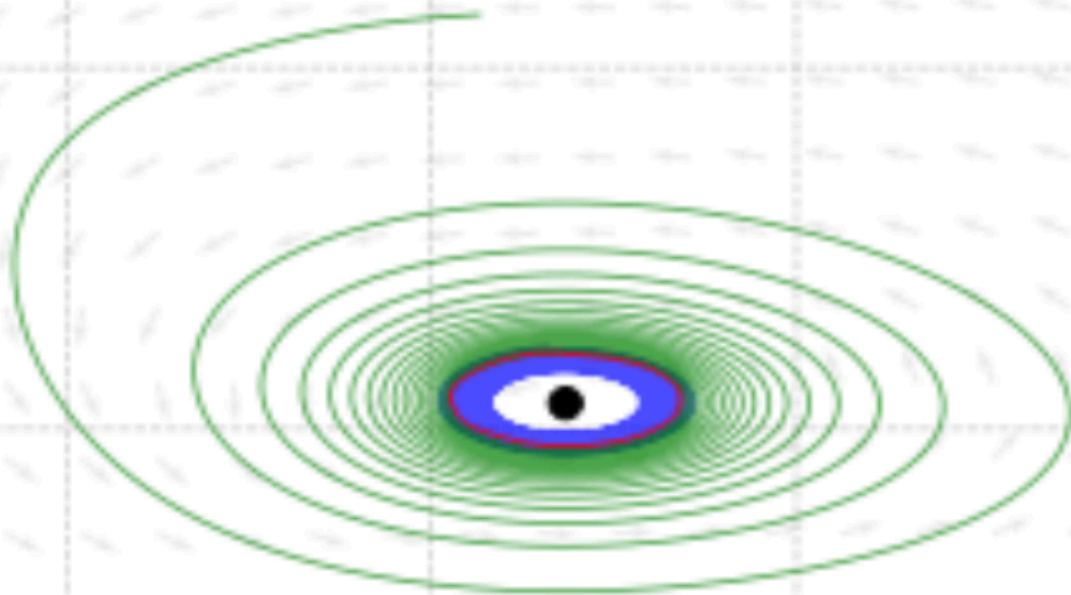


Oscilaciones sostenidas en cultivos: modelos simples, efectos reales



Dra. Martha Álvarez Ramírez

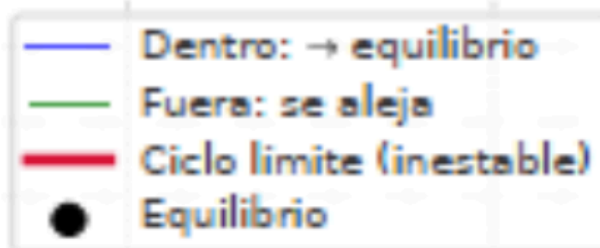
Departamento de Matemáticas, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

M. C. Carlos Eduardo Gómez Sánchez

Departamento de Matemáticas, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa
Departamento de Bioingeniería, Tecnológico de Monterrey Campus Estado de México

Dr. Julio Ernesto Solís Daun

¹Departamento de Matemáticas, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



0.2

0.4

0.6

0.8

S (g/L)

Abstract

Bioreactor is a key equipment in the production of biomolecules for the biotechnological industry. Nevertheless, under certain conditions, oscillations in cell growth and substrate consumption may suddenly arise, drastically affecting operation and productivity. This oscillatory behavior results from complex interactions between microorganisms and operational conditions. These interactions remain poorly understood from the perspective of bioreactor dynamics, which makes it difficult to identify the operational parameters that trigger oscillations. In this work, we show how the unstructured Haldane model proved useful in understanding and predicting such oscillatory behavior. For this purpose, an analysis of the equilibrium points and their stability was performed using the qualitative theory of differential equations. The analysis revealed a Hopf bifurcation, with a threshold marking the transition from a stable equilibrium point to a stable oscillatory behavior (limit cycle) at $S^* \approx \sqrt{K_s K_i}$. The feed substrate concentration S_{in} was identified as the bifurcation parameter responsible for this stability transition. This approach allowed us to gain insight into the dynamic nature of the bioreactor and opens the door to the design of improved operational and control strategies.

Keywords: Chemostat, Haldane model, Dynamical System, Stability, Hopf bifurcations.

Resumen

Los biorreactores son equipos clave en la producción de biomoléculas de interés biotecnológico. Sin embargo, bajo ciertas condiciones pueden presentarse oscilaciones inesperadas en el crecimiento celular y en el consumo de

nutrientes, lo que afecta drásticamente su operación y productividad. Estas oscilaciones reflejan las complejas interacciones entre los microorganismos y las condiciones de operación. El problema es que dichas interacciones siguen siendo poco comprendidas desde la perspectiva de la dinámica de los biorreactores, lo que dificulta identificar los parámetros operacionales que desencadenan las oscilaciones. En este estudio mostramos cómo el modelo matemático no estructurado de Haldane puede ayudar a comprender y predecir estos comportamientos. Para ello, se analizaron los puntos de equilibrio de dichos modelos y su estabilidad utilizando la teoría cualitativa de las ecuaciones diferenciales ordinarias. Este análisis reveló la aparición de una bifurcación de Hopf, con un umbral de transición desde un punto de equilibrio estable hacia una oscilación estable (ciclo límite) dado por $S^* \approx \sqrt{K_s K_i}$. El parámetro de bifurcación que se identificó fue la concentración de sustrato en el medio fresco de alimentación, S_{in} . Este enfoque ofrece una comprensión más profunda de la naturaleza dinámica de los biorreactores y abre nuevas posibilidades para el diseño de estrategias de operación y control más eficientes.

Palabras clave: Quimiostato, Modelo de Haldane, Sistemas dinámicos, Estabilidad, Bifurcaciones de Hopf.

Introducción

El término quimiostato se refiere a una técnica de cultivo en un biorreactor, donde el flujo de medio fresco que entra es igual al flujo de medio gastado que sale, permitiendo que el volumen y la concentración de las especies químicas en el biorreactor permanezcan constantes. Bajo esta condición, se dice que el quimiostato opera en estado

estacionario [1]. En la figura 1 se esquematizan los elementos básicos de un quimiostato.

