

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 N.º de publicación: **ES 2 091 714**

21 Número de solicitud: 9401507

51 Int. Cl.<sup>6</sup>: G01N 27/327

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **11.07.94**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.11.96**

Fecha de concesión: **07.04.97**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **16.05.97**

45 Fecha de publicación del folleto de patente:  
**16.05.97**

73 Titular/es: **Universidad de Alcalá de Henares  
Plaza de San Diego s/n  
Alcalá de Henares, Madrid, ES  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

72 Inventor/es: **Parellada Ferrer, Josefina;  
Domínguez Cañas, Elena y  
Fernández López, Víctor M.**

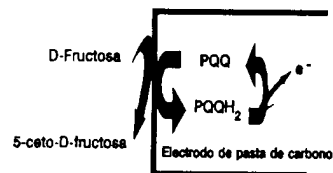
74 Agente: **No consta**

54 Título: **Biosensor para la medida de fructosa, manera de prepararlo y su aplicación al análisis de fructosa en productos alimenticios.**

57 Resumen:

Biosensor para la medida de fructosa, manera de prepararlo y su aplicación al análisis de fructosa en productos alimenticios.

Biosensor de pasta de carbono para la medida de fructosa basados en electrodos amperométricos de transferencia electrónica directa entre el enzima fructosa deshidrogenasa, FDH, en los que se evita la inactivación de la enzima por el aceite de parafina añadiendo a la mezcla grafito-enzima una solución acuosa de polietilen imina, PEI, y una vez seca la mezcla añadiendo la parafina para formar el electrodo. La enzima FDH puede ser la comercial aislada de *Gluconobacter* sp. o de cualquier otra fuente biológica natural o de otra obtenida por técnicas de ingeniería genética. A la mezcla de la enzima con el grafito, se añaden sustancias detergentes. El grafito utilizado se somete a un tratamiento térmico (puede ser al aire) durante más de 1 min. a una temperatura superior a 650 °C. La preparación del biosensor se lleva a cabo según las siguientes etapas: a) Se parte de una solución de enzima en un tampón de pH 5 que contiene un tensoactivo; b) la mezcla se deseca bajo presión reducida a 3-8 °C; c) Se le adiciona una solución acuosa de PEI tamponada a pH 5 y la mezcla se seca a 3-8 °C; d) El polvo de grafito resultante se mezcla con aceite de parafina, obteniendo la correspondiente pasta de carbono modificada.



ES 2 091 714 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

## DESCRIPCION

Biosensor para la medida de fructosa, manera de prepararlo y su aplicación al análisis de fructosa en productos alimenticios.

### Campo de la técnica

Biosensores conteniendo el enzima fructosa deshidrogenasa.

Preparación de electrodos de pasta de carbón con la enzima fructosa deshidrogenasa.

Análisis de fructosa en productos alimenticios (miel, jarabes de glucosa/fructosa, bebidas refrescantes y zumos de frutas).

### Introducción

El desarrollo de biosensores para la determinación del contenido de determinados componentes en productos alimenticios y en otras sustancias biológicas sin separaciones previas ha resuelto muchos de los problemas que presentan otros métodos tradicionales. Particular atención han recibido los biosensores amperométricos entre los que destacan los llamados de pasta de carbono basados en la incorporación de entidades biológicas, p.e. enzimas, a la pasta de carbono (mezcla de grafito y una sustancia plastificante, por ejemplo aceite de parafina) como pone de manifiesto la reciente revisión bibliográfica llevada a cabo por Kalcher y cols [Kalcher, K., Wang, J., Kauffmann, J.M., Svancara, I., Vytras, K., Neuhold, C., Zhongping, Y., (1994) *Electroanalysis* (en prensa)] en la que se recogen 311 referencias bibliográficas de electrodos de pasta de carbono para sensores electroquímicos. En este tipo de electrodos enzimáticos, el enzima se reparte de un modo homogéneo en la pasta de carbono aun cuando sólo actúa el que se encuentra en la superficie; el resto permanece en reserva en el interior de la pasta hasta que por pulido se renueva la superficie. Esto representa una notable ventaja frente a otros tipos de electrodos enzimáticos en los que el enzima se deposita en la superficie del electrodo y que en caso de inactivación del enzima hay que desechar. Por el contrario en los de pasta de carbono, mediante pulido se renueva la superficie y el electrodo queda listo para su reutilización. Además los biosensores basados en pasta de carbono son susceptibles de ser utilizados en sistemas analíticos automáticos p.e. en sistemas de inyección en flujo (FIA). Más aún la pasta de carbono convenientemente manipulada puede emplearse en la fabricación en serie de electrodos mediante la técnica de impresión por chorro (*jetprinting*) [Newman, J.D., Turner, A.P.F. and Marrazza, G. (1992) *Anal. Chim. Acta*, **262**, 13-17].

