

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 121**

51 Int. Cl.:

**H01M 8/16** (2006.01)

**H01M 4/90** (2006.01)

**H01M 4/88** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2010 PCT/FI2010/051048**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011 WO11073530**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2010 E 10837114 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2514017**

54 Título: **Una estructura multicapa**

30 Prioridad:

**16.12.2009 FI 20096338**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.07.2018**

73 Titular/es:

**TEKNOLOGIAN TUTKIMUSKESKUS VTT OY  
(100.0%)  
Vuorimiehentie 3  
02150 Espoo, FI**

72 Inventor/es:

**VAARI, ANU;  
OJALA, VILLE-MIKKO;  
VALKIAINEN, MATTI;  
SMOLANDER, MARIA y  
BOER, HARRY**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 675 121 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

Una estructura multicapa

### Antecedentes de la invención

### Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a estructuras laminadas para fuentes de energía, tales como celdas de combustible. En particular, la presente invención concierne a estructuras multicapas adecuadas como electrodo en fuentes de energía, que comprenden generalmente una capa laminar conductiva en combinación con una capa enzimática. La presente invención también concierne a métodos de producción de tales estructuras.

### Descripción de la técnica relacionada

- 10 Previamente se conocen celdas de combustible completamente enzimáticas que superponen capas laminares que contienen enzimas, combustible químico y electrodos, véase, por ejemplo, el documento US 3403053.

En la técnica, se han ensayado diversas mezclas de enzimas con mediadores, combustible, electrolitos y agregado tanto conductivo como gelificante. Generalmente, el componente de combustible, tal como glucosa, se mezcla con aditivos conductores y de empalme y, a continuación, se imprime sobre un colector de corriente.

- 15 Hay un problema relacionado con la tecnología conocida en el sentido de que las celdas de combustible completamente enzimáticas tienden a perder prematuramente la capacidad de energía mediante la degradación del combustible: se ha encontrado que durante la producción normal, la mezcla de combustible/catalizador es reactiva y la capa de combustible ya estará consumida cuando la celda se esté montando.

### Compendio de la invención

- 20 Es un objetivo de la presente invención eliminar al menos algunos de los problemas de la técnica y proporcionar nuevos tipos de ánodos para, en particular, celdas de combustible completamente enzimáticas imprimibles.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar un método de producción de tales ánodos.

- 25 La presente invención se basa en la idea de mantener las capas de combustible y catalizador separadas hasta que la celda se monte y se tome en uso. En ese momento, el sistema se activa humedeciéndolo con una solución de electrolito.

Por tanto, según la presente invención, en una estructura multicapa adecuada como electrodo en una fuente de energía, hay una capa enzimática que contiene una enzima básicamente seca capaz de oxidar o deshidrogenar material de carbohidrato bajo condiciones adecuadas.

- 30 Una estructura multicapa del presente tipo se consigue combinando una capa de combustible laminar que contiene una fuente de energía química que comprende un material de carbohidrato básicamente seco y una capa enzimática laminar que contiene la enzima básicamente seca. Estas capas se colocan una enfrente de la otra en interrelación conductiva para formar una estructura multicapa.

Más específicamente, las nuevas estructuras según la presente invención están caracterizadas por la reivindicación 1.

- 35 El método según la invención está caracterizado por la reivindicación 14.

- 40 Por la presente invención se obtienen ventajas considerables. Por tanto, la presente invención preverá fuentes de corriente eléctrica imprimibles completamente enzimáticas. Debido a que la capa ánodo enzimática y la capa que contiene combustible no están interactuando durante la producción y puesto que se mantienen latentes durante el tiempo de almacenamiento, la fuente de energía se mantendrá estable durante periodos de tiempo prolongados, incrementando así la utilidad de la fuente de energía.

La presente invención es de significancia potencialmente inmensa en el sentido de que permite la producción en masa de fuentes de energía tipo celda de combustible completamente enzimática usando tecnología de impresión.

Las presentes estructuras se pueden usar con diversas fuentes de energía químicas, incluyendo azúcar y miel.

- 45 A continuación, la invención se examinará más atentamente con la ayuda de la siguiente descripción detallada y ejemplo de referencia con referencia a los dibujos adjuntos.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra en vista lateral la sección trasversal de una celda de combustible impresa con fuentes de energía autónomas combinadas con capas impresas;

la Figura 2 presenta en forma de un diagrama de barras los resultados de la medición de la permeabilidad a oxígeno de un colector de corriente impreso sobre cartón revestido con PE;

la Figura 3 muestra las propiedades de descarga (potencial de celda en función de la densidad de corriente) de una celda de biocombustible impresa calculadas en dos momentos (20 h y 40 h);

5 la Figura 4 muestra la producción de energía de una celda (6,25 cm<sup>2</sup>) en función de la tensión de celda;

la Figura 5 muestra la corriente consumida mediante un termómetro digital a partir de una cascada de tres celdas de ALDH/ThL (FC1 a FC3) construidas entre dos láminas de cartón revestido con PE;

la Figura 6 presenta en forma de un diagrama de barras la actividad restante de una capa bioactiva conductiva después de 2 y 4 semanas de almacenamiento (Ejemplo 7);

10 la Figura 7 presenta en forma de un diagrama de barras la actividad restante de una capa bioactiva conductiva después de la adición de glicerol y carboximetil celulosa (Ejemplo 7);

la Figura 8 muestra el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la tensión de celda abierta y la tensión de la celda cargada (15 kOhm) (Ejemplo 8);

la Figura 9 muestra la actividad enzimática de aldosa deshidrogenasa en presencia de diferentes concentraciones de glucosa;

15 la Figura 10 muestra la tensión de celda en función del tiempo para celdas de ALDH/ThL construidas entre dos placas de grafito usando diferentes cantidades de combustible;

la Figura 11 muestra la tensión de celda en función del tiempo para tres fuentes de energía enzimáticas de ALDH/ThL cada una construida entre dos placas de grafito y conectadas en serie cuando se saca una corriente

20 de 5 mA durante 3 s cada 20 minutos;

La Figura 12 muestra la tensión de celda en función del tiempo para tres fuentes de energía enzimáticas de ALDH/ThL cada una construida entre dos placas de grafito y conectadas en serie con un condensador comercial de 0,16 F cuando se saca una corriente de 5 mA durante 3 s cada 20 minutos; y

25 la Figura 13 muestra la tensión de celda en función del tiempo para celdas de ALDH/ThL construidas entre dos placas de grafito en comparación con fuentes de energía que contienen una correspondiente cantidad de glucosa oxidasa (Gox) a tres pH diferentes.

Como se discutió anteriormente, la presente invención prevé estructuras de ánodo para celdas de combustible catalizadas por enzima imprimibles. Tales celdas generalmente tienen cuatro componentes principales, concretamente un colector de corriente, una capa de combustible, una capa enzimática y una capa separadora para

30 separar las tres capas anteriormente mencionadas del cátodo de la celda de combustible.

Según una realización, la estructura del ánodo se puede fabricar combinando primero de forma separada un colector de corriente con una capa de combustible y una capa de enzima con una capa separadora. A continuación, la capa que contiene combustible y las capas que contienen enzima se unen una a otra y se humedecen solamente cuando el ánodo se toma en uso.

35 Por medio de la invención, llega a ser posible fabricar una tinta que contiene tanto una enzima/mediador como el combustible a usar e imprimir ésta sin pérdida prematura de energía de la celda.