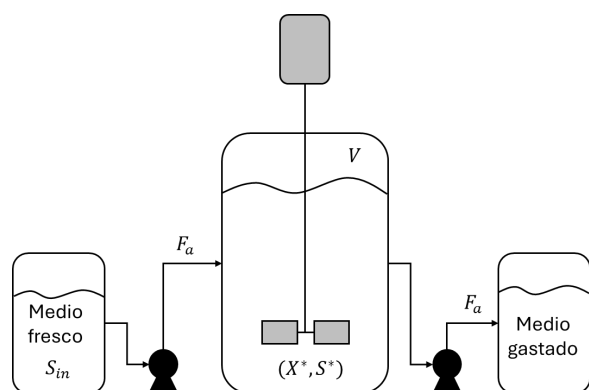


Figura 1: Esquema de un biorreactor operado en estado estacionario. A esta técnica de cultivo se le conoce como *quimiostato*. En el esquema, F_a es el flujo volumétrico, V es el volumen del medio de cultivo, S_{in} es la concentración de sustrato en el medio fresco de alimentación y (X^*, S^*) son las concentraciones de biomasa y sustrato que se alcanzan cuando el biorreactor opera en estado estacionario.

En la figura 2 se muestra una imagen de un biorreactor de 14 L de volumen, operado en estado estacionario. A primera vista, esto parece sólo un tanque con tuberías, sensores y una pantalla, pero en su interior ocurre algo mucho más fascinante: millones de células que se alimentan, respiran y crecen. Más allá de su valor como herramienta productiva, el quimiostato es un laboratorio vivo que permite estudiar y comprender cómo las células producen medicamentos, alimentos, combustibles y soluciones ambientales. Las aplicaciones de esto son amplias, entre las cuales destacan: (i) la producción de antibióticos, enzimas, vitaminas, vacunas, cerveza yogurt y (ii) la producción de etanol, biogas o hidrógeno.



Figura 2: Fotografía de un biorreactor operado como quimiostato.

Como cualquier sistema vivo, su comportamiento no siempre es predecible. Un cambio aparentemente pequeño, en la alimentación, el pH o el oxígeno, puede provocar respuestas desproporcionadas e inesperadas: fluctuaciones súbitas en la cantidad de células y sustrato, y en el peor de los casos, la pérdida total de biomasa en el biorreactor (el así denominado *lavado del biorreactor*).

Frente a esta complejidad, modelar no se trata de un lujo matemático sino, más bien, una herramienta de análisis. Un buen modelo traduce el proceso en ecuaciones que permiten explorar escenarios sin necesidad de gastar litros de medio ni semanas de ensayo y error en experimentos. Con ello, es posible responder preguntas clave como: ¿qué pasa si aumentamos un 10% el sustrato en el medio fresco de entrada? ¿cuál es el intervalo seguro de dilución para evitar el lavado del

biorreactor? ¿cómo influye un inhibidor en la productividad? Modelar permite anticipar riesgos, optimizar procesos y diseñar estrategias de control antes de que el proceso llegue a la industria.

En biorreactores operados como quimiostato, se han observado fenómenos dinámicos que van mucho más allá de un estado estacionario simple. Entre ellos, destacan las oscilaciones sostenidas en las concentraciones de biomasa y sustrato, a menudo acompañadas por variaciones sincronizadas en intermediarios metabólicos o productos finales [2]. Este comportamiento, documentado experimentalmente desde la década de 1980, se ha registrado en:

- Cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*, usada en panificación y fermentación alcohólica.

- Fermentaciones con *Zymomonas mobilis*, reconocida por su alta producción de etanol.

- Cultivos de *Escherichia coli*, para la producción de proteínas recombinantes, bajo condiciones específicas de limitación de oxígeno.

Experimentos con *Saccharomyces cerevisiae* o *Zymomonas mobilis* en cultivos continuos han registrado oscilaciones de sustrato y biomasa con periodos bien definidos. De hecho, como señalan Ajbar y colaboradores [3], basta un cambio moderado en los parámetros de operación para pasar de un régimen estacionario estable a un oscilador robusto. Además, existe la posibilidad de *biestabilidad dinámica*: que, en ciertos intervalos de la tasa de dilución, las oscilaciones y un equilibrio estacionario estable coexisten, de modo que perturbaciones

pequeñas pueden hacer “saltar” al sistema de un estado al otro. Bajo estas condiciones, combinaciones particulares de parámetros, tasa de dilución D , concentración de sustrato en la alimentación S_{in} , temperatura, pH y oxígeno disuelto, pueden llevar al sistema a un régimen periódico estable. En éste, el sustrato fluctúa con un periodo característico y la biomasa responde con un desfase: cuando el sustrato está en su punto máximo, la biomasa está en mínimo, y viceversa. Este desfase es típico de sistemas no lineales con retroalimentación.

Desde el punto de vista de la ingeniería de bioprocesos, el reto es mantener activos a los microorganismos, garantizar el suministro de nutrientes, retirar productos tóxicos y recolectar eficientemente el producto de interés. Las condiciones internas dependen de interacciones complejas entre las células y las condiciones de operación. Por ejemplo, si el sustrato entra demasiado rápido al biorreactor, la biomasa puede salir del biorreactor más rápido que lo que crece y así perderse; mientras que si entra demasiado lento, la producción se detiene porque las células microbianas no pueden consumir el sustrato a la misma velocidad que se suministra, ocasionando inhibición.

El interés por comprender estas oscilaciones es triple:

- 1) Perspectiva biológica: revelan mecanismos internos de regulación y posibles *ciclos límite metabólicos* en los que la dinámica bioquímica y la macroscópica se acoplan.

- 2) Perspectiva industrial: afectan la productividad, modificando la concentración media de producto y la eficiencia de conversión respecto a la

operación estacionaria.

3) Perspectiva de control: obligan a replantear la estrategia de operación, ya que un controlador diseñado para un punto fijo puede ser ineficaz en presencia de oscilaciones.

Para comprender y predecir el comportamiento de un biorreactor es necesario traducir sus procesos biológicos en un lenguaje matemático. Ese lenguaje son las ecuaciones diferenciales, que permiten describir cómo cambian las variables del sistema en el tiempo y constituyen la base de los modelos dinámicos que utilizaremos a lo largo de este trabajo. De manera sencilla, una ecuación diferencial ordinaria (EDO) expresa la evolución de una cantidad (o un vector de cantidades) $x(t)$ mediante una regla:

$$\dot{x}(t) = \frac{dx}{dt} = F(x(t), t; \mu) \quad (1)$$

donde t denota al tiempo, F representa el “campo de velocidades” y μ denota al conjunto de parámetros del modelo. Cuando F no depende explícitamente de t (caso *autónomo*), la EDO define un *sistema dinámico*: dada una condición inicial $x(0) = x_0$, esta regla determina de forma determinista la trayectoria $x \mapsto x(t)$.

Un *punto de equilibrio* (o estado estacionario) es aquel que no cambia en el tiempo. En sistemas autónomos se caracteriza por la solución de la ecuación algebraica:

$$F(x^*; \mu) = 0. \quad (2)$$

En otras palabras, se obtiene resolviendo un sistema algebraico de ecuaciones, al igualar a cero las componentes de F .

