

Basic concepts of metabolic flux analysis

INGENIERÍA METABÓLICA

Conceptos básicos de análisis de fluxes metabólicos

Claudia P. Sánchez-Henao^{1§} , Howard Ramirez-Malule² , Víctor A. López-Agudelo³ 

¹*Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Grupo de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Medellín, Colombia*

²*Universidad del Valle, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Química, Cali, Colombia*

³*Universidad de Antioquia, Departamento de Ingeniería Química, Medellín, Colombia*

[§]*cpatricia.sanchez@udea.edu.co, howard.ramirez@correounivalle.edu.co, valonso.lopez@udea.edu.co*

Recibido: 04 de mayo de 2020 – **Aceptado:** 23 de septiembre 2020

Abstract

Metabolism represents the biological level that is most related to the phenotypes of the cell and, alterations or reprogramming of this can (i) affect the production of primary or secondary metabolites in microorganisms of biotechnological interest, (ii) favor or not the inhibition of growth in pathogenic organisms and (iii) developing metabolic disorders such as obesity or diabetes, among others. The study of metabolism, redesign, and redirection of metabolic fluxes has become an important area of research (also known as Metabolic Engineering), as it has allowed the development and design of improved biological processes, the identification of therapeutic targets, the design of therapeutic strategies to cure metabolic disorders and the identification of biomarkers in cancer, among others. Currently, the development of computational methodologies is allowing to study the cell metabolism under different environmental conditions and directing experiments with the model's predictions. The purpose of this review is to highlight the importance of metabolic flux analysis as a general methodology to study metabolic reprogramming in different organisms of biotechnological, medical, and therapeutic interest. This work condenses the theoretical bases and key concepts to understand the analysis of metabolic fluxes, which will be a fundamental input for those who are entering to the world of systems biology or related areas.

Keywords: *Flux balance analysis, Metabolic control analysis, Metabolic flux analysis, Metabolic modeling.*

Resumen

El metabolismo representa el nivel biológico que más se relaciona con los fenotipos de la célula y, las alteraciones o reprogramaciones de éste pueden, entre otras, (i) afectar la producción de metabolitos primarios o secundarios en microorganismos de interés biotecnológico, (ii) favorecer o no la inhibición del crecimiento en organismos patógenos y (iii) desarrollar desórdenes metabólicos como la obesidad o la diabetes. Es por ello, que el estudio del metabolismo,

el rediseño, y el redireccionamiento de fluxes metabólicos se ha convertido en un área importante de investigación (también conocida como Ingeniería Metabólica), ya que ha permitido el desarrollo y diseño de procesos biológicos mejorados, la identificación de blancos terapéuticos, el diseño de estrategias terapéuticas para curar desordenes metabólicos y la identificación de biomarcadores en cáncer, entre otros. Actualmente, se han desarrollado metodologías computacionales que permiten estudiar el metabolismo celular a diferentes condiciones medioambientales, dirigiendo la experimentación con las predicciones del modelo. El propósito de esta revisión es resaltar la importancia del análisis de fluxes metabólicos como una metodología general para estudiar la reprogramación metabólica en distintos organismos de interés biotecnológico, médico, y terapéutico. Este trabajo condensa las bases teóricas y los conceptos claves para entender el análisis de fluxes metabólicos, lo cual será un insumo fundamental para aquellos que se están adentrando al mundo de la biología de sistemas o áreas afines.

Palabras clave: *Análisis de balance de fluxes, Análisis de control metabólico, Análisis de fluxes metabólicos, Modelado metabólico.*

1. Introducción

El metabolismo celular comprende todas las reacciones bioquímicas que se llevan a cabo dentro de una célula. Estas reacciones pueden favorecer el suministro de precursores para rutas biosintéticas, de energía para reacciones anabólicas, y los procesos de señalización y de mantenimiento generales. Para mantener el equilibrio o la homeostasis celular, las redes metabólicas deben tener una amplia plasticidad y robustez en respuesta a perturbaciones nutricionales y ambientales, lo que ha traído un gran interés por esta área en los últimos años, con la ayuda y el desarrollo de la Ingeniería Metabólica ⁽¹⁾.

Se ha descrito que la Ingeniería Metabólica tiene como fin diseñar microorganismos que puedan ser empleados para la producción rentable de productos de interés mundial tales como biocombustibles, biofertilizantes, biosurfactantes, farmacéuticos, entre otros. La Ingeniería Metabólica es básicamente un campo destinado al diseño, la construcción y la optimización de las vías metabólicas en un microorganismo de interés ⁽²⁾.

Además de las metodologías experimentales de biología sintética que han facilitado el diseño e inserción de rutas metabólicas, existen enfoques matemáticos que han permitido estudiar el metabolismo de una amplia variedad de

microorganismos en diferentes niveles de detalle, y en áreas que engloban la biotecnología y la medicina ⁽³⁾.

En la actualidad, estas metodologías matemáticas para estudiar el metabolismo se conocen como enfoques de modelado basado en restricciones (Constraint-based modeling, por sus siglas en inglés) ^(3,4), o métodos COBRA ^(5,6) y han estado en constante desarrollo desde que se ha incrementado la capacidad de cuantificar gran cantidad de biomoléculas de la célula, por medio de las tecnologías ómicas, que permiten capturar moléculas de diferentes niveles biológicos como el genoma (genes), transcriptoma (RNA mensajero), metaboloma (metabolitos), y el proteoma (proteínas) con una amplia precisión.

Con esta amplia disponibilidad de datos, se han logrado construir modelos metabólicos estequiométricos para cientos de microorganismos ^(7,8), aquí se relaciona directamente el metabolismo con el genoma, transcriptoma y proteoma. Particularmente, estos modelos metabólicos contienen información gen-proteína-reacción que permiten caracterizar el fenotipo a partir de la existencia de una enzima, la expresión de los genes y su posible actividad catalítica. Estos modelos estequiométricos son conocidos como modelos a escala del genoma y pueden ser construidos con diferentes puntos de partida de los niveles biológicos, de arriba hacia

abajo (top-down, partiendo de la información conocida de las rutas y reacciones metabólicas del microorganismo y asociándolas con la información de sus respectivos genes, proteínas o enzimas) o de abajo hacia arriba (bottom-up, partiendo de la información conocida del genoma del microorganismo y asociándolas con las proteínas, enzimas, reacciones y rutas metabólicas del microorganismo) ⁽⁹⁾.

De las metodologías computacionales más básicas empleadas en la Ingeniería Metabólica y en el estudio del metabolismo con enfoque sistémico, se encuentran el análisis de flux metabólico, el análisis de control metabólico, análisis termodinámico y modelado cinético⁽¹⁰⁾; en esta revisión se hará referencia a las metodologías más importantes de una forma narrativa

2. Análisis de Fluxes Metabólicos (MFA, por sus siglas inglés)

MFA es un enfoque matemático para el análisis del flux de metabolitos a través de una ruta metabólica, específicamente para los modelos metabólicos a escala metabólica o genómica que se han desarrollado/(re)construidos en los últimos 15 años ^(1,11). En otras palabras, MFA permite la observabilidad de una ruta metabólica gracias a la cuantificación de las velocidades de reacción en toda la red, lo cual se denomina comúnmente distribución de flux metabólico, y que está asociada a las condiciones de operación del bioproceso y al tipo de microorganismo empleado. Este enfoque permite analizar fenotipos y capacidades metabólicas de microorganismos a diferentes condiciones medioambientales, así como también modificaciones genéticas *in silico*. Los fluxes intracelulares de una ruta metabólica pueden ser cuantificados empleando modelos estequiométricos que tengan en cuenta todas (o la mayoría) de las reacciones intracelulares y por aplicación de un balance de materia alrededor de los metabolitos intracelulares ⁽¹²⁾. Como punto de partida se tiene un grupo de ecuaciones que

relacionan las velocidades de reacción de los sustratos de entrada y los metabolitos extracelulares (productos y subproductos) de una red metabólica propuesta de acuerdo con la literatura. A continuación, se muestra una representación global de una red metabólica (Figura 1a).

Entonces, de acuerdo con la idea básica de MFA, la distribución de fluxes es calculada mediante un balance de masa a todos los metabolitos internos de la red (Figura 1a y Figura 1b), el cual se representa matemáticamente a través de la Ec. 1:

$$\frac{d\mathbf{X}}{dt} = \mathbf{S} \cdot \mathbf{v} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde \mathbf{X} es el vector de concentración de metabolitos, y \mathbf{v} es el vector de distribución de fluxes, y \mathbf{S} es la matriz estequiométrica de tamaño $(m \times n)$. m y n son el número de metabolitos y el número de reacciones (fluxes), respectivamente. Las filas de la matriz \mathbf{S} simbolizan a los metabolitos, las columnas representan a los fluxes, mientras que los elementos de la matriz indican los coeficientes estequiométricos de los metabolitos en cada reacción, los cuales son negativos para reactivos y positivos para productos (Figura 1b).

