包含水解酶，微生物或水解酶与微生物的混合物，其中的微生物或水解酶可减少被所述抗海洋附生组合物和/或涂料所覆盖表面上的附生。所述组合物和/或涂料还可以包含催化有效量的无机盐。本发明还提供以所述组合物和/或涂料涂覆的制品。最后，本发明还提供减少海用表面上的附生，减少海水腐蚀，限制水在海用表面上吸附，降低海用表面的阻力系数，去除海用表面上的海洋生物，以及减少海用表面上霉菌的方法。

1. 一种抗海洋附生组合物，包含：
聚合物树脂基料；和
- 5 至少一种微生物，所述微生物在所述基料中生产至少一种淀粉酶或蛋白水解酶，所述微生物的含量为减少或防止海用表面附生的有效量。
 2. 根据权利要求 1 所述的抗海洋附生组合物，其中所述的基料选自：环氧材料，聚氨基甲酸酯材料，聚酯材料，玻璃纤维材料，聚硅氧烷材料和丙烯酸类材料；还包含至少一种淀粉酶或蛋白水解酶，它们与所述基料混合，它们的含量
 - 10 为减少或防止海用表面附生的有效量。
 3. 一种海用制品，它以权利要求 2 所述的组合物涂覆。
 4. 一种减少海用表面附生的方法，包括：用权利要求 2 所述的组合物涂覆海用表面，该组合物减少用其涂覆的海用表面上的附生。
 5. 一种抗海洋附生涂料，包含：
15 适合海用的涂料基料；
颜料；
至少一种微生物，所述微生物在所述基料中生产至少一种淀粉酶或蛋白水解酶，所述微生物的含量为减少或防止海用表面附生的有效量。
 6. 根据权利要求 5 所述的抗海洋附生涂料，所述基料选自：环氧材料，聚
 - 20 氨基甲酸酯材料，聚酯材料，玻璃纤维材料，聚硅氧烷材料和丙烯酸类材料；还包含至少一种淀粉酶或蛋白水解酶，它们与所述基料混合，它们的含量为减少或防止海用表面附生的有效量。
 7. 一种海用制品，它以权利要求 6 所述的涂料涂覆。
 8. 根据权利要求 4 所述减少海用表面附生的方法，所述组合物的形式是含
 - 25 颜料的涂料。
 9. 一种减少海水腐蚀的方法，包括：用权利要求 2 所述组合物涂覆该海用表面，该组合物由此形成至少一层膜，该膜能减少表面上腐蚀性分子的吸附。
 10. 根据权利要求 9 所述的方法，其中的组合物能抑制表面腐蚀和晶间腐蚀。
 11. 根据权利要求 9 所述减少海水腐蚀的方法，所述组合物的形式是含颜料
 - 30 的涂料。
 12. 根据权利要求 11 所述的方法，其中的涂料抑制表面腐蚀和晶间腐蚀。
 13. 一种限制水在海用表面上吸附的方法，包括用权利要求 2 所述组合物涂

覆表面，该组合物由此形成一层膜，该膜能降低所述表面的孔隙率。

14. 根据权利要求 13 所述限制水在海用表面上吸附的方法，所述组合物的形式是含颜料的涂料。

15 15. 一种降低海用表面阻力系数的方法，包括：用权利要求 2 所述的组合物涂覆该表面。

16. 根据权利要求 4 所述的方法，其中的微生物还生产一种表面活性剂，起着润湿剂的作用。

17. 根据权利要求 15 所述降低海用表面阻力系数的方法，所述组合物的形式是含颜料的涂料。

10 18. 根据权利要求 8 所述的方法，其中的微生物还生产一种表面活性剂，起着润湿剂的作用。

19. 根据权利要求 2 所述的抗海洋附生组合物，该组合物包含催化有效量的无机盐。

20. 根据权利要求 6 所述的涂料，该涂料包含催化有效量的无机盐。

15 21. 一种降低螺旋桨在工作条件下产生空泡趋势的方法，包括用权利要求 2 所述的抗海洋附生组合物涂覆螺旋桨表面。

22. 根据权利要求 21 所述降低螺旋桨在工作条件下产生空泡趋势的方法，所述组合物的形式是含颜料的涂料。

20 23. 一种减少海用表面上霉菌的方法，包括：用权利要求 2 所述组合物涂覆该海用表面，所述的组合物由此形成至少一层膜，该膜能减少霉菌在所述表面上吸附。

24. 根据权利要求 1 所述的抗海洋附生组合物，其中的微生物还生产一种表面活性剂，起着润湿剂的作用。

25 25. 根据权利要求 5 所述的抗海洋附生涂料，其中的涂料基料选自环氧材料，聚氨基甲酸酯材料，聚酯材料，玻璃纤维材料，聚硅氧烷材料和丙烯酸类材料。

26. 根据权利要求 5 所述的抗海洋附生涂料，其中的微生物还生产一种表面活性剂，起着润湿剂的作用。

27. 根据权利要求 1 所述的抗海洋附生组合物，在基料中还加有至少一种淀粉酶或蛋白水解酶。

30 28. 根据权利要求 5 所述的抗海洋附生涂料，在基料中还加有至少一种淀粉酶或蛋白水解酶。

29. 一种去除表面上不需要的附生物的方法，包括用如下组合物涂覆该表面，

所述组合物包含：

基料；和

至少一种能够生产至少一种淀粉酶或蛋白水解酶的微生物，所述微生物和酶的含量是足以去除表面上不需要的附生物的有效量。

5 30. 根据权利要求 29 所述的方法，其中的组合物还包含颜料。

31. 根据权利要求 29 或 30 所述的方法，其中的基料是聚合物。

32. 根据权利要求 29 或 30 所述的方法，其中的基料选自环氧材料，聚氨基甲酸酯材料，聚酯材料，玻璃纤维材料，聚硅氧烷材料和丙烯酸类材料。

10 33. 根据权利要求 29 或 30 所述的方法，其中的组合物还包含一种催化有效量的无机盐。

34. 根据权利要求 29 或 30 所述的方法，其中的组合物还包含至少一种淀粉酶或蛋白水解酶。

35. 根据权利要求 29 或 30 所述的方法，其中的微生物还生产一种表面活性剂，起着润湿剂的作用。

15 36. 根据权利要求 29 或 30 所述的方法，其中所述的附生物是软体生物。

37. 根据权利要求 29 或 30 所述的方法，其中所述的附生物是硬体生物。

38. 根据权利要求 29 或 30 所述的方法，其中组合物所含的酶作用于附生物的分泌物，从而去除硬体和软体附生物。

20 39. 根据权利要求 29 或 30 所述的方法，其中所述的表面是地板，天花板或砾滩。

抗海洋附生的方法和组合物

发明背景

5 本发明涉及抗海洋附生的方法、涂料和组合物。

从人类第一次涉入海洋环境起，一直受到海洋附生的困扰。海洋附生即不希望发生的生物体在海用表面上的附着，不仅发生在例如航海船舶船体和驱动系统等

10 的表面上，而且发生于接触海水的其他结构上。此类结构包括桩子，海洋浮标，缆线和管道等海下管线，防水墙，冷却塔，以及各种在水下工作的设备和结构。

附生取决于许多因素，包括：光，基材的结构和特征，水流，化学因素，幼虫的生物学复杂性，幼虫群的密度和构成，以及表面膜的有无。

海用表面上的表面膜具有重要意义，因为大多数海洋幼虫更容易附着于有膜的表面。D.J.Crisp, “海洋生物的化学吸附作用：影响无脊椎幼虫附着的因素”，177, 215(1974)(ed.P.T.Grant & A.M.Mackie)。海用结构体入水后，海洋微生物几乎立即会在构件体表面上形成这样的膜。D.Kirchman 等, Mar.Chem27:201-17(1989)。

