

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 298**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C09D 5/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07001141 .6**

96 Fecha de presentación: **02.06.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1811001**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.07.2007**

54 Título: **Composición antiincrustación**

30 Prioridad:
04.06.1999 GB 9913050

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.11.2012

73 Titular/es:
**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)
Langebrogade 1 Postboks 17
1001 Copenhagen K., DK**

72 Inventor/es:
**POULSEN, CHARLOTTE HORSMANS y
KRAGH, KARSTEN MATTHIAS**

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 391 298 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición antiincrustación.

La presente invención se refiere a una composición antiincrustación. En particular, la presente invención se refiere a una composición antiincrustación que comprende una enzima capaz de producir un compuesto que tiene un efecto antiincrustación.

Como se discute en la patente de EEUU A-5071479 se necesitan biocidas en ambientes muy diferentes, tales como agentes antihongos en pinturas de casas, algicidas en agua dulce, y agentes antiincrustación en estructuras marinas expuestas a la flora y fauna del agua del mar. Como se sabe, pueden crecer mohos o hongos sobre pinturas de casas o similares, y utilizan el medio pintura como un nutriente, o en algunos casos, el sustrato inferior, tal como la madera, como nutriente. Por razones obvias, esto puede causar a la superficie pintada un deterioro en la apariencia de la superficie pintada. Se puede incorporar un biocida a la pintura y cuando el micelio o cuerpos fructíferos del hongo contactan o penetran la película de pintura y así, a través del contacto íntimo con el biocida en la película, los hongos se destruyen. En torres de enfriamiento que utilizan agua dulce, se puede desarrollar verdín, mohos y algas si no están presentes compuestos eficaces para combatir su crecimiento.

Como se discute en la patente de EEUU A-5071479 el crecimiento de organismos marinos sobre las partes sumergidas del casco de un barco es un problema particular. Tal crecimiento incrementa la resistencia de rozamiento del casco al paso del agua, llevando a un incremento del consumo de combustible y/o a una reducción de la velocidad del barco. El crecimiento marino se acumula tan rápidamente que la solución de limpiar y repintar que se hace en dique seco generalmente se considera demasiado cara. Una alternativa que se ha practicado con eficacia incrementada con el paso de los años, es limitar la cantidad de incrustación mediante la aplicación en el casco de una pintura de recubrimiento que incorpora agentes antiincrustación. Los agentes antiincrustación son biocidas que se liberan de la superficie de la pintura durante un periodo de tiempo a una concentración letal para organismos marinos en la superficie del casco. La pintura antiincrustación falla sólo cuando la concentración de biocida disponible en la pintura superficial cae por debajo de la concentración letal y con las pinturas modernas se puede esperar una vida útil de hasta dos años.

Un biocida usado muy ampliamente, en particular en agentes antiincrustantes marinos, es tributil estaño (TBT). Sin embargo, hay una preocupación creciente sobre los efectos medioambientales causados por biocidas de estaño orgánicos a sus niveles comerciales actuales como un ingrediente activo antiincrustación en composiciones de recubrimiento para aplicaciones acuáticas (marinas). Se ha mostrado que, debido al amplio uso de compuestos de tipo tributil estaño en particular, a concentraciones tan altas como 20% en peso en pinturas para fondo de barcos, la contaminación del agua de alrededor debido a lixiviación ha alcanzado tal nivel que causa la degradación de mejillones y organismos de concha. Estos efectos se han detectado a lo largo de la costa de la Bretaña francesa y un efecto similar se ha confirmado en aguas EEUU y Extremo Oriente. Según la normativa de restricción más reciente, con excepciones limitadas, los barcos de recreo de hasta 25 metros de longitud ya no se les permite usar pintura antiincrustación que contiene niveles altos de compuestos de tributil estaño.

Las investigaciones han mostrado que siempre que la velocidad de lixiviado del estaño se pueda mantener a o por debajo de $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ por día, parece que la vida acuática no se ve afectada a largo plazo. Sin embargo, también se ha encontrado que para ser eficaz en el control de algas marinas, así como con organismos marinos más desarrollados, desde la superficie pintada del fondo de los barcos, se requiere una cierta velocidad mínima de lixiviación de estaño de aproximadamente 9 a $16 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{día}$. Normalmente, esta velocidad de lixiviado más alta se logra con una concentración del compuesto tributil estaño de aproximadamente 15% a 20% en peso de pintura.

En vista de la eficacia de TBT las autoridades reguladoras han acordado con reticencia que siempre que no haya un sustituto adecuado de los ingredientes de estaño activos de antiincrustación orgánica, los barcos grandes, es decir los que tienen una longitud mayor de 25 metros, aún se les permite usar tales compuestos para minimizar la incrustación. Por tanto hay un deseo de proporcionar biocidas alternativos a los compuestos con base TBT.

La patente de EEUU A-4297137 describe que los efectos de una composición antiincrustación se pueden prolongar mediante la moderación de la liberación de los constituyentes antiincrustación. Este documento describe pinturas antiincrustación que comprenden al menos una sustancia tóxica para organismos marinos que está incorporada uniformemente en una matriz sólida discontinua que es insoluble en agua de mar y está dispersa en la pintura. La matriz está formada al menos parcialmente a partir de al menos una sustancia que se vuelve soluble en agua de mar bajo la acción de enzimas liberadas por los organismos marinos que hay que inhibir y/o mediante la película bacteriana en contacto con la pintura. Así cuando el organismo marino se asocia con la superficie pintada, la sustancia tóxica se libera y los organismos se inhiben. Al igual que las descripciones de técnicas anteriores, las sustancias tóxicas previstas en la patente de EEUU A-4297137 solo incluyen los compuestos con base de cobre y estaño muy conocidos, tal como TBT.

Abarzua et al., Mar. Ecol. Prog. Ser., vol. 123:301-312, 1995 "Biotechnological investigation for the prevention of biofouling. L Biological and biochemical principles for the prevention of biofouling" proponen la extracción de agentes biogénicos que tienen propiedades antibacterianas, antialgas, antiprotozoos y anti macroincrustación a partir de algas e invertebrados marinos. Se propone que se pueda determinar la estructura de los agentes extraídos,

posteriormente sintetizada y se use el agente sintetizado para evitar la bioincrustación. No se proporciona método de extracción o de síntesis.

La patente EP A-0866103 describe un método para controlar la liberación de compuestos que tienen actividad antimicrobiana y composiciones de recubrimiento que utilizan este sistema. El método comprende la incorporación de una enzima y un sustrato en una matriz. La enzima actúa en el sustrato para proporcionar un compuesto. En una realización prevista sobre el compuesto puede actuar posteriormente otra enzima. El sustrato y enzima(s) producen un compuesto que tiene actividad antimicrobiana.

La patente de EEUU A-5747078 está relacionada con productos alimentarios. El documento muestra que la contaminación microbiana de comidas y alimentos, que puede causar graves problemas de salud, se puede inhibir por una composición que comprende un sistema lactoperoxidasa que mantiene una liberación continua de peróxido de hidrógeno. Después el peróxido de hidrógeno reacciona con tiocianato, catalizado por lactoperoxidasa, para producir hipotiocianato. El hipotiocianato después puede actuar como un agente antimicrobiano. Este documento proporciona un antecedente que muestra el sistema enzimático inmovilizado. El documento no habla sobre agentes antiincrustación o cualquier microorganismo que tenga propiedades incrustantes.

La presente invención mitiga el problema de la técnica previa.

En las reivindicaciones del apéndice se definen aspectos de la presente invención. Estos y otros aspectos preferentes se discuten a continuación.

Se ha encontrado que la provisión de un sistema integrado para la generación de un compuesto antiincrustación que utiliza una enzima a partir de un organismo marino proporciona un sistema estable que

- tiene eficacia a largo plazo en ambientes sucios tales como ambientes marinos
- requiere menos sustrato que sistemas de técnicas previas para proporcionar un efecto antimicrobiano dado. Las enzimas a partir de organismos marinos, tal como hexosa oxidasa (HOX) de alga, tiene valores bajos Km para glucosa, concretamente 2,7 mM. Este Km bajo significa que la enzima tiene una afinidad muy alta por la glucosa. Al contrario que enzimas no marinas tal como glucosa oxidasa (GOX) no marina puede tener un valor Km al menos 10 veces más alto para glucosa. En otras palabras los sistemas enzimáticos previos tienen una afinidad mucho más baja para glucosa que el de la presente invención. En aplicaciones antiincrustación, esto dará una diferencia significativa, ya que una enzima con alta afinidad por la glucosa será capaz de transformar toda la glucosa presente. Por otro lado una enzima con afinidad más baja para glucosa se espera que permita la lixiviación de glucosa al ambiente de alrededor. La lixiviación de glucosa contrarrestará la actividad antiincrustación deseada debido a que la glucosa será un sustrato para organismos incrustantes. La lixiviación de glucosa por tanto deriva en un incremento de la incrustación.
- requiere menos enzimas que sistemas de técnicas previas para proporcionar un efecto antimicrobiano dado. Las enzimas de organismos marinos, tal como HOX de algas, también tienen bajo valor Km para oxígeno de nuevo más bajo que el valor Km para oxígeno de sistemas de técnicas previas tal como GOX. De nuevo esta afinidad más alta para el sustrato da a HOX de algas una ventaja. Esto es debido a que en aplicaciones antiincrustación la peor incrustación estará en ambientes "cerrados" como puertos con bajo intercambio de agua y alto crecimiento de algas y otros organismos incrustantes. Exactamente en esos lugares la incrustación era peor, el contenido de oxígeno del agua también será el más bajo comparado con el mar abierto. Por tanto serán ventajosas las enzimas de organismos marinos con alta afinidad para oxígeno.
- proporciona actividad mejorada a temperaturas probables de trabajo. En composiciones de recubrimiento de superficies tal como pintura antiincrustación el componente antimicrobiano (antiincrustación) normalmente tiene que ser activo entre 15 y 30°C. Para composiciones antiincrustación esta es la temperatura del agua de mar donde la incrustación supone un problema. Al contrario que en sistemas de técnicas previas, las enzimas de organismos marinos, tal como HOX de alga, tienen temperatura óptima de actividad exactamente a la temperatura óptima para la incrustación y estas enzimas por lo tanto son perfectamente adecuadas como un agente antiincrustación. La temperatura óptima se muestra en el ejemplo 9.
- utiliza sustratos seguros y de disponibilidad inmediata.
- tiene tolerancia mejorada a la sal lo que conduce a una actividad más mejorada en ambientes marinos.
- es resistente a la degradación por organismos de incrustación. Las enzimas de organismos marinos, tal como HOX de alga, son enzimas marcadamente resistentes a proteasas. Sobrevivirán a tratamiento con pronasa (preparación de proteasas de amplio espectro) sin pérdida alguna de actividad. Esta resistencia a proteasa se considera especialmente importante en la aplicación antiincrustación ya que por lo tanto la enzima será resistente a degradación por proteasas de los organismos antiincrustación que están intentando adherirse a la superficie recubierta.

