



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO®

## **INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CIUDAD MADERO**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA



"POR MI PATRIA Y POR MI BIEN"

TESIS

### **ESTUDIOS DE FLUJOS METABÓLICOS DE MICROALGAS VERDES PARA PROCESOS DE BIORREFINACIÓN**

Que para obtener el grado de:

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

Presenta:

**M.C.I.Q. Mónica Fabiola Briones Báez**

**D00070469**

**CVU 784358**

Bajo la dirección de:

Director(a):

**Dr. Luciano Aguilera Vázquez**

Co-Director(a):

**Dr. Nelson Rangel Valdez**

Ciudad Madero, Tamaulipas, **09/junio/2023**

**OFICIO No. : U.084Bis/2023**  
**ASUNTO: Autorización de**  
impresión de tesis

**C. MÓNICA FABIOLA BRIONES BÁEZ**  
**No. DE CONTROL D00070469**  
**P R E S E N T E**

Me es grato comunicarle que después de la revisión realizada por el Jurado designado para su Examen de Grado de Doctorado en Ciencias de la Ingeniería, se acordó autorizar la impresión de su tesis titulada:

**“ESTUDIOS DE FLUJOS METABÓLICOS DE MICROALGAS VERDES PARA PROCESOS DE BIORREFINACIÓN”**

El Jurado está integrado por los siguientes catedráticos:

PRESIDENTE:	DR.	LUCIANO AGUILERA VÁZQUEZ
SECRETARIO:	DR.	NELSON RANGEL VALDEZ
PRIMER VOCAL:	DRA.	ANA LIDIA MARTÍNEZ SALAZAR
SEGUNDO VOCAL:	DR.	PEDRO MARTÍN GARCÍA VITE
TERCER VOCAL:	DRA.	CLAUDIA GUADALUPE GÓMEZ SANTILLÁN
DIRECTOR DE TESIS:	DR.	LUCIANO AGUILERA VÁZQUEZ
CO-DIRECTOR:	DR.	NELSON RANGEL VALDEZ

Es muy satisfactorio para la División de Estudios de Posgrado e Investigación compartir con usted el logro de esta meta. Espero que continúe con éxito su desarrollo profesional y dedique su experiencia e inteligencia en beneficio de México.

**ATENTAMENTE**

*Excelencia en Educación Tecnológica*

*"Por mi patria y por mi bien"*



**MARCO ANTONIO CORONEL GARCÍA**  
**JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE**  
**POSGRADO E INVESTIGACIÓN**



c.c.p.- Archivo  
MACG 'NRV'



---

---

# Agradecimientos

A mis directores de proyecto

Dr. Luciano Aguilera Vazquez y al Dr. Nelson Rangel Valdez por su apoyo incondicional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado a través de la beca.

A mi comité tutorial Dra. Ana Lidia Martinez Salazar, Dr. Pedro Martín García Vite, Dra. Nancy Cristal Zúñiga Peña, Dra. Claudia Guadalupe Gómez Santillán.

Al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Ciudad Madero.

# Índice general

Índice de Tablas . . . . .	X
Índice de Figuras . . . . .	XII
<b>1 Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Planteamiento del problema. . . . .	7
1.2 Objetivo general . . . . .	8
1.3 Objetivos específicos . . . . .	8
1.4 Justificación del estudio. . . . .	8
1.5 Organización de la tesis. . . . .	9
<b>2 Antecedentes</b>	<b>11</b>
2.1 Estudios del metabolismo de las microalgas en general. . . . .	12
2.2 Trabajos realizados con diferentes software . . . . .	16
2.3 Estudios realizados con Optimización multi-objetivo . . . . .	18
2.4 Análisis de Trabajos Relacionados . . . . .	19
<b>3 Marco Teórico</b>	<b>21</b>
3.1 Microalgas . . . . .	21
3.1.1 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . . . . .	23
3.1.2 <i>Dunaliella salina</i> . . . . .	24
3.1.3 <i>Chlorella vulgaris</i> . . . . .	25
3.2 Tipos de cultivo de microalgas . . . . .	25
3.2.1 Cultivos discontinuos Batch . . . . .	26
3.2.2 Cultivo semi-continuo . . . . .	26

3.2.3	Quimiostato . . . . .	27
3.3	Biorrefinería . . . . .	27
3.4	Enzimas . . . . .	29
3.4.1	Lipasas . . . . .	29
3.5	Ingeniería Metabólica . . . . .	30
3.6	Ingeniería Genética . . . . .	30
3.7	Análisis de flujos metabólicos . . . . .	31
3.8	Modelos a escala genómica . . . . .	32
3.9	Rutas metabólicas para la asimilación del carbono . . . . .	32
3.9.1	Ciclo Calvin-Benson . . . . .	33
3.9.2	Ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) o Ciclo de Krebs . . . . .	34
3.10	Técnicas computacionales . . . . .	34
3.10.1	Python . . . . .	35
3.10.2	COBRA Toolbox . . . . .	36
3.10.3	MATLAB . . . . .	37
3.10.4	COBRAPy . . . . .	37
3.11	Optimización . . . . .	39
3.12	Metaheurísticas . . . . .	40
3.12.1	Algoritmo metaheurístico . . . . .	40
3.13	Optimización multi-objetivo . . . . .	41
3.13.1	Optimalidad de Pareto . . . . .	41
3.13.2	Dominancia de Pareto . . . . .	42
3.14	Enfoque evolutivo . . . . .	42
3.14.1	Algoritmos genéticos . . . . .	44
3.14.2	NSGA-II . . . . .	45
3.14.3	MOEA/D . . . . .	47
3.14.4	Algoritmo evolutivo MOEA/D para MOFBA . . . . .	48
<b>4</b>	<b>Metodología</b>	<b>50</b>

4.1	Propuesta de Integración metodológica. . . . .	51
4.2	Construcción de la red metabólica . . . . .	53
4.3	Matriz estequiométrica . . . . .	57
4.4	Balance de masa para cada metabolito . . . . .	58
4.4.1	Definición de Función objetivo . . . . .	58
4.5	Evaluación de los flujos metabólicos mediante FBA . . . . .	60
4.6	Validación de la red metabólica . . . . .	64
<b>5</b>	<b>Algoritmos propuestos</b>	<b>65</b>
5.1	MOFBA: Modelos de optimización multiobjetivo para FBA . . . . .	67
5.1.1	MOFBA <sub>1</sub> . . . . .	67
5.1.2	MOFBA <sub>2</sub> . . . . .	68
5.1.3	MOFBA <sub>3</sub> . . . . .	69
5.1.4	MOFBA <sub>4</sub> . . . . .	69
5.2	Diseño de Metaheurísticas . . . . .	70
5.2.1	Esquemas de representación de las soluciones . . . . .	71
5.2.2	<b>Operadores genéticos</b> . . . . .	73
5.2.3	Esquema de manejo de restricciones. . . . .	74
5.3	Casos de Estudio . . . . .	74
5.3.1	Red piloto . . . . .	74
5.3.2	<b>Caso de Estudio: Red metatolica <i>C. reinhardtii</i></b> . . . . .	76
5.3.3	Caso de estudio: Ditrutición de flujos asociados al metabolismo del glutamato de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> . . . . .	78
5.3.4	Caso de estudio: Distribución de flujos en la biosíntesis de pigmentos de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> . . . . .	78
5.3.5	Caso de estudio: Red metabólica <i>Dunaliella salina</i> . . . . .	80
5.4	Diseño experimental . . . . .	82
<b>6</b>	<b>Resultados y Análisis</b>	<b>84</b>
6.1	Resultados . . . . .	84

6.1.1	Experimento 1 . . . . .	84
6.1.2	Experimento 2 . . . . .	94
6.1.3	Experimento 3 . . . . .	95
6.1.4	Experimento 4 . . . . .	96
6.1.5	Experimento 5 . . . . .	97
6.1.6	Experimento 6 . . . . .	98
6.1.7	Validación . . . . .	99
6.2	Análisis estadístico . . . . .	101
6.3	Discusión . . . . .	104
<b>7</b>	<b>Conclusiones y Trabajos Futuros</b>	<b>106</b>
7.1	Trabajos Futuros . . . . .	108
7.2	Contribuciones . . . . .	108
	<b>Bibliografía</b>	<b>108</b>
	<b>Anexos</b>	<b>120</b>
	<b>A LISTADO DE REACCIONES.</b>	<b>121</b>

# Índice de Tablas

Tabla 2.1	Análisis de Trabajos Relacionados. . . . .	20
Tabla 3.1	Composición de las microalgas . . . . .	28
Tabla 3.2	Resumen de los principales paquetes de Python synbio . . . . .	36
Tabla 4.1	Composición de Aminoácidos . . . . .	60
Tabla 5.1	Codificación de la solución propuesta para MOFBA. . . . .	71
Tabla 5.2	Parámetros específicos de implementación de NSGAI. . . . .	73
Tabla 5.3	Parámetros específicos de implementación de MOEAD. . . . .	74
Tabla 5.4	Reacciones de la red piloto. . . . .	76
Tabla 5.5	Reacciones derivadas de la red metabólica 5.2. . . . .	77
Tabla 5.6	Diseño de Experimentos para demostrar el soporte Metaheurístico para la comprensión del metabolismo en microalgas. . . . .	82
Tabla 6.1	Reporte sobre las mejores distancias euclidianas al punto ideal. . . . .	86
Tabla 6.2	Flujos obtenidos mediante FBA, contra algunas soluciones seleccionadas obtenidas por NSGAI y su distancia euclídeana. . . . .	91
Tabla 6.3	Distribución de flujos obtenidos mediante NSGAI asociados a la síntesis de pigmentos en el metabolismo de la microalga <i>C. vulgaris</i> . . . . .	100
Tabla 6.4	Datos analizados estadísticamente para validar diferencias entre el uso de <i>MOFBA</i> <sub>3</sub> y <i>MOFBA</i> <sub>4</sub> . La hipótesis nula $H_0$ fue aceptada cuando el p-value obtenido fue menor a 0.05. . . . .	102

Tabla 6.5	Datos analizados estadísticamente para establecer las diferencias entre el uso de NSGAI y MOEAD. La hipótesis nula $H_0$ fue aceptada cuando el p-value obtenido fue menor a 0.05. . . . .	103
Tabla 1.1	Listado de Reacciones. Caso de estudio: Distribución de flujos en la biosíntesis de pigmentos de la microalga <i>C. vulgaris</i> . . . . .	122
Tabla 1.2	Metabolitos en la distribución de flujos en la biosíntesis de pigmentos en la microalga <i>C. vulgaris</i> . . . . .	123

# Índice de Figuras

Figura 1.1	Vía metabólica para la síntesis de ácidos grasos en las microalgas [1]. . . . .	6
Figura 3.1	Estructura de la célula de microalga <i>C. reinhardtii</i> [2]. . . . .	24
Figura 3.2	Curva típica de crecimiento de los microorganismos en un sistema batch. . . . .	26
Figura 3.3	Esquema que representa la fotosíntesis incluyendo la fase luminosa y la fase oscura. . . . .	33
Figura 3.4	Dos funciones objetivo Frontera de Pareto . . . . .	43
Figura 3.5	Representación del Algoritmo NSGAii . . . . .	46
Figura 4.1	Esquema comparativo entre Metodología basada en método FBA y Metodología Propuesta basada en Metaheurísticas para la construcción de un modelo metabólico. . . . .	52
Figura 4.2	Árbol filogenético de la proteína beta caroteno quetolasa. . . . .	54
Figura 4.3	Red metabólica con una reacción bloqueada [3] . . . . .	56
Figura 4.4	Representación de la Matriz estequiométrica y red de PETRI [3] . . . . .	57
Figura 4.5	Metodología detallado para la obtención de un modelo metabólico. . . . .	61
Figura 5.1	Red piloto. . . . .	75
Figura 5.2	Red Metabólica de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . . . . .	77
Figura 5.3	Red Metabólica de <i>Distribución de flujos asociadas al metabolismo del glutamato</i> . . . . .	78
Figura 5.4	Distribución de flujos de pigmentos de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> [4]. . . . .	79
Figura 5.5	Mapa metabólico simplificado de la microalga <i>D. salina</i> . . . . .	81

Figura 6.1	Aproximación de Pareto para la configuración $C_0$ con respecto a los objetivos $(v_{10}, v_{14}, v_{18})$ . . . . .	87
Figura 6.2	Aproximación de Pareto para la configuración $C_0$ con respecto al plano formado por objetivos $(v_{10}, v_{14})$ . . . . .	88
Figura 6.3	Aproximación de Pareto para la configuración $C_0$ con respecto al plano formado por objetivos $(v_{10}, v_{18})$ . . . . .	89
Figura 6.4	Aproximación de Pareto para la configuración $C_0$ con respecto al plano formado por objetivos $(v_{14}, v_{18})$ . . . . .	90
Figura 6.5	Distribución de flujos de la distribución objetivo, (a) Optimización del flujo $v_{14}$ usando FBA, (b), (c),(d), corresponden a diferentes distribuciones de flujos obtenidas de la optimización de NSGAI $v_{14}$ , $v_{10}$ y $v_{18}$ simultáneamente. . .	92
Figura 6.6	Comparación entre el algoritmo NSGAI y las variantes (a) MOFBA <sub>1</sub> , (b) MOFBA <sub>2</sub> , (c) MOFBA <sub>3</sub> y (d) MOFBA <sub>4</sub> en la distribución de flujos de pigmentos 5.3.4. . . . .	95
Figura 6.7	Comparación entre los algoritmos NSGAI Y (b) MOEAD en la red de distribución de pigmentos de <i>Chlorella vulgaris</i> y red piloto NSGAI c) Y MOEAD d). . . . .	96
Figura 6.8	Comparación entre las variantes entre (a) FBA, (b) Random y, c) NSGAI en la microalga <i>C. vulgaris</i> 5.3.4. . . . .	97
Figura 6.9	Comparación entre (a) NSGAI y (b) FBA en la Distribución de flujos asociados al metabolismo del glutamato de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> . . . . .	98
Figura 6.10	Representación de la distribución obtenida entre NSGAI y FBA de la microalga <i>D. Sallina</i> 5.3.5. . . . .	99

---

---

# Nomenclatura

ADN ácido desoxirribonucleido

AFM Análisis de flujos metabólicos

BLAST Basic local alignment Search TOOL

EC Enzyme Commission numbers

GAMS General Algebraic Model

GC-MS Cromatografía de gases-Espectrometría de masas

Hydra Hybrid Draw and Routes Analysis

INST-MFA Análisis de flujos metabólicos isotópicamente no estacionarios

MOEA/D Algoritmo Evolutivo Multiobjetivo Basado en Descomposición

MOFBA FBA Multiobjetivo

NCBI Centro Nacional para la información Biotecnológica

NSGAI Algoritmo genético de clasificación no dominado

AKG 2-Oxoglutarato

ATP Adenosín trifosfato

F6P Fructosa-6-fosfato

FUM Fumarato

G6P Glucosa-6-fosfato

GLU Glutamato

MAL Malato

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PEP	Fosfoenol piruvato
PYR	Piruvato
SER	Serina
SUC	Succinato
TAP	Tris-acetato fosfato
$K$	Capacidad máxima de población en estado estacionario
$N$	Número de células de microalga por mililitro
$r$	Tasa de crecimiento

---

## Introducción

En la actualidad, el petróleo representa la principal fuente energética para la sociedad en general. Sin embargo, su uso es también causa de la contaminación ambiental producida y del cambio climático observado en las últimas décadas. De lo anterior, surge la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías para la obtención de fuentes de energía alternativas, que suplan el uso de combustibles fósiles y que puedan cubrir la demanda energética de la población [5]. Las fuentes de energías pueden clasificarse en solar, eólica, hidráulica y la proveniente de biomasa [6].

Los biocombustibles son clasificados de acuerdo a su origen en cuatro grandes grupos. De este modo, los biocombustibles de primera generación son derivados de la actividad agrícola directa, en su mayoría se utilizan como alimentos, como la caña de azúcar, los granos de maíz, y diversos aceites de semilla de girasol, soja, palma, ricino, semilla de algodón, coco y cacahuete. Con ello, se presenta la desventaja de desviar recursos alimenticios hacia la producción de energéticos. En el caso de los biocombustibles de segunda generación se tiene la ventaja de que no son de fuentes alimenticias, por ejemplo: el bagazo

de la caña de azúcar, la paja de trigo, el aserrín, las hojas secas de los árboles, el aceite de semilla de *Jatropha curcas*. Aunque su producción no compite con los recursos necesarios obtener alimentos, para su cultivo se necesitan grandes extensiones de tierras agrícolas, y en algunos casos como la *J. curcas*, la ocupación de las mismas se da durante periodos muy largos para el aprovechamiento de la semilla derivado de la maduración de esta especie. Por otra parte, la biomasa de tercera generación incluye pastos perennes, árboles y plantas de crecimiento rápido, así como las algas verdes y microalgas, en cuyo caso, no interfiere con la producción de alimentos. Finalmente, el grupo de biocombustibles identificados como de cuarta generación comprende el uso de bacterias genéticamente modificadas para la síntesis de carbohidratos y lípidos que sirven de base para la producción de biodiésel, bioetanol, o algún otra fuente de carbono que permita la combustión [7].

El biodiésel es un recurso capaz de satisfacer la demanda de combustibles destinados al transporte, el cual puede ser obtenido mediante el uso del aceite de microalgas como materia prima, pero es necesario aumentar el contenido de lípidos en las microalgas debido a que éste todavía no es capaz de competir a nivel comercial con el diésel derivado del petróleo [8].

La relevancia del estudio de las microalgas como fuente de biomasa estriba en que estos microorganismos son de crecimiento rápido y no necesita tierras de cultivo fértiles. Además, su cultivo se puede llevar a cabo en aguas con alta carga orgánicas, con lo cual algunas especies de microalgas se aplican a la biorremediación de ecosistemas acuáticos [9, 10]. Para cultivo se emplea la luz solar, representando un menor gasto energético para la producción de biomasa y sus derivados.

Las microalgas son organismos unicelulares fotosintéticos, que se pueden cultivar en agua salada o agua dulce, tienen un rápido crecimiento a comparación de otras fuentes de biomasa; pueden crecer en climas cálidos, tropicales o subtropicales [11]. Las microalgas tienen alta eficiencia fotosintética, por lo tanto, los cultivos de microalgas tienen una alta capacidad de absorción de CO<sub>2</sub> atmosférico [12]. Así también en función del tipo de metabolismo que lleven a cabo pueden crecer a partir de fuentes de carbono como carbonatos disueltos en agua y de otras fuentes orgánicas de carbono.

Las microalgas son fuente de diferentes productos de alto valor como lípidos, que pueden convertirse en biocombustibles, biogás, pigmentos, proteínas, vitaminas entre otros productos de interés. Una biorrefinería a partir de microalgas lograría la sostenibilidad económica y ambiental en la producción de biocombustibles como el biodiésel, biometano, bioetanol y biohidrógeno [13]. Así también, la industria farmacéutica y de cosméticos se puede favorecer al representar una fuente ilimitada de pigmentos como betacaroteno, astaxantina, carotenos y luteína [14]. En el tratamiento de aguas residuales para la eliminación de sustancias tóxicas como: pesticidas, herbicidas y metales pesados como el cromo [15].

Se ha demostrado que la acumulación de lípidos en la célula de microalga aumenta durante la limitación de nitrógeno [16]. Sin embargo esta adaptación depende también de la relación de C/N, a nivel metabólico. Esto depende de la disponibilidad de fuente de carbono, incrementando el flujo de carbono celular hacia la síntesis de lípidos [17], y ante la escasez de nitrógeno desencadena una menor producción de biomasa [18]. Las microalgas se pueden cultivar de manera fotoautotrófica, mixotrófica y heterotrófica, dependiendo de la fuente de carbono, las cuales pueden ser orgánicas (glucosa, acetato, glicerol, fructuosa, entre otras) o inorgánicas ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}_3^{-2}$ , entre otras) [19, 20].

La ingeniería metabólica es una alternativa para comprender el comportamiento del metabolismo de la microalga y orientarlo a productos de interés; esta ha sido desarrollada durante los últimos tres décadas como un campo que busca mejorar los bioprocesos usando diversas herramientas, como el análisis de flujos metabólicos, proteómica, genómica, etc. Se encarga del estudio y la evaluación de los cambios que se producen de forma dirigida en el metabolismo [21]. Su objetivo es generar procesos más eficientes, en este caso que las microalgas secreten o acumulen el metabolito deseado en altas concentraciones, modificando parámetros de cultivo. Así también, una parte fundamental de área disciplinar es la construcción de una red metabólica implica la recopilación de todas las reacciones enzimáticas conocidas en las rutas metabólicas del sistema biológico, así como los genes asociados a la codificación de las enzimas [22, 23].

Las rutas metabólicas de la síntesis de lípidos en las microalgas son un campo todavía en exploración. Se ha observado que durante el crecimiento de microalgas en cultivo mixotrófico, empleando acetato

como fuente de carbono, ha favorecido la acumulación de lípidos [24], y en algunos otros casos se ha usado como fuente de nitrógeno el glutamato de nitrógeno, logrando aumentar la concentración de lípidos en las células de microalgas [25].

Se han realizado numerosos estudios para conocer el metabolismo de las microalgas, siendo utilizadas como modelo en estudios de ingeniería metabólica la *Chlamydomonas reinhardtii* con mayor frecuencia, se han incorporado también las especies de *Nannochloropsis salina* y *Dunaliella salina*; aunque el grado de detalle aún no incluye los flujos que intervienen en el metabolismo cuando existe carencia de macronutrientes como el nitrógeno y fósforo que tienen un papel importante en la síntesis de lípidos [24].

Aunado a esto, falta comprender completamente el metabolismo central del carbono de las microalgas. Para considerar un flujo alternativo de carbono a la síntesis de ácidos grasos y con esto mejorar la eficiencia fotosintética y que produzcan más lípidos [17], para poder considerar su aplicación a nivel industrial. Debido al interés actual de fuentes de energía alternativa al petróleo, el análisis de las rutas metabólicas que tienen lugar en el cloroplasto en organismos fotosintéticos son de gran interés debido a la síntesis de ácidos grasos llevada a cabo en dichos organelos<sup>1</sup>. En la Figura 1.1 se puede observar la vía metabólica de la síntesis de ácidos grasos en las microalgas, la cual se inicia con la conversión del Acetil-CoA a Malonil-CoA catalizada por la enzima Acetil-CoA carboxilasa. La molécula de Malonil-CoA es la donadora de carbono para la síntesis de nuevos ácidos grasos, dicho carbono es transferido de la CoA a un cofactor proteico (ACP) para la obtención del Malonil-ACP, el cual participa en una serie de reacciones de condensación con los aceptores acil-ACP y Acetil-CoA. El ciclo termina cuando el grupo acil es removido del sitio ACP por la acil-ACP tioesterasa y una vez sintetizados los ácidos grasos libres son transportados del ACP al glicerol-3-fosfato o a monoacilglicerol-3-fosfato [11].

El análisis de flujos metabólicos (AFM) permite el cálculo de los flujos de las redes metabólicas de un organismo, utiliza modelos estequiométricos de las reacciones y balance de masa de los metabolitos [26]. Es una herramienta importante en la ingeniería metabólica, ayuda a comprender las

<sup>1</sup> Compartimento intracelular en células eucariotas fotosintéticas donde se concentra la mayor cantidad de clorofila

reacciones bioquímicas que ocurren en el interior y exterior de la microalga, y predice vía simulación el comportamiento de los microorganismos a diferentes perturbaciones, y con el desarrollo de un mapa metabólico adecuado permite la optimización *in silico* para su posterior validación *in vivo*.

La metodología de FBA permite optimizar una única función objetivo cada vez, es decir la concentración de un metabolito en particular. Sin embargo, existen casos donde se requiere utilizar más de una función objetivo, debido a que en la naturaleza no siempre todo el recurso va dirigido a una única función objetivo. Esto se conoce como optimización multi-objetivo y permite observar como diferentes valores de concentración de metabolitos pueden ser optimizados simultáneamente. Con esta estrategia, es posible variar las fuentes de cultivo permitiendo diferentes modos de metabolismo como heterotrofia, mixotrofia y autotrofia. Ronan M.T. Fleming, de la Universidad de Galway, en Irlanda, es líder del desarrollo de un módulo de software para Matlab de MathWorks®, denominado COBRA Toolbox (COntstraint-Based Reconstruction and Analysis)<sup>2</sup> [27], herramienta que permite optimizar más de una función objetivo, pero tiene la desventaja que no es de libre acceso.

Por lo anterior, se recurrió al uso de algoritmos metaheurísticos como NSGAI (Algoritmo genético de clasificación no dominado) y MOEA/D (Algoritmo Evolutivo Multiobjetivo Basado en Descomposición) empleando una versión libre de COBRA, denominado CobraPy<sup>3</sup> [28]. De este modo es posible encontrar un conjunto de posibles soluciones, a comparación de los métodos exactos los métodos metaheurísticos nos permiten obtener un conjunto de buenas soluciones y el tiempo de ejecución es mucho menor que los exactos. Este conjunto de soluciones obtenidas por los métodos heurísticos permite comprender y estudiar de manera más amplia el metabolismo celular de la microalga.

---

<sup>2</sup>Disponible en <https://github.com/opencobra/cobratoolbox>

<sup>3</sup>Disponible en <https://opencobra.github.io/cobrapy/>

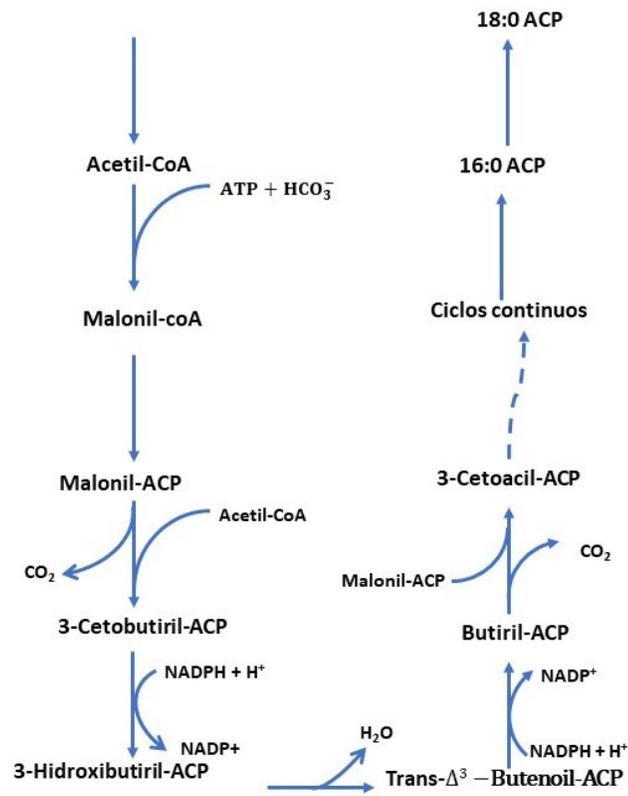


Figura 1.1: Vía metabólica para la síntesis de ácidos grasos en las microalgas [1].

## 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Aunado al aumento del costo de los combustibles fósiles debido a que cada vez es más difícil la extracción del petróleo y la disminución considerable de las reservas disponibles, se ha hecho evidente su papel como factor importante en el cambio climático hacen necesaria la búsqueda de fuentes de alternativas, que permitan producir combustibles limpios que no contaminen el medio ambiente. El biodiésel producido a partir de aceites vegetales, grasas animales, algas y microalgas, es considerado como una alternativa viable para sustituir el uso de diésel, por lo que es de suma importancia el desarrollo de un modelo metabólico que refleje lo que realmente ocurre en la célula microalgal con la finalidad de optimizar la producción de lípidos como materia prima en su obtención.

Además de los lípidos, se pueden obtener otros productos de interés como los son betacarotenos, astaxantinas, carotenos y luteína que son moléculas ampliamente utilizados en la industria farmacéutica y de la salud. Comprender completamente las redes metabólicas que existen en las microalgas presentaría una ventaja significativa para manipular las condiciones de cultivo como intensidad luminosa, nutrientes, o modificaciones genéticas apropiadas para obtener una mayor cantidad de biomasa con una concentración alta de lípidos. De esa manera se podría potencializar el uso de las microalgas para obtener biodiésel de manera industrial.

Un sistema de esta naturaleza considera múltiples variables que alteran el metabolismo de la célula, y tener una aproximación de un modelo basado en un análisis de los flujos metabólicos, que permita comprender y predecir el comportamiento del metabolismo celular, es primordial para plantear procesos de producción que garanticen una mayor cantidad de metabolitos como lípidos, carotenos y otros productos de interés. Los estudios experimentales cuyos alcances incluyan un número elevado de variables resultan sumamente costoso y representan una inversión de tiempo considerable, por ello existen alternativas *in silico* para estudiar a fondo las redes involucradas en el metabolismo de celular. De las metodologías más utilizadas para ello, una de las más destacada es FBA, pero es posible ampliar su alcance incorporando métodos metaheurísticos para la optimización multi-objetivo, métodos y

algoritmos que son de acceso libre. Estos permiten un acercamiento a lo que ocurre de manera biológica de forma natural, al optimizar varias funciones objetivo simultáneamente, a diferencia del enfoque mono-objetivo. Los resultados obtenidos mediante estos algoritmos se pueden validar utilizando antecedentes experimentales de la bibliografía, disminuyendo tiempo y costos en la experimentación.

## 1.2. OBJETIVO GENERAL

Comprender el metabolismo de la microalga haciendo uso del análisis de flujos metabólicos, en condiciones ambientales determinadas que permitan el aumento del rendimiento de la concentración de metabolitos de interés en la célula.

## 1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Planteamiento de la red metabólica de acuerdo a las bases de datos.
- Establecer un modelo metabólico que describa las principales reacciones presentes en el crecimiento de la microalga para obtener mayor rendimiento de lípidos.
- Validar que el modelo metabólico coincide con el metabolismo *in vivo*.

## 1.4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

El dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) es uno de los principales gases de efecto invernadero, que actualmente está agudizando el cambio climático. Este gas proviene de diferentes actividades económicas, de los sectores industrial y de servicios donde el uso de los combustibles derivados del petróleo son esenciales

para la generación de energía eléctrica, así como su uso en la cadena de transporte y la movilidad doméstica. Una forma de mitigar el efecto invernadero es utilizar las microalgas para capturar el CO<sub>2</sub> del ambiente y convertirlo a través de la fotosíntesis y ciclos como el de Calvin Benson, Krebs, en proteínas, carbohidratos, biocombustibles, pigmentos etc. que son de gran importancia industrial, con lo cual será posible tener una huella de carbono<sup>4</sup> mucho menor a la actual.

Así también, mediante la variación de condiciones de cultivo, como limitación de nitrógeno [29], CO<sub>2</sub>, irradiación, se puede orientar el metabolismo celular hacia la síntesis de productos de interés comercial [19]. Actualmente, existen modelos metabólicos para diferentes cepas de microalgas como la *C. reinhardtii* y *Chlorella*, pero no se ha logrado comprender en su totalidad el comportamiento de las redes metabólicas. Con el análisis de flujos metabólicos se pueden representar las principales rutas utilizadas en el organismo bajo diferentes condiciones de cultivo y entender el metabolismo de la microalga para la producción de metabolitos y potencializar el rendimiento de metabolitos deseados para que en un futuro pueda ser utilizado en procesos de biorrefinación de manera industrial.

## 1.5. ORGANIZACIÓN DE LA TESIS.

La tesis está organizada de la siguiente manera:

En el capítulo 2 se presenta el estado del arte, en la primera parte se presentan los principales estudios realizados a redes metabólicas en microalgas, la segunda parte aborda los trabajos realizados con diferentes software, en la tercera parte se describen los trabajos realizados con optimización multiobjetivo y finalmente se realiza un análisis de los trabajos relacionados.

En el capítulo 3 se presentan los aspectos teóricos, comenzando con el marco conceptual de las

---

<sup>4</sup>La huella de carbono de una actividad es el cantidad de este elemento que se despiden a la atmósfera, considerando tanto el fijado durante el proceso como el que se libera

microalgas y redes metabólicas, definiendo los solucionadores clásicos mono-objetivos y finalizando con las metaheurísticas multiobjetivos.

El capítulo 4 muestra la metodología utilizada para el análisis de redes metabólicas basados en los algoritmos metaheurísticos NSGAI Y MOEAD.

El capítulo 5 presenta los algoritmos propuestos, se presentan los modelos de optimización multiobjetivo con sus cuatro variantes, los casos de estudio y el diseño experimental.

El capítulo 6 presenta los resultados de los experimentos, el análisis estadístico y una discusión.

El capítulo 7 presenta las conclusiones de este trabajo, finalizando con sugerencias para trabajos futuros.

---

## Antecedentes

Este capítulo presenta el análisis de los trabajos relacionados con el estudio de las redes metabólicas en microalgas verdes. El capítulo se organiza en tres secciones, centrandó la primera en los antecedentes relacionados a estudios del metabolismo de una forma general a través de las redes metabólicas, tomando en cuenta la influencia de las condiciones de cultivo para la obtención de los metabolitos de interés. En la segunda sección, se presenta el análisis de los trabajos realizados con diferentes herramientas de software empleadas comúnmente como soporte en los modelos de optimización mono-objetivo. Finalmente, en la tercera sección se aborda el análisis de diversos trabajos en donde se utiliza la optimización multi-objetivo para el estudio del metabolismo en bacterias y cianobacterias.

## 2.1. ESTUDIOS DEL METABOLISMO DE LAS MICROALGAS EN GENERAL.

La ingeniería metabólica tiene como objetivo generar procesos de fermentación más eficientes, en los que las células sean capaces de secretar el producto de interés en altas concentraciones y produzcan la mínima cantidad de subproductos [24]. Dicho en otras palabras, la comprensión más profunda del metabolismo celular permitirá explotar el potencial de los procesos fotosintéticos en microalgas para la fijación de CO<sub>2</sub> y su transformación a metabolitos como lípidos o carbohidratos, entre otros compuestos de interés.

Nanette R. Boyle, y John A. Morgan (2009) [30] construyeron la red metabólica de la microalga *C. reinhardtii*, apoyándose en el análisis de balance de flujos (FBA) para predecir los flujos metabólicos en los tres modos de crecimiento autótrofo, heterótrofo y mixotrófico. En este trabajo, se propuso el primer modelo que incluyó tres compartimientos metabólicos activos, considerando 484 reacciones bioquímicas y 458 metabolitos intracelulares. Como resultado, fue posible incluir una nueva enzima en la base de datos (fructosa-1,6-bisfosfatasa). Para la solución del modelo se formuló un programa lineal en el Entorno GAMS (Sistema de Modelado Algebraico General)<sup>1</sup>.

Nanette R. Boyle, y John A. Morgan (2017) [24] profundizaron sus estudios, llevando a cabo el análisis de flujos metabólicos con marcaje de carbono (<sup>13</sup>C). Determinaron las redes metabólicas del metabolismo primario en condiciones heterotróficas, empleando el ión acetato como única fuente de carbono. La solución del modelo metabólico se realizó en Matlab R2009b (MathWorks®, Natick, MA, EE. UU.), utilizando un algoritmo (solver *fmincon*) para la optimización de funciones no lineales restringidas. Encontraron que los primeros pasos de la asimilación del acetato se distribuyen entre los tres compartimientos intracelulares. En particular, la enzima citrato sintasa no mitocondrial (modelada en el citoplasma) juega un papel importante en la asimilación del acetato en función de los residuos cuando se incluye en la topología de la red. El acetato restante se asimiló directamente en ácidos grasos

---

<sup>1</sup>Ver <https://www.gams.com/>

en el plastidio y está determinado principalmente por la demanda de lípidos en la composición de biomasa [24].