Para separar las capas de combustible y de enzima unas de otras hay una capa laminar colocada entre ellas. La capa separadora laminar es de un tipo capaz de ser mojada para transferir humedad o agua a la capa de enzima.

40 La capa intermedia es porosa. Tal sustrato poroso se puede seleccionar del grupo que consiste en tejidos fibrosos porosos y láminas de origen natural o sintético, en particular el sustrato poroso se selecciona de materiales celulósicos y lignocelulósicos, tales como láminas de papel o cartón, por ejemplo, papel de filtro.

Generalmente, en las realizaciones anteriores, la capa enzimática se deposita sobre una primera capa de sustrato laminar y la capa de combustible se deposita sobre la capa enzimática. Alternativamente, la capa de combustible se puede depositar sobre una segunda capa de sustrato laminar.

45 La primera capa de sustrato laminar se puede formar mediante una capa superficial formada por una membrana permeable a iones.

La segunda capa de sustrato laminar se puede formar mediante una lámina de papel, cartón o plástico, la cual es básicamente impermeable a humedad.

50 Para alcanzar la actividad catalítica deseada por la capa enzimática, la enzima preferiblemente se mezcla con un mediador de transferencia de electrones.

La enzima de oxidación o deshidrogenación se selecciona del grupo de peroxidasas y oxidasas. Para mencionar algunos ejemplos: la enzima se puede seleccionar del grupo de oxidorreductasas (EC 1.), incluyendo deshidrogenasas con NAD<sup>+</sup>, NADH<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup> o NADPH<sup>+</sup> como aceptores de electrones (EC 1.1.1), por ejemplo, glucosa deshidrogenasas (1.1.1.47), oxidasas con oxígeno como aceptor de electrones (EC 1.1.3), por ejemplo, glucosa oxidasas (EC 1.1.3.4) y quinoproteína deshidrogenasas (EC 1.1.5), por ejemplo, quinoproteína glucosa deshidrogenasas (EC 1.1.5.2).

55

La enzima debería tener una actividad suficiente para activar la celda; preferiblemente la actividad es de aproximadamente 1 a 100.000 nkat/g, preferiblemente 10 a 1.000 nkat/g, y se emplea en una cantidad de 0,0001 a 10 mg de proteína/g de material seco de la capa cátodo.

- 5 La actividad de la enzima preferiblemente se refleja en su potencial redox el cual, expresado como V frente a ENH, generalmente es de aproximadamente 0,01 a 0,5, preferiblemente no más de 0,3.

Preferiblemente, la enzima se selecciona de quinoproteína glucosa deshidrogenasa (EC 1.1.5.2) de *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter suboxydans* o *Acinetobacter calcoaceticus* o glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4) de *Aspergillus niger* o glucosa deshidrogenasa (1.1.1.47) de *Pseudomonas sp.* o de *Thermoplasma acidophilum*.

El mediador usado en las presentes estructuras preferiblemente presenta buenas propiedades electroquímicas.

- 10 En particular, el mediador se selecciona del grupo que consiste en TMPD (*N,N,N',N'*-tetrametil-*p*-fenilendiamina), tetracianoquinodimetano (TCNQ), metosulfato de fenazina (PMS, del inglés "Phenazine methosulphate"), hidroquinona, niqueloceno y dimetil ferroceno, ferroceno, butil ferroceno, ácido acético de ferroceno, hidroximetil ferroceno, ácido dicarboxílico de ferroceno, ferroceno carboxialdehído y otros derivados de ferroceno, y sus mezclas.

- 15 Se prefiere tener el mediador presente a concentraciones en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10,0 % en peso de la capa cátodo.

Además, la capa enzimática puede contener una tinta conductiva. La tinta conductiva generalmente comprende un componente eléctricamente conductivo seleccionado del grupo que consiste en nanotubos de carbono, partículas de metal, partículas de carbono y polímeros inherentemente conductivos y sus mezclas y, opcionalmente, un aglutinante.

- 20 La capa de combustible puede contener una fuente de energía química seleccionada del grupo de mono- y disacáridos. Por tanto, por ejemplo, la capa de combustible contiene un monosacárido seleccionado del grupo de xilosa, glucosa, arabinosa, manosa, galactosa y fructosa.

- 25 El método de producción de una estructura multicapa adecuada como electrodo en una fuente de energía, comprende las siguientes etapas, concretamente formar, en orden opcional, una primera estructura laminar mediante la proporción de una capa de combustible que contiene una fuente de energía química que comprende un material de carbohidrato básicamente seco; y formar una segunda estructura laminar mediante la proporción de una capa enzimática que contiene una enzima básicamente seca capaz de oxidar o deshidrogenar el material de carbohidrato bajo condiciones adecuadas.

- 30 A continuación, la capa de combustible de la primera estructura laminar se coloca en relación contigua con la capa enzimática de la segunda estructura laminar para formar una estructura multicapa.

La etapa de formación de la primera estructura laminar comprende proporcionar una primera capa de sustrato; depositar sobre la primera capa de sustrato una capa laminar conductiva; y proporcionar sobre la capa laminar conductiva una capa de combustible que contiene una fuente de energía química que comprende un material de carbohidrato básicamente seco del tipo anterior.

- 35 Una capa intermedia capaz de ser humedecida se coloca entre las capas de combustible y enzima, en donde dicha capa laminar conductiva se separa de dicha capa enzimática con dicha capa intermedia.

Es posible depositar la capa de combustible a partir de una suspensión o una solución. La suspensión puede tener una concentración del carbohidrato de generalmente aproximadamente 0,1 a 75 %, preferiblemente aproximadamente 1 a 50 %, en particular aproximadamente 1 a 30 % del peso total de la suspensión o la solución.

- 40 Tal capa generalmente se seca después de la deposición.

- 45 Según una realización preferida la cual se puede combinar con una cualquiera de las anteriores realizaciones, la etapa de formación de la segunda estructura laminar comprende proporcionar una segunda capa de sustrato; y proporcionar sobre la segunda capa de sustrato una capa enzimática. Generalmente, la capa enzimática contiene una enzima básicamente seca capaz de oxidar o deshidrogenar el material de carbohidrato bajo condiciones adecuadas. Las enzimas pueden ser cualquiera de los tipos anteriormente discutidos. Como es el caso con la capa de combustible, la capa enzimática se puede depositar a partir de una suspensión acuosa o solución, y la capa depositada preferiblemente se seca después de la deposición.

Usando los compuestos y métodos anteriores, la capa conductiva se forma por impresión, revestimiento o por una técnica equivalente para proporcionar una capa que tiene un grosor promedio de aproximadamente 20 nm a 100 µm.

- 50 Para conseguir el objetivo anteriormente explicado de una estructura laminar la cual es eléctricamente estable durante la producción y el almacenamiento, es preferido que o bien la capa enzimática o la capa de combustible esté básica seca tras el montaje de la estructura del ánodo. En el caso de la capa enzimática, se prefiere un contenido de humedad máximo de menos de 10 % en peso, preferiblemente menos de aproximadamente 5 % en peso. Igualmente, una capa de combustible "básicamente seca" tiene un contenido de humedad de menos del 10 % en

peso, preferiblemente menos de aproximadamente 5 % en peso. Es particularmente preferido que el contenido de humedad de las capas activas (enzima y combustible) sea menos de aproximadamente 5 % en peso para ambas.

Los siguientes ejemplos de referencia, que no caen dentro del alcance de las reivindicaciones, son útiles para entender la invención.

