

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 295**

51 Int. Cl.:

**G01N 27/327** (2006.01)

**G01N 27/30** (2006.01)

**G01N 27/416** (2006.01)

**C12Q 1/00** (2006.01)

**C12Q 1/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2008 E 13186241 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 2679990**

54 Título: **Electrodo enzimático**

30 Prioridad:

**18.09.2007 JP 2007240812**

**12.05.2008 JP 2008124741**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**30.12.2015**

73 Titular/es:

**ULTIZYME INTERNATIONAL LTD. (33.3%)**

**1-13-16, Minami Meguro-ku**

**Tokyo 152-0013, JP;**

**BIOENGINEERING LABORATORIES, LLC (33.3%)**

**y**

**ARKRAY, INC. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**TSUGAWA, WAKAKO y**

**SODE, KOJI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 555 295 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

Electrodo enzimático

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un electrodo enzimático sobre el que se sustenta una tinta que contiene glucosa-deshidrogenasa, en particular, un electrodo enzimático usado como sensor de la glucosa, y un método para producir el electrodo enzimático.

**Antecedentes de invención**

10 Un electrodo enzimático normalmente se refiere a un electrodo en el que se fija una enzima sobre la superficie de un electrodo tal como un electrodo de oro, un electrodo de platino, o un electrodo de carbono. Aprovechándose de la especificidad de la reacción de la enzima, el electrodo enzimático se ha usado ampliamente como un biosensor para detectar específicamente diversas sustancias fisiológicamente activas. En particular, el electrodo enzimático se puede usar como un sensor de la glucosa para medir la concentración de glucosa en sangre como un marcador importante en la diabetes.

15 Ejemplos de óxidorreductasas usadas para un electrodo enzimático incluyen deshidrogenasas representadas por la glucosa-deshidrogenasa (GDH), y oxidasas representadas por la glucosa-oxidasa (GOD). La GOD tiene una alta especificidad de sustrato respecto a la glucosa y una excelente estabilidad térmica. Ya que es posible la producción en masa de esta enzima, su coste de producción es inferior al de otras enzimas, lo cual resulta ventajoso. También, un sistema que usa GDH es poco probable que se vea influido por el oxígeno disuelto en una muestra para hacer medidas. Por lo tanto, incluso cuando la medida se lleva a cabo bajo condiciones de baja presión parcial de oxígeno o incluso cuando la medida se lleva a cabo con una alta concentración de muestra, lo que requiere una gran cantidad de enzima, la glucosa se puede medir de forma precisa.

20 En los casos donde estas óxidorreductasas se aplican al electrodo enzimático, ha habido el problema de que el valor de la corriente de respuesta del electrodo es bajo. Por lo tanto, con el fin de mejorar el valor de la corriente de respuesta del electrodo, los inventores de la presente invención propusieron un electrodo enzimático que tuviese una proteína de transferencia de electrones junto con un mediador de electrones (véase el documento de patente 2, más adelante).

25 El mediador de electrones se refiere a una sustancia redox, tal como un complejo metálico no proteínico o un compuesto orgánico, siendo la sustancia capaz de mediar en la transferencia de electrones desde una óxidorreductasa a un electrodo. Ejemplos de ellos incluyen ferricianuro de potasio, metosulfato de fenazina, ferroceno y sus derivados.

30 Proteína de transferencia de electrones se refiere a una proteína capaz de ser reducida por los electrones que recibe procedentes de un donador de electrones y que luego se oxida donando los electrones a un aceptor de electrones en un sistema de oxidación-reducción en el cuerpo. Ejemplos de la transferencia de electrones incluyen el citocromo b y el citocromo c, y preferiblemente el citocromo b562 o similares.

35 En el documento de patente 1, una proteína de transferencia de electrones, junto con una óxidorreductasa, se inmoviliza sobre un electrodo, y por eso se puede promover la transferencia de electrones desde un elemento redox al electrodo o a un mediador de electrones, obteniendo por ello un electrodo enzimático con un alto valor de la corriente de respuesta.

40 Para la medida de la concentración de glucosa usando estos electrodos enzimáticos, en general, se pone una solución reguladora en una celda con termostato, y se añade a ella una coenzima,  $\text{CaCl}_2$  y el mediador de electrones. Se mantiene luego la mezcla a temperatura constante. Después de eso, como electrodo de trabajo, por ejemplo, se usa un electrodo enzimático en el que se inmoviliza una enzima sobre un electrodo de carbono. Y se usan un contraelectrodo (por ejemplo, electrodo de platino) y un electrodo de referencia (por ejemplo, electrodo de  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ). Se aplica un voltaje constante al electrodo de carbono anteriormente mencionado y después de que la corriente eléctrica alcance un estado estacionario, se añade la muestra que contiene glucosa y luego se mide el aumento en la corriente eléctrica.

45 Por eso, estos métodos convencionales requieren el mediador de electrones que se va a incluir en el electrodo, que va a estar inmovilizado sobre la superficie del electrodo, o que se va a añadir a la celda con termostato como una solución acuosa. Y, se necesita proporcionar, por separado, el mediador de electrones y la óxidorreductasa. Por lo tanto, el procedimiento era complicado y hubo problemas con el coste de la producción en masa.

Documento de patente 1: JP 2003-121407 A

Documento de patente 2: WO 02/73181

Documento de patente 3: WO 2005/023111

El documento WO 2007/055100 describe un electrodo enzimático elaborado mezclando un polvo de carbono que tiene un nanonivel de partículas de platino sobre él, con una glucosa-deshidrogenasa cuya coenzima es el dinucleótido de flavina-adenina.

5 En el Analytical Chimica Acta, 192(2): 339-343, 1987, Pelleschi et al., se construyen sensores de glucosa inmovilizando glucosa-deshidrogenasa sobre electrodos de carbono y de platino.

En WO 03/021247 se describen biosensores que comprenden una macromolécula inmovilizada en la superficie de un electrodo.

### Descripción de la invención

Problemas que se van a resolver mediante la invención

10 Un objeto de la presente invención es proporcionar un electrodo enzimático, que no requiere que se use un mediador de electrones y que no es inferior a los que usan el mediador de electrones, permitiendo que se obtenga un alto valor de la corriente de respuesta y que se obtenga un amplio intervalo dinámico, en particular cuando se usa como un sensor de la glucosa.

Medios para resolver los problemas

15 En la presente invención, se ha descubierto que, cuando un electrodo enzimático como el reivindicado compuesto de una capa enzimática que contiene partículas de carbono, sobre la que se sustenta la glucosa-deshidrogenasa, y se usa una capa de electrodo que está en contacto con las partículas de carbono anteriormente mencionadas, como un sensor para medir glucosa, en el que el diámetro de las partículas de carbono anteriormente mencionadas no es superior a 100 nm, y su superficie específica es de al menos 200 m<sup>2</sup>/g, los electrones se transfieren uniformemente  
20 entre la capa de electrodo anteriormente mencionada y las partículas de carbono que sustentan la glucosa-deshidrogenasa, y por eso se puede lograr la función como electrodo enzimático.

Por lo tanto, la presente invención permite que se aumente la corriente de respuesta en el electrodo enzimático anteriormente compuesto, ajustando el diámetro de partícula y la superficie específica de la partícula de carbono sobre la que se sustenta la glucosa-deshidrogenasa, sin tener en cuenta la forma o el tamaño del material del  
25 electrodo que está en contacto con la partícula de carbono sobre la que se sustenta la glucosa-deshidrogenasa.

La estructura concreta de la presente invención es como sigue:

(1) Un electrodo enzimático que comprende una capa enzimática que contiene partículas de carbono que llevan glucosa-deshidrogenasa (GDH) con dinucleótido de flavina-adenina (FAD) como una coenzima; y una capa de  
30 electrodo en contacto con dichas partículas de carbono, en la que las partículas de carbono consisten en partículas de carbono con un diámetro de partícula de no más de 100 nm y una superficie específica de al menos 200 m<sup>2</sup>/g, y en el que la capa de electrodo está compuesta de metal.

(2) El electrodo enzimático según (1), en el que la glucosa-deshidrogenasa (GDH) es una subunidad catalítica de óxidorreductasa y una subunidad de transferencia de electrones.

(3) El electrodo enzimático según (1) ó (2), en el que la capa de electrodo está compuesta de alambre de  
35 metal.

(4) Un sensor de glucosa que comprende el electrodo enzimático según cualquiera de (1) a (3).

(5) Un método para producir en electrodo enzimático según la reivindicación 5.

(6) El método según (5), en el que la glucosa-deshidrogenasa (GDH) es una subunidad catalítica de  
40 óxidorreductasa o un complejo de una subunidad catalítica de óxidorreductasa y una subunidad de transferencia de electrones.

La partícula de carbono usada en la presente invención, sobre la cual se sustenta la glucosa-deshidrogenasa (GDH) con dinucleótido de flavina-adenina como una coenzima, se caracteriza por su pequeño diámetro de partícula y una gran superficie específica. Se usa la partícula de carbono que tiene un diámetro de partícula de no más de 100 nm y una  
45 superficie específica de al menos 200 m<sup>2</sup>/g y se prefiere un diámetro de partícula de no más de 50 nm y una superficie específica de al menos 200 m<sup>2</sup>/g. Ejemplos de semejante partícula de carbono incluyen negro Ketchen que se puede conseguir comercialmente (diámetro de partícula de 34 nm, superficie específica de 1400 m<sup>2</sup>/g), VULCAN (diámetro de partícula de 30 nm, superficie específica de 254 m<sup>2</sup>/g) y Lion Paste (una marca de fábrica de Lion Corporation) que contiene negro Ketchen.

En la presente invención, las partículas de carbono anteriormente mencionadas se mezclan junto con la glucosa-deshidrogenasa usando el dinucleótido de flavina-adenina (FAD) como una coenzima (en la presente memoria  
50 descriptiva, referida como "FADGDH") para preparar un material que constituye una tinta que compone un electrodo

enzimático. El material que constituye una tinta se puede producir añadiendo un disolvente, por ejemplo, una solución acuosa de propanol a las partículas de carbono, por ejemplo negro Ketchen, y realizando bien la mezcla.

