

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**EVALUACIÓN DE CÁTODOS MODIFICADOS CON LACASAS EN  
LA VELOCIDAD DE LA TRANSFERENCIA DE ELECTRONES  
PARA SU POTENCIAL APLICACIÓN EN CELDAS DE  
ELECTRÓLISIS MICROBIANAS**

**POR:**

**M.C. IRIS CRISTINA ARVIZU DE LEÓN**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
MICROBIOLOGÍA APLICADA**

Diciembre, 2023

**Evaluación de cátodos modificados con lacasas en la velocidad de la transferencia de electrones para su potencial aplicación en celdas de electrólisis microbianas**

Los miembros del comité de tesis aprueban la tesis realizada por la alumna:  
Iris Cristina Arvizu de León, con matrícula 1510927, como opción al grado de  
Doctorado en Microbiología Aplicada

**Firmas:**

---

Dra. Alcione García González

---

Dr. Refugio Bernardo García Reyes

---

Dra. María Elena Cantú Cárdenas

---

Dr. Ulrico Javier López Chuken

---

Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu

---

Dra. María Elena Cantú Cárdenas  
Subdirectora de Estudios de Posgrado

**Evaluación de cátodos modificados con lacasas en la velocidad de la transferencia de electrones para su potencial aplicación en celdas de electrólisis microbianas**

**Firmas:**

---

Dra. Alcione García González

---

Dr. Refugio Bernardo García Reyes

## **AGRADECIMIENTOS**

## RESUMEN

Iris Cristina Arvizu de León  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Ciencias Químicas

Fecha de graduación: diciembre de 2023

Título de Estudio: **Evaluación de cátodos modificados con lacasas en la velocidad de la transferencia de electrones para su potencial aplicación en celdas de electrólisis microbianas**

Número de páginas:74

Candidata para el grado de Doctorado en  
Microbiología Aplicada

### **Área de Estudio: Microbiología Aplicada**

**Propósito y Método de Estudio:** El uso de biocátodos en celdas de electrólisis microbiana es una de las formas más ingeniosas de producir energía verde, basada en la capacidad de algunas enzimas oxidorreductasas de acelerar la reducción de protones para dar lugar a la reacción de liberación de hidrógeno. En este trabajo se evaluó la enzima lacasa del hongo *Trametes versicolor* inmovilizada covalentemente sobre nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, ZnO y CuO para su uso como biocátodo en una celda de electrolisis microbiana. Primero se obtuvo la enzima del hongo *Trametes versicolor* mediante fermentación sumergida para posteriormente ser semipurificada con centrífugas una vez que se tuvo el extracto enzimático listo, se pasó a trabajar con las nanopartículas, la superficie de estas se modificó químicamente con el reactivo APTMS, luego se realizó la inmovilización de la enzima lacasa de forma covalente utilizando glutaraldehído como enlazador. Los materiales solos, material/NH<sub>2</sub>, material/NH<sub>2</sub>/Glut y material/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac se caracterizaron por FTIR, potencial  $\zeta$ , XPS y SEM. Posteriormente, las nanopartículas cargadas con enzimas se adsorbieron en un electrodo de carbono vítreo (GCE) para su caracterización electroquímica

mediante voltametría cíclica (CV), de esta manera se compararon los tres materiales para seleccionar al mejor y continuar con su caracterización mediante espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) y voltametría de barrido lineal (LSV).

Se obtuvo un extracto enzimático con una actividad de 1,127 U/mL una vez que se purificó esta actividad aumentó a 5,007 U/mL, las caracterizaciones por Potencial  $\zeta$ , XPS, SEM-EDAX y FTIR de los nanomateriales revelaron una correcta inmovilización de la enzima sobre los materiales. Alcanzando una capacidad de captación enzimática de 55% para CuO, 60% TiO<sub>2</sub> y 99% ZnO, se demostró que la lacasa inmovilizada sobre los nanomateriales mejoraban la actividad electrocatalítica cuando se soporta sobre un GCE; este bioeléctrico exhibió un aumento significativo en la oxidación y la reducción de los picos de corriente en comparación con el GCE solo y el material sin modificar.

**Contribuciones y Conclusiones:** Se seleccionó a TiO<sub>2</sub> como el mejor material para trabajar ya que presentó un potencial de oxidación-reducción mayor que los electrodos con CuO y ZnO, se observó como con GCE/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac, la tasa de transferencia de electrones mejoró mucho; la magnitud de la impedancia de este bioeléctrico fue de 1.15 Wcm<sup>2</sup> menor que la de los electrodos GCE 1.240 Wcm<sup>2</sup> y GCE/TiO<sub>2</sub> 1.26 Wcm<sup>2</sup>. Finalmente, las curvas de polarización mostraron que el sobrepotencial disminuye y la corriente catódica aumenta para el electrodo GCE/TiO<sub>2</sub>/ NH<sub>2</sub>/Glut/Lac, características requeridas para la evolución del hidrógeno, demostrando así con los resultados obtenidos que la lacasa inmovilizada en TiO<sub>2</sub> puede funcionar como un biocátodo en una celda de electrólisis microbiana.

FIRMA DEL ASESOR: \_\_\_\_\_  
Dra. Alcione García González

## ÍNDICE

<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>2 ANTECEDENTES</b> .....	
.....¡Error! Marcador no definido.	
<b>2.1 Métodos para la producción de H<sub>2</sub></b> .....¡Error! Marcador no definido.	
<b>2.2 Producción de H<sub>2</sub> utilizando métodos biológicos</b> .....	<b>8</b>
<b>2.3 Potencial redox durante la producción de H<sub>2</sub> en fermentación oscura</b> .....	<b>9</b>
<b>2.4 Progresos de mejoramiento en Celdas de electrólisis microbianas (CEM)</b> .....	<b>9</b>
<b>2.5 Transferencia electrónica en sistemas catalizados por lacasa</b> .....	<b>11</b>
<b>3. Marco Teórico</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1 Producción microbiológica de H<sub>2</sub></b> .....	<b>12</b>
<b>3.1.1 Biofotólisis</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1.2 Biofotólisis directa</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1.3 Biofotólisis indirecta</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1.4 Fotofermentación</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1.5 Fermentación oscura</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1.6 Celda de electrólisis microbiana</b> .....	<b>13</b>
<b>3.2 Sistemas Bioelectroquímicos</b> .....	<b>14</b>
<b>3.2.1 Celdas de combustible microbianas (CCM)</b> .....	<b>14</b>
<b>3.2.2 Configuración de las celdas de combustible microbianas (CCM)</b> .....	<b>14</b>
<b>3.3 Celdas de electrólisis microbiana (CEM)</b> .....	<b>15</b>
<b>3.3.1 Configuración de las celdas de electrólisis microbiana (CEM)</b> .....	<b>15</b>
<b>3.3.2 Diferencias</b> .....	<b>16</b>
<b>3.4 Microorganismos electrogénicos y/o electroactivos</b> .....	<b>16</b>
<b>3.4.1 Mecanismos de transporte de electrones en sistemas bioelectroquímicos</b> .....	<b>17</b>
<b>3.5 Bioánodos</b> .....	<b>18</b>
<b>3.5.1 Sustratos</b> .....	<b>18</b>
<b>3.5.2 Microorganismos anódicos</b> .....	<b>19</b>
<b>3.6 Cátodos y Biocátodos</b> .....	<b>19</b>

3.6.1 Materiales para cátodos y biocátodos.....	20
3.6.2.Lacasas.....	20
3.6.3 Mecanismos de acción de la lacasas .....	21
3.6.4Transferencia electrónica en sistemas catalizados por enzimas .....	21
3.6.5 Lacasas inmovilizadas para biocátado .....	22
<b>4. APORTACIÓN CIENTÍFICA.....</b>	<b>24</b>
<b>5.HIPÓTESIS.....</b>	<b>24</b>
<b>6. OBJETIVOS Y METAS.....</b>	<b>24</b>
<b>6.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>24</b>
<b>7 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
7.1 Adaptación del inóculo microbiano .....	25
7.2 Propagación de la cepa fúngica y obtención de la biomasa.....	25
7.3 Producción de lacasas por fermentación sumergida.....	25
7.4 Caracterización del extracto obtenido durante la fermentación .....	26
sumergida.....	26
7.5 Semi-purificación del extracto crudo.....	¡Error! Marcador no definido.
7.6 Modificación de los nanomateriales con Lacasa ....	¡Error! Marcador no definido.
7.7 Caracterización de los nanomateriales .....	28
7.9 Fabricación de cátodos.....	31
7.9.2 Síntesis de películas de TiO <sub>2</sub> sobre vidrio ITO por la técnica LB .....	31
7.10 Configuración de la celda de electrolisis microbiana con y sin cátodo modificado .....	33
<b>8.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
8.2 Funcionalización y caracterización de nanomateriales ZnO, TiO <sub>2</sub> y CuO.....	39
8.3 Pruebas de estabilidad.....	52
8.3 Pruebas de estabilidad.....	53
8.4 Caracterización de los electrodos de GCE	¡Error! Marcador no definido.
<b>9. Conclusiones Preliminares.....</b>	<b>70</b>
<b>10. DISPOSICIÓN DE LOS RESIDUOS GENERADOS .....</b>	<b>71</b>
<b>11. REFERENCIAS .....</b>	<b>72</b>



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resumen de las tecnologías de producción de hidrógeno por energía primaria y fuente.....	<b>4</b>
<b>Tabla 2.</b> Diferentes configuraciones de sustratos utilizados y tasa de evolución de hidrógeno (Q) en celdas de electrólisis microbiana.....	<b>8</b>
<b>Tabla 3.</b> Composición del medio Kirk and Farrell.....	<b>23</b>
<b>Tabla 4.</b> Composición del medio para bacterias.....	<b>30</b>
<b>Tabla 5.</b> Comparación entre actividades enzimáticas (U/mL), proteína extracelular ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y actividad específica, en los cortes por amicon del extracto crudo de <i>Trametes versicolor</i> .....	<b>35</b>
<b>Tabla 6.</b> Comparación entre el potencial de carga superficial de los nanomateriales solos y después de ser aminados con 2 aminocilanos APTMS y APTES.....	<b>37</b>
<b>Tabla 7.</b> Parámetros del análisis de circuito equivalente de los resultados de EIS.....	<b>57</b>
<b>Tabla 8.</b> Coeficiente de transferencia en la deposición de ODA sobre vidrio ITO.....	<b>59</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismos de transferencia electrónica directa (a) y mediada (b).....	19
<b>Figura 2.</b> Relación de la concentración de lacasa contra azúcares reductores en el extracto crudo durante la fermentación sumergida de <i>Trametes versicolor</i> .....	33
<b>Figura 3.</b> Relación de la concentración de lacasa contra proteína extracelular en el extracto crudo durante la fermentación sumergida de <i>Trametes versicolor</i> .....	34
<b>Figura 4.</b> Relación de la concentración de lacasa contra compuestos fenólicos en el extracto crudo durante la fermentación sumergida de <i>Trametes versicolor</i> .....	35
<b>Figura 5.</b> Gel de poliacrilamida al 10% marcador de peso molecular (a), lacasa comercial (+) (b), extracto semi-purificado lacasa <i>Trametes versicolor</i> (c), y medio Kirk (-) (d).....	36
<b>Figura 6.</b> Difractograma de TiO <sub>2</sub> , TiO <sub>2</sub> /NH <sub>2</sub> y TiO <sub>2</sub> /NH <sub>2</sub> /Glut.....	36
<b>Figura 7.</b> Difractograma de ZnO, ZnO/NH <sub>2</sub> y ZnO/NH <sub>2</sub> /Glut, fase wurtzita.....	37
<b>Figura 8.</b> Difractograma de CuO, CuO/NH <sub>2</sub> y CuO/NH <sub>2</sub> /Glut. fase tenorita.....	38
<b>Figura 9.</b> Espectro de XPS de TiO <sub>2</sub> , TiO <sub>2</sub> /NH <sub>2</sub> y TiO <sub>2</sub> /NH <sub>2</sub> /Glut.....	38
<b>Figura 10.</b> Espectro de XPS de ZnO, ZnO/NH <sub>2</sub> y ZnO/NH <sub>2</sub> /Glut.....	39
<b>Figura 11.</b> Espectro de XPS de CuO, CuO/NH <sub>2</sub> y CuO/NH <sub>2</sub> /Glut.....	39
<b>Figura 12.</b> Microscopia electrónica de barrido TiO <sub>2</sub> , TiO <sub>2</sub> /NH <sub>2</sub> y TiO <sub>2</sub> /NH <sub>2</sub> /Glut/Lac con aumento de 30,000X.....	41
<b>Figura 13.</b> Mapeo elemental de muestra de TiO <sub>2</sub> /NH <sub>2</sub> /Glut/Lac por EDX.....	42
<b>Figura 14.</b> Microscopia electrónica de barrido CuO, CuO/NH <sub>2</sub> y CuO/NH <sub>2</sub> /Glut/Lac con aumento de 30,000X.....	42
<b>Figura 15.</b> Mapeo elemental de muestra de CuO/NH <sub>2</sub> /Glut/Lac por EDX.....	43
<b>Figura 16.</b> Microscopía electrónica de barrido ZnO, ZnO/NH <sub>2</sub> , ZnO/NH <sub>2</sub> /Glut, ZnO/NH <sub>2</sub> /Glut con aumento de X30,000.....	44
<b>Figura 17.</b> Edax ZnO, ZnO/NH <sub>2</sub> y ZnO/NH <sub>2</sub> /Glut/Lac.....	44
<b>Figura 18.</b> Espectro de FT-IR de TiO <sub>2</sub> y TiO <sub>2</sub> /NH <sub>2</sub> /Glut/Lac.....	45
<b>Figura 19.</b> Espectro de FT-IR de CuO y CuO/NH <sub>2</sub> /Glut/Lac.....	46
<b>Figura 20.</b> Espectro de FT-IR de ZnO y ZnO/NH <sub>2</sub> /Glut/Lac.....	47
<b>Figura 21.</b> Diferentes concentraciones de lacasa inmovilizada sobre los nanomateriales.....	48

<b>Figura 22.</b> Estabilidad enzimática a diferentes temperaturas (1) y pH (2) en buffer de fosfatos.....	<b>48</b>
<b>Figura 23.</b> Estabilidad de la actividad enzimática a diferentes tiempos, conservada a -20° de TiO <sub>2</sub> /NH <sub>2</sub> /Glut/Lac, ZnO/NH <sub>2</sub> /Glut/Lac y CuO/NH <sub>2</sub> /Glut/Lac.....	<b>48</b>
<b>Figura 24.</b> Voltamperometría cíclica con los electrodos de GCE/TiO <sub>2</sub> y GCE/TiO <sub>2</sub> /NH <sub>2</sub> /Glut/Lac en Buffer de Fosfatos a pH 7.5 con 1 mM de ABTS.....	<b>50</b>
<b>Figura 25.</b> Voltamperometría cíclica con los electrodos de GCE/CuO y GCE/CuO/NH <sub>2</sub> /Glut/Lac en Buffer de Fosfatos a pH 7.5 con 1 mM de ABTS.....	<b>51</b>
<b>Figura 26.</b> Voltamperometría cíclica con los electrodos de GCE/ZnO y GCE/ZnO/NH <sub>2</sub> /Glut/Lac en Buffer de Fosfatos a pH 7.5 con 1 mM de ABTS.....	<b>51</b>
<b>Figura 27.</b> Voltamperometría cíclica de los electrodos de GCE/TiO <sub>2</sub> /NH <sub>2</sub> /Glut/Lac, GCE/ZnO/NH <sub>2</sub> /Glut/Lac y GCE/CuO/NH <sub>2</sub> /Glut/Lac.....	<b>51</b>
<b>Figura 28.</b> Voltamperogramas cíclicos del electrodo (A) GCE/TiO <sub>2</sub> /NH <sub>2</sub> /Glut/Lac, en solución de KCl 1M + K <sub>3</sub> Fe (CN) <sub>6</sub> 5mM a una velocidad de barrido de 10 a 200 mV/s, y (B) Curva de calibración de la intensidad de corriente en función de la velocidad de barrido.....	<b>52</b>
<b>Figura 29.</b> Voltamperogramas cíclicos para GCE, GCE/TiO <sub>2</sub> , GCE/TiO <sub>2</sub> /NH <sub>2</sub> , GCE/TiO <sub>2</sub> /NH <sub>2</sub> /Glut y GCE/TiO <sub>2</sub> /NH <sub>2</sub> /Glut/Lac en KCl 1M + K <sub>3</sub> Fe (CN) <sub>6</sub> 5mM a una velocidad de 90 mV/s.....	<b>53</b>
<b>Figura 30.</b> Electrodo de carbono vítreo + TiO <sub>2</sub> + Lacasa Comercial y lacasa del hongo <i>Trametes versicolor</i> , en 0.1 M de KCl + 5 mM K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> Programa de Barrido: -0.8 V a 0.8 V una velocidad de 90 mV/S.....	<b>54</b>
<b>Figura 31.</b> Espectros de impedancia (gráficos de Nyquist) obtenidos para (A) GCE, (B) GCE/TiO <sub>2</sub> y (C) GCE/TiO <sub>2</sub> /NH <sub>2</sub> /Glut/Lac en KCl 1M + K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> 5Mm.....	<b>57</b>
<b>Figura 32.</b> Curvas de polarización catódica para GCE, GCE/TiO <sub>2</sub> GCE/TiO <sub>2</sub> /NH <sub>2</sub> /Glut/Lac (a), pendientes de Tafel en Buffer de fosfato 100 mM con KCl 0.1M pH 7 (b).....	<b>57</b>
<b>Figura 33.</b> Isotherma de ODA en agua ultrapura.....	<b>58</b>
<b>Figura 34.</b> Espectro de DRIFTS para las distintas modificaciones de los vidrios ITO.....	<b>60</b>
<b>Figura 35.</b> Voltamperograma de las distintas modificaciones del vidrio ITO.....	<b>60</b>
<b>Figura 36.</b> Diagrama de Nyquist de las distintas modificaciones del vidrio ITO KCl 1M + K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> 5mM.....	<b>62</b>
<b>Figura 37.</b> Montaje y configuración de la celda de electrólisis microbiana.....	<b>62</b>

## **ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA**

H<sub>2</sub>: Hidrógeno  
MEC: Celda de electrólisis microbiana  
MCC: Celda de combustible microbiana  
APTMS: (3-aminopropil) trietoxisilano  
GC: Carbono vítreo  
CA: carbón Activado  
Lac: Lacasa  
ABTS: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico  
kDa: Kilodaltons  
NH<sub>2</sub>: Grupo amino  
AQS: antraquinona-2-sulfonato  
DRX: Difracción de rayos X  
FTIR: Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier  
SEM: Microscopía de barrido electrónico  
EDS: Espectroscopia de energía dispersiva  
XPS: Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X  
CV: Voltamperometría cíclica  
EIS: espectroscopía de impedancia electroquímica  
Tv: Trametes versicolor  
mL: Mililitros  
M: Molaridad  
mM: Milimolar  
μM: Micromolar  
U: unidades de actividad enzimática  
ipa: Corriente de pico anódico  
Epa: Potencial de pico anódico  
Ag/AgCl: electrodo de plata/cloruro de plata  
V: Volts  
A: Ampere  
e<sup>-</sup>: electrón  
H<sup>+</sup>: protón  
mV: milivolt  
μA: microampere  
LB: Langmuir Blodget  
ODA: Octadecilamina  
PBS: Buffer de fosfatos  
BES (2- Bromoetansulfonato)

# 1 INTRODUCCIÓN

La sobre población ha ocasionado el uso excesivo de los combustibles fósiles, haciendo que dependamos en un 97% de los combustibles fósiles para obtener electricidad, calor y transporte. Entre estos combustibles destacan el petróleo, carbón y gas fósil[1]. Sin embargo, la quema de combustibles fósiles produce emisiones de gases de efecto invernadero, como el CO<sub>2</sub>, generando contaminantes de corta y larga duración. Esto provoca problemas de contaminación y la depreciación de las reservas energéticas mundiales.[2]. Una alternativa para mitigar el impacto ambiental es utilizar fuentes alternas de energía[3], como la bioenergía (obtenida a partir de la biomasa)[4], el bioetanol y el biohidrógeno. Actualmente, las energías renovables abastecen el 14% de la demanda energética mundial, siendo el 10% aportado por biomasa[5].

Una de las alternativas más atractivas para reemplazar los combustibles fósiles es el uso de hidrógeno (H<sub>2</sub>), el cual puede ser producido a partir de varias fuentes de energía, como fósil, biomasa, a partir de la electrólisis del agua, entre otras.[6]. El valor calorífico del H<sub>2</sub> es el más alto entre los combustibles no nucleares; su combustión no libera gases de efecto invernadero. Por lo tanto, el hidrógeno es considerado un combustible limpio ideal[7]. Sin embargo, en la actualidad, más del 95% se produce a partir de combustibles de origen fósil. Por esta razón, es de gran importancia el desarrollo de investigaciones que permitan encontrar formas sustentables de producción de hidrógeno[8].

La generación de H<sub>2</sub> por sistemas biológicos es una alternativa amigable con el ambiente[9]. De los mecanismos para la generación de biohidrógeno, la fermentación oscura es la técnica más usada. No obstante, han surgido nuevas tecnologías, como las celdas de electrólisis microbianas (CEM). Estas celdas permiten producir H<sub>2</sub> y, al mismo tiempo, degradar materia orgánica, la cual puede alcanzar las mismas eficiencias de remoción que los sistemas de digestión anaerobia[10]. Este sistema bioelectroquímico posee la ventaja de generar energía y, al mismo tiempo, realizar el tratamiento de aguas residuales. En la CEM, se produce hidrógeno en el cátodo (que no contiene microorganismos) y biogás en el ánodo (que sí los contiene); esta parte opera de forma anaerobia. A pesar de que las celdas de electrólisis requieren un impulso de energía (0.5 a 1.0 V), son rentables debido a la ventaja de la generación de hidrógeno como una fuente de energía sostenible.

El mercado del combustible de hidrógeno está aumentando según el informe de Fuel Cells and Hydrogen Joint Undertaking. El cual está valuado en 820,000 millones de euros. Esta es la cifra anual que podría alcanzar el mercado para el H<sub>2</sub>, aparte de a una disminución en emisiones de 560 millones de toneladas de CO<sub>2</sub> para el año 2050[11]. El hidrógeno es utilizado en diversos procesos industriales, por eso su demanda es alta[12]. Pero el interés creciente a nivel internacional es usarlo como combustible, con el fin de eliminar la dependencia que se tiene del petróleo y sus derivados. Las CEM se consideran plataformas novedosas para enfrentar la problemática de contaminación del agua y, al mismo tiempo, la generación de hidrógeno. Sin embargo, presentan algunas desventajas, como los altos costos de fabricación que son afectados por los materiales que se utilizan en el cátodo, como el platino y el titanio. Por ello, se han aplicado diferentes estrategias con el fin de mejorar la velocidad de transferencia de electrones en el cátodo, utilizando materiales menos costosos. Una estrategia muy poco estudiada en CEM es modificar el cátodo con enzimas (del tipo oxidorreductasas) con el fin de mejorar el proceso de reducción del cátodo. Recientemente, se ha reportado la modificación de un cátodo con lacasas inmovilizadas para mejorar la eficiencia de una celda de combustible (CCM)[13].

Tal como se ha destacado previamente, la quema de combustibles fósiles resulta en la emisión de gases o compuestos de efecto invernadero y contribuye al calentamiento global. Como alternativa, se plantea la producción de biohidrógeno mediante métodos más verdes. Una forma de hacerlo es por electrólisis del agua. Sin embargo, uno de los problemas de esta reacción es el uso de metales preciosos para el cátodo. Una alternativa más sustentable es el desarrollo de biocátodos con materiales más ecológicos y económicos. Además, estudios recientes mostraron que los materiales conductores modificados con enzimas tipo oxidorreductasas mejoraron el potencial redox, por lo que la evaluación de estos materiales para la modificación de los cátodos podría resultar prometedora. En este trabajo de investigación, se evaluó el efecto de la modificación del cátodo con lacasas inmovilizadas en nanopartículas de óxidos metálicos de TiO<sub>2</sub>, CuO y ZnO, para su posterior aplicación en celdas de electrólisis microbianas

## 2.ANTECEDENTES

### 2.1 Métodos para la producción de H<sub>2</sub>

Como se ha señalado con anterioridad, el hidrógeno puede ser generado mediante la utilización de diversas sustancias presentes en la naturaleza (agua dulce, salada, biomasa, sulfuro de hidrógeno y combustibles fósiles). Para producir hidrógeno con un impacto ambiental nulo o bajo ("verde"), todo el CO<sub>2</sub> debe procesarse con la ayuda de una fuente de energía para generar hidrógeno. Estas fuentes de energía pueden ser térmicas, eléctricas, fotónicas o bioquímicas. En la **Tabla 1** se muestra una representación general y breve de métodos de producción de hidrógeno que se utilizan en la actualidad. Existen otros métodos para producir H<sub>2</sub>, los cuales son menos utilizados como son los de fotosíntesis artificial y el reformado de combustibles fósiles [14].

**Tabla 1.** Resumen de las tecnologías de producción de hidrógeno por energía primaria y fuente

Método	Fuente		Descripción	Bibliografía
	Energía Primaria	Material		
Electrólisis	Eléctrica	Agua	La corriente continua se utiliza para dividir el agua en O <sub>2</sub> y H <sub>2</sub>	Chen <i>et al.</i> , 2016[15] Cui <i>et al.</i> , 2019[16] Mandal, 2020 [17]
Descomposición del arco de plasma		Combustible fósil	El gas natural limpio pasa a través del arco de plasma para generar H <sub>2</sub> y hollín de carbono.	Xin <i>et al.</i> , 2017 [18] Moshrefiet <i>al.</i> , 2018[19]
Termoquímicos	Térmica División de agua	Agua	Reacciones químicas cíclicas (reacción neta: agua que se divide en H <sub>2</sub> )	Sanz <i>et al.</i> , 2020[20]
Termoquímicos (Fotocatálisis)	Térmica Conversión de biomasa	Biomasa	Conversión termo catalítica	Parthasarathy <i>et al.</i> , 2014[21] Dou <i>et al.</i> , 2018[22]
	Térmica Gasificación		Conversión de biomasa en gas de síntesis	Shayan <i>et al.</i> , 2018[23] Yao <i>et al.</i> , 2016[24]
	Térmica Reformar		Conversión de biomasa líquida (biocombustibles) en H <sub>2</sub>	Bendixen <i>et al.</i> , 2019[25]
	Fotónico	Agua	El agua se divide en H <sub>2</sub> mediante el uso del par electrón hueco generado por el fotocatalizador.	Zhu <i>et al.</i> , 2016[26]
Foto-electroquímico	Fotónico Bioquímica	Biomasa	Una celda híbrida produce simultáneamente corriente y voltaje al absorber la luz.	Tayebi <i>et al.</i> , 2019[27]
Fermentación Oscura			Se utilizan sistemas biológicos para generar H <sub>2</sub> en ausencia de luz.	Wang <i>et al.</i> , 2019 [28] Kumar <i>et al.</i> , 2018[29]
Electrólisis de alta temperatura	Térmica Eléctrica	Agua	La energía eléctrica y térmica se utilizan juntas para impulsar la división del agua a altas temperaturas.	Mehmeti <i>et al.</i> , 2018[30] Khalid <i>et al.</i> , 2020[31]



Método	Fuente		Descripción	Bibliografía
	Energía Primaria	Material		
Electrólisis	Eléctrica	Agua	La corriente continua se utiliza para dividir el agua en O <sub>2</sub> y H <sub>2</sub>	Chen <i>et al.</i> , 2016[15] Cui <i>et al.</i> , 2019[16] Mandal, 2020 [17]
Descomposición del arco de plasma		Combustible fósil	El gas natural limpio pasa a través del arco de plasma para generar H <sub>2</sub> y hollín de carbono.	Xin <i>et al.</i> , 2017 [18] Moshrefiet <i>al.</i> , 2018[19]
Termoquímicos	Térmica División de agua	Agua	Reacciones químicas cíclicas (reacción neta: agua que se divide en H <sub>2</sub> )	Sanz <i>et al.</i> , 2020[20]
Termoquímicos (Fotocatálisis)	Térmica Conversión de biomasa	Biomasa	Conversión termo catalítica	Parthasarathy <i>et al.</i> , 2014[21] Dou <i>et al.</i> , 2018[22]
	Térmica Gasificación		Conversión de biomasa en gas de síntesis	Shayan <i>et al.</i> , 2018[23] Yao <i>et al.</i> , 2016[24]
	Térmica Reformar		Conversión de biomasa líquida (biocombustibles) en H <sub>2</sub>	Bendixen <i>et al.</i> , 2019[25]
	Fotónico	Agua	El agua se divide en H <sub>2</sub> mediante el uso del par electrón hueco generado por el fotocatalizador.	Zhu <i>et al.</i> , 2016[26]
Foto-electroquímico	Fotónico Bioquímica	Biomasa	Una celda híbrida produce simultáneamente corriente y voltaje al absorber la luz.	Tayebi <i>et al.</i> , 2019[27]
Fermentación Oscura			Se utilizan sistemas biológicos para generar H <sub>2</sub> en ausencia de luz.	Wang <i>et al.</i> , 2019 [28] Kumar <i>et al.</i> , 2018[29]
Electrólisis de alta temperatura	Térmica Eléctrica	Agua	La energía eléctrica y térmica se utilizan juntas para impulsar la división del agua a altas temperaturas.	Mehmeti <i>et al.</i> , 2018[30] Khalid <i>et al.</i> , 2020[31]
Biofotólisis	Bioquímico Fotónico	Agua/ Biomasa	Se utilizan sistemas biológicos (microorganismos, bacterias, algas) para generar H <sub>2</sub>	Nagarajan <i>et al.</i> , 2017[32] Buitrón <i>et al.</i> , 2017[33]
Fotoelectrólisis	Fotónico Eléctrico	Agua	Los fotoelectrodos y la electricidad externa se utilizan para impulsar la electrólisis del agua.	Sheu <i>et al.</i> , 2017[34]

## 2.2 Producción de H<sub>2</sub> utilizando métodos biológicos

Los procesos biológicos para la producción de H<sub>2</sub> son de gran interés debido al bajo costo de la energía, la neutralidad del carbono y al uso de energías renovables. Estos procesos se basan principalmente en el mecanismo de funcionamiento de la enzima, que estimula la reacción de oxidación y la producción de H<sub>2</sub> [35]. Esta enzima se encuentra en algas verdes, cianobacterias (o algas verde azuladas), bacterias fotosintéticas y bacterias fermentativas[36]. Siendo las bacterias fermentativas las que presentan tasas mayores de producción de H<sub>2</sub> un ejemplo son *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Clostridium butyricum* y *Clostridium acetobutylicum*[37].

### 2.2.1 Fermentación oscura

Las rutas para obtener H<sub>2</sub> fermentativo oscuro es atractiva hacia la producción renovable de hidrógeno[38]. Una buena parte de las investigaciones sobre la obtención biológica de H<sub>2</sub> utilizando la metodología de fermentación oscura se ha llevado a cabo inhibiendo la etapa de metanogénesis y otras reacciones bioquímicas. Esto se debe a que, al permitir que la fermentación avance a esta etapa, se comienza a consumir el H<sub>2</sub> producido[9,38,39]. Como lo hicieron Liu *et al.*, 2020, llevaron a cabo un pretratamiento en el consorcio de lodos activados, originarios de una planta de tratamiento de aguas, mediante congelación en presencia de nitrito. Este pretratamiento suprimió los microorganismos responsables de la acetogénesis (32.1%), la metanogénesis (58.4%), y el proceso reductor de sulfato (51.5%), aumentando así el rendimiento de producción de H<sub>2</sub> durante la fermentación oscura, de 7.96 a 19.40 mL/gVS (sólidos volátiles). [40]. adicionaron óxido de calcio (CaO) a una concentración de 0.1 g/g de VSS (sólidos suspendidos volátiles) durante la fermentación oscura, obteniendo un rendimiento máximo de hidrógeno de 0.77, en comparación con la fermentación sin la adición de CaO<sub>2</sub>, que alcanzó 10.55 mL/gVSS. Utilizaron como consorcio lodos originarios de un tanque de sedimentación secundaria [28]. La generación de biohidrógeno por fermentación oscura se puede realizar utilizando cultivos puros como mixtos. Entre las especies más utilizadas en cultivos puro son *Caldicellulosiruptor*, *Clostridium*, *Dictyoglomus*, *Spirocheta*, *Anaerocellum*, *Fervidobacterium*, *Thermotoga* y *Thermoanaerobacter* [41]. Tal como lo presentan Srivastava *et al.*, 2017 donde utilizaron un cultivo puro de *Clostridium pasteurianum*

(MTCC116) usando como cosustrato paja de arroz hidrolizada logrando obtener una tasa máxima de producción de 23.96 mL/L/h en 96 h[42]. Los cultivos mixtos para la producción de H<sub>2</sub> por lo general provienen de plantas de tratamiento, y pueden pasar o no por un pretratamiento térmico como se ha mostrado anteriormente[43].