### Estado de la técnica

Se han descrito electrodos de platino [Khan, G.F., Kobatake, E., Ikariyama, Y., Aizawa, M., (1993) *Anal. Chim. Acta*, **281**, 527-533] o pasta de carbono [Ikeda, T., Matsushita, F. and Senda, M. (1991) *Biosensors and Bioelectronics*, **6**, 299-304] sobre los que se ha depositado el enzima fructosa deshidrogenasa, FDH, que dan una respuesta electroquímica al introducirlos en una disolución que contiene fructosa [Khan *et al.*, op. cit.; Ikeda *et al.*, o.c.]. También se han descrito electrodos de pasta de carbón sobre cuya superficie se ha depositado una disolución de FDH que incorpo-

rados a un sistema FIA (*Flow injection analysis* análisis por inyección en flujo-), dieron respuesta frente a inyecciones de fructosa [Gorton, L., Domínguez, E., Marko-Varga, G., Persson, B., Jönsson-Pettersson, G. Csöregi, E., Johansson, K., Narasaiah, D., Ghobadi, S., Kacaniklic V., Skotheim, T., Hale, S.T.P., Okamoto, Y., y Lan, H.L. en E. Pungor (Ed.), *Bioelectroanalysis*, 2nd Symposium held at Mátrafüred, Hungary 11-15 October, 1992. Akademiaia Kiadó, Budapest, Mátrafüred, Hungary, 1993, pp 33-52]. Sin embargo estos autores indican que el enzima pierde su actividad cuando se la incorpora a la mezcla grafito/aceite de parafina [Gorton *et al.*, op. cit.]. Por otra parte estos mismos autores observaron un aumento de respuesta cuando la disolución de FDH depositada sobre la superficie de la pasta de carbón contenía un 0.1% de polietileneimina [Gorton *et al.*, op. cit.]. Es de destacar que en todos estos electrodos se produce una transferencia directa de electrones entre el enzima y el electrodo.

A diferencia de estos electrodos sin mediadores redox se han descrito bioreactores de FDH, incorporados a sistemas FIA, con detección amperométrica de un mediador redox que se reduce por el enzima en presencia de fructosa [Matsumoto, k., Hamada, O., Ukeda, H., Osajima, Y., (1986) *Anal. Chem.*, **58**, 2732-2734; Matsumoto, k., Hamikado, H., Matsubara, H., Osajima, Y., (1988) *Anal. Chem.*, **60**, 147-151; Matsumoto, K., Baeza, J.J., Mottola, H.A., (1993) *Anal. Chem.*, **65**, 1658-1661]. También en dos patentes de las que son autores T. Yoshioka y S. Shiro [Toshihiko, Y. and Shiro, N. (1993), patente US 5,192,415; Toshihiko, Y. and Shiro, N. (1993), patente EP 537, 761] se refiere la preparación de electrodos para fructosa *en presencia de mediadores redox*, por ejemplo ferricianuro potásico. Sin embargo, no se ha encontrado ningún documento relativo a la preparación de biosensores de fructosa basados en la transferencia directa de electrones, esto es sin mediadores redox exógenos, entre el enzima fructosa deshidrogenasa y el electrodo de pasta de carbono a base de mezclas de grafito, aceite de parafina y fructosa deshidrogenasa, con o sin otros ingredientes.

### Descripción de la invención

La presente invención se refiere a unos biosensores para la determinación de fructosa, basados en electrodos amperométricos de transferencia electrónica directa entre el enzima fructosa deshidrogenasa, FDH, y la pasta de carbono donde se incorpora el enzima. Comprende el procedimiento de preparación de estos electrodos y su utilización para la determinación del contenido en fructosa en miel, jarabes de glucosa/fructosa, bebidas industriales y zumos o pulpas de frutas, así como en sustancias alimenticias o aditivos de alimentos para uso humano o animal.

El enzima FDH puede aislarse de *Gluconobacter* sp. (comercialmente disponible) pero la invención no está ligada al empleo de este microorganismo ya que la FDH a emplear puede obtenerse de cualquier otra fuente biológica natural o de otra obtenida por técnicas de ingeniería genética.

Para favorecer la mezcla del carbono con la

enzima es conveniente el empleo de sustancias detergentes del tipo éteres de polioxietileno (Triton X-100), ésteres de polioxietileno (comercialmente denominado MIRJ 4,5) o éteres cetílicos (tales como Brij 58) a concentraciones entre 0.05 y 1%.

Tras la preparación del electrodo el enzima utilizado queda absorbido sobre el material del electrodo (polvo de grafito). De esta manera se consigue una transferencia de electrones directa entre el enzima y el electrodo sin que sea necesario adicionar cofactores o mediadores redox. En el flujo de electrones responsable de la señal eléctrica que se observa en presencia de fructosa participan los centros redox del enzima. Estos centros redox son reducidos por la fructosa y son reoxidados directamente por la pasta de carbono según un esquema que se representa en la figura 1. El cambio de corriente es proporcional a la concentración de fructosa en el medio.