En la presente especificación “incrustantes” referidos mediante los términos “antiincrustante(s)”, “antiincrustacion” y “antiincrustacion” incluye organismos que pueden habitar y/o crecer sobre la superficie a tratar con la presente composición. Los organismos incluyen microorganismos tales como bacterias, hongos y protozoos, y algas y organismos tales como algas, plantas y animales. El organismo puede ser organismo marino.

5

La composición de la presente invención comprende una enzima precursora y un sustrato precursor, en la que la enzima precursora y el sustrato precursor generan un sustrato para la enzima de la presente invención mediante la acción de la enzima precursora sobre el sustrato precursor. Esta combinación de enzima precursora y sustrato precursor será referida en la presente memoria de aquí en adelante como “sustrato generador”.

10

La enzima del presente sistema se puede obtener o puede ser obtenible a partir de un microorganismo marino.

Preferentemente la enzima del presente sistema se obtiene o es obtenible a partir de un alga marina. Preferentemente la enzima del presente sistema se obtiene o es obtenible a partir de *Chondrus crispus*.

Preferentemente, el compuesto antiincrustacion es peróxido de hidrógeno.

15

Preferentemente, la enzima es una oxidasa. Preferentemente, la enzima se selecciona a partir de glucosa oxidasa, L aminoácido oxidasa, D amino oxidasa, galactosa oxidasa, hexosa oxidasa, piranosa oxidasa, malato oxidasa, colesterol oxidasa, arilalcohol oxidasa, alcohol oxidasa, latosterol oxidasa, aspartato oxidasa, amino oxidasa, D glutamato oxidasa, etanolamina oxidasa, NADH oxidasa, urato oxidasa (uricasa) y sus mezclas. Preferentemente, la enzima es hexosa oxidasa.

ENZIMA HEXOSA OXIDASA (HOX)

20

La hexosa oxidasa (D-hexosa: O₂-oxidoreductasa, EC 1.1.3.5) (también llamada HOX) es una enzima que en presencia de oxígeno es capaz de oxidar D-glucosa y varios otros azúcares reductores incluyendo maltosa, lactosa y celobiosa a sus correspondientes lactonas con posterior hidrólisis de los ácidos aldobiónicos respectivos. Consecuentemente, HOX difiere de otra oxidoreductasa, glucosa oxidasa, que sólo puede transformar D-glucosa, en que la enzima puede utilizar un amplio rango de sustratos de azúcar. La oxidación catalizada por HOX se puede ilustrar como sigue:

25



o



30

HOX se produce naturalmente por diversas especies de algas marinas. Tales especies se encuentran *inter alia* en la familia *Gigartinales*. Como se usa en la presente memoria, el término “HOX” denota una enzima que es capaz de oxidar los sustratos seleccionados del grupo que consiste en D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, maltosa, lactosa y celobiosa.

Preferentemente, la hexosa oxidasa es obtenible o se obtiene a partir del alga marina *Chondrus crispus*.

En un aspecto la enzima hexosa oxidasa es una enzima tratada en la descripción EP-A-0832245.

35

PRODUCCIÓN DE HEXOSA OXIDASA (HOX)

40

El gen que codifica la enzima HOX se ha clonado a partir del alga marina *Chondrus crispus* (Stougaard and Hansen 1996, Hansen and Stougaard, 1997). La levadura metilotrónica *Hansenula polymorpha* (desarrollada en Rhein Biotech, Dusseldorf/Alemania como un sistema de expresión para proteínas heterólogas) también se ha usado para producir la enzima HOX (la proteína nativa se purificó a partir de alga marina (Poulsen and Høstrup, 1998)). La patente WO 96/40935 y WO 98/13478 también describe la clonación y expresión en organismos huésped recombinantes de un gen que codifica una proteína con actividad HOX.

En una realización preferente, la enzima hexosa oxidasa comprende la secuencia de aminoácidos presentada en SEC ID N° 1 o uno de sus variantes, homólogo, derivativo o fragmento. En una realización preferente, la enzima hexosa oxidasa comprende la secuencia de aminoácidos presentada en SEC ID N° 1.

45

En una realización preferente, la enzima hexosa oxidasa está codificada por una secuencia de nucleótidos presentada en SEC ID N° 1 o una de sus variantes, homólogo, derivativo o fragmento. En una realización preferente, la enzima hexosa oxidasa está codificada por una secuencia de nucleótidos presentada en SEC ID N° 1.

50

En una realización preferente, la enzima hexosa oxidasa está codificada por una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar la secuencia de nucleótidos presentada en SEC ID N° 1 o una de sus variantes, homólogo, derivativo o fragmento o una secuencia complementaria a la secuencia de hibridación. En una realización preferente, la enzima hexosa oxidasa está codificada por una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar a la

secuencia de nucleótidos presentada en SEC ID N° 1 o una secuencia complementaria a la secuencia de hibridación.

La enzima, preferentemente la enzima hexosa oxidasa se puede preparar de un modo descrito en la solicitud de patente británica n° 9927801.2.

5 VARIANTES/HOMÓLOGOS/DERIVATIVOS (SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS)

Las secuencias de aminoácidos de la presente invención se presentan en SEC ID N° 1 o son secuencias obtenibles a partir de la enzima HOX de la presente invención pero también incluyen secuencias homólogas obtenidas de cualquier fuente, por ejemplo, proteínas virales/bacterianas relacionadas, homólogos celulares y péptidos sintéticos, así como sus variantes o derivados.

10 Así, la presente invención trata variantes, homólogos o derivados de las secuencias de aminoácidos presentadas en la presente memoria, así como variantes, homólogos o derivados que codifican las secuencias de nucleótidos para esas secuencias de aminoácidos.

15 En el contexto de la presente invención, se toma una secuencia homóloga para incluir una secuencia de aminoácidos con al menos 75, 85 o 90% idénticos, preferentemente al menos 95 o 98% idénticos al nivel de aminoácidos sobre al menos, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos según se presenta en SEC ID N° 1 de la secuencia que se lista en la presente memoria. En particular, la homología normalmente debería considerarse con respecto a esas regiones de la secuencia que se sabe que son esenciales para la actividad enzimática más que para secuencias vecinas no esenciales. Estas regiones incluyen pero no están limitadas los dominios de unión al FAD putativo en HOX tal como SGGH₇₉C, LGGH₁₄₆I y LGGH₃₂₀A. Aunque la homología también se puede considerar en términos de similitud (por ejemplo, restos de aminoácidos que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención es preferente expresar homología en términos de identidad de secuencia.

20 Las comparaciones de homología se pueden llevar a cabo a ojo, o más normalmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos comercialmente disponibles pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

25 El % de homología se puede calcular sobre secuencias continuas, por ejemplo se alinea una secuencia con la otra secuencia y cada aminoácido de una secuencia se compara directamente con el correspondiente aminoácido de la otra secuencia, un resto cada vez. Esto se llama un alineamiento "sin huecos". Normalmente, tales alineamientos sin huecos se llevan a cabo solo sobre un número relativamente corto de restos.

30 Aunque este es un método muy simple y consistente, falla al tener en cuenta que, por ejemplo, en un par de secuencias idénticas, una inserción o delección causará que el siguiente resto del aminoácido salga del alineamiento, esto potencialmente da como resultado una gran reducción del % de homología cuando se lleva a cabo un alineamiento global. Como consecuencia, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias, están diseñados para producir alineamientos óptimos que tengan en cuenta posibles inserciones y delecciones sin penalizar excesivamente el resultado total de homología. Esto se logra insertando "huecos" en la secuencia de alineamiento para tratar de maximizar la homología local.

35 Sin embargo, estos métodos más complejos asignan "huecos de penalización" a cada hueco que se da en el alineamiento de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una secuencia de alineamiento con los menos huecos posibles –que refleja una relación más alta entre las dos secuencias comparadas– logrará una puntuación más alta que una con muchos huecos. Los "costes de huecos afines" son usados normalmente y cargan un coste relativamente alto por la existencia de un hueco y una penalización más pequeña por cada resto posterior en el hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos más usado comúnmente. La penalización alta por hueco por supuesto que producirá alineamientos óptimos con menos huecos. La mayoría de los programas de alineamiento permiten modificar la penalización por huecos. Sin embargo, es preferente usar los valores predeterminados cuando se usan tales programas para comparación de secuencias. Por ejemplo cuando se usa el paquete GCG Wisconsin Bestfit (ver a continuación) la penalización por hueco omitido para secuencias de aminoácidos es -12 para un hueco y -4 para cada extensión.