Los estudios de la microalga *C. reinhardtii* en la producción de biocombustibles, han continuado por diversos autores, destacando el desarrollado por Nino (2016) [31], en el que se llevaron a cabo ensayos cinéticos, variando intensidad de la luz y concentración de nitrógeno, con medio de cultivo con acetato como fuente de carbono. Gracias a lo anterior, fue posible analizar los flujos de carbono y establecer una red metabólica para esta microalga. Además, el medio de cultivo favoreció a la acumulación de lípidos, ya que se dio un crecimiento mixotrófico.

El trabajo de Kato et al. [5] estudiaron la producción de lípidos en la microalga *Chlamydomonas sp.* en la cual se observó la influencia del ciclo luz/oscuridad y la concentración de nitrógeno sobre la acumulación de lípidos; así también, gracias al análisis de la red metabólica desarrollada, se estimó que la tasa de fijación de carbono fue mayor durante el ciclo luz/oscuridad, debido a la acumulación de metabolitos como la ribulosa 5 fosfato [5].

En el trabajo de Flassig et al. [32] se desarrolló un modelo dinámico del balance de flujos de la acumulación del  $\beta$ -caroteno en la microalga *Dunaliella salina*, variando las condiciones de entrada de nitrógeno e intensidad luminosa. El modelo fue validado usando un conjunto de datos experimentales independientes. El proceso de optimización se basó un cultivo alimentado por lotes con respecto a la alimentación de nitrógeno e intensidad luminosa, con el propósito de duplicar la producción de  $\beta$ -caroteno en el cultivo. El modelo proporcionó información cuantitativa de las concentraciones iniciales de metabolitos externos en las que se lleva el aumento del  $\beta$ -caroteno. La solución se realizó mediante DFBAlab (El laboratorio de Análisis Dinámico de Balance de Flujo) en MatLab® [32]<sup>2</sup>.

La microalga *Chlorella protothecoides* ha sido estudiada por Xiong et al. [33] mediante un análisis de distribución de flujos metabólicos con patrones de marcaje con <sup>13</sup>C. Las condiciones de cultivo fueron heterotróficas, con limitación de nitrógeno para obtener mayor cantidad de lípidos. Como resultado, se

---

<sup>2</sup>Ver la liga <https://yoric.mit.edu/dfbalab#gsc.tab=0>

construyó una red metabólica que consiste en las rutas de la glucólisis, las pentosas fosfato y el ciclo del ácido tricarboxílico. Confirmando el aumento de lípidos como consecuencia de la limitación de nitrógeno, pero dicho proceso requiere en exceso la presencia NADPH [33].

En el trabajo de Ramirez et al. [34] se desarrolló un modelo base y un mapa de flujos metabólicos para el cultivo autotrófico de la microalga *Chlorella vulgaris* y con utilizando un análisis de INST-MFA (Análisis de flujos metabólicos isotópicamente no estacionarios) con muestras de biomasa marcadas con <sup>13</sup>C. El modelo base consta de 31 reacciones contemplando los nodos G6P, F6P, PEP, PYR, AKG, SUC, FUM, MAL, SER y GLU, involucrando el ciclo de Calvin-Benson, glucólisis, ciclo de Krebs y la vía de las pentosas fosfato. Además, se comprobó la inactividad de la enzima fosfofructoquinosa. Los datos obtenidos en la experimentación provenientes de la GC-MS (Cromatografía de gases-Espectrometría de masas), se analizaron con dos herramientas de software dentro del ambiente computacional de MatLab@llamados Open Mebius<sup>3</sup> e INST-MFA: INCA, pero el modelo no se logró ajustar a las condiciones experimentales [34].

En la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, Li et al. [35] bloquearon la vía de competencia para producir almidón, con lo que descubrieron que existe un aumento en el contenido de lípidos entre los mutantes en condiciones de gran escasez de luz y nitrógeno. Este estudio demostró que la biomasa y la producción de lípidos de los mutantes seleccionados pueden mejorarse mediante manipulación fisiológica. Para este estudio se utilizaron cepas con mutaciones genéticas. Los medios de cultivo incluyeron tris-acetato fosfato (TAP) y Sueoka, con un medio empobrecido de nitrógeno; las microalgas primero crecieron bajo condiciones de iluminación baja durante 3 días y luego se sometieron a una alta iluminación por 6 días [35]. Además, se realizó una síntesis en dos etapas para la obtención de benceno, a partir del ácido graso insaturado eicosapentaenoico, un componente del aceite de microalga. Con la reacción de metátesis de olefina se obtuvo, 1,4-ciclohexadieno, y dos subproductos principales, el ácido 5-octacenoico y el ácido 5-decendioico, y mediante la etapa de deshidrogenación bajo presión de hidrógeno dio como resultado la formación de benceno, y los subproductos ácido sebácico y ácido octanoico, ambos productos deseables [35].

---

<sup>3</sup>Ver <https://www.mebius.illinois.edu/>

En el trabajo de Satthong et al. [36], la microalga *C. vulgaris* se cultivó en medio TAP con fotoperíodos luz/oscuridad 12:12 a 28C. Se utilizaron tres fuentes de luminosidad diferentes luz roja, LED y fluorescente, con una intensidad luminosa de 4000 lux y con flujo de aire. El modelo matemático se usa para evitar la fluctuación de factores experimentales, la ecuación clave utilizada fue:

$$\frac{dN}{dt} = r\left(1 - \frac{N}{K}\right)K \quad (2.1.1)$$

Donde  $N$  es la población de microalgas en función del tiempo,  $K$  es la capacidad máxima de población permitida en estado estacionario y  $r$  es la tasa de crecimiento de la población en ausencia de competencia intraespecífica. El crecimiento de la microalga variando los diferentes tipos de luz no tuvo una diferencia significativa [36].

En el trabajo de BA Pessi et al., 2023 [37], se aprovecharon el tratamiento de aguas residuales y la producción de biocombustibles en microalgas. En este trabajo, se cultivaron la microalga *Chlorella sp.* sobre residuos de fermentación, una mezcla de acetato, butirato y otros ácidos en condiciones de autotrofia, mixotrofia y heterotrofia. Para estudiar el comportamiento, construyeron un modelo utilizando el marco DRUM (Dynamic Reduction of Unbalanced Metabolism), el cual incluye 188 reacciones y 173 metabolitos. Después de una fase de calibración, probaron con éxito el modelo con 122 experimentos provenientes de la literatura científica.

El modelado metabólico de las microalgas hasta el momento se ha realizado maximizando una única función objetivo que generalmente es la maximización de la biomasa, en este trabajo de tesis se propone un modelo metabólico multi-objetivo que nos permita optimizar simultáneamente metabolitos de interés industrial, con el fin de que el estudio sea más cercano al comportamiento natural de la célula.

## 2.2. TRABAJOS REALIZADOS CON DIFERENTES SOFTWARE

Chirino et al. [38] realizaron una plataforma computacional llamada Hydra (Hybrid Draw and Routes Analysis) para el modelado metabólico de microorganismos, basando sus pruebas en observaciones del metabolismo de la cianobacteria *Synechosystis sp.* PCC6803. Hydra íntegra un conjunto de herramientas para el análisis diseño y representación de las redes metabólicas. Además, Piazzzi et al. [39] desarrollaron un modelo matemático para predecir el crecimiento de la microalga *Spirulina sp.* basado en la ecuación modificada Verhulst. Se agregaron dos parámetros en la ecuación, afinidad de las microalgas a la iluminación y afinidad de las microalgas al campo magnético [39].

Baroukh y Bernard [40] desarrollaron el modelo metabólico de la microalga *Chlorella sorokiniana* en crecimiento heterotrófico, cultivada en acetato y butirato como fuente de carbono. En su trabajo se incluyeron 163 reacciones metabólicas con la suposición del estado en casi equilibrio, resultando un modelo que se ajusta a los datos experimentales, prediciendo correctamente los rendimientos de biomasa ajustando algunos sustratos. Para la simulación del modelo utilizaron el algoritmo de Nelder-Mead. Este se basa en un método numérico para minimizar una función objetiva, buscando una solución aproximada óptima a un problema de muchas variables.

Mekanik et al. [41] construyeron un modelo metabólico a escala del genoma de la microalga *Auxenochlorella protothecoides*, tomando como base datos experimentales para el crecimiento y evaluaron la distribución de flujo, mediante simulaciones en MatLab® utilizando COBRA Toolbox. En este trabajo se establecieron dos funciones objetivo, la maximización de la biomasa y la tasa de producción de hidrógeno. El modelo predecir los cambios necesarios para la producción de hidrógeno, además de que con las estrategias propuestas se lograron producir simultáneamente hidrógeno y biomasa bajo anaerobiosis.

En el trabajo de Salgero et al. [42] para estudiar el metabolismo de la microalga *C. reinhardtii* se

construyó un nuevo modelo a partir del modelo iCre1355<sup>4</sup>. Se modificaron diferentes niveles de CO<sub>2</sub>, comparando datos del transcriptoma y metaboloma, en estado dinámico. A comparación del modelo anterior, que tenía 2394 reacciones y 1845 metabolitos distribuidos en diez compartimientos, a saber: espacio extracelular, citosol, cloroplasto, mitocondria, núcleo, mancha ocular, flagelo, glioxisoma, lumen tilacoidal y aparato de Golgi; el nuevo modelo consistió de 3726 reacciones y 2436 metabolitos, y para su solución se apoyaron en métodos *in silico*.

Así también, Salgero et al. [42] encontraron que cloroplasto es de importancia debido a que en él ocurren el 25 % de las reacciones. Igualmente, se construyeron dos modelos cinéticos, heterotrófico y mixotrófico, asociados con el consumo de sustrato a diferentes condiciones de crecimiento (únicamente ácido acético como fuente de carbono para heterotrofia y 10 % CO<sub>2</sub> y ácido acético como fuente de carbono para mixotrofia). Se concluyó que al aumentar la cantidad de CO<sub>2</sub> en el cultivo existe un incremento en la capacidad de producción de biomasa. Además, que la producción de ATP es un factor limitante para el crecimiento en las condiciones anteriores. La simulación de la red metabólica se realizó utilizando GAMS (General Algebraic Model System) [42].

Ryu et al. [43] propusieron un modelo matemático describiendo en condiciones heterotróficas los comportamientos en el interior de las microalgas en general; se consideraron al carbono, nitrógeno, fósforo y azufre como sustratos elementales. El modelo describe el consumo de los cuatro nutrientes y síntesis de los componentes celulares esenciales, incluidos aminoácidos, nucleótidos, lípidos, monosacáridos, polisacáridos, proteínas y pigmentos. El modelo toma en cuenta dos estados, la tasa de crecimiento y otro donde las microalgas acumulan energía bajo condiciones de estrés. Ellos mencionan que el modelo general puede servir como base para cualquier tipo de célula y adaptarse a diferentes tipos de parámetros, evitando la necesidad de desarrollar un modelo desde cero para cada nuevo tipo de aplicación.

En el trabajo de Fachet et al. [44], se estudió el metabolismo central de carbono de aquellas reacciones que se llevan a cabo en el núcleo de la célula de microalga *Dunalliella salina*, para obtener una mayor

---

<sup>4</sup>Ver en [https://github.com/baliga-lab/Chlamy\\_model\\_iCre1355](https://github.com/baliga-lab/Chlamy_model_iCre1355)

producción de  $\beta$ -caroteno durante condiciones de estrés abiótico. Reconstruyendo la red metabólica del núcleo para *D. salina*, CCAP 19/18, se obtuvo un modelo que consta de 221 reacciones y 212 metabolitos dentro de 3 compartimientos: citoplasma, cloroplasto y mitocondria. El análisis de balance de flujos para diferentes tasas de absorción de luz y nutrientes, se realizó en MatLab® Toolbox y CellNetAnalyzer.

En diversos casos de estudio se utiliza MatLab®, para el análisis de flujos metabólicos. Pero existen otras herramientas como Python, que es un software completamente gratuito a comparación de MatLab®. Además el lenguaje de programación de Python es compacto y legible, lo cual hace algunas tareas más accesibles y fáciles de llevar a cabo como la generación de gráficos de una alta calidad y manejar una gran cantidad de datos. Por añadidura, en Python se pueden emplear diferentes algoritmos para la solución de problemas, ya sea mono-objetivo o multi-objetivo.

### **2.3. ESTUDIOS REALIZADOS CON OPTIMIZACIÓN MULTI-OBJETIVO**

Una tendencia reciente que funciona en el análisis metabólico consiste en optimizar varios objetivos para participar en el estudio de más de un bioproducto de interés [45–47]. La optimización multi-objetivo se ha explotado en una amplia variedad de campos de la ciencia y la ingeniería. En medicina, Zhang et al. [48] propusieron un MOFBA no lineal para explicar el impacto de las células objetivo en el efecto Warburg en diferentes tipos de células. Los trabajos de [45, 48, 49] simulan modelos metabólicos a escala del genoma para ecosistemas microbianos como un intercambio de una sola cepa, utilizando análisis de equilibrio de flujo multi-objetivo y análisis de variabilidad de flujo (MO-FVA). En particular, Zomorodi y Marana [49] emplean la optimización multinivel para crear “OptCom”, una herramienta que ayuda en la optimización de varios bioproductos. La base del marco es la optimización multinivel; optimiza problemas integrados unos a otros en una estructura jerárquica en aras de alcanzar valores óptimos para el bioproducto final elegido. Budinich et al. [45] amplía el FBA para las

comunidades microbianas mediante la definición de una FBA multiobjetivo (MOFBA) para estudiar múltiples compensaciones entre nutrientes y tasas de crecimiento. Más recientemente, [46, 47] propone una formulación multiobjetivo de FBA que considera las limitaciones de nutrientes para el análisis metabólico.

En la última década, la optimización de varios bioproductos se remonta al trabajo de Zomorodi y Marras [50]. Allí se desarrolla el marco computacional *OptCom* para FBA de comunidades microbianas.

## 2.4. ANÁLISIS DE TRABAJOS RELACIONADOS

La tabla 2.1 se mencionan los trabajos más significativos indicando las diferencias que existen en los Métodos utilizados para el estudio de las redes metabólicas. Como se puede observar, hasta el momento no se ha desarrollado una optimización multi-objetivo en ningún tipo de cepa de microalga. El análisis de las redes metabólicas en microalgas, se realiza principalmente con FBA maximizando una única función objetivo y utilizando datos experimentales. Además se han utilizado de forma experimental, análisis de flujos metabólicos con patrones de etiquetado isotópico *in vivo* de metabolitos y modelos matemáticos para cuantificar los flujos.

Los estudios enfocados en la optimización multi-objetivo fueron desarrollados en bacterias y comunidades microbianas, pero no se ha desarrollado algún método metaheurístico en microalgas. Los métodos metaheurísticos tienen la ventaja de consumir menos recursos computacionales, a comparación de los métodos exactos. Como se había mencionado anteriormente la optimización multi-objetivo, nos presenta un conjunto de resultados diferentes que nos puede ayudar a observar las diferentes rutas que se pueden seguir para lograr la obtención de metabolitos de interés.

**Tabla 2.1:** Análisis de Trabajos Relacionados.

<b>Trabajos Relacionados</b>			
<b>Autor</b>	<b>Especie estudiada</b>	<b>Multi-objetivo</b>	<b>Método</b>
A.R. Zomorodi et al., (2012)	Comunidades microbianas	✓	Optcom (Optimización multinivel-multi-objetivo)
Budinich, et al., (2017)	Ecosistemas microbianos	✓	(MO-FBA) y (MO-FVA)
Ricardo Andrade, et al., (2020)	Saccharomyces cerevisiae	✓	MOMO (basada en Optimización de enteros mixtos multi-objetivo)
Nanette R Boyle, y John A Morgan (2017)	<i>C.reinhardtii</i>		<sup>13</sup> C Análisis de Flujos Metabólicos ( <sup>13</sup> C-MFA)
Nanette R Boyle, y John A Morgan (2009)	<i>C.reinhardtii</i>		FBA
Bruno Assis Pessi et al.,(2023)	<i>Chlorella sp.</i>		DRUM (Reducción dinámica del metabolismo desequilibrado)
Mahsa Mekanik et al., (2019)	<i>Auxenochlorella protothecoides</i>		FBA y despues LAMOS (Algoritmo lineal para encontrar múltiples soluciones óptimas)
C. Zuñiga et al., (2016)	<i>C. vulgaris</i> UTEX 395		FBA

---

## Marco Teórico

### 3.1. MICROALGAS

Las microalgas son organismos unicelulares eucariotas, fotosintéticos, pueden ser autótrofos, heterótrofos o mixotróficos, y pueden crecer en agua dulce o agua salada. Crecen más rápido que otras fuentes de biomasa, además de que no utilizan tierras fértiles que podrían ser utilizados para la agricultura. Tienen la capacidad de capturar el CO<sub>2</sub> de la atmósfera y convertirlo en el oxígeno que utilizamos para respirar [51]. Contienen diferentes organelos, mitocondria, núcleo, retículo endoplásmico, glioxisoma, cloroplasto, aparato de Golgi, vacuola, tilacoide, mancha ocular o estigma (orgánulo fotorreceptor permite a las células buscar la cantidad de luz óptima para la fotosíntesis) [52].

Las microalgas han sido fuentes de estudio desde hace tiempo por las diversas aplicaciones, debido a los diferentes metabolitos que contienen en su interior; una de ellas es en la alimentación que se ha

utilizado durante miles de años. Esto se debe a que algunas cepas de microalgas tienen la capacidad de almacenar un gran porcentaje de proteínas en el interior de la célula [6].

Los parámetros fisicoquímicos que influyen en la producción de microalgas son diversos, tales como el tipo y concentración de nutrientes, la temperatura, el pH y la intensidad lumínica [53].

La luz necesaria para que las microalgas puedan realizar el proceso de fotosíntesis puede ser natural o artificial. Sin embargo, las intensidades de luz muy elevadas con frecuencia son inhibitorias para el crecimiento microalgal, produciendo fotoinhibición o fotoinactivación esta puede definirse como el descenso de la capacidad fotosintética a elevadas intensidades de luz [54].

Los nutrientes esenciales, como el carbono y nitrógeno, repercuten en el crecimiento de la microalga y en la concentración de metabolitos obtenidos. Por ejemplo, el carbono puede ser suministrado al cultivo normalmente como CO<sub>2</sub> atmosférico, como carbonato o bicarbonato, y forman parte fundamental para que la fotosíntesis pueda llevarse a cabo. Durante el proceso de fotosíntesis, el consumo de CO<sub>2</sub>, conduce a una regulación gradual del pH. En presencia de altas concentraciones de CO<sub>2</sub> disuelto, el pH disminuye, lo que produce un menor consumo de CO<sub>2</sub>. Debido a la reducción de la enzima RuBISCO, responsable de la fijación de CO<sub>2</sub>, el CO<sub>2</sub> se absorbe y se transforma en material orgánico [55], completando el proceso fotosintético.

El contenido de nitrógeno de las microalgas es de alrededor del 7% de materia seca de las algas; el nitrógeno puede ser suministrado de forma orgánica (urea) o inorgánica (nitrato, amoníaco). Es absorbido y entra en la composición de proteínas y nucleótidos. Un aumento en la concentración de nitrógeno, hasta un cierto valor límite, favorece la producción de lípidos, proteínas y clorofila, mientras que la deficiencia del nitrógeno provoca un aumento significativo en la producción de lípidos [12]. El principio es que cuando existe una ausencia de nitrógeno, el exceso de carbono de la fotosíntesis, se canaliza en rutas metabólicas que conducen a la producción de triglicéridos y almidón [56].

El contenido de fósforo en las microalgas es bajo, no es un componente principal de los carbohidratos, ácidos grasos, o aminoácidos. Sin embargo, tiene un papel indispensable en el metabolismo de la célula, el fósforo absorbido es asimilado para sintetizar ATP a través de la fotofosforilación a nivel sustrato y fosforilación a nivel oxidativo. El fósforo asimilado participa en la formación de productos intermedios a través del ciclo Calvin, como ATP, ADP, ácidos nucleicos y fosfolípidos [57].

Las temperaturas óptimas para el crecimiento de la microalga varían entre cada cepa, pero generalmente se encuentran en el rango de 16 y 27°C, y por encima de 35°C no es posible el crecimiento [19].

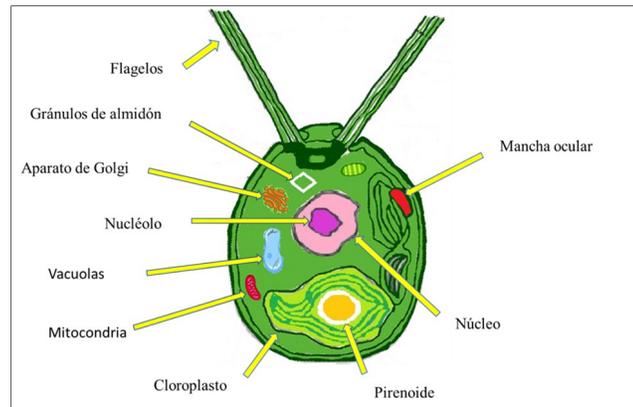
Todos los factores antes mencionados afectan el metabolismo de la microalga, y contribuyen a que se obtenga mayor concentración del metabolito de interés. Dentro de las microalgas más estudiadas está la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* y *Dunaliella salina*.

### 3.1.1. *Chlamydomonas reinhardtii*

*Chlamydomonas reinhardtii* ha sido utilizada como modelo base para el estudio del metabolismo de las microalgas, fue la primera microalga en la que se obtuvo la secuencia de su genoma, y la primer microalga en la que se obtuvo un modelo metabólico a nivel genómico [58].

En la Figura 3.1 se puede observar la estructura de la microalga *C. reinhardtii*. En la célula de la microalga *c. reinhardtii* se encuentran los flagelos que actúan en sintonía con la mancha ocular o estigma, ya que el estigma realiza la fototaxis, detectan la dirección de la luz, haciendo que los flagelos naden hacia la luz detectada por esta.

La pared celular dependiendo de la cepa de microalga, puede variar su composición bioquímica, por ejemplo, puede contener de celulosa, hemicelulosa, compuestos pécticos y glicoproteínas [59]. Mantener el equilibrio osmótico es de las principales funciones que tiene la pared celular. El núcleo



**Figura 3.1:** Estructura de la célula de microalga *C. reinhardtii* [2].

se encuentra presente en las células eucariotas, y este contiene la mayoría de la información genética organizada como cromosomas [2]. Las vacuolas ayudan a controlar la turgencia y está asociada con el mantenimiento de la presión osmótica en la célula [59]

La microalga *C. reinhardtii* se ha estudiado en la producción de lípidos para ser utilizada como bio-combustible, aunque aún no se ha podido lograr obtener el nivel de lípidos para escalarse a nivel industrial [60]. Varios estudios han intentado mejorar la producción de compuestos de valor agregado como pigmentos, lípidos, carbohidratos, etc. Además, esta microalga presenta un interés biotecnológico debido a que ya existen informes de la producción de proteínas terapéuticas humanas como la eritropoyetina, interferon  $\beta$  proinsulina e inmunoglobulina A, presentes en el cloroplasto de *C. reinhardtii* [61].

### 3.1.2. *Dunaliella salina*

*Dunaliella salina* es una microalga verde, esta especie presenta en su composición un porcentaje considerable de pigmentos como clorofila, así como un amplio rango de carotenoides y xantofilas, incluyendo  $\beta$ - caroteno y luteína, los cuales por su actividad pro vitamínica tienen aplicación tanto en la industria alimentaria como en la farmacéutica [62].

### 3.1.3. *Chlorella vulgaris*

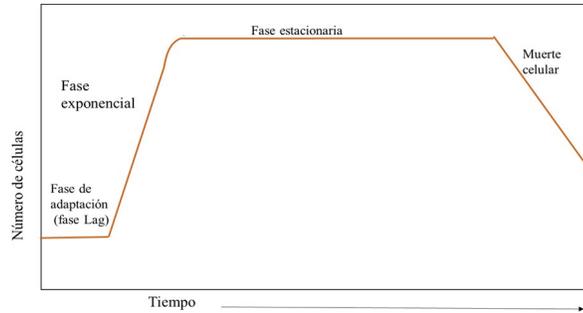
*Chlorella vulgaris* es una microalga verde con una gran capacidad de almacenar lípidos en su estructura celular. Además, se pueden obtener proteínas, carbohidratos, pigmentos, minerales y vitaminas. La clorofila se encuentra en mayor proporción, dentro de los pigmentos, oscilando entre 1 y 2% de su peso seco, además puede producir, carotenos, astaxantina, y luteína [63].

Una de las aplicaciones de la microalga *Chlorella vulgaris*, es usarla como biocombustibles, ya que, como se ha mencionado anteriormente, tiene una gran capacidad de almacenar lípidos. Además, se utiliza como suplemento alimenticio, debido a su alto contenido de proteínas, lípidos y vitaminas, actualmente esta microalga se utiliza a nivel industrial como bio-fertilizantes y en el área de la cosmetología [64].

## 3.2. TIPOS DE CULTIVO DE MICROALGAS

Las microalgas pueden crecer de forma autotrófica, heterotrófica y mixotrófica. En cultivos heterotróficos las microalgas usan carbón orgánico como su principal fuente de recurso energético. En sistemas autotróficos las microalgas usan la luz como fuente de energía y el CO<sub>2</sub> disuelto como fuente de carbono inorgánico, para generar energía química a través de la fotosíntesis [65].

El cultivo mixotrófico se realiza en primer lugar de forma autotrófica, seguido por un cultivo de forma heterotrófica, implica la absorción de fuentes de nutrientes orgánicos e inorgánicos en presencia de luz, bajo condiciones de respiración aeróbica y fotosíntesis, el cultivo mixotrófico tiene muchas ventajas, incluido el efecto foto inhibitor de capacidad fotosintética, pérdida nocturna de la biomasa, y daños foto oxidativos durante el periodo de cultivo [66], este tipo de cultivo ha reportado productividades más altas en lípidos y pigmentos como la luteína, que un cultivo autotrófico [67].



**Figura 3.2:** Curva típica de crecimiento de los microorganismos en un sistema batch.

Existen 3 formas de cultivar microalgas dependiendo del tipo de reactor a utilizar.

### 3.2.1. Cultivos discontinuos Batch

Funcionan en un régimen en estado no estacionario, ya que las composiciones varían con el tiempo, no existe entrada ni salida de flujos. En este tipo de reactor el tanque está inicialmente lleno con una gran cantidad de sustrato y una pequeña cantidad de biomasa (inoculo). Durante el proceso no se incorpora sustrato y este se detiene cuando ha sido consumido casi en su totalidad, al final se extraen la biomasa y los productos [44]. En este tipo de reactor las microalgas presentan las 4 fases de crecimiento. En la Figura 3.2 se presenta una curva de crecimiento donde se presentan las 4 fases de crecimiento, latencia, fase exponencial, fase estacionaria y muerte.

### 3.2.2. Cultivo semi-continuo

En este tipo de cultivo, parte del volumen se recoge para su utilización, generalmente al final de la fase exponencial, y la cantidad que se retira se reemplaza con medio de cultivo fresco. Se pueden

mantener sistemas cerrados para la producción de microalgas durante varias semanas utilizando métodos semicontinuos, en los que las condiciones de cultivo pueden ser cuidadosamente controladas. En sistemas con energía lumínica eficiente se puede recoger 3 veces por semana hasta el 90% del volumen de cultivo a altas concentraciones celulares [68].

### 3.2.3. Quimiostato

Este tipo de cultivo, las microalgas se mantienen en la fase exponencial de crecimiento “steady-state”, durante grandes periodos de tiempo, tiene la ventaja que las muestras tomadas a distintos tiempos son similares, para lograr esto se añade continuamente nutrientes en la misma medida que son gastados en el medio, para mantener los parámetros de crecimiento celular constantes [69]. En estos sistemas el factor que controla el crecimiento es la tasa a la que se añade el medio fresco. El cociente entre la tasa de flujo y el volumen de cultivo se denomina tasa de dilución  $D(\frac{f}{V})$ . Esta tasa es el volumen de medio que pasa por un recipiente de cultivo en un tiempo; su recíproco ( $\frac{1}{D}$ ) es el tiempo medio de residencia de una célula en el sistema [68].

## 3.3. BIORREFINERÍA

Las biorrefinerías son instalaciones donde se transforma la biomasa como las microalgas, en diferentes productos como combustibles, energía y productos químicos de valor agregado, con un mínimo de desechos y emisiones. En una biorrefinería se utilizan operaciones similares a las utilizadas en las refinerías del petróleo, como la destilación, la conversión química y separación de productos. Además, una biorrefinería aplica procesos sostenibles [70].

Las biorrefinerías son prometedoras para reducir los efectos de los gases de efecto invernadero GEI, ya que se obtienen energías limpias. A comparación de la energía obtenida en las biorrefinerías, la energía

**Tabla 3.1:** Composición de las microalgas. Datos en base seca [67]

Parametro	Unidad	Media	Rango
Análisis aproximado			
Materia Volátil	%p/p	52.4	37.2-61.7
Ceniza	%p/p	26.6	13.1-42.8
Carbono fijo	%p/p	21.0	9.0-29.2
Análisis final			
C	%p/p	45.1	38.6-54.4
H	%p/p	40.4	26.3-53.1
O	%p/p	7.3	4.6-12.7
N	%p/p	5.6	1.1-12.4
S	%p/p	1.6	0.47-3.3
Orgánicos			
Proteínas	%p/p	42.8	6.0-71.0
Carbohidratos	%p/p	29.9	4-83.6
Lípidos	%p/p	23.4	0.9-77.0
Ácidos nucleicos	%p/p	3.9	1.0-6.0
Orgánicos estructurales			
Hemicelulosa	%p/p	78.5	57.7-100
Celulosa	%p/p	14.1	0.0-28.9
Lignina	%p/p	7.4	0.0-30.8
Contenido Energético			
Mayor valor de calentamiento	MJ-Kg <sup>-1</sup>	17.4	7.9-24.0

obtenida del petróleo, ha contribuido a la contaminación ambiental y el calentamiento global.

Las microalgas se presentan como potenciales candidatos en procesos de biorrefinería, debido a que de ellas se obtienen múltiples productos [71].

Ejemplos de ellos son; biocombustibles que se pueden obtener como el bioetanol, biodiésel, biogás o biohidrógeno. También se pueden obtener productos no energéticos como pigmentos, vitaminas, proteínas, fertilizantes, etc. Además, se puede utilizar el CO<sub>2</sub> proveniente de alguna otra actividad industrial o se puede reutilizar el CO<sub>2</sub> generado en el proceso. La Tabla 3.2 muestra una composición general de las microalgas en base seca.

### 3.4. ENZIMAS

En el metabolismo ocurren una gran cantidad de reacciones bioquímicas, como en las reacciones químicas existen catalizadores, en el área biológica las enzimas son los catalizadores de estas reacciones

Las enzimas tienen una enorme variedad de funciones dentro de la célula: degradan azúcares, sintetizan grasas y aminoácidos, copian fielmente la información genética, participan en el reconocimiento y transmisión de señales del exterior y se encargan de degradar subproductos tóxicos para la célula, entre muchas otras funciones vitales. La identidad y el estado fisiológico de un ser vivo está determinado por la colección de enzimas que estén funcionando con precisión dentro de las células. Así, a lo largo de millones de años de evolución, la naturaleza ha desarrollado una gran diversidad de enzimas para mantener el complejo fenómeno de la vida [72].

Las microalgas consisten en un grupo muy diverso con un importante potencial genético inexplorado; el número de especies conocidas representa solo el 1% de lo que se cree que existe, por otra parte, los informes sobre genómica de microalgas están encontrando una variedad de genes novedosos y una gran diversidad genética funcional que puede ser investigada para uso biotecnológico [73]. Pocos estudios han estimado la influencia de la composición del medio en producción de enzimas por las microalgas. Los cultivos que alteran la fuente de nitrógeno en el medio pueden aumentar la actividad de enzimas específicas, estudios han reportado la capacidad de las microalgas para producir proteasas, lipasas, etc.

#### 3.4.1. Lipasas

Son enzimas que naturalmente hidrolizan los triglicéridos en ácidos grasos y glicerol. La eliminación selectiva del catabolismo lipídico, y específicamente lipasas, que catalizan la liberación de los ácidos grasos libres (FA) de los lípidos, pueden aumentar la acumulación de lípidos. Las microalgas acumulan triglicéridos cuando son privadas de nitrógeno, esta condición causa cambios en la transcripción de

todo el genoma. Entre los genes regulados por la privación de nitrógeno se encuentran numerosos genes que codifican lipasas, los genes reprimidos durante la acumulación de TAG podrían codificar las lipasas que hidrolizan TAG, DAG (diacilglicerol) o MAG (monoacilglicerol). Además de las aplicaciones en los biocombustibles las lipasas son útiles en detergentes, alimentación, saborizantes farmacéuticos, química, agroquímica, y en la industria cosmética [74].

### **3.5. INGENIERÍA METABÓLICA**

La ingeniería metabólica ha sido definida como la introducción de modificaciones específicas en las rutas metabólicas con el propósito de mejorar las propiedades celulares, utilizando diferentes técnicas experimentales y analíticas para determinar los flujos a través de rutas metabólicas críticas en la célula o tejido de interés. De esta forma, efectuando diversas alteraciones del sistema, se pueden determinar las interrelaciones entre distintos procesos metabólicos; por ejemplo, entre crecimiento celular y formación de un producto, y el control ejercido por enzimas específicas o grupos de enzimas sobre el flujo hacia determinadas rutas. Varios sistemas de modelado se han desarrollado, como el análisis de flujos metabólicos (MFA), y Modelos a escala genómica (GSMs), para mejorar el metabolismo de los microorganismos para aplicaciones industriales [52]. En términos generales, todas las especies de microalgas presentan los mismos ciclos metabólicos, pero a un nivel intrínseco cada especie presenta características propias con respecto de los flujos metabólicos e incluso reaccionan diferente a estímulos externos [34].

### **3.6. INGENIERÍA GENÉTICA**

Modifica las características hereditarias de un organismo en un sentido predeterminado mediante la alteración de su material genético. Suele utilizarse para conseguir que determinados microorganismos,

como bacterias, virus o microalgas, aumenten la síntesis de compuestos, formen compuestos nuevos, o se adapten a medios diferentes. Tiene numerosas aplicaciones en diferentes campos, desde la medicina, hasta la industria, se pueden obtener proteínas de interés médico y económico, antibióticos, enzimas, hormonas como la insulina y eritropoyetina, además de vacunas, se pueden mejorar genéticamente los vegetales y animales para obtener una mayor producción y mejor calidad nutricional [75].