El electrodo, que como se ha dicho, se prepara mezclando polvo de grafito, necesita la adición de un agente plastificante (por ejemplo parafina líquida) aparte de algunos de los siguientes ingredientes tales como Brij-58, dextrina, iones calcio y/o magnesio, kanamicina, lactitol, Mirj 45, polietilenglicol, polietileneimina, polilisina o Tritón X-100 para darle la consistencia adecuada.

Se ha visto que, a diferencia con lo que ocurre con otras deshidrogenasas (por ejemplo glucosa deshidrogenasa), la adición de la parafina líquida, necesaria para dar consistencia a la pasta inactiva la enzima. Así en los ensayos realizados por Gorton, Domínguez et al. [op. cit.] añadiendo la FDH a la pasta de grafito-parafina, encuentra que la respuesta del electrodo es nula. Esta dificultad la resuelven estos autores en el mencionado trabajo, como se ha expuesto al dar el estado de la técnica, depositando una disolución del enzima sobre el electrodo y posterior secado, solución evidentemente poco satisfactoria ya que el electrodo no puede regenerarse cuando se pierde la enzima.

En la presente invención se ha resuelto el problema de la inactivación de la enzima por la parafina llevando a cabo la preparación del electrodo de la siguiente manera:

Se parte de una solución de enzima (entre 200 y 600 unidades por mililitro de disolución) en un tampón de pH (entre 4 y 6) que contiene un 0.01 a un 1 % de un tensoactivo (p.e. un 0,1% de tritón X-100). Entre un 0.5 a un 10 % en peso de esta disolución se añade a polvo de grafito y se mezclan cuidadosamente hasta su homogenización. La mezcla se deseca bajo presión reducida (1 a 10 Pa) durante 5 a 60 minutos a 3 - 8°C. Una vez seca la pasta, se le adiciona entre un 0.5 y un 4 % en peso de una solución acuosa de polietileneimina, PEI, (solución al 0.1 % tamponada a pH=4-6) volviendo a mezclarse íntimamente los productos y a secarse la muestra bajo presión reducida durante un período de 2 a 30 horas a 3 - 8°C. El polvo de grafito resultante se mezcla con un plastificante adecuado, por ejemplo con un 50 % en peso de aceite de parafina, obteniendo la correspondiente pasta de carbono modificada.

El plastificante a añadir puede ser cualquiera de los descritos en bibliografía para estos fines [cif. K. Kalcher, *Electroanalysis*, 2, 419 (1984); C. Urbaniczky y K. Lundds troöm. *AnaL Chim. Acta*,

176, 169 (1984)] tales como aceite de parafina, aceite de silicona, Nujol, cera artificial, bromoformo y bromonaftaleno.

El electrodo obtenido, se introduce en un soporte de la forma adecuada y la superficie se pule.

Para electrodos con un área de 0.07 cm<sup>2</sup>, preparados según el orden de adición de los componentes que se indica y midiendo una solución con 15 mM de fructosa, los resultados obtenidos son los siguientes:

- Electrodo grafito-parafina-FDH [Gorton, Domínguez *et al*, op. cit.]. *Respuesta 0 nA*.
- Electrodo grafito-FDH-parafina [según la presente invención]. *Respuesta 2 nA*
- Electrodo grafito-FDH-PEI-parafina [según la presente invención]. *Respuesta 15 nA*.

Se ha encontrado que cuando el grafito de partida se somete a un proceso tratamiento térmico mediante calentamiento (puede ser al aire) durante mas de 1 min a una temperatura superior a 650°C, la sensibilidad del electrodo aumenta sensiblemente obteniéndose una *respuesta de 95 nA*. El aumento de corriente observado tras calentamiento del grafito, posiblemente se deba al incremento en el área de las partículas de grafito que dan lugar a una mayor superficie para absorber la FDH y al incremento de estructuras quinónicas, tal y como proponen Gorton et al. en anteriores trabajos [cif. Gorton, Baeza *et al*.; Gorton, L. Jönsson-Pettersson, G. Csöregi, E. Johansson, K. Domínguez, E. y Marko-Varga, G. (1992) *Analyst*, 117, 1235-1241].

Como puede deducirse de nuestros resultados más arriba presentados, el orden de adición de los componentes del electrodo de pasta de carbono modificado con FDH y la presencia de PEI son esenciales para la actividad de la enzima en el electrodo.

El efecto de la PEI también se observa cuando, para la medida de la actividad enzimática, se usa el enzima en solución (resultados no publicados) o cuando se añade al enzima depositada sobre la superficie de la pasta de carbono [cif. Gordon *et al*.].

