



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106164246 B

(45) 授权公告日 2020.09.25

(21) 申请号 201580016888.0

C12N 1/20 (2006.01)

(22) 申请日 2015.01.26

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106164246 A

(43) 申请公布日 2016.11.23

(30) 优先权数据

10-2014-0009820 2014.01.27 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016.09.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2015/000783 2015.01.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/111972 KO 2015.07.30

(73) 专利权人 西江大学产学协力团

地址 韩国首尔

(72) 发明人 李正国 金义镇

(74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理

有限公司 44224

代理人 刘培培

(51) Int. Cl.

C12N 1/00 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

Diksha Narhar Dani等.Isolation and characterization of a thylakoid membrane module showing partial light and dark reactions.《BBA》.2005,第1669卷(第1期),43-52.

Diksha Narhar Dani等.Isolation and characterization of a thylakoid membrane module showing partial light and dark reactions.《BBA》.2005,第1669卷(第1期),43-52.

Boris A. Feniouk等.Chromatophore vesicles of Rhodobacter capsulatus contain on average one FoF1-ATP synthase each.《Biophysical Journal》.2002,第82卷1115-1122.

Boris A. Feniouk等.Chromatophore vesicles of Rhodobacter capsulatus contain on average one FoF1-ATP synthase each.《Biophysical Journal》.2002,第82卷1115-1122.

审查员 周茂新

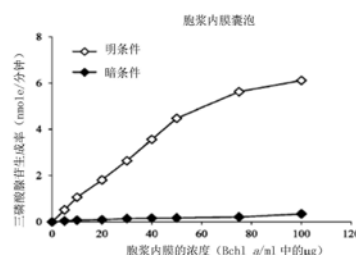
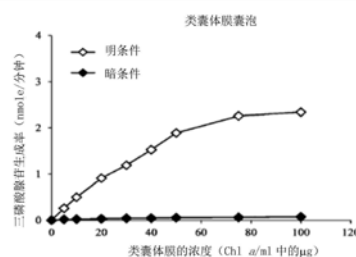
权利要求书2页 说明书13页 附图5页

(54) 发明名称

通过光合膜囊泡的三磷酸腺苷和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(磷酸盐)的持续生成方法

(57) 摘要

本发明涉及包含光合膜囊泡的用于生成光合光反应产物的组合物及通过利用所述组合物来生成所述光合光反应产物的方法。此外,本发明涉及用于制备光合光反应单元的方法,其包括从光合细菌或藻类的细胞膜中分离囊泡的步骤。



1. 用于生成光合作用中的光依赖性反应的产物的组合物,其包含从蓝细菌的类囊体膜中分离的光合膜囊泡和从紫色非硫细菌的胞浆内膜中分离的光合膜囊泡,

其中从蓝细菌的类囊体膜中分离的光合膜囊泡和从紫色非硫细菌的胞浆内膜中分离的光合膜囊泡吸收波长范围彼此不同的光,

其中所述光合作用中的光依赖性反应的产物为三磷酸腺苷(ATP)、经还原的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)和经还原的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述蓝细菌选自*Synechocystis* sp.、*Synechococcus* sp.、*Nostoc* sp.、*Anabaena* sp.、*Gloeobacter* sp.和*Cyanobacterium* sp.。

3. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述紫色非硫细菌选自*Rhodobacter* sp.、*Rhodospirillum* sp.、*Rhodopseudomonas* sp.、*Roseobacter* sp.、*Bradyrhizobium* sp.和*Rubrivivax* sp.。

4. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述波长范围彼此不同的光为可见光和红外光。

5. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述从蓝细菌的类囊体膜中分离的囊泡包含浓度为1μg叶绿素a/ml-1mg叶绿素a/ml的叶绿素a(Chl a)。

6. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述从紫色非硫细菌的胞浆内膜中分离的光合膜囊泡包含浓度为1μg细菌叶绿素a/ml-1mg细菌叶绿素a/ml的细菌叶绿素a。

7. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述从蓝细菌的类囊体膜中分离的光合膜囊泡和所述从紫色非硫细菌的胞浆内膜中分离的光合膜囊泡具有1-500nm的直径。

8. 光依赖性反应发生单元,其包含根据权利要求1的用于生成光合作用中的光依赖性反应的产物的组合物。

9. 生成光合作用中的光依赖性反应的产物的方法,其包括一起向从蓝细菌的类囊体膜和从紫色非硫细菌的胞浆内膜中分离的光合膜囊泡照射光,

其中所述光合作用中的光依赖性反应的产物为三磷酸腺苷(ATP)、经还原的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)和经还原的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH),

其中从蓝细菌的类囊体膜中分离的光合膜囊泡和从紫色非硫细菌的胞浆内膜中分离的光合膜囊泡吸收波长范围彼此不同的光。

10. 通过利用光合膜囊泡来生成光合作用中的光依赖性反应的产物的方法,其包括:

- 1) 从蓝细菌的类囊体膜(TM)和紫色非硫细菌的胞浆内膜(ICM)中分离光合膜囊泡;
- 2) 制备包含有所分离的光合膜囊泡的光依赖性反应发生单元;及
- 3) 向所述光依赖性反应发生单元照射光,

其中从蓝细菌的类囊体膜中分离的光合膜囊泡和从紫色非硫细菌的胞浆内膜中分离的光合膜囊泡吸收波长范围彼此不同的光,其中所述光合作用中的光依赖性反应的产物为三磷酸腺苷(ATP)、经还原的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)和经还原的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)。

11. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于,所述NADH能被转化成NADPH,而不需要附加酶处理。

12. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于,所述NADPH能被转换而成NADH,而不需要

附加酶处理。

13. 根据权利要求9或10所述的方法,其特征在于,所述光具有可见或红外范围内的波长。

14. 制备光合光反应发生机构的方法,其包括:

从蓝细菌的类囊体膜和紫色非硫细菌的胞浆内膜中分离光合膜囊泡,

其中从蓝细菌的类囊体膜中分离的光合膜囊泡和从紫色非硫细菌的胞浆内膜中分离的光合膜囊泡吸收波长范围彼此不同的光。

15. 根据权利要求14所述的方法,其特征在于,从蓝细菌的类囊体膜和紫色非硫细菌的胞浆内膜中分离光合膜囊泡包括:

(1) 通过粉碎蓝细菌或紫色非硫细菌来制备细胞裂解物;

(2) 在蔗糖密度梯度下通过离心分离来从所述细胞裂解物中含有的类囊体膜和胞浆内膜分离光合膜囊泡。

16. 根据权利要求15所述的方法,其特征在于,所述粉碎是通过利用玻璃珠或超声波进行。

17. 根据权利要求15所述的方法,其特征在于,所述蔗糖浓度为5-50%。

18. 根据权利要求15所述的方法,其特征在于,所述离心分离是以50,000-500,000g进行20分钟-24小时。

通过光合膜囊泡的三磷酸腺苷和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(磷酸盐)的持续生成方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于生成光合作用中光依赖性反应的产物的包含光合膜囊泡的组合物及通过利用该组合物的光合作用中光依赖性反应的产物的持续生成方法。

背景技术

[0002] 现代产业的结构只能让化学能源中的大部分原材料和能源化石燃料依赖于化石燃料,而别无他选。化石燃料的量是有限的,且化石燃料的使用会引发各种环境问题和经济问题。这种环境下,持续在进行新型的可替代化石燃料的再生能源的研究,且利用太阳光的能源生成技术对应于一种人类应于依赖的终极的能源技术。将光转化成化学或电能的光能利用技术通过利用各种方法可以得以实施,其中体内光合作用待3.5亿年的进化后以获得现有的发光能力告终。

[0003] 光合作用发生在植物体内,还发生在海藻和各种微生物体内。这种光合作用基于电子供体大致分为产氧光合作用与不产氧光合作用。所述产氧光合作用发生在植物、海藻、蓝细菌等体内,且其特征在于从座位电子供体的水(H_2O)中生成氧。这种产氧光合作用发生在植物和海藻的微生物和叶绿体内存在的独特的膜结构类囊体膜内。光能够激发电子来诱发一系列电子流,且在这种电子流中,质子会通过膜进行传递而形成膜的内外空间之间的质子浓度梯度。其结果,所述质子浓度梯度会通过ATP合酶的作用而合成三磷酸腺苷(ATP)。此外,这种电子流被传递至铁氧还蛋白,而最终将烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸($NADP^+$)还原成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)的还原形式。其中,所生成的NADPH可通过吡啶核苷酸转氢酶(Pnt)的作用转化成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)的还原形式。

