

从代谢流量分析角度探讨培养条件改变下对放射型根瘤菌 WSH2601 合成辅酶 Q₁₀ 的影响

吴祖芳¹ 堵国成² 陈 坚^{2*}

(¹ 宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211)

(² 江南大学教育部工业生物技术重点实验室 无锡 214036)

摘 要 分析了放射型根瘤菌(*R. radiobacter*) WSH2601 生物合成辅酶 Q₁₀ 的代谢途径网络,并在溶氧条件改变和培养基中添加玉米浆条件下对辅酶 Q₁₀ 发酵细胞内代谢途径流量变化作定量的分析,结果表明:提高溶氧浓度(20%) 5-磷酸核酮糖(Ru5P)物流(r_7)增加 26.6,即糖酵解途径(EMP)途径向磷酸戊糖途径(HMP)转移,添加 1% 玉米浆 r_7 增加 17.2,EMP 与 HMP 途径物流比值与三羧酸循环(TCA)途径物流都下降,而癸异戊烯基焦磷酸(DPP)生成物流通量(绝对值)变化都较小,即辅酶 Q₁₀ 的生物合成更大程度地取决于辅酶 Q₁₀ 生物合成途径中催化 DPP 的合成和 4-羟基苯甲酸(PHB)与 DPP 的缩合反应的两关键酶活性。6-磷酸葡萄糖(G6P)节点是辅酶 Q₁₀ 生物合成代谢途径的柔性节点,而丙酮酸节点是半柔性节点。细胞生物量的提高与 HMP 途径物流增加有关。

关键词 辅酶 Q₁₀, 代谢流量分析, 培养条件, 机理

中图分类号 Q935 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2005)02-0231-05

代谢流量分析(Metabolic Flux Analysis, MFA)是一种通过对生物体内代谢流(或称代谢通量)的分布及其变化规律的了解,在一定的培养条件下计算流经各种代谢途径的相关代谢物质流量的技术。代谢流的研究有多种方法^[1,2],代谢流量测定常用同位素示踪方法,在缺乏相关代谢反应的动力学和调节信息时,可利用物料的质量守恒定律和对中间代谢物的拟稳态假设,结合实验测定数据计算出细胞内代谢流的分布情况^[3]。

辅酶 Q₁₀ 是一种细胞代谢激活剂,在心血管疾病治疗、抗氧化、抗肿瘤等许多方面具有重要功能^[4],微生物发酵的营养条件、环境条件(溶氧、pH 和温度)的改变,可引起 EMP 等途径的调节发生变化,甚至发生途径的转换^[5];另一方面,若能了解目的产物合成的主要代谢途径,对进一步研究支配产物合成的控制机构具有重要意义^[5-7]。

本文主要分析了 *R. radiobacter* WSH2601 生物合成辅酶 Q₁₀ 的代谢途径网络,并在培养条件改变情况下对细胞内代谢途径流量的变化作定量的分析,从而可深入地理解 *R. radiobacter* WSH2601 生物合成辅酶 Q₁₀ 过程中所呈现出的代谢行为和特征,为辅酶 Q₁₀ 发酵过程的进一步优化提供线索,同时也为下一步的

菌株改造指明方向。

1 材料和方法

1.1 菌种和培养基

1.1.1 出发菌株 放射型根瘤菌 WSH2601(*Rhizobium radiobacter* WSH2601), IAM1526 经复合诱变处理后得到,由江南大学环境生物技术研究室保存。

1.1.2 培养基 种子培养基及发酵基本培养基配方均参照文献[9]。

1.2 培养条件

种子培养、摇瓶培养和典型发酵试验条件的操作方法参照文献[9]进行。

1.3 分析方法

1.3.1 细胞干重(DCW)和辅酶 Q₁₀ 含量的测定 :参照文献[9]进行。

1.3.2 还原糖和溶氧浓度(DO)的测定 :参照文献[10]进行。

1.3.3 氨基酸浓度的测定 :采用 HPLC 分析法(1100HP, USA),色谱条件:Zorbax SB-C18 柱 4.0mm × 125mm;流动相为:A 相,20mmol/L NaAc 溶液;B 相,20mmol/L NaAc:甲醇:乙腈 = 1:2:2 (V/V),流速,1.0mL/min;柱温 25℃,紫外可见光检测器,338nm,