### **2.3 Potencial redox necesario para la generación de H<sub>2</sub> durante la fermentación oscura**

La adición de mediadores redox (MR) se utiliza para mejorar la capacidad de transferencia de electrones. Esta estrategia incluye el uso de moléculas con la capacidad para aceptar electrones de microorganismos o donar electrones a microorganismos, actuando como un puente de electrones entre los microorganismos y los ánodos o cátodos[44–48]. Existen varios estudios donde se reporta el uso de MR para alcanzar una mayor producción de hidrógeno como lo reportan Atilano *et al.*, 2020, quienes utilizaron dos MR, Lawsona (LQ) y antraquinona 2-sulfonato (AQS), para mejorar la obtención de H<sub>2</sub> mediante fermentación oscura. Utilizando un lodo anaeróbico pretratado, obtuvieron una mejora en la producción de H<sub>2</sub> del 10% con LQ y del 11.4% utilizando AQS[39]. O Martínez en 2016, quien utilizó 4 MR (AQDS, AQS, riboflavina y Lawsona) inmovilizados en carbón activado utilizando un consorcio puro de *C. beijerinckii*, obtuvo un aumento en la concentración de hidrógeno de más del 20%, siendo el mejor MR la Lawsona (LQ) [49].

### **2.4 Progresos de mejoramiento en Celdas de electrólisis microbianas (CEM)**

La CEM es una tecnología innovadora, dado que las primeras investigaciones salieron en el año 2005 por Liu *et al.* Empleando un sistema donde los microorganismos se localizan en la cámara anódica, estimulando la oxidación del sustrato por medio de su metabolismo, generando protones y electrones que fueron transportados a la cámara catódica[50]. Existen numerosos reportes sobre la evolución de H<sub>2</sub> evaluado diferentes materiales en el ánodo, cátodo, voltajes y sustratos en la **Tabla 2** se resumen las diferentes configuraciones evaluadas.

**Tabla 2.** Diferentes configuraciones de sustratos utilizados y tasa de evolución de hidrógeno (Q) en celdas de electrólisis microbiana (MECs), extraída de Kadier *et al.*, 2016[51].

Tipo de sustrato	Concentración (g/L)	Volumen MEC (mL)	Tipo de electrodo		Producción de Hidrogeno (Q) ( $\text{m}^3\text{H}_2 \text{m}^{-3} \text{día}^{-1}$ )	Voltaje aplicado (V)
			Ánodo	Cátodo		
Acido acético	1	42	Grafito granular	Tela de carbón	1.10	0.6
Acetato (sodio acetato)	2.72	40	Filtro de grafito	Espuma de Ni	50	1
Glucosa	1	28	Tratado con amoniaco cepillo de grafito	Tela de carbón	0.83	0.5
Efluente sintético (Lignocelulosas Celobiosa)	1	28	Filtro de grafito	Tela de carbón	1.11	0.5
Aguas residuales domesticas	0.204-0.481	58 4	Papel carbón (no a prueba de humedad)	Papel carbón	0.154 L-H <sub>2</sub>	0.5
Aguas residuales	2 (COD)	28	Fibra de grafito	Tela de carbón	0.9-1.0	0.5

#### 2.4.1 Modificación del cátodo

Como se mencionó anteriormente, una de las grandes desventajas que presentan las CEM es el elevado costo de los materiales, lo que constituye una preocupación clave y motiva la búsqueda de alternativas para disminuir los gastos. Una manera de lograr esta reducción es a través de la modificación de los materiales empleados en la fabricación del cátodo, tal como lo hicieron Ghasemi *et al.*, 2020, Ellos fabricaron un nuevo conjunto de electrodos de cátodo utilizando polianilina y grafeno en una malla de acero inoxidable, lo que resultó en la producción de  $0.805 \text{ m}^3$  de  $\text{H}_2$ . Concluyeron que el costo de fabricación del cátodo modificado fue un 50% más bajo que los cátodos convencionales con platino en la tela de carbono[52]. Otra forma de modificar el cátodo es la inmovilización de una enzima oxidoreductasa sobre este, tal como lo hicieron Lee *et al.*, 2020, ellos construyeron un biocátodo con un material a base de carbón en forma de nanoflores de Cu, sobre la cual se inmovilizó la enzima lacasa. Posteriormente se acopló a una celda de combustible, las densidades de potencia máximas del  $\text{H}_2 / \text{O}_2$  de la celda fueron de  $52 \mu\text{W cm}^{-2}$  y  $0.41 \text{ mW cm}^{-2}$  y se mantuvo el 85% de la potencia durante 15 días a temperatura ambiente[53]. Aunque esta mejora no se realizó en un cátodo de una CEM se puede tomar como ejemplo.

## 2.5 Transferencia bioelectrónica en sistemas catalizados por lacasa

La transferencia bioelectrónica es un mecanismo que se lleva a cabo de manera intramolecular en las enzimas, donde los electrones migran del sitio activo a las especies reactivas. La eficiencia de la migración bioelectrónica puede variar según la orientación del sitio activo, lo cual depende de su posición en la enzima y su disposición al finalizar la inmovilización [54]. Como lo demostró Priyadharshini *et al.*, 2021 la enzima lacasa se inmovilizó utilizando tres enfoques diferentes, reticulación con polianilina electropolimerizada (PANI), atrapamiento en perlas de alginato de cobre (Cu-Alg) y encapsulación en micelas de Nafion (Nafion) estos sistemas se emplearon en cámaras catódicas de MFC para la decoloración del colorante Acid orange 7 obteniendo como resultados que la lacasa con PANI mostró la mayor estabilidad y actividad, obteniendo una densidad de potencia de  $38 \pm 1.7 \text{ mW m}^2$  en comparación  $25,6 \pm 2,1 \text{ mW m}^2$  para la lacasa Nafion, y  $14,7 \pm 1,04 \text{ mW m}^2$  para la lacasa Cu-Alg[55]. y João H *et al.*, 2019 donde se logró la inmovilización de la lacasa en un electrodo de carbono vítreo recubierto con capas de nanotubos de carbono de pared múltiple utilizando una película de botriósfaerano para ser utilizado como biosensor para la determinación de dopamina presentando un límite de detección de  $0.94 \mu\text{mol L}^{-1}$ [56].

### **3. Marco Teórico**

#### **3.1 Producción microbiológica de H<sub>2</sub>**

El gas hidrógeno tiene un gran potencial como combustible futuro, ya que durante su combustión no se produce CO<sub>2</sub>. Tiene la energía más alta por unidad de peso, con un poder calorífico de 142 kJ/kg, que es tres veces mayor que el de la gasolina. Es capaz de sustituir al petróleo y sus derivados, y se puede transportar para uso doméstico[12,38,43,57–59]. Sin embargo, el hidrógeno es considerado un verdadero combustible 'verde' solo si se produce a partir de fuentes renovables, como la biomasa. Existe una amplia variedad de microorganismos, entre los cuales se destacan las bacterias anaeróbicas debido a su alta tasa de producción y su capacidad para utilizar una amplia gama de sustratos [60]son capaces de producir hidrógeno en diferentes procesos, están los que dependen luz como biofotólisis y fotofermentación, o los que no dependen de esta como son la fermentación oscura y celdas microbianas[7,61].

##### **3.1.1 Biofotólisis**

Es el mecanismo de la luz solar sobre los sistemas biológicos (microalgas verdes y cianobacterias) que resulta en la disociación del H<sub>2</sub>O en H<sub>2</sub> molecular y oxígeno, se llevar a cabo de dos maneras directa o indirecta[4].

##### **3.1.2 Biofotólisis directa**

Proceso biológico en el cual las algas verdes como *Chlamydomonas* bajo condiciones anaerobias utilizan la energía solar para generar hidrogeno a partir de agua[62].

##### **3.1.3 Biofotólisis indirecta**

La producción de biohidrógeno está formada por dos etapas: en la primera, la energía solar se transforma en energía química en forma de carbohidratos, los cuales son utilizados como sustratos en la fermentación aeróbica (i); posteriormente, en la segunda etapa, estos carbohidratos son convertidos a biohidrógeno mediante la acción de la enzima hidrogenasa en procesos de fermentación anaeróbica (ii)[6,33,62].

### **3.1.4 Fotofermentación**

En este proceso se cataliza la producción de hidrógeno mediante la enzima nitrogenasa[7]. Las bacterias que llevan a cabo este proceso son fotosintéticas anoxigénicas, y en particular, las bacterias púrpuras sin azufre son capaces de reducir los iones  $H^+$  a  $H_2$  gaseoso. Utilizan tanto el poder reductor derivado de la oxidación de compuestos orgánicos como los ácidos grasos de bajo peso molecular, además de la energía derivada de la luz[8].

### **3.1.5 Fermentación oscura**

Es un proceso independiente de la luz, en el cual se pueden utilizar sustratos de fuentes renovables[1,9,38,39,63]. El mecanismo presenta la habilidad de los microorganismos anaeróbicos o microalgas para producir biohidrógeno en ausencia de luz solar, tales microorganismos son capaces de utilizar moléculas de hidrógeno ricas en energía, si están disponibles y utilizar los electrones de la oxidación del hidrógeno para producir energía[10]. El mecanismo de transformación de materia orgánica de forma anaerobia consta de diferentes reacciones consecutivas, las cuales se dividen en 4 fases: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y, por último, la metanogénesis. La digestión anaerobia involucra rutas metabólicas complejas de al menos dos o tres grupos fisiológicos, como bacterias fermentativas, sintróficas y metanogénicas. Un consorcio microbiano es capaz de metabolizar la materia orgánica, ya sea simple o compleja, y generar dióxido de carbono, metano, ácido sulfhídrico, amonio y  $H_2O$ [37].

### **3.1.6 Celda de electrólisis microbiana**

Es una técnica emergente para convertir compuestos orgánicos en energía limpia ( $H_2$ ). Con la ayuda de microorganismos electroquímicamente activos, el material orgánico se convierte en  $CO_2$ ,  $H^+$  y electrones. Estos electrones son transferidos al ánodo y se desplazan del ánodo a través de un circuito que contiene una fuente de poder hacia el cátodo, donde el hidrógeno se produce mediante la reducción de protones o agua[12,57,64].

Una ventaja de este método es el voltaje que requiere, aproximadamente de 0.2-0.8 V, para impulsar la producción de hidrógeno en el cátodo. Se han identificado rendimientos superiores de H<sub>2</sub> en celdas de electrólisis microbiana (67% - 91%, equivalente a 8-11 mol de H<sub>2</sub> por mol de glucosa) en comparación con el proceso de fermentación oscura[11].

### **3.2 Sistemas Bioelectroquímicos**

Se considera un enfoque prometedor para utilizar la energía de la biomasa residual para diversos fines, comparten un principio en común, los microorganismos electroactivos en la cámara anódica catalizan diferentes reacciones electroquímicas como las de óxido-reducción [65]. Presentan dos electrodos un ánodo y un cátodo sumergidos en sus respectivas soluciones electrolíticas conocidas como anolito y catolito, las cuales son separadas por una membrana[66]. Se pueden clasificar en dos tipos de celdas de electrólisis microbianas (CEM) o celdas de combustible microbianas (CCM); la clasificación dependerá del método de operación y de la forma de obtener electricidad. Las CCM son tecnologías capaces de obtener electricidad directamente, así como una escasa generación de H<sub>2</sub> y iones H<sup>+</sup> durante la etapa de biodegradación de la materia orgánica contenida en las aguas a tratar [13]. Mientras que una CEM su principal función es la de obtener compuestos químicos inorgánicos, entre los que destaca el hidrógeno [15].

#### **3.2.1 Celdas de combustible microbianas (CCM)**

Estos sistemas emplean bacterias para transformar la energía química presente en diversos sustratos en energía eléctrica. Las bacterias generan electrones y algunos iones H<sup>+</sup> gracias a su actividad metabólica, y los transfieren a un electrodo (ánodo) en lugar de a un aceptor final de electrones, como el oxígeno[16].

#### **3.2.2 Configuración de las celdas de combustible microbianas (CCM)**

Estos sistemas están conformados por una o dos cámaras, dentro de las cuales están ubicados el ánodo y el cátodo. En el ánodo, se encuentra una biopelícula formada por bacterias con la habilidad de biodegradar diferentes tipos de sustratos.



Gracias a su metabolismo, pueden llevar a cabo procesos de oxidación de los diferentes sustratos presentes en la cámara anódica, generando  $\text{CO}_2$ , protones y electrones. Los protones pasan al cátodo atravesando la membrana que separa las cámaras, mientras que los electrones fluyen con el apoyo de un circuito externo. Una vez en el cátodo, los electrones son reducidos a agua, formándose un gradiente eléctrico y así obteniendo energía eléctrica[17].

### **3.3 Celdas de electrólisis microbiana (CEM)**

Es una manera verde para la obtención de  $\text{H}_2$  de manera verde, inicia cuando los microorganismos oxidan la materia orgánica, liberando protones y electrones en la solución de anolito (ánodo), los electrones se transfieren desde el ánodo a través de un circuito eléctrico al contraelectrodo (cátodo) se realiza la reducción de oxígeno cuando el oxígeno está presente en el catolito, se puede producir corriente, pero sin oxígeno la generación no es espontánea. Pero si la generación se ve obligada por la aplicación de un pequeño voltaje ( $> 0.2 \text{ V}$  en la práctica) entre el ánodo y el cátodo, el  $\text{H}_2$  se genera mediante de la reducción de los  $\text{H}^+$ [67].

#### **3.3.1 Configuración de las celdas de electrólisis microbiana (CEM)**

Es un mecanismo electroquímico configurado por una cámara anódica (donde se encuentran los microorganismos y generan electrones e iones  $\text{H}^+$ ) y una cámara catódica (donde ocurre la evolución de  $\text{H}_2$ ). Ambas cámaras están divididas por una membrana, pero están unidas a una fuente de poder externa. Las bacterias exoelectrogénicas oxidan la materia orgánica en la parte anódica, generando como resultados compuestos protonados  $\text{H}^+$ ,  $\text{CO}_2$  y electrones. Estos últimos fluyen en el ánodo con la ayuda de una fuente de poder externa (circuito eléctrico), mientras que los protones atraviesan la membrana hacia el cátodo[68].

Muchas CEM tipo H están diseñadas con cámaras anódicas y catódicas separadas por una membrana, pero también existen celdas que no tienen membranas. Las celdas de dos cámaras presentan un problema en el que la membrana que separa las cámaras crea un gradiente de pH que afecta a los microorganismos en el ánodo.

Otro inconveniente es la distancia entre los electrodos (ánodo y cátodo), que crea una resistencia a la transferencia de masa, afectando la producción de  $H_2$  y provocando un decremento óhmico del voltaje. Además, se presenta otra resistencia, la de la transferencia de los electrones de las bacterias en el biofilm al electrodo. Las resistencias inherentes al sistema generan un decremento de potencial, resultando en un mayor gasto energético del mecanismo. Mientras que una celda con solo una cámara presenta el problema de que el  $H_2$  generado no es fácil de obtener ya que es necesario separarlo de una combinación de soluciones, y cuando mucho únicamente se contaría con  $CO_2$  y en algunas ocasiones  $CH_4$  por lo que es necesario realizar a un proceso de purificación aumentando el costo [69].

### **3.3.2 Diferencias**

En las celdas de combustible microbiana, la transferencia de carga eléctrica se produce en la dirección del ánodo al cátodo debido al tipo de potencial eléctrico del catolito, que es más positivo en comparación con el anolito. Mientras tanto, en las celdas de electrólisis microbiana, la corriente eléctrica se transporta del ánodo al cátodo con la ayuda de un impulso en forma de voltaje generado entre el ánodo y el cátodo mediante una fuente de poder externa. Esto se debe a que la evolución de hidrógeno que tiene lugar en el catolito generalmente cuenta con una fuerza de potencial de reducción de aproximadamente  $-0.41\text{ V vs EHS}$ [70].

### **3.4 Microorganismos electrogénicos y/o electroactivos**

La bioelectrogénesis es la obtención de energía eléctrica a partir de energía química, gracias a los microorganismos y sus mecanismos biológicos. Existe una amplia variedad de bacterias capaces de llevar a cabo procesos de biotransformación energética; sin embargo, algunas han desarrollado más esta habilidad en comparación con otras [71]. Las más eficientes son llamadas bioelectrogénicas y poseen características biológicas y redox únicas, siendo capaces de transferir electrones al exterior de la celda y convertir compuestos altamente tóxicos en no peligrosos. Estos microorganismos han llevado al desarrollo de tecnologías electroquímicas microbianas que incluyen aplicaciones en los campos de la biorremediación y la producción de bioenergía[72].

Se han identificado bacterias bioelectrogénicas que tienen la habilidad de transportar electrones al ánodo sin la necesidad de añadir mediadores redox. De estas, destacan dos tipos de bacterias electrogénicas: 1) aquellas que pueden producir sus propios mediadores redox y secretarlos al medio, reaccionando con el electrodo; 2) aquellas que no necesitan utilizar un mediador y pueden interactuar directamente con el electrodo. La gran mayoría de las bacterias bioelectrogénicas son gramnegativas, ya que la estructura de su pared celular contribuye a la diferencia en la carga de la superficie de la célula, lo que favorece las habilidades electrogénicas de estas bacterias [73–75].

La diversidad de especies y el origen de las bacterias presentes en el inóculo son de gran importancia, ya que están relacionados con la eficiencia energética y su posterior desempeño. En la actualidad, se han identificado más de 20 tipos de bacterias bioelectrogénicas, entre las que se incluyen especies de los géneros. *Geobacter sulfurreducens* es considerada como una de las bacterias electrogénicas más eficientes y se desarrolla en ambientes anaerobios[75]. Otra es *Pseudomonas aeruginosa* electrogenica productora de fenazinas como mediadores redox, el representante principal de este grupo corresponde a las bacterias reductoras de  $Fe^3$  del género *Shewanella*, otras bacterias con actividad bioelectrogenica documentada son *Desulfobulbus*, *Rhodoferraxferrireducens*, *Klebsiella Aeromonashydrophila*, *Rhodoferrax*,, *Clostridium butyricum*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Citrobacter*,, *Arcobacter*, *Aeromonas*, *Ppropionibacterium*, *Pseudomonas*, *Thermincola*, *Geothrix*, *Acidiphilium*, *Comamonas*, *Ochrobactrum*entre otras[76].

### **3.4.1 Mecanismos de transporte de electrones en sistemas bioelectroquímicos**

Como regla general, los diferentes mecanismos propuestos para explicar la transferencia de electrones se clasifican en función de si la transferencia de electrones al electrodo se produce a través de compuestos solubles (transferencia de electrones mediada) o a través de proteínas activas redox de membrana bacteriana y pili conductores (transferencia de electrones directa)[73].

Transferencia directa de electrones: las bacterias se ponen en contacto directo con el electrodo. Aquellas bacterias que pueden llevar a cabo esta transferencia lo hacen porque en la matriz extracelular o en su membrana celular presentan proteínas redox activas, como citocromos C o complejos enzimáticos. La transferencia de electrones puede ocurrir a través de nanocables o pilis, que las bacterias forman cuando la transferencia de electrones está limitada, permitiendo así que las células que no están en contacto directo con el electrodo puedan establecer conexión[39,77–79].

Transferencia de electrones mediada: se requiere la ayuda de mediadores redox, ya sean orgánicos o inorgánicos. Las bacterias tienen la capacidad de secretar estos mediadores al medio, y estos son reducidos u oxidados fuera de la membrana celular. Posteriormente, los mediadores donan o aceptan electrones en dirección desde o hacia un electrodo (mediadores redox endógenos). Entre los mediadores más investigados se encuentran los ácidos húmicos y las piocianinas[15].

### **3.5 Bioánodos**

En el ánodo, también llamado bioánodo, es donde los microorganismos electroquímicos activos, conocidos como electrógenos, oxidan compuestos orgánicos para transferir electrones mediante contacto directo entre la célula bacteriana y el electrodo, ya sea a través de nanocables o citocromos de tipo c unidos a la membrana[64]. O por medio de moléculas portadoras de electrones (endógenas o exógenas). Los electrones son conducidos por un circuito externo al cátodo para generar  $H_2$  mediante la reducción de iones  $H^+$ . Sin embargo, las células bacterianas poseen limitaciones energéticas para completar la oxidación de sustratos orgánicos para la formación de hidrógeno, lo que requiere la aplicación de un voltaje adicional para convertir el sustrato orgánico en  $CO_2$  e hidrógeno[80].

#### **3.5.1 Sustratos**

El tipo de sustrato utilizado en una CEM es un factor muy importante en su rendimiento, ya que su composición orgánica puede favorecer o inhibir la generación de electricidad. Los metabolitos fundamentales que se espera encontrar en el sustrato son aminoácidos, carbohidratos y ácidos grasos[81].

Sustratos orgánicos fermentables (como la biomasa lignocelulósica) están compuestos por polímeros de carbohidratos como celulosa, hemicelulosa, y un polímero aromático (lignina). Sustratos orgánicos no fermentables incluyen ácidos acéticos, ácido butírico, ácido láctico, ácido valérico, ácido propiónico, glucosa y acetato. Este último es el sustrato más utilizado, ya que es un producto final de la fermentación oscura. Las fuentes de aguas residuales incluyen aquellas provenientes de uso doméstico, aguas residuales de cerdos, efluentes de fermentación, muestras de aguas residuales de refinería, aguas residuales industriales y de procesamiento de alimentos, aguas residuales de campo, procesamiento de patatas, y aguas residuales de estiércol y lácteo [51]. Otro punto a considerar en la elección del sustrato es que dependiendo del tipo de sustrato con el cual se trabaja es el voltaje [28]. Que será necesario aplicar para que se puede llevar a cabo la producción de hidrogeno  $H_2$ .

### **3.5.2 Microorganismos anódicos**

Los microorganismos presentes en la cámara anódica llevan a cabo el proceso de oxidación del sustrato mediante un tipo de metabolismo en el que secretan protones y electrones que se transfieren a la cámara catódica. Estos microorganismos son anaeróbicos, y su actividad bioelectrocatalítica se ve afectada en gran medida por la exposición directa al  $O_2$ [82]. Las bacterias capaces de reducir un aceptor de electrones en estado sólido, como Fe (III), en su mayoría también pueden utilizar ánodos como aceptores de electrones. La tasa de transferencia de electrones y los mecanismos involucrados entre la membrana de la célula bacteriana y las superficies de los ánodos son clave para determinar el rendimiento de un sistema bioelectroquímico[83]. Entre los géneros de microorganismos reportados en los ánodos de celdas de electrolisis son *Desulfovibrio*, *Acidaminococcus*, *Desulfocapsa*, *Acetobacterium*, *Cloacibacillus*[2], *Geobacter*, *Shewanella* y *Butyricoccus*[84].

### **3.6 Cátodos y Biocátodos**

Es donde ocurre la reducción de los protones para producir hidrógeno gaseoso dentro de una CEM. Biocátodo es el concepto de un cátodo donde un sistema biológico actuará como el catalizador[85].

### **3.6.1 Materiales para cátodos y biocátodos**

Los materiales de cátodo son mayoritariamente metales preciosos. Para la reacción de desprendimiento de hidrógeno, se utilizan comúnmente materiales a base de platino, pero este material presenta un alto costo y cuenta con la desventaja del envenenamiento. Como alternativa a este material, se utilizan aleaciones de níquel y acero inoxidable, disulfuro de molibdeno y carburo de tungsteno.[12,55,86]. También se han reportado el uso de catalizadores como electrodos construidos con carbono[18,87]. Otra opción es el biocátodo, donde se inmoviliza un sistema biológico como enzimas oxidorreductoras en materiales a base de carbón. Enzimas hidrogenasas purificadas, aisladas de microorganismos, se han utilizado para reemplazar catalizadores químicos inmovilizados en células de *Desulfovibrio vulgaris*. Asimismo, se han concebido biocátodos que consisten en microorganismos que cubren un electrodo hecho de material (por ejemplo, carbono) o disperso en el electrolito para catalizar reacciones catódicas[53,88,89].

### **3.6.2 Lacasas**

Es un tipo de polifenol que contiene cobre oxidasa, p-difenol oxidasa. Son oxidorreductasas que contienen centros redox integrados en forma de cuatro átomos de cobre y tienen, dependiendo de la enzima, un potencial redox relativamente alto para la oxidación de compuestos fenólicos y otros compuestos aromáticos [90]. Son glicoproteínas extracelulares con pesos moleculares que van de 60 a 80 kDa. El potencial de oxidación-reducción de esta enzima está ligado al microorganismo de origen, dentro de los límites de 0.5 a 0.8 V[91]. Son proteínas estables que tienen un punto isoeléctrico en el rango de 2.6 a 4.5 y son funcionales en un rango de pH de 2 a 8.5. Las lacasas son enzimas de interés industrial con potenciales aplicaciones en detergentes, blanqueadores de pulpa, adhesivos, funcionalización de fibras, desintoxicación, blanqueo de mezclilla, decoloración textil y se ha demostrado que funcionan en biosensores y en células de biocombustible[92].

### 3.6.3 Mecanismos de acción de la lacasas

El mecanismo de las lacasas depende de la oxidación 4 electrones que se encuentran en el sustrato seguido de la reducción de O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O [93]. La actividad catalítica de la enzima comienza cuando acepta 4 electrones provenientes del sustrato a través del Cu tipo 1. El potencial del cobre tipo 1 cambia dependiendo del microorganismo del cual se obtiene la lacasa. El centro activo de cobre presenta el potencial redox que es responsable de la transferencia electrónica entre el sustrato y la enzima, determinando el mayor potencial del biocátodo. Después de una transferencia electrónica interna desde el Cu tipo 1 reducido hasta el conjunto tipo 2 y tipo 3 a través del tripéptido altamente conservado His-Cys-His, los átomos Cu del tipo 3 funcionan como aceptores de electrones en la oxidación aeróbica, donde la presencia del Cu tipo 2 es indispensable. La reducción de O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O se produce en el conjunto tipo 2 y tipo 3 [94,95]. El sitio de Cu tipo 1 (azul) posee un amplio espectro de ABS de 5000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a 600 nm, gracias a las evoluciones de transferencia de carga de ligando a metal [96].

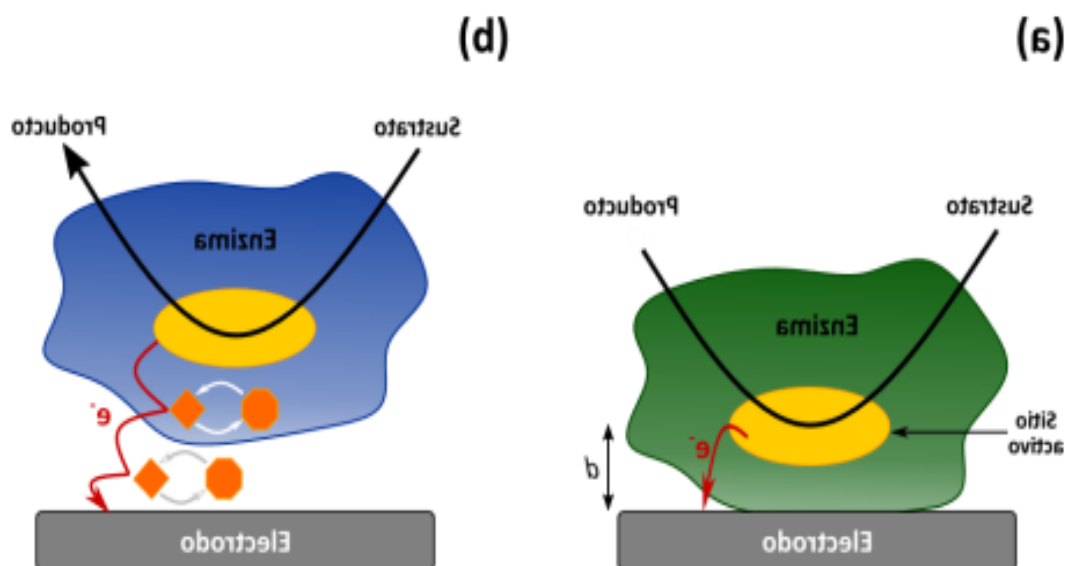
### 3.6.4 Transferencia electrónica en sistemas catalizados por enzimas

Para que un mecanismo de inmovilización se considere exitoso la enzima debe poder conservar y mejorar su estabilidad, Además, la forma en que ocurre la transferencia de electrones entre el sitio activo de la enzima que ha sido inmovilizada y la superficie del electrodo debe ser rápida e interrumpida [97].

#### 3.6.4.1 Transferencia directa

Este mecanismo de transferencia **Figura 1a**. solo se puede realizar a distancias cortas que van a menos de 15 Å y puede ser mejorado si al momento de inmovilizar la enzima su orientación permite que el sitio activo quede expuesto justo frente a la superficie del electrodo. Pero, gracias al alto peso molecular de las enzimas y que en la mayoría de los casos los sitios activos están orientados en los bolsillos conformacionales donde únicamente el sustrato está presente, éstos no serían fácil bioelectroquímicamente inhibiendo así la transferencia. Para estas situaciones, la única forma de lograr la transferencia es tener en el medio micromoléculas con habilidades de intermediarios entre el sitio activo de la enzima y los electrodos **Figura**

1b.



**Figura 1.** Mecanismos de transferencia electrónica directa (a) y mediada (b) entre el sitio activo de una enzima y el electrodo en la oxidación de un sustrato.

#### 3.6.4.2 Reacciones de transferencia de electrones de lacasa

Existen principalmente dos tipos de transferencia de electrones en el contexto de sistemas enzima-electrodo: transferencia de electrones directa (DET) y transferencia de electrones asistida por mediadores (MET). El diseño de electrodo-enzima en el caso de MET implica una estructura compleja con un alto sobrepotencial en el proceso electrocatalítico y una estabilidad operativa reducida. Por otro lado, en la DET, el sitio del potencial redox, es decir, el sitio T1 de la lacasa, debe estar orientado hacia el electrodo y tener la distancia más corta posible entre el sitio redox y el electrodo mientras la enzima lacasa está inmovilizada en el electrodo. Esto facilita la transferencia directa de electrones entre la enzima y el electrodo[95,96].

#### 3.6.5 Lacasas inmovilizadas para biocátodo

La inmovilización química y física de las enzimas nativas, que incluye la modificación estructural y la orientación, desempeña un papel crucial en la minimización de la pérdida de energía en la interfaz enzima-electrodo durante la transferencia de electrones. Entre las diversas estrategias, la orientación del sitio T1 de la lacasa hacia una molécula aromática hidrofóbica unida a la superficie de un electrodo minimiza la distancia espacial entre el centro redox de T1, permitiendo así una transferencia de electrones eficiente con intermediarios de transferencia de electrones minimizados,



Después de la inmovilización en la superficie del electrodo, las orientaciones de las enzimas redox y/o las distancias contribuyen a un túnel de electrones favorable[53,95,98]. Las lacasas derivadas del hongo *Trametes*, en particular las de *T. versicolor* y *T. hirsuta*, se han empleado en la modificación de electrodos con el propósito de catalizar la reacción de evolución de hidrógeno, ya sea a través de transferencia electrónica directa o mediada[87,99,100].

#### **4. APORTACIÓN CIENTÍFICA**

Desarrollo de cátodos modificados con lacasas para su potencial aplicación en celdas de electrólisis microbianas mejorando la velocidad de la transferencia de electrones.

#### **5. HIPÓTESIS**

Los cátodos modificados con lacasas presentan mayor velocidad de transferencia de electrones en comparación de los cátodos sin lacasas.

#### **6. OBJETIVOS Y METAS.**

##### **6.1 Objetivo General.**

Evaluar el efecto de cátodos modificados con lacasas mejorando la velocidad de la transferencia de electrones para su potencial aplicación en celdas de electrólisis microbiana.

##### **6.2 Objetivos Específicos**

1. Producir lacasas de *Trametes versicolor* por fermentación sumergida usando salvado de trigo como cosustrato.
2. Purificar el extracto enzimático rico en lacasas con membranas de ultrafiltración de 50 y 100 kDa.
3. Funcionalizar nanopartículas metálicas (TiO<sub>2</sub>, ZnO y CuO) con grupos amino y carbonilo para la inmovilización covalente de la lacasa obtenida por fermentación sumergida.
4. Caracterizar las nanopartículas metálicas en cada paso de la funcionalización y después de la inmovilización de la enzima, por técnicas instrumentales y electroquímicas tales como FTIR, SEM, potencial  $\zeta$ , DRX, XPS, CVA e IES.
5. Preparar un ánodo de carbón activado granular modificado con AQS, establecer la biopelícula y caracterizar electroquímicamente.
6. Obtener dos cátodos uno sin modificar y modificado con lacasa inmovilizada en el mejor óxido-metálico.
7. Construir dos celdas de electrólisis microbianas.

## 7 MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos y equipos utilizados durante el desarrollo del proyecto de la tesis se ubican en los laboratorios de Fisicoquímica de Interfases y de Tratamiento de Aguas 2.