40 El cálculo del % máximo de homología por lo tanto requiere en primer lugar la producción de un alineamiento óptimo, teniendo en cuenta la penalización por huecos. Un programa de ordenador adecuado para llevar a cabo tal alineamiento es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (University of Wisconsin U.S.A.; Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12:387). Ejemplos de otros softwares que pueden llevar a cabo comparaciones de secuencias incluyen, pero no están limitados, el paquete BLAST (ver Ausubel et al., 1999 *ibid* – Chapter 18), FASTA (Atschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 403-410) y la colección de herramientas de comparación GENWORKS. Tanto BLAST como FASTA para investigación en línea o fuera de línea (ver Ausubel et al., 1999 *ibid*, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo, es preferente usar en programa GCG Bestfit.

55 Aunque el % final de homología se puede medir en términos de identidad, el proceso de alineamiento en si mismo normalmente no está basado en una comparación de todos o ningún par. En cambio, generalmente se usa una matriz de puntuación de similitud con escala que asigna puntos en cada comparación de pares en base

a similitud química o distancia evolutiva. Un ejemplo de tal matriz comúnmente usada es la matriz BLOSUM62 – la matriz omitida de la colección de programas BLAST. Los programas GCG Wisconsin generalmente usan o bien los valores predeterminados públicos o una tabla de comparación de símbolos a medida si se proporciona (ver el manual del usuario para más detalles). Es preferente usar los valores predeterminados públicos para el paquete GCG, o en el caso de otro software, al matriz omitida BLOSUM62.

Una vez que el software ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el % de homología, preferentemente el % de identidad de la secuencia. Normalmente el software hace esto como parte de la secuencia de comparación y genera un resultado numérico.

Los términos “variante” o “derivativo” en relación con las secuencias de aminoácidos de la presente invención incluyen cualquier sustitución, variación, modificación, reemplazo, delección o adición de uno (o más) aminoácidos de o a la secuencia siempre que la secuencia de aminoácidos resultante tenga una actividad enzimática, preferentemente que tenga al menos la misma actividad enzimática que la secuencia de aminoácidos presentada en SEC ID N° 1.

SEC ID N° 1 se puede modificar para usar en la presente invención. Normalmente, las modificaciones se hacen de modo que mantienen la actividad enzimática de la secuencia. Las sustituciones de aminoácidos se pueden hacer, por ejemplo, de 1, 2 ó 3 a 10 ó 20 sustituciones siempre que la secuencia modificada retenga la actividad enzimática requerida. Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir el uso de analogías que se dan de manera no natural.

SEC ID N° 1 de la presente invención también puede tener delecciones, inserciones o sustituciones de restos de aminoácidos que producen un cambio inapreciable y dan como resultado una enzima funcionalmente equivalente. Las sustituciones deliberadas de aminoácidos se pueden hacer en base a similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia, y/o la naturaleza antipática de los restos siempre que se retenga la actividad enzimática de la enzima HOX. Por ejemplo, aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y aminoácidos con grupos polares sin carga que tienen valores similares de hidrofilia incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

Se pueden hacer sustituciones conservadoras, por ejemplo según la tabla siguiente. Los aminoácidos del mismo bloque en la segunda columna y preferentemente en la misma línea en la tercera columna se pueden sustituir entre ellos:

ALIFÁTICO	NO POLAR	G A P
		I L V
	POLAR SIN CARGA	C S T M
		N Q
	POLAR CARGADO	D E
		K R
AROMÁTICO		H F W Y

VARIANTES/HOMÓLOGOS/DERIVATIVOS (SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS)

Un experto entenderá que numerosas secuencias de aminoácidos diferentes pueden codificar la misma enzima HOX como resultado de la degeneración del código genético. Además, se entiende que los expertos pueden, usando técnicas rutinarias, hacer sustituciones de nucleótidos que no afectan a la enzima HOX codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención para reflejar el uso de codones de cualquier organismo huésped particular en el que se expresa la enzima HOX de la presente invención.

Los términos “variante”, “homólogo” o “derivativo” en relación con las secuencias de nucleótidos presentado en SEC ID N° 1 de la presente invención incluyen cualquier sustitución, variación, modificación, reemplazo, delección o adición de uno (o más) ácidos nucleicos de o a la secuencia siempre que la secuencia de nucleótidos resultante codifique una enzima HOX que tenga una actividad enzimática, preferentemente que tenga al menos la misma actividad enzimática que la secuencia de nucleótidos presentada en SEC ID N° 1 de la secuencia de la lista.

Como se indicó anteriormente, con respecto a la homología de la secuencia, preferentemente hay al menos 75%, más preferentemente al menos 85%, más preferentemente al menos 90% de homología en las secuencias mostradas en la secuencia de la lista de la presente memoria. Más preferentemente hay al menos 95%, al menos más preferentemente 98% de homología. Las comparaciones de homología de nucleótidos se pueden

llevar a cabo como se describió anteriormente. Un programa de comparación de secuencias preferente es el programa GCG Wisconsin Bestfit descrito anteriormente. La matriz de puntuación omitida tiene un valor de coincidencia de 10 para cada nucleótido idéntico y 9 para cada no coincidencia. La penalización de creación del hueco de omisión es -50 y la penalización de cada hueco de omisión de extensión es -3 para cada nucleótido.

- 5 La presente invención también engloba secuencias de nucleótidos que son capaces de hibridar selectivamente a las secuencias presentadas en la presente memoria, o cualquier variante, fragmento, o derivativo, o al complemento de cualquiera de los anteriores. Las secuencias de nucleótidos tienen preferentemente una longitud de 15 nucleótidos, más preferentemente longitud de al menos 20, 30, 40 o 50 nucleótidos.

SUSTRATO

- 10 Preferentemente, el sustrato se selecciona a partir de péptidos, L aminoácidos, e hidratos de carbono/azúcares, incluyendo hexosas, preferentemente glucosa, galactosa, lactosa, 2-desoxiglucosa, piranosa, xilano, celulosa, inulina, almidón, dextrano, pectina y sus mezclas.

- 15 En una realización muy preferente, la combinación enzima/sustrato se selecciona a partir de glucosa/hexosa oxidasa, glucosa/glucosa oxidasa, L aminoácido/L aminoácido oxidasa, galactosa/galactosa oxidasa, lactosa / β -galactoxidasa/hexosa oxidasa, lactosa / β -galactoxidasa/glucosa oxidasa, 2-desoxiglucosa/glucosa oxidasa, piranosa/piranosa oxidasa, y sus mezclas.

- 20 En un aspecto la composición antiincrustacion se genera por la acción de la enzima sobre el sustrato que está presente en la composición. Así el compuesto antiincrustacion se genera mediante un proceso de "una etapa". En algunos casos el sustrato se puede preparar in situ. En estos casos, la composición además comprende una enzima precursora y un sustrato precursor en la que la enzima precursora y el sustrato precursor se seleccionan de modo que la enzima precursora genera el sustrato. En este último aspecto la composición antiincrustacion se genera mediante un proceso de "dos etapas".

En el proceso de una etapa preferentemente la enzima se selecciona a partir de hexosa oxidasa, glucosa oxidasa, L aminoácido oxidasa, galactosa oxidasa, piranosa oxidasa, y sus mezclas.

- 25 En el proceso de una etapa preferentemente el sustrato se selecciona a partir de una hexosa, preferentemente glucosa, L aminoácido, galactosa, 2-desoxiglucosa, piranosa, y sus mezclas.

En el proceso de una etapa preferentemente la combinación enzima/sustrato se selecciona a partir de glucosa/hexosa oxidasa, glucosa/glucosa oxidasa, L aminoácido/L aminoácido oxidasa, galactosa/galactosa oxidasa, 2-desoxiglucosa/glucosa oxidasa, piranosa/piranosa oxidasa, y sus mezclas.

- 30 En el proceso de dos etapas preferentemente la enzima es hexosa oxidasa.

En el proceso de dos etapas preferentemente el sustrato es glucosa.

En el proceso de dos etapas preferentemente la enzima precursora es amiloglucosidasa.

En el proceso de dos etapas preferentemente el sustrato precursor es almidón.

- 35 Así en el proceso de dos etapas preferentemente la combinación sustrato precursor/ enzima precursora/ enzima es almidón/amiloglucosidasa/hexosa oxidasa.

Preferentemente, el sustrato precursor en el proceso de dos etapas se selecciona a partir de oligómeros y polímeros de sustratos para enzimas oxidativas, almidón, lactosa, celulosa, dextrona, péptido, inulina, y sus mezclas.

- 40 La provisión de sustratos precursores son particularmente preferentes porque proporcionan liberación prolongada y/o continua de sustrato por acción de la enzima precursora sobre el sustrato precursor.

El almidón nativo es particularmente preferente como un sustrato precursor. Al almidón nativo proporciona cristales densamente agrupados que se pueden aplicar directamente en un recubrimiento superficial. Además, el almidón nativo es insoluble en agua.

- 45 La celulosa también es particularmente preferente como un sustrato precursor. La celulosa es un componente común en pinturas y el uso de celulosa como un sustrato precursor reduce el número de componentes adicionales que se deben añadir a una composición de pintura.

Preferentemente, la enzima precursora en el proceso de dos etapas se selecciona a partir de enzimas exo-activas capaces de degradar sustratos oligoméricos o poliméricos a unidades monoméricas, por ejemplo β -galactosidasa, peptidasa; amiloglucosidasa, y sus mezclas.

- 50 Opcionalmente, la composición además comprende un ligante para inmovilizar al menos uno de los constituyentes, opcionalmente para inmovilizar las enzimas.

Las composiciones de la presente invención se pueden formular como recubrimientos, lacas, tintes, esmaltes, y similares, de aquí en adelante se referirán genericamente como "recubrimiento(s)".

Así, en un aspecto la presente invención proporciona un recubrimiento que consiste en una composición como se definió anteriormente.