* 通讯作者。Tel: 86-510-5885727; E-mail: jchen@sytu.edu.cn

作者简介: 吴祖芳(1963-)男,浙江奉化人,副教授,工学博士,研究方向为微生物制药、食品生物技术。E-mail: wzfwpf@163.com

收稿日期: 2004-08-28, 修回日期: 2004-12-29

262nm(Pro)

1.3.4 有机酸的分析测定 :HPLC 分析法(1100HP , USA), 色谱条件 :Zorbax 反相 SB-C18 柱(5μm , 4.6mm × 150mm) ,流动相 0.01mol/L 磷酸缓冲液 ,流速 0.6mL/min ,紫外检测波长为 210nm。

1.4 代谢流研究的数学基础和代谢方程组的求解

代谢流研究的理论基础是物料的质量守恒定律 ,对中间代谢物进行物料恒算可采用拟稳态假设^[3] ,在某一代谢网络中 ,有 M 个代谢反应 ,N 种代谢产物 ,有 H 个物料流入或流出该代谢网络 ,则对第 i 种代谢物 ,根据质量守恒定律有如下质量守恒式 (1)

$$\frac{dC_i V}{dt} = \sum_{k=1}^H F_k C_{ik} + \sum_{j=1}^M \alpha_{ij} R_j \quad (i = 1, 2, 3, \dots, N)$$

经变换得到如下式 (2)

$$\sum_{j=1}^M \alpha_{ij} R_j = \frac{dC_i V}{dt} -$$

$\sum_{k=1}^H F_k C_{ik}$ 。式 (2)为代谢流分析中的代谢方程组 ;根据代谢网络模式图(图 1) ,共有 23 个代谢反应方程和 23 个未知数 ,24 维反应速率向量 ,方程组有唯一解。在已知实验条件下 ,可检测到的参数有葡萄糖、乙酸等有机酸、氨基酸(AA) 细胞生物量及辅酶 Q₁₀ 浓度等 ,二氧化碳的释放速率由碳平衡计算得到 ,最后反应速率可通过约束条件全部得到 ,即利用 MATLAB 软件编程 ,解出代谢反应方程组的解。