[0004] 已知,不产氧光合作用发生在紫色非硫细菌、紫硫细菌、绿非硫细菌、绿硫细菌和Heliobacteria体内,而在此过程中不会生成氧分子,这与产氧光合作用不同。特别地,在紫色非硫细菌内,这种光合作用机制会发生在陷入于细胞内的胞浆内膜内。在细菌的胞浆内膜内存在的反应中心(reaction center)中,光化学反应是由光能引起的,从而诱导循环电子传递。在此过程中,通过利用质子浓度梯度作为推动力及在ATP合酶的作用下从二磷酸腺苷(ADP)和无机磷酸盐中合成ATP。然而,通过存在于胞浆内膜内的复合物I会发生质子往相反于胞浆内膜的方向传递的反向电子流,腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)被还原为NADH。然后,在同样存在于胞浆内膜内的琥珀酸脱氢酶(复合物II)的作用下,在琥珀酸被还原成富马酸的过程中失去了电子的苯醌(quinone)将重新获得电子。如产氧光合作用一样,在吡啶核苷酸转氢酶的作用下,由该机制产生的NADH可被转化成NADPH。

[0005] ATP和NAD(P)H用作调解各种体内生化反应的酶的辅因子。因此,在活体内,需要持续合成ATP和NAD(P)H,而这些用于生成这种消耗各种代谢物质中的能源的辅因子的酶反应是已知的。作为代表性的实施例,在糖酵解和柠檬酸(或TCA)循环中通过相关酶的作用来产生ATP和NADH。此外,已知有用于体外生化反应的合成ATP和NAD(P)H的方法。为了ATP合成,通过利用磷酸盐和磷酸肌酸激酶的方法是已知的。磷酸肌酸激酶能通过将磷酸肌酸的磷酸

基传递给ADP来调解用于ATP合成反应。也就是说,该酶是通过消耗所述磷酸肌酸来从ADP合成ATP的。此外,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶能通过消耗葡萄糖-6-磷酸调解 NADP^+ 还原成NADPH。然而,当这种反应实际应用在于产生有用的基质的体外酶反应时,不得不持续提供所述磷酸肌酸或耗葡萄糖-6-磷酸,导致生产成本的极增,但实操性低。

[0006] 韩国专利申请10-2011-7017135的发明在于用于再生ATP的分离的组合物可包含类囊体膜。然而,为了在类囊体膜内进行光合磷酸化来产生ATP,需要形成质子浓度梯度,但用平面膜不可能实现,因为不是囊泡型膜而不能空间上分开内外空间。事实上,上述申请没有公开通过所述类囊体膜产生ATP的结果。此外,上述发明也没有公开通过所述类囊体膜生成NAD(P)H的方法。

[0007] 此外,韩国专利申请10-2008-0021127的发明在将分离的类囊体膜用作活性组分的方面与本发明相似,但不同的是上述发明的主要特点在于公开了通过对胰脂肪酶的类囊体膜的抑制成分而让人有饱腹感来控制肥胖的方法。

[0008] 背景技术中公开的内容仅仅是用来帮助理解本发明的背景,从而本领域的技术人员不应当将之接受为对应于已知的传统技术。

发明内容

[0009] 技术问题

[0010] 发明人曾试图找到通过利用光合细菌如蓝细菌或紫色非硫细菌或藻类持续生成在光合作用中的光依赖性反应的产物如ATP和NAD(P)H的方法。最终,发明人确定了,当光合光反应发生机构被配置成从细菌或藻类的细胞膜中仅分离出囊泡时,在有电子供体时可以持续生成光合作用中的光依赖性反应的产物,从而完成本发明。

[0011] 因此,本发明的目的在于提供一种用于生成光合作用中的光依赖性反应的产物的组合物,该组合物含有光合膜囊泡(photosynthetic membrane vesicle)。

[0012] 本发明的另一目的在于提供光依赖性反应发生单元体,该单元体包含用于生成光合作用中的光依赖性反应的产物的组合物。

[0013] 本发明的又一个目的在于提供一种制备所述光依赖性反应发生单元体的方法,该方法包括分离出光合膜囊泡。

[0014] 本发明的又一个目的在于提供一种生成所述光合作用中的光依赖性反应的产物的方法,该方法包括向所述光合膜囊泡照射光。

[0015] 通过本发明的具体的说明书、权利要求书及附图,将对本发明的其他目的和优点及逆行清楚的说明。

[0016] 技术方案

[0017] 根据本发明的一个方面,本发明提供一种包含光合膜囊泡的组合物以生成所述光合作用中的光依赖性反应的产物。

[0018] 根据本发明的另一方面,本发明提供一种生成所述光合作用中的光依赖性反应的产物的方法,该方法包括向所述光合膜囊泡照射光。

[0019] 本发明的发明人曾试图找到通过利用光合细菌如蓝细菌、紫色非硫细菌或藻类持续生成在光合作用中的光依赖性反应的产物如ATP和NAD(P)H的方法。最终,发明人确定,当光合光反应发生机构配置成从细菌或藻类的细胞膜中仅分离囊泡时,在没有除水之外的其

他附加电子供体或其他附加基质下也可以持续生成光合作用中的光依赖性反应的产物。

[0020] 这里使用的术语“光合膜囊泡”是指细胞膜-蛋白质复合体,该复合体可以从能够利用光能进行光合作用的光合细菌或藻类内以囊泡形式分离出来并能够在适当的光照下进行光合作用中的光依赖性反应。

[0021] 这里使用的术语“光合细菌”是指能够利用光能进行光合作用的细菌,且基于电子供体的种类可大致分为产氧光合细菌和不产氧光合细菌。

[0022] 产氧光合细菌的特征在于从作为电子供体的水(H₂O)中生成氧,藻类或蓝细菌为其中具代表性例子。藻类或蓝细菌具有类囊体膜(thylakoid membrane, TM),该膜为能够进行光合作用的特殊的细胞膜结构。

[0023] 这里使用的术语“类囊体膜囊泡”是指包括两种光合体系和诸多能够传递电子的蛋白的细胞膜单位。所述类囊体膜囊泡与常见的膜囊泡不同具有能利用光能从非光合细菌中生成ATP和NADPH的能力。

[0024] 根据本发明的一个示例性实施例,能够获得类囊体膜囊泡的蓝细菌选自*Synechocystis* sp.、*Synechococcus* sp.、*Nostoc* sp.、*Anabaena* sp.、*Gloeobacter* sp.和*Cyanobacterium* sp.。

[0025] 不产氧光合作用的特征在于在光合作用中不生成氧,典型地在紫色非硫细菌,紫硫细菌,绿非硫细菌,绿硫细菌和*Helio bacteria*中进行不产氧光合作用。尤其,在紫色非硫细菌中,所述光合作用机制发生在往细胞内陷进去的胞浆内膜(intracytoplasmic membrane, ICM)内。

[0026] 这里使用的术语“胞浆内膜囊泡”是指胞浆内膜的细胞膜单元,该单元包括反应中心、捕光复合物和许多能够传递电子的蛋白。所述胞浆内膜囊泡与常见的细胞膜囊泡不同可以利用光能生成ATP和NADH。

[0027] 根据本发明的一个示例性实施例,从中获得所述胞浆内膜囊泡的紫色非硫细菌选自*Rhodobacter* sp.、*Rhodospirillum* sp.、*Rhodopseudomonas* sp.、*Roseobacter* sp.、*Bradyrhizobium* sp.和*Rubrivivax* sp.。

[0028] 除了*Rhodobacter sphaeroides*之外,*Rhodobacter* sp.紫色非硫细菌还包括*Rhodobacter capsulatus*、*Rhodobacter apigmentum*、*Rhodobacter aestuarii*、*Rhodobacter blasticus*、*Rhodobacter changlensis*、*Rhodobacter azotoformans*、*Rhodobacter ovatus*、*Rhodobacter gluconicum*、*Rhodobacter johrii*、*Rhodobacter litoralis*、*Rhodobacter maris*、*Rhodobacter megalophilus*、*Rhodobacter vinaykumarii*、*Rhodobacter viridis*、*Rhodobacter massiliensis*、*Rhodobacter denitrificans*和*Rhodobacter veldkampii*。

[0029] 除了*Rhodospirillum rubrum*之外,*Rhodospirillum* sp.紫色非硫细菌还包括*Rhodospirillum centenum*、*Rhodospirillum indiensis*、*Rhodospirillum oryzae*、*Rhodospirillum photometricum*、*Rhodospirillum molischianum*和*Rhodospirillum sulfurexigens*。

[0030] 除了*Rhodopseudomonas palustris*之外,*Rhodopseudomonas* sp.紫色非硫细菌还包括*Rhodopseudomonas acidiphila*、*Rhodopseudomonas boonkerdii*、*Rhodopseudomonas faecalis*、*Rhodopseudomonas harwoodiae*、*Rhodopseudomonas julialichen*、

Rhodopseudomonas oryzae、*Rhodopseudomonas pangongensis*、*Rhodopseudomonas pentothentatexigens*、*Rhodopseudomonas rhenobacensis*和*Rhodopseudomonas thermotolerans*。

[0031] 除了*Roseobacter denitrificans*之外,*Roseobacter* sp.紫色非硫细菌还包括*Roseobacter litoralis*、*Roseobacter prionitis*。

