

Ingeniería de Proteínas Como una Herramienta en Ingeniería de Vías Metabólicas

Dulce Catalina Díaz, Francisco Bolívar y Adelfo Escalante

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62210, México. E-mail: dcdiaz@ibt.unam.mx

RESUMEN

La utilización de microorganismos como fábricas celulares para la producción industrial de diversos compuestos requiere normalmente implementar estrategias de ingeniería de vías metabólicas (IVM) como sobre-expresar e inactivar genes para re-dirigir el flujo de carbono y energía a las vías de interés. En conjunto con esta aproximación, la ingeniería de proteínas es una herramienta promisoría que permitiría diversificar el espectro de compuestos sintetizados más allá del repertorio natural y optimizar los sistemas de producción, enriqueciendo las estrategias y alcances de la IVM. Por otro lado, la aplicación de ingeniería de proteínas permite construir vías sintéticas novedosas, aumentar la eficiencia de la producción al mejorar las propiedades catalíticas de enzimas, promoviendo la canalización de sustratos o alterando elementos de regulación, así como generando sistemas con respuestas moduladas. En esta contribución, se presenta una revisión de la metodología general utilizada para el diseño, construcción y optimización de cepas bacterianas sobreproductoras de compuestos de interés industrial por IVM. Posteriormente se describen los fundamentos de la ingeniería de proteínas considerando el diseño racional, aleatorio y computacional exponiendo de forma particular el caso de la evolución dirigida para mejorar las propiedades funcionales de una proteína de interés. Finalmente se presentan diversos ejemplos donde se describe la aplicación exitosa de la ingeniería de proteínas y de IVM para la obtención de fábricas celulares.

Palabras clave: Ingeniería metabólica, ingeniería de proteínas, evolución dirigida

ABSTRACT

The utilization of microorganisms as cellular factories suitable for industrial production of several compounds commonly requires the implementation of metabolic pathway engineering (MPE) strategies like over-expression and deletion of genes in order to re-direct energy and carbon flux through the desired pathway. Added to such traditional approaches protein engineering is a promising tool that might allow a wider spectrum of cell-synthesized compounds (beyond the natural repertory) as well as production system's optimization broadening the MPE strategies and scopes. Protein engineering can be used for the construction of novel pathways and enhancement of efficiency by

improving the catalytic properties of enzymes, prompting of metabolic channeling, modifying the cellular regulatory machinery and generating modulated-response systems. Herein we introduce the generalities of the methodology employed for the design, building and optimization of industrially important overproducer bacterial strains by MPE. Next, we describe protein-engineering fundamentals considering rational, aleatory and computational design pinpointing directed evolution as a strategy for protein features improvement. Finally, we show cases that exemplify the successful application of protein engineering and MPE to achieve the development of cellular factories.

Key words: Metabolic engineering, protein engineering, directed evolution

INTRODUCCIÓN

La utilización de microorganismos como fábricas celulares para la producción de moléculas de interés en la industria química, farmacéutica y agrícola; permitiría producir de forma sustentable una gran cantidad de compuestos que actualmente derivan de recursos naturales escasos o no renovables (Fisher, Freedman, Bevan, & Senger, 2014). La ingeniería de vías metabólicas (IVM) es una disciplina que permite optimizar y regular el metabolismo celular con el objetivo primordial de producir compuestos de interés a través de procesos biotecnológicos. La IVM combina el análisis sistemático de vías metabólicas o de mecanismos de regulación con técnicas de biología molecular para mejorar las propiedades celulares a partir de modificaciones genéticas (Koffas, Roberge, Lee, & Stephanopoulos, 1999).

En la generación de un organismo sobreproductor normalmente se requiere caracterizar el metabolismo celular de una forma integral a fin de localizar puntos de modificación, incluir componentes no nativos (que pueden ir desde una proteína hasta vías

metabólicas completas) y optimizar el sistema para aumentar su capacidad de síntesis. La posibilidad de diversificar el espectro de compuestos que se pueden sintetizar más allá del repertorio natural, así como obtener catalizadores mejorados enriquecería las estrategias y alcances de la IVM. En este sentido la ingeniería de proteínas podría ser una alternativa complementaria a las herramientas tradicionales de IVM para la producción de compuestos de alto interés industrial. (Abatemarco, Hill, & Alper, 2013).

A continuación, se revisa la metodología general utilizada para el diseño, construcción y optimización de cepas por IVM haciendo mención de las diferentes herramientas computacionales que auxilian dichas etapas. Posteriormente se muestra a la ingeniería de proteínas como una estrategia adicional y en algunos casos determinante para el éxito en IVM considerando los métodos para diseñar proteínas y finalmente se describen algunos ejemplos de la importancia de la modificación de proteínas en la obtención de fábricas celulares.

INGENIERÍA DE VÍAS METABÓLICAS

Artículos

Para la obtención de una cepa sobreproductora de compuestos de interés biotecnológico es necesario definir la serie de reacciones que permitan la síntesis del compuesto de interés, una vez que se ha construido la vía en el organismo se procede a caracterizar el fenotipo, determinando velocidades de producción y crecimiento, lo que en conjunto con diversos análisis como determinación del transcriptoma, proteoma, metaboloma y fluxoma permiten guiar las modificaciones genéticas a realizar en la optimización de la producción (Figura 1). Las aproximaciones generales de IVM para

generar cepas sobreproductoras implican cambios encaminados a mejorar la capacidad de asimilación de sustratos, incrementar la disponibilidad de intermediarios, disminuir la pérdida de materia y energía a vías no esenciales, etc. Finalmente, el nuevo fondo genético se evalúa empleando diferentes técnicas según las propiedades fisicoquímicas del compuesto a fin de obtener un organismo adecuado para la producción.

