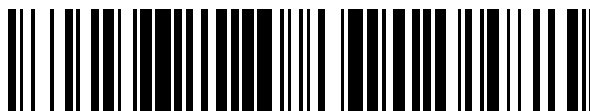


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 631**

51 Int. Cl.:  
**G01N 27/42** (2006.01)  
**C12M 1/34** (2006.01)  
**C12Q 1/26** (2006.01)  
**G01N 27/327** (2006.01)  
**G01N 33/573** (2006.01)  
**C12Q 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08831372 .1**  
96 Fecha de presentación: **18.09.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2192404**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.06.2010**

54 Título: **Método para medir una concentración de sustrato y dispositivo para ello**

30 Prioridad:  
**18.09.2007 JP 2007241333**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.09.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.09.2012**

73 Titular/es:  
**Ultizyme International Ltd.  
1-13-16, Minami Meguro-ku  
Tokyo 152-0013, JP;  
BioEngineering Laboratories, LLC y  
ARKRAY, Inc.**

72 Inventor/es:  
**TSUGAWA, Wakako y  
SODE, Koji**

74 Agente/Representante:  
**Arias Sanz, Juan**

ES 2 387 631 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

Método para medir una concentración de sustrato y dispositivo para ello

### Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método para medir la concentración de un sustrato y a un dispositivo (biosensor) para ello.

### Técnica anterior

10 Un biosensor es un sensor para medir un sustrato, mediante una reacción biocatalítica, concretamente permitiendo que un biocatalizador reaccione con un compuesto, un sustrato del mismo, teniendo el sensor como transductor, un dispositivo que puede detectar un producto que resulta de la reacción biocatalítica, un sustrato disminuido o un compuesto químico generado por una reacción con el producto. O, significa un sensor para medir el sustrato que también tiene, como transductor, un dispositivo que puede detectar señales físicas tales como un cambio en la luz y/o el color, o la fluorescencia, que resulta de la reacción biocatalítica. Ejemplos del biocatalizador incluyen enzimas, orgánulos, células y microorganismos.

15 Por tanto, puede decirse que un biosensor es un sensor que convierte una reacción biocatalítica en una señal que puede detectar un dispositivo electrónico, usando un biocatalizador como elemento de reconocimiento molecular y combinando una señal del mismo con un transductor tal como un dispositivo electroquímico, dispositivo óptico o dispositivo de detección térmica, y así puede analizar un sustrato reconocido por el biocatalizador. Uno de los biosensores representativos es un sensor enzimático que usa una enzima como biocatalizador. Por ejemplo, con el fin de medir glucosa (dextrosa), se ha desarrollado un sensor de glucosa, basándose en un concepto, en el que una enzima que oxida glucosa se inmoviliza sobre la superficie de un electrodo tal como un electrodo de oxígeno y un electrodo de peróxido de hidrógeno, y se miden electroquímicamente la cantidad de oxígeno consumido por una reacción oxidativa de glucosa y la cantidad de peróxido de hidrógeno generado al mismo tiempo.

20 Entre los sensores enzimáticos ampliamente usados en la actualidad, se usa principalmente un sensor que usa una oxidoreductasa. Un principio importante del mismo se basa en un método para medir, con un amperímetro, electrones generados cuando una sustancia reducida generada por una reacción enzimática en un ánodo se oxida de nuevo mediante un potencial eléctrico aplicado externamente; o un método para medir mediante una diferencia en los potenciales eléctricos generados entre un ánodo y un cátodo cuando los electrones generados se reducen al cátodo.

25 Asimismo, como método usado en un aparato sencillo de diagnóstico de glucemia o similar, se ha empleado un método que comprende colorear una sustancia reducida generada por una reacción enzimática tal como peróxido de hidrógeno o un aceptor de electrones artificial reducido según un método convencional, y determinar el color mediante un sensor óptico.

30 Además, como ejemplo de una enzima especial, también se ha notificado un sensor enzimático que emplea una luciferasa como enzima, que es una enzima derivada de un organismo emisor de luz tal como una luciérnaga, sensor enzimático que se caracteriza por detectar luz generada por una reacción enzimática en la que reacciona un sustrato para la luciferasa. Sin embargo, en cuanto a este método, las aplicaciones se limitan a los casos en los que puede usarse una luciferasa, tal como los casos en los que el objetivo se limita a la detección de una sustancia que es un sustrato para la luciferasa, tal como ATP, o los casos en los que puede emplearse un principio que cuando se detecta una reacción de anticuerpos, puede detectarse indirectamente a través de una señal óptica marcando el anticuerpo con la luciferasa.

35 Bibliografía no de patente 1: Katz *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 10752-10753

### Descripción de la invención

#### Problemas que van a resolverse mediante la invención

45 En el biosensor convencional descrito anteriormente, un aparato de medición que usa un biosensor tal como un sensor enzimático (a continuación en el presente documento denominado sistema de sensor enzimático) está compuesto por una parte de medición mediante el biosensor y una parte de monitor en la que se recibe y se procesa una señal medida. En los tipos principales, estas partes están integradas o, tal como se observa en un aparato de diagnóstico de glucemia mediante automedición, una parte que corresponde a la parte de medición puede separarse para desecharse. Además, la parte de medición para detectar una concentración de sustrato y la parte de monitor para detectar una señal procedente del biosensor necesitan estar en contacto directo con o conectados por cable a un campo en el que tiene lugar la reacción biocatalítica, o requieren un circuito para accionar un transmisor especial y por tanto ha de proporcionarse una fuente de alimentación, siendo todo ello problemático.

50 Mientras tanto, hasta ahora, se ha notificado un sensor enzimático que usa una fuerza electromotriz de una pila de combustible de enzima como índice. Sin embargo, puesto que la fuerza electromotriz de esta pila de combustible

sola es de menos de 1 V, mediante la fuerza electromotriz de la pila de combustible, la pila de combustible no podía hacer funcionar, como tal, un dispositivo para detectar. En el caso de medir una concentración de sustrato usando la fuerza electromotriz del sensor enzimático de tipo pila de combustible como índice, se requería que la fuerza electromotriz se conectara directamente a un voltímetro para medir el potencial eléctrico, midiendo así la concentración de sustrato. O, se requería que la fuerza electromotriz se conectara directamente al voltímetro para medir la fuerza electromotriz, y que se transmitiera un valor de respuesta del voltímetro a un receptor externo mediante un dispositivo inalámbrico accionado por una fuente de alimentación externa. (Véase "A Novel Wireless Glucose Sensor Employing Direct Electron Transfer Principle Based Enzyme Fuel Cell", Noriko Kakehi, Tomohiko Yamazaki, Wakako Tsugawa y Koji Sode Biosensors & Bioelectronics Epub, 11 de diciembre de 2006).

Por tanto, aunque un sensor enzimático de tipo pila de combustible es compacto y tiene una capacidad de detección de alto rendimiento, en los casos en que se incorpora o se monta en un organismo vivo y se intenta que su señal se detecte de manera inalámbrica, los datos del sensor enzimático de tipo pila de combustible no pueden leerse sin proporcionar además una fuente de alimentación. Por tanto, con el fin de aumentar la fuerza electromotriz de una pila de combustible de enzima, se considera que, conectando las pilas de combustible de enzima en serie, la fuerza electromotriz puede aumentar dependiendo del número de las pilas de combustible. Sin embargo, en los casos en que se pretende la generación de energía en un organismo vivo o la monitorización en un organismo vivo, disponer las pilas de combustible de enzima conectadas en serie en el organismo vivo complica el aparato y requiere electrodos grandes, lo que resulta problemático y prácticamente imposible.

### Medios para resolver los problemas

Por tanto, en la presente invención, se propone que la medición se lleve a cabo acumulando energía que resulta de una reacción biocatalítica tal como una enzima y usando, como índice, la tasa de acumulación o la frecuencia con la que se libera la energía una vez acumulada. Por tanto, en la presente invención, en los casos en que se produce una determinada cantidad de energía mediante una reacción biocatalítica dependiendo de la concentración de sustrato, teniendo en cuenta que la tasa de producción de la misma depende de la concentración de sustrato, se usa el hecho de que si la energía que va a acumularse se fija a un nivel determinado y la energía se libera cuando la energía se acumula al nivel determinado, la frecuencia de la liberación depende de la concentración de sustrato del biocatalizador. La presente invención propone que la concentración de sustrato del biocatalizador se mida midiendo la frecuencia de la liberación.

En particular, puede proporcionarse un método para medir la concentración de un sustrato y un dispositivo para ello combinando un biocatalizador tal como una enzima y un dispositivo que tiene un circuito en el que, acumulando una energía eléctrica en un condensador hasta un nivel determinado como energía que resulta de una reacción biocatalítica y liberando la energía, se genera una señal dependiendo de la cantidad de la electricidad liberada.

Asimismo, combinando un circuito que genera luz, ondas sónicas, ondas electromagnéticas o similares a partir de la energía eléctrica acumulada en el condensador, una señal generada desde el sensor puede recibirse fácilmente por un detector de señales en una parte de monitor sin contacto. Por tanto, la parte de medición y la parte de monitor pueden separarse. Por tanto, la separación de la parte de medición y la parte de monitor permite que la parte de medición sea mucho más pequeña. Tal miniaturización es ventajosa en un sensor portátil, o un sensor colocado o incorporado dentro de un organismo.

Además, en otro aspecto de la presente invención, se proporciona un circuito de un sensor enzimático inalámbrico novedoso que puede acumular una energía eléctrica generada por una reacción enzimática en un condensador, accionar un dispositivo inalámbrico mediante la fuerza electromotriz, y transmitir la señal a un receptor externo. Por tanto, se proporciona un sensor enzimático inalámbrico autoimpulsado que puede transmitir una señal de un sensor de manera inalámbrica usando una fuerza electromotriz de una pila de combustible de enzima sin una fuente de alimentación. Además, en el dispositivo de la presente invención, a diferencia de una medición convencional de un potencial eléctrico o similar, puede detectarse una señal inalámbrica por un lado de recepción cuando la fuerza electromotriz supera la tensión de accionamiento de un transmisor inalámbrico. Basándose en esto, se proporciona un dispositivo para medir la concentración de un sustrato que usa la frecuencia de accionamiento del transmisor inalámbrico como índice.

La estructura de la presente invención es tal como sigue:

(1) Un método para medir la concentración de un sustrato, conteniendo el método:

acumular energía que resulta de una reacción entre un biocatalizador y un sustrato reconocido por el biocatalizador a un nivel determinado; y

medir la concentración de sustrato usando como índice el hecho de que la tasa de acumulación de la energía depende de la concentración de sustrato.

(2) El método según el punto anterior 1, en el que dicho índice se mide basándose en la frecuencia de liberación de la energía en un periodo dado, liberándose dicha energía cuando alcanza o supera dicho nivel determinado.