[0032] 此外,*Rubrivivax* sp.紫色非硫细菌包括*Rubrivivax gelatinosus*。

[0033] 这里使用的术语“光合作用中的光依赖性反应的产应”是指通过能将光转化为化学能源的光合细菌或藻类的光依赖性反应所生成的产物,且该产物包含选自ATP、NADH和NADPH中的一种或多种光反应产物。

[0034] 本发明被设计成制备从光合细菌中分离出来的光合光反应发生单元而使之作为用于生成光合作用中的光依赖性反应的产物如能够进行各种生化反应的ATP和NAD(P)H的能量生成单元,当获得类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡后,允许在体外通过利用所分离出的光合作用特异性细胞膜囊泡进行所述光依赖性反应。

[0035] 在本发明中,光合作用的条件就是能够诱导光合细菌的光依赖性反应的条件,包括适当的光(波长和强度)、温度和空气组成,且本领域的技术人员可根据光合细菌的具体种类确定最佳条件。例如,藻类或蓝细菌的光合作用可在厌氧或好氧条件且约20-37℃温度下通过利用强度约为 $5-500\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ ($\mu\text{mole photons}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$)的光进行,优选地在400-700nm的波长范围内进行。为了满足这种波长范围,可以将荧光灯和LED灯作为光源使用。在一个示例性实施例中,所述蓝细菌的光合作用是在 $50\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 强度、有氧条件及30℃下利用白光(荧光)进行。紫色非硫细菌的光合作用也可以在约20-37℃、厌氧或微好氧条件下通过利用约3-300Watts/ m^2 的强度来进行,优选地在350-1000nm的波长范围内进行。其中,所述微好氧条件可限定为氧分压在5%以内的条件。为了满足这种波长范围,将白炽灯和卤素灯作为光源使用。在另一示例性实施例中,紫色非硫细菌的光合作用是在厌氧条件、30℃下通过利用15Watts/ m^2 强度的光来进行的。

[0036] 包含有蓝细菌或藻类的光反应机构的类囊体膜囊泡可通过利用光源并利用电子传递来在细胞内外空间内形成质子浓度梯度,且通过利用源自浓度梯度的动能作为对动力在ATP合成酶的作用下将ADP和无机磷酸盐转化成ATP。此外,在紫色非硫细菌的反应中心内,光化学反应是由光能诱导的,从而诱导出循环电子传递,且在ATP合酶的作用下通过利用所形成的质子浓度梯度作为推动力来合成ATP。图1展示了通过利用所分离出的类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡来测量ATP的合成效率的结果。在不向两种细胞囊泡提供光的暗条件下,ATP合成率低于能提供光的明条件,而基于该结果,可以确认由光生成的ATP中的大部分是光合作用中的光依赖性反应的产物。

[0037] 在本发明中,通过光反应检测用于生成ATP的类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡的最佳浓度。为此,所述类囊体膜囊泡是基于叶绿素a(Chl a)浓度被定量,且所述胞浆内膜囊泡是基于细菌叶绿素a(Bchl a)浓度被定量。

[0038] 从藻类或蓝细菌的类囊体膜囊泡中分离出来的囊泡内的叶绿素a浓度可以为 $1\mu\text{g}$ 叶绿素a/ml- 1mg 叶绿素a/ml,优选为 $5\mu\text{g}$ 叶绿素a/ml- $200\mu\text{g}$ 叶绿素a/ml。当叶绿素a的浓度少于上述范围时,没有充分地进行光合作用,且ATP和NAD(P)H的生成率较低。当叶绿素a的浓度大于上述范围时,由于有限的光通透性,ATP和NAD(P)H的生成效率不再上升并达到饱

和。

[0039] 此外,从紫色非硫细菌的胞浆内膜囊泡中分离出来的囊泡内的细菌叶绿素a浓度为1 μ g细菌叶绿素a/ml-1mg细菌叶绿素a/ml,优选为5 μ g细菌叶绿素a/ml-200 μ g细菌叶绿素a/ml。当细菌叶绿素a的浓度少于上述范围时,没有充分地进行光合作用,且ATP和NAD(P)H的生成率较低。当细菌叶绿素a的浓度大于上述范围时,由于有限的光通透性,ATP和NAD(P)H的生成效率不再上升并达到饱和。

[0040] 图2展示了根据所添加的类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡的浓度的ATP合成效率,且通过上述方法确定所述浓度。最终,在两种所述细胞囊泡内,根据所加入的囊泡的浓度,ATP合成率得到了提高,且展示了ATP合成率在超过一定的囊泡浓度时会达到饱和。这表明,由于光合机构的光吸收特性,当存在所述光合机构的高浓度时光通透性会下降,从而高于适当浓度的所述光合膜囊泡的使用是低效的。由于所述光合膜囊泡的最佳使用浓度还能与相对应的光响度成比例地得到提高,本领域的技术人员根据研究和研发目的并考虑提供光能的条件,可以确定并应用所述光合膜囊泡的最佳浓度。

[0041] 根据本发明的一个示例性实施例,本发明的组合物同时包含从藻类或蓝细菌的类囊体膜囊泡中分离的囊泡和从紫色非硫细菌的胞浆内膜囊泡中分离的囊泡。

[0042] 由于类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡具有不同的吸收波长,没有被其中一种囊泡吸收的波长范围的光能会被另一种囊泡吸收进去。因此,当光反应是通过同时利用两种光合膜囊泡来诱导时,在有限的空间内以相对较高的效率合成ATP。图3展示了基于上述预期当仅利用胞浆内膜囊泡来生成ATP时和当同时利用两种的类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡来生成ATP时所测量的ATP合成效率。其结果为,当加入两种光合膜囊泡时,ATP合成效率会更高。这表明,由于所述两种光合膜囊泡只吸收不同波长的光,当同时使用两种光合膜囊泡时,比起使用高浓度的一种光合膜囊泡,可以发生更有效的ATP合成。

[0043] 因此,当本发明的组合物同时包含从藻类或蓝细菌的类囊体膜囊泡中分离的囊泡和从紫色非硫细菌的胞浆内膜囊泡中分离的囊泡时,不同范围的波长的光,例如,同时吸收可见波长带的光和红外波长带的光,从而以最高效率生成光合作用中的光依赖性反应的产物。

[0044] 在所述类囊体膜囊泡内光合作用过程中所发生的电子流会通过还原NADP⁺来产生NADPH。由此生成的NADPH是通过作为膜蛋白的吡啶核苷酸转氢酶(Pnt)的作用可被转化成NADH。为了检测所分离的类囊体膜囊泡能否在光照下合成ATP的同时还能还原NADH和NADPH,测量了NADH和NADPH的还原效率。为了测量所述NADPH的还原效率,通过在含有所述类囊体膜囊泡的反应溶液内仅加入NADP⁺,以及为了测量所述NADH的还原效率,通过在含有所述类囊体膜囊泡的反应溶液内加入NAD⁺和NADP⁺,来进行实验。图4展示了通过照射光所确定的类囊体膜囊泡内的NADH和NADPH的还原效率。其结果,在暗条件下的NADH和NADPH的还原率显著低于明条件下的NADH和NADPH的还原率,由上述结果可知,大部分所生成的NADH和NADPH为通过利用光的光合作用中的光依赖性反应的产物。根据图4,由于所述NADPH生成效率高于NADH生成效率,仅由所述类囊体膜囊泡构成的光反应单元可最适合于应用在诱导能够消耗ATP和NADPH的生物合成反应。由于NADH还可通过类囊体膜囊泡的核苷酸转氢酶(nucleotide transhydrogenase)的作用下生成,从而也可以实施通过各种附加尝试以增加核苷酸转氢酶活性来提高所述NADH生成效率的方法。

[0045] 在胞浆内膜囊泡内,与类囊体膜囊泡不同,已知NADH主要在光合作用中生成。此外,所生成的NADH可通过作为膜蛋白的吡啶核苷酸转氢酶(Pnt)的作用被转化成NADPH。为了研究所分离的胞浆内膜囊泡能否在光照条件下具有ATP合成活性的同时还能还原NADH和NADPH,检测了NADH和NADPH的还原效率。为了测量所述NADH合成效率,在反应溶液中仅加入琥珀酸酯和 NAD^+ ,但为了测量NADPH合成效率,同时加入琥珀酸酯、 NAD^+ 和 NADP^+ 。图5展示了所述胞浆内膜囊泡内的NADH和NADPH的合成效率的测量结果。在暗条件下的NADH和NADPH的合成率显著低于明条件下的NADH和NADPH的合成率,由此可确定,大部分所合成的NADH和NADPH是通过利用光的光合作用中的光依赖性反应的产物。在胞浆内膜囊泡内,如所预期,所述NADH生成效率相对高于NADPH生成效率,从而当所述光反应单元被构成仅包含所述胞浆内膜囊泡时,所得出的结论为所述光反应单元可有助于诱导能够消耗ATP和NADH的生物合成反应。