2 结果和讨论

2.1 R. radiobacter WSH2601 发酵生产辅酶 Q₁₀ 的合成机理与代谢网络的分析

辅酶 Q₁₀ 的微生物合成途径 ,分为芳香环(醌环) 合成及异戊烯基侧链的生物合成路线^[11] ,在细菌中

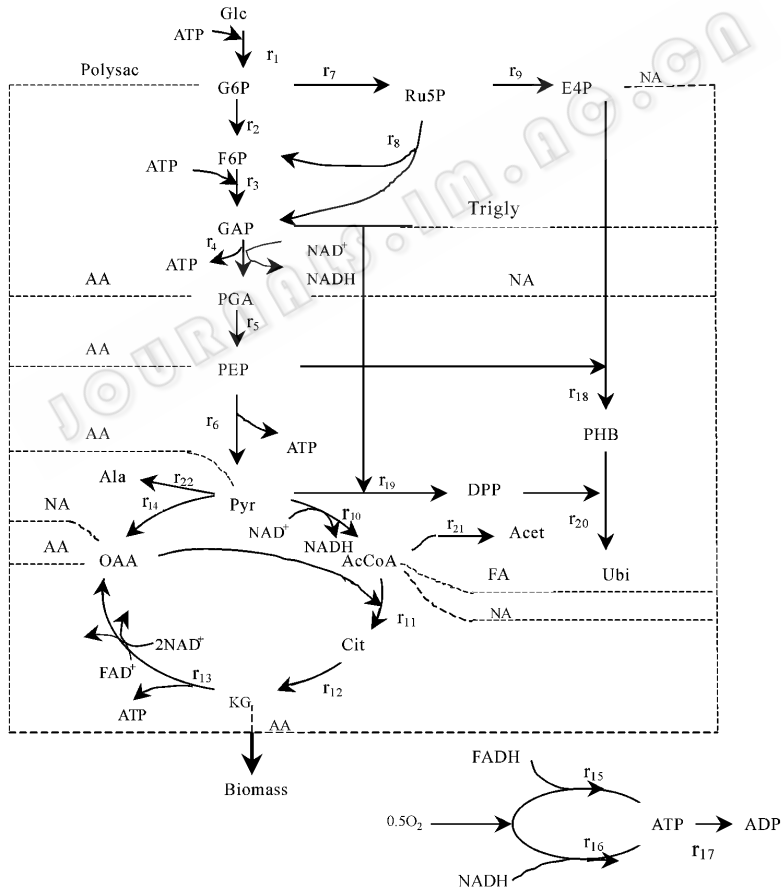


图 1 R. radiobacter WSH2601 发酵生产辅酶 Q₁₀ 的代谢网络模式图

Fig.1 Metabolic network mode of CoQ₁₀ production with R. radiobacter WSH2601

Abbreviations: AA, Amino acids; AcCoA, AcetylCoA; ADP, Adenosine diphosphate; ATP, Adenosine triphosphate; Cit, Citrate; DPP, Decaprenyl diphosphate; E4P, Erythrose 4-phosphate; FA, Fatty acids; FAD, Flavin adenine dinucleotide; FADH, Flavin adenine dinucleotide reduced; F6P, Fructose phosphate; GAP, Glyceraldehyde phosphate; Glc, Glucose; G6P, Glucose 6-phosphate; KG, α-ketoglutarate; NA, Nucleic acids; NADPH, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; OAA, Oxaloacetate; PEP, Phosphoenolpyruvate; PGA, Phosphoglycerate; PHB, Hydroxybenzoate acid; Polysac, Polysaccharides; PYR, Pyruvate; Ru5P, Ribulose phosphate; Trigly, Triglyceride; Ubi, Ubiquinone.

聚异戊烯基的合成主要通过 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸(2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate ,MEP)途径 ,醌环的合成主要由莽草酸途径(Shikimate Pathway)或分支酸途径(Chorismic Acid Pathway)(图 1)途径中的关键步骤由分支酸到 4-羟基苯甲酸(PHB)及 4-羟基苯甲酸-聚异戊烯基焦磷酸转移酶 ,后经苯环上羟基的甲基化 ,苯环上碳的甲基化 ,分别引入甲基 ,最后形成醌^[12,13]。

为了降低代谢网络的复杂性和减少代谢流量平衡方程而适于代谢流量分析 ,本文按以下原则简化复杂的代谢网络 (1)图 1 中对线性路径中的中间代谢物 ,按准稳态假定这些物质的生成与消耗速率相同 ,由此可简化为 1 个反应 (2)只列出主要代谢物质的流量平衡方程 (3)对每一个独立的代谢反应分开考虑。在此基础上 ,通过改变典型的培养条件对代谢流量的变化作出分析。

2.2 培养条件改变下的辅酶 Q₁₀ 发酵代谢流量分析

由前研究辅酶 Q₁₀ 发酵过程中细胞比生长速率、比产物生成速率的变化及其发酵过程曲线可知^[14] ,当发酵至第 30h 左右时 ,细胞生长处于对数期后期 ,生物量接近最大值 ,而辅酶 Q₁₀ 积累量也处在不断上升时期 ,即此时作为细胞内代谢流量分配变化的关键点 ,为本实验条件下的代谢流量分析的取样时间点。