En la presente invención, el electrodo enzimático se produce, en general, revistiendo una capa de electrodo con el material anteriormente mencionado que constituye una tinta.

- 5 Para la capa de electrodo usada en la presente invención, se usa un metal. Se prefiere usar un alambre de metal, más preferiblemente un alambre de oro o un alambre inoxidable.

10 La glucosa-deshidrogenasa usada en la presente descripción puede ser una óxidorreductas modificada en la que parte de la óxidorreductasa natural está modificada químicamente. Semejante enzima modificada se puede producir, por ejemplo, sustituyendo uno o más residuos aminoácido de la proteína con otros residuos aminoácido que se producen de forma natural o de forma no natural, o suprimiendo o añadiendo uno o más aminoácidos.

15 Como se describió anteriormente, el electrodo enzimático según la presente invención no requiere el mediador de electrones en la transferencia de electrones a la capa electrodo ajustando el diámetro de partícula y la superficie específica de la partícula de carbono sobre la que se sustenta la glucosa-deshidrogenasa. La glucosa-deshidrogenasa usada en la presente invención está, desde el punto de vista de las funciones, compuesta de una subunidad catalíticamente activa que tiene una actividad de deshidrogenación de la glucosa y una subunidad de transferencia de electrones que comprende una proteína de transferencia de electrones para ceder electrones proporcionados a partir de la subunidad catalítica anteriormente mencionada a la capa de electrodo. En este caso, en la presente invención, se puede usar sola la subunidad catalítica como óxidorreductasa, o se puede usar como un complejo de la subunidad catalítica y la subunidad de transferencia de electrones.

20 La subunidad catalítica tiene funciones de sacar un electrón de la glucosa de una muestra y donar este electrón a la subunidad de transferencia de electrones. Se usa la subunidad catalítica FADGDH con dinucleótido de flavina-adenina (FAD) como una coenzima. Por lo tanto, se proporciona el electrón a la subunidad de transferencia de electrones desde la subunidad catalítica a través de la FAD reducida.

25 Se establece el contenido de la subunidad catalíticas en, por ejemplo, una cantidad que corresponde a de 5 a 100 U en términos de actividad. Aquí, se conoce la definición de 1 unidad de enzima (1 U) para cada enzima. Por ejemplo, en el caso de la GDH, cuando se mide con el tiempo la decoloración basada en la reducción del DCIP (2,6-dicloroindofenol) bajo condiciones estándar de ensayo (pH 6,0; 37°C), a una longitud de onda de absorción de 600 nm, que es la longitud de onda de absorción del DCIP, se define 1 unidad como la cantidad de enzima que oxida 1  $\mu\text{M}$  de glucosa cada minuto (el coeficiente de extinción molar es de  $4,76 \times 1000 \mu\text{M}/\text{cm}$ ).

30 La FADGDH no está particularmente limitada, siempre que sea una subunidad catalítica que tenga una actividad de deshidrogenación de la glucosa, o un complejo de FADGDH en el que se une una subunidad de transferencia de electrones a la subunidad catalítica anteriormente mencionada. Entre ellas se prefiere usar la *Burkholderia capacia*, en particular la cepa *Burkholderia capacia* KS1 (en esta memoria descriptiva referida como "cepa KS1").

35 La cepa KS1 es una nueva cepa aislada del suelo en las proximidades de una fuente termal, e identificada como *Burkholderia capacia* basándose en sus propiedades micológicas. Se ha remitido al International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón, 305 – 8566), con el número de referencia FERM BP-7306 desde el 25 de septiembre de 2000. En el documento WO 02/36779 se describen detalles de la cepa KS1. Puede producir GDH que contiene la subunidad  $\alpha$  (peso molecular de aproximadamente 60 kDa) que es una subunidad catalítica, la subunidad  $\beta$  (peso molecular de aproximadamente 43 kDa) que corresponde al citocromo c que es una subunidad de transferencia de electrones y la subunidad  $\gamma$  (peso molecular de aproximadamente 14 kDa). El peso molecular se midió mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS bajo condiciones de reducción.

45 Con el fin de producir el electrodo enzimático según la presente invención, se mezcla bien la glucosa-deshidrogenasa o un complejo suyo junto con polvos de carbono y la mezcla resultante se fija sobre el electrodo. Con el fin de inmovilizar la glucosa-deshidrogenasa, o su complejo, sobre la partícula de carbono, después de fijarla sobre el electrodo, como se describió anteriormente, se realiza, por ejemplo, un tratamiento de reticulación usando un reactivo reticulante binario, tal como el glutaraldehído. Como alternativa, también se puede llevar a cabo una inmovilización usando un polielectrolito sólido. El Nafion es el que más se usa como polielectrolito sólido. Se puede hacer una película de enzima inmovilizada disolviendo el polielectrolito sólido, que incluye Nafion, en un disolvente tal como el isopropanol y añadiendo esta mezcla, gota a gota, a una película de enzima en la que hay absorbida una enzima, o se aplica y se seca; o mezclando la solución de Nafion con la enzima y secando.

55 El electrodo enzimático según la presente invención, en principio, opera sin un mediador de electrones. Sin embargo, no se descarta el uso del mediador de electrones. En los casos donde se usa el mediador de electrones, no está particularmente limitado y, por ejemplo, se puede usar ferricianuro de potasio, metosulfato de fenazina, complejos de rutenio o similares.

5 En los casos donde se usa el electrodo enzimático según la presente invención como sensor de la glucosa, el electrodo enzimático anteriormente mencionado se usa como electrodo de trabajo. Como contraelectrodo se puede usar, por ejemplo, un electrodo de platino, y como electrodo de referencia se puede usar, por ejemplo, un electrodo de Ag/AgCl. Se pone una solución reguladora en una celda con termostato y se colocan estos electrodos. Luego se aplica un voltaje constante al electrodo de trabajo y después de que la corriente eléctrica alcanza un estado estacionario, se añade a la celda con termostato una muestra que contiene glucosa y se mide el aumento en la corriente eléctrica. De acuerdo con la curva de calibración preparada a partir de una solución de glucosa de concentraciones estándar, se puede calcular la concentración de glucosa en la muestra.

10 Además, cuando se usa como sensor de la glucosa, el electrodo enzimático puede estar compuesto de manera que, por ejemplo, la concentración de glucosa se pueda medir de forma continua y se puedan llevar a cabo varias medidas de glucosa sin interrupción. En este caso, el sensor de la glucosa comprende además un elemento colector para recoger sangre o fluido intersticial de los tejidos subcutáneos, y está compuesto de manera que permita que la sangre o el fluido intersticial recogido por el elemento colector se ponga en contacto con el electrodo.

15 El sensor de glucosa anteriormente mencionado puede estar compuesto de manera que al menos una porción del electrodo esté embebido en los tejidos subcutáneos, y se use. En este caso, el electrodo se forma sobre un sustrato aislante.

20 El electrodo enzimático según la presente invención se puede usar como el ánodo de una celda enzimática de combustible. En este caso, se puede usar como combustible un sustrato según la especificidad de la enzima como sustrato. Para el cátodo, se puede usar un electrodo de platino con soporte de carbono, un electrodo de platino o similares y se puede construir una celda enzimática de combustible sin una pared divisoria. Como solución de reacción, se puede usar una solución reguladora común, tal como una solución reguladora de fosfato. Además se puede usar en fluidos corporales. Se puede ajustar la fuerza electromotriz cambiando el valor de la resistencia que se aplica a un circuito externo.

#### Breve descripción de los dibujos

25 Figura 1. La Figura 1 muestra la correlación entre la concentración de glucosa y el valor de la corriente eléctrica cuando se usa negro Ketchen en la capa de enzima FADGDH inmovilizada y se usó negro Ketchen en la capa de electrodo.

30 Figura 2. La Figura 2 muestra la correlación entre la concentración de glucosa y el valor de la corriente eléctrica cuando se usó la pasta de carbono en la capa de enzima FADGDH inmovilizada, y se usó negro Ketchen en el material del electrodo.

Figura 3. La Figura 3 muestra la correlación entre la concentración de glucosa y el valor de la corriente eléctrica cuando se usó negro Ketchen en la capa de enzima FADGDH inmovilizada, y se usó la pasta de carbono en el material del electrodo.

35 Figura 4. La Figura 4 muestra la correlación entre la concentración de glucosa y el valor de la corriente eléctrica cuando se usó la pasta de carbono en la capa de enzima FADGDH inmovilizada, y se usó pasta de carbono en el material del electrodo.

Figura 5. La Figura 5 muestra la correlación entre la concentración de glucosa y el valor de la corriente eléctrica cuando se usó negro Ketchen, Lion Paste, VULCAN y negro Denka en la capa de enzima FADGDH inmovilizada y se usó el carbono vítreo en el material del electrodo.

40 Figura 6. La Figura 6 muestra la correlación entre la superficie específica de la partícula de carbono de la capa de enzima inmovilizada y el valor de la corriente de respuesta.

Figura 7. La Figura 7 muestra la correlación entre la concentración de glucosa y el valor de la corriente eléctrica cuando se usó Lion Paste (W-311N, W-370) en la capa de enzima FADGDH inmovilizada y se usó el carbono vítreo en el material del electrodo.

45 Figura 8. La Figura 8 muestra la correlación entre la concentración de glucosa y el valor de la corriente eléctrica cuando se usó VULCAN en la capa de enzima FADGDH inmovilizada y se usó el VULCAN en el material del electrodo.

50 Figura 9. La Figura 9 muestra la correlación entre la concentración de glucosa y el valor de corriente eléctrica cuando se usó Lion Paste (W-311N) en la capa de enzima FADGDH inmovilizada y se usó el alambre de oro en el material del electrodo.

