

Depuración de un modelo metabólico de pequeña escala para la producción de biolípidos

Sebastián Nuñez*, María Teresita Castañeda†, Fabricio Garelli*, Claudio Voget†, Hernán De Battista*

*Grupo de Control Aplicado (GCA), Instituto de Investigaciones en Electrónica, Control y Procesamiento de Señales (LEICT), UNLP-CONICET, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, Argentina

†Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), UNLP-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina

Email: sebastian.nuniez@ing.unlp.edu.ar

Resumen—Los modelos metabólicos son muy útiles a la hora de analizar las capacidades de un microorganismo para producir metabolitos de interés. En este trabajo se depura un modelo metabólico para producción de lípidos mediante la levadura *Rhodospiridium toruloides* con el objetivo de mejorar la capacidad de predicción en diferentes condiciones de cultivo. El proceso de depuración consistió en balancear las reacciones e incorporar el metabolismo central del nitrógeno. El modelo resultante fue evaluado utilizando la técnica de análisis de balance de flujos. La producción máxima de biomasa y biolípidos fue comparada con la del modelo inicial. Además, se evaluó la producción en diferentes relaciones de carbono a nitrógeno y se contrastó con datos experimentales publicados. Los resultados muestran la potencialidad del modelo propuesto para estudiar y predecir la producción de lípidos con este microorganismo.

Palabras Clave—bioprocesos, modelizado metabólico, producción de lípidos, análisis de balance de flujos

I. INTRODUCCIÓN

Los lípidos microbianos o biolípidos se utilizan para la producción de biodiesel y pueden ser una alternativa a la utilización de combustibles fósiles. Estos biolípidos pueden obtenerse a partir de diversos microorganismos oleaginosos (bacterias, levaduras, algas, hongos filamentosos), los cuales son capaces de acumular más del 20% de su peso seco en lípidos, principalmente en forma de triglicéridos (TAG). La acumulación intracelular de lípidos se induce cuando hay exceso de carbono en el medio de cultivo y un nutriente esencial para el crecimiento (por ej. nitrógeno o fósforo) escasea.

Rhodospiridium toruloides es una de las especies de levaduras oleaginosas más empleadas debido a su versatilidad nutricional, su elevado rendimiento lipídico y la calidad del perfil de ácidos grasos obtenido [1]. No obstante, la productividad varía de acuerdo al medio de cultivo y las condiciones de operación. Para mejorar la productividad a escala industrial, un mayor entendimiento del metabolismo puede ser muy beneficioso.

En los últimos años, el empleo de los llamados modelos metabólicos basados en restricciones ha demostrado ser muy útil a la hora de evaluar el comportamiento de un microorganismo y su estado metabólico en diferentes condiciones [2]. Básicamente, un modelo metabólico es una representación

matemática de la red intracelular compuesta por metabolitos y reacciones, los cuales están vinculados entre sí a través de una matriz estequiométrica [3]. Los avances en el diseño, evaluación y aplicación de estos modelos metabólicos han sido acompañados por el desarrollo de un conjunto de herramientas computacionales [4], [5]. Dentro de esta disciplina, el Análisis de Balance de Flujos Metabólicos (FBA por su sigla en inglés) es una técnica muy utilizada para predecir, vía simulación, el comportamiento microbiano frente a diferentes perturbaciones externas [6]. A su vez, mediante el desarrollo de mapas metabólicos adecuados, permite la optimización del proceso *in silico* para luego llevar a cabo la correspondiente validación experimental. En consecuencia, a partir de la predicción del comportamiento microbiano se logra un ahorro significativo de tiempo y recursos económicos.

Si bien existen varios modelos validados para microorganismos de alto interés industrial como *Escherichia coli* [7] y *Saccharomyces cerevisiae* [8], pocos modelos han abordado la producción de lípidos con microorganismos oleaginosos [9], [10]. Recientemente, se ha reportado un modelo metabólico de pequeña escala para *R. toruloides* [11]. Este modelo permite predecir el rendimiento máximo de producción de lípidos en varias fuentes de carbono y constituye un paso importante hacia un mayor conocimiento del metabolismo. Sin embargo, tiene ciertas limitaciones que no permiten evaluar formación de lípidos y crecimiento de biomasa en forma simultánea. Además presenta un conjunto de reacciones con balance de masa incompleto y la división entre los compartimentos intracelulares, citosol y mitocondria, es parcial.