La *estabilidad* de un punto equilibrio describe si las soluciones, ante pequeñas perturbaciones, regresan a él o, por el contrario, se apartan del mismo, conforme transcurre el tiempo. Para analizarla, se suele linearizar el sistema en x^* mediante la matriz jacobiana

$$J = \frac{\partial F_i(x^*)}{\partial x_j}$$

y se estudian sus valores propios.

Una *órbita periódica* es una solución que se repite tras un cierto periodo $T > 0$:

$$x(t + T) = x(t) \quad (3)$$

Si, además, ésta atrae trayectorias vecinas, se denomina *ciclo límite*. Las órbitas periódicas representan *oscilaciones sostenidas* (ritmos) y son fundamentales para explicar fenómenos repetitivos en biología y en ingeniería. Con frecuencia éstas surgen a través de una *bifurcación de Hopf*, la cual consiste en que un punto de equilibrio pierde estabilidad y surge un ciclo límite.

El *espacio fase* (o espacio de estados) es el conjunto de todos los valores posibles de las variables del sistema. Para un sistema autónomo

$$\dot{x} = F(x; \mu), \quad \forall x \in \mathbb{R}^n, \forall \mu \in \mathbb{R}^m \quad (4)$$

el espacio fase es $\dot{x} \subseteq \mathbb{R}^n$. Cada condición inicial $x_0 \in X$ genera una trayectoria $t \mapsto x(t) = \varphi_t(x_0)$, y los objetos dinámicos (equilibrios, órbitas periódicas/ciclos límite, variedades estables e inestables, atractores) son *subconjuntos invariantes* de X .

En sistemas de dos variables, el *retrato de fase* es la representación en el plano de las trayectorias y del campo de direcciones, herramienta clave para visualizar estabilidad y la geometría de los ciclos.

En este caso particular de $n = 2$, para

$$F = [f(x_1, x_2), g(x_1, x_2)]$$

la derivada está dada por la matriz jacobiana

$$J = \begin{pmatrix} \frac{\partial f}{\partial x_1}(x_1, x_2) & \frac{\partial f}{\partial x_2}(x_1, x_2) \\ \frac{\partial g}{\partial x_1}(x_1, x_2) & \frac{\partial g}{\partial x_2}(x_1, x_2) \end{pmatrix}. \quad (5)$$

$\det J < 0$	Silla inestable
$\det J > 0, \Delta > 0$	Nodo (Estable si $\text{tr } J < 0$ e inestable si $\text{tr } J > 0$).
$\det J > 0, \Delta < 0$	Foco o espiral estable si $\text{tr } J < 0$ e inestable si $\text{tr } J > 0$
$\det J > 0, \text{tr } J = 0$	Centro

El polinomio característico asociado es

$$p(\lambda) = \lambda^2 - (\text{tr } J)\lambda + \det J, \quad (6)$$

cuyas raíces λ_1, λ_2 son los valores propios de J . Aquí,

$$\text{tr } J = \frac{\partial f}{\partial x_1} + \frac{\partial g}{\partial x_2} \quad (7)$$

es la traza de la matriz y

$$\det J = \frac{\partial f}{\partial x_1} \frac{\partial g}{\partial x_2} - \frac{\partial f}{\partial x_2} \frac{\partial g}{\partial x_1} \quad (8)$$

es la determinante de la matriz. El discriminante

$$\Delta = (\text{tr } J)^2 - 4 \det J \quad (9)$$

determina la naturaleza de las raíces del polinomio característico:

- $\Delta > 0 \Rightarrow$ valores propios reales y distintos
- $\Delta = 0 \Rightarrow$ valores propios reales e iguales
- $\Delta < 0 \Rightarrow$ valores propios complejos conjugados.

Además, usando el hecho de que

$$\text{tr } J = \lambda_1 + \lambda_2 \quad \text{y} \quad \det J = \lambda_1 \lambda_2,$$

se obtiene la clasificación de estabilidad de los puntos de equilibrio $E^* = (x_1^*, x_2^*)$:

Una bifurcación es un cambio cualitativo en la dinámica descrita por un sistema de ecuaciones diferenciales que ocurre al variar un parámetro. En otras palabras, describe cómo se transforman los equilibrios u oscilaciones del sistema cuando cambian las condiciones del modelo.

Ahora, enunciaremos un par de teoremas que nos ayudarán a identificar la existencia de una bifurcación.

Teorema 1. Considérese la ecuación diferencial de la ecuación (4), con un equilibrio $E^*(\mu)$ dependiente del parámetro. Supóngase que, para $\mu = \mu_0$, la matriz jacobiana evaluada en $E^*(\mu_0)$ posee un par de valores propios imaginarios puros $\pm i\omega_0$, con $\omega_0 > 0$, y que los demás de valores propios tienen parte real negativa $\text{Re}(\lambda(\mu)) < 0$. Entonces, en un entorno del punto de equilibrio $E^*(\mu_0)$ el sistema puede experimentar una bifurcación de Hopf. Si, además, se cumple la condición de transversalidad

$$\frac{d}{d\mu} \text{Re}(\lambda(\mu_0)) \neq 0, \quad (10)$$

se garantiza la aparición o desaparición de una familia de ciclos límite.

Este teorema es importante porque constituye una explicación simple y universal del origen de ritmos sostenidos en contextos tan diversos como la física,

la biología o la ingeniería.

Teorema 2. (*Coefficiente de Lyapunov en la bifurcación de Hopf*). Considérese nuevamente la ecuación (4), dependiente del parámetro $\mu \in \mathbb{R}^m$. Supóngase que para un valor crítico $\mu = \mu_0$, un equilibrio E^* posee un par de valores propios puramente imaginarios de la forma $\pm i\omega_0$ con $\omega > 0$, mientras que los demás valores propios tienen parte real negativa $R(\lambda) < 0$. Entonces, existe un número real ℓ_1 , denominado primer coeficiente de Lyapunov, cuyo signo determina el carácter de las oscilaciones periódicas que surgen como:

- Si $\ell_1 < 0$, la bifurcación es **supercrítica**: aparece una familia de ciclos límite estables de pequeña amplitud en el entorno de μ_0 .
- Si $\ell_1 > 0$, la bifurcación es **subcrítica**: surge una familia de ciclos límite inestables de pequeña amplitud y, típicamente, se destruye un ciclo estable cercano.
- Si $\ell_1 = 0$, se dice que el caso es **degenerado** (bifurcación de Bautin) y es necesario calcular coeficientes de Lyapunov de orden superior.

