

乳酸菌基因组规模代谢建模研究与在食品体系中的应用进展

刘子豪¹, 倪皓洁¹, 李文璐¹, 王凤忠², 王彦波¹, 曾 龔^{1,*}

(1.北京工商大学食品与健康学院, 北京 100048;

2.中国农业科学院农产品加工研究所, 农业农村部农产品质量安全收贮运管控重点实验室, 北京 100193)

摘 要: 乳酸菌具有改善食品风味、提高营养价值等重要作用, 被广泛应用于食品发酵领域。基因组规模代谢模型是研究微生物代谢的重要工具, 可以模拟生物体内代谢网络、准确描述基因型-表型关系, 目前已成功应用于乳酸菌代谢调控等研究中。本文系统回顾了近20 年以来构建的乳酸菌基因组规模代谢模型, 并重点综述了现有模型在食品体系中的应用情况。本文在分析现有模型存在的主要挑战与局限性的同时, 结合目前新技术、新思想对其未来发展方向进行展望, 旨在为未来如何更加有效、准确地将乳酸菌基因组规模代谢模型有机地应用在食品工业, 辅助食品微生物群落智慧设计提供参考。

关键词: 乳酸菌; 基因组规模代谢模型; 代谢模拟; 食品工业

Research Progress on Genome-Scale Metabolic Models of Lactic Acid Bacteria and Their Application in the Food System

LIU Zihao¹, NI Haojie¹, LI Wenlu¹, WANG Fengzhong², WANG Yanbo¹, ZENG Hong^{1,*}

(1. School of Food and Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 2. Key Laboratory of Agro-products Quality & Safety in Harvest, Storage, Transportation, Management and Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: Lactic acid bacteria (LAB) play a crucial role in improving the flavor and enhancing the nutritional value food, which have found wide application in the field of food fermentation. Genome-scale metabolic models (GSMMs) serve as essential tools for studying microbial metabolism, which simulate the metabolic networks of microorganisms and accurately describe the genotype-phenotype relationships. Several GSMMs have already been successfully applied to the metabolic regulation of LAB. This article systematically summarizes LAB GSMMs constructed over the past two decades, emphasizing their application in food systems. Moreover, it analyzes the primary challenges and limitations of the GSMMs and gives an outlook on future directions in by combining emerging technologies and innovative ideas. The final goal is to provide valuable insights for the effective and precise application of LAB GSMMs to the intelligent design of microbial communities in the food industry.

Keywords: lactic acid bacteria; genome-scale metabolic model; metabolic simulation; food industry

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240614-093

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 24-0348-09

引文格式:

刘子豪, 倪皓洁, 李文璐, 等. 乳酸菌基因组规模代谢建模研究与在食品体系中的应用进展[J]. 食品科学, 2024, 45(24): 348-356. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240614-093. <http://www.spkx.net.cn>

LIU Zihao, NI Haojie, LI Wenlu, et al. Research progress on genome-scale metabolic models of lactic acid bacteria and their application in the food system[J]. Food Science, 2024, 45(24): 348-356. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240614-093. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2024-06-14

基金项目: 农业农村部农产品质量安全收贮运管控重点实验室开放课题项目 (S2023KFKT-06)

第一作者简介: 刘子豪 (2001—) (ORCID: 0009-0005-0064-1283), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物风味调控。

E-mail: 1846643715@qq.com

*通信作者简介: 曾龔 (1994—) (ORCID: 0000-0001-6617-4466), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品生物成味。

E-mail: zenghong@btbu.edu.cn

乳酸菌是一类可以通过分解代谢降解碳水化合物而产生乳酸及相应风味产物的革兰氏阳性菌的统称,已被广泛地应用于发酵食品的生产中。研究表明,乳酸菌发酵是提升发酵食品品质最重要的因素之一^[1]。经乳酸菌发酵的食品在其理化性质、感官、营养和安全等属性上均有所提升,此外,乳酸菌发酵也可作为保藏手段,延长食物保藏期^[2-3]。乳酸菌的代谢活动直接影响其发酵表型如产酸速率、副产物种类及含量等,从而进一步影响发酵食品的品质、特征及风味^[4]。传统的乳酸菌发酵和代谢研究方法常依赖多联发酵罐、高效液相色谱等精密仪器进行大量实验测定,存在过程耗时长、成本高、仪器易受限于环境等多种因素影响,面对国家和民众在大食物观背景下对于未来食品智慧创制的重大需求,目前尚缺乏系统性、智慧化的计算机辅助设计技术支撑。

随着对乳酸菌在食品体系中的代谢活动研究逐渐深入和组学技术、信息技术的快速发展,基因组规模代谢模型(genome-scale metabolic models, GSMM)逐渐成为乳酸菌生长代谢过程仿真的强有力工具^[5]。GSMM是一种可以通过基因组信息和代谢数据对生物体内已知的代谢反应及其产物进行系统性描述的数学模型。模型建立在已知的代谢物化学计量数和完整的基因-蛋白质-反应物(gene-protein-reaction, G-P-R)关系上,可对微生物或微生物群落的代谢特征进行模拟和仿真,并在稳态下求得目标方程的最优解。因此,目前GSMM已成为系统生物学和代谢工程的重要研究工具^[6]。GSMM可以模拟和预测生物体在不同环境条件下的代谢状态和表型,从而揭示生物体的代谢特性和功能^[7],还可以作为代谢工程的指导平台,通过分析和优化生物体的代谢网络,实现目标代谢产物的高效生产和功能修饰^[8]。近20年来,GSMM逐渐被应用于乳酸菌的代谢研究,例如用于指导工业生产中发酵食品的风味提升、高价值化合物富集等^[9]。

传统食品微生物研究常从局部出发,针对具体目的展开研究。GSMM的出现提供了一个从整体层面系统性研究乳酸菌在食品发酵中的代谢途径和代谢发生机理的方案,为乳酸菌于食品体系的代谢研究提供了全新的思路与解决方法。虽然目前已有大量关于乳酸菌GSMM的报道,尚缺乏对这些重要工作的系统总结,缺少对于现有乳酸菌GSMM存在的关键局限和在未来如何改进现有模型从而有效支撑国家食品发展战略的提案。鉴于此,本文综述了目前已报道的乳酸菌GSMM,并根据其特征进行系统归类,以期更加有效、准确地将乳酸菌GSMM应用在食品工业生产中,为食品微生物智能创制提供重要参考。

1 常见的乳酸菌GSMM应用

Teusink等^[10]于2006年建立首个乳酸菌GSMM,模拟了多种因素对植物乳杆菌WCFS1生产ATP的影响,并讨论了乳酸菌GSMM的应用前景及重要性。在过去的20年中,乳酸菌GSMM逐步发展完善,唾液链球菌嗜热亚种、德氏乳杆菌保加利亚亚种和乳酸乳球菌等多个食品工业常见菌株GSMM逐步建立,拓展了发酵过程仿真、天然产物合成途径挖掘、风味物质代谢途径与代谢流分析等多种能力。目前已建立的乳酸菌GSMM及其相关信息见表1。