### 5 Ejemplo 1. Producción y purificación de ALDH a partir de *Gluconobacter oxydans*

Se conservaron células de *Gluconobacter oxydans* y se cultivaron usando un procedimiento en tres etapas. Comenzando con un precultivo de 3 l en matraces de agitación de los cuales se inoculó un pre-fementador de 28 l, lo cual por turnos después de 23 h de crecimiento se usó para inocular un fementador de producción de 300 l. Después de otras 23 h de cultivo el cultivo (DO=2,8) se enfrió a <20 °C y se separó en un separador Alfa Laval. La fase de biomasa era de 5,2 litros, este material se centrifugó en una centrifuga de laboratorio, dando como resultado una fracción de masa celular empaquetada de 970 g (peso húmedo) la cual se almacenó a -20 °C y se usó para la purificación de la enzima ALDH. Para esto primero se sometieron a lisis 200 g de células usando una célula de presión French a  $6,89 \times 10^7$  Pas (10.000 psi), después de lo cual la ALDH se podía extraer del lisado usando el detergente Tritón X-100. Se realizaron cuatro extracciones secuenciales enumeradas I, II, III y IV.

10 La ADLH se purificó de estos extractos de detergente usando un procedimiento de cromatografía en dos columnas. El extracto I y II se combinaron y así eran los extracto III y IV y se realizaron dos rondas de purificación según el procedimiento descrito a continuación (véase la Tabla 1).

15 Primero se aplicó el extracto crudo a una columna de intercambio catiónico de CM-Sefarosa FF en tampón de NaAc 10 mM de pH 5,0, Tritón X-100 al 0,1 % y la proteína unida se eluyó usando un gradiente de sal lineal. Las fracciones que contenían ALDH (basándose en la actividad enzimática) se reunieron y se purificaron más usando una columna de intercambio aniónico de FPLC UNO-Q en Tris-HCl 2,5 mM pH 7,2, Tritón X-100 al 0,1 %. Después de esto ALDH estaba semi pura como se juzgó por SDS-PAGE. Un resumen del rendimiento de las dos purificaciones se puede encontrar en la Tabla 1.

20 Este ejemplo ilustra la viabilidad de producir aldosa deshidrogenasa (ALDH) a partir de la bacteria *Gluconobacter oxydans* en un procedimiento de fermentación y purificación a gran escala. Esta ampliación de la producción de enzima facilitará la producción a mayor escala de electrodos enzimáticos impresos basado en que esta enzima se usa como catalizador.

Tabla 1. Resumen de la producción de ALDH a partir de 200 g de células (peso húmedo) que representa 1/5 de la fermentación.

Lote	Volumen (ml)	Actividad (nkat/ml)	[Proteína] (mg/ml)	Actividad de ALDH total (nkat)
Purificación I+II	10	298	4,7	2.984
Purificación III+IV	20	79	0,45	1.587
Total				4.571

30

### Ejemplo 2. Construcción de la celda de cartón impresa

Se prepararon capas de electrodos enzimáticos revistiendo o imprimiendo tintas conductivas que incluían componentes biocatalíticos sobre un papel, cartón o un soporte de fieltro de carbón. Se atraparon los componentes activos sobre el soporte mediante el efecto de inmovilización física de la tinta.

35 La estructura de la celda de cartón impresa se muestra en la Figura 1.

Los siguientes métodos se usaron para preparar las diferentes capas de la fuente de energía:

Se imprimió una capa de colector de corriente 1 sobre cartón (Cupforma classic PE, Stora Enso, Finlandia) usando tinta conductiva a base de carbono comercial (tinta conductiva a base de carbono de Peters SD 2843 HAL) mediante serigrafía. Se formó una capa de electrodo enzimático catódico 2 sobre la capa de colector de corriente seca usando la tinta activa que contenía enzima que consistía en 2,5 ml de tinta conductiva comercial (DuPont Carbono 5067), 200 mg de nanotubos de carbono (multi-pared, diámetro 10 a 30 nm, pureza >80 % de Hydrocell), 400 nkat de lacasa de *Trametes hirsuta* (ThL) y 50 mmol de ácido 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), tinta diluida con tampón de succinato de Na 50 mM (pH 4,5) a consistencia adecuada para revestir o imprimir. Se formó una capa 3 formadora del electrodo enzimático anódico sobre la capa de colector de corriente seca usando la tinta activa que contenía enzima que consistía en 2,5 ml de tinta conductiva comercial (DuPont Carbono 5067), 200 mg de nanotubos de carbono (multicapa, diámetro de 10 a 30 nm, pureza >80 % de Hydrocell), 400 nkat de enzima aldosa deshidrogenasa de *Gluconobacter oxydans* (ALDH) y 50 mmol de mediador redox N'N'N'-tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD, del inglés "Tetramethyl-p-phenylenediamine"), tinta diluida con tampón de fosfato de K 50

mM de pH 6,0 a consistencia adecuada para revestir o imprimir. Se formó una capa de combustible 4 a partir de la energía de glucosa seca, esparcida directamente sobre la capa ánodo seca. Se formó una capa separadora 5 a partir de membrana de celofán.

- 5 Se usaron dos métodos diferentes para preparar una capa conductiva que contenía enzima, técnica de revestimiento a mano o serigrafía. El revestimiento a mano se realizó usando K Hand Coater de RK Print Coat Instruments Ltd. Se usaron papel filtro Whatman 1 y membrana de celofán (tubo de diálisis) como un sustrato de impresión. El grosor aproximado de las capas de revestimiento era de alrededor de 50  $\mu\text{m}$  en ambos métodos. Las fuentes de energía autónomas con capas impresas se construyeron sellando las capas de colector de corriente con electrodos enzimáticos, capas de combustible y capas separadoras o bien en coberturas de grafito o de cartón 6.
- 10 Para usar la fuente de energía, se activará por humedad. Se usó tampón, por ejemplo, succinato de sodio a pH 5,0. La activación se podía realizar antes o después del sellado. Si la humidificación se realizaba después del sellado, la capa de cobertura debería estar equipada con suficiente abertura o pequeños poros ("pinhole").

### Ejemplo 3. Permeabilidad a oxígeno del colector de corriente

- 15 La permeabilidad a oxígeno del cartón revestido con polietileno, así como la permeabilidad a oxígeno de un colector de corriente impreso sobre un cartón revestido con polietileno se determinó con el Analizador de permeabilidad a oxígeno 8001. La humedad relativa (HR) del 50 % se usó en la medición del cartón revestido con PE. La permeabilidad a oxígeno del colector de corriente se determinó en humedad relativa del 0 %, 50 % y 80 %. La permeabilidad a oxígeno del cartón revestido con PE se midió tanto antes como después del tratamiento con calor necesario para el curado del colector de corriente, pero el tratamiento no tenía ningún efecto sobre la permeabilidad a oxígeno del cartón. Con el colector de corriente impreso sobre el cartón la permeabilidad a oxígeno disminuyó en un 85 %, de 2.000  $\text{cm}^3/\text{m}^2/\text{día}$  a 270  $\text{cm}^3/\text{m}^2/\text{día}$ . La humedad relativa no parecía tener un efecto importante sobre la permeabilidad a oxígeno del colector de corriente. Los resultados de la medición de la permeabilidad a oxígeno se presentan en la Figura 2.

- 25 Este ejemplo ilustra la idoneidad del material con permeabilidad a oxígeno limitada (es decir, 270  $\text{cm}^3/\text{m}^2/\text{día}$ ) para usarse como material de cobertura de la fuente de energía enzimática impresa.