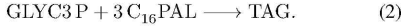
En este trabajo se presenta la depuración del modelo metabólico de pequeña escala del microorganismo *R. toruloides* presentado en [11]. Las reacciones de ese modelo fueron balanceadas en masa y carga iónica, incorporando los metabolitos necesarios. También se propusieron mejoras para el metabolismo central del nitrógeno con el objetivo de poder representar crecimiento en diferentes condiciones de cultivo. Finalmente, se analizó el comportamiento microbiano *in silico* por medio de la técnica FBA. Con esta herramienta es posible incorporar restricciones sobre los flujos y, mediante la maximización de una función objetivo, puede realizarse un estudio detallado del metabolismo microbiano.

II. DEPURACIÓN DEL MODELO METABÓLICO

II-A. Descripción del modelo inicial

El modelo de *R. toruloides* presentado en [11] lo denominamos modelo 'inicial'. Este modelo describe, mediante 85 reacciones y 69 metabolitos, las principales rutas metabólicas: glucólisis, ruta de pentosas fosfato, ciclo de Krebs y ciclo del glicoxilato. Incluye además reacciones de asimilación de cuatro fuentes de carbono (arabinosa, glucosa, glicerol y xilosa) y de intercambio de otros compuestos: NH_3 , O_2 , CO_2 y SO_4^{2-} .

La producción de lípidos (TAG) se representa con las reacciones 'C16' y 'C51' (ec. (1) y (2)), las cuales ocurren en el citosol:



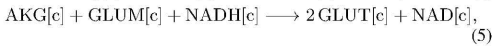
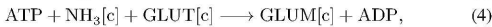
La ec. (1) describe la formación de ácido palmítico (C_{16}PAL), el cual es tomado como referencia, a partir de acetil coenzima A (AcCoA). En ec. (2) se detalla la formación de TAG a partir de palmítico y de glicerol-3-fosfato (GLYC3P). A partir de (1)-(2) puede observarse que la síntesis de TAG requiere energía (ATP) y poder reductor (NADPH).

Por otro lado, la expresión que representa la formación de biomasa a partir de los precursores necesarios para duplicar el material celular (Fig. 1), es análoga a la utilizada en modelos previos de la levadura *S. cerevisiae* [12], [13].

En este trabajo se realizó un análisis exhaustivo de las reacciones que componen el modelo inicial. Las siguientes secciones describen limitaciones encontradas y se detallan las propuestas para mejorar la capacidad predictiva del modelo.

II-B. Metabolismo central del nitrógeno

En el modelo inicial, las reacciones asociadas a la asimilación de nitrógeno son las siguientes:



donde '[c]' denota el compartimento citosólico. La expresión (3) representa el ingreso de nitrógeno desde el espacio extracelular (medio de cultivo). Las reacciones (4) y (5) describen la formación de los aminoácidos glutamato (glut) y glutamina (glum). Estos metabolitos no son consumidos y/o producidos en otras reacciones por lo que la dinámica de los mismos resulta en

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} \text{GLUT}[\text{c}] \\ \text{GLUM}[\text{c}] \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 2 & -1 \\ -1 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} v_{\text{GLT1}} \\ v_{\text{GLN1}} \end{pmatrix}, \quad (6)$$

donde v_{GLT1} y v_{GLN1} representan los flujos de las reacciones glutamato sintasa y glutamina sintetasa, respectivamente. Cuando los metabolitos se encuentran en estado estacionario, el único valor de flujo para v_{GLT1} y v_{GLN1} es cero porque la matriz en el lado derecho de (6) es no singular. De este modo, estas reacciones quedan bloqueadas por la estequiometría del

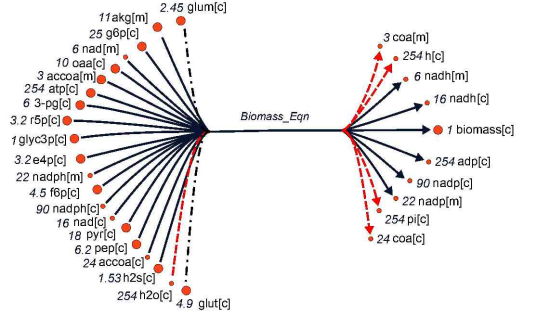
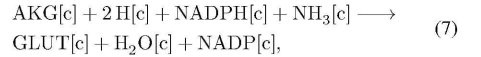


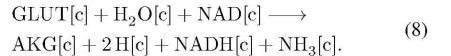
Figura 1. Reacción que representa la formación de biomasa. Los cambios debido a nuevos metabolitos se indican en línea roja y los cambios propuestos para el subsistema de nitrógeno en línea negra.

modelo y en consecuencia, el flujo de entrada de nitrógeno también resulta bloqueado (ec. (3)). Esto se traduce en que el modelo, en su estado actual, no permite considerar el consumo de nitrógeno. Esta es una limitación importante a la hora de describir el crecimiento y para calcular rendimientos en diferentes condiciones como ser variación de la relación de consumo de fuente de carbono y nitrógeno (relación C/N).

