

Modelo matemático de oscilaciones en el consumo de oxígeno en un cultivo continuo de levadura en condiciones de limitación de nutrientes

Tesis
entregada a la
Universidad Tecnológica Metropolitana
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de

Magister en biomatemática

Facultad de Ciencias Naturales, Matemática y del Medio Ambiente

Por Gonzalo Alfredo Ferrada Cerda

Enero, 2024

Director de Tesis Dr. Marcelo Rivas Astroza

Facultad de Ciencias Naturales, Matemática y del Medio Ambiente Universidad Tecnológica Metropolitana

Informe de Aprobación Tesis de Magister

Se informa a la *Escuela de Postgrado* de la *Facultad de Ciencias Naturales, Matemática y del Medio Ambiente* que la Tesis de Magister presentada por el candidato

Gonzalo Alfredo Ferrada Cerda

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de *Magister en biomatemática*, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 23 del mes de enero.

Director de Tesis

Dr. Marcelo Rivas Astroza

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Fernando Huancas Suárez

Dr. Aníbal Coronel Pérez

Dedicatoria

A Cata.

Gonzalo Ferrada Cerda

Índice general

1. Introducción	3
1.1. Antecedentes	3
1.1.1. El cultivo continuo de la levadura	3
1.1.2. Oscilaciones en el consumo de oxígeno	4
1.1.3. Ciclo metabólico de la levadura	6
1.1.4. Ciclo de división celular	8
1.1.5. Relación YMC-CDC	8
1.1.6. Sincronización colectiva	11
1.2. Planteamiento del Problema	14
1.2.1. Objetivo	14
1.2.2. Pregunta de Investigación	14
1.2.3. Justificación del estudio	14
2. Marco teórico	15
2.1. Fundamentos de modelamiento matemático de cultivos continuos de levadura en condiciones de limitación de nutrientes	15
2.2. El modelo	28
2.2.1. Supuestos básicos del modelo	29
2.2.2. Las ecuaciones de cambio	30
2.3. Fundamentos de simulación numérica	33
2.3.1. Campos de vectores	33
2.3.2. Diagramas de fase	35
2.3.3. Diagramas de bifurcación	36
2.3.4. Diagrama de retorno	38
2.3.5. Soluciones numéricas	40
2.3.6. Optimización de parámetros	42
2.3.7. Concordancia con los datos experimentales	46
2.4. Estudios previos	47
2.5. ¿Dónde estamos ahora?	51

3. Metodología	53
3.1. ¿Cómo se realizó la búsqueda y validación de parámetros?	53
3.1.1. Descripción de los métodos	57
4. Resultados	61
4.1. Búsqueda de parámetros	61
4.2. Análisis y búsqueda de patrones oscilatorios	63
4.2.1. Campo de vectores para nuestro modelo	63
4.2.2. Diagramas de fase para nuestro modelo	64
4.2.3. Diagramas de bifurcación para nuestro modelo	69
4.2.4. Gráfica de Poincaré aplicada a nuestro modelo	70
4.2.5. Soluciones numéricas para nuestro modelo	71
4.3. Optimización de parámetros	79
4.3.1. Algoritmos Genéticos para nuestro modelo	79
4.4. Ajuste de parámetros	81
4.5. Discusión de los resultados	86
5. Conclusión	87
5.1. Conclusiones	87
5.2. Perspectivas	88
6. Anexos	91
6.1. Códigos usados	91

Índice de figuras

1.1. Crecimiento de quimiostatos. En una cámara de quimiostato (A), se agita y airea un cultivo de levadura mientras se alimenta con medio fresco a una velocidad de dilución constante (D , volumen/h). Los medios agotados y las células se eliminan a la misma velocidad a través de un tubo de salida. El crecimiento celular alcanza un equilibrio en el que la composición del medio es aproximadamente constante y la tasa de crecimiento es igual a la tasa de dilución del medio. Las sondas miden constantemente el pH y la pO_2 (oxígeno disuelto) (B). Durante el crecimiento continuo, las oscilaciones metabólicas son detectables por cambios rítmicos en pO_2 (Figura adaptada de Burnetti, 2017 [9]).	4
1.2. El YMC. Durante el modo por lote, las células crecen a una alta densidad y luego se dejan en inanición durante al menos 4 horas. Durante el modo continuo (flecha), medio conteniendo glucosa es introducido en el cultivo a una tasa de dilución constante (0,09 a 0,1 horas ⁻¹). dO_2 se refiere a la concentración (% de saturación) del oxígeno disuelto en el medio (Figura adaptada de Tu et al., 2005 [70]).	6
1.3. Compartimentalización temporal. Procesos celulares claves están compartimentalizados en el tiempo por vía del ciclo metabólico. La progresión ordenada a través de distintas fases (OX, RB, RC) del ciclo metabólico permite una compartimentalización temporal de numerosos procesos celulares y metabólicos (Figura adaptada de Tu, 2005 [70]).	7
1.4. Bajo consumo de oxígeno, LOC, trazas de oxígeno disuelto encerradas en elipses verdes. Alto consumo de oxígeno, HOC, trazas de oxígeno disuelto encerradas en elipses rojas (Figura adaptada de Slavov, 2011) [66].	8
1.5. Crecimiento, tamaño y Start (Inicio) del ciclo celular en las células madre e hija. Las madres pueden volver a dividirse rápidamente después de una pequeña cantidad de crecimiento, mientras que las hijas deben crecer significativamente antes de alcanzar el umbral de tamaño crítico requerido para la división (Figura adaptada de Burnetti, 2017 [9]).	9

1.6.	El ciclo metabólico en células de levadura de crecimiento lento. El ciclo de los carbohidratos almacenados. En las células de crecimiento lento, el glucógeno y la trehalosa se acumulan durante G1 y luego se liquidan repentinamente hacia al final de G1. Poco después de la liquidación, los niveles de ARNm de las ciclinas de G1, Cln1 y Cln2 alcanzan un máximo, se pasa el Start y entonces ocurre la gemación y la síntesis de ADN. Datos adaptados de Silljé et al., 1997 [65]. Figura adaptada de Futcher, 2006 [21].	11
1.7.	Modelo simplificado de acoplamiento YMC-CDC (Figura adaptada de Burnett et al., 2016) [10].	12
2.1.	Modelo de Monod. La condición $\mu(K_s) = \frac{\mu_{max}}{2}$ en el modelo de Monod representa un punto clave en la relación entre la tasa específica de crecimiento μ y la concentración del sustrato (S). En este punto, la tasa de crecimiento alcanza la mitad de su valor máximo $\frac{\mu_{max}}{2}$. Esta condición es importante para comprender cómo los microorganismos responden y se adaptan a diferentes concentraciones de sustrato en su entorno, y proporciona información sobre el equilibrio entre la demanda metabólica y la disponibilidad de nutrientes.	17
2.2.	Diagrama de bifurcación. Se observa un diagrama de bifurcaciones de la amplitud de las oscilaciones en función de la tasa específica de crecimiento μ . Se puede observar como la amplitud de las oscilaciones varia de acuerdo a un modelo cuadrático.	18
2.3.	Gráfica de la evolución de las concentraciones de oxígeno y nutrientes en un sistema dinámico. Condiciones iniciales: $O_0 = 1,0$, $N_0 = 2,0$. Parámetros: $\mu = 0,5$, $K_N = 1,0$, $k = 0,1$, $Y = 0,8$	22
2.4.	Red de Petri. La red de Petri representa el consumo de oxígeno en un cultivo de levadura bajo limitación de glucosa. Los lugares “Glucosa” y “Oxígeno” indican las cantidades disponibles de ambos compuestos. La transición “Consumo de Oxígeno” representa el proceso de consumo. Se consume glucosa y oxígeno ($-k_1 \cdot Glucosa$ y $-k_3 \cdot Oxígeno$) y se produce glucosa y oxígeno ($k_2 \cdot Consumo de Oxígeno$ y $k_4 \cdot Consumo de Oxígeno$) durante el proceso.	23
2.5.	Autómata Celular. El autómata celular simula la evolución de un cultivo en una matriz bidimensional. Cada celda puede tener cuatro estados: “Ausencia de oxígeno”, “Presencia de oxígeno”, “Alto en nutrientes” y “Bajo en nutrientes”. La imagen muestra cómo los estados de las celdas cambian a lo largo del tiempo, siguiendo reglas de actualización específicas. La figura visualiza la dinámica del cultivo y su comportamiento en respuesta a las condiciones locales.	27
2.6.	Campo de vectores del modelo mínimo. La dirección, el sentido y la magnitud de las flechas indican que el aumento en la concentración de biomasa X , implica una disminución de la concentración de sustrato limitante S	34

2.7.	Diagrama de fases del modelo mínimo. El diagrama de fases de X y S muestra que a medida que aumenta la población X disminuye la concentración de sustrato S	36
2.8.	Diagrama de bifurcación del modelo mínimo. El diagrama de bifurcación del modelo mínimo muestra como las concentraciones de equilibrio de X y S varían en función de la variación del parámetro de dilución d . Cuando d crece observa que la concentración de equilibrio para S disminuye.	37
2.9.	Diagrama de retorno. El alineamiento parejo a la línea de identidad y la regularidad en la distancia entre los puntos, indica un posible comportamiento periódico de X	39
2.10.	Soluciones numéricas. La gráfica muestra la evolución de la población microbiana X y la concentración de sustrato S a lo largo del tiempo. Se utilizan pasos de predicción y corrección para obtener las soluciones numéricas con el método Adams-Bashforth-Moulton, que se representan como puntos en la gráfica. Esto nos permite visualizar cómo cambian X y S en función del tiempo y comprender mejor la dinámica del sistema quimiostato.	41
2.11.	Diagrama de flujo del algoritmo genético que fue usado en la depuración de los parámetros de nuestro modelo.	45
4.1.	Campo de vectores de C y O . Parámetros: $d = 0,1$; $\mu_{\max} = 0,18$; $v_{\max} = 0,65$; $K_{G_D} = 0,1$; $K_{O_D} = 0,1$; $K_{G_C} = 0,005$; $K_{O_C} = 0,005$; $G_{in} = 10$; $Y_{G_C} = 0,7$; $Y_{G_D} = 0,1$; $Y_{O_C} = 0,1$; $Y_{O_D} = 0,7$; $k = 1,2$; $O_{sat} = 10$; $a = 0,05$	63
4.2.	Diagrama de fase: Comprometidas v/s En Desarrollo. Se observa una estructura espiral con una circunferencia central, indicando oscilaciones amortiguadas en las células comprometidas y en desarrollo. La convergencia hacia la circunferencia muestra un ciclo límite estable, revelando oscilaciones regulares y repetitivas. Esto sugiere un mecanismo de autorregulación en el sistema.	66
4.3.	Diagrama de fase: Comprometidas v/s Oxígeno Disuelto. Este diagrama de fase muestra una trayectoria compleja y dinámica en el espacio de las concentraciones de células en estado de compromiso y oxígeno disuelto. Se observa una evolución desde un estado de crecimiento lineal hacia oscilaciones amortiguadas, seguido de una estabilización en torno a un ciclo límite principal. Estos patrones sugieren interacciones y retroalimentaciones entre las variables de interés.	67
4.4.	Diagrama de fase: En Desarrollo v/s Oxígeno Disuelto. El diagrama de fase muestra una trayectoria en forma de espiral que se arremolina hacia el centro, indicando una relación entre las células en desarrollo y el nivel de oxígeno disuelto. A medida que las células en desarrollo aumentan, se consume más oxígeno y su disponibilidad disminuye. Esto afecta el crecimiento de las células en desarrollo y puede estar influenciado por las células en estado de compromiso.	68