### Ejemplo 4. Propiedades de descarga de la fuente de energía completamente enzimática

- Las celdas de ALDH/ThL construidas entre dos placas de grafito como se indicó anteriormente se ensayaron con una carga resistiva de 10 a 75 kOhm después de un periodo de medición de OVC (de sus siglas en inglés) usando Adquisición de datos/Conmutador 34970A de Agilent con 20 posiciones independientes.

- 30 Las propiedades de descarga de la celda de biocombustible impresa calculadas en dos momentos (20 h y 40 h) se muestran en la Figura 3. Como se verá, la energía de producción máxima de la celda era de 11  $\mu\text{W}$  correspondiendo a densidad de energía de 0,84  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

### Ejemplo 5. Energía-corriente de la fuente de energía completamente enzimática con ánodo impreso

- 35 La curva de energía de la celda de ALDH/ThL construida entre dos placas de grafito como se indicó anteriormente se midió con un galvanostato conectado a un PC. La medición se empezó midiendo la tensión de circuito abierto durante 40 min después de lo cual la corriente sacada se incrementó con etapas de 0,2  $\mu\text{A}$  cada minuto hasta que la tensión de la celda estaba bajo 0,1 V.

La producción de energía de la celda (6,25  $\text{cm}^2$ ) en función de la tensión de celda se muestra en la Figura 4.

### Ejemplo 6. Celda de combustible enzimática como la fuente de energía para termómetro digital

- 40 Tres celdas de ALDH/ThL (FC1...3 en la Figura 5) construidas entre dos láminas de cartón revestido con PE como se indicó anteriormente se conectaron en serie y las celdas se usaron como fuente de energía para un termómetro digital con una pantalla de cristal líquido. El consumo de corriente de un termómetro digital típico (1 a 1,2 V) para hacer funcionar el termómetro se muestra en la gráfica de la Figura 5. El circuito equivalente de FC1 está indicado con fuerza electromotriz  $U_0$ , resistencia interna  $R_i$  y resistencia óhmica  $R_{ohm}$  y un condensador efectivo interno  $C_i$ .
- 45 Este ejemplo indica que la fuente de energía enzimática se puede usar para aplicaciones potenciales de energía con perfil de carga pulsada.

### Ejemplo 7. Estabilidad de almacenamiento del ánodo impreso

- 50 Se almacenaron capas que contenían aldosa deshidrogenasa producidas como se indica en el Ejemplo 5 bajo diferentes condiciones (-20 °C, +4 °C, +22 °C (ambiente/HR al 50 %/bajo nitrógeno) y la actividad enzimática restante basada en la tasa de consumo de oxígeno unida a la oxidación del mediador se determinó durante el almacenamiento para evaluar la estabilidad de almacenamiento a largo plazo de las capas impresas. Se encontró que las temperaturas bajas -20 °C y +4 °C eran óptimas para el mantenimiento de la actividad enzimática (véase la Figura 6).

La adición de glicerol y carboximetil celulosa (CMC) dio como resultado una estabilidad incrementada a temperatura ambiente y con aditivos añadidos a la tinta conductiva la actividad se podía mantener hasta 7 semanas (véase la Figura 7).

Por tanto, este ejemplo ilustra la idoneidad de ALDH como la capa bioactiva conductiva impresa.

5 **Ejemplo 8. El efecto de la temperatura de almacenamiento de la capa anódica sobre el rendimiento de la fuente de energía**

10 Las celdas de ALDH/ThL construidas entre dos placas de grafito como se indicó anteriormente se ensayaron con una carga resistiva de 15 kOhm después de un periodo de medición de OVC usando Adquisición de datos/Conmutador 34970A de Agilent con 20 posiciones independientes. Las capas impresas que contenían ALDH se almacenaron durante 49 días (+4,5 °C o +25 °C).

El efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la tensión de celda abierta y la tensión de la celda cargada (15 kOhm) se muestra en la Figura 8.

Este ejemplo indica que las capas impresas se pueden almacenar durante varias semanas antes de su uso en la fuente de energía enzimática y la temperatura de almacenamiento preferible es temperatura refrigerada.

15 **Ejemplo 9. Concentración de glucosa optimizada para ALDH**

La actividad enzimática de la aldosa deshidrogenasa se midió espectrofotométricamente usando metosulfato de fenazina (PMS) – sistema mediador de diclorofenol indofenol (DCIP, del inglés “Dichlorophenol indophenol”) en presencia de diferentes concentraciones de glucosa. En el intervalo de concentración entre 100 a 800 mM la actividad era prácticamente independiente de la concentración de glucosa (véase la Figura 9).

20 Este ejemplo ilustra que el catalizador enzimático es funcional en amplio intervalo de concentración del combustible.

**Ejemplo 10. Concentración de glucosa optimizada para electrodo de ALDH impreso**

25 Las celdas de ALDH/ThL construidas entre dos placas de grafito como se indicó anteriormente se ensayaron con una carga resistiva de 30 kOhm después de un periodo de medición de OVC usando Datos de adquisición/Conmutador 34970A de Agilent. En la construcción de la celda se usaron diferentes cantidades de glucosa como combustible.

Los resultados se muestran en la Figura 10.

30 Como se verá, se descubrió que la producción de la celda era más alta cuando la cantidad de glucosa era de 50 mg (0,28 mmol) (correspondiente a 700 mM si toda la glucosa está disuelta en la celda). El consumo de combustible se puede calcular mediante la ecuación (1) era en el caso de celda de combustible con glucosa,  $z$  tiene un valor de 2 y  $F$  es la constante de Faraday. Por ejemplo, esta cantidad, 0,28 mmol, de glucosa es suficiente para producir corriente de 100  $\mu$ A durante seis días.

$$\Rightarrow n_{\text{combustible}}(I, t) = \frac{I \cdot t}{zF} \quad (1)$$

**Ejemplo 11. El ensayo de ráfagas de la fuente de energía enzimática impresa**

35 Tres fuentes de energía enzimática de ALDH/ThL construidas entre dos placas de grafito como se indicó anteriormente se conectaron en serie y se sacó una ráfaga de corriente de 5 mA durante 3 s cada 20 minutos. La tensión de celda en función del tiempo se muestra en la Figura 11.

Este ejemplo demostró que incluso si la tensión de celda cae a 0 V durante cada ráfaga, la tensión de circuito abierto se podría mantener a nivel constante a través de todo el experimento durante varias horas.

**Ejemplo 12. Ensayo de ráfaga de la fuente de energía enzimática impresa con condensador**

40 Tres fuentes enzimáticas de ALDH/ThL construidas entre dos placas de grafito como se indicó anteriormente se conectaron en serie con un condensador comercial de 0,16 F y se sacó una ráfaga de corriente de 5 mA durante 3 s cada 20 minutos. La tensión de celda en función del tiempo se muestra en la Figura 12.

Este ejemplo demostró que con condensador la capacidad de carga del sistema se podría incrementar considerablemente cuando el tiempo entre los pulsos es bastante largo para permitir la carga del condensador.