表1 目前已建立的乳酸菌GSMM及其相关信息
Table 1 Current LAB GSMMs and its related information

模型名称	菌株	建模体系	基因数量	代谢物数量	反应数量	研究目的
iCH492 ^[11]	<i>Sterptococcus thermophilus</i> S-3	单菌	492	608	642	预测细胞生长和代谢通量分布
iTN656 ^[12]	<i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5	单菌	656	831	953	预测细胞生长和代谢通量分布,并优化工业规模的生物质生产过剩问题
未命名 ^[13]	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	多菌	518	650	754	研究共培养培养基中各种代谢物的分布、共培养菌株间潜在的代谢相互作用
	<i>S. thermophilus</i> LMG 18311		492	886	829	
未命名 ^[13-14]	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> ATCC 19254		559	1 129	1 088	比较 <i>S. thermophilus</i> LMG 18311与 <i>L. lactis</i> MG1363和 <i>L. plantarum</i> WCFS1的代谢差异,并研究其代谢特征与风味物质(乙醛)产生途径
	<i>S. thermophilus</i> LMG 18311	单菌	570	851	954	
iLMc559 ^[13,15]	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> ATCC 19254	单菌	559	1 129	1 088	研究乳酸菌的生长与风味化合物生产间的关系
未命名 ^[16]	<i>S. thermophilus</i>	多菌	566	847	1 208	研究嗜热链球菌与德氏乳杆菌保加利亚亚种的生长互作与不同初始接种比例对酸奶酸化的影响
	<i>L. delbrueckii</i> subsp.		501	950	1 385	
iRZ476 ^[17]	<i>S. thermophilus</i> CH8	单菌	476	632	656	应用建模方法研究氧化还原平衡和关键代谢产物分泌的相互依赖性
iHL622 ^[18]	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> ATCC PTA 6475	单菌	622	726	894	研究菌株代谢特征及对宿主潜在的益生作用
未命名 ^[19]	<i>L. plantarum</i> WCFS1/ <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> ATCC 393/ <i>L. salivarius</i> ATCC 11741/ <i>L. fermentum</i> ATCC 14931/ <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NZ9000/ <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293	单菌	686±139	906±29	1 042±65	研究乳酸菌的代谢特征、益生菌在不同饮食模式下发挥作用的能力,为筛选优质益生菌提供指导
	<i>L. plantarum</i> WCFS1	单菌	721	531	643	
iLME620 ^[20]	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	单菌	620	754	762	研究了菌株独特的代谢特征,并发现菌株代谢在低ATP生产下主要由细胞的氧化还原状态控制
iOA1084 ^[21]	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 2118	单菌	1 084	864	965	研究不同底物下L-氨基酸的生产能力,并研究高谷氨酸摄取速率对生长速率和L-氨基酸生产影响的机理,探索琥珀酸盐的潜在生产途径并诱导其过量生产
iAZ480/iMS520 ^[22]	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB12/ <i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> BB-46	单菌	480/520		731/771	研究菌株代谢与基本营养需求
Lreuteri-530 ^[23]	<i>L. reuteri</i> JCM 1112	单菌	530	660	714	研究菌株磷酸解途径和糖酵解途径的糖酵解通量占比,并研究关键基因敲除对乙醇生产和细菌生长的影响与机理
iWK557 ^[24]	<i>L. lactis</i> NZ9000	单菌	557	668	840	准确表征细菌生长和乳酸、乙酸合成速率

1.1 发酵过程仿真模拟

在食品发酵过程中,发酵微生物群落的组成与比例是影响发酵食品口感、质地和营养成分等指标的主要因素。然而,由于微生物群落内部不同种属的乳酸菌与酵母菌、乳酸菌与霉菌等微生物发生相互作用而发生动态变化,极大地增加了发酵过程的研究难度。针对这一问题,研究人员开发了一系列共培养模型模拟动态的多菌互作,以对食品发酵过程进行仿真模拟。

嗜热链球菌、德氏乳杆菌保加利亚亚种是经宏基因组测序测定酸奶中微生物丰度最高的两个菌种。为模拟酸奶发酵过程中重要菌株的相互作用,Qiu Sizhe等^[16]对其建立动态宏基因组规模代谢模型,并应用嗜热链球菌、德氏乳杆菌保加利亚亚种的GSMM对酸奶发酵过程进行双菌共培养模拟。该模型验证了嗜热链球菌与德氏乳杆菌保加利亚亚种之间的协同作用,并通过整合蛋白质组分配约束解释了乳酸菌生产乳酸的现象。随后应用该模型对不同嗜热链球菌、德氏乳杆菌保加利亚亚种初始接种比例的发酵剂发酵酸奶的酸化速率进行了模拟验证。该模型首次将蛋白质组分配约束整合到动态多菌体系的GSMM中,准确模拟了酸奶发酵剂在酸奶发酵过程中的生长与相互作用。

在奶酪中,乳酸乳球菌乳脂亚种MG1363、乳酸乳球菌IL1403、嗜热链球菌LMG 18311和肠膜明串珠菌ATCC 19254是嗜温发酵剂和嗜热发酵剂中4种常见菌。为模拟微生物群落共培养的代谢行为,Özcan等^[13]分别建立了这4种菌株的单菌GSMM,并对嗜温/嗜热发酵剂共培养过程进行了模拟验证。该研究预测了乳酸菌对奶酪关键风味化合物(乙偶姻、二乙酰和2,3-丁二醇等)的生产能力,并通过共培养模型中的不同菌株代谢通量交换揭示了其潜在的相互作用关系。该模型是首个以不同乳酸菌组成的微生物群落的动态GSMM,验证了多菌共培养的代谢水平特性可通过每个独立单菌的代谢水平特性进行预测。

由表1可见,目前已建立的乳酸菌GSMM仍以单菌模型居多。但近年来,如前文叙述的多菌互作模型已逐渐产生。这些研究表明,模拟复杂发酵剂群落已有研究基础。随着技术的进步,乳酸菌GSMM对复杂发酵过程模拟的精确度与准确度也会逐渐提高,对调控乳酸菌发酵的作用会更加显著。

1.2 天然产物生物合成途径挖掘

天然产物是指由植物、动物、微生物等生物体产生的物质,因其丰富的生物活性而被广泛应用于药品、保健食品和化妆品等领域^[25]。但天然产物在自然界中含量少,存在提取步骤繁琐、产率低、化学合成困难等难题^[26]。如何提高天然产物合成效率的同时降低其生产成本是食品科学、制药工程等领域亟待解决的问题。

随着代谢工程和微生物代谢研究的深入,优化或改造微生物能力逐步提高,微生物成为高效生产天然产

物的平台。此外,生物信息学的快速发展和基因组数据库的日益丰富使天然产物的生物合成也进入了基因组时代,研究人员可通过综合应用系统代谢工程的多种工具在系统水平上设计细胞代谢,将代谢流重新导向目标产物的形成^[27]。其中,GSMM是指导系统水平代谢工程以改进菌株的重要工具,目前已经作为指导工业菌株中产物合成路径挖掘的重要工具而被广泛应用^[28]。基于模式菌株基因组数据建立的GSMM已成为天然产物合成途径挖掘、细胞工厂设计的重要工具,指导了维生素^[29]、黄酮^[30]、生物碱^[31]等天然产物的高效生物生产。