- (3) El método según el punto anterior 1 ó 2, en el que el biocatalizador es una enzima, un orgánulo, un microorganismo o una célula.
- (4) El método según uno cualquiera de los puntos anteriores 1 a 3, en el que la reacción catalizada por el biocatalizador es una reacción de oxidación.
- 5 (5) El método según el punto anterior 3, en el que el biocatalizador es una enzima.
- (6) El método según el punto anterior 5, en el que la enzima es una oxidorreductasa.
- (7) El método según uno cualquiera de los puntos anteriores 1 a 6, en el que la energía que va a acumularse se acumula en un condensador como carga eléctrica.
- (8) Un aparato para medir la concentración de un sustrato, conteniendo el aparato:
- 10 una pila de combustible que tiene un ánodo en el que está dispuesto un biocatalizador y un cátodo en el que está dispuesto un aceptor de electrones externo;
- un condensador conectado a la pila de combustible en serie; y
- un dispositivo de medición para medir la concentración de sustrato usando el régimen de carga del condensador como índice:
- 15 en el que dicho condensador se carga basándose en una fuerza electromotriz generada transfiriendo electrones generados mediante una reacción entre el sustrato y el biocatalizador en el aceptor de electrones externo en el cátodo, y el régimen de carga del mismo se mide mediante el dispositivo de medición.
- (9) El aparato según el punto anterior 8, en el que el dispositivo de medición mide la frecuencia de descarga, por dicho condensador que descarga un potencial eléctrico acumulado cuando el potencial eléctrico cargado en el condensador alcanza o supera un nivel determinado.
- 20 (10) El aparato según el punto anterior 8 ó 9, que contiene además una bomba de carga para cargar el condensador, bomba de carga que amplifica la fuerza electromotriz basándose en la reacción biocatalítica cuando se carga el condensador.
- (11) El aparato según el punto anterior 9 ó 10, en el que el dispositivo de medición tiene un circuito de generación de señales que genera una señal mediante la descarga del condensador y mide la frecuencia de la señal.
- 25 (12) El aparato según el punto anterior 11, en el que el circuito de generación de señales es un transmisor inalámbrico.
- (13) El aparato según el punto anterior 11 ó 12, en el que el dispositivo de medición mide una señal física generada cuando se acciona el circuito de generación de señales.
- 30 (14) El aparato según el punto anterior 13, en el que la señal física es una onda sónica, luz o una onda electromagnética.
- (15) El aparato según uno cualquiera de los puntos anteriores 11 a 14, en el que el dispositivo de medición contiene además un receptor para recibir la señal generada mediante la descarga del condensador cuando el condensador supera la tensión de accionamiento del transmisor inalámbrico al cargar.
- 35 (16) El aparato según cualquiera de los puntos anteriores 8 a 15, en el que el biocatalizador dispuesto en el ánodo es una enzima.
- (17) El aparato según el punto anterior 16, en el que la enzima es una oxidorreductasa.
- (18) El aparato según el punto anterior 16, en el que la enzima cataliza la oxidación de glucosa.
- 40 Como biocatalizador usado en la presente invención, pueden usarse enzimas, orgánulos, células, microorganismos y similares. Además, como reacción catalizada por el biocatalizador, se prefiere una reacción redox de un objeto que va a medirse. Como enzima, pueden usarse diversas oxidorreductasas. Ejemplos las mismas incluyen oxidasas para alcohol, glucosa, colesterol, fructosilamina, glicerina y ácido úrico, usando estas oxidasas FAD como coenzima; deshidrogenasas para alcohol, glucosa y glicerina, requiriendo estas deshidrogenasas FAD como coenzima; y deshidrogenasas para alcohol, glucosa y glicerina, usando estas deshidrogenasas PQQ como coenzima. En particular, en los casos en que debe medirse glucosa, se prefiere(n) una glucosa oxidasa y/o glucosa deshidrogenasa que usan FAD o PQQ como coenzima. Ésta puede ser una enzima aislada y purificada de un microorganismo o células que producen la enzima. O, puede ser una enzima recombinante producida en *E. coli* o similar.
- 45 Además, el biocatalizador usado en la presente invención puede no ser una enzima sola, sino que puede ser una

membrana que contiene la enzima, un orgánulo que contiene la enzima o una célula que contiene la enzima siempre que pueda oxidar un sustrato en un ánodo y transmitir este electrón a un aceptor de electrones apropiado o directamente a un electrodo, y puede usarse siempre que se logre una reacción de oxidación del sustrato mencionado anteriormente por el resultado de estas reacciones enzimáticas y una pluralidad de reacciones enzimáticas acopladas a ellas.

Como método para generar una energía eléctrica usando una enzima según la presente invención, puede emplearse una pila de combustible de enzima. Es decir, es una pila de combustible de enzima caracterizada porque una oxidasa o deshidrogenasa está inmovilizada sobre un ánodo.

En este caso, como cátodo, puede usarse un electrodo en el que se usa una enzima que reduce oxígeno tal como bilirrubina oxidasa o un electrodo en el que se combinan aceptores de electrones apropiados. O, puede usarse un catalizador que tiene la capacidad de reducir oxígeno tal como platino o un catalizador inorgánico que contiene platino.

Asimismo, se cree que puede usarse como ánodo una estructura que contiene un aceptor de electrones así como la enzima. Es decir, pueden usarse los que transfieren un electrón obtenido mediante una reacción enzimática a un aceptor de electrones artificial y que oxidan el electrón en el electrodo. O, las deshidrogenasas que pueden transferir directamente electrones a un electrodo tal como una enzima que tiene citocromo en una subunidad de transporte de electrones y similares pueden constituir el ánodo sin añadir ningún aceptor de electrones artificial. Como materiales de electrodo para el ánodo y el cátodo, pueden usarse electrodos cargados o recubiertos con partículas de carbono, electrodos de carbono, electrodos de oro, electrodos de platino, o similares.

El aceptor de electrones artificial del ánodo o cátodo no está particularmente restringido y puede usarse un complejo de osmio, un complejo de rutenio, metosulfato de fenacina y un derivado del mismo, un compuesto de quinona o similares.

La enzima para el cátodo no está particularmente restringida, y puede aplicarse bilirrubina oxidasa o lacasa. El aceptor de electrones artificial del cátodo no está restringido y puede usarse ferricianuro de potasio, ABTS o similares.

Como enzima para el ánodo, pueden usarse diversas oxidasas o deshidrogenasa. En particular, en los casos en que debe medirse glucosa, puede usarse glucosa oxidasa o glucosa deshidrogenasa usando PQQ o FAD como coenzima.

En la presente invención, como método para montar una enzima en un electrodo, puede usarse una mezcla de la enzima tal como está y un material de electrodo tal como pasta de carbono. O, tras prepararse mediante un método general para inmovilizar una enzima, puede montarse una enzima inmovilizada sobre el electrodo. Los ejemplos incluyen métodos en los que se lleva a cabo un tratamiento de reticulación con un reactivo de reticulación binario tal como glutaraldehído después de mezclar ambos; y métodos para inmovilizar de manera inclusiva en un polímero sintético tal como un polímero de fotorreticulación, polímero electroconductor o polímero redox, o una matriz de polímero natural. La proteína mezclada así preparada se mezcla con partículas de carbono o se mezcla con pasta de carbono que está compuesta por las partículas de carbono y está en un modo en que puede combinarse fácilmente con una enzima. Después, la mezcla resultante se somete adicionalmente a un tratamiento de reticulación y luego se monta en el electrodo compuesto por carbono, oro o platino. Como partícula de carbono, puede usarse una que tiene un área superficial específica que oscila desde aproximadamente  $10 \text{ m}^2/\text{g}$  hasta no menos de  $500 \text{ m}^2/\text{g}$ , más preferiblemente no menos de  $800 \text{ m}^2/\text{g}$ . Ejemplos de lo anterior incluyen VULCAN como producto comercialmente disponible y ejemplos de este último incluyen Ketchen negro.

Además, cuando la enzima se monta en el electrodo de esta manera, un aceptor de electrones artificial puede inmovilizarse al mismo tiempo. Normalmente, se mezclan glucosa deshidrogenasa que usa FAD como coenzima, FADGDH y metosulfato de metoxifenacina (mPMS). La mezcla se mezcla además con pasta de carbono y luego se liofiliza. Esto se monta sobre un electrodo de carbono y el producto resultante se sumerge tal como está en una disolución acuosa de glutaraldehído para reticular una proteína, obteniéndose así un electrodo de enzima.

En la pila de combustible de enzima, se inmoviliza una oxidasa o deshidrogenasa que usa un objeto de medición como sustrato sobre el electrodo de ánodo. Una reductasa de oxígeno se inmoviliza sobre el cátodo. Los electrodos así preparados se usan como electrodos para el ánodo y el cátodo. En el ánodo, por ejemplo, puede usarse m-PMS como aceptor de electrones artificial y también en el cátodo, por ejemplo, puede usarse ABTS como aceptor de electrones artificial.

Conectando la parte así preparada en la que se genera una energía eléctrica mediante una reacción enzimática a un condensador, puede almacenarse energía eléctrica. Es decir, basándose en una fuerza electromotriz obtenida mediante la reacción enzimática, el condensador conectado al circuito mostrado en la figura 2 se carga hasta que se llena la capacidad del condensador. Por tanto, en los casos en que la reacción enzimática se lleva a cabo en una disolución de la misma concentración de sustrato, cuando se usa un condensador con una capacidad más grande, se requiere un periodo de tiempo más largo para completar la carga. A la inversa, cuando se usa un condensador con una capacidad más pequeña, el tiempo para completar la carga es más corto. O, en los casos en que se usa un

