

Cálculo de Modos de Flujo Elemental en redes metabólicas mediante búsqueda dispersa

Jose A. Egea^a, José F. Hidalgo^b, Francisco Guil^b, José M. García^b

^aDepartamento de Matemática Aplicada y Estadística, Universidad Politécnica de Cartagena, C/ Dr. Fleming s/n, 30202, Cartagena.

^bGrupo de Arquitectura y Computación Paralela, Facultad de Informática, Universidad de Murcia, Campus Universitario de Espinardo, 30100, Murcia.

josea.egea@upct.es
{jhidalgo,fguil,jmgarcia}@um.es

Abstract. En este trabajo se presenta un algoritmo de búsqueda dispersa para el cálculo de Modos de Flujo Elemental (MFE) de redes metabólicas. Uno de los enfoques para abordar este cálculo consiste en formular un problema de programación lineal que minimice la suma de flujos que circulan a través de una red, sujeto a una serie de restricciones físico-químicas. El método de resolución habitual se centra en la elección de reacciones que deben ser suprimidas o no, lo que lleva a un problema en variables binarias. En este trabajo abordamos un nuevo enfoque basado en variables continuas y consistente en modificar los coeficientes de la función objetivo del programa lineal. Dado el tamaño de las redes reales, que puede implicar contener miles de variables, el uso de métodos heurísticos para la obtención de soluciones es recomendado. Aquí hacemos uso de la búsqueda dispersa para la creación de un conjunto de referencia lo más diverso posible en cuanto a direcciones y un método de actualización del mismo basado también en diversidad. El método de combinación también tiene en cuenta esta necesidad de diversidad y ha sido modificado con respecto a formulaciones tradicionales. La aplicación del método propuesto a un caso de estudio pone de manifiesto dos puntos clave: (i) este enfoque elimina el problema de las soluciones infactibles, y (ii) el método de búsqueda dispersa es capaz de encontrar todos los MFEs de la red en un número reducido de iteraciones.

Keywords: Modos de flujo elemental, metaheurísticas, búsqueda dispersa, redes metabólicas

1 Introducción

El análisis de redes metabólicas es un área relevante de la biología de sistemas. Las redes metabólicas son conjuntos de procesos metabólicos que determinan las propiedades bioquímicas y fisiológicas de las células. Estas redes se representan habitualmente como metabolitos unidos por reacciones bioquímicas.

Una metodología exhaustivamente usada en el estudio de redes metabólicas es el análisis de modos de flujo elemental (MFEs) [12]. Los MFEs pueden ser

considerados como rutas con significado biológico en condiciones de estado estacionario, y constituyen un conjunto único que permite representar cualquier posible situación fisiológica en un sistema celular.

A pesar de las interesantísimas aplicaciones que pueden surgir del análisis de MFEs, su estudio ha estado normalmente limitado a redes de tamaño pequeño o mediano, debido al aumento exponencial en el número de MFEs con el tamaño de la red. Los métodos más usados para calcular MFEs están basados en la formulación de un problema de programación lineal que resulta de analizar la red y de imponer una serie de restricciones estequiométricas, termodinámicas y de estado estacionario. De entre los diferentes métodos para calcular MFEs usando programación lineal, uno de los más destacados está es *EFMEvolve* [7], que usa un algoritmo genético para seleccionar subconjuntos de reacciones inactivas. La ventaja del uso de metaheurísticas para resolver el problema de este modo es que, en lugar de evaluar todas las posibles combinaciones de reacciones no activas (que sería inabordable en redes de tamaño medio o alto), el método selecciona diferentes soluciones por medio de los miembros de su población que van evolucionando en el tiempo basándose en una función objetivo. Esto evita, por un lado, explorar gran parte del espacio de búsqueda y, por otro, encontrar demasiadas soluciones duplicadas.