Figura 10. La Figura 10 muestra la correlación entre la concentración de glucosa y el valor de corriente eléctrica cuando se usó Lion Paste (W-311N) en la capa de enzima FADGDH inmovilizada y se usó el alambre de acero inoxidable en el material del electrodo.

Figura 11. La Figura 11 muestra la correlación entre la concentración de glucosa y el valor de corriente eléctrica cuando se usó Lion Paste (W-311N) en la capa de enzima FADGDH inmovilizada y se usó el electrodo integral de acero inoxidable en el material del electrodo.

5 Figura 12. La Figura 12 muestra un electrodo que se puede conseguir comercialmente, hecho sustentando partículas de carbono sobre el sustrato polimérico.

Figura 13. La Figura 13 muestra una curva de respuesta después de que las muestras que contienen glucosa se añadieran, gota a gota, al electrodo enzimático, elaborado aplicando la tinta enzimática sobre el electrodo mostrado en la Figura 12, y de que se aplicase el potencial eléctrico.

10 Figura 14. La figura 14 muestra, en la curva de respuesta mostrada en la Figura 13, la correlación entre la concentración de glucosa en la muestra y el valor de la corriente eléctrica 5, segundos después de la aplicación del potencial eléctrico.

### Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención se describirá ahora con detalle por medio de ejemplos; sin embargo, la presente invención no se limita a ello. Los Ejemplos 1 a 5 y 9 no forman parte de la invención.

15 Ejemplos en el caso de usar partículas de carbono como capa de electrodo

En primer lugar, se muestran los ejemplos en los casos donde se usan partículas de carbono tanto para la capa de electrodo como para la capa enzimática.

#### Ejemplo 1

20 Se proporciona como partícula de carbono, negro Ketchen (de ahora en adelante referido como KB) con un diámetro de partícula de 34 nm, una superficie específica de 1400 m<sup>2</sup>/g, y una porosidad del 78% en volumen. Al KB (100 mg) se le añadió agua Milli Q (400 µl) y Nafion al 5% (solución acuosa de 1-propanol al 48%) (1 ml). Se realizó bien la mezcla y se dejó reposar durante 3 días para proporcionar una tinta de KB. Se usó una mezcla de solución reguladora de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) (10 µl) y 8,4 U/ml de FADGDH (40 µl) con la tinta KB (10 µl) como una tinta FADGDH/KB. A un electrodo integral (φ 0,4 mm), lleno de KB como material del electrodo, se añadió, gota a gota, la tinta FADGDH/KB para obtener 25 U/mm<sup>2</sup> y se secó a 4°C durante 2 horas. Se usó el electrodo enzimático preparado como electrodo de trabajo, se usó Pt como contraelectrodo y se usó el electrodo de referencia de Ag/AgCl como electrodo de referencia. La Figura 1 muestra los resultados de las medidas de un valor de la corriente de respuesta tras la adición de glucosa, cuando se aplicó un potencial eléctrico de +250 mV frente a Ag/AgCl usando solución reguladora de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) (10 ml) como solución de reacción en un sistema de tres electrodos. La medida se llevó a cabo a 37°C, mientras que la solución de la reacción estaba siendo agitada a 250 rpm. El valor de la corriente de respuesta se definió como la diferencia obtenida al restar el valor de la corriente eléctrica obtenida con una glucosa 0 mM, del valor medido a cada concentración de glucosa.

35 Como se muestra en la Figura 1, aumentando gradualmente la concentración de glucosa, aumentó el valor observado de la corriente eléctrica. A una concentración final 55 mM de glucosa, el valor de la corriente de respuesta era de aproximadamente 1500 nA. A 5 mM de glucosa, la densidad de corriente era de 6998 nA/mm<sup>2</sup>. Se confirmó que, cuando se usó la partícula de carbono de KB, con un diámetro de partícula de no más de 100 nm, y una superficie específica de al menos 200 m<sup>2</sup>/g, se obtuvo un valor de corriente de respuesta suficiente.

#### Ejemplo comparativo 1

40 Se preparó un electrodo enzimático con los mismos procedimientos que los descritos en el Ejemplo 1, excepto que en vez de KB se usó, como partícula de carbono, CP que tenía un diámetro de partícula de 7000 nm y una superficie específica de 1 m<sup>2</sup>/g. Es decir, al CP (100 mg), se le añadió agua Milli Q (400 µl) y Nafion al 5% (solución acuosa de 1-propanol al 48%) (1 ml). Se realizó bien la mezcla y se dejó reposar durante 3 días para proporcionar una tinta de CP. Se usó una mezcla de solución reguladora de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) (10 µl) y 8,4 U/ml de FADGDH (40 µl) con la tinta CP (10 µl) como una tinta FADGDH/CP. A un electrodo integral (φ 0,4 mm), lleno de KB como material del electrodo, se añadió, gota a gota, la tinta FADGDH/CP para obtener 25 U/mm<sup>2</sup> y se secó a 4°C durante 2 horas. Se usó el electrodo enzimático preparado como electrodo de trabajo, se usó Pt como contraelectrodo, y se usó el electrodo de referencia de Ag/AgCl como electrodo de referencia. La Figura 3 muestra los resultados de las medidas de un valor de la corriente de respuesta tras la adición de glucosa cuando se aplicó un potencial eléctrico de +250 mV frente a Ag/AgCl usando solución reguladora de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) (10 ml) como solución de reacción en un sistema de tres electrodos. La medida se llevó a cabo a 37°C, mientras que la solución de la reacción estaba siendo agitada a 250 rpm. El valor de la corriente de respuesta se definió como la diferencia obtenida al restar el valor de la corriente eléctrica obtenida con una glucosa 0 mM, del valor medido a cada concentración de glucosa.

55 Como se muestra en la Figura 2, aumentando gradualmente la concentración de glucosa, aumentó el valor observado de la corriente eléctrica. A una concentración final 55 mM de glucosa, el valor de la corriente de

respuesta era de aproximadamente 800 nA. Con una glucosa 5 mM, la densidad de corriente era de 3160 nA/mm<sup>2</sup>. Se confirmó que, comparando la Figura 1 y la Figura 2, en los casos donde se usó el electrodo integral lleno con el mismo KB como una capa de electrodo, el valor de la corriente de respuesta disminuyó desde 1500 nA a aproximadamente 800 nA cambiando del material que constituye la tinta con la que este electrodo está revestido, de la tinta FADGDH/KB a la tinta FADGDH/CP. Es decir, se confirmó que, cuando se usaba la misma capa de electrodo, cuanto más pequeño era el diámetro de partícula de la partícula carbono sobre la que se sustentaba la enzima y más grande era la superficie específica, mayor se hacía la corriente de respuesta.

#### Ejemplo 2

Al KB (100 mg), se añadió agua Milli Q (400 µl) y Nafion al 5% (solución acuosa en propanol al 48%) (1 ml). Se realizó bien la mezcla y se dejó reposar durante 3 días para proporcionar una tinta KB. Se usó una mezcla de solución reguladora de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) (10 µl) y 8,4 U/ml de FADGDH (40 µl) con la tinta KB (10 µl) como una tinta FADGDH/KB. A un electrodo integral (φ 0,4 mm), lleno de pasta de carbono (CP) como material del electrodo, se añadió, gota a gota, la tinta FADGDH/CP para obtener 25 U/mm<sup>2</sup> y se secó a 4°C durante 2 horas. La Figura 3 muestra la correlación entre el valor de la corriente eléctrica en estado estacionario y la concentración de glucosa en la solución de la reacción. Como se muestra en la Figura 3, en el caso de la presente enzima, el valor de la corriente eléctrica a 55 mM era de aproximadamente 110 nA incluso aunque se use la mismo área del electrodo y la misma cantidad de la enzima. La densidad de corriente del presente electrodo enzimático con una glucosa 5 mM era de 690 nA/mm<sup>2</sup>.

#### Ejemplo comparativo 2

Se preparó un electrodo enzimático con los mismos procedimientos que los descritos en el Ejemplo 1, excepto que en vez de KB se usó, como partícula de carbono, pasta de carbono (de ahora en adelante referida como CP) que tenía un diámetro de partícula de 7000 nm y una superficie específica de 1 m<sup>2</sup>/g. A la CP (100 mg), se añadió agua Milli Q (400 µl) y Nafion al 5% (solución acuosa en propanol al 48%) (1 ml). Se realizó bien la mezcla y se dejó reposar durante 3 días para proporcionar una tinta CP. Se usó una mezcla de solución reguladora de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) (10 µl) y 8,4 U/ml de FADGDH (40 µl) con la tinta CP (10 µl) como una tinta FADGDH/CP. A un electrodo integral (φ 0,4 mm), lleno de CP como material del electrodo, se añadió, gota a gota, la tinta FADGDH/CP para obtener 25 U/mm<sup>2</sup> y se secó a 4°C durante 2 horas. La Figura 4 muestra la correlación entre el valor de la corriente eléctrica en estado estacionario y la concentración de glucosa en la solución de la reacción. Como se muestra en la Figura 4, en el caso del electrodo de FADGDH/CP, el valor de la corriente eléctrica a 55 mM era de aproximadamente 55 nA incluso aunque se usen el mismo área del electrodo y la misma cantidad de la enzima. La densidad de corriente del presente electrodo enzimático con una glucosa 5 mM era de 330 nA/mm<sup>2</sup>.

Se confirmó que, comparando la Figura 3 y la Figura 4, en los casos donde se usó el electrodo integral lleno con la misma CP como capa de electrodo, el valor de la corriente de respuesta disminuyó desde 690 nA a aproximadamente 55 nA, cambiando el material que constituye una tinta con la que se reviste este electrodo, de la tinta FADGDH/KB a la tinta FADGDH/CP. Es decir, se confirmó que, cuando se usó la misma capa de electrodo, cuanto más pequeño era el diámetro de partícula de la partícula carbono sobre la que se sustentaba la enzima y más grande era la superficie específica, mayor se hacía la corriente de respuesta.