De forma intuitiva, cerca de la bifurcación, la dinámica puede reducirse al siguiente sistema de ecuaciones diferenciales en coordenadas polares:

$$\dot{r} = r(\alpha(\mu - \mu_0) + \beta r^2 + \dots) \quad (11)$$

donde r representa la amplitud de las oscilaciones. El coeficiente ℓ_1 es proporcional a β , y su signo determina si los ciclos que aparecen son estables ($\ell_1 < 0$) o inestables ($\ell_1 > 0$). Para una exposición más detallada se recomienda consultar el libro clásico de Guckenheimer y Holmes [6].

Este análisis lineal constituye la base para el estudio cualitativo de modelos más complejos. En particular, el uso de ecuaciones diferenciales permite describir de manera sistemática la evolución temporal de variables biológicas relevantes, tales como sustrato, biomasa y productos, así como: (i) Predecir el comportamiento ante cambios operativos, (ii) determinar condiciones para maximizar la producción, (iii) Analizar fenómenos como biestabilidad, oscilaciones y bifurcaciones y (iv) diseñar estrategias de control para mantener un régimen deseado.

Aunque el quimiostato clásico con rendimiento constante predice un único equilibrio estable, la incorporación de mecanismos simples, mantenimiento celular, inhibición por sustrato o producto, y rendimientos variables, enriquece la retroalimentación y puede generar oscilaciones sostenidas. Matemáticamente, este cambio se explica mediante una bifurcación de Hopf: al variar un parámetro de control (por ejemplo, la concentración de sustrato en la alimentación S_{in}), un par de valores propios complejos del equilibrio cruza el eje imaginario, el equilibrio pierde estabilidad y nace una órbita periódica estable (ciclo límite). En la Sección 2 iniciamos con el quimiostato como modelo base y discutimos sus limitaciones. En la Sección 3 presentamos un modelo extendido con mantenimiento celular, rendimiento $Y(S)$ y cinética tipo Haldane (para capturar inhibición a altas concentraciones). Mostramos que el sistema pierde estabilidad mediante una bifurcación de Hopf, subcrítica en nuestro ejemplo. Al superar el umbral de Sin, emergen oscilaciones sostenidas a través de un pliegue de ciclos. Finalmente, en la Sección 4

presentamos simulaciones numéricas representativas (series de tiempo y retrato de fase del ciclo límite), junto con observaciones prácticas para operación y control.

MODELOS MATEMÁTICOS

Modelo no estructurado simple

El punto de partida clásico en biotecnología para describir un cultivo continuo (*quimiostato*) es el modelo no estructurado, que se basa en balances de materia para la biomasa y el sustrato. En su forma más simple está dado por:

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} &= \mu(S)X - DX, \\ \frac{dS}{dt} &= D(S_{in} - S) - \frac{\mu(S)}{Y}X, \end{aligned} \quad (12)$$

donde $X(t)$ es la concentración de biomasa (g/L), indicador del crecimiento celular en el biorreactor; $S(t)$ es la concentración de sustrato limitante (g/L) en el medio que indica el consumo por las células; D es la tasa de dilución (h^{-1}), S_{in} es la concentración de sustrato en la alimentación de medio fresco (g/L); Y es el rendimiento de biomasa respecto al sustrato consumido (g biomasa/g sustrato), y $\mu(S)$ es la velocidad específica de crecimiento (h^{-1}), que a menudo se modela con la cinética de Monod:

$$\mu(S) = \mu_{\text{máx}} \left(\frac{S}{K_S + S} \right). \quad (13)$$

siendo $\mu_{\text{máx}}$ la velocidad específica de crecimiento máxima y K_S la constante de semisaturación.

Este modelo supone que la población microbiana es homogénea y que el

rendimiento Y es constante. En estas condiciones, las soluciones típicamente convergen a un único punto de equilibrio estable, sin la aparición de oscilaciones sostenidas, ver la Figura 3. Por sí solo, este modelo no explica los fenómenos dinámicos complejos observados experimentalmente, como oscilaciones, pulsos o biestabilidad. Para capturar este tipo de comportamientos es necesario introducir elementos adicionales al modelo, tales como: (i) términos de mantenimiento celular; (ii) inhibición por metabolitos (productos); (iii) rendimientos variables dependientes de condiciones ambientales y (iv) interacciones físicas o de transporte no ideales.

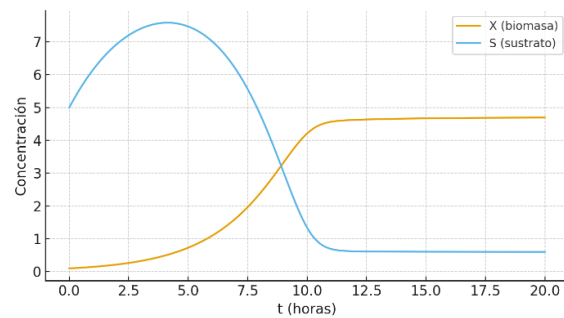


Figura 3: Gráficas de un cultivo continuo. Aquí los parámetros son: sustrato inicial $S(0) = 5$ g/L, biomasa inicial $X(0) = 0,1$ g/L, $\mu_{\text{máx}} = 0,8$ h^{-1} , constante de saturación $K_S = 1,0$ g/L, rendimiento biomasa/sustrato $Y = 0,5$, tasa de dilución $D = 0,3$ h^{-1} y concentración de entrada de sustrato $S_{in} = 10$ g/L.

Cuando el modelo básico de quimiostato (1) se amplía con mecanismos como mantenimiento celular, rendimientos variables o inhibición por metabolitos, el panorama cambia drásticamente. Lo que antes era un punto de equilibrio estable se convierte, en determinadas condiciones, en un sistema capaz de oscilar de manera espontánea.

El caso más simple es el del rendimiento variable con el sustrato, donde Y ya no

es constante, sino que depende de S . Esto refleja el hecho de que las células no siempre convierten el sustrato en la reacción con la misma eficiencia: factores tales como el estrés metabólico o el exceso de sustrato pueden modificar esa eficiencia. Al introducir esta dependencia en el modelo, se altera la estabilidad del equilibrio y, si la variación es suficientemente marcada, aparece una bifurcación de Hopf: el equilibrio pierde estabilidad y surge un *ciclo límite*, es decir, una órbita periódica estable visible en el plano de fases S vs X . En esta situación, las concentraciones de biomasa y sustrato oscilan de forma mantenida, repitiendo un patrón temporal característico. Para una descripción más formal de la bifurcación de Hopf, se remite al lector al apéndice y al libro de Perko [8].

