可见光驱动*Methanosarcina barkeri*-天然碳基半导体产甲烷性能及机制

张艺韞¹, 任国平¹, 胡安东¹, 金曙光², 叶捷^{1*}, 周顺桂^{1*}

1. 福建农林大学资源与环境学院, 福州 350002;

2. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085

* E-mail: yejie@fafu.cn; sgzhou@soil.gd.cn

收稿日期: 2020-10-11; 接受日期: 2020-12-09; 网络版发表日期: 2021-02-22

国家自然科学基金(批准号: 41925028, 41977281)资助项目

摘要 利用半人工光合系统(非光合微生物-纳米半导体生物杂化体系)将二氧化碳转化为高热值的甲烷有助于缓解全球温室效应和能源危机. 作为生物杂化体系的关键组分, 纳米半导体颗粒的结构及性质显著影响生物杂化体系的性能. 本研究以油菜花粉为原料, 成功构建*Methanosarcina barkeri*-天然碳基半导体生物杂化体系(*M. barkeri*-NCS), 并将其应用于二氧化碳还原产甲烷过程. 结果表明, 所制备的天然碳基半导体具有可见光响应好、孔体积大等优势. 在可见光($1.0 \pm 0.2 \text{ mW/cm}^2$)照射下, *M. barkeri*-NCS生物杂化体系具有良好的光电性能, 其甲烷产量最高可达 $51 \pm 4.5 \text{ } \mu\text{mol/g}$. 实时荧光定量多聚合酶链式反应结果进一步显示, *M. barkeri*膜结合氢酶和细胞色素相关基因表达显著上调, 尤其是EchB(2.47 ± 0.25 倍)和VhtC(2.83 ± 0.15 倍), 这表明这些基因在生物杂化体系光生电子传递-捕获-利用过程中起着关键作用. 该研究结果有望为构建高效的半人工光合系统提供理论支撑.

关键词 光催化, 产甲烷, 生物杂化体系, *Methanosarcina barkeri*, 天然碳基半导体

1 引言

随着工业化的快速发展, 全球化石燃料的消耗量日益增加, 这不仅加剧了能源枯竭, 也导致了二氧化碳(CO_2)等温室气体的排放量急剧上升, 进而对人们赖以生存的环境造成严重威胁. 因此, 将 CO_2 还原成高附加值化学品对缓解温室效应和能源危机至关重要^[1,2]. 作为 CO_2 资源化的重要产物之一, 甲烷(CH_4)是地球上重要的生物质能源, 其热值高达 890 kJ/mol . 因此将

CO_2 还原为 CH_4 不仅能够减缓温室效应, 而且可为化石燃料替代品的开发提供潜在途径^[3].

近年来, 光催化还原 CO_2 产 CH_4 作为新兴的研究方向得到了科研人员的普遍关注^[4-6]. 这种人工光合技术主要是利用丰富的太阳能激发半导体光催化材料产生光生电子, 从而实现还原 CO_2 产 CH_4 . 该过程具有构成简单、可设计性强、光合转化效率高于自然光合系统等优势^[7]. 但这种单一的人工光合技术也存在还原产物(CH_4/H_2)选择性差等缺陷. 虽然有研究者通过使用

引用格式: 张艺韞, 任国平, 胡安东, 等. 可见光驱动*Methanosarcina barkeri*-天然碳基半导体产甲烷性能及机制. 中国科学: 技术科学, 2021, 51: 601–612
Zhang Y Y, Ren G P, Hu A D, et al. Visible light-driven *Methanosarcina barkeri*-natural carbon-based semiconductor for methane production (in Chinese). Sci Sin Tech, 2021, 51: 601–612, doi: 10.1360/SST-2020-0414

生物酶催化剂来解决这一难题^[8], 然而酶分离纯化的复杂性^[9]、酶自身的不稳定性^[10]及氧的不耐受性^[11]限制了该方法的推广应用. 与酶相比, 产甲烷菌等全细胞微生物具有可自我修复/复制等特性, 且在复杂环境条件下能量损失更小, 因此具有更广阔的应用前景. 最新研究表明, 基于产甲烷菌高选择性生物催化能力与半导体优越的光捕获特性所构建的半人工光合系统(生物杂化体系)可以有效实现CO₂还原产CH₄^[12]. 但目前使用的半导体主要以硫化镉(CdS)等金属化合物为主^[12,13], 由此构建的生物杂化体系容易因为光腐蚀引起重金属的释放, 进而造成环境污染^[14], 加之其带隙较宽, 通常需要利用紫光等较强的光源激发, 不仅容易对菌体造成光损伤^[15], 也不利于实际推广利用. 因此开发新型的生物兼容性强的非金属半导体光催化材料尤为重要.

碳基非金属半导体由于环境友好等特点而备受关注^[16,17]. 相比于碳化氮(CN)、g-C₃N₄等碳基材料, 利用天然材料制备碳基半导体引起科研人员的极大兴趣^[18]. 与传统化学合成相比, 这种制备方法具有材料来源丰富、制备过程经济环保等优点, 而且所制备的碳基半导体存在均匀的多孔碳骨架结构, 可应用于不同的领域^[19,20]. Xiao等人^[21]的研究结果显示, 以花粉为原料制备的天然碳基催化剂具有孔体积及比表面积大等特性, 可提供丰富的气体吸附/活化位点. 此外, 该材料所具有的分层空心结构不仅能够有效促进电子-空穴对的分离, 而且能够通过内部光散射和反射提高可见光的响应^[22]. 然而, 目前国内外对天然碳基半导体的研究还主要集中于无机催化体系, 将其与微生物相结合的探索仍处于初步阶段, 已有的研究结果也主要是证实天然碳基半导体的强氧化性能够有效实现杀菌等功能^[18,23]. 对于天然碳基半导体能否与非光合产甲烷菌形成高效的半人工光合系统尚不明确, 特别是该系统在可见光条件下能否驱动CO₂还原产CH₄过程及相关机制也缺乏深入研究.