15

微生物促进附生的进一步发展。C.E.Zobell 和 E.C.Allen, “海洋细菌在水下表面附生中的重要性”，细菌学杂志, 29: 230-51(1935)。事实上，研究者发现，基础膜的形成与生物体在海用表面上附着之间似乎存在着某些关联性。R.Mitchell & L.Yong, “微生物在海洋附生中的作用”，技术报道, 3, V.S.Office of Naval Research Contract No. N00014-67-A-0298-0026 NR-306-025(1972)。

20

表面膜可能含有微生物分泌至胞外的糖和蛋白质，这些可使微生物本身与海用表面附着。A.Danielsson 等, “有关细菌的附着—某些酶对海洋假单胞菌附着的影响”，Botanica Marine 20:13-17(1977)；G.G.Geeseey 等, “来自阿而卑斯溪流的天

25 然座生菌群的显微检测”，Can. J.Microbio.23: 1733-36(1977)。吸附于表面的蛋白质可能对发生在海水—表面界面处的微生物、化学和生物化学过程具有重要影响。D.L.Kirchman 等, “海水中表面上蛋白质的吸附”，海洋化学, 27: 201-217(1989)。这样的附着为微生物提供了便利，它因此可以在利于其生长的物理环境中获得不断更新的有机营养素供应。J.W.Costerton 等, “细菌是如何粘附的”，美国科学, 238: 86-95(1977)。

30

然而，附生(即不希望发生的微生物在海用表面上附着)造成了许多问题。附生提高了海用表面的阻力，增加了其重量，促进其腐蚀；破坏其外观；因去除附

生物和修复而增加了维护费用。而且，即使少量附生物或相当量的生物体附着于螺旋桨就可能显著降低螺旋桨的效率或造成空泡问题。

海洋相关行业曾试图通过在船舶或结构体用的涂料中添加各种有毒物质来减少附生，例如加汞、锡和铜。然而，这些添加剂会造成严重的环境问题。含这些添加剂的涂料的配方常会在涂覆结构后使其中的有毒物质暴露于环境。正是这种暴露，使得这些有毒物质渗入海洋环境，从而减少甲壳类的附着。

然而，这些物质的毒性是一把双刃剑；通常，这些添加剂除减少甲壳类附着之外，对环境都具有破坏作用。由于使用这些添加剂带来的环境问题，美国环境保护协会(EPA)严禁这些化合物的继续使用，尤其是锡和汞。此外，即使在允许使用这些添加剂的地方，这些添加剂的使用费也十分昂贵，因为需要经常重刷(有时频繁至每6月一次)。这样，从来源和破坏环境两方面来说，这些有毒添加剂的代价过于昂贵。而且，附着于水下表面的海洋生物会对毒物产生免疫力，从而使之失效。

也曾为解决海用表面附生问题进行过其他常识。法国专利 2,562,554 描述了一种涂料形式的含蛋白水解酶的抗海洋附生组合物。国际专利申请 WO95/27009 描述了一种含卤过氧化物酶的抗附生涂料。此外，日本专利摘要，第 012 卷，No.491(C-554)(1988年12月21日)描述了一种将特定阳离子表面活性剂与酶混合而成的抗附生组合物。

综上所述，需要一种抗海洋附生的方法和组合物，其中不使用会严重破坏环境的有毒添加剂。在进行了大量实验后，发明人形成了这样的构思：在海用涂料中添加可限制海洋附生的水解酶和/或微生物。

本发明提供的解决海洋附生问题的方法明显优于现有技术。例如，本发明利用水解酶和/或活细胞来避免生物附生。这样，本发明的涂料中不含大量有毒物质(例如重金属)而仍然有效。这就避免了重金属引起的环境问题。

在本发明的实施例中，通过简单的混合将微生物和/或水解酶包含在例如环氧类、聚氨基甲酸酯类或其他海用稳定的涂料中。只要本发明的海用组合物和/或涂料能够与之粘附，所述的微生物和/或水解酶就可以用于该表面(桨叶，螺旋桨，船体，冷却塔等)。所以，本发明的涂料具有广泛的用途。

除使用水解酶之外，使用微生物具有更多的优点。例如，当在本发明组合物和/或涂料中接种有益微生物时，该微生物会分泌更多的水解酶等物质，从而增强已加在涂料和/或油漆中水解酶的作用。这种补充作用可以在组合物和/或涂料的预期使用期内稳定地持续，或持续直至微生物群在海洋环境中解体。这些有益微

生物可竞争性抑制海用表面上的附生微生物，从而减少附生。

发明概述：

因此，本发明涉及可实质性解决以上问题中至少其一的方法和涂料。

- 5 为了达到本发明的目的和优点，本发明涉及一种抗海洋附生组合物，其中包含至少一种水解酶或至少一种微生物，或所述水解酶和微生物的混合物，其中的水解酶或微生物或其混合物可减少用组合物所涂覆的海用表面上的附生。

- 10 本发明还涉及：一种抗海洋附生涂料，包含适合海用涂料；和至少一种水解酶或至少一种微生物，或所述水解酶和微生物的混合物，其中的水解酶或微生物或其混合物可减少用其涂覆的海用表面上的附生。

本发明还涉及减少海用表面上附生的方法，用抗附生组合物或抗附生涂料涂覆的制品，减少海水腐蚀的方法，和限制海用表面对水吸附的方法。

本发明的另一方面内容是从海用表面上去除附生生物体，降低螺旋桨在工作条件下产生空泡趋势，和减少海用表面上霉菌的方法。

- 15 本发明还包括含有催化有效量无机盐的上述抗海洋附生组合物和涂料。

- 20 本发明实施方式之一是一种抗海洋附生组合物，包含：聚合物树脂基料；和至少一种微生物，所述微生物可在所述基料中生产至少一种淀粉酶或蛋白水解酶，所述微生物的含量为减少或防止海用表面附生的有效量。其中所述的基料选自：例如但不限于环氧材料，聚氨基甲酸酯材料，聚酯材料，玻璃纤维材料，聚硅氧烷材料和丙烯酸类材料；还包含至少一种淀粉酶或蛋白水解酶，它们与所述基料混合，它们的含量为减少或防止海用表面附生的有效量。