Una de las ventajas del electrodo objeto de la presente invención sobre el descrito por Gorton es, la posibilidad de regeneración mediante pulido de su superficie que permite eliminar el reactivo desactivado y aflorar nuevo reactivo embebido en su masa.

Ejemplo de fabricación y utilización del electrodo  
*Preparación de fabricación y utilización del electrodo*

A 5 mg de polvo de grafito precalentado a 700°C durante 1 1/2 min se adicionaron 35  $\mu$ l de la solución de enzima (440 unidades de FDH se disolvieron en 1 ml de buffer acetato 0.1 M de pH 5, que contiene un 0,1% de tritón X-100), mezclándose cuidadosamente para su homogenización. La mezcla se desecó bajo presión reducida durante aproximadamente 15 minutos. Una vez seca, se le adicionaron otros 35  $\mu$ l de una solución acuosa de PEI (solución al 0.1% a pH=5), volviendo a mezclarse íntimamente los producción

y a secarse la muestra bajo presión reducida durante un período de 24 horas a 4°C. El polvo de grafito resultante se mezcló cuidadosamente con 4 mg de aceite de parafina, obteniendo la correspondiente pasta de carbono modificada.

#### Instrumentación

Las medidas electroquímicas se realizaron con un voltamógrafo BAS modelo CV-27 conectado a un detector electroquímico METROHM modelo 656 y a un registrador X-Y YOKOGAWA modelo 3023. Todas las medidas se hicieron a temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) en una celda electroquímica formada por el electrodo de pasta de carbono modificado como electrodo de trabajo, uno de carbón vítreo como electrodo auxiliar y un electrodo de Ag/CIAg saturado de KCl como electrodo de referencia.

La celda se conectó a un sistema de una sola línea de inyección de flujo (FI) con una bomba peristáltica GILSON modelo MINIPULS3 y una válvula de inyección modelo RHEODYNE modelo 7125 con un bucle de 20  $\mu\text{l}$ . Las conexiones entre varias partes del sistema FI fueron realizadas con tubos de teflón. Todas las soluciones fueron deaireadas antes de su uso para impedir que aparecieran microburbujas en el sistema de flujo.

#### Utilización del electrodo

##### Resultados obtenidos

En todos los casos se ha utilizado un electrodo de 0.03  $\text{cm}^2$  de superficie y las medidas se realizaban a 25°C.

El porcentaje de respuesta del biosensor de FDH se estudió en el intervalo de pH de 4 a 7 usando un tampón acetato. Como se muestra en la figura 2 el pH óptimo fue 4 para la enzima libre, entre 4-5 para la enzima en solución en presencia del polímero PEI y entre 5-6 para la enzima inmovilizada en la pasta de carbono. Así pues, la presencia del polímero y la inmovilización de la FDH en la pasta de carbono desplazan el pH máximo aproximadamente en 1.5 unidades más, ampliándose el intervalo en el cual la enzima presenta una mayor actividad.

##### Efecto de la velocidad de flujo

En la figura 3 se muestra la influencia de la velocidad del flujo sobre la capacidad de respuesta del biosensor de FDH frente a una disolución 10 mM de fructosa. A partir de estos datos hemos elegido un flujo de 0.7 ml como el más idóneo para nuestros experimentos, ya que aun cuando se obtiene una menor respuesta que a flujos más altos, permite una mayor frecuencia de análisis.

##### Linealidad y límite de detección

La intensidad de la corriente se estudió en el intervalo de 0.5 a 50 mM de fructosa, comprobándose que la respuesta es directamente proporcional a la concentración de fructosa hasta 10 mM (Fig. 4). El análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, en sistema de flujo (inyectando volúmenes de muestras de 0.02 ml), dio

$$y = 3.174x - 1.84, r=0.977, n=24$$

donde  $y$  es altura del pico (intensidad de corriente/nA) y  $x$  es la concentración de fructosa (mM).

El límite de detección, correspondiente a tres

veces la señal del blanco, fue de 75  $\mu\text{M}$  de fructosa. No se han observado interferencias al adicionar otros azúcares (10 mM) tales como glucosa, sacarosa, lactosa, galactosa y manitol.

#### Reproducibilidad

La reproducibilidad de la intensidad de la respuesta se examinó usando 10 mM de fructosa. El coeficiente de variación fue de 1.6 % (n=15) como puede verse en la figura 5.

#### Estabilidad

La estabilidad del electrodo de pasta de carbono modificado con FDH fue examinado por inyección de 20  $\mu\text{l}$  de fructosa 10 mM cada 7.3 minutos en el sistema de flujo (0.75  $\text{ml min}^{-1}$ ) durante períodos de aproximadamente 5-6 horas a lo largo de 4 días (ver figura 6).

El biosensor es muy estable durante aproximadamente las primeras 10 a 12 horas de trabajo, existiendo una pérdida aproximada de un 15 % de actividad en tomo a las 24 horas y de un 40 % a las 48 horas de trabajo.