γ -氨基丁酸是一种非蛋白质结构的氨基酸,作为动物中枢神经系统的一致性神经递质,具有肠道保护、神经刺激和心脏保护等功能。在适当的条件下,乳酸菌可大量生产 γ -氨基丁酸^[32]。Ardalani等^[21]通过乳酸乳球菌NCDO 2118的GSMM模拟,发现增加乳球菌的谷氨酸摄取速率可通过消耗细胞质质子,使ATP合成酶反应从ATP消耗转变为ATP产生,从而提高 γ -氨基丁酸的合成能力。透明质酸是存在于脊椎动物细胞外基质的酸性糖胺聚糖,可调节组织重塑过程,例如伤口愈合、胚胎发育、血管生成等^[33]。Badri等^[34]通过重建乳酸乳球菌GSMM表达18个靶点(包括传统透明质酸合成路径及非传统路径中的靶点)、沉默12个靶点,成功挖掘出可以与以葡萄糖为原料的生产途径并行、通过肌酐过量生产透明质酸的新途径,使透明质酸的产率增长为原有产率的2.8倍。通过上述研究可见,随着乳酸菌GSMM的逐渐细化,其在食品体系内的应用也逐渐拓展。

1.3 风味代谢分析

风味是多种感官感知集合形成的复杂感觉,主要包括气味、滋味和触觉/疼痛^[35],是影响消费选择的主要因素之一^[36]。当消费者摄入高脂肪或高糖分的食物时,以多巴胺为代表的神经奖励系统会更高程度地被激活并抑制饱足信号,从而促进进食^[37]。因此,提升食物的风味具有重要的现实意义。发酵食品的生产过程通常涉及由多种微生物所组成的微生物群落代谢活动,而食品体系中微生物群落组成的多样性及其在发酵过程中的动态变化均加大了模型研究的难度^[38]。鉴于此,目前研究人员通常聚焦于核心功能性微生物群落代谢活动与风味物质形成的相关性。当前已有多个研究应用GSMM对乳酸菌的风味物质生产代谢途径进行探索与模拟。

琥珀酸及琥珀酸盐是最为常见的有机酸类鲜味物质,鲜味阈值较低,在多种发酵食品中起到呈味作用^[39]。在乳酸乳球菌中,琥珀酸的生物合成途径尚不明确^[21,40],缺乏良好的调控机制。Ardalani等^[21]通过乳酸乳球菌NCDO 2118的GSMM模拟分析发现该菌可利用嘌呤和精氨酸生物合成的副产物延胡索酸作为唯一底物生产琥珀酸,通过模拟去除精氨酸和甘氨酸,提高了琥珀酸的生产能力,并成功揭示了其代谢机理:甘氨酸可通过甘氨酸羟甲基转移酶催化色氨酸生成,其副产物5,10-亚

甲基四氢叶酸被嘌呤代谢途径消耗,生成延胡索酸,并最终被延胡索酸还原酶还原为琥珀酸。精氨酸缺失可激活精氨酸生物合成的一个沉默循环,将谷氨酸转化为鸟氨酸并通过4步反应生成琥珀酸。该模型系统解释了该菌株缺乏三羧酸循环途径中的部分酶与基因,却可在发酵液中检测出琥珀酸的原因^[40]。肠膜明串珠菌是一种可利用柠檬酸盐产生风味化合物的乳酸菌,具有产生优良风味的特性,被广泛用于工业发酵^[41]。Özcan等^[15]重建了肠膜明串珠菌ATCC 19254的GSMM,包含559个基因、1 129个代谢物和1 088个反应。通过模型模拟了该菌株在额外添加柠檬酸盐情况下的生长与风味物质(如乙酰、双乙酰等)合成情况,发现在达到最大生长速率之前,氧气和柠檬酸盐的存在均会促进ATP生成并提高生长速率。当生长速率达到最大时,即进一步增加碳和氧的吸收量无法提高菌株生长速率时,菌株才会消耗多余的碳源和ATP从而启动风味物质的生产。结合模型模拟结果,Özcan等^[15]认为在底物添加柠檬酸盐的情况下,风味物质生产与柠檬酸的吸收代谢并不消耗生长所需ATP,因此风味物质以代谢废物的形式被合成并释放。上述研究通过应用GSMM解析了消费者所喜爱的风味物质生产途径及产生机理,为探索乳酸菌风味物质代谢通路、代谢途径提出了相较于传统方法更便捷的有效手段。

2 乳酸菌GSMM应用于食品体系中的挑战

目前已建立的乳酸菌GSMM已经证明其有能力在化学培养基体系模拟微生物代谢过程,但由于食品体系本身的复杂性及GSMM本身的局限性,例如次级代谢途径整合欠缺、动态模拟困难等,导致乳酸菌GSMM应用于真实的食品发酵过程仍面临一定挑战(图1)。

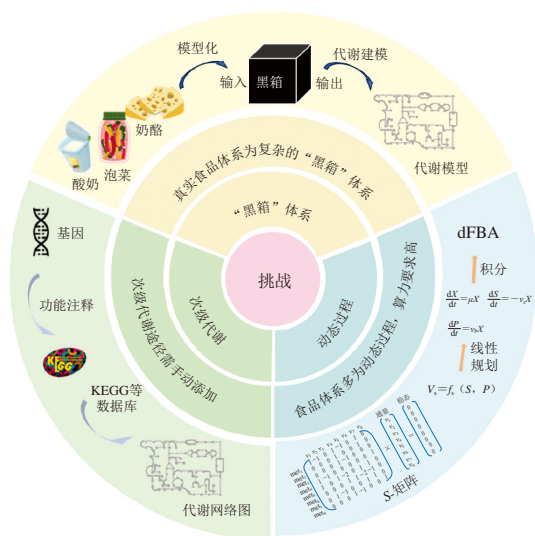


图1 乳酸菌GSMM应用于食品体系的挑战

Fig. 1 Challenges in the application of LAB GSMMs in the food system

2.1 复杂的“黑箱”体系

目前,大多数乳酸菌GSMM已经可以准确模拟化学培养基(chemical defined medium, CDM)体系中的微生物动力学,但对于真实食品体系,由于其复杂的“黑箱”特征,使得GSMM对食品体系进行仿真仍存在诸多限制^[42]。

“黑箱”体系通常指系统内部工作机制未知的一种复杂系统。在这种复杂的体系内,一般只研究系统的输入、输出及其关系,无法研究其内部各因素的扰动对系统的影响。真实的食品体系相较于“白箱”的CDM,大多为“黑箱”体系。由乳酸菌发酵的食品通常为固体(奶酪)、浑浊/不透明(酸奶)或是多相体系(泡菜),在这样复杂的基质中准确定量发酵过程中微生物的生长与代谢随时间的变化十分困难^[9]。同时,在真实发酵过程中,发酵食品是由复杂多变的微生物群落共同代谢生成的^[43]。微生物群落中的微生物存在相互作用,影响菌株组成比例、群落稳定性和发酵产品的风味^[44-45]。乳酸菌作为一类以发酵碳水化合物产生乳酸为特征的细菌,会降低环境的pH值抑制其他菌株的生长,从而改变发酵微生物群落的组成^[46-48]。因此,在真实食品发酵过程中,食品本身的理化特性造成微生物的代谢状态、微生物群落的竞争与互作等难以随时间而时刻表征,限制了乳酸菌GSMM在食品体系中的应用。

目前,构建微生物群落GSMM是代谢建模的一个前沿研究方向,其可以模拟发酵菌群的相互作用与生长速率,有助于解释食品微生物组在发酵过程中不同微生物的相互作用关系。构建群落GSMM首先需建立单菌GSMM,而后将单菌模型通过一定的法则组合形成群落模型^[12],其中为多个菌株分别定义生长目标尤为困难^[9]。