4.5. Diagrama de Bifurcación. El desorden de los valores estables de O desde $d = 0$ hasta $d = 0,175$, sugieren la posibilidad de la existencia de oscilaciones en O . Por el contrario, desde $d = 0,175$ hasta $d = 0,4$ la existencia de oscilaciones en la variable O , es improbable.	69
4.6. Diagrama de Poincaré. Los puntos de coordenadas (O_n, O_{n+1}) se encuentran perfectamente alineados. Se usó una muestra de 100 iteraciones. Este hecho indica una probabilidad altísima de oscilaciones en la variable O	71
4.7. Diagrama de Poincaré. Con 1000 iteraciones aparece un conjunto de puntos alejados de la línea central. Este hecho sugiere la presencia de inestabilidad en las oscilaciones de O	72
4.8. Soluciones numéricas. La gráfica muestra las oscilaciones de la concentración de células en estado de compromiso (rojo), células en estado de desarrollo (azul) y la concentración de oxígeno disuelto (verde) en el cultivo de levadura en un quimiostato. Los valores iniciales y los parámetros del sistema se han configurado de acuerdo con el modelo propuesto. Las oscilaciones en la concentración de oxígeno disuelto son evidencia de un reclutamiento repentino de células en estado de compromiso, lo que resulta en un aumento acelerado del consumo de oxígeno.	73
4.9. Variación del parámetro a . Las gráficas muestran cómo la variación de la tasa de obediencia a afecta las concentraciones de las células en estado de compromiso y desarrollo en un cultivo de levadura. Se observa que un aumento en a promueve el crecimiento de ambas poblaciones celulares a lo largo del tiempo. Estos resultados respaldan la hipótesis de reclutamiento de células en estado de compromiso por parte de las células en desarrollo.	74
4.10. Variación del parámetro a . A medida que el valor de la tasa de obediencia a aumenta, se observa un incremento en la amplitud y pronunciación de las oscilaciones en las concentraciones de glucosa y oxígeno disuelto. Esta respuesta se debe a la intensificación de la competencia y el consumo de sustratos por parte de las células en estado de compromiso, influenciado por el parámetro a . En consecuencia, se generan oscilaciones más marcadas en las concentraciones de glucosa y oxígeno disuelto en el quimiostato.	75
4.11. Variación del parámetro d . La variación de la tasa de dilución d afecta las amplitudes de las oscilaciones. Un mayor valor de d reduce las amplitudes, mientras que un valor más bajo las aumenta. Esto demuestra la influencia de la tasa de dilución en la dinámica del sistema.	77
4.12. Variación del parámetro d . La variación de la tasa de dilución d prácticamente no afecta la amplitud de las oscilaciones de las concentraciones de oxígeno disuelto y glucosa. Si afecta los períodos de ambas oscilaciones, siendo más pronunciado este efecto en las oscilaciones de O . Un mayor valor de d incrementa el período de disponibilidad del oxígeno disuelto en una concentración máxima, para las células.	78

4.13. Evolución de la aptitud promedio. La gráfica muestra la evolución de la aptitud promedio de los individuos según el número de generaciones.	80
4.14. Soluciones numéricas con parámetros depurados. La gráfica muestra las soluciones de nuestro modelo de ecuaciones diferenciales usando los parámetros obtenidos con la técnica de optimización de algoritmos genéticos.	80
4.15. Fracción de Células en estado de Compromiso y Oxígeno Disuelto. La figura extraída de Burnetti, 2017 [9] muestra la curva de oxígeno disuelto (pO_2) (curva de color negro) en conjunto con la curva de la fracción de células en estado de compromiso (Fraction Committed) (curva de color verde). Los círculos rellenos y vacíos corresponden a los puntos en donde este grupo de células ingresa al HOC y egresa del HOC respectivamente.	83
4.16. Parámetros Ajustados. La figura muestra el resultado del ajuste de curva. Los puntos de color rojo representan los valores experimentales de la fracción de células comprometidas. Los puntos de color azul representan los niveles experimentales de oxígeno disuelto. La línea de color púrpura representa la curva ajustada de la fracción de células comprometidas y la curva de color gris representa la curva ajustada del nivel de oxígeno disuelto.	85

Resumen

Dependiendo de factores como: la tasa de dilución, el nivel de oxígeno y pH; un cultivo continuo de levadura con glucosa limitante, presenta oscilaciones autosostenidas en la concentración de oxígeno disuelto [38, 20]. Según Futcher [21] esto ocurre porque las células que se encuentran en las postrimerías de la etapa G1 liquidan sus provisiones de carbohidratos, produciendo a raíz de esto, un estallido de glucosa. Una parte de la glucosa generada, es quemada por las células vía respiración oxidativa, fermentando el resto en etanol, el cual se libera al medio. Este fenómeno incrementa en gran medida la tasa de respiración. El etanol liberado entra en contacto con las células que se encuentran en rezagadas, propiciando que alcancen a las células que van a la vanguardia. Debido a este mecanismo, un conjunto grande de células, se compromete orquestadamente con iniciar el ciclo de división celular.

La secuencia de eventos descrita, se encuentra conectada al ciclo metabólico de la levadura, ya que las fases *oxidativas* (Ox) y de *reducción - construcción* (R/B) parecen producirse en una ventana temporal que comienza en la etapa G1 tardía y termina justo antes del inicio de la larga fase de crecimiento G1 [70]. En este período se detecta un alto consumo de oxígeno. Por otro lado el desarrollo de las células de levadura parece acontecer en paralelo a la fase de *reducción - carga* (R/C), etapa en la cual estas células usan la glucosa de tres maneras distintas; como fuente de energía, como material para construir su pared celular, como provisiones en forma de glucógeno y trehalosa que le servirán, a la postre, como materiales para el próximo ciclo de división celular [21]. En esta ventana temporal se produce un bajo consumo de oxígeno.

En este trabajo asumimos la hipótesis de Futcher [21] en cooperación con el modelo simplificado propuesto por Burnetti et al. [10, 9] con el fin de modelar matemáticamente el mecanismo de oscilación en el consumo de oxígeno de las células de levadura en un cultivo continuo en condiciones de limitación de nutrientes. Para llevar a cabo tal tarea, elaboramos un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias, las cuales representan las interdependencias y el cambio en el tiempo de las concentraciones de biomasa y sustratos limitantes. A partir de este modelo matemático, obtenemos sugerencias acerca de los valores idóneos de los parámetros del sistema que propicien oscilaciones en la concentración de oxígeno disuelto. Finalmente, este modelo es forzado a adecuarse a un caso particular ajustando, en la medida de lo posible, sus parámetros para que reproduzca un resultado experimental obtenido por Burnetti [9].

Abstract

Depending on factors such as dilution rate, oxygen level, and pH, a continuous yeast culture with limiting glucose exhibits self-sustained oscillations in dissolved oxygen concentration [38, 20]. According to Futcher [21], this occurs because cells at the end of the G1 stage deplete their carbohydrate reserves, leading to a burst of glucose. Some of the generated glucose is oxidatively respired by cells, while the rest is fermented into ethanol, which is released into the medium. This phenomenon significantly increases the respiration rate. The released ethanol comes into contact with lagging cells, enabling them to catch up with the leading cells. Due to this mechanism, a large set of cells collectively commits to initiating the cell division cycle.

The described sequence of events is linked to the yeast metabolic cycle, as the oxidative (Ox) and reduction-construction (R/B) phases appear to occur in a temporal window beginning in late G1 and ending just before the onset of the long G1 growth phase [70]. High oxygen consumption is detected during this period. On the other hand, yeast cell development seems to occur in parallel with the reduction-charging (R/C) phase, during which cells use glucose in three different ways: as an energy source, as material to build their cell wall, and as reserves in the form of glycogen and trehalose, which will ultimately serve as materials for the next cell division cycle [21]. Low oxygen consumption occurs during this temporal window.

In this work, we adopt Futcher’s hypothesis [21] in conjunction with the simplified model proposed by Burnetti et al. [10, 9] to mathematically model the oscillation mechanism in yeast cell oxygen consumption in a continuous culture under nutrient limitation conditions. To accomplish this task, we formulate a system of ordinary differential equations representing the interdependencies and time changes in biomass and limiting substrates concentrations. From this mathematical model, we obtain insights into the ideal parameter values that facilitate oscillations in dissolved oxygen concentration. Finally, we force this model to fit a particular case by adjusting its parameters as much as possible to replicate an experimental result obtained by Burnetti [9].

Capítulo 1

Introducción

1.1. Antecedentes

1.1.1. El cultivo continuo de la levadura

El cultivo de microorganismos, y en particular la producción de levaduras, es una práctica experimental que se encuentra en un estado de desarrollo avanzado. Esta tarea ha sido, desde hace largo tiempo, perfeccionada en virtud de sus beneficios. De hecho, las levaduras constituyen un grupo de microorganismos muy íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad [5]. Algunas especies de levaduras del género *Saccharomyces* son capaces de llevar a cabo el proceso de fermentación, facultad que se ha usado desde hace muchísimos años en la producción de pan y de bebidas alcohólicas. El consumo de levaduras ha ayudado a inspirar un sinnúmero de obras de arte que ensalzan al Dios del vino y a aquellos que disfrutaban de su consumo [64, 56]. El perfeccionamiento y el natural desarrollo de las técnicas de producción de los productos asociados con las levaduras pudo haber propiciado progresivamente el estudio detallado de *S. Cerevisiae*. A raíz de su simpleza, este microorganismo se convirtió en un modelo de estudio para la célula eucarionte, contribuyendo de manera muy importante a la biología celular.

Con el fin de recrear las condiciones adecuadas para la producción de cierto producto derivado, por ejemplo, de la fermentación, los microorganismos como la levadura se encierran junto a sus nutrientes al interior de una vasija. Este artefacto, conocido como bioreactor, consiste comúnmente en un recipiente hermético, donde pueden controlarse algunas variables ambientales relevantes, para la transformación del material biológico, como la temperatura, pH, alimentación, suministro de oxígeno, etc. Es muy importante para la dinámica del cultivo, si el bioreactor posee entrada y/o salida de medio fresco. Cuando el sistema posee una entrada y una salida para el suministro de nutrientes, el bioreactor recibe el nombre de Quimioestado. Cuando el sistema no posee entrada ni salida, el cultivo se denomina cultivo por lote y da pie a un cultivo en modo discontinuo.

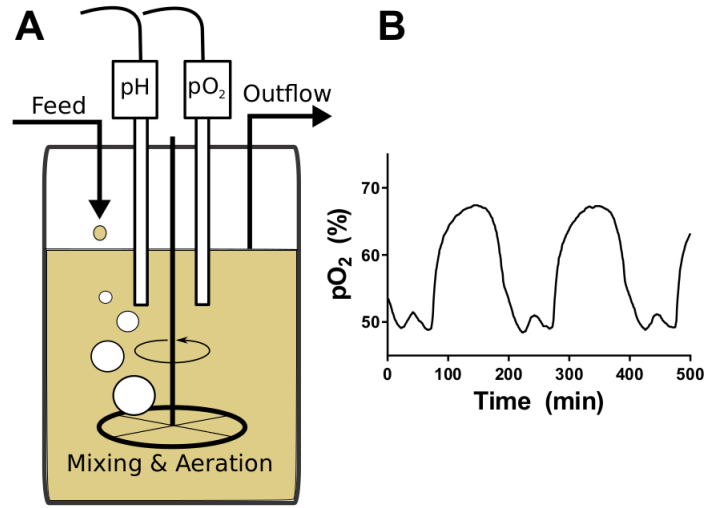


Figura 1.1: Crecimiento de quimiostatos. En una cámara de quimiostato (A), se agita y airea un cultivo de levadura mientras se alimenta con medio fresco a una velocidad de dilución constante (D , volumen/h). Los medios agotados y las células se eliminan a la misma velocidad a través de un tubo de salida. El crecimiento celular alcanza un equilibrio en el que la composición del medio es aproximadamente constante y la tasa de crecimiento es igual a la tasa de dilución del medio. Las sondas miden constantemente el pH y la pO_2 (oxígeno disuelto) (B). Durante el crecimiento continuo, las oscilaciones metabólicas son detectables por cambios rítmicos en pO_2 (Figura adaptada de Burnetti, 2017 [9]).