- condensador con la misma capacidad, cuando la concentración de sustrato de la enzima es menor, la cantidad de la energía eléctrica generada por tiempo unitario es más pequeña y por tanto el tiempo para completar la carga es más largo, mientras que cuando la concentración de sustrato es más alta, el tiempo para completar la carga es, en cambio, más corto. Es decir, fijando el condensador a una determinada cantidad de capacidad, el tiempo requerido para cargar varía dependiendo de la concentración del sustrato de la enzima. Por tanto, puede medirse la concentración de sustrato usando el tiempo requerido para cargar (régimen de carga) como índice. Es decir, registrando por adelantado la correlación entre el tiempo observado requerido para cargar (régimen de carga) y la concentración de sustrato y, basándose en ello, preparando una curva de calibración, puede medirse la concentración de sustrato de una muestra desconocida a partir del tiempo observado requerido para cargar.
- Asimismo, conectando un circuito apropiado al condensador de manera que la descarga comienza cuando se completa la carga, puede medirse la concentración de sustrato de la misma manera midiendo la frecuencia de carga y descarga por tiempo unitario. Es decir, registrando por adelantado la correlación entre la frecuencia de descarga observada por tiempo unitario y la concentración de sustrato y preparando, basándose en ello, una curva de calibración, puede medirse la concentración de sustrato de una muestra desconocida a partir de la frecuencia de descarga observada.
- Además, si se genera luz, una onda sónica o una onda electromagnética por un circuito que se conecta ahí, observando la luz, la onda sónica o la onda electromagnética, y midiendo la frecuencia a la que se observa por tiempo unitario o el intervalo entre sus observaciones, puede medirse la concentración del sustrato. Es decir, registrando por adelantado la correlación entre el tiempo observado requerido para generar la luz, la onda sónica o la onda electromagnética y la concentración de sustrato y preparando, basándose en ello, una curva de calibración, puede medirse la concentración de sustrato de una muestra desconocida a partir del tiempo observado requerido para generar la luz, la onda sónica o la onda electromagnética o una frecuencia por tiempo unitario.
- Además, dependiendo del circuito que va a accionarse, es posible que se fije de manera apropiada un potencial eléctrico del condensador. Es decir, combinando una fuerza electromotriz de una pila de combustible de enzima que genera una energía eléctrica generada mediante una reacción enzimática como fuerza electromotriz con un circuito amplificador, puede aumentarse el potencial eléctrico cargado en el condensador. Para esta amplificación, puede usarse una bomba de carga comercialmente disponible o un circuito IC de la misma. El potencial eléctrico almacenado en el condensador puede ajustarse dependiendo del tipo y el número de la bomba de carga combinados. El potencial eléctrico en el condensador puede fijarse dependiendo del circuito de generación de señales que va a accionarse.
- La frecuencia en la que se carga y se descarga el condensador depende, tal como se describió anteriormente, de la capacidad del condensador y la concentración del sustrato. Es decir, si la concentración de sustrato es constante, cuanto más pequeña sea la capacidad del condensador, mayor será la frecuencia de carga y descarga. Y, cuanto más grande sea la capacidad del condensador, menor será la frecuencia de carga y descarga. Además, si la capacidad del condensador es constante, la frecuencia de carga y descarga cambia dependiendo de la concentración de sustrato. Y, cuanto más baja sea la concentración de sustrato, menor será la frecuencia de carga y descarga. Cuanta más alta sea la concentración de sustrato, mayor será la frecuencia de carga y descarga.
- Por ejemplo, cuando se conecta un voltímetro a ambos extremos del condensador, lo que se observa se muestra en la figura 3. En este modo, se usa una muestra de concentración de glucosa constante como sustrato; se emplea una enzima que cataliza la deshidrogenación de glucosa como enzima; y se amplifica una fuerza electromotriz generada por una pila de combustible de enzima desde 0,3 V de la pila de combustible de enzima hasta 1,8 V a través de una bomba de carga, cargando así el condensador. Tal como se muestra en la figura 3, puede observarse que el potencial eléctrico del condensador alcanza 1,8 V a intervalos regulares, y la energía eléctrica generada a partir de la reacción enzimática se almacena y luego se libera. En este caso, cuando la capacidad del condensador conectado se cambia desde 0,47  $\mu\text{F}$  hasta 1  $\mu\text{F}$ , el intervalo de carga y descarga observado cambia. Es decir, cuando la capacidad del condensador es de 0,47  $\mu\text{F}$ , el intervalo es de 0,2 segundos (la frecuencia de carga y descarga es de 5 veces/segundo, 5 Hz) mientras que la frecuencia cambia tal como sigue: 2,4 Hz a 1  $\mu\text{F}$ , 0,27 Hz a 10  $\mu\text{F}$  y 0,028 Hz a 100  $\mu\text{F}$ .
- Además, cuando se observa un estado en el que se carga el condensador, usando un condensador de 10  $\mu\text{F}$  y cambiando la concentración de glucosa, el intervalo de carga y descarga es más largo a una concentración de glucosa más baja, y el intervalo de carga y descarga es más corto a una concentración de glucosa más alta (véase la figura 4). A la inversa, cuando esto se observa como frecuencia de carga y descarga, la frecuencia de carga y descarga es más baja a una concentración de glucosa más baja, y la frecuencia de carga y descarga es más alta a una concentración de glucosa más alta.
- Conectando este circuito a un circuito que genera una señal dependiendo de la carga y descarga del condensador de la misma manera y observando la luz, la onda sónica o la onda electromagnética generada a partir de ello, puede medirse la concentración de sustrato de la misma manera. Por ejemplo, en los casos en que se conecta un diodo emisor de luz, observando el intervalo de emisión o la frecuencia de emisión del diodo emisor de luz, puede medirse la concentración de sustrato.

Tal como se muestra en la figura 5, el intervalo de emisión es más largo a una concentración de glucosa más baja y el intervalo de emisión es más corto a una concentración de glucosa más alta. A la inversa, cuando esto se observa como frecuencia de emisión, la frecuencia de emisión es más baja a una concentración de glucosa más baja y la frecuencia de emisión es más alta a una concentración de glucosa más alta.

5 Asimismo, en los casos en que un circuito resonante que genera una onda electromagnética está conectado a este circuito, observando el intervalo o la frecuencia de la transmisión de la onda electromagnética, puede medirse la concentración de sustrato. En este caso, el intervalo de la onda electromagnética transmitida es más largo a una concentración de glucosa más baja y el intervalo es más corto a una concentración de glucosa más alta. Cuando esto se observa como frecuencia de transmisión de la onda electromagnética, la transmisión es más baja a una concentración de glucosa más baja y la frecuencia de transmisión es más alta a una concentración de glucosa más alta.

10 Tal como puede observarse a partir de este modo, es evidente que, cuando se conecta un transmisor de señales accionado por la capacitancia y el potencial eléctrico de un condensador, independientemente del tipo de la señal transmitida a partir de él, es decir, luz, una onda sónica, o una onda electromagnética, puede medirse la concentración de un sustrato de una reacción enzimática observando el intervalo y la frecuencia. Además, también es evidente que la enzima no se limita a la deshidrogenasa que usa glucosa como sustrato que se muestra en el presente documento, y pueden usarse diversas oxidasas y deshidrogenasas. Los ejemplos de las mismas incluyen oxidasas para alcohol, glucosa, colesterol, fructosilamina, glicerina y ácido úrico, usando estas oxidasas FAD como coenzima; deshidrogenasas para alcohol, glucosa y glicerina, usando estas deshidrogenasas FAD como coenzima; y deshidrogenasas para alcohol, glucosa y glicerina, usando estas deshidrogenasas PQQ como coenzima. Incluso cuando no es una enzima sola, siempre que pueda oxidar un sustrato en un ánodo y transmitir este electrón a un aceptor de electrones apropiado o directamente a un electrodo, puede ser una membrana, un orgánulo, una célula o un microorganismo, conteniendo todos ellos la enzima. Si se logra una reacción de oxidación del sustrato mencionado anteriormente por el resultado de estas reacciones enzimáticas, puede usarse, lo que es evidente a partir de casos de estudio de biosensores que usan biocatalizadores que catalizan diversas reacciones redox.

15 Asimismo, como otro modo, puede usarse un circuito de transmisión usado en comunicación inalámbrica como circuito de transmisión de señales conectado a un condensador. Estos circuitos de transmisión requieren un nivel determinado o más alto de potencial eléctrico para su accionamiento. Si la fuerza electromotriz es menor que este nivel, el circuito se detiene y también la transmisión. Además, no puede accionarse cuando la fuerza electromotriz no es más alta que el nivel determinado. Es decir, cuando el circuito de transmisión inalámbrico accionado a 1,5 V se conecta al condensador y se observa la señal transmitida por un sistema de recepción distante, se observa que la transmisión desde el dispositivo inalámbrico se corresponde con la carga y descarga del condensador. Es decir, dependiendo de la concentración de un sustrato de una reacción enzimática, el circuito de transmisión inalámbrico se acciona y la señal se transmite. El intervalo es más largo cuando la concentración de sustrato enzimático es más baja y el intervalo es más corto cuando la concentración de sustrato enzimático es más alta. Además, la frecuencia de transmisión de la señal es más baja cuando la concentración de sustrato enzimático es más baja y la frecuencia de transmisión de la señal es más alta cuando la concentración de sustrato enzimático es más alta. Por tanto, puede medirse la concentración de sustrato enzimático observando un registro de transmisión recibido.

20 Como circuito de transmisión inalámbrico de este tipo, puede emplearse un circuito resonante. Además, para un condensador en este circuito resonante, también puede emplearse un condensador cuya capacidad es variable.

#### Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La figura 1 muestra una vista esquemática del método para medir un sustrato y el aparato para ello según la presente invención.

[Figura 2] La figura 2 muestra un diagrama de circuito de un condensador usado en la presente invención.

45 [Figura 3] La figura 3 muestra el cambio en el potencial eléctrico mediante una carga y descarga repetidas en un condensador en el aparato según la presente invención.

[Figura 4] La figura 4 muestra la relación entre la frecuencia de carga de un condensador y la concentración de glucosa.

50 [Figura 5] La figura 5 muestra el intervalo de emisión (tiempo) de un diodo emisor de luz con respecto al cambio en la concentración de glucosa.

[Figura 6A] La figura 6A muestra el tiempo requerido para cargar un condensador (resistencia 100 k $\Omega$ ).

[Figura 6B] La figura 6B muestra el tiempo requerido para cargar un condensador (resistencia 500 k $\Omega$ ).

[Figura 6C] La figura 6C muestra el tiempo requerido para cargar un condensador (resistencia 500 k $\Omega$ ).

[Figura 7A] La figura 7A muestra el tiempo requerido para cargar un condensador con respecto al cambio en la

concentración de glucosa (10 kΩ).

[Figura 7B] La figura 7B muestra el tiempo requerido para cargar un condensador con respecto al cambio en la concentración de glucosa (500 kΩ).

5 [Figura 8A] La figura 8A muestra el cambio en el potencial eléctrico de un condensador mediante una pila de combustible de enzima con respecto al tiempo (0,47 μF).

[Figura 8B] La figura 8B muestra el cambio en el potencial eléctrico de un condensador mediante una pila de combustible de enzima con respecto al tiempo (1 μF).

[Figura 8C] La figura 8C muestra el cambio en el potencial eléctrico de un condensador mediante una pila de combustible de enzima con respecto al tiempo (10 μF).

10 [Figura 8D] La figura 8D muestra el cambio en el potencial eléctrico de un condensador mediante una pila de combustible de enzima con respecto al tiempo (100 μF).

[Figura 9] La figura 9 muestra la frecuencia de señal en el caso de cambiar la concentración de glucosa.

[Figura 10] La figura 10 muestra el cambio en el tiempo requerido para un condensador que alcanza 1,8 V con respecto al cambio en la concentración de glucosa.

15 [Figura 11] La correlación de la frecuencia a la que un condensador alcanza 1,8 V por tiempo unitario con respecto al cambio en la concentración de glucosa.