### 3.7. ANÁLISIS DE FLUJOS METABÓLICOS

La metodología para la determinación de los flujos de la vía metabólica es el análisis de flujos metabólicos (MFA) por el cual los flujos intracelulares son calculados usando un modelo estequiométrico para las reacciones intracelulares y aplicando balances de masa alrededor de metabolitos intracelulares, un conjunto de flujos extracelulares medidos como entrada para el cálculo capta típicamente las tasas de sustratos y las tasas de secreción de los metabolitos. El resultado final del cálculo del flujo es un mapa de flujo metabólico que muestra un diagrama de las reacciones bioquímicas incluidas en los cálculos junto con una estimación de la tasa de estado estacionario a la que ocurre cada reacción. El análisis de flujos metabólicos hace la suposición de que la masa se encuentra en estado estacionario, se pueden medir o definir suficientes números de flujos externos o internos para determinar el sistema de ecuaciones algebraicas.

El análisis de flujos metabólicos con etiquetado  $^{13}\text{C}$  se ha utilizado para estudiar fenotipos metabólicos de numerosos sistemas microbianos, vegetales y animales bajo condiciones experimentales bien controladas, validan el análisis de flujos metabólicos [76], la administración de un trazador de isótopos estables como la glucosa marcada con  $^{13}\text{C}$  a un sistema biológico permite el monitoreo de los patrones de isótopos que emergen en los metabolitos, estos procesos son análogos a la adición de un tinte de color, el etiquetado está determinado por su tiempo de residencia constante, finalmente se alcanzara un estado estacionario isotópico [77]. Los sustratos se seleccionan en función de los flujos que se quieren cuantificar, para cuantificar el etiquetado con  $^{13}\text{C}$  existen dos técnicas que se pueden utilizar, la

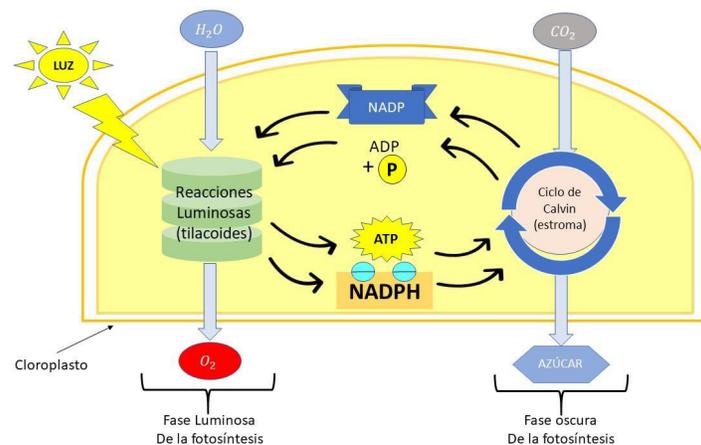
resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas. Los modelos metabólicos son clasificados en dos diferentes grupos: Modelos a escala genómica (GSM) y Modelos centrales (CM). Los análisis fueron clasificados en Análisis de balance de flujos (FBA) y Modelos elementales (EM), Análisis de flujos metabólicos (MFA), MFA usando  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{C}$  MFA).

### **3.8. MODELOS A ESCALA GENÓMICA**

Los modelos a escala genómica son representaciones matemáticas de toda la información genómica disponible y las reacciones bioquímicas que ocurren en un organismo. La construcción de una red metabólica se puede obtener utilizando una red metabólica de otro organismo como base, con características parecidas o realizando reacciones una por una, todos los modelos pueden ser expresados como un balance general de masa, que incluye cada metabolito siendo producido o consumido dentro de la red [34].

### **3.9. RUTAS METABÓLICAS PARA LA ASIMILACIÓN DEL CARBONO**

Los ciclos como el Calvin Benson, el ácido tricarboxílico (TCA), la vía de la pentosa fosfato y la fotosíntesis, son parte de las rutas del metabolismo de la microalga. Mediante la fotosíntesis se lleva a cabo el crecimiento celular y obtención de metabolitos de interés, es un proceso fisicoquímico por el cual las plantas, las algas y bacterias fotosintéticas utilizan la energía de la luz solar para sintetizar compuestos orgánicos. Las microalgas producen biomasa a partir del consumo de energía proveniente de la luz solar o alguna otra fuente alterna y usan el  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono donde este es absorbido y transformado en material orgánico en forma de glucosa mediante la enzima Rubisco [78]. Se realiza en dos etapas, la fase luminosa o fotoquímica que se lleva a cabo en la membrana tilacoidal



**Figura 3.3:** Esquema que representa la fotosíntesis incluyendo la fase luminosa y la fase oscura..

de los cloroplastos de la célula, que conduce a la formación de ATP (Adenosin trifosfato) y NADHP (adenina dinucleotido fosfato) y la fase oscura, fase de fijación de carbono o ciclo de Calvin que acontece en el estroma de los cloroplastos. El ATP y NADHP producidos por las reacciones luminosas son utilizados para fijar el  $CO_2$  y reducirlo para la síntesis de carbohidratos en el ciclo de Calvin [79].

### 3.9.1. Ciclo Calvin-Benson

**Etapas 1 Carboxilación;** Una molécula de  $CO_2$  se combina con la ribulosa 1,5 bifosfato (RUBP) produciendo, ácido 3-Fosfoglicerido (3 PGA), esta reacción es catalizada por la enzima RUBisco

**Etapas 2 Reducción:** El ATP y el NADHP (Nicotidamina adenina dinucleótido fosfato) se utilizan para convertir las moléculas de 3-PGA en moléculas de gliceraldehido-3-fosfato (GAP).

**Etapas 3 Regeneración:** Dos moléculas de (GAP) salen para emplearse en la síntesis de sacarosa en el citosol, que puede considerarse el producto de las reacciones independientes de la luz, las restantes se convierten en difosfato de ribulosa, que actúan como receptor de 6 moléculas de  $CO_2$ , la regeneración de las moléculas de difosfato de ribulosa requieren ATP [80].

Una vez formada la glucosa, participa en la glucólisis, se realiza en dos fases: la fase preparativa se lleva a cabo cuando la glucosa pasa a gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato por medio del gasto energético de dos moléculas de ATP; la fase de rendimiento energético ocurre cuando el gliceraldehído-3-fosfato se transforma en piruvato generando dos moléculas de ATP y dos de NADH + H<sup>+</sup>. El piruvato se debe transformar en Acetil-coA y dar inicio al ciclo de Krebs [25].

### 3.9.2. Ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) o Ciclo de Krebs

La entrada del carbón en el ciclo se produce a partir de la condensación del Acetil-coA con oxalacetato para formar citrato catalizada por la enzima citrato sintasa, posteriormente el citrato se convierte en su isómero isocitrato vía aconitasa, el isocitrato se oxida y se convierte en -cetoglutarato catalizada por la isocitrato deshidrogenasa durante este paso el NAD<sup>+</sup> se reduce a NADH, el -cetoglutarato es convertido a succinil-coA por el -cetoglutarato deshidrogenasa, en la próxima reacción el succinil-coA es hidrolizado a succinato, el succinato es deshidrogenado a fumarato, en esta reacción el FAD es reducido a FADH<sub>2</sub>. El FAD es integrado en el succinato deshidrogenasa, el fumarato es convertido a L-malato por la fumarasa y finalmente el ciclo se completa con la formación del oxalacetato del L-malato catalizado por la enzima malato deshidrogenasa [51].

## 3.10. TÉCNICAS COMPUTACIONALES

Han existido cambios significativos en la biología molecular, como consecuencia se han obtenido una gran cantidad de información acerca de la composición molecular de los organismos y su entorno, en la actualidad se encuentra datos genómicos, metabólicos, transcriptómicos y proteómicos [81], todos estos datos proporcionan información para el entendimiento del metabolismo de los organismos, y se puede desarrollar un modelo estequiométrico, incluyendo las reacciones bioquímicas que participan en el sistema, el análisis de flujos metabólicos se desarrolla *in silico*, con la ayuda de algoritmos y

software como el Python, MATLAB, COBRA, Hydra.

Existen numerosas herramientas de software que permiten trabajar con modelos metabólicos a escala del genoma, incluyendo reconstrucción de redes, análisis y simulaciones. Algunos funcionan como herramientas independientes que se pueden instalar en la computadora, otros son paquetes de biblioteca que pueden estar MATLAB o Python, otros pueden estar directamente de la web. Algunos ejemplos de las herramientas son las siguientes [82]:

- CellDesigner (<http://www.celldesigner.org>) es un editor de diagramas estructurados para dibujar redes reguladoras de genes y bioquímicas.
- COPASI (<http://copasi.org/>) es una aplicación de software para simulación y análisis de redes bioquímicas y su dinámica.
- OptFlux (<http://www.optflux.org/>) es un software basado en Java para restricciones basadas en análisis que puede realizar muchos cálculos útiles de manera amigable.
- cobrapy (<https://opencobra.github.io/>) es un paquete de Python que proporciona un simple interfaz para reconstrucción y análisis basados en restricciones metabólicas.
- Cameo (<http://cameo.bio/>) es una biblioteca de python de alto nivel desarrollada para ayudar a la tensión. Proceso de diseño en proyectos de ingeniería metabólica.
- Telurio (<http://tellurium.analogmachine.org/>) es un entorno Python para modelado dinámico reproducible de redes biológicas.

### 3.10.1. Python

Python es un lenguaje de programación que puede ser utilizado en aplicaciones científicas, cuando se instala Python no tiene incluidas librerías, pero es posible adicionar una extensa variedad de paquetes,

módulos o librerías como NumPy, SciPy, matplotlib, Pyomo, entre otras, que convierten a Python en un software comparable con paquetes comerciales como MATLAB u Octave. Incluso con estas librerías Python puede sustituir a estos paquetes comerciales en aplicaciones donde se requiera el uso del cómputo científico. Una de las ventajas de Python es que posee una licencia de código abierto denominada Python software Foundation License, haciéndolo fácil de utilizar de forma gratuita.

Machine Learning o aprendizaje automático es un algoritmo que revisa datos y es capaz de predecir comportamientos futuros. Se divide en 3 categorías: aprendizaje supervisado, no supervisado y aprendizaje de refuerzo.

**Tabla 3.2:** Resumen de los principales paquetes de Python *synbio* [82]

Paquete	Descripción
numpy	Agrega soporte para matrices multidimensionales
Scipy	Computación científica y técnica
pandas	Manipulación de datos y análisis
jupyter	Ciencia de datos interactivos y computación científica
matplotlib	Biblioteca de trazado
seaborn	Visualización de datos nacidos
cobrapy	Simulación de modelos a escala genómica basados en restricciones
biopython	Bioinformática en python
pysbo	Herramientas de biología sintética
scikit-learn	Aprendizaje automático de estadística

### 3.10.2. COBRA Toolbox

Es un paquete de código abierto que se ejecuta en el ambiente de MATLAB, los controles cobra son parte de un ciclo iterativo de biología de sistemas, se puede utilizar para integrar datos experimentales, además se puede usar para predecir resultados de nuevos experimentos.

### 3.10.3. MATLAB

MATLAB es un paquete ampliamente empleado en las ramas de ingeniería y ciencia, aplicaciones informáticas, Simulink está incorporado dentro de MATLAB para incluir módulos con un entorno gráfico, el entorno gráfico de Simulink sirve para modelar el sistema [83], el paquete es fácil de usar, cuenta con algoritmos numéricos para varios análisis, caja de herramientas, complejos vectores y matrices, incluidas las matrices dispersas como tipos de datos fundamentales, además de que se puede graficar [84].

Existen diversas áreas de aplicación del paquete, por ejemplo, simulación de varios sistemas, mapeo del genoma humano, análisis financiero, análisis en economías emergentes, aplicaciones de microbiología, procesamientos de imágenes para arqueología y geología subacuática.

Han existido cambios significativos en la biología molecular, como consecuencia se han obtenido una gran cantidad de información acerca de la composición molecular de los organismos y su entorno, en la actualidad se encuentra datos genómicos, metabólicos, transcriptómicos y proteómicos [81], todos estos datos proporcionan información para el entendimiento del metabolismo de los organismos, y se puede desarrollar un modelo estequiométrico, incluyendo las reacciones bioquímicas que participan en el sistema, el análisis de flujos metabólicos se desarrolla in silico, con la ayuda de algoritmos y softwares como el Python, MATLAB, COBRA, Hydra.

### 3.10.4. COBRAPy

COBRA para Python es un paquete de Python que brinda soporte para COBRA básico, está orientada a objetos que facilita la representación de complejos procesos biológicos de metabolismo y expresión génica, están orientadas para un conjunto de clases que representan organismos, reacciones bioquímicas [28]. COBRAPy cuenta con muchas ventajas del código Python y permite la integración de modelos

con bases de datos y otras fuentes de datos de alto rendimiento. Además, COBRApy no es un software comercial para operaciones COBRA de uso común.

En sistemas biológicos el modelado muchas veces está basado en restricciones, es frecuente que en sistemas biológicos hagan falta parámetros a medir, las restricciones se centran en emplear datos fisicoquímicos y restricciones biológicas como compartimentación, direccionalidad termodinámica.

Recientemente, el transcriptoma se ha usado para reducir el conjunto de datos computados, los modelos basados en restricciones frecuentemente son indeterminados y pueden proporcionar múltiples soluciones matemáticas, que pueden resolverse con el software COBRApy, además que es ampliamente utilizado en la ingeniería metabólica. Las capacidades centrales de COBRApy están habilitadas por un conjunto de clases que representan organismos (Modelo), reacciones bioquímicas (reacción) y biomoléculas (Metabolito y gen). Se puede acceder al código central a través de Python o Jython (Python para Java). COBRApy contiene:

- (1) cobra.io: un paquete de entrada / salida para leer / escribir modelos SBML y caja de herramientas de estructuras MATLAB.
- (2) cobra.flux\_analysis: un paquete para realizar operaciones comunes de FBA, incluido eliminación de genes y análisis de variabilidad de flujo [85].
- (3) cobra.topology: un paquete para realizar análisis estructural
- (4) cobra.prueba: un conjunto de pruebas unitarias y datos de prueba.
- (5) cobra.solvers: interfaces para paquetes de optimización lineal.
- (6) cobra.mlab: una interfaz para COBRA Toolbox para MATLAB [28].

### 3.11. OPTIMIZACIÓN

La optimización de problemas consiste en maximizar o minimizar una función objetivo real o discreta a través de la selección de valores apropiados para las variables de decisión de forma sistemática. Existe una gran variedad de métodos de optimización, que se pueden categorizar en exactos, aproximados, determinista, o no deterministas [86].

La mayoría de los modelos metabólicos de microalgas se centran en el estudio de funciones de un solo objetivo, p.e. optimizar la biomasa producida. En este caso es el Análisis de Flujos Metabólicos (o FBA por sus siglas en inglés Flux Balance Análisis) el método de optimización mayormente utilizado para este propósito. Considerando una red metabólica de estado estable, FBA busca resolver el sistema de ecuaciones asociado a la matriz estequiométrica de la red para determinar los flujos de las reacciones que mejoren un metabolito de interés [4, 87].

A pesar del uso diversificado de FBA para la predicción de flujos en redes metabólicas a gran escala, no siempre es completamente preciso en predecir flujos in vivo [24]. Es más, la mayoría de los modelos metabólico satisfacen  $n > m$ , es decir el número de ecuaciones o reacciones es mayor al número de metabolitos, indicando que existen múltiples soluciones. Esta situación se vuelve aún más compleja cuando se trata de optimizar simultáneamente más un un bioproducto, lo que recientemente ha llevado al estudio de estrategias de optimización multiobjetivo [88–90]. En esta última línea de investigación destacan las metaheurísticas, métodos por excelencia que contribuyen a identificar conjuntos adecuados de soluciones a problemas con más de un objetivo. El éxito de estas estrategias en problemas multi-objetivos fomenta el interés del análisis de su desempeño en el caso de la optimización de redes metabólicas, realizado en el presente trabajo de investigación. Para tener un conocimiento con un detalle ligeramente más amplio, se introducen las metaheurísticas a continuación.

## 3.12. METAHEURÍSTICAS

Las metaheurísticas han ganado popularidad, con respecto a los métodos exactos, debido a su simplicidad y a la robustez de los resultados, se han utilizado en diferentes áreas como la economía, ingeniería, negocios y ciencias sociales, pero todavía existe una gran oportunidad de desarrollarla en otros campos como la química, matemáticas y física [91].

### 3.12.1. Algoritmo metaheurístico

Las metaheurísticas son ampliamente utilizadas en problemas de optimización mediante la búsqueda de soluciones para problemas particulares. Se utilizan diferentes algoritmos que utilizan reglas o ecuaciones matemáticas, que durante varias iteraciones logran llegar a una convergencia, y así encontrar un conjunto de soluciones óptimas, de acuerdo al criterio establecido por la necesidad del usuario [92]. A diferencia de los métodos exactos, las metaheurísticas logran obtener buenos resultados con mayor rapidez.

Las metaheurísticas se utilizan para resolver problemas de optimización mediante el proceso de búsqueda de soluciones óptimas para un problema de interés particular. El proceso de búsqueda se puede llevar a cabo usando múltiples agentes que esencialmente forman un sistema de soluciones en evolución usando un conjunto de reglas o ecuaciones matemáticas durante múltiples iteraciones. Estas iteraciones continúan hasta que la solución encontrada cumple con algún criterio predefinido. Se dice que esta solución final es una solución óptima y se considera que un sistema ha alcanzado un estado convergente. A diferencia de los métodos exactos que encuentran la solución óptima a expensas de un tiempo computacional elevado, los métodos heurísticos encuentran una solución casi óptima con bastante rapidez.

### 3.13. OPTIMIZACIÓN MULTI-OBJETIVO

En la naturaleza existen problemas donde se deben de optimizar múltiples funciones objetivo simultáneamente, este tipo de problemas pueden ser llamados problemas de optimización multi-objetivo, multicriterio o problemas de optimización de vectores. Los métodos de optimización multio-bjetivo surgen de la necesidad de optimizar varios objetivos conflictivos que aparecen en los problemas de optimización [93]. Estos métodos buscan compensaciones adecuadas entre los criterios [94] y ofrecen un conjunto de soluciones óptimas de Pareto a diferencia de los métodos mono-objetivo que solo brindan una solución. El contar con diversidad de soluciones mejora la capacidad de decisión de un individuo al ampliar el espacio de posibilidades entre las que se puede tomar una decisión.

La ecuación 3.14.1 muestra la formulación multi-objetivo general seguida por estos trabajos.

$$\begin{aligned} \text{máx } F(x) &= (f_1(x), f_2(x), \dots, f_q(x)) \\ \text{Sujeto} & \\ x &\in R_F \end{aligned} \tag{3.13.1}$$

Donde  $F(x)$  es el vector de funciones objetivo, y  $x$  es el vector de variables de decisión que pertenece a la región factible, es decir, la región que satisface todas las restricciones presentes en el problema [95].

#### 3.13.1. Optimalidad de Pareto

Un punto  $x^*$  en el espacio de soluciones factible  $S$  se llama punto óptimo de Pareto si no hay otro punto  $x$  en el conjunto  $S$  que mejore al menos el valor de una función objetivo de  $x^*$  sin empeorar otro. Formalmente, considerando minimización de funciones objetivo, Se se define de la siguiente manera:

Un punto  $x^*$  en el espacio factible  $S$  es un punto óptimo de Pareto si y solo si no existe otro punto  $x$  en el conjunto  $S$  tal que  $f(x) \leq f(x^*)$  con al menos un  $f_i(x) < f_i(x^*)$  [96].

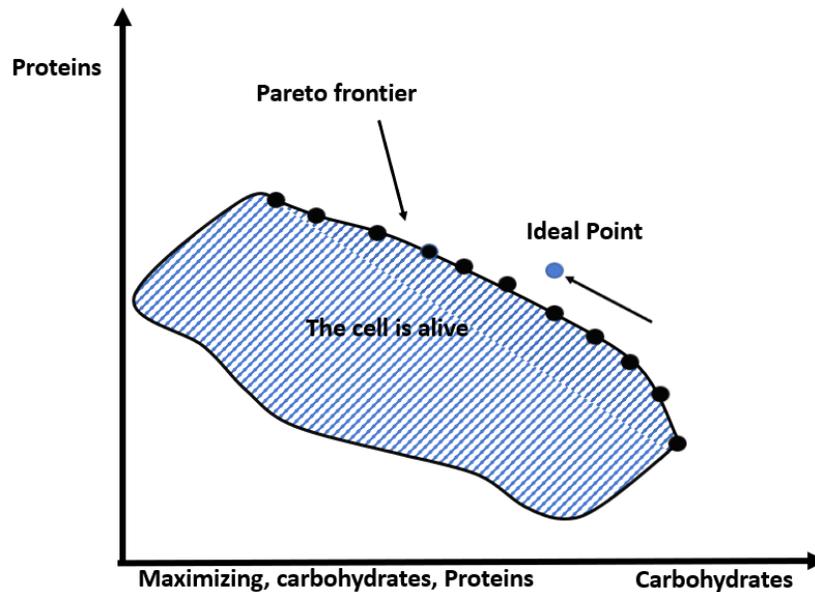
El conjunto de todas las soluciones o puntos óptimos es llamado conjunto óptimo de Pareto, y para que pertenezcan a este conjunto deben ser soluciones no dominadas.

### 3.13.2. Dominancia de Pareto

La frontera de Pareto es el conjunto de todas las soluciones óptimas de Pareto. Una solución óptima de Pareto es una solución no dominada  $x \in R_F$ . Una solución  $x$  domina a otra  $y$ , denotada  $x \succ y$ , si hay al menos una función  $f \in F$  en la que el valor  $f(x)$  es estrictamente mejor que  $f(y)$  y  $F(x)$  no es peor que  $F(y)$  para ninguna otra de las funciones restantes. Una solución es no dominada si no existe otra solución  $y \in R_F$  tal que  $y \succ x$  [93,97]. Uno de los enfoques más comunes para aproximar la frontera de Pareto es a través de algoritmos evolutivos. La Figura 3.4 ilustra las fronteras de Pareto utilizando dos funciones objetivo: maximización de carbohidratos y proteínas [98].

## 3.14. ENFOQUE EVOLUTIVO

El uso de algoritmos evolutivos multi-objetivo (MOEA) son ampliamente reconocidos en la comunidad científica como enfoque para resolver problemas de optimización con múltiples objetivos. Los Algoritmos evolutivos (AE) se han utilizado en múltiples áreas de estudio, entre ellas la biología, la inteligencia artificial, administrativas, entre otras. Los algoritmos evolutivos emulan la biología, los algoritmos evolutivos son metaheurísticas inspiradas en la teoría Darwiniana de la supervivencia del más apto [99], emulan la teoría de la evolución natural, se mide la aptitud de los fenotipos (posibles soluciones), después se utilizan mecanismos de selección donde se elige un grupo de padres por cada generación y se decide que padres e hijos pasaran a la siguiente generación, los operadores genéticos



**Figura 3.4:** *Dos funciones objetivo Frontera de Pareto*

de variación generaran nuevos individuos a partir de los padres seleccionados, y los operadores de mutación se basan en un padre y cambiaran aleatoriamente algunos valores, los valores de recombinación crean descendencia al combinar los valores de genotipos de dos o más padres y al final aquellos que satisfagan las condiciones de aptitud establecidas por el usuario se seleccionaran para la siguiente generación [100].

Los AE Presentan presentan la ventaja que los tiempos computacionales son menores a comparación de los métodos exactos de solución multi-objetivo. En general, cualquier método de solución de problemas, que utilice los procesos operativos provenientes del paradigma Darwiniano: como reproducción, mutación, competencia y selección se le nombra algoritmo evolutivo [101].

Existen 3 paradigmas principales dentro de los algoritmos evolutivos: Programación Evolutiva, Estrategias Evolutivas y Algoritmos Genéticos [102].

### 3.14.1. Algoritmos genéticos

Los algoritmos genéticos simulan el proceso de evolución natural y son utilizados en problemas de optimización multi-objetivo, al igual que los algoritmos evolutivos presentan los operadores de selección, mutación y cruza.

El operador de Selección, al igual que en la naturaleza, los individuos más aptos tienen más posibilidades de sobrevivir y reproducirse, basados en esta sencilla idea, el algoritmo elige de acuerdo a sus valores de aptitud que individuos permanecerán para crear la próxima generación. A continuación se enlistan algunos operadores de selección [103]:

- selección por torneo.
- Selección elitista.
- Selección por rango.
- Selección proporcional a la aptitud.
- Selección por rueda de ruleta.

El operador de Cruza, aparece después de seleccionar a los individuos que serán los padres, estos se combinarán y producirán una descendencia que estará presente en la siguiente generación [104].

El operador de mutación mantiene la diversidad de la población al introducir otro nivel de aleatoriedad. De hecho, este operador evita que las soluciones se vuelvan similares y aumenta la probabilidad de evitar soluciones locales en el algoritmo genético [103].

### 3.14.2. NSGA-II

El algoritmo evolutivo multi-objetivo basado en clasificación no dominada (NSGAI) propuesto por [105] ha sido bastante efectivo cuando se manejan dos o tres objetivos [106, 107]. El NSGAI emplea un enfoque elitista y preserva la diversidad de soluciones.

Los tres componentes principales de NSGAI son su enfoque de ordenación rápido no dominado, el procedimiento de estimación de distancia de aglomeración rápida y el operador de comparación de aglomeración simple, la metodología de NSGAI se describe a continuación. [108].

1. Inicialización de la población  $P_0$  de tamaño  $N$  utilizando una distribución uniforme.
2. Crea una población descendiente  $Q_t$  utilizando la selección binaria de torneos y mutación realizados sobre la población padre ( $P_t$ ), donde el subíndice "t" denota el número de generaciones. La población descendiente y su población progenitora se combinan para producir la población total  $R_t$ ,  $R_t = P_t + Q_t$ , La población  $R_t$  será de tamaño  $2N$ .
3. Realiza un enfoque de ordenamiento rápido no dominado en toda la población  $R_t$  para identificar distintos frentes de funciones objetivo.  $F =$  ordenación rápida no dominada ( $R_t$ ), donde  $F = (F_0, F_1, F_2, \dots)$ , tendrá en  $F_0$  al conjunto no dominado de soluciones de  $R_t$  que mejor se aproxima a la frontera de Pareto.
4. Construir una nueva población padre ( $P_{t+1}$ ) de tamaño  $N$  a partir de los frentes obtenidos ( $F_i$ ). En caso de empates, se usa el indicador de aglomeración como criterio de desempate. Esta población de tamaño  $N$  ahora se usa para selección, cruce y mutación para crear una nueva población ( $Q_{t+i}$ ) de tamaño  $N$ .
5. El proceso debe repetirse hasta alcanzar el número máximo de iteraciones.

En la Figura 3.5 se puede observar la representación del algoritmo NSGAI.

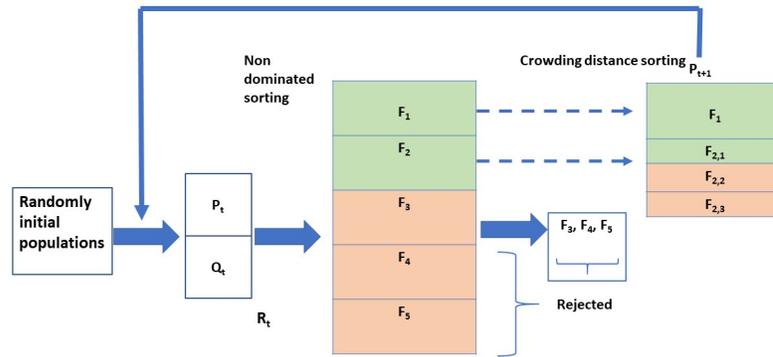


Figura 3.5: Representación del Algoritmo NSGAii

---

**Algorithm 1** Pseudocódigo para el algoritmo metaheurístico NSGAIL.

---

```

 $Q_t \leftarrow GeneticOperators(P_t)$ 
 $R_t \leftarrow P_t \cup Q_t$ 
 $F \leftarrow FastNonDominatedSort(R_t)$ 
 $P_{t+1} \leftarrow \emptyset$ 
 $i \leftarrow 0$ 
while  $|P_{t+1}| + |F_i| \leq N$  do
     $P_{t+1} \leftarrow P_{t+1} \cup F_i$ 
     $i \leftarrow i + 1$ 
end while
 $CD_i \leftarrow CrowdingDistanceAssignment(F_i)$ 
 $F'_i \leftarrow SORT(CD_i, F_i)$ 
 $P_{t+1} \leftarrow P_{t+1} \cup F'_i[1 : N - |P_{t+1}|]$ 
 $t \leftarrow t + 1$ 
return  $P_{t+1}$ 

```

---

### 3.14.3. MOEA/D

La estrategia de este algoritmo se basa en descomponer el problema de optimización multi-Objetivo MOP en un cierto número de subproblemas de optimización escalar que se optimizan de manera simultánea. Cada subproblema se optimiza utilizando información que proviene exclusivamente de sus subproblemas vecinos, logrando menor complejidad computacional en cada generación. La ecuación 3.14.1 muestra la formulación multi-objetivo general seguida por estos trabajos.

$$\begin{aligned} \text{máx } F(x) &= (f_1(x), f_2(x), \dots, f_m(x)) \\ \text{Sujeto a} & \\ x &\in \Omega \end{aligned} \tag{3.14.1}$$

Donde  $F(x)$  es el vector de funciones objetivo, y  $x$  es el vector de variables de decisión que pertenece a la región factible  $\Omega$ , es decir, la región que satisface todas las restricciones presentes en el problema, que define  $m$  como el número de objetivos [95].

El uso del algoritmo multi-objetivo basado en descomposición (MOEA/D); descompone un problema de objetivos múltiples en múltiples subproblemas y los resuelve todos juntos.

Existen varios enfoques para transformar un problema de objetivos múltiples en un número escalar de problemas de optimización. Uno de los enfoques más populares en MOEA/D es el propuesto por [109]. en este enfoque, el problema de optimización escalar se puede formular de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} g^{te} (y | w_i, z) &= \max \{ w_i | f_k(x) - z_k \} \\ \text{Subject to: } x &\in \Omega \end{aligned} \tag{3.14.2}$$

Donde  $w = (w_1, w_2, \dots, w_N)$  es un vector de pesos y  $w_i \geq 0$  para todos  $i = 1, \dots, k$ , y el conjunto  $z = (z_1, z_2, \dots, z_k)$  es el punto de referencia, donde  $z_i = \max\{f_i(x) \mid x \in \omega\}$  for  $i = 1, \dots, m$ . Para cada punto óptimo de Pareto  $x^*$ , existe un vector de pesos  $w$ , donde  $x^*$  es la solución óptima de 3.14.2. Por lo tanto, existe una solución óptima para cada solución óptima de Pareto en 3.14.1.

#### 3.14.4. Algoritmo evolutivo MOEA/D para MOFBA

Algoritmo 2 presenta el esquema algorítmico simplificado de MOEA/D usado en la investigación. El algoritmo está basado en la estrategia descrita por (Zhang Li, 2007), particularmente empleando el enfoque de Tchebycheff para transformar la aproximación del frente de Pareto en problemas de optimización escalares. Primero, el algoritmo inicializa las estructuras  $x$ ,  $z$ , FV, y  $B(i)$  de acuerdo al framework descrito por (Zhang Li, 2007) (Línea 1). Posteriormente, para cada vector de pesos, se lleva a cabo la reproducción de padres usando  $x$ ; el proceso de reproducción escoge 2 padres y genera 2 nuevos hijos a partir de los operadores genéticos seleccionados (Línea 4). Una vez creados los hijos  $y_1, y_2$ , se usan para actualizar  $z$ , la alternativa al punto de referencia  $z^*$  (Línea 5). Finalmente, se actualizan los vectores  $x$  y FV con los hijos  $y_1, y_2$  si éstos últimos satisfacen la condición de Tchebycheff  $g(y, V_j, z)$ , ver Línea 6. El proceso se itera hasta cumplir con el número máximo de evaluaciones definido. El algoritmo reporta el estado del vector  $x$  en la última iteración.

---

**Algorithm 2** Pseudocódigo para el algoritmo metaheurístico MOEAD.

---

**Input:**

$\lambda = \{\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_N\}$  = conjunto de  $N$  vectores de peso.

$T = N/10$ , el tamaño de la vecindad de los vectores de pesos.

**Output:**

$x = \{x_1, x_2, \dots, x_N\}$  última generación de soluciones asociadas a los vectores de pesos.

1.  $(x, z, FV, B(i)) \leftarrow \text{Initialization}()$

2. **do**

3. **for**  $i = 1$  to  $N$  **do**

4.  $\{y_1, y_2\} \leftarrow \text{Reproduction}(x, B(i), T)$

5. UpdateZ  $(z, \{y_1, y_2\})$  //  $z$ : for each  $j = 1, \dots, K$ , if  $z_j < f_j(y')$  then set  $z_j = f_j(y')$ ,  $y' \in \{y_k, y_l\}$

6. UpdateNeighborhood  $\{x, B(i), \lambda, FV, \{y_1, y_2\}\}$  // for each  $j \in B(i)$ , if  $g^{te}(y' \lambda_j, z) \leq g^{te}(x_i \lambda_j, z)$  set  $x_j = y'$  and  $FB_j = F(y')$ ,  $y' \in \{y_k, y_l\}$ .

7. **end for**

**while** Stopping Criteria unsatisfied

when numEvaluations  $<$  maxEvaluations **do**

---

---

## Metodología

El objetivo principal de esta tesis fue mejorar el entendimiento de las rutas metabólicas de la microalga y la información que pueden proveer a través de la optimización de la producción de diferentes metabolitos de interés, en diferentes condiciones.

Tradicionalmente, el Análisis de Balance de Flujo (o FBA, de sus siglas en inglés Flux Balance Analysis) es el método utilizado para analizar un sistema biológico. En el caso del estudio de microalgas, se usa para optimizar una sola función objetivo que agrupa un conjunto de metabolitos de interés, por ejemplo, la biomasa. La metodología propuesta considera, teniendo como base el método FBA, la optimización de múltiples funciones objetivo, y ampliar con ello el control sobre los flujos de interés. Adicionalmente, considera la integración de metaheurísticas, que de manera simultánea optimicen las funciones identificadas con el fin de proveer un mejor soporte de información con relación al sistema metabólico bajo estudio. Lo anterior es demostrado al comprobar la siguiente hipótesis.

$H_0$ : No es posible definir una metodología basada en metaheurísticas que mejore la información de flujos de red metabólicos provistos por el método FBA mediante la redefinición del Análisis de Balance de Flujos como un Problema de Optimización Multi-objetivo.

$H_A$ : Es posible definir una metodología basada en metaheurísticas que mejore la información de flujos de red metabólicos provistos por el método FBA mediante la redefinición del Análisis de Balance de Flujos como un Problema de Optimización Multi-objetivo.

Este capítulo presenta el análisis de la metodología propuesta para la integración de metaheurísticas y FBA. El subcapítulo 4.1 muestra la propuesta metodológica, y el resto de los subcapítulos detalla cada uno de sus pasos del método clásico. La novedosa estrategia de integración se describe con amplitud en el siguiente capítulo.