微生物细胞中的糖酵解途径(EMP)、磷酸戊糖途径(HMP)和三羧酸循环(TCA)是糖降解以及细胞能量和还原力产生的重要形式 ,为了解这些反应过程在 *R. radiobacter* WSH2601 发酵生产辅酶 Q₁₀ 代谢过程中的地位和作用 ,设计实验条件为 A(基本发酵培养基 ,溶氧浓度控制在 50%)、B(基本发酵培养基 ,溶氧浓度控制在 70%)和 C(基本发酵培养基中加入玉米浆 10g/L ,溶氧浓度控制在 50%)^[5,7,15,16] ,并按 1.4 中的一些数学计算方法 ,最后经归一化得到辅酶 Q₁₀ 生物合成的代谢通量分布(表 1) ,代谢途径反应和 24 维反应速率向量略。由于 *R. radiobacter* WSH2601 用于生产辅酶 Q₁₀ 的代谢流量分析未见文献报道 ,细胞组分数据与部分代谢中间产物转换成细胞成分的转化系数值(C_i)参考文献 [16,17]。

在 A、B 和 C 3 种实验条件下 ,由代谢通量分配网络模型经 MATLAB 程序计算结果(表 1) ,所有涉及的不可逆代谢反应均未出现负的代谢通量 ,初步表明该代谢网络(图 1)构建的合理性。

表 1 *R. radiobacter* WSH2601 发酵生产辅酶 Q₁₀ 的代谢流分布

Table 1 Metabolic flux distribution of CoQ ₁₀ production at different culture conditions with <i>R. radiobacter</i> WSH2601			
Flux	A	B	C
r ₁	100	100	100
r ₂	87.81	60.62	70.14
r ₃	93.76	84.15	87.47
r ₄	94.24	88.78	90.61
r ₅	92.37	86.40	88.36
r ₆	89.10	82.25	84.41
r ₇	9.80	36.37	26.99
r ₈	7.29	29.30	21.55
r ₉	0.31	0.24	0.25
r ₁₀	65.70	52.28	55.95
r ₁₁	60.62	31.93	44.83
r ₁₂	60.54	31.87	44.83
r ₁₃	41.38	14.43	25.71
r ₁₄	19.09	24.90	23.69
r ₁₅	8.28	2.89	5.14
r ₁₆	76.93	61.91	67.78
r ₁₇	124.2	55.93	77.88
r ₁₈	0.09	0.07	0.08
r ₁₉	0.16	0.10	0.17
r ₂₀	0.17	0.11	0.19
r ₂₁	12.07	9.06	8.06
r ₂₂	1.21	0.54	0.43
r ₂₃	45.07	58.06	55.06

由 A→B 培养条件变化过程(即提高溶氧浓度)细胞生物量提高 ,辅酶 Q₁₀ 积累略有减少 ;由图 2 可以看出 ,6-磷酸果糖(F6P)和 3-磷酸甘油醛(GAP)物流(r₂、r₃)减少较明显 ,EMP 与 HMP 途径物流比(r₂/r₇)从 8.9 降低到 1.7 ,5-磷酸核酮糖(Ru5P)物流(r₇)增加显著达 26.6 ,说明 HMP 途径流量增加 ,TCA 途径物流(r₁₁、r₁₂ 和 r₁₃)有较大的减少 ,减少量分别达到 30、30 和 27 ,丙酮酸物流(r₆)略有减少 ,细胞生成物流(r₂₃)增加 ,而辅酶 Q₁₀ 的生物合成物流(r₂₀)减少。因此 ,上述变化过程表明 ,提高溶氧浓度可使 EMP 途径向 HMP 途径转移 ,通过 HMP 途径形成的中间产物在提供细胞菌体成分生物合成的碳骨架起到很重要的作用。

由 A→C 条件的变化过程(即添加玉米浆) ,细胞生物量和辅酶 Q₁₀ 发酵产量在同期内分别增加约 5g/L 和 5mg/L ,EMP 与 HMP 途径物流比值(r₂/r₇)从 8.9 降低到 2.6 ,Ru5P 物流(r₇)增加量也较大达 17.2 ,TCA 途径物流(r₁₁、r₁₂ 和 r₁₃)降低 ,比 A 条件下分别下降为 15.8、15.7 和 15.6 ,丙酮酸物流(r₆)略有减少 ,细胞生物量生成物流(r₂₃)增加 ,同样表明细胞生物量的提高与 HMP 途径物流增加有关 ,而辅酶 Q₁₀ 的生物合成物流(r₂₀)变化与 A→B 条件变化的结