En general, se asume que los metabolitos intracelulares están en un pseudo estado estacionario (Figura 1c), ya que en términos de escalas de tiempo, el metabolismo se adapta a cambios nutricionales y ambientales mucho más rápido que otros procesos celulares tales como la replicación o expresión génica, de manera que todo reactivo de una reacción es consumido rápidamente para formar un producto ⁽¹³⁾. Por lo tanto, el balance se puede reescribir como en la Ec. 2:

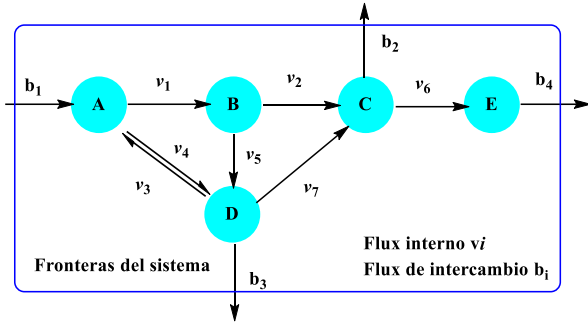
$$\mathbf{S} \cdot \mathbf{v} = 0 \quad (\text{Ec. 2})$$

Los fluxes medidos (que se pueden obtener sus valores por algún procedimiento o técnica analítica) son usados para reducir el posible espacio de solución dada la Ec. 2. Por lo tanto, el

vector de reacciones \mathbf{v} es dividido en el vector de fluxes medidos \mathbf{v}_m y fluxes desconocidos \mathbf{v}_u . De manera similar, la matrix \mathbf{S} puede dividirse en \mathbf{S}_m y \mathbf{S}_u (Ec. 3). Dado estos arreglos de la matrix, la Ec. 2 puede ser reescrita como la Ec. 4:

$$\mathbf{S} \cdot \mathbf{v} = \mathbf{S}_u \cdot \mathbf{v}_u + \mathbf{S}_m \cdot \mathbf{v}_m = 0 \quad (\text{Ec. 3})$$

$$\mathbf{S}_u \cdot \mathbf{v}_u = -\mathbf{S}_m \cdot \mathbf{v}_m \quad (\text{Ec. 4})$$



(a)

$$\begin{aligned} \frac{dA}{dt} &= b_1 + v_3 - v_1 - v_4 \\ \frac{dB}{dt} &= v_1 - v_2 - v_5 \\ \frac{dC}{dt} &= v_2 + v_7 - v_6 - b_2 \\ \frac{dD}{dt} &= v_4 + v_5 - v_7 - b_3 \\ \frac{dE}{dt} &= v_6 - b_4 \end{aligned} \quad \mathbf{S} = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & -1 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 \end{bmatrix} \quad \mathbf{v} = \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \\ v_7 \\ b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ b_4 \end{bmatrix}$$

(b)

$$b_1 + v_3 - v_1 - v_4 = 0$$

$$v_1 - v_2 - v_5 = 0$$

$$v_2 + v_7 - v_6 - b_2 = 0$$

$$v_4 + v_5 - v_7 - b_3 = 0$$

$$v_6 - b_4 = 0$$

(c)

Figura 1. Ejemplo de una red metabólica. (a) b_1, b_2, b_3, b_4 y $v_1, v_2, v_3, v_4, v_5, v_6, v_7$ representan reacciones de intercambio e intracelulares, respectivamente. (b) balance de masa para cada uno de los metabolitos y representación matricial de la red metabólica. (c) balance de masa en estado estacionario ($\mathbf{S} \cdot \mathbf{v} = 0$).

2.1. Grados de libertad y dependencia lineal

En general se pueden presentar tres escenarios al momento de solucionar el sistema matricial de la Figura 1b y Ec. 4, y está relacionado con los

grados de libertad (GL) de la matrix, el cual está definido como la Ec. 5:

$$GL = n - \text{rango}(\mathbf{S}) \quad (\text{Ec. 5})$$

donde el rango de \mathbf{S} proporciona el número de filas o columnas linealmente independientes. Si el GL es igual a cero, indica que el sistema es determinado y posee una única solución, es decir, existen suficientes mediciones experimentales disponibles y la ecuación 4 puede ser usada para calcular únicamente los fluxes desconocidos \mathbf{v}_u . Cuando hay una única solución al sistema, se conoce como MFA.

En el caso de que GL sea mayor que cero, se considera el sistema como sub-determinado y el sistema tiene infinitas soluciones. En este caso es necesario agotar los grados de libertad mediante la determinación de fluxes a partir de datos experimentales, o en su defecto se trataría como un problema de optimización donde es posible aplicar métodos de programación lineal (LP, por sus siglas en inglés) para poder dar solución al sistema, en este caso, se conoce más como Análisis de Balance de Fluxes (FBA, por sus siglas en inglés). Al aplicar metodología FBA es posible determinar la distribución de fluxes más probable en la red metabólica según las restricciones impuestas y después de proponer una adecuada función objetivo.

El último escenario es donde GL es menor que cero, y el sistema se considera sobre-determinado o redundante. Aquí se asegura la consistencia estadística de los datos medidos, y la estimación de fluxes se realiza por medio de la minimización de la suma de errores cuadrados entre los fluxes medidos y calculados en la red metabólica.

Debido a la alta interconectividad en una red metabólica, generalmente el número de reacciones (fluxes) es mayor al número de metabolitos participantes en dichas reacciones. En la red de la Figura 1a participan 5 metabolitos (A, B, ..., E), 11 fluxes (v_1, v_2, \dots, v_7 y $b_1, b_2,$

b3, b4), S tiene un tamaño de (5×11) y los GL son 6; para resolver el sistema como MFA se tendría que garantizar la medición de 6 fluxes: En caso de no poder contar con el total de esos fluxes medidos, el sistema propuesto se resuelve como un sistema sub-determinado y se procede a aplicar FBA.

2.2. Análisis de Balance de Fluxes

FBA es un caso particular de MFA, donde los GL son mayores a cero, es decir, hay más variables que ecuaciones linealmente independientes^(11,14). FBA emplea métodos/estrategias de programación lineal casi siempre para generar/obtener la distribución de fluxes más probable a lo largo de la red metabólica maximizando/minimizando una función objetivo específica^(1,11,14). En estado estacionario, el problema LP se puede representar como la Ec. 6:

$$\begin{aligned} \text{Maximizar/Minimizar } Z &= \mathbf{w} \cdot \mathbf{v} & (\text{Ec. 6}) \\ \text{Sujeto a: } \mathbf{S} \cdot \mathbf{v} &= 0 \\ v_{li} &\leq v \leq v_{ls} \end{aligned}$$

donde Z es la función objetivo, \mathbf{w} es el vector de pesos, $\mathbf{S}_{m \times n}$ es la matriz estequiométrica, \mathbf{v} el vector de fluxes, mientras que v_{li} y v_{ls} son los límites inferiores y superiores de los fluxes intracelulares, respectivamente. El vector de los pesos es generalmente utilizado para definir las propiedades de una solución particular buscada, este puede llegar a ser un escalar (valor único de 1 para la variable a optimizar).

A continuación, se presentan las diferentes opciones que se pueden analizar para poder seccionar una función objetivo a este problema subdeterminado.

2.2.1. Funciones objetivo

No hay una función objetivo universal para los estudios de FBA, lo que constituye una de las principales limitaciones de este enfoque. En efecto, es necesario probar diferentes funciones objetivo-lineales, y la que mejor se ajuste a los

datos experimentales, es la seleccionada para realizar el análisis de la distribución de fluxes.

Por lo tanto, un gran número de funciones objetivo se han implementado/utilizado en las dos últimas décadas⁽¹⁵⁻¹⁷⁾, siendo una de las más empleadas la maximización del crecimiento celular (biomasa)^(1,11,17-19). A continuación, se lista una serie de funciones objetivos ampliamente utilizadas en estudios de FBA y su significado biológico⁽¹⁵⁾.

- **Maximización de biomasa (Ec. 7):** la célula busca evolutivamente el rendimiento máximo (max) de biomasa durante la adquisición de nutrientes y en fase exponencial de crecimiento.

$$\max \frac{v_{biomasa}}{v_{nutriente}} \quad (\text{Ec. 7})$$

Siendo $v_{biomasa}$ (flux de biomasa) y $v_{nutriente}$ flux de un nutriente seleccionado.

- **Maximización de biomasa por unidad de flux (Ec. 8):** la célula busca maximizar (max) el rendimiento de biomasa mientras minimiza el uso de enzimas. Esta función objetivo es no lineal.

$$\max \frac{v_{biomasa}}{\sum_{i=1}^n v_i^2} \quad (\text{Ec. 8})$$

Siendo $v_{biomasa}$ (flux de biomasa) y v_i un flux en particular a evaluar.