En este trabajo proponemos un enfoque distinto al usado tradicionalmente cuando se buscan MFEs basándose en programación lineal. En lugar de que el espacio de soluciones sean las reacciones no activas (problema binario), aquí se propone que el espacio de soluciones sean los coeficientes de la función objetivo para buscar en distintas direcciones y encontrar así distintos vértices del poliedro generado en la formulación de la programación lineal. Esto hace que el problema sea continuo en el espacio de soluciones, aunque igualmente costoso de resolver dada la cantidad de reacciones que hay en redes de tamaño realista. Para su resolución proponemos un algoritmo de búsqueda dispersa adaptado a las características del problema, que hace hincapié en la diversificación más que en la intensificación, como se presentará en las siguientes secciones. Se ha probado el método sobre la red presentada en [13] encontrándose todos los MFEs en un número reducido de iteraciones.

Este artículo está estructurado de la siguiente forma: en la Sección 2 se explica la metodología basada en programación lineal para el cálculo de MFEs, así como la formulación alternativa propuesta. En la Sección 3 se describe el algoritmo de búsqueda dispersa implementado para la resolución de este problema; esta metodología se aplica al caso de estudio en la Sección 4. El artículo finaliza con una serie de conclusiones.

2 Metodología

2.1 Cálculo de MFEs mediante programación lineal

Una red metabólica con m metabolitos y n reacciones está definida por una matriz estequiométrica, S , de dimensión $m \times n$. Consideremos el siguiente ejemplo de Szallasi et al. [13] cuya red metabólica está representada en la Figura 1.

En esta red se consideran 6 metabolitos (nombrados con las letras A, B, C, D, E, P) y 10 reacciones r_i , siendo dos de ellas reversibles, r_2 y r_8 .

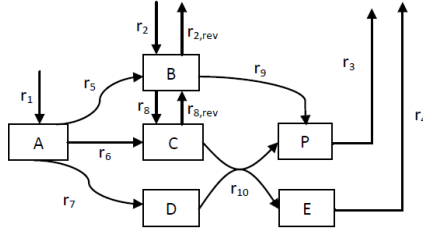


Figura 1. Red metabólica presentada en [13]

La matriz estequiométrica correspondiente a esta red metabólica es:

$$S = \begin{pmatrix} & r_1 & r_2 & r_3 & r_4 & r_5 & r_6 & r_7 & r_8 & r_9 & r_{10} & r_{2,rev} & r_{8,rev} \\ A & 1 & 0 & 0 & 0 & -1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ B & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & -1 & -1 & 0 & -1 & 1 \\ C & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & -1 \\ D & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ E & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ P & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Nótese que se pone un número positivo en el elemento de la matriz x_{ij} cuando el metabolito i es producto de la reacción j , mientras que se pone un número negativo en ese elemento de la matriz cuando el metabolito i es sustrato de la reacción j . Estos números, en valor absoluto, son los coeficientes estequiométricos de las reacciones consideradas.

Para ser un MFE, un flujo $\mathbf{v} \in \mathbb{R}^n$ a través de una reacción, tiene que cumplir las siguientes condiciones:

1. Condición de estado estacionario: Todos los metabolitos internos están balanceados.
2. Las reacciones irreversibles deben tener flujos positivos.
3. Irreducibilidad: Los índices positivos de un MFE no pueden ser un subconjunto propio de los índices positivos de otro MFE.

Normalmente, los métodos computacionales para calcular MFEs dividen las reacciones reversibles en dos irreversibles con sentido opuesto. De esta forma todos los flujos tienen que ser positivos.