本发明的另一实施方式是一种海用制品，它以本发明组合物涂覆。

本发明的另一实施方式是一种减少海用表面附生的方法，包括：本发明组合物涂覆海用表面，该组合物可减少用其涂覆的海用表面上的附生。

- 25 本发明的另一实施方式是一种抗海洋附生涂料，包含：适合海用的涂料基料；颜料；至少一种微生物，所述微生物可在所述基料中生产至少一种淀粉酶或蛋白水解酶，所述微生物的含量为减少或防止海用表面附生的有效量。

本发明的另一实施方式是一种海用制品，它以上述抗海洋附生涂料涂覆。

- 30 本发明的另一实施方式是一种减少海水腐蚀的方法，包括：用本发明组合物涂覆该海用表面，该组合物由此形成至少一层膜，该膜能减少表面上腐蚀性分子的吸附。

本发明的另一实施方式是一种限制水在海用表面上吸附的方法，包括用本发

明组合物涂覆表面，该组合物由此形成一层膜，该膜能降低所述表面的孔隙率。

本发明的另一实施方式是一种降低海用表面阻力系数的方法，包括用本发明组合物涂覆该表面。

5 本发明的另一实施方式是一种降低螺旋桨在工作条件下产生空泡趋势的方法，包括用本发明抗海洋附生组合物涂覆螺旋桨表面。

本发明的另一实施方式是一种减少海用表面上霉菌的方法，包括：用本发明组合物涂覆该海用表面，所述的组合物由此形成至少一层膜，该膜能减少霉菌在所述表面上吸附。

10 本发明的另一实施方式是一种去除表面上不需要的附生物的方法，包括用如下组合物涂覆该表面，所述组合物包含：基料；和至少一种能够生产至少一种淀粉酶或蛋白水解酶的微生物，所述微生物和酶的含量是足以去除表面上不需要的附生物的有效量。

附图简述：

- 15 图 1 是涂有本发明涂料的上排板 1-4 和对照的试验结果。
图 2 是涂有本发明涂料的上排板 5-7 和对照的试验结果。
图 3 是涂有本发明涂料的上排板 8-10 和对照的试验结果。
图 4 是涂有本发明涂料的下排板 1-4 和对照的试验结果。
图 5 是涂有本发明涂料的下排板 5-7 和对照的试验结果。
20 图 6 是涂有本发明涂料的下排板 8-10 和对照的试验结果。

本发明的详细描述：

25 本发明涉及一种抗海洋附生组合物，包含至少一种水解酶或至少一种微生物，或所述水解酶和微生物的混合物，其中的水解酶或微生物或其混合物可减少用组合物涂覆的海用表面上的附生。本发明还涉及被组合物涂覆的海用制品，减少海用表面上附生的方法，包括：用所述组合物涂覆海用表面，该组合物可减少用其涂覆的海用表面上的附生。

30 本发明的另一方面内容是一种海用涂料，包含适合海用的涂料；和至少一种水解酶或或至少一种微生物，或所述水解酶和微生物的混合物，其中的水解酶或

微生物或其混合物可减少用所述涂料涂覆的海用表面上的附生。本发明还涉及被所述涂料涂覆的海用制品，和减少海用表面上附生的方法，包括：用所述涂料涂覆海用表面，该涂料可减少用其涂覆的海用表面上的附生。

5 本发明的另一实施例揭示了一种抗海洋附生的方法，包括：用抗海洋附生组合物涂覆海用表面，该组合物可形成至少一层膜，从而减少该表面上腐蚀性分子的吸附。同时，本发明的另一方法中，组合物可抑制表面腐蚀和晶间腐蚀。

本发明的另一实施例是抗海水腐蚀的方法，包括：用抗海洋附生涂料涂覆海用表面，涂料由此形成至少一层膜，从而减少表面上腐蚀性分子的吸附。本发明的另一种方法中，所述的涂料抑制表面腐蚀和晶间腐蚀。

10 本发明的另一实施例是限制水在海用表面上吸附的方法，包括：用抗海洋附生组合物或涂料涂覆所述表面，所述组合物或涂料形成一层膜，从而降低表面的孔隙率。

本发明的另一方面内容是降低海用表面阻力系数的方法，包括：用抗海洋附生组合物或涂料涂覆表面。本发明还包括，其中所用抗海洋附生组合物或涂料中的微生物可产生起润湿剂作用的表面活性剂。

15 本发明内容之一是去除海用表面附生的上海洋生物的方法，包括：用抗海洋附生组合物或涂料涂覆所述表面。本发明的另一内容是将抗海洋附生组合物或涂料用于抗硬体或软体海洋生物附生的方法。本发明的另一种方法中，抗海洋附生组合物或涂料中的水解酶或微生物或其混合物作用于已经存在的生物体分泌物，引起硬体或软体附生物的脱落。

20 本发明的另一内容中，所述的抗海洋附生组合物或涂料含有催化有效量的无机盐。本发明的另一内容是抑制螺旋桨在工作条件下产生空泡趋势的方法，包括用抗海洋附生组合物或涂料涂覆螺旋桨的表面。本发明的另一些内容用抗海洋附生组合物去除海用表面上霉菌的方法，包括，用抗海洋附生组合物涂覆所述表面，组合物于是形成至少一层膜，从而减少所述表面上霉菌的吸附或附着，或抑制海用表面上霉菌的生长。

以下可参见在此详细描述的本发明优选实施方式和实施例。

30 本发明含微生物和/或水解酶的保护性涂料和/或油漆可通过多种途径发挥作用。一种可能的作用机制是以有益菌群作为涂料的一部分。可对所述有益微生物进行选择，使它们竞争性抑制不需要的生物体，由此减少附生。所述有益微生物的作用机制可以是，强选择性地去除海用构件表面上水所形成的微膜中的关键营养素，例如有机化合物或食源性微生物。或者，所述微生物可通过分泌抗生素或

其他化合物抑制附生生物体生长来起作用。以这种方式，所述有益微生物可有效抑制附生微生物的生长(例如霉菌)，并进而抑制海洋中幼虫的附生聚集。

所述涂料和/或油漆还可以通过直接作用于表面膜起作用，即通过水解膜中的蛋白质和多糖来破坏其聚合物结构。这可以打断最终可能导致船舶壳体上聚集大量海洋生物(包括细菌，真菌，附生甲壳等)的链反应。这样的作用可以是胞外酶破坏构成表面膜的糖和蛋白质。发明人对这种机制进行了试验：用脱脂乳和玉米淀粉作为模型结构测定了两种重要的水解酶，蛋白水解酶和 α 淀粉酶的活性。所述涂料和/或油漆也可能通过在涂覆后改变海用表面的表面张力来起效。所述表面张力的改变可破坏不良海洋生物在表面上的附着。