因此, 本研究利用油菜花粉制备天然碳基半导体(NCS), 选取*Methanosarcina barkeri* (*M. barkeri*)为模式产甲烷菌株, 构建*M. barkeri*-NCS生物杂化体系. 通过对构建的生物杂化体系进行表征, 探究其在可见光条件下还原CO₂产CH₄潜能, 并对可能的电子传递机制进行解析. 研究结果有望为构建高效的CO₂还原产CH₄生物杂化体系提供理论依据.

2 材料与方法

2.1 天然碳基半导体的制备及*M. barkeri*的培养

根据Xiao等人^[21]的方法, 将10 g油菜花粉浸泡在100 mL无水乙醇中, 超声2 h后过滤, 并用去离子水清洗数次. 然后将处理后的样品加入100 mL乙醇和甲醛(v/v, 1:1)混合溶液中, 搅拌1 h后过滤, 并用去离子水清洗数次. 最后用H₂SO₄溶液(12 mol/L, 100 mL)对所得到的样品进一步处理, 在80°C水浴中搅拌4 h后, 将产物用去离子水冲洗至pH 7.0, 并在真空中干燥24 h后备用.

M. barkeri MS(DSM800)购买自德国DSMZ公司. 将获得的*M. barkeri*接入以乙酸钠为碳源的DSM311b培养基中, 置于37°C恒温培养箱中培养, 收集对数期的菌液, 4°C保存作为原始菌液^[12].

2.2 *M. barkeri*-NCS生物杂化体系的构建及还原CO₂产CH₄实验

在37°C下, 在10 mL DSM311b培养基中接种0.5 mL *M. barkeri*原始菌液. 当*M. barkeri*培养至生长对数期($A_{600} \sim 0.2$)时, 加入2 mg NCS构建*M. barkeri*-NCS生物杂化体系. 经过2天的培养箱避光培养, 将生物杂化体系在4°C, 7500 r/min条件下离心6 min, 用生理盐水洗涤3次. 最终用1 mL生理盐水重悬浮, 然后将其立即加入到10 mL以NaHCO₃为碳源的无机培养基中, 并加入0.3 wt%的半胱氨酸(Cys)作为牺牲试剂^[24]. 此外, *M. barkeri*-CdS及*M. barkeri*-Ni_(0.75%):CdS生物杂化体系是目前已报道的能够有效驱动CO₂还原产CH₄的生物杂化体系, 但这两种体系的产CH₄过程均是在紫光激发下进行的, 对于其在可见光全波段下的产CH₄性能尚不明确. 因此, 本文同时选取*M. barkeri*-CdS及*M. barkeri*-Ni_(0.75%):CdS生物杂化体系为研究对象, 探究其在可见光全波段下的产CH₄性能, 并与*M. barkeri*-NCS生物杂化体系进行比较. 在构建*M. barkeri*-CdS及*M. barkeri*-Ni_(0.75%):CdS生物杂化体系过程中, 我们将*M. barkeri*-NCS生物杂化体系中的NCS替换为等量的CdS及Ni_(0.75%):CdS. 在比较不同半导体所构建的生物杂化体系的产CH₄性能的实验中, 原体系中的NCS需要替换为等量的CdS及Ni_(0.75%):CdS, 构建*M. barkeri*-CdS及*M. barkeri*-Ni_(0.75%):CdS生物杂化体系^[12,13]. 所有的培养和取样操作都在厌氧手套箱中

进行。

以发光二极管(LED)灯(380~780 nm)为模拟可见光光源,在 $1.0 \pm 0.2 \text{ mW/cm}^2$ 下,进行*M. barkeri*-NCS生物杂化体系还原 CO_2 产 CH_4 性能研究。设置对照试验评估*M. barkeri*, NCS和光照三个要素在还原 CO_2 产 CH_4 过程中的作用,并探究不同天然碳基半导体投加量(0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mg/mL)、不同半导体(CdS, $\text{Ni}_{(0.75\%)}\text{:CdS}$ 和NCS)、不同光强(0.4, 0.8, 1.0, 1.2, 1.6 mW/cm^2)及光暗循环(12 h/12 h)下生物杂化体系产 CH_4 性能。采用日本岛津GC2014气相色谱仪测定 CH_4 的浓度,并计算*M. barkeri*-NCS生物杂化体系的平均量子效率(QE)^[25]。此外,为了验证产生 CH_4 的来源,设置对照试验,将洗菌后培养基中的 $\text{NaH}^{12}\text{CO}_3$ 用 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ 代替,然后用Agilent 7890-5975c气相色谱-质谱仪在所选离子监测(SIM) ($m/z=17, 45$)模式测定顶空气体质谱。

2.3 表征方法

将NCS固定在硅片上,并使用日本日立SU8020进行场发射扫描电子显微镜(FESEM)成像。此外,将收集的*M. barkeri*-NCS生物杂化体系样品用2.5%戊二醛固定12 h,用不同浓度乙醇(30%, 50%, 70%, 80%, 90%和95%)梯度洗脱,然后保存至100%的乙醇中^[26]。将悬液滴在碳膜上,在室温(25°C)下干燥。使用美国Tecnai G2 F20 S-TWIN进行透射电子显微镜(TEM)成像,并通过附加在TEM上的X-MaxN能量色散X射线检测器(EDS)分析生物杂化体系表面的元素组成。X射线衍射光谱(XRD)采用日本岛津XRD-6000型X射线衍射仪进行测定,以Cu靶 $K\alpha$ 线作为辐射源,工作电压为40 kV,工作电流为30 mA,扫描速度为 $1^\circ/\text{min}$,扫描范围为 $5^\circ \sim 80^\circ$ ^[27]。使用美国赛默飞的IS 50 FTIR测定傅立叶变换红外(FTIR)光谱^[28]。使用Thermo ESCALA 250 XPS光谱仪系统进行能谱分析,以Al靶 $K\alpha$ 线作为辐射源,测试能量为30 eV,并通过XPS PEAK41软件拟合峰^[29]。