1.1.2. Oscilaciones en el consumo de oxígeno

En la naturaleza nos encontramos con fenómenos de carácter oscilatorio por doquier. El día y la noche, el ciclo celular, el ritmo circadiano y las estaciones del año, son sólo algunos de los ejemplos más familiares. En esta investigación, nos acercaremos al estudio de oscilaciones presentes en cultivos del microorganismo unicelular *Saccharomyces Cerevisiae*, conocido corrientemente como la “Levadura de la cerveza” o “Baker’s yeast” (Levadura de panadería). Cuando la levadura es cultivada al interior de un quimioestato, en fuentes de carbón como la glucosa, el etanol o el acetaldehído, suministrando una cantidad moderada o mínima de nutriente, se producen oscilaciones que se manifiestan a través de la tasa de consumo de oxígeno o la tasa de evolución del CO_2 , entre otras formas [58]. También se han observado otras oscilaciones relacionadas con el consumo de glucosa y la producción de biomasa [42][16]. Entender a cabalidad cuales son las causas de estas oscilaciones es una tarea pendiente.

El objetivo de este trabajo consiste, en construir un modelo matemático de las oscilaciones en el consumo de oxígeno, en un cultivo continuo de levadura en condiciones de limitación de nutrientes. Este modelo debe ser coherente con el conocimiento biológico disponible del

metabolismo celular de la levadura.

Respecto del tema general de las oscilaciones en cultivos de levadura, se han ensayado variadas explicaciones sin que a partir de ellas se haya podido construir una teoría definitiva. Existen dos tipos de perspectivas en modelamiento oscilatorio del metabolismo de *S. Cerevisiae*; las que se han centrado principalmente en reacciones intracelulares y las que se enfocan en procesos de transporte acoplados a cinéticas intracelulares sustancialmente concentradas[58].

El fenómeno oscilatorio, objeto de nuestro estudio, son las fluctuaciones sostenidas y autónomas, de la cantidad de oxígeno disuelto presente en el medio de cultivo de la levadura, cuando esta crece en condiciones de continuidad y de limitación de nutrientes. El proceso que propicia las oscilaciones respiratorias se ha descrito de la siguiente manera. Cuando las células de levadura prototróficas crecen en un cultivo a una alta densidad, se privan de alimento durante un período corto y luego se alimentan continuamente con bajas concentraciones de glucosa. Como consecuencia de esto, la población de células se vuelve altamente sincronizada y sufre fuertes oscilaciones en el consumo de oxígeno. Cuando se cumplen estas condiciones, la levadura exhibe ciclos robustos y altamente periódicos en forma de ráfagas respiratorias [70]. Durante estas oscilaciones, las células pasan por fases en las que consumen oxígeno rápidamente, seguidas de fases más largas en las que consumen mucho menos oxígeno. La duración del período de estos ciclos metabólicos en tales condiciones de crecimiento, suele ser de aproximadamente 4 a 5 horas, pero puede variar según la tasa de adición de glucosa [70]. Dichos ciclos persisten mientras se suministren concentraciones continuas de glucosa a las células.

Este hecho aún resulta sorprendente, porque esperaríamos que el consumo de oxígeno de una población de microorganismos aeróbicos, como *S. Cerevisiae*, presente un comportamiento estable en el tiempo. Esperaríamos observar, un consumo decreciente de oxígeno, si los microorganismos disminuyeran en número. Esperaríamos observar un consumo creciente de este, si la cantidad de microorganismos aumentara y un consumo constante, si la cantidad de estos organismos no cambiara. Contradiciendo este hecho, se observó a mediados del siglo XX que la cantidad de oxígeno disuelto y los niveles de pH en un cultivo de *S. Cerevisiae*, presenta fluctuaciones en forma oscilante cuando esta levadura crece en condiciones de continuidad y de limitación de nutrientes. Este hecho fue observado inicialmente por R. K. Finn y R. E. Wilson en el año 1954 [20] y por H. Kaspar von Meyenburg en el año 1969¹[38]. A partir de estas observaciones se debió reconocer, que el consumo de oxígeno de una población de *S. Cerevisiae* no siempre será una función monótona del tiempo, sino que por el contrario, el consumo de oxígeno, en las condiciones de cultivo consideradas, presenta un comportamiento oscilatorio a lo largo del tiempo.

¹H. Kaspar von Meyenburg (1969). Energetics of the budding cycle of *Saccharomyces cerevisiae* during glucose limited aerobic growth.

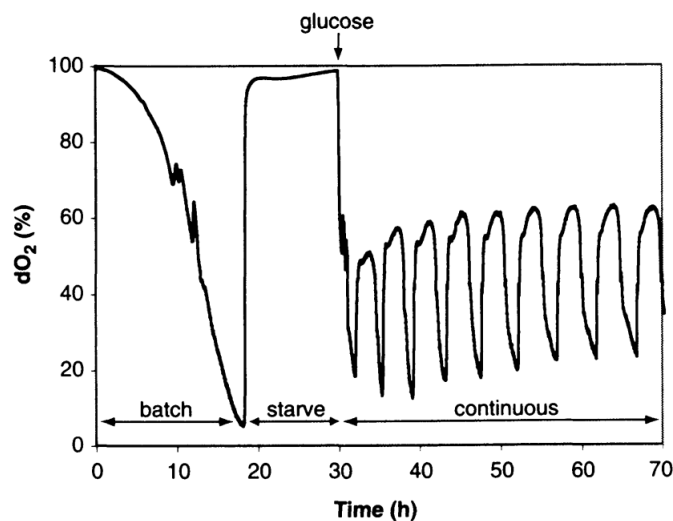


Figura 1.2: El YMC. Durante el modo por lote, las células crecen a una alta densidad y luego se dejan en inanición durante al menos 4 horas. Durante el modo continuo (flecha), medio conteniendo glucosa es introducido en el cultivo a una tasa de dilución constante (0,09 a 0,1 horas^{-1}). dO_2 se refiere a la concentración (% de saturación) del oxígeno disuelto en el medio (Figura adaptada de Tu et al. , 2005 [70]).

1.1.3. Ciclo metabólico de la levadura

Recientes estudios de expresión genética han mostrado como las variaciones respiratorias están íntimamente relacionadas con el metabolismo celular de *S. Cerevisiae*. Para nuestro propósito, no es importante describir la naturaleza bioquímica de estas relaciones, más, si es necesario mencionar y bosquejar brevemente, la conexión general entre estas variaciones respiratorias y el metabolismo celular, además de considerar con mayor detalle, los aspectos más relevantes para la configuración de nuestro modelo.

Estudios completos de micromatrices, han revelado que más de la mitad del genoma de la levadura, se expresa periódicamente en función de oscilaciones respiratorias de modo muy preciso, hecho que especificaría un programa ampliamente orquestado responsable de regular numerosas salidas celulares [69]. Esta expresión periódica, de gran parte del genoma de la levadura, se encuentra conectada con gran variedad de procesos celulares, los cuales dan forma a una serie de procesos encadenados entre sí, de forma periódica, serie recurrente de eventos bautizada por Tu et al. como “Ciclo metabólico de la levadura” (Yeast Metabolic Cycle (YMC)) [70]. El YMC consiste, *a grosso modo*, en la compartimentalización temporal de eventos celulares claves. Entre estos eventos celulares claves, son de especial interés aquellos relacionados con la producción de proteínas relacionadas con el manejo de la energía. Gran parte de las proteínas con funciones asociadas con la energía y el metabolismo, son codifi-

cadav por genes que tienden a expresarse con una periodicidad excepcionalmente precisa y robusta, hecho que parece sugerir que estos ciclos, podrían ser intrínsecamente metabólicos [70]. Los estudios de los perfiles de expresión génica temporal, revelaron tres supercúmulos de expresión génica, aptos para definir con ellos las tres fases principales del YMC: OX (*oxidativa-respiratoria*), RB (*reductiva-constructiva*) y RC (*reductiva-de carga*). Diferentes categorías de genes alcanzan su punto máximo en cada fase y cada célula pasaría sucesivamente por cada una de las tres fases durante cada YMC [70] (Figura 1.3).

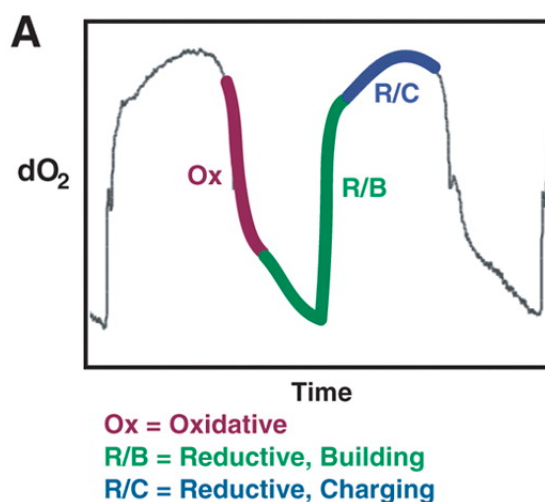


Figura 1.3: Compartimentalización temporal. Procesos celulares claves están compartimentalizados en el tiempo por vía del ciclo metabólico. La progresión ordenada a través de distintas fases (OX, RB, RC) del ciclo metabólico permite una compartimentalización temporal de numerosos procesos celulares y metabólicos (Figura adaptada de Tu, 2005 [70]).

Un aspecto interesante de mencionar, consiste en el establecimiento de la relación, entre las fases del metabolismo celular y las instancias de alto consumo de oxígeno (HOC, High Oxygen Consumption), y de bajo consumo de oxígeno (LOC, Low Oxygen Consumption). Como se puede observar, comparando las figuras 1.3 y 1.4, las fases del YMC correspondientes a un alto consumo de oxígeno, HOC, son la fase Oxidativa (OX) y la fase Reductiva-Constructiva (RB), mientras que la fase Reductiva-Carga (RC), corresponde a una etapa de bajo consumo de oxígeno, LOC.

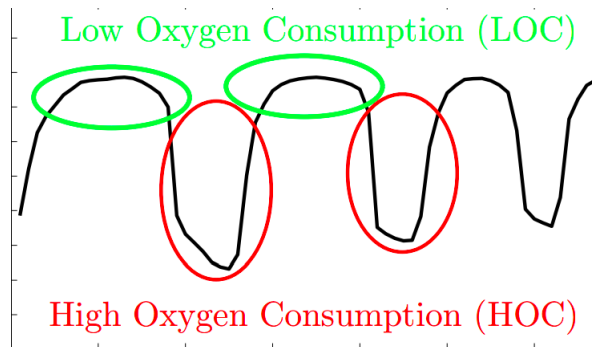


Figura 1.4: Bajo consumo de oxígeno, LOC, trazas de oxígeno disuelto encerradas en elipses verdes. Alto consumo de oxígeno, HOC, trazas de oxígeno disuelto encerradas en elipses rojas (Figura adaptada de Slavov, 2011) [66].