- **Maximización de ATP (Ec. 9):** La célula busca evolutivamente la eficiencia energética máxima.

$$\max v_{ATP} \quad (\text{Ec. 9})$$

Siendo v_{ATP} flux de ATP

- **Maximización de ATP por unidad de flux (Ec. 10):** la célula busca maximizar el

rendimiento de ATP mientras minimiza el uso de enzimas. Esta función objetivo es no lineal.

$$\max \frac{v_{ATP}}{\sum_{i=1}^n v_i^2} \quad (Ec. 10)$$

- **Minimización del flux intracelular global (Ec. 11):** La célula busca la máxima eficiencia enzimática para el crecimiento celular. Esta función objetivo es no lineal.

$$\min \sum_{i=1}^n v_i^2 \quad (Ec. 11)$$

Siendo min: minimizar y v_i un flux en particular a evaluar.

- **Minimización del potencial redox (Ec. 12):** La célula busca que el número de reacciones oxidantes se reduzca para conservar su energía o usar esa energía de la manera más eficiente posible.

$$\max \frac{\sum_n v_{NADH}}{v_{nutriente}} \quad (Ec. 12)$$

- **Minimización del consumo de nutrientes (Ec. 13):** La célula busca el uso más eficiente de sus nutrientes.

$$\min \frac{v_{nutrientes}}{v_{biomasa}} \quad (Ec. 13)$$

2.3. Restricciones a los sistemas biológicos

Las restricciones delimitan las funciones celulares, y deben estar en concordancia en la forma como los microorganismos operan y evolucionan. Sin embargo, la mayoría de las restricciones conocidas se basan en interpretación/entendimiento de los sistemas biológicos. A continuación, de acuerdo con el enfoque de MFA o FBA, se describen subclases de restricciones^(20,21).

- **Restricciones fisicoquímicas fundamentales:** consideradas como restricciones inviolables. Este tipo de restricciones involucran los conceptos de conservación de masa, energía y momentum, así como la velocidad máxima de reacción y de transporte de especies.
- **Restricción de balance de masa:** esta restricción se basa en el balance de masa en estado estacionario ($S \cdot v = 0$), la cual es análoga a la ley de Kirchhoff para circuitos eléctricos, esta ley establece que la suma de las corrientes que entran a un nodo debe ser igual a la suma de corrientes que salen del nodo. Es decir, la tasa de producción debe ser igual a la tasa de consumo para cada metabolito (nodo) de la red metabólica en estado estacionario (Figura 1a y 1c).
- **Restricciones de balance de energía o termodinámicas:** de manera análoga a las restricciones de balance de masa, las restricciones de balance de energía se basan en la segunda ley de Kirchhoff la cual establece que la suma de las caídas de voltaje alrededor de un lazo cerrado es igual a cero⁽²²⁾. Es decir, los cambios en la energía libre de Gibbs alrededor de un lazo de una red de reacciones bioquímicas deben ser igual a cero, lo cual se convierte en una restricción de igualdad. Así mismo, los principios termodinámicos también indican que para proceder una reacción el cambio en su energía libre de Gibbs debe ser menor a cero, lo cual sería una restricción de desigualdad.
- **Restricciones espaciales o topobiológicas:** también llamadas restricciones tridimensionales. Por ejemplo, la aglomeración de moléculas dentro de la célula (por ejemplo, ADN, ARN) podrían afectar la forma y la función de los sistemas biológicos.

- **Restricciones medioambientales:** unas de las principales características de estas restricciones es que depende del tiempo y de las condiciones de operación del cultivo celular. La disponibilidad de nutrientes (fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, oxígeno, azufre, etc., en el medio de cultivo) y aceptores/donadores de electrones, pH, temperatura, y osmolaridad son ejemplos de restricciones medio ambientales. Los medios de cultivo químicamente definidos son comúnmente empleados para realizar estudios de MFA y FBA debido a que es posible extraer información detallada de cada uno de los nutrientes ⁽²³⁾. Información del medio de cultivo y de datos obtenidos a partir de técnicas analíticas son incorporados en el modelo metabólico del microorganismo de estudio para una mejor descripción y predicción del fenotipo metabólico.
- **Restricciones experimentales (Fluxes):** se puede obtener más información del modelo metabólico a partir de la distribución de fluxes de los isótopos para los metabolitos intracelulares, esto se denomina distribución isotópoma y la técnica empleada se llama ¹³C-MFA ^(24,25). ¹³C-MFA es una extensión de MFA y permite la resolución de rutas en paralelo sin ninguna medición de flux relacionado, ciclos metabólicos, entre otros, lo cual es una limitación del MFA tradicional ⁽²⁵⁾. Este enfoque puede ser resumido como un problema de ajuste de datos entre concentración experimental y simulada de metabolitos enriquecidos con ¹³C.
- **Restricciones de regulación:** estas restricciones están ligadas con la expresión génica que depende principalmente del entorno de crecimiento (condiciones medioambientales) del microorganismo. La regulación de la expresión génica podría desencadenar en la expresión o represión de

síntesis de enzimas, lo cual conlleva a la activación o inactivación de una reacción en la red metabólica ⁽²⁶⁾.

2.3.1. Incorporación de restricciones a enfoque FBA

Para incorporar las restricciones anteriormente descritas a un estudio empleando el enfoque de FBA, éstas deben ser descritas matemáticamente. En este sentido las restricciones se pueden dividir en dos clases (i) de balances (restricción de igualdad) y (ii) de límites (restricción de desigualdad).

i) Restricciones de balances

- **Balance de masa:** balance de masa en estado estacionario $S \cdot v = 0$ ⁽²⁷⁾.
- **Balance de energía (energía libre de Gibbs):** $N(S) * G = 0$, donde N es el espacio nulo de la matriz S , y G es el vector de los cambios de las energías libres de Gibbs de cada reacción ^(27,28). Algunos autores utilizan el concepto de potencial químico de reacción en vez de energía libre Gibbs de reacción ⁽²⁹⁾.
- **Fluxes:** estos pueden ser cuantificados experimentalmente aplicando balances de masa al sistema y utilizando datos provenientes de aplicación de técnicas analíticas, $v = v_{exp}$.

ii) Restricciones de límites

- **Fluxes:** delimitado por el mínimo y máximo flux de cada reacción.
 $v_{li} \leq v \leq v_{ls}$. Para reacciones irreversibles $v_{li} = 0$ ($0 \leq v \leq v_{ls}$). Donde el subíndice li y ls denotan el límite inferior y superior de la variable, respectivamente. Estos límites también pueden ser expresados como el valor

mínimo y máximo de la variable, $v_{min} \leq v \leq v_{max}$.

- **Concentraciones:** las concentraciones no pueden ser negativas bajo ninguna circunstancia ($0 \leq C \leq C_{ls}$) y pueden ser muy importantes cuando se utilizan restricciones termodinámicas como en la metodología planteada en “Thermodynamic-based Metabolic Flux Analysis” (TMFA) ⁽³⁰⁾.
- **Constantes cinéticas:** análogamente a la restricción de concentraciones, es posible delimitar las restricciones para constantes cinéticas ($0 \leq k \leq k_{max}$).

2.4. Métodos matemáticos de solución de fluxes metabólicos

A continuación, se describen las principales características de los métodos de optimización empleados para representar fenotipos metabólicos ⁽²¹⁾.

- **Programación lineal (LP):** este método se utiliza en problemas en los cuales tanto la función objetivo como las restricciones (igualdad e desigualdad) son lineales. A continuación, se muestra un ejemplo de LP en FBA (Ec. 14).

$$\text{Maximizar } ATP \quad (\text{Ec. 14})$$

Sujeto a: $S \cdot v = 0$ (restricción balance de masa)

$$v_{li} \leq v \leq v_{ls} \quad (\text{restricción de limite})$$

- **Programación Cuadrática (QP):** este método se utiliza cuando el problema a resolver involucra un conjunto de restricciones lineales (igualdad e desigualdad) y una función objetivo cuadrática. A continuación, se muestra un ejemplo de formulación QP para la identificación de fluxes metabólicos (Ec. 15).

$$\text{Minimizar } v_j^2 \quad (\text{Ec. 15})$$

Sujeto a: $S \cdot v = 0$

$$v_{li} \leq v \leq v_{ls} \quad (\text{restricción de limite})$$

- **Programación Lineal Entera-Mixta (MILP):** este método se utiliza cuando el problema a resolver involucra variables de decisión real y entera. Como ejemplos, se pueden aplicar las reglas booleanas (formalismo o lógica booleana) para representar las restricciones de regulación. En este caso las reglas booleanas definen que producto génico (o proteína) está activo (“encendido”) o inactivo (“apagado”) como respuesta a la disponibilidad de señales ambientales. Este enfoque se puede extender para la presencia o ausencia de algún nutriente/sustrato en el medio de cultivo. Por ejemplo, si el microorganismo es aerobio estricto, la simulación no podría proceder en condiciones anaerobias ⁽³¹⁾.