利用日本岛津UV2600紫外可见光谱仪测定样品漫反射光谱。利用上海辰华CHI 760E电化学工作站分别在1.0和1.5 kHz下进行莫特-肖特基测试。利用上海辰华CHI 660E电化学工作站进行光电流(I - t)和电化学阻抗谱(EIS)测定,其中氧化铟锡(ITO)导电玻片($1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$)为工作电极,铂电极和饱和甘汞电极分别为对电极和参比电极^[12]。

利用Sigma-Aldrich MAK037定量试剂盒测定还原/氧化型辅酶I(NADH/NAD)比值,以评估 CO_2 还原产 CH_4 过程中*M. barkeri*胞内氧化还原当量变化。利用Sangon Biotech BSP02一步法细菌活性蛋白提取试剂盒提取*M. barkeri*活性蛋白,并使用Thermo Scientific Pierce BCA蛋白质分析试剂盒测定总蛋白浓度。利用Qiagen RNeasy Mini试剂盒对不同条件下的生物杂化体系样品进行RNA的提取和纯化。纯化的RNA通过KR118 FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix试剂盒反转录为cDNA模板。针对*Ech*, *Vht*, *Hdr*, *mcrA*和内参基因*rpoA1*设计了相应引物^[12],所有引物均经聚合酶链式反应(PCR)验证。实时荧光定量PCR(qPCR)通过Roche LightCycler 480系统进行。反应体系总体积为20 μL ,包括10 μL iTaq Universal SYBR Green Supermix、1 mmol/L基因特异性引物、3 μL 无菌水和50 ng cDNA。以60°C为退火温度,进行40个周期。

所有实验都进行了三次重复。采用 t 检验, $P < 0.05$ 为存在显著性差异,有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 天然碳基半导体表征

FESEM结果(图1(a))显示,以油菜花粉为原料制备的NCS颗粒呈现出均匀的椭圆形形貌,其长和宽分别约为28和21 μm ,且具有中空壳状结构,表明NCS成功保留了油菜花粉的原始形态和结构。高倍FESEM图像(图1(b))和TEM图像(图1(c))进一步证明,NCS颗粒表面由多孔的中空网络结构组成,其中均匀分布着大量的孔径,这为天然碳基半导体收集光能和吸附、传递 CO_2 提供了有利条件^[30]。此外,XRD图谱(图1(d))显示,在 22° 左右存在较宽的衍射峰,这表明形成了近似非晶态材料^[31]。XPS谱图(图1(e), (f))显示,NCS主要存在C, O, N和S四种元素,元素占比分别为74.93%, 20.02%, 2.94%和2.11%。这其中C 1s主要在结合能为284.8, 286.3和288.6 eV处有三个特征峰,这表明NCS中存在C-C, C-NR₂和O-C=O键^[32]; O 1s则主要在结合能为532.0, 533.5和536.0 eV处有四个特征峰,这表明NCS中存在C=O, C-OH和O-C=O^[33,34]; N 1s在结合能为399.8和401.1 eV处有特征峰,这表明NCS中存在吡咯型氮(pyrrolic-N)和氧化型氮(oxidized-N)^[32,34]; S 2p在结合能为168.9和170.1 eV处有特征峰,这表明

图1 (网络版彩图)合成的NCS颗粒表征。(a), (b) FESEM图像; (c) TEM图像; (d) XRD图谱; (e) XPS全光谱; (f) C, O, N和S各元素的XPS光谱

Figure 1 (Color online) Characterizations of the NCS. (a), (b) FESEM image; (c) TEM image; (d) XRD pattern; (e) XPS spectra of survey; (f) XPS spectra of C, O, N and S.

NCS中存在 SO_3^{2-} 和 SO_4^{2-} [35], 这可能是由于制备NCS时使用了 H_2SO_4 [36]。由这些结果可知, 所制备的NCS半导体是以C为主要元素, 并掺杂N和S等元素的多孔碳基材料。

3.2 构建*M. barkeri*-NCS生物杂化体系

由图2(a)可知, 多孔的NCS与*M. barkeri*具有不同的形貌结构。八叠球状的*M. barkeri*与NCS有良好的接触, 且部分*M. barkeri*嵌入到NCS结构中, 从而有效形成生物杂化体系。TEM高角环形暗场像(图2(b))及元素分布(图2(d))结果显示, *M. barkeri*-NCS生物杂化体系主要由C, O, N和S四种元素组成且分布较为均匀。此外, 通过FTIR光谱(图2(c))显示, *M. barkeri*-NCS生物杂化体系有多处明显的特征峰, 这些特征峰意味着生物杂化体系主要由C=O(1658 cm^{-1}), C-H(1206 和 2927 cm^{-1}), O-H(3292 cm^{-1})以及 CO_3^{2-} (1542 cm^{-1})等官能团组成 [34,37,38], 进而表明生物杂化体系主要由C,