#### Ejemplo 3

Con el fin de examinar la influencia de la superficie específica de una partícula de carbono sobre la que se sustenta la enzima, usando el mismo electrodo de carbono vítreo (GC) como una capa de electrodo, se midió la corriente de respuesta, usando como partícula de carbono, además del KB usado anteriormente, VULCAN (VC, una marca de fábrica de Cabot) que tiene un diámetro de partícula de 30 nm, y una superficie específica de 254 m<sup>2</sup>/g, Lion Paste (LP, una marca de fábrica de Lion Corporation) que es una pasta compuesta de negro de acetileno (Denka Black, DB, Denki Kagaku Kogyo Kabushiki Kaisha) que tiene un diámetro de partícula 35 nm y una superficie específica de 68 m<sup>2</sup>/g y KB.

En primer lugar, con el KB (100 mg) se mezclaron agua Milli Q (200 µl) y Nafion al 5% (1200 µl) para proporcionar una tinta KB. Con el VC (100 mg) se mezclaron agua Milli Q (200 µl) y Nafion al 5% (1200 µl) para proporcionar una tinta VC. Se mezcló la tinta KB y la tinta VC, la solución reguladora de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) y 4,6 U/µl de FADGDH, en una relación de volúmenes de 1:3,8:3,2, para proporcionar tinta enzimática KB y tinta enzimática VC, respectivamente. A continuación, con el DB (50 mg) se mezclaron agua Milli Q (850 µl) y Nafion al 5% (600 µl) para proporcionar una tinta DB. Se mezcló la tinta DB, la solución reguladora de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) y 4,6 U/µl de FADGDH, en una relación de volúmenes de 1:1,4:1,6, para proporcionar una tinta enzimática DB. También, usando Lion Paste con KB como componente principal, se mezcló Lion Paste W-311N, Nafion al 5%, solución reguladora de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) y 4,6 U/µl de FADGDH, en una relación de volúmenes de 1:1:4:4, para proporcionar tinta enzimática LP. Además, sin usar partículas de carbono, se mezclaron Nafion al 5%, solución reguladora de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) y 4,6 U/µl de FADGDH, en una relación de volúmenes de 1:5:4, para proporcionar una tinta enzimática.

Se añadió, gota a gota, tinta enzimática KB (tinta KB en la Figura 5), tinta enzimática VC (tinta KB en la Figura 5), tinta enzimática DB (tinta DB en la Figura 5), tinta enzimática Lion Paste (tinta LP en la Figura 5), o tinta enzimática (tinta en la Figura 5) (5  $\mu$ l), a un electrodo de carbono vítreo (GC) pulido ( $\phi$  3 mm) y se secó a 4°C durante 2 horas. Este electrodo fue sometido a un tratamiento de reticulación usando vapores de solución de glutaraldehído al 25%, durante 30 minutos y luego se sumergió en Tris-HCl 10 mM (pH 7,0) durante 20 minutos. Este electrodo se sumergió en solución reguladora de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) a 4°C durante una noche para que se equilibrase. En un sistema de tres electrodos que usa el electrodo enzimático preparado como electrodo de trabajo, Pt como contraelectrodo y Ag/AgCl como electrodo de referencia, y que usa también solución reguladora de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) (10 ml) como solución de reacción, se midió un valor de la corriente de respuesta tras la adición de glucosa cuando se aplicó un potencial eléctrico de +250 mV frente a Ag/AgCl, y se preparó una curva de calibración (150 rpm, 37°C).

Los resultados de las medidas de la glucosa, usando el electrodo enzimático así obtenido, se muestran en la Figura 5. A medida que aumentaba la concentración de glucosa, se observó un aumento en la corriente eléctrica en cualquiera de los electrodos enzimáticos. Entre ellos, cuando se usó la tinta enzimática KB o la tinta enzimática Lion Paste, se obtuvo una respuesta similar, siendo la respuesta excepcionalmente alta comparada con la de las otras tintas. Cuando se usó la tinta enzimática VC, se obtuvo la respuesta suficientemente alta para ser prácticamente aceptable, mientras que era inferior a la de las dos tintas anteriores. Por el contrario, cuando se usó la tinta enzimática DB, se obtuvo únicamente una señal tan baja como la del caso de usar la tinta enzimática sin partículas de carbono. La correlación entre el valor de la corriente de respuesta de estos sensores a una concentración 5 mM de glucosa y la superficie específica de la partícula de carbono de la tinta usada, se muestra en la Figura 6. Con VULCAN (VC), que tiene una superficie específica de 254 m<sup>2</sup>/g, se obtuvo una respuesta virtualmente satisfactoria, mientras que con el negro de acetileno que tiene una superficie específica de 68 m<sup>2</sup>/g, no se obtuvo una respuesta satisfactoria de corriente. Por eso, se demostró que había una elevada correlación entre el valor de la corriente de respuesta y la superficie específica de la partícula de carbono que se va a usar, y se requiere que la partícula de carbono tenga una superficie específica de al menos 200 m<sup>2</sup>/g para ser usada. También, se requería que el diámetro de partícula no fuera de más de 100 nm.

#### Ejemplo 4

Se mezclaron Nafion (5%), Lion Paste W-311N o W-370C, solución reguladora de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) y 8,5 U/ $\mu$ l de FADGDH, en una relación de volúmenes de 1:1:4:4, para proporcionar una tinta enzimática. Cada una de las tintas enzimáticas se añadió, gota a gota, al electrodo de carbono vítreo (GC) ( $\phi$  3 mm) de manera que la cantidad de FADGDH fuese de 17 U (2,4 U/mm<sup>2</sup>) y se secó a 4°C, durante 2 horas. Este electrodo fue sometido a un tratamiento de reticulación usando vapores de solución de glutaraldehído al 25%, durante 30 minutos y luego se sumergió en Tris-HCl 10 mM (pH 7,0), a temperatura ambiente durante 20 minutos, para retirar el glutaraldehído sin reaccionar. Este electrodo se sumergió en solución reguladora de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) durante 30 minutos para que se equilibrase. Usando éste como electrodo de trabajo, un alambre de platino como contraelectrodo y un electrodo de referencia de Ag/AgCl como electrodo de referencia, y usando también solución reguladora de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) (10 ml) como solución de reacción, se midió un valor de la corriente de respuesta tras la adición de glucosa cuando se aplicó un potencial eléctrico de +250 mV frente a Ag/AgCl. La medida se llevó a cabo a 37°C mientras que se agitaba la solución de reacción a 250 rpm. El valor de la corriente de respuesta se definió como la diferencia obtenida al restar el valor de la corriente eléctrica obtenida con una glucosa 0 mM del valor medido a cada concentración de glucosa.

Los resultados de las medidas de la glucosa usando el electrodo enzimático así obtenido se muestran en la Figura 7. A medida que aumentaba la concentración de glucosa, se observó un aumento en la corriente eléctrica en cualquiera de los electrodos enzimáticos. Cuando se usó Lion Paste W-311N o W-370C como partícula de carbono en la capa enzimática, la densidad de corriente observada a una concentración 5 mM de glucosa fue de 1694 nA/mm<sup>2</sup> o 1452 nA/mm<sup>2</sup>, respectivamente. Se confirmó que cuando se usó Lion Paste que tiene KB como componente principal, se obtuvo una alta respuesta de corriente independientemente de los tipos de productos.

#### Ejemplo 5

Como partícula de carbono se proporcionó VULCAN (VC) que tenía un diámetro de partícula de 30 nm y una superficie específica de 254 m<sup>2</sup>/g. Al VC (100 mg), se añadió agua Milli Q (400  $\mu$ l) y Nafion al 5% (solución acuosa en propanol al 48%) (1 ml). Se realizó bien la mezcla y se dejó reposar durante 3 días para proporcionar una tinta VC. Se usó una mezcla de solución reguladora de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) (10  $\mu$ l) y 8,4 U/ml de FADGDH (40  $\mu$ l) con la tinta VC (10  $\mu$ l) como una tinta FADGDH/KB. A un electrodo integral ( $\phi$  0,75 mm), lleno de VC como material del electrodo, se añadió, gota a gota, la tinta FADGDH/CP para conseguir 25 U/mm<sup>2</sup> y se secó a 4°C durante 2 horas. El electrodo enzimático preparado se usó como electrodo de trabajo, se usó Pt como contraelectrodo y se usó un electrodo de referencia de Ag/AgCl como electrodo de referencia. La Figura 5 muestra los resultados de la corriente de respuesta tras la adición de glucosa cuando se aplicó un potencial eléctrico de +250 mV frente a Ag/AgCl usando solución reguladora de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) (10 ml) como solución de reacción en un sistema de tres electrodos. La medida se llevó a cabo a 37°C mientras que la solución de reacción estaba siendo agitada a 250 rpm. El valor de la corriente de respuesta se definió como la diferencia obtenida al

restar el valor de la corriente eléctrica obtenida con una glucosa 0 mM, del valor eléctrico medido a cada concentración de glucosa.

Como se muestra en la Figura 8, aumentando gradualmente la concentración de glucosa, aumentó el valor de la corriente eléctrica observada. A una concentración final 55 mM de glucosa, el valor de la corriente de respuesta fue de aproximadamente 3500 nA. Con una glucosa 5 mM, la densidad de corriente fue de 2327 nA/mm<sup>2</sup>. Como se describió anteriormente, se confirmó que la tinta VC que usa VC que tiene un diámetro de partícula de 30 nm y una superficie específica de 254 m<sup>2</sup>/g, se obtuvo un valor satisfactorio de la corriente de respuesta cuando se usó un carbono vítreo para la capa de electrodo como se muestra en el Ejemplo 3, o cuando se usó VC para la capa de electrodo como se muestra en el presente ejemplo.