REDES METABÓLICAS

Las redes metabólicas son una representación del conjunto de reacciones

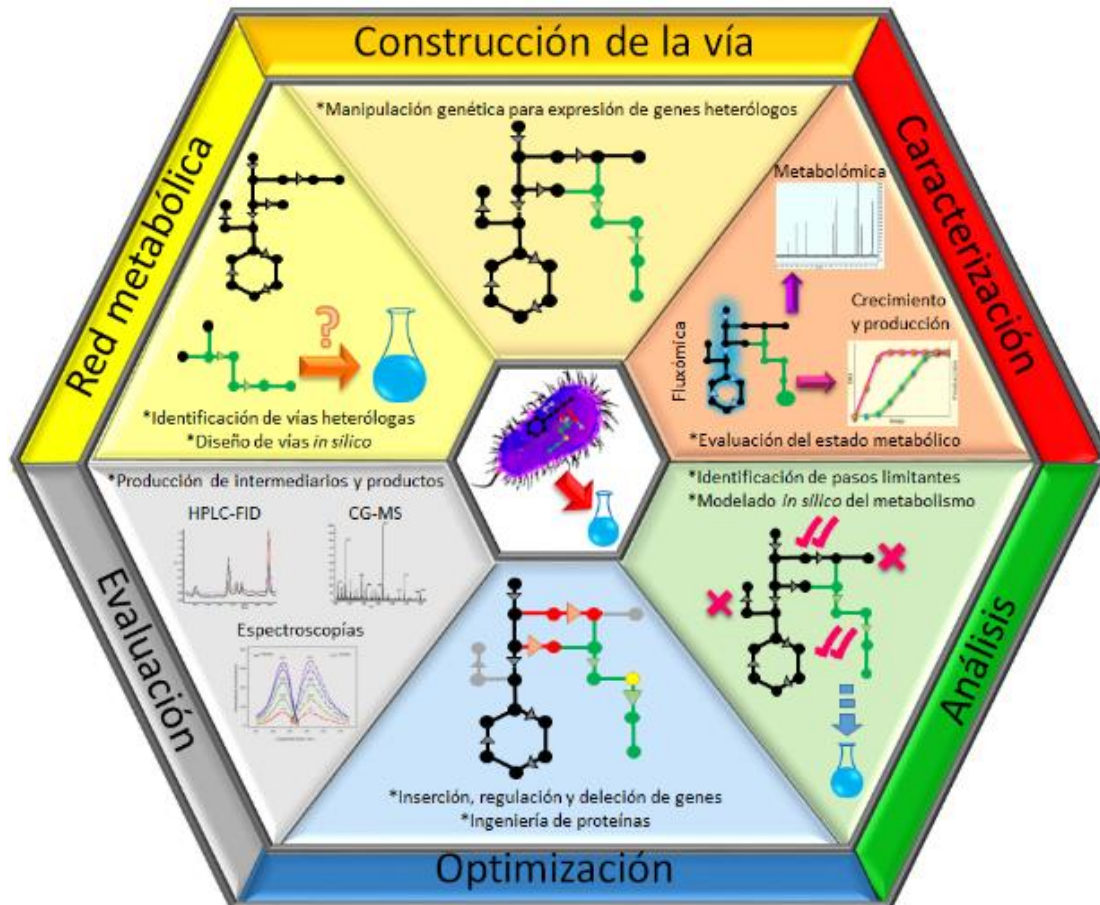


Fig. 1. Diseño, construcción y optimización de cepas en ingeniería de vías metabólicas. Basado en (Ng et al., 2015)

que integran el metabolismo de un organismo en que se describe la identidad y función de proteínas, genes y regulación involucrada, que son utilizadas en IVM a fin de elucidar asociaciones entre los componentes del sistema o puntos de modificación. Las fuentes de dicha información son generalmente bases en las que se integran datos bioquímicos, genómicos, enzimáticos y de interacción con moléculas (Zhou, 2013). Entre las bases de datos especializadas en enzimas, su nomenclatura, propiedades y reacciones se encuentran ENZYME (www.enzyme.expasy.org) y BRENDA (www.brenda-enzymes.org). UNIPROT (www.uniprot.org) contiene las secuencias, modelos estructurales y anotaciones funcionales de proteínas de diversos organismos. Algunas bases de datos comúnmente utilizadas en la búsqueda de vías metabólicas y genomas son BioCyc (<http://BioCyc.org>), KEGG (www.genome.jp/kegg/) y REACTOME (www.reactome.org). El análisis de las bases de datos mencionadas y otras permitieron, hasta 2013, reconstruir redes metabólicas de más de 90 organismos (<http://systemsbiology.ucsd.edu/InSilicoOrganisms/OtherOrganisms>).

VIAS METABÓLICAS SINTÉTICAS

Si bien el repertorio de moléculas que un organismo puede sintetizar es basto, también es limitado, por lo cual al aplicar una estrategia de IVM se pueden incluir vías metabólicas sintéticas. La construcción de vías metabólicas sintéticas parte del conocimiento

sobre la actividad de enzimas probadas experimentalmente, modificadas o diseñadas *in silico* para integrarlas en un conjunto de reacciones con el objetivo de dotar a un organismo hospedero de la capacidad metabólica para producir compuestos que de forma natural no sintetiza utilizando para éste fin la expresión heteróloga de diversos genes (Na, Kim, & Lee, 2010). Los genes que comprenden las vías sintéticas pueden proceder de organismos cuyos genomas no han sido completamente secuenciados de tal manera que una vez identificadas las nuevas vías puedan ser expresadas en un organismo que sea más adecuado para la producción a nivel industrial (Bumpus, Evans, Thomas, Ntai, & Kelleher, 2009). Herramientas computacionales como OptStrain (Pharkya, Burgard, & Maranas, 2004), BNICE (Hatzimanikatis et al., 2005) y GEM-Path (Campodonico, Andrews, Asenjo, Palsson, & Feist, 2014) permiten automatizar el diseño de vías metabólicas sintéticas *in silico*. Dado un compuesto de interés, se realiza la búsqueda de posibles reacciones que deriven en dicho compuesto, tomando en cuenta la máxima producción a partir del mínimo de pasos no-nativos a introducir en un organismo y las implicaciones termodinámicas del sistema. Utilizando vías metabólicas sintéticas se ha logrado la producción de biocombustibles como propano (Menon et al., 2015), precursores de plásticos (Borodina et al., 2015), terapéuticos como artemisinina y resveratrol (Krivoruchko & Nielsen, 2014) e incluso el diseño de vías optimizadas para la

fijación de CO² en plantas (Bar-Even, Noor, Lewis, & Milo, 2010).

FLUXOMICA Y METABOLÓMICA

Considerando que el objetivo principal de la ingeniería de vías metabólicas es alcanzar la máxima producción celular de un compuesto de interés, se debe seguir una estrategia lógica de manipulaciones genéticas para obtener el fenotipo deseado, sin embargo, la complejidad celular hace que la elección sistemática de las modificaciones a realizar resulte difícil, por ejemplo, la caracterización del estado metabólico de la célula. El estado metabólico de una célula refleja la actividad celular asociada a la regulación de genes, transcritos, proteínas y metabolitos, y puede evaluarse con estudios de metabolómica o fluxómica (Toya & Shimizu, 2013).

La fluxómica integra el análisis de flujos metabólicos en que se estiman las velocidades de reacción (flujos) de una red de reacciones y mapas estequiométricos de dicha red para determinar el flujo de carbono en las vías metabólicas, obteniéndose una representación cuantitativa del estado metabólico de la célula (Winter & Krömer, 2013). El análisis de flujos metabólicos de ¹³C se realiza comúnmente en estado estacionario (la concentración de componentes intracelulares no varía con el tiempo) las células se cultivan en presencia de sustratos marcados como azúcares o ácidos orgánicos, que al ser metabolizados se distribuyen en la célula hasta formar parte de los esqueletos de carbono de biomoléculas y

metabolitos (Antoniewicz, 2015). La distribución del flujo se refleja en el enriquecimiento isotópico de aminoácidos proteinogénicos que pueden ser medidos empleando resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopia de masas (EM). Los flujos se estiman del patrón generado por los metabolitos marcados, construyendo un modelo matemático (mapa de flujo) que simule el enriquecimiento de ¹³C en los metabolitos y se ajuste a los resultados experimentales. La obtención de mapas de flujo permite identificar blancos de modificación en las vías, evaluar el impacto de manipulaciones genéticas previamente realizadas en el organismo o analizar el metabolismo energético de la célula (Wiechert, 2001).