#### Determinación de fructosa en miel

Se disolvieron 10 g de miel en 100 ml de tampón acetato 0.1 M de pH 5. Esta solución se filtró a través de filtro de papel Whatman No 1, practicando diferentes diluciones a la solución resultante. Las muestras fueron medidas al menos seis veces cada una.

Para la determinación de la fructosa, como técnica de referencia para validación de los resultados obtenidos con los biosensores de la presente invención, se utilizó la técnica convencional de cromatografía líquida (HPLC) con detector de índice de refracción.

En la tabla I se presenta la cantidad de fructosa que contienen la miel según su origen botánico. Estos resultados, muestran que el biosensor de fructosa da resultados similares a los obtenidos mediante la técnica de HPLC. Es evidente que este biosensor de FDH proporciona un método fiable y a la vez simple, rápido y económico.

TABLA I

Estudio de comparación entre el electrodo de pasta de carbono y el método de la AOAC para la determinación de fructosa en miel

| Muestra de miel | % de fructosa |           | Diferencias en % 6 |
|-----------------|---------------|-----------|--------------------|
|                 | HPLC          | Biosensor |                    |
| Naranja         | 37.70         | 37.60     | -0.2               |
| Romero          | 37,39         | 37.89     | +1.3               |
| Gayuba          | 37.31         | 38.84     | +4.1               |
| Mil flores      | 35.09         | 37.16     | +5.8               |

#### Descripción de las figuras

Figura 1.- Esquema de la reacción de oxidación de la D-fructosa en un electrodo de pasta de carbono modificado con FDH.

Figura 2.- Influencia del pH sobre la actividad de FDH en presencia de 10 mM de fructosa. (a) FDH en solución, (b) FDH en solución con 0.05% PEI, (c) electrodo de pasta de carbono modificado con FDH; Potencial + 0.4 V vs Ag/AgCl. La velocidad del flujo 0.70  $\text{ml min}^{-1}$ .

Figura 3.- Efecto de la velocidad del flujo en la altura del pico en la determinación de fructosa por FIA usando el biosensor de pasta de carbono modificada con FDH. En las siguientes condiciones muestra 10 mM de fructosa, volumen de inyección 200  $\mu$ l, transportador tampón acetato 0.1 M de pH 5.0 ( $E_{appl} = + 0.4$  V vs Ag/AgCl).

Figura 4.- Respuesta del biosensor de fructosa en función de la concentración de fructosa por análisis de inyección de flujo utilizando

tampón acetato 0.1 M de pH 5 como portador. Volumen de inyección 200  $\mu$ l y, flujo de 1.2  $\text{ml min}^{-1}$ .  $E_{appl}=+0.4$  V.

Figura 5.- Reproducibilidad de la intensidad de respuesta a inyecciones de soluciones de fructosa 10 mM.

Figura 6.- Estabilidad del biosensor de FDH durante las horas de trabajo. Ordenadas intensidad; en abscisas tiempo en horas.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

## REIVINDICACIONES

1. Biosensor de pasta de carbono para la medida de fructosa basados en electrodos amperométricos de transferencia electrónica directa entre el enzima fructosa deshidrogenasa, **FDH**, **caracterizado** porque, para evitar la inactivación de la enzima por el aglomerante (*pasting liquid*, en la bibliografía anglosajona) del grafito (aceite de parafina, por ejemplo), antes del aglomerante o plastificante, se añade a la mezcla grafito-enzima una solución acuosa de polietilenimina, **PEI**, y una vez seca la mezcla se procede a añadir el aglomerante y formar el electrodo.

2. Biosensor de pasta de carbono para la medida de fructosa, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la enzima **FDH** puede ser la comercial, aislada de *Gluconobacter* sp. (comercialmente disponible) o una procedente de cualquier otra fuente biológica natural o de otra obtenida por técnicas de ingeniería genética.

3. Biosensor de pasta de carbono para la medida de fructosa, según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque, para favorecer la mezcla de la enzima con el grafito, se añade a la mezcla sustancias detergentes del tipo eteres de polioxictileno (Triton X-100), esterres de polioxictileno (MIRJ 45) o éter cetílico (Brij 58).

4. Biosensor de pasta de carbono para la medida de fructosa, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el grafito utilizado se somete a un tratamiento térmico (puede ser al aire) durante más de 1 min a una temperatura superior a 650°C.

5. Preparación de un biosensor de pasta de carbono, según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque esta se lleva a cabo según las siguientes etapas:

- a) Se parte de una solución de enzima (entre 200 y 600 unidades por mililitro de disolución) en un tampón de pH (entre 4 y 6) que contiene un 0.01 a un 1 % de un tensoactivo (p.e. un 0.1% de tritón X-100). Entre un 0.5 a un 10 % en peso de esta disolución se añade a polvo de grafito y se mezclan cuidadosamente hasta su homogenización.

