

Enzymer i bundmaling til skibe

Efter at der blev indført forbud mod brugen af TBT i bundmalinger til skibe, har man arbejdet på at udvikle alternative malinger. En ny lovende metode er at tilsætte enzymer til bundmalingen - og så er de miljøvenlige. Metoden kan videreudvikles til andre »smart coatings«

Af Knud Allermann og Ib Schneider, BioLocus A/S

Alle overflader i naturen bliver efter kortere eller længere tid begroet af mange forskellige organismer (»biofouling«). I havet er begroingen af flader under vand særlig aggressiv, og specielt begroining (fouling) af skibe er et meget stort problem, der koster ejerne og dermed indirekte samfundet meget betydelige beløb at begrænse og bekæmpe. I EU regnes der med, at omkostningerne ved biofouling på skibe løber op i ca. 1 mia. euro/år. Globalt regnes der med 6,6 mia. euro/år. Kan man ikke begrænse begroingen på bunden af et skib, resulterer det i en betydelig gnidningsmodstand. Det betyder nedsat hastighed, tab af manøvre- evne og et stærkt øget forbrug af fossile brændstoffer og dermed øget udslip af drivhusgasser. Desuden fremmer begroingen korrosionsprocesserne på materialerne. Som mange lystsejlere ved, så vil skibsbunden meget hurtigt blive begroet med et tykt lag små krebsdyr (rurer) og alger, hvis man ikke gør noget for at forhindre det. Bevoksningens art og den hastighed den vokser med afhænger af, hvor i verden man sejler. Men en ting er sikker: den kommer, og selv i vores kølige farvande begroes en lystbåd på få måneder. Man kan let forestille sig problemerne for en stor supertanker.



Figur 2. Båd bundmalet med hård enzymholdig maling. Malingen er ikke særlig effektiv, idet bunden er begroet med alger og rurer efter 6 måneder i vandet.

Antifouling

I mange år har man brugt TBT (tributyltin) i bundmaling til skibe. Det har været en effektiv gift mod alle organismer, der



Figur 1. Båd bundmalet med selvpolerende enzymholdig maling. Der ses kun ganske let begroining – men malingen er næsten også poleret helt væk. Bemærk striben midt på båden fra fribord til køl. Det er en kobberbaseret kontrolmaling, der ikke kan opfylde Miljøstyrelsens 2003 bekendtgørelse om udludning af kobber fra bundmalinger til lystbåde.

forsøgte at fasthæfte sig på en skibsbund. TBT blev i det meste af verden anvendt som antifouling-middel og indlejret i selvpolerende bundmalinger. Malingerne fungerer ved, at der langsomt afstødes ultratynde lag og dermed til stadighed frigøres frisk TBT (gift) ved overfladen. Malingstypen har i mange år holdt skibsbunde fri for begroining. Men alarmklokkerne gik i gang, da man ved den franske kyst opdagede, at TBT blev ophobet i østers. Siden har man påvist meget betænkelige hormonlignende effekter på flere havdyr. I danske farvande er det påvist, at TBT kan spores gennem hele fødekæden op til fisk og marsvin. Det er derfor muligt, at TBT er medvirkende til nogle af de hormonlignende bivirkninger, der observeres. Derfor indførte

mange lande (herunder Danmark) forbud mod at bruge TBT i bundmalinger til lystbåde. Begrundelsen var, at de kystnære farvande først skulle beskyttes (det er selvfølgelig også nemmere at indføre nationale begrænsninger end internationale). Imidlertid er man nu i den Internationale Marine Organisation (IMO) blevet enige om, at TBT er så skadeligt for miljøet, at det bør fjernes fra alle skibe.

IMO har indført et udfasningsprogram for alle skibe: fra 2003 måtte der ikke mere påføres TBT-holdig bundmaling på skibe, og fra 2008 skal det forsegles eller fjernes fra alle skibe. TBT-sagen har skærpet myndighedernes opmærksomhed omkring biocider og har medført en række nationale og regionale restriktioner startende med lystbådsområdet. I EU har det resulteret i et meget restriktivt biociddirektiv, der kræver omfattende dokumentation for, at alle »aktivstoffer« er miljøvenlige.