45

**Ejemplo 13. Comparación de aldosa deshidrogenasa y glucosa oxidasa**

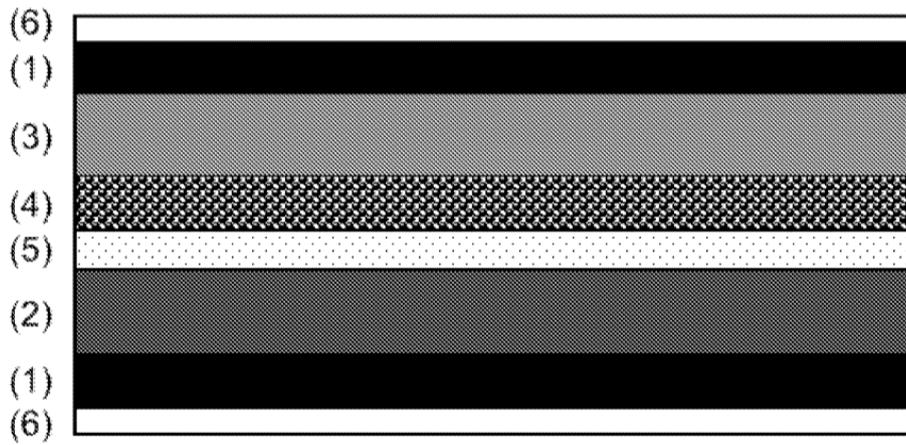
5 Las celdas de ALDH/ThL construidas entre dos placas de grafito como se indicó anteriormente se ensayaron con una carga resistiva de 0 a 50 kOhm después de un periodo de medición de OVC usando Datos de adquisición/Conmutador 34970A de Agilent con 20 posiciones independientes. En paralelo a las celdas que contienen ALDH, se prepararon fuentes de energía que contenían una cantidad correspondiente de glucosa oxidasa (Gox) como enzima anódica y se ensayaron en tres condiciones de pH (4,5, 5 y 6).

Como se ve a partir de los resultados informados en la Figura 13, se descubrió que en las condiciones particulares con TMPD como mediador de transferencia de electrones el rendimiento de la ALDH era mejor que el de la GOx.

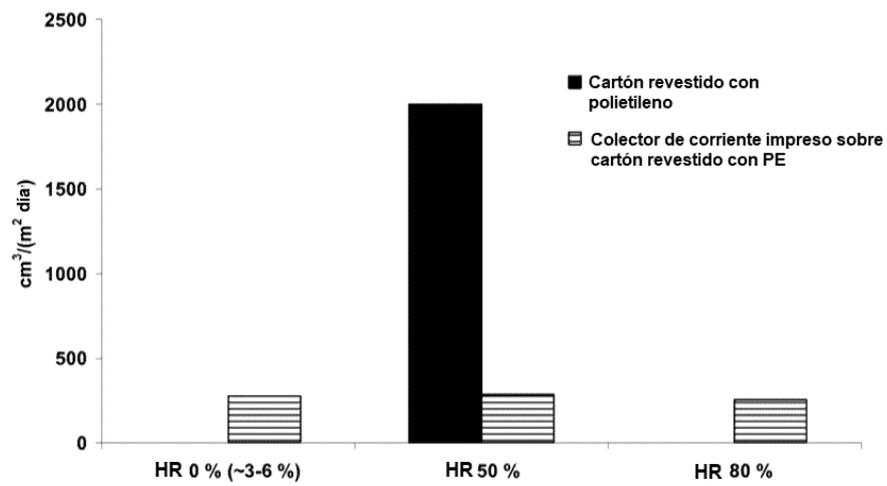
## REIVINDICACIONES

1. Una estructura multicapa adecuada como un electrodo en una fuente de energía, que comprende
  - una capa laminar conductiva;
  - una capa enzimática laminar que contiene una enzima básicamente seca capaz de oxidar o deshidrogenar material de carbohidrato bajo condiciones adecuadas;
  - una capa de combustible laminar que contiene una fuente de energía química que comprende un material de carbohidrato básicamente seco, y
  - una capa intermedia laminar que es capaz de ser mojada para transferir humedad o agua a dicha capa enzimática, siendo dicha capa intermedia porosa, caracterizada por que dicha capa intermedia laminar está colocada entre dicha capa de combustible y dicha capa enzimática.
2. La estructura multicapa según la reivindicación 1, en donde la capa intermedia comprende un sustrato poroso que se selecciona del grupo que consiste en tejidos fibrosos porosos y láminas de origen natural o sintético, en particular el sustrato poroso se selecciona de materiales celulósicos y lignocelulósicos, tales como láminas de papel o cartón, por ejemplo, papel de filtro.
3. La estructura multicapa según la reivindicación 1 ó 2, en donde la capa enzimática se deposita sobre una primera capa de sustrato laminar.
4. La estructura multicapa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la capa de combustible se deposita sobre una segunda capa de sustrato laminar, la cual preferiblemente está formada por una lámina de papel, cartón o plástico, la cual es básicamente impermeable a la humedad.
5. La estructura multicapa según la reivindicación 3 ó 4, comprendiendo además una capa superficial formada por una membrana permeable a iones, preferiblemente la membrana forma la primera capa de sustrato laminar.
6. La estructura multicapa según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la enzima se mezcla con un mediador de transferencia de electrones.
7. La estructura multicapa según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la enzima de oxidación se selecciona del grupo de peroxidases y oxidasas, siendo la enzima preferiblemente seleccionada del grupo de oxidoreductasas (EC 1), incluyendo las deshidrogenasas con NAD<sup>+</sup>, NADH<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup> o NADPH<sup>+</sup> como aceptores de electrones (EC 1.1.1), por ejemplo, glucosa deshidrogenasas (1.1.1.47), oxidasas con oxígeno como aceptor de electrones (EC 1.1.3), por ejemplo, glucosa oxidasas (EC 1.1.3.4) y quinoproteína deshidrogenasas (EC 1.1.5), por ejemplo, quinoproteína glucosa deshidrogenasas (EC 1.1.5.2). y teniendo la enzima, por ejemplo, una actividad de aproximadamente 1 a 100.000 nkat/g, preferiblemente 10 a 1.000 nkat/g, y se emplea en una cantidad de 0,0001 a 10 mg de proteína/g de material seco de una capa cátodo.
8. La estructura multicapa según la reivindicación 7, en donde la enzima tiene un potencial redox, expresado como V frente a ENH, de no más de 0,3, siendo dicha enzima preferiblemente seleccionada de quinoproteína glucosa deshidrogenasa (EC 1.1.5.2) de *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter suboxydans* o *Acinetobacter calcoaceticus* o glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4) de *Aspergillus niger* o glucosa deshidrogenasa (1.1.1.47) de *Pseudomonas sp.* o de *Thermoplasma acidophilum*.
9. La estructura multicapa según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde el mediador presenta propiedades electroquímicas, siendo el mediador preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en TMPD (*N,N,N',N'*-tetrametil-*p*-fenilendiamina), TCNQ (tetracianoquinodimetano), PMS (metosulfato de fenazina), hidroquinona, níqueloceno y dimetil ferroceno, ferroceno, butil ferroceno, ácido acético de ferroceno, hidroximetil ferroceno, ácido dicarboxílico de ferroceno, ferroceno carboxialdehído y otros derivados de ferroceno, y sus mezclas, estando dicho mediador preferiblemente presente en una concentración de 0,001 a 10,0 % en peso de una capa cátodo.
10. La estructura multicapa según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la capa enzimática contiene además una tinta conductiva, comprendiendo dicha tinta conductiva preferiblemente un componente eléctricamente conductivo seleccionado del grupo que consiste en nanotubos de carbono, partículas de metal, partículas de carbono y polímeros inherentemente conductivos y sus mezclas y, opcionalmente, un aglutinante.
11. La estructura multicapa según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la capa laminar conductiva se forma por impresión, revestimiento o por una técnica equivalente para producir una capa que tiene un grosor promedio de 20 nm a 100 µm.
12. La estructura multicapa según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la capa de combustible contiene una fuente de energía química seleccionada del grupo de mono- y disacáridos, preferiblemente la capa de combustible contiene un monosacárido seleccionado del grupo de xilosa, glucosa, galactosa y fructosa.