Como se describió anteriormente, se confirmó que cuando se usó la partícula de carbono tanto para la capa de electrodo como para la capa enzimática, si se usó el mismo tipo de partícula de carbono en la capa de electrodo, cuanto más pequeño era el diámetro de partícula de la partícula de carbono usado en la capa enzimática y mayor era su superficie específica, mayor se hacía la corriente de respuesta y, en particular, cuando se usó una partícula de carbono que tenía un diámetro de partícula de no más de 100 nm y una superficie específica de al menos 200 m<sup>2</sup>/g, se obtuvo una corriente de respuesta satisfactoria. Y, se confirmó también, que si se usaba el mismo tipo de partícula de carbono en la capa enzimática, cuanto más pequeño era el diámetro de partícula de la partícula de carbono usado en la capa de electrodo y mayor era su superficie específica, mayor se hacía la corriente de respuesta y, en particular, cuando se usó una partícula de carbono que tenía un diámetro de partícula de no más de 100 nm y una superficie específica de al menos 200 m<sup>2</sup>/g, se mejoró la corriente de respuesta.

Ejemplos en el caso de usar alambre de metal como capa de electrodo

A continuación, se describirán ejemplos en el caso de usar un alambre de metal como capa de electrodo y usar una tinta LP como capa de enzima.

#### Ejemplo 6

Se sumergió un alambre de oro ( $\phi$  0,5 mm) en una solución piraña (peróxido de hidrógeno:ácido sulfúrico concentrado = 1:3) durante 5 minutos para ser lavado, lo que se repitió 3 veces. Este alambre de oro se revistió con una tinta de enzima preparada usando Lion Paste W-311N bajo las mismas condiciones que las descritas en la explicación del Ejemplo 4 y se secó a 4°C durante 2 horas. Este electrodo se sometió a un tratamiento de reticulación de la misma manera que la descrita en la explicación del Ejemplo 4 para ser equilibrado, y después se usó como electrodo de trabajo. En un sistema de tres electrodos que usa un alambre de oro sin revestimientos como electrodo contador y un electrodo de referencia de Ag/AgCl como electrodo de referencia, se midió un valor de corriente de respuesta tras la adición de glucosa de la misma manera que la descrita en la explicación del Ejemplo 4.

Los resultados de las medidas de glucosa usando el electrodo de enzima así obtenido se muestran en la Figura 9. Según aumentó la concentración de glucosa, se observó un aumento en la corriente eléctrica. La densidad de corriente observada a 5 mM de concentración de glucosa fue 201 nA/mm<sup>2</sup>.

Ejemplo 7

Se mezclaron Nafion (5 %), Lion Paste W-311N, fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) y 8,4 U/ $\mu$ l de FADGDH en una relación de volumen de 1:1:4:4 para proporcionar una tinta de enzima. Con la tinta de enzima, se revistieron 10 mm del extremo de un alambre de acero inoxidable ( $\phi$  0,5 mm) y se secó a 4°C durante 2 horas. Este alambre de acero inoxidable se sometió a un tratamiento de reticulación usando vapores de solución de glutaraldehído al 25 % durante 30 minutos y después se sumergió en Tris-HCl 10 mM (pH 7,0) a temperatura ambiente durante 20 minutos para retirar el glutaraldehído sin reaccionar. Este alambre de acero inoxidable se sumergió adicionalmente en fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) durante 1 hora para ser equilibrado. Usando esto como electrodo de trabajo, un alambre de platino como electrodo contador, Ag/AgCl como electrodo de referencia, así como usando fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) (10 ml) como solución de reacción, se midió un valor de corriente de respuesta tras la adición de glucosa cuando se aplicó un potencial eléctrico a +400 mV frente a Ag/AgCl. La medida se llevó a cabo a 37°C mientras la solución de reacción estaba siendo agitada a 250 rpm. El valor de corriente de respuesta se definió como la diferencia obtenida restando el valor de corriente eléctrica de estado estacionario obtenido a 0 mM de glucosa del valor de corriente eléctrica de estado estacionario medido a cada concentración de glucosa.

Los valores de corriente de respuesta tras la adición de glucosa cuando se usó como electrodo de trabajo cada alambre de acero inoxidable en el que estaba inmovilizada la enzima se muestran en la Figura 10. Según aumentó la concentración de glucosa, se observó un aumento en la corriente eléctrica. La densidad de corriente observada a 5 mM de concentración de glucosa fue 232 nA/mm<sup>2</sup>.

#### Ejemplo 8

Se usó una porción de acero inoxidable (0,165 mm<sup>2</sup>) del extremo de un electrodo integral de acero inoxidable como electrodo de trabajo y la otra porción de acero inoxidable (0,942 mm<sup>2</sup>) se usó como electrodo contador. El electrodo

de trabajo se sumergió en una tinta de enzima en la que se mezclaron 5 % de Nafion, Lion Paste W-311N, fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) y 8,4 U/ $\mu$ l de FADGDH en una relación de volumen de 1:1:4:4 y después se secó a 4°C durante 2 horas. Este electrodo se sometió a un tratamiento de reticulación usando vapores de solución de glutaraldehído al 25% durante 30 minutos y después se sumergió en fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) durante 30 minutos para ser equilibrado. En un sistema de tres electrodos usando un potencioestato con este electrodo, así como usando Ag/AgCl como electrodo de referencia, se midió un valor de corriente de respuesta tras la adición de glucosa cuando se aplicó un potencial eléctrico a +400 mV frente a Ag/AgCl. La medida se llevó a cabo usando fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) (10 ml) como solución de reacción, a 37°C y una velocidad de agitación de 150 rpm. El valor de corriente de respuesta se definió como la diferencia obtenida restando el valor de corriente eléctrica de estado estacionario obtenido a 0 mM de glucosa del valor de corriente eléctrica de estado estacionario medido a cada concentración de glucosa.

Se muestra en la Figura 11 una curva de calibración del valor de corriente de respuesta del electrodo integral de acero inoxidable preparado frente a glucosa. En la medida en un sistema de electrodos, el valor de corriente de respuesta a 5 mM de concentración de glucosa fue 134 nA/mm<sup>2</sup>. Este valor fue casi el mismo que el valor obtenido del electrodo de enzima del Ejemplo 7 preparado usando el alambre de acero inoxidable de 0,5 mm. Por tanto, se construyó un sensor de glucosa usando este electrodo integral de acero inoxidable.

Ejemplo de preparación del electrodo enzimático

Ejemplo 9

Se aplicó una tinta enzimática sobre un electrodo que se puede conseguir comercialmente (electrodo de carbono de tipo circular Bio Device Technology Co., Ltd., DepChip) (mostrado en la Figura 12) que se prepara sustentando partículas de carbono sobre un sustrato polimérico, construyendo con ello un electrodo enzimático. Como tinta enzimática, se usó una mezcla de Nafion al 5%, Lion Paste W-211N, solución reguladora de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) y 4,0 U/ $\mu$ l de FADGDH en una relación de volúmenes de 1:1:1:7. Esta tinta enzimática (1,5  $\mu$ l) se aplicó sobre el electrodo de la Figura 12 y luego se secó a 4°C durante 2 horas. En un sistema de tres electrodos que usa un potencioestato con este electrodo, así como Ag/AgCl sobre el mismo electrodo como electrodo de referencia, se midió un valor de la corriente de respuesta tras la adición de glucosa cuando se aplica un potencial eléctrico a +250 mV frente al electrodo de Ag/AgCl.

En la medida, se añadió primero, gota a gota, una solución de muestra (5  $\mu$ l) ,que contenía diversas concentraciones de glucosa disuelta en solución acuosa reguladora de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0), al electrodo enzimático bajo condiciones de no aplicar al electrodo potenciales eléctricos. Y, 5 segundos más tarde, en un sistema de tres electrodos que usa un potencioestato así como Ag/AgCl sobre el mismo electrodo como electrodo de referencia, se aplicó un potencial eléctrico a +250 mV frente al electrodo de Ag/AgCl. En la Figura 13 se muestran los cambios del valor de la corriente eléctrica observados cuando se añadieron las muestras que contenían diversas concentraciones. Como se muestra, el valor de la corriente eléctrica observado varía dependiendo de la concentración de la glucosa añadida. Usando el valor de la corriente eléctrica al cabo de 5 segundos de la aplicación del potencial eléctrico como un valor de referencia, se examinó la correlación con la concentración de glucosa. En la Figura 14 se muestra una representación gráfica que recoge el valor de la corriente eléctrica 5 segundos después de la aplicación del potencial eléctrico a lo largo del eje vertical y que recoge la concentración de la glucosa en la muestra, a lo largo del eje horizontal. Según se describe en la presente memoria descriptiva, que usa el presente electrodo enzimático sin añadir un mediador de electrones, se midió la concentración de glucosa.

Los ejemplos anteriores son meramente ilustrativos de la presente invención. Por ejemplo, el electrodo enzimático que usa el material que constituye una tinta según la presente invención, como se describió con detalle, se puede usar como electrodo de trabajo en un sensor de glucosa y se puede aplicar, preferiblemente, a una enzima anódica en una pila de combustible que usa glucosa como combustible.