- * Bionedbrydelighed af enzymer i havvand er 100% indenfor 12 døgn.
- * EC50 for alger i vækstrategiforsøg > 100 mg/l
- * EC50 for Daphnia magna > 100 mg/l
- * EC50 for zebrafisk > 100 mg/l

Figur 3. Der ses ikke toksiske effekter på alger, dafnier og fisk, når disse udsættes for de anvendte enzymer. Enzymerne nedbrydes endvidere 100% i havvand efter 12 døgn. Arbejdet er udført af DHI Vand & Miljø efter OECDs GLP-retningslinjer.

Miljøvenlig antifouling

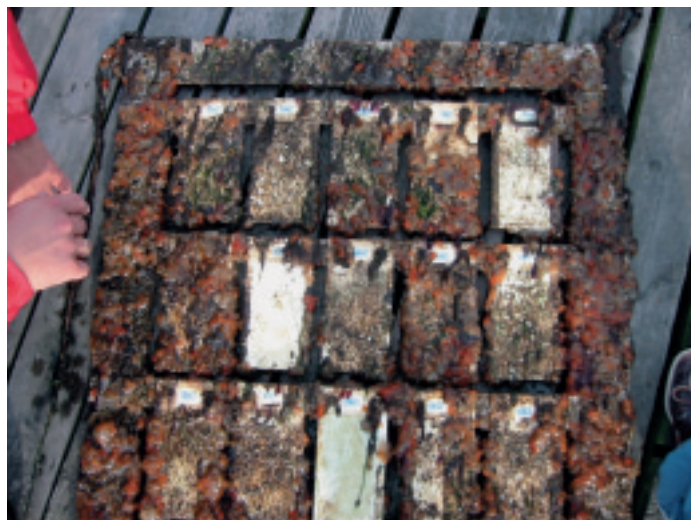
Kravet til branchen er således klart: der skal udvikles alternativer til de eksisterende antifouling-metoder. Som overgangsløsning bruges der hovedsageligt bundmaling med kobberforbindelser, hvilket regnes for en stakket frist, da myndighederne også ønsker kobberforbindelserne væk. I Sverige og Danmark er der allerede indført begrænsninger i brugen af kobber til lystbåde. Globalt undersøges der mange alternativer. Som overgangsløsning til de store skibe er man gået to veje:

1. Der udvikles overflader, som har en meget lav overfladeenergi, hvilket resulterer i en meget glat overflade, en »fouling release«-overflade. Til disse metoder anvendes silikone- og teflonforbindelser. Længst fremme er silikoneprodukterne. De har vundet indpas til skibe, der sejler meget hurtigt (15-20 knob), næsten konstant og med meget korte ophold. Det er et dyrt produkt, og det er vanskeligt at påføre og reparere. Man regner med, at virkningen af fouling release-produkter skyldes den lave overfladeenergi, men i så fald skulle teflonoverflader være mere effektive. Det viser sig da også, at virkningen af silikoneprodukterne også skyldes en konstant frigivelse af lavmolekylære silikoneforbindelser, som skaber en ultratynd forsæbningshinde på overfladen. Disse stoffers påvirkning af miljøet er der endnu ingen, der har undersøgt.

2. De fleste andre metoder inden for bundmaling går på at finde »miljøvenlige gifte«, altså alternative organiske forbindelser, der hæmmer organismene, men som nedbrydes hurtigt ved frigivelse og dermed ikke ophobes i miljøet som eksempelvis TBT og kobber.

Enzymer virker

Enzymer er proteiner, der deltager som katalysator i en proces uden selv at blive forbrugt. F.eks. kan visse hydrolytiske enzymer specifikt nedbryde andre proteiner eller polymerer som f.eks. polysaccharider. BioLocus har patenteret en metode,



Figur 4. Ramme (raft) med 15 paneler der har været nedsænket i Marselisborg havn i 6 måneder.