A la determinación y análisis global de los metabolitos que componen un sistema vivo se le denomina metabolómica (Dromms & Styczynski, 2012). Los metabolitos celulares incluyen azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, alcoholes, coenzimas y lípidos. Tan sólo en la base de datos del metaboloma de *Escherichia coli* hay registradas 2708 moléculas (Guo et al., 2013). La medición del metaboloma implica extraer los metabolitos una vez interrumpida la actividad celular, separarlos utilizando técnicas cromatográficas o electroforesis y caracterizar los compuestos por RMN, EM u otro tipo de espectroscopia (Alonso, Marsal, & Julià, 2015). Los datos metabolómicos permiten identificar la acumulación de intermediarios que estarían asociados a cuellos de botella en las vías metabólicas, aunque existen reportes en que

la concentración de metabolitos no se perturba al manipular genéticamente a la célula debido a la utilización de vías alternas o regulación enzimática (Ishii et al., 2007).

OPTIMIZACION Y CONSTRUCCIÓN DE CEPAS EN INGENIERIA DE VÍAS METABOLICAS

1.- IDENTIFICACIÓN DE BLANCOS DE MODIFICACIÓN

Una vez definida la red metabólica (que integre o no vías sintéticas) para generar un compuesto, se debe optimizar la producción a partir de redirigir los recursos celulares desde el metabolismo primario o secundario hacia la conversión de un producto deseado, suprimiendo además el flujo de carbono y energía hacia vías no esenciales. Se han desarrollado diversos métodos computacionales para predecir el comportamiento metabólico de un sistema utilizando modelos estequiométricos, cinéticos o híbridos (Tomar & De, 2013). Una aproximación que emplea modelos estequiométricos es el análisis de balance de flujos (ABF) en que se predice un fenotipo metabólico simulando distribuciones de flujo basadas en restricciones. En ABF las reacciones metabólicas y sus coeficientes estequiométricos se representan matemáticamente en forma de una matriz, estequiometrica que delimita el balance de flujo en el sistema, posteriormente se define una función objetivo que sea relevante al problema en estudio, por ejemplo si la variable en estudio es maximizar el crecimiento la función objetivo es la producción de biomasa,

para el caso en que además se quiera sobreproducir un compuesto es posible acoplar la producción de biomasa a la generación de dicha molécula en forma de subproducto, finalmente la serie de ecuaciones generadas se resuelven con algoritmos de programación lineal para traducirlas en flujos (Orth, Thiele, & Palsson, 2010). La optimización de una cepa partiendo del modelamiento *in silico* utilizando ABF se auxilia de programas como OptKnock (Burgard, Pharkya, & Maranas, 2003), OptGene (Patil, Rocha, Förster, & Nielsen, 2005) y COBRA (Becker et al., 2007) que permiten identificar genes candidatos a inactivar para lograr la producción de un compuesto asociado a la maximización del crecimiento. OptReg (Pharkya & Maranas, 2006) y EMILiO (Yang, Cluett, & Mahadevan, 2011) permiten la búsqueda de genes no sólo a deletar sino a regular de forma positiva o negativa. En la literatura se encuentran revisiones exhaustivas de métodos computacionales empleados para la optimización de cepas en ingeniería de vías metabólicas y ejemplos exitosos de su utilización (Bordbar, Monk, King, & Palsson, 2014; Ng, Khodayari, Chowdhury, & Maranas, 2015; Zomorodi, Suthers, Ranganathan, & Maranas, 2012).

2.- RECONFIGURACION DEL METABOLISMO

Tomando en cuenta las modificaciones sugeridas por el modelamiento *in silico* y los resultados de fluxómica o metabolómica, se procede a la manipulación directa de los

constituyentes celulares que incluye sintetizar ácidos nucleicos para expresar proteína(s) de interés o alterar su concentración en la célula, modificar propiedades en las proteínas mutando la secuencia de DNA, etc. (Copeland et al., 2012). Algunas estrategias para modificar la concentración de una proteína expresada heterológamente son: 1) optimizar el uso de codones a los del organismo hospedero, la secuencia optimizada se puede obtener con Gene Designer (Villalobos, Ness, Gustafsson, Minshull, & Govindarajan, 2006), 2) introducir genes en plásmidos de expresión, los componentes del vector pueden ser elegidos o diseñados con GenoCAD (Czar, Cai, & Peccoud, 2009), 3) modificar la estabilidad de transcritos, NuPack (Zadeh et al., 2010) y Vienna RNA Websuite (Gruber, Lorenz, Bernhart, Neuböck, & Hofacker, 2008) auxilian en el diseño y predicción de la estructura del RNA y 4) modificar el sitio de unión al ribosoma del mRNA, dada una secuencia RBS Calculator (Salis, 2011), puede predecir la velocidad del inicio de la transcripción y proponer secuencias modelo que se ajusten a una velocidad requerida.

Las herramientas clásicas de ingeniería genética que permiten modificar la expresión de un gen y la concentración de una proteína no son eficientes para resolver pasos limitantes originados por propiedades inherentes a las proteínas como retroinhibición y promiscuidad enzimática (Chen & Zeng, 2013). Además, en la integración de vías metabólicas sintéticas comúnmente no se obtiene la eficiencia esperada debido a la incompatibilidad de las

proteínas heterólogas con el hospedero. Aunado a lo anterior dos problemáticas comunes en IVM son el flujo ineficiente hacia la vía deseada debido a cuellos de botella asociados a la regulación enzimática, baja actividad catalítica o a la expresión inadecuada de proteínas y la pérdida de intermediarios por difusión o competencia con otras vías metabólicas. En este sentido la ingeniería de proteínas se ha utilizado para la obtención de enzimas con propiedades mejoradas (mayor eficiencia catalítica, menor inhibición, mayor estabilidad, etc.) así como el desarrollo de andamios sintéticos o “scaffolds” sobre los cuales se reclutan proteínas con diferentes actividades enzimáticas que al estar espacialmente cercanas generan la canalización de sustratos e intermediarios disminuyendo o previniendo la pérdida de los metabolitos y optimizando el flujo hacia la vía de interés (Dueber et al., 2009).