Un segundo caso en el que se pueden presentar oscilaciones es cuando se considera el mantenimiento celular, que representa el consumo de sustrato para funciones vitales distintas al crecimiento. Aunque su formulación matemática es simple, su efecto es significativo: desplaza la región de operación hacia un régimen donde las oscilaciones son posibles y, a menudo, amplía el intervalo de tasas de dilución en el que se observan.

Ivanitskaya *et al.* [7] propusieron una visión más general: consideran clases completas de modelos de segundo orden con pequeñas modificaciones del *quimiostato* básico y muestran que, independientemente de los detalles, las oscilaciones tienden a aparecer en una trayectoria bien definida del plano (D, S_{in}) . Esta trayectoria se puede identificar gráficamente y permite predecir, sin resolver las ecuaciones, en qué condiciones un cultivo continuo podría presentar oscilaciones.

Modelo no estructurado extendido

Para capturar las oscilaciones observadas experimentalmente, una opción sencilla es ampliar el modelo básico incorporando (i) un término de muerte celular k_d y uno de mantenimiento celular m ; y (ii) un rendimiento Y que depende de la concentración de sustrato S . La velocidad específica de crecimiento puede incluir además inhibición por sustrato en el caso de la ecuación de Haldane. Un modelo típico que introduce las variaciones anteriores está descrito por el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} &= (\mu(S) - D - k_d)X \\ \frac{dS}{dt} &= D(S_{in} - S) - \frac{\mu(S)}{Y(S)}X - mX \end{aligned} \quad (14)$$

La velocidad específica de crecimiento puede modelarse con cinética de Haldane para incluir inhibición a altas concentraciones de sustrato:

$$\mu(S) = \mu_{\text{máx}} \left(\frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}} \right) \quad (15)$$

donde K_I es la constante de inhibición por sustrato. El rendimiento se asume variable con el sustrato de la forma:

$$Y(S) = Y_0 + Y_1 S \quad (16)$$

con Y_0 el rendimiento basal y Y_1 la sensibilidad del rendimiento a la concentración de sustrato.

Para investigar por qué un cultivo continuo puede entrar en un comportamiento oscilatorio (de subidas y bajadas regulares) de biomasa y sustrato, es necesario identificar el

momento exacto en que el sistema deja de ser estable y comienza a oscilar: en el lenguaje de la dinámica de sistemas, este cambio se conoce como *bifurcación de Hopf*. Detectarla en el modelo extendido no sólo señala el umbral a partir del cual aparecen las oscilaciones, sino que también permite interpretarlas en términos del proceso real: condiciones de operación en las que las interacciones entre crecimiento, consumo y mantenimiento generan un patrón repetitivo y predecible, tal como se ha observado en experimentos con cultivos continuos.

En la siguiente sección realizaremos este análisis para el modelo descrito por las ecuaciones (14)-(16), determinando las condiciones en las que surge la bifurcación de Hopf y caracterizando el comportamiento dinámico asociado para ciertos valores de los parámetros.

RESULTADOS

Puntos de equilibrio, estabilidad y bifurcación de Hopf

En el caso del modelo extendido, denotamos $x = (X, S)$ y su espacio fase está definido como:

$$X = \{x \in \mathbb{R}^2 : X \geq 0, S \geq 0\},$$

pues tanto la biomasa como el sustrato son cantidades no negativas. Bajo estas condiciones físicas, todas las trayectorias del sistema permanecen en la región positiva del plano fase.

El punto de equilibrio positivo de (14) es:

$$E^* = (X^*, S^*) = \left(\frac{D(S_{in} - S^*)}{\frac{D + k_d}{Y(S^*)} + m}, S^* \right), \quad (17)$$

Donde

$$S^* = \frac{K_1(\mu_{\max} - (D + k_d)) + \sqrt{-4K_S K_1(D + k_d) + K_1(D + k_d - \mu_{\max})^2}}{2(D + k_d)}. \quad (18)$$

Nótese que, en E^* , la condición de balance celular

$$\mu(S^*) = D + k_d$$

fija el sustrato residual S^* ; es decir, la tasa específica de crecimiento iguala las pérdidas por dilución y muerte celular. En consecuencia, definimos la tasa específica de consumo de sustrato (conocida como relación de Pirt) como

$$q_S^* = \frac{D + k_d}{Y(S^*)} + m, \quad (19)$$

donde $\frac{D + k_d}{Y(S^*)} + m$ representa la demanda asociada al crecimiento y m al mantenimiento no asociado al crecimiento (homeostasis, bombas iónicas, reparación y recambio celular, etc.).

Con ello,

$$X^* = \frac{D(S_{in} - S)}{q_S^*}. \quad (20)$$

es decir, la biomasa sostenida en equilibrio es el flujo neto de sustrato realmente consumido dividido entre la demanda específica de sustrato por unidad de biomasa. Metabólicamente, $\frac{D + k_d}{Y(S^*)}$ cuantifica el sustrato canalizado a síntesis de biomasa (para compensar dilución y muerte celular), mientras que m recoge los requerimientos energéticos basales de mantenimiento. En consecuencia, X^* aumenta con S_{in} y con el rendimiento $Y(S^*)$, y disminuye al incrementarse m , k_d o D (este último suele elevar S^* y reducir la conversión).

Para determinar su estabilidad lineal calculamos la matriz jacobiana

$$J = \begin{pmatrix} \mu(S) - (D + k_d) & \mu'(S) \\ -\frac{\mu(S)}{Y(S)} - m & -D - X \frac{\mu'(S)Y(S) - \mu(S)Y'(S)}{Y(S)^2} \end{pmatrix}, \quad (21)$$

evaluada en (X^*, S^*) , donde $' = d/dS$. A partir de estas expresiones se obtiene

que la traza y el determinante de la matriz jacobiana, al evaluar en el punto de equilibrio, son:

$$\text{tr } J = -D - \frac{\mu'(S^*)}{Y(S^*)} X^* + \frac{(D + k_d)Y'(S^*)}{Y(S^*)^2} X^* \quad (22)$$

$$\det J = -\mu(S^*)X^* \left(\frac{D + k_d}{Y(S^*)} + m \right) \quad (23)$$

donde

$$\mu(S) = \mu_{\text{máx}} \left(\frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}} \right)$$

y

$$\mu'(S) = \mu_{\text{máx}} \left(\frac{K_S + \frac{S^2}{K_I}}{\left(K_S + S + \frac{S^2}{K_I} \right)^2} \right)$$

Como vimos antes, los valores propios λ_1 y λ_2 de la matriz $J(X^*, S^*)$ determinan el tipo de comportamiento que presenta el sistema en torno al equilibrio. El teorema de Hartman-Grobman (véase [8]) asegura que, siempre que el equilibrio E^* sea hiperbólico (es decir, que ningún valor propio tiene parte real cero), la dinámica local (es decir, en una vecindad del equilibrio E^*) es cualitativamente equivalente a la del sistema linealizado. En este marco, es posible clasificar de manera precisa las distintas situaciones que pueden ocurrir alrededor del equilibrio:

1. Si $\det J < 0$, el equilibrio E^* es un *punto silla*: es inestable pues, aunque algunas trayectorias tienden hacia él, al menos una dirección conduce al alejamiento.
2. Si $\det J > 0$ y $\text{tr } J < 0$, el equilibrio E^* es *estable*: cualquier pequeña perturbación se atenúa con el tiempo y el sistema retorna al estado estacionario.