En el enfoque de resolución más usado se considera lo siguiente: dado un conjunto de K reacciones anuladas en la red y un índice μ correspondiente a una reacción objetivo a partir de la cual se produce cierto metabolito de interés, el problema de optimización para calcular un MFE puede formularse como un programa lineal de la siguiente forma:

$$\text{Minimizar } \sum_{r=1}^n v_r \quad (1)$$

Sujeto a

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

$$\mathbf{v} \geq 0 \quad (3)$$

$$v_\mu \geq 1 \quad (4)$$

$$\forall i \in K : v_i = 0 \quad (5)$$

La Ecuación 2 define el estado estacionario. La Ecuación 3 asegura que no haya flujos negativos. La Ecuación 4 fuerza que el flujo sea positivo a través de una reacción determinada, r_μ , que puede dar lugar a un metabolito producto de interés. Es decir, si la solución es factible, \mathbf{v} producirá ese metabolito de interés. Finalmente, la Ecuación 5 garantiza que el flujo encontrado no pasará a través de las reacciones en K , esto es, de las reacciones bloqueadas de antemano.

Este problema puede ser resuelto muy eficientemente mediante el método Simplex. El conjunto de flujos \mathbf{v} solución de este problema es un MFE. El espacio de soluciones correspondiente al estado estacionario y la condición de irreversibilidad (Ecuaciones 2 y 3) corresponde a un cono poliédrico convexo, \mathcal{P} . Los rayos extremos o vectores generadores del poliedro definen los límites de la posible distribución de flujos en estado estacionario que se pueden lograr. En otras palabras, todas las combinaciones de flujos posibles en estado estacionario se encuentran dentro del cono definido por esos rayos extremos.

Cambiando las reacciones bloqueadas en el conjunto K se generan diferentes programas lineales que pueden dar lugar a MFEs diferentes. De hecho, este procedimiento podría encontrar todos los MFEs de una red si se probasen todas las posibles combinaciones existentes para K , generando al mismo tiempo gran cantidad de problemas infactibles. Para redes de tamaño medio-alto habría una explosión combinatoria que haría imposible resolver todos los programas lineales derivados de todas esas combinaciones. Las metaheurísticas son una buena alternativa para la selección y evolución de diferentes conjuntos de K para enumerar un número significativo de MFEs evitando soluciones redundantes o problemas infactibles. Aparte del ya comentado *EFMEvolver* [6], otros métodos basados en heurísticas o metaheurísticas utilizan procedimientos similares para el cálculo de MFEs [11, 1].

2.2 Enfoque propuesto

Uno de los mayores inconvenientes del uso del enfoque mostrado anteriormente es que el problema binario consistente en escoger el conjunto K de reacciones

bloqueadas, elimina o añade restricciones del problema de programación lineal produciendo en muchas ocasiones problemas infactibles. El problema de programación lineal puede resumirse en encontrar el mejor vértice del poliedro en base a una función objetivo. El enfoque de la sección anterior considera siempre la misma función objetivo pero modifica las restricciones (y por tanto los vértices presentes) para la resolución.

En este trabajo proponemos lo siguiente: no bloquear ninguna reacción (es decir, eliminar la Ecuación 5 de la formulación pero sí modificar los coeficientes de la función objetivo (Ecuación 1) de tal manera que puedan tener un valor diferente a 1 (en concreto, entre -1 y 1). Es decir, la nueva función objetivo del programa lineal sería:

$$\text{Minimizar } \sum_{r=1}^n c_r v_r \quad (6)$$

Donde los coeficientes c_r serían nuestros grados de libertad y tomarían valores reales en el intervalo $[-1, 1]$. La razón de esta propuesta es que, como se ha comentado anteriormente, los rayos extremos del cono poliédrico son MFEs, o dicho de otra forma, los vértices del poliedro generado por las restricciones de las Ecuaciones 2 y 4 son MFEs. Si modificamos los coeficientes de la función objetivo lo suficiente como para cambiar el vertice óptimo, seremos capaces de encontrar distintos vértices (y por tanto distintos MFEs) asegurando factibilidad en todo momento. La Figura 2 ilustra este hecho para un problema en 2 dimensiones, donde si la pendiente de la recta que representa la función objetivo (representada por rectas con distinta pendiente pasando por el origen de coordenadas) varía lo suficiente, el vértice óptimo cambiará.