[0046] 然而,在胞浆内膜囊泡内的NAD(P)H产生过程中,需要使用作为电子供体的琥珀酸酯,这与类囊体膜囊泡的能力形成对比,因为类囊体膜囊泡是通过从水溶液中的水中获得电子来持续生成NAD(P)H,而不需要加入外部物质。因此,为了合成ATP,使用所述类囊体膜囊泡和使用胞浆内膜囊泡均无显著差异,但为了生成NAD(P)H,采用所述类囊体膜囊泡可能更有效。然而,由于所述类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡具有不同的吸收波长,当两种光合作用特异性细胞膜囊泡被一起使用以诱导光反应时,在有限空间内显示出更高效率。当在同时含有所述类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡的反应溶液中没有加入琥珀酸酯时,所述类囊体膜囊泡可生成ATP和NAD(P)H,且所述胞浆内膜囊泡只可以生成ATP。因此,基于本申请所提供的信息,本领域的技术人员根据研究和研发的目的可以确定所述类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡是分别加入还是同时加入。

[0047] 根据本发明的又一方面,本发明提供光依赖性反应发生单元,该单元包括用于生成光合作用中的光依赖性反应的产物的组合物。

[0048] 这里使用的术语“光依赖性反应发生单元”是指,能与光合细菌或藻类分别进行所述光合作用中的光依赖性反应的机构或装置中的一个单元,其中该单元包含一种组合物且该组合物包含所述光合膜囊泡,优选地含有选自类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡中的一种或多种经分离的囊泡。这些单元的组合可以构成一个大型集合体。

[0049] 根据本发明的一个示例性实施例,本发明涉及通过利用光合膜囊泡来生成光合作用中的光依赖性反应的产物的方法,该方法包括以下步骤:

[0050] 1) 从选自光合细菌或藻类的,优选为从蓝细菌或藻类的类囊体膜和紫色非硫细菌的胞浆内膜中的一种或多种细胞膜中分离囊泡;

[0051] 2) 构建包含有所分离的囊泡的光依赖性反应发生单元;和

[0052] 3) 通过向所述光依赖性反应发生单元照射光来生成所述光合作用中的光依赖性反应的产物。

[0053] 所述光依赖性反应发生单元可通过将所获得的囊泡简单地游离在水溶液中来制备,而这只可以显示暂时的效果。根据所述方法,可将相应产物聚集在所述反应溶液中,当回收所述产物时,包含在所述光反应单元内的囊泡的结构和功能可受损,从而该方法不可能是最优的。因此,通过利用各种类型和形状的具有小于所述类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡的孔径的膜如透析膜或滤膜,制备具有所获得的类囊体膜囊泡、胞浆内膜囊泡或两者

组合的单元,小于所述囊泡的所述光合作用中的光依赖反应的产物会通过所述透析膜或滤膜的孔隙,从而获得所述光合作用中的光依赖反应的产物,而不去破坏所述囊泡的结构和功能。由于从蓝细菌或藻类的类囊体膜中分离出的囊泡和从紫色非硫细菌的胞浆内膜中分离出的囊泡可具有1-500nm的直径,优选为10-200nm,因此孔径小于上述囊泡的透析膜或滤膜是有利的。

[0054] 此外,为了形成柱状反应容器,可以采用平面膜,且为了形成三维反应容器,可以采用空间形状的膜。此外,为了制备具有类囊体膜囊泡、胞浆内膜囊泡或它们的组合的光反应单元,除了对化学物质如塑料或乙烯基类塑料(vinyl)进行改性之外,可以使用通过将所述类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡固定在内部来制备所述光反应单元的纳米晶格结构。进一步,由于能与所述类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡的表面上的脂质或膜蛋白中的一种或多种相结合的物质被黏贴在反应容器结构的特定部位的表面上,所述光反应单元可以通过固定类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡来进行制备。

[0055] 根据本发明的又一方面,本发明提供制备光依赖性反应发生单元的方法,该方法包括从光合细菌或藻类中分离囊泡。

[0056] 囊泡的分离可以包括粉碎所述光合细菌或藻类破裂和从所粉碎的最终物中分离囊泡。

[0057] 在本发明中,为了从培养的光合细菌或藻类中分离所述类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡,对粉碎细胞的方法并没有特别限制,但优选地使用对光合作用特异性细胞膜的破坏减少到最低的物理方法。具体来讲,优选地使用通过强力混合玻璃珠的粉碎方法、通过使用超声波(超声)的粉碎方法和通过使用高压注射(使用法压壶)的粉碎方法。然而,通过使用如SDS的洗涤剂或如氯仿的有机溶剂的用于粉碎细胞的化学方法并不好,因为可以破坏所述囊泡膜的结构和功能。

[0058] 在本发明中,在所述光合细菌或藻类的粉碎之后,作为分离所述类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡的方法,可以使用通过利用蔗糖浓度梯度的离心分离法,从而根据所述光合作用特异性细胞膜的比重诱导分离,但不受特别限制。此外,由于所述类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡具有1-500nm的直径,优选为10-200nm,通过使用具有大于或小于所述囊泡的直径的空隙的各种类型和形状的膜的尺寸依赖性分离也可以是有用的替换方法。

[0059] 在通过利用蔗糖浓度梯度的离心分离中,所述蔗糖浓度可以为5-50%,且所述离心分离是在10-50%类囊体膜囊泡和5-35%胞浆内膜囊泡的蔗糖浓度梯度下优选进行的。当小于上述浓度范围时,蔗糖的比重低于所述光合膜囊泡的比重,从而无法进行离心分离。然而,当超过上述范围时,蔗糖的比重可能过高而无法进行离心分离。

[0060] 通过利用上述蔗糖浓度梯度的离心分离可以在50,000-500,000g下进行20分钟-24小时,且对于所述类囊体膜囊泡来说,优选地在100,000-400,000g下进行1-20小时,而对于胞浆内膜囊泡来说,优选地在60,000-200,000g下进行30分钟-10小时。当小于上述范围时,无法分离出普通的细胞膜和所述光合膜囊泡,因为它们同时存在于上清液的上部份,而当超过上述范围时,也无法分离出普通的细胞膜和所述光合膜囊泡,因为它们都被沉淀下来。

[0061] 从生物体中提纯高附加价值的生物材料如药物、保健食品的补充剂、化妆品成分等需要花费高昂的费用。因此,已尝试过研发一种通过利用相应的合成酶和前体在体外直

接制备这些有用的物质的工艺。当各种酶反应大多需要作为能源的ATP或NAD(P)H,即使化学合成ATP或NAD(P)H,或者通过利用常用酶再生成ATP和NAD(P)H,还应持续提供成为能源的基质,从而利用这些材料的工艺研发需要大量资金。根据本发明中所提供的生成ATP和NAD(P)H方法,该方法不像传统方法,可以在照射光的条件下通过利用光合膜囊泡来持续提供ATP和NAD(P)H,且在此过程中,除了水之外并不需要其他附加的电子供体,因此获得经济型的ATP或NAD(P)H生产。

[0062] 有益效果

[0063] 综上,本发明的特点及优势在于:

[0064] (1) 本发明提供包含光合膜囊泡的组合物来生成光合作用中的光依赖性反应的产物,以及提供通过利用所述组合物来生成光合作用中的光依赖性反应的产物的方法。

[0065] (2) 此外,本发明提供制备光依赖性反应发生单元的方法,该方法包括从光合细菌和藻类。

[0066] (3) 通过利用本发明的组合物,在照射光的条件下,可以使用光合膜囊泡来持续提供光合作用中的光依赖性反应的产物,当通过将从其他能吸收不同波长的光的来源的囊泡进行组合来构成光依赖性反应发生单元时,可以最大化所述光合作用中的光依赖性反应的产物的产量。此外,本发明的生成光合作用中的光依赖性反应的产物的方法不需要除了水之外的其他附加电子供体,因此获得经济型的ATP和/或NAD(P)H生产。

附图说明

[0067] 图1展示了通过利用类囊体膜(TM)囊泡或胞浆内膜(ICM)囊泡在光照射条件(明亮)和暗条件(黑暗)下研究的ATP生成水平。在各条件下,ATP生成率用nmole/min·mg蛋白来表示。

[0068] 图2展示了通过利用类囊体膜(TM)囊泡或胞浆内膜(ICM)囊泡在光照射条件(明亮)和暗条件(黑暗)下研究的ATP生成率。上图展示了利用类囊体膜囊泡的ATP生成率,下图展示了利用胞浆内膜囊泡的ATP生成率。所述类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡的浓度分别由叶绿素a(Chl a)浓度和细菌叶绿素a(Bchl a)浓度所确定。在各浓度条件下,所述ATP生成率用nmole/分钟来表示。