INGENIERÍA DE PROTEÍNAS

La ingeniería de proteínas se refiere al diseño y modificación de diversas propiedades estructurales y/o funcionales en dichas biomoléculas (Lutz, 2010). Obtener enzimas que han sido sometidas a ingeniería, es una forma de superar los obstáculos naturales de enzimas nativas para generar un catalizador optimizado con propiedades deseadas que se ajusten a los requerimientos del sistema (Otte & Hauer, 2015). Las modificaciones a una proteína se realizan a partir del diseño racional, aleatorio o computacional; aunque estudios en que se combinan estas aproximaciones subrayan el

potencial aditivo de dicha estrategia por sobre el uso de los diseños individuales (Currin, Swainston, Day, & Kell, 2014).

DISEÑO RACIONAL

En el diseño racional se identifican regiones de interés en la proteína y se reemplazan aminoácidos de sitios específicos que han sido seleccionados a partir del conocimiento estructural y mecanístico de la enzima. Las metodologías empleadas para cambiar la secuencia de DNA en forma sitio-dirigida hacen uso de oligonucleótidos que codifican la mutación deseada y han sido revisadas en la literatura (Antikainen & Martin, 2005; Ling & Robinson, 1997). Actualmente el modelamiento por homología, acoplamiento molecular y dinámica molecular se combinan para sugerir el sitio y naturaleza de posibles mutaciones (Ferrari, Lee, & Fraaije, 2015). La información requerida para implementar una aproximación de diseño racional restringe el número de proteínas que pueden ser estudiadas pero al delimitar los aminoácidos mutados se reduce significativamente el número de variantes a ser analizadas. Haciendo uso de mutaciones sitio-dirigidas es posible modificar la especificidad de enzimas (Petschacher et al., 2014), aumentar la actividad enzimática (Dutta, Dattagupta, & Biswas, 2013), modificar la termoestabilidad (Farrokh, Yakhchali, & Karkhane, 2014) o invertir la enantioselectividad (F. Guo, Franzen, Ye, Gu, & Yu, 2014), entre otros.

MUTAGENESIS AL AZAR

Los cambios lejanos al sitio catalítico que no pueden ser racionalizados pueden tener una influencia sobre la catálisis enzimática (Morley & Kazlauskas, 2005). La mutagénesis al azar es una aproximación que permite generar proteínas, enzimas, vías metabólicas o incluso genomas enteros con propiedades mejoradas sin requerir información estructural previa (Labrou, 2010). Modificar aleatoriamente la identidad de uno o pocos aminoácidos en sitios específicos se realiza con mutagénesis a saturación (Siloto & Weselake, 2012), mientras que cambios múltiples de secuencia se logran empleando PCR propensa al error (epPCR), recombinación homóloga, DNA shuffling, cepas mutagénicas, nucleótidos con bases degeneradas, agentes físicos y químicos (Neylon, 2004; Nordwald, Garst, Gill, & Kaar, 2013). Introduciendo mutaciones al azar es posible obtener enzimas con la capacidad de catalizar reacciones en ambientes no naturales como solventes orgánicos (Dror, Shemesh, Dayan, & Fishman, 2014), modificar el estado oligomérico de proteínas (Gurskaya et al., 2001), eliminar mecanismos de regulación enzimática como la retro-inhibición (Lu & Stephanopoulos, 2005), cambiar el uso de cofactores (Pick, Ott, Howe, Schmid, & Sieber, 2014), etc.

EVOLUCIÓN DIRIGIDA

Artículos

La evolución dirigida es un tipo de diseño aleatorio en que se realizan rondas de mutagénesis y selección de variantes con la acumulación concomitante de modificaciones benéficas simulando un proceso de evolución darwiniana (Abatemarco et al., 2013). La evolución dirigida es una herramienta poderosa para evaluar combinaciones de cambios en secuencia que puedan tener impacto en el plegamiento y función de una proteína. El primer paso es diversificar la secuencia construyendo bibliotecas de mutantes generadas por técnicas como epPCR (Figura 2). En la técnica de epPCR se amplifica un gen en presencia de DNA polimerasas de baja fidelidad y/o condiciones que disminuyan la fidelidad de la enzima

(variando las concentraciones de Mn^{2+} , Mg^{2+} y nucleótidos) a fin de promover la incorporación errónea de nucleótidos en la reacción, pudiendo variar además la frecuencia de mutación en el gen (Leemhuis, Kelly, & Dijkhuizen, 2009). Un segundo paso implica diferenciar las proteínas con propiedades deseadas desde una población en que dichas características no han cambiado. En la selección se aplican condiciones para analizar todos los miembros de la biblioteca de manera simultánea en que sólo las clonas con la característica deseada puedan prevalecer (por ejemplo ensayos de complementación o de resistencia a un antibiótico). En la selección de mutantes se evalúan y analizan las variantes

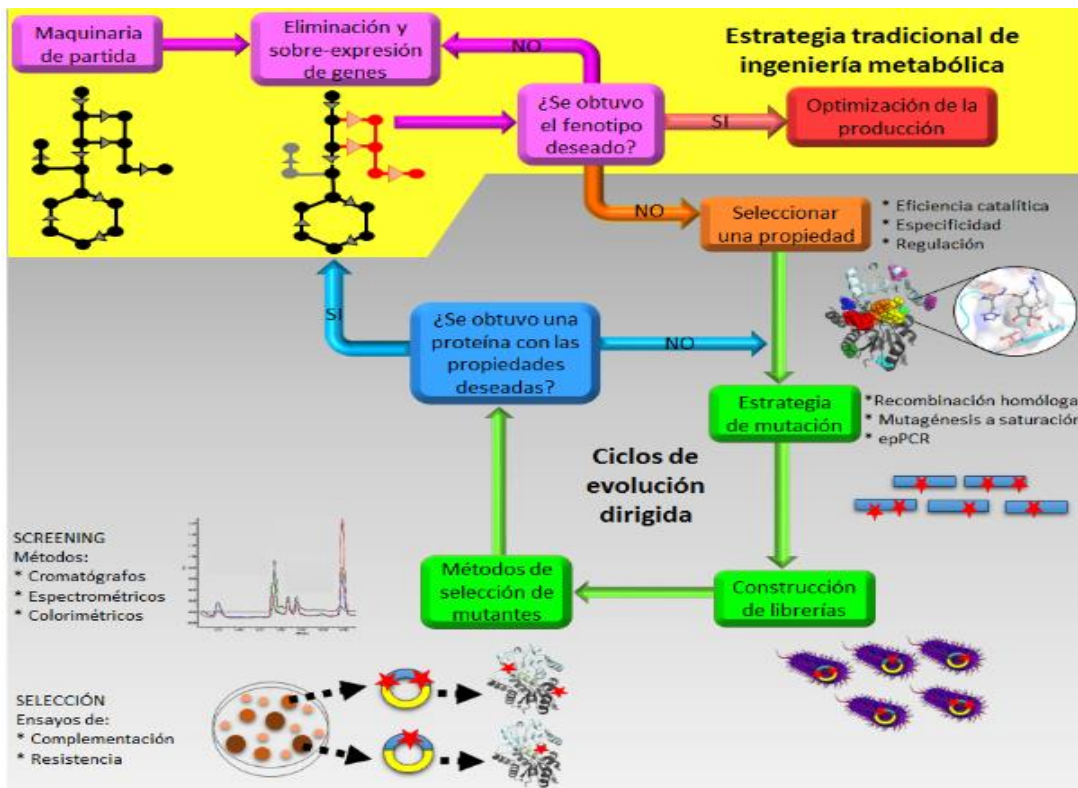


Fig. 2. Estrategia general para implementar evolución dirigida como una herramienta de ingeniería de vías metabólicas. Basado en (Abatemarco et al., 2013).