5 Preferentemente, el recubrimiento está formulado para el tratamiento de una superficie seleccionada a partir de madera de exterior, superficie externa de un sistema de calentamiento central, y un casco de un barco marino.

El recubrimiento incluye un vehículo líquido (disolvente) para disolver o suspender la composición.

10 El vehículo líquido se puede seleccionar a partir de cualquier líquido que no interfiere con las actividades de cualquier componente esencial de la composición. En particular, el vehículo líquido no debe interferir con la actividad de las enzimas esenciales y/o componente antiincrustación. Los vehículos líquidos adecuados se describen en la patente de EEUU A-5071479 e incluyen agua y disolventes orgánicos incluyendo hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos, tales como xileno, tolueno, mezclas de hidrocarburos alifáticos y aromáticos que tienen puntos de fusión entre 100 y 320°C, preferentemente entre 150 y 230°C; destilados de petróleo muy aromáticos, por ejemplo disolvente nafta, aceite de alquitrán destilado y sus mezclas; alcoholes tales como butanol, octanol y glicoles; aceites vegetales y minerales; quetonas tales como acetona; fracciones de petróleo tales como licor mineral y queroseno, hidrocarburos clorinados, ésteres de glicol, éteres de éster de glicol, sus derivados y mezclas.

15 El vehículo líquido puede contener al menos un disolvente polar, tal como agua, mezclado con un disolvente orgánico de baja volatilidad aceitoso o similar a aceite, tal que la mezcla de disolventes aromáticos y alifáticos encontrado en alcohol blanco, también llamado comúnmente licor mineral.

20 El vehículo típicamente puede contener al menos uno de un diluyente, un emulsionante, un humectante, un dispersante u otro agente activo de superficie. Ejemplos de emulsionantes adecuados se describen en la patente EEUU A-5071479 e incluyen ésteres de óxido de nonilfenol de etileno, ésteres de polioxietileno de sorbitol o ésteres de ácidos grasos de polioxietileno de sorbitán, sus derivados y mezclas.

25 Se puede incorporar cualquier material de recubrimiento de superficie en la composición y/o recubrimiento de la presente invención. Ejemplos de materiales de recubrimiento reconocidos son resinas de cloruro de polivinilo en un sistema con base de disolvente, gomas cloradas en un sistema con base de disolvente, resinas acrílicas y resinas de metacrilato en sistemas con base de disolvente o acuoso, sistemas cloruro de vinilo-copolímero de acetato de vinilo como dispersiones acuosas o sistemas con base de disolvente, copolímeros de butadieno tales como gomas butadieno-estireno, gomas butadieno-acrilonitrilo, y gomas butadieno-estireno-acrilonitrilo, aceites de secado tales como aceite de lino, resinas alquíd, asfalto, resinas epoxi, resinas de uretano, resinas de poliéster, resinas fenólicas, sus derivados y mezclas.

30 La composición y/o recubrimiento de la presente invención puede contener pigmentos seleccionados a partir de pigmentos inorgánicos tales como dióxido de titanio, óxido férrico, silicio, talco o arcilla de China, pigmentos orgánicos tales como negro de carbón o tintes insolubles en agua de mar, sus derivados y mezclas.

35 La composición y/o recubrimiento de la presente invención puede contener materiales tales como colofonia para proporcionar liberación controlada del compuesto antiincrustación, ya que colofonia es muy ligeramente soluble en agua de mar.

40 La composición y/o recubrimiento de la presente invención puede contener plasticidas, modificadores de las características reológicas, otros ingredientes convencionales y sus mezclas.

45 La composición y/o recubrimiento de la presente invención, particularmente el recubrimiento, además comprende un adyuvante que convencionalmente se usa en composiciones usadas para proteger materiales expuestos a un medio acuático. Estos adyuvantes se pueden seleccionar de fungicidas adicionales, disolventes auxiliares, aditivos de procesamiento tales como desespumantes, fijadores, plastificantes, estabilizantes-UV o mejoradores de estabilidad, tintes solubles en agua o insolubles en agua, pigmentos de color, secantes, inhibidores de incrustación, agentes espesantes o antiprecipitados tales como celulosa de carboximetil, ácido poliacrílico o ácido polimet-acrílico, agentes antioxidantes, sus derivados y mezclas.

El fungicida(s) adicional usado en la composición y/o recubrimiento de la presente invención preferentemente es soluble en el vehículo líquido.

50 En un aspecto la presente invención proporciona un agente antiincrustante marino que consiste en una composición como se definió anteriormente.

Preferentemente, el antiincrustante es autopulible.

55 En un aspecto de la presente invención, el sustrato o sustrato generador y/o la enzima está encapsulado. Preferentemente el sustrato/sustrato generador y/o enzima está encapsulado por una membrana semipermeable.

El sustrato/sustrato generador y enzima pueden estar encapsulados individualmente independientemente entre ellos o pueden estar encapsulados juntos. En la realización anterior, el sustrato/sustrato generador o enzima se pueden activar por el agente antiincrustación. Por ejemplo, el material encapsulado se puede seleccionar de modo que en contacto con un agente antiincrustación, el sustrato/sustrato generador o enzima se pueden liberar al contactar con el otro sustrato/sustrato generador o enzima. De este modo, se puede proporcionar una composición de modo que solo proporcione un compuesto antiincrustación o incremente la provisión de compuesto antiincrustación cuando entra en contacto con un agente antiincrustación.

La composición de la presente invención se puede proporcionar como un producto listo para usar o como un concentrado. El producto listo para usar puede estar en la forma de una disolución acuosa, dispersión acuosa, disolución en aceite, dispersión en aceite, emulsión o una preparación en aerosol. El concentrado se puede usar, por ejemplo, como un aditivo para recubrir, o se puede diluir antes de usar con disolventes adicionales o agentes en suspensión.

Una preparación en aerosol según la invención se puede obtener de una manera usual mediante la incorporación de la composición de la presente invención comprendida, o disuelta o suspendida en un disolvente adecuado, en un líquido volátil adecuado para usar como un propelente, por ejemplo la mezcla de cloruros y fluoruros derivados de metano y etano comercialmente disponibles bajo la marca "Freon", o aire comprimido.

Como se discute en la patente EEUU A-5071479 la composición y/o recubrimiento de la presente invención puede incluir ingredientes adicionales conocidos por ser útiles en conservantes y/o recubrimientos. Tales ingredientes incluyen fijadores tales como carboxi metil celulosa, alcohol polivinilo, parafina, co-disolventes, tales como acetato de etilglicol y acetato de metoxipropilo, plasticidas tales como ésteres de ácido benzoico y ftalatos, por ejemplo, ftalato de dibutilo, ftalato de dioctilo y ftalato de didodecilo, sus derivados y mezclas. Opcionalmente también se puede incluir tintes, pigmentos de color, inhibidores de incrustación, estabilizadores químicos o secantes (secadores) tales como octoato de cobalto y naftenato de cobalto, dependiendo de aplicaciones específicas.

La composición y/o recubrimiento de la presente invención se pueden aplicar mediante cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica incluyendo con brocha, spray, recubrimiento con rodillo, sumergiendo y sus combinaciones.

Las combinaciones de la presente invención se pueden preparar simplemente por mezclado de los diversos ingredientes a una temperatura a la que no se vean afectados adversamente. Las condiciones de preparación no son críticas. El equipamiento y métodos convencionalmente usados en la fabricación de recubrimientos y composiciones similares se pueden emplear ventajosamente.

Ahora se describirá la invención, solo a modo de ejemplo, con los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

El efecto antiincrustación de una composición antiincrustación de la presente invención se prueba según los siguientes ejemplos. Estos ejemplos muestran la eficacia de la presente composición en evitar la incrustación. Los ejemplos también proporcionan la optimización de las propiedades antiincrustación de la presente composición.

La hexosa oxidasa (HOX) usada en cada uno de los presentes ejemplos está disponible de DaniscoCultor. HOX es un producto fermentado a partir de levadura *Hansenula polymorfa* que expresa el gen que codifica la enzima HOX clonada a partir del alga marina *Chondrus crispus*.

Ejemplo 1 – Preparación de una composición antiincrustación ("una etapa")

Hexosa oxidasa soluble o inmovilizada u otro peróxido de hidrógeno que genera enzimas tal como glucosa oxidasa se prueba como un compuesto antiincrustación que genera enzimas en una composición antiincrustación. La hexosa oxidasa se puede inmovilizar por ejemplo por unión a un intercambiador de aniones, Q Sepharose FFTM (disponible de Pharmacia) usando 20 mM de tampón trietanolamina, pH 7,3. Alternativamente, la hexosa oxidasa o peróxido de hidrógeno alternativo que genera enzimas se une por enlace covalente a un vehículo adecuado tal como ShepharosaTM (Pharmacia, Suecia) activado con epoxi, agarosa activada con carbodiimida (Bio-Rad, EEUU). Otros procedimientos tradicionales conocidos en la técnica para inmovilización también se pueden utilizar.

El intervalo de concentraciones usadas en 0,0001 a 1000 U de actividad hexosa oxidasa/peróxido de hidrógeno que genera enzimas por ml de composición antiincrustación. Una unidad de actividad de enzima se define como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de H_2O_2 por minuto a 25°C.

Para establecer la adecuación para usar en la presente invención la actividad de la enzima se puede analizar como sigue. La actividad de hexosa oxidasa (HOX) se mide según el siguiente procedimiento.

El análisis HOX se basa en la medición de peróxido de hidrógeno generado en la oxidación de glucosa.

ES 2 391 298 T3

El peróxido de hidrógeno oxida o-dianisidina en presencia de peroxidasa para formar un colorante.