Por tanto, nos planteamos buscar los coeficientes de la función objetivo de tal manera que se generen direcciones lo más diversas posibles y así que la resolución del problema de programación lineal correspondiente proporcione vértices óptimos diferentes, esto es, encontremos los distintos MFEs de la red metabólica.

3 Algoritmo de búsqueda dispersa propuesto

En esta sección proponemos un algoritmo de búsqueda dispersa adaptado al tipo de problema descrito anteriormente. Como se ha comentado, en el problema no se define una función objetivo a optimizar sino que se deben generar soluciones lo suficientemente diversas como para obtener pendientes de la función objetivo en el problema de programación lineal asociado lo más diversas posible.

La búsqueda dispersa fue introducida por Fred Glover [3] como una heurística para programación entera. La mayor parte de las implementaciones del método han sido aplicadas a problemas enteros o binarios, aunque hay algunos ejemplos de aplicación en el dominio continuo. Laguna y Martí presentaron la librería *OptQuest* [9], basada en búsqueda dispersa, y posteriormente analizaron algunos diseños avanzados para problemas de optimización global [8]. Más tarde, Herrera,

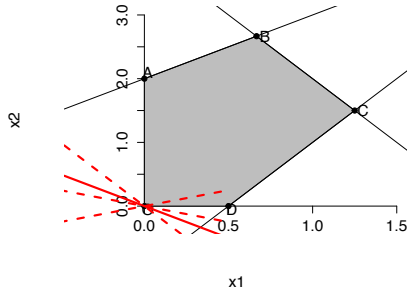


Figura 2. Polígono definido por un programa lineal en dos dimensiones

Lozano y Molina [4] analizaron diversos métodos de combinación y de mejora en búsqueda dispersa. Egea et al. presentaron un método de búsqueda dispersa aplicada a procesos químicos y biológicos [2]. Más recientemente, Hvattum et al. [5] estudiaron diferentes métodos de mejora para búsqueda dispersa en el contexto de optimización global en el dominio continuo. A continuación se realizará un breve repaso del clásico *five-step template* [10] aplicado a la implementación presentada en este trabajo.

Método de diversificación de soluciones: Este paso es muy básico y consiste en generar una serie de $nDiverse$ soluciones de dimensión n , de tal forma que cada una de las dimensiones obtiene un valor siguiendo una distribución uniforme en el intervalo $[-1, 1]$, para cubrir todas las posibles pendientes de la función objetivo.

Formación del conjunto de referencia: Tras haber definido un tamaño del conjunto de referencia *DimRefset*, la primera solución que entra en él se escoge aleatoriamente con todas su dimensiones elegidas según una distribución uniforme en el intervalo $[0, 1]$. Este intervalo asegura que esta primera solución tenga un resultado acotado en la primera llamada al algoritmo de programación lineal y por tanto proporcione el primer MFE .

A partir de ahí, el conjunto de referencia se actualiza buscando la máxima diversidad en las direcciones definidas por los nuevos elementos (y por tanto en las pendientes de la función objetivo), siguiendo un criterio de ortogonalidad. Se seleccionan nuevos elementos en el conjunto de referencia mediante un criterio

de minimización del máximo coseno del ángulo que las soluciones candidatas a entrar forman con los elementos del conjunto de referencia.

Sea \mathbf{Q} una matriz que contiene los productos escalares entre los elementos del conjunto de referencia actual (en filas) y los elementos de las $nDiverse$ soluciones creadas previamente. En la primera iteración de este paso \mathbf{Q} es $1 \times nDiverse$ dimensional. A partir de \mathbf{Q} se define otra matriz \mathbf{C} que contendrá en cada elemento i, j el coseno del ángulo que forman la solución $i = 1, \dots, b \leq DimRefset$ del conjunto de referencia y la solución $j = 1, 2, \dots, nDiverse$ de las candidatas. Cada elemento de \mathbf{C} será el elemento de \mathbf{Q} dividido por el producto de los módulos de las soluciones correspondientes a la fila y columna involucrada.

