

Optativa 4rt curs de Biotecnologia

Modelització i simulació de biosistemes

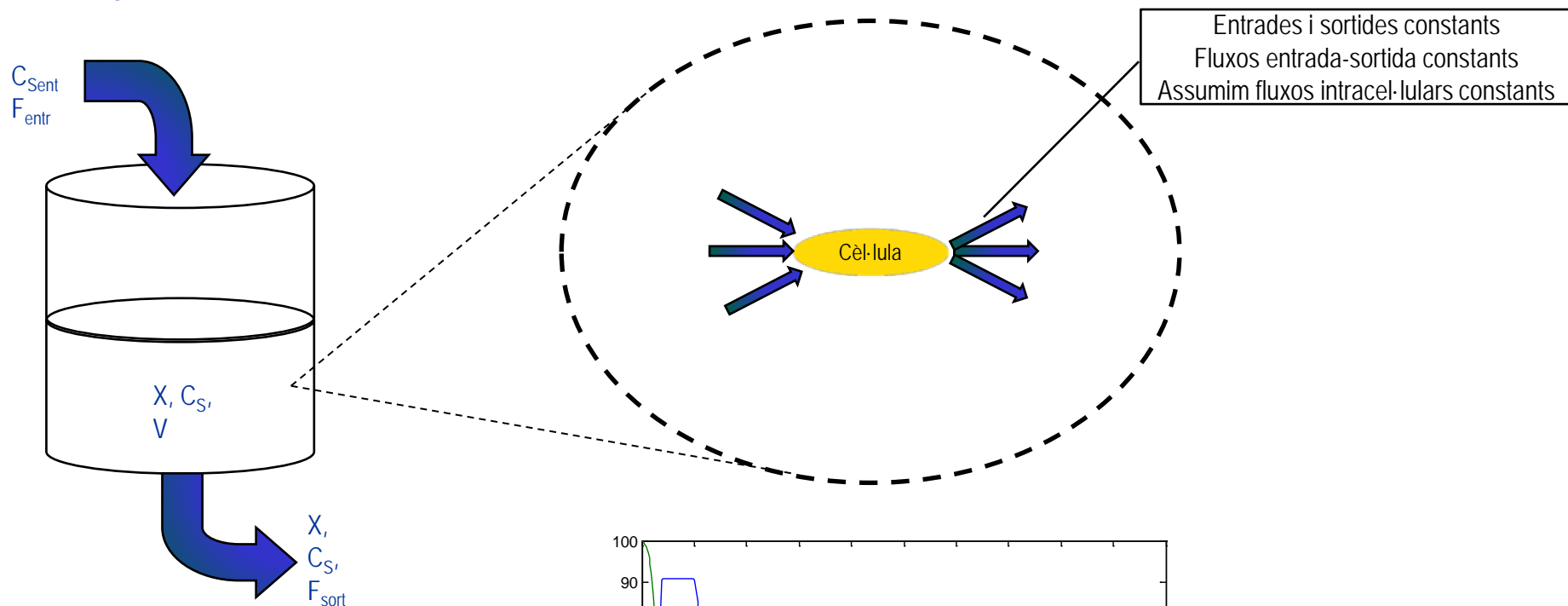
Sistemes en estat estacionari. MFA

Joan Albiol

Departament d'Enginyeria Química
Escola d'Enginyeria
Universitat Autònoma de Barcelona

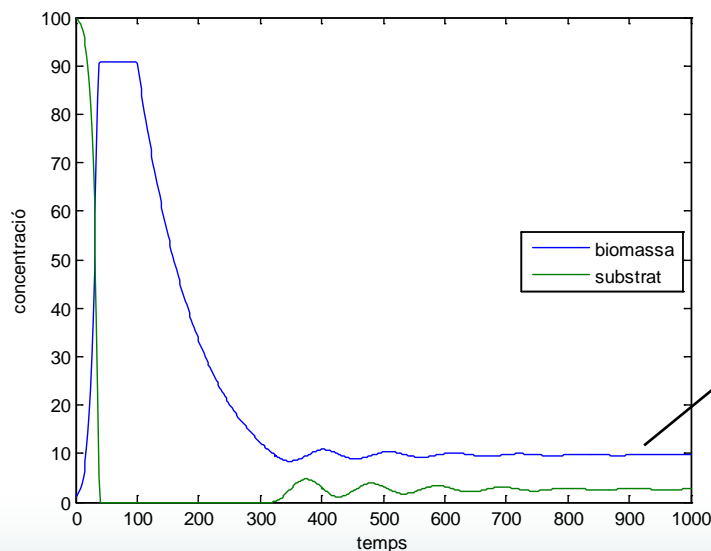


Exemple de situació de referència: Bioreactor RCTA en estat estacionari.



$$A = E - S + G$$

$$r_s = \frac{m}{Y_{X/S}} = \frac{D(C_{sent} - C_s)}{X} = q_s; \frac{\text{æmmol}}{\text{g} \cdot \text{h}} \frac{\text{ö}}{\text{ö}}$$



Estat estacionari.
($dx/dt=0$)

A partir de les diverses fonts d'informació disponibles es poden construir models estequiomètrics per estudiar el metabolisme generalment seguint un procés iteratiu