HOX



POD



Reactivos

1. 100 mM tampón fosfato, pH 6,3
2. 100 mM D-glucosa (SIGMA, G-8270) en 100 mM de tampón fosfato, pH 6,3
3. o-Dianisidina (SIGMA, D-3252), 3,0 mg/ml en agua destilada
- 10 4. Peroxidasa (SIGMA, P-8125), 0,10 mg/ml en 100 mM de tampón fosfato, pH 6,3

Análisis

- 120 μl reactivo 1
150 μl reactivo 2
10 μl reactivo 3
15 10 μl reactivo 4 y
10 μl disolución de enzima

El análisis se lleva a cabo en una placa de microtitulación. La reacción se inicia por la adición de disolución enzimática. La mezcla se incuba a 25°C durante 15 minutos agitando. La prueba en blanco contiene todos los componentes con agua en vez de disolución enzimática. La formación del colorante se mide en una placa de microtitulación leída a 405 nm. La linealidad de la reacción se puede comprobar usando un programa cinético sobre el lector de microplaca.

20 Se puede construir una curva estándar de peróxido de hidrógeno usando diversas concentraciones de H₂O₂ (MERCK).

Ejemplo 2 – Preparación de una composición antiincrustación (“dos etapas”)

25 Se analiza glucosa y galactosa en concentraciones de 0,01 a 100 μg por ml de composición antiincrustación como sustratos para generar un sustrato para hexosa oxidasa en los sistemas descritos en el ejemplo 1. Para proporcionar un sistema que genera un sustrato continuo se usa almidón, preferentemente gránulos de almidón intacto de trigo, maíz o patata, en una concentración de 0,01 ng a 100 μm por ml de composición antiincrustación, junto con amiloglucosidasa (GRINDAMYL™ AG 1500 Bakery Enzyme de DaniscoCultor u otro producto comercial de amiloglucosidasa). Los componentes están presentes en concentraciones que proporcionan de 0,000001 a 10 AGU por ml de composición antiincrustación.

30 1 AGU se define como la actividad de amiloglucosidasa que libera 1 μmol de glucosa por minuto a partir de maltosa (0,5% p/v) en 50 mM de acetato de sodio, pH 5,0 (ajustado con ácido acético concentrado) a 40°C. el análisis se para por la transferencia de 200 μl de mezcla de ensayo a 100 μl de 0,1 M de ácido clorhídrico hidrociónico y la cantidad de glucosa liberada se mide usando reactivo glucosa dehidrogenasa (Merck nº 12193) u otro sistema de detección de glucosa.

35 Ejemplo 3 – Generación de peróxido de hidrógeno mediante pintura que contiene HOX

Se llevó a cabo el siguiente experimento para analizar la capacidad de hexosa oxidasa (HOX) de generar peróxido de hidrógeno.

40 A 11,0 g de pintura (pintura de pared con base de agua Sadolin Glans 7 y con base de aceite Histor 9010, respectivamente) se añadió 2,0, 0,5 y 1 g, respectivamente, de HOX (DaniscoCultor producto fermentado de *Hansenula polymorpha*) secada por spray sobre almidón (10 U/g). A la pintura con base de agua también se añadió 5 g de agua por tratamiento.

45 Pipetas plásticas de transferencia desechables (Sarstedt) se sumergieron (la parte de la cabeza) en la pintura. Las pipetas de transferencia se dejaron secar al aire durante 3 horas.

Después se midió la actividad de hexosa oxidasa (HOX) mediante inmersión de la cabeza de la pipeta cubierta con pintura en un tubo de vidrio con 2 ml de reactivo de ensayo HOX, ver a continuación, la única actividad de HOX viene de HOX en la pintura.

Los tubos se incubaron a temperatura ambiente.

5 Como blanco se usó pintura sin adición de HOX.

10 El resultado del experimento se muestra en la tabla 1. HOX esta distribuida homogéneamente en la pintura, ya que la totalidad de la superficie de la pintura inmediatamente se puso roja cuando tomó contacto con el reactivo de ensayo HOX. El color desarrollado se observa inmediatamente indicando que la pintura no tiene ningún efecto inhibitor sobre la actividad HOX. El experimento prueba que HOX es capaz de generar peróxido de hidrógeno a partir de sustrato exógeno añadido (aquí glucosa) incluso cuando se inmoviliza en una matriz de pintura tras el secado.

Tabla 1

	Actividad
Pintura con base de agua, blanco	0
0,2 g HOX	+
0,5 g HOX	++
1,0 g HOX	+++
Pintura con base de aceite, blanco	0
0,2 g HOX	+
0,5 g HOX	++
1,0 g HOX	+++
Control, análisis del reactivo más HOX libre	+++

El intervalo de concentraciones usado es 0,0001 a 1000 U de actividad hexosa oxidasa o una enzima alternativa que genera peróxido de hidrógeno por ml de composición antiincrustacion.

15 Ejemplo 4 – Sistema modelo para recubrimiento

Se usa un tubo de diálisis que contiene una composición antiincrustacion como un sistema modelo para un recubrimiento para evitar incrustacion sobre la superficie de un material cubierto.

Una composición antiincrustacion en el tubo de diálisis se usa para generar una concentración de peróxido de hidrógeno sobre la superficie del tubo de diálisis eficaz para crear antiincrustacion.

20 El tubo de diálisis usado tiene un valor de corte de 10.000 Da. El tubo de diálisis es o bien un tubo de diálisis o una caja de diálisis (tal como Slide-A-Lyzer™ disponible de Pierce; IL, EEUU).

25 El tubo de diálisis está inmerso en un matraz de vidrio con 1 a 5 litros de agua de mar o de lago recogida como se indicó anteriormente. El matraz de vidrio se agita lentamente con un agitador magnético y se incuba a temperatura ambiente cerca de una ventana para permitir que la luz del día penetre. Se monitoriza visualmente la incrustacion sobre el tubo de diálisis durante hasta 4 semanas basándose en la aparición de una capa de crecimiento microbiano sobre el tubo de diálisis y se valora sobre una escala de 1 a 5 como se describió anteriormente. Como control negativo se usó un tubo de diálisis que contenía agua de grifo.

30 Opcionalmente, la catalasa inmovilizada en piezas de membrana de nitrocelulosa, que posteriormente se han bloqueado con 0,1% Tween 20, se añaden al agua de lago o de mar para evitar la acumulación de peróxido de hidrógeno en el agua que rodea el tubo de diálisis. La concentración de catalasa usada está en el intervalo de 0,000001 a 100 CU, donde 1 CU se define como la actividad de catalasa que degrada 1 µmol de peróxido de hidrógeno por minuto a 30°C en 50 mM de tampón de fosfato de sodio, pH 7,0, como se describió para catalasa en el catálogo Sigma: Biochemicals Organic Compounds for Research and Diagnostic Reagents, Sigma Chemical Company 1995, página 221.

35 Las composiciones de la presente invención son eficaces en evitar incrustacion.

Ejemplo 5 – Estabilidad de HOX en pintura.

Las cabezas pintadas de las pipetas de transferencia descritas en el ejemplo 1 se mantuvieron a temperatura ambiente durante 2 meses y después se “analizaron” en la mezcla de reactivos como se describió en el ejemplo 2.

Tabla 2

	Actividad
Pintura con base de agua, blanco	0
0,2 g HOX	+
0,5 g HOX	++
1,0 g HOX	No determinado
Pintura con base de aceite, blanco	0
0,2 g HOX	+++
0,5 g HOX	+++
1,0 g HOX	+++
Control, análisis del reactivo más HOX libre	No determinado

A partir de los resultados de la tabla 2 queda claro que HOX fue estable durante dos meses a temperatura ambiente en una matriz de pintura seca.

Ejemplo 6 – Prueba de recubrimiento.

5 Establecimiento de un sistema de prueba para una composición antiincrustacion.

Se recogieron muestras de 0,5 a 5 ml de agua de lago o de mar en tubos de ensayo del lago Brabrandssøen cerca de Aarhus, Dinamarca, y del mar Báltico en Aarhus. El día de la toma de las muestras de agua la composición antiincrustacion que se probaba se añadió a los tubos de ensayo y se sellaron con Parafilm™.

10 Los tubos de ensayo se incubaron a temperatura ambiente cerca de una ventana para permitir que la luz del día penetrara. Se monitoriza visualmente la incrustacion durante hasta 4 semanas basándose en la aparición de una capa de crecimiento microbiano sobre las paredes del tubo de ensayo. Para comparar se usaron como controles positivo y negativo un tubo de ensayo con 0,1% de azida de sodio y un tubo de ensayo sin composición antiincrustacion, respectivamente.

15 Estos tubos de ensayo se valoraron de 1 a 5, respectivamente, sobre una escala de 1 a 5 de actividad antiincrustacion altamente eficaz a sin actividad, respectivamente.

Se usa material comercial de recubrimiento antiincrustacion marino sin la adición de biocida antiincrustacion. Las composiciones antiincrustacion según la presente invención se mezclan con el material de recubrimiento y se aplican a la superficie de placas de metal, vidrio y plástico según las instrucciones del fabricante del material de recubrimiento.

20 Las placas recubiertas se sumergen en agua en un lago o en agua de mar. La incrustacion sobre las placas se monitoriza visualmente durante hasta 2 años basándose en la aparición de una capa de crecimiento microbiano sobre las placas y valorando sobre una escala de 1 a 5 como se describió anteriormente. Como control negativo se usó un recubrimiento sin composición antiincrustacion.

Las composiciones de la presente invención son eficaces en prevenir incrustacion.

25 Ejemplo 7 – Estabilidad de la composición antiincrustacion en agua de acuario.

A 10,0 g de pintura (con base de aceite Histor 9010) se añadieron 500 mg de almidón (Merck 1253), 50 mg de HOX (producto fermentado DanisCultor a partir de *Hansenula polymorpha*) secada por spray sobre almidón (10 U/g).