Para desbloquear las reacciones (3)-(5), una posibilidad es incorporar reacciones presentes en el microorganismo y omitidas en el modelo inicial. En [14], se describe la existencia de la enzima Glutamato deshidrogenasa, la cual cataliza las reacciones GDH1,



y GDH2,



La incorporación de estas reacciones permite eliminar la restricción estequiométrica sobre las reacciones (4)-(5) pero no sobre el ingreso de nitrógeno (ec. (3)).

Otra observación importante es que la reacción que representa la formación de biomasa del modelo inicial no contiene ningún precursor con nitrógeno. Este último es necesario durante el anabolismo para la biosíntesis de proteínas y ácidos nucleicos, por ende es fundamental para la duplicación celular. Por esta razón, consideramos incluir no sólo las reacciones (7)-(8) sino también glutamina y glutamato como precursores para la formación de biomasa. Esta modificación permite tener un consumo de nitrógeno asociado al crecimiento y a su vez desbloquear todas las reacciones del subsistema de asimilación de nitrógeno. Los coeficientes agregados fueron tomados de un modelo de levadura reportado en [15] y la modificación se presenta en la Fig. 1. Debe tenerse en cuenta que para determinar valores exactos de los coeficientes debería realizarse un análisis cuantitativo de la composición de la biomasa. Ante la falta de esta información para *R. toruloides*

Tabla I
REACCIONES INCORPORADAS AL MODELO.

Nombre	Reacción	BiGG ID	UniProtKB ID
ATPS	$\text{atp}[c] + \text{h2o}[c] \rightarrow \text{adp}[c] + \text{pi}[c] + \text{h}[c]$	ATPS	M7WU42
ATPtm_H	$\text{adp}[c] + \text{h}[c] + \text{atp}[m] \rightleftharpoons \text{atp}[c] + \text{h}[m] + \text{adp}[m]$	ATPtm_H	A0A0K3CF66
CO2tm	$\text{co2}[c] \rightleftharpoons \text{co2}[m]$	CO2tm	
GDH1	$\text{akg}[c] + \text{nadh}[c] + \text{nh3}[c] + 2 \text{h}[c] \rightarrow \text{nadh}[c] + \text{glut}[c] + \text{h2o}[c]$	GLUDyi	
GDH2	$\text{nad}[c] + \text{glut}[c] + \text{h2o}[c] \rightarrow \text{akg}[c] + \text{nadh}[c] + \text{nh3}[c] + 2 \text{h}[c]$	GLUDxi	M7XRK5
H2Ot	$\text{h2o}[e] \rightleftharpoons \text{h2o}[c]$	H2Ot	
H2Otm	$\text{h2o}[c] \rightleftharpoons \text{h2o}[m]$	H2Otm	
HCO3seq	$\text{co2}[c] + \text{h2o}[c] \rightleftharpoons \text{h}[c] + \text{hco3}[c]$	HCO3E	M7X3Y4
O2tm	$\text{o2}[c] \rightleftharpoons \text{o2}[m]$	O2tm	
Pit2r	$\text{h}[e] + \text{pi}[e] \rightleftharpoons \text{pi}[c] + \text{h}[c]$	Pit2r	

se utilizó valores de referencia de la levadura *S. cerevisiae*. Si bien el ajuste en los coeficientes afectaría el rendimiento máximo de crecimiento y el flujo de nitrógeno que ingresa al modelo, los efectos cualitativos y la mejora respecto del modelo inicial pueden observarse con los valores de referencia utilizados.

II-C. Balance de masas y revisión de reacciones de transporte entre compartimentos

Las reacciones del modelo fueron revisadas y corregidas utilizando las bases de datos BiGG [17] y UniProtKB [18]. Esto permitiría a futuro agregar reacciones adicionales para aumentar el nivel de detalle del modelo, partiendo de las reacciones identificadas en las bases de datos.