Pathway databases



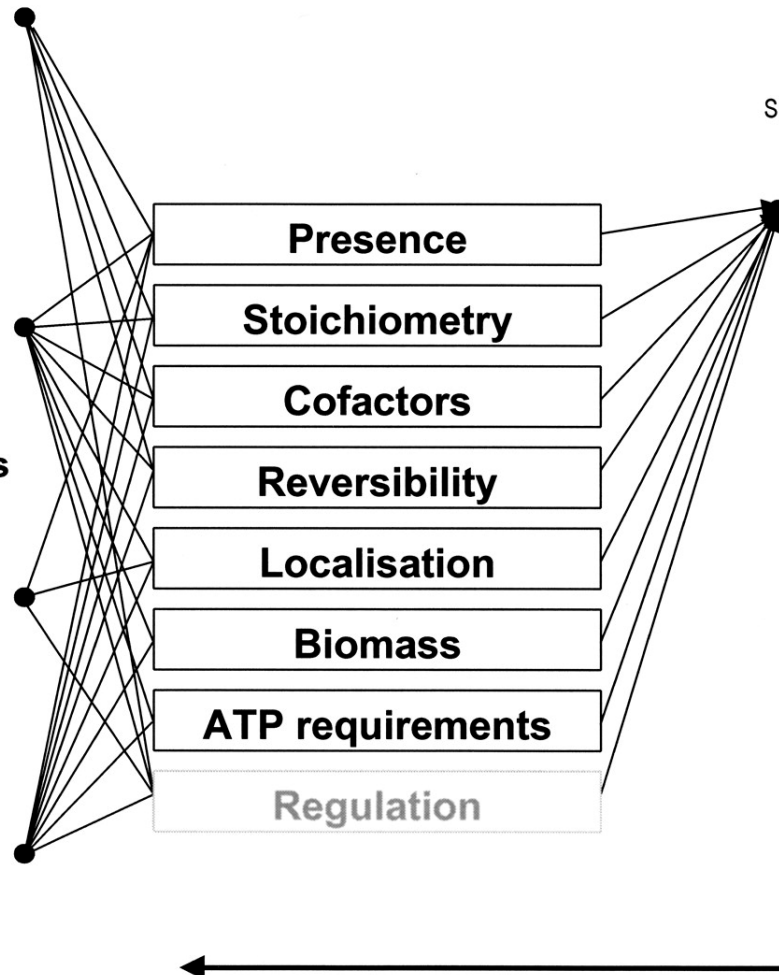
Biochemistry Books

ATGGTTCATTTAGGTCCAAAGAA
ACCACAGGCTAGAAAGGGTTCC
ATGGCTGATGTGCCAAGGAAT
TGATGGATGAAATTCATCAGTTG
GAAGATATGTTACAGTTGACAG

Annotated Genome

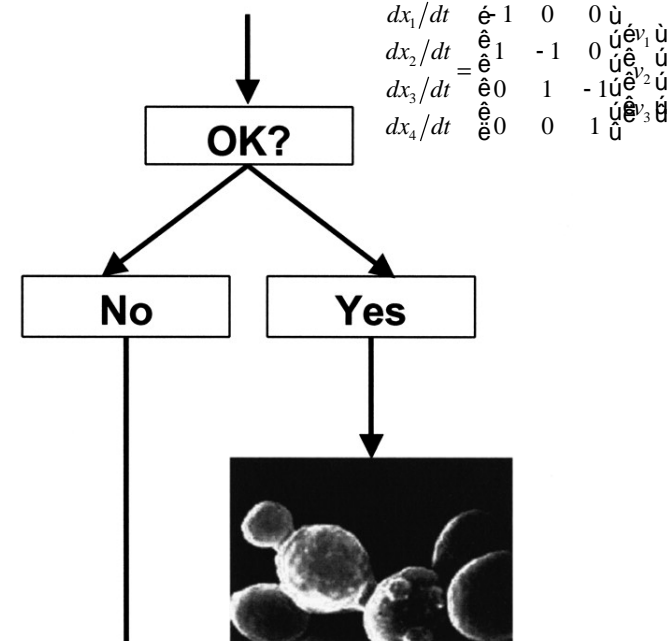


Recent publications
Review articles

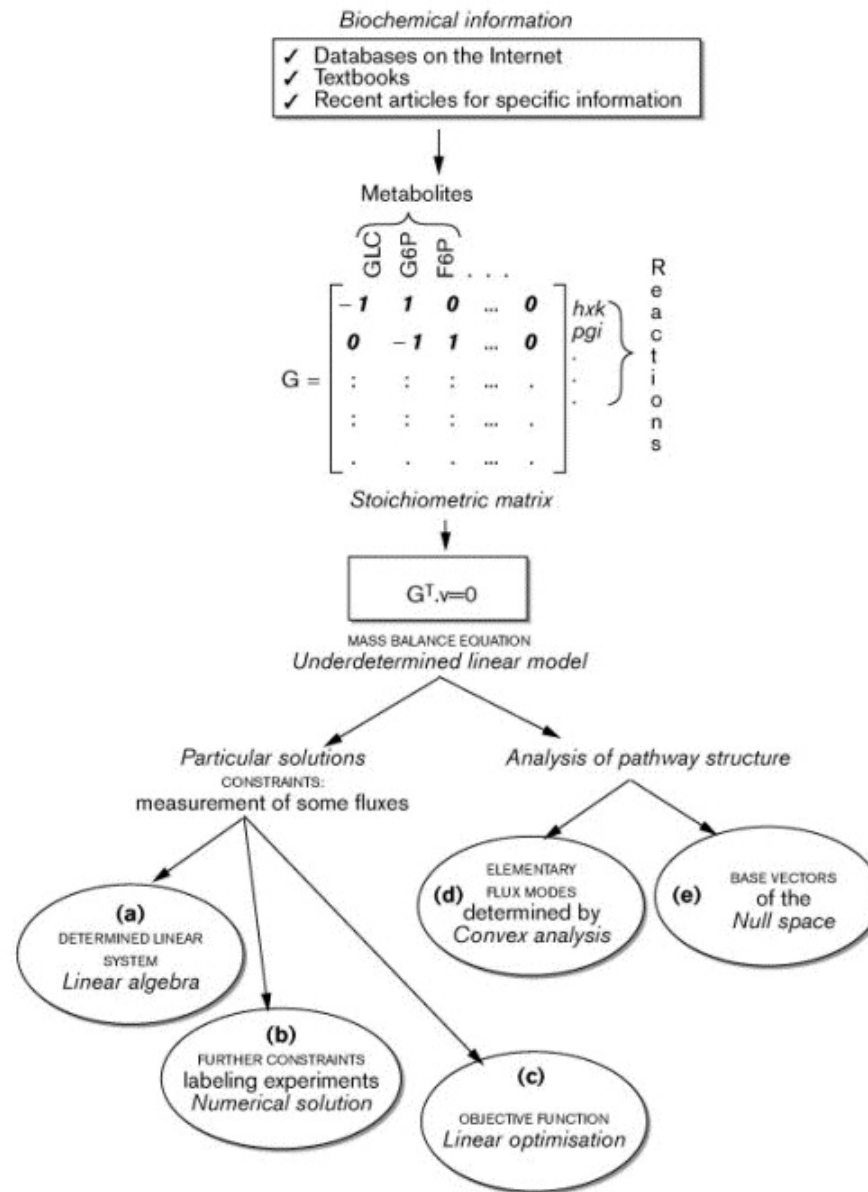


$$S = \begin{matrix} & \begin{matrix} \text{HXK1} & \text{PGI1} & \text{PFK1} \end{matrix} & & & & & & & & \\ \begin{matrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & \dots & 0 & 0 \end{matrix} & \text{GLC} \\ \begin{matrix} -1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & \dots & 0 & 0 \end{matrix} & \text{G6P} \\ \begin{matrix} 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & \dots & \dots & 0 & 0 \end{matrix} & \text{F6P} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \begin{matrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & \dots & 0 & 0 \end{matrix} & \text{Amino Acids} \\ \begin{matrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & \dots & 0 & 0 \end{matrix} & \text{Nucleotides} \end{matrix}$$

Metabolic Model



Predictions₃



Les xarxes metabòliques es defineixen a partir dels seus constituents fonamentals: les reaccions

Una reacció senzilla tal com la catalitzada per la catalasa [EC 1.11.1.6]

Noms alternatius per abreujar



Coefficients estequiomètrics



Reordenació convencional:

Productes - Substrats

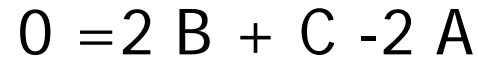
$$0 = 2 B + C - 2 A$$

En realitat els coeficients no són únics

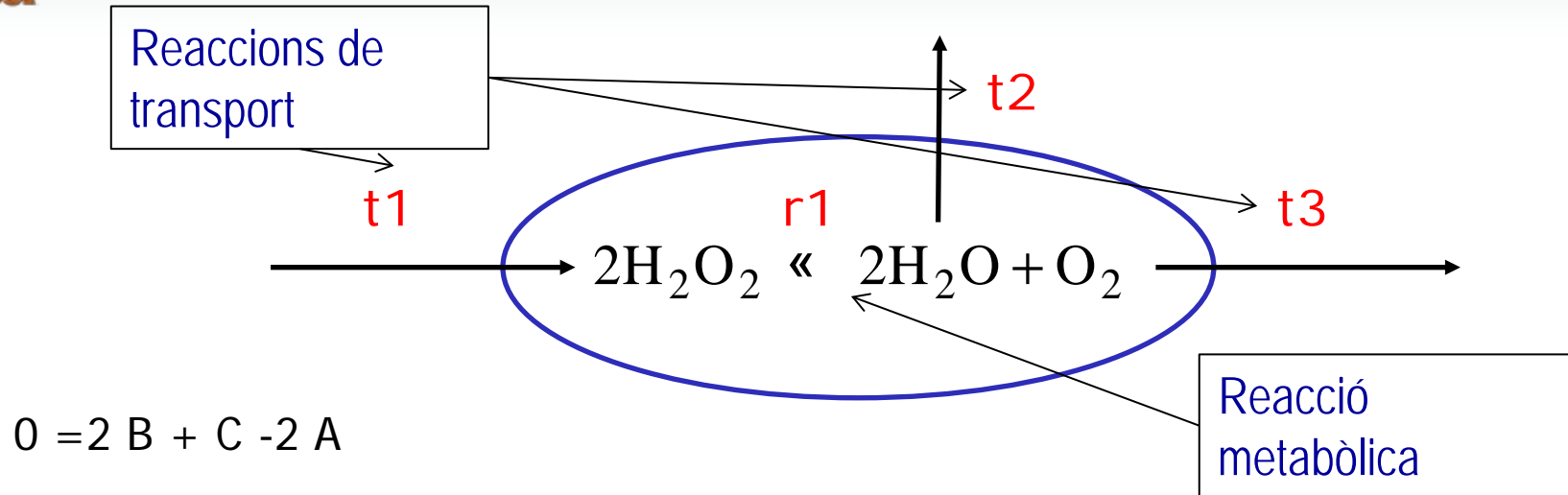
Es poden multiplicar o dividir per una constant sense variar la relació.

Exemple alternativa de coeficients: $0 = 1 B + 0.5 C - 1 A$

Conceptes bàsics a recordar:



- Els coeficients estequiomètrics relacionen el nombre de molècules que intervenen. Es poden escalar mantenint la proporcionalitat.
- Els signes dels coeficients depenen de la direcció escollida.
- Les reaccions son reversibles i avancen cap a l'equilibri.
- A l'equilibri les velocitats directa e inversa són iguals
- Els enzims acceleren la reacció però no poden canviar les condicions d'equilibri.
- Les reaccions molt desplaçades cap a productes es poden considerar a la pràctica com a irreversibles.



Com ja hem vist en tots els sistemes vius es compleix el principi de conservació de la matèria que es pot representar com:

$$\text{Acumulació} = \text{Generació} + \text{Entrada} - \text{Sortida}$$

Es pot escriure una equació de conservació o balanç per cada metabòlit, per ex.:

Acumulació

Entrada - Sortida

Generació

$$\frac{d(H_2O_2)}{dt} = -2 \times r1 + t1 - 0$$

$$\frac{d(H_2O)}{dt} = +2 \times r1 + 0 - t2$$

$$\frac{d(O_2)}{dt} = +1 \times r1 + 0 - t3$$

The diagram shows three mass balance equations. The first equation for H_2O_2 is enclosed in a dashed box, with an arrow from the 'Acumulació' (Accumulation) label pointing to it. The right-hand side of this equation, $-2 \times r1 + t1 - 0$, is also enclosed in a dashed box, with an arrow from the 'Entrada - Sortida' (Input - Output) label pointing to it. The second equation for H_2O has an arrow from the 'Generació' (Generation) label pointing to its right-hand side, $+2 \times r1 + 0 - t2$. The third equation for O_2 is shown below the others.