O和H元素组成 [39]。此外, 结合NCS的XPS结果可知, 生物杂化体系表面存在着丰富的羟基(-OH)基团。已有研究表明, -OH基团能够有效促进电荷转移, 从而抑制光生电子与空穴的复合 [40], 进而使生物杂化体系在还原 CO_2 产 CH_4 过程中更具优势。此外, 其他官能团在光照前后没有发生显著性变化, 且峰位置也相对比较稳定, 由此证明*M. barkeri*-NCS生物杂化体系具有较高的结构稳定性。

3.3 *M. barkeri*-NCS生物杂化体系光电性能

为了研究*M. barkeri*-NCS生物杂化体系的光电性能, 我们首先对NCS的能带结构进行了测定。由紫外-可见光固体漫反射光谱(图3(a))可知, NCS催化剂的带隙宽度(E_g)约为 2.06 eV ($\lambda_{\text{吸收}}=599\text{ nm}$), 小于CdS等硫族半导体的带隙宽度 [41], 这意味着NCS具有更强的可见光吸收能力。莫特-肖特基扫描结果显示, 在不同频率(1.0 和 1.5 kHz)下的曲线斜率均为正值(图3(b)), 表明所

图 2 (网络版彩图) *M. barkeri*-NCS 生物杂化体系的形貌表征. (a) TEM 图像; (b) TEM 高角环形暗场像; (c) FTIR 谱图; (d) C, O, N 和 S 各元素分布的 EDS 图像

Figure 2 (Color online) Characterizations of the *M. barkeri*-NCS biohybrids. (a) TEM image; (b) TEM high-angle annular dark-field image; (c) FTIR spectra; (d) elements mapping images of C, O, N and S by EDS.

制备的 NCS 催化剂是 n 型特征半导体, 这有利于 CO_2 的还原. 同时, 由其外推距可知, 所制备的 NCS 催化剂的最低未占据分子轨道(LUMO)为 $-1.05 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ ($-0.85 \text{ V vs. 标准氢电极(NHE)}$). 由此可知 NCS 催化剂的导带电位大约位于 -0.85 eV , 满足 CO_2 还原为 CH_4 的氧化还原电位要求^[42,43]. $I-t$ 曲线(图 3(c))进一步表征生物杂化体系的光电性能. 结果显示, 生物杂化体系在光照后的光电流立即增加, 可以产生 $0.05 \sim 0.10 \mu\text{A}$ 的光电流, 在停止光照后立即下降. 相比之下, *M. barkeri*-NCS 生物杂化体系的光电流高于单独 NCS. 这表明 *M. barkeri* 可以有效接收 NCS 产生的光电子, 从而促进光生电子转移^[44]. 阻抗拟合结果(图 3(d))也进一步证实, 光照条件下 *M. barkeri*-NCS 生物杂化体系具有更小的界面电荷转移电阻, 这与 $I-t$ 曲线结果一致.

3.4 *M. barkeri*-NCS 生物杂化体系产 CH_4 性能

我们首先探究不同光强、碳基半导体投加量及牺牲试剂 Cys 浓度对 *M. barkeri*-NCS 生物杂化体系产 CH_4 性能的影响. 实验结果显示, 当光强为 $1.0 \pm$

0.2 mW/cm^2 、天然碳基半导体投加量为 2 mg/mL 、牺牲试剂浓度为 $0.3 \text{ wt\%}$ 时, 生物杂化体系产 CH_4 性能达到最佳. 因此, 在接下来的研究中我们以此参数开展进一步的研究. 如图 4(a) 所示, 随着光照的进行, *M. barkeri*-天然碳基半导体生物杂化体系产 CH_4 量逐渐增加. 在光照三天后, *M. barkeri*-NCS 生物杂化体系产 CH_4 量可达 $51 \pm 4.5 \mu\text{mol/g}$, 该结果显著优于 *M. barkeri*-CdS 及 *M. barkeri*- $\text{Ni}_{(0.75\%)}\text{:CdS}$ 生物杂化体系(图 4(b)). 由于 $\text{Ni}_{(0.75\%)}\text{:CdS}$ 及 CdS 禁带宽度较大 ($2.66 \sim 2.68 \text{ eV}$), 需要更强的光源激发. 而本研究使用的光源中紫光含量相对较低, 限制了 *M. barkeri*-CdS 及 *M. barkeri*- $\text{Ni}_{(0.75\%)}\text{:CdS}$ 生物杂化体系光生电子的产生及捕获, 从而导致二者产 CH_4 量没有显著差异, 均在 $10.6 \mu\text{mol/g}$ 左右. 为了进一步研究 *M. barkeri*-NCS 生物杂化体系光催化产 CH_4 的关键驱动因子, 我们设计了相关对照实验. 如图 4(a) 所示, 单纯 *M. barkeri* 在黑暗条件下产生了微量 CH_4 (约 $3.9 \mu\text{mol/g}$), 这可能是由 *M. barkeri* 在培养过程中残留的中间代谢产物引起的^[12]. 但是在光照条件下, 单纯 *M. barkeri* 的 CH_4 生成

图3 (网络版彩图) *M. barkeri*-NCS生物杂化体系的光电化学表征. (a) NCS的禁带宽度图; (b) NCS的莫特-肖特基图; (c) 光照循环下*M. barkeri*-NCS生物杂化体系的*I-t*图(20 s/20 s); (d) NCS和*M. barkeri*-NCS生物杂化体系的阻抗谱图

Figure 3 (Color online) Photoelectrochemical tests of the *M. barkeri*-NCS biohybrids. (a) Band gap plot of NCS; (b) Mott-Schottky curves of NCS; (c) *I-t* curves of the *M. barkeri*-NCS biohybrids with a light on/off cycle (20 s/20 s); (d) electrical impedance diagrams of NCS and *M. barkeri*-NCS biohybrids.