## **4.1. PROPUESTA DE INTEGRACIÓN METODOLÓGICA.**

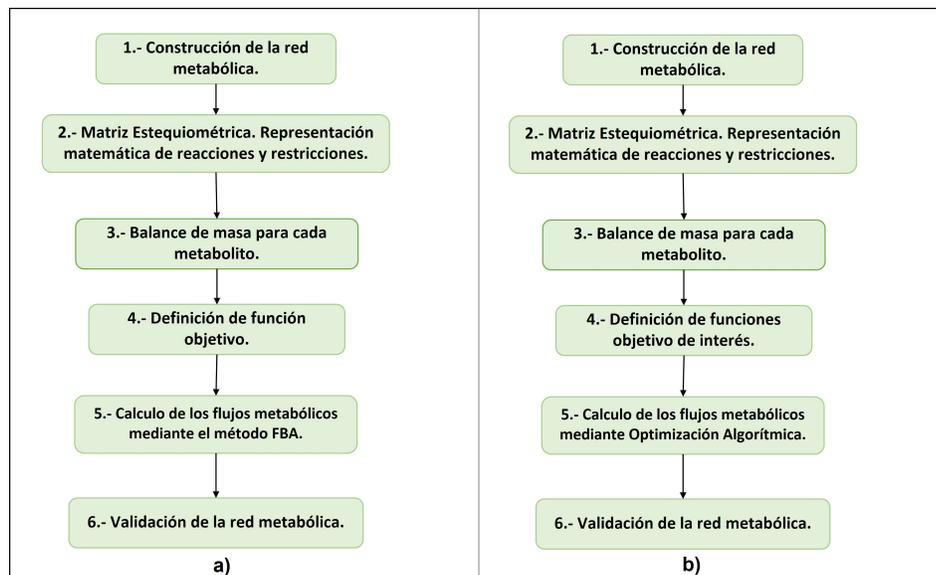
La Figura 4.1 presenta un análisis comparativo entre la metodología clásica basada en el método FBA y la propuesta que integra metaheurísticas. El análisis de los cambios se presenta a continuación.

La metodología clásica (ver Figura 4.1a) consta de seis pasos claramente identificables. El primer paso es la construcción de la red metabólica que consiste en encontrar todas las reacciones presentes en la microalga de acuerdo con la información obtenida de las bases de datos que la contiene. El segundo paso consiste en definir la red metabólica mediante una matriz estequiométrica, denotada por  $S$ ; en esta matriz cada fila representa un metabolito y cada columna representa una reacción, añadiendo restricciones para acotar el espacio de soluciones y que se apegue a la realidad de lo que ocurre en la célula. El tercer paso involucra el balance de masa para cada metabolito, considerando que el sistema se maneja en un estado estacionario o pseudoestacionario donde los flujos de las reacciones, denotados por  $V$ , deben satisfacer  $SV=0$ , con lo cual se define un sistema lineal de ecuaciones. El cuarto paso, define la función objetivo a maximizar o minimizar. El quinto paso se encarga de resolver el sistema

de ecuaciones definido a través de la matriz estequiométrica, y en el método clásico éste se hace mediante FBA. Finalmente, el último paso coteja los valores obtenidos a través del método FBA con valores obtenidos experimentalmente para observar qué tan buenos son los resultados obtenidos por esta metodología.

La metodología propuesta, y mostrada en la Figura 4.1b, difiere principalmente de la clásica en los pasos 4 y 5. El paso 4 es un nuevo paso que ahora busca proponer no una sino varias funciones objetivo que sean de interés para la investigación de la red metabólica. El paso 5 en lugar de sugerir invocar al método FBA como el optimizador de flujos, propone el uso de algoritmos de optimización en general, el cuál puede incluir el método FBA, algoritmos aleatorios u otras estrategias basadas en metaheurísticas como se evaluó en este trabajo de investigación.

El resto del capítulo detalla cada uno de los pasos concernientes a la metodología clásica, y la definición de los pasos propuestos para la integración se describen en el siguiente capítulo.



**Figura 4.1:** Esquema comparativo entre Metodología basada en método FBA y Metodología Propuesta basada en Metaheurísticas para la construcción de un modelo metabólico.

## 4.2. CONSTRUCCIÓN DE LA RED METABÓLICA

La construcción del modelo debe comenzar con la búsqueda de las rutas metabólicas que están involucradas en la célula de microalgas, para obtener información de las reacciones bioquímicas y las enzimas que participan en el metabolismo en la producción de componentes de biomasa.

Las reacciones bioquímicas son catalizadas por enzimas. Estas son proteínas que regulan la rapidez y especificidad de las múltiples reacciones que existen en el interior de una célula. Estas reacciones son de primordial importancia porque pueden ser usadas para los diferentes procesos metabólicos como la respiración, fotosíntesis, fijación de nitrógeno [110].

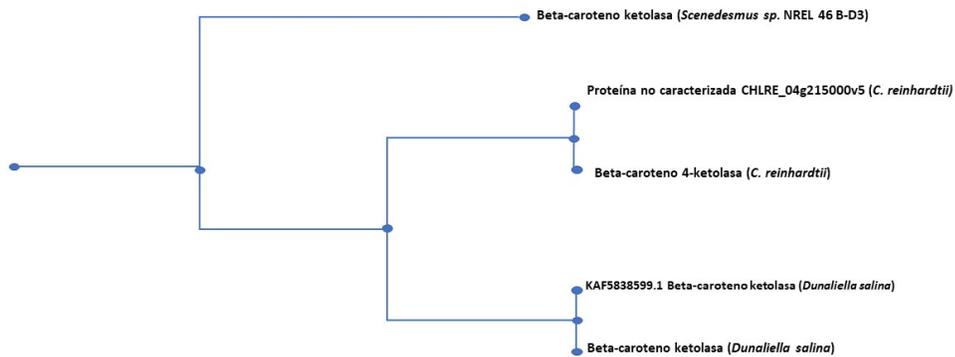
Las proteínas están compuestas por cadenas largas de aminoácidos, en el ácido desoxirribonucleico (ADN) gran variedad de genes codifican proteínas teniendo la capacidad de plegarse para convertirse en enzimas, aunque no todas las proteínas se convierten en enzimas, todas las enzimas son proteínas [111].

Una forma de encontrar las similitudes de homología de proteínas entre un organismo y otro, es mediante Basic local alignment Search TOOL (BLAST) es una herramienta desarrollada por el Centro Nacional para la información Biotecnológica (NCBI) es un programa de búsqueda de similitudes de secuencias genómicas, se puede utilizar a través de una interfaz web. Puede comparar una secuencia problema con una gran cantidad de secuencias que se encuentran en su base de datos.

Con el objetivo de comparar si una reacción estaba presente en la microalga *Dunaliella Salina* mediante BLAST se compararon los genes presentes con un organismo en las que su genoma ya fue estudiado. Se encontró que tiene un porcentaje de identidad del 75% con *Chlamydomonas reinhardtii* y *Tetrademus obliquos*, se decidió tomar como organismo base para este proyecto a *C. reinhardtii*, por ser el organismo más estudiado.

Una forma de representar las relaciones que existen entre los organismos es mediante un árbol filogené-

tico, en la Figura 4.2, se presenta el árbol filogenético de la microalga *Dunaliella Salina* realizado en BLAST, basado en el alineamiento de la secuencia de la proteína beta caroteno quetolasa, Enzyme Commission numbers (EC.) 1.14.99.63, R0534, está proteína es una enzima que participa en la biosíntesis de carotenoides como la astaxantina y la flexixantina [112]. En esta representación se puede observar una similitud entre las microalgas *C. reinhardtii* y *D. Salina* estas microalgas tienen características homólogas entre ellas, en su estructura comparten gran cantidad de enzimas que son codificados por los genes presentes.



**Figura 4.2:** Árbol filogenético de la proteína beta caroteno quetolasa.

Para llevar a cabo la construcción del modelo, se analizaron las reacciones conocidas de *C. reinhardtii* si se encontraba una proteína con homología en el sistema se añadía la reacción al modelo.

Los metabolitos y las reacciones se identificaron utilizando indicadores KEGG (Enciclopedia de Kioto de Genes y Genomas), así como los números EC (Números de la Comisión de enzimas) cada número EC se asocia a un nombre recomendado para dicha enzima.

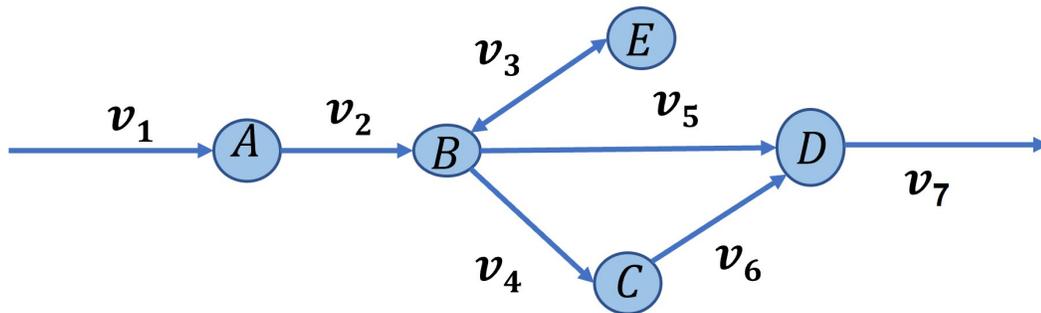
Además, se usaron otros recursos para la construcción del modelo metabólico como uniprot (Universal

proteína), BIGG, BRENDA (Base de datos de enzimas BRAunschweig). Debido a que presenta mayor información se utilizó como modelo base *C. reinhardtii* 1080, las asociaciones de Gen proteína reacción se establecieron usando BLASTp para comparar las secuencias de homología de proteínas de *Dunaliella Salina* con *C. reinhardtii*, *Chlorella sp.* y con otras algas verdes.

En resumen, la construcción del modelo metabólico se lleva a cabo estableciendo las reacciones metabólicas presentes en la microalga bajo estudio. Normalmente se considera para esta tarea la anotación del genoma del *Dunaliella Salina* GenBank assembly accession: GCA002284615.2.

Una red metabólica que es representada por una matriz estequiométrica tiene que ser consistente, es decir aquella en la que todas las reacciones se encuentren activas en al menos un modo de flujo. Sin embargo, existen metabolitos dead-end son nombrados así porque solo son producidos o consumidos por las reacciones de la red. En consecuencia, el flujo estacionario a través de todas las reacciones en las que participan deberá ser cero debido a la restricción de balance de masas. De no ser así, el metabolito se acumularía de forma indefinida, o se consumiría completamente, lo que afectaría la condición de estado estacionario y, como consecuencia esas reacciones se encontrarán bloqueadas, al estar bloqueada como en la Figura 4.3 esta no se encontrara activa en ningún modo del flujo ocasionando inconsistencias en la red y haciendo que las reacciones con secuencia a esas reacciones dead-end también se encuentren bloqueadas [113].

La Figura 4.3 representa un modelo metabólico que contiene inconsistencias en forma de reacciones bloqueadas y metabolitos dead-end. Las flechas indican reacciones y los nodos metabolitos. El nodo E representa un metabolito dead-end y como consecuencia el flujo en la reacción  $v_3$  sería ceros y es una reacción bloqueada.



**Figura 4.3:** Red metabólica con una reacción bloqueada [3]

Cuando no está lo suficientemente detallado un modelado metabólico, puede ocurrir que ciertas reacciones no estén presentes en la red metabólica y que existan otras que no deben estarlo. Por lo tanto existirán algunas reacciones que no estarán conectadas a la red generaran huecos, que hará que algunas reacciones estén bloqueadas y producirá inconsistencias en la red.

Por lo tanto, se revisaron estequiométricamente todas las reacciones y verifico la carga de todas ellas, se observó que existían errores en algunas reacciones. Al tener identificadas las reacciones que están bloqueadas, se procedió a evaluar la causa del bloqueo y en consecuencia decidir si la reacción se eliminara o agrega otra para lograr la consistencia de la red. La revisión de la consistencia de la red, mediante el algoritmo FASTCC (Fast consistency check) de cobrapy, el algoritmo toma como entrada un modelo metabólico global y un conjunto de reacciones que se sabe que están activas, (es decir, tiene flujo distinto de cero), y produce un modelo específico, este método se basa en programación lineal, identificando las reacciones bloqueadas y nos presenta una lista de las reacciones que son consistentes en la red y eliminará las reacciones bloqueadas.

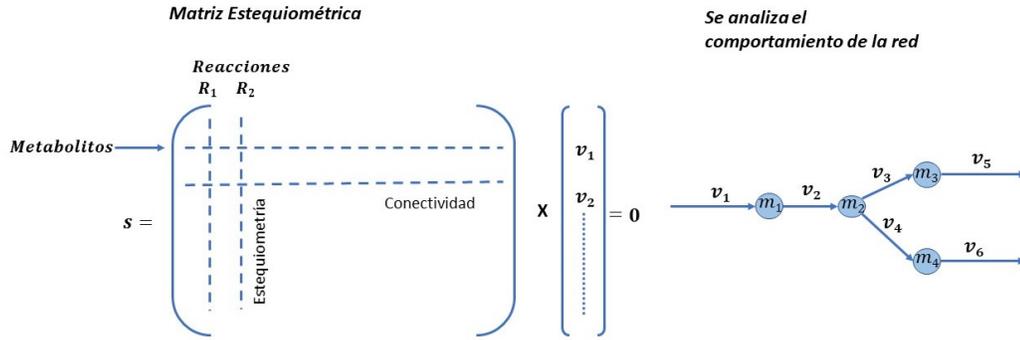


Figura 4.4: Representación de la Matriz estequiométrica y red de PETRI [3]

### 4.3. MATRIZ ESTEQUIOMÉTRICA

Una vez establecidas las reacciones bioquímicas que están presentes en el metabolismo de la microalga, con estas reacciones se generan un conjunto de ecuaciones utilizando el coeficiente estequiométrico de cada componente que está presente en cada reacción, cuando es un sustrato el valor del coeficiente estequiométrico asignado a la matriz será negativo y cuando es un producto el valor del coeficiente estequiométrico será positivo [114]. Con el entendimiento de que en cada fila representa a un metabolito presente y cada columna representa a la reacción.

En FBA se asume que el sistema se encuentra en estado estacionario o pseudoestacionario [26]. Una característica relevante, de esta suposición radica en que todos los metabolitos que no se encuentren en una ramificación de la red metabólica pueden ser eliminados, dando como resultado que todas las reacciones que ocurren entre dos metabolitos localizados en ramificaciones pueden ser representadas con una sola reacción, sin que esto dé como resultado ninguna pérdida de información [115], la ventaja de este enfoque es reducir el sistema a un conjunto de reacciones lineales, que pueden ser resueltas de acuerdo a las técnicas de álgebra lineal [116].

La Figura 4.4 es la representación de la matriz estequiométrica y red de PETRI y muestra cómo las reacciones están ligadas a los metabolitos. Donde  $v = \{v_1, v_2, \dots\}$  son los flujos y  $m = \{m_1, m_2, \dots\}$

los metabolitos que intervienen en el modelo.

#### 4.4. BALANCE DE MASA PARA CADA METABOLITO

Al tener todas las reacciones presentes, se debe llevar a cabo, mediante un balance de materia alrededor de los metabolitos presentes en el modelo estequiométrico propuesto, adicionando restricciones metabólicas acotando el espacio de soluciones, asumiendo un estado estacionario, o pseudoestacionario, obteniendo un sistema de ecuaciones algebraicas lineales, de la siguiente forma [26].

$$Sv = \frac{dC}{dt} = 0 \quad (4.4.1)$$

Siendo  $S$  la matriz estequiométrica de dimensiones  $(m \times n)$ , donde  $m$  (filas) representan los metabolitos y  $n$  (columnas) las reacciones y  $v$  el Vector de dimensión  $(n \times 1)$ .

##### 4.4.1. Definición de Función objetivo

Las funciones objetivo se utilizan para realizar una búsqueda en el espacio de posibles soluciones para encontrar estados funcionales particulares. Las funciones objetivo se añaden de igual forma como ecuaciones en el modelo [3].

A continuación se describirá la importancia de la ecuación objetivo teniendo primordial interés en la síntesis de biomasa. La función objetivo más utilizada es la producción de la biomasa, pero también existen otro tipo de funciones objetivo dependiendo del propósito de estudio. Por ejemplo, la producción de metanol, la minimización de la producción de ATP, minimización de consumo de nutrientes, maximización de la producción de un metabolito en particular, así como la maximización en conjunto

de la producción de la biomasa y la producción de un metabolito de interés [3], al tener dos funciones objetivo a optimizar da como resultado un enfoque de optimización multiobjetivo .

La ecuación de biomasa es una reacción que representa todos los requerimientos nutricionales y energéticos de una célula para su crecimiento. Para formular la ecuación de la biomasa es necesario conocer la composición de una célula en términos de sus componentes moleculares. De esta forma el nivel de detalle de la ecuación de biomasa formulada para un cierto organismo dependerá, en gran medida, de la información experimental o en las bases de datos disponible sobre la composición de la célula así como los requerimientos energéticos necesarios para generar la biomasa a partir de los diversos precursores [117]. La ecuación se incluye como una reacción más del modelo y tiene la siguiente forma general:



Donde  $X_i$  son los distintos componentes de la biomasa como aminoácidos, lípidos, proteínas carbohidratos etc. y  $n_i$  es el coeficiente estequiométrico o la proporción de dicho compuesto en 1g de peso seco de célula. [52].

Para la ecuación de la función objetivo de la biomasa, cada ecuación contiene los coeficientes estequiométricos expresados en molg-1 de peso seco, se incluyen los 20 aminoácidos esenciales, los valores de la clorofila a y b, el contenido de lípidos, proteínas y los valores de carotenos y beta carotenos se obtuvieron de fuentes bibliográficas al no contar con datos experimentales [118] [119] [120].

Para los datos de la función objetivo de mantenimiento de ATP al no tener datos experimentales, se tomaron de [30], en 29.890 moles por gramo de peso seco de igual manera se supuso que el mantenimiento no asociado al crecimiento era 1,50 mmol ATP / gramos de peso seco.

En la tabla 4.1 se presentan la composición de aminoácidos presentes en la microalga *Dunaliella salina*.

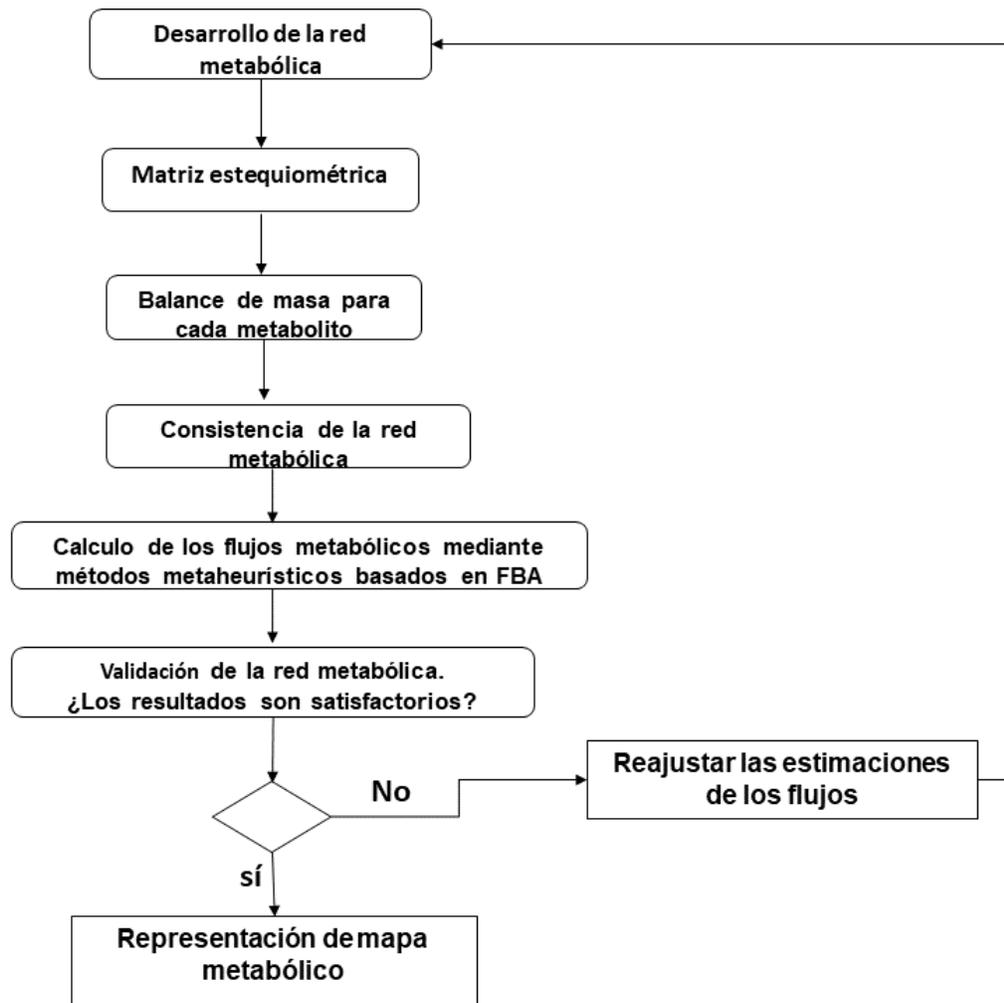
**Tabla 4.1:** Composición de Aminoácidos [118]

<b>Aminoácido</b>	<b>Fracción molar</b>
Alanina	7.02
Arginina	9.42
Aspartato	8.86
Cisteína	0.43
Glutamina	13.46
Glutamato	0
Glicina	8.59
Histidina	3.58
Hidroxiprolina	0
Isoleucina	4.17
Leucina	7.47
Lysina	5.86
Metionina	0.61
Fenilalanina	7.13
Prolina	5.22
Serina	4.24
Treonina	4.55
Triptófano	0.01
Tirosina	3.36
Valina	6.02

## **4.5. EVALUACIÓN DE LOS FLUJOS METABÓLICOS MEDIANTE FBA**

FBA es el método más utilizado para calcular los flujos metabólicos cuando existe una sola función objetivo, pero también existen otros métodos para evaluar los flujos existentes en una red metabólica, cuando existen múltiples funciones objetivo, que serán detallados en el siguiente capítulo.

FBA (análisis de balance de flujos) es utilizado para analizar flujos en condiciones equilibradas de metabolitos. FBA está basado en restricciones, evaluando la matriz estequiométrica y los flujos de cada reacción.



**Figura 4.5:** Metodología detallado para la obtención de un modelo metabólico.

La metodología usada para realizar la evaluación de los flujos metabólicos se muestra en la Figura 4.5.

Por medio de FBA, la optimización lineal de la función objetivo  $Z$  está dada por:

$$\begin{aligned}
 \max.Z &= W^T \\
 S.V &= 0 \\
 V_{min} &\leq v \leq V_{max}
 \end{aligned}
 \tag{4.5.1}$$

Donde  $S$  es la matriz estequiométrica para la red metabólica,  $V$  es el vector de reacción e intercambio de

flujos,  $V_{min}$  y  $V_{max}$  son vectores de límites de flujo superior e inferior.  $W$  es el vector de coeficientes que define a  $Z$  como una combinación lineal de  $V$ . Tomando un supuesto que todas las células son estables y todas tienen un mismo propósito, la función objetivo, como se había mencionado anteriormente la función objetivo más utilizada es la maximización de la producción de biomasa.

Para la solución de FBA, Python tiene un paquete llamado *cobrapy*, para análisis de rutas metabólicas, es de licencia libre y es orientado a objetos, es un paquete de modelado basado en restricciones, proporciona acceso a los métodos de uso común como análisis de balance de flujos, análisis de variabilidad de flujo y análisis de eliminación de genes [28]. *Cobrapy* tiene la opción de agregar manualmente o automáticamente todas las reacciones y metabolitos.

Cada reacción puede ser añadida a *cobrapy*, utilizando el diccionario de metabolitos creados, y de acuerdo sus respectivos coeficientes estequiométricos. A cada reacción se le asignan vectores de límites de flujo inferiores y superiores, que definen los valores máximos y mínimos de las tasas de reacción, algunas reacciones tienen un valor mínimo negativo, esto significa que las reacciones también pueden ir en sentido contrario al de la propia reacción, por lo tanto, es una reacción reversible, para las reacciones reversibles los valores máximos y mínimos fueron desde -1000 hasta 1000, y para las reacciones irreversibles desde 0.0 hasta 1000. En *Cobrapy* se puede iterar a través de los objetos del modelo para observar el contenido, ya sea reacciones y metabolitos.

*Cobrapy* mediante la función de `solution.fluxes`, muestra los valores de todos los flujos de la red metabólica, dependiendo de las condiciones de crecimiento, estos aumentarán o disminuirán.

Maximizar la función objetivo de biomasa (BOF), permite simular la tasa de crecimiento y el rendimiento de la biomasa, es ampliamente utilizada, ya que se enfoca en que todos los recursos sean direccionados en el metabolismo, para producir todos los compuestos celulares obtenidos en la biomasa, como aminoácidos, nucleótidos, lípidos, proteínas, vitaminas y cofactores. Las simulaciones de balance de flujo se pueden resolver utilizando `Model.optimize()`, esto permite maximizar o minimizar el flujo

predeterminado. La función `Model.optimize()` devolverá un objeto Solución. Un objeto de solución tiene varios atributos:

- `objective_value`: el valor objetivo
- `status`: el estado del solucionador de programación lineal
- `fluxes`: una serie de pandas con flujo indexado por identificador de reacción. El flujo de una variable de reacción es la diferencia de los valores primarios para las variables de reacción hacia delante y hacia atrás.
- `shadow_prices`: una serie de pandas con precio de sombra indexado por el identificador de metabolito

Cobrapy tiene la función `model.summary()`, este presenta una representación rápida de las entradas y salidas del modelo, y el objetivo optimizado, en este caso se optimizó la ecuación de Biomasa. Para el Análisis de Balance de Flujos, (FBA) Python tiene un paquete llamado cobrapy, para análisis de rutas metabólicas, es de licencia libre y es orientado a objetos, es un paquete de modelado basado en restricciones, proporciona acceso a los métodos de uso común como análisis de balance de flujos, análisis de variabilidad de flujo y análisis de eliminación de genes [28].

Cobrapy tiene un paquete llamado `optlang` para resolver problemas de optimización matemática, maximizar o minimizar una función objetivo sobre un conjunto de variables sujetas a una serie de restricciones. La resolución se realiza mediante herramientas como el software gratuito `glpk` a través del paquete `optlang`.

El solucionador GLPK (GNU Linear Programming Kit) es un paquete de software libre desarrollado por Andrew O. Mackorin, es un conjunto de rutinas escritas en ANSI.

El utilizar Cobrapy permite optimizar una única función objetivo, pero al tener en el modelo dos

o más funciones objetivo, se debe recurrir a otro tipo de solucionadores, que pueden ser el uso de metaheurísticas basadas en FBA, que serán explicadas en el siguiente capítulo.

#### **4.6. VALIDACIÓN DE LA RED METABÓLICA**

Para llevar a cabo la validación de la red se compararan el valor obtenido de los flujos metabólicos con los propuestos ya sea con los trabajos empíricos o con la información recabada de la literatura. Para el caso de los dos primeros casos de estudio la validación se realizó mediante los resultados obtenidos con los modelos evolutivos y los valores obtenidos con el enfoque clásico, asegurando la validación de la red.

---

## Algoritmos propuestos

La mayoría de los modelos metabólicos de microalgas se centran en el estudio de una sola función objetivo, por ejemplo la biomasa. Para el caso particular de las redes metabólicas en estado estacionario, el análisis de balance de flujos (o FBA) es el método de optimización más utilizado para su estudio [87, 121]. Tal es el caso de la aplicación de FBA en modelos de organismos fotosintéticos, incluyendo *Synechocystis sp.* PCC 6803 [122, 123], *Synechococcus sp.* PCC 7002 [124, 125], *Cyanothece sp.* ATCC 51142 [126], *C. reinhardtii* [30], *Anabaena sp.* UTEX 2576 [127], *Chlorella vulgaris* UTEX 395 [4], *Chlorella variabilis* [128], *Chlorella protothecoides* [129], *Arabidopsis thaliana* [130] para estimar flujos y rendimientos. Sin embargo, a pesar del uso generalizado de FBA para predecir flujos en redes a gran escala, no siempre es preciso para predecir flujos *in vivo* [24].

Tradicionalmente, la optimización de redes metabólicas considera una aproximación de estado estacionario en la que se supone que las concentraciones de metabolitos son constantes. Dado que en la mayoría de las redes metabólicas del mundo real el número de reacciones (indicado por  $n$ ) es mayor

que el número de metabolitos (indicado por  $m$ ), existe una gran cantidad de combinaciones de flujos de reacción que satisfacen tales sistemas. Este capítulo presenta el FBA multiobjetivo propuesto y el enfoque evolutivo que lo resuelve, produciendo de manera eficiente una aproximación adecuada de la frontera de Pareto con un conjunto bastante diverso de soluciones de Pareto que pueden mejorar la toma de decisiones en ingeniería metabólica.

Una tendencia reciente que trabaja el análisis metabólico es optimizar varios objetivos involucrando en el estudio más de un bioproducto de interés [45–47]. El fomento de la optimización multiobjetivo en FBA podría sugerir una alternativa para mejorar la capacidad de predicción de FBA. Sin embargo, los enfoques revisados no aprovechan la versatilidad de las metaheurísticas para aproximar la frontera de Pareto y consumen recursos computacionales moderados. En otras palabras, el uso de una metaheurística puede aproximar mejor la frontera de Pareto y proporcionar una mayor diversidad de soluciones que los enfoques anteriores [93,94].

En este trabajo se proponen formulaciones multiobjetivo novedosas para FBA (denotadas MOFBA cada una de ellas) y un enfoque de solución basado en los dos algoritmos metaheurísticos NSGAI [105] y MOEA/D (Algoritmo Evolutivo Multiobjetivo [109] Basado en Descomposición) que tienen la ventaja de utilizar menos recursos computacionales y tiempos de ejecución, y que proporciona buenos resultados, en comparación con los métodos matemáticos exactos que consumen grandes recursos computacionales y una gran cantidad de tiempo. Los resultados ventajosos obtenidos se observan en una mayor distribución de soluciones factibles para redes metabólicas analizadas.

Las características novedosas incluidas en esta investigación son: 1) cuatro variantes de optimización multiobjetivo basadas en FBA que dan soporte al análisis de redes metabólicas; 2) cuatro esquemas de codificación novedosos para solucionar cada MOFBA propuesto; 3) el análisis de desempeño de la metodología basada en metaheurísticas en comparación con el método FBA clásico, en función de la calidad de las soluciones obtenidas por número y distribución; y 4) adaptaciones novedosas de los marcos metaheurísticos NSGAI Y MOEA/D para resolver los MOFBA propuestos.

## 5.1. MOFBA: MODELOS DE OPTIMIZACIÓN MULTIOBJETIVO PARA FBA

La ecuación 5.1.1 representa la generalización multi-objetivo del problema de optimización lineal para FBA presentado en la ecuación 4.5.1, denotado por MOFBA. Esta generalización propone la optimización simultánea de un conjunto de bioproductos  $\{v_{b_1}, \dots, v_{b_m}\}$  en lugar de uno solo. La ecuación 3.14.2 también considera la matriz estequiométrica  $S$ , el vector de flujos  $v$ , y la condición de estado estacionario  $Sv = 0$ .

$$\begin{aligned}
 \text{MOFBA} \quad & \text{máx } F(v) = \{v_{b_1}, \dots, v_{b_m}\} \\
 & \text{Subject to} \\
 & S \cdot v = 0 \\
 & LB_j \leq v_j \leq UB_j, \forall j \in \{1, \dots, n\}
 \end{aligned} \tag{5.1.1}$$

Este trabajo propone cuatro variantes que aproximan la solución buscada por el problema de optimización multi-objetivo definido en la ecuación 5.1.1. Estas variantes, denominadas MOFBA<sub>1</sub>, MOFBA<sub>2</sub>, MOFBA<sub>3</sub>, y MOFBA<sub>4</sub>, se aseguran de respetar la condición de estado estacionario, es decir, aseguran que se satisface  $Sv = 0$ , y los límites de los flujos por reacción; más detalles de estos problemas de proveen a continuación.

### 5.1.1. MOFBA<sub>1</sub>

MOFBA<sub>1</sub> es el problema de optimización que resulta de la implementación directa del problema definido en la ecuación 5.1.1. Es decir, considera tantas funciones objetivo, como conjuntos de metabolitos

de interés se tengan; así mismo, considera tantas variables de decisiones como flujos de reacciones se necesiten para definir el sistema metabólico.

### 5.1.2. MOFBA<sub>2</sub>

MOFBA<sub>2</sub> es el segundo problema de optimización propuesto. Al igual que MOFBA<sub>1</sub>, las funciones objetivo a optimizar son los conjuntos de metabolitos de interés. Por otro lado, MOFBA<sub>2</sub> considera como el conjunto de variables de decisión únicamente los flujos de las reacciones asociadas a los metabolitos de interés presentes en la función objetivo, y una adicional que define quién de esos metabolitos se optimiza con prioridad. La prioridad de optimización se utiliza en este problema para resolver FBA mono-objetivo en el sub-problema que se define considerando los nuevos límites de flujo para los metabolitos de interés y optimizando el metabolito  $k$  seleccionado. Los valores de las reacciones que no participan en el modelo de optimización se mantienen fijos en los límites iniciales de la red metabólica analizada. Formalmente, se define como en la ecuación 5.1.2, donde  $FBA(v_{bk}, v)$  representa optimizar la reacción correspondiente al metabolito  $v_{bk}$ , usando los flujos límites de flujos  $v$  definidos (los cuales se actualizan únicamente en los asociados a los metabolitos de interés).

$$\begin{aligned}
 \text{MOFBA} \quad & \text{máx } F(v) = \{v_{b_1}, \dots, v_{b_m}\} \\
 & \text{Subject to} \\
 & \quad FBA(v_{bk}, v) \text{ is feasible} \\
 & \quad LB_j \leq v_{b_j} \leq UB_j, \forall j \in \{1, \dots, m\} \\
 & \quad 1 \leq k \leq m
 \end{aligned} \tag{5.1.2}$$

### 5.1.3. MOFBA<sub>3</sub>

MOFBA<sub>3</sub> propone un modelo surrogado para optimizar los metabolitos de interés. El modelo surrogado maximiza el hipervolumen, y minimiza la distancia generacional, entre los flujos obtenidos para los metabolitos de interés  $\{v_{b_1}, \dots, v_{b_m}\}$  y un conjunto de referencia seleccionados, respectivamente. Las variables de decisión son las mismas consideradas para MOFBA<sub>2</sub>. Se debe hacer notar que, dadas las características de los flujos, el punto de referencia para el cálculo del hipervolumen es  $R = \{1000, 1000, \dots, 1000\}$ , y el conjunto de referencia  $Z_r$  analizado para el cálculo de la distancia generacional son los puntos obtenidos como soluciones óptimas por FBA al optimizar individualmente cada objetivo. La definición formal quedaría como en la ecuación 5.1.3.

$$\begin{aligned}
 \text{MOFBA} \quad & \text{mín } F(v) = -1HV(\{v_{b_1}, \dots, v_{b_m}\}, R), DG(\{v_{b_1}, \dots, v_{b_m}\}, Z_r) \\
 & \text{Subject to} \\
 & \text{FBA}(v_{bk}, v) \text{ is feasible} \\
 & LB_j \leq v_{b_i} \leq UB_j, \forall i \in \{1, \dots, m\} \\
 & 1 \leq k \leq m
 \end{aligned} \tag{5.1.3}$$

### 5.1.4. MOFBA<sub>4</sub>

MOFBA<sub>4</sub> es el último problema de optimización propuesto combina las estrategias de optimización de MOFBA<sub>2</sub> y MOFBA<sub>3</sub>. Es decir, propone optimizar no solo los metabolitos de interés, sino también el Hipervolumen y la Distancia Generacional, teniendo como variables de decisión únicamente los metabolitos de interés y el selector  $k$  que indica qué función objetivo se optimizará. La ecuación 5.1.4 define formalmente este problema de optimización.

$$\begin{aligned}
 \text{MOFBA} \quad \min F(v) &= -1HV(\{v_{b_1}, \dots, v_{b_m}\}, R), DG(\{v_{b_1}, \dots, v_{b_m}\}, Z_r)(v_{b_1}, \dots, v_{b_m}) \\
 \text{Subject to} \\
 \text{FBA}(v_{bk}, v) &\text{ is feasible} \\
 \text{LB}_j &\leq v_{bj} \leq \text{UB}_j, \forall i \in \{1, \dots, m\} \\
 1 &\leq k \leq m
 \end{aligned} \tag{5.1.4}$$

Los MOFBA propuestos no se pueden resolver con los solucionadores lineales tradicionales, como FBA. Las alternativas consisten en usar esquemas enumerativos o enfoques aproximados que permitan obtener soluciones pertenecientes a la frontera óptima de Pareto. En este sentido, este trabajo de investigación analizó el uso de metaheurísticas que integran FBA en su proceso de búsqueda como el enfoque de solución ad hoc para este propósito, ya que en cada iteración mejoran su aproximación al frente de Pareto.