Per treballar és convenient expressar-ho com matrius i vectors

$$\begin{aligned}\frac{d(\text{H}_2\text{O}_2)}{dt} &= -2 \times r_1 + t_1 - 0 \\ \frac{d(\text{H}_2\text{O})}{dt} &= +2 \times r_1 + 0 - t_2 \\ \frac{d(\text{O}_2)}{dt} &= +1 \times r_1 + 0 - t_3\end{aligned}$$

Així les reaccions queden
escrites en vertical

Es pot agrupar tot en una sola parella de matriu-vector

The diagram illustrates the derivation of the mass balance equation for a control volume. It shows the time derivatives of mass for H_2O_2 and O_2 in internal and external phases, which are equated to the sum of source terms (S , T , M) multiplied by the volume fractions (v).

The vector of time derivatives is:

$$\begin{bmatrix} \frac{d(\text{H}_2\text{O}_2)_{\text{int}}}{dt} \\ \frac{d(\text{H}_2\text{O})_{\text{int}}}{dt} \\ \frac{d(\text{O}_2)_{\text{int}}}{dt} \\ \frac{d(\text{H}_2\text{O}_2)_{\text{ext}}}{dt} \\ \frac{d(\text{H}_2\text{O})_{\text{ext}}}{dt} \\ \frac{d(\text{O}_2)_{\text{ext}}}{dt} \end{bmatrix}$$

This is equated to the sum of source terms multiplied by volume fractions:

$$= \begin{bmatrix} -2 \\ 2 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} r_1 \\ v_r \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ -1 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} t_1 \\ v_t \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ -1 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} t_2 \\ v_t \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} t_3 \\ v_t \end{bmatrix}$$

The source terms are labeled S , T , and M , and the volume fractions are labeled v .

Cada fila de la matriu estequiomètrica representa un balanç a cada metabòlit intern i representa una restricció que s'ha de complir.

$$\frac{dX_i}{dt} = V_{syn} - V_{deg} + V_{trans} - V_{use}$$

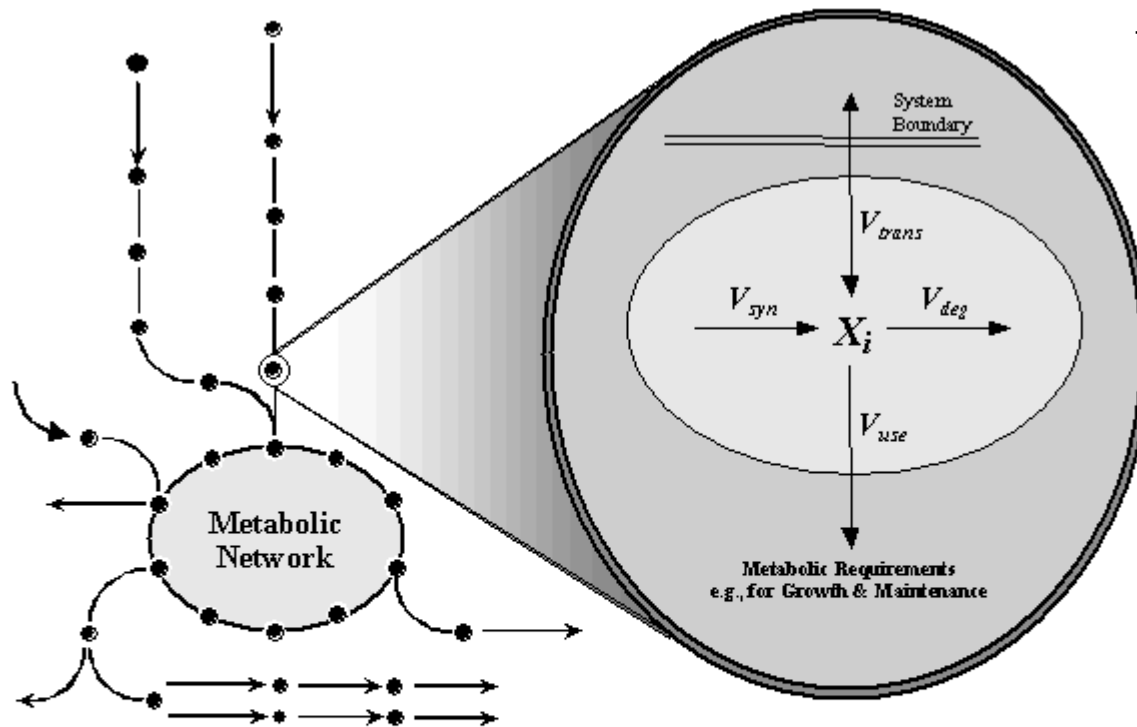


Figure 1: Defining the mass balance constraints. The mass balance constraints are defined by summing the rates of production and degradation for each metabolite in the network.

Per a molts estudis només és necessari tenir en compte les concentracions internes i llavors només mirem la part superior de la matriu

$$\begin{array}{c}
 \frac{d(\text{H}_2\text{O}_2)_{\text{int}}}{dt} \\
 \frac{d(\text{H}_2\text{O})_{\text{int}}}{dt} \\
 \frac{d(\text{O}_2)_{\text{int}}}{dt} \\
 \hline
 \frac{d(\text{H}_2\text{O}_2)_{\text{ext}}}{dt} \\
 \frac{d(\text{H}_2\text{O})_{\text{ext}}}{dt} \\
 \frac{d(\text{O}_2)_{\text{ext}}}{dt}
 \end{array}
 =
 \begin{array}{cccc}
 \begin{array}{c} \hat{e} \\ \hat{e} \\ \hat{e} \\ \hat{e} \\ \hat{e} \\ \hat{e} \end{array} &
 \begin{array}{c} 2 \\ 2 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} &
 \begin{array}{c} 1 \\ 0 \\ 0 \\ -1 \\ 0 \\ 0 \end{array} &
 \begin{array}{c} 0 \\ -1 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \\ 0 \end{array}
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 \hat{u} \\ \hat{u} \\ \hat{u} \\ \hat{u} \\ \hat{u} \\ \hat{u}
 \end{array}
 \times
 \begin{array}{c}
 \hat{e}^1 \\ \hat{e}^1 \\ \hat{e}^1 \\ \hat{e}^2 \\ \hat{e}^3 \\ \hat{e}^3
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 \hat{u} \\ \hat{u} \\ \hat{u} \\ \hat{u} \\ \hat{u} \\ \hat{u}
 \end{array}$$



$$\begin{array}{c}
 \frac{dA}{dt} \\
 \frac{dB}{dt} \\
 \frac{dC}{dt}
 \end{array}
 =
 \begin{array}{c}
 \frac{dS_1}{dt} \\
 \frac{dS_2}{dt} \\
 \frac{dS_3}{dt}
 \end{array}
 = \frac{dS}{dt} =
 \begin{array}{c}
 \frac{d(\text{H}_2\text{O}_2)_{\text{int}}}{dt} \\
 \frac{d(\text{O}_2)_{\text{int}}}{dt} \\
 \frac{d(\text{H}_2\text{O})_{\text{int}}}{dt}
 \end{array}
 =
 \begin{array}{cccc}
 \begin{array}{c} \hat{e} \\ \hat{e} \\ \hat{e} \end{array} &
 \begin{array}{c} 2 \\ 2 \\ 1 \end{array} &
 \begin{array}{c} 1 \\ 0 \\ 0 \end{array} &
 \begin{array}{c} 0 \\ 0 \\ -1 \end{array}
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 \hat{u} \\ \hat{u} \\ \hat{u}
 \end{array}
 \times
 \begin{array}{c}
 \hat{e}^1 \\ \hat{e}^1 \\ \hat{e}^2 \\ \hat{e}^3
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 \hat{u} \\ \hat{u} \\ \hat{u} \\ \hat{u}
 \end{array}
 = \mathbf{N} \cdot \mathbf{v}$$

Freqüentment només
tenim en compte els
metabòlits que estan dins
la cèl·lula (al ss $dS/dt=0$)

D'aquesta manera queda descrit de forma general un sistema de qualsevol grandària

Si tenim S_i metabolits i els seus corresponents coeficients estequiomètrics n_{ij} per cada reacció j llavors tindrem:

$$\frac{dS_i}{dt} = \sum_{j=1}^r n_{ij} v_j$$

r – número de reaccions

j – número de la reacció

i – número de metabolit

S_i – concentració de metabolit

v_j – velocitat de reacció

n_{ij} – coeficient estequiomètric

- En aquests casos assumirem que el canvi de concentració de metabòlits només depèn de les reaccions expressades i no d'altres factors com la difusió (sistema homogeni. Conc. igual a tot arreu).
- Per als casos senzills també **considerarem que la dilució deguda al creixement cel·lular és negligible** respecte al canvi degut a les reaccions (efecte de les reaccions entre 100 i 1000 vegades més gran. Turnover – o taxa de recanvi - elevat).