1.1.4. Ciclo de división celular

Se denomina ciclo de división celular (CDC) o simplemente ciclo celular al conjunto ordenado de sucesos que conducen al crecimiento de la célula y la división en dos células hijas. Las etapas son: G1-S-G2 y M ². Las células de *S. Cerevisiae* respetan este orden, crecen y se reproducen según este esquema. Sin bien las células de *S. Cerevisiae* respetan las etapas mencionadas, su división en dos células hijas se produce de forma asimétrica en un proceso denominado Gemación (Budding). ³

1.1.5. Relación YMC-CDC

Es importante abordar la relación existente entre el ciclo metabólico y el ciclo celular. Se ha descrito un acoplamiento entre el ciclo metabólico (YMC) y el ciclo de división celular (CDC)

²“El ciclo de división mitótica de *S. Cerevisiae* consta de una fase de replicación del DNA (S) y de otra de segregación cromosómica o mitosis (M) separadas por dos fases (G1) (entre M del ciclo previo y S) y G2 (entre S y M), finalizando con la separación citoplásmica o citoquinesis. A diferencia de otras células eucariotas, y debido a que las células se dividen mediante gemación, esta división no es exactamente simétrica, generándose una célula hija de menor tamaño que la célula madre. Mientras que esta última puede iniciar inmediatamente un nuevo ciclo de división, la célula hija debe crecer hasta alcanzar un tamaño crítico antes de iniciar su primer proceso de gemación. En base a criterios morfológicos y genéticos, se ha definido un punto clave en la fase G1, denominado *Start* (equivalente al ‘restriction point’ de células superiores), a partir del cual las células inician la emergencia de la yema al mismo tiempo que preparan la maquinaria para la replicación y posterior segregación cromosómica. *Start* también es el punto del ciclo en el que confluyen señales externas (feromonas sexuales, estado nutricional del medio, etc.) y las células ‘deciden’ si continuar el ciclo de división o entrar en un estado de reposo en forma de células no gemadas (a menudo denominado fase G0)”[31].

³La gemación (del latín *gemma* “joya o brote”) es un tipo de reproducción asexual. Es una división desigual: consiste en la formación de protuberancias llamadas yemas en el cuerpo del espécimen progenitor que, al crecer y desarrollarse, originan nuevos organismos. Estos pueden separarse del progenitor, o bien quedar unidos a él, formando una colonia. A nivel unicelular, es un proceso de mitosis asimétrica que se da en algunos seres unicelulares, como las levaduras <https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Gemacion&oldid=153608023> [74].

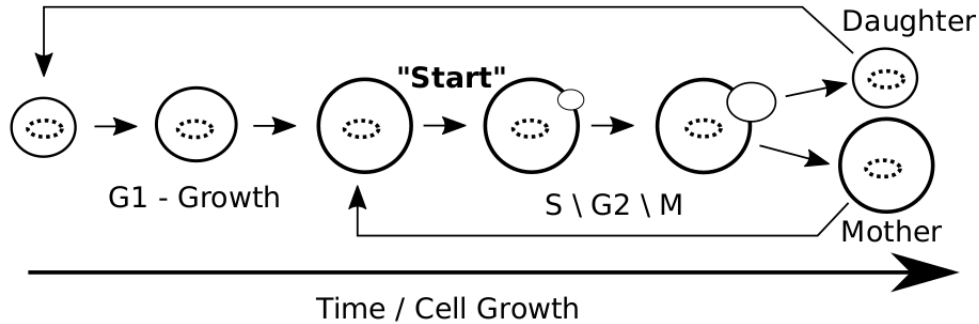


Figura 1.5: Crecimiento, tamaño y Start (Inicio) del ciclo celular en las células madre e hija. Las madres pueden volver a dividirse rápidamente después de una pequeña cantidad de crecimiento, mientras que las hijas deben crecer significativamente antes de alcanzar el umbral de tamaño crítico requerido para la división (Figura adaptada de Burnetti, 2017 [9]).

[38, 60]. El acoplamiento entre el YMC y el CDC es una cuestión abordada recientemente por Burnetti et al. [10]⁴, quienes aportan evidencia de que el Inicio (Start) del ciclo de división celular y la etapa de alto consumo de oxígeno (HOC) están estrechamente vinculadas a través de diferentes cepas de *S. Cerevisiae* y distintas tasas de crecimiento. Como explicación de este acoplamiento, se sugiere el siguiente mecanismo. Una vez que las células han acumulado reservas de energía suficientes, y por ende, se encuentran en los momentos finales de su etapa de crecimiento G1, estas pueden comprometerse irremisiblemente a iniciar el ciclo de división celular, entrando directamente a la etapa S, quemando los carbohidratos acumulados y aumentando de manera explosiva el consumo de oxígeno. La lógica detrás de este acoplamiento YMC-CDC sería, asegurar la replicación del ADN, permitiendo que la división celular sólo ocurra cuando se hayan acumulado suficientes reservas de energía [10]. Sin embargo, estudios posteriores, revelaron que las células ingresan a la fase de alto consumo de oxígeno del ciclo metabólico, antes de pasar el Start, lo que respalda un modelo de acoplamiento del ciclo metabólico - ciclo de división celular; en el que el ciclo metabólico más corto controla el compromiso con el ciclo celular, probablemente a través de la modulación de los umbrales de tamaño celular [9].

Se sabe que, a pesar haber cierta independencia entre el YMC y el CDC, la replicación del ADN ocurre una vez por YMC [40, 41]. A decir de Futcher [21], hay que aceptar que las oscilaciones metabólicas se encuentran, por decirlo de alguna de manera, superimpuestas al ciclo celular. Al menos, el hecho de que la relación entre YMC y copia del ADN sea de uno a uno, asegura que no podrían haber dos CDC en un YMC o viceversa. Por otro lado, el YMC está definido en función de los estados HOC y LOC. Al estado HOC le corresponden

⁴Anthony. J. Burnetti, Mert Aydin, and Nicolas E. Buchler. Cell Cycle start is coupled to entry into the yeast metabolic cycle across diverse strains and growth rates. *Molecular Biology of the Cell*, 27:64-74, 2016.

las fases OX y RB, mientras que con el estado LOC se encuentra asociada la fase RC. Se ha observado que la replicación del ADN es un proceso que ocurre en la fase RC [9]. Como dato anexo, es interesante notar que se midió que, a tasas de dilución D más bajas las células pasan más tiempo en LOC, acumulando carbohidratos de almacenamiento, debido al menor flujo de glucosa. Una vez que estas células, que se encuentran en LOC, alcanzan un umbral metabólico, cambian a HOC y catabolizan sus carbohidratos almacenados para proporcionar biomasa y energía, útiles para el crecimiento y la división celular [10, 21].

La quema y el almacenamiento de carbohidratos es un proceso cíclico, del cual se tiene una imagen muy elocuente desde hace ya tiempo [57, 43]. En su larga y lenta etapa de crecimiento (G1), en condiciones de limitación de glucosa, las células hijas crecen por respiración oxidando parte de la glucosa, y guardando parte de esta como glucógeno y trehalosa. Luego, en algún momento de G1 tardío, un evento, posiblemente un máximo en el nivel de AMP cíclico ⁵, detiene este proceso. El almacenamiento cesa y las reservas de glucógeno y trehalosa se transforman repentinamente en glucosa, la cual se usa vía glucólisis para realizar respiración oxidativa, aumentando en gran manera con esto la tasa de respiración. Sin embargo, la repentina explosión de glucosa es demasiada como para poder ser absorbida por la vía respiratoria, de modo tal que el resto fermenta a etanol. Increíblemente, en este punto del ciclo, las células en régimen estricto de escasez de glucosa, excretan etanol de la glucólisis producto del desborde de glucosa, en el medio. De esta manera, obtienen parte de su energía de la fermentación, al quemar repentinamente sus carbohidratos, incrementando en gran medida su producción de ATP ⁶. Las células expresan ARNm para las ciclinas Cln1 y Cln2 y se comprometen a atravesar el ciclo celular pasando el punto conocido como Start, entrando en consecuencia a la llamada fase S, en donde ocurre la replicación del ADN. Luego, habiendo agotado las reservas de carbohidratos, las células detienen la fermentación, respiran a un ritmo bajo permitido por las pequeñas cantidades de glucosa (y ahora etanol) disponibles en el medio y comienzan el arduo proceso de almacenamiento de carbohidratos para el próximo ciclo celular (Figura 1.6) [70, 21].

⁵El AMP cíclico, o simplemente AMPc (monofosfato de adenosina cíclico), un importante segundo mensajero intracelular en las células eucariotas. El AMPc juega un papel crucial en la transducción de señales celulares y está involucrado en la regulación de numerosos procesos fisiológicos.

⁶El ATP (adenosín trifosfato) es la moneda energética de las células. Funciona como un portador de energía al liberarla cuando se rompe un enlace entre sus grupos fosfato. Esta energía impulsa una variedad de procesos celulares cruciales, desde la contracción muscular hasta la síntesis de moléculas esenciales. En resumen, el ATP desempeña un papel central en proporcionar la energía necesaria para las actividades celulares fundamentales.

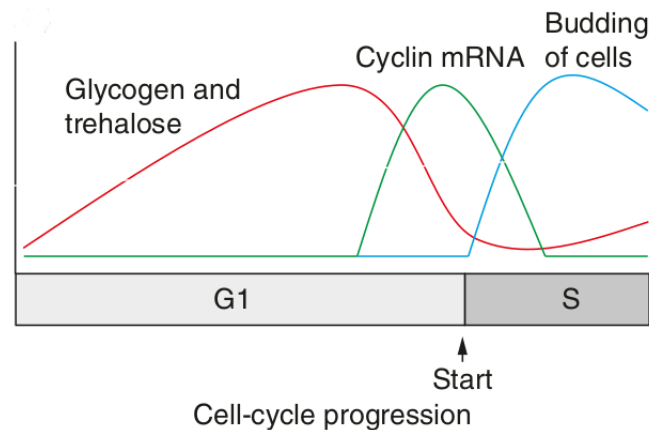


Figura 1.6: El ciclo metabólico en células de levadura de crecimiento lento. El ciclo de los carbohidratos almacenados. En las células de crecimiento lento, el glucógeno y la trehalosa se acumulan durante G1 y luego se liquidan repentinamente hacia al final de G1. Poco después de la liquidación, los niveles de ARNm de las ciclinas de G1, Cln1 y Cln2 alcanzan un máximo, se pasa el Start y entonces ocurre la gemación y la síntesis de ADN. Datos adaptados de Silljé et al., 1997 [65]. Figura adaptada de Fletcher, 2006 [21].

Entonces, ¿De qué modo podrían relacionarse la secuencia de eventos del CDC con los estados HOC y LOC?

Las observaciones sugieren que en cierto momento la población de *S. Cerevisiae* se sincroniza en torno a un mismo evento del ciclo celular, de manera que producto de esta orquestación obtenemos como consecuencia el fenómeno del alto y bajo consumo de oxígeno [21].

1.1.6. Sincronización colectiva

¿Como se produce esta sincronización colectiva de las células de *S. Cerevisiae*?