30 Se sumergió (la parte de la cabeza) una pipeta plástica de transferencia desechables (Sarstedt) en la pintura. Las pipetas de transferencia se dejaron secar al aire durante 24 horas. Después se mantuvo en 250 ml de agua de un acuario en una botella Kautex durante dos meses. La botella se dejó en una ventana a luz del día. Después de dos meses se lavó la cabeza de la pipeta, se secó con aire y después se “ensayó” en mezcla completa de reactivo HOX. La HOX aún mostraba actividad completa.

Ejemplo 8 – Prueba del concepto de sustrato generador.

35 Para proporcionar un almidón de sistema continuo de sustrato generador, preferentemente gránulos intactos de almidón de trigo, maíz o patata en una concentración de 0,01 ng a 100 mg por ml de composición antiincrustacion, así como amiloglucosidasa (AMG) (GRINDAMYL™ AG 10000 Bakery Enzyme de

ES 2 391 298 T3

DaniscoCultor u otro producto de amiloglucosidasa comercial) en concentraciones que proporcionan de 0,000001 a 100 AGU por ml de composición antiincrustacion se usan junto con HOX.

5 A 10,0 g de pintura (con base de aceite Histor 9010) se añadieron 500 mg de almidón (Merck), HOX (producto fermentado DanisCultor a partir de *Hansenula polymorpha*) secada por spray sobre almidón (10 U/g) y AMG (10.000 AGU/g) como se indicó en la tabla. Se sumergió (la parte de la cabeza) una pipeta plástica de transferencia desechables (Sarstedt) en la pintura. Las pipetas de transferencia se dejaron secar al aire durante 3 horas.

10 Después se midió la actividad de hexosa oxidasa (HOX) mediante inmersión de la cabeza de la pipeta cubierta de pintura en un tubo de vidrio con 2 ml de reactivo de ensayo HOX sin glucosa, ver el ejemplo 1 para el reactivo de ensayo, la única actividad de HOX venía de HOX en la pintura y el único sustrato para HOX generado por AMG en la pintura mediante hidrólisis de almidón a glucosa en la pintura.

Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 48 horas.

Como blanco se usó pintura sin HOX ni AMG añadido.

Tabla 3

	Actividad
50 mg HOX + 10 mg AMG	+
50 mg HOX + 20 mg AMG	+
50 mg HOX	-
Blanco (sin enzimas)	-

15 Los resultados que se dan en la tabla 3 muestran que la combinación de HOX y AMG funciona como se pretende. AMG es generador de glucosa a partir de almidón inmovilizado en la pintura y HOX es generador de peróxido de hidrógeno a partir de la glucosa generada.

Ejemplo 9 – Temperatura de actividad.

20 Se evaluó hexosa oxidasa (HOX purificada) en relación con la actividad como una función de la temperatura y comparado con una glucosa oxidasa comercial (Amano 081443/00018).

Procedimiento:

Muestra: la muestra de enzima se disolvió en agua y se desaló sobre una columna PD10 usando 20 mM de tampón fosfato pH 6,3 y se diluyó a 0,4 U/ml.

Se añade a una placa Elisa:

25 150 µl 100 mM glucosa en 100 mM tampón fosfato, pH 6,3

120 µl 100 mM tampón fosfato, pH 6,3

10 µl 0-dianisidina (3 mg/ml en agua)

10 µl peroxidada (0,10 mg/ml en 100 mM tampón fosfato, pH 6,3)

10 µl muestra

30 Se ensayó 10 minutos a 30°C y se midió a 405 nm.

Resultados

Los resultados de la medición de actividad como una función de la temperatura se muestran en la tabla 4 y en la figura 1.

Tabla 4

Temperatura	Hexosa oxidasa	Glucosa oxidasa comercial
°C	Actividad relativa, %	Actividad relativa, %
10	70	67
25	98	67
27,5	100	72
32,5	98	78
37,5	94	78
42	83	85
45	81	100
50	59	94

Los resultados de actividad frente a temperatura ilustran claramente una diferencia en el perfil de actividad.

- 5 La hexosa oxidasa tiene su temperatura óptima entre 25-35°C, que casi es coincidente con la temperatura de incrustación máxima. Por el contrario parece que GOX tiene una temperatura óptima a 50°C que está muy por encima de las temperaturas que se pueden alcanzar en el mar.

ES 2 391 298 T3

SEC ID N° 1

Nombre de la molécula: hoxpic

1644 bbs ADN linear

Secuencia impresa: 1-1644 (completa)

Fecha de impresión 04 junio 1999

Descripción:

```

1  ATG GCT ACT TTG CCA CAA AAG GAC CCA GGT TAC ATT GTT ATT
   M  A  T  L  P  Q  K  D  P  G  Y  I  V  I
43  GAC GTC AAC GCT GGT ACT CCA GAC AAG CCT GAC CCA AGA TTG
   D  V  N  A  G  T  P  D  K  P  D  P  R  L
85  CCA TCC ATG AAG CAA GGT TTC AAC AGA AGA TGG ATT GGT ACC
   P  S  M  K  Q  G  F  N  R  R  W  I  G  T
127 AAC ATC GAT TTC GTT TAC GTC GTT TAC ACT CCA CAA GGT GCT
   N  I  D  F  V  Y  V  V  Y  T  P  Q  G  A
169 TGT ACT GCT TTG GAC AGA GCT ATG GAA AAG TGT TCT CCA GGT
   C  T  A  L  D  R  A  M  E  K  C  S  P  G
211 ACC GTC AGA ATC GTT TCT GGT GGT CAC TGT TAC GAA GAC TTC
   T  V  R  I  V  S  G  G  H  C  Y  E  D  F
253 GTT TTC GAC GAA TGT GTC AAG GCT ATT ATC AAC GTT ACT GGT
   V  F  D  E  C  V  K  A  I  I  N  V  T  G
295 TTG GTT GAA TCT GGT TAC GAC GAC GAT AGA GGT TAC TTC GTC
   L  V  E  S  G  Y  D  D  D  R  G  Y  F  V
337 TCT TCC GGT GAC ACC AAC TGG GGT TCC TTC AAG ACC TTG TTC
   S  S  G  D  T  N  W  G  S  F  K  T  L  F
379 AGA GAC CAC GGT AGA GTT TTG CCA GGT GGT TCC TGT TAC TCC
   R  D  H  G  R  V  L  P  G  G  S  C  Y  S
421 GTC GGT TTG GGT GGT CAC ATT GTC GGT GGA GGT GAC GGT ATT
   V  G  L  G  G  H  I  V  G  G  G  D  G  I
463 TTG GCC AGA TTG CAC GGT TTG CCA GTC GAT TGG TTA TCC GGT
   L  A  R  L  H  G  L  P  V  D  W  L  S  G
505 GTT GAA GTT GTC GTT AAG CCA GTC TTG ACC GAA GAC TCT GTT
   V  E  V  V  V  K  P  V  L  T  E  D  S  V
547 CTT AAG TAC GTT CAC AAG GAT TCC GAA GGT AAC GAC GGT GAG
   L  K  Y  V  H  K  D  S  E  G  N  D  G  E
589 TTG TTT TGG GCT CAC ACT GGT GGA GGT GGA GGT AAC TTC GGT
   L  F  W  A  H  T  G  G  G  G  G  N  F  G
631 ATT ATC ACC AAA TAC TAC TTC AAG GAT TTG CCA ATG TCT CCA
   I  I  T  K  Y  Y  F  K  D  L  P  M  S  P
673 AGA GGT GTC ATC GCT TCT AAC TTA CAC TTC TCT TGG GAC GGT
   R  G  V  I  A  S  N  L  H  F  S  W  D  G
715 TTC ACT AGA GAT GCC TTG CAA GAT TTG TTG ACT AAG TAC TTC
   F  T  R  D  A  L  Q  D  L  L  T  K  Y  F
757 AAG TTG GCT AGA TGT GAT TGG AAG AAT ACT GTT GGT AAG TTC
   K  L  A  R  C  D  W  K  N  T  V  G  K  F

```

799 CAA ATC TTC CAC CAA GCA GCT GAA GAG TTT GTT ATG TAC TTG
 Q I F H Q A A E E F V M Y L

841 TAT ACA TCC TAC TCT AAC GAC GCC GAG AGA GAA GTT GCC CAA
 Y T S Y S N D A E R E V A Q

883 GAC AGA CAC TAT CAT TTG GAG GCT GAC ATT GAA CAG ATC TAC
 D R H Y H L E A D I E Q I Y

925 AAA ACA TGC GAG CCT ACC AAA GCT CTT GGT GGT CAT GCT GGT
 K T C E P T K A L G G H A G

967 TGG GCT CCT TTC CCT GTT AGA CCT AGA AAG AGA CAC ACA TCC
 W A P F P V R P R K R H T S

1009 AAG ACT TCT TAT ATG CAT GAC GAG ACT ATG GAC TAC CCT TTC
 K T S Y M H D E T M D Y P F

1051 TAC GCT TTG ACT GAG ACT ATC AAC GGT TCC GGT CCT AAT CAG
 Y A L T E T I N G S G P N Q

1093 AGA GGT AAG TAC AAG TCT GCT TAC ATG ATC AAG GAC TTT CCA
 R G K Y K S A Y M I K D F P

1135 GAC TTC CAG ATT GAT GTT ATC TGG AAA TAC CTT ACT GAG GTT
 D F Q I D V I W K Y L T E V

1177 CCT GAC GGT TTG ACT AGT GCC GAA ATG AAG GAT GCT CTT CTT
 P D G L T S A E M K D A L L

1219 CAG GTT GAT ATG TTC GGT GGT GAG ATT CAC AAG GTT GTT TGG
 Q V D M F G G E I H K V V W

1261 GAT GCT ACT GCA GTT GCT CAG AGA GAG TAC ATC ATC AAA CTG
 D A T A V A Q R E Y I I K L

1303 CAG TAC CAG ACA TAC TGG CAG GAA GAA GAC AAG GAT GCA GTT
 Q Y Q T Y W Q E E D K D A V

1345 AAC TTG AAG TGG ATT AGA GAC TTT TAC GAG GAG ATG TAT GAG
 N L K W I R D F Y E E M Y E

1387 CCT TAT GGT GGT GTT CCA GAC CCT AAC ACT CAG GTT GAG AGT
 P Y G G V P D P N T Q V E S

1429 GGT AAA GGT GTT TTT GAG GGA TGC TAC TTC AAC TAC CCT GAT
 G K G V F E G C Y F N Y P D

1471 GTT GAC TTG AAC AAC TGG AAG AAC GGT AAG TAT GGT GCC TTG
 V D L N N W K N G K Y G A L

1513 GAA CTT TAC TTT TTG GGT AAC CTG AAC AGA TTG ATC AAG GCC
 E L Y F L G N L N R L I K A

1555 AAA TGG TTG TGG GAT CCT AAC GAG ATC TTC ACA AAC AAA CAG
 K W L W D P N E I F T N K Q

1597 TCT ATC CCT ACT AAA CCT CTT AAG GAG CCT AAG CAG ACT AAA
 S I P T K P L K E P K Q T K

1639 TAG TAG
 - -

LISTA DE SECUENCIAS

[0135]