10 本发明可用于防止甲壳类或其他硬体海洋生物的附生，所述生物包括：

冠状蠕虫：多毛纲；环节动物门；沙蚕亚纲；龙介虫科；

贻贝：双壳类；软体动物门；翼形亚纲(Pteriomorpha)；贻贝科；

牡蛎：双壳类；软体动物门；翼形亚纲(Pteriomorpha)；牡蛎科；

蛤：双壳类；软体动物门；虎鲨亚纲；帘蛤科；

15 苔藓动物：苔藓动物；苔藓动物门；蠕象亚目和子囊孢子；驼贝属；

附生甲壳：贝类；节肢动物门；甲壳亚门。

本发明还可用于抗软体动物附生，这些动物会妨碍壳体的形状和使用，破坏海用构件的基材，会缩短设备的使用寿命，增加操作费用。这些软体动物例如：

藻类(植物)：扇藻和刺松藻；

20 苔藓动物(动物)：船底附生物

水螅(动物)：数枝螅水母属

海洋莱德氏菌(海洋细菌)：Zibria

本发明的方法和组合物可用于多种表面，包括但不限于船壳，海上浮标，防水墙，桩子，入水管，地板，天花板和砾滩。例如，可用本发明方法和组合物尽可能消除浮标上的附生。所述的浮标指一大类漂浮体，它们会因海洋生物附生而受损。

同样，本发明方法和组合物可用于防水墙。海洋生物在防水墙上的聚集会对防水墙产生远期的不利影响。而就短期而言，这些生物的生长会破坏外观，而且会造成危险。而且，硬体附生物的粗糙性还会严重损坏航船。

30 同样，本发明可用于尽可能避免因海洋生物附生而堵塞换热器、蒸发器、冷凝器和燃烧及发火系统，从而大大降低各种海用构件的维护费用。

本发明的组合物和/或涂料包含各种水解酶，但本发明也可不用所述的水解酶

而同样有效。合适的酶例如蛋白水解酶，淀粉酶和业内所知的其他水解酶。所选的水解酶应避免和消除不良海洋生物的附着。所选的水解酶应能在它们所在的海洋环境中存活并繁殖。

5 本发明的组合物和/或涂料包含各种微生物,但本发明也可不用所述的微生物而同样有效。合适的微生物包括:杆菌,埃希氏菌,假单胞菌或业内所知的其他微生物。所选的微生物应能在海洋环境中避免或消除不良海洋生物的附着。所选的微生物应能在它们所在的海洋环境中存活并繁殖。

10 本发明的组合物和/或涂料包含抑制不良微生物生长有效量的上述酶和/或微生物。所述组合物和/或涂料可以是多种形式的,包括油漆,亮光漆,糊剂,薄片,环氧类树脂,树脂,蜡,凝胶,胶水,以及业内所知的其他形式。根据需要,所述的组合物和/或涂料可含聚合物、寡聚物,单体,也可含交联剂或固化促进剂。除此以外,为获得业内所知的其他效果,所述的组合物和/或涂料还可含其他添加剂。所述的添加剂包括防腐剂,颜料,染料,填充剂,表面活性剂等业内所知的其他添加剂。

15 本发明的组合物和/或涂料可含聚合树脂基料,但本发明也可以不含基料,或采用其他基料。可将本发明组合物和/或涂料涂成单层或多层。

20 此外,发明人发现加入某些无机盐(NaCl , CaCl_2 , MgSO_4 等)可以增强液态和固态(以树脂包裹) α 淀粉酶(Genencor)的催化水解。虽然已知 CaCl_2 是 α 淀粉酶所催化反应的辅因子,但活化所需的量(约 60ppm)大大低于后文实施例中在环氧树脂中的用量。因此可以加入催化有效量的此类无机盐。催化有效量大于活化所需的无机盐量。后文实施例 7 和 8 对催化有效量有更充分的论述。

以下实施例可充分体现本发明的各项内容。

实施例 1

25 为了证明包在海用涂料或油漆内的酶能保留其酶活性,进行了一系列的实验。用来测定两种重要酶即蛋白水解酶和 α 淀粉酶的活性的底物分别是脱脂乳和玉米淀粉。如前所述,这些底物分别代表了作为作用对象的糖蛋白中的蛋白质部分和多糖部分,糖蛋白则被认为是生物附生过程的起始物。

30 用塑料和玻璃罐(100ml)作为酶反应器。酶获自 Genencor International, Inc.(Rochester, NY)。所试的酶是:

Desize 160(α 淀粉酶-液体)

Maxamyl CXT 5000(α 淀粉酶-被包裹)

Purafect 2000G-(蛋白水解酶-被包裹)**Maxamyl 15,000 CXT (α 淀粉酶-液体)**

在所有试验中，将胶囊化的酶直接加入指明的涂料中。在检测液体酶的活性时，首先将酶加入氯化钙。加氯化钙是以其作为吸附剂协助与涂料的混合，因为水会影响硬化过程。后来发现，加入氯化钙(CaCl_2)或其他盐可提高淀粉酶的活性。

用以下试验测定蛋白水解酶水解活性。醋(稀乙酸)可从溶液中沉淀出乳蛋白。所以，可如下监测乳蛋白的酶水解：在乳蛋白溶液中加入蛋白水解酶，并逐渐加入乙酸。然后，以沉淀量的减少作为酶活性的指标，表示为水解百分比。

除非另做说明，酶活性试验用 25ml 1:4 稀释的脱脂乳水溶液(稀释至含 0.94% 蛋白质)进行。通过与无酶无细胞的对照进行比较对此活性定量。加入足量的酸以沉淀出其中所有的蛋白质。以沉积后致密的沉淀体积作为水解前脱脂乳溶液中蛋白质的含量。通过比较加酶或加细胞前后蛋白质酸沉淀的量来测定酶活性。没有酸沉淀，说明蛋白质 100%地被所加的酶水解。

如下测定淀粉酶活性，加入玉米淀粉在水中的悬浮液，混合成接近固化的粘稠度(12g/10ml 水)。将水和淀粉加入悬浮于水中或包在固化环氧树脂中的 α 淀粉酶中。由此发生的反应若使得固化的淀粉悬浮液完全液化，则认为是完全(100%)水解。在反应中，如果粘度因 α 淀粉酶的加入而降低，可根据手动搅拌桨的受阻程度来估计活性。虽然这些活性指标都是主观性的，但相对于标准对照(例如含水和淀粉但没有酶)而言，它们具有可重复性。

将 400mg 包被蛋白水解酶(Purafect 2000G，获自 Genencor International Inc., Rochester, NY)与 2 英寸环氧树脂带和硬化剂(2,4,6-三(二甲基氨基解甲基)苯酚)，获自 ITW Brands, Woodale, IL)混合。用该树脂/酶混合物涂覆液体容积 100ml，直径 2 英寸(50mm)的塑料瓶的内底。让该混合物硬化 16 小时。在反应器内加入稀释的脱脂乳，参见表 1，室温下培养 5 小时。取出样品，加入乙酸沉淀未被水解的蛋白质，测定蛋白水解酶的水解活性。