Øverste række nr. 5 fra venstre: selvpolerende enzymholdig maling

Mellemste række nr. 1 fra venstre: ubehandlet panel (kontrol)

Mellemste række nr. 2 fra venstre: selvpolerende enzymholdig maling

Nederste række nr. 3 fra venstre: kobberbaseret kontrolmaling

hvor der bruges hydrolytiske enzymer i bundmaling. Metoden blev påvist ved forsøg på det hollandske institut, TNO, der udførte »proof of concept«-forsøg for firmaet. Forsøgene blev udført med larver af den, for skibe, værste fouling-organisme, rur. Forsøgene viste klart, at tilstedeværelsen af proteolytiske enzymer hindrede de fritsvømmende larver i at sætte sig fast på en overflade. Samtidig skete der ingen skade på larverne, de svømmede blot rundt for at finde et bedre sted at sætte sig. De indledende forsøg blev starten på et udviklingsprojekt, som endnu er i gang.

WWW
Besøg os på nettet

**Rietschle
Thomas**
Vakuumpumper
Lavtrykskompressorer
Sidekanalblæsere
www.rtpumps.dk
e-mail: rtpumpsdk@rtpumps.com
+45 59 44 40 50

**Vakuumteknik
der betaler sig!**

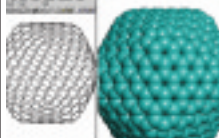
For yderligere oplysninger:
Busch Vakuumteknik A/S
+45 87 88 07 77
info@busch.dk
www.busch.dk



Videnskabelig software



www.innomax.dk
Inno-Max
Tlf: 96 96 11 11



www.mikrolab.dk

Alt i udstyr og tilbehør
til laboratoriet
Vi bygger også kundespecifiseret udstyr
Spørg først ML - det betaler sig!



MIKROLAB AARHUS

Enzymer i maling

Det næste spørgsmål var, om enzymer bevarer deres aktivitet i maling, og om de virker længe nok. En række indledende forsøg viste, at de bevarer aktiviteten og ikke kun i vandbaserede malinger. Faktisk er de bedste resultater opnået med opløsningsbaserede malinger med bestemte typer af bindere. Der arbejdes stadig med disse forhold, idet et bundmalingsprodukt til store skibe skal være aktivt i mindst 2½-3 år, da det er det korteste interval mellem dokninger hos de store rederier. Kan aktiviteten bevares endnu længere, er det naturligvis en stor fordel. De stabilitetsforsøg, der er udført, viser, at enzymerne kan bevare deres aktivitet i malingsprøver i flere år. Maling er et billigt produkt sammenlignet med mange andre produkter udviklet i bioteknologiske virksomheder. Derfor skal enzymerne også være i en prisklasse, der er sammenlignelig med andre råvarer til malingsproduktion, især sammenlignet med de aktivstoffer, de skal konkurrere med. Derfor koncentrerer vi os om brugen af industrielt fremstillede enzymer til f.eks. vaskepulver i ton-skala og dermed til relativt lave priser.

BioLocus har sammen med EnPro ApS, DHI Vand & Miljø og Dansk Sejlunion modtaget udviklingsstøtte fra Miljøstyrelsen. Ved starten af 2004 er støtten blevet forlænget, og CISMI er indtrådt i samarbejdet. Desuden har BioLocus sammen med flere partnere modtaget EU-udviklingsstøtte gennem CRAFT-programmet. Sidstnævnte projekt har opnået EU-støtte på 6,3 mio. kr. og løber i 2003 og 2004. Desuden er der et udviklingssamarbejde med Jotun A/S, verdens næststørste bundmalingsproducent. Der forhandles endvidere med flere andre industrielle koncerner om udviklings-samarbejde.

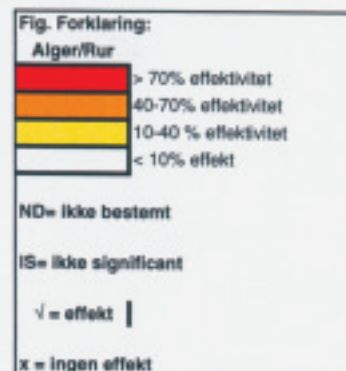
Hvordan virker enzymerne mod begroning?