## 5.2. DISEÑO DE METAHEURÍSTICAS

Dos metaheurísticas fueron implementadas para resolver los cuatro problemas de optimización MOFBA<sub>1</sub>, MOFBA<sub>2</sub>, MOFBA<sub>3</sub>, y MOFBA<sub>4</sub>. Estas metaheurísticas se basan en los marcos de trabajo de NSGAI y MOEAD.

Las metaheurísticas consideradas requieren la definición de las siguientes características: 1) método de inicialización de la población; 2) esquema de codificación; 3) función de evaluación de la aptitud; 4) operadores genéticos; y 5) estrategia de manejo de restricciones. El método de inicialización de la población para ambas estrategias (NSGAI y MOEAD) es aleatorio. El conjunto propuesto para el resto de estos componentes para manejar los MOFBAs propuestos se detallan en el resto de esta sección.

### 5.2.1. Esquemas de representación de las soluciones

Este trabajo propone el uso de conjuntos distintivos de codificación de soluciones para cada MOFBA (como se definen en las Ecuaciones 5.1.1 a 5.1.4).

Esquema de codificación propuesto  $W$  PARA MOFBA<sub>1</sub> considera una red metabólica  $M_N$  constituida por un conjunto de reacciones  $\mathcal{V}$ , y dos subconjuntos  $\mathcal{V}^M, \mathcal{V}^b \subseteq \mathcal{V}$ , donde  $\mathcal{V}^M \cap \mathcal{V}^b = \emptyset$ , que representan las reacciones de los metabolitos de interés para un tomador de decisiones. Además, sea  $v = (v_1, \dots, v_n)$  el vector de flujos para  $\mathcal{V}$  y supongamos que existen límites inferiores y superiores iniciales  $LB_i, UB_i$  para cada  $v_i, 1 \leq i \leq n$ . Entonces, el esquema de codificación  $\mathcal{W}$  propone la redefinición de los límites de cada  $v_i$  asociada con una reacción en  $\mathcal{V}^M \cup \mathcal{V}^b$  usando dos valores  $(I_i, \Delta_i)$ . Los nuevos límites se calculan como  $LB_i^{new} = I_i$  y  $UB_i^{new} = (UB_i - I_i)\Delta_i + I_i$ . Todos los flujos restantes mantendrán sus límites sin cambios. En otras palabras, la solución codifica cambios en los límites para que FBA resuelva  $\mathcal{M}_N$  utilizando un bioproducto preespecificado, que en este trabajo se supone que es  $v_1^b$ . El vector de codificación resultante  $w$  es de tamaño  $2|\mathcal{V}^M| + 2|\mathcal{V}^b|$ . La Tabla 5.1 muestra un ejemplo gráfico de  $w$  aplicado a un caso con  $|\mathcal{V}| = 7$ , and  $|\mathcal{V}^M| = |\mathcal{V}^b| = 3$ . Teniendo como cotas iniciales  $LB_i = 0$ , y  $UB_i = 10$ , y considerando  $\mathcal{V}^M = \{v_1, v_2, v_3\}$  y  $\mathcal{V}^b = \{v_4, v_5, v_6\}$ , el uso de  $w$  resultará en los nuevos límites  $(LB, UB) = \{(5, 7.5), (0, 7.5), (2, 8.4), (10, 10), (2.5, 6.25), (7.5, 8.75)\}$ . Señalemos que cualquier aplicación de  $\mathcal{W}$  sobre un reacción  $i$  utiliza sus valores iniciales para  $LB_i, UB_i$ .

Encode Solution $w$											
Variables de decisión						Objetivos					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$LB_{v_1^M}$	$\Delta_{v_1^M}$	$LB_{v_2^M}$	$\Delta_{v_2^M}$	$LB_{v_3^M}$	$\Delta_{v_3^M}$	$LB_{v_1^b}$	$\Delta_{v_1^b}$	$LB_{v_2^b}$	$\Delta_{v_2^b}$	$LB_{v_3^b}$	$\Delta_{v_3^b}$
5	0.50	0	0.75	2	0.80	10	1.00	2.5	0.50	7.5	10

**Tabla 5.1:** Codificación de la solución propuesta para MOFBA.

Para MOFBA<sub>2</sub>, MOFBA<sub>3</sub>, MOFBA<sub>4</sub> se consideran como esquema de codificación un vector de tamaño  $n + 1$ , donde  $n$  es el número de funciones objetivo. Los primeros  $n$  elementos del vector son variables reales cuyo valor representa la cota superior de flujo para cada metabolito de interés en las reacciones asociadas. El elemento adicional es un selector de optimización mono-objetivo que toma valores entre 1 y  $n$ , indicando que metabolito se va a optimizar en turno. Cuando se trate de una reacción reversible, el valor en la variable indicada será mismo para la cota inferior (pero en negativo).

**Función de evaluación de Aptitud.** Entre todos los problemas de optimización MOFBA, las funciones de evaluación de aptitud (o FEA), consideran un subconjunto derivado de conjunto compuesto por los valores de los flujos de metabolitos de interés como de las métricas de Hipervolumen y Distancia Generacional. Dado que la información requerida sobre los bioproductos está asociada a reacciones específicas, se evalúa la aptitud de una solución obtenida por las metaheurísticas sobre los MOFBA considerando sus valores de flujo. En MOFBA<sub>1</sub> Y MOFBA<sub>2</sub>, los criterios o funciones objetivo a optimizar serán los flujos de las reacciones correspondientes a los bioproductos de interés elegidos en  $\mathcal{V}^b$  y denotados  $(v_1^b, \dots, v_m^b)$ . En MOFBA<sub>3</sub>, se optimiza el Hipervolumen y la Distancia Generacional obtenidos a partir de una solución y el punto de referencia  $R$  y el conjunto de referencia  $Z_r$  definidos como sigue. El punto  $R$  es el peor valor extremos posible de flujos, que es 1000 para cualquier metabolito de interés, considerando su definición para FBA, en plataformas de amplio uso, como CobraPy. El conjunto  $Z_r$  se compone de tres puntos, que incluyen los flujos óptimos obtenidos al resolver mediante el método FBA el caso en cuestión optimizando individualmente cada metabolito de interés, por lo tanto, si son  $n$  funciones objetivo,  $Z_r$  tendrá una cardinalidad de  $n$ . Cabe mencionar que cuando se requiere un bioproducto líder, en MOFBA<sub>2</sub> a MOFBA<sub>4</sub> éste se elige derivado del valor de una de las variables de decisión consideradas, como se describió previamente.

### 5.2.2. Operadores genéticos

Estos operadores crean nuevas soluciones variando dinámicamente y aleatoriamente los valores de las variables de decisión en las soluciones existentes. Su selección se debió a su éxito en la resolución de problemas que involucran variables de decisión con valores reales [131]. Los operadores elegidos para NSGAI para mutación, cruce y selección fueron Mutación polinomial [132], SBXCrossover [133] y una selección aleatoria simple pero confiable, respectivamente. Los valores concretos de estos parámetros fueron tomados de la literatura y se muestran en la tabla 5.2.

**Tabla 5.2:** *Parámetros específicos de implementación de NSGAI.*

Parámetro	Valor
Mutación Polinomial	Probabilidad = $1.0/d$ , donde $d$ es el número de variables de decisión. Índice de Distribución = 20
SBXCrossover	Probabilidad = 100% Índice de Distribución = 20
Criterio de Paro	Al cumplirse 100000 evaluaciones
Tamaño de la Población	100

Los operadores elegidos para MOEAD para mutación y cruce fueron Mutación polinomial [134], con cruce por evolución diferencial. La estrategia de selección es aleatoria simple pero confiable, respectivamente, y la función de agregación empleada fue la distancia de Tshebycheff. Para una referencia más amplia de los operadores revisar [109]. Los valores concretos de estos parámetros fueron tomados de la literatura, y se muestran en la tabla 5.3.

**Tabla 5.3:** *Parámetros específicos de implementación de MOEAD.*

Parámetro	Valores
Mutación Polinomial	Probabilidad = $1.0/d$ , donde $d$ es el número de variables de decisión. Índice de Distribución = 20
Evolución Diferencial	CR = 1 F=0.5 K=0.5
Criterio de Paro	Al cumplirse 100000 evaluaciones
Tamaño de la Población	100

### 5.2.3. Esquema de manejo de restricciones.

Este trabajo utiliza el método de manejo de restricciones propuesto en [135] para generar presión selectiva hacia solución factibles. A medida que las generaciones evolucionan en ambas metaheurísticas, la competencia entre soluciones siempre preferirá la solución factible, a pesar del estado de no dominación. A la larga, tal estrategia tiende a erradicar las soluciones inviables en el informe final del algoritmo.

## 5.3. CASOS DE ESTUDIO

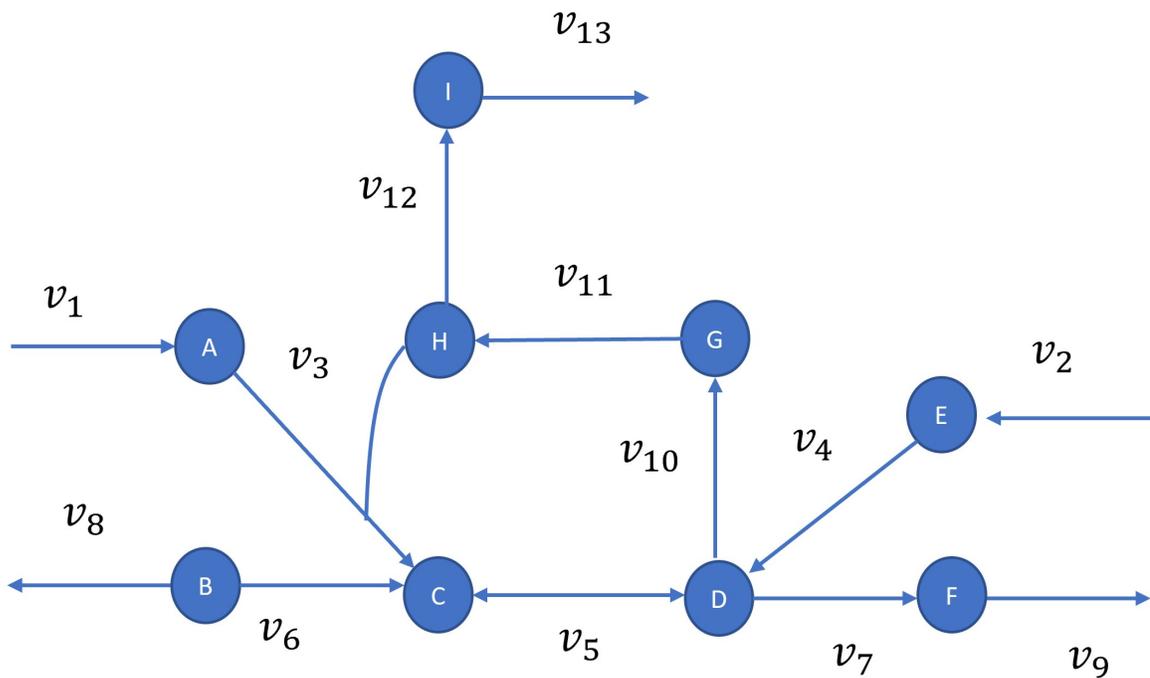
### 5.3.1. Red piloto

En la investigación de soluciones eficaces en problemas multiobjetivos, se comenzaron a llevar a cabo pruebas en redes pequeñas creadas de forma ficticia con el fin de evaluar el desempeño de los diversos

algoritmos, con el fin de examinar su factibilidad y la problemática que presentaban. Por ejemplo, los intervalos de límites de flujos, ya que en los modelos metabólicos reales existen diversas reacciones que presentan reversibilidad, estas reacciones son representadas de forma matemática, estableciendo un rango de límites inferiores desde -1000 hasta 1000. Además, se introdujo un ciclo, que ocurre de manera habitual en el metabolismo.

Esta red piloto consta de 13 reacciones y 10 metabolitos mostrados en la tabla 5.4, creadas de forma ficticia. Con las reacciones  $v_3, v_5, v_{10}$  y  $v_{11}$ , se simuló un ciclo, debido a que estos existen de forma abundante en sistemas metabólicos, por ejemplo, el ciclo de Krebs y el TCA. Se añadió una reacción reversible  $v_5$  donde los upper bound y lower bound fueron desde -100 hasta 100 respectivamente. Estas cuotas establecidas permiten a la reacción ir a la inversa dependiendo de las necesidades celulares. En esta red se optimizaron 3 reacciones simultáneamente,  $v_8, v_9, v_{13}$ . La optimización se realizó mediante los algoritmos NSGAI y MOEAD. En la Figura 5.4, se presenta la representación gráfica de la red piloto.

Figura 5.1: Red piloto.



Nombre	Fórmula
$v_1$ :	$\rightarrow A$
$v_2$ :	$A \rightarrow C$
$v_3$ :	$H + A \rightarrow C$
$v_4$ :	$E \rightarrow D$
$v_5$ :	$C \rightleftharpoons D$
$v_6$ :	$C \rightarrow B$
$v_7$ :	$D \rightarrow F$
$v_8$ :	$B \rightarrow$
$v_9$ :	$F \rightarrow$
$v_{10}$ :	$D \rightarrow G$
$v_{11}$ :	$G \rightarrow H$
$v_{12}$ :	$H \rightarrow I$
$v_{13}$ :	$I \rightarrow$

**Tabla 5.4:** Reacciones de la red piloto.

### 5.3.2. Caso de Estudio: Red metabólica *C. reinhardtii*

Este trabajo analiza el FBA de un módulo importante de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. La Figura 5.2 presenta la red metabólica relacionada, y la Tabla 5.5 las reacciones correspondientes. Este caso presenta tres bioproductos de interés que son proteínas, carbohidratos y  $CO_2$  (indicados aquí como  $v_{10}$ ,  $v_{14}$ , y  $v_{18}$ ). Además, estas redes muestran tres sustratos principales que son acetato, E4P y X5P (o  $v_1$ ,  $v_{16}$ , y  $v_{17}$ , respectivamente). La optimización de los tres bioproductos ( $v_{10}$ ,  $v_{14}$ ,  $v_{18}$ ) teniendo como variables de decisión de control ( $v_1$ ,  $v_{16}$ ,  $v_{17}$ ) es la base para validar NSGAII. La siguiente sección presenta detalles específicos sobre el experimento realizado.

Nombre	Fórmula	Fórmula	Fórmula
v1 :	-> acetato	v10 :	PROT ->
v2 :	acetato -> ACCOA	v11 :	T3P <=> F6P
v3 :	acetato -> CIT	v12 :	F6P <=> G6P
v4 :	CIT ->	v13 :	G6P -> CARB
v5 :	ACCOA -> OAA	v14 :	CARB ->
v6 :	OAA <=> PEP + CO2	v15 :	E4P + X5P -> F6P + T3P
v7 :	PEP <=> T3P	v16 :	-> E4P
v8 :	PEP -> PYR	v17 :	-> X5P
v9 :	PYR -> PROT	v18 :	CO2->

Tabla 5.5: Reacciones derivadas de la red metabólica 5.2.

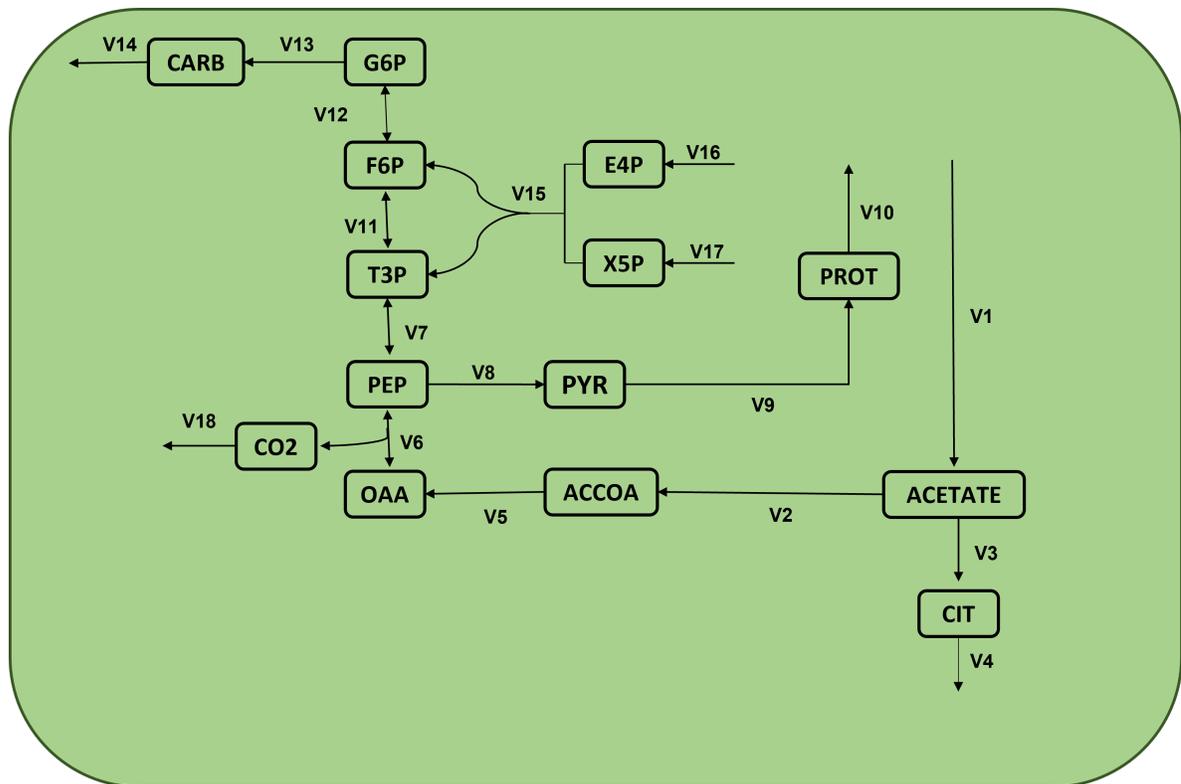


Figura 5.2: Red Metabólica de *Chlamydomonas reinhardtii*.

### 5.3.3. Caso de estudio: Distribución de flujos asociados al metabolismo del glutamato de la microalga *Chlorella vulgaris*.

En la Figura 5.3 se observa la distribución de flujos asociadas al metabolismo del glutamato para la microalga *C.Vulgaris*, en el cloroplasto y en el citoplasma, en 3 diferentes condiciones de crecimiento autotrofia, heterotrofia y mixotrofia este metabolismo es de gran importancia porque están involucradas las vías para la producción de diferentes productos de interés los aminoácidos como la tirosina, valina, leucina etc., que después pueden ser utilizados en la producción de proteínas.

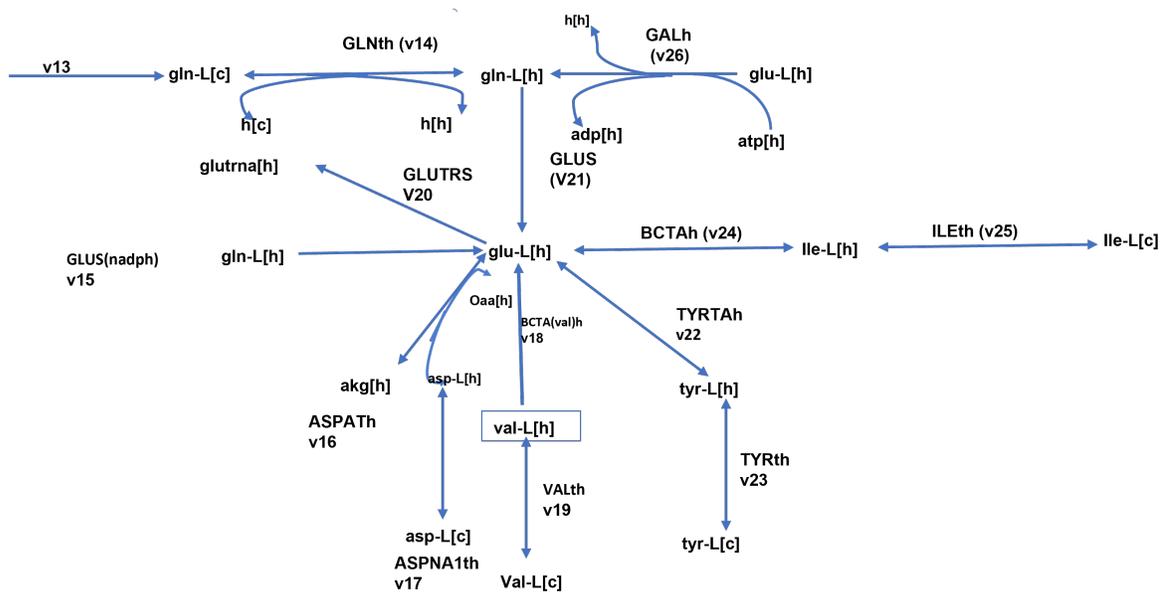


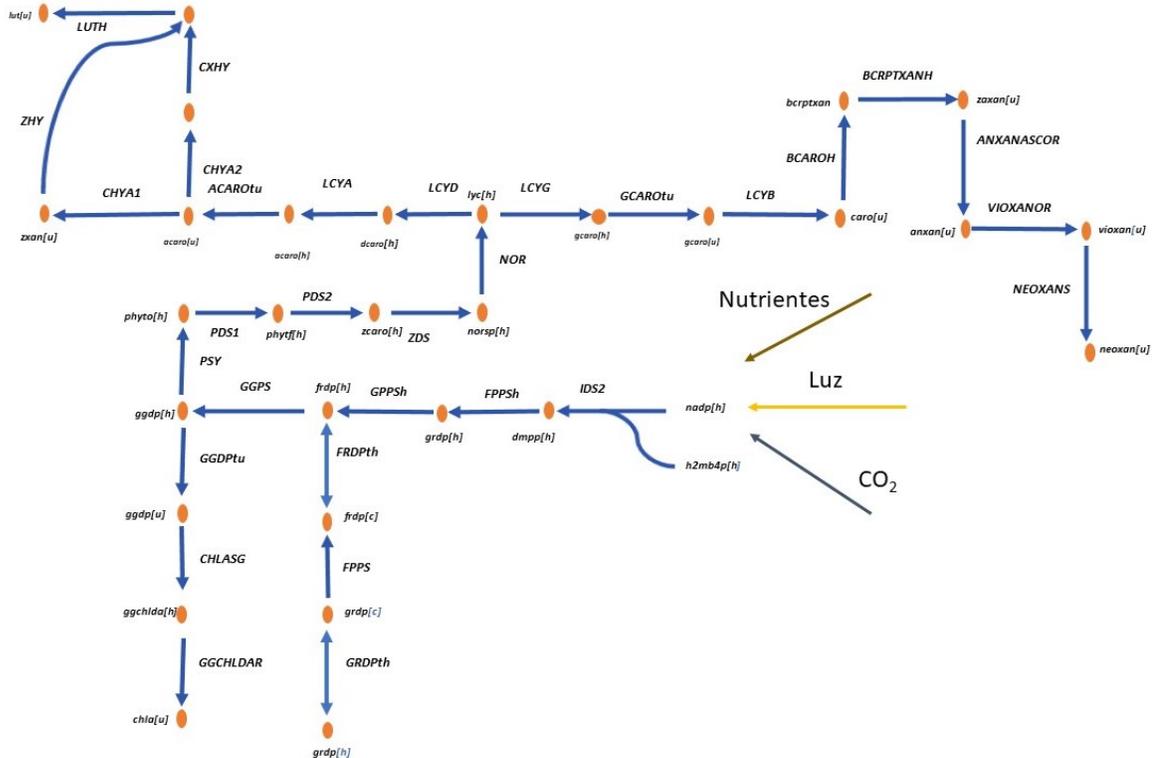
Figura 5.3: Red Metabólica de Distribución de flujos asociadas al metabolismo del glutamato.

### 5.3.4. Caso de estudio: Distribución de flujos en la biosíntesis de pigmentos de la microalga *Chlorella vulgaris*.

Se estudio la red metabólica de la microalga *Chlorella vulgaris* [4], mediante el algoritmos NSGAIL para 3 diferentes condiciones de cultivo, fotoautotrofia (luz + componentes), heterotrofia (componente), y mixotrofia ( $CO_2$  + luz + componente). Entre los compuestos que se usaron como nutrientes para el

cultivo, fueron la adición de fuentes de nitrógeno, como  $NO_3$ ,  $NH_4$ , además de sulfatos como el  $SO_4$ ,  $Fe_2$ , Magnesio. Las diferentes fuentes de cultivo afectan la producción de metabolitos. En la siguiente figura se puede observar la distribución de pigmentos en la microalga *C. vulgaris* [4].

**Figura 5.4:** Distribución de flujos de pigmentos de la microalga *Chlorella vulgaris* [4].



En este caso se estudiará una parte de la red de la distribución de pigmentos, ya que existe una gran importancia el estudio de la síntesis de la distribución de estos en las microalgas como la *C. vulgaris*, entre estos pigmentos se puede observar que la síntesis de clorofila a se activa en la reacción GGCHLDAR (geranilgeranil-clorofilida a reductasa), cuando existe condiciones de cultivo de fotoautotofía y mixotofía, donde existe una fuente de luz que favorece a la fotosíntesis, en el cultivo de manera heterotrofica esta reacción se mantiene inactiva ya que no existe fuente de luz y solo se administran nutrientes como nitratos, sulfatos, fierro y Magnesio.

La reacción GRDPth (transporte de pirofosfato de geranilo) solo se activa en autotofía cuando no existe

adición de  $CO_2$ , pero existe una fuente de luz y nutrientes que sirve para su desarrollo, esta reacción conduce a la síntesis de isoprenoides involucrados en la fotosíntesis, como clorofilas y carotenoides.

La reacción CHLBSG (clorofila b sintasa (geranilgeranilo)) la síntesis de la geranilgeranil-clorofila b en el caso de heterotrofia se puede seguir sintetizando en menor proporción a comparación de autotrofia, pero en mixotrofia al añadirle el  $CO_2$  la síntesis de producción de clorofila b se inactiva, debido a que en algunos estudios se ha encontrado que la síntesis de pigmentos se ve disminuida al añadirle una cantidad alta de  $CO_2$ .

En la reacción LUTH (lutein hydroxylase) a partir de la luteína, se puede obtener la luteoxantina un pigmento que se encuentra activo en todas las formas de cultivo, pero el flujo se encuentra en menor proporción en heterotrofia y en mayor proporción en fotoautotrofia.

En NEOXANS (Neoxantina sintasa), la síntesis de neoxantina se encuentra activa en los 3 diferentes tipos de cultivo, pero se encuentra en menor proporción en el cultivo heterotrofico, y en mayor proporción en fotoautotrofia, así como en la formación de luteoxantina, se confirma que a mayor proporción de  $CO_2$  se ve disminuida la formación de pigmentos.

### 5.3.5. Caso de estudio: Red metabólica *Dunaliella salina*

En la Figura 5.5 se muestra el mapa simplificado de las reacciones presentes en el modelo de la microalga *D. Salina*, mostrando rutas para la obtención de carotenos, lípidos y aminoácidos se realizó en la aplicación Escher es de uso libre y te permite visualizar, editar y construir mapas de rutas metabólicas, tiene precargado diferentes modelos como el de . [136]. Hasta ahora el modelo contiene 1008 reacciones, donde se evaluaron los flujos metabólicos usando NSGAI y MOEAD.



## 5.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Esta subsección presenta el conjunto de experimentos realizados con el fin de validar la aplicación de los modelos optimización propuestos como herramientas para mejorar la comprensión de los metabolismos en microalgas. Con el propósito de simplificar los resultados presentados, las cuatro redes metabólicas de microalgas consideradas como caso de estudio fueron analizadas en cada experimento, y los resultados reportados son consistentes con las observaciones descritas.

Considerando la  $H_0$  presentada en el Capítulo 4, se propusieron cinco experimentos, resumidos en la Tabla 5.6.

**Tabla 5.6:** *Diseño de Experimentos para demostrar el soporte Metaheurístico para la comprensión del metabolismo en microalgas.*

<b>Experimento</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Variables Involucradas</b>
<i>Experimento<sub>1</sub></i>	Demostrar que el uso de metaheurísticas da soporte a la comprensión del metabolismo de microalgas	<i>C. reinhardtii</i> , FBA, NSGAI, <i>MOFBA<sub>1</sub></i>
<i>Experimento<sub>2</sub></i>	Usar diferentes modelos de optimización produce diferentes resultados	<i>C. vulgaris</i> , NSGAI, <i>MOFA<sub>1</sub></i> , <i>MOFBA<sub>2</sub></i> , <i>MOFBA<sub>3</sub></i> , <i>MOFBA<sub>4</sub></i>
<i>Experimento<sub>3</sub></i>	Existen algoritmos de optimización más adecuados para resolver problemas específicos	<i>C. vulgaris</i> , red piloto, NSGAI, MOEAD, <i>MOFBA<sub>4</sub></i>
<i>Experimento<sub>4</sub></i>	Validar que una selección aleatoria no es suficiente	<i>C. Vulgaris</i> , NSGAI, FBA, Random
<i>Experimento<sub>5</sub></i>	Confirmar la distribución en otras microalgas	<i>C. vulgaris</i> , NSGAI, <i>MOFBA<sub>4</sub></i>
<i>Experimento<sub>6</sub></i>	Es posible resolver redes con números grandes de metabolitos y reacciones	<i>D. sallina</i> , NSGAI, <i>MOFBA<sub>4</sub></i>

En el Experimento 1 se fijó el algoritmo, la microalga, y se comparó el modelo mono-objetivo de FBA contra el multiobjetivo definido por *MOFBA<sub>1</sub>*. Se observó que el metabolismo de una microalga se puede describir con diferentes flujos, no uno solo, y estos se pueden controlar para obtener información en diferentes metabolitos de interés.

El Experimento 2 se buscó demostrar que diferentes modelos de optimización multiobjetivo ofrecen diferentes resultados. Se fijó el algoritmo a NSGAI, se modificó la microalga para demostrar la versatilidad del enfoque, y finalmente, se analizaron los 4 modelos de optimización propuestos. Para los casos estudiados se observó que el mejor consistentemente era el MOFBA<sub>4</sub>, que fue utilizado en los experimentos subsecuentes.

El Experimento 3 evaluó el desempeño de distintos algoritmos sobre un mismo problema de optimización. Lo observado fue que, para los tres objetivos (es decir, tres metabolitos de interés) considerados, NSGAI fue el mejor. Este resultado es consistente con la literatura dado que para dos o tres objetivos NSGAI muestra un mejor desempeño que MOEAD. Dejando abierta la pregunta si MOEAD, mejorará para un número mayor de objetivos, lo cual es una línea de investigación abierta para su aplicación en el estudio de redes metabólicas de microalgas.

El Experimento 4 muestra que simplemente un muestreo aleatorio no es suficiente para obtener una mejor distribución de las soluciones. Algo que es posible a través de uso de metaheurísticas.

Los Experimentos 5 y 6 confirman la facilidad de adaptación de los métodos propuestos a distintos tipos de redes metabólicas, considerando diferentes configuraciones o bien un incremento considerable en el número de sus componentes (p.e., el caso de *D. salina*).

---

# Resultados y Análisis

## 6.1. RESULTADOS

### 6.1.1. Experimento 1

En el caso de estudio de la red metabólica 5.3.2 Se realizó un análisis de las soluciones encontradas con NSGAI y FBA. La calidad de la solución se comparó estadísticamente entre NSGAI y las distintas soluciones informadas por FBA para cada configuración, y cada objetivo tomó la delantera. Se probó la hipótesis nula  $H_0$  : Las medianas de las diferencias entre las dos muestras del grupo son iguales. Usando la prueba estadística de Wilcoxon con un nivel significativo establecido en 0.01, y como pares de muestras grupales  $(NSGAI_{MinEuclid}, FBA_{Obj_1})$ ,  $(NSGAI_{MinEuclid}, FBA_{Obj_2})$ ,  $(NSGAI_{MinEuclid}, FBA_{Obj_3})$ , los valores  $-p$  obtenidos fueron 0.000018, 0.000026, y 0.000087, respectivamente. Estos resultados significan un rechazo de  $H_0$  y, por lo tanto, indican que existe una diferencia entre los resultados de

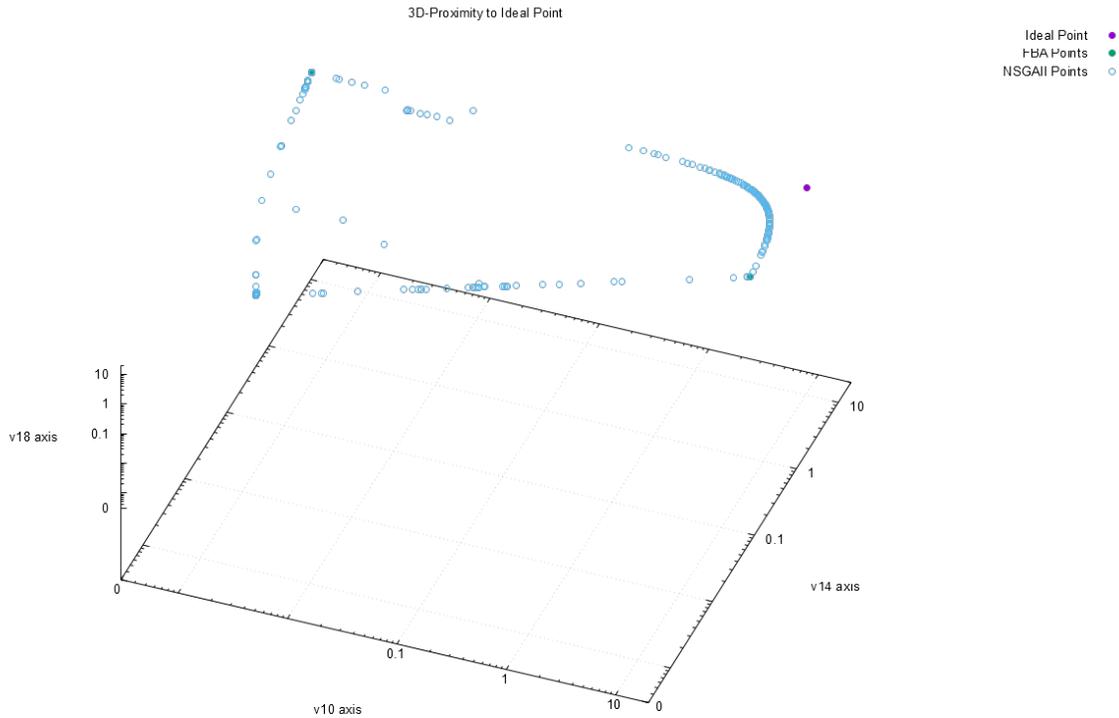
calidad de NSGAI y FBA, favoreciendo a NSGAI debido a sus valores más bajos.