13. La estructura multicapa según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la capa enzimática básicamente seca tiene un contenido de humedad de menos del 10 % en peso, preferiblemente menos de aproximadamente 5 % en peso.
- 5 14. Un método de producción de una estructura multicapa adecuada como un electrodo en una fuente de energía, comprendiendo las etapas de formación de, en orden opcional,
- a) una primera estructura laminar mediante
- la proporción de una capa de combustible que contiene una fuente de energía química que comprende un material de carbohidrato básicamente seco; y
- b) una segunda estructura laminar mediante
- 10 - la proporción de una capa enzimática que contiene una enzima básicamente seca capaz de oxidar o deshidrogenar el material de carbohidrato bajo condiciones adecuadas; y posteriormente
- c) colindar la capa de combustible de la primera estructura laminar con la capa enzimática de la segunda estructura laminar para formar una estructura multicapa,
- en donde la etapa de formación de la primera estructura laminar comprende
- 15 - proporcionar una primera capa sustrato;
- depositar sobre la primera capa sustrato una capa laminar conductiva; y
  - proporcionar sobre la capa laminar conductiva una capa de combustible que contiene una fuente de energía química que comprende un material de carbohidrato básicamente seco; en donde una capa intermedia capaz
- 20 de ser mojada se coloca entre las capas del combustible y la enzima, en donde dicha capa laminar conductiva se separa de dicha capa enzimática con dicha capa intermedia.
15. El método según la reivindicación 14, en donde la etapa de formación de la segunda estructura laminar comprende
- proporcionar una segunda capa sustrato; y
  - proporcionar sobre la segunda capa sustrato una capa enzimática, conteniendo dicha capa una enzima
- 25 básicamente seca capaz de oxidar o deshidrogenar el material de carbohidrato bajo condiciones adecuadas.
16. El método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 15, en donde
- la capa de combustible se deposita a partir de una suspensión y dicha capa se seca después de la deposición; y/o
  - la capa enzimática se deposita a partir de una suspensión acuosa y dicha capa se seca después de la
- 30 deposición.



**Fig. 1**



**Fig. 2**

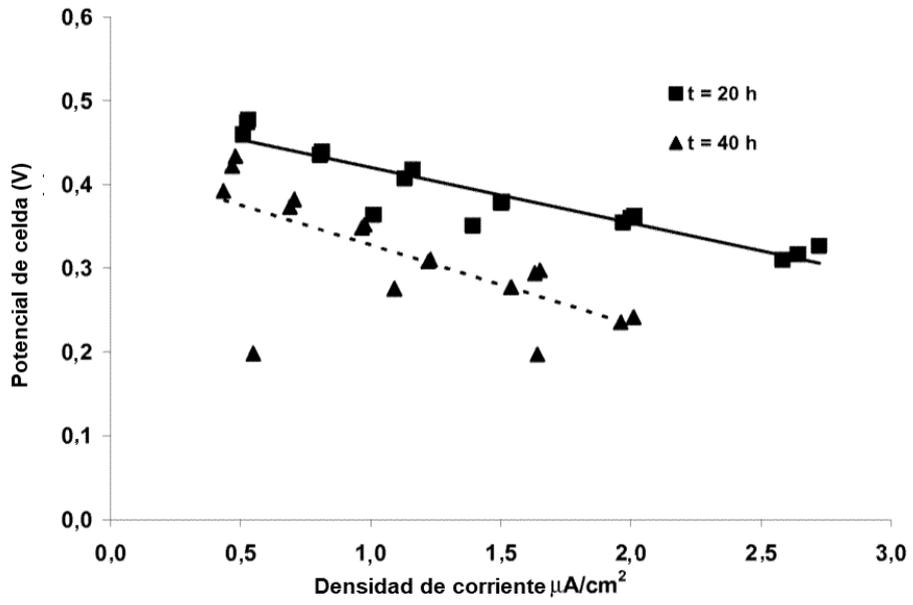


Fig. 3

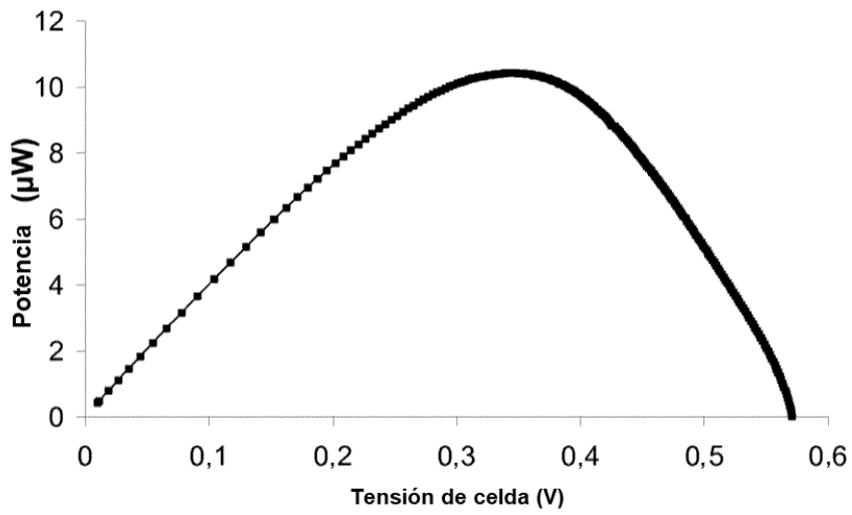
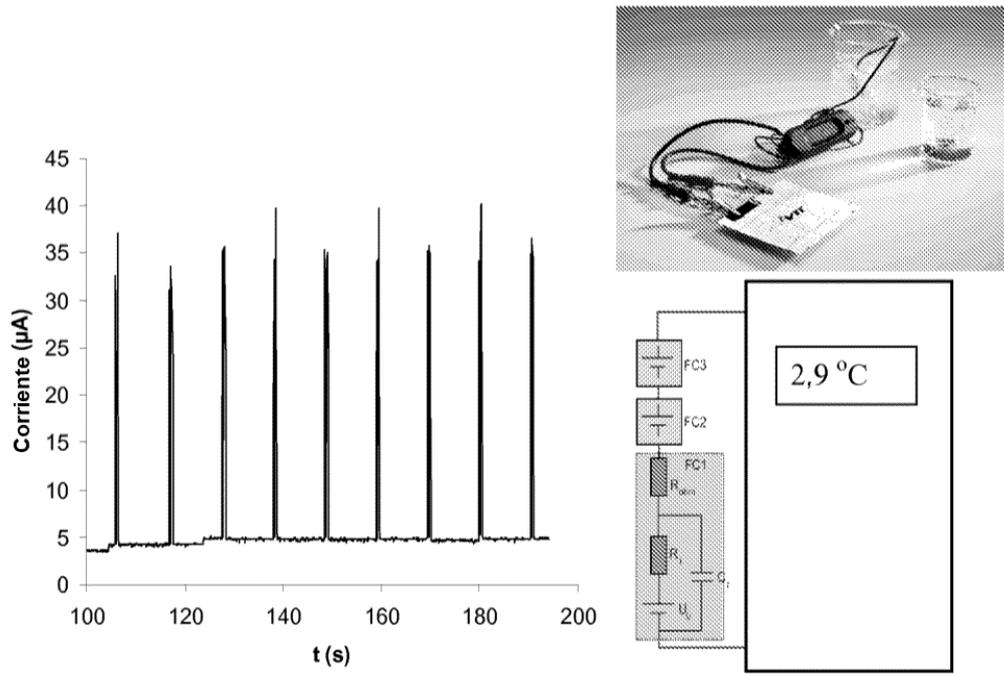
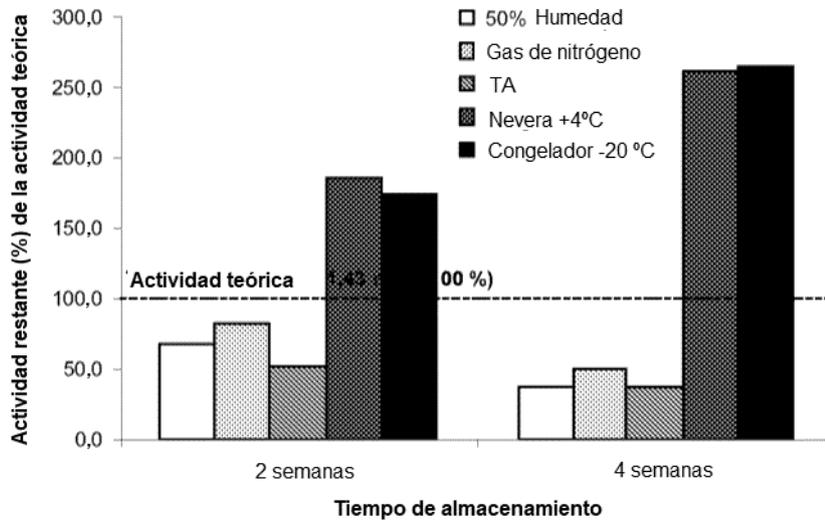