2.2 次级代谢分析

自1999年第1个GSMM建立以来,已有超过6 000个GSMM被应用于模拟和研究细菌、古菌和真核生物体的代谢特征^[49]。传统GSMM的构建首先需要全基因组测序或宏基因组测序结果,获得该生物的基因组序列。其次,由于GSMM的建立是基于细胞代谢网络中的G-P-R关系,因此需从测序结果中预测蛋白质的编码基因并结合数据库对其进行功能注释,从而将基因与其编码的蛋白质或酶相关联,揭示这些基因在代谢网络中的作用及其产物参与的代谢途径与反应^[50-51]。目前,常用于基因组功能基因注释及其所在生物学通路预测的数据库包括基因本体(Gene Ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)、非冗余蛋白质数据库(Non-Redundant Protein Database, NR)等^[52]。最后,将结果输入诸如CarveMe、modelSEED和RAVEN等自动化建模软件中,即可半自动/自动生成GSMM草稿模型^[53]。经过对模型手动的细化、

施加限制条件后即可通过GSMM对微生物生长代谢进行预测。GSMM构建的基本流程见图2。



图2 GSMM构建的基本流程

Fig. 2 Basic process of GSMM construction

次级代谢产物（如风味物质、天然产物等）作为一种与微生物生长、发育、分裂无直接关系的化合物，其合成与积累十分复杂，受到内部（如基因、酶等）与外部（如环境、营养状态等）多种因素影响^[54]。因此，即便同一种属的生物，其次级代谢途径也存在较大的差别^[55]。

乳酸菌具有丰富的次级代谢途径，产生的次级代谢产物种类繁多，主要包括脂肪酸、有机酸、胞外多糖和 γ -氨基丁酸等，在提高食品风味与健康属性方面发挥了重要作用^[56]。例如，在丙酮酸过量的情况下，丙酮酸可在丙酮酸合成酶的作用下生成 α -乙酰乳酸，并在酸性条件下氧化脱羧生成双乙酰。双乙酰具有典型的奶香和奶油香，是许多发酵乳制品的特征风味^[57]。然而，正是由于乳酸菌的次级代谢产物众多、次级代谢途径复杂，而可供进行基因注释的次级代谢产物数据库又较少，极大地限制了在GSMM模型中整合乳酸菌次级代谢途径。在传统GSMM构建过程中，用于功能基因注释的数据库一般不含有次级代谢途径，需依靠研究人员根据具体研究的次级代谢产物进行手动重构。因此，想要在GSMM中整合次级代谢途径，详尽且准确的次级代谢网络重建与代谢通路研究尤为重要^[58]。此外，乳酸菌作为一种非模式菌株，其次级代谢通路挖掘较模式菌株大肠杆菌、酿酒酵母也存在较大差距^[59-63]，无法作为其建模的参考模板。以上多重因素共同限制了在乳酸菌GSMM中整合次级代谢途径及在食品功能物质生产中的应用^[64]。

2.3 动态过程模拟

制约乳酸菌GSMM应用于真实食品体系的另一个难点是动态过程模拟。发酵食品的生产 and 风味物质的形成均为动态过程，其中包含了微生物群落、代谢物浓度等指标的动态变化。利用GSMM模型对微生物进行代谢分析的最常用方法是代谢流平衡分析^[65]。代谢流平衡分析的前提是细胞处于稳态，即每种代谢物产生速率等于其消耗速率，代谢物总量不变。在此基础上对每个反应的通量定义上下界，通过线性规划算法找到最优的通量分布^[65-66]。由于代谢流平衡分析基于稳态的设定，限制

了其模拟微生物相互作用的动态过程的能力^[67]。此外，代谢流平衡分析不能预测代谢物的浓度、细胞的二次生长^[68]以及非稳态体系^[69]。因此，后人建立了动态代谢流平衡分析^[70]。动态代谢流平衡分析的原理是在每个时间点应用代谢流平衡分析，将这些时间点的变化率组成一个微分方程组，便可描述不同物质（如底物、代谢产物等）随时间的变化情况^[71]。其典型应用案例是COMETS（computation of microbial ecosystems in time and space）^[72]，可对微生物群落在不同时间点和空间位置的分布、相互作用和演化过程进行分析^[69]。动态代谢流平衡分析解决了经典静态代谢流平衡分析的诸多应用限制。然而，动态代谢流平衡分析一般对算力要求较高，同时应用动态代谢流平衡分析的模型在建立、验证与优化的过程中需要大量的实验数据作为支撑，而上文所说食品体系通常为复杂的“黑箱”体系，准确、定量获取过程数据较为困难。

3 新一代食品微生物GSMM

生物体内的新陈代谢由于复杂的约束条件限制，要提高GSMM模拟新陈代谢的精确度与准确度，需科学地对GSMM施加约束^[73]。GSMM是整合多约束和多生物过程的优质平台^[50]，代谢流平衡分析算法也与转录组和酶约束条件具有高兼容性^[69]，因此可通过整合多种限制条件增强GSMM的预测能力与预测范围。近年来，诸多新技术、新理论不断被应用于食品微生物研究中，如将高通量测序技术及多组学技术应用于发酵食品风味形成^[74]与多菌互作^[75]、将细胞资源分配理论应用于微生物代谢的研究中^[76]。本文将从构建次级代谢途径、应用代谢调控理论与整合多组学数据3个方面讨论未来新一代食品微生物代谢模型的研究方向。

3.1 次级代谢途径构建

由于微生物次级代谢活动与微生物生长繁殖无直接关系^[58]，许多微生物次级代谢产物（例如风味物质、生物活性物质）的研究基础薄弱，代谢通路不清晰。在乳酸菌GSMM上整合次级代谢通路一般需要3个步骤：1）通过基因组挖掘识别次级代谢物和相关生物合成基因簇（biosynthetic gene clusters, BGC）；2）重建次级代谢途径；3）模拟次级代谢流量^[77]。目前，重建次级代谢途径的主要方法有两种：BGC法和逆合成法。

BGC通常包含多个物理聚类的非同源基因，这些基因编码酶催化一个次级代谢产物生物合成途径的各种反应^[78-79]。目前已开发多个可识别BGC、重建起次级代谢途径并整合入GSMM内的工具，如DDAP^[80]和BiGMeC^[81]软件。BiGMeC可通过输入的DNA序列识别并进行功能注释，包括氧化还原辅因子和能量需求，并可将以上信

息整合进GSMM。DDAP是一种基于机器学习的类型I聚酮合酶合成产物生产途径预测算法,具有性能好、直观高效、不依赖大型数据库等优点。

然而,由于许多食品的关键风味化合物的次级代谢途径尚不清晰,因此遵循自上而下法则的逆合成方法更适合与GSMM结合进行食品风味分析。目前,研究人员已开发了多个可通过逆合成算法预测可能产生目标次级代谢产物反应的工具^[77],如RetroPath 2.0、BioNavi-NP等^[82]。逆合成途径的原理是通过反向反应模版,利用合成规则反向分解为可能的前体^[83],并最终输出为所有可能连接前体与次级代谢产物的路线^[82]。

3.2 代谢调控理论

微生物的生长繁殖由外部资源(如底物、氧气、光照等)和内部资源(遗传信息、酶、细胞内空间资源等)共同决定^[84],而细胞承受代谢通量的能力受其资源分配的限制^[73]。资源分配理论是指微生物根据外界环境的变化将其内部资源进行动态分配以实现某一生物学目标的理论。在近10年内,蛋白质资源分配理论又作为资源分配理论的典型代表,获得了广泛地研究与应用^[84]。