45

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un electrodo enzimático que comprende una capa enzimática que contiene partículas de carbono que llevan glucosa-deshidrogenasa (GDH) con dinucleótido de flavina-adenina (FAD) como coenzima; y una capa de electrodo, en el que las partículas de carbono consisten en partículas de carbono con un diámetro de partícula de no más de 100 nm y una superficie específica de al menos 200 m<sup>2</sup>/g y en el que la capa de electrodo está compuesta por metal.
- 10 2. El electrodo enzimático según la reivindicación 1, en el que la glucosa-deshidrogenasa (GDH) es una subunidad catalítica de óxidorreductasa o un complejo de una subunidad catalítica de óxidorreductasa y una subunidad de transferencia de electrones.
3. El electrodo enzimático según la reivindicación 1 ó 2, en el que la capa de electrodo está compuesta por un alambre de metal.
4. Un sensor de glucosa que comprende el electrodo enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 5. Un método para producir un electrodo enzimático según la reivindicación 1, que comprende revestir una superficie de una capa de electrodo con un material que constituye una tinta que comprende glucosa-deshidrogenasa (GDH) con dinucleótido de flavina-adenina (FAD) como coenzima; y partículas de carbono que tienen un diámetro de no más de 100 nm y una superficie específica de al menos 200 m<sup>2</sup>/g, en el que la capa de electrodo está compuesta de metal, y luego secar.
- 20 6. El método según la reivindicación 5, en el que la glucosa-deshidrogenasa (GDH) es una subunidad catalítica de óxidorreductasa o un complejo de una subunidad catalítica de óxidorreductasa y una subunidad de transferencia de electrones.
7. El método para producir un electrodo enzimático según la reivindicación 5 ó 6, que comprende además añadir un polielectrolito sólido a una película enzimática en la que se absorbe la enzima, o se aplica y se seca.
- 25 8. El método para producir un electrodo enzimático según la reivindicación 5 ó 6, en el que el material que constituye la tinta comprende además el polielectrolito sólido.
9. El método para producir un electrodo enzimático según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que dicho polielectrolito sólido es Nafion<sup>TM</sup>.
- 30 10. Una celda enzimática de combustible que emplea el electrodo enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el electrodo enzimático se usa como ánodo.