En forma de matrius i vectors:

Matriu estequiomètrica: $\mathbf{N} = \{n_{ij}\} \quad i = 1 \leq n, (\text{metabol.}) \quad j = 1 \leq r, (\text{reacc.})$

Vector de concentracions de metabòlits: $\mathbf{S} = [S_1, \dots, S_n]^T$

Vector de velocitats de reacció: $\mathbf{v} = [v_1, \dots, v_r]^T$

Vector paràmetres: $\mathbf{p} = [p_1, \dots, p_m]^T$

Les concentracions de metabòlits
i les velocitats de reacció
depenen del valor dels
paràmetres:

$$\mathbf{S} = \mathbf{S}(\mathbf{p}) \quad ; \quad \mathbf{v} = \mathbf{v}(\mathbf{S}, \mathbf{p}) \quad \text{per ex.:}$$

$$\mathbf{v} = \frac{\mathbf{v}_{\max} \times \mathbf{S}}{K_m + \mathbf{S}}$$

$$\mathbf{p} = [\mathbf{v}_{\max}, K_m]$$

Amb aquesta nomenclatura
podem escriure una equació que
descriu el balanç sencer:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d\mathbf{S}}{dt} = \mathbf{\dot{S}} = \mathbf{N} \cdot \mathbf{v} \\ \text{O també:} \\ \frac{d\mathbf{S}}{dt} = \mathbf{N} \cdot \mathbf{v}(\mathbf{S}(\mathbf{p}), \mathbf{p}) \end{array} \right.$$

Un estat que interessa és l'estat estacionari:

Aquell estat dinàmic en que les variables (concentracions de metabòlits) no canvien amb el temps

Si les variables que descriuen el sistema no varien -> la derivada és zero

$$\frac{d\mathbf{S}}{dt} = 0 \quad \text{El que implica} \rightarrow \quad 0 = \mathbf{N} \cdot \mathbf{v}(\mathbf{S}(\mathbf{p}), \mathbf{p})$$

En un estat metabòlic estacionari anomenarem **flux metabòlic** a:

$$\mathbf{J} = \mathbf{v}(\mathbf{S}(\mathbf{p}), \mathbf{p})$$

Es a dir els fluxos metabòlics equivalen al **conjunt de velocitats de reacció** que s'estableixen en estat estacionari (no confondre la **J** amb el Jacobià)

En un cas general l'equació:

$$\frac{d\mathbf{S}}{dt} = \mathbf{N} \cdot \mathbf{v}(\mathbf{S}(\mathbf{p}), \mathbf{p})$$

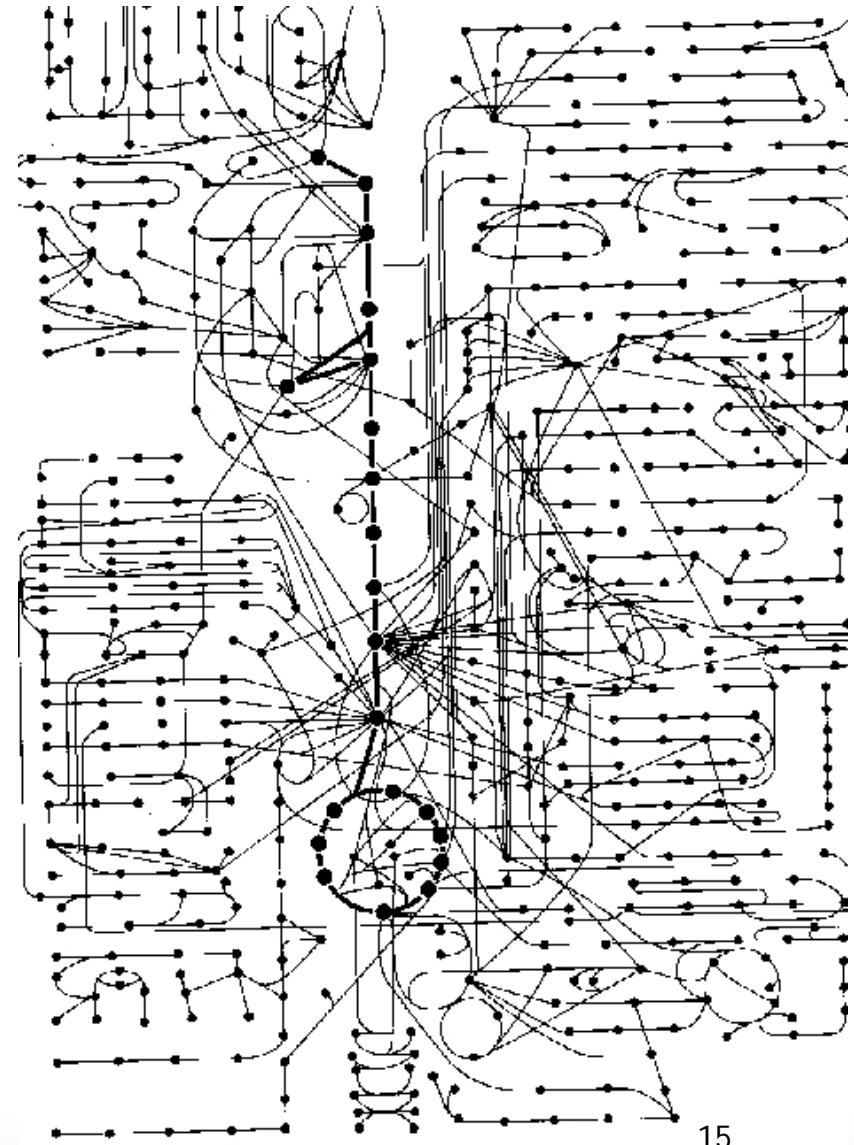
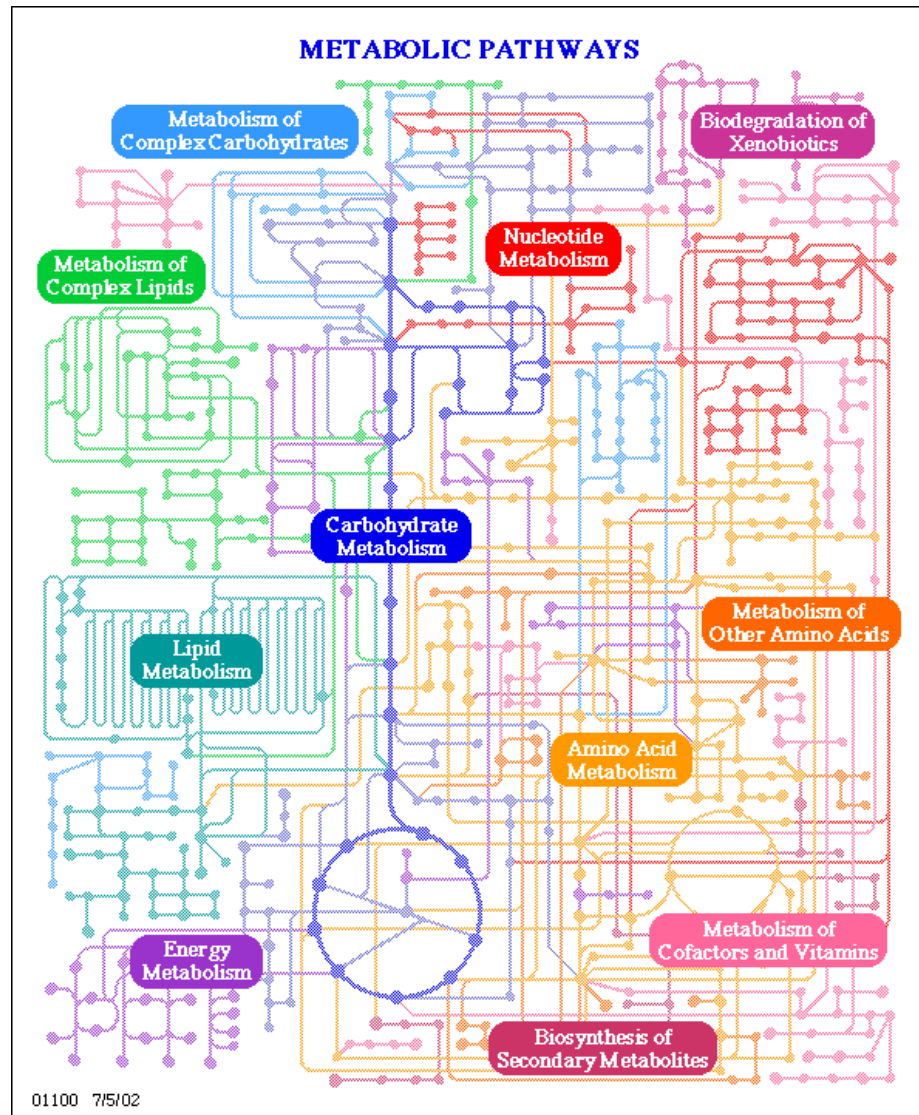
- És un sistema d'equacions habitualment no lineal on les velocitats de cada reacció depenen de les cinètiques de cada enzim.
- A la majoria de casos aquests sistemes no tenen solució analítica i s'ha de recorre a buscar una solució numèrica.
- En un cas en estat estacionari ideal $\frac{d\mathbf{S}}{dt} = 0$, les concentracions de metabòlits no varien i els fluxos són constants.
- En aquest cas els fluxos es poden determinar si es disposa d'una informació mínima.