[Figura 12] La correlación entre la frecuencia de una señal observada y la concentración de glucosa en un sensor inalámbrico (amplificación de 1,8 V).

20 [Figura 13] La correlación entre la frecuencia de una señal observada y la concentración de glucosa en un sensor inalámbrico (amplificación de 2,4 V).

[Figura 14] La figura 14 muestra un ejemplo, como circuito de transmisión de señales, de un circuito de medición/transmisión que usa un circuito resonante como transmisor.

[Figura 15] La figura 15 muestra un ejemplo en el que se registró una onda electromagnética observada usando el circuito de transmisión mostrado en la figura 14.

25 [Figura 16] La figura 16 muestra un ejemplo, como circuito de transmisión de señales, de un circuito de medición/transmisión que usa, como transmisor, un circuito resonante que usa un diodo varactor.

[Figura 17] La figura 17 muestra un ejemplo en el que se midió una onda electromagnética observada usando un circuito de transmisión mostrado en la figura 16 y la concentración de glucosa en una muestra.

#### **Mejor modo para llevar a cabo la invención**

30 La presente invención se describirá ahora en detalle a continuación mediante ejemplos de la misma. Sin embargo, la presente invención no se limita a los ejemplos.

#### **Ejemplo 1**

##### **Preparación de ánodo:**

35 Se mezclaron tinta negra Ketchen (10 ml), PPB 100 mM (pH 7,0) (10 ml) y una disolución de complejo de FADGDH (40 ml) (1,2 U/ml). Además, se recubrió con 50 ml de la mezcla de manera uniforme sobre 1 cm<sup>2</sup> de tela de fibra de carbono y luego se secó al aire a 4°C durante 3 horas. Sumergiendo el producto resultante en una disolución de glutaraldehído al 1% (10 ml) a temperatura ambiente durante 30 minutos, se llevó a cabo un tratamiento de reticulación. A continuación, sumergiendo esta tela de fibra de carbono en Tris-HCl 10 mM (10 ml) durante 20 minutos, se eliminó el glutaraldehído sin reaccionar. Después, el producto resultante se sumergió en PPB 100 mM (pH 7,0) (10 ml) durante 1 hora hasta que se equilibró, preparando así un ánodo.

##### **Preparación de cátodo:**

45 Se mezclaron tinta al carbón soportada sobre platino (10 ml) y PPB 100 mM (pH 7,0) (50 ml). Además, se recubrió con 50 ml de la mezcla de manera uniforme sobre tela de fibra de carbono y el producto resultante se secó al aire a 4°C durante 3 horas. Al producto resultante, se añadieron gota a gota 50 ml de polidimetilsiloxano (PDMS) al 3% (p/v) diluido en etanol y se secó al aire durante la noche para proporcionar un cátodo.

##### **Construcción de pila eléctrica y circuito:**

Usando el ánodo y el cátodo preparados, se construyó una pila eléctrica usando PPB 100 mM (pH 7,0) que contiene



glucosa 20 mM como disolución de reacción. La pila eléctrica, un resistor variable, un condensador y un conmutador, se conectaron todos en serie, preparando así un circuito.

5 En el circuito así preparado, se examinó el tiempo de carga del condensador. Por tanto, usando dos tipos de condensadores (0,1 mF y 1 mF), con la condición de que se lleve a cabo la carga a una concentración de glucosa de 20 mM, se midieron un potencial eléctrico aplicado al condensador y una corriente eléctrica que fluye en el circuito cuando el conmutador se conectara a una resistencia para examinar el tiempo de carga para el condensador.

10 En este caso, en la figura 6 se muestran los resultados cuando el condensador de 1 mF se usó como condensador y la resistencia era de 100 k $\Omega$ , 500 k $\Omega$  y 1000 k $\Omega$ . La corriente eléctrica fluyó al mismo tiempo cuando se encendió el conmutador. Además, la corriente eléctrica disminuyó con el tiempo y el potencial eléctrico en el condensador aumentó. Además, cuando el valor de resistencia se cambió para disminuir o aumentar el valor de corriente eléctrica, el tiempo de carga del condensador aumentó o disminuyó en consecuencia. En cualquier resistencia, cuando se calculó la cantidad de carga cargada en el condensador a partir del valor de corriente eléctrica que fluía en el circuito, fue casi igual a la capacidad del condensador. Además, cuando se usó el condensador de 0,1 mF, se obtuvieron resultados similares. Sin embargo, en comparación con el condensador de 1 mF, el tiempo de carga fue más corto. Se demostró que, incluso en los casos en que se usaba una pila de combustible de enzima como fuente de alimentación, el condensador podía funcionar adecuadamente.

15 Usando un circuito preparado de la misma manera, se evaluó la dependencia del tiempo de carga de un condensador de la concentración de glucosa. Usando un condensador de 1 mF, se midió el potencial eléctrico en el condensador cuando se fijó una resistencia a 10 k $\Omega$  o 500 k $\Omega$ . En este caso, añadiendo gradualmente una muestra de glucosa para aumentar la concentración de glucosa en una disolución de reacción, se examinó el tiempo de carga a cada concentración de glucosa.

20 Los resultados se muestran en la figura 7. A una resistencia de o bien 10 k $\Omega$  o bien 500 k $\Omega$ , cuando la concentración de glucosa aumenta, el tiempo de carga disminuye. A 500 k $\Omega$ ; apenas se observó disminución en el tiempo de carga con aproximadamente 6 mM mientras que, a 10 k $\Omega$ , se observó un aumento en la corriente eléctrica de hasta 11 mM. Se demostró que, usando el tiempo para cargar el condensador como índice, podía medirse la concentración de sustrato de una enzima.

## Ejemplo 2

### Preparación de ánodo:

30 Se mezclaron tinta negra Ketchen (10 ml), PPB 100 mM (pH 7,0) (10 ml) y una disolución de complejo de FADGDH (40 ml) (4,2 U/ml). Además, se recubrió con 300 ml de la mezcla de manera uniforme sobre 6 cm<sup>2</sup> de tela de fibra de carbono y luego se secó al aire a 4°C durante 3 horas. Sumergiendo el producto resultante en una disolución de glutaraldehído al 1% (10 ml) a temperatura ambiente durante 30 minutos, se llevó a cabo un tratamiento de reticulación. A continuación, sumergiendo esta tela de fibra de carbono en Tris-HCl 10 mM (10 ml) durante 20 minutos, se eliminó el glutaraldehído sin reaccionar. Después, el producto resultante se sumergió en PPB 100 mM (pH 7,0) (10 ml) durante 1 hora hasta que se equilibró, preparando así un ánodo.

### Preparación de cátodo:

40 Se mezclaron tinta al carbón soportada sobre platino (60 ml) y PPB 100 mM (pH 7,0) (300 ml). Además, se recubrió con 300 ml de la mezcla de manera uniforme sobre tela de fibra de carbono (6 cm<sup>2</sup>) y el producto resultante se secó al aire a 4°C durante 3 horas. Al producto resultante, se añadieron gota a gota 300 ml de polidimetilsilosano (PDMS) al 3% (p/v) diluido en etanol y se secó al aire durante la noche para proporcionar un cátodo.

### Construcción de pila eléctrica y circuito:

45 Usando el ánodo y el cátodo preparados, se construyó una pila eléctrica usando PPB 100 mM (pH 7,0) como disolución de reacción. Se combinó una bomba de carga (amplificador IC; S-882Z18 fabricado por Seiko Instruments Inc.) que puede amplificar desde 0,3 V hasta 1,8 V con esta pila de combustible, construyendo así un circuito mostrado en la figura 1. Además, como circuito de generación de señales, se conectó un diodo emisor de luz de color naranja y se conectaron a demás diversos condensadores de 0,47 a 100 mF. Midiendo el potencial eléctrico en el condensador, y el intervalo y la frecuencia de emisión del diodo emisor de luz, se evaluó el ciclo de carga y descarga.

### 50 Construcción de circuito usando amplificador IC y evaluación de frecuencia de señal mediante capacidad de condensador

Se evaluó el accionamiento del presente circuito por una pila de combustible de enzima mediante el parpadeo del diodo emisor de luz o mediante el cambio con el tiempo del potencial eléctrico del condensador. Y también se evaluó una diferencia de la frecuencia de señal obtenida cuando el condensador se sustituyó por otros de 0,47 a 100 mF. La concentración de glucosa en una disolución de reacción fue de 20 mM.

En la figura 8 se muestra el cambio con el tiempo del potencial eléctrico del condensador en este caso. Cuando se usó el condensador de 0,47 mF, se observaron señales de tipo impulso a una frecuencia de cinco veces por segundo (5/s). Además, en el mismo ciclo, se observó el parpadeo del diodo. Cuando se cambió la capacidad del condensador, la frecuencia de la señal cambió. El ciclo fue de 2,4/s, 0,27/s y 0,028/s cuando se usó el condensador de 1 mF, 10 mF y 100 mF, respectivamente. Se demostró que la frecuencia de la señal podía aumentarse haciendo que la capacidad del condensador sea más pequeña.

**Dependencia del ciclo de carga y descarga del condensador de la concentración de glucosa**

Cuando se cambió la concentración de glucosa que era un sustrato enzimático, se evaluó la frecuencia de la señal obtenida en ese momento mediante el parpadeo del diodo emisor de luz o el cambio con el tiempo del potencial eléctrico del condensador. Como condensador, se usó un condensador de una capacidad de 10 mF. Los resultados se muestran en la figura 9. Cuando la concentración de glucosa aumenta, se acorta el tiempo requerido para que el condensador alcance un potencial eléctrico máximo, y se observó un aumento en la frecuencia en la que se alcanza un potencial eléctrico pico por tiempo unitario. Basándose en este resultado, se determinó la concentración de glucosa y el parpadeo de LED, es decir, el tiempo requerido para que el condensador alcance 1,8 V (figura 10) y el número del parpadeos de LED por tiempo unitario, es decir, la frecuencia en la que el condensador alcanzó 1,8 V por tiempo unitario (figura 11). Tal como se muestra en estas curvas, se demostró que, a partir de la curva obtenida, el parpadeo de LED, es decir, el tiempo requerido para que el condensador alcance 1,8 V y el número del parpadeo de LED por tiempo unitario, es decir, la frecuencia en la que el condensador alcanzó 1,8 V por tiempo unitario eran dependientes de la concentración de glucosa. A partir de esto, se demostró que podía medirse la concentración de glucosa usando la frecuencia de señal como índice y se construyó un nuevo biosensor que usaba la carga y descarga del condensador.