- b) La mezcla se deseca bajo presión reducida (1 a 10 Pa) durante 5 a 60 minutos a 3 - 8°C.

- c) Una vez seca la pasta, se le adiciona entre un 0.5 y un 4 % en peso de una solución acuosa de **PEI** (solución al 0.1 % tamponada a pH=4-6) volviendo a mezclarse íntimamente los productos y a secarse la muestra bajo presión reducida durante un período de 2 a 30 horas a 3 - 8°C.

- d) El polvo de grafito resultante se mezcla con un plastificante adecuado, por ejemplo con un 50 % en peso de aceite de parafina, obteniendo la correspondiente pasta de carbono modificada.

6. Utilización del biosensor de pasta de carbono, según las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada** porque la respuesta del biosensor de FDH tiene lugar a pH óptimo entre 5 y 6 para la enzima inmovilizada en la pasta de carbono.

7. Utilización del biosensor de pasta de carbono, según las reivindicaciones 1 a 5, en sistema de flujo, **caracterizada** porque la intensidad de la corriente, utilizando un electrodo de 0.03 cm<sup>2</sup> de superficie a 25°C, de temperatura, e inyectando volúmenes de muestra de 0.02 ml, en el intervalo de 0.5 a 50 mM de fructosa es directamente proporcional a la concentración de fructosa hasta 10 mM, existiendo entre la altura del pico y (intensidad de corriente en nA) y  $\underline{y}$  la concentración de fructosa (mM) una correlación dada por la fórmula

$$\underline{y} = 3.174\underline{x} - 1.84, r=0.977, n=24$$

con un límite de detección, correspondiente a tres veces la señal del blanco (75  $\mu$ M de fructosa).

8. Utilización del biosensor de pasta de carbono, según las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada** porque el biosensor es muy estable durante aproximadamente las primeras 10 a 12 horas de trabajo, existiendo una pérdida aproximada de un 15 % de actividad en tomo a las 24 horas y de un 40 % a las 48 horas de trabajo.