$$0 = \mathbf{N} \cdot \mathbf{v}$$

- La matriu **N** conté informació de totes les vies metabòliques considerades i delimita les solucions possibles. El seu estudi ja dona informació valuosa

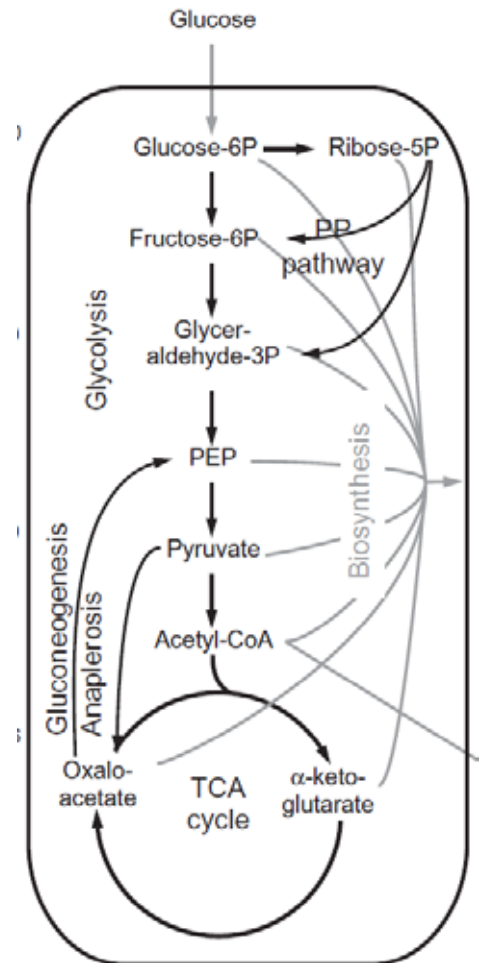
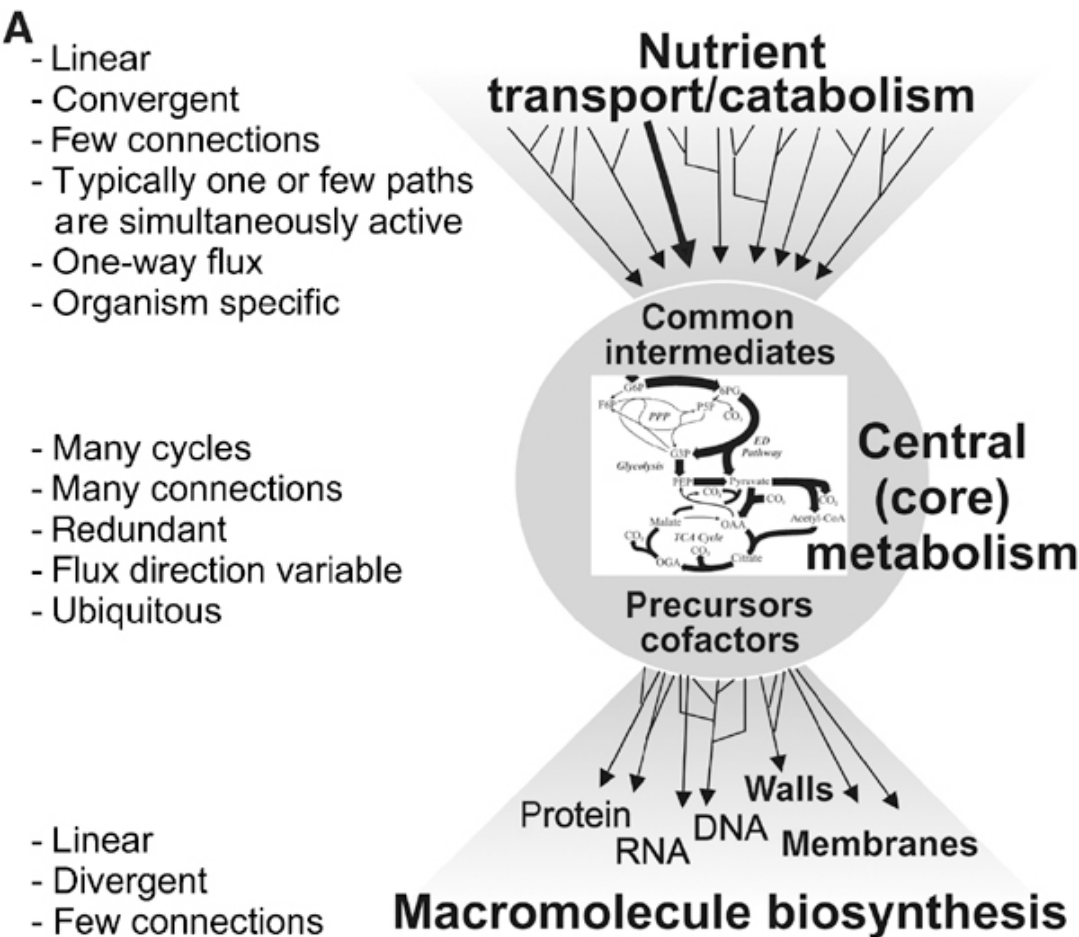
Anàlisi de la distribució del flux. (Metabolic Flux analysis)

Visions generals del metabolisme com xarxes complexes



Anàlisi de la distribució del flux. (Metabolic Flux analysis)

Visió del metabolisme com una estructura en 'corbatí' (bow Tie))



Tot i que el metabolisme és una xarxa complexa, freqüentment n'hi ha prou considerant el metabolisme central. (Sempre que transporti la major part del carboni)

En molts casos interessa calcular la distribució de fluxos metabòlics d'una xarxa donat que es troben directament relacionats amb el seu estat fisiològic. Per determinar-los es necessiten mesures experimentals. Podem reformular el sistema inicial tal com:

$$0 = \mathbf{N} \cdot \mathbf{v} \quad \longrightarrow \quad 0 = \mathbf{N}_c \cdot \mathbf{v}_c + \mathbf{N}_m \cdot \mathbf{v}_m$$

Agrupant les reaccions en dues matrius que inclouen respectivament, els fluxos calculats i els mesurats.

$$\mathbf{N}_c \cdot \mathbf{v}_c = - \mathbf{N}_m \cdot \mathbf{v}_m = b$$

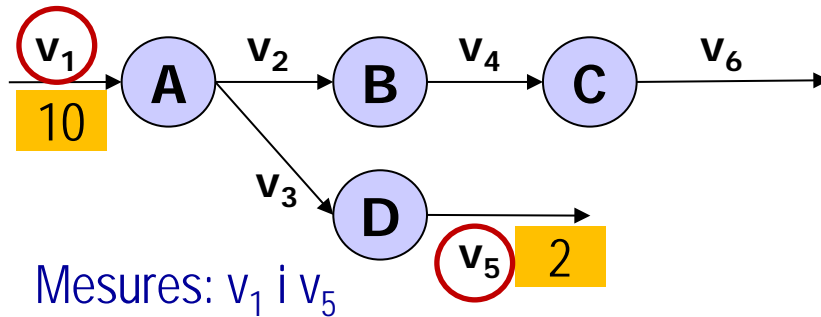
$$\mathbf{N}_c \cdot \mathbf{v}_c = b$$

Depenent del sistema i del nombre de mesures hi ha 3 possibilitats

- Sistema completament **determinat**:
nombre d'incògnites = nombre files de \mathbf{N}_c = rang(\mathbf{N}_c)
- Sistema **sobredeterminat**: nombre d'incògnites < nombre equacions
(assumint nombre d'incògnites = rang(\mathbf{N}_c))
- Sistema **subdeterminat**: nombre d'incògnites > nombre equacions (lin. ind.)