**Accionamiento de sistema inalámbrico mediante pila de combustible de enzima amplificada**

Usando el ánodo y el cátodo preparados, se construyó una pila eléctrica usando PPB 100 mM (pH 7,0) como disolución de reacción. Se combinó una bomba de carga (amplificador IC; S-882Z18 fabricado por Seiko Instruments Inc.) que puede amplificar desde 0,3 V hasta 1,8 V o una bomba de carga (amplificador IC; S-882Z24 fabricado por Seiko Instruments Inc.) que puede amplificar desde 0,3 V a 2,4 V con esta pila de combustible, construyendo así un circuito mostrado en la figura 1. Como circuito de generación de señales, se conectó un transmisor de sistema inalámbrico (transmisión infrarroja). Es decir, una parte de fuente de alimentación del transmisor inalámbrico se conectó a un circuito de generación de señales mostrado en la figura 1, construyendo así un biosensor que usa, como índice, el accionamiento del sistema de transmisión inalámbrico mediante un potencial eléctrico descargado cuando se cargó el condensador. La concentración de glucosa en la disolución de reacción fue de 0 a 25 mM.

Como resultado, en presencia de glucosa, se accionó el transmisor de sistema inalámbrico y se transmitió una señal a un receptor a intervalos regulares.

La figura 12 muestra la correlación entre la frecuencia de la señal observada a una amplificación de 1,8 V y la concentración de glucosa. La figura 13 muestra la correlación entre la frecuencia de la señal observada a una amplificación de 2,4 V y la concentración de glucosa. Tal como se muestra en este caso, a cualquier amplificación, la frecuencia de recepción de la señal se correlaciona con la concentración de glucosa y, monitorizando esta frecuencia, puede medirse la concentración de glucosa. La concentración de glucosa medible es, en cualquier caso, desde 0,5 mM hasta 20 mM, que cubre un intervalo suficiente para medir un valor de glucemia en diabetes mellitus. Por tanto, se demuestra que puede aplicarse bien a un aparato de diagnóstico de glucemia incluyendo un aparato de diagnóstico continuo de glucemia.

A partir de esto, se demostró que el sistema inalámbrico podía accionarse usando la fuerza electromotriz acumulada mediante el resultado de la reacción enzimática, fuerza electromotriz que se carga en el condensador. Por tanto, se demostró que, en el presente biosensor novedoso, el transmisor inalámbrico podía aplicarse como circuito de transmisión de señales.

**Construcción de circuito de medición/transmisión usando un circuito resonante como transmisor**

Se construyó una pila de combustible de la misma manera que se describió en el ejemplo 1 y se combinaron con ella un condensador de 10 µF y un amplificador IC de desde 0,3 hasta 1,8 V, construyendo así un biocondensador. Como fuente de alimentación, se conectó una potencia de salida del biocondensador a ambos extremos, produciendo así un circuito de oscilación de Hartley. Usando este transmisor, puede medirse la frecuencia de recepción de una onda electromagnética mediante un circuito de recepción. Como resultado, en presencia de glucosa, tal como se describe en la figura 15, se observó que la onda electromagnética se recibía a intervalos regulares. Es evidente, a partir de la descripción hasta ahora, que esta frecuencia de recepción de la onda electromagnética depende de la concentración de glucosa.

**Construcción de circuito de medición/transmisión usando como transmisor un circuito resonante que usa un diodo varactor**

Se construyó una pila de combustible de la misma manera que se describió en el ejemplo 1 y se combinaron con ella

5 un condensador de  $0,47 \mu\text{F}$  y un amplificador IC de desde  $0,3$  hasta  $1,8 \text{ V}$ , construyendo así un biocondensador. Como fuente de alimentación, se conectó una potencia de salida del biocondensador a ambos extremos de un varactor (1sV149), produciendo así un circuito de oscilación de Hartley. Usando este transmisor, puede medirse la frecuencia de recepción de una onda electromagnética mediante un circuito de recepción. La figura 17 muestra un ejemplo en el que se midieron la frecuencia de la onda electromagnética observada cuando se usa este circuito de transmisión y la concentración de glucosa en muestras. Tal como se muestra en este caso, puede medirse la concentración de glucosa usando el presente circuito.

## REIVINDICACIONES

1. Método para medir la concentración de un sustrato, comprendiendo dicho método:  
 acumular energía que resulta de una reacción entre un biocatalizador y un sustrato reconocido por dicho biocatalizador a un nivel determinado; y  
 5 medir la concentración de sustrato usando como índice el hecho de que la tasa de acumulación de dicha energía depende de dicha concentración de sustrato.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho índice se mide basándose en la frecuencia de liberación de la energía en un periodo dado, liberándose dicha energía cuando alcanza o supera dicho nivel determinado.
- 10 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho biocatalizador es una enzima, un orgánulo, un microorganismo o una célula.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha reacción catalizada por dicho biocatalizador es una reacción de oxidación.
5. Método según la reivindicación 3, en el que dicho biocatalizador es una enzima.
- 15 6. Método según la reivindicación 5, en el que dicha enzima es una oxidorreductasa.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha energía que va a acumularse se acumula en un condensador como carga eléctrica.
8. Aparato para medir la concentración de un sustrato, comprendiendo dicho aparato:  
 20 una pila de combustible que tiene un ánodo en el que está dispuesto un biocatalizador y un cátodo en el que está dispuesto un aceptor de electrones externo;  
 un condensador conectado a dicha pila de combustible en serie; y  
 un dispositivo de medición para medir dicha concentración de sustrato usando el régimen de carga de dicho condensador como índice;  
 25 en el que dicho condensador se carga basándose en una fuerza electromotriz generada transfiriendo electrones generados mediante una reacción entre dicho sustrato y dicho biocatalizador en dicho aceptor de electrones externo en dicho cátodo, y el régimen de carga del mismo se mide mediante dicho dispositivo de medición.
9. Aparato según la reivindicación 8, en el que dicho dispositivo de medición mide la frecuencia de descarga, por dicho condensador que descarga un potencial eléctrico acumulado cuando dicho potencial eléctrico cargado en dicho condensador alcanza o supera un nivel determinado.
- 30 10. Aparato según la reivindicación 8 ó 9, que comprende además una bomba de carga para cargar dicho condensador, bomba de carga que amplifica dicha fuerza electromotriz basándose en dicha reacción biocatalítica cuando se carga dicho condensador.
- 35 11. Aparato según la reivindicación 9 ó 10, en el que dicho dispositivo de medición tiene un circuito de generación de señales que genera una señal mediante dicha descarga de dicho condensador y mide la frecuencia de dicha señal.
12. Aparato según la reivindicación 11, en el que dicho circuito de generación de señales es un transmisor inalámbrico.
- 40 13. Aparato según la reivindicación 11 ó 12, en el que dicho dispositivo de medición mide una señal física generada cuando se acciona dicho circuito de generación de señales.
14. Aparato según la reivindicación 13, en el que dicha señal física es una onda sónica, luz o una onda electromagnética.
15. Aparato según la reivindicación 14, en el que dicha señal física es una onda electromagnética y se usa un diodo varactor para un circuito de transmisión de dicha onda electromagnética.
- 45 16. Aparato según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que dicho dispositivo de medición comprende además un receptor para recibir dicha señal generada mediante dicha descarga de dicho condensador cuando dicho condensador supera la tensión de accionamiento de dicho transmisor inalámbrico al cargar.

17. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 16, en el que dicho biocatalizador dispuesto en dicho ánodo es una enzima.
18. Aparato según la reivindicación 17, en el que dicha enzima es una oxidorreductasa.
19. Aparato según la reivindicación 17, en el que dicha enzima cataliza la oxidación de glucosa.