### 7.1 Adaptación del inóculo microbiano

El lodo utilizado como inóculo fue una mezcla de lodos de las plantas tratadoras de aguas residuales de la empresa Hershey's, ubicada en Escobedo Nuevo León y de la Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma ubicada en Monterrey, NL y enriquecido con estiércol de vaca. El lodo fue alimentado con glucosa 4 g/L y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 g/L para mantenerlo.

### 7.2 Propagación de la cepa fúngica y obtención de la biomasa

El hongo fue colectado en un trabajo anterior del equipo investigación identificado genéticamente como *Trametes versicolor*. La cepa fúngica fue activada en agar PDA (papa dextrosa) esterilización durante 15 min a 121 °C y 15 psi, a continuación, se sembró en el agar con el método de agar plots, se llevó a incubar a 30 °C $\pm$ 1 por 12 días para ser almacenadas a 4 °C  $\pm$  1, esta metodología se repitió 1 vez cada mes para mantener la cepa fresca.

### 7.3 Producción de lacasas por fermentación sumergida

La fermentación sumergida se realizó en un matraz de 500 mL al cual se le adiciono 250 mL de medio Kirk **Tabla 3** (Kirk and Farrell 1987)[101]. El cual fue suplementado con salvado de trigo 5 g/L como cosustrato y 1 mM de  $\text{CuSO}_4$  como cofactor, cada matraz fue inoculado con 12 plots [102]. Las condiciones para llevar a cabo la fermentación fueron a 30°C ,150 rpm por 12 días. Se tomaron alícuotas de 1 mL cada 2 días y los últimos 4 días cada 24 h, con la finalidad seguir el comportamiento de la fermentación y medir, proteína extracelular, actividad enzimática, azúcares reductores y compuestos fenólicos.

**Tabla 3.** Composición del medio Kirk and Farrell

Medio Kirk	
Reactivo	Concentración (g/L)
Glucosa	1
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0.2
<b>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	0.05
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0.01
<b>CuSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	0.08
<b>MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O</b>	0.07
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MO<sub>4</sub>O<sub>2</sub>4H<sub>2</sub>O</b>	0.05
<b>ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	0.043
<b>FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O</b>	0.01
<b>10 L de solución de elementos traza</b>	

## 7.4 Caracterización del extracto obtenido durante la fermentación sumergida

### 7.4.1 Ensayo enzimático para determinar lacasas

Se determinó a través de la oxidación del ABTS, adicionando 700 µL de H<sub>2</sub>O, 100 µL extracto con la enzima, 100 µL de buffer de acetatos 1 M a pH 5 y 100 µL de ABTS 5mM. El tiempo de reacción comenzó al añadir el ABTS llevando a incubar la muestra por 1 min 40°C (en ausencia de luz) en un baño seco, posteriormente se leyó la diferencia de absorbancia en un intervalo de 1 minuto a 420 nm a, la actividad enzimática se determinó mediante el uso de la siguiente ecuación (1): en un espectrofotómetro UV-Vis.

$$\frac{U}{mL} = \frac{\Delta Abs * V_r}{\xi * V_m * t * d} \quad \text{Ecuación (1):}$$

$\xi$  = Coeficiente de extinción molar (0.036 µmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)[103].

$\Delta Abs$  = Diferencial de absorbancia inicial y final

$V_r$  = Volumen total de la reacción (µl)

$V_m$  = Volumen de la muestra (µl)

$t$  = tiempo de la reacción (min)

$d$  = Paso de luz de la celda (cm)

La unidad de enzima (U/mL), fue definida como 1 µmol de ABTS oxidado por minuto por mililitro.

#### **7.4.2 Determinación de proteína**

La determinación se llevó a cabo siguiendo el método de Bradford [104]. En primer lugar, se construyó una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina como estándar en un rango de concentraciones (125 a 2000 µg/ml). El procedimiento comenzó con la adición de 75 µl de la muestra y 1 mL del reactivo de Bradford en un tubo Eppendorf, seguido de una agitación suave. Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente se procede a la lectura de la absorbancia a 595 nm.

#### **7.4.3 Determinación de la concentración de compuestos fenólicos**

Se construyó la curva de calibración utilizando como estándar ácido tánico a diferentes concentraciones (4 a 200 mg/L). Para el inicio de la reacción se tomaron 500 µL de muestra, 500 µL del reactivo R-Folin-Ciocalteu, 1.5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20% p/p y 5 mL H<sub>2</sub>O. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas, para después medir la absorbancia a 765 nm.

#### **7.5 Semi-purificación del extracto crudo**

Los extractos crudos fueron cortados mediante unidades de centrifugación Centricones (amicones), con 2 filtros uno de 50 kDa y otro de 100 kDa, para concentrar el extracto. La centrifugación se realizó a 4500 rpm, 4 °C por 15 min para cada una de las fracciones del extracto se les midió la actividad enzimática (ABTS) así como la concentración de proteína (Bradford) siguiendo la metodología que se explicó anteriormente, una vez que obtuvo la fracción más concentrada se almaceno a 4°C.

#### **7.6 Modificación de los nanomateriales con Lacasa**

##### **7.6.1 Aminación del nanomaterial**

Se trabajó con tres nanomateriales: CuO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZnO, a los cuales se les realizó la modificación del material con dos aminosilanos APTES y APTMS. En un recipiente adecuado, se dispusieron 0.5 g del nanomaterial, añadiendo 50 mL de tolueno y 1.5 mL de APTES o APTMS. Se dejó en agitación durante 20 horas a 60 °C. Pasado el tiempo, el nanomaterial se separó mediante centrifugación, realizando 2 lavados con tolueno y 1 con acetona. Finalmente, el material se dejó secar al vacío en ausencia de luz a 50 °C durante 24 h[105]. Posteriormente el material se presentará como CuO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub> y ZnO/NH<sub>2</sub>.

### **7.6.2 Adición de Glutaraldehído**

Por cada 100 mg de CuO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub> y ZnO/NH<sub>2</sub> se les añadió 0.5 mL de glutaraldehído y 10 mL de PBS a pH7, la solución se dejó agitando durante 12 horas a 120 rpm, pasado el tiempo se realizó la separación mediante centrifugación y se realizaron 3 lavados con agua destilada, para después dejarse secar a vacío en ausencia de luz a 50°C por 24 horas[105]. Posteriormente el material se presentará como CuO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glut, TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glut y ZnO/NH<sub>2</sub>/Glut.

### **7.6.3 Inmovilización de lacasas**

En un matraz de 50 mL se adiciono 100 mg de CuO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glut, TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glut o ZnO/NH<sub>2</sub>/Glut y 15 mL de PBS a pH 7.5 1M y 15 mg de lacasa comercial o 15 mL del extracto, se dejó en agitación a 155 rpm durante 18 h a temperatura ambiente. Las nanopartículas se colectaron por centrifugación, realizando 8 lavados con PBS para remover los restos enzima que no se lograron inmovilizar, Finalmente, las nanopartículas cargadas con lacasa CuO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac y ZnO/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac se suspendieron en PBS y se almacenaron sin luz a 4 °C.

## **7.7 Caracterización de los nanomateriales**

La caracterización de los nanomateriales solos, con la adición de amina (NH<sub>2</sub>), glutaraldehído (Glut) y Lacasa (Lac) por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) los espectros fueron adquiridos en modos de transmisión a través de potasio gránulos de bromuro (KBr), Espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS), Microscopia electrónica de barrido (SEM) y Carga superficial mediante potencial  $\zeta$ .

### **7.7.1 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier con Reflexión Total Atenuada (FTIR-KBr)**

Se empleó para la identificación de los enlaces Ti-O correspondientes a TiO<sub>2</sub>, Zn-O para ZnO<sub>2</sub> y Cu-O de CuO<sub>2</sub>, así como las vibraciones Si-O correspondientes a SiO<sub>2</sub> y los enlaces N-H asociados con los grupos amina unidos al nanomaterial nanopartículas. Todos los espectros se registraron a temperatura ambiente durante un intervalo de número de onda de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> (Perkin Elmer Spectrum GX).

Los espectros fueron adquiridos en modos de transmisión a través de potasio gránulos de bromuro (KBr) en la región del infrarrojo medio. Se realizaron 50 escaneos en todos los casos para obtener la mejor relación señal-ruido.

### **7.7.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)**

Se realizó un Sistema de Microanálisis de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS o EDX) con el fin de identificar los elementos presentes en las nanopartículas/Lac, las magnificaciones fueron desde 1000x hasta 30000x, la caracterización se llevó a cabo con el propósito de investigar la morfología de las nanopartículas. El instrumento utilizado fue un Microscopio Electrónico de Barrido marca JEOL (modelo J7600F).

### **7.7.3 Potencial zeta ( $\zeta$ )**

Se preparó una reacción con 10 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura y 20 mg de nanopartículas, fueron sonicadas por 15 minutos y se determinó el potencial  $\zeta$  mediante dispersión dinámica de luz utilizando un equipo Zetasizer NANO ZSP, Malvern a una temperatura de 25 °C

### **7.7.4 Espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS)**

Se utilizó para analizar la composición química de los nanomateriales durante las 4 etapas de modificación: Nanomaterial solo, Nanomaterial/NH<sub>2</sub> y Nanomaterial /NH<sub>2</sub>/GLUT. Las mediciones de XPS se realizaron en un espectrofotómetro Thermo Scientific K-Alpha XPS. Se utilizó una fuente de rayos X monocromática AlK $\alpha$ , con un área de punto de 400  $\mu$ m. Los resultados incluyen un espectro de encuestas y alta.

## 7.8 Fabricación de ánodos

### 7.8.1 Cloración del Carbón Activado

Se preparo el reactivo de Lucas para iniciar la coloración del carbón activado granular (CA) para esto se adiciono 20 g de  $ZnCl_2$  en 200 mL de HCl al 36% y se dejó disolver por 1 hora pasado el tiempo se agregaron 10 g de CA y se dejó en agitación a 150 rpm por 24 h a 35° este proceso funciona para sustituir los grupos fenólicos del CA por grupos cloro, una vez que se termina el proceso de cloración se realiza la separación del CA mediante centrifugación para realizar 5 lavados con HCl si después de los mismos se sigue soltando un color verde proveniente del Zn es necesario hacer 1 o 2 lavados extras, posteriormente el material se dejó secar a 50 °C durante 24 h.

### 7.8.2 Inmovilización de AQS en Carbón Activado

Una vez seco el material se preparó una solución de AQS a 6 Mm, donde después se adiciono los 20 g del carbón clorado la solución se dejó en agitación a 150 rpm por 24 h a 35°. Pasado el tiempo de la inmovilización se separó el CA de la solución por centrifugación, posteriormente se pasó a secar el CA-AQS por 24h a 80 °C, con este último paso los grupos Cl presentes en el CA que reaccionaron con el grupo -SO<sub>3</sub> del AQS para formar enlaces covalentes.

Para la cuantificación de las concentraciones iniciales y finales de ambas soluciones se tomaron muestras las cuales fueron leídas a 330 nm, para calcular la capacidad de adsorción ( $Q_{ad}$ ) se utilizó la Ecuación (2):  
Ecuación (2).

$$Q_{ad} = \frac{(C_i - C_f)V}{m}$$

Una vez seco el carbón, se efectuaron lavados con H<sub>2</sub>O y se tomaron las muestras para cuantificar la capacidad de desorción ( $Q_{des}$ ) mediante la Ecuación (3).

$$Q_{des} = \frac{Q_{ad} - V * C_f}{m}$$

Ecuación (3):

Finalmente, el CA-AQS se llevó a secar nuevamente a 60 °C por 18 h para ser almacenado en un desecador.



### **7.8.3 Construcción del Ánodo**

Se construyeron 2 ánodos con carbón (CA-AQS) (500-700  $\mu\text{m}$ ), 2.5 g CA/AQS fue empaquetado en bolsas de un tamaño de 4 cm de largo por 2.7 cm de ancho de malla de acero inoxidable (X.325 MESH ancho 1), estas fueron tejidas con hilo de nylon con hilo de nylon debido a su naturaleza inerte.

## **7.9 Fabricación de cátodos**

### **7.9.1 Preparación de electrodos**

Se trabajo con 2 electrodos de carbón vítreo (GCE) con un diámetro de 0.071  $\text{cm}^2$  se pulieron hasta obtener una superficie similar a un espejo con alúmina de 0.5  $\mu\text{M}$  y un paño de pulido Buehler, una vez limpio el electrodo fue sumergido repetidamente en una solución de Buffer de fosfato de 5 mL con 100mg de nanomaterial solo o Nanomaterial/ $\text{NH}_2$ /GLUT/LAC. Para garantizar la estabilización de las nanopartículas en la superficie del GCE, se realizaron 30 inmersiones llevado donde el electrodo se sumergió durante 30 s en la solución, se seca durante 30 s con aire caliente y se deja reposar durante 30s, esto se hizo con el fin de caracterizar los distintos nanomateriales.

### **7.9.2 Síntesis de películas de $\text{TiO}_2$ sobre vidrio ITO por la técnica LB**

Inicialmente, se añadieron 200 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura (18  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$  a 25  $^\circ\text{C}$ ) en la balanza de Langmuir blodgett, se instalaron barreras y se suspendió una placa de papel cromatográfico para llevar a cabo mediciones de la tensión superficial, se procedió a limpiar el vidrio ITO utilizando metanol (HPLC), se secó y se ubicó en un dispositivo de inmersión (dipper) antes de sumergirlo en la solución, las barreras fueron cerradas para asegurar condiciones controladas, y se registró cualquier cambio en la tensión superficial. En caso de que la tensión superficial variara, se añadió una cantidad significativa de agua ultrapura para reponer el volumen perdido. Este proceso se repitió hasta que la variación de la tensión superficial se mantuvo constante durante al menos tres repeticiones consecutivas. Se adicono 50  $\mu\text{L}$  de ODA (Octadecilamina) a 0.5 mg/mL por goteo, para no aumentar la tensión superficial en más de 0.5 unidades, ya que un aumento superior podría afectar a las películas formadas, se dejó reposar por 30 minutos para permitir la evaporación del cloroformo presente en la solución de ODA,

para después cerrar las barreras a una velocidad constante de 10 mm/min hasta alcanzar un valor de 45 mN/m de tensión superficial. Se inició el proceso de deposición de monocapas de ODA a una velocidad de subida y bajada de 7 mm/min, con un tiempo de espera de 300 segundos entre ciclos, generando un total de 7 monocapas. Finalmente se sumergió el vidrio ITO en una solución de TPO (Tris(4-piridilmetil)amina) con una concentración de 1M a 20 °C, durante 1 hora, con agitación, para después llevar a calcinar mufla durante 1 hora a 500 °C.

### **7.9.3 Caracterización de los electrodos**

La caracterización se realizó de manera electroquímica, realizando pruebas de Voltamperometrías cíclicas, Impedancia y Curvas de Polarización. Se trabajó con tres electrodos: contraelectro de platino, electrodo de referencia de Ag/AgCl y el electrodo de trabajo GCE modificado. Se utilizó un potencióstato-galvanostato de la serie Gamry G300.

### **7.9.4 Voltamperometría Cíclica (CV)**

Se trabajo con una solución de KCl 1 M con  $K_3Fe(CN)_6$  5 mM (se utilizó ferrocianuro como sonda electroactiva). Primero se realizaron mediciones a diferentes velocidades en 10 a 200 mV/s utilizando un programa de barrido de -0.8 a 0.8V. Posteriormente se trabajó a una única velocidad de 90 mV/s manejando el mismo programa de barrido, esto con el fin de comparar los 3 nanomateriales solos y modificados con lacasa (nanomaterial/ $NH_2$ /GLUT/LAC).

### **7.9.5 Impedancia (EIS)**

Las mediciones se obtuvieron en condiciones potencioestáticas en el potencial de circuito abierto ( $E_{oc}$ ) para GCE no modificado y modificado, utilizando una onda sinusoidal de 10 mV de amplitud en el rango de frecuencia de 10 kHz a 10 MHz con 5 puntos/década.

### **7.9.6 Voltamperometría de barrido lineal (LSV)**

Para evaluar la cinética de la reacción de evolución de hidrógeno (HER), se realizaron las mediciones en el electrodo GCE no modificado y modificado en una solución de fosfato 100 mM con KCl 0.1 M a pH 7. La solución se burbujeó con gas nitrógeno durante 10 minutos antes de cada experimento para eliminar el oxígeno disuelto. El barrido lineal fue realizado con una velocidad de 20 mV/s, comenzando en el potencial de circuito abierto y terminando en un potencial de  $-1.2$  V vs. Ag/AgCl.

### **7.10 Configuración de la celda de electrolisis microbiana con y sin cátodo modificado**

La configuración de la celda es de doble cámara anódica (área biológica) y catódica (área de reducción de  $H_2$ ) con una capacidad total de operación de 150 mL de cual se utilizó 100 mL, fueron separadas por una membrana de intercambio protónico de Nafion® 117 ( $19.63\text{ cm}^2$ ) la distancia que se guardó entre el ánodo y el cátodo de 7.5 cm.

La cámara anódica de la celda 1 (prueba) fue configurada con el ánodo de CA-AQS y el cátodo con vidrio ITO modificado (ITO-TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/GLUT/LAC), mientras que en la celda 2 (celda control) se equipó con un ánodo de CA-AQS, pero con un cátodo sin modificar (ITO-TiO<sub>2</sub>).

#### **7.10.1 Sustrato e inóculo de la cámara anódica y catódica**

Se inoculó la cámara catódica con un lodo proveniente de las plantas tratadoras de Heineken y Hershey's los cuales antes de ser inoculados en la celda fueron aclimatados en un reactor batch por 6 meses durante los cuales fueron alimentados con 2.5 g/L de glucosa y 1.5 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, pasado el tiempo se tamizó el lodo granular y se le realizó un pretratamiento térmico para eliminar las bacterias metanogénicas incubando el lodo a 70° por 20 minutos, una vez realizado el pretratamiento se inocularon 4.5 g SSV/L en la cámara anódica. Se agregarán 100 mL de medio de cultivo **Tabla 4** se le agregó BES (2-Bromoetansulfonato) a 286 μM para la inhibición metanogénica [106]. En la cámara anódica y 100 mL de PBS 50 mM a pH 7 en la cámara catódica, una vez armada la celda se llevó a cabo un intercambio de atmósfera con gas N<sub>2</sub> en ambos compartimentos.

**Tabla 4.** Composición del medio para bacterias

Medio para Ánodo	
Reactivo	Concentración (g/L)
EDTA	1
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.164
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.228
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.04
MgCl	2.32
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.18
ZnCl <sub>2</sub>	0.01
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.02
(2-Bromoetansulfonato)	286μM

### **7.10.2 Activación de Membrana de Nafion® 117**

Se activaron las membranas Nafion 117 poniéndolas de reaccionar 1 hora en solución de Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% en peso a 80°C, posteriormente se dejó 1 hora en H<sub>2</sub>O a 80°C para eliminar trazas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Pasado el tiempo se dejó 1 hora en una solución de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 4M 80°C, para después dejarla otra hora agua desionizada a 80°C. Después del tratamiento las membranas se almacenaron en agua desionizada a temperatura ambiente[107].

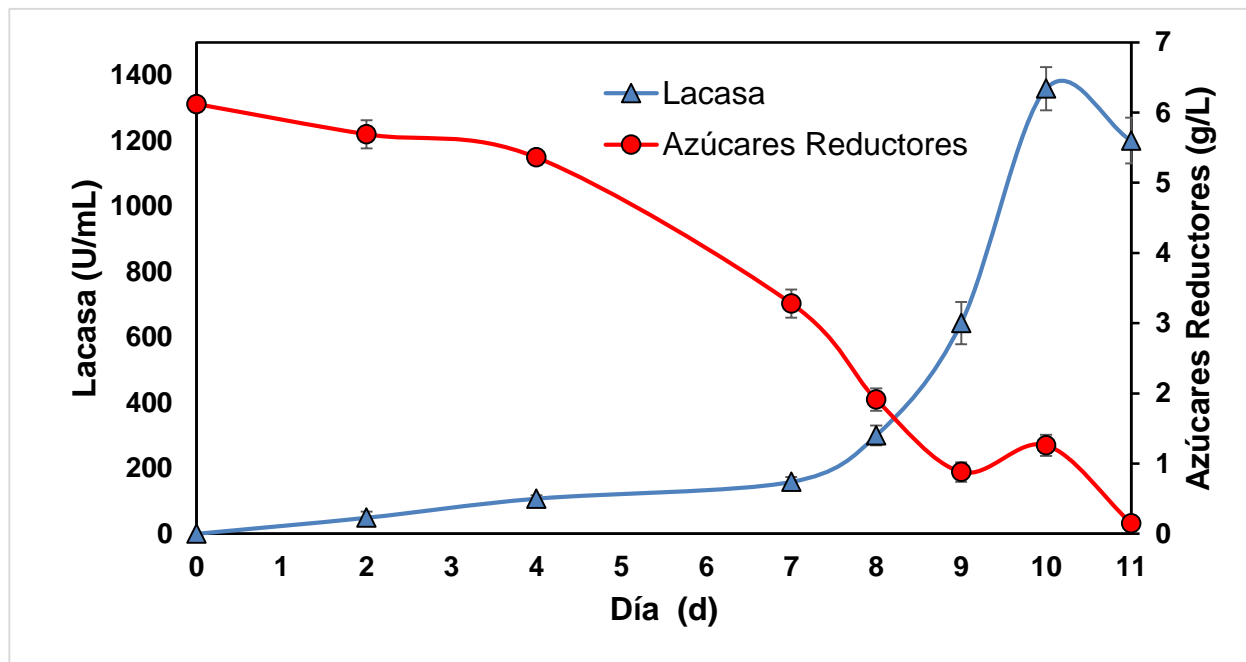
### **7.10.3 Evaluar el rendimiento de la celda de electrolisis microbiana con y sin cátodo modificado**

Una vez armadas las celdas de electrólisis con sus respectivos cátodos y ánodos, se monitoreó el potencial de estas dos veces a la semana de manera manual, utilizando un multímetro. Comenzamos con un potencial de 276 mV (control) y 268 mV (experimental), el cual disminuyó a medida que el biofilm se estableció. Antes de arrancar las celdas y conectarlas a la fuente de poder, realizamos una prueba de generación de potencial a circuito abierto, alcanzando potenciales de -237 mV (experimental) y -200 mV (control). Posteriormente, se realizó una VC con un programa de barrido de -0.5 a 0.5 V a una velocidad de 10 mV para caracterizar los ánodos y verificar la correcta formación del biofilm.

## 8.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

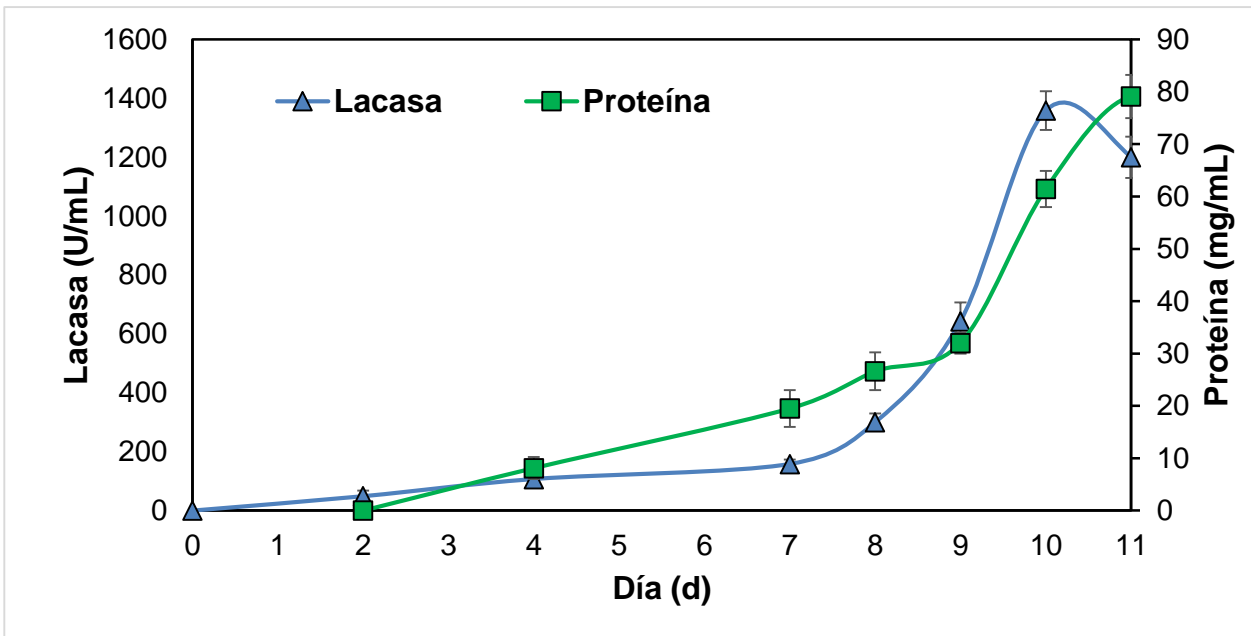
### 8.1 Producir y purificar lacasas de *Trametes versicolor*

En las **Figura 2**, se analiza el comportamiento de la fermentación sumergida del hongo *Trametes versicolor* en relación con la actividad enzimática de lacasa vs los azúcares reductores en el medio líquido. Cuando inicia la fermentación se cuantificaron un total de 6.3 g/L, los cuales durante el paso de los días fueron disminuyen al ser consumidos por el hongo como fuente de energía , cuando bajan a 1.8 g/L, la actividad enzimática llega a su punto máximo de 1,400 U/mL, al día 10, el comportamiento que se observó es coherente con lo esperado, ya que varios autores han documentado que en situaciones de escasez de nutrientes y de estrés metabólico se dispara la producción de metabolitos secundarios, donde las enzimas se expresan[108]. La actividad enzimática obtenida fue de 1,400 U/mL que se lo comparamos con Khalid *et al.*, 2020 con 855 U/mL [109] y Raja *et al.*,2020 1228 U/mL [110]. Utilizando en todos los casos hongos de pudrición blanca como en este proyecto, se tiene una buena actividad.



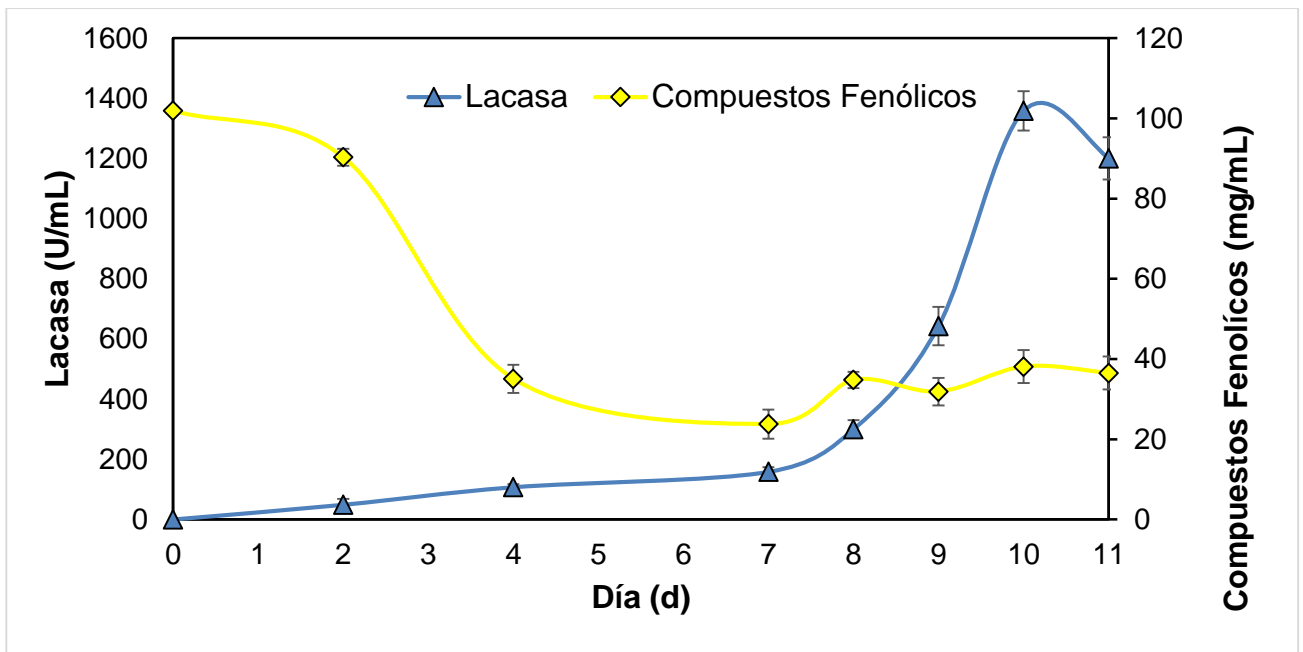
**Figura 2.** Relación de la concentración de lacasa contra azúcares reductores en el extracto crudo durante la fermentación sumergida de *Trametes versicolor*

En la **Figura 3**, se observa la concentración de actividad enzimática de lacasa contra la proteína extracelular, observando un comportamiento fluctuante durante la cinética en la concentración de proteína, llegando a 24.16 mg/mL en el día 11 que fue un día después del mayor actividad de lacasa, se esperaría que el día que se presentó la máxima actividad enzimática se presentara la mayor cantidad de proteína, además, es importante tener en cuenta que el hongo *T. versicolor* no solo es capaz de producir enzimas como lacasas, sino que también tiene la capacidad de generar enzimas como la MnP y LiP y otro tipo de proteínas las cuales no todas se excretan al medio al mismo tiempo[111].



**Figura 3.** Relación de la concentración de lacasa contra proteína extracelular en el extracto crudo durante la fermentación sumergida de *Trametes versicolor*

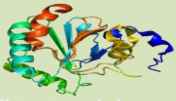
En la **Figura 4** se presenta la relación entre actividad enzimática Vs compuestos fenólicos, cuando se presentó la mayor actividad enzimática la concentración de compuestos fenólicos se redujo a 3.94 mg/L, lo cual es significativamente menor que la concentración inicial de 10 mg/L. Este descenso se explica por el hecho de que una cantidad limitada de compuestos fenólicos actúa como inductor para la actividad enzimática, como se ha mencionado en investigaciones anteriores[112]. Mientras que altas cantidades puede inhibir su producción, recordando que lo que se utilizó como cosustrato fue salvado de trigo, los compuestos fenólicos que se pueden llegar a estar presentes y ayudar como mediadores son el ácido ferúlico y el ácido p-cumárico que pueden ser sustratos para la lacasa [113].



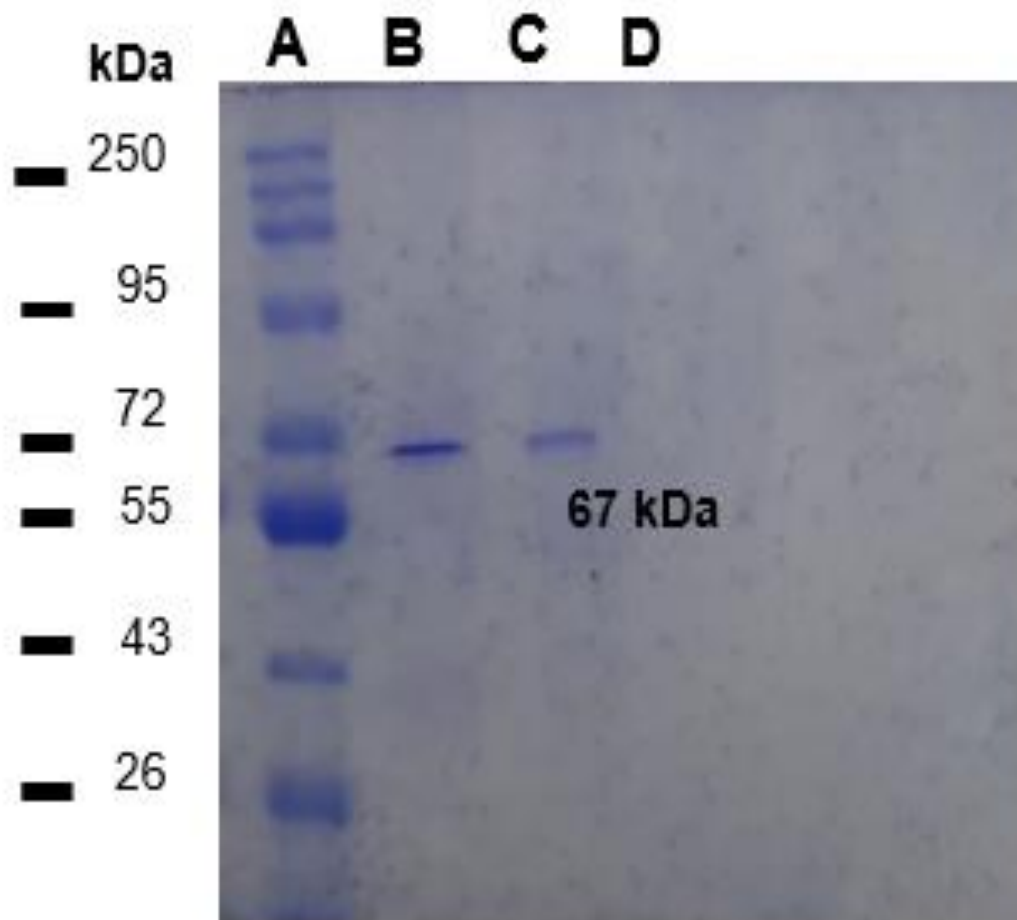
**Figura 4.** Relación de la concentración de lacasa contra compuestos fenólicos en el extracto crudo durante la fermentación sumergida de *Trametes versicolor*

Después de varias cinéticas para obtener suficiente extracto crudo se obtuvo una actividad de 1,123U/mL de lacasa en nuestro extracto crudo, esta actividad con ayuda de centricones de 100 y 50 kDa se logró concentrar 6.43 veces la concentración inicial teniendo una actividad de 7,230 U/mL y una actividad específica de 97.70 como se aprecia en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Comparación entre **actividades enzimáticas (U/mL)**, **proteína extracelular (µg/mL)** y **actividad específica**, en los cortes por amicon del extracto crudo de *Trametes versicolor*

 Estructura de lacasa	Extracto crudo	Ultrafiltración (100 kDa)	Ultrafiltración (50 kDa)
<b>Actividad enzimática</b>	1,123 U/mL	1,176 U/mL	7,230 U/mL
<b>Proteína extracelular</b>	80 mg/mL	77 mg/mL	74 mg/mL
<b>Actividad específica</b>	14.037 U/µg	15.272 U/µg	97.702 U/µg

Una vez que se obtuvo la enzima semipurificada con centricones se le realizó una electroforesis para corroborar que solo tuviéramos enzima lacasa en nuestro extracto en la **Figura 5** se presenta el resultado en donde en el carril A está el marcador molecular, en el B enzima lacasa comercial, en el C nuestro extracto tratado y en el D medio solo como control, la lacasa tiene un peso molecular de entre 59 a 69 kDa[114]. La nuestra presenta un peso alrededor de los 67 kDa pareció a la enzima comercial así mismo el carril C donde se corrió nuestra muestra se presenta limpio sin otras enzimas [115]. Como lignina peroxidasa o manganeso peroxidasa enzimas que también se producen durante la fermentación sumergida[100].