Udviklingsarbejdet med de forskellige partnere, ikke mindst de tilknyttede forskningslaboratorier, har givet meget interessante resultater. Resultaterne understøtter den grundlæggende hypotese, at enzymerne virker ved at nedbryde de initiale limstoffer, som larver og zoosporer udskiller, når de undersøger en overflade, og som de senere stadier af organismen kitter sig hårdt fast til. Det biologisk interessante er, at vidt forskellige organismer som alger og rurer bruger protein som en meget vigtig bestanddel af den initiale »lim«. Derfor ser det ud til, at proteinaser er de mest effektive enzymer til at forhindre fasthæftning af organismer. I det videre arbejde skal enzymernes effekt optimeres.

Er enzymer miljøvenlige?

De fleste eksperter vil umiddelbart sige, at enzymer meget hurtigt nedbrydes, når de undslipper til det omgivende havvand. Det virker indlysende, men pga. indførelsen af det kommende EU-biociddirektiv, skal man over for EU-myndighederne påvise, at aktivstoffer er bionedbrydelige og ikke toksiske over for organismer i vandmiljøet. Miljøstyrelsen har støttet en undersøgelse af dette for enzymeres vedkommende. Undersøgelserne er udført af DHI Vand & Miljø og viser som forventet, at enzymer nedbrydes 100% i havvand på under 12 dage, og at de ikke er akut toksiske for alger, dafnier og fisk. Disse forsøg skal måske senere følges op af en egentlig »risk assessment« modelberegning, men endnu ved vi ikke med sikkerhed, hvad EU-myndighederne vil forlange.

Enzymnavn	Enzymtype	Alge "Ulva"	Kisel-alge "Navicula"	Rur "Balanus"
Proteases				
Alcalase 2.5 L, Type DX	Serine - protease	✓✓✓	✓✓	✓✓✓
Savinase 16 L, Type EX	Serine - protease	✓✓✓	✓	✓✓✓
Esperase 8 L	Serine - protease	✓	✓	✓
Amylases				
Termamyl 120 L, Type S	alpha-amylase	✓	✓	x
Fungamyl 800 L	alpha-amylase	x	x	x
AMG 300 L	Glucoamylase	x	x	x
Pectinases				
Pectinex Ultra SP	Polygalacturonase	x	x	x
Multicomplex				
Energen L	endo-1,3(4)-beta-glucanase	x	x	x
Viscozyme L	Multi-enzyme complex	x	x	x
Glucanex 200G	exo-1,3-beta-glucanase	ND	ND	✓
Shearzyme Plus	xylanase, glucanase, cellulase	x	x	x
Xylanses				
Pulpzyme HC	endo-1,3-beta-xylosidase	x	x	x
Lipases				
Lipolase 100 L, Type EX	Triacylglycerol lipase	x	x	x
Lipex 100 L	Triacylglycerol lipase	✓	x	x
Cellulases				
Carezyme 4500 L	mono-component cellulase	✓	x	x
Denimax 991 L	acid cellulase	✓	x	x
Cellusoft L	endo-glucanase	✓✓	x	x
Endolase 5000 L	mono-component cellulase	✓	x	x



Figur 6. Screening af en række kommercielle enzymprodukters indvirkning på vedhæftningen af en alge, en kiselalge og rurlarver på en overflade. Enzymerne er fra Novozymes A/S, og screeningen er foretaget på University of Birmingham og University of Newcastle, begge UK.

Figur 5. Deltagerne i EU-projektet som BioLocus koordinerer. Projektet løber i 2003–2004, og budgettet er på 1.7 mio. euro.