量几乎忽略不计, 这是因为*M. barkeri*对光敏感, 光照可能会阻碍*M. barkeri*的正常生理代谢以及CH₄的生成^[25]. 此外, 虽然碳基半导体催化剂对CO₂还原产CH₄的积极作用已被广泛报道^[45], 但本研究中单独NCS体系在光照下几乎不产生CH₄, 这可能是由于NCS中光生电子与空穴的快速复合限制了光电子转移及*M. barkeri*对光生电子的捕获^[46]. 需要指出的是, 所制备NCS的导带具有将CO₂还原为CO的潜力($\text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{CO} + \text{H}_2\text{O}$, $E_0 = -0.53 \text{ V vs. NHE}$, pH=7.0), 该过程可能竞争光电子, 进而限制CH₄的生成^[22]. 在单独NCS体系中检测到的少量CO($5.46 \pm 0.31 \mu\text{mol/g}$)验证了这种可能. 此外, *M. barkeri*-NCS生物杂化体系在黑暗条件下的CH₄生成量几乎没有变化, 说明该生物杂化体系产CH₄过程需要在光驱动下进行. 为了进一步确认CH₄的来源, 以¹³C标记的NaH¹³CO₃作为碳源和电子受体开展同位素标记实验. 结果仅检测到¹³CH₄($m/z=17$)和¹³CO₂($m/z=45$)的特征峰(图4(c)), 这说明生物杂化体

系产生的CH₄来自于CO₂还原. 为了模拟昼-夜循环, 采用12 h光与12 h暗交替循环的方法研究了*M. barkeri*-NCS生物杂化体系的产CH₄性能. 如图4(d)所示, 在前两个光-暗循环期间, *M. barkeri*-NCS生物杂化体系的CH₄产量就达到了 $42.32 \pm 2.07 \mu\text{mol/g}$, 量子效率最高可达0.08%, 特别是在黑暗阶段CH₄产量仍有少量提高. 这可能是由于在光照条件下产生的NADH等产物可作为黑暗条件下的额外电子供体, 进而促进CH₄的生成^[47].

3.5 *M. barkeri*-NCS生物杂化体系产CH₄机制

我们对*M. barkeri*-NCS生物杂化体系产CH₄的机制进行研究. NADH/NAD比值测试显示, 在光照下, *M. barkeri*-NCS生物杂化体系具有更高的胞内还原电位(图5(a)), 这表明光生电子可以在细胞内触发NADH的快速生成^[47]. 加之积累的NADH可以作为额外的电子供体, 这有利于暗循环中CH₄的产生. 随着光照时间的推移, 细胞内NADH浓度显著降低, 这可能是由于牺

图4 (网络版彩图) *M. barkeri*-NCS生物杂化体系产CH₄性能. (a) 不同处理组的CH₄产量; (b) 不同半导体生物杂化体系的CH₄产量; (c) C同位素标记; (d) 光暗循环CH₄产量

Figure 4 (Color online) Photocatalytic performance for CH₄ production with the *M. barkeri*-NCS biohybrids. (a) The CH₄ yields of different treatments; (b) the CH₄ yields with different semiconductor biohybrids; (c) C-labeled plot; (d) the CH₄ yields under light-dark cycle conditions.

性试剂的消耗导致体系中活性氧自由基的浓度不断增加, 进而影响了*M. barkeri*的活性. 此外, 膜相关蛋白在产甲烷菌还原CO₂产CH₄过程起到了重要的作用^[48]. 我们首先对光照过程中不同处理样品进行总蛋白的提取, 用其来表征生物量的变化. 结果如图5(b)显示, 在光照前两天, *M. barkeri*-NCS生物杂化体系的总蛋白不断增加, 随后总蛋白量开始下降, 这与CH₄积累量变化相一致. 相比较之下, 其他处理组的总蛋白量从第一天开始便随着时间推移不断下降, 其中光照下单纯菌(*M. barkeri*(light))的总蛋白量下降的速率最快, 这可能是由于较高的光照强度导致参与光电子转移的功能蛋白失活^[49].

为了深入了解膜结合蛋白在*M. barkeri*-NCS生物杂化体系光电子转移中的作用, 采用qRT-PCR对*M. barkeri*还原CO₂过程中传递电子的主要膜结合蛋白进行分析, 包括铁还原蛋白依赖型氢酶EchA-F

($H_2 + Fd_{ox} \rightleftharpoons Fd_{red}^{2-} + 2H^+$)、甲烷吩嗪依赖型氢酶VhtACG($H_2 + MP \rightleftharpoons MPH_2$)和异二硫化物还原酶HdrDE($MPH_2 + Com-S-S-CoB \rightleftharpoons MP + HS-CoM + HS-CoB$). 图5(c)表明, 光照下EchA-F和VhtACG的相对表达量均有不同程度的增加, 表明氢酶在介导*M. barkeri*-NCS生物杂化体系电子传递的过程中有重要作用. 其中EchB(2.47±0.25倍), EchE(1.38±0.01倍)和EchF(1.33±0.06倍)的相对表达量显著增加, 这可能是由于大量光生电子直接或通过EchB间接催化EchE产生H₂, 进而还原EchF产生的铁氧化蛋白引起. 这一过程产生的铁还原蛋白可为CO₂还原为甲酰甲烷呋喃提供电子供体^[50]. 同时, 细胞内产生的H₂也可以被VhtACG, 特别是VhtA基因捕获和氧化, 从而使其相对表达量增加1.76±0.06倍. 以上结果证实, 氢酶可介导碳基半导体产生的光生电子的传递^[51]. 此外, VhtC和HdrE是*M. barkeri*重要的膜结合细胞色素b的组成部分. 光照条件下, VhtC

图 5 (网络版彩图) *M. barkeri*-NCS生物杂化体系产甲烷分子机制. (a) NADH变化; (b) 生物量变化; (c) *M. barkeri*的Ech, Vht, Hdr和*mcrA*表达(*表示显著相关, $P<0.05$; **表示极显著相关, $P<0.01$)

Figure 5 (Color online) Molecular mechanism of *M. barkeri*-NCS biohybrids for CH_4 production. (a) NADH variation; (b) biomass variation; (c) relative transcript abundance of Ech, Vht, Hdr and *mcrA* in the *M. barkeri*-NCS biohybrids (* indicates significant correlation, $P<0.05$; ** indicates extremely significant correlation, $P<0.01$).