蛋白质资源分配理论是指蛋白质是细胞内质量分数最高、限制性最大的资源,细胞代谢能力受到总蛋白质含量的限制^[85]。细胞内总蛋白质池可通过其功能进行分类,一般可分成合成代谢、分解代谢、代谢物跨膜运输和与生长无关的部分^[85]。不同功能分类的蛋白质共同竞争有限的总蛋白质池^[76]。因此,在蛋白质总量受限的情况下,一类蛋白质比例的增加就意味着另一类蛋白质比例的减少^[86]。同时,微生物在内部资源与外部资源供需平衡下,常常追求诸如最大化生长速率等目标。但若细菌受到环境影响致使内、外部资源供需不平衡或不能满足当前目标,菌株便会重新分配其蛋白质组,以缓解生长压力^[84,87]。

蛋白质资源分配理论是能够实现更为精准的代谢流预测的新理论,其整合了蛋白质组约束条件的GSMM(proteome-constrained GSMM, pcGSMM)模拟代谢通量的可变性远低于未整合蛋白质组约束的GSMM,该理论革命性地提高了GSMM的代谢预测能力和准确度。pcGSMM可预测GSMM无法预测的表型,如大肠杆菌的溢流代谢和酿酒酵母的反巴斯德效应等^[88-90],在模式微生物中得到了广泛的验证。如乳酸菌生产乙酸较生产乳酸可产生更多的ATP,但乳酸菌仍偏好生产乙酸。通过整合受限蛋白质组分配的动态GSMM(dynamic GSMM, dGSMM)发现乙酸生产的蛋白质组成本远高于乳酸生产。因此,在实现最大化生长速率这一目标下,乳酸菌偏好产能较少但蛋白质组成本较低的乳酸生产途径^[34]。同时,群落中单个菌株摄取资源进行生长增殖会对整个微生物群落造成影响,菌株的资源摄取又受到蛋白质组

等内部资源的分配限制。由此可见,pcGSMM具有预测微生物群落之间动态的相互作用从而改变群落构成的能力^[91],为上文中所提到的建立复杂发酵剂GSMM及其应用于真实食品体系中提供了可行的解决方法。

3.3 多组学数据驱动模型优化

随着高通量测序技术的快速发展,各种类型、层次的组学数据快速积累。多组学技术是综合不同层面(基因组学、转录组学、代谢组学等)的生物分子信息^[92],系统性研究生物不同组分的相互作用,从而全面理解生物学特性的研究方法,尤其适合探究基因型对表型复杂的影响机制^[93]。GSMM因其包含G-P-R关系的模型结构,天然具备整合多组学数据作为额外约束条件的能力^[58]。如转录组学可限制代谢通量、代谢组学可定义热力学可行区域等。整合多组学数据可为GSMM提供更为准确的细胞代谢流预测结果^[94]。目前,已有将转录组学、蛋白质组学、代谢组学数据作为额外约束条件,从而有效提高GSMM模型预测的范围与准确度的案例^[95]。GECKO是一种可将蛋白质组学数据简化并整合入酿酒酵母GSMM的方法^[96],能够更好的预测和模拟酿酒酵母的生长和代谢产物交换速率、预测酶在反应过程和途径水平上的需求,目前已广泛应用于酿酒酵母GSMM的建立。蛋白质组学可推断生物体内酶的转换数,从而减少实验测定并准确构建pcGSMM^[9]。此外,将代谢组学整合进维氏假单胞菌1YdBTEX2的GSMM中可提高代谢网络的完整性、发现缺失反应并提高模型预测数据的准确性。综上所述,多组学的额外约束可提高乳酸菌GSMM的模拟精确性与准确性。随着组学技术的不断发展,多组学整合将成为提高GSMM模拟能力的重要工具。

4 结 语

乳酸菌是发酵食品工业中应用最为广泛的菌种,系统地研究乳酸菌的代谢活动、阐明其代谢机理是食品发酵工业的长期目标。GSMM作为生物信息学的重要工具,可以模拟生物体内代谢网络、准确描述基因型-表型关系,已经在多个物种上证实其具有准确模拟预测新陈代谢及副产物生产的能力,目前已成功应用于乳酸菌代谢调控的研究中。然而,食品体系的复杂性与微生物群落在发酵过程中的动态变化和多样性均限制了乳酸菌GSMM与真实食品体系相结合。鉴于此,本文聚焦于近20年来乳酸菌GSMM的重要研究成果,从乳酸菌GSMM在食品体系中的现有应用、模型局限性和未来研究方向3个方面进行系统综述,以期为乳酸菌GSMM与真实食品体系有机结合提供可行方向和关键理论指导,从而更好地服务于食品工业生产,真正实现降本增效,以新技术、新思想为食品发酵工业注入新活力。未来有望通过

整合次级代谢途径重构、多组学等新技术以及代谢调控理论、细胞资源分配理论等新理论建立高质量、多约束的新一代乳酸菌GSMM,实现对乳酸菌的动态代谢过程更加准确的模拟,解析并拓展乳酸菌代谢产生的风味物质与生物活性物质,建立并丰富次级代谢途径数据库,从而更好地调控食品工业对应用乳酸菌发酵的食品品质。此外,通过人工智能辅助的多组学分析方法解析发酵食品体系中的核心微生物群落,从而建立高质量的多菌共培养GSMM模型,精准模拟群落微生物变化趋势、代谢特征,通过模型辅助分析、预测、调控和优化发酵食品的风味品质和生产工艺,也是未来实现食品微生物智慧设计的重要工作方向。

参考文献:

- [1] SHARMA R, GARG P, KUMAR P, et al. Microbial fermentation and its role in quality improvement of fermented foods[J]. *Fermentation*, 2020, 6(4): 106. DOI:10.3390/fermentation6040106.
- [2] SIDDIQI S A, EROL Z, RUGJI J, et al. An overview of fermentation in the food industry looking back from a new perspective[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2023, 10(1): 85. DOI:10.1186/s40643-023-00702-y.
- [3] 王宁晓璇, 李欣, 黄玉立, 等. 机器学习在传统发酵食品微生物结构及品质控制中的应用研究进展[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(13): 360-367. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2023070288.
- [4] WANG Y Q, WU J T, LV M X, et al. Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 612285. DOI:10.3389/fbioe.2021.612285.
- [5] KIM W J, KIM H U, LEE S Y. Current state and applications of microbial genome-scale metabolic models[J]. *Current Opinion in Systems Biology*, 2017, 2: 10-18. DOI:10.1016/j.coisb.2017.03.001.
- [6] BI X Y, LIU Y F, LI J H, et al. Construction of multiscale genome-scale metabolic models: frameworks and challenges[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(5): 721. DOI:10.3390/biom12050721.
- [7] FANG X, LLOYD C J, PALSSON B O. Reconstructing organisms *in silico*: genome-scale models and their emerging applications[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(12): 731-743. DOI:10.1038/s41579-020-00440-4.
- [8] CASTILLO S, PATIL K R, JOUHTEN P. Yeast genome-scale metabolic models for simulating genotype-phenotype relations[J]. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 2019, 58: 111-133. DOI:10.1007/978-3-030-13035-0_5.
- [9] SOMERVILLE V, GRIGAITIS P, BATTJES J, et al. Use and limitations of genome-scale metabolic models in food microbiology[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2022, 43: 225-231. DOI:10.1016/j.cofs.2021.12.010.
- [10] TEUSINK B, WIERSMA A, MOLENAAR D, et al. Analysis of growth of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on a complex medium using a genome-scale metabolic model[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(52): 40041-40048. DOI:10.1074/jbc.M606263200.
- [11] HOU C J, SONG X, XIONG Z Q, et al. Genome-scale reconstruction of the metabolic network in *Streptococcus thermophilus* S-3 and assess urea metabolism[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2024, 104(3): 1458-1469. DOI:10.1002/jsfa.13026.
- [12] NAMRAK T, RAETHONG N, JATUPONWIPHAT T, et al. Probing genome-scale model reveals metabolic capability and essential nutrients for growth of probiotic *Limosilactobacillus reuteri* KUB-AC5[J]. *Biology*, 2022, 11(2): 294. DOI:10.3390/biology11020294.
- [13] ÖZCAN E, SEVEN M, ŞIRIN B, et al. Dynamic co-culture metabolic models reveal the fermentation dynamics, metabolic capacities and interplays of cheese starter cultures[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(1): 223-237. DOI:10.1002/bit.27565.
- [14] PASTINK M I, TEUSINK B, HOLS P, et al. Genome-scale model of *Streptococcus thermophilus* LMG18311 for metabolic comparison of lactic acid bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(11): 3627-3633. DOI:10.1128/AEM.00138-09.
- [15] ÖZCAN E, SELVI S S, NIKEREL E, et al. A genome-scale metabolic network of the aroma bacterium *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(7): 3153-3165. DOI:10.1007/s00253-019-09630-4.
- [16] QIU S Z, ZENG H, YANG Z J, et al. Dynamic metagenome-scale metabolic modeling of a yogurt bacterial community[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2023, 120(8): 2186-2198. DOI:10.1002/bit.28492.
- [17] RAU M H, GASPAR P, JENSEN M L, et al. Genome-scale metabolic modeling combined with transcriptome profiling provides mechanistic understanding of *Streptococcus thermophilus* CH8 metabolism[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(16): e0078022. DOI:10.1128/aem.00780-22.
- [18] LUO H, LI P S, WANG H, et al. Genome-scale insights into the metabolic versatility of *Limosilactobacillus reuteri*[J]. *BMC Biotechnology*, 2021, 21(1): 46. DOI:10.1186/s12896-021-00702-w.
- [19] KODURU L, LAKSHMANAN M, LEE Y Q, et al. Systematic evaluation of genome-wide metabolic landscapes in lactic acid bacteria reveals diet- and strain-specific probiotic idiosyncrasies[J]. *Cell Reports*, 2022, 41(10): 111735. DOI:10.1016/j.celrep.2022.111735.
- [20] KODURU L, KIM Y, BANG J, et al. Genome-scale modeling and transcriptome analysis of *Leuconostoc mesenteroides* unravel the redox governed metabolic states in obligate heterofermentative lactic acid bacteria[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 15721. DOI:10.1038/s41598-017-16026-9.
- [21] ARDALANI O, MOTAMEDIAN E, HAMED J. Reconstruction and validation of genome-scale metabolic model of *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118 and *in silico* analysis for succinate and gamma-aminobutyric acid overproduction[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2021, 170: 107967. DOI:10.1016/j.bej.2021.107967.
- [22] SCHÖPPING M, GASPAR P, NEVES A R, et al. Identifying the essential nutritional requirements of the probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium longum* through genome-scale modeling[J]. *NPJ Systems Biology and Applications*, 2021, 7(1): 47. DOI:10.1038/s41540-021-00207-4.
- [23] KRISTJANSDDOTTIR T, BOSMA E F, DOS SANTOS F B, et al. A metabolic reconstruction of *Lactobacillus reuteri* JCM 1112 and analysis of its potential as a cell factory[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 186. DOI:10.1186/s12934-019-1229-3.
- [24] 孙伟康, 张娟, 堵国成. 乳酸乳球菌NZ9000基因组规模代谢网络模型的构建与验证[J]. *生物工程学报*, 2020, 36(8): 1629-1639. DOI:10.13345/j.cjb.190552.
- [25] 王海蛟. 代谢工程改造大肠杆菌合成5-羟基色氨酸的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2019: 1-12. DOI:10.27461/d.cnki.gzjdx.2019.000830.
- [26] ATANASOV A G, ZOTCHEV S B, DIRSCH V M, et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2021, 20(3): 200-216. DOI:10.1038/s41573-020-00114-z.
- [27] PARK S Y, YANG D, HA S H, et al. Metabolic engineering of microorganisms for the production of natural compounds[J]. *Advanced Biosystems*, 2018, 2(1): 1700190. DOI:10.1002/adbi.201700190.
- [28] DE OLIVEIRA DAL'MOLIN C G, NIELSEN L K. Plant genome-scale metabolic reconstruction and modelling[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2013, 24(2): 271-277. DOI:10.1016/j.copbio.2012.08.007.
- [29] ACEVEDO-ROCHA C G, GRONENBERG L S, MACK M, et al. Microbial cell factories for the sustainable manufacturing of B