3. Si $\det J > 0$ y $\text{tr } J > 0$, el equilibrio E^* es *inestable*: incluso perturbaciones mínimas hacen que las trayectorias se alejen progresivamente de este estado.

Ya que el modelo (14)-(15) considera cinética de Haldane, existe una condición muy concreta para que el equilibrio pueda volverse inestable y dar paso a oscilaciones, lo cual ocurre cuando la concentración de sustrato en equilibrio S^* supera un valor umbral relacionado con K_S y K_I . Cuando se cumple esta condición y, además, la traza de $J(X^*, S^*)$ es exactamente cero, ocurre en la *bifurcación de Hopf*, es decir, el equilibrio deja de ser estable y aparece un ciclo repetitivo, conocido como *ciclo límite*. En un biorreactor continuo, esto significa que las concentraciones de biomasa y sustrato empiezan a oscilar de manera regular.

De aquí que, para determinar las oscilaciones sostenidas, debemos considerar:

$$\det J > 0 \iff \mu'(S^*) < 0 \iff \sqrt{K_S K_I},$$

donde existe la bifurcación de Hopf cuando:

$$\det J > 0, \quad \text{tr } J = 0$$

En particular, si Y es constante:

$$\text{tr } J = -D - \frac{\mu'(S^*)}{Y} X^* = 0 \iff X^* = \frac{DY}{-\mu'(S^*)}, \mu'(S^*) < 0.$$

En conclusión, el análisis teórico muestra que el modelo extendido puede perder estabilidad a través de una bifurcación de Hopf, dando lugar a oscilaciones sostenidas. Para ilustrar de manera concreta este fenómeno y observar su manifestación en las trayectorias del sistema, en la siguiente sección se presenta un ejemplo numérico representativo.

Análisis numérico de la bifurcación de Hopf

El ejemplo numérico de esta sección complementa el análisis teórico al mostrar que la concentración de sustrato en la alimentación, S_{in} , actúa como parámetro de bifurcación. Al variar S_{in} , el sustrato en estado estacionario S^* cambia y el equilibrio puede perder estabilidad, dando lugar a oscilaciones sostenidas en las concentraciones de biomasa y sustrato. Desde el punto de vista biológico, este parámetro refleja la disponibilidad externa de sustrato: valores bajos mantienen al sistema en régimen estacionario, mientras que valores más altos pueden ocasionar que S^* rebase el umbral $\sqrt{K_S K_I}$ y, consecuentemente, inducir un comportamiento oscilatorio. A continuación, se presenta la simulación de modelo (14)-(16), que ilustra cómo los cambios en S_{in} modifican la dinámica del reactor, mostrando con datos y figuras el comportamiento antes, en y después de la bifurcación de Hopf. En lo que sigue se describen los parámetros elegidos y se muestran de manera visual los escenarios que permiten apreciar, paso a paso, la transición desde un régimen estable hacia oscilaciones sostenidas.

Los parámetros cinéticos y operativos considerados son representativos de un cultivo microbiano en un reactor continuo o quimiostato, con cinética de Haldane (inhibición por sustrato) y rendimiento celular dependiente de la concentración de sustrato:

$$K_S = 0,317 \text{ g/L}, \quad K_I = 6 \text{ g/L}, \quad \mu_{\text{máx}} = 0,909 \text{ h}^{-1},$$

$$Y(S) = 0,147 + 0,653S, \quad D = 0,506 \text{ h}^{-1},$$

$$k_d = 0,0138 \text{ h}^{-1}, \quad m = 0,139 \text{ h}^{-1}$$

Con estos valores, la dinámica se resolvió mediante integración numérica utilizando un método de Runge-Kutta adaptativo de orden 4 (véase [4]), partiendo de condiciones iniciales cercanas al equilibrio. Posteriormente

exploramos distintos valores de S_{in} con el propósito de identificar el punto crítico de Hopf y analizar el comportamiento del reactor en ambos lados de la bifurcación.

Ubicación de la bifurcación de Hopf

Aplicando el teorema 1, vemos que los valores propios de la matriz jacobiana (3), evaluada en el equilibrio E^* , resultan ser un par de imaginarios puros

$$\lambda_{1,2} = \pm 0,5418485691i,$$

lo que indica que la bifurcación de Hopf ocurre exactamente para

$$S_{in}^{\text{Hopf}} = 2,0362393414 \text{ g/L}$$

$$S^* = 0,4732193469 \text{ g/L},$$

$$X^* = 0,6184216391 \text{ g/L}.$$

con frecuencia $\omega = 0,5148485691 \text{ rad/h}$ (período $\approx 11,6 \text{ h}$). El cálculo del primer coeficiente de Lyapunov arrojó $\ell_1 = 0,17784822516$, lo que confirma que se trata de una bifurcación de *Hopf subcrítica*, en la cual la órbita periódica aislada o ciclo límite asociado es inestable; para mayores detalles ver el Apéndice. Este tipo de bifurcación implica que, al cruzar el umbral, el sistema “salta” directamente a oscilaciones de gran amplitud, sin una fase intermedia de oscilaciones de pequeña amplitud.

En términos sencillos, una bifurcación de Hopf *subcrítica* significa que, justo en S_{in}^{Hopf} , se alcanza el umbral de $S^* = \sqrt{K_S K_I}$, y nace una oscilación muy pequeña pero inestable; no se sostiene por sí sola. Sin embargo, las simulaciones evidencian la existencia de un ciclo límite externo y estable para $S_{in} > S_{in}^{\text{Hopf}}$, consistente con un pliegue de ciclos en una vecindad pequeña del punto de equilibrio; al cruzar el umbral, la dinámica salta hacia ese ciclo estable. Esta oscilación

grande no se detecta con el análisis local del equilibrio porque es un efecto global de la no linealidad (lo que en términos técnicos se llama un “pliegue de ciclos”, es decir, una colisión entre dos oscilaciones). Por eso, al aumentar S_{in} más allá del umbral, la trayectoria no se queda en la oscilación pequeña (inestable), sino que salta directamente a la oscilación grande y estable. El resultado observable es un cambio brusco: de un régimen estacionario se pasa, súbitamente, a oscilaciones sostenidas de gran amplitud, y puede aparecer biestabilidad e histéresis en un rango de parámetros.