Para realizar el balance de masas se utilizó el toolbox COBRA para Matlab [5]. El procedimiento consistió en: i) cargar las reacciones del modelo en el formato de datos COBRA; ii) incorporar en la estructura de datos del modelo la información de cada metabolito (fórmula química y carga iónica); iii) realizar un análisis de balance de masa, reacción por reacción, con ayuda de comandos del toolbox COBRA; iv) localizar las reacciones desbalanceadas en bases de datos y luego actualizarlas.

En resumen, se modificaron 47 reacciones del modelo inicial agregando los siguientes cofactores: protones (H^+), agua (H_2O), fosfato (Pi) y coenzima A (CoA), en los casos en los que fue necesario. Esto incluyó revisar las reacciones de intercambio entre los compartimentos citosólico y mitocondrial para obtener un modelo con compartimentos completamente separados (Fig. 2). Los modelos que separan adecuadamente los metabolitos en compartimentos suelen tener una distribución de flujos más realista respecto de aquellos que no tienen división o que la misma es parcial [12]. Por ej. no todos los metabolitos pueden difundir por la membrana, por lo que no es válido asumir reacciones del tipo difusión ($\text{met}[c] \rightleftharpoons \text{met}[m]$) para todos los metabolitos que aparecen en ambos compartimentos. Este es el caso por ejemplo de moléculas complejas como el malato y succinato los cuales requieren el transporte mediado por fosfato y protones, respectivamente (reacciones MDCTmal, MDCTSucc en Fig. 2). Otro cambio importante es la incorporación de una reacción de intercambio del ATP generado en la mitocondria (ATPtm_H)

ya que en el modelo inicial no se hace distinción del ATP entre los compartimentos.

Dado que la lista completa de reacciones es extensa, sólo se presenta un listado de aquellas reacciones incorporadas en el proceso de revisión (Tabla I). Los identificadores de UniProtKB refieren a la existencia de las reacciones incorporadas en el microorganismo, mientras que para otras reacciones genéricas se provee el identificador en BiGG.

El modelo depurado se presenta en la Fig. 2, donde se observa la separación entre citosol y mitocondria por una serie de reacciones de transporte, muchas de las cuales fueron revisadas y actualizadas. En resumen, el modelo propuesto consta de 93 metabolitos en total con 63 especies únicas (ya que ciertos metabolitos aparecen en más de un compartimento). Las 105 reacciones pueden clasificarse como: 80 internas, 12 de transporte entre espacio extracelular y citosólico, 11 auxiliares para definir los límites del modelo y 2 para cálculos auxiliares en el contexto de FBA (TAGEx, GrowthEx). Las reacciones marcadas con el prefijo 'EX_' son de intercambio con el medio y pueden utilizarse para definir restricciones en el nutriente o sustancia que intercambian.

III. ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD METABÓLICA Y OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS

El análisis de la capacidad de la red metabólica implica el estudio de todos los estados funcionales, o bien, las distribuciones de flujo que pueden ser alcanzadas o no por la célula [3]. Típicamente, los sistemas biológicos son indeterminados con lo cual para estimar un fenotipo en el cual la producción de un metabolito deseado es máxima, se requiere incorporar la mayor cantidad de restricciones posibles. Esto incluye restricciones fijas (estequiométricas) y variables (dependientes de las condiciones de cultivo).

La información estequiométrica de la red metabólica se puede representar con una matriz S cuyas filas corresponden a los metabolitos y las columnas a las reacciones. Una vez establecida esta matriz, el balance de masas de los metabolitos intracelulares puede describirse a partir de la ecuación diferencial:

$$\frac{dc}{dt} = Sv - \mu c, \quad (9)$$

donde $c = (c_1 \ c_2 \ \dots \ c_m)^T$ es el vector con las concentraciones de los m metabolitos, $v = (v_1 \ v_2 \ \dots \ v_n)^T$ el