Otros autores introducen variables binarias en el enfoque de FBA para la modelación de delección de genes, donde “uno” indica que la reacción esta activa y puede tomar un valor diferente de cero, mientras que “cero” denota que la reacción esta inactiva y que el flux por dicha reacción es cero bajo cualquier condición metabólica ⁽³²⁾ (Ec. 16).

$$v_{li} * y_i \leq v \leq v_{ls} * y_i \quad (\text{Ec. 16})$$

(restricción de límite)

$$y_i = \begin{cases} 1 & \text{si el flux de la reacción } j \text{ esta activo } (v_i) \\ 0 & \text{si el flux de la reacción } j \text{ esta inactivo } (v_i) \end{cases}$$

- **Programación No Lineal (NLP):** este método se utiliza cuando la función objetivo del problema a resolver no es lineal ni cuadrática y/o las restricciones no son lineales. A continuación, se muestra un ejemplo de NLP (Ec. 17).

$$\text{Minimizar } g(x) \text{ [NLP]} \quad (\text{Ec. 17})$$

Sujeto a: $S \cdot v = 0$

$$f_i(x) \leq v \leq h_i(x) \quad i = 1, 2, \dots, M \\ x \in \mathbb{R}^N$$

donde $g(x)$, $f_i(x)$ y $h_i(x)$ son funciones definidas en \mathbb{R}^N , que denotan la función objetivo, y las restricciones no lineales de desigualdad de los fluxes intracelulares (M) de la red metabólica.

3. Análisis de Variabilidad de Fluxes (FVA, por sus siglas en inglés)

FVA es empleado para encontrar el rango de los valores permitidos para cada uno de los fluxes mientras se satisface todas las restricciones nutricionales y se cumple o no con el rendimiento óptimo definido por la función objetivo seleccionada, es decir, permite determinar el mínimo y máximo flux que puede obtener cada reacción de la red metabólica mientras se satisfacen todas las restricciones (nutricionales, estequiométricas, termodinámicas, entre otras) y una restricción de igualdad adicional la cual puede o no ser el valor de la función objetivo optimizada ^(21,33,34).

La formulación matemática de FVA puede ser descrita de la siguiente forma (Ec. 18, 19 y 20):

Paso 1.

Maximizar—Minimizar $Z = w \cdot v$ (Ec. 18)

Sujeto a: $S \cdot v = 0$
 $v_{li} \leq v \leq v_{ls}$

Paso 2

Maximizar v_j (Ec. 19)

Sujeto a: $S \cdot v = 0$
 $Z_{obj} = w \cdot v$
 $v_{li} \leq v \leq v_{ls}$

Paso 3

Minimizar v_j (Ec. 20)

Sujeto a: $S \cdot v = 0$
 $Z_{obj} = w \cdot v$
 $v_{li} \leq v \leq v_{ls}$

donde Z_{obj} es el valor de la función objetivo calculado en el paso 1.

El resultado es un intervalo de valores de fluxes permisibles a través de cada reacción que satisfacen las restricciones.

4. Rutas Extremas y Ciclos Termodinámicos Infactibles

Las rutas extremas son un conjunto único y mínimo de vectores que caracterizan completamente las capacidades en estado estacionario de una red metabólica (Ec. 21):

$$S \cdot v_{ss} = 0 \quad v_{ss_i} \geq 0, \quad \forall i \quad (Ec. 21)$$

donde S es la matriz estequiométrica, v_i es el vector de fluxes positivos de manera que las reacciones reversibles son separadas en sus componentes hacia adelante y hacia atrás. Cualquier distribución de fluxes en estado estacionario v_{ss} dentro del cono puede ser descrita como una combinación lineal no negativa de los bordes extremos del cono (Ec. 22):

$$v_{ss} = \sum_{i=1}^n \alpha_i p_i \quad \alpha_i \geq 0 \quad (Ec. 22)$$

donde las rutas extremas p_i son un conjunto de vectores base convexos que definen todo el politopo de soluciones de fluxes en estado estacionario ^(22,35), y α_i son pesos positivos y acotados.

Estos vectores base pueden definir tres tipos de rutas extremas, como se indica en la Figura 2:

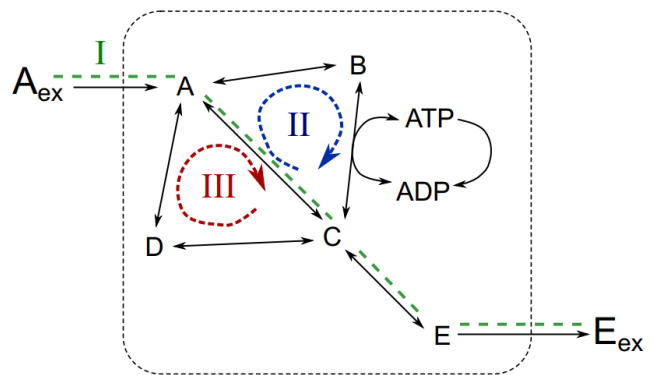


Figura 2. Tipos de rutas extremas encontradas en la solución FBA de redes metabólicas en estado estacionario. Adaptado de ⁽³⁵⁾

Tipo I: conocidas como rutas primarias. Son rutas que tienen fluxes de intercambio que cruzan los límites del sistema y representan rutas metabólicas primarias. Estas rutas extremas detallan la conversión de sustratos (A) en productos (E).

Tipo II: conocidas como ciclos fútiles ($A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow A$, en azul). Las rutas extremas también tienen fluxes de intercambio que cruzan los límites del sistema, pero estos fluxes de intercambio solo corresponden a metabolitos como ATP, NADH, NADPH, H₂O etc. Estas rutas deben ir en dirección favorable de energía libre, por ejemplo, involucrando el gasto de ATP, $ATP \rightarrow ADP + Pi$.

Un ciclo fútil que funciona en sentido inverso ($A \rightarrow C \rightarrow B \rightarrow A$, en azul) cargaría metabolitos de energía como el ATP sin una fuente externa de energía (Figura 2). Por lo tanto, es preciso clasificar las rutas tipo II en dos subgrupos⁽³⁶⁾, teniendo en cuenta la direccionalidad de la utilización del cofactor: (a) ciclos fútiles, que consumen energía y, por lo tanto, son termodinámicamente factibles, y (b) ciclos generadores de energía (CGE) que generan metabolitos energéticos como el ATP sin una fuente energética externa. Los CGE deben eliminarse de las redes metabólicas ya que generan sobreestimación de tasas de crecimiento microbiano cuando la producción de biomasa se utiliza como función objetivo ⁽³⁶⁾.

Tipo III: conocidas como ciclos internos ($A \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow A$, en rojo). Son rutas en las que no se involucra metabolitos de intercambio como el ATP, NADH, etc, ni las rutas primarias. Basados en la termodinámica, estos ciclos no pueden estar activos debido a que no hay fuente de energía para conducirlos. Por lo tanto, estas rutas extremas

deben eliminarse de las redes metabólicas. Para la red metabólica de *Mycobacterium tuberculosis*, un patógeno intracelular que ocasiona la Tuberculosis pulmonar, se han identificado ciclos termodinámicos infactibles que afectan enzimas del metabolismo del folato (timidilato cinasas), y algunas enzimas del metabolismo redox (ubiquinona oxidoreductasas) ⁽³⁷⁾.

Actualmente, existen diferentes estrategias para la eliminación de ciclos internos (Rutas Tipo III) y CGE (Rutas Tipo II, generadoras de energía) en redes metabólicas ^(27,36,38). i) Eliminar aquellas reacciones reversibles linealmente dependientes. ii) Restringir la direccionalidad utilizando datos del cambio en la energía libre de Gibbs de reacción ^(30,39). iii) Implementación de algoritmos basados en la segunda ley de Kirchhoff (LoopLaw) ^(38,40).

5. Muestreo Uniforme (Uniform Sampling)

Una poderosa herramienta para evaluar las capacidades fenotípicas de las redes metabólicas es el muestreo uniforme ^(41,42). Este permite identificar todo el espacio de solución y los rangos posibles de los fluxes en estado estacionario de diferente red metabólica que esté bajo condiciones fisicoquímicas definidas (Figura 3). Actualmente, se han desarrollado diferentes algoritmos para el desarrollo del muestreo uniforme ^(43, 44), generalmente basados en el algoritmo de Kaufman y Smith (artificial Centering hit-and-run, ACHR) ⁽⁴⁵⁾ y muestreo de Montecarlo ⁽⁴⁶⁾.

El muestreo uniforme ha sido utilizado exitosamente en un sin número de modelos metabólicos a escala genómica para explorar y explicar fenotipos de adaptación metabólica en patógenos ⁽⁴⁷⁾, células animales ⁽⁴⁶⁾, plantas ⁽⁴⁸⁾ y organismos de interés industrial ⁽⁴⁹⁾.