Se consideraron tres escenarios representativos para explicar mejor la bifurcación de Hopf (ver Figuras 4 y 5):

1) *Antes de Hopf* ($S_{in} = 1.55$ g/L): el equilibrio es estable; las perturbaciones iniciales generan oscilaciones transitorias que se amortiguan hasta alcanzar un estado estacionario. En términos operativos, el reactor mantiene condiciones constantes tras un breve ajuste.

2) *En Hopf* ($S_{in} = 2.0362393414$ g/L): se observan oscilaciones de amplitud casi constante, reflejo de la condición crítica en la que el equilibrio está al borde de perder estabilidad. Este punto marca la transición entre régimen estable y régimen oscilatorio.

3) *Después de Hopf* ($S_{in} = 3.8$ g/L): el sistema presenta un ciclo límite estable con oscilaciones sostenidas de gran amplitud y periodo regular (Figura 5). Interpretándolo en un contexto biotecnológico, este comportamiento podría generar variaciones periódicas en la concentración de biomasa y sustrato, afectando el rendimiento y la productividad del biorreactor.

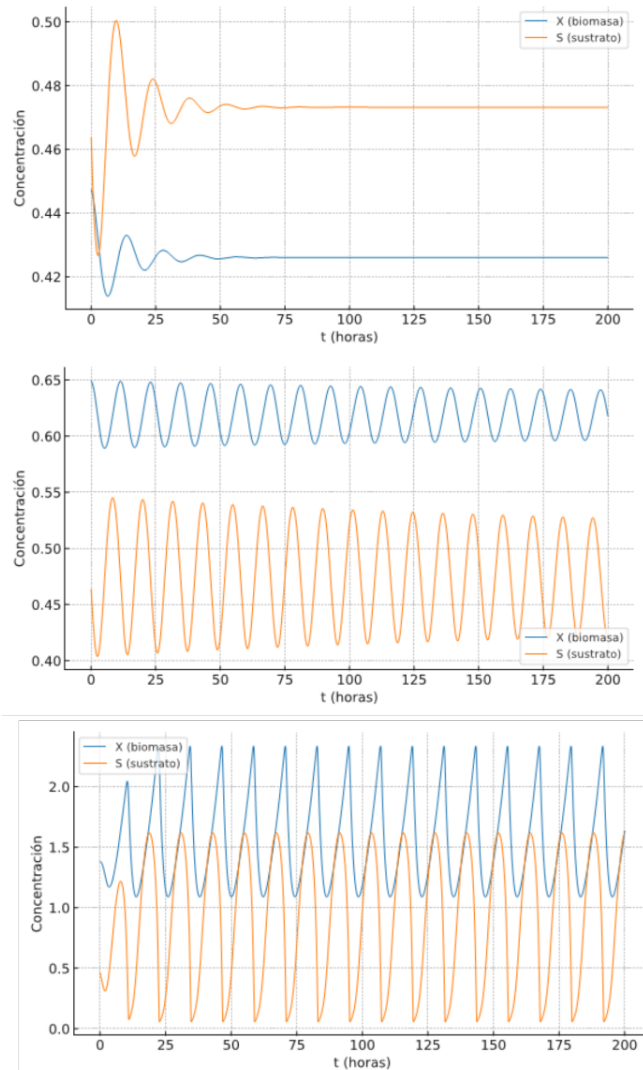


Figura 4: Variaciones de sustrato y biomasa respecto al tiempo antes, en y después de la bifurcación de Hopf para el modelo extendido. (Arriba) $S_{in} = 1.55$ g/L con condiciones iniciales $X(0) = 0.4473399219$ g/L y $S(0) = 0.4637559599$ g/L: oscilaciones amortiguadas hacia el equilibrio. (Centro) $S_{in} = 1.68$ g/L con condiciones iniciales $X(0) = 0.6493437211$ g/L y $S(0) = 0.4637559599$ g/L: oscilaciones casi neutras en el umbral crítico. (Abajo) $S_{in} = 3.8$ g/L y condiciones iniciales $X(0) = 1.3820823613$ g/L y $S(0) = 0.4637559599$ g/L: oscilaciones sostenidas (ciclo límite estable).

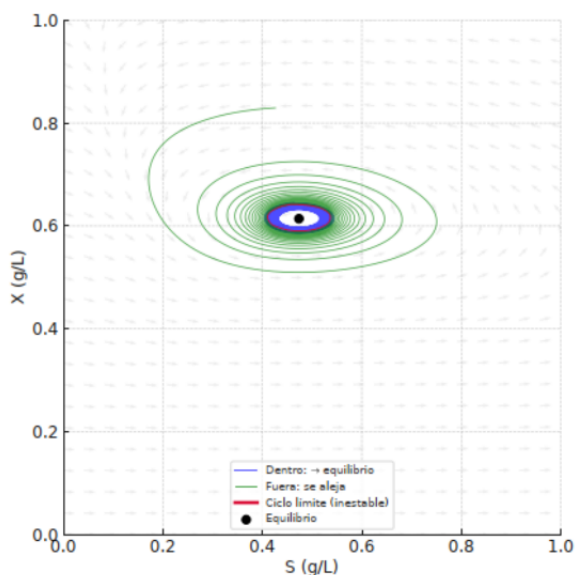


Figura 5: Retrato de fase del ciclo límite inestable en el plano (S, X) para $S_{in} = 2.0362393414$ g/L y punto de equilibrio $(X^*, S^*) = (0.6493437211, 0.4637559599)$ g/L.

DISCUSIÓN

El análisis numérico muestra que pequeñas variaciones en la concentración de sustrato en el medio fresco pueden inducir cambios drásticos en la dinámica del reactor. En la práctica, operar cerca de una bifurcación de Hopf implica un alto riesgo de entrar en oscilaciones sostenidas, las cuales pueden: (i) Provocar estrés periódico en los microorganismos, afectando su metabolismo (ii) Alterar la productividad y el rendimiento del proceso y (iii) Dificultar el control de calidad del producto.

Las oscilaciones de las concentraciones de biomasa y de sustrato generan un microambiente estresante en los microorganismos que crecen en un quimiostato. En ciertos instantes las células se encuentran con altas concentraciones de sustrato e instantes después se encuentra con bajas concentraciones de sustrato. Esto afecta la velocidad de consumos de sustrato y

en consecuencia la generación de energía necesaria para el crecimiento celular.