$$C_{i,j} = \frac{Q_{i,j}}{\|\mathbf{x}_i\| \cdot \|\mathbf{x}_j\|}$$

Sea \mathbf{V} el vector que contiene los valores máximos de la matriz \mathbf{C} por columnas:

$$\mathbf{V} = \max \mathbf{C}_{\cdot,j}, \quad j = 1, 2, \dots, nDiverse$$

La solución que entrará a formar parte del conjunto de referencia será aquella que proporcione un valor mínimo en \mathbf{V} , es decir, $x_i, i = 1, 2 \dots, nDiverse$ entrará en el conjunto de referencia si $x_i = \min \mathbf{V}$. En este punto, la solución candidata pasa a formar parte del conjunto de referencia, y las dimensiones de \mathbf{Q} cambian, aumentando una fila y disminuyendo una columna (al igual que el tamaño del conjunto de referencia aumenta al tener un elemento más y el conjunto $nDiverse$ disminuye al eliminar de él a la solución que entró al conjunto de referencia). Este proceso se repite hasta que el conjunto de referencia contiene los $DimRefset$ miembros definidos inicialmente.

Con este procedimiento aseguramos que los cosenos de los ángulos de las nuevas soluciones del conjunto de referencia con respecto al resto de miembros son mínimos, y por lo tanto las soluciones serán lo más diversas posibles en cuanto a ángulos, para generar la mayor cantidad de direcciones de búsqueda distintas, lo que significa encontrar la pendientes más diversas en la función objetivo que nos lleven a diferentes vértices del poliedro definido en el programa lineal correspondiente, y por tanto a diferentes MFEs.

Combinación de soluciones: Habiendo completado el conjunto de referencia, se realizan combinaciones de todas las parejas de elementos para formar nuevas soluciones. El número de soluciones generadas en cada iteración es de una por cada pareja, es decir, $\frac{DimRefset(DimRefset-1)}{2}$.

En este trabajo se utiliza el método de combinación $BLX - \alpha$ como propusieron Herrera, Lozano y Molina para implementaciones de búsqueda dispersa en el dominio continuo [4]. Sin embargo, dada la naturaleza de este problema donde lo que se busca es la máxima diversidad de ángulos entre las soluciones, es probable que el valor de α más adecuado tenga valores superiores a 0.5, como se propone en el artículo citado, dado que lo que se busca es una mayor diversidad

y por tanto sea necesario “alejarse” de las soluciones ya presentes en el conjunto de referencia.

Actualización del conjunto de referencia: Tras la generación de nuevas soluciones por combinación de los elementos del conjunto de referencia, éstas son evaluadas secuencialmente y entrarán en el conjunto de referencia si y sólo si han generado un nuevo MFE tras la resolución del programa lineal correspondiente. La solución a la que reemplazan se escoge realizando un procedimiento similar al descrito en el apartado de creación del conjunto de referencia. Es decir, esta solución que dio lugar a un nuevo MFE se compara con las soluciones del conjunto de referencia con respecto al ángulo formado con ellas, y sustituirá a aquélla que esté más cerca de ella en relación a este ángulo. Por lo tanto, en muchas iteraciones el conjunto de referencia permanece inalterado si no se encuentran nuevos MFEs. En cualquier caso, la diversidad de las nuevas soluciones generadas está asegurada por el método de combinación $BLX - \alpha$.

En este paso no se realiza la tradicional ordenación del conjunto de referencia por calidad o diversidad, ya que las soluciones presentes en él no son inherentemente mejores o peores que el resto, sino que lo que se busca es que sean diversas en cuanto a direcciones.

Método de mejora: En esta aplicación no se ha implementado ningún método de mejora previo a la resolución del problema de programación lineal ya que no disponemos de ninguna función objetivo que nos indique la calidad de la solución, sino que buscamos diversidad, que ya está asegurada por el método de combinación y de actualización del conjunto de referencia.