(2.83 ± 0.15 倍)和HdrE(1.18 ± 0.08 倍)的相对表达量均有增加, 这表明光生电子可能能够直接注入到细胞色素b中, 进而促进VhtC和HdrE进行甲烷吩嗪的氧化还原^[50,52]. 因此, 细胞色素介导的机制也是*M. barkeri*-NCS生物杂化体系中一个重要的光电子转移途径. 此外, 作为Hdr的另外一个基因, HdrD相对表达量也增加 1.82 ± 0.12 倍, 这意味着通过HdrE传递的电子或光生电子可能能够直接催化HdrD生成辅酶M和辅酶B, 促进产 CH_4 进程^[53].

甲基辅酶M还原酶(Mcr)是产甲烷菌将甲基最终转化为 CH_4 的关键功能酶, 而其中*mcrA*基因可以作为研究产甲烷菌多样性的分子标记物^[54]. 为证明传递的光生电子最终用来生成了 CH_4 , 对*mcrA*基因进行分析,

结果显示其转录水平显著提高(1.55 ± 0.07 倍), 表明光照激发半导体所产生的光生电子能够有效促进氢酶及细胞色素等关键功能蛋白表达, 进而强化产 CH_4 性能(图6). 但是, 目前对于*M. barkeri*-NCS生物杂化体系能量转换途径和中间代谢产物等尚不明确, 新的电子传递途径仍有待探索. 此外, *M. barkeri*的亚基基因表达不同的原因也值得进一步研究, 解决这些问题有助于更好地理解 and 构建生物杂化体系.

4 结果与讨论

我们利用油菜花粉制备了天然碳基半导体(NCS), 并成功将其应用于*M. barkeri*-NCS半人工光合系统的

图 6 (网络版彩图) *M. barkeri*-NCS生物杂化体系电子传递途径

Figure 6 (Color online) Proposed photoelectrons transfer mechanism in the *M. barkeri*-NCS biohybrids.

构建。该半人工光合系统在可见光下能够有效驱动 CO_2 还原产 CH_4 ，最高 CH_4 产量可达 $51 \pm 4.5 \mu\text{mol/g}$ 。机理分析结果显示，膜结合蛋白如氢酶和细胞色素在

M. barkeri-NCS 半人工光合系统的光电子转移中起着关键作用。该研究结果对于构建高效的半人工光合系统具有重要意义。

参考文献

- 1 Olah G A, Goeppert A, Prakash G K S. Chemical recycling of carbon dioxide to methanol and dimethyl ether: From greenhouse gas to renewable, environmentally carbon neutral fuels and synthetic hydrocarbons. *J Org Chem*, 2009, 74: 487–498
- 2 Anderson T R, Hawkins E, Jones P D. CO_2 , the greenhouse effect and global warming: From the pioneering work of Arrhenius and Callendar to today's Earth System Models. *Endeavour*, 2016, 40: 178–187
- 3 Janke C, Duyar M S, Hoskins M, et al. Catalytic and adsorption studies for the hydrogenation of CO_2 to methane. *Appl Catal B-Environ*, 2014, 152–153: 184–191
- 4 Sastre F, Puga A V, Liu L, et al. Complete photocatalytic reduction of CO_2 to methane by H_2 under solar light irradiation. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 6798–6801
- 5 Kim H R, Razzaq A, Grimes C A, et al. Heterojunction p-n-p $\text{Cu}_2\text{O/S-TiO}_2/\text{CuO}$: Synthesis and application to photocatalytic conversion of CO_2 to methane. *J CO₂ Util*, 2017, 20: 91–96
- 6 Wang H, Zhang L, Wang K, et al. Enhanced photocatalytic CO_2 reduction to methane over $\text{WO}_3 \cdot 0.33\text{H}_2\text{O}$ via Mo doping. *Appl Catal B-Environ*, 2019, 243: 771–779
- 7 Habisreutinger S N, Schmidt-Mende L, Stolarczyk J K. Photocatalytic reduction of CO_2 on TiO_2 and other semiconductors. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 7372–7408
- 8 Lee S H, Choi D S, Kuk S K, et al. Photobiocatalysis: Activating redox enzymes by direct or indirect transfer of photoinduced electrons. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 7958–7985
- 9 Dobbek H, Svetlitchnyi V, Gremer L, et al. Crystal structure of a carbon monoxide dehydrogenase reveals a $[\text{Ni-4Fe-5S}]$ cluster. *Science*, 2001, 293: 1281–1285
- 10 Woolerton T W, Sheard S, Reisner E, et al. Efficient and clean photoreduction of CO_2 to CO by enzyme-modified TiO_2 nanoparticles using