Figura 1

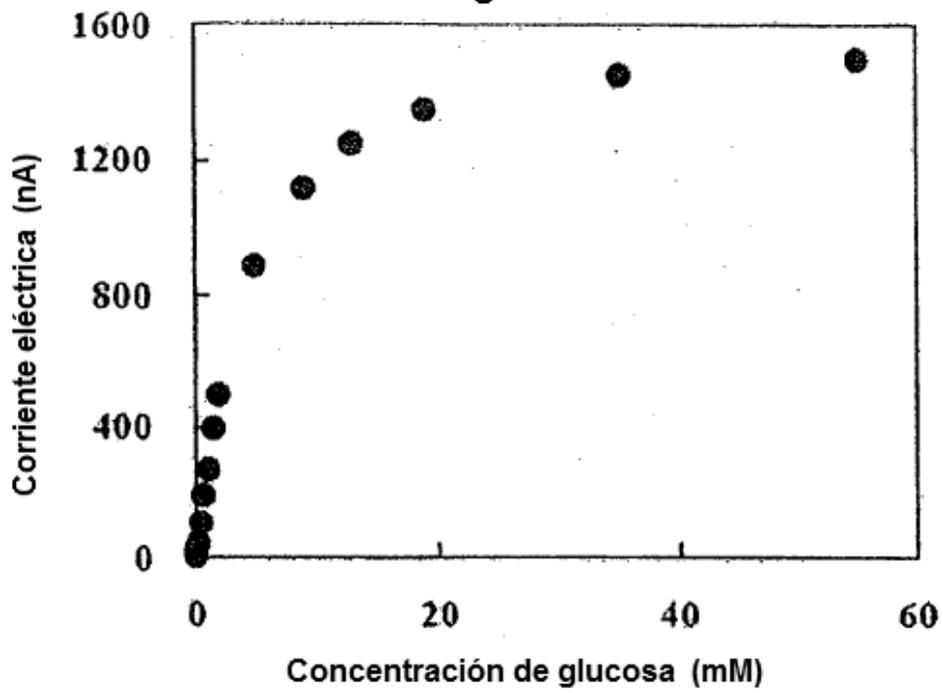


Figura 2

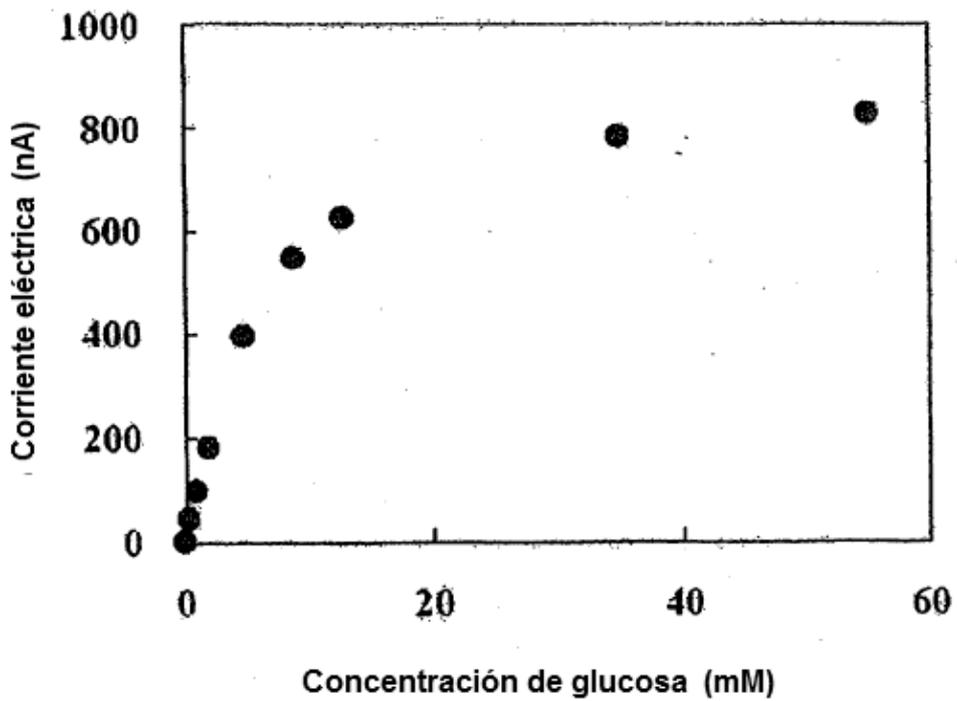


Figura 3

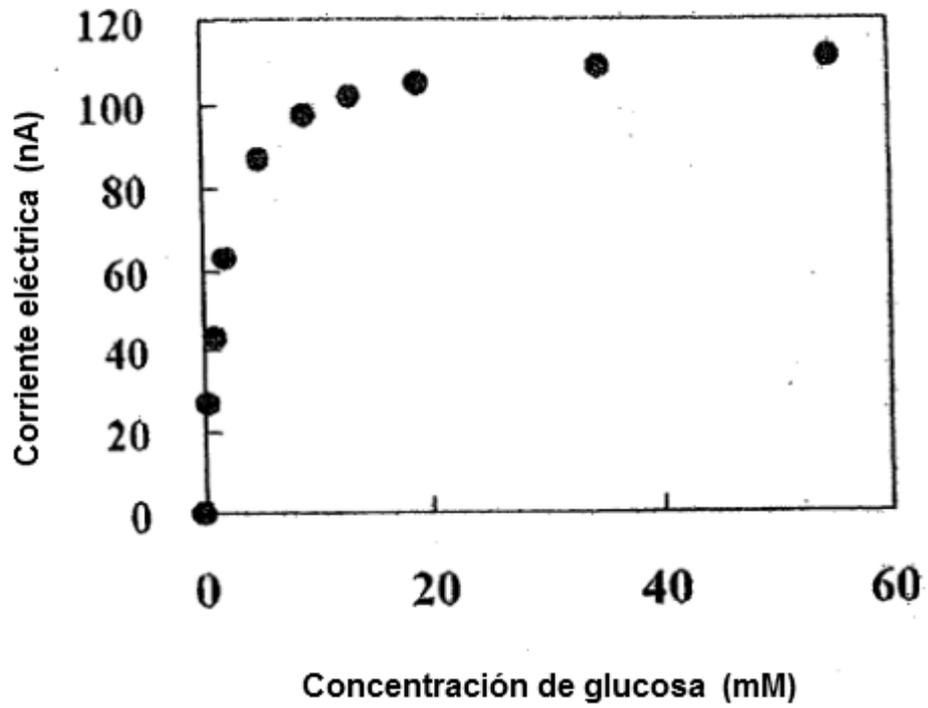


Figura 4

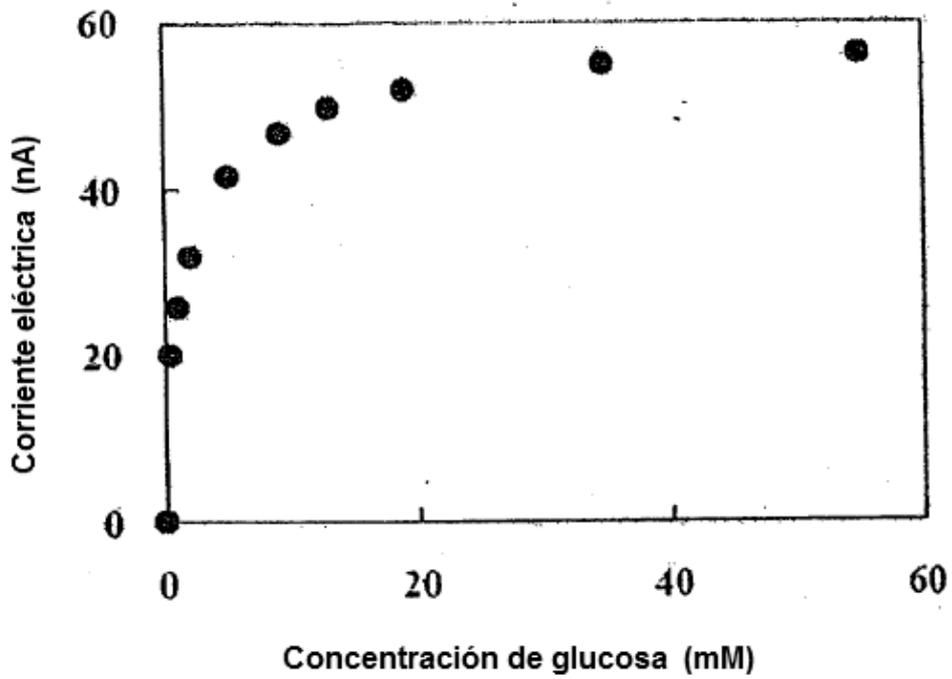


Figura 5

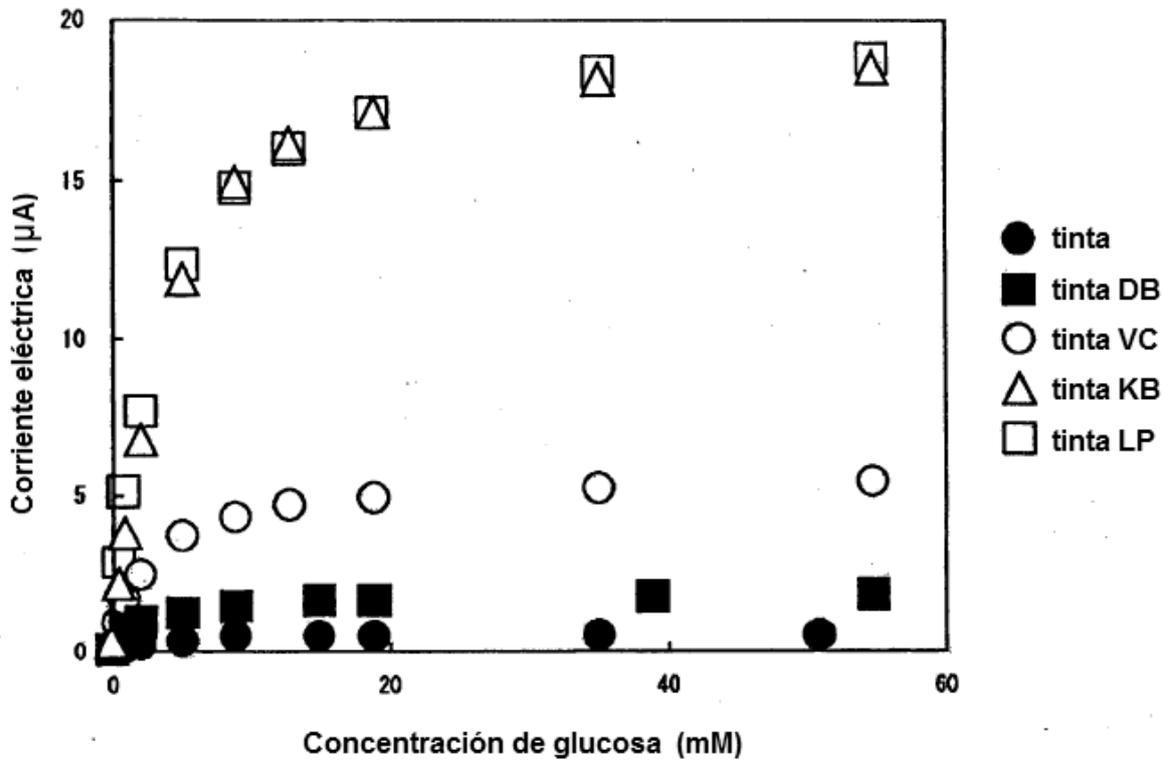


Figura 6

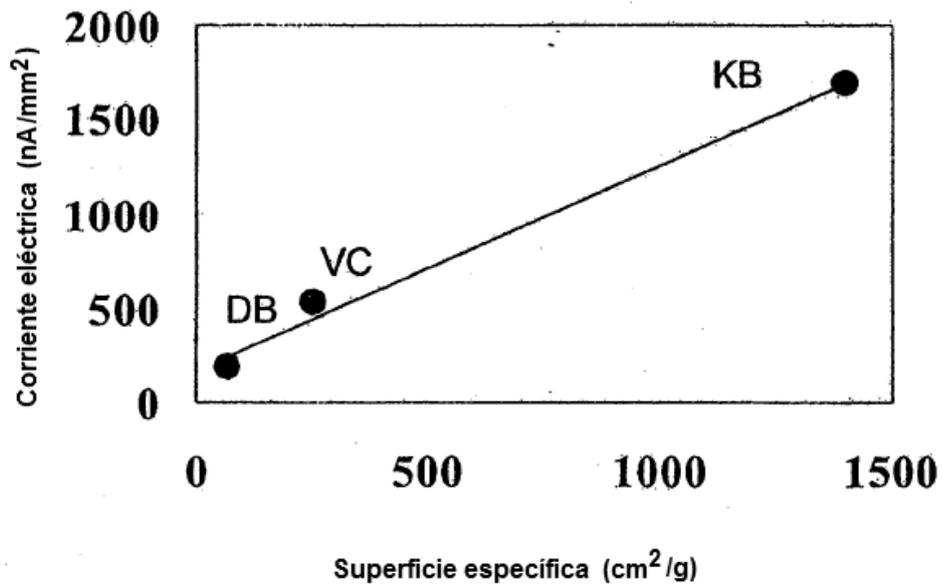


Figura 7

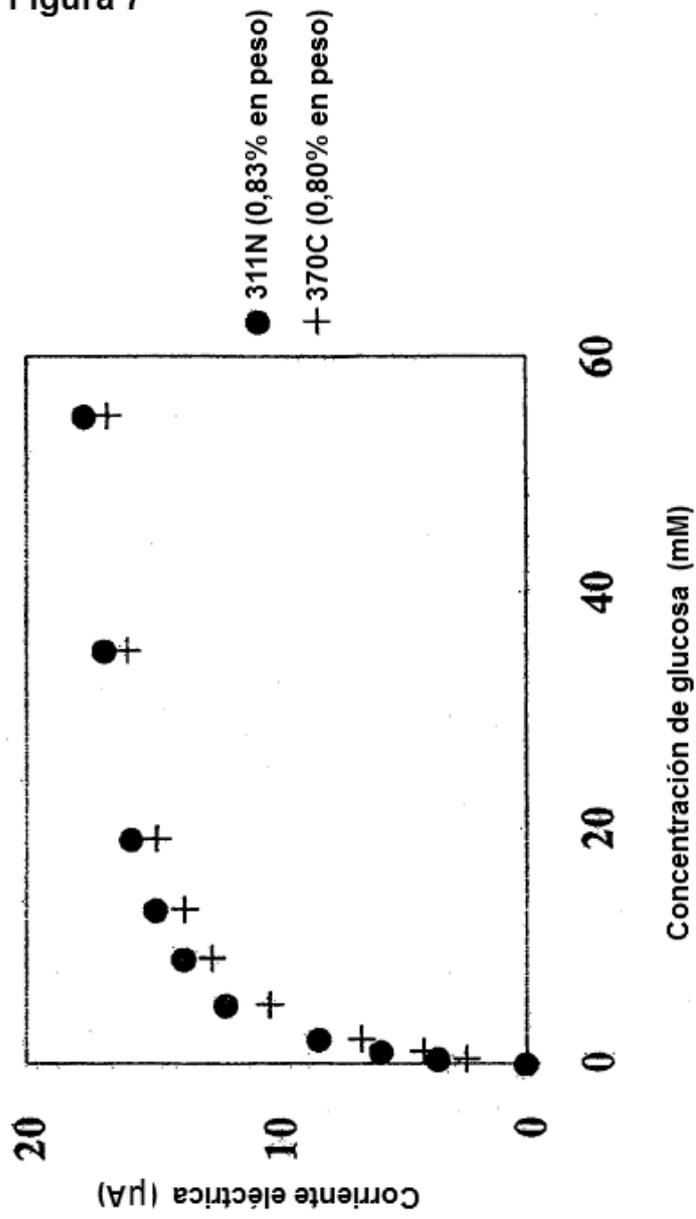