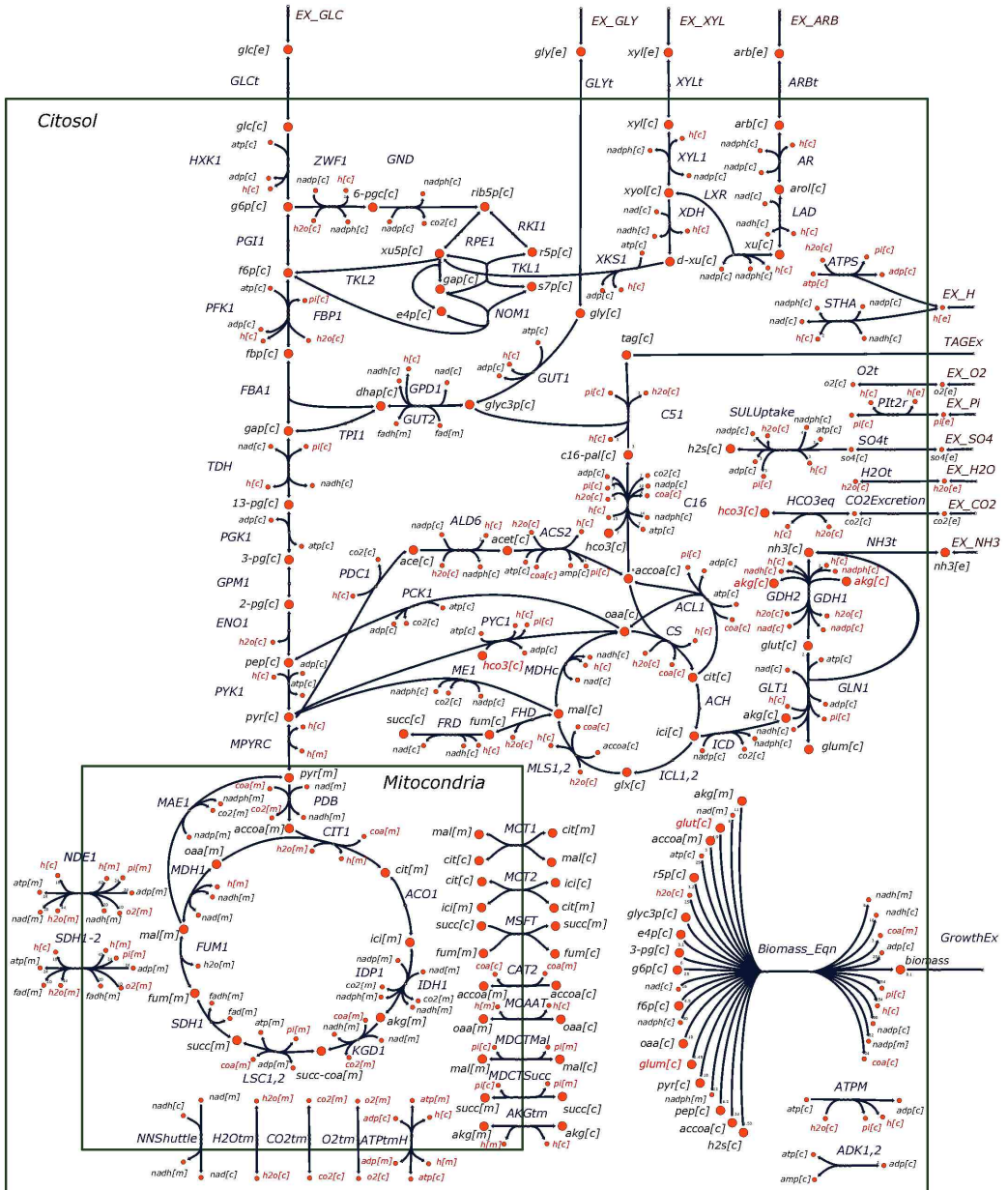


Figura 2. Mapa metabólico de *Rhodosporidium toruloides*. Los círculos de mayor tamaño representan metabolitos primarios (●) y los pequeños metabolitos secundarios (◐). Los cambios introducidos se remarcan en color rojo. Los compartimentos citosólico y mitocondrial se delinean en color verde. Las cotas en las reacciones 'EX_GLC', 'EX_GLY', 'EX_XYL' y 'EX_ARB' permiten regular la entrada de fuente de carbono. Este mapa fue generado con Escher [16].

vector de n flujos intracelulares, S es la matriz estequiométrica (de dimensión $m \times n$) y μ la tasa de crecimiento de la biomasa [3]. Dado que la dinámica intracelular es mucho más rápida que la extracelular puede suponerse que la concentración de metabolitos intracelulares se encuentra en estado estacionario. Además, el término de dilución por crecimiento ($-\mu c$) puede en general ser despreciado con respecto a Sv . Luego el valor de flujos en estado estacionario se obtiene de resolver la expresión

$$Sv = 0. \quad (10)$$

En los modelos metabólicos, típicamente se tiene más cantidad de reacciones que de metabolitos ($n > m$) por lo que la expresión (10) no tiene solución única. No obstante, puede reducirse el conjunto de soluciones si se agregan restricciones adicionales tales como irreversibilidad de algunos flujos y la capacidad máxima de las enzimas (por ej. velocidades máximas de las reacciones).