果相反,从 0.17 提高到 0.19,但变化量不大。

在 $A \rightarrow B$ 和 $A \rightarrow C$ 变化条件下,两者都能提高细胞生物量,从 ATP 消耗用于维持细胞所需能量的物流(r_{17})变化来看,提高溶氧浓度, r_{17} 反而下降,减少量约 68,加入玉米浆条件下, r_{17} 减少量相对降低为 46,但在这两种变化条件下用于细胞物质合成的 ATP 消耗物流(r_{23})增加, r_{23} 流量值分别增加 13 和 10,这是因为在 $A \rightarrow B$ 和 $A \rightarrow C$ 条件变化情况下菌体细胞(如蛋白质、多糖、核酸和脂类等)的生物合成增加,从而使能量需求增加;ATP 生成反应物流(r_4 , r_6 和 r_{13})都呈下降趋势。

2.3 培养条件改变下 6-磷酸葡萄糖(G6P)等节点通量的分配

在上述培养条件变化下,从初级代谢途径重要节点代谢通量变化来分析(图 2),对于 G6P 节点,溶氧浓度提高时($A \rightarrow B$)代谢通量分配变化较明显,F6P 生成减少,进入 HMP 途径的流量显著增加,加入玉米浆时($A \rightarrow C$),上述流量变化相对减弱,因此 G6P 节点为柔性节点。同理,由表 1 数据,对于丙酮酸节点,培养条件变化时,丙酮酸节点流量发生了变化但不显著,因此,认为丙酮酸节点为半柔性节点。

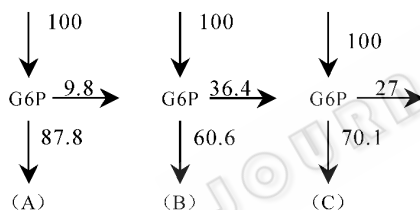


图 2 改变培养条件(A、B 和 C)时 G6P 节点通量的分配

Fig. 2 Flux partitioning of G6P node under different culture conditions

3 讨论

研究结果表明,当发酵体系溶氧浓度提高 20% 或加入 1% 玉米浆时,HMP 途径的代谢流量增加显著,EMP 途径、TCA 循环物流略有减少,但 HMP 途径中对辅酶 Q_{10} 生物合成有关的起始物质 4-磷酸赤藓糖(E4P)生成物流并没有显著增加,辅酶 Q_{10} 合成流量没有较大幅度的提高,那么,HMP 物流显著增加的碳源到哪里去了呢?这是因为一方面,Ru5P 增加后又转化为 F6P 和 GAP,进入 EMP 途径和 TCA 循环,另外 Ru5P 可转化 5-磷酸核糖(R5P),由此可合成嘌呤、嘧啶核苷酸,进一步合成核苷酸。因此,Ru5P 物流量增加为细胞菌体的生物合成提供更多的碳骨架,而不是主要由 TCA 循环途径产生的中间体提供。由代谢反应方程 r_7 可知, r_7 物流增加可生成较多的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH),为

细胞菌体的生物合成提供较强的还原力,NADPH 是合成脂肪酸、类固醇和谷氨酸的供氢体,在聚异戊烯合成中也可提供氢;由于细胞生长量提高时其 TCA 循环物流并没有增加,因此细胞物质合成的短链脂肪酸不是主要由 TCA 循环的中间产物提供。