Sistema determinat: incògnites=rang(N_c)

Exemple senzill:



$$0 = \mathbf{N} \cdot \mathbf{v}$$

	v_1	v_2	v_3	v_4	v_5	v_6
A	1	-1	-1	0	0	0
B	0	1	0	-1	0	0
C	0	0	0	1	0	-1
D	0	0	1	0	-1	0

Matriu estequiomètrica \mathbf{N} de rang: 4

Reordenació i divisió: $0 = \mathbf{N}_c \cdot \mathbf{v}_c + \mathbf{N}_m \cdot \mathbf{v}_m$

$$0 = \begin{matrix} & v_2 & v_3 & v_4 & v_6 \\ \begin{matrix} \leftarrow \\ \leftarrow \\ \leftarrow \\ \leftarrow \\ \leftarrow \end{matrix} & \begin{pmatrix} -1 & -1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 \\ 0 & 0 & 1 & -1 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \end{pmatrix} & \begin{matrix} v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_6 \end{matrix} \end{matrix} + \begin{matrix} & v_1 & v_5 \\ \begin{matrix} \leftarrow \\ \leftarrow \end{matrix} & \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{pmatrix} & \begin{matrix} v_1 \\ v_5 \end{matrix} \end{matrix}$$

$$\mathbf{N}_c \cdot \mathbf{v}_c = -\mathbf{N}_m \cdot \mathbf{v}_m = \mathbf{b}$$

$$\mathbf{N}_c \cdot \mathbf{v}_c = \mathbf{b}$$

Solució: $\mathbf{v}_c = \mathbf{N}_c^{-1} \cdot \mathbf{b}$

Canvi de signe

$$\begin{matrix} \begin{pmatrix} 8 \\ 2 \\ 8 \\ 8 \\ 8 \end{pmatrix} \\ \mathbf{v}_c \end{matrix} = \begin{matrix} \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ -1 & -1 & 0 & -1 \\ -1 & -1 & -1 & -1 \end{pmatrix} \\ \mathbf{N}_c^{-1} \end{matrix} \cdot \begin{matrix} \begin{pmatrix} 10 \\ 0 \\ 0 \\ 2 \end{pmatrix} \\ \mathbf{b} \end{matrix}$$

Anàlisi de fluxos metabòlics (Metabolic Flux Analysis)

Sistema sobredeterminat : nombre d'incògnites < nombre equacions

en principi N_c no es pot invertir **Solució: una possibilitat** -> reduir la matriu N_c fins a quedar un sistema determinat i fer servir les altres equacions per verificar la consistència de dades

Divisió de matrius: $N_c = \begin{bmatrix} N_c^{rang(N)} \\ N_c^{n-rang(N)} \end{bmatrix}$; $b = \begin{bmatrix} b_a^{rang(N)} \\ b_b^{n-rang(N)} \end{bmatrix}$

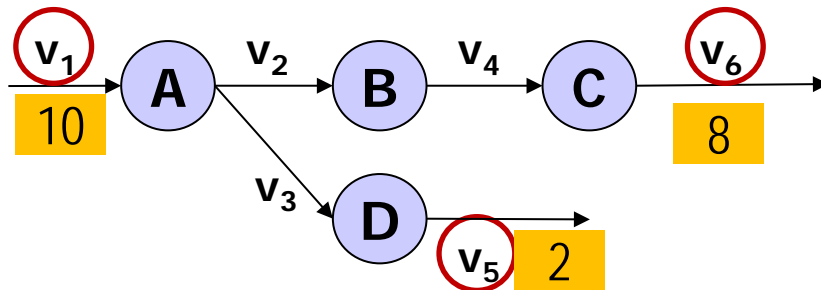
Solució:

$$v_c = (N_c^{rang(N)})^{-1} \cdot b_a^{rang(N)};$$

Validació:

$$b_b^{n-rang(N)} - N_c^{n-rang(N)} \times v_c = 0$$

Exemple anterior mesurant v_1, v_5, v_6 :



$$0 = \begin{bmatrix} 1 & -1 & 0 \\ 1 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_2 \\ v_3 \\ v_4 \end{bmatrix} + \underbrace{\begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \\ 0 & -1 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_1 \\ v_5 \\ v_6 \end{bmatrix}}_{-b}$$

Solució:
Agafem 3 equacions

$$\begin{bmatrix} 8 \\ 2 \\ 8 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & 1 & 1 \\ -1 & -1 & -1 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 10 \\ 0 \\ 8 \end{bmatrix}$$

$$v_c = (N_c^{rang(N)})^{-1} b$$

Validació:

$$\begin{bmatrix} 8 \\ 2 \\ 8 \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} 10 \\ 0 \\ 8 \end{bmatrix} = 0$$

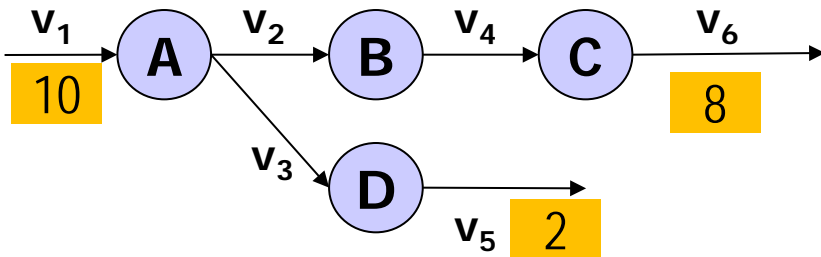
$$b_b^{n-rang(N)} - N_c^{n-rang(N)} v_c = 0$$

Sistema sobredeterminat II : nombre d'incògnites < nombre equacions

Solució alternativa: fer servir la **pseudoinversa** (preferentment la de Moore-Penrose)
(equivalent a una solució per mínims quadrats)

$$\mathbf{v}_c = \left(\mathbf{N}_c^T \mathbf{N}_c \right)^{-1} \mathbf{N}_c^T \mathbf{b} = \mathbf{N}^\# \mathbf{b}$$

Exemple anterior mesurant v_1, v_5, v_6 :



$$0 = \begin{matrix} & v_2 & v_3 & v_4 & & & & & \\ \begin{matrix} v_1 \\ v_5 \\ v_6 \end{matrix} & \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 \\ 1 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix} & \begin{pmatrix} v_2 \\ v_3 \\ v_4 \end{pmatrix} & + & \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \\ 0 & -1 & 0 \end{pmatrix} & \begin{pmatrix} v_1 \\ v_5 \\ v_6 \end{pmatrix} \end{matrix}$$

$$\begin{pmatrix} v_2 \\ v_3 \\ v_4 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 \\ 1 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} 1 & 1 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & -1 & 1 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} v_1 \\ v_5 \\ v_6 \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} v_2 \\ v_3 \\ v_4 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -0.5 & 0.5 & 0.5 & -0.5 \\ -0.25 & -0.25 & -0.25 & 0.75 \\ -0.25 & -0.25 & 0.75 & -0.25 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} v_1 \\ v_5 \\ v_6 \end{pmatrix}$$

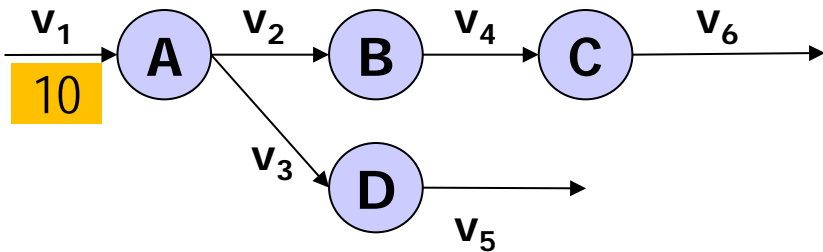
pseudoinversa senzilla $\mathbf{N}_c^\#$

Sistema subdeterminat: nombre d'incògnites > nombre equacions

Solució: no hi ha solució única. Possibilitats:

- Fer servir el kernel i un criteri d'optimització per seleccionar-ne una.
- Afegir informació experimental (habitualment basada en marcatge amb ^{13}C)
- Afegir noves restriccions ...

Exemple anterior mesurant v_1



$$0 = \begin{bmatrix} -1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & -1 \\ 0 & 1 & 0 & -1 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} v_1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$

$$b = \begin{bmatrix} 10 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$

$$N_c^{\#} = \begin{bmatrix} -0.4 & 0.4 & 0.2 & -0.2 \\ -0.6 & -0.4 & -0.2 & 0.2 \\ -0.4 & -0.6 & 0.2 & -0.2 \\ -0.6 & -0.4 & -0.2 & -0.8 \\ -0.4 & -0.6 & -0.8 & -0.2 \end{bmatrix}$$

Pseudoinversa
Moore-Penrose

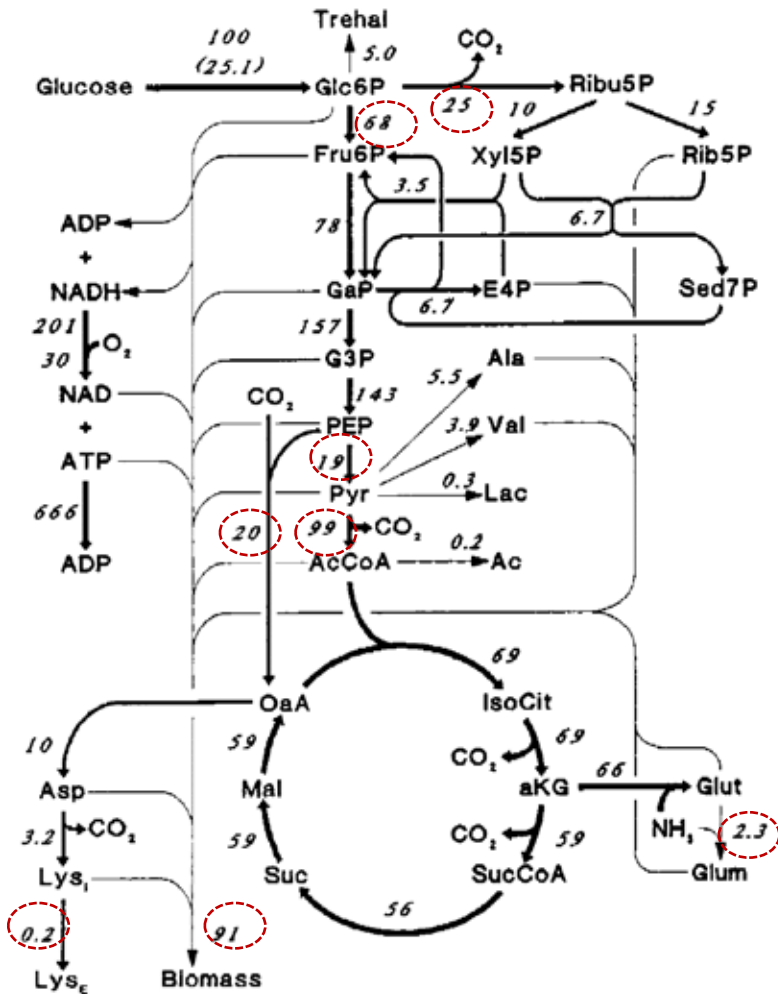
$$K_c = \begin{bmatrix} 1 \\ -1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \end{bmatrix}$$

$$p = \begin{bmatrix} 4 \\ 6 \\ 4 \\ 6 \\ 4 \end{bmatrix}, h = \begin{bmatrix} 1 \\ -1 \\ 1 \\ -1 \\ 1 \end{bmatrix}$$