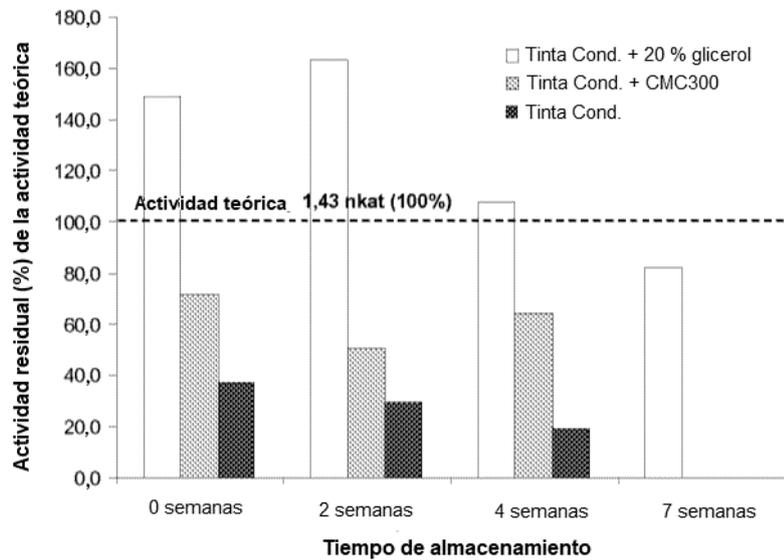
Fig. 4



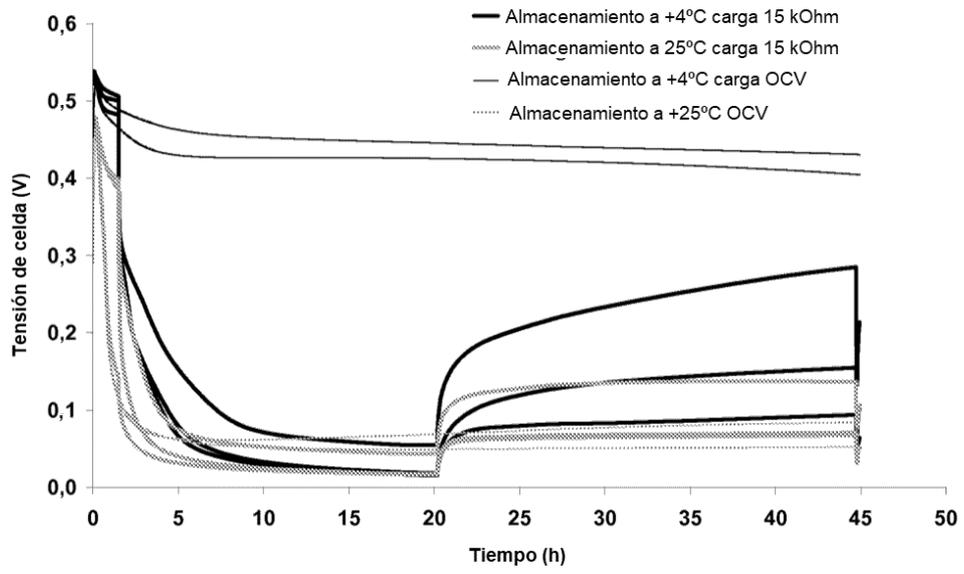
**Fig. 5**



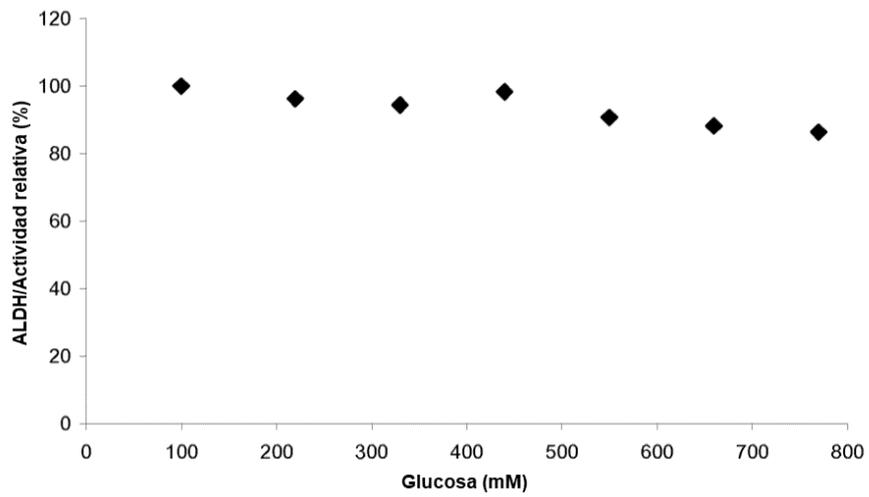
**Fig. 6**



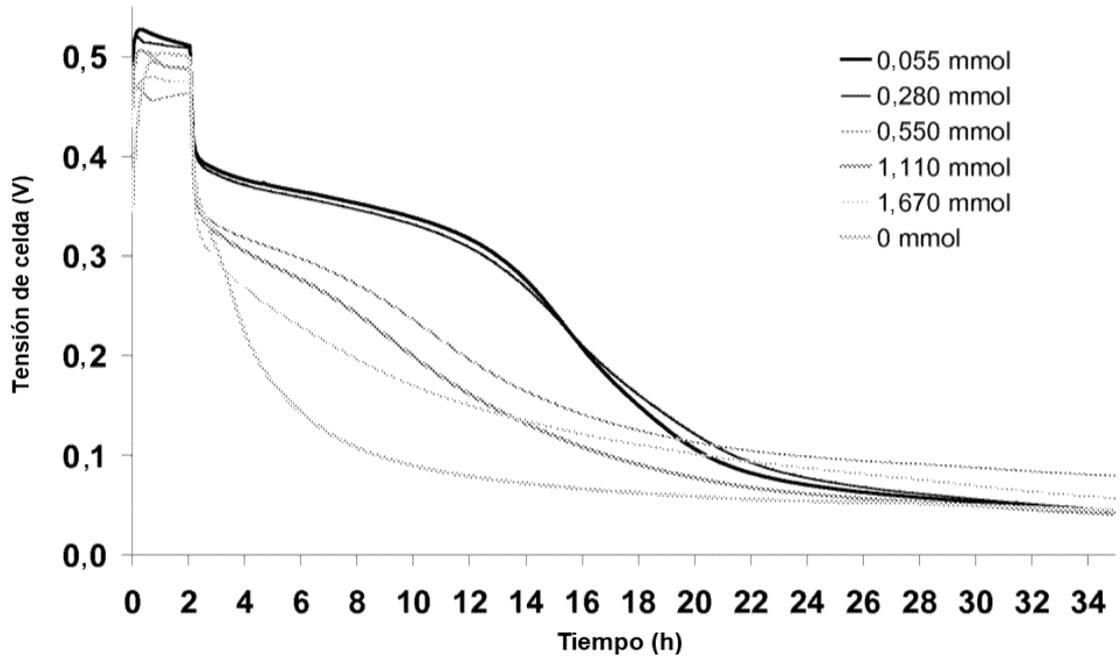