表 1

试验混合物	%水解
环氧树脂	0
环氧树脂 + Purafect 2000G	100

因此，胶囊化蛋白水解酶(Purafect 2000G)在被环氧树脂包裹后保留了其酶活性。

实施例 2

如实施例 1 所述再次测定胶囊化蛋白水解酶(Purafect 2000G)的酶活性, 所不同的是, 用海水代替自来水稀释脱脂乳。所得结果与实施例 1 相同。因此, 用海水代替自来水对包裹在环氧树脂中的蛋白水解酶的活性没有影响。

5

实施例 3

用实施例 1 中的环氧树脂/酶混合物涂覆直径 12.5mm 的塑料珠。将脱脂乳稀释至含.12%蛋白质, 将其加入反应容器。常温下培养 4 小时后, 取出样品, 加入稀乙酸沉淀未水解的乳蛋白。结果如下:

10

表 2

试验材料	%水解
对照(无酶)	0
环氧树脂& Purafect 2000G	100
Purafect 2000G 涂覆的塑料珠	80

因此, 内部底表面涂有环氧树脂/酶, 或含有酶涂覆的塑料珠的反应器证明蛋白质完全或接近于完全水解。

实施例 4

15

如实施例 1 所述制备酶反应器, 即在塑料罐的内部底表面涂以环氧树脂/酶(蛋白水解酶), 然后进行 24 小时和 28 天的水解活性试验, 以确定其时间稳定性。结果见表 3。

表 3

试验材料	%水解
对照(无酶)	0
环氧树脂& Purafect 2000G(24 小时)	100
环氧树脂& Purafect 2000G(48 小时)	80

常温下 28 天后, 环氧树脂与酶仍然有效, 活性仅有少量降低。

20

实施例 5

用其他树脂代替以上所用的 Devcon 环氧树脂接受检测。

1)PC-11 强环氧树脂粘合剂, Protective Painting Company

- 2)Polypoxy 环氧树脂组合物(水下修补化合物 7055, Pettit Paint Company, Rockaway, NJ)
- 3)Gel-Coat 聚酯树脂组合物, Clear Coat Corp., FL 的白 Gel-Coat
- 4)Bondo 聚酯树脂&玻璃纤维材料(Dynatron/Bondo Corporation)

如实施例 1 所述, 用 100mgPurafect 2000G 作为蛋白水解酶酶源制备所有树脂/酶混合物。2 小时后, 取出各反应器内的混合物样品。如实施例 1 所述测定水解百分比。结果见表 4。

表 4

试验材料	%水解
对照(无环氧树脂和酶)	0
PC-11	70
Polypoxy	90
Gel-Coat	50
玻璃纤维	95

5

实施例 6

试验中, 将液体酶作为酶-树脂制剂的组分。在以上试验中, 只用蛋白水解酶来水解被认为是生物附生过程中基础物质的蛋白质。在本实验中, 即检测蛋白水解酶也检测淀粉酶。首先在 4.0mg CaCl₂ 中加入 Purafect 4000L(0.5ml)或 Desize 160(0.5ml), 然后与 Devcon'5 Minute 环氧树脂混合, 目的是减少随酶加入的游离水。游离水会影响环氧树脂的固化。

将淀粉悬浮液加入反应器 2 和 4。在反应器 1 和 3 中加入稀释脱脂乳。常温下培养 2 小时, 按照实施例 1 的方法检测各种混合物的水解程度。组合物和结果见表 5。

15

表 5

反应器	试验材料		结果	
	环氧树脂和蛋白质	环氧树脂和淀粉酶	%淀粉水解	%脱脂乳水解
1	-	-	-	0
2	-	-	0	-
3	0	-	-	100
4	-	0	100	-

反应器 3 中的反应混合物变得澄清, 与加入的稀乙酸不反应, 说明乳蛋白已

被 CaCl_2 吸附的酶/树脂制剂完全水解。含 CaCl_2 和水反应混合物非常粘稠，很难倒出。含酶-树脂的混合物象水一样稀薄，很容易倒出。各种情况都证明，液体酶可以在环氧树脂中使用。淀粉和蛋白质都被环氧树脂/液体酶制剂水解。淀粉(多糖)或蛋白质的水解不因在酶树脂制剂中加入氯化钙而受到干扰。

5

实施例 7

如前所述，研究了无机盐加入酶-环氧树脂后对 α 淀粉酶活性的影响。该研究最先缘于有关氯化钙干燥剂对酶活性影响的疑问。曾认为钙离子参与 α 淀粉酶的活性，并在约 60ppm 时起着辅因子的作用。因此研究了加入氯化钙对于 α 淀粉酶活性的影响。

按照实施例 1 所述制备数个容器。各加入 12g 淀粉，并如下表所示加入水和氯化钙。将该含水混合物搅拌至均匀。如实施例 1 所述测定该混合物的水解百分比。结果见表 6。

表 6

容器	H_2O	CaCl_2	(α 淀粉酶) Desize 160	%水解
1	10ml	0	0.5ml	10
2	10ml	1g	0.5ml	80
3	10ml	2g	0.5ml	80
4	10ml	4g	0.5ml	90
5	10ml	8g	0.5ml	0*

15 *：过量氯化钙形成一种弹性、柔软且具有可塑性的聚合物。这表明淀粉与二价离子之间发生了相互作用。

看来，当加入的氯化钙超过单纯活化酶所需的量时， α 淀粉酶的催化活性显著增强。这表明了 α 淀粉酶活性增强的另一机制。

20 实施例 8

试验了其他无机盐，看它们是否也能增强 α 淀粉酶的催化活性。所选的是中性一价盐氯化钠和能形成水合物的二价酸式盐硫酸镁。

用实施例 7 的方法，结果如下。

表 7

容器	Mg_2SO_4	NaCl	Desize 160	%水解
1	-	-	0.5ml	0

2	-	-	0.5ml	10
3	0.5g	-	0.5ml	30
4	1.0g	-	0.5ml	30
5	2.0g	-	0.5ml	70
6	4.0g	-	0.5ml	90
7	-	0.5g	0.5ml	50
8	-	1.0g	0.5ml	90
9	-	2.0g	0.5ml	90
10	-	4.0g	0.5ml	100

实施例 9

除使用胶囊化或液体酶之外，还可以使用生长期或静止期的全细胞作为酶活性源。例如，Sybron Corporation 生产具有多种用途的孢子或营养细胞悬浮液，可生产 α 淀粉酶和/或蛋白水解酶。

因此，试验了包在 Gel-Coat 中的 Sybron 孢子和细胞悬浮液。在环氧树脂混合物中加入氯化钙，用该同一反应器检测 α 淀粉酶和蛋白水解酶的活性。将 α 淀粉酶和蛋白水解酶的活性与细胞和孢子悬浮液的活性比较。