individualmente desde librerías de 10^2 - 10^4 miembros, aunque el uso de tecnologías como FACS (fluorescence activated cell sorter) permite el análisis de 10^7 eventos/h (Aharoni, Griffiths, & Tawfik, 2005). FACS es un tipo de citometría de flujo en que se separan uno a uno los miembros de una biblioteca, seleccionándolos según la fluorescencia emitida por partículas que interactúan con componentes de la superficie celular, ésta técnica es muy útil cuando se mutan proteínas de membrana celular. Una vez seleccionadas mutantes individuales, el tercer paso en una estrategia de evolución dirigida es identificar las variantes que exhiban mayor impacto en la obtención de las propiedades deseadas, la secuencia nucleotídica de dicha mutante puede someterse a posteriores rondas de mutagénesis-selección- evaluación y con esto acumular cambios en secuencia que se reflejen en mejores propiedades enzimáticas.

DISEÑO COMPUTACIONAL

Dada una proteína de 100 aminoácidos existirían 20^{100} mutantes, aún empleando métodos actuales para la construcción de librerías que almacenan 10^{15} variantes, todas las diferentes secuencias realmente analizadas están subrepresentadas en el diseño aleatorio (Jäckel, Kast, & Hilvert, 2008). De las tres estrategias utilizadas en ingeniería de proteínas, el diseño computacional es la aproximación con el mayor potencial de análisis combinatorio, pudiendo evaluar *in silico* 10^{80} secuencias en algunas horas (Hayes et al., 2002). El diseño computacional de proteínas se basa en la

combinación de campos de fuerza y algoritmos de búsqueda para identificar soluciones termodinámicamente óptimas (secuencias individuales o combinaciones de secuencias) compatibles con la estructura tridimensional de una proteína y/o sus posibles propiedades funcionales (Van der Sloot, Kiel, Serrano, & Stricher, 2009). La aproximación computacional ha encontrado aplicación en muchos campos de ingeniería de proteínas dirigidos al estudio de plegamientos, re-diseño y optimización de propiedades enzimáticas así como diversificación y generación de nuevas funciones catalíticas (Mak & Siegel, 2014; Saven, 2011).

INGENIERIA DE PROTEÍNAS COMO HERRAMIENTA EN INGENIERIA DE VÍAS METABÓLICAS

La ingeniería de proteínas se puede utilizar como herramienta en IVM para construir vías sintéticas novedosas al generar enzimas con funciones que no se encuentran en la naturaleza o con diferente especificidad de sustrato, optimizar la vía al mejorar las propiedades enzimáticas, alterar la regulación modificando la función de factores transcripcionales o proteínas alostéricas, aumentar la eficiencia de producción con andamios proteicos y modificar vías de señalización (Chen, Wilmanns, & Zeng, 2010; Lee et al., 2012). Diversas aplicaciones de ingeniería de proteínas en IVM y las aproximaciones metodológicas utilizadas se muestran en la Tabla 1.

Un ejemplo en que se integran estrategias de IVM e ingeniería de proteínas es el trabajo de Wittmann y colaboradores para la generación de una cepa de *Corynebacterium glutamicum* sobreproductora de lisina (J. Becker, Zelder, Häfner, Schröder, & Wittmann, 2011). El diseño racional de dicha cepa se basó en análisis de flujo de ^{13}C a fin de identificar blancos de modificación en el metabolismo caracterizando su impacto en la producción de lisina, una vez realizada la modificación (sobreexpresión, inactivación o mutación de genes) se obtuvo el mapa de flujo de la nueva cepa que permitía caracterizar su estado metabólico y con esto se seleccionó la siguiente modificación. Los cambios realizados al metabolismo de *C. glutamicum* se muestran en la Figura 3. Considerando que la vía de síntesis de lisina está inhibida por lisina y treonina se introdujo una mutante de la enzima aspartoquinasa resistente a retro-inhibición y se aumentó el flujo a través de la vía sobre-expresando a la enzima diaminopimelato deshidrogenasa. Con el fin de aumentar la disponibilidad del sustrato oxalacetato se inactivó el gen *pck*. El flujo de carbono en la vía de síntesis de lisina se incrementó al sobre-expresar proteínas que se encuentran en reacciones iniciales, intermedias o finales de la vía y se disminuyó la pérdida de carbono hacia la vía de síntesis de treonina expresando una mutante de la enzima homoserina deshidrogenasa con menor actividad. La principal enzima anaplerótica en la producción de lisina es la enzima piruvato carboxilasa, que sintetiza oxalacetato desde piruvato y CO_2 , para

aumentar el flujo a través de ésta proteína se realizaron modificaciones en el gen *pyc* que dan lugar a una enzima con mejores propiedades cinéticas y posteriormente se substituyó su promotor natural por uno fuerte. Estas últimas modificaciones no incrementaron la producción de lisina a pesar de que los mapas indicaban mayor flujo a través de la enzima piruvato carboxilasa, pudiéndose explicar con la observación de que el oxalacetato estaba siendo re-dirigido a la glucólisis, por lo cual se decidió disminuir la actividad del ciclo de los ácidos tricarbónicos cambiando el codón de inicio ATG por el codón raro GTG en el gen *icd* que codifica para la enzima isocitrato deshidrogenasa. Los flujos en esta nueva cepa mostraban una respuesta celular que reflejaba la demanda de NADPH impuesta por la producción de lisina, para incrementar el poder reductor en la célula se sobre-expresaron genes de la vía de las pentosas fosfato consiguiendo así una cepa capaz de producir hasta 120 g/L de lisina en cultivos por lote alimentado.