<110> Danisco A/S

<120> Composición

ES 2 391 298 T3

<130> P006441EPA
 <140> 07001141,6
 <141> 02-06-200
 <150> GB 9913050,2
 5 <151>04-06-1999
 <160> 2
 <170> versión de patente 3.4
 <210> 1
 <211> 1644
 10 <212> ADN
 <213> Chondrus crispus
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1964)
 15 <400> 1

atg gct act ttg cca caa aag gac cca ggt tac att gtt att gac gtc	48
Met Ala Thr Leu Pro Gln Lys Asp Pro Gly Tyr Ile Val Ile Asp Val	
1 5 10 15	
aac gct ggt act cca gac aag cct gac cca aga ttg cca tcc atg aag	96
Asn Ala Gly Thr Pro Asp Lys Pro Asp Pro Arg Leu Pro Ser Met Lys	
20 25 30	
caa ggt ttc aac aga aga tgg att ggt acc aac atc gat ttc gtt tac	144
Gln Gly Phe Asn Arg Arg Trp Ile Gly Thr Asn Ile Asp Phe Val Tyr	
35 40 45	
gtc gtt tac act cca caa ggt gct tgt act gct ttg gac aga gct atg	192
Val Val Tyr Thr Pro Gln Gly Ala Cys Thr Ala Leu Asp Arg Ala Met	
50 55 60	
gaa aag tgt tct cca ggt acc gtc aga atc gtt tct ggt ggt cac tgt	240
Glu Lys Cys Ser Pro Gly Thr Val Arg Ile Val Ser Gly Gly His Cys	
65 70 75 80	
tac gaa gac ttc gtt ttc gac gaa tgt gtc aag gct att atc aac gtt	288
Tyr Glu Asp Phe Val Phe Asp Glu Cys Val Lys Ala Ile Ile Asn Val	
85 90 95	
act ggt ttg gtt gaa tct ggt tac gac gac gat aga ggt tac ttc gtc	336
Thr Gly Leu Val Glu Ser Gly Tyr Asp Asp Asp Arg Gly Tyr Phe Val	
100 105 110	
tct tcc ggt gac acc aac tgg ggt tcc ttc aag acc ttg ttc aga gac	384
Ser Ser Gly Asp Thr Asn Trp Gly Ser Phe Lys Thr Leu Phe Arg Asp	
115 120 125	
cac ggt aga gtt ttg cca ggt ggt tcc tgt tac tcc gtc ggt ttg ggt	432
His Gly Arg Val Leu Pro Gly Gly Ser Cys Tyr Ser Val Gly Leu Gly	
130 135 140	

ES 2 391 298 T3

ggt cac att gtc ggt gga ggt gac ggt att ttg gcc aga ttg cac ggt Gly His Ile Val Gly Gly Gly Asp Gly Ile Leu Ala Arg Leu His Gly 145 150 155 160	480
ttg cca gtc gat tgg tta tcc ggt gtt gaa gtt gtc gtt aag cca gtc Leu Pro Val Asp Trp Leu Ser Gly Val Glu Val Val Val Lys Pro Val 165 170 175	528
ttg acc gaa gac tct gtt ctt aag tac gtt cac aag gat tcc gaa ggt Leu Thr Glu Asp Ser Val Leu Lys Tyr Val His Lys Asp Ser Glu Gly 180 185 190	576
aac gac ggt gag ttg ttt tgg gct cac act ggt gga ggt gga ggt aac Asn Asp Gly Glu Leu Phe Trp Ala His Thr Gly Gly Gly Gly Gly Asn 195 200 205	624
ttc ggt att atc acc aaa tac tac ttc aag gat ttg cca atg tct cca Phe Gly Ile Ile Thr Lys Tyr Tyr Phe Lys Asp Leu Pro Met Ser Pro 210 215 220	672
aga ggt gtc atc gct tct aac tta cac ttc tct tgg gac ggt ttc act Arg Gly Val Ile Ala Ser Asn Leu His Phe Ser Trp Asp Gly Phe Thr 225 230 235 240	720
aga gat gcc ttg caa gat ttg ttg act aag tac ttc aag ttg gct aga Arg Asp Ala Leu Gln Asp Leu Leu Thr Lys Tyr Phe Lys Leu Ala Arg 245 250 255	768
tgt gat tgg aag aat act gtt ggt aag ttc caa atc ttc cac caa gca Cys Asp Trp Lys Asn Thr Val Gly Lys Phe Gln Ile Phe His Gln Ala 260 265 270	816
gct gaa gag ttt gtt atg tac ttg tat aca tcc tac tct aac gac gcc Ala Glu Glu Phe Val Met Tyr Leu Tyr Thr Ser Tyr Ser Asn Asp Ala 275 280 285	864
gag aga gaa gtt gcc caa gac aga cac tat cat ttg gag gct gac att Glu Arg Glu Val Ala Gln Asp Arg His Tyr His Leu Glu Ala Asp Ile 290 295 300	912
gaa cag atc tac aaa aca tgc gag cct acc aaa gct ctt ggt ggt cat Glu Gln Ile Tyr Lys Thr Cys Glu Pro Thr Lys Ala Leu Gly Gly His 305 310 315 320	960
gct ggt tgg gct cct ttc cct gtt aga cct aga aag aga cac aca tcc Ala Gly Trp Ala Pro Phe Pro Val Arg Pro Arg Lys Arg His Thr Ser 325 330 335	1008
aag act tct tat atg cat gac gag act atg gac tac cct ttc tac gct Lys Thr Ser Tyr Met His Asp Glu Thr Met Asp Tyr Pro Phe Tyr Ala 340 345 350	1056
ttg act gag act atc aac ggt tcc ggt cct aat cag aga ggt aag tac Leu Thr Glu Thr Ile Asn Gly Ser Gly Pro Asn Gln Arg Gly Lys Tyr 355 360 365	1104
aag tct gct tac atg atc aag gac ttt cca gac ttc cag att gat gtt Lys Ser Ala Tyr Met Ile Lys Asp Phe Pro Asp Phe Gln Ile Asp Val 370 375 380	1152
atc tgg aaa tac ctt act gag gtt cct gac ggt ttg act agt gcc gaa Ile Trp Lys Tyr Leu Thr Glu Val Pro Asp Gly Leu Thr Ser Ala Glu 385 390 395 400	1200

ES 2 391 298 T3

atg aag gat gct ctt ctt cag gtt gat atg ttc ggt ggt gag att cac	1248
Met Lys Asp Ala Leu Leu Gln Val Asp Met Phe Gly Gly Glu Ile His	
405 410 415	
aag gtt gtt tgg gat gct act gca gtt gct cag aga gag tac atc atc	1296
Lys Val Val Trp Asp Ala Thr Ala Val Ala Gln Arg Glu Tyr Ile Ile	
420 425 430	
aaa ctg cag tac cag aca tac tgg cag gaa gaa gac aag gat gca gtt	1344
Lys Leu Gln Tyr Gln Thr Tyr Trp Gln Glu Glu Asp Lys Asp Ala Val	
435 440 445	
aac ttg aag tgg att aga gac ttt tac gag gag atg tat gag cct tat	1392
Asn Leu Lys Trp Ile Arg Asp Phe Tyr Glu Glu Met Tyr Glu Pro Tyr	
450 455 460	
ggt ggt gtt cca gac cct aac act cag gtt gag agt ggt aaa ggt gtt	1440
Gly Gly Val Pro Asp Pro Asn Thr Gln Val Glu Ser Gly Lys Gly Val	
465 470 475 480	
ttt gag gga tgc tac ttc aac tac cct gat gtt gac ttg aac aac tgg	1488
Phe Glu Gly Cys Tyr Phe Asn Tyr Pro Asp Val Asp Leu Asn Asn Trp	
485 490 495	
aag aac ggt aag tat ggt gcc ttg gaa ctt tac ttt ttg ggt aac ctg	1536
Lys Asn Gly Lys Tyr Gly Ala Leu Glu Leu Tyr Phe Leu Gly Asn Leu	
500 505 510	
aac aga ttg atc aag gcc aaa tgg ttg tgg gat cct aac gag atc ttc	1584
Asn Arg Leu Ile Lys Ala Lys Trp Leu Trp Asp Pro Asn Glu Ile Phe	
515 520 525	
aca aac aaa cag tct atc cct act aaa cct ctt aag gag cct aag cag	1632
Thr Asn Lys Gln Ser Ile Pro Thr Lys Pro Leu Lys Glu Pro Lys Gln	
530 535 540	
act aaa tag tag	1644
Thr Lys	
545	