所用的孢子悬浮液是 Bio B+, 来自 Sybron Chemicals Inc., 111 Kesler Mill Road, Salem, Virginia 25143, 其中含有孢子期的多粘芽孢杆菌。

所用的细胞悬浮液是 Bio P, 来自 Sybron Chemicals Inc., 111 Kesler Mill Road, Salem, Virginia 25143, 其中含有营养期的枯草芽孢杆菌, 铜绿假单胞菌, 恶臭假单胞菌, 荧光假单胞菌和赫氏埃希氏菌。

按实施例 1 所述制备样品容器, 测定淀粉和脱脂乳溶液的%水解。

15

表 8

	%脱脂乳水解	%淀粉水解
1 Bio P	100	0
2 Bio B+	100	0
3 Desize 160	0	90
4 Purafect 2000G	100	50
5 Maxamyl 15,000	0	90
6 脱脂乳对照	0	-
7 淀粉对照	-	0

虽然用孢子或营养细胞都没有检测到 α 淀粉酶活性时，其他细胞或孢子悬浮液可能具有这样的活性。

蛋白水解酶(Purafect 2000G)对淀粉的活性表明该酶被 α 淀粉酶污染。

5 实施例 10

检测包在聚酯树脂和玻璃纤维材料(Bondo, 参见实施例 5)中的胶囊化和液体 α 淀粉酶催化淀粉水解的能力。在胶囊化和液体酶制剂中都加入硫酸镁。加入的各酶浓度可将它们的活性大致标准化。

按实施例 5 和表 9 制备反应器。

10

表 9

RX 容器	MgSO ₄	液体 Desize160	胶囊化 Maxamy15000	液体 Maxamy15000
1	5.0g	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	0.5ml	-	-
4	-	-	*2.0g	-
5	-	-	-	0.5ml
6	5.0g	0.5ml	-	-
7	5.0g	-	*2.0g	-
8	5.0g	-	-	0.5ml

*: 包入树脂前加入 0.1ml H₂O

让容器硬化过夜，向各容器内加入 10ml 水和 11.5g 淀粉，将该混合物搅拌均匀。60 分钟后，按照实施例 1 所述测定%水解，结果见表 10。

表 10

样品	%水解
1	10
2	10
3	10
4	0
5	10
6	50
7	80
8	70

实施例 11

为了研究是否可用微生物在水下防治海洋生物的附生，用微生物包在几种不同涂料中形成的混合物涂覆玻璃纤维板，见表 11。制备过程如下。

- 5 21 块玻璃纤维板用粒度 60 的粗砂纸手工砂光，用二甲苯和纸巾擦去残屑。长板尺寸：17 7/8×5 7/8×1/8"厚(454mm×149mm×3.2mm)，短板：13 7/8×5 7/8×1/8"厚(352mm×148mm×3.2mm)。

在树脂基料中加入表 11 所示的微生物，手工振荡均匀。表 11 中含量的单位是盎司乘以 100。对照板 C 没有涂试验组合物。

- 10 Dura Shine 是一种液体聚合物，参见美国专利 5,073,407，购自 Howe Labs, Eden, New York。Turtle Wax Finish 2001 液(Finish2001)是一种聚硅氧烷树脂，含有 Turtle Wax, Chicago, Illinois 的氨基甲酸乙酯。Glidden Latex 是一种无毒丙烯酸乳胶漆，来自 Glidden Paints, Jacksonville, Florida。

- 15 Bio B+来自 Sybron Chemicals Inc., 111Kesler Mill Road, Salem, Virginia 25143；这种混合物含有多粘芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌的孢子。

Bio P 来自 Sybron Chemicals Inc., 111Kesler Mill Road, Salem, Virginia 25143；含有营养期的枯草芽孢杆菌，铜绿假单胞菌，恶臭假单胞菌，荧光假单胞菌和赫氏埃希氏菌。

- 20 然后，用于聚合物油漆的 2"漆刷将所述混合物刷在玻璃纤维板上。让玻璃纤维板吹干 24 小时，然后涂第二层。让板吹干 48 小时，包在纸巾中，送至海水测试点。

表 11

海水试验

板	B +	P Bio	Dura Shine	Finish 2001	Glidden Latex
1	*25	25	200	-	
2	-	50	200	-	
3	50	-	200	-	
4	25	25	-	200	
5	-	50	-	200	
6	50	-	-	200	
7	25	25	-	-	200
8	-	50	-	-	200

9	50	-	-	-	200
10	50	50	100	-	100

*: 盎司乘以 100

将板固定在 PVC 架子上, 从一艘漂浮的驳船上将其悬挂在海水环境中, 使之持续地浸在海水中, 经受充分的潮汐流。板在水中分两种浸入深度(上排=水线处, 下排=完全浸入), 浸 4 个月。测定每个月积累起来的藻量, 记录在表 12 中。

5

表 12

藻类

	上排											%覆盖	下排										
	板号												板号										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	C*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	C*	
一月	20	50	30	60	25	25	30	35	30	35	40	一月	3	2	1	70	65	70	40	25	10	15	10
二月	15	25	20	40	15	15	30	30	30	35	35	二月	3	2	2	45	40	45	35	30	15	20	15
三月	12	20	12	15	7	7	35	30	25	35	35	三月	4	3	3	20	25	30	40	35	30	20	25
四月	3	3	2	2	1	1	35	35	25	40	30	四月	5	5	5	7	2	5	45	40	35	30	30

*=对照板(未处理)

表 12 列出了每月上排和下排每板(1-10 和对照)被藻类附生的面积百分比。以上结果还被绘制成图 1-6。

以上结果表明, 选择合适的微生物可以在涂料中获得并维持抗附生特性。例如, 在上排, Dura Shine 涂料的平均藻类附生面积为 2.67%, 对照为 30%。Finish 2001 涂料的平均藻类附生面积为 1.33%, 对照为 30%。

表 13 和表 14 列出了浸了 4 个月后被硬壳苔藓虫(代表一类硬壳附生物)附生的面积百分比。涂含微生物的涂料使得苔藓虫生长抑制了 33%甚至 100%。而且, 在板上观察到形成了一层深绿色生物膜。这层生物膜表明下面有一层可防止软体和硬体附生的微生物膜。这与以下结果一致: 最有效的涂料, Dura Shine 和 Finish 2001, 可形成生物膜(表明加入涂料中的保护性微生物群生长)覆盖最大百分比。

表 13-上排-4 个月

板#	%硬壳苔藓虫	%生物膜
1	1	80
2	1	70
3	1	85

4	0	75
5	1	65
6	0	75
7	1	55
8	3	55
9	2	65
10	5	25
C	5	55

表 14-下排-4 个月

板#	%硬壳苔藓虫	%生物膜
1	3	85
2	1	75
3	3	80
4	3	85
5	2	65
6	3	75
7	5	35
8	5	40
9	7	40
10	12	25
C	7	55