CONCLUSIONES

La construcción de fábricas celulares competentes para la producción industrial de compuestos normalmente requiere implementar diversas estrategias de IVM como sobre expresar e inactivar genes para re-dirigir el flujo de carbono y energía a las vías de interés. En conjunto con dichas aproximaciones tradicionales la ingeniería de proteínas es una herramienta promisorias que permitiría diversificar el tipo de compuestos sintetizados y optimizar los sistemas de

Tabla 1. Aplicaciones de la ingeniería de proteínas en ingeniería de vías metabólicas

ZZZ	Aproximación	Ejemplo	Metodología	Referencia
Construcción de vías novedosas	Modificación de residuos o motivos determinantes de la especificidad para emplear diferentes sustratos	Construcción de una vía <i>de novo</i> para la síntesis de 1,3-propanediol a partir de homoserina	La mutación <i>in silico</i> de los residuos importantes para la especificidad en la enzima glutamato deshidrogenasa sugirió combinaciones de secuencia para obtener una desaminasa de homoserina sin equivalente en la naturaleza.	(Chen, Geng, & Zeng, 2015)
	Utilización de enzimas promiscuas para obtener enzimas en que se diversifique el uso de sustratos, catálisis o síntesis de compuestos	Obtención de enzimas que sintetizan sesquiterpenos particulares desde un parental que produce hasta 52 compuestos diferentes	Se utilizó un algoritmo para recombinar mutaciones de sitios específicos en la enzima γ -humuleno sintasa, asociando el análisis a la síntesis de terpenos. Las combinaciones sugeridas se construyeron por mutagénesis a saturación permitiendo obtener nuevas sintasas de terpenos	(Yoshikuni, Ferrin, & Keasling, 2006)
	Obtención de nuevas actividades catalíticas con el diseño <i>de novo</i> de proteínas	Generación de una nueva vía para la fijación de carbono que puede ser ligada al metabolismo central	Empleando un diseño computacional, se rediseñó el sitio de unión de la enzima benzaldehído liasa para aumentar su especificidad por formaldehído. La formolasa cataliza la carboligación de tres moléculas de formaldehído para sintetizar dihidroxiacetona	(Siegel et al., 2015)
Optimización de vías metabólicas	Modificación de la regulación enzimática	Eliminación de la retro-inhibición de un paso limitante en la síntesis de L-lisina	Comparado la estructura y secuencia de dihidrodipicolinato sintasas resistentes o no a la inhibición por L-lisina, se identificaron aminoácidos a mutar puntualmente, eliminando la regulación alostérica.	(Geng, Chen, Zheng, Sun, & Zeng, 2013)
	Cambio en la especificidad de cofactores o isómeros	Optimización de cepas productoras de etanol	Considerando la estructura de una xilosa reductasa que utiliza NADH, se modificó racionalmente a una xilosa reductasa dependiente de NADPH obteniendo mutantes que emplean NADH	(Bengtsson, Hahn-Hägerdal, & Gorwa-Grauslund, 2009)

	Aumento en la eficiencia catalítica de enzimas	Aumento en la actividad de enzimas heterólogas que son cuello de botella en la producción de compuestos de interés farmacéutico	Empleando mutagénesis a saturación en el sitio de unión de la enzima levopimaradieno sintasa y evolución dirigida de la enzima geranilgeranil difosfato sintasa se aumentó la eficiencia catalítica de las enzimas que al expresarse con otros genes incrementan 2600 veces la producción de levopimaradieno	(Leonard et al., 2010)
Construcción de sistemas dinámicos para regular el metabolismo	Ingeniería de factores transcripcionales o enzimas alostéricas para regular la actividad de vías metabólicas	Desarrollo de un sistema sensor-regulador para la producción de biodiesel	Se realizó la ingeniería del factor transcripcional FadR, modificándolo para sensar la concentración de acil-CoA y posteriormente activar la transcripción de enzimas de la vía de síntesis de ésteres de ácidos grasos	(Zhang, Carothers, & Keasling, 2012)
Modificación de vías de señalización y canalización de metabolitos	Utilización de andamios proteicos	Aumento en la producción de compuestos de interés para la industria química	Enzimas heterólogas implicadas en la vía sintética de producción de ácido D-glutámico en <i>E. coli</i> se conjugaron en un andamio proteico. La cepa que expresa el andamio produjo 5 veces más ácido glutámico que la contraparte con enzimas libres.	(Moon, Dueber, Shiue, & Prather, 2010)

producción.

Si bien la ingeniería de proteínas como una ciencia individual ha reportado numerosos casos de éxito en el desarrollo de procesos biocatalíticos aplicados en industrias farmacéuticas como Pfizer, Novartis y Sanofi-Aventis (Bornscheuer et al., 2012) su utilización en IVM ha sido limitada a pesar de los diferentes puntos de aplicación que se han expuesto en esta revisión.

Si bien la ingeniería de proteínas como una ciencia individual ha reportado numerosos casos de éxito en el desarrollo de procesos biocatalíticos para la obtención de fármacos e intermediarios de atorvastatina, pregabalina, atazanavir y otros aplicados en industrias farmacéuticas como Pfizer, Novartis y Sanofi-Aventis (Bornscheuer et al., 2012) su utilización en IVM ha sido limitada a pesar de los diferentes puntos de aplicación que se han expuesto en esta revisión.

Con el avance de las ciencias “ómicas”, la biología sintética, el diseño de herramientas computacionales potentes y el desarrollo de tecnologías empleadas en ingeniería de proteínas; la IVM se ha posicionado como una alternativa real para la generación de compuestos desde un enfoque biotecnológico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo contó con el apoyo del Proyecto CONACYT-Ciencia Básica 240519

REFERENCIAS

- Abatemarco, J., Hill, A., & Alper, H. S. (2013). Expanding the metabolic engineering toolbox with directed evolution. *Biotech J.*, 8, 1397–410.
- Aharoni, A., Griffiths, A. D., & Tawfik, D. S. (2005). High-throughput screens and selections of enzyme-encoding genes. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 9, 210–6.
- Alonso, A., Marsal, S., & Julià, A. (2015). Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 3, 23.
- Antikainen, N. M., & Martin, S. F. (2005). Altering protein specificity: techniques and applications. *Bioorg. Med. Chem.*, 13(8), 2701–16.
- Antoniewicz, M. R. (2015). Methods and advances in metabolic flux analysis: a mini-review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 42, 317–25.
- Bar-Even, A., Noor, E., Lewis, N. E., & Milo, R. (2010). Design and analysis of synthetic carbon fixation pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107, 8889–8894.
- Becker, J., Zelder, O., Häfner, S., Schröder, H., & Wittmann, C. (2011). From zero to hero--design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production. *Met.Eng.*, 13, 159–68.
- Becker, S. A., Feist, A. M., Mo, M. L., Hannum, G., Palsson, B. Ø., & Herrgard, M. J. (2007). Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox. *Nat. Protoc.*, 2, 727–38.