Fig.1

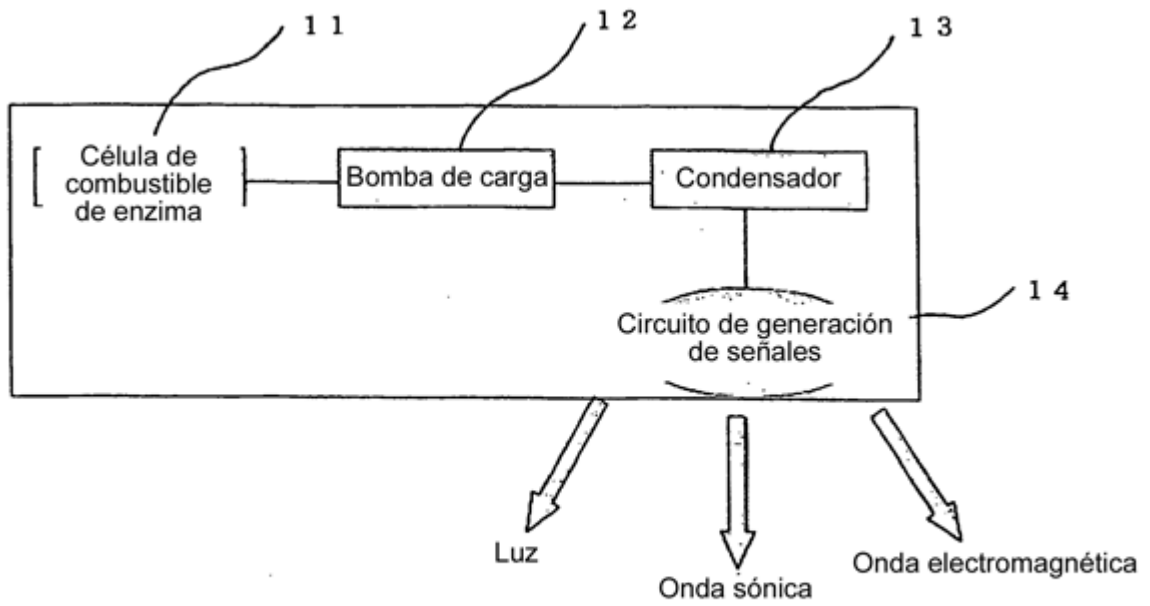


Fig.2

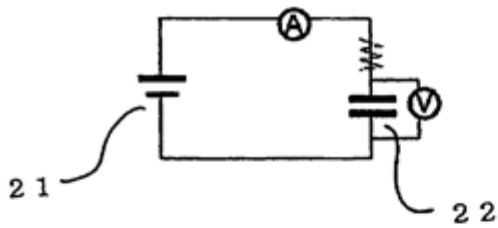


Fig.3

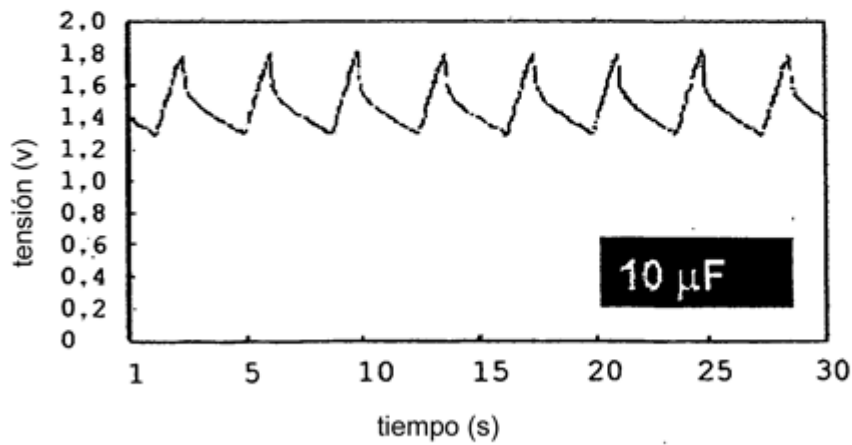


Fig. 4

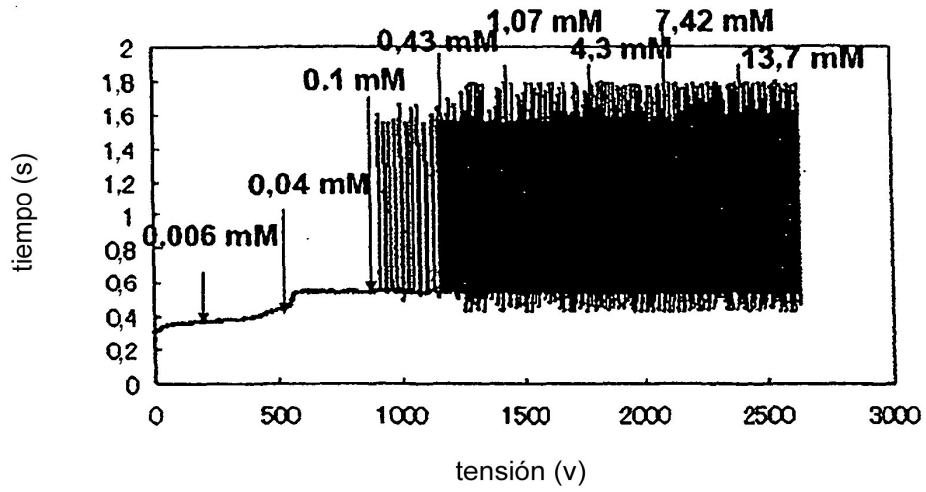


Fig. 5

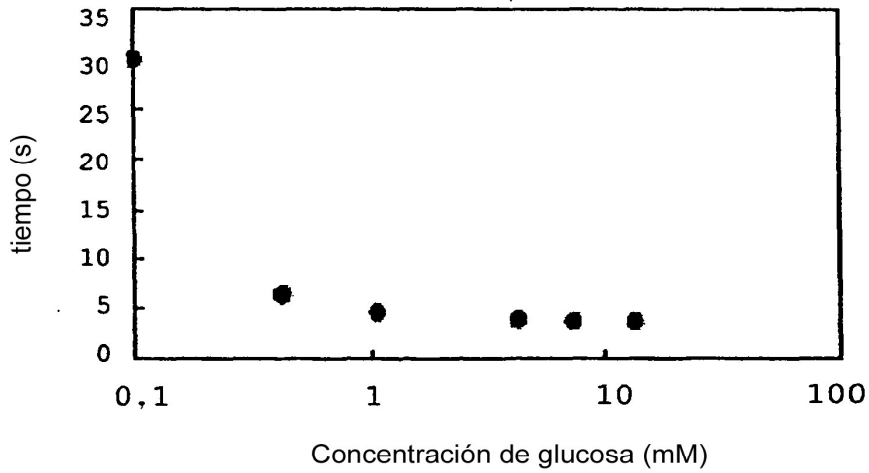


Fig. 6A

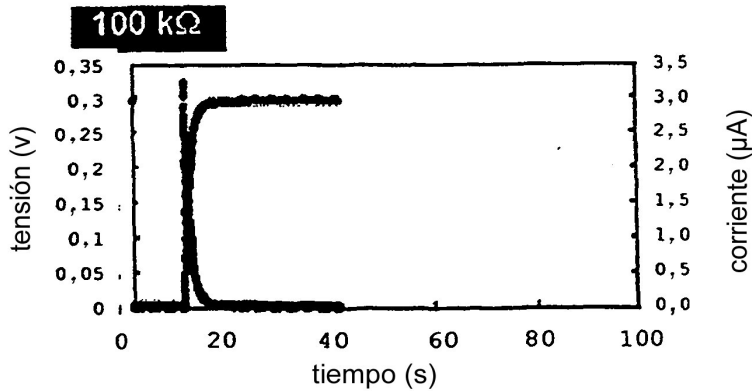


Fig. 6B

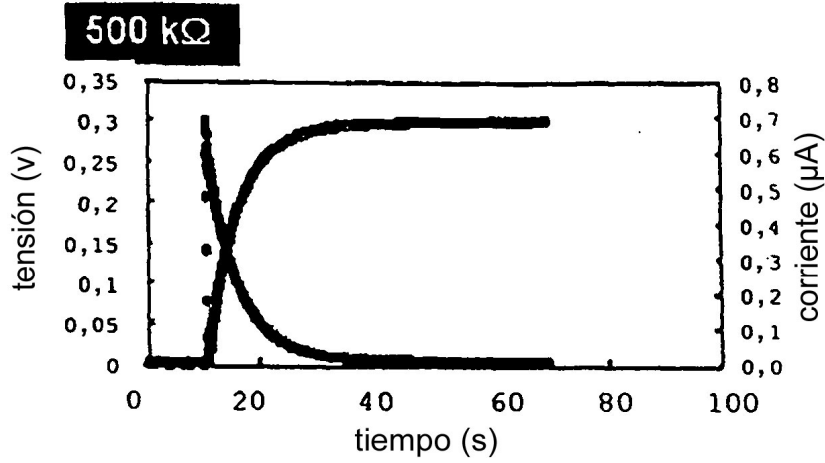


Fig. 6C