表 15 和 16 列出了板上没有被(软体和硬体生物)附生的总面积。所列的是每月(1-4 月)上下排每板(1-10 和对照)的数据。

5

表 15-上排
板号

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	C*
一月	77	45	65	38	74	69	68	63	67	55	48
二月	82	69	75	58	84	83	67	66	64	51	52
三月	82	70	79	81	90	90	61	64	69	47	53
四月	91	84	86	93	95	96	58	55	66	29	59

表 16-上排
板号

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	C*
一月	77	73	89	28	30	28	45	50	70	75	65
二月	80	80	89	52	54	53	51	66	66	63	68
三月	82	82	87	76	69	67	43	61	51	54	62
四月	86	89	84	86	91	89	35	42	47	28	56

5

以上结果再次表明，与为处理的对照相比，用本发明组合物和/或油漆明显具有更好的抗附生效果。

10 实施例 12

在聚氨基甲酸酯树脂混合物中试验本发明抗硬体生物附生的效果。试验混合物含多种组合的孢子、酶和营养细胞。过程如下。

如实施例 11 所述制备试验板。用塑料带在长度上将每块试验板分成两个试验表面区。如下文表 17 所示，用 4oz.聚氨基甲酸酯树脂(聚氨基甲酸酯无色透明漆 No.603, Behr Process Corp., Santa Ana, CA)，加入 0.25oz.各种孢子、营养细胞和/或酶，制备涂料混合物。然后手工混合，手工将其涂在试验板上，如表 17 所示。所用的孢子、营养细胞和酶如实施例 11 所述。

表 17

#附生甲壳	试验板#	P Bio	B+	α淀粉酶	蛋白水解酶
49	对照	-	-	-	-
45	3A	-	-	-	0.25
√ 38	3B	-	-	0.25	0.25
√ 37	4A	0.25	-	0.25	0.25
√ 38	4B	0.25	0.25	0.25	0.25
46	5A	-	0.25	-	-

	51	5B	0.25	0.25	-	-
√	28	6A	0.25	-	-	-
√	27	6B	-	-	0.25	-
√	38	7A	0.25	0.25	0.25	-
√	37	7B	0.25	0.25	-	0.25

√: 最有效的混合物

孢子、营养细胞和/或酶量的单位是盎司。

涂好涂料后, 将试验板挂在 PVC 管架上, 至少吹干 24 小时。然后, 将试验板送至试验地。在试验地, 将试验板固定在 PVC 管架上。所用的固定技术是, 用塑料拉杆在试验板的角上将它们挂在 PVC 的框架上。所有试验板固定在 PVC 框架上后, 将框架吊入水中, 使得水平的成排的板浸入水下约 6 英寸。将 PVC 框架挂在一个浮码头上。所以, 在试验全过程中, 试验板在水中保持着相同的相对位置。

试验板在水下浸 3 个月。第一个月中, 每周一次让试验板经受大致相当于每小时 3 哩船速的缓慢水流。切不了让试验板干燥。然后, 将 PVC 管架在水中悬至其原深度。

4 个月后结束试验。在第一个月的末尾, 记录生长的附生甲壳、贻贝、牡蛎、船底附生物和海草的数量。计数面积限制在试验板上端起的 3"正方形上。结果见表 17。以上数据表明, 试验区内附生甲壳的平均数量为 38.5, 对照区内为 49。这减少的 21%表明本发明可用于抑制硬体附生物的生长。海草和附生物覆盖了约 40%的试验区。在以后的 3 个月中, 试验区内的生长基本保持不变, 而对照区则继续长期, 几乎长至 3/8 英寸厚, 并覆盖 100%的表面; 这种生长是层叠的。而且, 试验区内的软体附生持续减少, 在结束时, 只有 10%的区域有软体附生。这再一次有力地证明, 本发明既可抑制软体附生, 也可抑制硬体附生。

20

实施例 13

在本试验中, 用两种其他液体聚合物代替环氧树脂作为催化活性细胞和酶的包裹剂进行了试验。

手工振荡混合试验涂料。各种涂料的成分如表 18 所示(其中的单位是 g)。Finish 2001, Dura Shine, Bio B+和 Bio P 即实施例 11 所述的材料。所用的蛋白水解酶是 Purafect 4000L, 如实施例 6 所述。

将涂料混合物涂在木刮板上 1×1.5 英寸的区域, 干燥 60 分钟。此时, 用水

冲洗，洗去未能粘附的涂料。将涂覆后的刮板浸在 25ml 的 1:4 稀释脱脂乳中，浸 2 小时。用实施例 1 所述的方法测定水解百分比。结果见表 18。

样品	Finish 2001*	Dura-Shine*	蛋白水解酶*	Bio B+*	Bio P*	%水解
1	4.8	0	0.56	0	0	70
2	4.8	0	0	0.56	0	20
3	4.8	0	0	0	0.56	0
4	4.8	0	0.56	0.56	0	70
5	4.8	0	0.56	0	0.56	50
6	0	4.8	0.56	0	0	50
7	0	4.8	0	0.56	0	0
8	0	4.8	0	0	0.56	10
9	0	4.8	0.56	0.56	0	60
10	0	4.8	0.56	0	0.56	80
11	4.8	0	0	0	0	0
12	0	4.8	0	0	0	0

*: 表中数值的单位是 g

- 5 对本领域技术人员来说显而易见，在本发明精神下和本发明范围内，可对本发明的组合物和方法进行多种修改。因此，这些修改只要在所附权利要求书的范围内，就应理解为被本发明所涵盖。