Artículos

- Bengtsson, O., Hahn-Hägerdal, B., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2009). Xylose reductase from *Pichia stipitis* with altered coenzyme preference improves ethanolic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels*, 2, 9.
- Bordbar, A., Monk, J. M., King, Z. a, & Palsson, B. O. (2014). Constraint-based models predict metabolic and associated cellular functions. *Nat. Rev. Genet.*, 15, 107–20.
- Bornscheuer, U. T., Huisman, G. W., Kazlauskas, R. J., Lutz, S., Moore, J. C., & Robins, K. (2012). Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature*, 485, 185–194.
- Borodina, I., Kildegaard, K. R., Jensen, N. B., Blicher, T. H., Maury, J., Sherstyk, S., ... Nielsen, J. (2015). Establishing a synthetic pathway for high-level production of 3-hydroxypropionic acid in *Saccharomyces cerevisiae* via β -alanine. *Metab. Eng.*, 27, 57–64.
- Bumpus, S. B., Evans, B. S., Thomas, P. M., Ntai, I., & Kelleher, N. L. (2009). A proteomics approach to discovering natural products and their biosynthetic pathways. *Nat. Biotechnol.*, 27, 951–956.
- Burgard, A. P., Pharkya, P., & Maranas, C. D. (2003). OptKnock: A bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization. *Biotechnol. Bioeng.*, 84, 647–657.
- Campodonico, M. A., Andrews, B. A., Asenjo, J. A., Palsson, B. Ø., & Feist, A. M. (2014). Generation of an atlas for commodity chemical production in *Escherichia coli* and a novel pathway prediction algorithm, GEM-Path. *Metab. Eng.*, 25, 140–158.
- Chen, Z., Geng, F., & Zeng, A.-P. (2015). Protein design and engineering of a *de novo* pathway for microbial production of 1,3-propanediol from glucose. *Biotechnol. J.*, 10, 284–9.
- Chen, Z., Wilmanns, M., & Zeng, A. P. (2010). Structural synthetic biotechnology: From molecular structure to predictable design for industrial strain development. *Trends Biotechnol.*, 28, 534–542.
- Chen, Z., & Zeng, A.-P. (2013). Protein design in systems metabolic engineering for industrial strain development. *Biotechnol. J.*, 8, 523–33.
- Copeland, W. B., Bartley, B. A., Chandran, D., Galdzicki, M., Kim, K. H., Sleight, S. C., Sauro, H. M. (2012). Computational tools for metabolic engineering. *Metab. Eng.*, 14, 270–280.
- Currin, A., Swainston, N., Day, P. J., & Kell, D. B. (2014). Synthetic biology for the directed evolution of protein biocatalysts: navigating sequence space intelligently. *Chem. Soc. Rev.*, 44, 1172–1239.
- Czar, M. J., Cai, Y., & Peccoud, J. (2009). Writing DNA with GenoCAD. *Nucl. Acid. Res.*, 37, 1–8.
- Dromms, R. a, & Styczynski, M. P. (2012). Systematic applications of metabolomics in metabolic engineering. *Metabolites*, 2, 1090–122.
- Dror, A., Shemesh, E., Dayan, N., & Fishman, A. (2014). Protein engineering by random

- mutagenesis and structure-guided consensus of *Geobacillus stearothermophilus* Lipase T6 for enhanced stability in methanol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80, 1515–27.
- Dueber, J. E., Wu, G. C., Malmirchegini, G. R., Moon, T. S., Petzold, C. J., Ullal, A. V., ... Keasling, J. D. (2009). Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nat. Biotechnol.*, 27, 753–759.
- Dutta, S., Dattagupta, J. K., & Biswas, S. (2013). Enhancement of proteolytic activity of a thermostable papain-like protease by structure-based rational design. *PloS One*, 8, e62619.
- Farrokh, P., Yakhchali, B., & Karkhane, A. A. (2014). Rational design of K173A substitution enhances thermostability coupled with catalytic activity of *Enterobacter sp.* Bn12 lipase. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 262–9.
- Ferrari, A. R., Lee, M., & Fraaije, M. W. (2015). Expanding the substrate scope of chitooligosaccharide oxidase from *Fusarium graminearum* by structure-inspired mutagenesis. *Biotechnol Bioeng.*, 112, 1074–80.
- Fisher, A. K., Freedman, B. G., Bevan, D. R., & Senger, R. S. (2014). A review of metabolic and enzymatic engineering strategies for designing and optimizing performance of microbial cell factories. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, 11, 91–99.
- Geng, F., Chen, Z., Zheng, P., Sun, J., & Zeng, A. P. (2013). Exploring the allosteric mechanism of dihydrodipicolinate synthase by reverse engineering of the allosteric inhibitor binding sites and its application for lysine production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97, 1963–1971.
- Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neuböck, R., & Hofacker, I. L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucl. Acid. Res.*, 36, 70–74.
- Guo, A., Jewison, T., Wilson, M., Liu, Y., Knox, C., Djoumbou, Y., Wishart, D. (2013). ECMDB: The *E. coli* Metabolome Database. *Nucl. Acid. Res.*, 41, 625–630.
- Guo, F., Franzen, S., Ye, L., Gu, J., & Yu, H. (2014). Controlling enantioselectivity of esterase in asymmetric hydrolysis of aryl prochiral diesters by introducing aromatic interactions. *Biotechnol. Bioeng.*, 111, 1729–39.
- Gurskaya, N. G., Fradkov, A. F., Terskikh, A., Matz, M. V., Labas, Y. a., Martynov, V. I., ... Lukyanov, S. a. (2001). GFP-like chromoproteins as a source of far-red fluorescent proteins. *FEBS Lett.*, 507, 16–20.
- Hatzimanikatis, V., Li, C., Ionita, J. A., Henry, C. S., Jankowski, M. D., & Broadbelt, L. J. (2005). Exploring the diversity of complex metabolic networks. *Bioinformatics*, 21, 1603–1609.
- Hayes, R. J., Bentzien, J., Ary, M. L., Hwang, M. Y., Jacinto, J. M., Vielmetter, J., ... Dahiyat, B. I. (2002). Combining computational and experimental screening for rapid optimization of protein properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99, 15926–31.