- visible light. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 2132–2133
- 11 Brown K A, Harris D F, Wilker M B, et al. Light-driven dinitrogen reduction catalyzed by a CdS:nitrogenase MoFe protein biohybrid. *Science*, 2016, 352: 448–450
- 12 Ye J, Yu J, Zhang Y, et al. Light-driven carbon dioxide reduction to methane by *Methanosarcina barkeri*-CdS biohybrid. *Appl Catal B-Environ*, 2019, 257: 117916
- 13 Ye J, Ren G, Kang L, et al. Efficient photoelectron capture by Ni decoration in *Methanosarcina barkeri*-CdS biohybrids for enhanced photocatalytic CO₂-to-CH₄ conversion. *iScience*, 2020, 23: 101287
- 14 Chen M F, Huang C Z, Pu D Y, et al. Toxic effects of CdSe/ZnS QDs to zebrafish embryos (in Chinese). *Environ Sci*, 2015, 36: 719–726 [陈幕飞, 黄承志, 蒲德永, 等. CdSe/ZnS量子点对斑马鱼胚胎发育的毒性效应. *环境科学*, 2015, 36: 719–726]
- 15 Svitkova V, Blaskovicova J, Tekelova M, et al. Assessment of CdS quantum dots effect on UV damage to DNA using a DNA/quantum dots structured electrochemical biosensor and DNA biosensing in solution. *Sens Actuat B-Chem*, 2017, 243: 435–444
- 16 Low J, Cheng B, Yu J, et al. Carbon-based two-dimensional layered materials for photocatalytic CO₂ reduction to solar fuels. *Energy Storage Mater*, 2016, 3: 24–35
- 17 Masih D, Ma Y, Rohani S. Graphitic C₃N₄ based noble-metal-free photocatalyst systems: A review. *Appl Catal B-Environ*, 2017, 206: 556–588
- 18 Wang B, Jiang Z, Yu J C. Treated rape pollen: A metal-free visible-light-driven photocatalyst from nature for efficient water disinfection. *J Mater Chem A*, 2019, 7: 9335–9344
- 19 Choi Y, Zheng X T, Tan Y N. Bioinspired carbon dots (biodots): Emerging fluorophores with tailored multiple functionalities for biomedical, agricultural and environmental applications. *Mol Syst Des Eng*, 2020, 5: 67–90
- 20 Sun J, Zhang J, Zhang M, et al. Bioinspired hollow semiconductor nanospheres as photosynthetic nanoparticles. *Nat Commun*, 2012, 3: 1139
- 21 Xiao K M, Wang T Q, Sun M Z, et al. Photocatalytic bacterial inactivation by a rape pollen-MoS₂ biohybrid catalyst: Synergetic effects and inactivation mechanisms. *Environ Sci Technol*, 2020, 54: 537–549
- 22 Jiang Z, Sun H, Wang T, et al. Nature-based catalyst for visible-light-driven photocatalytic CO₂ reduction. *Energ Environ Sci*, 2018, 11: 2382–2389
- 23 Lou X W D, Archer L A, Yang Z. Hollow micro-/nanostructures: Synthesis and applications. *Adv Mater*, 2008, 20: 3987–4019
- 24 Pellegrin Y, Odobel F. Sacrificial electron donor reagents for solar fuel production. *Comptes Rendus Chimie*, 2017, 20: 283–295
- 25 Sakimoto K K, Wong A B, Yang P. Self-photosensitization of nonphotosynthetic bacteria for solar-to-chemical production. *Science*, 2016, 351: 74–77
- 26 Wang B, Xiao K, Jiang Z, et al. Biohybrid photoheterotrophic metabolism for significant enhancement of biological nitrogen fixation in pure microbial cultures. *Energ Environ Sci*, 2019, 12: 2185–2191
- 27 Ito N, Sato Y, Song P K, et al. Electrical and optical properties of amorphous indium zinc oxide films. *Thin Solid Films*, 2006, 496: 99–103
- 28 Özgenç Ö, Durmaz S, Boyacı I H, et al. Determination of chemical changes in heat-treated wood using ATR-FTIR and FT Raman spectrometry. *Spectrochim Acta Part A-Mol Biomol Spectr*, 2017, 171: 395–400
- 29 Di T, Cheng B, Ho W, et al. Hierarchically CdS-Ag₂S nanocomposites for efficient photocatalytic H₂ production. *Appl Surf Sci*, 2019, 470: 196–204
- 30 Yang Q, Yang C C, Lin C H, et al. Metal-organic-framework-derived hollow N-doped porous carbon with ultrahigh concentrations of single Zn atoms for efficient carbon dioxide conversion. *Angew Chem*, 2019, 131: 3549–3553
- 31 Peng J, Chen N, He R, et al. Electrochemically driven transformation of amorphous carbons to crystalline graphite nanoflakes: A facile and mild graphitization method. *Angew Chem*, 2017, 129: 1777–1781
- 32 Lee W H, Lee J G, Reucroft P J. XPS study of carbon fiber surfaces treated by thermal oxidation in a gas mixture of O₂/(O₂+N₂). *Appl Surf Sci*, 2001, 171: 136–142
- 33 Fan L Z, Qiao S, Song W, et al. Effects of the functional groups on the electrochemical properties of ordered porous carbon for supercapacitors. *Electrochim Acta*, 2013, 105: 299–304
- 34 Yuan G, Zhao X, Liang Y, et al. Small nitrogen-doped carbon dots as efficient nanoenhancer for boosting the electrochemical performance of three-dimensional graphene. *J Colloid Interface Sci*, 2019, 536: 628–637
- 35 Rodriguez J A, Jirsak T, Chaturvedi S, et al. Reaction of SO₂ with ZnO(0001)-O and ZnO powders: Photoemission and XANES studies on the formation of SO₃ and SO₄. *Surf Sci*, 1999, 442: 400–412