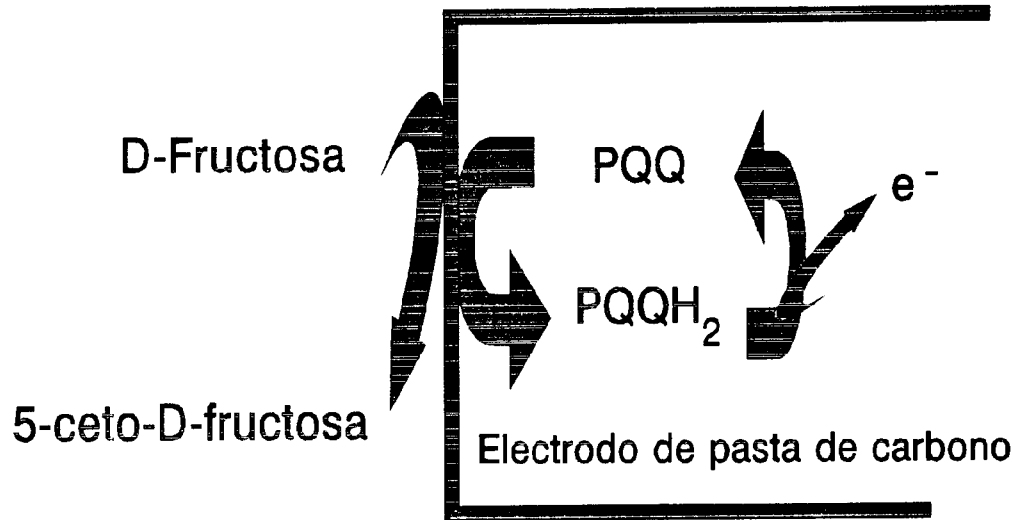


Figura 1

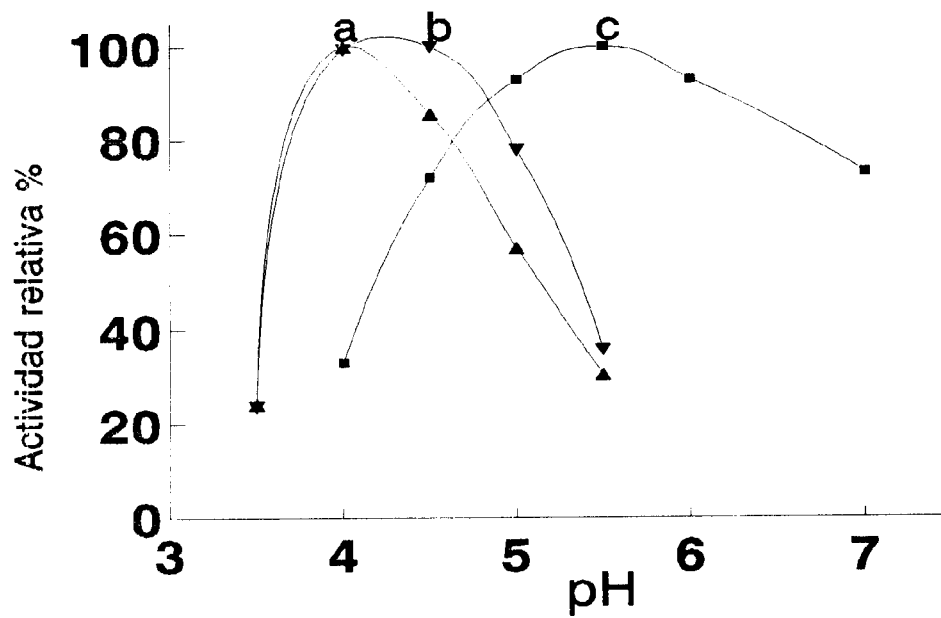


Figura 2

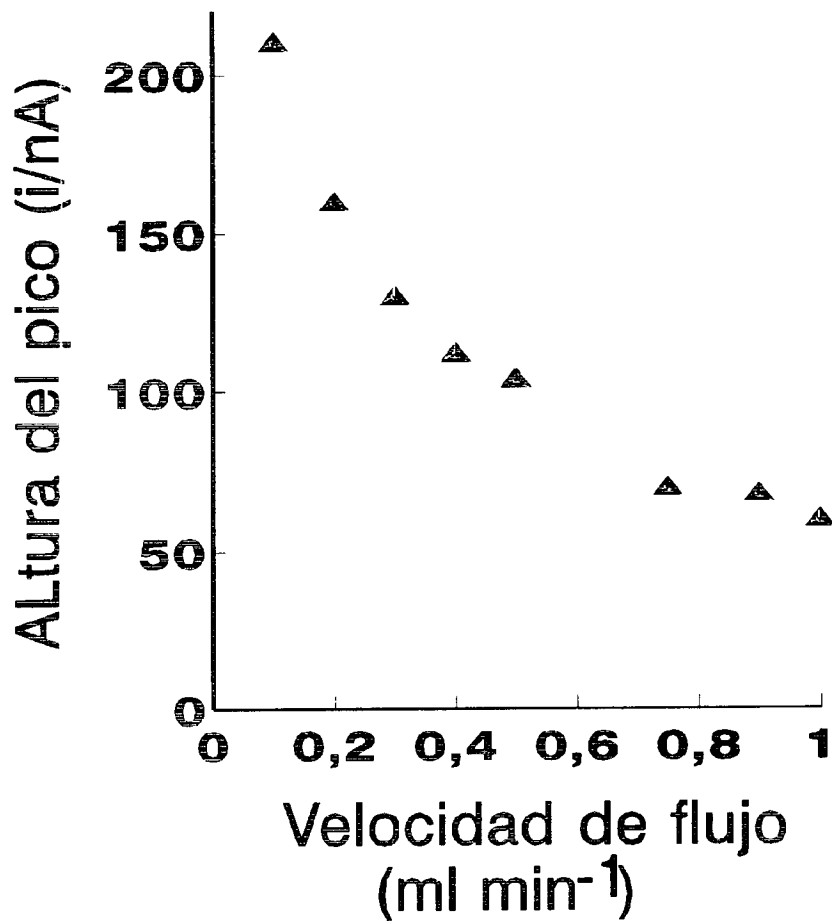


Figura 3

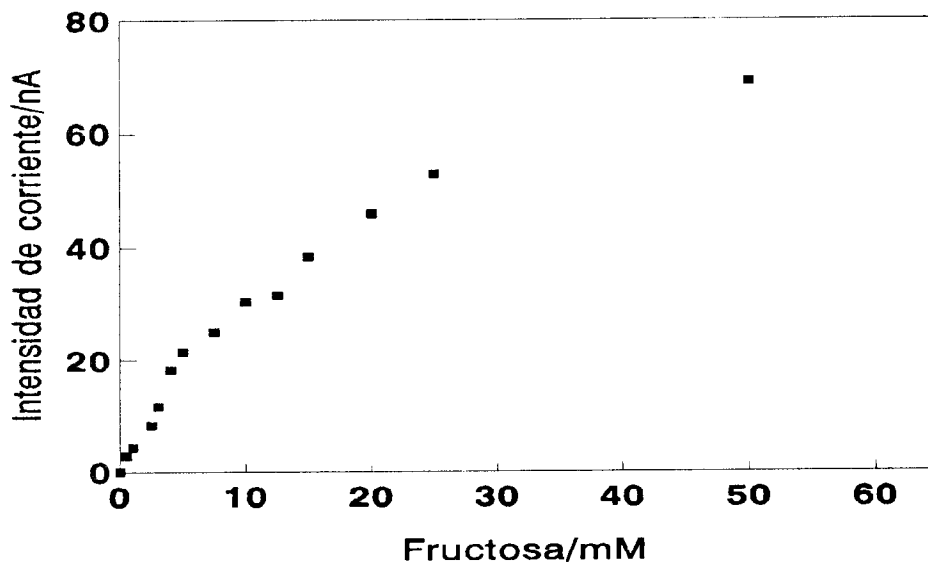


Figura 4



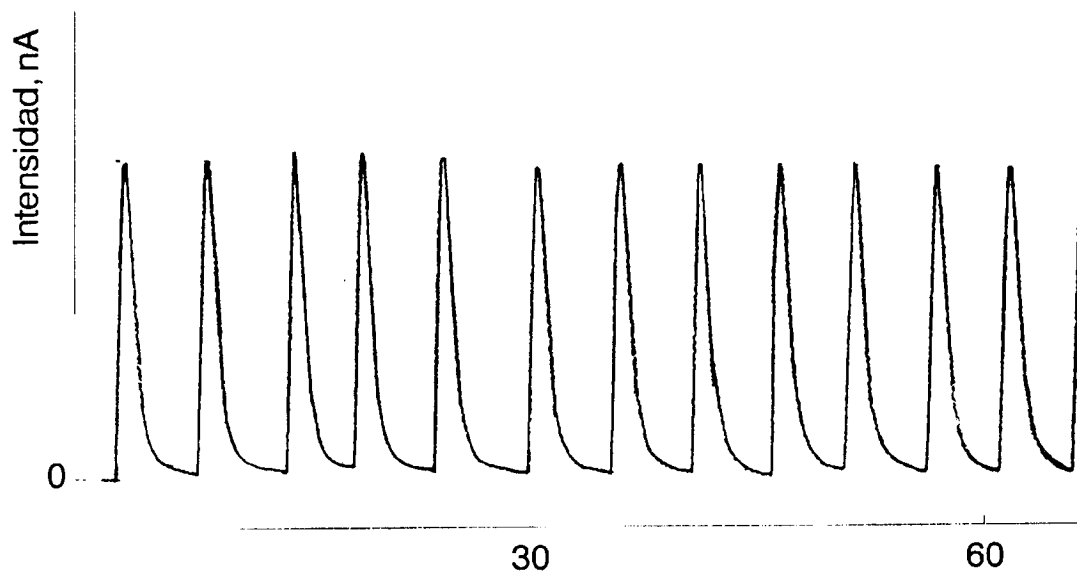


Figura 5

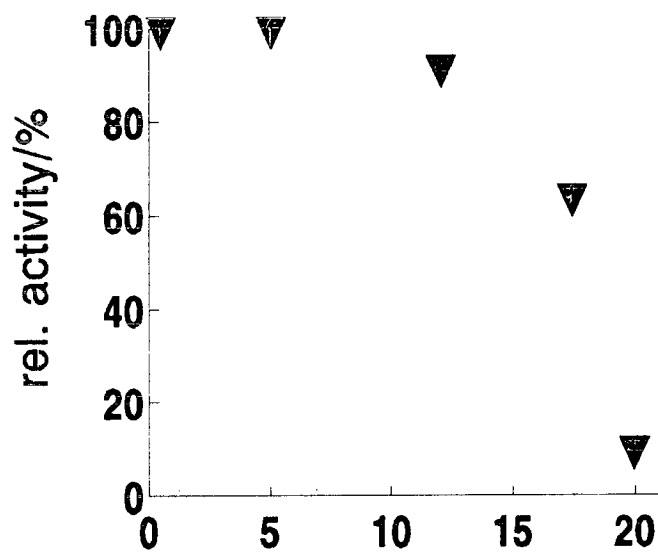


Figura 6



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>: G01N27/327

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados  | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| A         | US-5298144-A (SPOKANE, R.B.) 29.03.94<br>* todo el documento *  | 1-8                        |
| A         | Base de datos WPIL en Questel, semana 9136, Londres: Derwent Publications Ltd., AN 91-262458, JP-3170856-A (NAKANO SUMISE, KK) 24.07.91<br>* resumen *                  | 1-8                        |
| A         | Base de datos WPIL en Questel, semana 9417, Londres: Derwent Publications Ltd., AN 94-141360, JP-608804-A (MATSUSHITA DENKI SANGYO, KK) 29.03.94<br>* resumen *         | 1-8                        |
| A         | Ikeda, T. et al., "Amperometric fructose sensor based on direct bioelectrocatalysis", 1991, Biosensors & Bioelectronics, vol. 6, pp.: 299-304.<br>* todo el documento * | 1-8                        |

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

**Fecha de realización del informe**  
03.10.96

**Examinador**  
A. Maquedano Herrero

**Página**  
1/1