Los objetivos del procedimiento de muestreo uniforme son: 1) generar muestras de puntos aleatorios uniformes del espacio de fluxes en estado estacionario (Ec. 21 y 2) calcular el hipervolumen de ese espacio.

Con el fin de que esos objetivos se cumplan, el espacio de solución de fluxes en estado estacionario está encerrado por un objeto geométrico en que los puntos uniformemente distribuidos pueden ser fácilmente generados y permiten calcular cómodamente el volumen. Un paralelepípedo con la misma dimensión del rango, r , del espacio nulo de S (Ec. 21), es un objeto que cumple el criterio de la forma del espacio de fluxes en estado estacionario.

El paralelepípedo es representado como una matrix B , donde cada columna representa un conjunto de bordes del paralelepípedo, tal como se indica en la Ec. 23.

$$B = \begin{pmatrix} \vdots & \vdots & \vdots \\ \mathbf{b}_1 & \dots \mathbf{b}_i \dots & \mathbf{b}_r \\ \vdots & \vdots & \vdots \end{pmatrix} \quad (Ec. 23)$$

El volumen del paralelepípedo se calcula como se describe en la Ec. 24 ⁽⁵⁰⁾,

$$Volume = \sqrt{\det(B^T B)} \quad (Ec. 24)$$

donde las columnas de B son los ejes que encierran el paralelepípedo. El muestreo aleatorio uniforme puede ser generado dentro de un paralelepípedo simplemente por medio de la generación de pesos aleatorios uniformes en todos los bordes del paralelepípedo entre los valores mínimos y máximos permitidos (restricciones) y eligiendo puntos que estén dentro del espacio basado en los pesos w_i , generados en cada uno de los vectores base del espacio nulo \mathbf{b}_i , como se indica en la Ec. 25:

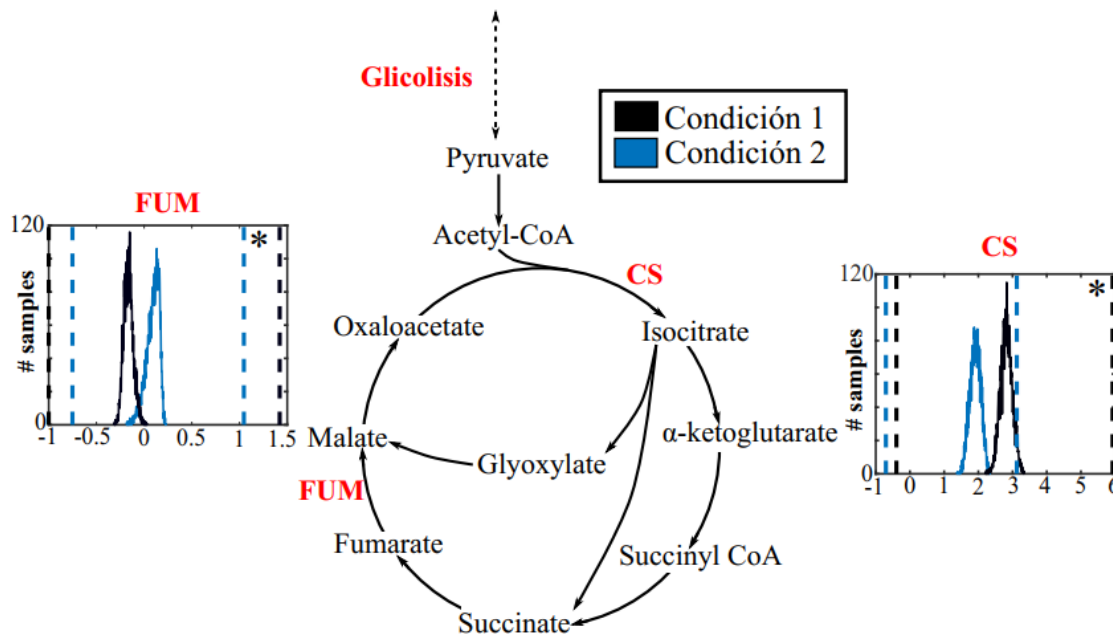


Figura 3. Ejemplo de distribuciones de probabilidad de fluxes obtenidos por muestreo uniforme en una red metabólica sometida a dos tipos de condiciones fisicoquímicas. CS, hace referencia a la enzima Citrato Sintasa y FUM hace referencia a la enzima Fumarasa del ciclo de Krebs.

$$v = \sum_i w_i \mathbf{b}_i, \quad w_{i,min} \leq w_i \leq w_{i,max} \quad (\text{Ec. 25})$$

donde v es un punto dentro del espacio definido por la suma de los pesos de cada uno de los vectores base entre los valores mínimo y máximos permisibles del paralelepípedo.

5. Análisis de Control Metabólico (MCA, por sus siglas en inglés)

MCA representa un aspecto muy importante para determinar las interacciones entre las diferentes rutas y cuantificar la distribución de flux alrededor de un punto de bifurcación. Se requiere de la cuantificación de una ruta para poder mejorarla sistemáticamente, el control del flux es importante para mantener las velocidades de síntesis y conversión de metabolitos cercanos al balance de materia sobre un amplio rango de condiciones externas. Este concepto proporciona la regulación cuantitativa del flux metabólico a través de los parámetros sensibles denominados coeficientes de controles de flux y de concentración, y coeficiente de elasticidad^(51, 52). El MCA se aplica a condiciones estables o pseudoestables, y se define únicamente por la actividad de las enzimas que catalizan las etapas bioquímicas individuales en una ruta. El coeficiente de elasticidad (CE) está dado por la Ec. 26 y expresa la sensibilidad de la velocidad de reacción (flux) enzimática alcanzada, v_i , al variar la concentración de los metabolitos X_j ^(12,51,53).

$$CE: \varepsilon_{X_j}^{E_i} = \frac{X_j}{v_i} \frac{\delta v_i}{\delta X_j} \quad (\text{Ec. 26})$$

donde $\varepsilon_{X_j}^{E_i}$ es el coeficiente de elasticidad del metabolito X_j en la reacción i , X_j es la concentración del metabolito j , y E_i es la actividad de la enzima y v_i es la velocidad de reacción i .

El coeficiente de control puede ser de control de flux (CCF) o de control de concentración (CCC), y se refieren al cambio relativo del flux o en la concentración de un metabolito, en estado estable, como producto en un cambio infinitesimal en la actividad de la enzima. Esto se muestra en las Ec. 27 y 28. Se conocen unos parámetros (que provienen de dos teoremas que emanan de la teoría de MCA que permiten relacionar el coeficiente de control, sea de concentración o de flux con el de elasticidad para a partir del conocimiento de uno, calcular el del otro. Lo anterior se describe en las Ec. 29, 30 y 31^(53,54).

$$CCF: C_{E_i}^J = \frac{E_i}{J} \frac{\delta J}{\delta E_i} \quad (\text{Ec. 27})$$

$$CCC: C_{E_i}^{X_j} = \frac{E_i}{X_j} \frac{\delta X_j}{\delta E_i} \quad (\text{Ec. 28})$$

donde $C_{E_i}^J$ es el CCF de la enzima i , J es el flux del estado estacionario y E_i es la actividad específica de la enzima i . Análogamente, $C_{E_i}^{X_j}$ es el CCC de la enzima i y X_j es la concentración del metabolito j .

Teorema de la suma para CCF es:

$$\sum_{i=1}^n C_{E_i}^J = 1 \quad (\text{Ec. 29})$$

Teorema de la suma para CCC es:

$$\sum_{i=1}^n C_{E_i}^{X_j} = 0 \quad (\text{Ec. 30})$$

Teorema de conectividad es:

$$\sum_{i=1}^n C_{E_i}^J * \varepsilon_{X_j}^{E_i} = 0 \quad (\text{Ec. 31})$$

Un ejemplo sencillo para entender las bondades de MCA es tomando como caso particular una ruta bioquímica lineal. En este caso, si una enzima exhibe el valor más alto de CCF, dicha enzima puede ser catalogada/considerada como limitante de la velocidad de reacción, es decir, una sobreexpresión de esta enzima incrementa

significativamente el flux a través de dicha ruta. En el caso que los CCF no varíen significativamente, se puede afirmar que el control de la ruta está distribuido equitativamente (2).

6. Aplicaciones de MFA/FBA

Con el desarrollo de las tecnologías ómicas (genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica), los modelos metabólicos se han convertido en herramientas de integración fundamental para analizar estos datos y generar hipótesis testeables en el laboratorio que permitan el entendimiento de cómo funciona el metabolismo y cuál es su relación con los diferentes niveles biológicos de las células (55).

MFA y sus derivados han surgido como métodos precisos y confiables para la estimación de fluxes metabólicos intracelulares en diferentes tipos de aplicaciones, biotecnológicas y médicas (56,57).