**Figura 5.** Gel de poliacrilamida al 10% marcador de peso molecular (a), lacasa comercial (+) (b), extracto semi-purificado lacasa *Trametes versicolor* (c), y medio Kirk (-)(d).



## 8.2 Funcionalización y caracterización de nanomateriales ZnO, TiO<sub>2</sub> y CuO.

### 8.2.1 Aminación con APTMS y APTES.

Se probaron dos compuestos aminados distintos para la modificación de nuestros nanomateriales a los cuales se les realizó una prueba de estabilidad midiendo su potencial  $\zeta$ , como se observa en la **Tabla 6** con el APTMS se obtuvieron cargas superficiales más altas que las obtenidas por el APTES para todos los nanomateriales

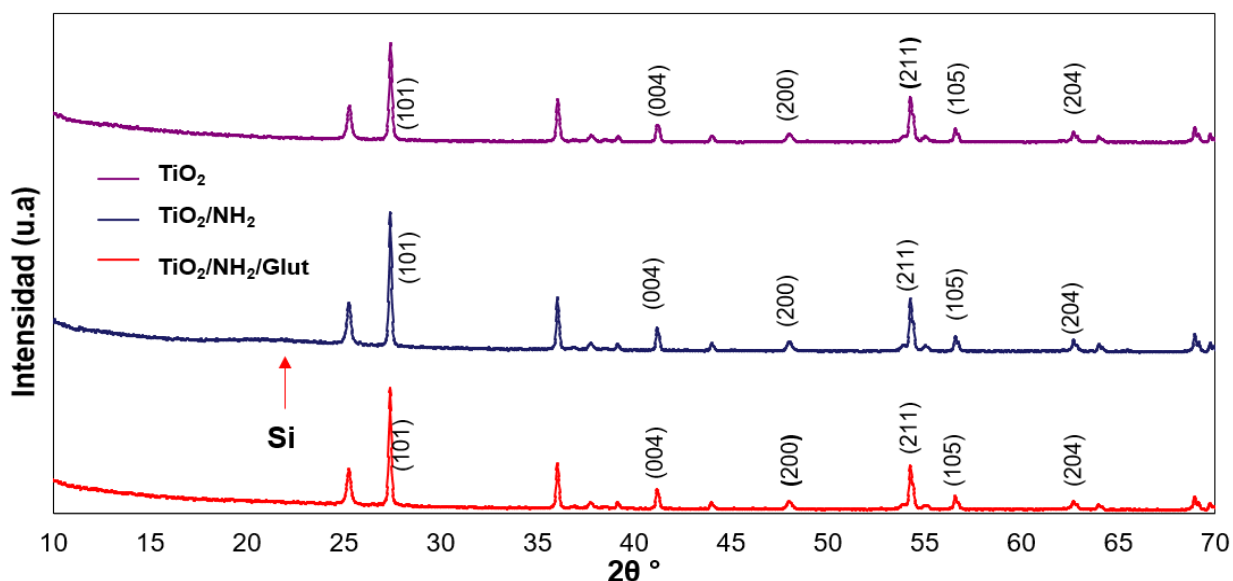
**Tabla 6.** Comparación entre el potencial de carga superficial de los nanomateriales solos y después de ser aminados con 2 aminocilanos APTMS y APTES.

Material	Potencial $\zeta$ (mV)	Desviación std (mV)
TiO <sub>2</sub>	-21	± 1.76
TiO <sub>2</sub> +APTMS	22.5	± 3.22
TiO <sub>2</sub> +APTES	20.5	± 2.89
ZnO	-18	± 2.01
ZnO+ APTMS	23.7	± 2.89
ZnO+APTES	19.8	± 3.13
CuO	-15.3	± 1.87
CuO+APTMS	19.7	± 3.81
CuO+APTES	18.2	± 4.12

Esto puede deberse a la estructura de ambos compuestos, en el caso del APTMS se tienen 3 grupos metoxi, mientras que APTES tiene 3 grupos etoxi, lo cual al momento de unirse al TiO<sub>2</sub> por efecto de impedimento estérico sólo una cantidad limitada de moléculas se pueden unir al TiO<sub>2</sub>, caso contrario al APTMS, que al ser una molécula más compacta permite que una mayor cantidad de grupos amino rodeen la nanopartícula[116].

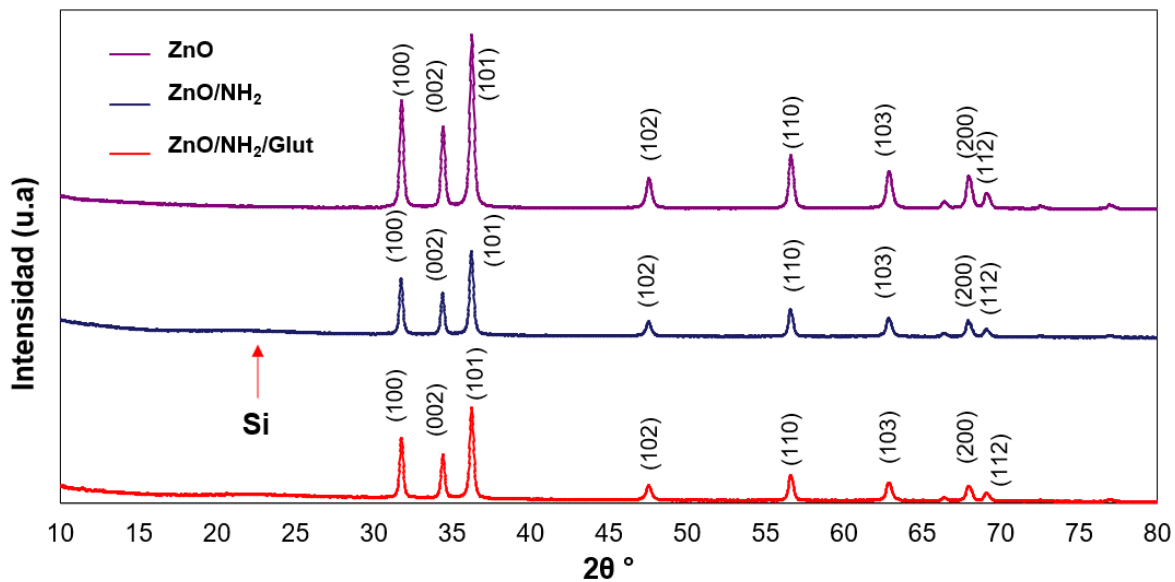
## 8.2.2 Difracción de rayos X

Desde el espectro que se presenta en la **Figura 6**, las intensidades y posiciones de los picos observados son consistentes con los datos XRD estándar para el  $\text{TiO}_2$  tanto con la fase anatasa (JCPDS No. 71-1166) como con la fase de rutilo (JCPDS No. 21-1276). Las fracciones ponderales de las dos fases cristalinas en el  $\text{TiO}_2$  después de la aminación y la adición de glutaraldehído presentan las mismas fases que el  $\text{TiO}_2$  solo las fases cristalinas de anatasa, que corresponden a los picos representativos de la anatasa (101) al ángulo de difracción ( $2\theta$ ) de  $25,35^\circ$  y la anatasa (200) a la difracción de  $48^\circ$ , presentando una diferencia únicamente en  $23^\circ$  por una ligera pancita por la adición del Si[117].



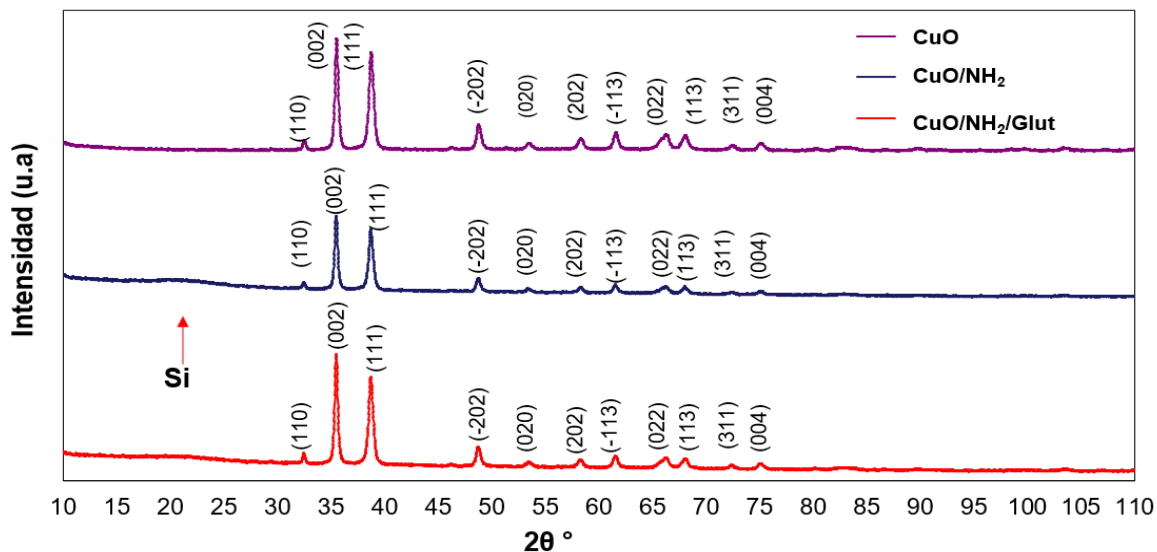
**Figura 6.** Difractograma de  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2/\text{NH}_2$  y  $\text{TiO}_2/\text{NH}_2/\text{Glut}$ .

En la **Figura 7** se muestra los patrones XRD de  $\text{ZnO}$ ,  $\text{ZnO}/\text{NH}_2$  y  $\text{ZnO}/\text{NH}_2/\text{Glut}$ . Las posiciones de los picos de difracción de todos los materiales corresponden totalmente con la tarjeta estándar JCPDS 36-1451, así mismo no se observan picos de impurezas[118]. Lo que indica que el material de  $\text{ZnO}$  tenía una estructura de wurtzita, y la funcionalización de APTMS y Glut no afectó la estructura cristalina de los materiales de  $\text{ZnO}$ .



**Figura 7.** Difractograma de ZnO, ZnO/NH<sub>2</sub> y ZnO/NH<sub>2</sub>/Glut, fase wurtzita

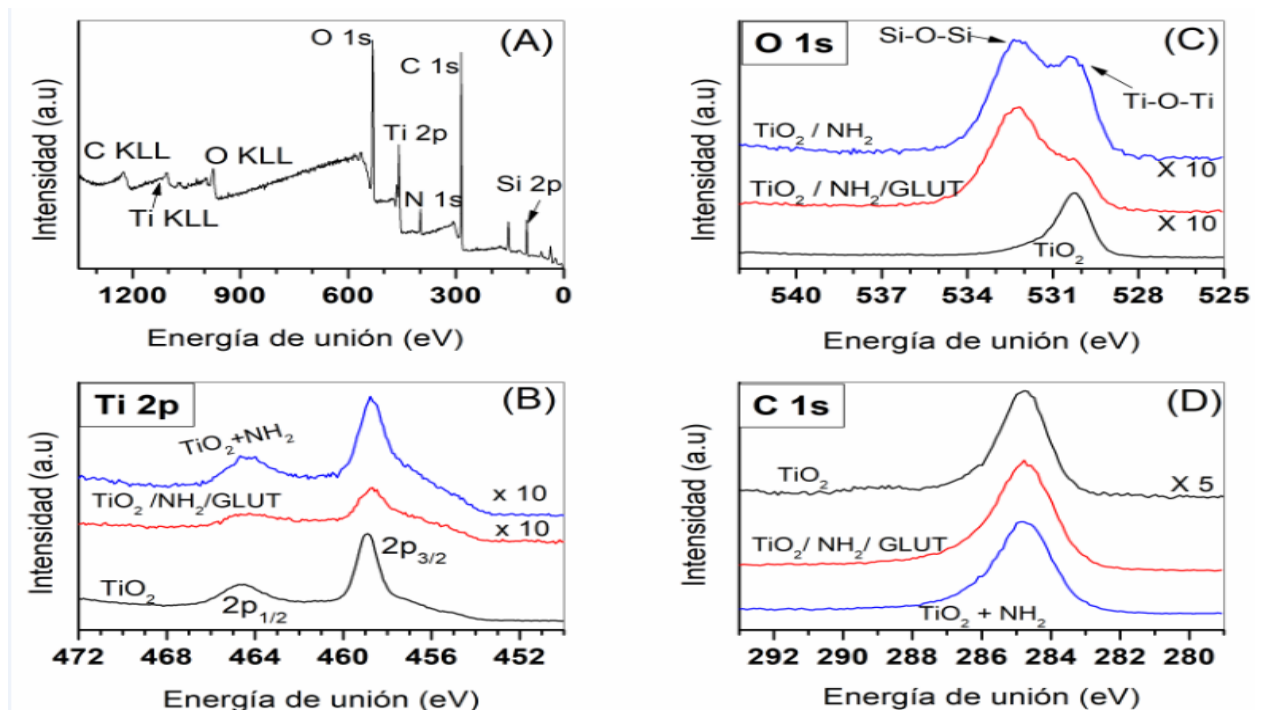
En la **Figura 8** se muestra el Difractograma de CuO, CuO/NH<sub>2</sub> y CuO/NH<sub>2</sub>/Glut donde se presentan que de todos los materiales corresponden a CuO (fase de tenorita), al igual que en los casos anteriores la estructura cristalina no se vio modificada después de la adición de APTMS y glutaraldehído mostrando únicamente como diferencia en 2θ por una ligera pancita por la adición del Si correspondiente del APTMS[119].



**Figura 8.** Difractograma de CuO, CuO/NH<sub>2</sub> y CuO/NH<sub>2</sub>/Glut, (fase tenorita)

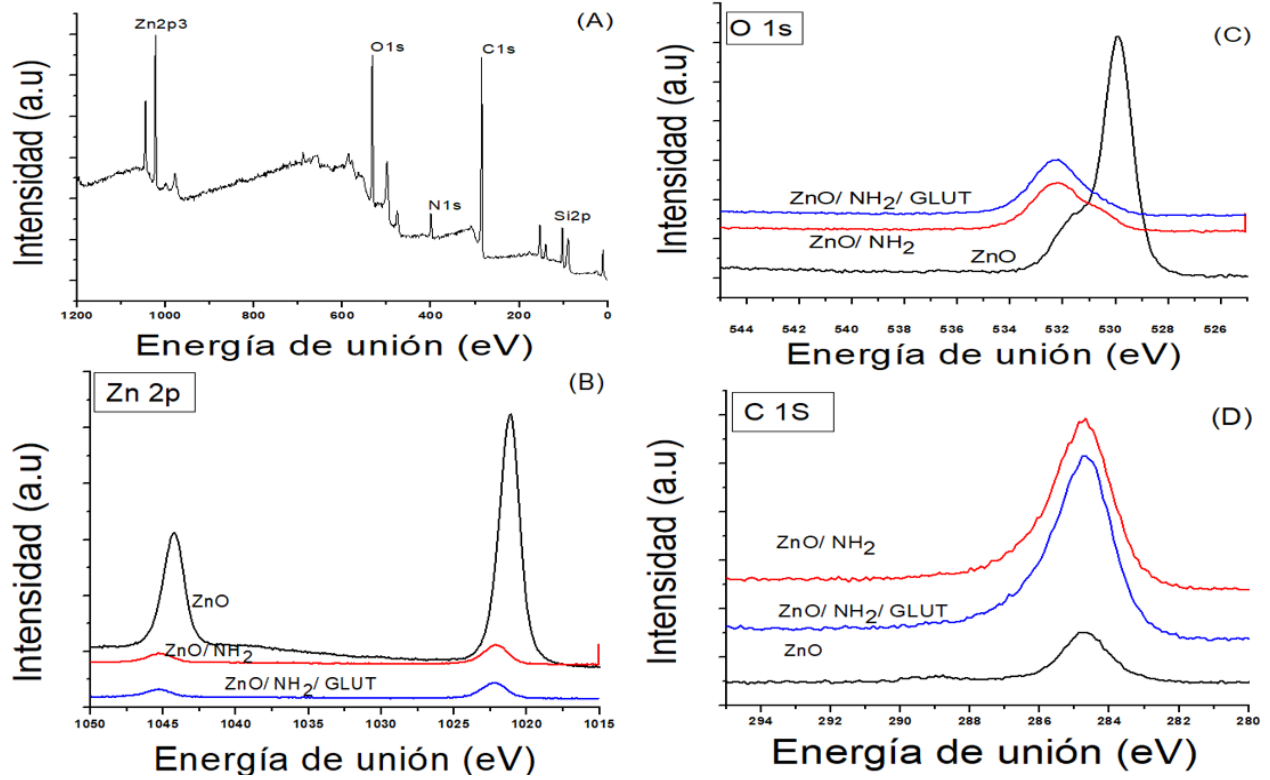
### 8.2.3 Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X

Obteniendo más información relacionada con el proceso de funcionalización de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$  y  $\text{CuO}$  se pueden obtener con XPS, en la **Figura 9** se muestra el espectro de  $\text{TiO}_2$ , presentando los pico  $\text{Ti } 2p$ ,  $\text{O } 1s$ ,  $\text{C } 1s$ , en la **Figura 10** el espectro De  $\text{ZnO}$  con los picos de  $\text{Zn } 2p$ ,  $\text{O } 1s$ ,  $\text{C } 1s$  y en la **Figura 11** del  $\text{CuO}$  con los picos  $\text{Cu } 2p$   $\text{O } 1s$ ,  $\text{C } 1s$  todos correspondientes al nanomaterial con el que se trabajó, posteriormente cuando se realizó la adición de APTMS se pudieron apreciar picos de  $\text{Si } 2p$  y  $\text{N } 1s$  en todos los espectros lo cual indica que el grupo amino se unió correctamente, a la superficie de del nanomaterial a través del grupo silano[120]

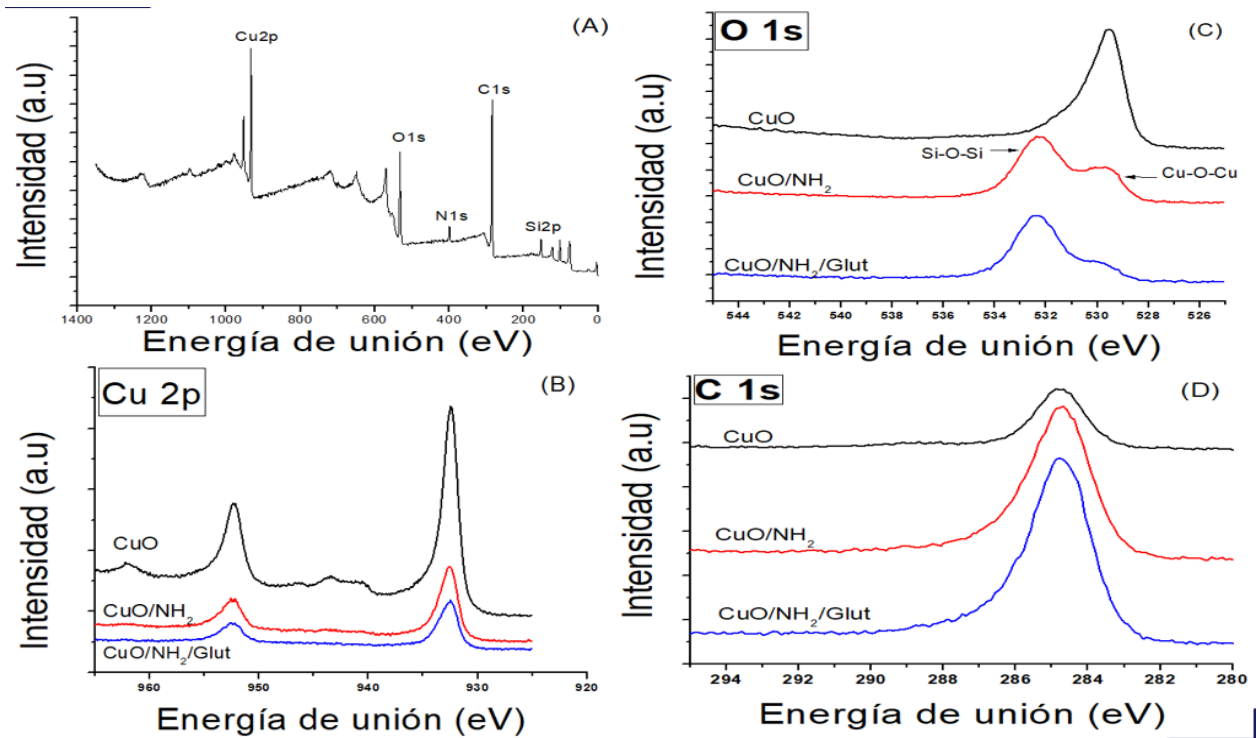


**Figura 9.** Espectro de XPS de  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2/\text{NH}_2$  y  $\text{TiO}_2/\text{NH}_2/\text{Glut}$

El mecanismo de unión de APTMS ocurre primero por hidroxilación de silano; entonces el  $\text{Si-OH}$  puede reaccionar rápidamente por condensación y forman grupos  $\text{Si-O-Si}$  con los grupos hidroxilo superficiales, así mismo el nitrógeno presenta un estado de oxidación 3+, después con la adición del Glutaraldehído aumenta la intensidad del pico  $\text{C } 1s$  correspondientes a los enlaces carbonilo  $\text{C=O}$  presentes y disminuye la de  $\text{Si}$ .



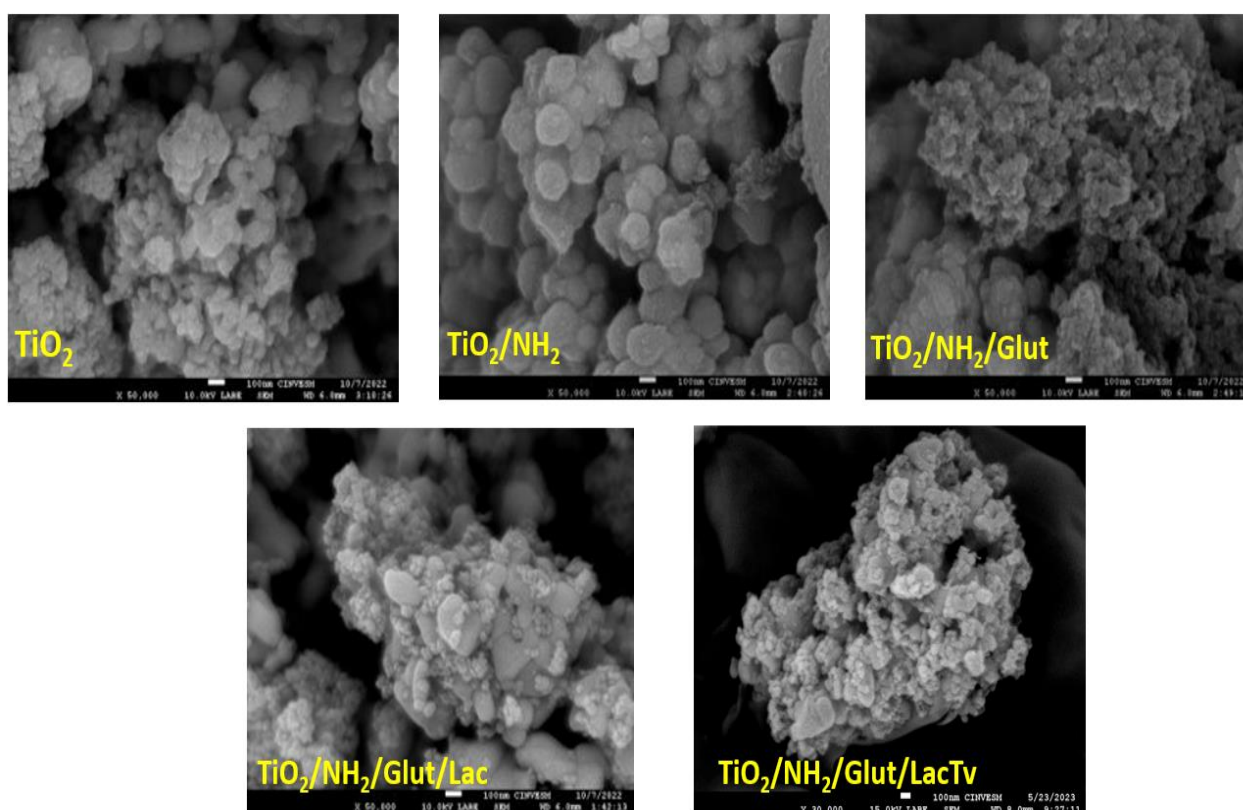
**Figura 10.** Espectro de XPS de ZnO, ZnO/NH<sub>2</sub> y ZnO/NH<sub>2</sub>/Glut



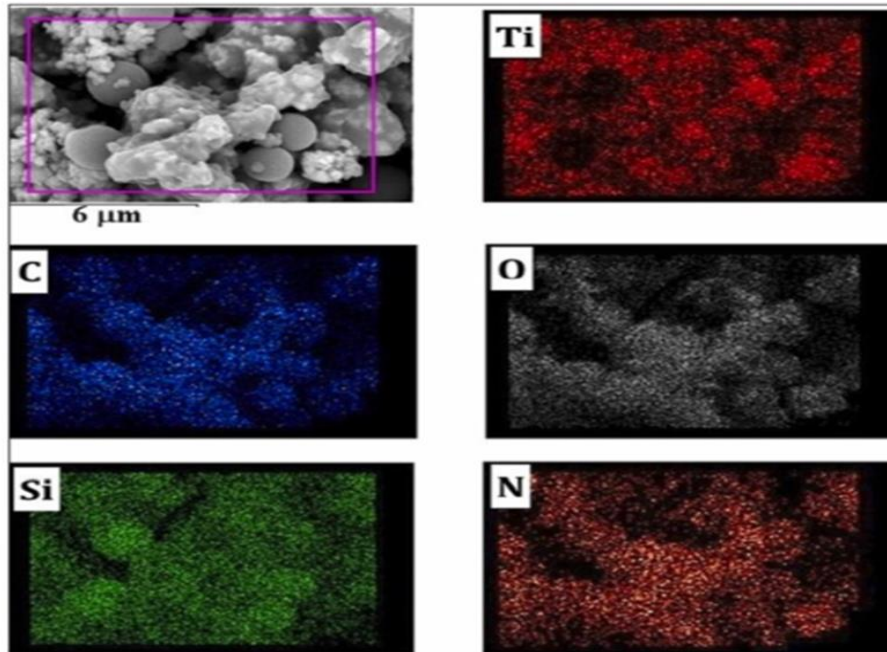
**Figura 11.** Espectro de XPS de CuO, CuO/NH<sub>2</sub> y CuO/NH<sub>2</sub>/Glut

### 8.2.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Se llevó a cabo un análisis SEM para investigar cambios en la morfología y la composición elemental de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{CuO}$  y  $\text{ZnO}$  debido a la modificación química y la inmovilización de la enzima lacasa comercial y la previamente purificada proveniente del hongo *Trametes versicolor*. Las **figuras 12, 14 y 16** muestran imágenes SEM para las nanopartículas (NP) solas, NP/ $\text{NH}_2$ , NP/ $\text{NH}_2$ /Glut, NP/ $\text{NH}_2$ /Glut/LacC (lacasa comercial) y NP/ $\text{NH}_2$ /Glut/LacTv (*Trametes versicolor*), respectivamente. Los aglomerados de nanopartículas exhibieron una morfología muy similar. La reticulación con glutaraldehído no cambió la morfología de la nanopartícula solas, sin embargo, una vez que se realiza la animación con APTMS se puede ver como las nanopartículas se ven más aglomeradas.