Un modelo simplificado de este fenómeno es el siguiente. Al comienzo de cada YMC una fracción de la población de células se compromete a catabolizar los carbohidratos almacenados, ingresar al HOC e iniciar el CDC. Estas levaduras “comprometidas” secretan metabolitos que convocan a otras levaduras “susceptibles” con suficientes carbohidratos almacenados para catabolizarlos, para ingresar al HOC. Esto produce una avalancha de levaduras comprometiéndose sincrónicamente a iniciar el HOC. No todas las levaduras responden de esta manera a las señales emitidas por las levaduras en estado de compromiso. Existe otra fracción de células en estado refractario las cuales no han acumulado suficientes reservas de energía o suficiente biomasa para optar a iniciar el CDC. Durante el YMC, esta fracción de células refractarias en LOC acumulará reservas de energía y biomasa necesarias para iniciar el HOC

espontáneamente, comprometerse al CDC y convocar por medio de sus señales a una nueva fracción de células susceptibles para entrar al HOC [10]. (Figura.1.7)

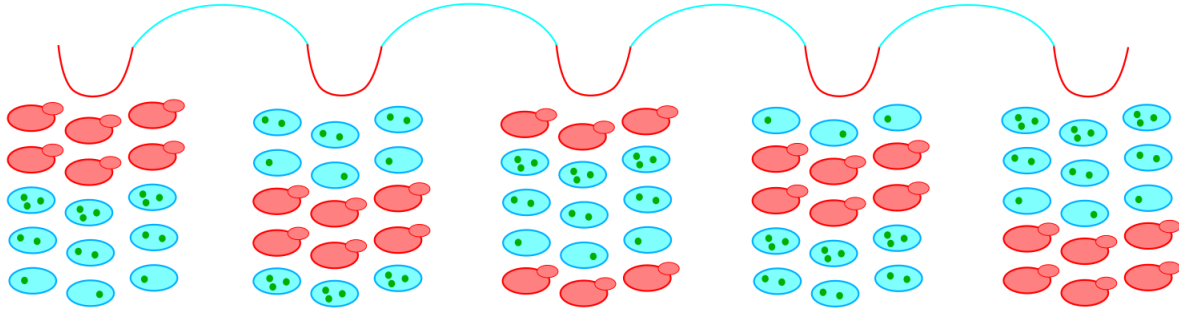


Figura 1.7: Modelo simplificado de acoplamiento YMC-CDC (Figura adaptada de Burnett et al., 2016) [10].

El proceso representado por la figura 1.7 puede describirse de la siguiente manera. La traza de oxígeno disuelto dO_2 indica LOC (línea celeste) y HOC (línea roja) en múltiples YMC. Al comienzo de cada YMC, una fracción de la población (células rojas con brotes) se compromete a catabolizar los carbohidratos almacenados, ingresando al HOC e iniciar el CDC. Estas levaduras “comprometidas” secretan metabolitos, que activan otras levaduras “susceptibles” con suficientes carbohidratos almacenados para catabolizar sus carbohidratos almacenados [63]. Dicha señalización autocatalítica a través de metabolitos secretados provoca una avalancha de levaduras susceptibles que ingresan sincrónicamente al HOC y se comprometen con el CDC. Sin embargo, está claro que no todas las levaduras se comprometen con CDC cada YMC. El resto de la población de levadura en LOC (células celestes) es refractaria a las señales metabólicas, porque las células no han acumulado suficientes reservas de energía (puntos verdes) para comprometerse en el YMC, y/o no han acumulado suficiente biomasa para iniciar el Start del ciclo celular. Durante el próximo YMC, estas levaduras “refractarias” en LOC continúan acumulando sus reservas de almacenamiento de carbohidratos y biomasa, de modo que una nueva fracción de levaduras estará lista para iniciarse espontáneamente y provocar que otras levaduras susceptibles se comprometan en el siguiente YMC. La población de levadura en un quimiostato bajo en glucosa se auto-organiza en múltiples cohortes escalonadas, de modo que solo una cohorte ingresa sincrónicamente al CDC cada YMC (es decir, acoplamiento de uno a algunos). Es probable que las células migren entre cohortes con el tiempo, debido a la variabilidad de célula a célula tanto en el YMC como en el CDC. Naturalmente este proceso puede describirse con mucho más detalle. Sin embargo, para nuestro propósito de modelamiento matemático, nos mantendremos en este nivel de complejidad. Una descripción simple, que es coherente con el proceso descrito, es la propuesta por Futcher en el año 2006 [21] :

... pero una explicación simplificada es que las células que primero liquidan sus carbohidratos almacenados y secretan etanol están alimentando con etanol a otras células en el cultivo. Por lo tanto, las células que reciben el etanol pueden crecer más rápido y alcanzar a las células más avanzadas. Una vez que se ponen al día, también se convierten en alimentadores en lugar de receptores. Para decir lo mismo de una manera diferente, cada célula tiene una oscilación interna de almacenamiento y luego quema de carbohidratos, y estas oscilaciones pueden sincronizarse a través de un cultivo completo por los efectos de alimentación cruzada del etanol liberado y quizás otros metabolitos (por ejemplo, se han sugerido sulfuro de hidrógeno y acetaldehído) [52].

Futcher, 2006 [21].

Se ha observado que las células comprometidas secretan metabolitos que actúan como señales para atraer a otras células susceptibles, lo que desencadena un ciclo sincrónico de compromiso y entrada al estado de alto consumo. Sin embargo, no todas las células responden a estas señales, ya que algunas permanecen refractarias debido a la falta de reservas energéticas o biomasa suficientes. A medida que el ciclo avanza, estas células refractarias acumulan las reservas necesarias para iniciar el siguiente ciclo y desencadenar la entrada de una nueva fracción de células susceptibles.

En conclusión, el estudio de la sincronización colectiva en el cultivo de levadura *S. cerevisiae* es de gran importancia para comprender los mecanismos que subyacen al fenómeno de las oscilaciones en el consumo de oxígeno de la levadura. El modelo simplificado propuesto por Burnetti et al. [10] en conjunto con la explicación proporcionada por Futcher [21] propone el mecanismo que subyace a esta sincronización colectiva. Consideramos que estas dos ideas generales son idóneas para desarrollar, con ayuda de ellas, un modelo matemático de las oscilaciones en el consumo de oxígeno de un cultivo continuo de levadura en condiciones de limitación de nutrientes.

1.2. Planteamiento del Problema

1.2.1. Objetivo

Construir un modelo matemático que reproduzca las oscilaciones en el consumo de oxígeno en un cultivo de levadura en condiciones de continuidad y limitación de nutrientes.

1.2.2. Pregunta de Investigación

¿Por qué se producen oscilaciones autosostenidas en la concentración de oxígeno disuelto en un cultivo continuo de levadura en condiciones de limitación de nutrientes?

1.2.3. Justificación del estudio

El objetivo de estudio posee una significancia destacada en diversos aspectos. En primer lugar, comprender y modelar el cultivo de levadura en condiciones de continuidad y limitación de nutrientes, resulta útil para la industria biotecnológica y alimentaria. Las levaduras desempeñan un papel esencial en la producción de alimentos, bebidas y productos bioquímicos. Al desarrollar un modelo matemático consistente con el fenómeno biológico, se proporciona una herramienta valiosa para optimizar y controlar los procesos de cultivo de levadura. El desempeño que tenga el modelo en la simulación de oscilaciones en el consumo de oxígeno, así como también en la simulación de otros tipos de oscilaciones asociadas, es un ítem de particular interés. Las oscilaciones metabólicas pueden tener implicaciones relevantes en la producción de metabolitos deseados. Al desencadenar respuestas adaptativas en las levaduras, dichas oscilaciones pueden influir en la producción de productos metabólicos específicos. Por lo tanto, comprender y predecir estas oscilaciones resulta crucial para maximizar la eficiencia y el rendimiento de los procesos biotecnológicos que involucran levaduras.

Por otro lado, construir el modelo sobre la base del conocimiento biológico del metabolismo celular, garantiza su coherencia con los mecanismos biológicos subyacentes. Esto proporciona una interpretación más precisa de los resultados y una comprensión más profunda de los factores que influyen en el comportamiento del cultivo de levadura.

En resumen, construir un modelo matemático del cultivo de levadura en condiciones de continuidad y limitación de nutrientes, capaz de generar oscilaciones en el consumo de oxígeno, es significativo tanto, desde una perspectiva aplicada en la industria biotecnológica y alimentaria, como desde una perspectiva científica, al contribuir a la optimización de los cultivos microbianos y al ensanchar el entendimiento de los procesos metabólicos llevados a cabo por la levadura.

Capítulo 2

Marco teórico

2.1. Fundamentos de modelamiento matemático de cultivos continuos de levadura en condiciones de limitación de nutrientes

El modelamiento matemático de los cultivos de levadura en condiciones de continuidad y limitación de nutrientes se benefician de varios enfoques y herramientas. Se utilizan modelos cinéticos, como el modelo de Monod [50], para describir el consumo de oxígeno y nutrientes por parte de los microorganismos. También se consideran efectos de retroalimentación y análisis de estabilidad [32, 68, 25] y podrían emplearse modelos de reacción-difusión, para comprender las oscilaciones en el consumo de oxígeno [53]. En el modelamiento microbiano, también tienen un lugar importante los enfoques basados en matemática discreta, como redes de Petri [62, 13] y autómatas celulares [26], los que permiten recrear una dinámica discreta del sistema. Estas herramientas ayudan a comprender los mecanismos de las posibles oscilaciones y predecir su comportamiento en diferentes condiciones experimentales.

Los modelos basados en la teoría de la cinética de crecimiento microbiano describen cómo los microorganismos consumen el oxígeno y otros nutrientes, en función de su tasa de crecimiento y la disponibilidad de los sustratos. En particular, el modelo de Monod [50], propuesto por Jacques Monod, es ampliamente utilizado en estudios de crecimiento microbiano bajo limitación de nutrientes y describe cómo la tasa de crecimiento de un microorganismo está relacionada con la concentración del sustrato limitante. Este modelo se basa en la idea de que la tasa de crecimiento microbiano depende de la velocidad, a la cual los microorganismos consumen los nutrientes disponibles.

La ecuación del modelo de Monod es la siguiente:

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right), \quad (2.1)$$

donde:

- μ es la tasa de crecimiento específico microbiano.
- μ_{max} es la tasa máxima de crecimiento específico microbiano.
- S es la concentración del sustrato limitante.
- K_s es la constante de saturación, que representa la concentración del sustrato a la cual la tasa de crecimiento es la mitad de la tasa máxima.

En la ecuación (2.1), se puede observar que a medida que la concentración del sustrato S se acerca a cero, la tasa de crecimiento específico μ tiende a cero, lo cual indica que el crecimiento está limitado por la disponibilidad de nutrientes. A medida que la concentración del sustrato aumenta, la tasa de crecimiento también aumenta hasta alcanzar su valor máximo (μ_{max}). Sin embargo, a medida que la concentración del sustrato continúa aumentando, la tasa de crecimiento se estabiliza y no puede aumentar más, lo cual está representado por la constante de saturación K_s (Figura 2.1).

En el modelamiento de las oscilaciones en el consumo de oxígeno, es importante considerar aspectos más allá de los modelos de crecimiento microbiano. Uno de los aspectos que puede desempeñar un papel crucial en la generación de oscilaciones, es el efecto de la retroalimentación positiva y negativa entre los componentes del sistema. Estos efectos se refieren a cómo las variaciones en una variable afectan a otras variables del sistema, creando un ciclo de retroalimentación que puede amplificar o amortiguar las oscilaciones.