Los resultados en la tabla 6.1 muestran que NSGAI mejoró FBA en términos de calidad. Considerando múltiples objetivos, NSGAI obtuvo soluciones más cercanas al punto ideal que las obtenidas por FBA. Además, la prueba estadística confirma que efectivamente existe una diferencia significativa entre estos resultados. Además, el buen desempeño de NSGAI con respecto al indicador de diversidad  $\mathcal{D}$  también se confirma según los valores mostrados en la Columna 6, donde el número de soluciones va desde unas pocas decenas hasta varios cientos, dependiendo de la configuración, mientras que la FBA clásica generalmente ofrece solo una solución cuando no se usa el análisis de varianza de flujo (FVA).

Distancia euclidiana al punto ideal					
Config.	$\mathcal{Q}^{NSGAI}$	$\mathcal{Q}^{FBA}_{Obj_1}$	$\mathcal{Q}^{FBA}_{Obj_2}$	$\mathcal{Q}^{FBA}_{Obj_3}$	$ F_0 $
$C_0$	7.16	10.12	10	10	349
$C_1$	8.07	10.12	10	10	158
$C_2$	11.56	14.23	14.14	14.14	2501
$C_3$	11.56	14.23	14.14	14.14	1701
$C_4$	7.12	10.12	10	10	217
$C_5$	8.34	10.12	10	10	359
$C_6$	8.19	14.23	10	10	617
$C_7$	10	10.12	14.14	10	53
$C_8$	10	10.12	14.14	10	68
$C_9$	10	14.27	10	10	147
$C_{10}$	8.25	14.31	10	10	397
$C_{11}$	8.24	14.31	10	10	279
$C_{12}$	7.13	10.12	10	10	218
$C_{13}$	0	0	0	0	125
$C_{14}$	8.16	10	10	14.14	1821
$C_{15}$	8.16	10	10	14.14	1646
$C_{16}$	0	0	0	0	189
$C_{17}$	0	0	0	0	216
$C_{18}$	9.98	10	10	10	160
$C_{19}$	0	0	0	0	88
$C_{20}$	0	0	0	0	171
$C_{21}$	8.20	10.06	10.06	10	202
$C_{22}$	7.13	10.12	10.12	10	325
$C_{23}$	7.13	10.12	10.12	10	465
$C_{24}$	0	0.06	0.06	0	81
$C_{25}$	0	0	0	0	125
$C_{26}$	8.17	10	10	14.14	1597
$C_{27}$	8.18	10	10	14.14	1199
$C_{28}$	0	0	0	0	175
$C_{29}$	0	0	0	0	280
$C_{30}$	0	0	0	0	391
$C_{31}$	8.27	10	10	10	276
$C_{32}$	7.17	10	10	10	261
$C_{33}$	0	0	0	0	122
$C_{34}$	0	0	0	0	55
$C_{35}$	0	0	0	0	90
$C_{36}$	0	0	0	0	25

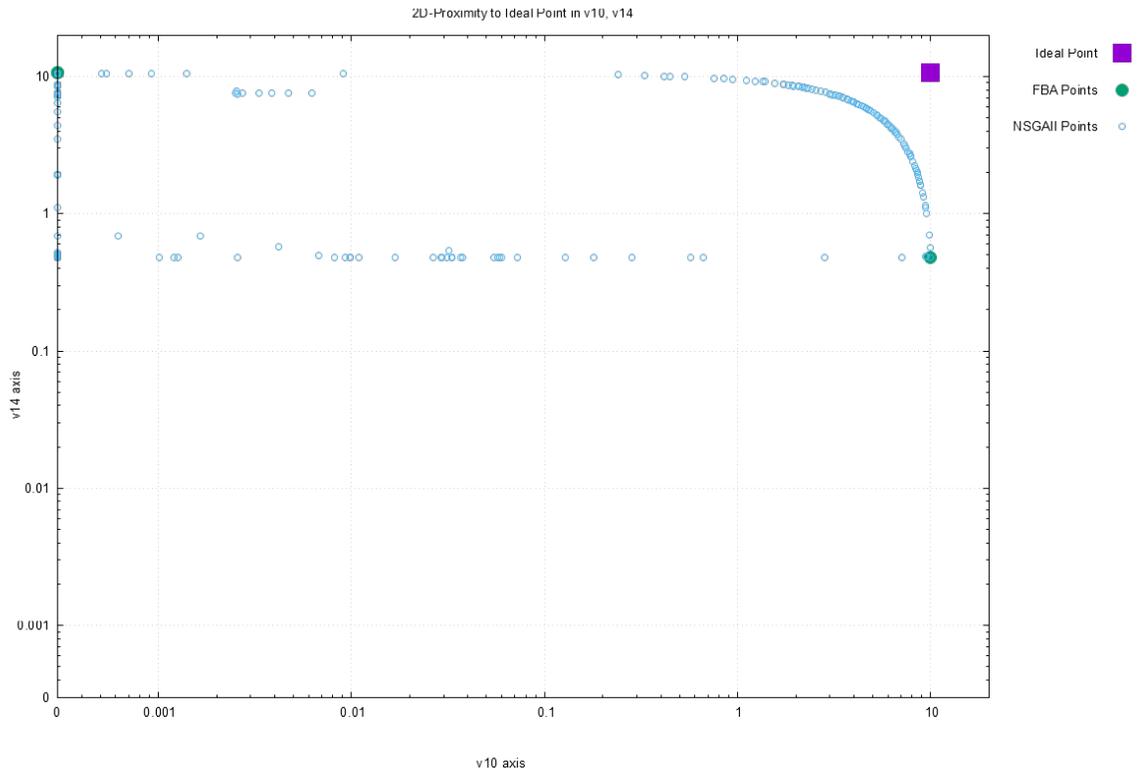
**Tabla 6.1:** Reporte sobre las mejores distancias euclidianas al punto ideal.

**Figura 6.1:** Aproximación de Pareto para la configuración  $C_0$  con respecto a los objetivos  $(v_{10}, v_{14}, v_{18})$ .

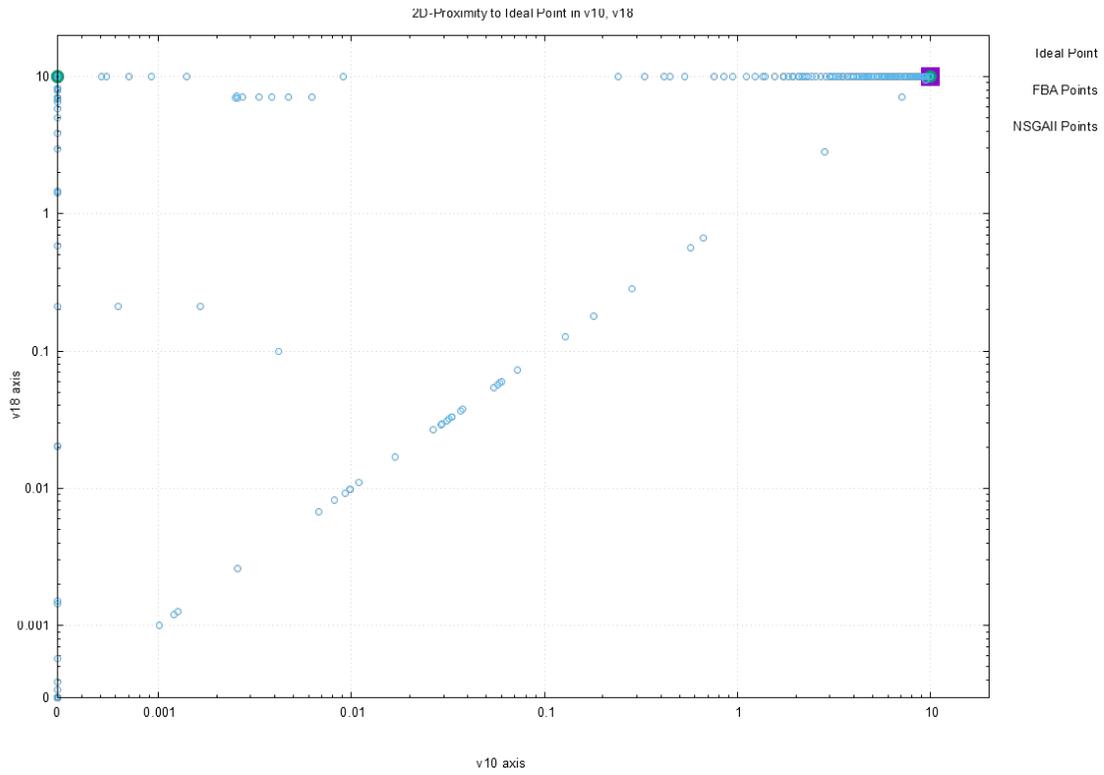


Las Figuras 6.1, 6.2, 6.3 y 6.4 ofrecen una perspectiva del comportamiento de NSGAI con respecto al indicador de dispersión  $\mathcal{S}$  aplicado a los resultados obtenidos en la configuración  $C_0$ . Todas estas figuras muestran el punto ideal en color púrpura, las tres soluciones reportadas por FBA en color verde y todas las soluciones reportadas por NSGAI en círculos azules. De estos gráficos, hay tres observaciones principales que deben comentarse: 1) primero, las soluciones de NSGAI describen el contorno real de la frontera de Pareto, mientras que las soluciones de FBA son solo puntos extremos; 2) existen soluciones más cercanas al punto ideal a pesar de que Logística de Amazon garantiza soluciones óptimas; y, 3) las soluciones de NSGAI están ampliamente distribuidas en la frontera de Pareto. Por lo tanto, a partir de las observaciones anteriores, se puede notar que la propagación de NSGAI mejora la de FBA; este comportamiento se repite en todas las demás configuraciones.

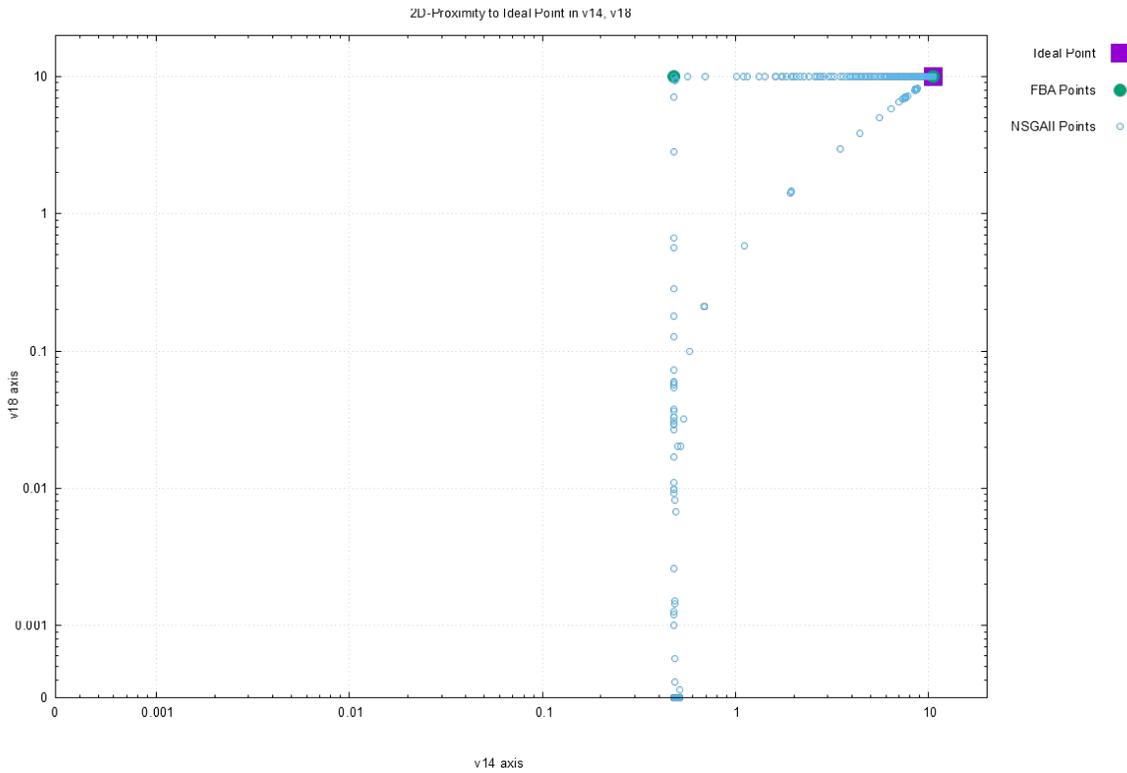
**Figura 6.2:** Aproximación de Pareto para la configuración  $C_0$  con respecto al plano formado por objetivos  $(v_{10}, v_{14})$ .



**Figura 6.3:** Aproximación de Pareto para la configuración  $C_0$  con respecto al plano formado por objetivos  $(v_{10}, v_{18})$ .



**Figura 6.4:** Aproximación de Pareto para la configuración  $C_0$  con respecto al plano formado por objetivos  $(v_{14}, v_{18})$ .

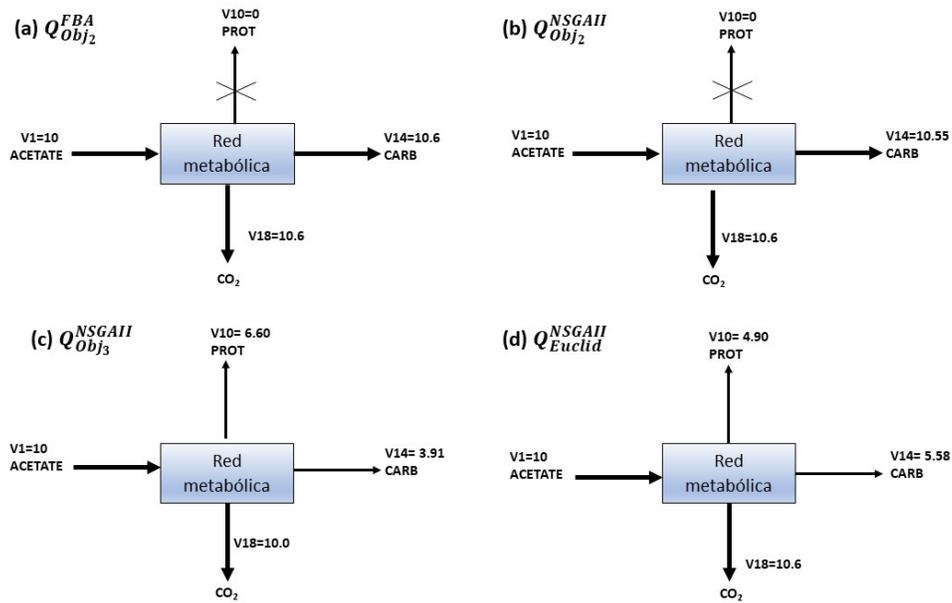


En la tabla 6.2 se muestra una mirada numérica más cercana a las diferencias entre NSGAI y FBA bajo la configuración  $C_0$ . Esta tabla compara los flujos logrados por FBA en cada caso, contra algunas soluciones seleccionadas reportadas por NSGAI.

		$Q_{Obj_1}^{FBA}$	$Q_{Obj_2}^{FBA}$	$Q_{Obj_3}^{FBA}$	$Q_{Obj_1}^{NSGAI}$	$Q_{Obj_2}^{NSGAI}$	$Q_{Obj_3}^{NSGAI}$	$Q_{Euclid}^{NSGAI}$
POR OBJETIVO	$v_{10}$	0	10	10	0	9.99	3.93	5.099
	$v_{14}$	10.12	0	0	10.11	0.045	6.68	5.019
	$v_{18}$	0	0	0	0	0	0	0
EUCLIDEANA		10.12	10	10	10.119	10	7.49	7.15
OBJECTIVO	$v_{10}$	10	0	0	10	3.80E-09	6.60	4.90
	$v_{14}$	0.48	10.6	10.6	0.48	10.55	3.91	5.58
	$v_{18}$	10	10	10	10	10	10	10
FLUJOS	$v_1$	10	10	10	10	10	10	10
	$v_{16}$	0.24	0.30	0.30	0.24	0.27	0.26	0.24
	$v_{17}$	0.24	0.30	0.30	0.24	0.27	0.26	0.24
	$v_1$	10	10	10	10	10	10	10
	$v_2$	10	10	10	10	10	10	10
	$v_3$	0	0	0	0	0	0	0
	$v_4$	0	0	0	0	0	0	0
	$v_5$	10	10	10	10	10	10	10
	$v_6$	10	10	10	10	10	10	10
	$v_7$	0	10	10	0	9.99	3.93	5.099
	$v_8$	10	0	0	10	3.80e-09	6.60	4.90
	$v_9$	10	0	0	10	3.80e-09	6.60	4.90
	$v_{10}$	10	0	0	10	3.80e-09	6.60	4.90
	$v_{11}$	0.24	10.3	10.3	0.24	10.27	3.65	5.34
	$v_{12}$	0.48	10.6	10.6	0.48	10.55	3.91	5.58
	$v_{13}$	0.48	10.6	10.6	0.48	10.55	3.91	5.58
	$v_{14}$	0.48	10.6	10.6	0.48	10.55	3.91	5.58
	$v_{15}$	0.24	0.3	0.3	0.24	0.27	0.26	0.24
$v_{16}$	0.24	0.3	0.3	0.24	0.27	0.26	0.24	
$v_{17}$	.24	0.3	0.3	0.24	0.27	0.26	0.24	
$v_{18}$	10	10	10	10	10	10	10	

**Tabla 6.2:** Flujos obtenidos mediante FBA, contra algunas soluciones seleccionadas obtenidas por NSGAI y su distancia euclídeana.

**Figura 6.5:** Distribución de flujos de la distribución objetivo, (a) Optimización del flujo  $v_{14}$  usando FBA, (b), (c),(d), corresponden a diferentes distribuciones de flujos obtenidas de la optimización de NSGAI  $v_{14}$ ,  $v_{10}$  y  $v_{18}$  simultáneamente.



La Figura 6.5 es una sobresimplificación de la red metabólica de *Chlamydomonas reinhardtii* (detallada en la figura 5.2). La representación de la Figura 6.5a son valores obtenidos al optimizar el flujo  $v_{14}$  usando FBA. Las cifras 6.5b, 6.5c y 6.5d corresponden a los resultados obtenidos de NSGAI. A partir de estos resultados, se puede ver que una célula siempre produce un compromiso entre la cantidad de biomasa, las reservas de Carbono y su proceso de respiración. Todo lo que ocurre en el interior se distribuye en distintas formas y proporciones. La ventaja de la implementación propuesta de NSGAI es que una ejecución del algoritmo produce varias distribuciones de flujos, en contraste con FBA que solo produce una, el conjunto de soluciones de NSGAI mejora la visión del investigador del escenario fisiológico bajo diferentes condiciones.

El crecimiento de acetato como fuente de carbono de *Chlamydomonas reinhardtii* sintetiza  $CO_2$  como un producto del metabolismo, como se ve en todas las distribuciones de flujos que se muestran en 6.5a-d, denotado como  $v_{18}$ . En este caso, el metabolismo del Carbono actúa como fuente de energía

para el crecimiento de la biomasa.

La Figura 6.5c muestra que el valor de proteína de 6,60 es mayor que el flujo de carbohidratos que corresponde a 3,9, lo que indica una baja acumulación de carbohidratos a favor de una producción de proteína más significativa. Este resultado concuerda con el mayor contenido de proteína observado cuando *Chlamydomonas reinhardtii* se cultiva heterotróficamente [30].

La Figura 6.5d muestra una distribución de flujos ligeramente más uniforme en comparación con las que se muestran en 6.5a, donde todos los flujos se dirigen a la producción de carbohidratos, comprometiendo todo el flujo de proteínas  $v_{10}$ , lo que conduce a un estado sin crecimiento de la biomasa.

NSGAI también puede producir soluciones con valores de flujos similares a los obtenidos de FBA. Por ejemplo, en la Figura 6.5b, los valores son casi iguales a los de la Figura 6.5a, donde los flujos producidos apuntan a la generación de Carbohidratos y  $CO_2$ . Sin embargo, estas soluciones comprometen la producción de proteínas, situación que implica un crecimiento nulo y una condición indeseable para un proceso real, como se discutió en investigaciones experimentales anteriores [30, 137]. Algunas ideas adicionales surgen de los resultados anteriores. Comencemos por la variedad de configuraciones utilizadas en la comparación, esto demuestra la versatilidad de NSGAI para adaptarse a diferentes circunstancias y su capacidad para mejorar el análisis de la red metabólica dada la mayor cantidad de soluciones que produce para cada una de ellas.

Después de eso, el uso de enfoques evolutivos requiere menos recursos que FBA cuando se trata de múltiples objetivos, por ejemplo, tiene la ventaja de gastar menos tiempo y memoria. Los enfoques como NSGAI permiten un mayor poder de elección en el proceso de toma de decisiones también debido a la variedad y cantidad de soluciones, y la posibilidad de un reconocimiento más fácil de los flujos más importantes en una red y su influencia e impacto en lugar de no tener una metodología.

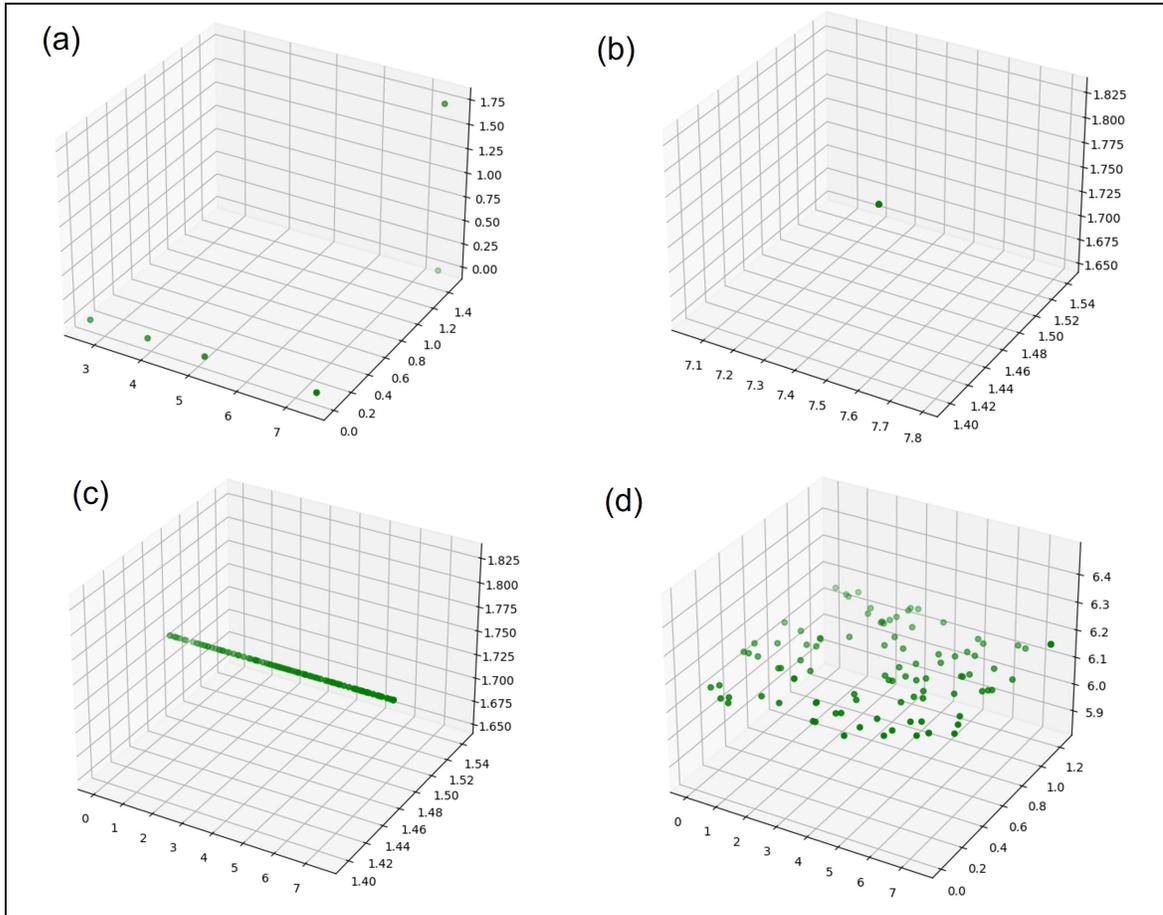
Finalmente, al analizar conjuntos de varias decenas o cientos de soluciones al mismo tiempo en lugar de

solo una a través del enfoque clásico, es posible tener una mejor perspectiva de lo que está sucediendo, teniendo una observación más realista de lo que está sucediendo en el metabolismo celular [138].

### 6.1.2. Experimento 2

En el Experimento 1 se demostró que NSGAIi presenta mejor calidad en las soluciones que el FBA clásico para 3 funciones objetivos. Pero las cuatro variantes descritas anteriormente MOFBA<sub>1</sub>, MOFBA<sub>2</sub>, MOFBA<sub>3</sub>, MOFBA<sub>4</sub> para NSGAIi, pueden ser mejoradas entre sí. En la Figura 6.6 se presenta la distribución de flujos de pigmentos en la microalga *C. reinhardtii*, se puede observar que cada variante de MOFBA ofrece distintos comportamientos, todos mejoran al FBA Figura 6.6a), b) y c) pero el mejor comportamiento en las soluciones se pudo observar en la variante de MOFBA<sub>4</sub> Figura 6.6d).

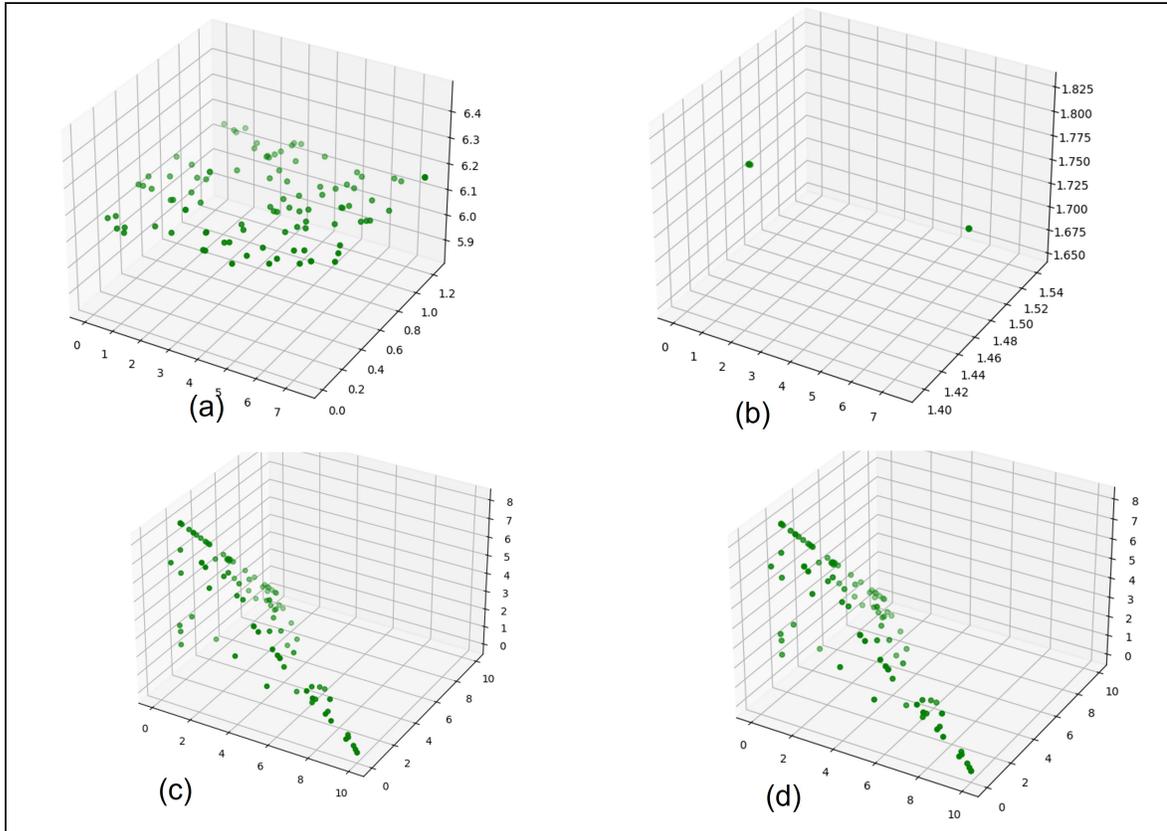
**Figura 6.6:** Comparación entre el algoritmo NSGAI y las variantes (a) MOFBA<sub>1</sub>, (b) MOFBA<sub>2</sub>, (c) MOFBA<sub>3</sub> y (d) MOFBA<sub>4</sub> en la distribución de flujos de pigmentos 5.3.4.



### 6.1.3. Experimento 3

En la Figura 6.7 se presenta la evaluación entre los algoritmos NSGAI 6.7a) y MOEAD 6.7b) en la distribución de flujos asociados al metabolismo del glutamato de la microalga *C. vulgaris* y de la red piloto NSGAI 6.7c) y MOEAD 6.7d) con la variante del algoritmo MOFBA<sub>3</sub>. Se probó que el algoritmo NSGAI presenta una diversidad de resultados a comparación de MOEAD. La metaheurística es importante, y en este caso NSGAI es la mejor, lo cual es coherente con la literatura, por que este algoritmo tiene buen comportamiento con 2 y 3 objetivos.

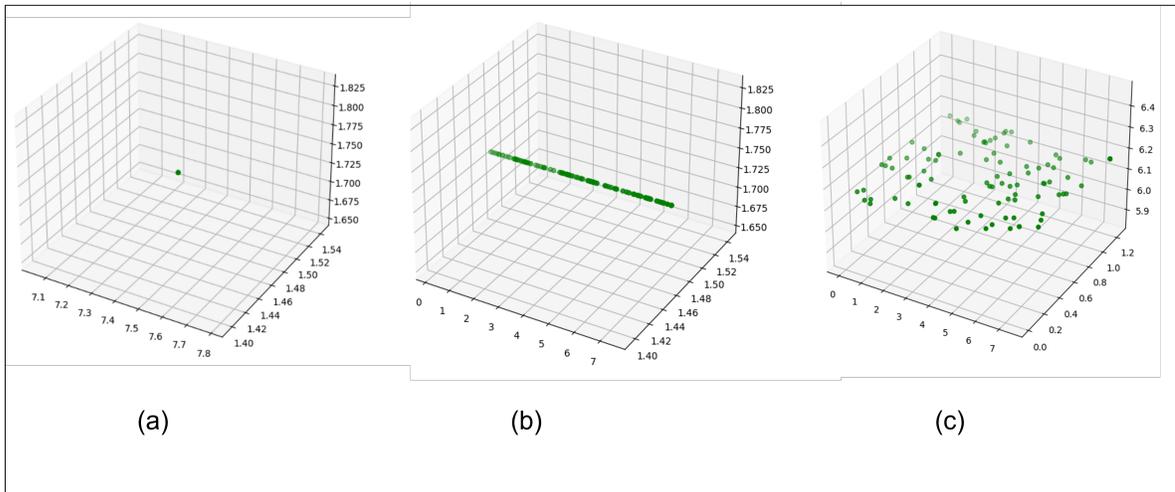
**Figura 6.7:** Comparación entre los algoritmos NSGAI Y (b) MOEAD en la red de distribución de pigmentos de *Chlorella vulgaris* y red piloto NSGAI c) Y MOEAD d).



#### 6.1.4. Experimento 4

Además de probar los diferentes casos de estudio con los enfoques FBA, NSGAI Y MOEAD, se experimento mediante un enfoque rápido aleatorio, al cual llamamos random en la distribución de flujo de pigmentos en la microalga *C. vulgaris*. En la siguiente Figura 6.8 se muestra la comparación entre FBA 6.8a), random 6.8c) y NSGAI 6.8 b). El método Random a pesar de ser rápido no ofrece buenos resultados Figura 6.8b) a comparación de lo presentado en la Figura 6.8 c) NSGAI.

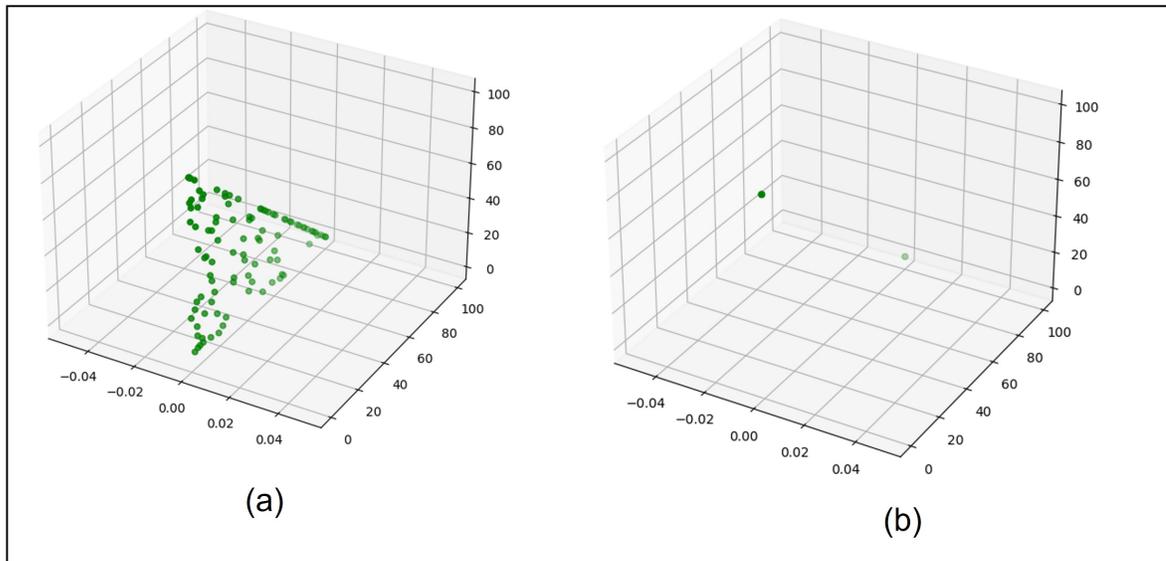
**Figura 6.8:** Comparación entre las variantes entre (a) FBA, (b) Random y, c) NSGAII en la microalga *C. vulgaris* 5.3.4.