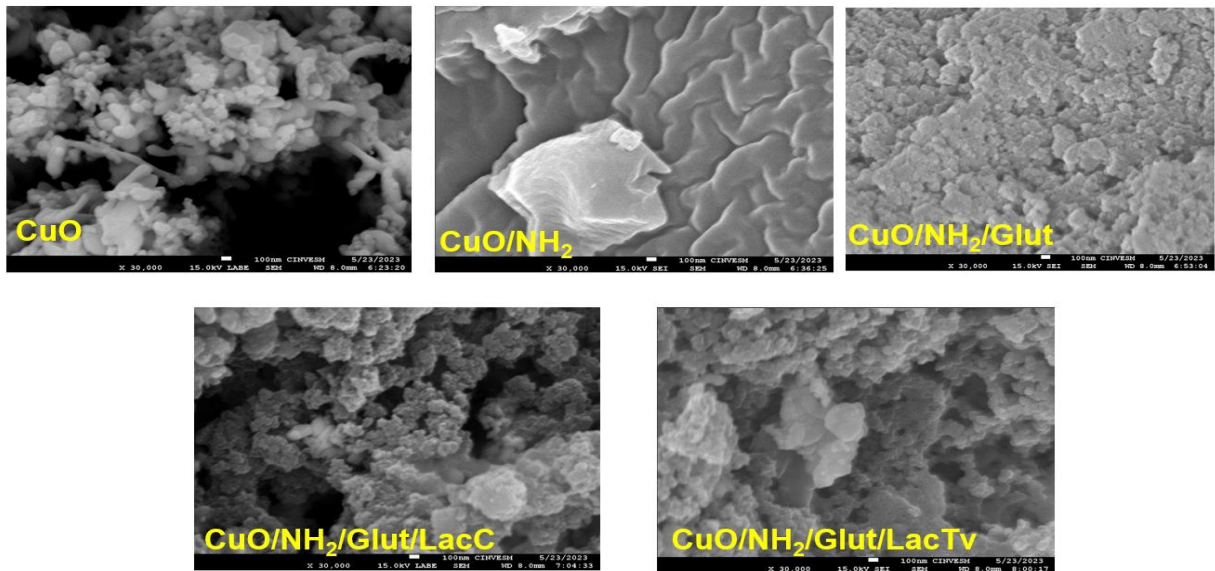


**Figura 12.** Microscopía electrónica de barrido  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2/\text{NH}_2$ ,  $\text{TiO}_2/\text{NH}_2/\text{Glut}$ ,  $\text{TiO}_2/\text{NH}_2/\text{Glut}/\text{LacC}$  y  $\text{TiO}_2/\text{NH}_2/\text{Glut}/\text{LacTv}$  con aumento de X30,000



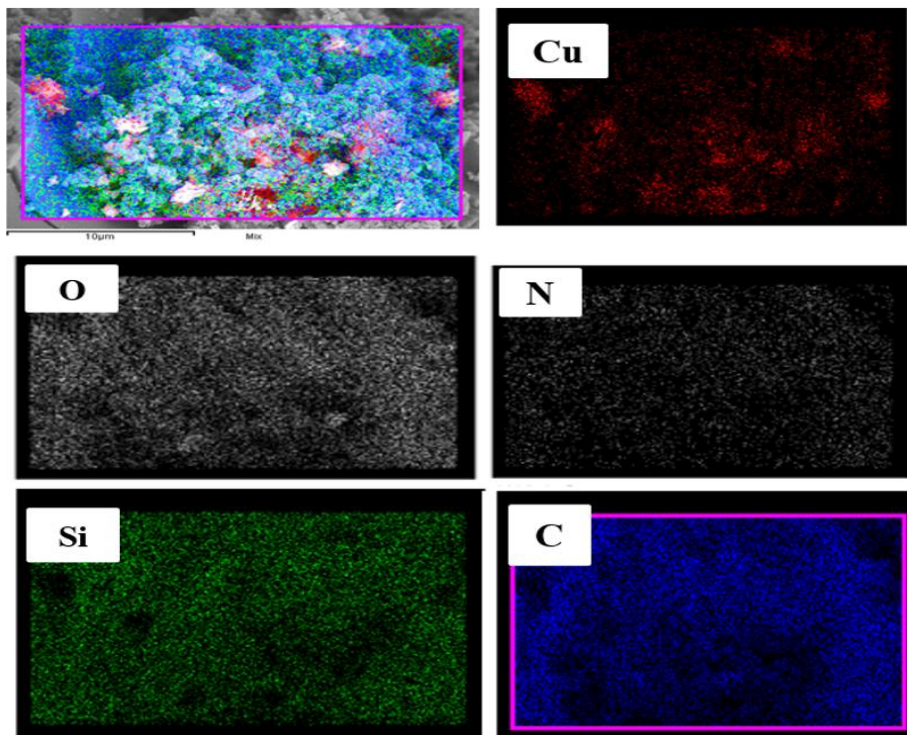
**Figura 13.** Mapeo Elemental de muestra de  $\text{TiO}_2/\text{NH}_2/\text{Glut}/\text{Lac}$  por EDS

En la **Figura 13** se muestra una región rectangular (con un borde de línea magenta) donde se realizó el análisis EDS para  $\text{TiO}_2/\text{NH}_2/\text{Glut}/\text{Lac}$ , donde podemos ver la forma en que se distribuyen los elementos durante la inmovilización teniendo la presencia de Ti el cual no tiene una distribución uniforme, el contenido de C y O es alto como se aprecia en el mapeo y en la **Figura 18** lo que sugiere que algunos aglomerados contienen una mayor cantidad de APTMS/Glut. Los mapeos para Si y N permitieron validar la funcionalización exitosa de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$



**Figura 14.** Microscopía electrónica de barrido  $\text{CuO}$ ,  $\text{CuO}/\text{NH}_2$ ,  $\text{CuO}/\text{NH}_2/\text{Glut}$ ,  $\text{CuO}/\text{NH}_2/\text{Glut}/\text{LacC}$  y  $\text{CuO}/\text{NH}_2/\text{Glut}/\text{LacTv}$  con aumento de X30,000

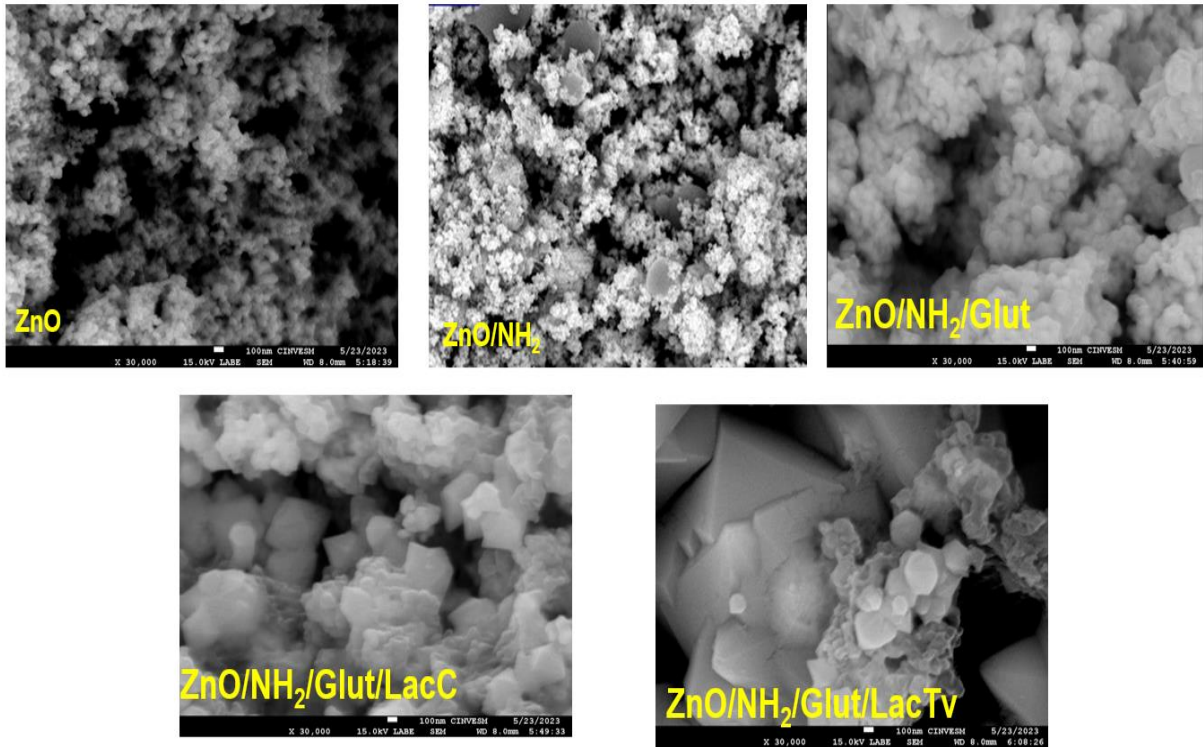
En la **Figura 15** se muestra una región rectangular (con un borde de línea magenta) donde se realizó el análisis EDS para CuO/NH<sub>2</sub>/Glut/LacTv, podemos apreciar que para este caso el Cu si se encuentra correctamente distribuido por toda la imagen, así como el Si y el C lo que nos indica una buena animación y adición de Glut, así como la distribución de N el cual se presentan una pequeñas aglomeraciones lo que nos podría indicar que la enzima esta mayormente inmovilizada en algunas zonas que en otras, sin embargo al comparar con la **Figura 18** podemos decir que si se realizó la inmovilización de manera correcta con forme fue aumentando el porcentaje de elemento después de cada paso de la funcionalización.



**Figura 15.** Mapeo Elemental de muestra de CuO/NH<sub>2</sub>/Glut/LacTv por EDS

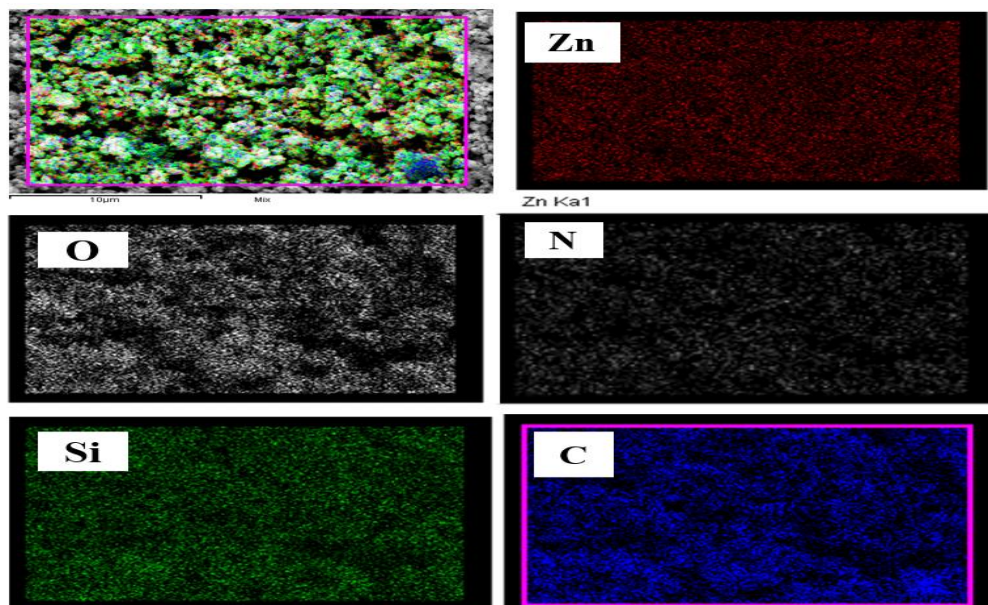
Se llevó a cabo un análisis SEM para evaluar los cambios en la morfología de los nanomateriales después de la adición del APTMS y glutaraldehído, en las **Figura 16** (ZnO) se presentan las micrográficas de todos los nanomateriales solos (a), con APTMS (b) y con glutaraldehído (c) donde se aprecia para todas las figuras que los aglomerados de nanopartículas presentaron una morfología muy similar al momento de la adición de APTMS y Glut, lo que nos indica que la morfología no se vio afectada por el mecanismo de inmovilización de la lacasa y mantiene la estructura de la superficie original, lo que puede proteger a la enzima de ser afectada por el medio ambiente[121].





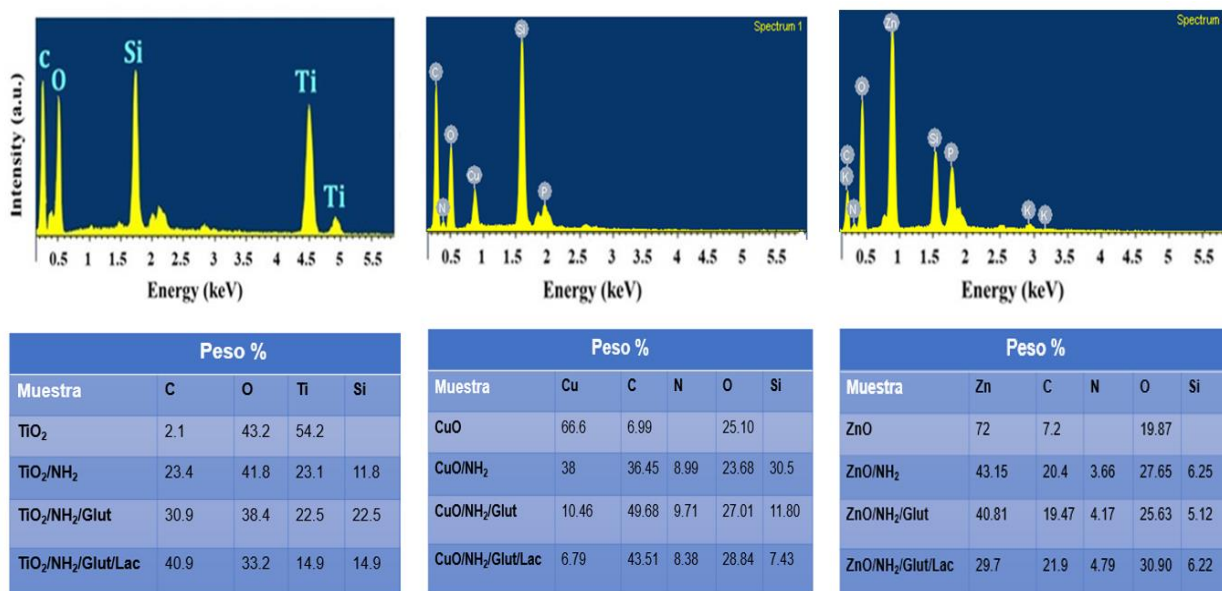
**Figura 16.** Microscopía electrónica de barrido ZnO, ZnO/NH<sub>2</sub>, ZnO/NH<sub>2</sub>/Glut, ZnO/NH<sub>2</sub>/Glut/LacC y ZnO/NH<sub>2</sub>/Glut/LacTv con aumento de X30,000

En la **Figura 17** se muestra una región rectangular (con un borde de línea magenta) donde se realizó el análisis EDS para ZnO/NH<sub>2</sub>/Glut/LacTv, podemos apreciar que para este caso el ZnO al igual que el TiO<sub>2</sub> la distribución se es pareja por toda la imagen, lo que nos indica que existen aglomeraciones de otros elementos como Si, C y N, pero la presencia de estos elementos en nuestra imagen nos indica la correcta funcionalización del material



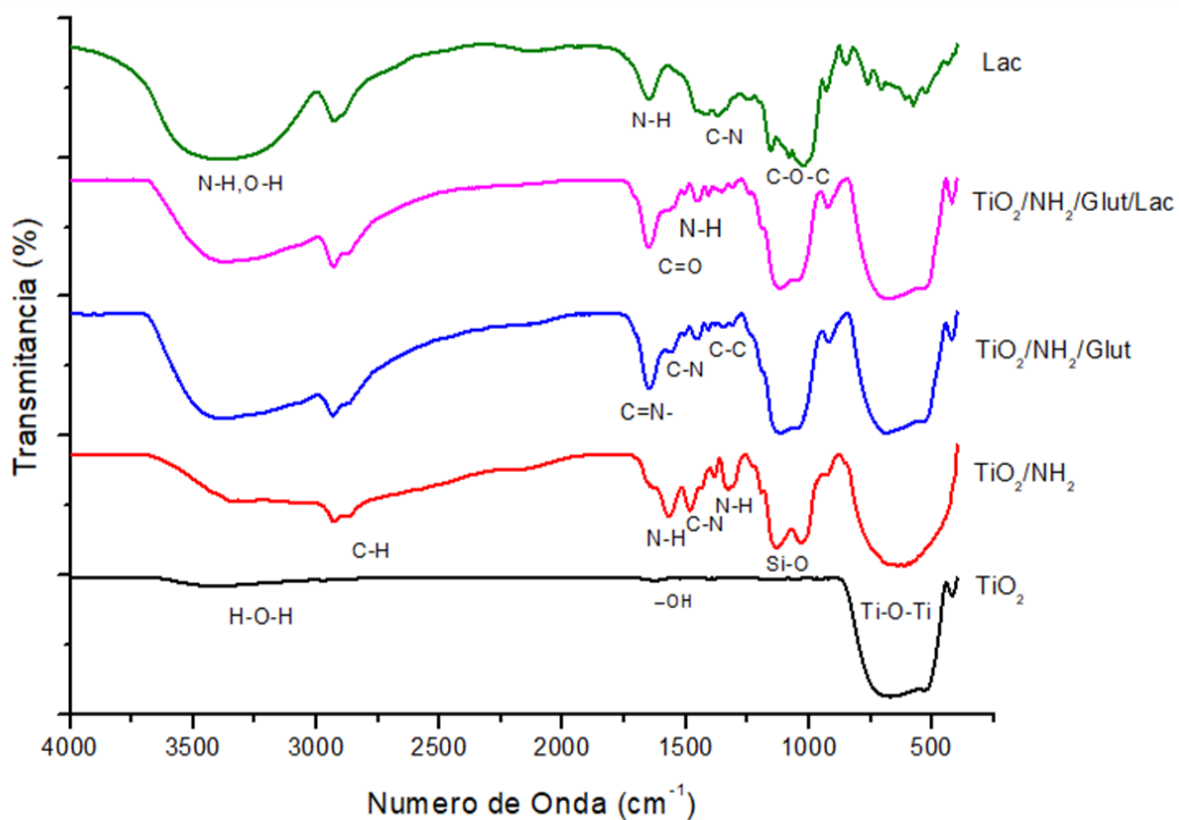
**Figura 17.** Mapeo Elemental de muestra de ZnO/NH<sub>2</sub>/Glut/LacTv por EDS 47

En la figura se presenta la cuantificación de EDS para las cuatro muestras se presenta en para el TiO<sub>2</sub>, CuO y ZnO, se detectó una pequeña cantidad de C, probablemente debido a contaminación carbonosa en todas las muestras. El contenido de carbono después del tratamiento químico con APTMS es de alrededor del 23% para TiO<sub>2</sub>, 38% para CuO y 43% para ZnO en peso y aumenta después de la reticulación con glutaraldehído y después de la inmovilización de lacasa en TiO<sub>2</sub>. Por el contrario, el contenido de Ti, Cu y ZnO y O disminuyó siendo esto lo esperado ya que se forma una capa sobre la nanopartícula con cada paso de la inmovilización así mismo cuando se adiciona el APTMS aparece la presencia de Si para todas las muestras por la silanización.



**Figura 18.** La composición química de áreas seleccionadas se muestra como regiones rectangulares con un borde de línea magenta en las imágenes SEM presentadas en la Figura 13, 15 y 17.

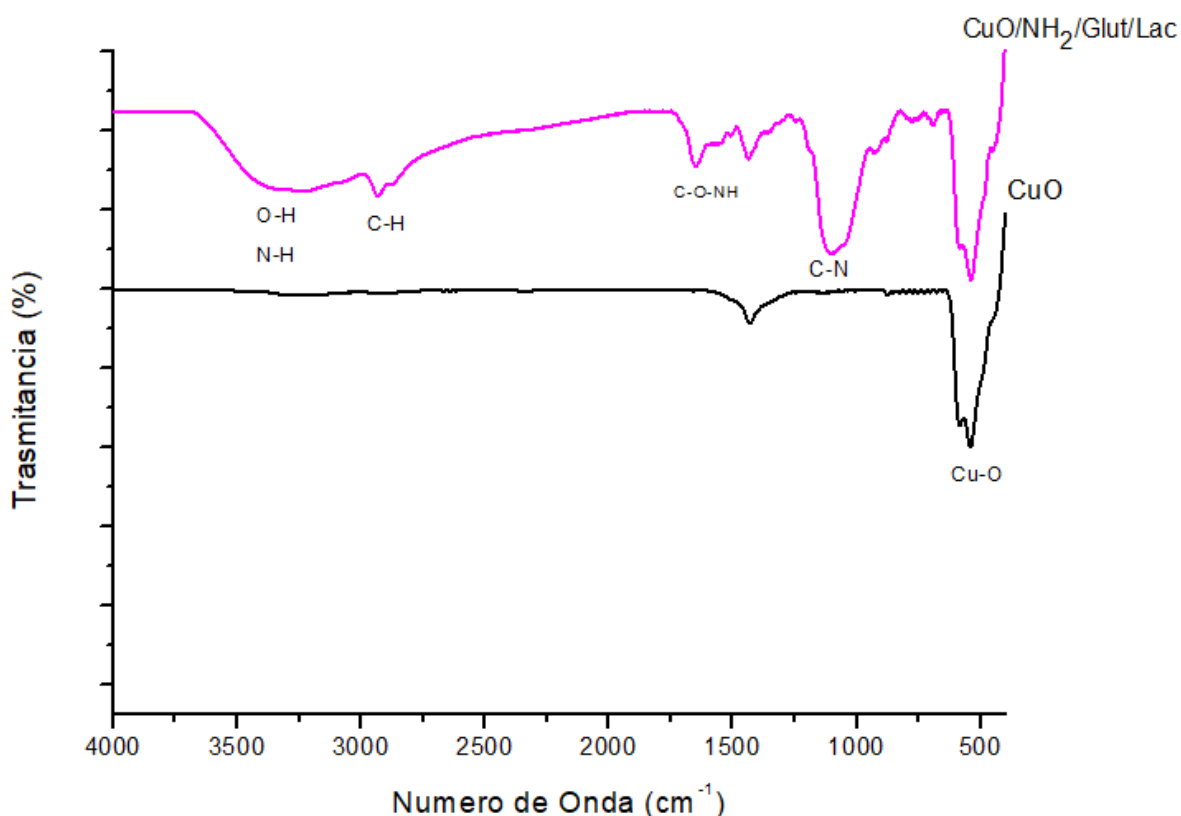
### 8.2.5 Espectroscopía infrarroja FT-IR



**Figura 19.** Espectro de FT-IR de TiO<sub>2</sub> y TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac

Continuando con la caracterización de los nanomateriales en la **Figura 19** se presenta el espectro de FT-IR de TiO<sub>2</sub>, donde empezando de la parte inferior de la imagen se presentan las bandas entre 3500 y 3000 cm<sup>-1</sup> corresponden al estiramiento vibracional de los enlaces O-H, los picos se encuentran en el rango de 700–400 cm<sup>-1</sup> son característico de los enlaces Ti-O-Ti [122,123]. Para TiO<sub>2</sub> después de la modificación química con APTMS aparecieron nuevas señales en el espectro. se presenta un pico en 1043 cm<sup>-1</sup> y 1129 cm<sup>-1</sup>, que se atribuyen al pico de absorción del Si-O enlace de APTMS, así como picos a 1350 y 1559 cm<sup>-1</sup> correspondiente a las vibraciones de estiramiento N-H (de los grupos amina) y a C-N. confirmaron la formación de bandas C-NH-C debido a la reacción de los grupos epóxido-amina, mientras que el pico de absorción a 2933 cm<sup>-1</sup> se atribuyó al enlace C-H del grupos metilo[124]. Así mismo en 1443 cm<sup>-1</sup> se presentan vibraciones de C=N debido a la reacción entre el grupo aldehído del glutaraldehído y el grupos amina de TiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>[125]. En el caso de TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac, apareció una banda de 1550–1650 cm<sup>-1</sup> correspondiente al

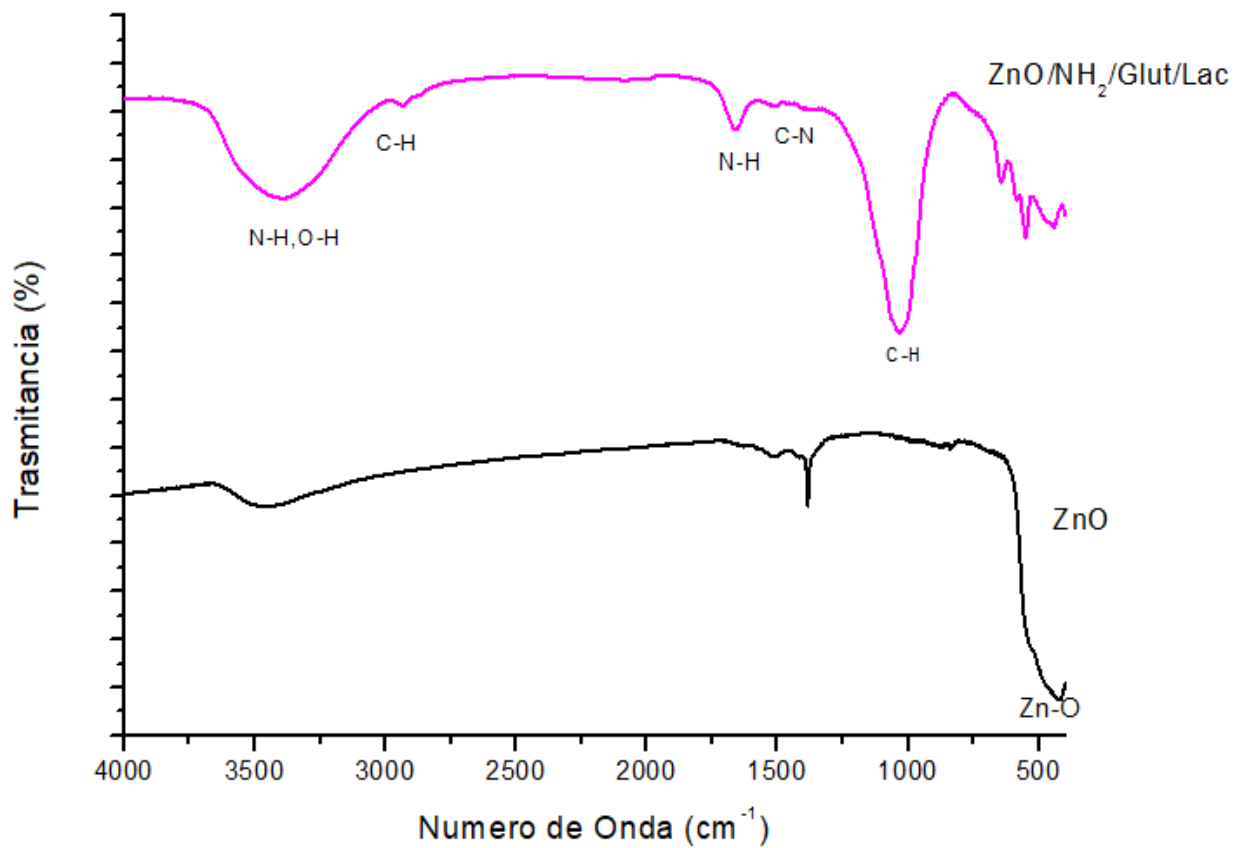
estiramiento de C=O (banda de amida I,  $1631\text{ cm}^{-1}$ ) y de flexión N-H (banda de amida II,  $1552\text{ cm}^{-1}$ ) de la proteína. Finalmente, el espectro de lacasa (forma libre) que se presenta en la parte superior de la imagen presenta una banda correspondiente al enlace peptídico N-H en  $1630\text{ cm}^{-1}$ , una señal a  $1350\text{ cm}^{-1}$  atribuida a la vibración de estiramiento C-N de las aminas, y una banda fuerte y aguda con un pico en  $1100\text{ cm}^{-1}$  debido al enlace C-O-C[124,126].



**Figura 20.** Espectro de FT-IR de CuO y CuO/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac

En la **Figura 20 y 21** se presentan los espectros de CuO y ZnO solos y con NH<sub>2</sub>/Glut/Lac en la **Figura 20** en la parte inferior se parecía una vibración de  $400\text{ a }500\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al enlace de CuO-O[127]. Mientras que en la **Figura 21** en  $550\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  se presenta una vibración correspondiente al enlace Zn-O[128]. En la misma imagen en la parte superior se muestran la aparición de nuevas bandas correspondientes a la adición de la enzima lacasa (NH<sub>2</sub>/Glut/Lac) apareció una banda de  $1127\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al enlace C-N, a  $1630\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al

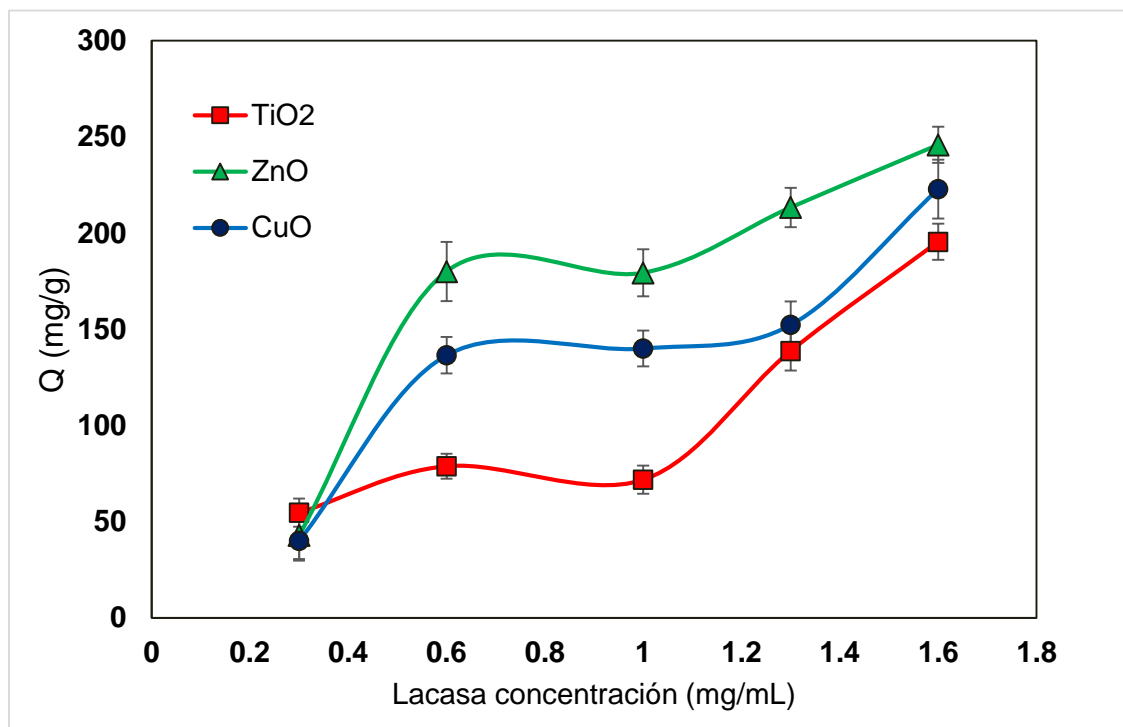
estiramiento de C=O debido a la absorción característica de aldehído grupos, los grupos aldehído pueden actuar como un sitio de unión para los grupos amino primarios , en  $2800\text{ cm}^{-1}$  se aprecia un enlace de C-H y por último en  $3400\text{ cm}^{-1}$  una vibración de estiramiento de O-H o N-H los cuales pueden ser debido a los grupos amino primarios[129].



**Figura 21.** Espectro de FT-IR de ZnO y ZnO/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac

### 8.3 Pruebas de estabilidad

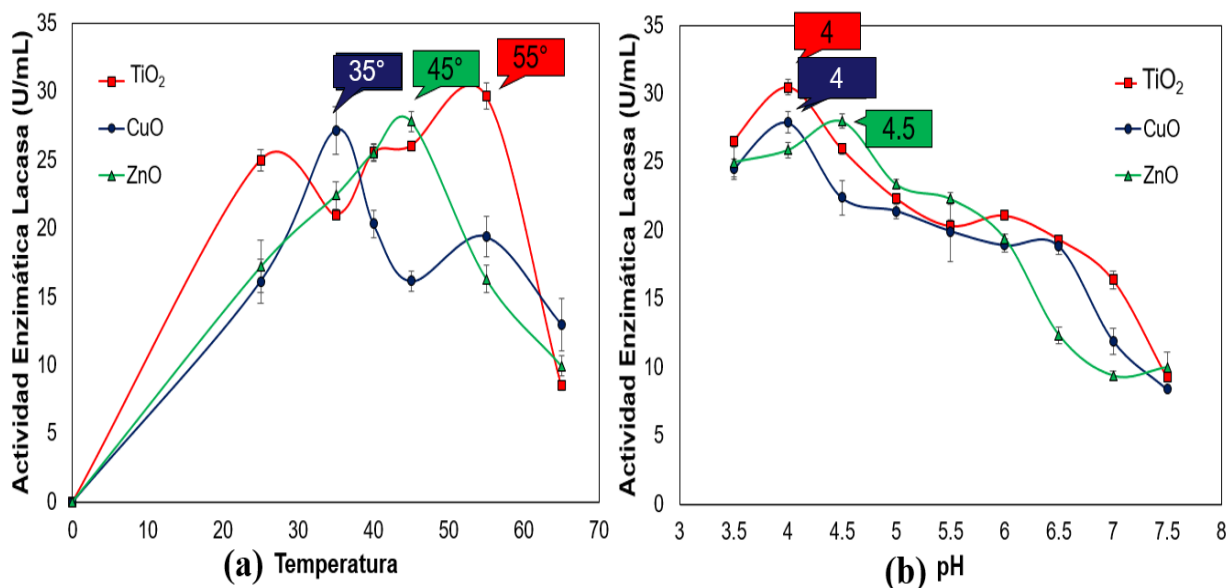
Se determinó la capacidad máxima de adsorción química de la enzima lacasa en relación a los tres nanomateriales  $\text{TiO}_2/\text{NH}_2/\text{Glut}$ ,  $\text{ZnO}/\text{NH}_2/\text{Glut}$  y  $\text{CuO}/\text{NH}_2/\text{Glut}$ , como se presenta en la **Figura 22** se obtuvo una gráfica de la cantidad de lacasa inmovilizada por gramo de nanomaterial vs la concentración enzimática final en una solución, donde se aprecia que a la concentración de de 0.6 y 1 mg/mL de lacasa comienza a saturarse los tres nanomateriales, sin embargo pasando esta parte se puede observar que aún es capaz el material de seguir adsorbiendo enzima.



**Figura 22.** Diferentes concentraciones de lacasa inmovilizada sobre los nanomateriales

### 8.3 Pruebas de estabilidad

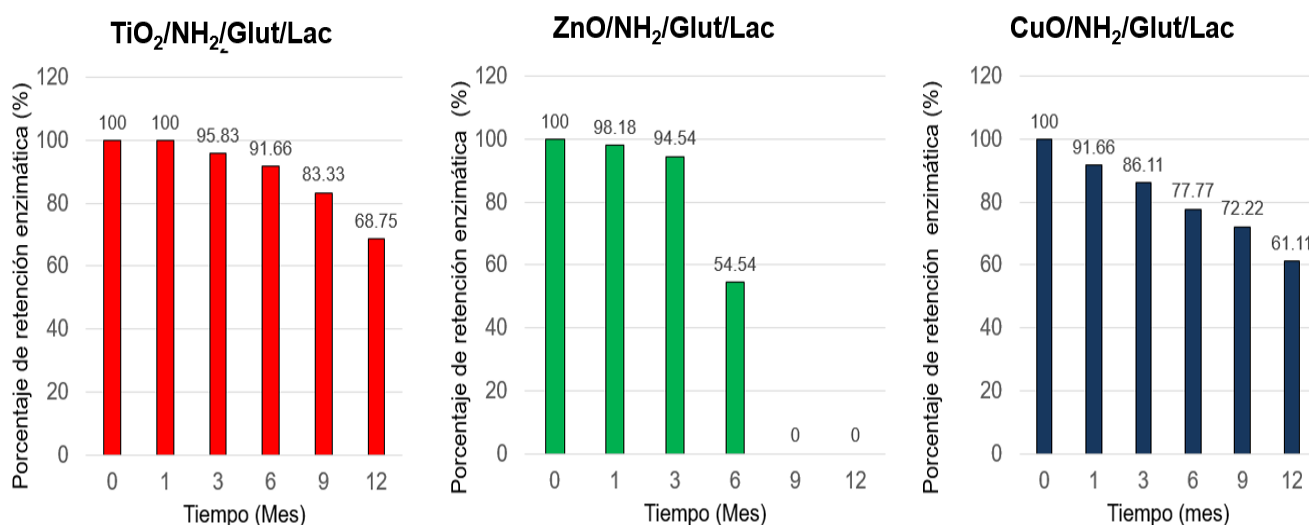
En la **Figura 23**, se procedió a analizar el impacto de la temperatura (a) y el pH (b) con el fin de identificar los valores óptimos para las condiciones de reacción de la actividad enzimática inmovilizada en los tres nanomateriales.