**Fig. 7**



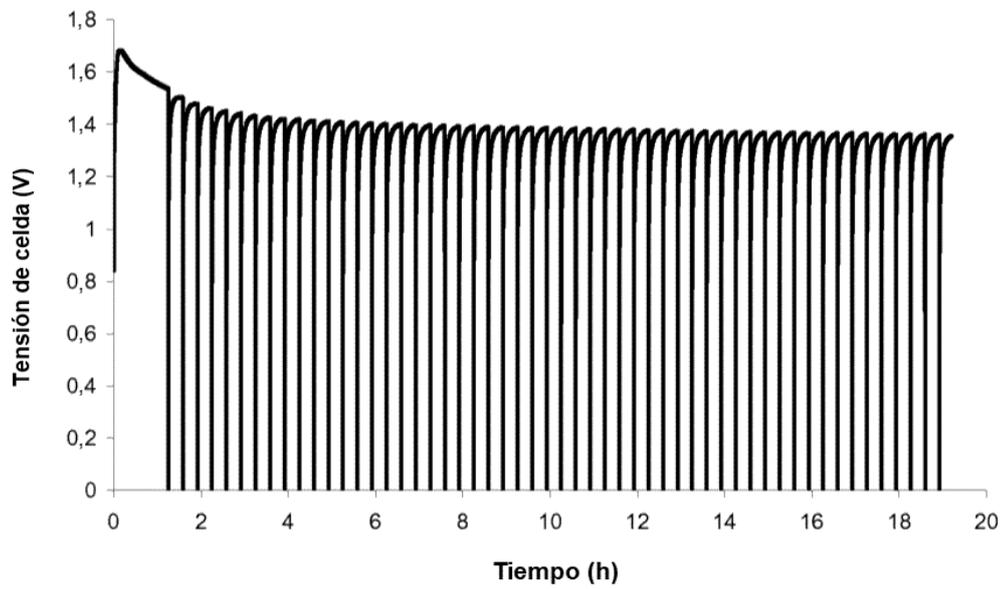
**Fig. 8**



**Fig. 9**



**Fig. 10**



**Fig. 11**

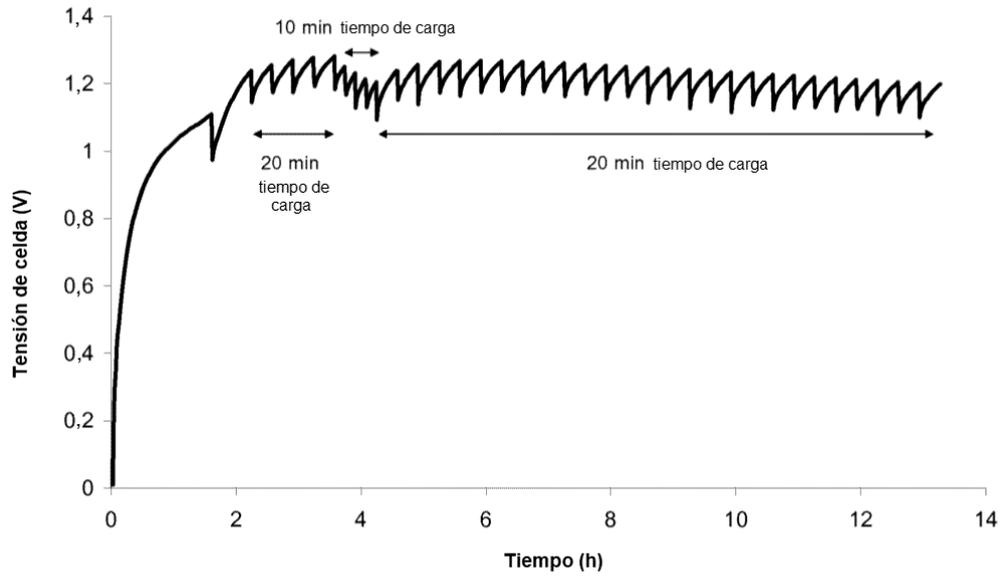


Fig. 12

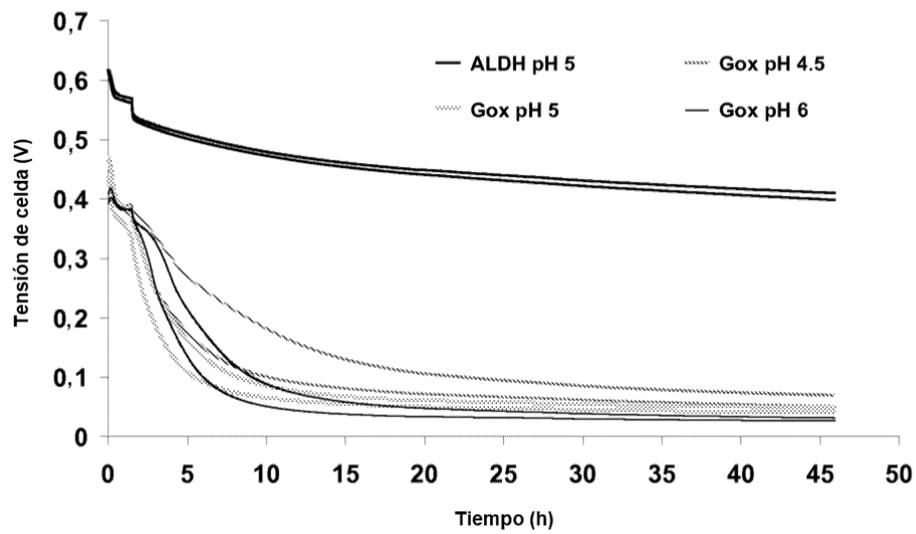


Fig. 13