Aunque la mayoría de investigaciones donde se aplica MFA han sido realizadas utilizando microorganismos modelo como *E. coli* ó *S. cerevisiae*, también se ha utilizado para comprender el metabolismo y mejorar producciones de metabolitos en microorganismos industriales como *Bacillus subtilis* (producción de Rivo flavinas) (58,59), *Corynebacterium glutamicum* (producción de Lisina y Valina) (60,61), *Pichia pastoris* (producción de S-adenosylmethionine) (62), *Penicillium chrysogenum* (producción de Penicilina) (63), *Aspergillus niger* (producción de ácido oxálico) (64), *Basfia succiniciproducens* (producción de succinato) (65), *Rhodospseudomonas palustris* (producción de hidrógeno) (66), *Streptomyces clavuligerus* (producción de ácido clavulánico) (67-70), etc.

En *E. coli*, específicamente se ha utilizado MFA para la producción de ácidos grasos (71,72), mejorar

la disponibilidad de NADPH e incrementar la producción de Licopeno (73), e incrementar la supervivencia a estrés (74). En *S. cerevisiae* mejorar la producción de Etanol (75), n-Butanol (76), Isoprenoides (77), Acetil-CoA (78), Acido Shikimico y Mucónico (79), S-Adenosil-Metionina (80) y, tolerancia a estrés (59).

En el área de la medicina, MFA y FBA se han utilizado ampliamente en la identificación de biomarcadores y la caracterización metabólica de células de cáncer (81-83), evaluación de la interacción metabólica entre la microbiota intestinal con el desarrollo de alteraciones del intestino (84), incluido cáncer (85) y en la identificación de blancos terapéuticos en bacterias patógenas como *Mycobacterium tuberculosis* (16,37,86-89).

La biología de sistemas está creciendo a pasos acelerados y este tipo de enfoques de cómputo de fluxes intracelulares se están utilizando en para el entendimiento de fenómenos celulares, y sistémicos cada vez más complejos, como en la combinación con modelos farmacocinéticos para explorar tratamientos a diferentes enfermedades (90-92), o en combinación con modelos basados en agentes para estudiar fenómenos inflamatorios como el desarrollo de granulomas (93-95).

7. Conclusiones de la revisión de estas metodologías

Las estrategias de análisis y síntesis de redes metabólicas en las cuales se aplique las metodologías de MFA, y sus derivados como el FBA, FVA, y el muestreo uniforme, y, el MCA, constituyen herramientas que permiten el estudio y análisis de como interactúa cada uno de los compuestos (metabolitos) intracelulares y extracelulares para organizarlos de forma sistémica y de esta forma entender el comportamiento metabólico y poder proponer estrategias de mejora a cualquier bioproceso que

se lleve a cabo, buscando así eficiencia en los recursos. Este material de revisión indudablemente es insumo fundamental para aquellos investigadores que se están adentrando en el mundo de la biología de sistemas o áreas afines, que le permite entender algunos conceptos y seleccionar algunas de estas metodologías para aplicarla a su caso de estudio ya sea para el mejoramiento de un organismo o para su aplicación el mejoramiento de un proceso biotecnológico.

8. Referencias

- (1) Gianchandani EP, Chavali AK, Papin JA. The application of flux balance analysis in systems biology. *Wiley Interdiscip. Rev Syst Biol Med.* 2010;2(3):372–82. <https://doi.org/10.1002/wsbm.60>.
- (2) Woolston BM, Edgar S, Stephanopoulos G. Metabolic Engineering: Past and Future. *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 2013;4(1):259–88. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061312-103312>.
- (3) Bordbar A, Monk JM, King ZA, Palsson BO. Constraint-based models predict metabolic and associated cellular functions. *Nat Rev Genet.* 2014;15(2):107–20. <https://doi.org/10.1038/nrg3643>.
- (4) Lewis NE, Nagarajan H, Palsson BO. Constraining the metabolic genotype-phenotype relationship using a phylogeny of in silico methods. *Nat Rev Microbiol.* 2012 Apr;10(4):291–305. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2737>.
- (5) Heirendt L, Arreckx S, Pfau T, Mendoza SN, Richelle A, Heinken A, et al. Creation and analysis of biochemical constraint-based models using the COBRA Toolbox v. 3.0. *Nat Protoc.* 2019;14(3):639. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0098-2>.
- (6) Wang H, Marčišauskas S, Sánchez BJ, Domenzain I, Hermansson D, Agren R, et al. RAVEN 2.0: A versatile toolbox for metabolic network reconstruction and a case study on *Streptomyces coelicolor*. *PLoS Comput Biol.* 2018;14(10):e1006541. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006541>.
- (7) Norsigian CJ, Pusarla N, McConn JL, Yurkovich JT, Dräger A, Palsson BO, et al. BiGG Models 2020: Multi-strain genome-scale models and expansion across the phylogenetic tree. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D402–6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1054>.
- (8) King ZA, Lu J, Dräger A, Miller P, Federowicz S, Lerman JA, et al. BiGG Models: A platform for integrating, standardizing and sharing genome-scale models. *Nucleic Acids Res.* 2015;44(D1):D515–22. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1049>.
- (9) Arnold A, Nikoloski Z. Bottom-up metabolic reconstruction of arabidopsis and its application to determining the metabolic costs of enzyme production. *Plant Physiol.* 2014;165(3):1380–91. <https://doi.org/10.1104/pp.114.235358>.
- (10) Shimizu H. Metabolic engineering - Integrating methodologies of molecular breeding and bioprocess systems engineering. *J Biosci Bioeng.* 2002;94(6):563–73. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(02\)80196-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80196-7).

- (11) Orth JD, Thiele I, Palsson BO. What is flux balance analysis? *Nat Biotechnol.* 2010;28(3):245–8. <https://doi.org/10.1038/nbt.1614>.
- (12) Rios-Estepa R, Lange BM. Experimental and mathematical approaches to modeling plant metabolic networks. *Phytochemistry.* 2007;68(16–18):2351–74. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.04.021>.
- (13) Reimers AM, Reimers AC. The steady-state assumption in oscillating and growing systems. *J Theor Biol.* 2016;406:176–86. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.06.031>.
- (14) Erdrich P, Steuer R, Klamt S. An algorithm for the reduction of genome-scale metabolic network models to meaningful core models. *BMC Syst Biol.* 2015;9(1):48. <https://doi.org/10.1186/s12918-015-0191-x>.
- (15) Schuetz R, Kuepfer L, Sauer U. Systematic evaluation of objective functions for predicting intracellular fluxes in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol.* 2007 Jan;3(119):119. <https://doi.org/10.1038/msb4100162>.
- (16) López-Agudelo VA, Baena A, Ramirez-Malule H, Ochoa S, Barrera LF, Ríos-Estepa R. Metabolic adaptation of two in silico mutants of *Mycobacterium tuberculosis* during infection. *BMC Syst Biol.* 2017;11(1). <https://doi.org/10.1186/s12918-017-0496-z>.
- (17) Sánchez C, Quintero JC, Ochoa S. Flux Balance Analysis in the Production of Clavulanic Acid by *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol Prog.* 2015;31(5):1226–36. <https://doi.org/10.1002/btpr.2132>.
- (18) Feist AM, Palsson BO. The biomass objective function. *Curr Opin Microbiol.* 2010;13(3):344–9. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.03.003>.
- (19) Acevedo A, Conejeros R, Aroca G. Ethanol production improvement driven by genome-scale metabolic modeling and sensitivity analysis in *Scheffersomyces stipitis*. *PLoS One.* 2017;12(6):1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180074>.
- (20) Price ND, Reed JL, Palsson B. Genome-scale models of microbial cells: Evaluating the consequences of constraints. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(11):886–97. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1023>.
- (21) Palsson BØ. *Systems Biology Properties of Reconstructed Networks*. 1st ed. New York, NY: Cambridge University Press; 2006. 336 p.
- (22) Palsson B, Price ND, Famili I, Beard DA. Extreme pathways and Kirchhoff's second law. *Biophys J.* 2002;83(5):2879–82. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75297-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75297-1).
- (23) Marinos G, Kaleta C, Waschina S. Defining the nutritional input for genome-scale metabolic models: A roadmap. *PLoS One.* 2020;15(8):e0236890. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236890>.
- (24) Krömer J, Quek L, Nielsen L. 13C-FLUXOMICS: A TOOL FOR MEASURING METABOLIC PHENOTYPES. *Aust Biochem.*