En el caso específico del cultivo de levadura, existen interacciones complejas entre el consumo de oxígeno, la producción de productos metabólicos y la regulación génica [69], que pueden influir en la generación de oscilaciones. Estas interacciones se capturan mediante modelos de retroalimentación, que utilizan ecuaciones y relaciones para describir cómo los cambios en una variable afectan a las demás. Por ejemplo, la producción de productos metabólicos puede influir en el consumo de oxígeno, y a su vez, el consumo de oxígeno puede afectar la regulación génica [67]. Estos modelos permiten estudiar cómo estas interacciones complejas contribuyen a las oscilaciones observadas en el sistema. En conjunto con considerar las interacciones entre los componentes del sistema, se utilizan técnicas de análisis de estabilidad para investigar las condiciones en las que se producen las oscilaciones. El análisis de estabilidad tiene como objetivo determinar si los estados estacionarios del sistema son estables o inestables frente a pequeñas perturbaciones [22]. En el contexto de las oscilaciones en el consumo de oxígeno, se

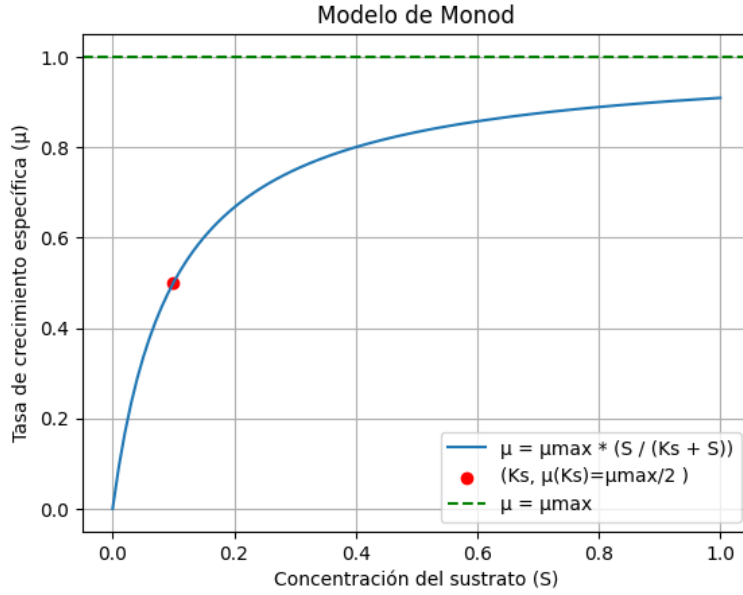


Figura 2.1: Modelo de Monod. La condición $\mu(K_s) = \frac{\mu_{\max}}{2}$ en el modelo de Monod representa un punto clave en la relación entre la tasa específica de crecimiento μ y la concentración del sustrato (S). En este punto, la tasa de crecimiento alcanza la mitad de su valor máximo $\frac{\mu_{\max}}{2}$. Esta condición es importante para comprender cómo los microorganismos responden y se adaptan a diferentes concentraciones de sustrato en su entorno, y proporciona información sobre el equilibrio entre la demanda metabólica y la disponibilidad de nutrientes.

exploran las bifurcaciones [25], que corresponden a cambios cualitativos en el comportamiento del sistema a medida que se modifican los parámetros o las condiciones iniciales.

Las bifurcaciones son puntos críticos donde se produce un cambio abrupto en el comportamiento del sistema. Estas pueden manifestarse como cambios en la amplitud, frecuencia o forma de las oscilaciones. El análisis de bifurcaciones permite identificar los puntos en los que ocurren estas transiciones y comprender cómo los cambios en los parámetros del modelo o en las condiciones iniciales pueden dar lugar a diferentes tipos de oscilaciones [32, 68, 25].

Una herramienta comúnmente utilizada en el análisis de bifurcaciones es la representación gráfica de las bifurcaciones. Este tipo de gráfico muestra cómo cambian las soluciones del sistema a medida que se varían los parámetros. En el contexto de las oscilaciones en el consumo de oxígeno, el diagrama de bifurcaciones puede representar cómo varía la amplitud de las oscilaciones en función de un parámetro específico, como la tasa específica de crecimiento microbiano. Esta representación visual ayuda a identificar las regiones en las que se producen bifurcaciones y a comprender cómo los cambios en los parámetros influyen en las oscilaciones.

A continuación, se muestra un ejemplo de un diagrama de bifurcaciones para ilustrar este concepto. En este caso, se considera un sistema simplificado que describe las oscilaciones en el consumo de oxígeno en un cultivo de levadura. El parámetro que se varía es la tasa de crecimiento específico microbiano, y la variable de interés es la amplitud de las oscilaciones (Figura 2.2).

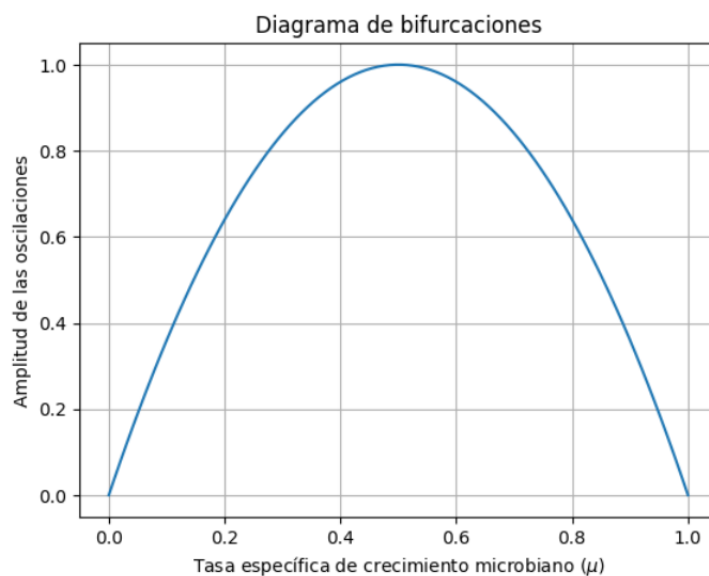


Figura 2.2: Diagrama de bifurcación. Se observa un diagrama de bifurcaciones de la amplitud de las oscilaciones en función de la tasa específica de crecimiento μ . Se puede observar como la amplitud de las oscilaciones varia de acuerdo a un modelo cuadrático.

El estudio de las oscilaciones en el consumo de oxígeno en un cultivo continuo de levadura bajo limitación de nutrientes bien podría involucrar también el uso de herramientas matemáticas más avanzadas, como los modelos de reacción-difusión [53]. Estos modelos son especialmente útiles cuando se considera la difusión de los sustratos y productos metabólicos a través del medio de cultivo, ya que esta difusión puede tener un impacto significativo en las oscilaciones observadas. Anticipamos que uno de los aspectos centrales del modelo simplificado de sincronización descrito en el capítulo anterior, involucra la difusión en el medio de señales metabólicas.

Para comprender mejor el papel de la difusión en las oscilaciones, se debería utilizar la ecuación de difusión [53], que describe cómo las concentraciones de los sustratos y productos metabólicos cambian en función de su difusión en el medio. En combinación con las ecuaciones cinéticas que describen el consumo de oxígeno por parte de la levadura [50], se pueden obtener

modelos más completos, que no solo tienen en cuenta las tasas de consumo y producción, sino también la distribución espacial de las concentraciones en el quimiostato.

Para ilustrar este enfoque, consideremos la ecuación de difusión en una dimensión, que describe cómo una concentración C de un sustrato se propaga en el medio de cultivo a lo largo del tiempo. La ecuación de difusión se puede expresar como:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2},$$

donde $\frac{\partial C}{\partial t}$ es la tasa de cambio de la concentración en el tiempo, D es el coeficiente de difusión y $\frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$ es la segunda derivada espacial de la concentración.

Al combinar la ecuación de difusión con las ecuaciones cinéticas que describen el consumo de oxígeno por parte de la levadura, se obtendría un sistema de ecuaciones que permitiría simular la dinámica del consumo de oxígeno. Estas ecuaciones se pueden resolver numéricamente utilizando métodos como el método de diferencias finitas o el método de elementos finitos. En el contexto de las oscilaciones en el consumo de oxígeno en un cultivo continuo de levadura, el sistema de ecuaciones de reacción-difusión y cinéticas se podría expresar de la siguiente manera. La ecuación de difusión del oxígeno describe la difusión espacial de la concentración de oxígeno a través del medio de cultivo. Esta se expresa como:

$$\frac{\partial O}{\partial t} = D \cdot \nabla^2 O,$$

donde $\frac{\partial O}{\partial t}$ es la tasa de cambio de la concentración de oxígeno en el tiempo, D es el coeficiente de difusión y ∇^2 es el operador laplaciano que describe la difusión espacial de la concentración. Por otro lado, una ecuación cinética de Monod describiría el consumo de oxígeno por parte de la levadura y se expresaría como:

$$r = \frac{\mu \cdot O}{K + O},$$

donde r es la tasa de consumo de oxígeno, μ es la tasa de crecimiento de la levadura, O es la concentración de oxígeno y K es la constante de saturación.

Una vez que se obtienen las soluciones numéricas, se pueden realizar análisis y visualizaciones para comprender mejor la dinámica en el consumo de oxígeno. Por ejemplo, se pueden trazar perfiles de concentración a lo largo del tiempo y el espacio para observar la dinámica de la difusión y consumo de oxígeno en el quimiostato. Estas visualizaciones pueden proporcionar información valiosa sobre los patrones espaciales y temporales presentes. El modelo de reacción-difusión también permite estudiar cómo los cambios en los parámetros del sistema afectan las posibles oscilaciones. Por ejemplo, se podrían realizar experimentos virtuales variando el coeficiente de difusión para analizar cómo diferentes tasas de difusión afectan la

aparición y la amplitud de las oscilaciones en el consumo de oxígeno.

En el estudio de las oscilaciones en el consumo de oxígeno en cultivos continuos de levadura bajo limitación de nutrientes, se han empleado técnicas de análisis no lineal y teoría de sistemas dinámicos para profundizar en la comprensión de estos fenómenos complejos [11, 15]. Estas herramientas matemáticas avanzadas ofrecen una perspectiva más detallada de las oscilaciones y permiten investigar la estabilidad de los puntos de equilibrio, identificar bifurcaciones y analizar la existencia de atractores caóticos o periódicos en el sistema [32, 68, 25].

Uno de los conceptos fundamentales en el análisis no lineal es la estabilidad de los puntos de equilibrio. En el contexto de las oscilaciones en el consumo de oxígeno, un punto de equilibrio representa un estado en el que no hay cambios en las concentraciones de oxígeno y nutrientes. El análisis de estabilidad busca determinar si estos puntos de equilibrio son estables, es decir, si el sistema tiende a volver a ellos después de pequeñas perturbaciones, o si son inestables y el sistema se aleja de ellos. El análisis de estabilidad se puede realizar mediante diversas técnicas, como el cálculo de los autovalores de la matriz jacobiana del sistema en el punto de equilibrio [32]. Los autovalores proporcionan información sobre la estabilidad del punto de equilibrio: si todos los autovalores tienen partes reales negativas, el punto de equilibrio es estable, mientras que si al menos uno de los autovalores tiene una parte real positiva, el punto de equilibrio es inestable.

Además de la estabilidad de los puntos de equilibrio, las técnicas de análisis no lineal también permiten identificar bifurcaciones en el sistema [25]. Una bifurcación ocurre cuando hay un cambio cualitativo en el comportamiento del sistema a medida que se modifican los parámetros o las condiciones iniciales. Por ejemplo, pueden surgir bifurcaciones de Hopf [22, 15], en las cuales el sistema pasa de un comportamiento estacionario a un comportamiento oscilatorio a medida que se varían ciertos parámetros. Estas bifurcaciones son cruciales para comprender cómo se generan las oscilaciones en el consumo de oxígeno y cómo evolucionan a medida que cambian las condiciones del cultivo.

La teoría de sistemas dinámicos también es útil para examinar la existencia de atractores caóticos o periódicos en el sistema [2, 68]. Un atractor es un conjunto de valores hacia el cual tiende el sistema a medida que evoluciona en el tiempo. En el caso de las oscilaciones en el consumo de oxígeno, se pueden presentar atractores periódicos, que representan patrones repetitivos de oscilación, o atractores caóticos, que exhiben comportamiento aparentemente aleatorio pero determinista. Estos atractores pueden ser identificados mediante técnicas como el mapeo de Poincaré [32], que consiste en observar la evolución del sistema en planos de sección transversal a ciertos puntos o trayectorias.

Para ilustrar estas ideas, consideremos un sistema hipotético de consumo de oxígeno en un cultivo microbiano. Supongamos que tenemos un modelo matemático que describe la dinámi-

ca del sistema, dado por las siguientes ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dO}{dt} = \frac{\mu \cdot O \cdot N}{K_N + N} - k \cdot O, \quad (2.2)$$

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{\mu \cdot O \cdot N}{Y \cdot (K_N + N)}, \quad (2.3)$$

donde O representa la concentración de oxígeno, N representa la concentración de nutrientes, t es el tiempo, μ es la tasa específica de crecimiento, K_N es la constante de saturación de nutrientes, k es la constante de consumo de oxígeno y Y es el rendimiento en biomasa por unidad de oxígeno consumido.