[0069] 图3展示了当同时使用具有不同吸收波长的类囊体膜囊泡或胞浆内膜囊泡时ATP合成效率的提高程度。所述类囊体膜(TM)囊泡和胞浆内膜(ICM)囊泡的浓度分别由叶绿素a(Chl a)浓度和细菌叶绿素a(Bchl a)浓度所确定。在不使用类囊体膜(TM)囊泡或使用固定浓度40μg Chl a/ml这两种条件下,加入不同浓度的胞浆内膜(ICM)囊泡后,通过利用具有广范围的波长和强度为15Watts/m²的白炽灯时测量ATP生成率,且所述值用nmole/分钟来表示。

[0070] 图4展示了通过使用类囊体膜囊泡在明条件和暗条件下还原NAD⁺和NADP⁺的效率。NADH和NADPH生成率用nmole/min·mg蛋白来表示。

[0071] 图5展示了通过利用胞浆内膜囊泡在明条件和暗条件下的还原NAD⁺和NADP⁺的效率。NADH和NADPH生成率用nmole/min·mg蛋白来表示。

具体实施方式

[0072] 下面,将进一步结合实施例详细说明本发明。这些实施例仅仅用来进一步详细解释本发明,因此根据本发明的精神,对本领域的技术人员显而易见的是本发明的范围不受这些实施例的限制。

[0073] 实施例1:蓝细菌的类囊体膜囊泡的分离

[0074] 为了分离包含蓝细菌(cyanobacterium)的光反应机构的类囊体膜囊泡,将*Synechocystis* sp.PCC 6803用作靶菌株。为了让所述菌株生长,使用经部分改性的BG11基本培养基【18mM硝酸钠(NaNO_3)、0.23mM钾磷酸一氢(K_2HPO_4)、0.30mM硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、0.24mM氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、31 μM 柠檬酸、23 μM 柠檬酸铁铵、0.19mM碳酸钠(Na_2CO_3)、8.8mM硫代硫酸钠、46 μM 硼酸(H_3BO_3)、14 μM 氯化锰(MnCl_2)、0.77 μM 硫酸锌($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、1.6 μM 钼酸钠($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、0.32 μM 硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)、0.17 μM 硝酸钴(II) ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Cratz and Myers.1955.Am.J.Bot.42:282-287)】,其中,为了让所述菌株快速生长,通过使用过滤器将灭菌后的葡萄糖加至形成10mM。将所述*Synechocystis*菌株接种于含有50ml的BG11基本培养基的300ml烧杯内,然后在有氧条件、30℃下以100rpm摇晃并进行培养。其中,使用具有强度约有50 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 的白色荧光灯。当所述菌株的在600nm下的光密度达到约1.0时,将所述菌株再次接种于含有500ml的BG11基本培养基的1L烧杯内,然后在上述生长条件下进行培养,使在600nm下的光密度达到约2.0。

[0075] 在光合作用条件下培养蓝细菌,然后在4℃下以约7,000g进行离心分离10分钟,而获得细胞粒,将这些细胞粒悬浮于约10ml的10mM Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液中且该缓冲液含有1mM EDTA,然后置于冰上。通过玻璃球将所悬浮的细胞进行粉碎,即在包含所述细胞的缓冲液内加入所述玻璃球至装满玻璃球,然后用力摇晃5次,每次2分钟(共10分钟),来粉碎所述细胞。这之后,在4℃下以约3,000g进行离心分离10分钟后,去掉未被粉碎的细胞、大细胞碎片和所述玻璃球。其中,从而获得的上清液包含各种水溶性细胞成分和细胞膜(包含囊泡),然后以100,000g离心分离30分钟,而获得总的细胞膜。然后,为了从所述总的细胞膜中分离所述类囊体膜囊泡,通过利用10-50%蔗糖浓度梯度以130,000g对所述样本进行离心分离15小时。从而分离的层中,获得对应于38-42%蔗糖浓度梯度的部分,然后通过以187,000g进行离心分离45分钟来浓缩。待离心分离后,将位于底层上的所述膜囊泡溶解在10mM Tris-HCl (pH7.5) 缓冲液内且该缓冲液包含0.25M蔗糖,然后通过使用dextran T-500和PEG 3350进行相分配法(Norling et al.1998.FEBS Lett.436:189-192),从而在底部的第5和第6层中获得因有蓝细菌的类囊体膜囊泡而显示绿色的部分。

[0076] 实施例2:紫色非硫细菌的胞浆内膜囊泡的分离

[0077] 为了分离包含紫色非硫细菌的光反应机构的胞浆内膜囊泡,将*Rhodobacter sphaeroides*2.4.1(ATCC BAA-808,Cohen-Bazire et al.1956.J.Cell.Comp.Physiol.49:25-68)用作靶菌株。为了让所述菌株生长,使用Sistrom基本培养基【20mM磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、3.8mM硫酸铵($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)、34mM琥珀酸、0.59mM L-谷氨酸)、0.30mM L-天冬氨酸、8.5mM氯化钠、1.05mM氨三乙酸、1.2mM氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、0.23mM氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、25 μM 硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、0.16 μM 钼酸铵($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、4.7 μM EDTA、38 μM 硫酸锌($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、9.1 μM 硫酸锰($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、1.6 μM 硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)、0.85 μM 硝酸钴(II) ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、1.8 μM 硼酸(H_3BO_3)、8.1 μM 烟酸、1.5 μM 盐酸硫胺、41nM生物素

(Sistrom.1962.J.Gen.Microbiol.28:607-616)】。将所述Rhodobacter sphaeroides菌株接种于含有30ml的Sistrom基本培养基的300ml烧杯内,然后在有氧条件、30℃下以250rpm摇晃并培养。当所述菌株的在600nm下的光密度达到约1.0时,将所述菌株接种于装有Sistrom基本培养基的1L透明容器内以防止氧气进入,然后在厌氧条件下通过利用强度为15Watts/m²的荧光灯培养至在600nm下的光密度达到约2.0。

[0078] 在4℃下,以约7,000g对在光合作用条件下培养的Rhodobacter sphaeroides细菌进行离心分离10分钟,而获得细胞粒,将这些细胞粒悬浮于约10ml的10mM Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液中且该缓冲液含有1mM EDTA,然后置于冰上。为了粉碎所悬浮的细胞,实施通过利用超声波(超声)的细胞粉碎方法,进行4次,每次5分钟(共20分钟)。这之后,在4℃下以约10,000g进行离心分离30分钟后,去掉未被粉碎的细胞和大细胞碎片。其中,从而获得的上清液包含各种水溶性细胞成分和细胞膜(包含囊泡),为了分离所述胞浆内膜囊泡,通过利用5-35%蔗糖浓度梯度以96,000g进行离心分离4小时。然后,从分离的多个层中获得显示褐色的包含胞浆内膜囊泡的部分,且所述胞浆内膜囊泡包含Rhodobacter sphaeroides的光合机构。

[0079] 实施例3:通过利用光合膜囊泡的ATP生成的确认

[0080] 在明条件下传递水中的电子的过程中,包含蓝细菌的光反应机构的类囊体膜囊泡会通过传递质子在所述膜的内外空间形成质子浓度梯度(proton concentration gradient),且通过利用源自质子浓度梯度的动能作为推动力在ATP合成酶的作用下将ADP和无机磷酸盐转化成ATP。同样地,Rhodobacter sphaeroides的反应中心内,通过光能来诱导光化学反应,从而诱导循环电子传递,且通过利用由此形成的质子浓度梯度作为推动力在ATP合成酶的作用下合成ATP。因此,在该实施例中,为了研究类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡是否在光条件下具有能够进行光依赖性反应的活性,测试了ATP合成效率。所述ATP合成效率可以通过各种可选择性地检测ATP的方法去评估(通常使用ATP定量方法,该方法是通过消耗ATP并利用该ATP作为推动力来转化透明基质的酶反应来对具有对应于特定波长的光密度或显示荧光性的最终产物进行实施),且本领域的技术人员基于研究和研发的目的可以确定用于评估所述效率的最佳方法。在本实施例中,作为用于定量ATP的方法,使用了ATP检测试剂盒(BioVision)。

[0081] 所述反应是在30℃下通过使用50mM PBS缓冲液(磷酸盐缓冲盐水,pH 7.4)并加入作为基质的ADP至形成浓度1mM来进行的。对所述类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡内分别含有的蛋白质的水平进行定量,从而确定这些蛋白质的浓度。对多次测量的ATP生成率的值进行标准化作为两种类型的细胞膜囊泡中分别含有的蛋白质的浓度。通过在570nm下光密度的变化来评估ATP合成程度,且通过使用各种浓度的ATP进行上述实施的实验来绘制标准曲线,从而可以将所测量的光密度值转化成ATP的产量。由此确定的ATP生成量用根据时间的值来表示,且所述ATP生成率用每分钟单位蛋白质的ATP生成值nmole来表示。图1展示了根据由上述方法所确定的类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡的ATP合成效率。两种细胞膜囊泡在无光照的暗条件下比起有光照的明条件下展示出更低的ATP合成率,由此结果可认为,大部分在该实施例中生成的ATP为光合作用中的光依赖性反应的产物。在本实施例中,为了测量所述类囊体膜囊泡的ATP合成效率,使用了强度为50μE/m²·s的荧光灯光,且为了测量所述胞浆内膜囊泡的ATP合成效率,使用了强度为15Watts/m²的白炽灯光。