### 6.1.5. Experimento 5

Al comparar el desempeño del algoritmo NSGAII con la variante MOFBA<sub>4</sub> y el FBA clásico de optimización mono-objetivo, se puede observar en la Figura 6.9 que el algoritmo NSGAII MOFBA<sub>4</sub> presenta superioridad al demostrar que se mejora la información provista al proveer mas soluciones y una mejora de la distribución. Está distribución se puede observar en diferentes redes metabólicas como en el metabolismo del glutamato en la microalga *C. vulgaris*, así como en los diferentes cepas de microalgas estudiadas.

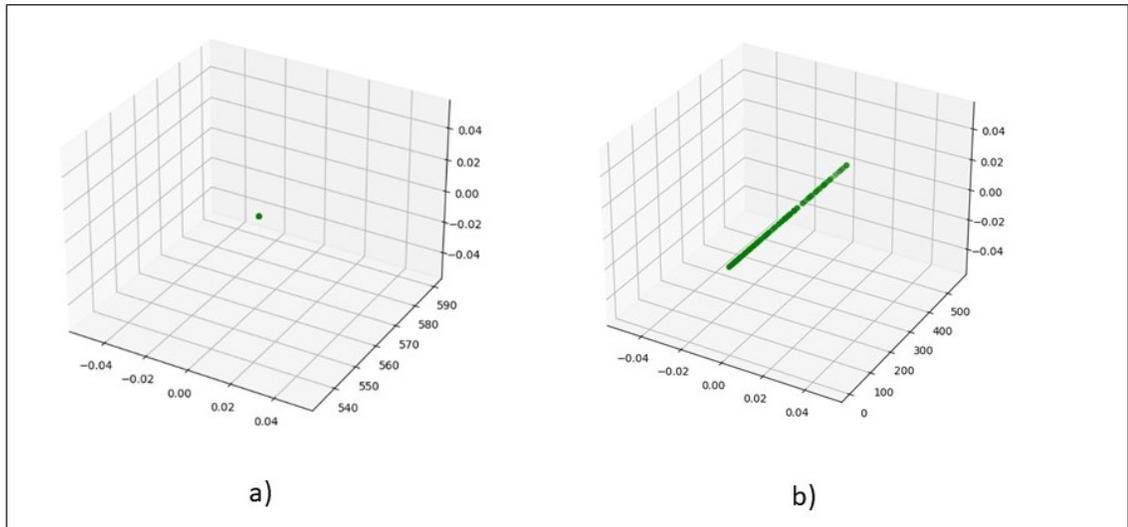
**Figura 6.9:** Comparación entre (a) NSGAI y (b) FBA en la Distribución de flujos asociados al metabolismo del glutamato de la microalga *Chlorella vulgaris*.



### 6.1.6. Experimento 6

En la Figura 6.10 se representa el caso de estudio 5.3.5 de la microalga *D. salina* se puede observar que a pesar de ser una red metabólica más grande que contiene 1008 reacciones, el algoritmo NSGAI puede resolver el problema de optimización, presentando un buen desempeño al tener una distribución de flujos más amplia a comparación del FBA clásico.

**Figura 6.10:** Representación de la distribución obtenida entre NSGAI y FBA de la microalga *D. Sallina* 5.3.5.



### 6.1.7. Validación

La Tabla 6.3 muestra que los métodos propuestos obtienen soluciones factibles, se demuestra que satisfacen las condiciones identificadas en un experimento *in vivo* [4] demostrando con esto la correlación de las soluciones *in silico* y su capacidad de emular resultados en diferentes condiciones de cultivo. Demostrando que NSGAI presenta una gran versatilidad para limitar los parámetros en la condiciones de cultivo, mediante los valores de lower bound y upper bound. Así mismo, se añaden algunas soluciones factibles correspondientes a NSGAI

Reacción	LB	UB	S1	S2	S3	S4
NADPH	0.000487	0.000487	0.000487	0.000487	0.000487	0.000487
IDS2	0	0.000487	7.42E-05	4.72E-05	2.58E-05	4.33E-07
FPPSh	0	0.000487	7.42E-05	4.72E-05	2.58E-05	4.33E-07
GPPSh	0	0.000487	7.42E-05	4.72E-05	2.58E-05	4.33E-07
FRDPth	0	0	0	0	0	0
FPPS	0	0	0	0	0	0
GRDPth	0	0	0	0	0	0
GRDPH	0	0	0	0	0	0
GGPPS	0	0.000487	7.42E-05	4.72E-05	2.58E-05	4.33E-07
v1	0	0.000402078	0	0	0	0
GGDPtu	-0.0000849	0.0000849	7.42E-05	4.72E-05	2.58E-05	4.33E-07
CHLASG	0	0.0000742	7.42E-05	4.72E-05	2.58E-05	4.33E-07
GGCHLDAR	0	0.0000742	7.42E-05	4.72E-05	2.58E-05	4.33E-07
CHLAU	0	0.0000742	7.42E-05	4.72E-05	2.58E-05	4.33E-07
PSY	0	2.24E-08	0	0	0	0
PDS1	-2.24E-08	2.24E-08	0	0	0	0
PDS2	-2.24E-08	2.24E-08	0	0	0	0
ZDS	-2.24E-08	2.24E-08	1.59E-08	1.54E-08	1.06E-08	3.58E-09
NOR	-2.24E-08	2.24E-08	1.59E-08	1.54E-08	1.06E-08	3.58E-09
v2	0.00E+00	8.00E-11	0	0	0	0
LCYG	-1.59E-08	1.59E-08	1.59E-08	1.54E-08	1.06E-08	3.58E-09
GCAROtu	-1.59E-08	1.59E-08	1.59E-08	1.54E-08	1.06E-08	3.58E-09
LCYB	-1.59E-08	1.59E-08	1.59E-08	1.54E-08	1.06E-08	3.58E-09
v3	0.00E+00	1.24E-08	1.24E-08	1.20E-08	7.10E-09	1.00E-10
BCAROH	-3.48E-09	3.48E-09	3.48E-09	3.48E-09	3.48E-09	3.48E-09
BCRPTXANH	-3.48E-09	3.48E-09	3.48E-09	3.48E-09	3.48E-09	3.48E-09
v4	0.00E+00	6.16E-09	6.16E-09	6.16E-09	6.16E-09	6.16E-09
ANXANASCOR	-2.68E-09	2.68E-09	-2.68E-09	-2.68E-09	-2.68E-09	-2.68E-09
v5	0.00E+00	3.88E-09	3.88E-09	3.88E-09	3.88E-09	3.88E-09
VIOXANOR	-2.41E-09	2.41E-09	-2.41E-09	-2.41E-09	-2.41E-09	-2.41E-09
v6	0.00E+00	2.70E-10	2.70E-10	2.70E-10	2.70E-10	2.70E-10
NEOXANS	-1.47E-09	1.47E-09	1.47E-09	1.47E-09	1.47E-09	1.47E-09
NEOXANU	0	1.47E-09	1.47E-09	1.47E-09	1.47E-09	1.47E-09
LCYD	-6.42E-09	6.42E-09	0	0	0	0
LCYA	-6.42E-09	6.42E-09	0	0	0	0
v7	0.00E+00	1.33E-09	0	0	0	0
ACAROtu	-5.09E-09	5.09E-09	0	0	0	0
CHYA1	0	0	0	0	0	0
ZHY	0	0	0	0	0	0
CHYA2	0	5.09E-09	0	0	0	0
CXHY	0	5.09E-09	0	0	0	0
v8	0	3.35E-09	-1.74E-09	-1.74E-09	-1.74E-09	-1.74E-09
LUTH	-1.74E-09	1.74E-09	1.74E-09	1.74E-09	1.74E-09	1.74E-09
LOROXANU	0	1.74E-09	1.74E-09	1.74E-09	1.74E-09	1.74E-09
FRDPth	0	1	0	0	0	0

**Tabla 6.3:** Distribución de flujos obtenidos mediante NSGAI asociados a la síntesis de pigmentos en el metabolismo de la microalga *C. vulgaris*. 100

## 6.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Esta sección valida estadísticamente que existe diferencia al usar distintos problemas de optimización o algoritmos, con el fin de mostrar que es relevante su elección. Para ello, resume los resultados al comparar por Hipervolumen (el indicador de cercanía con respecto al frente Óptimo de Pareto) si existe o no diferencia significativa entre los modelos de optimización  $MOFBA_3$  y  $MOFBA_4$ , y los algoritmos NSGAI y MOEAD.

El primer análisis considera los modelos  $MOFBA_3$  y  $MOFBA_4$ , fija el algoritmo de solución a NSGAI, y evalúa todas las redes. Para el análisis, se obtuvo el Hipervolumen de cada una de las 30 corridas del algoritmo por problema. Haciendo uso de la prueba no paramétrica de rangos con signo de Wilcoxon, con un nivel de confianza de 95%, se validó la  $H_0$  que especifica que la media de la diferencia entre las muestras es la misma. La tabla 6.4 resume los resultados, mostrando el valor de hipervolumen por corrida, para cada red, y en la última fila el estatus de aceptación de la  $H_0$ . Se puede observar que la hipótesis es rechazada en casi todas las redes metabólicas analizadas. Exceptuando *chlorella*, se puede comentar que el mejor modelo de optimización es  $MOFBA_4$ .

<i>D. salina</i>		Metabolismo del Glutamato en <i>C. reinhardtii</i>		Red pigmentos en <i>C.vulgaris</i>		Red Piloto	
<i>MOFBA</i> <sub>4</sub>	<i>MOFBA</i> <sub>3</sub>	<i>MOFBA</i> <sub>4</sub>	<i>MOFBA</i> <sub>3</sub>	<i>MOFBA</i> <sub>4</sub>	<i>MOFBA</i> <sub>3</sub>	<i>MOFBA</i> <sub>4</sub>	<i>MOFBA</i> <sub>3</sub>
711821819.59	999975055.63	999999963568785.00	999999962.30	926954932.92	901051695.57	992402704.03	995298596.92
716581229.70	443942790.08	999999963996386.00	999999964.02	927738247.44	902701769.88	992588316.26	995364553.00
720822744.03	999953641.84	999999965146063.00	999999960.82	928833221.14	901038837.88	992355130.99	995264867.91
697466605.34	444009703.68	999999964208888.00	999999963.72	928855779.40	901023429.91	992743421.18	995360424.66
732718814.59	443811168.83	999999963003740.00	999999963.33	930513480.58	901045894.86	992480655.75	995075259.39
717096185.73	999999998.63	999999962774977.00	999999963.75	930089211.18	901050916.70	992334437.61	995086272.47
707669180.35	444075280.13	999999961506473.00	999999961.36	929893872.23	901032456.03	992243460.37	995091970.31
703462826.67	443822756.11	999999963112840.00	999999961.76	930057408.51	901044520.18	992511086.36	995037396.71
718073101.84	444126672.47	999999964754233.00	999999964.58	931273419.55	901069427.74	992577966.07	995066897.52
721925857.00	443900875.58	999999962696981.00	999999962.88	927814872.41	901061699.79	992086422.98	995235365.29
697077553.63	444212962.87	999999961054011.00	999999963.23	929642834.59	901050171.39	992420311.27	995083286.61
722677588.87	443945034.11	999999964366605.00	999999963.24	929825044.03	901099322.58	992694204.68	995129833.68
714475495.06	444055232.72	999999961428775.00	999999961.76	927170927.94	901066403.21	992589633.83	995014610.56
721357264.35	443863544.24	999999961559894.00	999999964.36	931896717.39	901061012.72	992142654.64	995101616.93
702353262.47	444362122.72	999999962453169.00	999999962.35	932867964.02	901053840.14	992290214.00	994943244.10
709313461.30	444558969.76	999999964252754.00	999999960.84	931345050.73	901058694.88	992336566.09	995109012.88
722752258.13	1000000000.00	999999964013299.00	999999962.84	929859507.66	901082894.26	992673904.78	995195211.90
716503128.79	443996472.54	999999962915427.00	999999960.27	928374573.98	901033229.60	992526130.26	995120045.26
714671996.96	443807810.97	999999963097500.00	999999964.47	930514934.16	901086193.22	992606962.14	995124744.46
711348744.51	1000000000.00	999999961694677.00	999999961.85	930207104.23	901024891.94	992449743.21	995103925.88
723956228.47	999989293.37	999999962720291.00	999999962.97	929216872.49	901027839.12	992645941.52	995209778.76
724149437.33	999999807.15	999999963344855.00	999999962.04	929298172.83	901066312.46	992409057.53	995192354.66
708884483.11	999999571.24	999999961990210.00	999999964.54	930311566.63	901066087.33	992452652.64	995025689.50
697556728.74	999999929.31	999999964480450.00	999999962.94	929815814.57	901054424.28	992582877.88	995336009.62
712682040.93	1000000000.00	999999964032510.00	999999964.10	929754918.14	901257922.88	992399325.34	995042702.86
709653348.59	444065636.56	999999961123836.00	999999964.31	926882664.40	901045654.44	992384433.72	995128855.40
719576472.48	999995050.36	999999964112722.00	999999964.02	930710737.62	901037580.09	992633703.32	994906552.64
718939094.74	999991407.63	999999963078273.00	999999962.14	930352101.53	901070488.19	992350962.85	995041549.47
718516000.68	1000000000.00	999999965787054.00	999999962.39	930945673.37	901089698.53	992991732.25	995191963.41
705451008.27	999997649.16	999999962531879.00	999999964.92	934042405.72	901045627.14	992499817.46	995171890.71
$H_0$	ACCEPTED	$H_0$	REJECTED	$H_0$	REJECTED	$H_0$	REJECTED

**Tabla 6.4:** Datos analizados estadísticamente para validar diferencias entre el uso de *MOFBA*<sub>3</sub> y *MOFBA*<sub>4</sub>. La hipótesis nula  $H_0$  fue aceptada cuando el p-value obtenido fue menor a 0.05.

El segundo análisis considera los algoritmos NSGAI y MOEAD, fija el modelo de optimización a *MOFBA*<sub>4</sub>, y evalúa todas las redes. Para el análisis, se obtuvo el Hipervolumen de cada una de las 30 corridas de cada algoritmo sobre el problema resuelto. Haciendo uso de la prueba no paramétrica de rangos con signo de Wilcoxon, con un nivel de confianza de 95 %, se validó la  $H_0$  que especifica que la media de la diferencia entre las muestras es la misma. La tabla 6.5 resume los resultados, mostrando el valor de hipervolumen por corrida, para cada red, y en la última fila el estatus de aceptación de la  $H_0$ . Se puede observar que la hipótesis es rechazada en todas las redes metabólicas analizadas.

Estos resultados, de ambos análisis confirman lo esperado, que es relevante considerar qué modelo de optimización utilizar y que algoritmo, por que sus desempeños al obtener conjuntos de solución pueden ser diferentes.

<i>D. salina</i>		Metabolismo del Glutamato <i>C. vulgaris</i>		Red pigmentos en <i>C. vulgaris</i>		Red Piloto	
NSGAI	MOEAD	NSGAI	MOEAD	NSGAI	MOEAD	NSGAI	MOEAD
711821819.5944	999174028.1189	999999963.57	999999999.71	926954932.9185	999779348.8089	992402704.0349	999970733.8406
716581229.6978	999198591.5239	999999964.00	999999999.62	927738247.4356	999773139.5408	992588316.2629	999970441.1893
720822744.0299	999079306.4903	999999965.15	999999999.69	928833221.1415	999747665.7859	992355130.9929	999968883.6012
697466605.3384	999178066.0220	999999964.21	999999999.75	928855779.3982	999747441.6985	992743421.1842	999970607.2073
732718814.5950	999118355.9105	999999963.00	999999999.75	930513480.5843	999806879.8398	992480655.7483	999970422.3908
717096185.7349	999130519.3264	999999962.77	999999999.77	930089211.1795	999775313.9281	992334437.6119	999969993.3869
707669180.3454	999242536.4993	999999961.51	999999999.75	929893872.2276	999777039.5346	992243460.3709	999970306.2333
703462826.6664	999195250.3318	999999963.11	999999999.71	930057408.5063	999736288.0254	992511086.3564	999972227.9567
718073101.8415	999193328.6278	999999964.75	999999999.77	931273419.5473	999778394.7396	992577966.0707	999970190.4242
721925856.9997	999088342.6618	999999962.70	999999999.77	927814872.4056	999781505.4418	992086422.9787	999971475.3632
697077553.6297	999065054.7049	999999961.05	999999999.77	929642834.5902	999754289.3798	992420311.2662	999969019.9048
722677588.8685	999151884.4032	999999964.37	999999999.71	929825044.0348	999770509.4839	992694204.6771	999967163.6295
714475495.0644	9998982245.9730	999999961.43	999999999.72	927170927.9436	999763210.8057	992589633.8266	999970643.4482
721357264.3492	999198459.9079	999999961.56	999999999.74	931896717.3908	999780134.8363	992142654.6363	999969206.5528
702353262.4725	999157009.8650	999999962.45	999999999.73	932867964.0186	999758883.4003	992290213.9974	999971767.6582
709313461.2975	999161541.5739	999999964.25	999999999.74	931345050.7331	999791602.9407	992336566.0868	999970281.2721
722752258.1257	999892892.4606	999999964.01	999999999.74	929859507.6627	999780968.0417	992673904.7839	999970406.5560
716503128.7878	999156701.9787	999999962.92	999999999.73	928374573.9835	999758285.6906	992526130.2628	999968837.4011
714671996.9596	9992355671.4788	999999963.10	999999999.79	930514934.1631	999793675.1476	992606962.1393	999968837.8790
711348744.5073	999170825.4947	999999961.69	999999999.73	930207104.2344	999788948.8766	992449743.2051	999969985.8820
723956228.4688	999242511.8464	999999962.72	999999999.76	929216872.4870	999768448.0790	992645941.5167	999970491.0555
724149437.3254	999188063.0076	999999963.34	999999999.71	929298172.8314	999775436.9818	992409057.5293	999969968.5335
708884483.1147	999035498.8866	999999961.99	999999999.75	930311566.6349	999764936.7467	992452652.6430	999971776.1819
697556728.7428	999311206.0055	999999964.48	999999999.71	929815814.5665	999782034.7972	992582877.8844	999970016.8023
712682040.9329	999144403.0914	999999964.03	999999999.76	929754918.1363	999767761.7333	992399325.3360	999969768.5016
709653348.5898	999111161.3348	999999961.12	999999999.69	926882664.4031	999764975.9606	992384433.7168	999970422.2629
719576472.4841	999248246.2152	999999964.11	999999999.76	930710737.6175	999769076.2168	992633703.3211	999968064.4180
718939094.7382	999259623.2718	999999963.08	999999999.68	930352101.5335	999737333.9071	992350962.8458	999967905.1526
718516000.6756	999318848.8487	999999965.79	999999999.73	930945673.3651	999777008.1954	992991732.2458	999967247.5121
705451008.2720	999182122.7548	999999962.53	999999999.78	934042405.7196	999758611.8961	992499817.4559	999971416.8314
$H_0$	RECHAZADA	$H_0$	RECHAZADA	$H_0$	RECHAZADA	$H_0$	RECHAZADA

**Tabla 6.5:** Datos analizados estadísticamente para establecer las diferencias entre el uso de NSGAI y MOEAD. La hipótesis nula  $H_0$  fue aceptada cuando el p-value obtenido fue menor a 0.05.

A través de los resultados gráficos observados, principalmente por el volumen y dispersión de las soluciones obtenidas en todas las redes metabólicas de algas consideradas, se demuestra que el método propuesto basado en optimización multi-objetivo resuelto mediante metaheurísticas ofrece mejor soporte para el análisis que usar únicamente el método FBA. Por otro lado, el análisis estadístico presentado en esta sección demuestra que es relevante considerar el modelo de optimización y el

algoritmo, ya que éstos pueden contribuir con diferentes tipos de mejoras. Los análisis estadísticos aquí presentados demuestran que puede existir diferencia significativa entre modelos de optimización, o entre algoritmos metaheurísticos.

### 6.3. DISCUSIÓN

Anteriormente, no se había experimentado el estudio de redes metabólicas con optimización multiobjetivo. Aunque, existen metodologías exactas, el empleo de enfoques evolutivos requiere de menos recursos computacionales en el ámbito de múltiples objetivos, por ejemplo, otorga la ventaja de utilizar menos tiempo y memoria. Los enfoques como NSGAI y MOEAD permiten un mayor poder de elección en el proceso de toma de decisiones también debido a la variedad y cantidad de soluciones, y la posibilidad de un reconocimiento más fácil de los flujos más importantes en una red y su influencia e impacto en lugar de no tener una metodología.

Algunas ideas adicionales surgen de los resultados anteriores. El experimento 1 demuestra la versatilidad de NSGAI para adaptarse a diferentes circunstancias y su capacidad para mejorar el análisis de la red metabólica dada la mayor cantidad de soluciones que produce para cada una de ellas. Como se demostró en los experimentos 1,2,3,4,5, y 6 donde se mejora la capacidad de análisis de una red metabólica mediante la introducción del algoritmo NSGAI.

Los problemas de optimización multiobjetivo presentes en la literatura, actualmente toman en cuenta diferentes métricas de solución. El Experimento 2 compara el uso del algoritmo NSGAI con las 4 variantes de problemas de optimización, resultando el problema de optimización MOFBA<sub>4</sub> el más prometedor, al introducir diferentes estrategias de optimización como el optimizar no solo los metabolitos de interés, sino también el Hipervolumen y la Distancia Generacional. A comparación del MOFBA<sub>3</sub> que minimiza el Hipervolumen y el MOFBA<sub>2</sub> donde las variables de decisión son solamente los flujos de las reacciones de interés.

Aunque en los casos de estudio NSGAI tuvo un mejor desempeño observable gráficamente que MOEAD, como ocurrió en el Experimento 3, debido a que los casos de estudio tuvieron 3 funciones objetivo y de acuerdo a la literatura NSGAI es mejor que MOEAD cuando se tienen 3 funciones objetivo, se abre la posibilidad de poder utilizar MOEAD en redes donde se necesite optimizar más de 3 funciones objetivo. Se puede observar también, a través del experimento 4, que usar simplemente un aleatorio para muestrear soluciones no es suficiente para obtener un buen conjunto de soluciones como usar las metaheurísticas, si no que se debe tener consideraciones especiales que permitan respetar restricciones o la información de control deseada por un individuo interesado.

El uso de los diferentes algoritmos se probó en diferentes cepas de microalgas, como se ve en el experimento 1 con *C. reinhardtii*, el experimento 5 usando *C. Vulgaris*, en el experimento 6 con *D. salina*, comprobando su factibilidad en las diferentes redes metabólicas. Esto confirma también que no solamente se pueden utilizar en una sola microalga. Dejando abierta la posibilidad de ser utilizada en otro tipo de especies donde exista alguna necesidad de optimizar más de una función objetivo.

Además, se pudo observar que los algoritmos pueden ser utilizados en redes metabólicas con gran cantidad de reacciones como en el caso de *D. salina* en el experimento 6, aunque la dispersión de resultados no fue tan grande como en el caso de las redes pequeñas, abre la pauta para seguir mejorando la investigación.

---

## Conclusiones y Trabajos Futuros

El presente trabajo de investigación realizó un estudio de flujos metabólicos en las microalgas verdes. El objetivo se centró en comprobar la idoneidad de métodos *in silico* como estrategias de apoyo para una mejora en el análisis del metabolismo en microalgas. A través de los experimentos desarrollados se obtuvo evidencia que permite sustentar las siguientes conclusiones:

- El estudio de flujos metabólicos en microalgas se mejora a través del incremento en el número de soluciones que satisfacen las condiciones de una microalga para que esta pueda vivir. Esto es observable porque a diferencia de métodos tradicionales como FBA que solamente ofrecen una solución, que se amplía de manera limitada mediante análisis de sensibilidad, se ve enormemente favorecido al integrarse en una metodología basada en metaheurísticas y problemas de optimización multi-objetivo incrementa tanto el número de flujos que satisfacen las condiciones buscadas en la red metabólica, también de manera simultánea permiten optimizar varios metabolitos de interés.

- Existe más de una alternativa para analizar una red metabólica optimizando varios metabolitos de interés, teniendo como núcleo en el proceso de optimización al método FBA. El presente trabajo propuso cuatro modelos de optimización que demuestran este resultado, cada uno de ellos ofreciendo ángulos de análisis diferentes al que FBA por si mismo ofrece.
- Es posible resolver los problemas de optimización de soporte al estudio metabólico considerando distintas metaheurísticas evolutivas, y obtener resultados significativos para el análisis. Esto se demuestra al hacer uso de NSGAI y MOEAD para resolver los problemas de optimización propuestos. Se hace notar que en este estudio NSGAI mostró el mejor desempeño en general, lo cuál es consistente con la literatura al abordar exclusivamente la optimización simultánea de tres objetivos. Esto demuestra que para trabajos futuros el análisis de la mejor metaheurística debe realizarse previamente al estudio.
- Se puede controlar los parámetros de búsqueda de solución durante el análisis de una red metabólica, al ajustar los límites de las reacciones convenientemente. Esto contribuye a mejorar aún más el estudio de las microalgas, ya que es posible la definición de ambientes controlados. Esto se observa en el proceso de validación donde los parámetros para generar soluciones fueron limitados a los valores encontrados en trabajos sobre especímenes *in vivo*.
- Un tomador de decisiones, p.e. un investigador en el área de ingeniería metabólica, mejora su capacidad de decisión al visualizar un conjunto de flujos metabólicos que satisfacen las condiciones especificadas para la red metabólica que estudia.
- La dimensión de la red afecta el desempeño, como se observa al analizar el método propuesto en la microalga *D. Sallina*, donde el frente aproximado no tiene mucha dispersión, aunque logra tener suficientes resultados.

## **7.1. TRABAJOS FUTUROS**

A partir del presente trabajo de investigación se desprenden numerosas líneas de trabajo. Por ejemplo, los algoritmos evolutivos pueden ser aplicados en otras especies, en donde se tenga la necesidad de optimizar más de una función objetivo, según los requisitos del organismo y tomando las soluciones más adecuadas según a las necesidades del modelo, además, el uso de los algoritmos compensan la producción entre los flujos de los metabolitos de interés y los flujos de producción de biomasa. Adicionalmente, los algoritmos pueden ser usados en consorcios de microorganismos donde existe una competencia entre los microorganismos. También, se pueden analizar nuevos enfoques metaheurísticos, o definir modelos de optimización alternativos, o incluso independencias del método FBA. Mejorar las estrategias de dispersión en redes más complejas. Finalmente, es posible considerar preferencias específicas de un tomador de decisiones que mejoren aún más el proceso de búsqueda.

## **7.2. CONTRIBUCIONES**

En esta sección se presentan las principales contribuciones que se derivan del trabajo realizado en esta tesis.

- La construcción de dos modelos que permiten evaluar diferentes funciones objetivos, mediante algoritmos metaheurísticos.
- Implementación de modelos metaheurísticos basados en FBA en redes metabólicas.
- La calidad en las soluciones encontradas con los algoritmos metaheurísticos y las soluciones reportadas con FBA fueron satisfactorias.
- Una mayor capacidad de análisis de los flujos que intervienen en el metabolismo celular al tener mayor cantidad de resultados.

---

---

## Bibliografía

- [1] J. Ohlrogge and J. Browse, "Lipid biosynthesis." *The plant cell*, vol. 7, no. 7, p. 957, 1995.
- [2] P. Bodénès, "Study of the application of pulsed electric fields (pef) on microalgae for the extraction of neutral lipids." Ph.D. dissertation, Université Paris Saclay (COMUE), 2017.
- [3] B. Palsson, *Systems biology*. Cambridge university press, 2015.
- [4] C. Zuñiga, C.-T. Li, T. Huelsman, J. Levering, D. C. Zielinski, B. O. McConnell, C. P. Long, E. P. Knoshaug, M. T. Guarnieri, M. R. Antoniewicz *et al.*, "Genome-scale metabolic model for the green alga *Chlorella vulgaris* utex 395 accurately predicts phenotypes under autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic growth conditions," *Plant physiology*, vol. 172, no. 1, pp. 589–602, 2016.
- [5] Y. Kato, Y. Fujihara, C. J. Vavricka, J.-S. Chang, T. Hasunuma, and A. Kondo, "Light/dark cycling causes delayed lipid accumulation and increased photoperiod-based biomass yield by altering metabolic flux in oleaginous *Chlamydomonas* sp." *Biotechnology for biofuels*, vol. 12, no. 1, pp. 1–11, 2019.
- [6] P. Spolaore, C. Joannis-Cassan, E. Duran, and A. Isambert, "Commercial applications of microalgae," *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 101, no. 2, pp. 87–96, 2006.
- [7] B. Heap, "The current status of biofuels in the European Union, their environmental impacts and future prospects," 2012.
- [8] L. Carlos Fernandez-Linares, J. Montiel-Montoya, A. Millan-Oropeza, and J. Agustin Badillo-Corona, "Production of biofuels obtained from microalgae," *REVISTA RA XIMHAI*, vol. 8, no. 3, pp. 101–115, 2012.
- [9] L. Tessarolli, I. Bagatini, A. Vieira *et al.*, "Bacterial degradation of dissolved organic matter released by *Planktothrix agardhii* (cyanobacteria)," *Brazilian Journal of Biology*, vol. 78, pp. 108–116, 2017.
- [10] D. L. Sutherland and A. Bramucci, "Dissolved organic phosphorus bioremediation from food-waste concentrate using microalgae," *Journal of Environmental Management*, vol. 313, p. 115018, Jul 2022. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115018>

- [11] O. S. Castillo, S. G. Torres-Badajoz, C. A. Núñez-Colín, V. Peña-Caballero, C. H. Herrera Méndez, and J. R. Rodríguez-Núñez, “Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas,” *Hidrobiológica*, vol. 27, no. 3, pp. 337–352, 2017.
- [12] S. Tebbani, F. Lopes, R. Filali, D. Dumur, and D. Pareau, *Biofijación de CO<sub>2</sub> por microalgas*. ISTE Group, 2020.
- [13] A. Huang, S. Wu, W. Gu, Y. Li, X. Xie, and G. Wang, “Provision of carbon skeleton for lipid synthesis from the breakdown of intracellular protein and soluble sugar in *phaeodactylum tricorutum* under high CO<sub>2</sub>,” *BMC biotechnology*, vol. 19, no. 1, p. 53, 2019.
- [14] A. M. Santos Montes, Y. González Arechavala, and C. Martín Sastre, “Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas,” 2014.
- [15] Y. M. M. Barroso, P. A. P. Mantilla, and J. F. B. Perez, “Remoción de cromo en aguas residuales industriales mediante el uso de biomasa de *spirulina* sp, sedimentación primaria y precipitación química,” *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, vol. 10, no. 1, pp. 141–152, 2019.
- [16] A. E. Allende Usaqui, “Evaluación del contenido lipídico de la microalga *tetraselmis contracta* ante diferentes concentraciones de nitrato como nutriente, para su potencial uso como biodiesel, 2018,” 2018.
- [17] M. Han, S.-J. Hong, Z.-H. Kim, B.-K. Cho, H. Lee, H.-K. Choi, and C.-G. Lee, “Enhanced production of fatty acids via redirection of carbon flux in marine microalga *tetraselmis* sp.” *Journal of microbiology and biotechnology*, vol. 28, no. 2, pp. 267–274, 2018.
- [18] K. Chokshi, I. Pancha, A. Ghosh, and S. Mishra, “Nitrogen starvation-induced cellular crosstalk of ROS-scavenging antioxidants and phytohormone enhanced the biofuel potential of green microalga *acutodesmus dimorphus*,” *Biotechnology for biofuels*, vol. 10, no. 1, p. 60, 2017.
- [19] M. T. Arias Peñaranda, R. O. Cañizares Villanueva, A. d. J. Martínez Roldán *et al.*, “Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos,” *Acta Biológica Colombiana; Vol. 18, núm. 1 (2013); 43-68 Acta Biológica Colombiana; Vol. 18, núm. 1 (2013); 43-68 1900-1649 0120-548X*, 2013.
- [20] A. M. Ardila-Álvarez, Y. López-Matos, M. E. Vásquez-Cáceres, D. González-Delgado, and A. F. Barajas-Solano, “Obtención de lípidos y carbohidratos a partir de microalgas mediante el diseño de medios de cultivo selectivos,” *Tecnológicas*, vol. 20, no. 38, p. 83, Feb 2017. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.22430/22565337.581>
- [21] O. Fernández-Oliva, J. C. Dustet-Mendoza, and E. Chico-Véliz, “Dos aplicaciones de la técnica de análisis de flujos metabólicos,” *Revista Cubana de Química*, vol. 24, no. 1, pp. 70–82, 2012.
- [22] J. Nielsen, “Metabolic engineering,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 55, pp. 263–283, 2001.
- [23] J. Nielsen, J. und Villadsen, “Modeling of microbial kinetics,” *Chemical Engineering Science*, vol. 47, no. 17, pp. 4225–4270, 1992.
- [24] N. R. Boyle, N. Sengupta, and J. A. Morgan, “Metabolic flux analysis of heterotrophic growth in *chlamydomonas reinhardtii*,” *PloS one*, vol. 12, no. 5, p. e0177292, 2017.