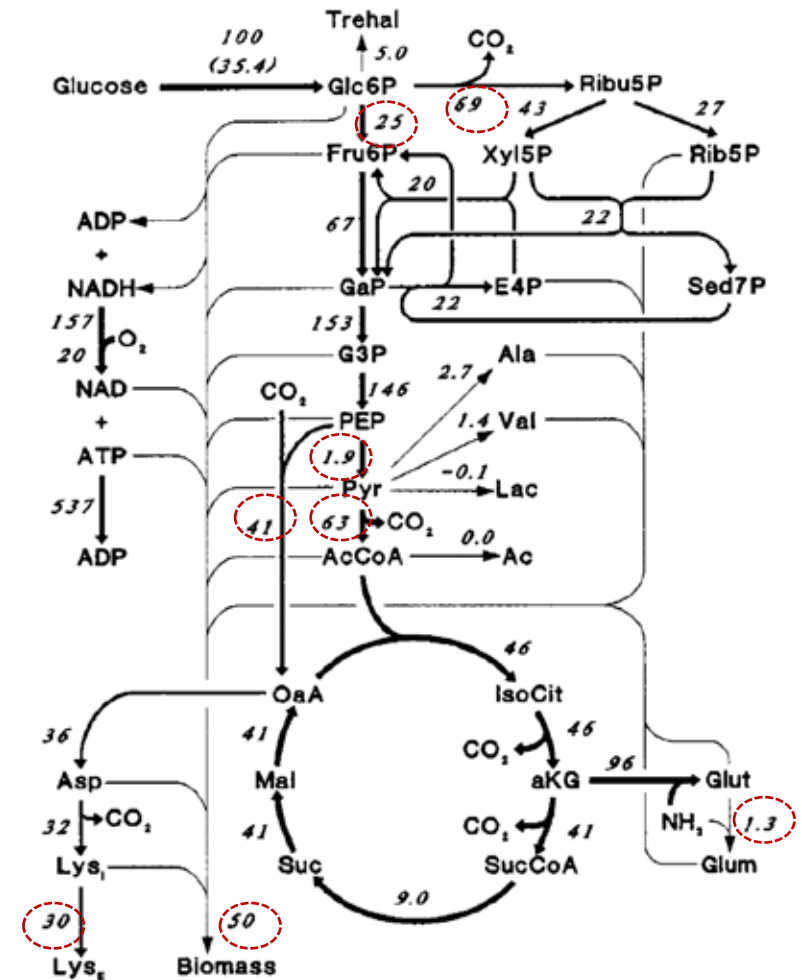
Solució
si $\alpha=1$

Consideracions per tots els casos: la bondat de la solució depèn del condicionament de la matriu N_c i de la propagació l'error experimental

Exemple d'utilització del càlcul de fluxos: Síntesi de lisina a *C.glutamicum*

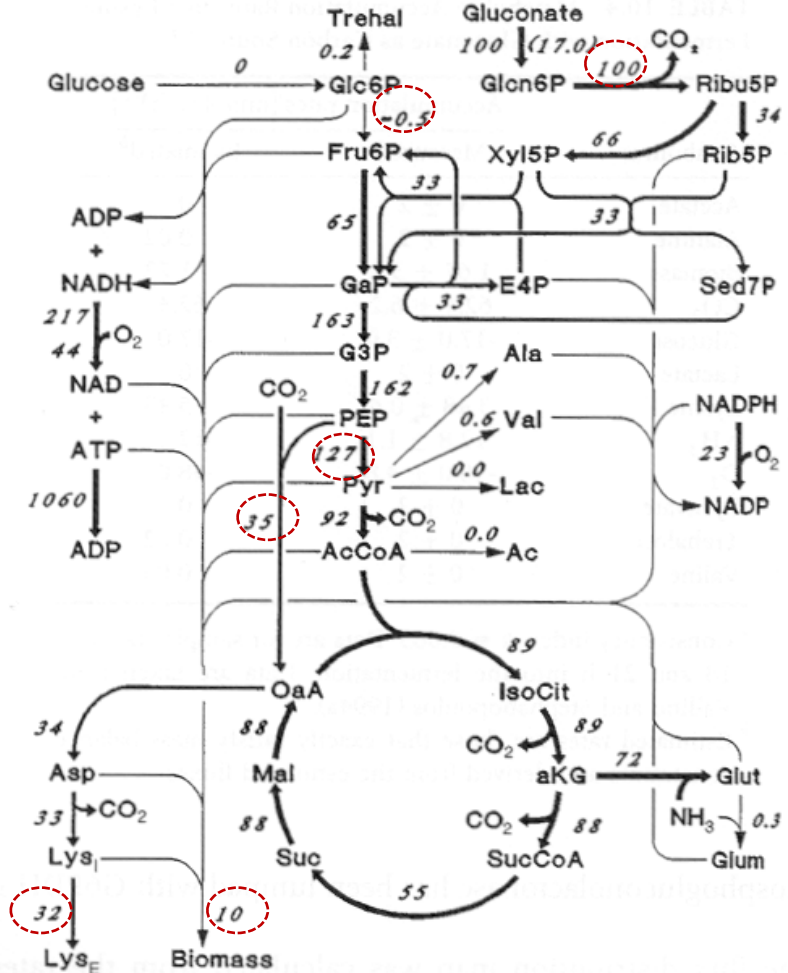
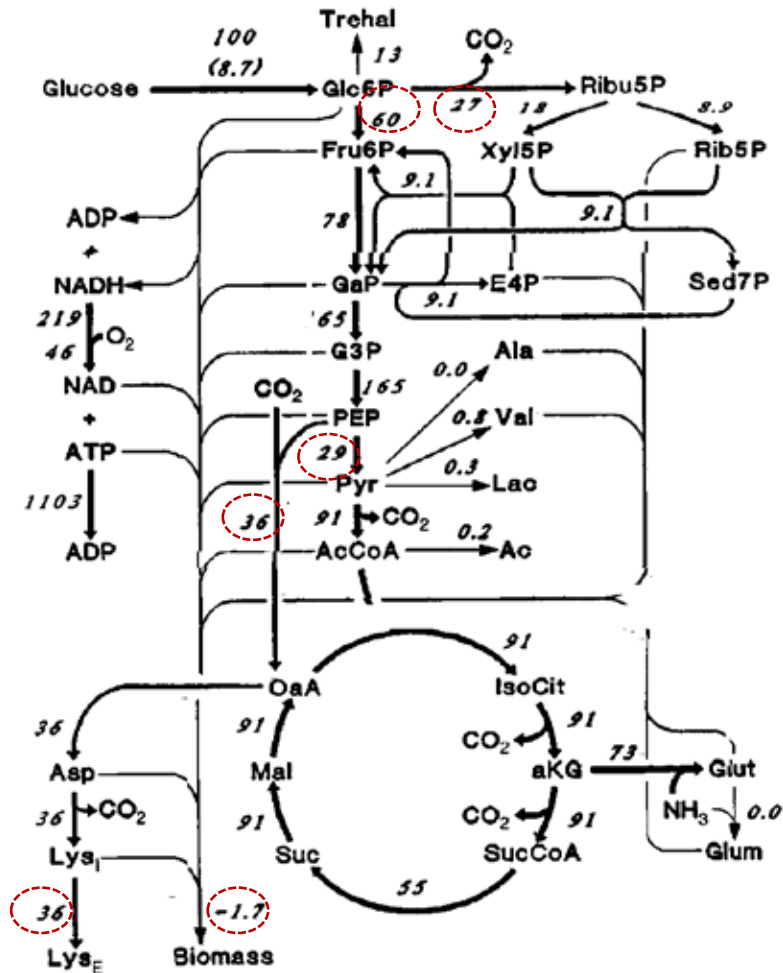


Fase no productora



Fase productora

Exemple d'utilització del càlcul de fluxos: síntesi de lisina a *C.glutamicum* II



Pertorbacions al Glc6P: A partir de mesures experimentals amb consum de glucosa en un mutant de *C.glutamicum* (NFG068) amb atenuació (90%) a la Glc6P isomerasa per veure si el flux redirigia de Gl6P a la via PPP. S'observa creixement, producció de productes menors que el control i de lisina un 25% més gran però degut a una més llarga fase de producció. Però els flux eren similars i les velocitats d'acumulació 2-3 vegades menors.