[0082] 实施例4:根据光合细胞膜囊泡的浓度的ATP生成效率的实验

[0083] 通过光依赖性反应,将对所述类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡的用于生成ATP的最佳浓度进行确认。为此,制备各种浓度的经分离的类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡,然后如实施例3中所述的方法测量ATP合成率。在该实施例中,所述类囊体膜囊泡是基于叶绿素a的浓度进行定量,而所述胞浆内膜囊泡是基于细菌叶绿素a的浓度进行定量。通过利用含有丙酮和甲醇(比例为7:2)的混合溶剂对部分的所述经分离的类囊体膜囊泡或胞浆内膜囊泡进行提取,从而从所述囊泡中提取作为色素的叶绿素a或细菌叶绿素a。其中,在约660nm下测量所述叶绿素a的光密度,在约780nm下测量所述细菌叶绿素a的光密度,然后与已知浓度的叶绿素a或细菌叶绿素a一起代入所述标准曲线上,从而算出所述经分离的类囊体膜囊泡或胞浆内膜囊泡的浓度。

[0084] 图2展示了通过上述方法确认的所述类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡的浓度的ATP合成效率。其结果,两种细胞膜囊泡在明条件下随着浓度的增加均展示出提高的ATP合成率,而在暗条件下均展示出低的ATP合成程度。在所述类囊体膜囊泡内,浓度为约80 μ g叶绿素a时所述ATP合成率达到饱和,而在所述胞浆内膜囊泡内,浓度为约100 μ g细菌叶绿素a时所述ATP合成率达到饱和。该结果展示了有高浓度的光合机构时由于所述光合机构能够吸收光,从而降低光通透性,因此在适当或以上浓度的光合膜囊泡的使用是低效的。当增加光强度时,也可以增加所添加的光合膜囊泡的最佳浓度,通过考虑提供光能的条件,本领域的技术人员根据研究和研发的目的可以确认这里使用的所述光合膜囊泡的浓度。

[0085] 实施例5:具有不同吸收波长的两种光合细胞膜囊泡的ATP生成效率的实验

[0086] 所述类囊体膜囊泡吸收波长小于660nm和660nm左右的短波长,但所述胞浆内膜囊泡则直接在光合作用中使用波长在800-900nm范围内的光能。因此,当两种光合膜囊泡同时用来诱导所述光依赖性反应时,它们将分别吸收对应波长的光能,从而一个囊泡将不会影响另一个的光合效率。由此预期,可在有限空间内以相对较高的效率合成ATP。为了确认该项,在固定所分离的类囊体膜囊泡的浓度下,加入不同浓度的胞浆内膜囊泡,然后通过如实施例3中所述的方法测量ATP合成率。为了同时测量所述两种光合膜囊泡的ATP合成效率,使用强度为15Watts/m²的具有宽波长范围内的光能的白炽灯光。图3展示了当通过仅用所述类囊体膜囊泡或同时使用所述类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡来生成ATP时测得的ATP合成效率。从所述胞浆内膜囊泡的浓度为超过60-80 μ g细菌叶绿素a的条件中,所述ATP合成率不再随着所加入的光合机构的浓度而增加,从而它的值达到了饱和。然而,在所述ATP合成率还没达到饱和已达到饱和的所有浓度下,通过添加所述两种光合膜囊泡来进行实验,从而获得相对较高的ATP合成率。该结果显示,所述两种光合膜囊泡吸收不同波长的光。进一步,为了避免因使用高浓度的其中任一种光合膜囊泡而使所述ATP合成率达到饱和,可以同时使用所述两种光合膜囊泡,从而以较高效率合成ATP。

[0087] 实施例6:通过使用类囊体膜囊泡的还原NADP⁺的实验

[0088] 在所述类囊体膜囊泡内,光照射过程中所发生的电子流会被传递至铁氧还蛋白,而通过还原NADP⁺最终生成NADPH。由此生成的NADPH在预期存在于所述细胞膜囊泡内的吡啶核苷酸转氢酶(Pnt)的作用下可被转化成NADH。这种NADH和NADPH对于体内的各种类型的生物合成来说是必需的,且已与ATP一起成为光合作用中光依赖性反应的核心产物。因此,在本实施例中,为了研究所分离的类囊体膜囊泡在明条件下具有ATP合成活性的同时是否

也能还原NADH和NADPH,评估了对NADH和NADPH的还原效率。对NADH和NADPH的还原效率可通过各种能选择性地检测所述两种物质的方法来进行评估(主要方法是,通过氧化NADH和NADPH并利用将该氧化物用作推动力来转化透明基质的酶反应,来诱导具有对应于特定波长的光密度或荧光的最终产物,然后测量该最终产物,从而定量NADH和NADPH),且本领域的技术人员根据研究和研发的目的可以确定所述最佳方法。在本实施例中,作为定量NADH和NADPH的方法,使用了NADH检测试剂盒(BioVision)和NADPH检测试剂盒(BioVision)。两种类型的试剂盒均被用来选择性地测量NADH和NADPH。

[0089] 在30℃下,通过使用50mM PBS缓冲液(磷酸盐缓冲盐水,pH 7.4)和含有作为基质的1mM NAD⁺和1mM NADP⁺的溶液进行反应。为了评估NADPH合成效率,在反应溶液内仅加入NAD⁺,但为了评估NADH合成效率,其中加入了NAD⁺和NADP⁺。通过对这里使用的类囊体膜囊泡内所含有的蛋白质进行定量,来确定所述蛋白质的浓度,然后将通过多次测量来获得的值标准化为所述类囊体膜囊泡内所含有的蛋白质的浓度值。根据在450nm下的光密度的变化,评估NADH和NADPH的合成程度,然后通过利用各种浓度的NADH和NADPH进行上述实施的实验来绘制标准曲线,从而可以将所测量的光密度值转化成NADH和NADPH的产量。由此确定的NADH和NADPH的产量用根据时间的值来表示,且所述NADH和NADPH的生成率用每分钟所生成的NADH和NADPH的nmole值表示。图4展示了当使用根据上述方法所确定的类囊体膜囊泡并照射强度为50μE/m²·s的荧光灯光时的NADH和NADPH的合成效率。其结果,NADH和NADPH的合成率在未照射光的暗条件下显著低于明条件下的合成率,由此可认为,在本实施例中生成的大部分的NADH和NADPH为通过利用光的光合作用中的光依赖性反应的产物。其结果,所述NADPH生成效率高于NADH生成效率,从而通过利用类囊体膜囊泡来生成光依赖性反应产物的方法可有利于诱导能消耗ATP或NADPH的生物合成反应。然而,从图4的结果还可以确认,在核苷酸转氢酶的作用下也可以产生相当水平的NADH,从而也适用于通过利用存在于类囊体膜囊泡内的核苷酸转氢酶的作用来诱导能够消耗NADH的生物合成。

[0090] 实施例7:通过使用胞浆内膜囊泡的还原NADP⁺的实验

[0091] 与用于产生ATP的光合磷酸化不同,在所述胞浆内膜囊泡内会发生反向电子流,琥珀酸在作为复合物II的琥珀酸脱氢酶的作用下被转化成富马酸,然后通过复合物I将NADP⁺还原成NADH。由此产生的NADH如同在产氧光合作用一样在吡啶核苷酸转氢酶(Pnt)的作用下可被转化成NADPH。因此,在本实施例中,为了确认所分离的胞浆内膜囊泡在明条件下具有ATP合成活性的同时能否还原NADH and NADPH,根据实施例6中所述的方法评估NADH and NADPH的还原效率。

[0092] 在30℃下,通过使用50mM PBS缓冲液(磷酸盐缓冲盐水,pH 7.4)和含有作为基质的1mM NAD⁺和1mM NADP⁺的溶液进行反应。为了评估NADH合成效率,在反应溶液内仅加入NAD⁺,但为了评估NADPH合成效率,其中加入了NAD⁺和NADP⁺。通过对这里使用的胞浆内膜囊泡内所含有的蛋白质进行定量,来确定所述蛋白质的浓度,然后将通过多次测量而获得的值标准化为所述胞浆内膜囊泡内所含有的蛋白质的浓度值。图5展示了当使用根据上述方法所确定的胞浆内膜囊泡并照射强度为50μE/m²·s的白炽灯光时的NADH和NADPH的合成效率。其结果,与实施例6相类似,NADH和NADPH的合成率在未照射光的暗条件下显著低于明条件下的合成率,由此可认为,在本实施例中生成的大部分的NADH和NADPH为通过利用光的光合作用中的光依赖性反应的产物。相反的是,在胞浆内膜囊泡内,与实施例6中所示的结果不