**Figura 23.** Estabilidad enzimática a diferentes temperaturas (1) y pH (2) en buffer de fosfatos

Los resultados indicaron mayor actividad a temperaturas altas de 35° para CuO, 45° para ZnO y 55° para TiO<sub>2</sub> resaltando que aunque esta fue la temperatura óptima para TiO<sub>2</sub>, fue el material que presentó mayor estabilidad a las 5 temperaturas que se probaron la temperatura óptima para la enzima lacasa de manera libre es de 40 grados[90]. Observando que para el caso de ZnO y TiO<sub>2</sub> presentaron estabilidad a temperaturas mayores, demostrando así que al inmovilizar la enzima se mejora su estabilidad para distintos rangos de temperatura[55]. El cambio de temperatura puede ser causado por el cambio de las propiedades físicas y químicas de la enzima inmovilizada, la formación de enlaces covalentes a través de grupos amino de lacasa inmovilizada también podría reducir la flexibilidad conformacional y dar como resultado una mayor energía de activación para que la molécula reorganice la conformación adecuada que se une al sustrato[130]. Depende del tipo de material que se utiliza como soporte ya que existen algunos como el TiO<sub>2</sub> y CuO que no conducen el calor de manera tan eficiente ayudando así a que la enzima no se vea afectada por el cambio de temperatura tan pronto[127]. En el caso del pH óptimo (b) se presentó a pH ácidos

de 4 para  $\text{TiO}_2$  y  $\text{CuO}$  mientras que para  $\text{ZnO}$  se presentó a 4.5, siendo de nuevo el  $\text{TiO}_2$  el material que presento mayor estabilidad a los 5 tipos de pH que se analizaron, el pH óptimo para la enzima lacasa libres es de 3.5 coincidiendo con los pH que se presentaron[99]. En términos generales, la inmovilización de enzimas puede desplazar el perfil de pH hacia regiones más ácidas o alcalinas, lo cual depende del soporte utilizado y está relacionado con las cargas electroestáticas tanto del soporte como de la enzima una vez que ha sido inmovilizada, así como con el tipo de enlace que se forma para unir el soporte y la enzima [131]. En nuestro caso se forma un enlace covalente el cual contiene aminoácidos, puentes de disulfuro y tioles teniendo estos sus propias características de pH ácido o básico que están cargados dependiendo el pH de la dilución en la que se trabaje[128].



**Figura 24.** Estabilidad de la actividad enzimática a diferentes tiempos, conservada a  $-20^\circ$  de  $\text{TiO}_2/\text{NH}_2/\text{Glut}/\text{Lac}$ ,  $\text{ZnO}/\text{NH}_2/\text{Glut}/\text{Lac}$  y  $\text{CuO}/\text{NH}_2/\text{Glut}/\text{Lac}$ .

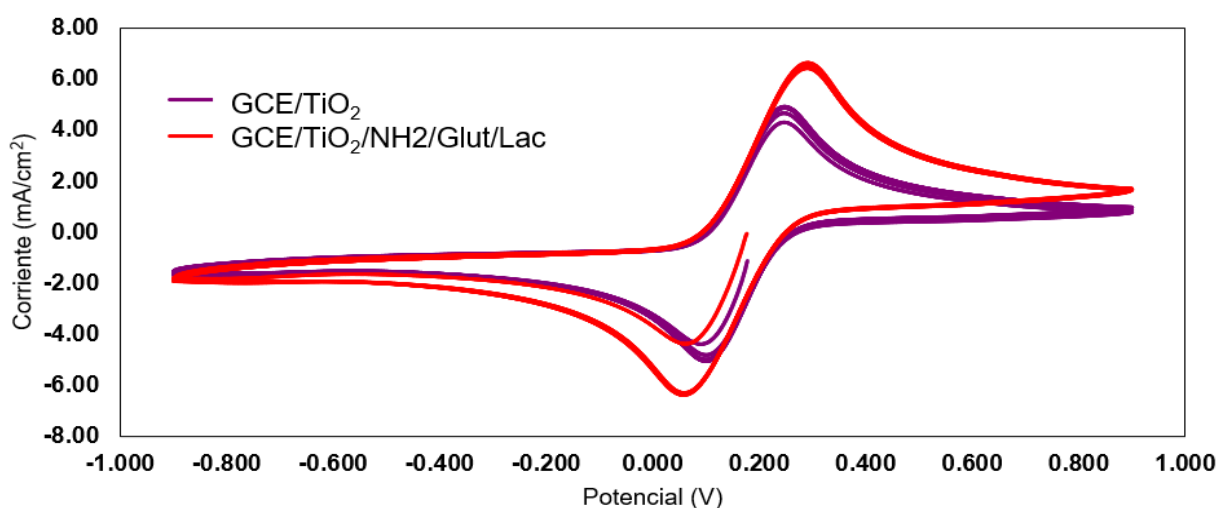
La lacasa tiene un intervalo óptimo de pH y temperatura a los cuales se mantiene su estructura terciaria estable y al inmovilizarla covalentemente se espera que se mantenga más tiempo activa. Otra prueba se realizó para comprobar la estabilidad de la inmovilización fue leer la actividad enzimática a nuestros nanomateriales con lacasa inmovilizada con el paso de los meses, **Figura 24** obteniendo como resultados que el material de nuevo más estable fue el  $\text{TiO}_2$  ya que después de 12 meses aun presentaba actividad del 68.75%, seguido de  $\text{CuO}$  que conservo el 61.11% y por último el  $\text{ZnO}$  el



cual perdió su actividad después de los 6 meses de almacenamiento, la enzima lacasa con el paso de tiempo se degrada y por lo tanto pierde su actividad al inmovilizar la enzima de manera covalente a un soporte nos ayuda a que se preserve su actividad por más tiempo tal en este proyecto la inmovilización de la enzima implica la unión covalente entre los grupos amina en la proteína y los grupos aldehído en la superficie de la nanopartícula funcionalizada. El aumento de la estabilidad se puede atribuir principalmente a la estabilización de la enzima inmovilizada en los materiales de soporte a través de la formación de enlaces covalentes, lo que reduce la aparición de cambios drásticos en la conformación de la molécula de enzima en condiciones extremas[132].

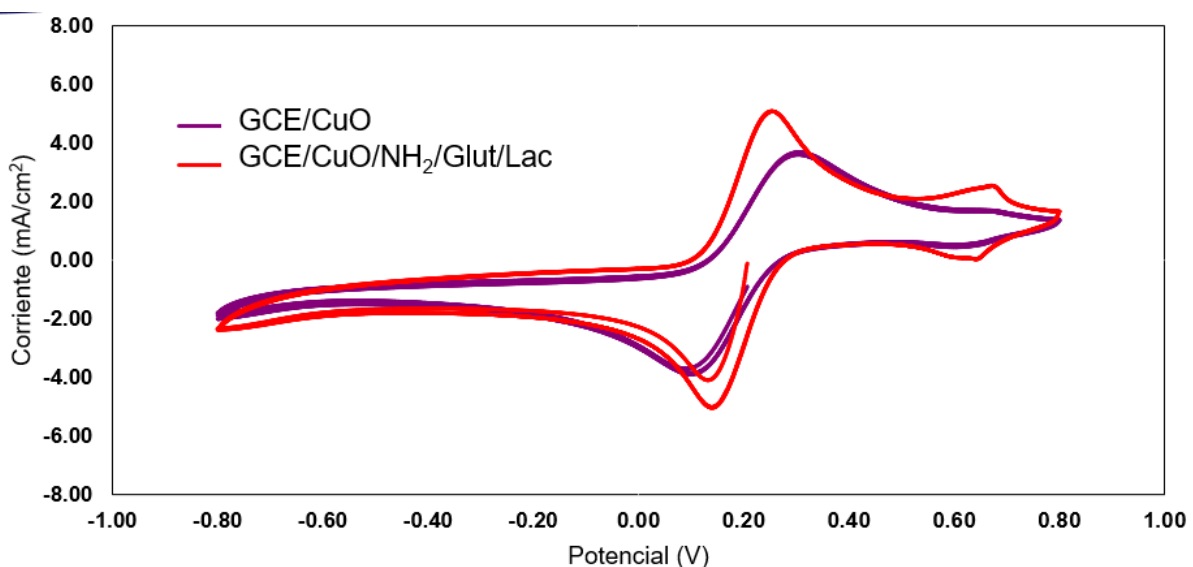
#### 8.4 Caracterización de los electrodos de GCE

Una vez que se tuvieron los nanomateriales con lacasa inmovilizada se realizaron la prueba electroquímica para determinar si mejoraba el potencial de oxidación y reducción de los nanomateriales modificados con lacasa, en la **Figura 25** se presenta el voltamperograma de GCE/TiO<sub>2</sub> y GCE/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac donde se aprecia como cuando la enzima lacasa se encuentra inmovilizada en TiO<sub>2</sub> el potencial de oxidación y reducción pasa de 0.23 mA/cm<sup>2</sup> y 0.077 mA/cm<sup>2</sup> utilizando GCE/TiO<sub>2</sub> y 0.309 mA/cm<sup>2</sup> y 0.062 mA/cm<sup>2</sup> utilizando GCE/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac, lo cual nos indica que el uso de la lacasa al ser de tipo óxidos-reductor mejor los potenciales de oxidación y reducción de TiO<sub>2</sub>[53].



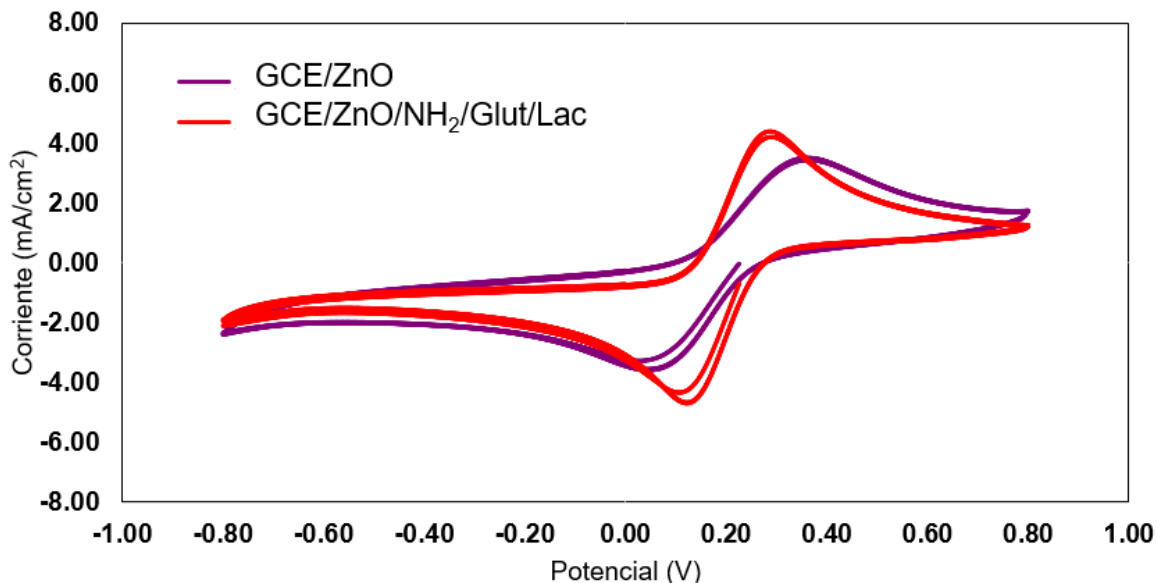
**Figura 25.** Voltamperometría cíclica con los electrodos de GCE/TiO<sub>2</sub> y GCE/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac en Buffer de Fosfatos a pH 7.5 con 1 mM de ABTS

Este mismo comportamiento se repite, en la **Figura 26** donde le presentan los voltamperogramas de GCE/CuO y GCE/CuO/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac y la **Figura 27** GCE/ZnO y GCE/ZnO/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac, donde una vez que el soporte fue modificado con la enzima lacasa se observa como mejor el potencial de oxidación y reducción de ABTS de los nanomateriales pasando de pico máximo de oxidación de 3.59 mA/cm<sup>2</sup> con GCE/CuO a 4.95 mA/cm<sup>2</sup> con GCE/CuO/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac, así mismo con el pico de reducción pasando de -3.38 mA/cm<sup>2</sup> a -4.96 mA/cm<sup>2</sup> respectivamente.

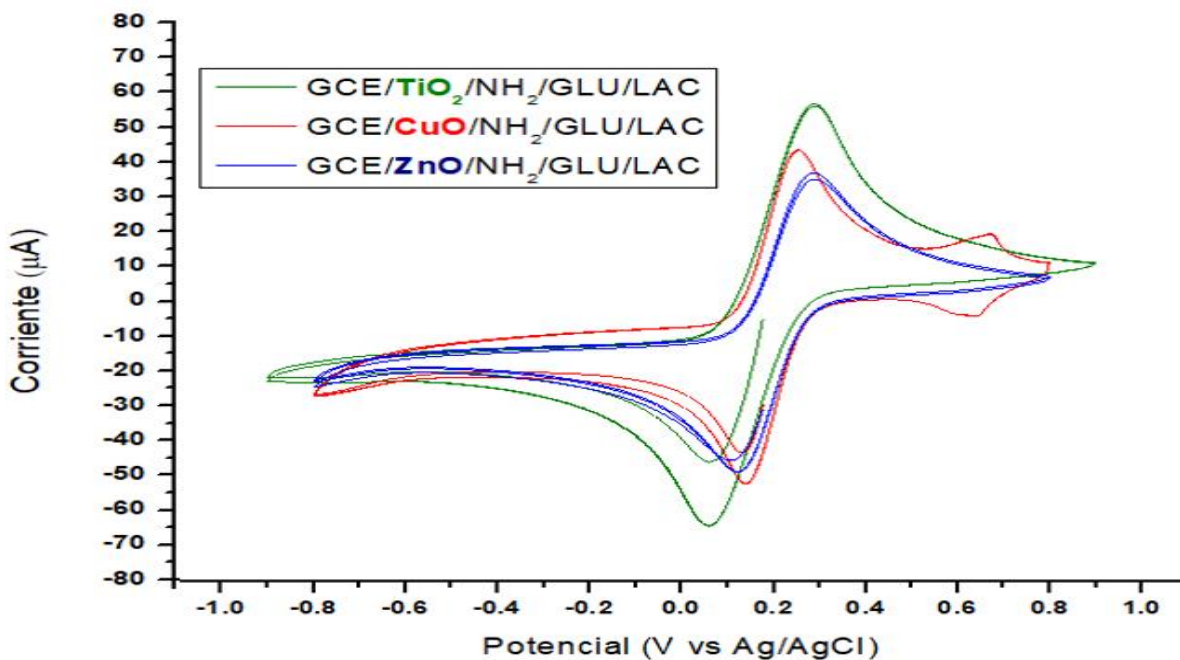


**Figura 26.** Voltamperometría cíclica con los electrodos de GCE/CuO y GCE/CuO/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac en Buffer de Fosfatos a pH 7.5 con 1 mM de ABTS.

Mientras que en la **Figura 27** se aprecia como con GCE/ZnO se presenta un pico de oxidación de 3 mA/cm<sup>2</sup> a 4.29 mA/cm<sup>2</sup> con GCE/ZnO/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac, los picos de reducción pasan de 3.95 mA/cm<sup>2</sup> a 4.27 mA/cm<sup>2</sup>, aun que para este nanomaterial si se presentó una mejora con la lacasa inmovilizada no fue tanta la diferencia en comparación TiO<sub>2</sub> y CuO, esto podría deberse a lo mostrado anteriormente en la **Figura 20** en la que se presenta que ZnO/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac fue el material menos estable.

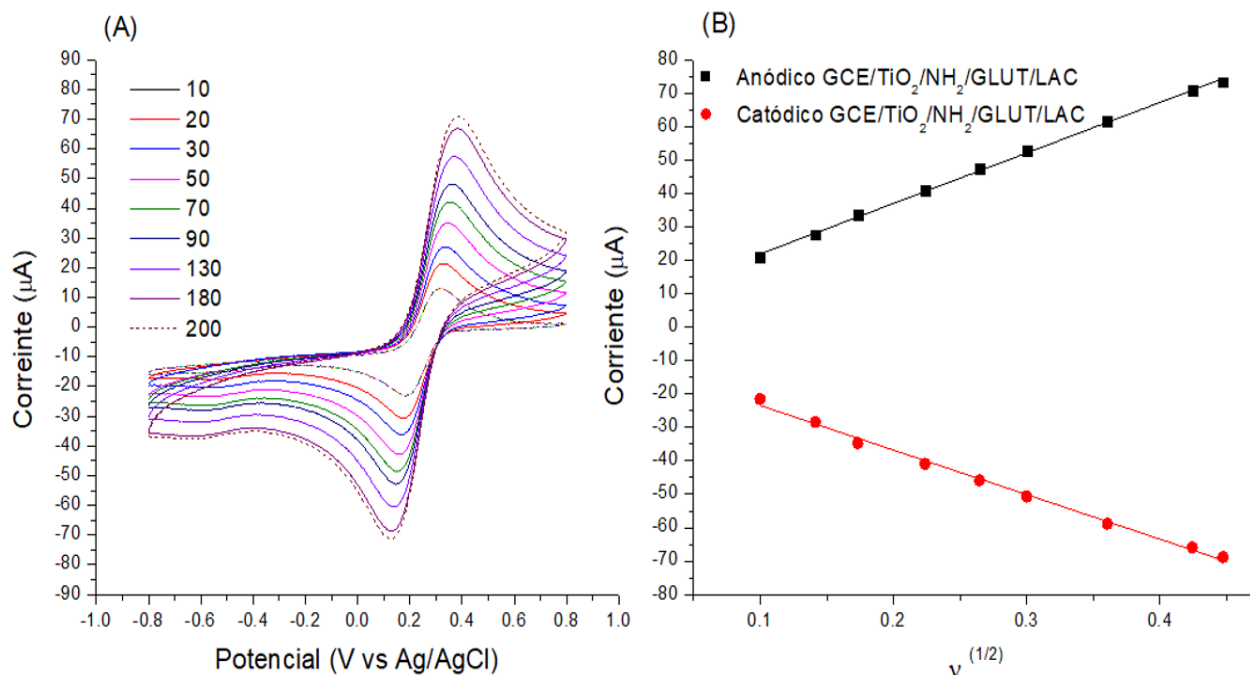


**Figura 27.** Voltamperometría cíclica con los electrodos de GCE/ZnO y GCE/ZnO/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac en Buffer de Fosfatos a pH 7.5 con 1 mM de ABTS.



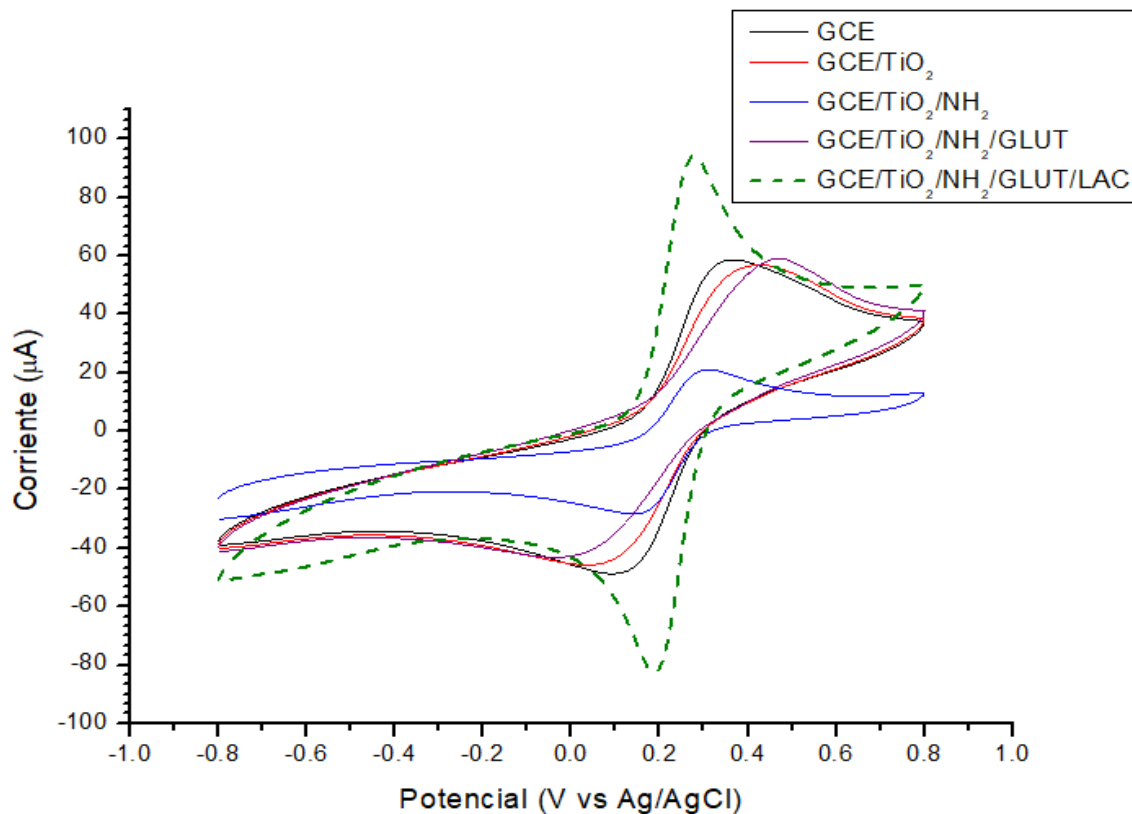
**Figura 28.** Voltamperometría cíclica de los electrodos de GCE/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac, GCE/ZnO/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac y GCE/CuO/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac.

Posteriormente se realizó la comparación de los electrodos de GCE/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac, GCE/ZnO/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac y GCE/CuO/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac, por que aun que todos los materiales presentaron una mejora con la lacasa inmovilizada se aprecia en la **Figura 28** que el mejor material para ser utilizado como bio-catodo en la CEM es el TiO<sub>2</sub>, presentando los mejores potenciales tanto de oxidación como de reducción que para nuestro estudio era el que más nos interesaba.



**Figura 29.** Voltamperogramas cíclicos del electrodo (A) GCE/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac, en solución de KCl 1M + K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 5mM a una velocidad de barrido de 10 a 200 mV/s, y (B) Curva de calibración de la intensidad de corriente en función de la velocidad de barrido

Continuando con la caracterización electroquímica, pero del material de TiO<sub>2</sub>, el número de electrones intercambiados, la reversibilidad o irreversibilidad de una reacción redox y la información sobre la cinética de transferencia de electrones se puede obtener evaluando el efecto de la velocidad de barrido en los picos de oxidación-reducción [127]. Se realizaron pruebas de voltamperometrías cíclicas para el electrodo GCE/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac en un electrolito KCl 1 M + K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub> 5 mM a diferentes velocidades de barrido (**Figura. 29A**). Se observó que las corrientes de oxidación y reducción del par Fe (III)/Fe (II) aumentan con la velocidad de barrido debido a la cinética heterogénea, el análisis de las corrientes de los picos anódicos y catódicos mostró que siguen una relación lineal con la raíz cuadrada de la velocidad de escaneo (**Figura. 29B**), que es consistente con la ecuación de Randles-Sevcik, lo que indica que el proceso está controlado por difusión. Estos resultados manifiestan un comportamiento electroquímico típico controlado por la superficie[133] y muestran que material a base de lacasa muestra una excelente respuesta al ferricianuro.

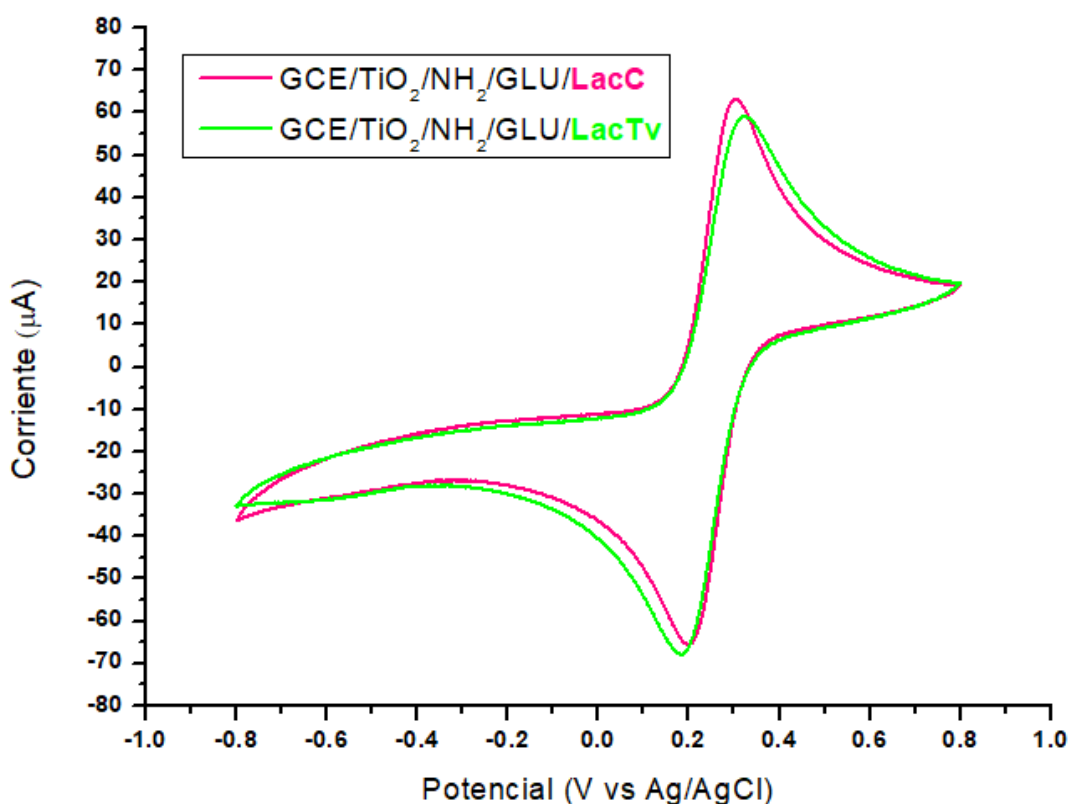


**Figura 30.** Voltamperogramas cíclicos para GCE, GCE/TiO<sub>2</sub>, GCE/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>, GCE/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glut y GCE/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac en KCl 1M + K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 5mM a una velocidad de 90 mV/s

Se utilizó electrolito (electrolito KCl 1 M + K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 5 mM) para determinar el efecto de la modificación de la GCE utilizando una única velocidad para analizar si el tener la lacasa inmovilizada mejora el potencial de oxidación y reducción en la **Figura 31** se muestran los voltamogramas obtenidos para GCE, GCE/TiO<sub>2</sub>, GCE/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/GLUT y GCE/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/GLUT/LAC (cada paso de la inmovilización). Se puede observar que la presencia de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> únicamente no mejora el potencial oxido-reducción en comparación con el de GCE. Sin embargo, la modificación química de TiO<sub>2</sub> más la inmovilización de lacas mejora la respuesta de potencial. La presencia de grupos amino cargados positivamente en la superficie después del tratamiento con APTMS se esperaba que mejoraría la adsorción de [Fe(CN)<sub>6</sub>], pero los resultados sugieren que no mejorar el transporte de electrones, en el caso de

GCE/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub> se presenta un comportamiento cuasi-reversible con cinética de transferencia de electrones lenta (los picos están más separados en comparación con los de la muestra GCE/TiO<sub>2</sub>). El efecto de la funcionalización con GLUT se nota en el

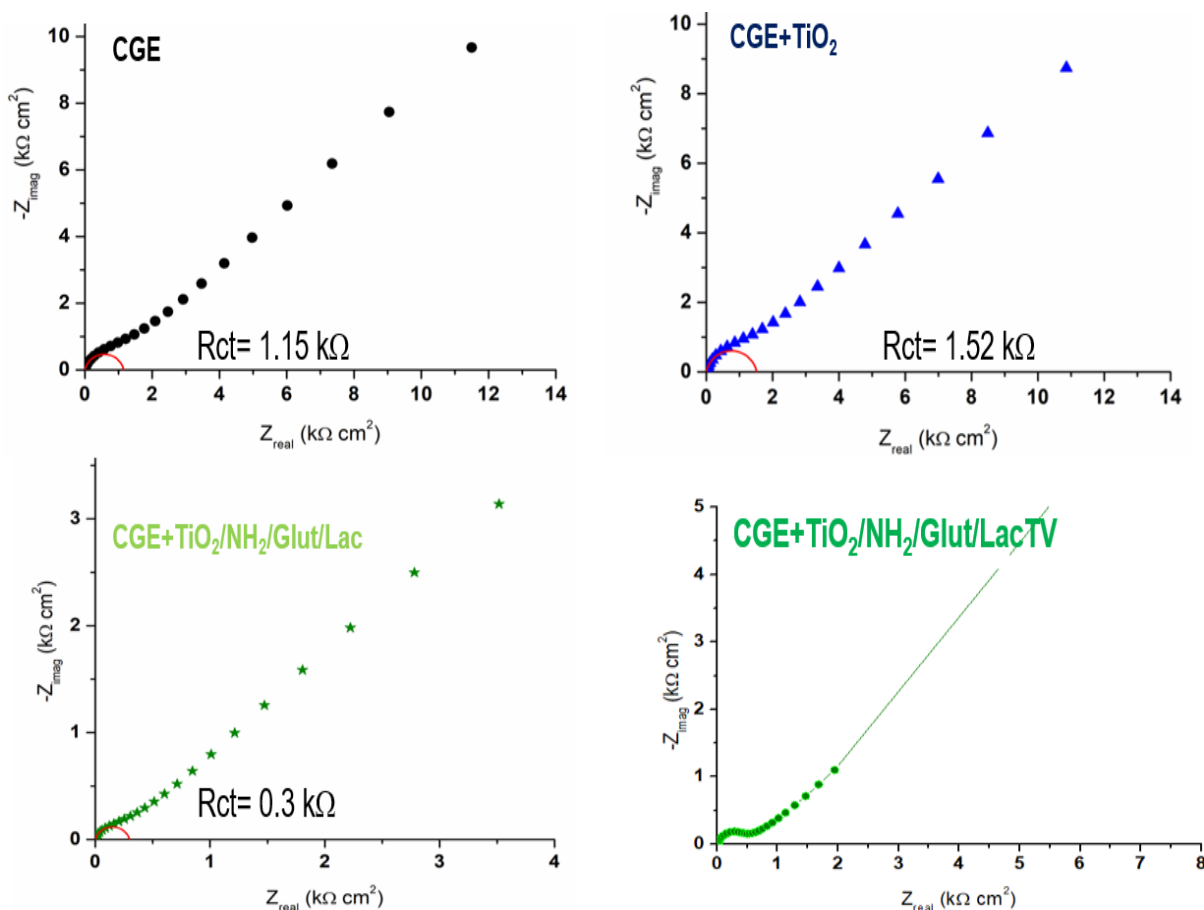
voltamograma (para GCE/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/GLUT) solo como un aumento menor en el pico de corriente anódica, en comparación con GCE/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>. Pero cuando se adiciona la lacasa, el electrodo GCE/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac se asemeja más a un comportamiento de Nernst; la separación de picos disminuye, lo que indica que la barrera a la transferencia de electrones también disminuye. Además, el electrodo GCE/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac presenta un aumento en los picos de corriente de oxidación y reducción, lo que demuestra que lacasa inmovilizada en TiO<sub>2</sub> mejora la actividad electrocatalítica hacia Fe(CN)<sub>6</sub>; esto puede deberse a los centros de cobre activos de lacasa[134].