<210> 2

<211> 546

<212> PRT

5 <213> *Chondrus crispus*

<400> 2

ES 2 391 298 T3

Met Ala Thr Leu Pro Gln Lys Asp Pro Gly Tyr Ile Val Ile Asp Val
1 5 10 15

Asn Ala Gly Thr Pro Asp Lys Pro Asp Pro Arg Leu Pro Ser Met Lys
20 25 30

Gln Gly Phe Asn Arg Arg Trp Ile Gly Thr Asn Ile Asp Phe Val Tyr
35 40 45

Val Val Tyr Thr Pro Gln Gly Ala Cys Thr Ala Leu Asp Arg Ala Met
50 55 60

ES 2 391 298 T3

Glu Lys Cys Ser Pro Gly Thr Val Arg Ile Val Ser Gly Gly His Cys
 65 70 75 80
 Tyr Glu Asp Phe Val Phe Asp Glu Cys Val Lys Ala Ile Ile Asn Val
 85 90 95
 Thr Gly Leu Val Glu Ser Gly Tyr Asp Asp Asp Arg Gly Tyr Phe Val
 100 105 110
 Ser Ser Gly Asp Thr Asn Trp Gly Ser Phe Lys Thr Leu Phe Arg Asp
 115 120 125
 His Gly Arg Val Leu Pro Gly Gly Ser Cys Tyr Ser Val Gly Leu Gly
 130 135 140
 Gly His Ile Val Gly Gly Gly Asp Gly Ile Leu Ala Arg Leu His Gly
 145 150 155 160
 Leu Pro Val Asp Trp Leu Ser Gly Val Glu Val Val Val Lys Pro Val
 165 170 175
 Leu Thr Glu Asp Ser Val Leu Lys Tyr Val His Lys Asp Ser Glu Gly
 180 185 190
 Asn Asp Gly Glu Leu Phe Trp Ala His Thr Gly Gly Gly Gly Gly Asn
 195 200 205
 Phe Gly Ile Ile Thr Lys Tyr Tyr Phe Lys Asp Leu Pro Met Ser Pro
 210 215 220
 Arg Gly Val Ile Ala Ser Asn Leu His Phe Ser Trp Asp Gly Phe Thr
 225 230 235 240
 Arg Asp Ala Leu Gln Asp Leu Leu Thr Lys Tyr Phe Lys Leu Ala Arg
 245 250 255
 Cys Asp Trp Lys Asn Thr Val Gly Lys Phe Gln Ile Phe His Gln Ala
 260 265 270
 Ala Glu Glu Phe Val Met Tyr Leu Tyr Thr Ser Tyr Ser Asn Asp Ala
 275 280 285
 Glu Arg Glu Val Ala Gln Asp Arg His Tyr His Leu Glu Ala Asp Ile
 290 295 300
 Glu Gln Ile Tyr Lys Thr Cys Glu Pro Thr Lys Ala Leu Gly Gly His
 305 310 315 320

Ala Gly Trp Ala Pro Phe Pro Val Arg Pro Arg Lys Arg His Thr Ser
 325 330 335

Lys Thr Ser Tyr Met His Asp Glu Thr Met Asp Tyr Pro Phe Tyr Ala
 340 345 350

Leu Thr Glu Thr Ile Asn Gly Ser Gly Pro Asn Gln Arg Gly Lys Tyr
 355 360 365

Lys Ser Ala Tyr Met Ile Lys Asp Phe Pro Asp Phe Gln Ile Asp Val
 370 375 380

Ile Trp Lys Tyr Leu Thr Glu Val Pro Asp Gly Leu Thr Ser Ala Glu
 385 390 395 400

Met Lys Asp Ala Leu Leu Gln Val Asp Met Phe Gly Gly Glu Ile His
 405 410 415

Lys Val Val Trp Asp Ala Thr Ala Val Ala Gln Arg Glu Tyr Ile Ile
 420 425 430

Lys Leu Gln Tyr Gln Thr Tyr Trp Gln Glu Glu Asp Lys Asp Ala Val
 435 440 445

Asn Leu Lys Trp Ile Arg Asp Phe Tyr Glu Glu Met Tyr Glu Pro Tyr
 450 455 460

Gly Gly Val Pro Asp Pro Asn Thr Gln Val Glu Ser Gly Lys Gly Val
 465 470 475 480

Phe Glu Gly Cys Tyr Phe Asn Tyr Pro Asp Val Asp Leu Asn Asn Trp
 485 490 495

Lys Asn Gly Lys Tyr Gly Ala Leu Glu Leu Tyr Phe Leu Gly Asn Leu
 500 505 510

Asn Arg Leu Ile Lys Ala Lys Trp Leu Trp Asp Pro Asn Glu Ile Phe
 515 520 525

Thr Asn Lys Gln Ser Ile Pro Thr Lys Pro Leu Lys Glu Pro Lys Gln
 530 535 540

Thr Lys
 545

REIVINDICACIONES

1. Una composición antiincrustación que comprende
 - (i) un material de recubrimiento de superficie
 - (ii) una primera enzima y un primer sustrato, en el que dicho sustrato es un oligómero o un polímero de un segundo sustrato, siendo dicho segundo sustrato un sustrato para una enzima oxidativa, y en donde dicha primera enzima es capaz de generar dicho segundo sustrato a partir de dicho primer sustrato; y
 - (iii) una segunda enzima, en donde dicha segunda enzima es una oxidasa; y en donde dicha segunda enzima genera una composición antiincrustación cuando actúa sobre dicho segundo sustrato.
2. Una composición según la reivindicación 1 en donde la segunda enzima se selecciona de glucosa oxidasa, L aminoácido oxidasa, D amino oxidasa, galactosa oxidasa, hexosa oxidasa, piranosa oxidasa, malato oxidasa, colesterol oxidasa, arilalcohol oxidasa, alcohol oxidasa, latosterol oxidasa, aspartato oxidasa, amino oxidasa, D glutamato oxidasa, etanolamina oxidasa, NADH oxidasa, urato oxidasa (uricasa) y sus mezclas.
3. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la enzima es hexosa oxidasa.
4. Una composición según la reivindicación 3, en donde la hexosa oxidasa se obtiene por clonación y expresión en organismos huésped recombinantes de un gen que codifica la proteína.
5. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el segundo sustrato es un azúcar.
6. Una composición según la reivindicación 4 en donde el azúcar es glucosa.
7. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la primera enzima es amiloglicosidasa.
8. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el primer sustrato se selecciona de almidón, lactosa, celulosa, dextrosa, péptido, inulina, y sus mezclas.
9. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el primer sustrato es almidón.
10. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la composición además comprende un ligante para inmovilizar al menos uno de los constituyentes de la composición, preferentemente para inmovilizar la enzima.
11. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la composición se formula como un recubrimiento, una laca, un tinte o un esmalte.
12. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la composición además comprende un material de recubrimiento de superficie seleccionado de resinas de cloruro de polivinilo en un sistema con base de disolvente, cauchos clorados en un sistema con base de disolvente, resinas acrílicas y resinas de metacrilato en sistemas con base de disolvente o acuoso, sistemas copolímeros de cloruro de vinilo- acetato de vinilo como dispersiones acuosas o sistemas con base de disolvente, copolímeros de butadieno, cauchos butadieno-estireno, cauchos butadieno-acrilonitrilo, cauchos butadieno-estireno-acrilonitrilo, aceites de secado aceite de lino, resinas alquíd, asfalto, resinas epoxi, resinas de uretano, resinas de poliéster, resinas fenólicas, sus derivados y mezclas.
13. Un recubrimiento que consiste en una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
14. Un recubrimiento según la reivindicación 13 formulado para el tratamiento de una superficie seleccionada de madera de exteriores, superficies externas de un sistema de calentamiento central, y un casco de un barco marino.
15. Un agente antiincrustación marino que consiste en una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
16. Un agente antiincrustación marino según la reivindicación 15 en el que el agente antiincrustación es autopulible.

17. Un método para liberar un compuesto antiincrustación de un revestimiento de superficie, método que comprende incorporar en un revestimiento de superficie:

5

- (i) una primera enzima y un primer sustrato, en donde dicho sustrato es un oligómero o un polímero de un segundo sustrato, siendo dicho segundo sustrato un sustrato para una enzima oxidasa, y en donde dicha primera enzima general dicho segundo sustrato a partir de dicho primer sustrato;
- (ii) una segunda enzima, en donde dicha segunda enzima es una oxidasa; y en donde dicha segunda enzima genera un compuesto antiincrustación al actuar sobre dicho segundo sustrato.

Actividad como una función de la temperatura.

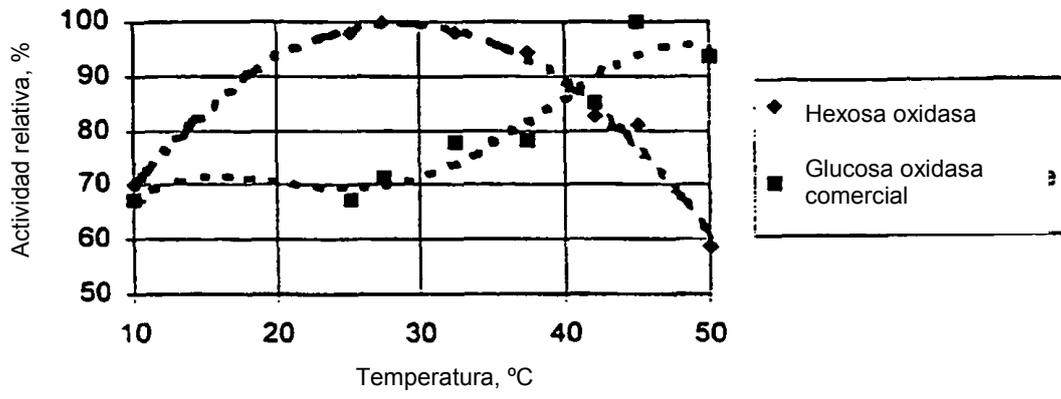


Figura 1