- [25] N. Gupta, P. Khare, and D. Singh, “Nitrogen-dependent metabolic regulation of lipid production in microalga *scenedesmus vacuolatus*,” *Ecotoxicology and environmental safety*, vol. 174, pp. 706–713, 2019.
- [26] C. P. Sánchez Henao, “Análisis de flujos metabólicos en la producción de ácido clavulánico a partir de *streptomyces clavuligerus*,” 2013.
- [27] L. Heirendt, S. Arreckx, T. Pfau, S. N. Mendoza, A. Richelle, A. Heinken, H. S. Haraldsdóttir, J. Wachowiak, S. M. Keating, V. Vlasov, S. Magnusdóttir, C. Y. Ng, G. Preciat, A. Žagare, S. H. J. Chan, M. K. Aurich, C. M. Clancy, J. Modamio, J. T. Sauls, A. Noronha, A. Bordbar, B. Cousins, D. C. El Assal, L. V. Valcarcel, I. Apaolaza, S. Ghaderi, M. Ahookhosh, M. Ben Guebila, A. Kostromins, N. Sompairac, H. M. Le, D. Ma, Y. Sun, L. Wang, J. T. Yurkovich, M. A. P. Oliveira, P. T. Vuong, L. P. El Assal, I. Kuperstein, A. Zinovyev, H. S. Hinton, W. A. Bryant, F. J. Aragón Artacho, F. J. Planes, E. Stalidzans, A. Maass, S. Vempala, M. Hucka, M. A. Saunders, C. D. Maranas, N. E. Lewis, T. Sauter, B. Palsson, I. Thiele, and R. M. T. Fleming, “Creation and analysis of biochemical constraint-based models using the cobra toolbox v.3.0,” *Nature Protocols*, vol. 14, no. 3, p. 639–702, Feb 2019. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1038/s41596-018-0098-2>
- [28] A. Ebrahim, J. A. Lerman, B. O. Palsson, and D. R. Hyduke, “Cobrapy: constraints-based reconstruction and analysis for python,” *BMC systems biology*, vol. 7, no. 1, p. 74, 2013.
- [29] C. Zuniga, J. Levering, M. R. Antoniewicz, M. T. Guarnieri, M. J. Betenbaugh, and K. Zengler, “Predicting dynamic metabolic demands in the photosynthetic eukaryote *chlorella vulgaris*,” *Plant physiology*, vol. 176, no. 1, pp. 450–462, 2018.
- [30] N. R. Boyle and J. A. Morgan, “Flux balance analysis of primary metabolism in *chlamydomonas reinhardtii*,” *BMC systems biology*, vol. 3, no. 1, pp. 1–14, 2009.
- [31] J. A. Niño Gómez, “Análisis de los flujos metabólicos de *chlamydomonas reinhardtii* para su aplicación en la producción de biocombustibles.”
- [32] R. J. Flassig, M. Facht, K. Höffner, P. I. Barton, and K. Sundmacher, “Dynamic flux balance modeling to increase the production of high-value compounds in green microalgae,” *Biotechnology for biofuels*, vol. 9, no. 1, p. 165, 2016.
- [33] W. Xiong, L. Liu, C. Wu, C. Yang, and Q. Wu, “<sup>13</sup>C-tracer and gas chromatography-mass spectrometry analyses reveal metabolic flux distribution in the oleaginous microalga *chlorella protothecoides*,” *Plant physiology*, vol. 154, no. 2, pp. 1001–1011, 2010.
- [34] H. M. Ramírez-Alvarado *et al.*, “Análisis de flujos metabólicos de cepa *costarricense chlorella vulgaris*: modelo base para ingeniería metabólica de organismos autótrofos.” 2018.
- [35] Y. Li, D. Han, G. Hu, M. Sommerfeld, and Q. Hu, “Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *chlamydomonas reinhardtii*,” *Biotechnology and bioengineering*, vol. 107, no. 2, pp. 258–268, 2010.
- [36] S. Saththong, K. Saego, P. Kitrunloadjanaporn, N. Nuttavut, S. Amornsamankul, and W. Triampo, “Modeling the effects of light sources on the growth of algae,” *Advances in Difference Equations*, vol. 2019, no. 1, p. 170, 2019.

- [37] B. A. Pessi, C. Baroukh, A. Bacquet, and O. Bernard, “A universal dynamical metabolic model representing mixotrophic growth of chlorella sp. on wastes,” *Water Research*, vol. 229, p. 119388, 2023.
- [38] R. R. Chirino, J. G. González, R. A. J. Infante, V. C. Vázquez, J. T. Dopico, L. V. García, J. C. Palacios, P. F. de Córdoba Castellá, J. F. U. Schölzel, E. N. Peris *et al.*, “Desarrollo de una plataforma computacional para el modelado metabólico de microorganismos,” *Nereis: revista iberoamericana interdisciplinar de métodos, modelización y simulación*, no. 3, pp. 25–31, 2011.
- [39] A. C. F. Piazzzi, M. C. Veiga, L. O. Santos, J. A. V. Costa, R. C. Kuhn, and N. P. G. Salau, “Modeling the growth of microalgae spirulina sp. with application of illuminance and magnetic field,” *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 94, no. 6, pp. 1770–1776, 2019.
- [40] C. Baroukh and O. Bernard, “Metabolic modeling of c. sorokiniana diauxic heterotrophic growth,” *IFAC-PapersOnLine*, vol. 49, no. 26, pp. 330–335, 2016.
- [41] M. Mekanik, E. Motamedian, R. Fotovat, and V. Jafarian, “Reconstruction of a genome-scale metabolic model for auxenochlorella protothecoides to study hydrogen production under anaerobiosis using multiple optimal solutions,” *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 44, no. 5, pp. 2580–2591, 2019.
- [42] D. A. M. Salguero, M. Fernández-Niño, L. M. Serrano-Bermúdez, D. O. P. Melo, F. V. Winck, C. Caldana, and A. F. G. Barrios, “Development of a chlamydomonas reinhardtii metabolic network dynamic model to describe distinct phenotypes occurring at different co2 levels,” *PeerJ*, vol. 6, p. e5528, 2018.
- [43] K. H. Ryu, B. Kim, S. Heo, Y.-K. Chang, and J. H. Lee, “Mathematical modeling of microalgal internal metabolic behaviors under heterotrophic conditions and its application,” *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol. 59, no. 4, pp. 1631–1645, 2019.
- [44] M. Facht, C. Witte, R. J. Flassig, L. K. Rihko-Struckmann, Z. McKie-Krisberg, J. E. Polle, and K. Sundmacher, “Reconstruction and analysis of a carbon-core metabolic network for dunaliella salina,” *BMC bioinformatics*, vol. 21, no. 1, pp. 1–9, 2020.
- [45] M. Budinich, J. Bourdon, A. Larhlimi, and D. Eveillard, “A multi-objective constraint-based approach for modeling genome-scale microbial ecosystems,” *PLOS ONE*, vol. 12, pp. e0171744, 1–22, 2017.
- [46] R. Andrade, M. Doostmohammadi, J. Santos, M.-F. Sagot, N. P. Mira, and S. Vinga, “Momo - multi-objective metabolic mixed integer optimization: application to yeast strain engineering,” *BMC Informatics*, vol. 21, pp. 69, 1–13, 2020.
- [47] E. van Pelt-KleinJan, D. H. de Groot, and B. Teusink, “Understanding fba solutions under multiple nutrient limitations,” *Metabolites*, vol. 11, pp. 257, 1–24, 2021.
- [48] Y. Zhang and D. Boley, “Nonlinear multi-objective flux balance analysis of the warburg effect,” *arXiv preprint arXiv:2111.12145*, 2021.
- [49] A. R. Zomorodi and C. D. Maranas, “Optcom: a multi-level optimization framework for the metabolic modeling and analysis of microbial communities,” *PLoS computational biology*, vol. 8, no. 2, p. e1002363, 2012.

- [50] —, “Optcom: A multi-level optimization framework for the metabolic modeling and analysis of microbial communities,” *PLOS: Computational Biology*, vol. 8, pp. 1–13, 2012.
- [51] L. C. Fernández-Linares, J. Montiel-Montoya, A. Millán-Oropeza, and J. A. Badillo-Corona, “Producción de biocombustibles a partir de microalgas,” *Ra Ximhai*, vol. 8, no. 3, pp. 101–115, 2012.
- [52] J. D. Tibocha-Bonilla, C. Zuñiga, R. D. Godoy-Silva, and K. Zengler, “Advances in metabolic modeling of oleaginous microalgae,” *Biotechnology for biofuels*, vol. 11, no. 1, p. 241, 2018.
- [53] L. A. Velasco, J. Barros-Gómez, G. H. Ospina-Salazar, and C. A. Trujillo, “Efecto de la intensidad lumínica, temperatura y salinidad sobre el crecimiento de la microalga *isochrysis galbana* (clon t-iso),” *Intropica*, pp. 93–99, 2009.
- [54] J. R. Benemann, D. M. Tillett, and J. C. Weissman, “Microalgae biotechnology,” *Trends in biotechnology*, vol. 5, no. 2, pp. 47–53, 1987.
- [55] M. Morales, L. Sánchez, and S. Revah, “The impact of environmental factors on carbon dioxide fixation by microalgae,” *FEMS microbiology letters*, vol. 365, no. 3, p. fnx262, 2018.
- [56] C. R. M. Barraza, “Inducción lipídica por limitación de nutrientes en las microalgas *scenedesmus dimorphus* y *chlorella sorokiniana*,” *Centro de investigación en materiales avanzados*, 2011.
- [57] W. Zhou, Q. Lu, P. Han, and J. Li, “Microalgae cultivation and photobioreactor design,” in *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*. Elsevier, 2020, pp. 31–50.
- [58] R. L. Chang, L. Ghamsari, A. Manichaikul, E. F. Hom, S. Balaji, W. Fu, Y. Shen, T. Hao, B. Ø. Palsson, K. Salehi-Ashtiani *et al.*, “Metabolic network reconstruction of *chlamydomonas* offers insight into light-driven algal metabolism,” *Molecular systems biology*, vol. 7, no. 1, p. 518, 2011.
- [59] R. A. Andersen, “The microalgal cell,” *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*, pp. 1–20, 2013.
- [60] Y. Su, K. Song, P. Zhang, Y. Su, J. Cheng, and X. Chen, “Progress of microalgae biofuel’s commercialization,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 74, pp. 402–411, 2017.
- [61] C. A. D. Arias, C. F. M. d. Oliveira, J. V. D. Molino, L. S. Ferreira-Camargo, M. C. Matsudo, and J. C. M. d. Carvalho, “Production of recombinant biopharmaceuticals in *chlamydomonas reinhardtii*,” *International Journal of Plant Biology*, vol. 14, no. 1, pp. 39–52, 2022.
- [62] H. Y. Mohammad, F. E.-Z. Tawfeek, E. Eltanahy, T. A. Mansour, and Z. Khalil, “Enhancement of growth, lipid, and carbohydrate production of the egyptian isolate *dunaliella salina* sa20 using mozzarella cheese whey as a growth supplement,” *Egyptian Journal of Botany*, vol. 63, no. 1, pp. 101–111, 2023.
- [63] R. Yadavalli, H. Ratnapuram, J. R. Peasari, C. N. Reddy, V. Ashokkumar, and C. Kuppam, “Simultaneous production of astaxanthin and lipids from *chlorella sorokiniana* in the presence of reactive oxygen species: a biorefinery approach,” *Biomass Conversion and Biorefinery*, pp. 1–9, 2021.

- [64] C. Safi, B. Zebib, O. Merah, P.-Y. Pontalier, and C. Vaca-Garcia, "Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 35, pp. 265–278, 2014.
- [65] S. P. Cuellar-Bermudez, J. S. Garcia-Perez, B. E. Rittmann, and R. Parra-Saldivar, "Photosynthetic bioenergy utilizing CO<sub>2</sub>: an approach on flue gases utilization for third generation biofuels," *Journal of Cleaner Production*, vol. 98, pp. 53–65, 2015.
- [66] H. U. Cho, Y. M. Kim, and J. M. Park, "Enhanced microalgal biomass and lipid production from a consortium of indigenous microalgae and bacteria present in municipal wastewater under gradually mixotrophic culture conditions," *Bioresour. Technol.*, vol. 228, pp. 290–297, 2017.
- [67] G. A. Cuevas-Castillo, F. S. Navarro-Pineda, S. A. B. Rodríguez, and J. C. S. Rivero, "Advances on the processing of microalgal biomass for energy-driven biorefineries," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 125, p. 109606, 2020.
- [68] A. Albalbe, A. Cid, P. Fidalgo, E. Torres, and C. Herrero, "Microalgas: Cultivos y aplicaciones," *Universidad Da Coruña. España, Coruña*, 1995.
- [69] A. B. Juan and C. C. Terol, *Problemas resueltos de reactores químicos y bioquímicos*. Universitat Jaume I. Servei de Comunicació i Publicacions, 2015.
- [70] N. D. Giraldo-Calderón, R. J. Romo-Buchelly, A. A. Arbeláez-Pérez, D. Echeverri-Hincapié, and L. Atehortúa-Garcés, "Microalgae biorefineries: applications and emerging technologies," *Dyna*, vol. 85, no. 205, pp. 219–233, 2018.
- [71] K. W. Chew, J. Y. Yap, P. L. Show, N. H. Suan, J. C. Juan, T. C. Ling, D.-J. Lee, and J.-S. Chang, "Microalgae biorefinery: high value products perspectives," *Bioresour. Technol.*, vol. 229, pp. 53–62, 2017.
- [72] J. R. Ramírez, M. A. Aceves *et al.*, "Enzimas: ¿qué son y cómo funcionan?" 2014.
- [73] L. Wang, B. Pan, J. Sheng, J. Xu, and Q. Hu, "Antioxidant activity of spirulina platensis extracts by supercritical carbon dioxide extraction," *Food Chemistry*, vol. 105, no. 1, pp. 36–41, 2007.
- [74] B. d. S. A. F. Brasil, F. G. de Siqueira, T. F. C. Salum, C. M. Zanette, and M. R. Spier, "Microalgae and cyanobacteria as enzyme biofactories," *Algal Research*, vol. 25, pp. 76–89, 2017.
- [75] E. S. Servando, C. C. Saro, J. C. Marrero, H. M. P. Núñez, and I. G. Fuentes, "La manipulación genética un enigma del siglo XXI," *Panorama Cuba y Salud*, vol. 7, no. 1, pp. 37–43, 2012.
- [76] Z. Dai and J. W. Locasale, "Understanding metabolism with flux analysis: from theory to application," *Metabolic Engineering*, vol. 43, pp. 94–102, 2017.
- [77] Y. E. Cheah and J. D. Young, "Isotopically nonstationary metabolic flux analysis (inst-mfa): putting theory into practice," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 54, pp. 80–87, 2018.
- [78] M. C. Pedraza Cuesta and M. C. Prada Garavito, "Evaluación de la biofijación de CO<sub>2</sub> y producción de biomasa a partir de las microalgas bajo condiciones de fotobiorreactor a escala laboratorio," B.S. thesis, Fundación Universidad de América, 2018.

- [79] E. Pérez-Urria Carril, “Fotosíntesis: aspectos básicos,” *Reduca (Biología)*, vol. 2, no. 3, 2009.
- [80] E. B. Sydney, A. C. N. Sydney, J. C. de Carvalho, and C. R. Soccol, “Potential carbon fixation of industrially important microalgae,” in *Biofuels from Algae*. Elsevier, 2019, pp. 67–88.
- [81] R. Jaime-Infante, Z. H. Martínez, J. Triana-Dopico, O. F. Tellez, A. M. Aquino, D. Gamermann, P. F. de Córdoba-Castellá, and J. I. Urchueguía-Schölzel, “Herramienta para la optimización de flujos metabólicos en un sistema biológico.” *Investigación Operacional*, vol. 35, no. 2, pp. 96–103, 2014.
- [82] P. Carbonell, *Metabolic Pathway Design*. Springer, 2019.
- [83] S. Al-Fedaghi, “Thining matlab for computer engineering.”
- [84] S. Eshkabilov, *Beginning MATLAB and Simulink*. Springer, 2019.
- [85] R. Mahadevan and C. Schilling, “The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models,” *Metabolic engineering*, vol. 5, no. 4, pp. 264–276, 2003.
- [86] M. Cavazzuti and M. Cavazzuti, “Deterministic optimization,” *Optimization methods: From theory to design scientific and technological aspects in mechanics*, pp. 77–102, 2013.
- [87] K. Raman and N. Chandra, “Flux balance analysis of biological systems: applications and challenges,” *Briefings in bioinformatics*, vol. 10, no. 4, pp. 435–449, 2009.
- [88] M. Budinich, J. Bourdon, A. Larhlimi, and D. Eveillard, “A multi-objective constraint-based approach for modeling genome-scale microbial ecosystems,” *PloS one*, vol. 12, no. 2, p. e0171744, 2017.
- [89] R. Andrade, M. Doostmohammadi, J. L. Santos, M.-F. Sagot, N. P. Mira, and S. Vinga, “Momo-multi-objective metabolic mixed integer optimization: application to yeast strain engineering,” *BMC bioinformatics*, vol. 21, pp. 1–13, 2020.
- [90] E. van Pelt-KleinJan, D. H. de Groot, and B. Teusink, “Understanding fba solutions under multiple nutrient limitations,” *Metabolites*, vol. 11, no. 5, p. 257, 2021.
- [91] K. Hussain, M. N. Mohd Salleh, S. Cheng, and Y. Shi, “Metaheuristic research: a comprehensive survey,” *Artificial intelligence review*, vol. 52, pp. 2191–2233, 2019.
- [92] X.-S. Yang and S. Deb, “Cuckoo search: recent advances and applications,” *Neural Computing and applications*, vol. 24, pp. 169–174, 2014.
- [93] K.-H. Chang, “Chapter 19 - multiobjective optimization and advanced topics,” in *e-Design*, K.-H. Chang, Ed. Boston: Academic Press, 2015, pp. 1105–1173. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123820389000193>
- [94] P. Limleamthong and G. Guillén-Gosálbez, “Combined use of bilevel programming and multi-objective optimization for rigorous analysis of pareto fronts in sustainability studies: Application to the redesign of the uk electricity mix,” in *28th European Symposium on Computer Aided Process Engineering*, ser. Computer Aided Chemical Engineering, A. Friedl, J. J. Klemeš, S. Radl, P. S. Varbanov, and T. Wallek, Eds. Elsevier, 2018, vol. 43, pp. 1099–1104. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444642356501923>

- [95] K.-H. Chang, “Multiobjective optimization and advanced topics,” *Design Theory and Methods Using CAD/CAE*, pp. 325–406, 2015.
- [96] J. S. Arora, “Multiobjective optimum design concepts and methods,” *Introduction to optimum design*, pp. 657–679, 2012.
- [97] C. A. Coello, G. B. Lamont, and D. A. Van Veldhuizen, *Algorithms for Solving Multi-Objective Problems*. New York, NY, USA: Springer, 2007.
- [98] P. Ngatchou, A. Zarei, and A. El-Sharkawi, “Pareto multi objective optimization,” in *Proceedings of the 13th International Conference on, Intelligent Systems Application to Power Systems*. IEEE, 2005, pp. 84–91.
- [99] T. Back, *Evolutionary algorithms in theory and practice: evolution strategies, evolutionary programming, genetic algorithms*. Oxford university press, 1996.
- [100] A. E. Eiben and J. Smith, “From evolutionary computation to the evolution of things,” *Nature*, vol. 521, no. 7553, pp. 476–482, 2015.
- [101] P. H. R. Gabriel and A. C. B. Delbem, “Fundamentos de algoritmos evolutivos,” 2008.
- [102] L. V. S. Quintero, C. A. C. Coello *et al.*, “Una introducción a la computación evolutiva y alguna de sus aplicaciones en economía y finanzas//an introduction to evolutionary computation and some of its applications in economics and finance,” *Revista de Métodos Cuantitativos para la Economía y la Empresa*, vol. 2, pp. páginas–3, 2006.
- [103] S. Mirjalili and S. Mirjalili, “Genetic algorithm,” *Evolutionary Algorithms and Neural Networks: Theory and Applications*, pp. 43–55, 2019.
- [104] A. J. Umbarkar and P. D. Sheth, “Crossover operators in genetic algorithms: a review.” *ICTACT journal on soft computing*, vol. 6, no. 1, 2015.
- [105] K. Deb, A. Pratap, S. Agarwal, and T. Meyarivan, “A fast and elitist multiobjective genetic algorithm: Nsga-ii,” *IEEE Transactions on Evolutionary Computation*, vol. 6, no. 2, pp. 182–197, 2002.
- [106] L. Cruz, E. Fernandez, C. Gomez, G. Rivera, and F. Perez, “Many-objective portfolio optimization of interdependent projects with ‘a priori’ incorporation of decision-maker preferences,” *Applied Mathematics & Information Sciences*, vol. 8, no. 4, pp. 1517–1531, 2014.
- [107] G. Rivera, R. Florencia, M. Guerrero, R. Porras, and J. Sanchez-Solis, “Online multi-criteria portfolio analysis through compromise programming models built on the underlying principles of fuzzy outranking,” *Information Sciences*, vol. 580, no. 2021, pp. 734–755, 2021.
- [108] T. Vo-Duy, D. Duong-Gia, V. Ho-Huu, H. C. Vu-Do, and T. Nguyen-Thoi, “Multi-objective optimization of laminated composite beam structures using nsga-ii algorithm,” *Composite Structures*, vol. 168, pp. 498–509, 2017.
- [109] Q. Zhang and H. Li, “Moea/d: A multiobjective evolutionary algorithm based on decomposition,” *IEEE Transactions on evolutionary computation*, vol. 11, no. 6, pp. 712–731, 2007.

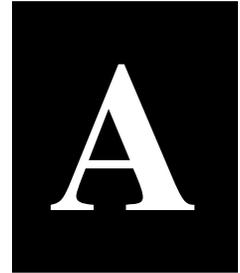
- [110] C. A. Ville *et al.*, “Biología,” *Editorial Océano*, 1996.
- [111] T. Arfin, S. Athar, and S. Rangari, “Proteins and their novel applications,” *Handbook of biopolymers: advances and multifaceted applications*. Pan Stanford Publishing, Singapore, pp. 75–93, 2018.
- [112] A. Dereeper, S. Audic, J.-M. Claverie, and G. Blanc, “Blast-explorer helps you building datasets for phylogenetic analysis,” *BMC evolutionary biology*, vol. 10, no. 1, pp. 1–6, 2010.
- [113] N. Vlassis, M. P. Pacheco, and T. Sauter, “Fast reconstruction of compact context-specific metabolic network models,” *PLoS Comput Biol*, vol. 10, no. 1, p. e1003424, 2014.
- [114] F. J. B. VALENZUELA, “Estimación de los flujos metabólicos de isaria fumosorosea durante la síntesis de metabolitos insecticidas,” 2010.
- [115] C. López Zazueta, O. Bernard, and J.-L. Gouzé, “Dynamical reduction of linearized metabolic networks through quasi steady state approximation,” *AIChE Journal*, vol. 65, no. 1, pp. 18–31, 2019.
- [116] Z. Hou, R. Chi, and H. Gao, “An overview of dynamic-linearization-based data-driven control and applications,” *IEEE Transactions on Industrial Electronics*, vol. 64, no. 5, pp. 4076–4090, 2016.
- [117] A. M. Feist and B. O. Palsson, “The biomass objective function,” *Current opinion in microbiology*, vol. 13, no. 3, pp. 344–349, 2010.
- [118] C. Liang, L. Wang, Y. Zhang, J. Zhang, X. Zhang, and N. Ye, “The effects of elevated co2 concentrations on changes in fatty acids and amino acids of three species of microalgae,” *Phycologia*, vol. 59, no. 3, pp. 208–217, 2020.
- [119] A. Vanitha, M. Narayan, K. Murthy, and G. Ravishankar, “Comparative study of lipid composition of two halotolerant alga, *dunaliella bardawil* and *dunaliella salina*,” *International journal of food sciences and nutrition*, vol. 58, no. 5, pp. 373–382, 2007.
- [120] M. Guevara, R. Pinto, J. Villarroel, E. Hernández, R. Díaz, B. Gotera, and R. Cortez, “Influencia de la salinidad y la irradiancia sobre el crecimiento y composición bioquímica de una nueva cepa de *dunaliella salina*, proveniente de las salinas de araya, venezuela,” *Saber*, vol. 28, no. 3, pp. 494–501, 2016.
- [121] J. D. Orth, I. Thiele, and B. Ø. Palsson, “What is flux balance analysis?” *Nature biotechnology*, vol. 28, no. 3, pp. 245–248, 2010.
- [122] H. Knoop, Y. Zilliges, W. Lockau, and R. Steuer, “The metabolic network of *synechocystis* sp. pcc 6803: systemic properties of autotrophic growth,” *Plant physiology*, vol. 154, no. 1, pp. 410–422, 2010.
- [123] A. Montagud, A. Zelezniak, E. Navarro, P. F. de Córdoba, J. F. Urchueguía, and K. R. Patil, “Flux coupling and transcriptional regulation within the metabolic network of the photosynthetic bacterium *synechocystis* sp. pcc6803,” *Biotechnology journal*, vol. 6, no. 3, pp. 330–342, 2011.

- [124] T. T. Vu, E. A. Hill, L. A. Kucek, A. E. Konopka, A. S. Beliaev, and J. L. Reed, “Computational evaluation of *synechococcus* sp. pcc 7002 metabolism for chemical production,” *Biotechnology journal*, vol. 8, no. 5, pp. 619–630, 2013.
- [125] X. Qian, M. K. Kim, G. K. Kumaraswamy, A. Agarwal, D. S. Lun, and G. C. Dismukes, “Flux balance analysis of photoautotrophic metabolism: Uncovering new biological details of subsystems involved in cyanobacterial photosynthesis,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, vol. 1858, no. 4, pp. 276–287, 2017.
- [126] S. Alagesan, S. B. Gaudana, A. Sinha, and P. P. Wangikar, “Metabolic flux analysis of *cyanotheca* sp. atcc 51142 under mixotrophic conditions,” *Photosynthesis research*, vol. 118, no. 1, pp. 191–198, 2013.
- [127] D. A. Norena-Caro, C. Zuniga, A. J. Pete, S. A. Saemundsson, M. R. Donaldson, A. J. Adams, K. M. Dooley, K. Zengler, and M. G. Benton, “Analysis of the cyanobacterial amino acid metabolism with a precise genome-scale metabolic reconstruction of *anabaena* sp. utex 2576,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 171, p. 108008, 2021.
- [128] A. Juneja, F. W. Chaplen, and G. S. Murthy, “Genome scale metabolic reconstruction of *chlorella variabilis* for exploring its metabolic potential for biofuels,” *Bioresource Technology*, vol. 213, pp. 103–110, 2016.
- [129] C. Wu, W. Xiong, J. Dai, and Q. Wu, “Genome-based metabolic mapping and <sup>13</sup>C flux analysis reveal systematic properties of an oleaginous microalga *chlorella protothecoides*,” *Plant physiology*, vol. 167, no. 2, pp. 586–599, 2015.
- [130] N. Stiti, T. D. Missihoun, S. O. Kotchoni, H.-H. Kirch, and D. Bartels, “Aldehyde dehydrogenases in *arabidopsis thaliana*: biochemical requirements, metabolic pathways, and functional analysis,” *Frontiers in plant science*, vol. 2, p. 65, 2011.
- [131] L. Cruz-Reyes, E. Fernandez, and N. Rangel-Valdez, “A metaheuristic optimization-based indirect elicitation of preference parameters for solving many-objective problems,” *International Journal of Computational Intelligence Systems*, vol. 10, no. 2017, pp. 56 – 77, 2017.
- [132] K. Deb and M. Goyal, “A combined genetic adaptive search (geneas) for engineering design,” *Computer Science and Informatics*, vol. 26, no. 4, pp. 30 – 45, 1996.
- [133] K. Deb and R. B. Agrawal, “Simulated binary crossover for continuous search space,” *Complex Systems*, vol. 9, no. 2, pp. 115 – 148, 1995.
- [134] K. Deb, M. Goyal *et al.*, “A combined genetic adaptive search (geneas) for engineering design,” *Computer Science and informatics*, vol. 26, pp. 30–45, 1996.
- [135] K. Deb, “An efficient constraint handling method for genetic algorithms,” *Computer methods in applied mechanics and engineering*, vol. 186, no. 2000, pp. 311 – 338, 2000.
- [136] A. y. E. A. y. S. N. y. L. N. E. y. P. B. O. King, Zachary A y Dr .<sup>a</sup> ger, “Escher: una aplicación web para crear, compartir e incorporar visualizaciones ricas en datos de rutas biológicas,” *PLoS computational biology*.

- [137] A. M. Kliphuis, A. J. Klok, D. E. Martens, P. P. Lamers, M. Janssen, and R. H. Wijffels, “Metabolic modeling of *chlamydomonas reinhardtii*: energy requirements for photoautotrophic growth and maintenance,” *Journal of applied phycology*, vol. 24, no. 2, pp. 253–266, 2012.
- [138] M. F. Briones-Baez, L. Aguilera-Vazquez, N. Rangel-Valdez, A. L. Martinez-Salazar, and C. Zuñiga, “Multi-objective optimization of microalgae metabolism: An evolutive algorithm based on fba,” *Metabolites*, vol. 12, no. 7, p. 603, 2022.

# **Anexos**

ANEXO



---

# **LISTADO DE REACCIONES.**

Reacción	Descripción	Fórmula
FRDPth	Transporte de farnesil pirofosfato	frdp[h] <=> frdp[c]
GRDPth	Transporte de pirofosfato de geranilo	grdp[h] <=> grdp[c]
ACAR0tu	Transporte de alfacaroteno	acar0[h] <=> acar0[u]
GCAR0tu	Transporte de gammacaroteno	gcar0[h] <=> gcar0[u]
GGDPtu	Transporte de difosfato de geranilgeranilo por difusión	ggdp[h] <=> ggdp[u]
FPPS	Farnesil pirofosfato sintasa	grdp[c] + ipdp[c] -> frdp[c] + ppi[c]
FPPSh	Farnesil pirofosfato sintasa, cloroplasto	grdp[h] + ipdp[h] -> frdp[h] + h[h] + ppi[h]
GGPS	geranilgeranilo difosfato sintasa	frdp[h] + ipdp[h] -> ggdp[h] + h[h] + ppi[h]
GPPSh	geranyl pyrophosphate synthase, chloroplast	dmp[h] + ipdp[h] -> grdp[h] + h[h] + ppi[h]
IDS2	dimetilalil-difosfato sintasa	h[h] + h2mb4p[h] + nadph[h] -> dmp[h] + h2o[h] + nadp[h]
ANXANASCOR	Antheraxantina:ascorbato oxidoreductasa	anxan[u] + ascb-L[u] <=> dhdascb[u] + h2o[u] + zaxan[u]
BCAROH	betacaroteno hidroxilasa	caro[u] + h[u] + nadph[u] + o2[u] <=> bcrptxan[u] + h2o[u] + nadp[u]
BCRPTXANH	beta-criptoxantina hidroxilasa	bcrptxan[u] + h[u] + nadph[u] + o2[u] <=> h2o[u] + nadp[u] + zaxan[u]
CHYA1	alfa-caroteno hidroxilasa (formadora de zeinoxantina)	acar0[u] + h[u] + nadph[u] + o2[u] -> h2o[u] + nadp[u] + zxan[u]
CHYA2	alfa-caroteno hidroxilasa (formadora de alfa-criptoxantina)	acar0[u] + h[u] + nadph[u] + o2[u] -> crpxan[u] + h2o[u] + nadp[u]
CXHY	criptoxantina hidroxilasa	crpxan[u] + h[u] + nadph[u] + o2[u] -> h2o[u] + lut[u] + nadp[u]
LCYA	licopeno ciclasa (productor de alfacaroteno)	dcaro[h] <=> acar0[h]
LCYB	licopeno ciclasa (productor de betacaroteno)	gcar0[u] <=> caro[u]
LCYD	licopeno ciclasa (productor de deltaroteno)	lyc[h] <=> dcaro[h]
LCYG	licopeno ciclasa (productor de gammacaroteno)	lyc[h] <=> gcar0[h]
NEOXANS	neoxantina sintasa	vioxan[u] <=> neoxan[u]
NOR	Neurosporene oxidoreductasa	norsp[h] + o2[h] + pqh2[h] <=> 2 h2o[h] + lyc[h] + pq[h]
PDS1	fitoeno desaturasa (1)	phyto[h] + pq[h] <=> phytf[h] + pqh2[h]
PDS2	fitoeno desaturasa (2)	phytf[h] + pq[h] <=> pqh2[h] + zcaro[h]
PSY	Fitoeno sintasa	2 ggdp[h] -> 2 h[h] + phyto[h] + 2 ppi[h]
VIOXANOR	violaxantina:ascorbato oxidoreductasa	ascb-L[u] + vioxan[u] <=> anxan[u] + dhdascb[u] + h2o[u]
ZDS	Zeta-caroteno desaturasa	o2[h] + pqh2[h] + zcaro[h] <=> 2 h2o[h] + norsp[h] + pq[h]
ZHY	zeinoxantina hidroxilasa	h[u] + nadph[u] + o2[u] + zxan[u] -> h2o[u] + lut[u] + nadp[u]
CHLASG	Clorofila A sintasa (geranilgeranilo)	chl[a]u + ggdp[u] -> ggchld[a]u + h[u] + ppi[u]
GGCHLDAR	Geranilgeranil-clorofilida a reductasa	ggchld[a]u + 3 h[u] + 3 nadph[u] -> chl[a]u + 3 nadp[u]

**Tabla 1.1:** Listado de Reacciones. Caso de estudio: Distribución de flujos en la biosíntesis de pigmentos de la microalga *C. vulgaris*

Anexo A. LISTADO DE REACCIONES.

Metabolito	Nombre	Fórmula
h2o[h]	H2O	H2O
ppi[h]	Diphosphate	P2HO7
nadph[u]	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate - reduced	C21H26N7O17P3
acaroh[h]	alpha-Carotene	C40H56
acarou[u]	alpha-Carotene	C40H56
ascb-L[u]	Ascorbate	C6H7O6
carou[u]	beta-Carotene	C40H56
chla[u]	Chlorophyll a	C55H72MgN4O5
chlda[u]	Chlorophyllide a	C35H34MgN4O5
dcaro[h]	delta-Carotene	C40H56
dhdascb[u]	Dehydroascorbate	C6H5O6
dmpp[h]	Dimethylallyl diphosphate	C5H9O7P2
frdp[c]	trans,trans-Farnesyl diphosphate	C15H25O7P2
gcaro[h]	gamma-Carotene	C40H56
gcarou[u]	gamma-Carotene	C40H56
ggchlda[u]	geranylgeranyl-Chlorophyllide a	C55H66MgN4O5
ggdp[u]	Geranylgeranyl diphosphate	C20H33O7P2
grdp[c]	Geranyl diphosphate	C10H17O7P2
h[h]	H+	H
h[u]	H+	H
h2o[u]	H2O	H2O
lut[u]	Lutein	C40H56O2
nadp[h]	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	C21H25N7O17P3
nadp[u]	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	C21H25N7O17P3
nadph[h]	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate - reduced	C21H26N7O17P3
nadph[u]	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate - reduced	C21H26N7O17P3
neoxan[u]	Neoxanthin	C40H56O4
norsp[h]	Neurosporene	C40H58
o2[h]	O2	O2
o2[u]	O2	O2
phyto[h]	Phytoene	C40H64
ppi[c]	Diphosphate	P2HO7
pq[h]	oxidized plastoquinone	C13H16O2
pqh2[h]	reduced plastoquinone	C13H18O2
zaxan[u]	Zeaxanthin	C40H56O2
zcaro[h]	zeta-Carotene	C40H60
zxan[u]	Zeinoxanthin	C40H56O
ggdp[h]	Geranylgeranyl diphosphate /D	C20H33O7P2
acaroh[h]	alpha-Carotene	C40H56
acarou[u]	alpha-Carotene	C40H56
anxan[u]	Antheraxanthin	C40H56O3
bcrptxan[u]	beta-Cryptoxanthin	C40H56O
carou[u]	beta-Carotene	C40H56
crpxan[u]	alpha-Cryptoxanthin	C40H56O
dcaro[h]	delta-Carotene	C40H56
dmpp[h]	Dimethylallyl diphosphate	C5H9O7P2
frdp[h]	trans,trans-Farnesyl diphosphate	C15H25O7P2
gcaro[h]	gamma-Carotene	C40H56
gcarou[u]	gamma-Carotene	C40H56
ggdp[h]	Geranylgeranyl diphosphate	C20H33O7P2
grdp[c]	Geranyl diphosphate	C10H17O7P2
grdp[h]	Geranyl diphosphate	C10H17O7P2
h[h]	H+	H
lyc[h]	Lycopene	C40H56
phytfl[h]	Phytofluene	C40H62
vioxan[u]	Violaxanthin	C40H56O4

**Tabla 1.2:** Metabolitos en la distribución de flujos en la biosíntesis de pigmentos en la microalga *C. vulgaris*.