**Figura 31.** Electrodo de carbono vítreo + TiO<sub>2</sub> + Lacasa Comercial y lacasa del hongo *Trametes versicolor*, en 0.1 M de KCl + 5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> Programa de Barrido: -0.8 V a 0.8 V a una velocidad de 90 mV/S

#### 8.4.2 Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)

También se utilizó la espectroscopia de impedancia electroquímica para investigar el efecto de la modificación del electrodo, en la **Figura 32** (a-c) se muestran los diagramas de Nyquist para los electrodos GCE solo y los dos modificados en una solución de KCl 1M+K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 5 mM. Los diagramas de Nyquist para GCE y GCE/TiO<sub>2</sub> muestra la presencia de un semicírculo capacitivo en el rango de alta frecuencia y una región lineal para datos de baja frecuencia, que es típico para un proceso de transferencia de carga con difusión de reactivos/productos a la interfaz[135].



**Figura 32.** Espectros de impedancia (gráficos de Nyquist) obtenidos para (A) GCE, (B) GCE/TiO<sub>2</sub> y (C) GCE/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac en KCl 1M + K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 5mM.

Los espectros de impedancia para GCE no modificado y modificado fueron modelados por un circuito equivalente de Randles que se presenta en la **Figura 32 (d)**. En tal circuito, R<sub>s</sub> es la resistencia del electrolito, R<sub>ct</sub> es la resistencia de transferencia de carga, Q los parámetros n están asociados con un elemento de fase constante (CPE). Los parámetros de ajuste óptimos para todos los espectros de impedancia analizados son presentados en la **Tabla 7**. Donde Q representa una pseudo-capacitancia, se

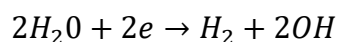
aprecia que el valor de los electrodos aumenta ligeramente. Para el GCE, el valor de  $R_{ct}$  es  $1,5 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ , que disminuye ligeramente en la presencia de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ . Este resultado corresponde a lo obtenido en la **Figura 32**, que la cinética del proceso redox es muy similar para los electrodos GCE y GCE/ $\text{TiO}_2$  siendo este un material semiconductor. Sin embargo, la presencia de la lacasa conduce a una drástica disminución del valor  $R_{ct}$ . Este hallazgo es un resultado muy importante porque indica que la velocidad de transferencia de electrones aumenta considerablemente en presencia de la lacasa, la magnitud de la impedancia para el electrodo de  $\text{TiO}_2/\text{NH}_2/\text{Glut}/\text{Lac}$  es más pequeño que el correspondiente a los electrodos GCE y GCE/ $\text{TiO}_2$ . En consecuencia, como se muestra en la **Tabla 7**, el coeficiente de Warburg presenta un valor inferior al obtenido para el electrodo GCE/ $\text{TiO}_2$

**Tabla 7.** Parámetros del análisis de circuito equivalente de los resultados de EIS.

Parámetros	GCE	GCE/ $\text{TiO}_2$	GCE/ $\text{TiO}_2/\text{NH}_2/\text{Glut}/\text{Lac}$
$R_s$ (W $\text{cm}^2$ )	1.24	1.24	1.15
$Y_o$ ( $\text{mF cm}^{-2} \text{ s}_{(-1-n)}$ )	23.47	30.85	51.12
n	0.87	0.87	0.85
$R_{ct}$ ( $\text{KW cm}^2$ )	1.50	1.30	0.30
S ( $\text{KW cm}^2 \text{ s}^{-1/2}$ )	2.50	2.20	0.79

#### 8.4.3 Voltametría de barrido lineal

Evaluar la cinética de la tasa de evolución de hidrógeno (HER) usando el electrodo basado en lacasa, mediciones de LSV (utilizando una velocidad de exploración de  $20 \text{ mV/s}$ ) se llevaron a cabo en un electrolito de tampón de fosfato  $100 \text{ mM}$  con  $0.1 \text{ M}$  de  $\text{KCl}$  a  $\text{pH } 7$ . A este  $\text{pH}$ , se produce hidrógeno a través de la reducción del agua[136]:

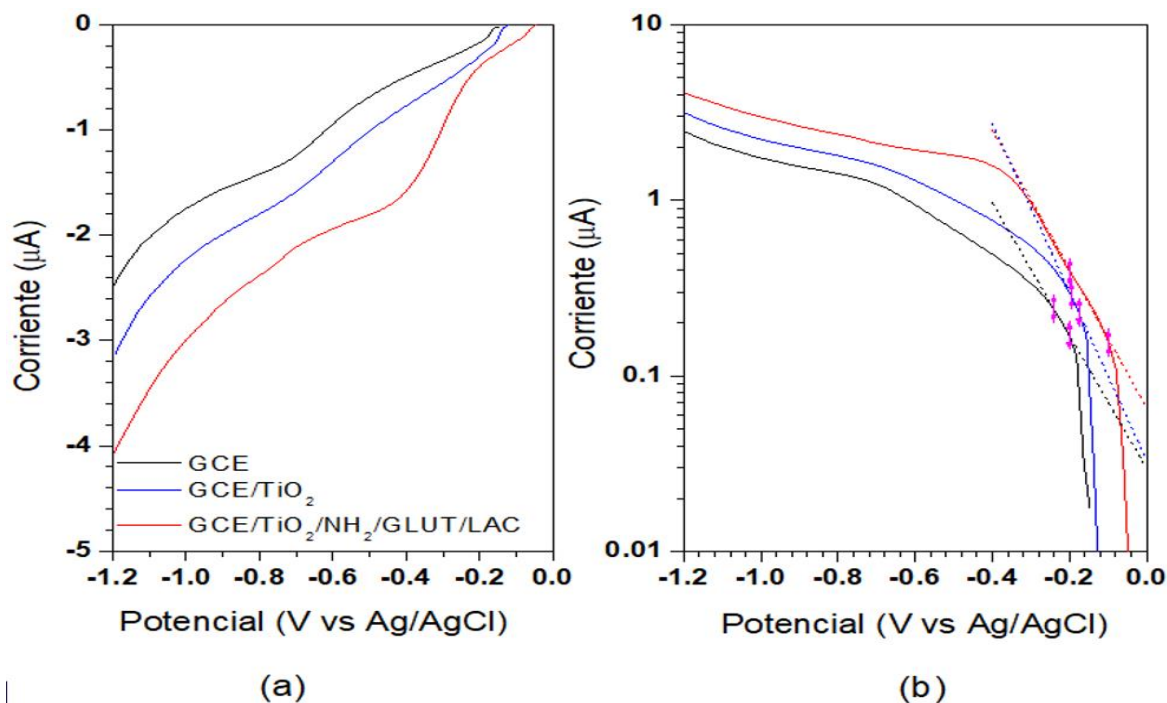


Las curvas de polarización que se presentan en la **Figura 33 (a)** muestran que con la modificación de GCE, el sobrepotencial disminuye y la corriente catódica aumenta.

a un potencial de  $-1 \text{ V}$  frente a  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ , la corriente catódica en el electrodo GCE/ $\text{TiO}_2/\text{NH}_2/\text{GLUT}/\text{LAC}$  es aproximadamente del electrodo de GCE. Estos resultados muestran una alta actividad electrocatalítica del electrodo a base de lacasa para realizar



HER. El análisis de Tafel presentado en la **Figura 33(b)** muestra que, para los electrodos modificados, las pendientes de Tafel disminuyen ( $-197$  mV/dec para GCE,  $-174$  mV/dec para GCE/TiO<sub>2</sub>, y  $-152$  mV/dec para GCE/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/GLUT/LAC). Cuanto menor sea la pendiente, menor es el sobrepotencial necesario para alcanzar la misma corriente.

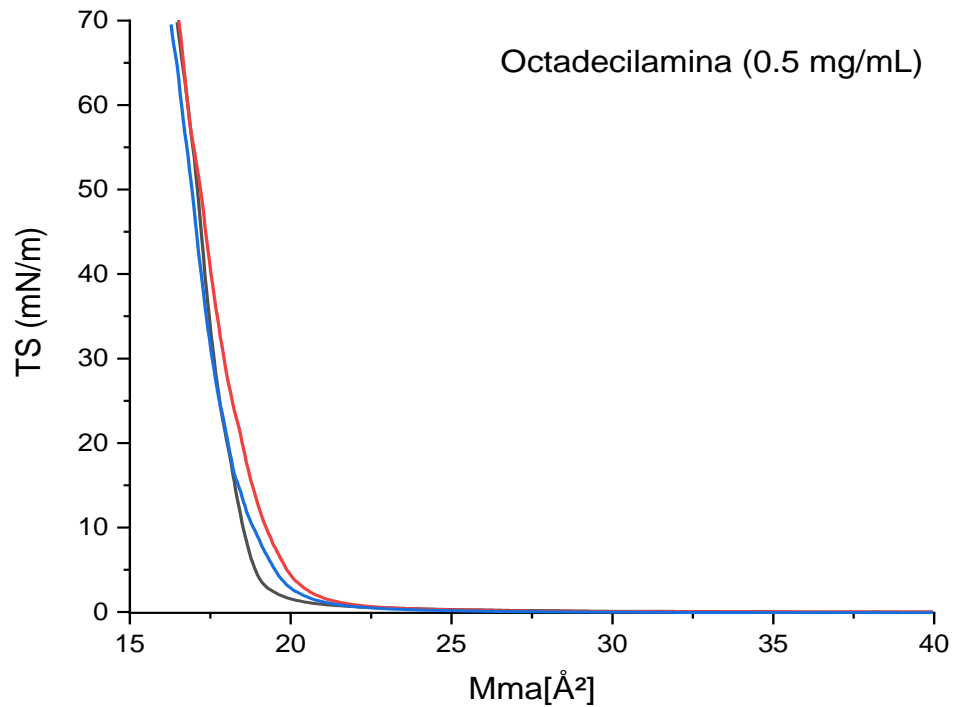


**Figura 33.** Curvas de polarización catódica para GCE, GCE/TiO<sub>2</sub> y GCE/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glut/Lac (a), pendientes de Tafel en Buffer de fosfato 100 mM con KCl 0.1 M y pH 7 (b).

Recordando que bajos sobrepotenciales y alta estabilidad son requerido para la evolución de hidrógeno[137]. Se demuestra con los resultados obtenidos que lacasa inmovilizada en TiO<sub>2</sub> puede funcionar como bio-catodo en una celda de electrólisis microbiana.

### 8.5 Isotherma de octadecilamina y coeficiente de transferencia de monocapas

La isoterma obtenida se muestra en la **Figura 34**, en la cual, se puede observar que la fase líquido-condensado es la fase característica en la formación de la isoterma, cosa que comparado con investigaciones previas realizadas por Albretch. *et al.*, en 2006.<sup>54</sup>



**Figura 34.** Isotherma de ODA en agua ultrapura

Los valores de coeficiente de transferencia de deposición de monocapas de octadecilamina sobre el vidrio ITO se muestran en la **Tabla 8**. Los valores de coeficiente rondan un valor de 1, siendo esto, adecuado ya que se considera una correcta deposición cuando el coeficiente se aproxima a el valor de 1[138].

**Tabla 8.** Coeficiente de transferencia en la deposición de ODA sobre vidrio ITO

Monocapa	Coeficiente de Transferencia
1	.804
2	1.191
3	1.029
4	1.139
5	0.997
6	1.076
7	0.982

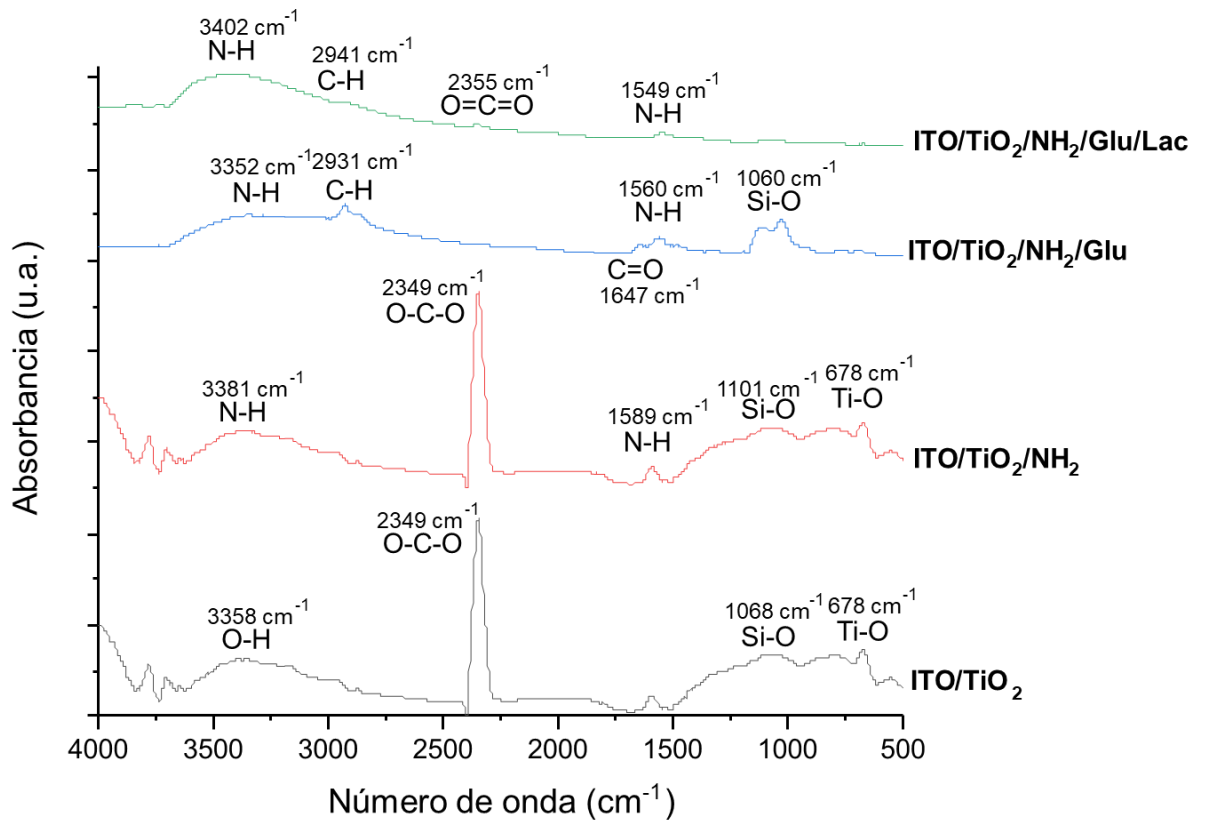
### 8.5.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia difusa

Se consiguieron espectros de DRIFTS para examinar las modificaciones en vidrios ITO/TiO<sub>2</sub>, ITO/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>, ITO/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glu e ITO/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glu/Lac cada uno de estos casos mostró bandas características relacionadas con las respectivas modificaciones.

Para el espectro del vidrio ITO/TiO<sub>2</sub>, que se muestra en la **Figura 35**, se aprecia la vibración de tensión O-H a 3359 cm<sup>-1</sup>, la cual puede deberse a la absorción de la humedad presente en el ambiente antes del análisis, la vibración de tensión O=C=O a 2348 cm<sup>-1</sup>, se genera mediante el proceso de calcinación de las capas de octadecilamina, en este proceso, varios átomos de carbono quedan retenidos en el interior de las capas de dióxido de titanio y experimentan una transformación para convertirse en dióxido de carbono, la banda de flexión de O-H a 1588 cm<sup>-1</sup> tensión del enlace Si-O a 1100<sup>-1</sup>, que proviene del vidrio mismo, la tensión del enlace Ti-O a 677 cm<sup>-1</sup>, que es característica del dióxido de titanio a comparación de estos resultados con la literatura respalda la identificación de las bandas características y las modificaciones observadas en el vidrio ITO/TiO<sub>2</sub>[139].

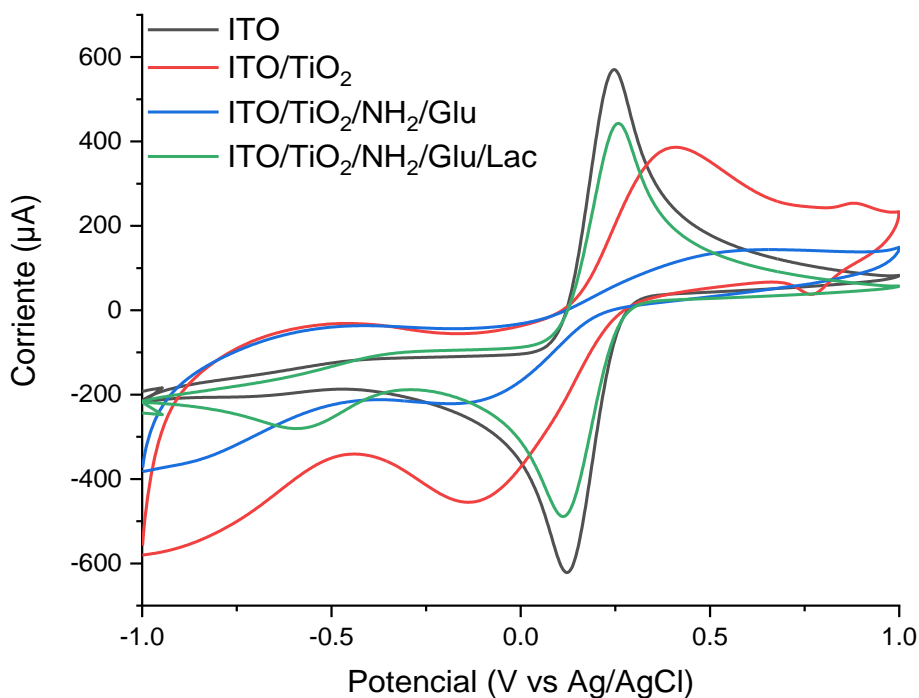
El espectro correspondiente al vidrio ITO/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub> exhibió bandas de absorción que se localizan en una posición parecida a las del vidrio ITO/TiO<sub>2</sub>, No obstante, se observó un cambio importante en la banda de O-H, que se transforma en una banda de tensión de N-H a 3376 cm<sup>-1</sup>. Este cambio se debe a que este vidrio se encontraba en un horno de vacío durante el análisis, Además de esta modificación, se identificó otra banda de flexión de N-H a 1587 cm<sup>-1</sup>, la banda de tensión Si-O a 1102 cm<sup>-1</sup>, que proviene del vidrio mismo, mostró una definición más clara y se sugiere que procede del APTMS, el cual forma enlaces en la superficie del dióxido de titanio[140]. En el caso de ITO/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glu se detectó la presencia de la vibración de tensión de C-H de alcanos, que se origina a partir del glutaraldehído, a 2931 cm<sup>-1</sup>. Además, se observaron la tensión del enlace C=N a 1647 cm<sup>-1</sup>, la tensión del enlace C=O a 1485 cm<sup>-1</sup> y la flexión del enlace C-H a 1388 cm<sup>-1</sup>. Estas mismas bandas de absorción fueron previamente identificadas[140].

Finalmente, la inmovilización de la enzima lacasa condujo a cambios significativos en el espectro. Se observó un aumento en la cantidad de bandas de tensión de N-H a 3423  $\text{cm}^{-1}$ . La banda de tensión originada por el dióxido de carbono volvió a aparecer a 2347  $\text{cm}^{-1}$ . Además, se notó una disminución considerable en la intensidad de las vibraciones de tensión y flexión para los enlaces C=N , C-H, las vibraciones de tensión de los enlaces Si-O y Ti-O también disminuyeron, lo cual sugiere que estos compuestos quedaron en las capas inferiores de la modificación del vidrio ITO como resultado de la inmovilización de la enzima lacasa.[139].



**Figura 35.** Espectro de DRIFTS para las distintas modificaciones de los vidrios ITO

## 8.5.2 Voltamperometría Cíclica

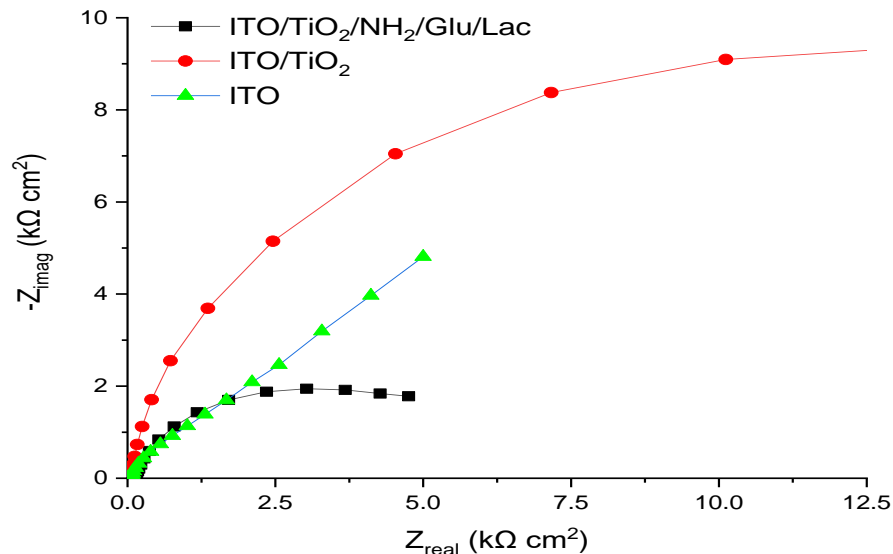


**Figura 36.** Voltamperograma de las distintas modificaciones del vidrio ITO.

En la **Figura 36** se presenta el comportamiento electroquímico del vidrio ITO así como sus modificaciones ITO/TiO<sub>2</sub>, ITO/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glu e ITO/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glu/Lac se utiliza como solución electrolítica de KCl 1M+K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 5mM en el rango de -0.8 a 0.8V en comparación con el electrodo estándar plata cloruro de plata a una velocidad de barrido de 100 mV/s para todos los experimentos , esto para corroborar que cuando la lacasa esta inmovilizada mejora el potencias de oxido reducción del vidrio ITO, sin embargo al ser el vidrio ITO un material conductor (se preparan recubriendo por pulverización catódica una fina capa conductora de óxido de indio y estaño sobre un sustrato de vidrio de alta calidad) podemos apreciar que es mejor la respuesta que presenta frente al par ferro-ferri cianuro, que la que presenta con las modificaciones, en su voltamperograma se observa un pico redox reversible caracterizado por una separación pico a pico ( $\Delta E_p$ ) de aproximadamente 60 mV, lo cual concuerda con los datos previamente reportados en la literatura[141] y caracteriza una reacción redox reversible controlada por la difusión ideal en el sustrato ITO, mientras que para la lacasa se presenta un comportamiento similar pero un potencias de oxi-reducción menor.

### 8.5.3 Espectroscopia de impedancia electrónica

Para continuar con la caracterización electroquímica del vidrio ITO, ITO/TiO<sub>2</sub>, e ITO/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glu/Lac se realizó la técnica de EIS para examinar qué tan eficiente fue la transferencia de electrones en estos electrodos y se registraron espectros de impedancia **Figura 37**, analizando la forma del diagrama de Nyquist del vidrio ITO podemos apreciar que su resistencia de transferencia de carga es baja se registró un comportamiento casi una línea, indicando el paso libre de iones debido a que la superficie del electrodo se encuentra limpia y sin ningún recubrimiento en la superficie[142]. Si se compara con las representaciones gráficas ITO/TiO<sub>2</sub>, e ITO/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glu/Lac Podemos observar comportamientos distintos al examinar la formación de semicírculos, los cuales están relacionados con la resistencia a la transferencia de carga, que a su vez está vinculada con la superficie y la conductividad eléctrica [143]. En el caso del ITO/TiO<sub>2</sub>, se evidencia la formación de un semicírculo. En cuanto al vidrio ITO/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Glu/Lac, también se nota la formación de un semicírculo, aunque de un tamaño considerablemente menor en comparación con el ITO/TiO<sub>2</sub>. Esto sugiere que la resistencia a la transferencia es menor en este caso, lo que indica una mayor eficiencia en la transferencia de electrones en este vidrio[144]. Esto resulta especialmente significativo, ya que se esperaba que la inmovilización de la lacasa mejorara la transferencia de electrones.



**Figura 37.** Diagrama de Nyquist de las distintas modificaciones del vidrio ITO KCl 1M + K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 5mM.

Membrana de intercambio protónico Nafion® 117

- Carbón granular con AQ empacado en bolsas de malla de acero inoxidable como colector
- Inoculo de lodo con un voltaje de -200 mV y -267 mV



- Electrodo de Vidrio ITO/ TiO<sub>2</sub>
- ITO/TiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/Lac



**ÁNODO**

80 mL Medio enriquecido con Acetato

**CÁTODO**

80 mL Buffer de fosfato pH 7 a 100 mM

**Figura 87.** Montaje y configuración de la celda de electrólisis microbiana

## 9. CONCLUSIONES

1. Se produjo un extracto enzimático extracelular rico en lacasas por fermentación sumergida de *Trametes versicolor* nativo usando salvado de trigo como cosustrato, obtenido mayor actividad a lo reportado previamente en la literatura.
2. El extracto enzimático rico en lacasas se purificó obteniendo una fracción con membranas de ultrafiltración entre 50 y 100 kDa. Después de la purificación la enzima se concentró 3.3 veces con respecto al extracto crudo, obteniendo además una banda de proteína única alrededor de los 67 kDa, correspondiente al peso molecular reportado de la lacasa.
3. Se funcionalizaron las nanopartículas metálicas con grupos amino y carbonilo, así como la inmovilización covalente de la enzima en estas nanopartículas funcionalizadas, de acuerdo con los resultados obtenidos por FTIR, SEM, potencial  $\zeta$ , DRX y XPS.
4. El mayor porcentaje de inmovilización de lacasa se obtuvo con las nanopartículas de, sin embargo, la lacasa inmovilizada en  $\text{TiO}_2$  tuvo mejor estabilidad después de 12 meses con ciclos de congelación, así como mejor estabilidad a cambios de temperatura.
5. Los electrodos (cátodos) GCE con nanopartículas metálicas con lacasas inmovilizadas mejoraron los picos de oxidación y reducción de las CVA, indicando que la lacasa inmovilizada en las nanopartículas metálicas mejoran la actividad electrocatalítica.
6. La enzima inmovilizada en  $\text{TiO}_2$  y soportada en GCE mejoró el rendimiento electroquímico, como lo mostró la CVA y el IES, que no se observó cuando solo se modifica el GCE con nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  o  $\text{TiO}_2$  funcionalizado.
7. Las curvas de polarización del GCE modificado con lacasas inmovilizada en nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  aumentaron la corriente catódica y disminuyeron el sobrepotencial, mostrando una alta actividad electrocatalítica que favorece la reacción de evolución del hidrógeno.



8. Se logró la modificación superficial del vidrio ITO utilizando la técnica de LB para la deposición de un precursor de  $\text{TiO}_2$  de acuerdo con lo obtenido en el coeficiente de transferencia.
9. Se funcionalizaron los vidrios ITO/ $\text{TiO}_2$  con grupos amino y carbonilo de acuerdo con los resultados obtenidos por DRIFTS, para posteriormente inmovilizar la enzima lacasa obteniendo un porcentaje de retención de 49%.
10. La enzima inmovilizada en el vidrio ITO/ $\text{TiO}_2$ / $\text{NH}_2$ /Glu, mejora el potencial electroquímico como se demuestra en la CV, EIS.
11. Al comparar los materiales solos y con lacasa inmovilizada con la técnica de EIS la resistencia de transferencia se hace más pequeña lo que indica la velocidad de transferencia de electrones aumenta, aceptando la hipótesis del proyecto

## **10 . DISPOSICIÓN DE LOS RESIDUOS GENERADOS**

Los residuos generados en el presente trabajo serán dispuestos en los contenedores asignados de acuerdo con lo establecido en el reglamento de los laboratorios y de seguridad y medio ambiente vigente de la Facultad de Ciencias Químicas UANL.

## 11. REFERENCIAS

- [1] D. Das, T.N. Veziroglu, Advances in biological hydrogen production processes, *Int. J. Hydrogen Energy*. 33 (2008) 6046–6057. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.098>.
- [2] A. Almatouq, A.O. Babatunde, M. Khajah, G. Webster, M. Alfodari, Microbial community structure of anode electrodes in microbial fuel cells and microbial electrolysis cells, *J. Water Process Eng.* 34 (2020) 101140. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101140>.
- [3] M.V. and ´ Serve W.M. Kengen, Heleen P. Goorissen, A.J.M. Stams, Biological Hydrogen Production by Anaerobic Microorganisms, *Biotechnology*. 97 (2007) 2006–2008.
- [4] I.D. Swain, Bioengineering aspects of biophotolysis, *Physiother. Theory Pract.* 7 (1991) 257.
- [5] S.W. Guyton, D.L. Paull, R.P. Anderson, Biophotolysis-based Hydrogen Production by Cyanobacteria and Green Microalgae, *Am. J. Surg.* 163 (2007) 497–501. [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(92\)90396-9](https://doi.org/10.1016/0002-9610(92)90396-9).
- [6] P. Sathyaprakasan, G. Kannan, Economics of Bio-Hydrogen Production, *Int. J. Environ. Sci. Dev.* 6 (2015) 352–356. <https://doi.org/10.7763/ijesd.2015.v6.617>.
- [7] P.C. Moreno, Desarrollo de un proceso de producción fotofermentativa de hidrógeno a partir de suero de leche, *Communauté Université de Grenoble Alpes*, 2018.
- [8] A. Adessi, R. De Philippis, Hydrogen Production : Photofermentation, *Microb. Technol. Adv. Biofuels Prod.* (2011). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1208-3>.
- [9] A. Djalma, N. Ferraz-junior, C. Andreani, S. Damasceno, S.I. Maintinguer, E. Tapiavenegas, I. Valdez-vazquez, A. Vesga-baron, M. Zaiat, Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions, *Renew. Sustain. Energy Rev.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109602>.
- [10] Ł. Rafa, I. Ho, K. Kucharska, M. Glinka, P. Rybarczyk, Hydrogen production from biomass using dark fermentation, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 91 (2018) 665–694. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>.
- [11] D. Liang, W. He, C. Li, F. Wang, J.C. Crittenden, Y. Feng, Remediation of nitrate contamination by membrane hydrogenotrophic denitrifying biofilm integrated in microbial electrolysis cell, *Water Res.* 188 (2021) 116498. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116498>.
- [12] A.W. Jeremiasse, H.V.M. Hamelers, C.J.N. Buisman, Microbial electrolysis cell with a microbial biocathode, *Bioelectrochemistry*. 78 (2010) 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.05.005>.
- [13] R. Pliego-Arreaga, C. Regalado, A. Amaro-Reyes, B.E. García-Almendárez, Assessment of microbial electrolysis cells fed hydrolysate from agave bassase to determine the feasibility of bioelectrohydrogen production, *Rev. Mex. Ing. Química*. 12 (2013) 505–511. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62029966013>.
- [14] I. Dincer, C. Acar, Review and evaluation of hydrogen production methods for better sustainability, *Int. J. Hydrogen Energy*. 40 (2014) 11094–11111. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.12.035>.
- [15] M. Aguilar-González, G. Buitrón, A. Shimada-Miyasaka, O. Mora-Izaguirre, State of the art of bioelectrochemical systems: feasibility for enhancing rumen propionate production, *Agrociencia*. 50 (2016) 149–166.