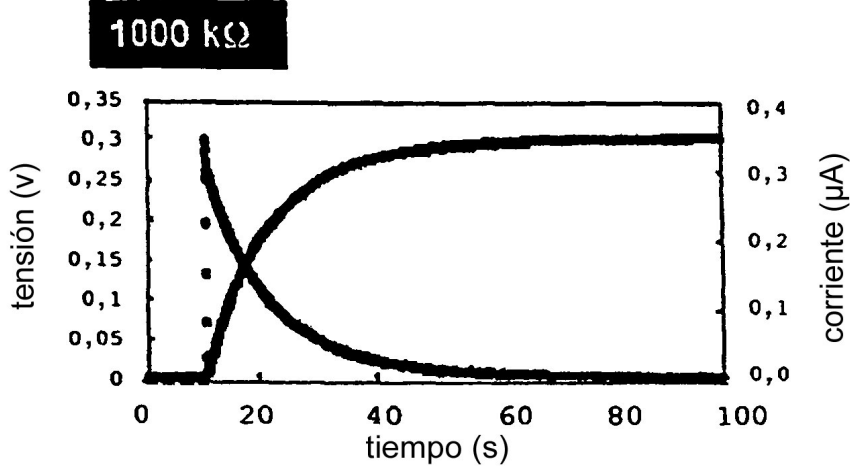


Fig. 7A

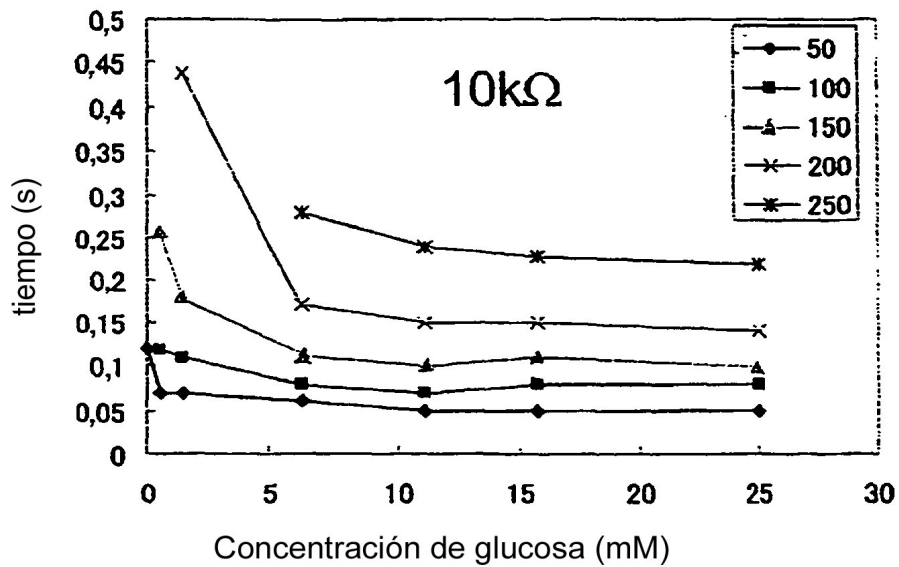




Fig. 7B

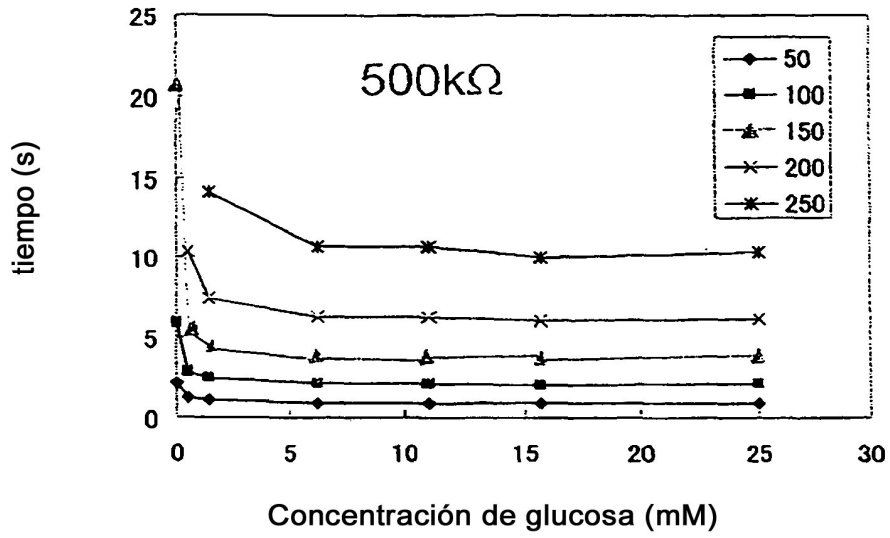


Fig. 8A

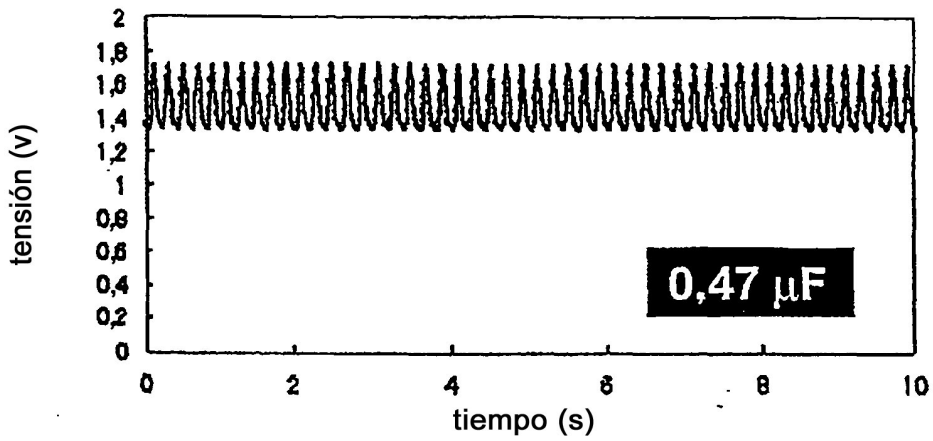


Fig. 8B

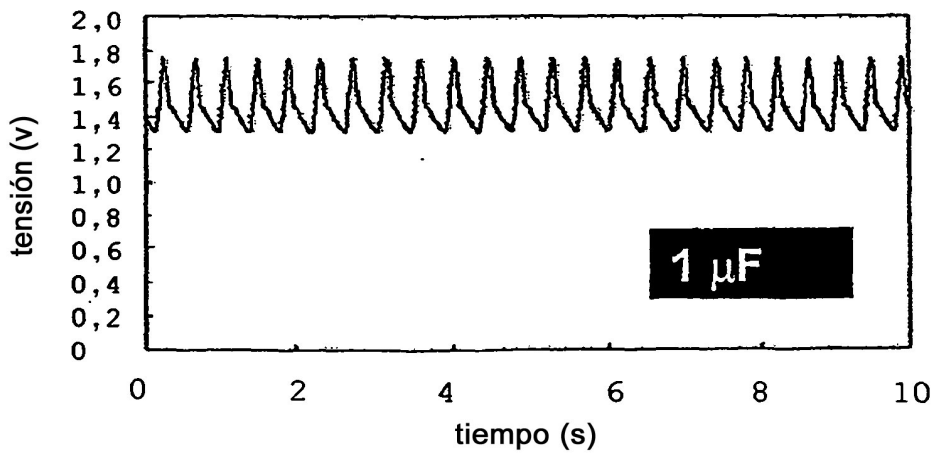


Fig.8C

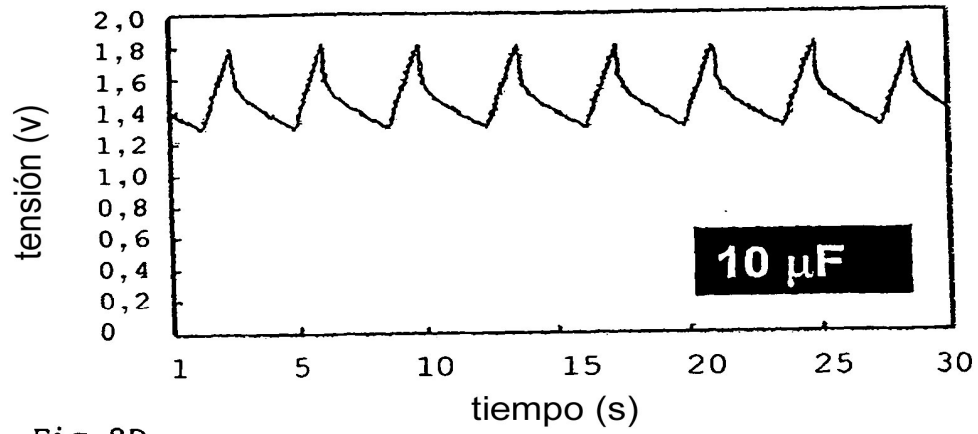


Fig.8D

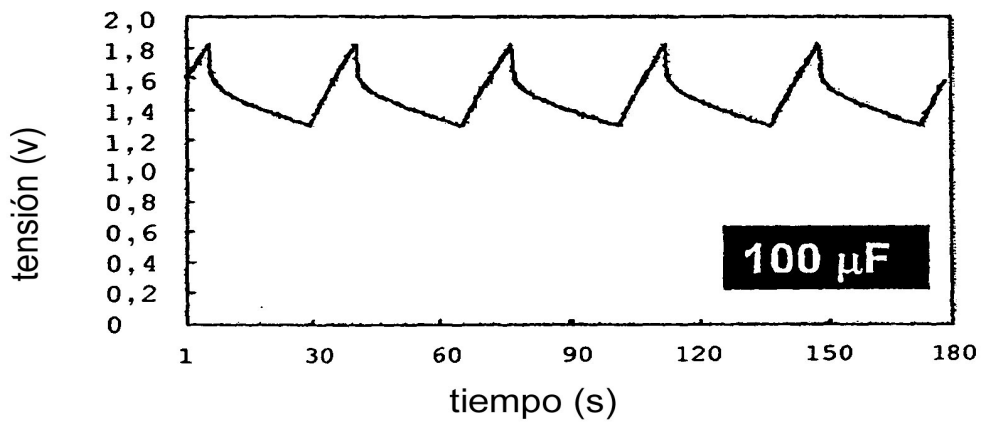


Fig. 9

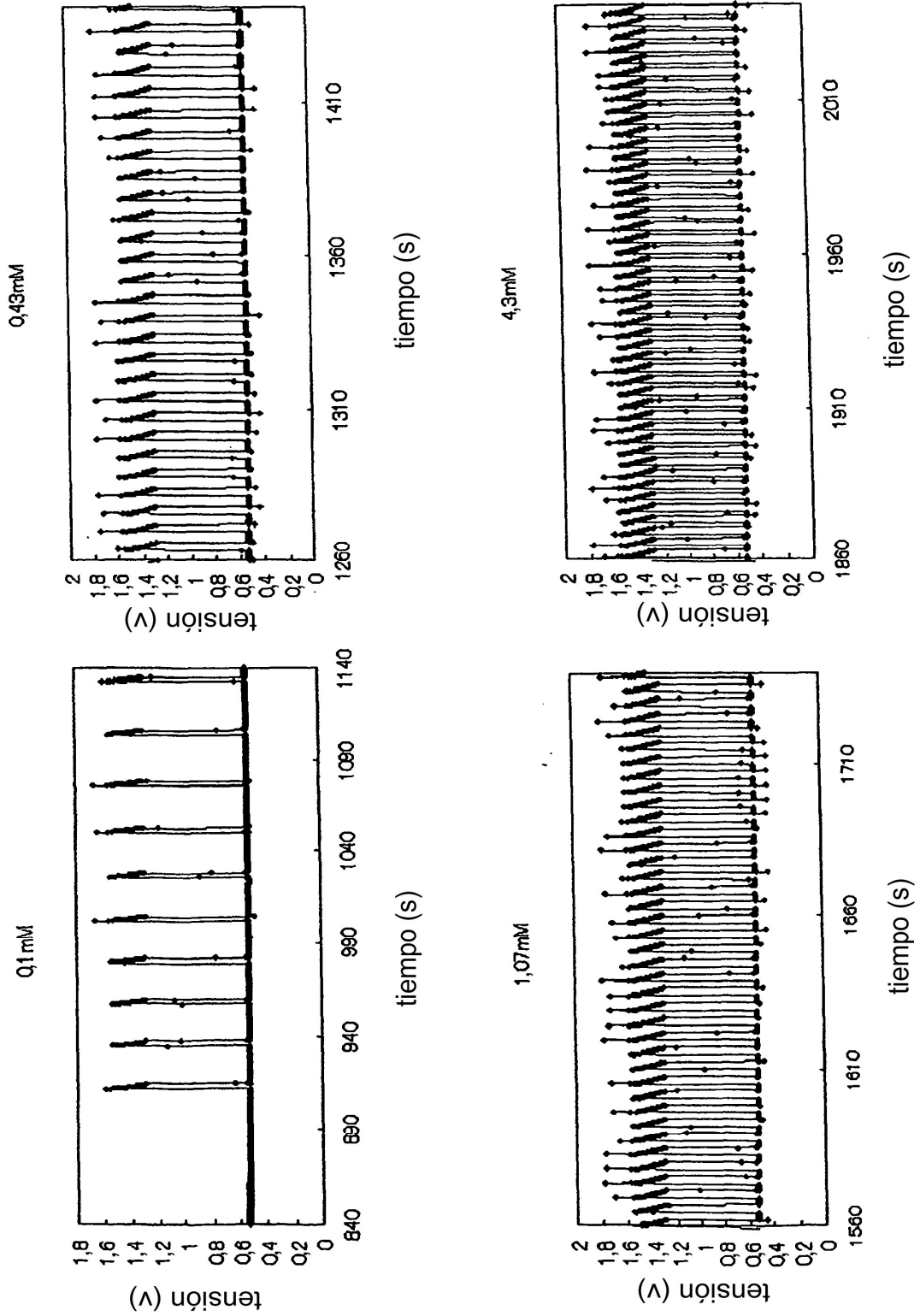