Figura 8

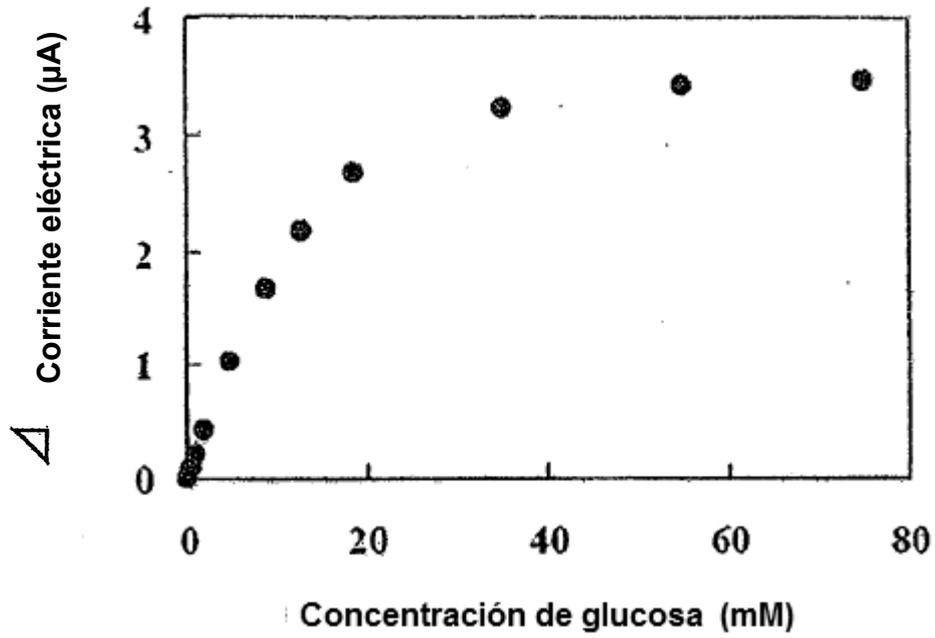


Figura 9

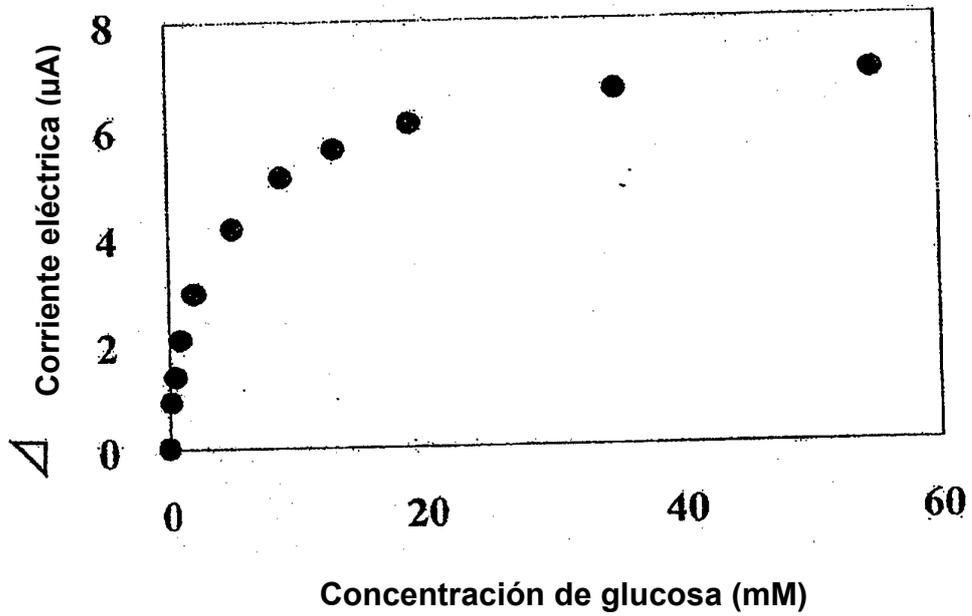


Figura 10

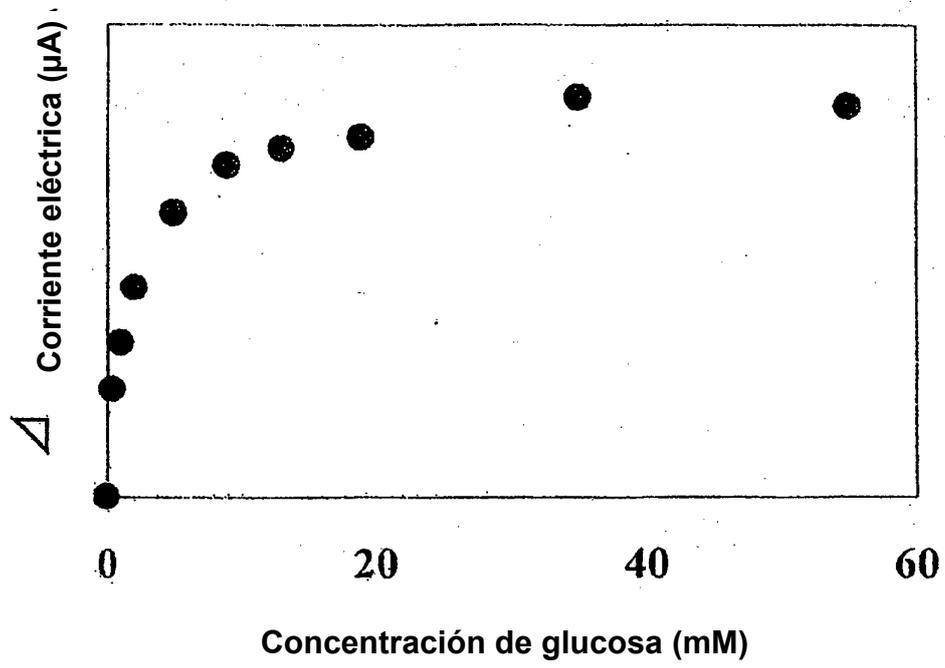


Figura 11

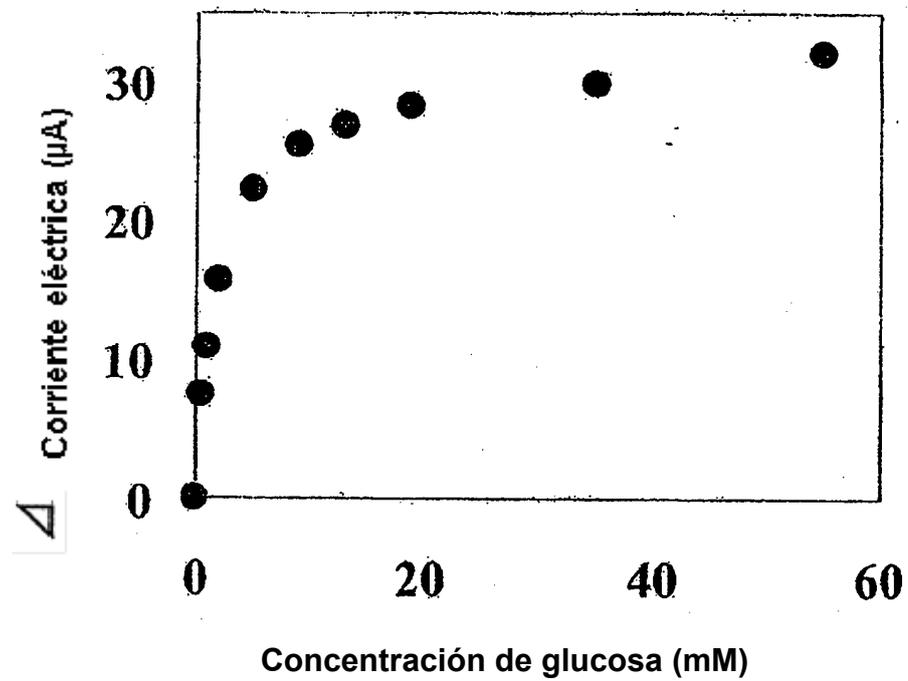


Figura 12

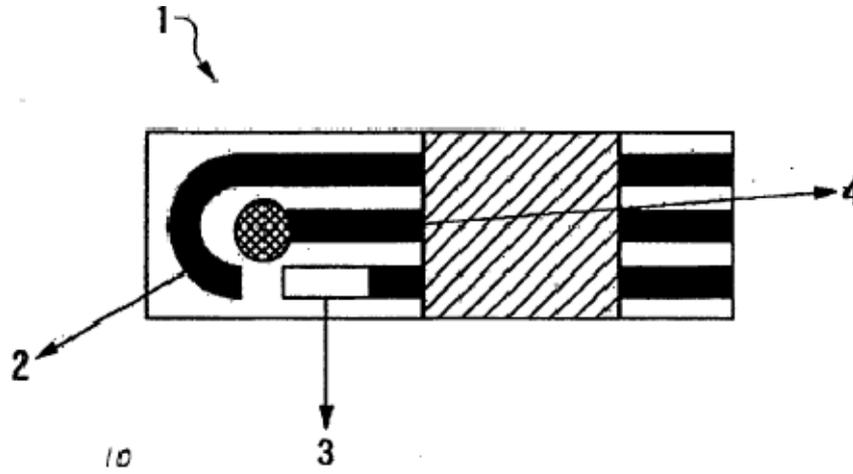


Figura 13

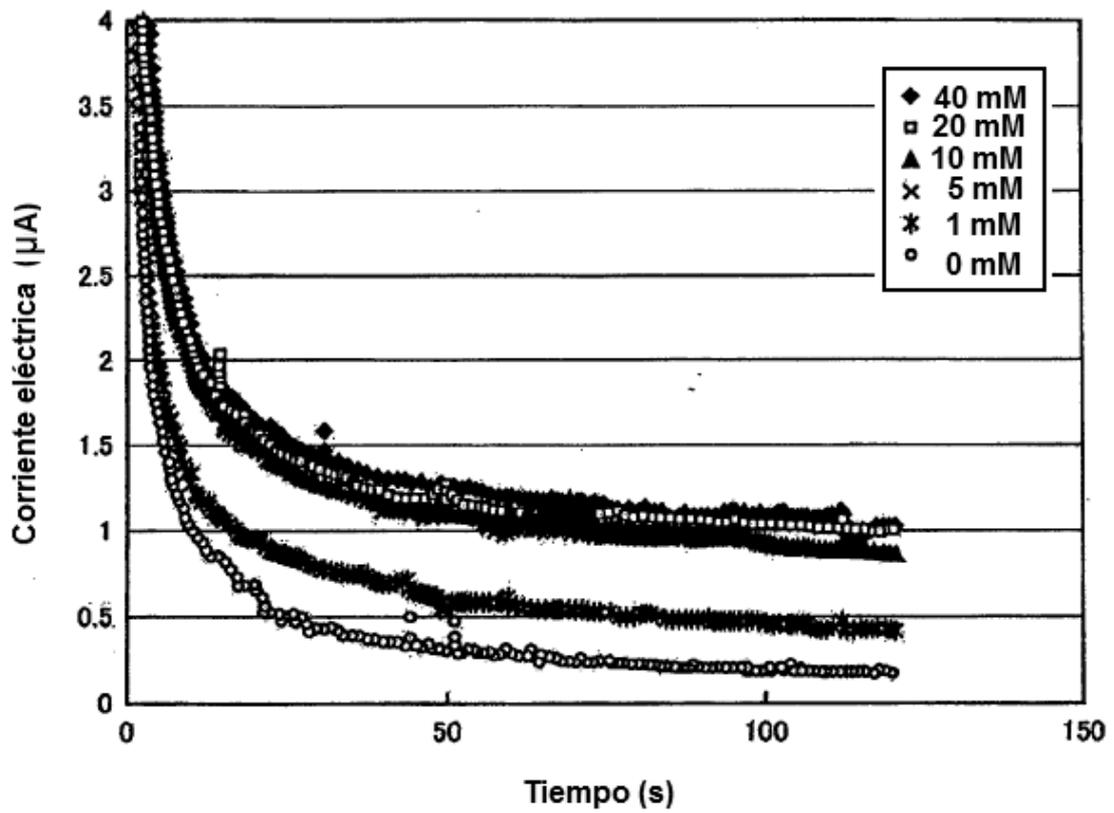


Figura 14