FBA es una técnica predictiva basada en restricciones en la que se considera que el vector de flujos metabólicos v es tal que cumple con (10) y además optimiza una función objetivo. De este modo, se plantea como el problema de optimización lineal:

$$\begin{aligned} \text{máx.} \quad & Z = w^T v, \\ \text{sujeto a} \quad & Sv = 0, \\ & v_{\min} \leq v \leq v_{\max}. \end{aligned} \quad (11)$$

donde w es el vector de coeficientes que define a la función objetivo (Z) como una combinación lineal de los v_i . Los vectores v_{\min} y v_{\max} contienen las cotas mínimas y máximas para cada una de las reacciones. Esto permite incorporar información de las restricciones conocidas en los flujos (por ej. limitaciones en los flujos de entrada, de salida y de intercambio) y también indicar las reacciones que son irreversibles.

En el modelo metabólico presentado en este trabajo se tiene una matriz S de dimensión $m \times n = 93 \times 105$. Las funciones objetivo utilizadas en (11) fueron 'Biomass_Eqn', para maximizar crecimiento y 'TAGEx' para maximizar producción de lípidos.

A partir de la distribución de flujos obtenido como solución de (11), es posible determinar el rendimiento de TAG respecto a un sustrato (por ej. para glucosa: $Y_{TAG/S} = TAGEx/GLCt$) como también el rendimiento de biomasa ($Y_{X/S} = GrowthEx/GLCt$).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se realizó una revisión completa de un modelo metabólico de pequeña escala del microorganismo *R. toruloides*. Se propusieron modificaciones en el metabolismo de nitrógeno y se balancearon todas las reacciones estequiométricamente definidas, no así las pseudoreacciones como por ejemplo la de formación de biomasa. En esta sección, se determina la capacidad del modelo depurado y se compara con el modelo inicial. En [11], calcularon el rendimiento máximo de producción de TAG en las cuatro fuentes de carbono, glucosa, glicerol, arabinosa y xilosa, cuando toda

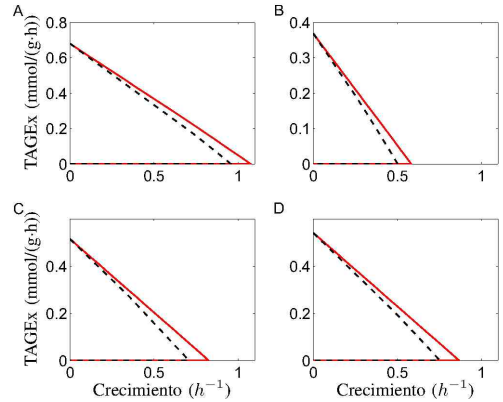


Figura 3. Producción de TAG vs crecimiento en cada fuente de carbono: A) glucosa, B) glicerol, C) arabinosa, D) xilosa. En el modelo modificado (línea a trazos negra), las restricciones adicionales impuestas por las modificaciones resultan en una tasa de crecimiento menor en comparación con el modelo inicial (línea continua roja). Valores calculados con flujo de fuente de carbono máximo de 10 mmol/(g-h).

la fuente de carbono se direcciona a la producción de TAG. Este cálculo fue obtenido a partir de un conjunto de vectores de flujo denominados Modos Elementales [3]. Esta técnica es empleada para describir la capacidad metabólica de un microorganismo, con lo cual es útil para calcular rendimientos máximos teóricos. Sin embargo presenta limitaciones cuando se pretende simular el comportamiento *in silico* de un microorganismo en diferentes condiciones de cultivo (por ej. con C/N variables). En este trabajo calculamos esos rendimientos no sólo en la condición presentada en [11] sino también en otras condiciones de operación. Esto es posible con el enfoque FBA ya que se pueden incorporar restricciones en la ec. (11).