- vitamins[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2019, 56: 18-29. DOI:10.1016/j.copbio.2018.07.006.
- [30] SUN J C, SUN W T, ZHANG G L, et al. High efficient production of plant flavonoids by microbial cell factories: challenges and opportunities[J]. Metabolic Engineering, 2022, 70: 143-154. DOI:10.1016/j.ymben.2022.01.011.
- [31] KULAGINA N, GUIRIMAND G, MELIN C, et al. Enhanced bioproduction of anticancer precursor vindoline by yeast cell factories[J]. Microbial Biotechnology, 2021, 14(6): 2693-2699. DOI:10.1111/1751-7915.13898.
- [32] DIEZ-GUTIÉRREZ L, VICENTE L S, BARRÓN L J R, et al. Gamma-aminobutyric acid and probiotics: multiple health benefits and their future in the global functional food and nutraceuticals market[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 64: 103669. DOI:10.1016/j.jff.2019.103669.
- [33] MALONEY F P, KUKLEWICZ J, COREY R A, et al. Structure, substrate recognition and initiation of hyaluronan synthase[J]. Nature, 2022, 604(7904): 195-201. DOI:10.1038/s41586-022-04534-2.
- [34] BADRIA, RAMAN K, JAYARAMAN G. Uncovering novel pathways for enhancing hyaluronan synthesis in recombinant *Lactococcus lactis*: genome-scale metabolic modeling and experimental validation[J]. Processes, 2019, 7(6): 343. DOI:10.3390/pr7060343.
- [35] 宋焕禄. 食品挥发性风味分析技术概论[J]. 食品与发酵科技, 2023, 59(4): 1-6. DOI:10.3969/j.issn.1674-506X.2023.04-001.
- [36] NETTORE I C, MAIONE L, DESIDERIO S, et al. Influences of age, sex and smoking habit on flavor recognition in healthy population[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020, 17(3): 959. DOI:10.3390/ijerph17030959.
- [37] HANSEN T T, JAKOBSEN T A, NIELSEN M S, et al. Hedonic changes in food choices following roux-en-Y gastric bypass[J]. Obesity Surgery, 2016, 26(8): 1946-1955. DOI:10.1007/s11695-016-2217-x.
- [38] ZHANG H X, WANG L, WANG H Y, et al. Effects of initial temperature on microbial community succession rate and volatile flavors during Baijiu fermentation process[J]. Food Research International, 2021, 141: 109887. DOI:10.1016/j.foodres.2020.109887.
- [39] 吴娜, 顾赛麒, 陶宁萍, 等. 鲜味物质间的相互作用研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(10): 389-392; 400. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2014.10.077.
- [40] LAPUJADE P, COCAIGN-BOUSQUET M, LOUBIERE P. Glutamate Biosynthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(7): 2485-2489. DOI:10.1128/AEM.64.7.2485-2489.1998.
- [41] LEVATA-JOVANOVIC M, SANDINE W E. A method to use *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* 91404 to improve milk fermentations[J]. Journal of Dairy Science, 1997, 80(1): 11-18. DOI:10.68/jds.s0022-0302(97)75907-1.
- [42] VAN IMPE J F, VERCAMMEN D, VAN DERLINDEN E. Toward a next generation of predictive models: a systems biology primer[J]. Food Control, 2013, 29(2): 336-342. DOI:10.1016/j.foodcont.2012.06.019.
- [43] MELKONIAN C, ZORRILLA F, KJÆRBØLLING I, et al. Microbial interactions shape cheese flavour formation[J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 8348. DOI:10.1038/s41467-023-41059-2.
- [44] SIONEK B, SZYDŁOWSKA A, KÜÇÜKGÖZ K, et al. Traditional and new microorganisms in lactic acid fermentation of food[J]. Fermentation, 2023, 9(12): 1019. DOI:10.3390/fermentation9121019.
- [45] WANG Y Y, ZHANG C H, LIU F S, et al. Ecological succession and functional characteristics of lactic acid bacteria in traditional fermented foods[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(22): 5841-5855. DOI:10.1080/10408398.2021.2025035.
- [46] BAHULE C E, DA SILVA MARTINS L H, CHAÚQUE B J M, et al. Metaproteomics revealing microbial diversity and activity in the spontaneous fermentation of maize dough[J]. Food Chemistry, 2024, 435: 137457. DOI:10.1016/j.foodchem.2023.137457.
- [47] CHOI Y J, LIM J Y, KANG M J, et al. Changes in bacterial composition and metabolite profiles during kimchi fermentation with different garlic varieties[J]. Heliyon, 2024, 10(2): e24283. DOI:10.1016/j.heliyon.2024.e24283.
- [48] SUN L, XUE Y L, XIAO Y Z, et al. Community synergy of lactic acid bacteria and cleaner fermentation of oat silage prepared with a multispecies microbial inoculant[J]. Microbiology Spectrum, 2023, 11(3): e0070523. DOI:10.1128/spectrum.00705-23.
- [49] CHEN Y, LI F R, NIELSEN J. Genome-scale modeling of yeast metabolism: retrospectives and perspectives[J]. FEMS Yeast Research, 2022, 22(1): foac003. DOI:10.1093/femsyr/foac003.
- [50] CRUZ F, FARIA J P, ROCHA M, et al. A review of methods for the reconstruction and analysis of integrated genome-scale models of metabolism and regulation[J]. Biochemical Society Transactions, 2020, 48(5): 1889-1903. DOI:10.1042/BST20190840.
- [51] FEIST A M, PALSSON B Ø. The growing scope of applications of genome-scale metabolic reconstructions using *Escherichia coli*[J]. Nature Biotechnology, 2008, 26(6): 659-667. DOI:10.1038/nbt1401.
- [52] 顾鑫, 杨晓贺, 姚亮亮, 等. 大豆灰斑病菌Race15的全基因组测序分析[J]. 大豆科学, 2021, 40(4): 466-475. DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2021.04.0466.
- [53] ALTAMIRANO Á, SAA P A, GARRIDO D. Inferring composition and function of the human gut microbiome in time and space: a review of genome-scale metabolic modelling tools[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2020, 18: 3897-3904. DOI:10.1016/j.csbj.2020.11.035.
- [54] LI Y Q, KONG D X, FU Y, et al. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 148: 80-89. DOI:10.1016/j.plaphy.2020.01.006.
- [55] 李伟程. 1 008 株乳酸乳球菌群体基因组学和功能基因组学研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2023. DOI:10.27229/d.cnki.gnmnu.2023.000060.
- [56] BINTSIS T. Lactic acid bacteria as starter cultures: an update in their metabolism and genetics[J]. AIMS Microbiology, 2018, 4(4): 665-684. DOI:10.3934/microbiol.2018.4.665.
- [57] 裴志雯, 殷俊玲, 夏傲喏, 等. 高产双乙酰的附属发酵剂筛选及其对切达奶酪品质的影响[J]. 食品与发酵工业: 1-13[2024-10-11]. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.037809.
- [58] GRIESEMER M, NAVID A. Uses of multi-objective flux analysis for optimization of microbial production of secondary metabolites[J]. Microorganisms, 2023, 11(9): 2149. DOI:10.3390/microorganisms11092149.
- [59] BAÑARES A B, NISOLA G M, VALDEHUESA K N G, et al. Engineering of xylose metabolism in *Escherichia coli* for the production of valuable compounds[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2021, 41(5): 649-668. DOI:10.1080/07388551.2021.1873243.
- [60] DU L Y, YUE J M, ZHU Y Y, et al. Production of indigo by recombinant *Escherichia coli* with expression of monooxygenase, tryptophanase, and molecular chaperone[J]. Foods, 2022, 11(14): 2117. DOI:10.3390/foods11142117.
- [61] QI Z P, TONG X Y, KE K X, et al. *De novo* synthesis of dihydro- β -ionone through metabolic engineering and bacterium-yeast coculture[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(6): 3066-3076. DOI:10.1021/acs.jafc.3c07291.
- [62] WANG Z B, SUN J X, YANG Q, et al. Metabolic engineering *Escherichia coli* for the production of lycopene[J]. Molecules, 2020, 25(14): 3136. DOI:10.3390/molecules25143136.
- [63] YAN Z B, PAN Y Y, HUANG M T, et al. *De novo* pterostilbene production from glucose using modular coculture engineering in