在 A 实验条件下细胞维持所需能耗物流较大,ATP 消耗物流(r_{17})达 124.2,当溶氧浓度增大或加入玉米浆引起细胞生长速度加快时, r_{17} 减少显著,这是因为 ATP 用于细胞物质合成消耗的能量大大增加, r_{23} 值从 45 分别增加到 58 和 55,而 ATP 生成物流(如氧化磷酸化、TCA 循环等物流)并未增加,导致维持细胞所需的能量(ATP)消耗物流(r_{17})减少。由于微生物细胞自身的调节功能,如果 ATP 积累过多时会反馈抑制 EMP 途径中某些酶,从而又降低糖酵解速度,即引起 TCA 循环途径流量受阻。

对于癸异戊烯基二磷酸(DPP, C_{50})合成物流(r_{19}),溶氧浓度过高时 DPP 物流(r_{19})降低,相反,由 $A \rightarrow C$ 即发酵培养基中加入玉米浆后, r_{19} 增加,最后引起辅酶 Q_{10} 产量的提高,但从 DPP 生成物流通量绝对值大小来看,即使初级代谢流量改变较大的情况下,目的产物形成流量并未有大的改变,因此辅酶 Q_{10} 积累量的提高在很大程度上由催化缩合反应的酶(4-羟苯甲酸-聚异戊烯基焦磷酸转移酶)活性大小来决定,该酶活力大小是提高辅酶 Q_{10} 产量的瓶颈,这与文献 18 报道的结果一致,因此通过分子生物学手段改造代谢途径可较大幅度地提高辅酶 Q_{10} 的合成通量。

由上述研究结果可以得到,辅酶 Q_{10} 前体物质的合成是由 EMP、TCA 和 HMP 途径而来的,而过低的 EMP 与 HMP 物流会影响目标产物的合成量,因此,葡萄糖的代谢流在 EMP、TCA 和 HMP 之间的合理分配是获得最大产物合成量的前提。从细胞能量水平上来说,从中间物及 ATP 积累速率变化分析可知,*R. radiobacter* WSH2601 辅酶 Q_{10} 发酵的细胞体系能量维持不需太高。

4 结论

(1) 根据放射型根瘤菌 WSH2601(*R. radiobacter* WSH2601)生产辅酶 Q_{10} 的生物合成途径的代谢网络及 EMP、TCA 和 HMP 之间的代谢物流及其变动情况,认为代谢途径中生成 G6P、丙酮酸和磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)是辅酶 Q_{10} 生物合成代谢途径的主流途径。

(2) 培养条件的改变引起 EMP 途径与 HMP 途

径间流量平衡的较大改变,影响到细胞生长和辅酶 Q₁₀ 积累量的变化。细胞生物量的增加主要由 HMP 途径物流提供碳骨架和还原力;且代谢途径中物流的合理分配是目标产物最大量合成的前提;PHB 与 DPP 缩合反应速率是限制辅酶 Q₁₀ 产量提高的瓶颈。

(3)由代谢途径节点物流的变化,认为代谢途径中 G6P 节点是辅酶 Q₁₀ 生物合成代谢途径的柔性节点,而丙酮酸节点为半柔性节点。

参 考 文 献

- [1] de Noronha P P, Nielsen J, Bazin M J. Pathway kinetics and metabolic control analysis of a high-yielding strain of *Penicillium chrysogenum* during fed batch cultivations. *Biotech Bioeng*, 1996, **51**:168–176.
- [2] van Gulik W M, de Laat W T A M, Vinke J L, et al. Application of metabolic flux analysis for the identification of metabolic bottlenecks in the biosynthesis of penicillin-G. *Biotech Bioeng*, 2000, **68**(6):602–618.
- [3] Kauffman K J, Prakash P, Edwards J S. Advances in flux balance analysis. *Curr Opin Biotech*, 2003, **14**:1–6.
- [4] 吴祖芳,翁佩芳,陈 坚. 辅酶 Q₁₀ 的功能研究进展. 宁波大学学报, 2001, **14**(2):85–88.
- [5] Pfefferle C, Theobald U, Gurtler H, et al. Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *J Biotech*, 2000, **80**:135–142.
- [6] 张惠展. 途径工程——第三代基因工程. 北京:中国轻工业出版社, 2002, 11–17.
- [7] Upke C, Sinskey A J, Stephanopoulos G. Intracellular flux analysis applied to the effect of dissolved oxygen on hybridomas. *App Microbiol Biotech*, 1995, **44**:27–36.