La Fig. 3 presenta curvas de producción de lípidos vs crecimiento para cada una de las fuentes de carbono. Como puede apreciarse, el óptimo de producción de TAG sin crecimiento de biomasa coincide en ambos modelos. Sin embargo, debido a las restricciones adicionales que imponen las modificaciones propuestas, la tasa de crecimiento máxima se reduce respecto de la obtenida con el modelo inicial. También se aprecia que el máximo crecimiento se obtiene cuando la fuente de carbono es glucosa. Sin embargo, es interesante conocer la capacidad de síntesis de biomasa y TAG con fuentes de carbono alternativas como el glicerol (subproducto de la elaboración del biodiesel), arabinosa y xilosa (presentes en residuos agroindustriales).

Por otro lado, se evaluó la capacidad del modelo depurado cuando se varía la relación C/N en el medio de cultivo con glucosa como fuente de carbono. En estas condiciones, y dependiendo del valor de este parámetro, se produce biomasa hasta que comienza a escasear el sustrato limitante del crecimiento y el exceso de carbono se almacena en forma de triglicéridos en cuerpos lípidicos. Para simular lo que ocurre

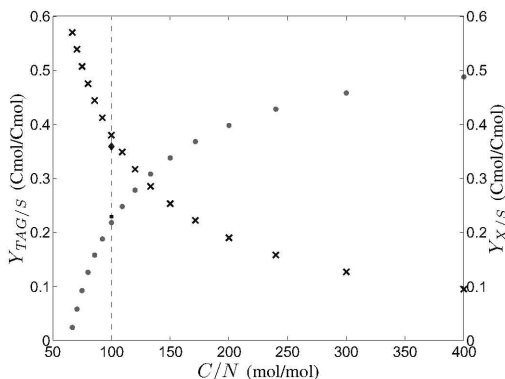


Figura 4. Rendimiento de producción de lípidos (●) y de biomasa (×) como función de la relación glucosa a nitrógeno. Los rendimientos experimentales indicados en color azul fueron tomados de un cultivo reportado en [11].

en estas condiciones se estableció "TAGEx" como función objetivo de (11) y se fijó un flujo de ingreso de carbono y nitrógeno. Finalmente los rendimientos obtenidos *in silico* se compararon con los resultados experimentales en sistema por lote para un $C/N \approx 100$. En la Fig. 4 se muestra cómo varía el rendimiento de producción de TAG y de biomasa en forma simultánea para diferentes relaciones de entrada de glucosa y nitrógeno (GLC/NH₃t). Las curvas obtenidas indican, como es esperado, que el rendimiento de producción de TAG aumenta para valores de C/N altos. En cuanto al valor experimental, se aprecia que los rendimientos son cercanos al resultado del modelo. Nótese que este tipo de análisis sólo se puede realizar con el modelo modificado, ya que el modelo inicial tiene bloqueado el subsistema de asimilación de nitrógeno.

V. CONCLUSIONES

El modelo propuesto en este trabajo proviene de la depuración de un modelo reciente del microorganismo *R. toruloides*. Mediante la comparación de los modelos se pudo observar que la adición de reacciones y metabolitos necesarios para balancear el sistema reducen la tasa máxima de crecimiento para las cuatro fuentes de carbono contempladas en el modelo. Por otro lado, la incorporación de nitrógeno como precursor en la reacción de formación de biomasa permitió evaluar *in silico* la producción de TAG y biomasa para diferentes relaciones de carbono a nitrógeno. Estos resultados fueron comparables con valores experimentales, con lo cual se concluye que el modelo puede ser útil para predecir el comportamiento del microorganismo.

Las líneas de trabajo futuras incluyen validar el modelo con datos experimentales obtenidos en diferentes condiciones de cultivo (por lotes, continuo), analizar en detalle la distribución de flujos para ver el efecto de posibles soluciones alternativas

y generar un modelo dinámico que permita vincular los flujos intracelulares con las variables macroscópicas del biorreactor.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por proyectos de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2014-2394), CONICET (PIP 112-201501-00837) y la Universidad Nacional de La Plata (Proyecto I216).