- Escherichia coli*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(1): 516-528. DOI:10.1021/acs.jafc.3c06629.
- [64] VAN'T HOF M, MOHITE O S, MONK J M, et al. High-quality genome-scale metabolic network reconstruction of probiotic bacterium *Escherichia coli* Nissle 1917[J]. BMC Bioinformatics, 2022, 23(1): 566. DOI:10.1186/s12859-022-05108-9.
- [65] ORTH J D, THIELE I, PALSSON B Ø. What is flux balance analysis?[J]. Nature Biotechnology, 2010, 28(3): 245-248. DOI:10.1038/nbt.1614.
- [66] JOSEPH C, ZAFEIROPOULOS H, BERNAERTS K, et al. Predicting microbial interactions with approaches based on flux balance analysis: an evaluation[J]. BMC Bioinformatics, 2024, 25(1): 36. DOI:10.1186/s12859-024-05651-7.
- [67] YANG C, XUE B Y, ZHANG Y M, et al. Metabolic flux simulation of microbial systems based on optimal planning algorithms[J]. Green Chemical Engineering, 2023, 4(2): 146-159. DOI:10.1016/j.gce.2022.04.003.
- [68] MAHADEVAN R, EDWARDS J S, DOYLE F J. Dynamic flux balance analysis of diauxic growth in *Escherichia coli*[J]. Biophysical Journal, 2002, 83(3): 1331-1340. DOI:10.1016/S0006-3495(02)73903-9.
- [69] DIENER C, GIBBONS S M. More is different: metabolic modeling of diverse microbial communities[J]. mSystems, 2023, 8(2): e0127022. DOI:10.1128/msystems.01270-22.
- [70] GHADERMAZI P, CHAN S H J. Microbial interactions from a new perspective: reinforcement learning reveals new insights into microbiome evolution[J]. Bioinformatics, 2024, 40(1): btae003. DOI:10.1093/bioinformatics/btae003.
- [71] HARCOMBE W R, RIEHL W J, DUKOVSKI I, et al. Metabolic resource allocation in individual microbes determines ecosystem interactions and spatial dynamics[J]. Cell Reports, 2014, 7(4): 1104-1115. DOI:10.1016/j.celrep.2014.03.070.
- [72] GOMEZ J A, BARTON P I. Dynamic flux balance analysis using DFBAlab[M]//WALKER J M. Methods in molecular biology. New York: Springer New York, 2017: 353-370. DOI:10.1007/978-1-4939-7528-0_16.
- [73] KERKHOVEN E J. Advances in constraint-based models: methods for improved predictive power based on resource allocation constraints[J]. Current Opinion in Microbiology, 2022, 68: 102168. DOI:10.1016/j.mib.2022.102168.
- [74] WEN L F, YANG L X, CHEN C, et al. Applications of multi-omics techniques to unravel the fermentation process and the flavor formation mechanism in fermented foods[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2024, 64(23): 8367-8383. DOI:10.1080/10408398.2023.2199425.
- [75] JIANG N, WU R N, WU C, et al. Multi-omics approaches to elucidate the role of interactions between microbial communities in cheese flavor and quality[J]. Food Reviews International, 2023, 39(8): 5446-5458. DOI:10.1080/87559129.2022.2070199.
- [76] REGUEIRA A, LEMA J M, MAURICIO-IGLESIAS M. Microbial inefficient substrate use through the perspective of resource allocation models[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2021, 67: 130-140. DOI:10.1016/j.copbio.2021.01.015.
- [77] QIU S Z, YANG A D, ZENG H. Flux balance analysis-based metabolic modeling of microbial secondary metabolism: current status and outlook[J]. PLoS Computational Biology, 2023, 19(8): e1011391. DOI:10.1371/journal.pcbi.1011391.
- [78] SMIT S J, LICHMAN B R. Plant biosynthetic gene clusters in the context of metabolic evolution[J]. Natural Product Reports, 2022, 39(7): 1465-1482. DOI:10.1039/d2np00005a.
- [79] WU Y N, GONG F L, LI S J. Leveraging yeast to characterize plant biosynthetic gene clusters[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2023, 71: 102314. DOI:10.1016/j.pbi.2022.102314.
- [80] SULHEIM S, FOSSHEIM F A, WENTZEL A, et al. Automatic reconstruction of metabolic pathways from identified biosynthetic gene clusters[J]. BMC Bioinformatics, 2021, 22(1): 81. DOI:10.1186/s12859-021-03985-0.
- [81] LI T Y, TRIPATHI A, YU F G, et al. DDAP: docking domain affinity and biosynthetic pathway prediction tool for type I polyketide synthases[J]. Bioinformatics, 2020, 36(3): 942-944. DOI:10.1093/bioinformatics/btz677.
- [82] DELÉPINE B, DUIGOU T, CARBONELL P, et al. RetroPath2.0: a retrosynthesis workflow for metabolic engineers[J]. Metabolic Engineering, 2018, 45: 158-170. DOI:10.1016/j.ymben.2017.12.002.
- [83] WATSON I A, WANG J B, NICOLAOU C A. A retrosynthetic analysis algorithm implementation[J]. Journal of Cheminformatics, 2019, 11(1): 1. DOI:10.1186/s13321-018-0323-6.
- [84] ZENG H, ROHANI R, HUANG W E, et al. Understanding and mathematical modelling of cellular resource allocation in microorganisms: a comparative synthesis[J]. BMC Bioinformatics, 2021, 22(1): 467. DOI:10.1186/s12859-021-04382-3.
- [85] REGUEIRA A, ROMBOUTS J L, WAHL S A, et al. Resource allocation explains lactic acid production in mixed-culture anaerobic fermentations[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2021, 118(2): 745-758. DOI:10.1002/bit.27605.
- [86] ELSEMMAN I E, PRADO A R, GRIGAITIS P, et al. Whole-cell modeling in yeast predicts compartment-specific proteome constraints that drive metabolic strategies[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 801. DOI:10.1038/s41467-022-28467-6.
- [87] KRATZ J C, BANERJEE S. Dynamic proteome trade-offs regulate bacterial cell size and growth in fluctuating nutrient environments[J]. Communications Biology, 2023, 6(1): 486. DOI:10.1038/s42003-023-04865-4.
- [88] CHEN Y, GUSTAFSSON J, RANGEL A T, et al. Reconstruction, simulation and analysis of enzyme-constrained metabolic models using GECKO Toolbox 3.0[J]. Nature Protocols, 2024, 19(3): 629-667. DOI:10.1038/s41596-023-00931-7.
- [89] SÁNCHEZ B J, ZHANG C, NILSSON A, et al. Improving the phenotype predictions of a yeast genome-scale metabolic model by incorporating enzymatic constraints[J]. Molecular Systems Biology, 2017, 13(8): 935. DOI:10.1525/msb.20167411.
- [90] CHEN Y, NIELSEN J. Mathematical modeling of proteome constraints within metabolism[J]. Current Opinion in Systems Biology, 2021, 25: 50-56. DOI:10.1016/j.coisb.2021.03.003.
- [91] PACCIANI-MORI L, SUWEIS S, MARITAN A, et al. Constrained proteome allocation affects coexistence in models of competitive microbial communities[J]. The ISME Journal, 2021, 15(5): 1458-1477. DOI:10.1038/s41396-020-00863-0.
- [92] SUBRAMANIAN I, VERMA S, KUMAR S, et al. Multi-omics data integration, interpretation, and its application[J]. Bioinformatics and Biology Insights, 2020, 14: 1177932219899051. DOI:10.1177/1177932219899051.
- [93] BERSANELLI M, MOSCA E, REMONDINI D, et al. Methods for the integration of multi-omics data: mathematical aspects[J]. BMC Bioinformatics, 2016, 17(Suppl 2): 15. DOI:10.1186/s12859-015-0857-9.
- [94] AMINIAN-DEHKORDI J, VALIEI A, MOFRAD M R K. Emerging computational paradigms to address the complex role of gut microbial metabolism in cardiovascular diseases[J]. Frontiers in Cardiovascular Medicine, 2022, 9: 987104. DOI:10.3389/fcvm.2022.987104.
- [95] DE BECKER K, TOTIS N, BERNAERTS K, et al. Using resource constraints derived from genomic and proteomic data in metabolic network models[J]. Current Opinion in Systems Biology, 2022, 29: 100400. DOI:10.1016/j.coisb.2021.100400.
- [96] DOMENZAIN I, SÁNCHEZ B, ANTON M, et al. Reconstruction of a catalogue of genome-scale metabolic models with enzymatic constraints using GECKO 2.0[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 3766. DOI:10.1038/s41467-022-31421-1.