La ecuación (2.2) describe la tasa de cambio de la concentración de oxígeno. En el segundo miembro de la ecuación (2.2), el primer término modela la tasa de producción de oxígeno debido al crecimiento de los microorganismos. Esta tasa depende de la concentración de oxígeno, la concentración de nutrientes y la constante de saturación de nutrientes K_N . A medida que la concentración de nutrientes aumenta, la tasa de producción de oxígeno también aumenta, pero se satura a medida que la concentración de nutrientes se acerca a K_N . El segundo término de la ecuación (2.1) representa la tasa de consumo de oxígeno, donde k es la constante de consumo. Si la tasa de producción de oxígeno es mayor que la tasa de consumo, la concentración de oxígeno aumentará, y viceversa.

La ecuación (2.3) describe la tasa de cambio de la concentración de nutrientes. El segundo miembro de la ecuación (2.3) representa la tasa de consumo de nutrientes debido al crecimiento de los microorganismos. Esta tasa depende de la concentración de oxígeno, la concentración de nutrientes, la constante de saturación de nutrientes K_N y el rendimiento en biomasa por unidad de oxígeno consumido Y . A medida que la concentración de oxígeno aumenta, la tasa de consumo de nutrientes disminuye. El término $Y \cdot (K_N + N)$ en el denominador del segundo miembro de la ecuación (2.3) asegura que la tasa de consumo de nutrientes se reduzca a medida que la concentración de nutrientes se acerca a K_N .

Para comprender mejor las propiedades dinámicas del sistema, podemos realizar simulaciones utilizando Python [72] y sus bibliotecas científicas, como NumPy, SciPy y Matplotlib [55, 34]. A continuación se muestra un ejemplo de la evolución de las concentraciones de oxígeno y nutrientes en el tiempo, utilizando valores numéricos particulares para los parámetros del modelo (2.2)-(2.3) (Figura 2.3).

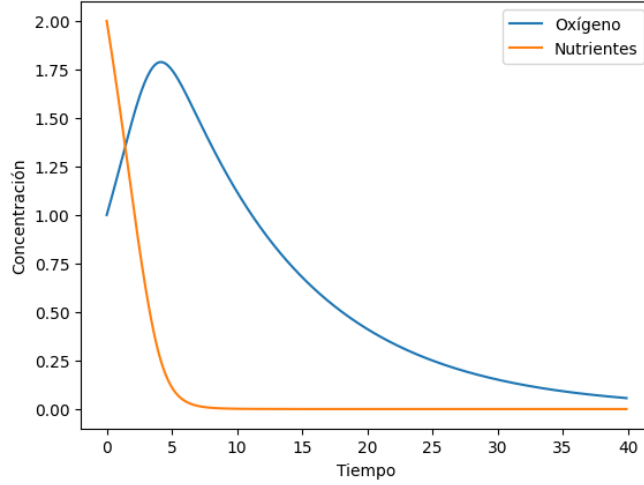


Figura 2.3: Gráfica de la evolución de las concentraciones de oxígeno y nutrientes en un sistema dinámico. Condiciones iniciales: $O_0 = 1,0$, $N_0 = 2,0$. Parámetros: $\mu = 0,5$, $K_N = 1,0$, $k = 0,1$, $Y = 0,8$.

Por otro lado, además de las simulaciones numéricas, podemos aplicar técnicas de análisis no lineal y sistemas dinámicos al modelo (2.2)-(2.3) para obtener información más detallada sobre sus propiedades cualitativas. El análisis de estabilidad del sistema de ecuaciones diferenciales nos permite examinar cómo evolucionarán las concentraciones de oxígeno y nutrientes a lo largo del tiempo. Para ello, buscamos los puntos de equilibrio del sistema, que son aquellos donde las tasas de cambio de las variables son cero, es decir, cuando $\frac{dO}{dt} = 0$ y $\frac{dN}{dt} = 0$. Además, podemos explorar la existencia de atractores caóticos o periódicos en el sistema utilizando técnicas como el mapeo de Poincaré. Este método consiste en seleccionar una sección transversal en el espacio de fase del sistema y observar cómo las trayectorias se cruzan con esa sección. Si encontramos trayectorias que no se repiten y llenan de manera densa el espacio, es posible que el sistema exhiba un comportamiento caótico. Por otro lado, si las trayectorias se agrupan en puntos o ciclos, indicaría la presencia de atractores periódicos.

Existen otros métodos que bien podrían ser empleados para abordar el problema de las oscilaciones en el consumo de oxígeno en un cultivo continuo de levadura bajo limitación de nutrientes. Uno de estos métodos es el enfoque basado en matemática discreta [53], el cual se utiliza para modelar el sistema como una serie de eventos discretos en lugar de una serie de eventos de evolución continua en el tiempo. Un método, comúnmente utilizado en este enfoque, es el modelado mediante redes de Petri [62, 13, 30]. Las redes de Petri son una representación matemática y gráfica que describe la interacción entre entidades discretas, como lugares (representando estados) y transiciones (representando eventos o cambios). En el contexto de las oscilaciones en el consumo de oxígeno, los lugares podrían representar diferentes estados metabólicos de la levadura, como la disponibilidad de nutrientes, la producción de metabolitos

y el consumo de oxígeno, mientras que las transiciones pueden representar cambios o eventos, como el suministro de nutrientes o la regulación de la expresión génica. El modelado mediante redes de Petri permite capturar la dinámica discreta y los cambios en el sistema a medida que ocurren los eventos. Se pueden definir reglas y condiciones que gobiernan la transición de un estado a otro, lo que permite estudiar cómo las oscilaciones en el consumo de oxígeno podrían surgir de las interacciones discretas entre los diferentes componentes del sistema.

Para ilustrar esto, consideremos un ejemplo sencillo, utilizando ecuaciones de redes de Petri. Supongamos que queremos modelar las oscilaciones en el consumo de oxígeno en un cultivo de levadura bajo limitación de glucosa. Podemos representar el estado del sistema con dos lugares: “Glucosa” y “Oxígeno”, y una transición llamada “Consumo de Oxígeno”. Las ecuaciones que describen este sistema podrían ser las siguientes:

$$\begin{aligned}\frac{dGlucosa}{dt} &= -k_1 \cdot Glucosa + k_2 \cdot Consumo\ de\ Oxígeno, \\ \frac{dOxígeno}{dt} &= -k_3 \cdot Oxígeno + k_4 \cdot Consumo\ de\ Oxígeno,\end{aligned}$$

donde k_1 y k_3 representan las tasas de consumo de glucosa y oxígeno, respectivamente, y k_2 y k_4 representan las tasas de producción de glucosa y oxígeno a través del consumo de oxígeno. La interpretación gráfica la anterior red de Petri se presenta en la figura 2.4.

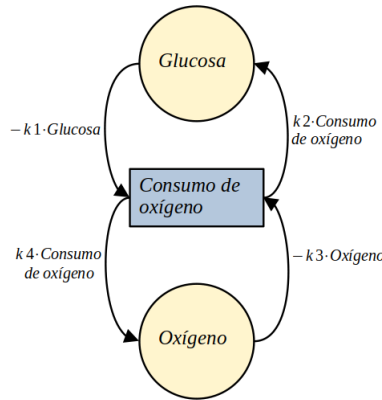


Figura 2.4: Red de Petri. La red de Petri representa el consumo de oxígeno en un cultivo de levadura bajo limitación de glucosa. Los lugares “Glucosa” y “Oxígeno” indican las cantidades disponibles de ambos compuestos. La transición “Consumo de Oxígeno” representa el proceso de consumo. Se consume glucosa y oxígeno ($-k_1 \cdot Glucosa$ y $-k_3 \cdot Oxígeno$) y se produce glucosa y oxígeno ($k_2 \cdot Consumo\ de\ Oxígeno$ y $k_4 \cdot Consumo\ de\ Oxígeno$) durante el proceso.

La red de Petri representada en la figura 2.4 describe un sistema de consumo de oxígeno en un cultivo de levadura bajo limitación de glucosa. El sistema consta de dos lugares: “Glucosa” y “Oxígeno”, que representan las cantidades de glucosa y oxígeno disponibles en el cultivo, respectivamente. La transición “Consumo de Oxígeno” modela el proceso mediante el cual la levadura consume glucosa y oxígeno. Cuando la transición “Consumo de Oxígeno” se dispara, se consumen cantidades de glucosa y oxígeno proporcionadas por los arcos con etiquetas “ $-k_1 \cdot Glucosa$ ” y “ $-k_3 \cdot Oxígeno$ ”, respectivamente. A su vez, la transición “Consumo de Oxígeno” produce glucosa y oxígeno como resultado del proceso de consumo de oxígeno, según los arcos con etiquetas “ $k_2 \cdot Consumo\ de\ Oxígeno$ ” y “ $k_4 \cdot Consumo\ de\ Oxígeno$ ”.

La red de Petri de la figura 2.4 permite modelar la dinámica del sistema de consumo de oxígeno en el cultivo de levadura, considerando la influencia de las tasas de consumo de glucosa y oxígeno, así como las tasas de producción de glucosa y oxígeno mediante el consumo de oxígeno. La simulación y el análisis de redes de Petri permiten explorar diferentes escenarios y condiciones experimentales, lo que contribuye a comprender mejor las oscilaciones en el consumo de oxígeno en un cultivo de levadura bajo limitación de nutrientes.

El uso de autómatas celulares [26, 18] se ha convertido en un método valioso para comprender los mecanismos causales de modelos biológicos. Los autómatas celulares son modelos matemáticos discretos, que nos permiten simular sistemas dinámicos, mediante la división del espacio y el tiempo en unidades discretas. En el contexto específico de las oscilaciones en el consumo de oxígeno, los autómatas celulares se podrían utilizar para representar el cultivo de levadura como una matriz bidimensional de células, donde cada célula tiene un estado que refleja su estado metabólico y su interacción con las células vecinas. En un modelo de autómatas celulares, cada célula puede representar diferentes estados metabólicos relevantes, como la presencia o ausencia de oxígeno, la concentración de nutrientes o la producción de metabolitos. Las reglas locales se definen para determinar cómo evoluciona el estado de cada célula en función del estado de sus células vecinas. Estas reglas pueden reflejar procesos biológicos o médicos como la difusión de nutrientes o drogas [44], el consumo y la producción de oxígeno, la comunicación entre células y la regulación génica. La simulación con autómatas celulares nos brinda la capacidad de observar cómo las interacciones locales entre las células pueden dar lugar a patrones emergentes y oscilaciones en el consumo de oxígeno a nivel macroscópico. Al variar los parámetros del modelo, como las tasas de difusión, las tasas de consumo y producción de oxígeno, podemos realizar experimentos virtuales y examinar cómo estos cambios afectan la dinámica del consumo de oxígeno.

Un ejemplo concreto de un modelo de autómatas celulares para el estudio de las oscilaciones en el consumo de oxígeno en cultivos de levadura podría ser el siguiente. Supongamos que representamos el cultivo de levadura en una matriz bidimensional de células, donde cada célula puede tener uno de dos estados posibles: “Oxígeno presente” o “Oxígeno ausente”. Las células interactúan con sus células vecinas y su estado evoluciona de acuerdo con ciertas reglas

locales. Podemos definir una regla que establece que una célula cambiará su estado a “Oxígeno ausente” si ninguna de sus células vecinas tiene oxígeno presente. Además, si una célula tiene al menos dos células vecinas con oxígeno presente, cambiará su estado a “Oxígeno presente”. Estas reglas pueden representar un proceso de difusión de oxígeno entre las células y reflejar la dependencia de la presencia de oxígeno en las células vecinas.