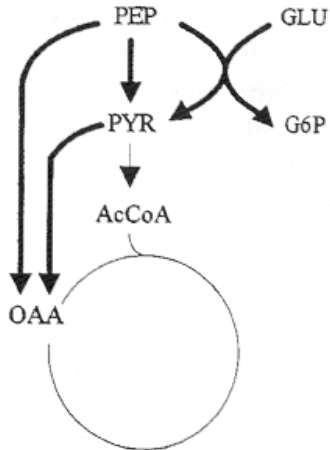
Pertorbacions al Glc6P a partir de mesures experimentals amb consum de gluconat amb el que es sobrepassa el punt GL6P. Si aquest punt es rígida i el limitant, ara s'hauria de produir més lisina. La producció instantània no va passar del 35 %. Va augmentar la respiració i no hi va haver productes. Per tant el node GL6P és flexible i en tot cas no era on hi havia una limitació.

Exemple d'utilització del càlcul de fluxos: síntesi de lisina a *C.glutamicum* III.

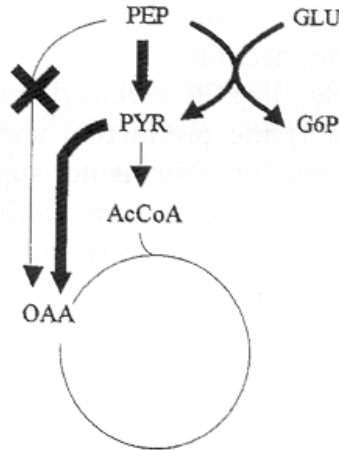
Exemples de comparació de fluxos i efecte de condicions

El gruix de la línia indica la grandària del flux metabòlic.

(a) wild type

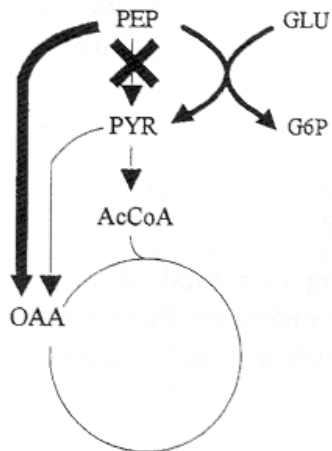


(b) ppc mutant



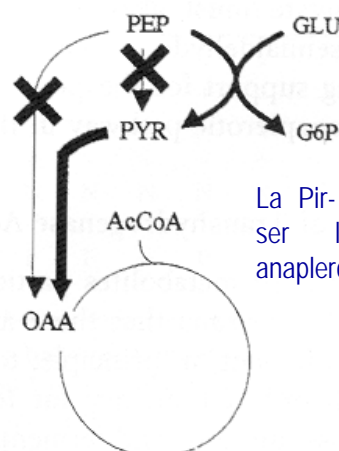
Creixement i producció de lisina no afectats.

(c) pyk mutant



Mitjanament atenuats Reducció de creixement (al 77%) i lisina (al 50%)

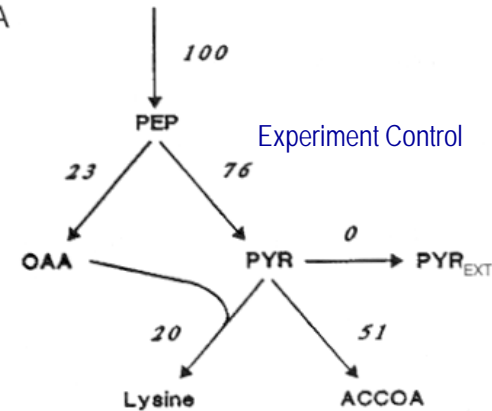
(d) ppc pyk mutant



Fortament atenuats en creixement (30%) i producció de Lisina (25%)

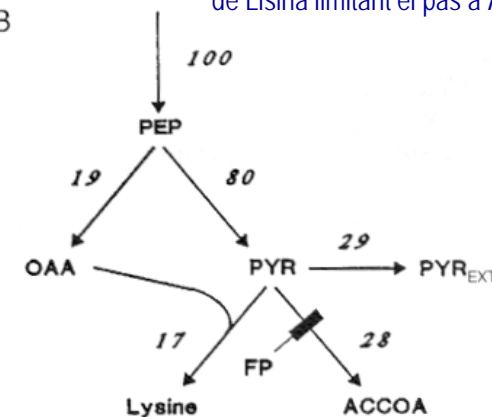
La Pir- carboxilasa sembla ser la principal via anapleròtica

A



Intent de redirigir el flux cap a la síntesi de Lisina limitant el pas a Acet-CoA

B



Fermentació amb el pas Pir-AcCoA amb flux reduït (inhibit per fluoropiruvat.o fent servir un mutant atenuat de PDC)
Es redueixen ambdós flux i es força la excreció de piruvat
Indica que segurament el node PEP/Pir és rígida

Anàlisi de fluxos metabòlics (Metabolic Flux Analysis- ^{13}C)

Si no hi ha prou informació per resoldre la Xarxa metabòlica s'obté més informació per mitjà de la tècnica de marcatge amb ^{13}C . (^{13}C Metabolic flux analysis)

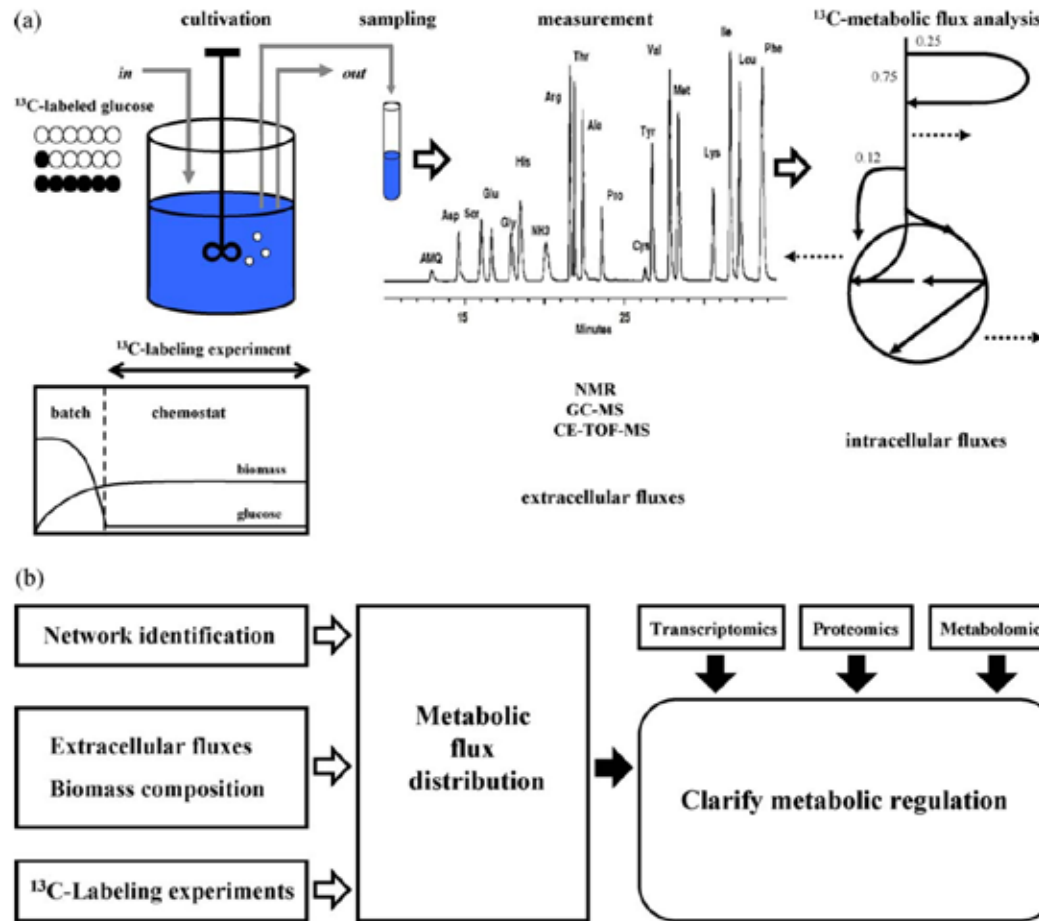


Fig. 2. ^{13}C -Metabolic flux analysis: (a) ^{13}C -Labeling experiment, the measurement of isotopomer distribution, and the flux determination. (b) Overall scheme for metabolic flux analysis to uncover metabolic regulation.