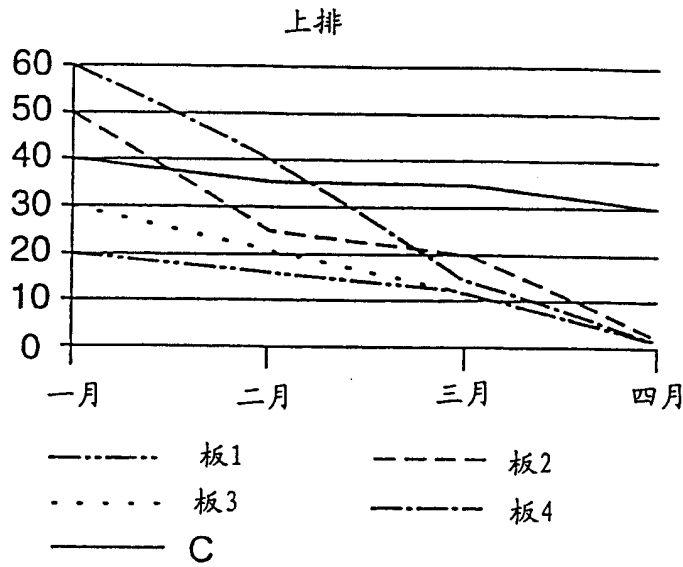


图 1

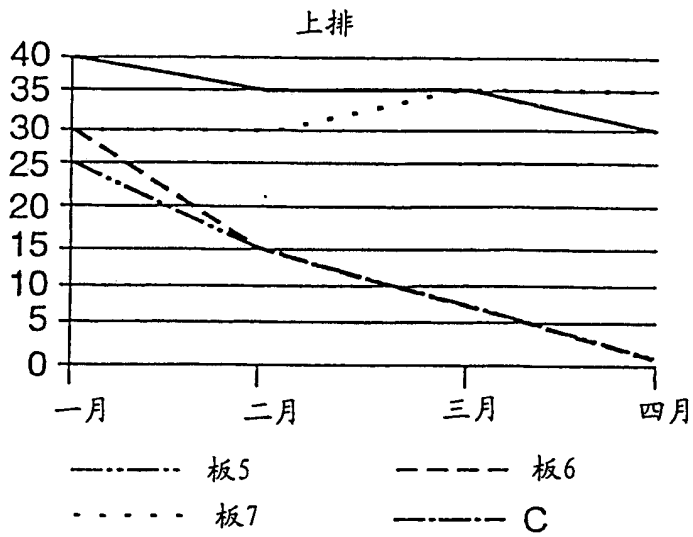


图 2

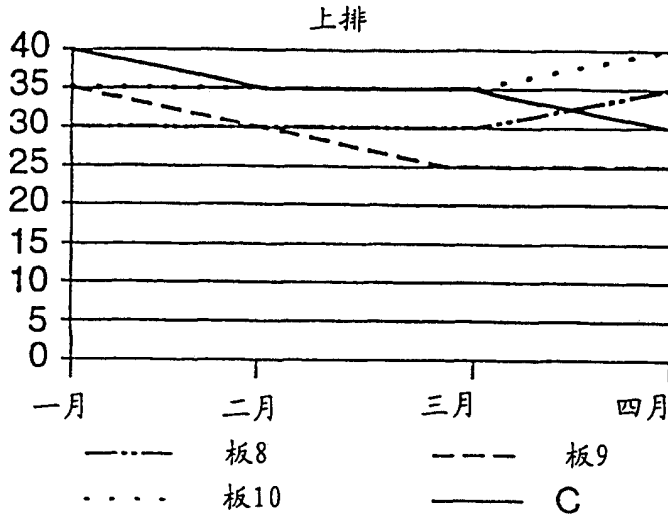


图 3

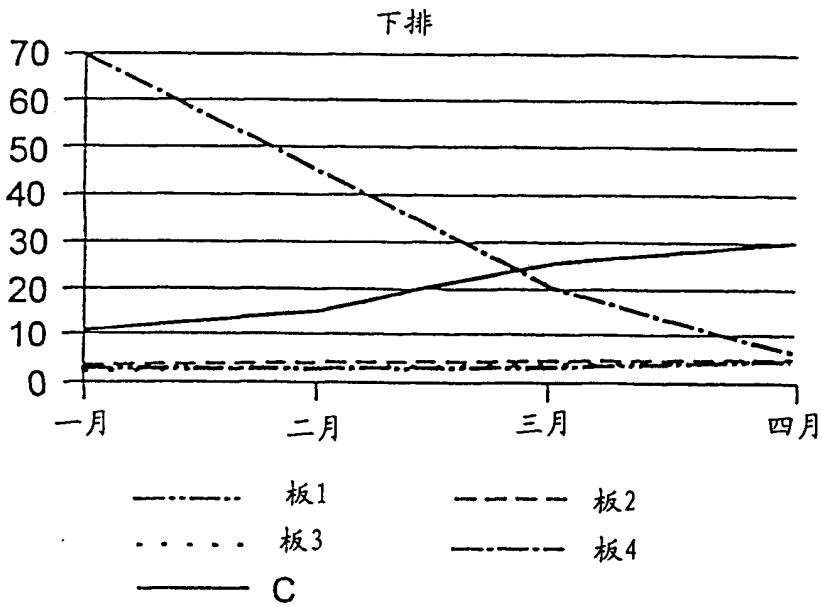


图 4

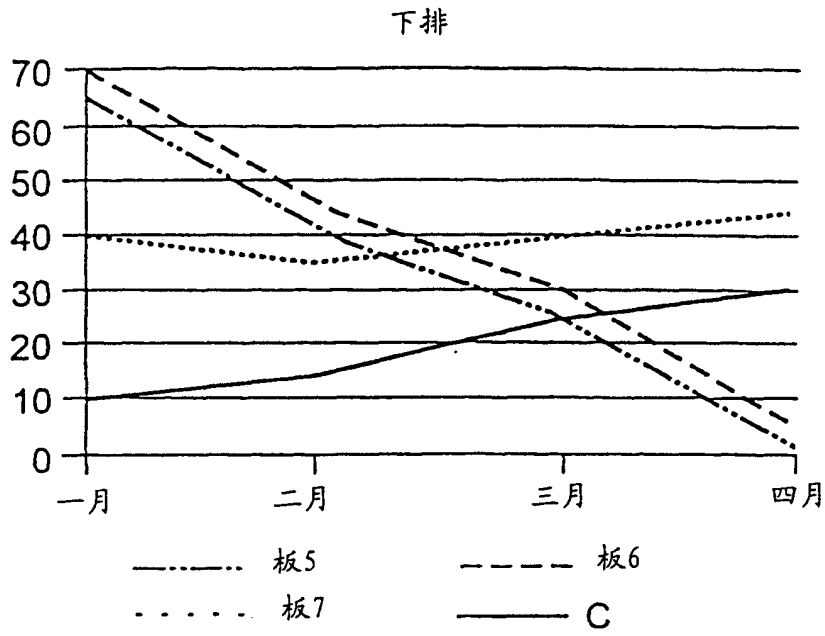


图 5

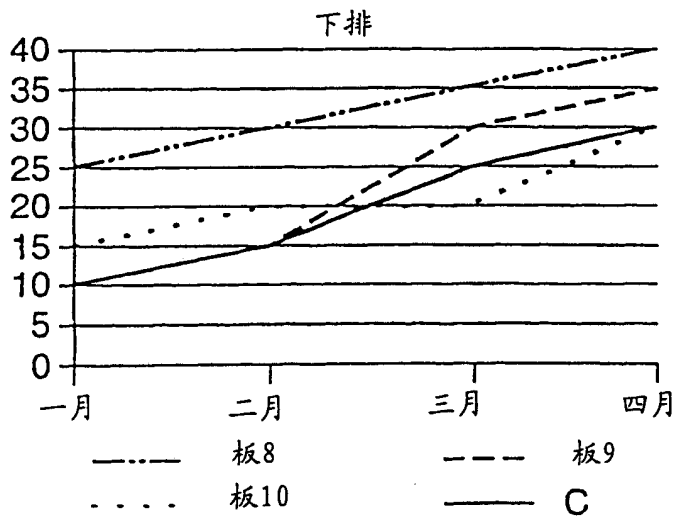


图 6