Organisation	Country	Business Activity	R&D function in project
BioLocus ApS (BLC – A1)	Denmark	Biotechnology	Enzymes, paint and immobilisation
Euronavy SA (EUR – A2)	Portugal	Paint manufacture	Development of paint
Rovima SA (RVM – A3)	France	Paint manufacture	Development of paint
InterChem SA (INC – A4)	Greece	Binder manufacture	Development of binder
Archaezyme Ltd (ARC – A5)	Israel	Enzyme company	Screening for enzymes
TNO (TNO – B1)	The Netherlands	R&D institution in coatings and corrosion	Enzymes, binder and EB composite development
University of Birmingham (UBL – B2)	United Kingdom	University/Biology	R&D screening and tests of adhesives in algae
University of Newcastle (UNC – B3)	United Kingdom	University/Biology	R&D screening and tests of adhesives in barnacles

Det første malingsprodukt på markedet med enzymer?

BioLocus arbejder på at få et prøvesalg af et antifouling-produkt i gang i Danmark og Sverige i 2005. I 2003 har der med støtte af Miljøstyrelsen været afholdt forsøg i fem danske havne med testpaneler og afprøvninger på 22 lystbåde. Forsøget gav både dårlige resultater og lovende fingerpeg om, i hvilken retning et produkt skal forbedres. Det første produkt bliver en selvpolerende type, der sikrer, at nye enzymer løbende eksponeres i malingens overflade. Samtidig fortsætter arbejdet med at videreudvikle den selvpolerende malingstype til de store skibe, hvor der allerede er udviklet nye selvpolerende bindersystemer og formuleret en maling, der viser enzymaktivitet i overfladen. Det er sandsynligt, at der udtages supplerende patenter.

Andre enzymprodukter er i støbeskeen?

Det forventes, at andre begrebsproblemer også kan løses med enzymteknologi. Imprægnering af net til opdræt af fisk i havbrug foregår i dag med brug af store koncentrationer af kobberforbindelser. Indledende forsøg er udført for at finde en metode med enzymer. Konservering af vandbaserede

% Cypridvedhæftning					
Enzym (µg/ml)	10	50	100	500	1000
Kontrol	80%	80%	80%	80%	80%
Alcalase	50%	0%	0%	0%	0%

Figur 7. Forsøg udført på TNO, NL viser, at serin proteasen –Alcalase fra Novozymes A/S – kan forhindre fasthæftning af rurlarven (Cyprid) 100% ved en koncentration på 50 mg/ml.

maling er et område, hvor der anvendes konserveringsmidler, som risikerer at blive forbudt i fremtiden. Der kunne nævnes en række andre tekniske løsninger, hvor man kan nyttiggøre enzymer på overflader af coatings og membraner.

E-mail-adresse:
info@biolocus.com

Kilder

Allermann, K. & Schneider, I. »Enzymes acting as Antifouling Non-toxic Agents in Coatings« at Smart Coatings II, European Coating Conference, Berlin June 16-17, 2003.

J. Callow, M. Pettitt, S. Henry, M. Callow, T. Clare, I. Schneider and K. Allermann. »Mode of Action of Proteolytical Enzymes on the Fouling Process of Barnacles and Algae«. Workshop: New Perspectives in Marine Biofouling and Biofouling Control. Kristineberg Marine Research Station in Sweden. October 3-4, 2003.

Schneider, I. & Allermann, K. »Enzymes and bio-paints – a sea change in marine coatings«. Asia Pacific Coatings Journal, vol. 16 No 5, October 2003.

PESTICIDANALYSER

Antistoffer til immunkemisk måling af pesticider

Som et alternativ til de konventionelle pesticidmålinger har Statens Serum Institut (SSI) i samarbejde med bl.a. Danmarks og Grønlands Geologiske Undersøgelse (GEUS) udviklet en række monoklonale antistoffer mod et udvalg af herbicider. Disse antistoffer kan anvendes til kvantitative immunkemiske analyser af herbicider i ppb-området samtidig med at analyserne kun kræver omkring 0,5 ml prøve.

SSI kan i dag levere antistoffer mod bl.a. 2,6-dichlorbenzamid (BAM) og et udvalg af triaziner samt nedbrydningsprodukter.

Antistofferne er nærmere beskrevet under www.ssi.dk/antistoffer

Oplysninger kan fås ved henvendelse på microbiology@ssi.dk, på fax: 3268 8179 eller tlf.: 3268 8378