4 Caso de estudio

En esta sección se aplica el método propuesto sobre la red metabólica mostrada en la Sección 2.1. Hay dos reacciones que entran en el sistema, etiquetadas como r_1 y r_2 . Se sabe que este sistema contiene 8 MFEs. Para encontrar todos los MFEs de esta red es necesario establecer dos reacciones objetivo (Ecuación 4). Éstas serán r_1 y r_2 .

Se han llevado a cabo experimentos con el método propuesto para distintos valores del parámetro α del método de combinación $BLX - \alpha$. Se han comparado los resultados obtenidos con la ejecución de un método aleatorio puro y con los presentados por Egea y García [1] usando la metaheurística de búsqueda de vecindad variable, aunque usando el enfoque tradicional de resolución del programa lineal explicado en secciones anteriores. En todos los casos, $nDiverse = 100$ y $dimRefset = 7$. Se han realizado 25 experimentos independientes para cada caso, con un límite de llamadas al algoritmo de programación lineal de 1000. En las Tablas 1 y 2 se presenta el número de veces que cada caso puede verse en las Tablas 1 y 2, el método de combinación presenta ejecución encontró el máximo número de MFEs posible, así como el promedio de mejores resultados para un valor de $\alpha = 0.3$, que es el propuesto por diversos autores como el más adecuado. Dada la naturaleza de este problema es necesario encontrarlo.

Tabla 1. Resultados fijando r_1

	Aleat.	$\alpha = 0.5$	$\alpha = 1$	$\alpha = 2$	$\alpha = 3$	$\alpha = 4$	$\alpha = 5$	$\alpha = 6$	$\alpha = 7$	$\alpha = 8$	[1]
#Éxitos	24	0	17	24	25	25	25	25	25	24	25
Media	525.1*	-	269.6*	238.1*	146.7	160.4	139.6	192.2	222.9	229.6*	266

Tabla 2. Resultados fijando r_2

	Aleat.	$\alpha = 0.5$	$\alpha = 1$	$\alpha = 2$	$\alpha = 3$	$\alpha = 4$	$\alpha = 5$	$\alpha = 6$	$\alpha = 7$	$\alpha = 8$	[1]
#Éxitos	25	8	18	25	25	25	25	25	25	25	25
Media	207.8	465.4*	236.7*	133	59.6	85.4	97.6	94.9	87	113.9	254

obtener una gran diversidad en las soluciones, por lo que valores de α superiores a 1 proporcionan mejores resultados, mejorando significativamente los resultados obtenidos con un método aleatorio y los presentados en [1], donde se usó otro enfoque. Para este problema, valores de α en torno a 3 y 5 parecen ofrecer los mejores resultados, encontrándose todos los MFEs en el menor número medio de llamadas al algoritmo de programación lineal. Los resultados con un asterisco indica que la media ha sido calculada sólo sobre aquellos experimentos en los que se encontraron todos los MFEs posibles.

5 Conclusiones y trabajo futuro

El análisis de modos de flujo elemental (MFE) es una herramienta fundamental para caracterizar redes metabólicas. El cálculo de MFEs en redes de tamaño medio-alto es una tarea compleja que requiere de la aplicación de métodos de resolución eficientes para hacer frente a la explosión combinatoria que hay en el campo de las soluciones. En este trabajo se presenta un algoritmo de búsqueda dispersa para abordar este problema. Se presenta un nuevo enfoque en el que, dada la formulación de programas lineales para encontrar MFEs, se propone explorar el campo de soluciones de los coeficientes de la función objetivo para encontrar distintos vértices de la zona factible (es decir, MFEs). La naturaleza del problema exige la exploración de direcciones de búsqueda lo más diversas posibles, con lo que tanto el método de generación y actualización del conjunto de referencia como el método de combinación han sido diseñados de acuerdo a este criterio.