- 36 Liao S, Donggen H, Yu D, et al. Preparation and characterization of ZnO/TiO₂, SO₄²⁻/ZnO/TiO₂ photocatalyst and their photocatalysis. *J PhotoChem PhotoBiol A-Chem*, 2004, 168: 7–13
- 37 Rong J, Qiu F, Zhang T, et al. A facile strategy toward 3D hydrophobic composite resin network decorated with biological ellipsoidal structure rapeseed flower carbon for enhanced oils and organic solvents selective absorption. *Chem Eng J*, 2017, 322: 397–407
- 38 Ming J, Wu Y, Yu Y, et al. Steaming multiwalled carbon nanotubes via acid vapour for controllable nanoengineering and the fabrication of carbon nanoflutes. *Chem Commun*, 2011, 47: 5223–5225
- 39 Guan X, Chen G, Shang C. ATR-FTIR and XPS study on the structure of complexes formed upon the adsorption of simple organic acids on aluminum hydroxide. *J Environ Sci*, 2007, 19: 438–443
- 40 Huang Y, Wang Y, Bi Y, et al. Preparation of 2D hydroxyl-rich carbon nitride nanosheets for photocatalytic reduction of CO₂. *RSC Adv*, 2015, 5: 33254–33261
- 41 Vogel R, Hoyer P, Weller H. Quantum-Sized PbS, CdS, Ag₂S, Sb₂S₃, and Bi₂S₃ particles as sensitizers for various nanoporous wide-bandgap semiconductors. *J Phys Chem*, 2002, 98: 3183–3188
- 42 Gelderman K, Lee L, Donne S W. Flat-band potential of a semiconductor: using the Mott-Schottky equation. *J Chem Educ*, 2007, 84: 685
- 43 Cestellos-Blanco S, Zhang H, Kim J M, et al. Photosynthetic semiconductor biohybrids for solar-driven biocatalysis. *Nat Catal*, 2020, 3: 245–255
- 44 Stams A J M, Plugge C M. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7: 568–577
- 45 Jo W K, Kumar S, Tonda S. N-doped C dot/CoAl-layered double hydroxide/g-C₃N₄ hybrid composites for efficient and selective solar-driven conversion of CO₂ into CH₄. *Compos Part B-Eng*, 2019, 176: 107212
- 46 Xu H Q, Hu J, Wang D, et al. Visible-light photoreduction of CO₂ in a metal-organic framework: boosting electron-hole separation via electron trap states. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 13440–13443
- 47 Zhang R, He Y, Yi J, et al. Proteomic and metabolic elucidation of solar-powered biomanufacturing by bio-abiotic hybrid system. *Chem*, 2020, 6: 234–249
- 48 Cheng L, Zheng Z Z, Wang C, et al. Recent advances in methanogens. *Microbiol China*, 2016, 43: 1143–1164 [承磊, 郑珍珍, 王聪, 等. 产甲烷古菌研究进展. *微生物学通报*, 2016, 43: 1143–1164]
- 49 Brown K A, Wilker M B, Boehm M, et al. Characterization of photochemical processes for H₂ production by CdS nanorod-[FeFe] hydrogenase complexes. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 5627–5636
- 50 Lovley D R. The hydrogen economy of *Methanosarcina barkeri*: Life in the fast lane. *J Bacteriol*, 2018, 200: JB.00445-18
- 51 Hola K, Pavliuk M V, Németh B, et al. Carbon dots and [FeFe]-hydrogenase biohybrid assemblies for efficient light-driven hydrogen evolution. *ACS Catal*, 2020, 10: 9943–9952
- 52 Kornienko N, Sakimoto K K, Herlihy D M, et al. Spectroscopic elucidation of energy transfer in hybrid inorganic-biological organisms for solar-to-chemical production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 11750–11755
- 53 Kulkarni G, Mand T D, Metcalf W W. Energy conservation via hydrogen cycling in the methanogenic archaeon *Methanosarcina barkeri*. *MBio*, 2018, 9: e01256-18
- 54 Lueders T, Chin K J, Conrad R, et al. Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase alpha-subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. *Environ Microbiol*, 2001, 3: 194–204

Visible light-driven *Methanosarcina barkeri*-natural carbon-based semiconductor for methane production

ZHANG YiYun¹, REN GuoPing¹, HU AnDong¹, JIN ShuGuang², YE Jie¹ & ZHOU ShunGui¹

¹ College of Resources and Environment, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

² Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

The reduction of carbon dioxide to methane with high calorific values by a semi-artificial photosynthetic system (nonphotosynthetic microorganism-semiconductor biohybrids) contributes to the alleviation of the global greenhouse effect and energy crisis. As a key component, the structure and properties of semiconductor nanoparticles significantly affect the biohybrid performance. In this study, rape pollen is used as the raw material to successfully construct *Methanosarcina barkeri*-natural carbon-based semiconductor biohybrids (*M. barkeri*-NCS) for carbon dioxide reduction to methane. The results indicate that the prepared natural carbon-based semiconductors have distinct advantages, such as a good visible light response and a large pore volume. Meanwhile, the *M. barkeri*-NCS biohybrids have excellent photoelectrical properties, and the methane yield of which reaches up to $51 \pm 4.5 \mu\text{mol/g}$ under visible light irradiation ($1.0 \pm 0.2 \text{ mW/cm}^2$). The performed real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis further reveals that the genes related to the membrane-bound hydrogenase and cytochrome of *M. barkeri*, especially EchB (2.47 ± 0.25 times) and VhtC (2.83 ± 0.15 times), are significantly up-regulated, indicating their key roles in photoelectron transfer, trap, and utilization. The results are expected to provide theoretical support for constructing an efficient semi-artificial photosynthetic system.

photocatalysis, methanogenesis, biohybrid, *Methanosarcina barkeri*, natural carbon-based semiconductors

doi: [10.1360/SST-2020-0414](https://doi.org/10.1360/SST-2020-0414)