REFERENCIAS

- [1] A. Tanimura, M. Takashima, T. Sugita, R. Endoh, M. Kikukawa, S. Yamaguchi, E. Sakuradani, J. Ogawa, and J. Shima, "Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production," *Bioresource Technology*, vol. 153, pp. 230 – 235, 2014.
- [2] E. O'Brien, J. Monk, and B. Palsson, "Using genome-scale models to predict biological capabilities," *Cell*, vol. 161, pp. 971 – 987, 2015.
- [3] F. Llaneras and J. Picó, "Stoichiometric modelling of cell metabolism," *Journal of Bioscience and Bioeng.*, vol. 105, no. 1, pp. 1 – 11, 2008.
- [4] I. Rocha, P. Maia, P. Evangelista, P. Vilaça, S. Soares, J. P. Pinto, J. Nielsen, K. R. Patil, E. C. Ferreira, and M. Rocha, "OptFlux: an open-source software platform for *in silico* metabolic engineering," *BMC Systems Biology*, vol. 4, no. 1, p. 45, 2010.
- [5] J. Schellenberger, R. Que, R. M. T. Fleming, I. Thiele, J. D. Orth, A. M. Feist, D. C. Zielinski, A. Bordbar, N. E. Lewis, S. Rahmanian, J. Kang, D. R. Hyde, and B. Ø. Palsson, "Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0," *Nature Protocols*, vol. 6, pp. 1290 – 1307, 2011.
- [6] J. D. Orth, I. Thiele, and B. Ø. Palsson, "What is flux balance analysis?" *Nature Biotechnology*, vol. 28, pp. 245 – 248, 2010.
- [7] J. D. Orth, T. M. Conrad, J. Na, J. A. Lerman, H. Nam, A. M. Feist, and B. Ø. Palsson, "A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism—2011," *Molecular Systems Biology*, vol. 7, no. 1, 2011.
- [8] B. D. Heavner and N. D. Price, "Comparative analysis of yeast metabolic network models highlights progress, opportunities for metabolic reconstruction," *PLoS Computational Biology*, vol. 11, p. e1004530, 2015.
- [9] N. Loira, T. Duermo, J.-M. Nicaud, and D. J. Sherman, "A genome-scale metabolic model of the lipid-accumulating yeast *Yarrowia lipolytica*," *BMC systems biology*, vol. 6, no. 1, p. 35, 2012.
- [10] P. Mishra, G.-Y. Park, M. Lakshmanan, H.-S. Lee, H. Lee, M. W. Chang, C. B. Ching, J. Ahn, and D.-Y. Lee, "Genome-scale metabolic modeling and *in silico* analysis of lipid accumulating yeast *Candida tropicalis* for dicarboxylic acid production," *Biotechnology and Bioengineering*, 2016.
- [11] R. R. Bommarédy, W. Sabra, G. Maheshwari, and A.-P. Zeng, "Metabolic network analysis and experimental study of lipid production in *Rhodospiridium toruloides* grown on single and mixed substrates," *Microbial Cell Factories*, vol. 14, no. 1, pp. 1–13, 2015.
- [12] J. Förster, A. K. Gombert, and J. Nielsen, "A functional genomics approach using metabolomics and *in silico* pathway analysis," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 79, no. 7, pp. 703–712, 2002.
- [13] E. Gruchattka, O. Hädicke, S. Klant, V. Schütz, and O. Kayser, "In silico profiling of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* as terpenoid factories," *Microbial Cell Factories*, vol. 12, no. 1, pp. 1–18, 2013.
- [14] Z. Zhu, S. Zhang, H. Liu, H. Shen, X. Lin, F. Yang, Y. J. Zhou, G. Jin, M. Ye, H. Zou *et al.*, "A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*," *Nature commun.*, vol. 3, p. 1112, 2012.
- [15] A. K. Gombert, M. Moreira dos Santos, B. Christensen, and J. Nielsen, "Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression," *Journal of Bacteriology*, vol. 183, pp. 1441 – 1451, 2001.
- [16] Z. A. King, A. Dräger, A. Ebrahim, N. Sonnenschein, N. E. Lewis, and B. Ø. Palsson, "Escher: A web application for building, sharing, and embedding data-rich visualizations of biological pathways," *PLOS Computational Biology*, vol. 11, no. 8, pp. 1–13, 2015.
- [17] Z. A. King, J. Lu, A. Dräger, P. Miller, S. Federowicz, J. A. Lerman, A. Ebrahim, B. Ø. Palsson, and N. E. Lewis, "BiGG Models: A platform for integrating, standardizing and sharing genome-scale models," *Nucleic Acids Research*, vol. 44, no. D1, pp. D515 – D522, 2016.
- [18] "UniProt: the universal protein knowledgebase," *Nucleic Acids Research*, vol. 45, no. D1, pp. D158–D169, 2017.