- 2009;40(3):17–20.
- (25) Wiechert W. ¹³C metabolic flux analysis. *Metab Eng.* 2001 Jul;3(3):195–206. <https://doi.org/10.1006/mben.2001.0187>.
- (26) Wu H, Von Kamp A, Leoncikis V, Mori W, Sahin N, Gevorgyan A, et al. MUFINS: Multi-formalism interaction network simulator. *npj Syst Biol Appl.* 2016;2:16032. <https://doi.org/10.1038/npjbsa.2016.32>.
- (27) Maranas CD, Zomorodi AR. *Optimization Methods in Metabolic Networks*. 1st ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2016.
- (28) Beard DA, Liang S, Qian H. Energy balance for analysis of complex metabolic networks. *Biophys J.* 2002;83(1):79–86. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75150-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75150-3).
- (29) Qian H, Beard DA, Liang SD. Stoichiometric network theory for nonequilibrium biochemical systems. *Eur J Biochem.* 2003;270(3):415–21. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03357.x>.
- (30) Henry CS, Broadbelt LJ, Hatzimanikatis V. Thermodynamics-based metabolic flux analysis. *Biophys J.* 2007;92(5):1792–805. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.093138>.
- (31) Covert MW, Palsson BO. Constraints-based models: Regulation of gene expression reduces the steady-state solution space. *J Theor Biol.* 2003;221(3):309–25. <https://doi.org/10.1006/jtbi.2003.3071>.
- (32) Burgard AP, Pharkya P, Maranas CD. OptKnock: A Bilevel Programming Framework for Identifying Gene Knockout Strategies for Microbial Strain Optimization. *Biotechnol Bioeng.* 2003;84(6):647–57. <https://doi.org/10.1002/bit.10803>.
- (33) Mahadevan R, Schilling CH. The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models. *Metab Eng.* 2003;5(4):264–76. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2003.09.002>.
- (34) Gudmundsson S, Thiele I. Computationally efficient flux variability analysis. *BMC Bioinformatics.* 2010;11(2):2–4. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-489>.
- (35) Noor E. Removing both Internal and Unrealistic Energy-Generating Cycles in Flux Balance Analysis. *arXiv Prepr arXiv180304999*. 2018; Available from: <http://arxiv.org/abs/1803.04999>.
- (36) Fritzemeier CJ, Hartleb D, Szappanos B, Papp B, Lercher MJ. Erroneous energy-generating cycles in published genome scale metabolic networks: Identification and removal. *PLoS Comput Biol.* 2017;13(4):e1005494. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005494>.
- (37) López-Agudelo VA, Mendum TA, Laing E, Wu HH, Baena A, Barrera LF, et al. A systematic evaluation of mycobacterium tuberculosis genome-scale metabolic networks. *PLoS Comput Biol.* 2020;16(6):e1007533. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007533>.
- (38) Schellenberger J, Lewis NE, Palsson B. Elimination of thermodynamically infeasible loops in steady-state metabolic

- models. *Biophys J.* 2011;100(3):544–53. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.12.3707>.
- (39) Martínez VS, Nielsen LK. NExT: Integration of Thermodynamic Constraints and Metabolomics Data into a Metabolic Network. In: Krömer J, Nielsen L, Blank L, editors. *Metabolic Flux Analysis Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. New York, NY: Humana Press; 2012. p. 65–78.
- (40) Desouki AA, Jarre F, Gelius-Dietrich G, Lercher MJ. CycleFreeFlux: Efficient removal of thermodynamically infeasible loops from flux distributions. *Bioinformatics.* 2015;31(13):2159–65. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv096>.
- (41) Schellenberger J, Palsson B. Use of randomized sampling for analysis of metabolic networks. *J Biol Chem.* 2009;284(9):5457–61. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800048200>.
- (42) Haraldsdóttir HS, Cousins B, Thiele I, Fleming RMT, Vempala S. CHRR: Coordinate hit-and-run with rounding for uniform sampling of constraint-based models. *Bioinformatics.* 2017;33(11):1741–3. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx052>.
- (43) Megchelenbrink W, Huynen M, Marchiori E. optGpSampler: An improved tool for uniformly sampling the solution-space of genome-scale metabolic networks. *PLoS One.* 2014;9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086587>.
- (44) Saa PA, Nielsen LK. LI-ACHRB: A scalable algorithm for sampling the feasible solution space of metabolic networks. *Bioinformatics.* 2016;32(15):2330–7. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw132>.
- (45) Kaufman DE, Smith RL. Direction choice for accelerated convergence in hit-and-run sampling. *Oper Res.* 1998;46(1):84–95. <https://doi.org/10.1287/opre.46.1.84>.
- (46) Price ND, Schellenberger J, Palsson BO. Uniform sampling of steady-state flux spaces: Means to design experiments and to interpret enzymopathies. *Biophys J.* 2004;87(4):2172–86. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.043000>.
- (47) Bordbar A, Lewis NE, Schellenberger J, Palsson B, Jamshidi N. Insight into human alveolar macrophage and *M. tuberculosis* interactions via metabolic reconstructions. *Mol Syst Biol.* 2010;6(1):422. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.68>.
- (48) Herrmann HA, Dyson BC, Vass L, Johnson GN, Schwartz J-M. Flux sampling is a powerful tool to study metabolism under changing environmental conditions. *NPJ Syst Biol Appl.* 2019;5(32):1-8. <https://doi.org/10.1038/s41540-019-0109-0>.
- (49) Piubeli F, Salvador M, Argandoña M, Nieto JJ, Bernal V, Pastor JM, et al. Insights into metabolic osmoadaptation of the ectoines-producer bacterium *Chromohalobacter salexigens* through a high-quality genome scale metabolic model. *Microb Cell Fact.* 2018;17(1):2. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0852-0>.
- (50) Meyer C. Matrix analysis and applied linear algebra. 1st ed. Philadelphia, PA: Society for Industrial and Applied

- Mathematics (SIAM); 2000. 718 p. <https://doi.org/10.1038/nbt0597-448>.
- (51) Moreno-Sánchez R, Saavedra E, Rodríguez-Enríquez S, Olín-Sandoval V. Metabolic Control Analysis: A tool for designing strategies to manipulate metabolic pathways. *J Biomed Biotechnol*. 2008;2008(1). <https://doi.org/10.1155/2008/597913>.
- (52) Villadsen J, Nielsen J, Lidén G. *Bioreaction Engineering Principles*. 3rd ed. Springer; 2011.
- (53) Kacser H, and Burns J. The control of flux. In: *Symp Soc Exp Biol*. 1973. p. 65–104.
- (54) Kacser H, Burns JA, Fell DA. The control of flux. *Biochem Soc Trans*. 1995;23(2):341–66. <https://doi.org/10.1042/bst0230341>.
- (55) Jamil IN, Remali J, Azizan KA, Nor Muhammad NA, Arita M, Goh HH, et al. Systematic Multi-Omics Integration (MOI) Approach in Plant Systems Biology. *Front Plant Sci*. 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00944>.
- (56) Crown SB, Antoniewicz MR. Publishing ¹³C metabolic flux analysis studies: A review and future perspectives. *Metab Eng*. 2013;20:42–8. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.08.005>.
- (57) Antoniewicz MR. A guide to ¹³C metabolic flux analysis for the cancer biologist. *Exp Mol Med*. 2018;50(4):1–13. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0060-y>.
- (58) Sauer U, Hatzimanikatis V, Bailey JE, Hochuli M, Szyperski T, Wüthrich K. Metabolic Fluxes In Riboflavin-Producing *Bacillus Subtilis*. *Nat Biotechnol*. 1997;15(5):448–52.
- (59) Heer D, Heine D, Sauer U. Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to high concentrations of furfural is based on NADPH-dependent reduction by at least two oxireductases. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(24):7631–8. <https://doi.org/10.1128/AEM.01649-09>.
- (60) Bommareddy RR, Chen Z, Rappert S, Zeng AP. A de novo NADPH generation pathway for improving lysine production of *Corynebacterium glutamicum* by rational design of the coenzyme specificity of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Metab Eng*. 2014;25:30–7. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.06.005>.
- (61) Bartek T, Blombach B, Lang S, Eikmanns BJ, Wiechert W, Oldiges M, et al. Comparative ¹³C metabolic flux analysis of pyruvate dehydrogenase complex-deficient, L-valine-producing *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(18):6644–52. <https://doi.org/10.1128/AEM.00575-11>.
- (62) Jordà J, Jouhten P, Cámara E, Maaheimo H, Albiol J, Ferrer P. Metabolic flux profiling of recombinant protein secreting *Pichia pastoris* growing on glucose:methanol mixtures. *Microb Cell Fact*. 2012;11(1):57. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-57>.
- (63) Van Gulik WM, De Laat WTAM, Vinke JL, Heijnen JJ. Application of metabolic flux analysis for the identification of metabolic bottlenecks in the biosynthesis of penicillin-G. *Biotechnol Bioeng*. 2000;68(6):602–18. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000620\)68:6%3C602::AID-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000620)68:6%3C602::AID-)