El método propuesto ha sido probado sobre una red de tamaño pequeño, encontrando todos los MFEs de la red usando un número de llamadas al algoritmo de programación lineal mucho menor que el de un método aleatorio puro y el de otro método basado en búsqueda de vecindad variable que usa un enfoque diferente.

En el futuro se hará un estudio más exhaustivo de los parámetros del método (*nDiverse*, *DimRefset*). También se estudiarán métodos de combinación específicos para aumentar la diversidad y se mejorará la actualización del conjunto de referencia para que soluciones que no generaron un nuevo MFE puedan en-

trar en dicho conjunto basándose en la diversidad que aportan. Por supuesto, se aplicará el método a redes de tamaño más realista y se compararán con los resultados de la bibliografía. El método presentado es compatible con una formulación mixta entera donde el índice de la reacción objetivo sería un grado de libertad adicional entero para el cálculo de las MFES.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido financiado por la Fundación Séneca (Agencia Regional de Ciencia y Tecnología, Región de Murcia) bajo el proyecto con referencia 15290/PI/2010, y por el MINECO + Fondos FEDER bajo el proyecto con referencia TIN2012-31345.

References

1. Egea, J.A., García, J.M.: Calculating elementary flux modes with variable neighbourhood search. In: Ortuño, F., Rojas, I. (eds.) *Bioinformatics and Biomedical Engineering, Lecture Notes in Computer Science*, vol. 9656, pp. 304–314. Springer International Publishing (2016)
2. Egea, J.A., Rodríguez-Fernández, M., Banga, J.R., Martí, R.: Scatter search for chemical and bio-process optimization. *Journal of Global Optimization* 37(3), 481–503 (2007)
3. Glover, F.: Heuristics for integer programming using surrogate constraints. *Decision Sciences* 8, 156–166 (1977)
4. Herrera, F., Lozano, M., Molina, D.: Continuous scatter search: An analysis of the integration of some combination methods and improvement strategies. *European Journal of Operational Research* 169(2), 450–476 (2006)
5. Hvattum, L., Duarte, A., Glover, F., Martí, R.: Designing effective improvement methods for scatter search: An experimental study on global optimization. *Soft Computing* 17(1), 49–62 (2013)
6. Kaleta, C., de Figueiredo, L.F., Schuster, S.: Can the whole be less than the sum of its parts? pathway analysis in genome-scale metabolic networks using elementary flux patterns. *Genome Research* 19(10), 1872–83 (2009)
7. Kaleta, C., de Figueiredo, L.F., Schuster, S.: EFMEvolver: Computing elementary flux modes in genome-scale metabolic networks. *LNCS* 157, 179–189 (2009)
8. Laguna, M., Martí, R.: Experimental testing of advanced scatter search designs for global optimization of multimodal functions. *Journal of Global Optimization* 33(2), 235–255 (2005)
9. Laguna, M., Martí, R.: The OptQuest callable library. In: Voss, S., L., W.D. (eds.) *Optimization Software Class Libraries*, pp. 193–218. Kluwer Academic Publishers (2002)
10. Martí, R., Laguna, M., Glover, F.: Principles of scatter search. *European Journal of Operational Research* 169(2), 359–372 (2006)
11. Pey, J., Villar, J.A., Tobalina, L., Rezola, A., García, J.M., Beasley, J.E., Planes, F.J.: TreeEFM: calculating elementary flux modes using linear optimization in a tree-based algorithm. *Bioinformatics* 31(6), 897–904 (2015)
12. Schuster, S., Dandekar, T., Fell, D.A.: Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering. *Trends in Biotechnology* 17(2), 53–60 (1999)
13. Szallasi, Z., Stelling, J., Periwal, V. (eds.): *System Modeling in Cellular Biology: From Concepts to Nuts and Bolts*. The MIT Press, 1 edn. (2006)