Microorganismos como *Escherichia coli* o *Saccharomyces cerevisiae* responden ante este tipo de estímulos ambientales cambiantes. Por ejemplo, en condiciones de altas concentraciones de glucosa, la bacteria *Escherichia coli* manifiesta el fenómeno de *sobre flujo de carbono* en la ruta metabólica encargada de asimilar y transformar ese sustrato. Como resultado, el exceso de carbono se redirige a otras vías, lo que conduce a la producción y secreción de ácidos orgánicos tóxicos para la célula, como el acetato y el ácido fórmico [10]. A causa de esto, el pH del medio baja y disminuye la velocidad del crecimiento bacteriano. Por otro lado, cuando el sustrato disminuye debido a las oscilaciones, las bacterias son capaces de metabolizar el acetato y utilizarlo como fuente de energía, aunque no para crecimiento celular. Estos eventos se repiten cíclicamente por las oscilaciones generando un estrés fisiológico y metabólico a la bacteria.

En el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se sabe que en condiciones de alta concentración de glucosa se presenta el efecto conocido como *Crabtree*, en el cual se produce y secreta etanol al medio de cultivo, que es un subproducto parcialmente oxidado, aún en condiciones aerobias; donde se esperaría una oxidación completa de la glucosa [11]. Esta desviación del carbono hacia un subproducto de fermentación disminuye el rendimiento de biomasa respecto al sustrato Y , además de que el etanol en altas concentraciones es tóxico para la levadura. Cuando la concentración de sustrato disminuye por las oscilaciones, la velocidad de crecimiento también disminuye, pero no así la concentración de etanol

en el medio, generando un ambiente estresante y tóxico para las células.

CONCLUSIONES

De lo anterior, vemos que las oscilaciones en un quimiostato tienen gran impacto en el metabolismo y la fisiología de los microorganismos. Sin embargo, saber que se presentan oscilaciones no es suficiente para comprender el fenómeno y poder generar una estrategia de acción para controlar el sistema y así evitar los efectos negativos. El estudio de la bifurcación para identificar los parámetros que ocasionan estos cambios abruptos y encontrar sus umbrales, es de gran importancia desde el punto de vista biotecnológico, pues permite comprender con mayor profundidad las interacciones no lineales del sistema y generar estrategias de acción para diseñar sistemas de control adecuados que permitan estabilizar el quimiostato. Estos resultados subrayan la necesidad de un control fino de las condiciones de operación, en particular de S_{in} y, en caso de ser necesario, también de D , para evitar operar cerca del umbral (manteniendo $S^* < \sqrt{K_S K_I}$ y así prevenir regímenes oscilatorios no deseados.

En el modelo extendido, la concentración de sustrato en la alimentación S_{in} es el *parámetro de bifurcación* que desplaza el equilibrio (X^*, S^*) hacia la región inhibitoria de la cinética de Haldane. Al aumentar S_{in} , puede ocurrir que $\mu'(S^*) < 0$ (equivalentemente, $S^* > \sqrt{K_S K_I}$) y el equilibrio pierda estabilidad cuando $\text{tr}J(X^*, S^*) = 0$ con $\det J(X^*, S^*) > 0$, esto es, en el punto S_{in}^{Hopf} . El signo positivo del primer coeficiente de Lyapunov

($\ell_1 > 0$) indica una *Hopf subcrítica*: el ciclo que nace en el umbral es inestable; sin embargo, para $S_{in} > S_{in}^{\text{Hopf}}$ puede existir un *ciclo límite externo y estable*

(típicamente vía un pliegue de ciclos) al que la dinámica *salta* al cruzar el umbral. El resultado es una transición brusca desde un régimen estacionario a oscilaciones de gran amplitud, con posibilidad de biestabilidad e histéresis en un intervalo de parámetros.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Juan S. Aranda Barradas por la revisión crítica de la versión preliminar del trabajo escrito.

Referencias

- [1] A. Suichi, A. E. Humphrey. (1973) "Biochemical Engineering," *Academic Press*, pp. 128-162.
- [2] J. E. Bailey, D. F. Ollis. (1983) "Biochemical Engineering Fundamentals," *McGraw Hill*, pp. 545-550.
- [3] A. Ajbar and K. Alhumaizi. (1997) "On the existence of oscillatory behavior in unstructured models of bioreactors," *Mathematical Biosciences*, vol. 143, no. 1, pp. 1-25.
- [4] R. L. Burden and J. D. Faires. (2011) *Numerical Analysis*. 9th edition, Brooks/Cole, Cengage Learning.
- [5] R. Freter, G. V. Stauffer, D. Cleven, L. V. Holdeman, and W. E. C. Moore. (1983). "Oscillations in Continuous Cultures of Microorganisms: Criteria of Utility of Mathematical Models," *Journal of Theoretical Biology*, vol. 95, no. 2, pp. 297- 323. doi: 10.1016/0022-5193(83)90247-5.
- [6] J. Guckenheimer, P. Holmes: *Nonlinear Oscillations, Dynamical Systems, and Bifurcations of Vector Fields*. (1993). Applied

- Mathematical Sciences, vol. 42, Springer-Verlag.
- [7] L. N. Ivanitskaya, A. V. Malygin, and E. E. Sel'kov. (1989) Oscillations in continuous cultures of microorganisms: a general theoretical approach. *Journal of Theoretical Biology*, 141(4):499–511.
- [8] L. Perko. (2001). *Differential Equations and Dynamical Systems*. Springer, New York, 3rd edition.
- [9] I. A. Yegorov, F. Mairet, and D. Dochain. (1997). “On the existence of oscillatory behavior in unstructured models of bioreactors,” *Mathematical Biosciences*, vol. 143, no. 1, pp. 1–25. doi: 10.1016/S0025-5564(97)00021-2.
- [10] J. Bafna-Rührer, Y. D. Bhutada, J. V. Orth, S. Ozmerih, L. Yang, D. Zielinski and S. Sudarsan. (2024). “Repeated glucose oscillations in high cell-density cultures influence stress-related functions of *Escherichia coli*,” *PNAS Nexus*, vol. 95, no. 3, pp. 376–389. doi: <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgae376>.
- [11] L. Gibart, R. Khoodeeram, G. Bernot, J. Comet, J. Trosset. (2021). “Regulation of Eukaryote Metabolism: An Abstract Model Explaining the Warburg/Crabtree Effect,” *Processes*, vol. 9, no. 3, pp. 1496–1532. doi: <https://doi.org/10.3390/pr9091496>.