- Ishii, N., Nakahigashi, K., Baba, T., Robert, M., Soga, T., Kanai, A., ... Tomita, M. (2007). Multiple high-throughput analyses monitor the response of *E. coli* to perturbations. *Science*, 316, 593–7.
- Jäckel, C., Kast, P., & Hilvert, D. (2008). Protein design by directed evolution. *Annu. Rev. Biophys.*, 37, 153–73.
- Koffas, M., Roberge, C., Lee, K., & Stephanopoulos, G. (1999). Metabolic engineering. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 1, 535–557.
- Krivoruchko, A., & Nielsen, J. (2014). Production of natural products through metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 35C, 7–15.
- Labrou, N. E. (2010). Random mutagenesis methods for *in vitro* directed enzyme evolution. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 11, 91–100.
- Lee, J. W., Na, D., Park, J. M., Lee, J., Choi, S., & Lee, S. Y. (2012). Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. *Nat. Chem. Biol.*, 8, 536–546.
- Leemhuis, H., Kelly, R. M., & Dijkhuizen, L. (2009). Directed evolution of enzymes: Library screening strategies. *IUBMB Life*, 61, 222–8.
- Leonard, E., Ajikumar, P. K., Thayer, K., Xiao, W.-H., Mo, J. D., Tidor, B., ... Prather, K. L. J. (2010). Combining metabolic and protein engineering of a terpenoid biosynthetic pathway for overproduction and selectivity control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107, 13654–13659.
- Ling, M. M., & Robinson, B. H. (1997). Approaches to DNA mutagenesis: an overview. *Anal. Biochem.*, 254, 157–178.
- Lu, T., & Stephanopoulos, G. (2005). Feedback inhibition of chorismate mutase / prephenate dehydrogenase (TyrA) of *Escherichia coli*: generation and characterization of tyrosine-insensitive mutants. *Appl Environ Microbiol*, 71, 7224–7228.
- Lutz, S. (2010). Beyond directed evolution--semi-rational protein engineering and design. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 21, 734–43.
- Mak, W. S., & Siegel, J. B. (2014). Computational enzyme design: Transitioning from catalytic proteins to enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 27, 87–94.
- Menon, N., Pásztor, A., Menon, B. R., Kallio, P., Fisher, K., Akhtar, M. K., ... Scrutton, N. S. (2015). A microbial platform for renewable propane synthesis based on a fermentative butanol pathway. *Biotechnol. Biofuels*, 8, 61.
- Moon, T. S., Dueber, J. E., Shiue, E., & Prather, K. L. J. (2010). Use of modular, synthetic scaffolds for improved production of glucaric acid in engineered *E. coli*. *Metab. Eng.*, 12, 298–305.
- Morley, K. L., & Kazlauskas, R. J. (2005). Improving enzyme properties: when are closer mutations better? *Trends Biotechnol.*, 23, 231–7.
- Na, D., Kim, T. Y., & Lee, S. Y. (2010). Construction and optimization of synthetic

- pathways in metabolic engineering. *Curr. Opin. Microbiol.*, 13, 363–370.
- Neylon, C. (2004). Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. *Nucl. Acid. Res.*, 32, 1448–59.
- Ng, C. Y., Khodayari, A., Chowdhury, A., & Maranas, C. D. (2015). Advances in *de novo* strain design using integrated systems and synthetic biology tools. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 28, 105–114.
- Nordwald, E. M., Garst, A., Gill, R. T., & Kaar, J. L. (2013). Accelerated protein engineering for chemical biotechnology via homologous recombination. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 24, 1017–1022.
- Orth, J. D., Thiele, I., & Palsson, B. Ø. (2010). What is flux balance analysis? *Nat. Biotechnol.*, 28, 245–248.
- Otte, K. B., & Hauer, B. (2015). Enzyme engineering in the context of novel pathways and products. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 35, 16–22.
- Patil, K. R., Rocha, I., Förster, J., & Nielsen, J. (2005). Evolutionary programming as a platform for *in silico* metabolic engineering. *BMC Bioinf.*, 6, 308.
- Petschacher, B., Staunig, N., Müller, M., Schürmann, M., Mink, D., De Wildeman, S., ... Glieder, A. (2014). Cofactor specificity engineering of *Streptococcus mutans* NADH oxidase 2 for NAD(P)(+) Regeneration in Biocatalytic Oxidations. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, 9, e201402005.
- Pharkya, P., Burgard, A. P., & Maranas, C. D. (2004). OptStrain: A computational framework for redesign of microbial production systems. *Genome Res.*, 14, 2367–2376.
- Pharkya, P., & Maranas, C. D. (2006). An optimization framework for identifying reaction activation/inhibition or elimination candidates for overproduction in microbial systems. *Metab. Eng.*, 8, 1–13.
- Pick, A., Ott, W., Howe, T., Schmid, J., & Sieber, V. (2014). Improving the NADH-cofactor specificity of the highly active AdhZ3 and AdhZ2 from *Escherichia coli* K-12. *J. Biotechnol.*, 189, 157–65.
- Salis, H. M. (2011). The ribosome binding site calculator. In *Methods Enzymol.* (Vol. 498, pp. 19–42).
- Saven, J. G. (2011). Computational protein design: Engineering molecular diversity, nonnatural enzymes, nonbiological cofactor complexes, and membrane proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 15, 452–457.
- Siegel, J. B., Smith, A. L., Poust, S., Wargacki, A. J., Bar-Even, A., Louw, C., ... Baker, D. (2015). Computational protein design enables a novel one-carbon assimilation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 112, 3704–9.
- Siloto, R. M. P., & Weselake, R. J. (2012). Site saturation mutagenesis: Methods and applications in protein engineering. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 1, 181–189.
- Tomar, N., & De, R. K. (2013). Comparing methods for metabolic network analysis

- and an application to metabolic engineering. *Gene*, 521, 1–14.
- Toya, Y., & Shimizu, H. (2013). Flux analysis and metabolomics for systematic metabolic engineering of microorganisms. *Biotechnol. Adv.*, 31, 818–826.
- Van der Sloot, A. M., Kiel, C., Serrano, L., & Stricher, F. (2009). Protein design in biological networks: from manipulating the input to modifying the output. *Protein Eng. Des. Sel.*, 22, 537–42.
- Villalobos, A., Ness, J. E., Gustafsson, C., Minshull, J., & Govindarajan, S. (2006). Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments. *BMC Bioinf.s*, 7, 285.
- Wiechert, W. (2001). ^{13}C metabolic flux analysis. *Metab. Eng.*, 3, 195–206.
- Winter, G., & Krömer, J. O. (2013). Fluxomics - connecting 'omics analysis and phenotypes. *Environ. Microbiol.*, 15, 1901–1916.
- Yang, L., Cluett, W. R., & Mahadevan, R. (2011). EMILiO: A fast algorithm for genome-scale strain design. *Metab. Eng.*, 13, 272–281.
- Yoshikuni, Y., Ferrin, T. E., & Keasling, J. D. (2006). Designed divergent evolution of enzyme function. *Nature*, 440, 1078–1082.
- Zadeh, J. N., Steenberg, C. D., Bois, J. S., Wolfe, B. R., Pierce, M. B., Khan, A. R., ... Pierce, N. A. (2010). NUPACK: Analysis and Design of Nucleic Acid Systems. *J. Comput. Chem.*, 31, 170–173.
- Zhang, F., Carothers, J. M., & Keasling, J. D. (2012). Design of a dynamic sensor-regulator system for production of chemicals and fuels derived from fatty acids. *Nat. Biotechnol.*, 30, 354–359.
- Zhou, T. (2013). Computational reconstruction of metabolic networks from KEGG. *Methods Mol. Biol.*, 930, 235–49.
- Zomorodi, A. R., Suthers, P. F., Ranganathan, S., & Maranas, C. D. (2012). Mathematical optimization applications in metabolic networks. *Metab. Eng.*, 14, 672–686.