- [16] D.M. Revelo, N.H. Hurtado, J.O. Ruiz, Celdas de combustible microbianas (CCMs): Un reto para la remoción de materia orgánica y la generación de energía eléctrica, *Inf. Tecnol.* 24 (2013) 17–28. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000600004>.
- [17] A. Mora Collazos, E. Bravo Montañó, Bacterial Diversity Associated with Anodic Biofilms in Microbial Fuel Cells Fed with Wastewater, *Acta Biol. Colomb.* 22 (2017) 77–84. <https://doi.org/10.15446/abc.v22n1.55766>.
- [18] Y. Xin, B. Sun, X. Zhu, Z. Yan, X. Zhao, X. Sun, Hydrogen production from ethanol decomposition by pulsed discharge with needle-net configurations, *Appl. Energy.* 206 (2017) 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.08.055>.
- [19] M.M. Moshrefi, F. Rashidi, Hydrogen Production from Methane Decomposition in Cold Plasma Reactor with Rotating Electrodes, *Plasma Chem. Plasma Process.* (2018). <https://doi.org/10.1007/s11090-018-9875-5>.
- [20] D. Sanz, J. Marug, J.A. Botas, H<sub>2</sub> production by thermochemical water splitting with reticulated porous structures of ceria-based mixed oxide materials, *J. Hydrog. Energy.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.04.222>.
- [21] P. Parthasarathy, K.S. Narayanan, Hydrogen production from steam gasification of biomass: Influence of process parameters on hydrogen yield: A review, *Renew. Energy.* 66 (2014) 570–579. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2013.12.025>.
- [22] B. Dou, H. Zhang, Y. Song, L. Zhao, B. Jiang, M. He, Sustainable Energy & Fuels Hydrogen production from the thermochemical conversion of biomass: issues and challenges, *Sustainable Energy & Fuels.* (2018). <https://doi.org/10.1039/c8se00535d>.
- [23] E. Shayan, V. Zare, I. Mirzaee, Hydrogen production from biomass gasification; a theoretical comparison of using different gasification agents, *Energy Convers. Manag.* 159 (2018) 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.12.096>.
- [24] D. Yao, Q. Hu, D. Wang, H. Yang, C. Wu, H. Chen, Hydrogen production from biomass gasification using biochar as a catalyst/support, *Bioresour. Technol.* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.011>.
- [25] F.B. Bendixen, W.L. Eriksen, K. Aasberg-petersen, C. Frandsen, I. Chorkendorff, P.M. Mortensen, Electrified methane reforming: A compact approach to greener industrial hydrogen production, *Science (80- )*. 759 (2019) 756–759.
- [26] Z. Zhu, C. Kao, B. Tang, W. Chang, R. Wu, Efficient hydrogen production by photocatalytic water-splitting using Pt-doped TiO<sub>2</sub> hollow spheres under visible light, *Ceram. Int.* (2016) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.01.047>.
- [27] M. Tayebi, B.K. Lee, Recent advances in BiVO<sub>4</sub> semiconductor materials for hydrogen production using photoelectrochemical water splitting, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 111 (2019) 332–343. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.05.030>.
- [28] L. Zhang, Y.Z. Wang, T. Zhao, T. Xu, Hydrogen production from simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic materials in a dual-chamber microbial electrolysis cell, *Int. J. Hydrogen Energy.* 44 (2019) 30024–30030. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.09.191>.
- [29] A.K. Sista Kameshwar, W. Qin, Comparative study of genome-wide plant biomass-degrading CAZymes in white rot, brown rot and soft rot fungi, *Mycology.* 9 (2018) 93–105. <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1419296>.
- [30] A. Mehmeti, A. Angelis-Dimakis, C.B. Muñoz, M. Graziadio, S.J. McPhail, Eco-thermodynamics of hydrogen production by high-temperature electrolysis using solid oxide cells, *J. Clean. Prod.* 199 (2018) 723–736. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.07.166>.
- [31] F. Khalid, Y. Bicer, High temperature electrolysis of hydrogen bromide gas for hydrogen production using solid oxide membrane electrolyzer, *Int. J. Hydrogen Energy.* 45 (2020) 5629–5635. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.01.293>.

- [32] D. Nagarajan, D.J. Lee, A. Kondo, J.S. Chang, Recent insights into biohydrogen production by microalgae – From biophotolysis to dark fermentation, *Bioresour. Technol.* 227 (2017) 373–387. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.104>.
- [33] G. Buitrón, J. Carrillo-Reyes, M. Morales, C. Faraloni, G. Torzillo, Biohydrogen production from microalgae, *Microalgae-Based Biofuels Bioprod. From Feed. Cultiv. to End-Products.* (2017) 209–234. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00009-1>.
- [34] J.K. Sheu, P.H. Liao, T.C. Huang, K.J. Chiang, W.C. Lai, M.L. Lee, InGaN-based epitaxial films as photoelectrodes for hydrogen generation through water photoelectrolysis and CO<sub>2</sub> reduction to formic acid, *Sol. Energy Mater. Sol. Cells.* 166 (2017) 86–90. <https://doi.org/10.1016/j.solmat.2017.03.014>.
- [35] Y. Lu, J. Koo, O<sub>2</sub> sensitivity and H<sub>2</sub> production activity of hydrogenases—A review, *Biotechnol. Bioeng.* 116 (2019) 3124–3135. <https://doi.org/10.1002/bit.27136>.
- [36] D. Das, T.N. Veziroğlu, Hydrogen production by biological processes: A survey of literature, *Int. J. Hydrogen Energy.* 26 (2001) 13–28. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(00\)00058-6](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(00)00058-6).
- [37] I. Harun, J.M. Jahim, N. Anuar, O. Hassan, Hydrogen production performance by *Enterobacter cloacae* KBH3 isolated from termite guts, *Int. J. Hydrogen Energy.* 37 (2012) 15052–15061. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.07.101>.
- [38] Y. Sun, J. He, G. Yang, G. Sun, V. Sage, A review of the enhancement of biohydrogen generation by chemicals addition, *Catalysts.* 9 (2019). <https://doi.org/10.3390/catal9040353>.
- [39] M.M. Atilano-Camino, C.D. Luévano-Montaña, A. García-González, D.S. Olivo-Alanis, L.H. Álvarez-Valencia, R.B. García-Reyes, Evaluation of dissolved and immobilized redox mediators on dark fermentation: Driving to hydrogen or solventogenic pathway, *Bioresour. Technol.* 317 (2020) 123981. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123981>.
- [40] X. Liu, D. He, Y. Wu, Q. Xu, D. Wang, Q. Yang, Y. Liu, B.J. Ni, Q. Wang, X. Li, Freezing in the presence of nitrite pretreatment enhances hydrogen production from dark fermentation of waste activated sludge, *J. Clean. Prod.* 248 (2020) 119305. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119305>.
- [41] M. Mohokum, J. Dördelmann, *Enzymes and Microorganisms for Biohydrogen Production*, (2014) 106–116.
- [42] N. Srivastava, M. Srivastava, D. Kushwaha, V.K. Gupta, A. Manikanta, P.W. Ramteke, P.K. Mishra, Efficient dark fermentative hydrogen production from enzyme hydrolyzed rice straw by *Clostridium pasteurianum* ( MTCC116 ), *Bioresour. Technol.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.077>.
- [43] V.L. Pachapur, P. Kutty, P. Pachapur, S.K. Brar, Y. Le Bihan, R. Galvez-Cloutier, G. Buelna, Seed pretreatment for increased hydrogen production using mixed-culture systems with advantages over pure-culture systems, *Energies.* 12 (2019) 1–26. <https://doi.org/10.3390/en12030530>.
- [44] R. Kumar, L. Singh, A.W. Zularisam, Exoelectrogens: Recent advances in molecular drivers involved in extracellular electron transfer and strategies used to improve it for microbial fuel cell applications, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 56 (2016) 1322–1336. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.029>.
- [45] L.H. Alvarez, Y.A. Del Angel, B. García-Reyes, Improved Microbial and Chemical Reduction of Direct Blue 71 Using Anthraquinone-2,6-disulfonate Immobilized on Granular Activated Carbon, *Water, Air, Soil Pollut.* 228 (2017) 38. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3212-5>.
- [46] B. Santos, F.J. Cervantes, J.B. Van Lier, Review paper on current technologies for

- decolourisation of textile wastewaters : Perspectives for anaerobic biotechnology, 98 (2007) 2369–2385. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.013>.
- [47] G.J. León-garcía, E. Razo-flores, F.J. Cervantes, Propiedades catalíticas del humus y su potencial aplicación en la degradación de contaminantes prioritarios, *Rev. Latinoam. Recur. Nat.* 3 (2007) 118–128.
- [48] F.P. Van Der Zee, R.H.M. Bouwman, D.P.B.T.B. Strik, G. Lettinga, J.A. Field, Application of redox mediators to accelerate the transformation of reactive Azo dyes in anaerobic bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 691–701. <https://doi.org/10.1002/bit.10073>.
- [49] C.G. Martínez Cobos, Aplicación de mediadores redox solubles e inmovilizados para incrementar la producción de hidrógeno por *Clostridium beijerinckii*, Universidad Autónoma de Nuevo León, 2016.
- [50] C. Paz Mireles, Efecto de la composición de mezclas de metabolitos procedentes de la fermentación oscura para su uso en la producción de biohidrógeno en celdas de electrólisis microbiana, Instituto potosino de investigación científica y tecnológica, 2016.
- [51] A. Kadier, Y. Simayi, M.S. Kalil, P. Abdeshahian, A.A. Hamid, A review of the substrates used in microbial electrolysis cells (MECs) for producing sustainable and clean hydrogen gas, *Renew. Energy.* 71 (2014) 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.05.052>.
- [52] B. Ghasemi, S. Yaghmaei, K. Abdi, M.M. Mardanpour, S.A. Haddadi, Introducing an affordable catalyst for biohydrogen production in microbial electrolysis cells, *J. Biosci. Bioeng.* 129 (2020) 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.07.001>.
- [53] J.Y.Y. Lee, K. Elouarzaki, H.S. Sabharwal, A.C. Fisher, J.M. Lee, A hydrogen/oxygen hybrid biofuel cell comprising an electrocatalytically active nanoflower/laccase-based biocathode, *Catal. Sci. Technol.* 10 (2020) 6235–6243. <https://doi.org/10.1039/d0cy00675k>.
- [54] L. Munk, M.L. Andersen, A.S. Meyer, Influence of mediators on laccase catalyzed radical formation in lignin, *Enzyme Microb. Technol.* 116 (2018) 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.05.009>.
- [55] P. Mani, V.T. Fidal, T. Keshavarz, T.S. Chandra, G. Kyazze, Laccase Immobilization Strategies for Application as a Cathode Catalyst in Microbial Fuel Cells for Azo Dye Decolourization, *Front. Microbiol.* 11 (2021) 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.620075>.
- [56] J.H. Coelho, A.P.P. Eisele, C.F. Valezi, G.J. Mattos, J.G. Schirmann, R.F.H. Dekker, A.M. Barbosa-Dekker, E.R. Sartori, Exploring the exocellular fungal biopolymer botryosphaeran for laccase-biosensor architecture and application to determine dopamine and spironolactone, *Talanta.* 204 (2019) 475–483. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.06.033>.
- [57] H. Luo, G. Liu, R. Zhang, Y. Bai, S. Fu, Y. Hou, Heavy metal recovery combined with H<sub>2</sub> production from artificial acid mine drainage using the microbial electrolysis cell, *J. Hazard. Mater.* 270 (2014) 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.01.050>.
- [58] R. Rousseau, L. Etcheverry, E. Roubaud, R. Basséguy, M.L. Délia, A. Bergel, Microbial electrolysis cell (MEC): Strengths, weaknesses and research needs from electrochemical engineering standpoint, *Appl. Energy.* 257 (2020) 113938. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2019.113938>.
- [59] M. Ge, J. Cai, J. Iocozzia, C. Cao, J. Huang, X. Zhang, J. Shen, S. Wang, S. Zhang, K.Q. Zhang, Y. Lai, Z. Lin, A review of TiO<sub>2</sub> nanostructured catalysts for sustainable H<sub>2</sub> generation, *Int. J. Hydrogen Energy.* 42 (2017) 8418–8449. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.12.052>.

- [60] W. Dong, Y. Yang, C. Liu, J. Zhang, J. Pan, L. Luo, G. Wu, M.K. Awasthi, B. Yan, Caproic acid production from anaerobic fermentation of organic waste - Pathways and microbial perspective, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 175 (2023) 113181. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2023.113181>.
- [61] G. Giraldo, L. Fernando, M. Franco, E. Alejandro, S. Arango, J. Julián, L. Fernando, G. Giraldo, E. Alejandro, M. Franco, J. Julián, S. Arango, La fotocatalisis como alternativa para el tratamiento de aguas residuales, *Rev. Lasallista Investig.* 1 (2004) 83–92.
- [62] S. Li, F. Li, X. Zhu, Q. Liao, J.S. Chang, S.H. Ho, Biohydrogen production from microalgae for environmental sustainability, *Chemosphere.* 291 (2022) 132717. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132717>.
- [63] G. Kumar, S. Shobana, D. Nagarajan, D.J. Lee, K.S. Lee, C.Y. Lin, C.Y. Chen, J.S. Chang, Biomass based hydrogen production by dark fermentation — recent trends and opportunities for greener processes, *Curr. Opin. Biotechnol.* 50 (2018) 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.12.024>.
- [64] T.H.J.A. Sleutels, R. Lodder, H.V.M. Hamelers, C.J.N. Buisman, Improved performance of porous bio-anodes in microbial electrolysis cells by enhancing mass and charge transport, *Int. J. Hydrogen Energy.* 34 (2009) 9655–9661. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.09.089>.
- [65] Q. Zhao, J. An, X. Wang, N. Li, In-situ hydrogen peroxide synthesis with environmental applications in bioelectrochemical systems: A state-of-the-art review, *Int. J. Hydrogen Energy.* 46 (2021) 3204–3219. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.05.227>.
- [66] L. Huang, M. Li, Y. Pan, Y. Shi, X. Quan, G. Li Puma, Efficient W and Mo deposition and separation with simultaneous hydrogen production in stacked bioelectrochemical systems, *Chem. Eng. J.* 327 (2017) 584–596. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.06.149>.
- [67] B.E. Logan, D. Call, S. Cheng, H.V.M. Hamelers, T.H.J.A. Sleutels, A.W. Jeremiasse, R.A. Rozendal, Microbial electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 8630–8640. <https://doi.org/10.1021/es801553z>.
- [68] Y.A. Del Angel, Impacto de un mediador redox inmovilizado en carbón activado durante el tratamiento anaerobio de efluentes agroindustriales para la producción de hidrógeno, Universidad Autonoma de Nuevo León, 2020. <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1120700020921110%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.reuma.2018.06.001%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.arth.2018.03.044%0Ahttps://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1063458420300078?token=C039B8B13922A2079230DC9AF11A333E295FCD8>.
- [69] B. Awate, R.J. Steidl, T. Hamlischer, G. Reguera, Stimulation of electro-fermentation in single-chamber microbial electrolysis cells driven by genetically engineered anode biofilms, *J. Power Sources.* 356 (2017) 510–518. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.02.053>.
- [70] S. Veronica, F. Rodriguez, Identificación de consorcios microbianos en celdas de electrólisis microbiana, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, 2010. <http://www.bvcooperacion.pe/biblioteca/bitstream/123456789/6458/1/BVCI0006652.pdf>.
- [71] W.N. Logroño, M.M. Echeverría, C.G. Recalde, P. Graziani, Bioconversion of organic solid wastes with soils from the Amazonian and high Andean regions of Ecuador in single chamber microbial fuel cells, *Inf. Tecnológica.* 26 (2015) 61–68. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000200008>.

- [72] T.M. Fernandes, L. Morgado, D.L. Turner, C.A. Salgueiro, Protein engineering of electron transfer components from electroactive *Geobacter* bacteria, *Antioxidants*. 10 (2021) 1–25. <https://doi.org/10.3390/antiox10060844>.
- [73] N. Uria, I. Ferrera, J. Mas, Electrochemical performance and microbial community profiles in microbial fuel cells in relation to electron transfer mechanisms, *BMC Microbiol.* (2017) 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1115-2>.
- [74] G. Liu, J. Zhou, C. Chen, J. Wang, R. Jin, H. Lv, Decolorization of azo dyes by *Geobacter metallireducens*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 7935–7942. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4545-7>.
- [75] Z. Fang, H.L. Song, N. Cang, X.N. Li, Performance of microbial fuel cell coupled constructed wetland system for decolorization of azo dye and bioelectricity generation, *Bioresour. Technol.* 144 (2013) 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.073>.
- [76] I. Robles, F. Espejel, Relevant aspects about design of constructed wetlands coupled to bioelectrochemical systems for wastewater treatment and energy generation, *Mex. J. Biotechnol.* (2018). <https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.2.63>.
- [77] L.H. Alvarez, M.A. Perez-cruz, J.R. Rangel-mendez, F.J. Cervantes, Immobilized redox mediator on metal-oxides nanoparticles and its catalytic effect in a reductive decolorization process, *J. Hazard. Mater.* 184 (2010) 268–272. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.08.032>.
- [78] F. Cervantes, J. Pérez, J. Gómez, Avances en la eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales, *Rev. Latinoam. Microbiol.* 42 (2000) 73–82.
- [79] L.H. Alvarez, I.C. Arvizu, R.B. García-Reyes, C.M. Martínez, D. Olivo-Alanis, Y.A. Del Angel, Quinone-functionalized activated carbon improves the reduction of congo red coupled to the removal of p-cresol in a UASB reactor, *J. Hazard. Mater.* 338 (2017) 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.05.032>.
- [80] R. Valdez-Ojeda, M. Aguilar-Espinosa, L. Gómez-Roque, B. Canto-Canché, R.M. Escobedo Gracia-Medrano, J. Domínguez-Maldonado, L. Alzate-Gaviria, Genetic identification of the bioanode and biocathode of a microbial electrolysis cell, *Rev. Mex. Ing. Quim.* 13 (2014) 573–581.
- [81] O. Guadarrama, Caracterización de un sistema híbrido de celda de combustible microbiana productora de hidrógeno-celda de combustible de hidrógeno para la producción de electricidad, Instituto mexicano de tecnología del agua, 2017.
- [82] M. Li, K. Lv, S. Wu, S. Chen, Immobilization of Anodophilic Biofilms for Use in Aerotolerant Bioanodes of Microbial Fuel Cells, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 8 (2016) 34985–34990. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b11064>.
- [83] C.M. Martínez, L.H. Alvarez, Application of redox mediators in bioelectrochemical systems, *Biotechnol. Adv.* 36 (2018) 1412–1423. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.05.005>.
- [84] A.S. Commault, G. Lear, M.A. Packer, R.J. Weld, Influence of anode potentials on selection of *Geobacter* strains in microbial electrolysis cells, *Bioresour. Technol.* 139 (2013) 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.047>.
- [85] A. Kundu, J.N. Sahu, G. Redzwan, M.A. Hashim, An overview of cathode material and catalysts suitable for generating hydrogen in microbial electrolysis cell, *Int. J. Hydrogen Energy.* 38 (2013) 1745–1757. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.11.031>.
- [86] A. Kadier, P. Abdeshahian, Y. Simayi, M. Ismail, A.A. Hamid, M.S. Kalil, Grey relational analysis for comparative assessment of different cathode materials in microbial electrolysis cells, *Energy.* 90 (2015) 1556–1562. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2015.06.108>.

- [87] A. Zuleta-Correa, A. Merino-Restrepo, A. Hormaza-Anaguano, S.A. Cardona Gallo, Use of white rot fungi in the degradation of an azo dye from the textile industry<sup>1</sup>, *Dyna*. 83 (2016) 128. <https://doi.org/10.15446/dyna.v83n198.52923>.
- [88] J.A. Fernández, L.M. Henao, A.M. Pedroza-Rodríguez, B. Quevedo-Hidalgo, Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5, *Rev. Colomb. Biotecnol.* 11 (2009) 59–72.
- [89] Gustavo Dávila y Rafael Vázquez-Duhalt, Enzimas Ligninolíticas Fúngicas Para Fines Ambientales, *Mensaje Bioquímico*. XXX (2006) 29–55. <http://bq.unam.mx/mensajebioquimicoUTH>.
- [90] R. Tapia-Tussell, D. Pérez-Brito, C. Torres-Calzada, A. Cortés-Velázquez, L. Alzate-Gaviria, R. Chablé-Villacís, S. Solís-Pereira, Laccase gene expression and vinasse biodegradation by *Trametes hirsuta* strain Bm-2, *Molecules*. 20 (2015) 15147–15157. <https://doi.org/10.3390/molecules200815147>.
- [91] and A.K. Jasmina Čilerdžić, Mirjana Stajić, \* Jelena Vukojević, Sonja Duletić-Laušević, Potential of *Trametes hirsuta* to produce ligninolytic enzymes during degradation of agricultural residues, *BioResources*. 6 (2011) 2885–2895.
- [92] F. Gassara, S.K. Brar, R.D. Tyagi, R.P. John, M. Verma, J.R. Valero, Parameter optimization for production of ligninolytic enzymes using agro-industrial wastes by response surface method, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 16 (2011) 343–351. <https://doi.org/10.1007/s12257-010-0264-z>.
- [93] F. D'Acunzo, C. Galli, B. Masci, Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems. Solubility and steric issues, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 5330–5335. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03256.x>.
- [94] M. Fernández, Immobilization of laccase: methods and potential industrial applications, Universidade de Vigo, 2013.
- [95] S. Dutta, R. Patil, T. Dey, Electron transfer-driven single and multi-enzyme biofuel cells for self-powering and energy bioscience, *Nano Energy*. 96 (2022) 107074. <https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2022.107074>.
- [96] B. Ghosh, R. Saha, D. Bhattacharya, M. Mukhopadhyay, Laccase and its source of sustainability in an enzymatic biofuel cell, *Bioresour. Technol. Reports*. 6 (2019) 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.03.013>.
- [97] L. Coria, F. Battaglini, I. Co-directora, S. Wirth, Biocátodos basados en ensamblados de polielectrolitos electroactivos con lacasas, 2021.
- [98] M. Bilal, S.S. Ashraf, J. Cui, W.Y. Lou, M. Franco, S.I. Mulla, H.M.N. Iqbal, Harnessing the biocatalytic attributes and applied perspectives of nanoengineered laccases—A review, *Int. J. Biol. Macromol.* 166 (2021) 352–373. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.195>.
- [99] R. Gonzalo, T. Sáez, I. Colombiano, Producción de enzimas ligninolíticas por Basidiomycetes mediante la técnica de fermentación en sustrato sólido Solid substrate fermentation for lignolytic enzyme production using Bas ..., *Rev. Colomb. Biotecnol.* V, nú (2003) 56–64.
- [100] M. Vrsanska, S. Voberkova, V. Langer, D. Palovcikova, A. Moulick, V. Adam, P. Kopel, Induction of laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase activities in white-rot fungi using copper complexes, *Molecules*. 21 (2016). <https://doi.org/10.3390/molecules21111553>.
- [101] T.K. Kirk, O. Gifford, P. Drive, R.L. Farrell, Enzymatic “Combustion”: The Microbial Degradation of Lignin, *Microbiol.* (1987) 465–505.
- [102] F.S. Archibald, R. Bourbonnais, L. Jurasek, M.G. Paice, I.D. Reid, Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*, *J. Biotechnol.* 53 (1997) 215–236. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)01675-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)01675-1).



- [103] T. Shin, S. Murao, E. Matsumura, A Chromogenic Oxidative Coupling Lactase and Angiotensin of Lactase : I Converting Applications Assay for, *Anal. Biochem.* 166 (1987) 380–388.
- [104] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>.
- [105] S.K.S. Patel, V.C. Kalia, J.H. Choi, J.R. Haw, I.W. Kim, J.K. Lee, Immobilization of laccase on SiO<sub>2</sub> nanocarriers improves its stability and reusability, *J. Microbiol. Biotechnol.* 24 (2014) 639–647. <https://doi.org/10.4014/jmb.1401.01025>.
- [106] K.J. Chae, M.J. Choi, K.Y. Kim, F.F. Ajayi, I.S. Chang, I.S. Kim, Selective inhibition of methanogens for the improvement of biohydrogen production in microbial electrolysis cells, *Int. J. Hydrogen Energy.* 35 (2010) 13379–13386. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.114>.
- [107] S. Pujiastuti, H. Onggo, Effect of various concentration of sulfuric acid for Nafion membrane activation on the performance of fuel cell, *AIP Conf. Proc.* 1711 (2016). <https://doi.org/10.1063/1.4941639>.
- [108] C.A. Echavarría, A.I.M. Gallón, Induction of lacasa activity in *Ganoderma* sp and the antioxidant activity of its biomass, *Rev. Cuba. Farm.* 44 (2010) 519–532.
- [109] N. Khalid, M. Asgher, S.A. Qamar, Evolving trend of *Boletus versicolor* IBL-04 by chemical mutagenesis to overproduce laccase: Process optimization, 3-step purification, and characterization, *Ind. Crops Prod.* 155 (2020) 112771. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112771>.
- [110] C. Zhu, G. Bao, S. Huang, Optimization of laccase production in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* (ATCC 52857) induced through yeast extract and copper, *Biotechnol. Equip.* 30 (2016) 270–276. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1135081>.
- [111] A. Teresa, M. Araque, G. David, M. Martínez, S. Segundo, G. Muñoz, S. Elena, B. Dios, O. Loera, T. Eum, A.D. En, F. Sólida, A.T. Márquez-araque, L. Corral, Fibrolytic activity of enzymes produced by *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 and *Aspergillus niger* AD96.4 in solid fermentation, *Interciencia.* 32 (2007) 780–785.
- [112] A. Rico Campos, Deslignificación enzimática de materiales lignocelulósicos de interés industrial, Universidad de Sevilla, Sevilla, 2014.
- [113] F. Villa, Phenolic acids with antioxidant activity in maize bran and wheat bran, *Cielo.* 3 (2016) 43–50.
- [114] R. Román, C. Torres-duarte, M. Ayala, R. Vázquez-duhalt, Production of laccase from *Coriolopsis gallica* at pilot plant scale, (2009).
- [115] A. Vignault, J. Gombau, M. Jourdes, V. Moine, J.M. Canals, M. Fermaud, J. Roudet, F. Zamora, P.L. Teissedre, Oenological tannins to prevent *Botrytis cinerea* damage in grapes and musts: Kinetics and electrophoresis characterization of laccase, *Food Chem.* 316 (2020) 126334. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126334>.
- [116] A. Sienkiewicz, A. Wanag, E. Kusiak-Nejman, E. Ekiert, P. Rokicka-Konieczna, A.W. Morawski, Effect of calcination on the photocatalytic activity and stability of TiO<sub>2</sub> photocatalysts modified with APTES, *J. Environ. Chem. Eng.* 9 (2021) 104794. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104794>.
- [117] H.P. Duong, M.D. Le, H.C. Dao, C.Y. Chen, Surface modification of TiO<sub>2</sub> nanotubes by grafting with APTS coupling agents, *Mater. Res. Express.* 4 (2017). <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aa92b3>.
- [118] P. Saravanan, K. Jayamoorthy, S. Ananda Kumar, Switch-On fluorescence and photo-induced electron transfer of 3-aminopropyltriethoxysilane to ZnO: Dual applications in sensors and antibacterial activity, *Sensors Actuators, B Chem.* 221

- (2015) 784–791. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.05.069>.
- [119] E.P. Etape, L.J. Ngolui, J. Foba-tendo, D.M. Yufanyi, B.V. Namondo, Mixed Oxide by a Modified Oxalate Route, *J. Appl. Chem.* 2017 (2017).
- [120] Y. Zhang, C. Wang, F. Liu, X. Sun, X. Guo, L. Zhao, G. Lu, 3-Aminopropyltriethoxysilane functionalized ZnO materials for improving the gas sensitivity to 2-butanone, *Sensors Actuators B Chem.* 363 (2022) 131845. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.131845>.
- [121] X. Chen, B. He, M. Feng, D. Zhao, J. Sun, Immobilized laccase on magnetic nanoparticles for enhanced lignin model compounds degradation, *Chinese J. Chem. Eng.* 28 (2020) 2152–2159. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.02.028>.
- [122] X. Liu, S. Risbakk, P. Almeida Carvalho, M. Yang, P. Hoff Backe, M. Bjørås, T. Norby, A. Chatzitakis, Immobilization of FeFe-hydrogenase on black TiO<sub>2</sub> nanotubes as biocathodes for the hydrogen evolution reaction, *Electrochem. Commun.* 135 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2022.107221>.
- [123] J. Lu, M. Nie, Y. Li, H. Zhu, G. Shi, Design of composite nanosupports and applications thereof in enzyme immobilization: A review, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 217 (2022) 112602. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112602>.
- [124] S. Kashefi, S.M. Borghei, N.M. Mahmoodi, Covalently immobilized laccase onto graphene oxide nanosheets: Preparation, characterization, and biodegradation of azo dyes in colored wastewater, Elsevier B.V, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.11.156>.
- [125] A. Bharti, S. Mittal, S. Rana, D. Dahiya, N. Agnihotri, N. Prabhakar, Electrochemical biosensor for miRNA-21 based on gold-platinum bimetallic nanoparticles coated 3-aminopropyltriethoxy silane, *Anal. Biochem.* 609 (2020) 113908. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113908>.
- [126] S. Moradi, Z. Shokri, N. Ghorashi, A. Navaee, A. Rostami, Design and synthesis of a versatile cooperative catalytic aerobic oxidation system with co-immobilization of palladium nanoparticles and laccase into the cavities of MCF, *J. Catal.* 382 (2020) 305–319. <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2019.12.023>.
- [127] E. Sohoul, M. Ghalkhani, M. Rostami, M. Rahimi-Nasrabadi, F. Ahmadi, A noble electrochemical sensor based on TiO<sub>2</sub>@CuO-N-rGO and poly (L-cysteine) nanocomposite applicable for trace analysis of flunitrazepam, *Mater. Sci. Eng. C.* 117 (2020) 111300. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111300>.
- [128] K.S. Ranjith, P. Manivel, R.T. Rajendrakumar, T. Uyar, Multifunctional ZnO nanorod-reduced graphene oxide hybrids nanocomposites for effective water remediation: Effective sunlight driven degradation of organic dyes and rapid heavy metal adsorption, *Chem. Eng. J.* 325 (2017) 588–600. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.05.105>.
- [129] P. Sathishkumar, S. Kamala-Kannan, M. Cho, J.S. Kim, T. Hadibarata, M.R. Salim, B.T. Oh, Laccase immobilization on cellulose nanofiber: The catalytic efficiency and cyclic application for simulated dye effluent treatment, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 100 (2014) 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.12.008>.
- [130] S.Z. Mazlan, S.A. Hanifah, Effects of Temperature and pH on Immobilized Laccase Activity in Conjugated Methacrylate-Acrylate Microspheres, *Int. J. Polym. Sci.* 2017 (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/5657271>.
- [131] S.H. Valencia, J.M. Marín, G.M. Restrepo, Efecto del pH en la Degradación Fotocatalítica de Materia Orgánica Natural, *Inf. Tecnol.* (2011). <https://doi.org/10.4067/S0718-07642011000500008>.
- [132] C. Ji, L.N. Nguyen, J. Hou, F.I. Hai, V. Chen, Direct immobilization of laccase on titania nanoparticles from crude enzyme extracts of *P. ostreatus* culture for micro-

- pollutant degradation, *Sep. Purif. Technol.* 178 (2017) 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.01.043>.
- [133] A. Mourya, S.K. Sinha, B. Mazumdar, Glassy carbon electrode modified with blast furnace slag for electrochemical investigation of Cu<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> metal ions, *Microchem. J.* 147 (2019) 707–716. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.03.082>.
- [134] Z. Li, Y. Zheng, T. Gao, Z. Liu, J. Zhang, G. Zhou, Fabrication of biosensor based on core–shell and large void structured magnetic mesoporous microspheres immobilized with laccase for dopamine detection, *J. Mater. Sci.* 53 (2018) 7996–8008. <https://doi.org/10.1007/s10853-018-2165-z>.
- [135] H.S. Magar, R.Y.A. Hassan, A. Mulchandani, Electrochemical impedance spectroscopy (Eis): Principles, construction, and biosensing applications, *Sensors*. 21 (2021). <https://doi.org/10.3390/s21196578>.
- [136] F. Tian, S. Geng, L. He, Y. Huang, A. Fauzi, W. Yang, Y. Liu, Y. Yu, Interface engineering: PSS-PPy wrapping amorphous Ni-Co-P for enhancing neutral-pH hydrogen evolution reaction performance, *Chem. Eng. J.* 417 (2021) 129232. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.129232>.
- [137] W. Chen, Z. Qin, B. McElhenny, F. Zhang, S. Chen, J. Bao, Z.M. Wang, H.Z. Song, Z. Ren, The effect of carbon quantum dots on the electrocatalytic hydrogen evolution reaction of manganese-nickel phosphide nanosheets, *J. Mater. Chem. A*. 7 (2019) 21488–21495. <https://doi.org/10.1039/c9ta06944e>.
- [138] O. Albrecht, H. Matsuda, K. Eguchi, Main and tilt transition in octadecylamine monolayers, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 284–285 (2006) 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.02.044>.
- [139] I.C. Arvizu, R.B. García-Reyes, M.A. Pech-Canul, A. García-González, Evaluating the role of laccase immobilized TiO<sub>2</sub> for potential use as biocathode in a microbial electrolysis cell, *Biochem. Eng. J.* 194 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.108883>.
- [140] N.S.K. Gunda, M. Singh, L. Norman, K. Kaur, S.K. Mitra, Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker, *Appl. Surf. Sci.* 305 (2014) 522–530. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.03.130>.
- [141] M. Senthilkumar, J. Mathiyarasu, J. Joseph, K.L.N. Phani, V. Yegnaraman, Electrochemical instability of indium tin oxide (ITO) glass in acidic pH range during cathodic polarization, *Mater. Chem. Phys.* 108 (2008) 403–407. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2007.10.030>.
- [142] R. Pruna, F. Palacio, M. Martínez, O. Blázquez, S. Hernández, B. Garrido, M. López, Organosilane-functionalization of nanostructured indium tin oxide films, *Interface Focus*. 6 (2016). <https://doi.org/10.1098/rsfs.2016.0056>.
- [143] Y. Liu, N. Wang, C. Yang, W. Hu, Sol-gel synthesis of nanoporous NiCo<sub>2</sub>O<sub>4</sub> thin films on ITO glass as high-performance supercapacitor electrodes, *Ceram. Int.* 42 (2016) 11411–11416. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.04.071>.
- [144] C. Quiñonez, W. Vallejo, G. Gordillo, Structural, optical and electrochemical properties of TiO<sub>2</sub> thin films grown by APCVD method, *Appl. Surf. Sci.* 256 (2010) 4065–4071. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.02.020>.