- [8] Chassagnole C, Diano A, Letisse F, et al. Metabolic network analysis during fed-batch cultivation of *Corynebacterium glutamicum* for pantothenic acid production: First quantitative data and analysis of by-product formation. *J Biotech*, 2003, **104**:261–272.
- [9] 吴祖芳,堵国成,陈 坚. 放射型根瘤菌 WSH2601 生产辅酶 Q₁₀ 的摇瓶发酵条件. 无锡轻工大学学报, 2003, **22**(1):65–69.
- [10] Wu Z F, Du G C, Chen J. Effects of dissolved oxygen concentration and DO-stat feeding strategy on CoQ₁₀ production with *Rhizobium radiobacter*. *W J of Microbiol Biotech*, 2003, **19**(9):925–928.
- [11] Winrow M J, Rudney H. The biosynthesis of ubiquinone. In: McCormick D B, Wright L D. ed. *Methods in enzymology*, New York:Academic press, 1971, **18**:214–232.
- [12] Pandian S, Saengchjan S, Raman T S. An alternative pathway for the biosynthesis of isoprenoid compounds in bacteria. *Biochem J*, 1981, **196**:675–681.
- [13] Meganathan R. Ubiquinone biosynthesis in microorganisms. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, **203**:131–139.
- [14] 吴祖芳,堵国成,陈 坚. 营养条件和流加发酵对放射型根瘤菌(*Rhizobium radiobacter*)产辅酶 Q₁₀ 的影响. 生物工程学报, 2003, **19**(2):212–216.
- [15] Natori Y, Nagasaki T. Enhancement of Coenzyme Q₁₀ accumulation by mutation and effects of medium components on the formation of Coenzyme Q Homologs by *Pseudomonas* N842 and mutants. *Agric Biol Chem*, 1981, **45**(10):2175–2182.
- [16] Hua Q, Shimizu K. Effects of dissolved oxygen concentration on the intracellular flux distribution for pyruvate fermentation. *J Biotech*, 1999, **68**:135–147.
- [17] 陈 坚,李 寅. 发酵过程优化原理与实践. 北京:化学工业出版社, 2002, 154–162.
- [18] 朱旭芬,曾云中,吴雪昌. 生物体内泛醌的种类与合成条件. 浙江大学学报, 2000, **27**(3):324–328.

Effects of culture conditions on coenzyme Q₁₀ production by *Rhizobium radiobacter* by metabolic flux analysis

WU Zu-fang¹ DU Guo-cheng² CHEN Jian²

(¹ Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

(² Key Laboratory of Industrial Biotechnology Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Metabolic pathway network of CoQ₁₀ synthesis by *R. radiobacter* WSH2601 were instructed. The metabolic flux and its changes were determined under the conditions of changing DO concentration and addition of 1% CSL in the medium. The results illustrated that the Ru5P flux (r_7) increased by 26.6 when increasing the DO concentration, r_7 increased by 17.2 when addition of 1% CSL. The ratio of EMP and HMP flux as well as TCA flux decreased at these two conditions. DPP flux had a little change at these two conditions. Therefore, the CoQ₁₀ accumulation is greatly determined by two key enzymes activities of condensation reaction between *p*-hydroxybenzoate acid (PHB) and decaprenyl diphosphate (DPP). The nodes of G6P, pyruvate and PEP are principal nodes in primary metabolism of CoQ₁₀ fermentation. The flexibility of principal nodes was evaluated that the G6P node is elastic, while pyruvate node is weakly flexibility, at the condition of changing culture conditions. The increase of DCW is associated with the improvement of HMP pathway flux.

Key words: Coenzyme Q₁₀, Metabolic flux analysis, Culture conditions, Mechanism

* Corresponding author. Tel 86-510-5885727; E-mail: jchen@sytu.edu.cn

Received date 08-28-2004