Fig.10

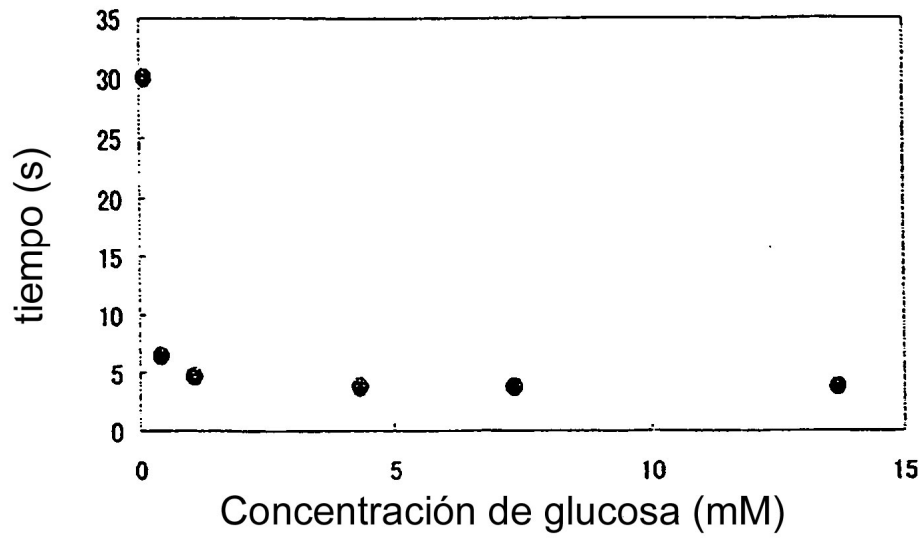


Fig.11

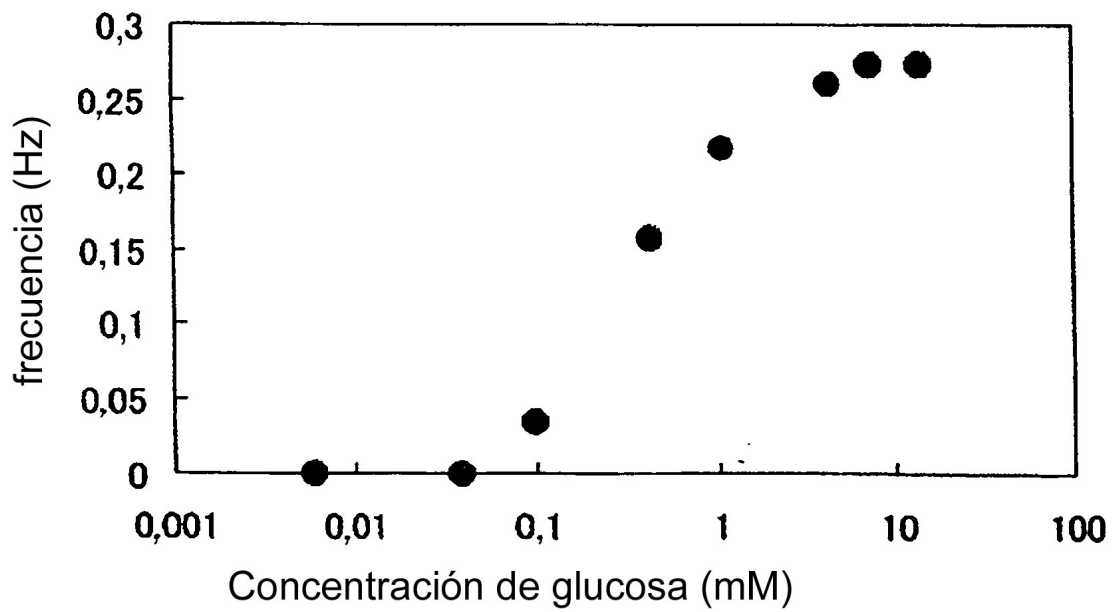


Fig.12

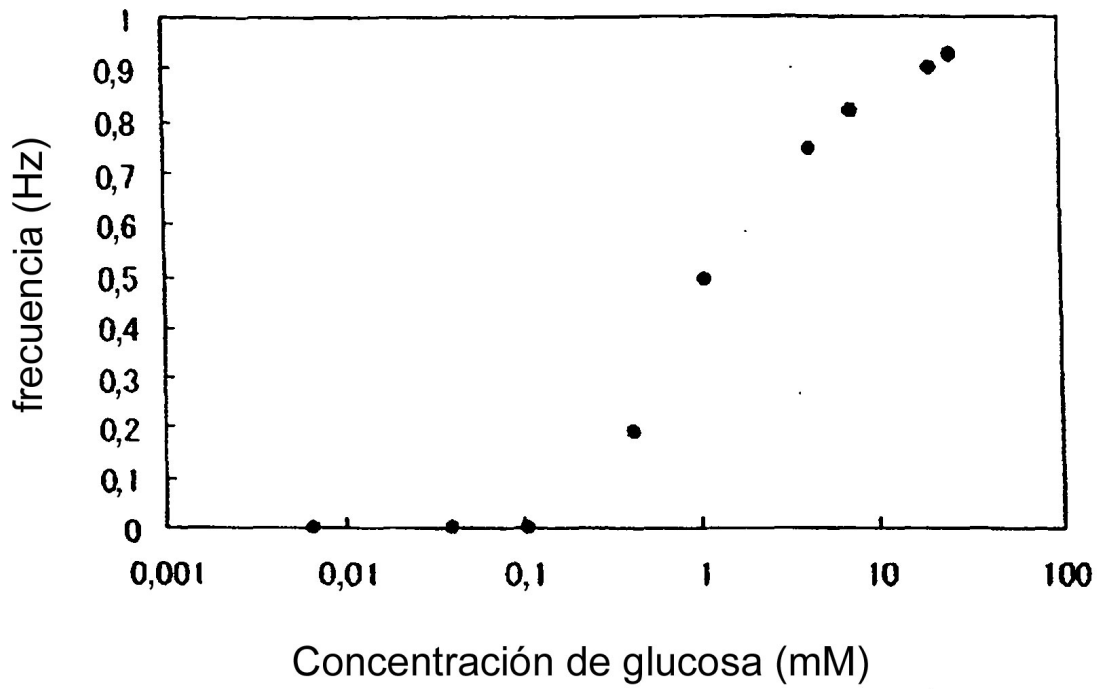


Fig.13

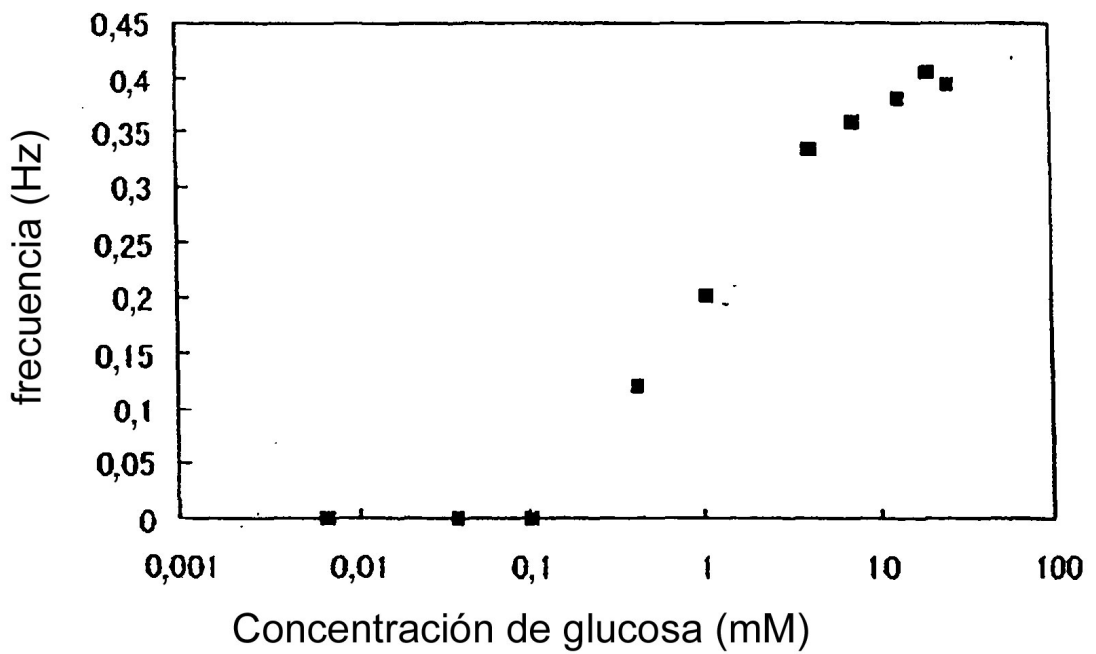


Fig.14

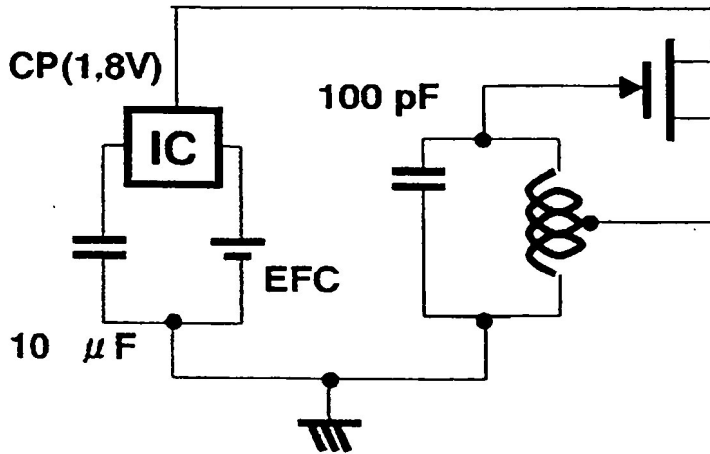


Fig.15

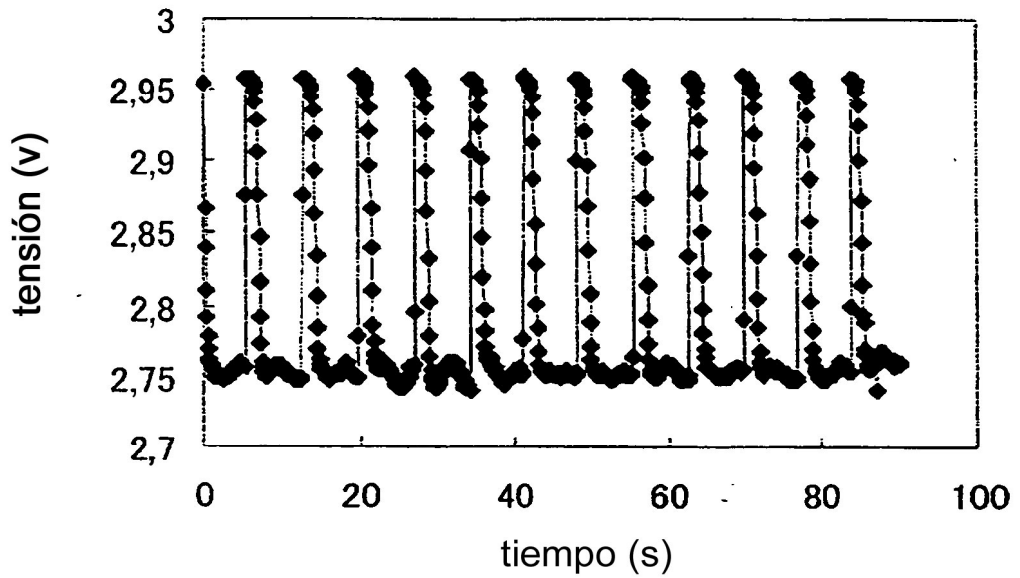


Fig.16

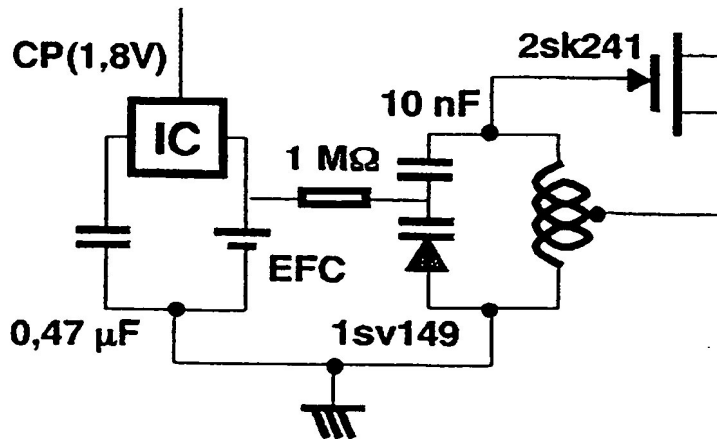


Fig.17