同,NADH生成效率显著高于NADPH生成效率,从而通过利用胞浆内膜囊泡来生成光依赖性反应产物的方法可有利于诱导能消耗ATP或NADH的生物合成反应。然而,还可以确认的是,在核苷酸转氢酶的作用下也可以产生相当水平的NADPH,因此通过各种附加尝试来增强核苷酸转氢酶的活性,也可以提高NADPH生成效率。

[0093] 此外,虽然没有详细说明分别使用具有不同吸收范围的光能的通过同时使用类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡来提高NADH和NADPH合成效率的方法,但本领域的技术人员根据实施例5中所述的通过同时使用类囊体膜囊泡和胞浆内膜囊泡来提高ATP合成效率的方法可以容易的实现。

[0094] 以上,详细地描述了本发明的示例性实施例。本发明可被修改或实施成各种形式,从而仅详细描述了特定的实施例。然而,本发明不限于具体内容,应当理解的是本发明包括在本发明的技术精神和范围内的所有修改、等效物和替代物。

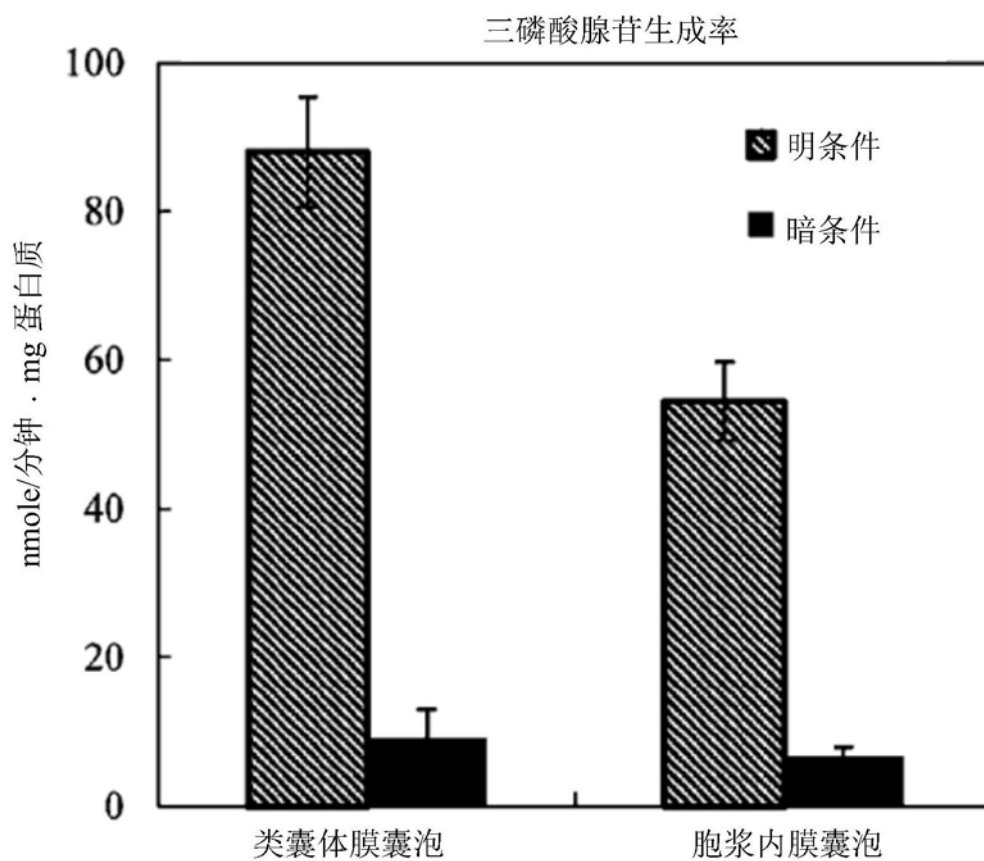


图1

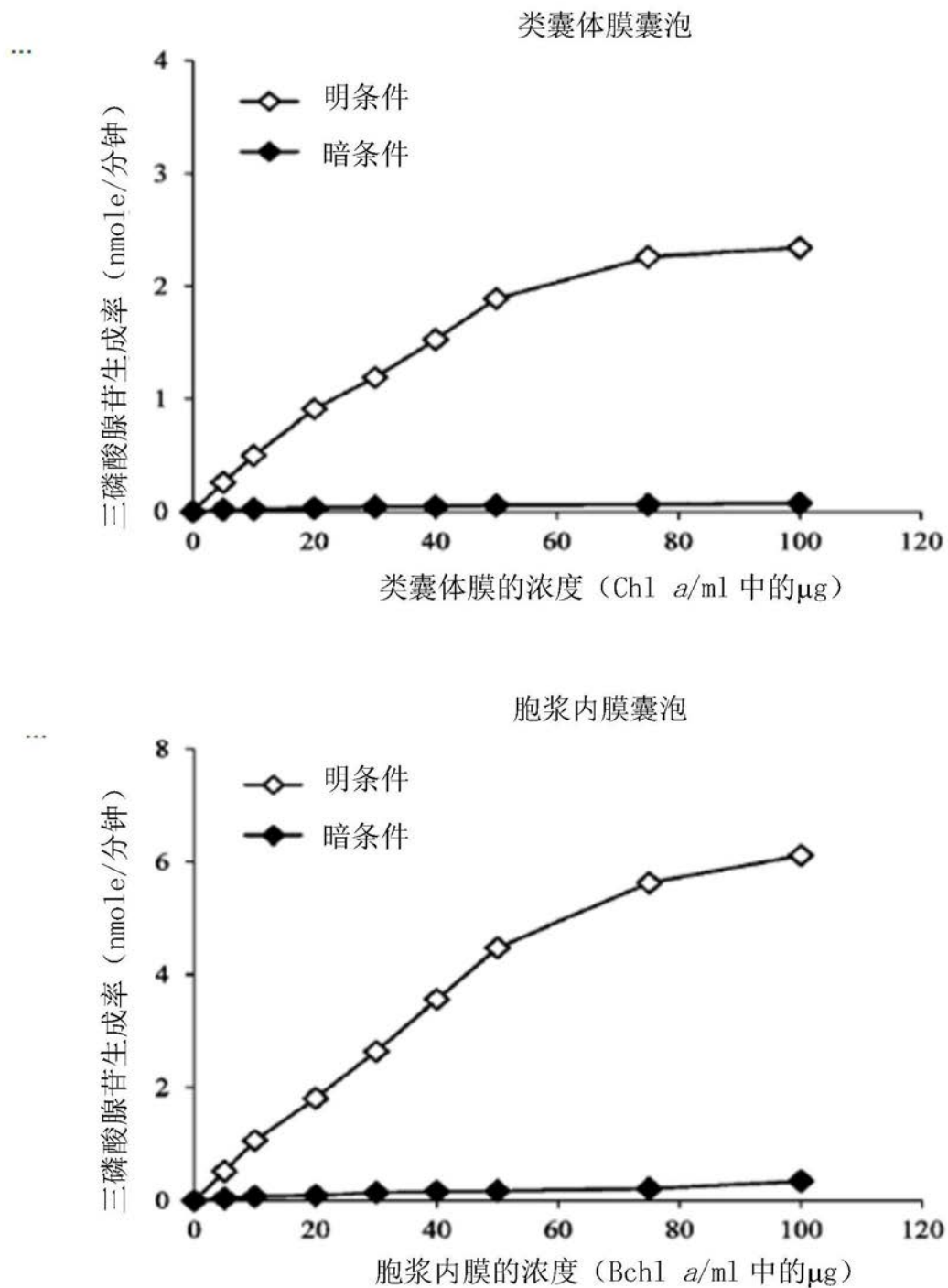


图2

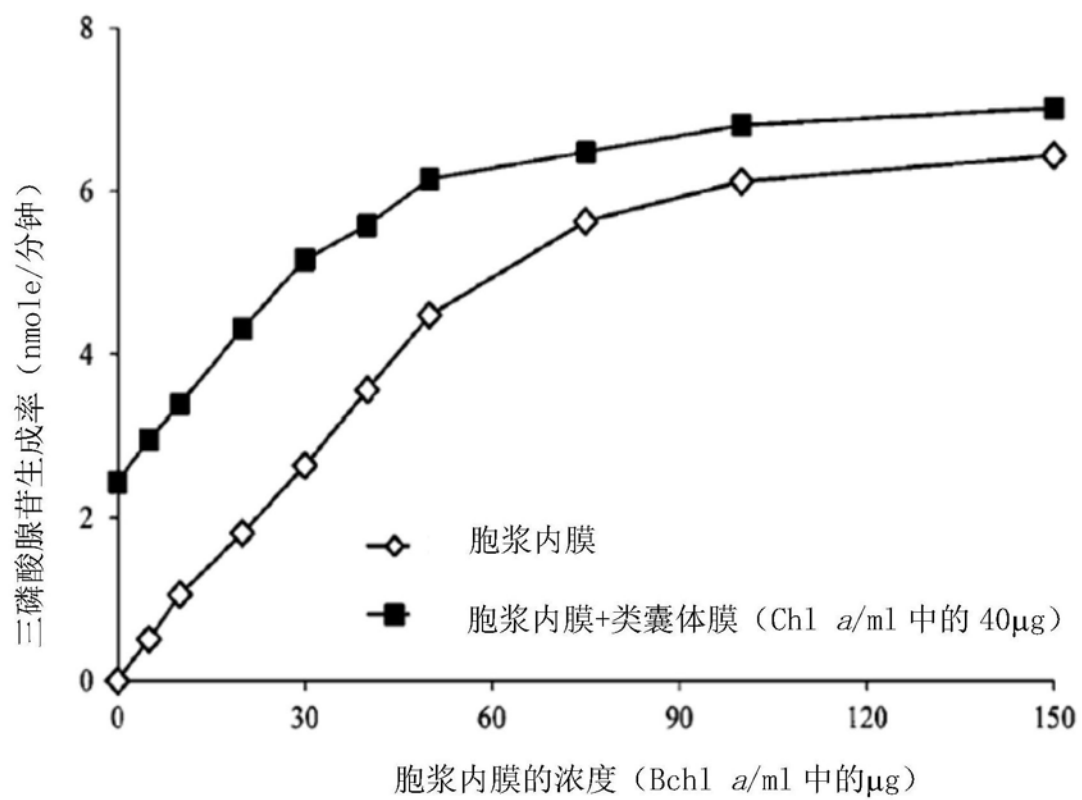


图3

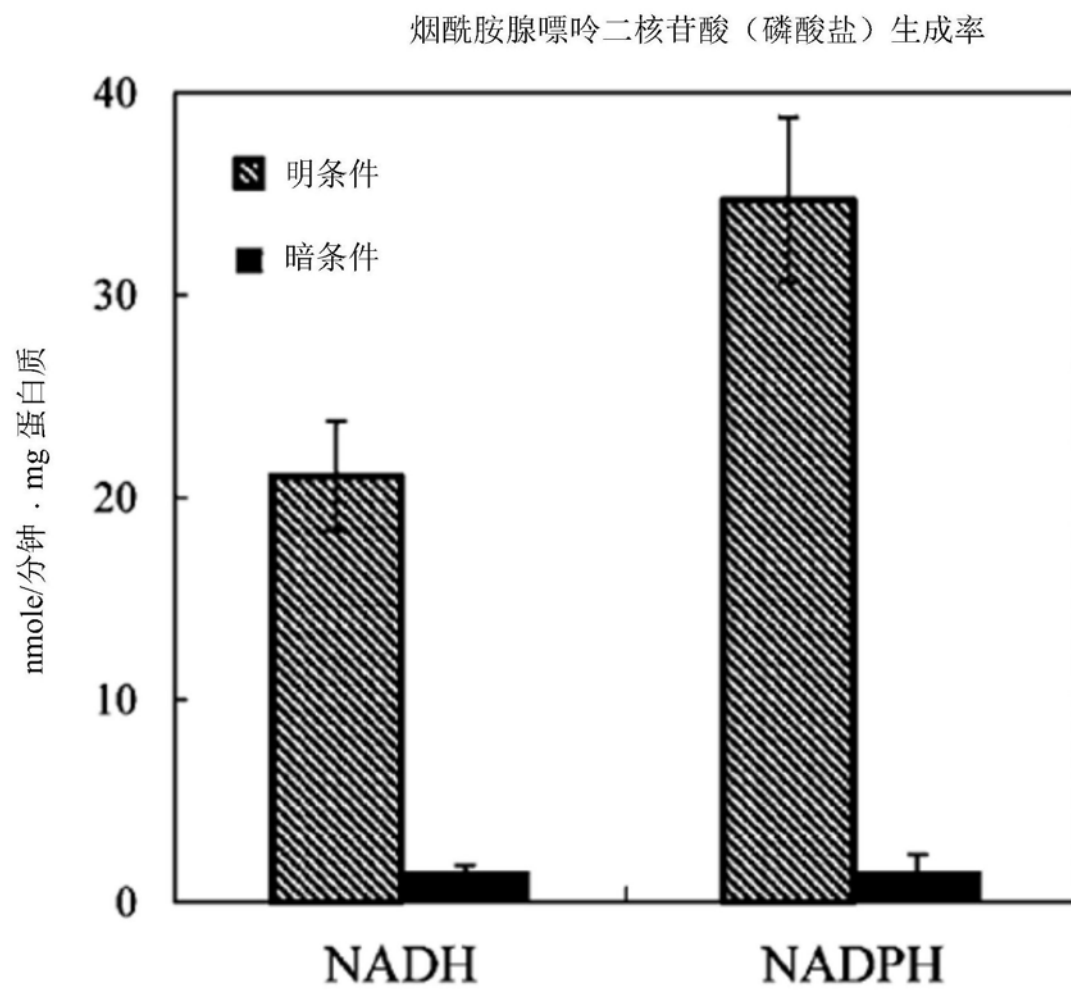


图4

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（磷酸盐）生成率

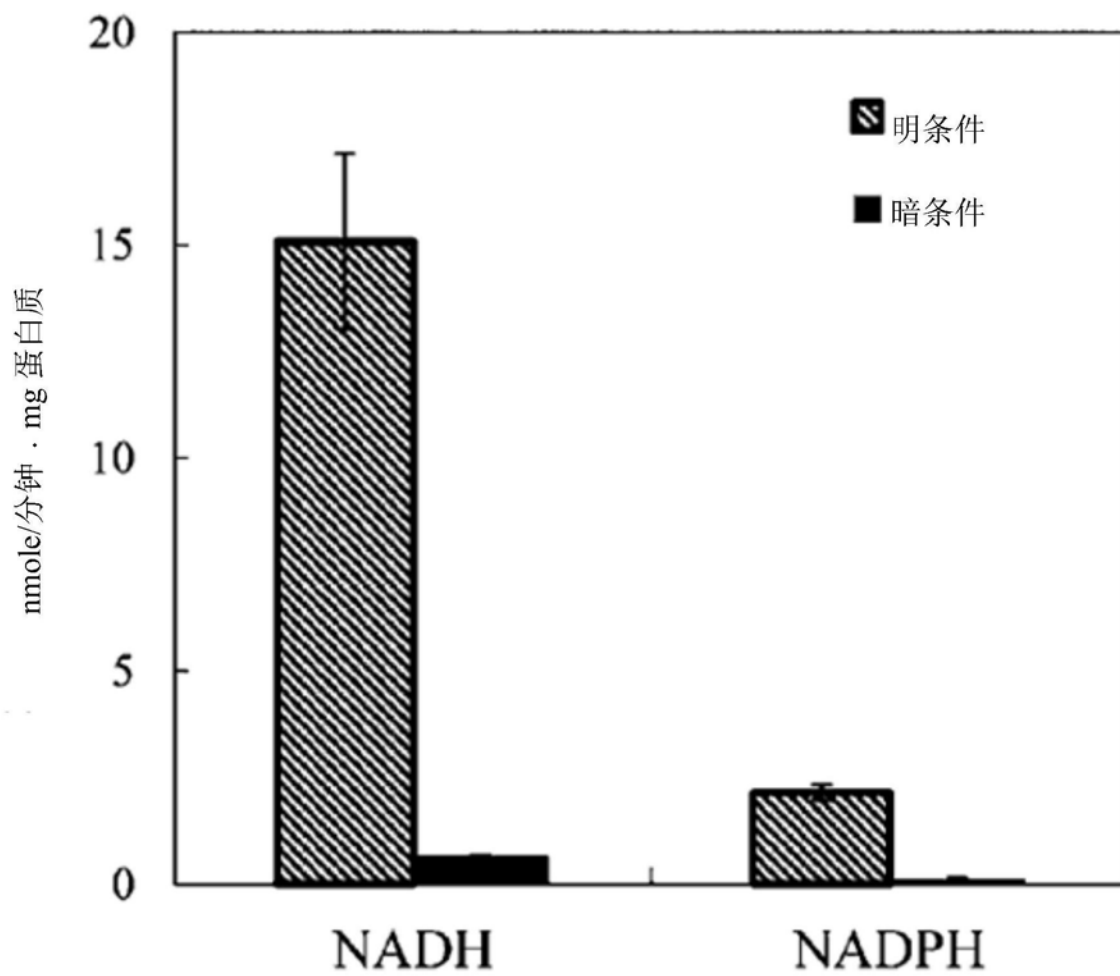


图5