- BIT3%3E3.0.CO;2-2.
- (64) Pedersen H, Christensen B, Hjort C, Nielsen J. Construction and characterization of an oxalic acid nonproducing strain of *Aspergillus niger*. *Metab Eng.* 2000;2(1):34–41. <https://doi.org/10.1006/mben.1999.0136>.
- (65) Becker J, Reinefeld J, Stellmacher R, Schäfer R, Lange A, Meyer H, et al. Systems-wide analysis and engineering of metabolic pathway fluxes in bio-succinate producing *basfia succiniciproducens*. *Biotechnol Bioeng.* 2013;110(11):3013–23. <https://doi.org/10.1002/bit.24963>.
- (66) McKinlay JB, Oda Y, Ruhl M, Posto AL, Sauer U, Harwood CS. Non-growing *rhodospseudomonas palustris* increases the hydrogen gas yield from acetate by shifting from the glyoxylate shunt to the tricarboxylic acid cycle. *J Biol Chem.* 2014;289(4):1960–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.m113.527515>.
- (67) Gómez-Ríos D, López-Agudelo VA, Ramírez-Malule H, Neubauer P, Junne S, Ochoa S, et al. A genome-scale insight into the effect of shear stress during the fed-batch production of clavulanic acid by *streptomyces clavuligerus*. *Microorganisms.* 2020;8(9):1–19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091255>.
- (68) Ramirez-Malule H, Junne S, Nicolás Cruz-Bournazou M, Neubauer P, Ríos-Esteba R. *Streptomyces clavuligerus* shows a strong association between TCA cycle intermediate accumulation and clavulanic acid biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018 May 9;102(9):4009–23. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8841-8>.
- (69) Toro L, Pinilla L, Avignone-Rossa C, Ríos-Esteba R. An enhanced genome-scale metabolic reconstruction of *Streptomyces clavuligerus* identifies novel strain improvement strategies. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2018;41(5):657–69. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1900-9>.
- (70) Sánchez C, Gómez N, Quintero JC, Ochoa S, Rios R. A Combined Sensitivity and Metabolic Flux Analysis Unravel the Importance of Amino Acid Feeding Strategies in Clavulanic Acid Biosynthesis. In: Castillo LF, Cristancho M, Isaza G, Pinzón A, Rodríguez JMC, editors. *Advances in Computational Biology*. Cham: Springer International Publishing; 2014. p. 169–75.
- (71) He L, Xiao Y, Gebreselassie N, Zhang F, Antoniewicz MR, Tang YJ, et al. Central metabolic responses to the overproduction of fatty acids in *Escherichia coli* based on ¹³C-metabolic flux analysis. *Biotechnol Bioeng.* 2014;111(3):575–85. <https://doi.org/10.1002/bit.25124>.
- (72) Ranganathan S, Tee TW, Chowdhury A, Zomorodi AR, Yoon JM, Fu Y, et al. An integrated computational and experimental study for overproducing fatty acids in *Escherichia coli*. *Metab Eng.* 2012;14(6):687–704. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.08.008>.
- (73) Wang Y, San KY, Bennett GN. Improvement of NADPH bioavailability in *Escherichia coli* through the use of phosphofructokinase deficient strains. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97(15):6883–93. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4859-0>.
- (74) Fu Y, Yoon JM, Royce LA, Rodriguez-

- Moya M, Gonzalez R, Jarboe L, et al. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* MG1655 under octanoic acid stress. *Sustain Eng Forum Core Program Top 2011 AIChE Annu Meet.* 2011;1(10):626–7.
- (75) Feng X, Zhao H. Investigating xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* via ¹³C metabolic flux analysis. *Microb Cell Fact.* 2013;12(1):114. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-114>.
- (76) Lian J, Si T, Nair NU, Zhao H. Design and construction of acetyl-CoA overproducing *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food, Pharm Bioeng Div 2014 - Core Program Area 2014 AIChE Annu Meet.* 2014;2:750–60.
- (77) Shiba Y, Paradise EM, Kirby J, Ro DK, Keasling JD. Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of isoprenoids. *Metab Eng.* 2007;9(2):160–8. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2006.10.005>.
- (78) Papini M, Nookaew I, Siewers V, Nielsen J. Physiological characterization of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Aspergillus nidulans* phosphoketolase pathway: Validation of activity through ¹³C-based metabolic flux analysis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;95(4):1001–10. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3936-0>.
- (79) Curran KA, Leavitt JM, Karim AS, Alper HS. Metabolic engineering of muconic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng.* 2013;15(1):55–66. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.10.003>.
- (80) Hayakawa K, Kajihata S, Matsuda F, Shimizu H. ¹³C-metabolic flux analysis in S-adenosyl-L-methionine production by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng.* 2015;120(5):532–8. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.03.010>.
- (81) Ghaffari P, Mardinoglu A, Asplund A, Shoaie S, Kampf C, Uhlen M, et al. Identifying anti-growth factors for human cancer cell lines through genome-scale metabolic modeling. *Sci Rep.* 2015;5(1):1–10. <https://doi.org/10.1038/srep08183>.
- (82) Agren R, Bordel S, Mardinoglu A, Pornputtapong N, Nookaew I, Nielsen J. Reconstruction of genome-scale active metabolic networks for 69 human cell types and 16 cancer types using INIT. Maranas CD, editor. *PLoS Comput Biol.* 2012 May;8(5):e1002518. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002518>.
- (83) Pacheco MP, Bintener T, Ternes D, Kulms D, Haan S, Letellier E, et al. Identifying and targeting cancer-specific metabolism with network-based drug target prediction. *EBioMedicine.* 2019;43:98–106. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.046>.
- (84) Aden K, Rehman A, Waschina S, Pan WH, Walker A, Lucio M, et al. Metabolic Functions of Gut Microbes Associate With Efficacy of Tumor Necrosis Factor Antagonists in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology.* 2019;157(5):1279–1292.e11. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.07.025>.

- (85) Greenhalgh K, Ramiro-Garcia J, Heinken A, Ullmann P, Bintener T, Pacheco MP, et al. Integrated In Vitro and In Silico Modeling Delineates the Molecular Effects of a Synbiotic Regimen on Colorectal-Cancer-Derived Cells. *Cell Rep.* 2019;27(5):1621-1632.e9. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.001>.
- (86) Beste DJ V, Hooper T, Stewart G, Bonde B, Avignone-Rossa C, Bushell ME, et al. GSMN-TB: a web-based genome-scale network model of Mycobacterium tuberculosis metabolism. *Genome Biol.* 2007;8(5):R89. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-r89>.
- (87) Beste DJV, Bonde B, Hawkins N, Ward JL, Beale MH, Noack S, et al. 13C Metabolic Flux Analysis Identifies an Unusual Route for Pyruvate Dissimilation in Mycobacteria Which Requires Isocitrate Lyase and Carbon Dioxide Fixation. *PLoS Pathog.* 2011;7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002091>.
- (88) Borah K, Beyß M, Theorell A, Wu H, Basu P, Mendum TA, et al. Intracellular Mycobacterium tuberculosis Exploits Multiple Host Nitrogen Sources during Growth in Human Macrophages. *Cell Rep.* 2019;29(11):3580-3591.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.037>.
- (89) Beste DJV, Mendum TA, McFadden J, Nöh K, Niedenführ S, Wiechert W, et al. 13C-flux spectral analysis of host-pathogen metabolism reveals a mixed diet for intracellular mycobacterium tuberculosis. *Chem Biol.* 2013;20(8):1012–21. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.06.012>.
- (90) Cordes H, Thiel C, Baier V, Blank LM, Kuepfer L. Integration of genome-scale metabolic networks into whole-body PBPK models shows phenotype-specific cases of drug-induced metabolic perturbation. *npj Syst Biol Appl.* 2018;4(1):10. <https://doi.org/10.1038/s41540-018-0048-1>.
- (91) Sier JH, Thumser AE, Plant NJ. Linking physiologically-based pharmacokinetic and genome-scale metabolic networks to understand estradiol biology. *BMC Syst Biol.* 2017;11(1):1–16. <https://doi.org/10.1186/s12918-017-0520-3>.
- (92) Maldonado EM, Leoncikis V, Fisher CP, Moore JB, Plant NJ, Kierzek AM. Integration of genome scale metabolic networks and gene regulation of metabolic enzymes with physiologically based pharmacokinetics. *CPT pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2017;6(11):732–46. <https://doi.org/10.1002/psp4.12230>.
- (93) Pienaar E, Sarathy J, Prideaux B, Dietzold J, Dartois V, Kirschner DE, et al. Comparing efficacies of moxifloxacin, levofloxacin and gatifloxacin in tuberculosis granulomas using a multi-scale systems pharmacology approach. *PLoS Comput Biol.* 2017;13(8):e1005650. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005650>.
- (94) Kirschner D, Pienaar E, Marino S, Linderman JJ. A review of computational and mathematical modeling contributions to our understanding of Mycobacterium tuberculosis within-host infection and treatment. *Curr Opin Syst Biol.* 2017;3:170–85. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.05.01>

4. maps metabolite and gene perturbations to granuloma sterilization predictions. *Infect Immun.* 2016;84(5):1650–69. <https://doi.org/10.1128/IAI.01438-15>.
- (95) Pienaar E, Matern WM, Linderman JJ, Bader JS, Kirschner DE. Multiscale model of *Mycobacterium tuberculosis* infection