Al simular este modelo de autómatas celulares, podemos observar cómo los patrones emergentes y las oscilaciones en el consumo de oxígeno surgirían de las interacciones locales entre las células. Podríamos analizar cómo la variación de los parámetros, como las tasas de difusión del oxígeno o la densidad inicial de células con oxígeno presente, afectaría la aparición y la estabilidad de las oscilaciones.

Además del comportamiento en el consumo de oxígeno, los autómatas celulares también nos permitirían explorar otros aspectos del sistema, como la relación entre la disponibilidad de nutrientes y las oscilaciones metabólicas. Podemos extender nuestro modelo de autómatas celulares para incluir la concentración de nutrientes y su influencia en el metabolismo celular.

Supongamos que añadimos un estado adicional a nuestras células para representar la concentración de nutrientes, por ejemplo, “Bajo” y “Alto”. Ahora, las células no solo interactúan en función de su estado de oxígeno, sino también en función de su estado de nutrientes. Podemos establecer reglas que reflejen cómo la concentración de nutrientes influye en la producción y consumo de oxígeno.

Por ejemplo, podríamos definir una regla que establezca que si una célula tiene un estado de “Oxígeno presente” y “Bajo” en nutrientes, su estado de nutrientes cambiará a “Alto” y comenzará a producir oxígeno. Del mismo modo, si una célula tiene un estado de “Oxígeno ausente” y “Alto” en nutrientes, su estado de nutrientes cambiará a “Bajo” y comenzará a consumir oxígeno.

El autómata celular se representa como una matriz bidimensional de células, donde cada célula tiene un estado que puede estar en uno de los siguientes valores:

- O para indicar la ausencia de oxígeno.
- P para indicar la presencia de oxígeno.
- B para indicar un bajo nivel de nutrientes.
- H para indicar un alto nivel de nutrientes.

Definimos la matriz de células como C con tamaño $n \times m$, donde n es el número de filas y m es el número de columnas. Cada elemento de la matriz se denota como C_{ij} , que representa

el estado de la célula en la posición (i, j) .

Las reglas de evolución de las células se definen de la siguiente manera:

- Si $C_{ij} = O$ y ninguna de las células vecinas $(C_{i-1,j}, C_{i+1,j}, C_{i,j-1}, C_{i,j+1})$ tiene oxígeno presente (P), entonces C_{ij} cambia a O .
- Si $C_{ij} = O$ y al menos dos células vecinas tienen oxígeno presente (P), entonces C_{ij} cambia a P .
- Si $C_{ij} = P$ y C_{ij} tiene bajo nivel de nutrientes (B), entonces C_{ij} cambia a H y comienza a producir oxígeno.
- Si $C_{ij} = P$ y C_{ij} tiene alto nivel de nutrientes (H), entonces C_{ij} cambia a B y comienza a consumir oxígeno.

Estas reglas reflejan la difusión de oxígeno entre las células y la influencia de la concentración de nutrientes en la producción y consumo de oxígeno. Mediante la simulación de este autómata celular y la variación de los parámetros, como las tasas de difusión y las condiciones iniciales de oxígeno y nutrientes, podemos estudiar la aparición y estabilidad de las oscilaciones metabólicas en el consumo de oxígeno. Con estas nuevas reglas, podemos explorar cómo la interacción entre la disponibilidad de nutrientes y la producción/consumo de oxígeno influye en las posibles oscilaciones metabólicas. Podemos ajustar los parámetros del modelo, como la tasa de producción y consumo de oxígeno en función de la concentración de nutrientes, y observar cómo estos cambios afectan a la dinámica resultante.

En cuanto al análisis de los resultados de las simulaciones de autómatas celulares, se pueden utilizar diversas herramientas visuales para representar los patrones emergentes y las oscilaciones posiblemente observadas. Una opción es utilizar gráficas de visualización en Python [72], como Matplotlib, para mostrar la evolución temporal del consumo de oxígeno en función del tiempo simulado (Figura 2.5).

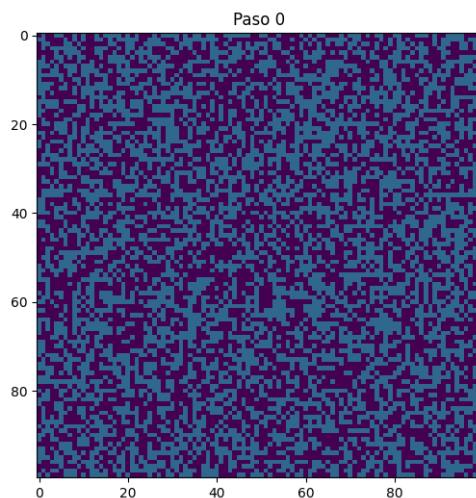


Figura 2.5: Autómata Celular. El autómata celular simula la evolución de un cultivo en una matriz bidimensional. Cada celda puede tener cuatro estados: “Ausencia de oxígeno”, “Presencia de oxígeno”, “Alto en nutrientes” y “Bajo en nutrientes”. La imagen muestra cómo los estados de las celdas cambian a lo largo del tiempo, siguiendo reglas de actualización específicas. La figura visualiza la dinámica del cultivo y su comportamiento en respuesta a las condiciones locales.

Para una comprensión más detallada de las oscilaciones y los patrones espaciales, podríamos utilizar visualizaciones bidimensionales de la matriz de células, donde cada celda se representa gráficamente con diferentes colores o símbolos según su estado metabólico y su interacción con las células vecinas. Esto nos permitiría identificar patrones espaciales emergentes y comprender mejor la dinámica del sistema.

En conclusión, los autómatas celulares podrían ser una herramienta valiosa para el estudio de las oscilaciones en el consumo de oxígeno en cultivos de levadura bajo limitación de nutrientes. Mediante la simulación y el análisis de estos modelos, podríamos obtener conocimientos fundamentales sobre los mecanismos subyacentes y explorar cómo diversos factores influyen en las oscilaciones metabólicas. Estas investigaciones nos ayudarían a comprender mejor los sistemas biológicos y a diseñar estrategias para optimizar el cultivo de levadura y otros procesos relacionados.

El modelado matemático, aplicado al problema de las oscilaciones en el consumo de oxígeno en un cultivo continuo de levadura bajo limitación de nutrientes, se basa en una variedad de enfoques y herramientas. Estos enfoques incluyen, modelos cinéticos basados en la teoría de la cinética de crecimiento microbiano, modelos de retroalimentación que capturan los efectos de retroalimentación positiva y negativa entre los componentes del sistema, técnicas de análi-

sis de estabilidad para investigar las condiciones bajo las cuales se producen las oscilaciones, técnicas de análisis no lineal y teoría de sistemas dinámicos y podrían eventualmente incluir modelos de reacción-difusión que consideran la difusión de los sustratos y productos metabólicos así como también el enfoque basado en matemática discreta utilizando redes de Petri y el uso de autómatas celulares, entre otros. Estas perspectivas proporcionan una comprensión más profunda de los mecanismos subyacentes de las oscilaciones en el consumo de oxígeno y permiten explorar cómo diferentes variables y condiciones experimentales afectan el comportamiento del sistema. Además, facilitan la predicción y el diseño de estrategias para controlar y regular las oscilaciones en el consumo de oxígeno en cultivos continuos de levadura bajo limitación de nutrientes.

2.2. El modelo

El modelamiento matemático de quimiostatos se basa en fundamentos teóricos, que permiten describir y comprender el comportamiento de los organismos en sistemas de cultivo controlados. Se utilizan ecuaciones y modelos matemáticos para representar las interacciones entre microorganismos, nutrientes y otros factores relevantes.

El principio de conservación de masa es fundamental en el modelamiento matemático de quimiostatos. Este principio establece que, la masa total de los componentes presentes en el sistema se conserva a lo largo del tiempo. Las ecuaciones de balance de masa se derivan a partir de este principio y describen cómo varían las concentraciones de los componentes en función de las tasas de crecimiento, consumo y producción. Por ejemplo, para el nutriente con concentración S y el microorganismo con concentración X , las ecuaciones de balance de masa serían:

$$\dot{X} = \text{crecimiento} - \text{salida}, \quad (2.4)$$

$$\dot{S} = \text{entrada} - \text{salida} - \text{consumo}. \quad (2.5)$$

Estas ecuaciones permiten modelar cómo varían las concentraciones de los componentes en función de las tasas de entrada, salida, consumo y crecimiento. Al resolver estas ecuaciones, se puede obtener información sobre la dinámica del sistema y cómo se afectan las concentraciones a lo largo del tiempo.

El modelo mínimo de quimiostato [29] ha sido desarrollado con el objetivo de proporcionar una descripción detallada de lo que ocurre en un cultivo de microorganismos cuando crece en un bioreactor alimentado de manera continua, manteniendo un volumen constante V y condiciones de mezcla perfecta [11]. En este sistema, todos los nutrientes necesarios para el crecimiento del cultivo se incorporan en el flujo de entrada F (volumen por unidad de tiempo), pero solo uno de ellos actúa como limitante para el crecimiento, lo que significa que su

disponibilidad controla la tasa de crecimiento de la biomasa.

El modelo se basa en dos variables de estado principales: la concentración de biomasa X y la concentración del sustrato limitante S . Estas variables representan las cantidades de biomasa presente en el cultivo y la concentración del sustrato limitante en el medio de cultivo, respectivamente. Las ecuaciones de equilibrio del modelo describen cómo estas variables cambian con el tiempo:

$$\dot{X} = (\mu - d)X, \quad (2.6)$$

$$\dot{S} = d(S_{in} - S) - \frac{\mu}{Y}X. \quad (2.7)$$

La ecuación de equilibrio (2.6) se refiere a la tasa de cambio de la concentración de biomasa X . Esta tasa de cambio está determinada por la diferencia entre la tasa de crecimiento específico μ y la tasa de dilución d del cultivo, donde $d = \frac{F}{V}$. La tasa de crecimiento específico μ es una medida de la velocidad a la cual la biomasa se acumula en el cultivo, mientras que la tasa de dilución d representa la velocidad a la cual el medio de cultivo se retira del sistema. Si la tasa de crecimiento específico es mayor que la tasa de dilución, la biomasa aumentará con el tiempo.

La ecuación de equilibrio (2.7) describe la tasa de cambio de la concentración del sustrato limitante S . Esta tasa de cambio está influenciada por varios factores. En primer lugar, la tasa de dilución d afecta la concentración del sustrato limitante, ya que el sustrato se retira del sistema a una velocidad determinada por esta tasa. Además, la entrada de sustrato limitante en el flujo de alimentación, representada por S_{in} , también influye en la concentración del sustrato limitante. Por último, la tasa de crecimiento específico μ tiene un efecto en la concentración del sustrato limitante, ya que las células en crecimiento consumen el sustrato para su metabolismo y multiplicación. El coeficiente de rendimiento de conversión de sustrato en biomasa Y indica la cantidad de biomasa producida a partir del sustrato consumido.

Las ecuaciones de equilibrio (2.6)-(2.7) permiten describir de manera matemática el comportamiento del cultivo en el quimiostato y su interacción con los nutrientes limitantes y la biomasa en crecimiento. A través de este modelo, podemos analizar cómo varían las concentraciones de biomasa y sustrato limitante en función del tiempo y los parámetros del sistema. Esto proporciona información importante sobre el crecimiento y la dinámica del cultivo en el quimiostato, lo que puede ser útil para optimizar las condiciones de cultivo y maximizar la producción de biomasa o metabolitos de interés.

2.2.1. Supuestos básicos del modelo

Un modelo matemático se funda sobre sus supuestos. La elección de los elementos que constituyen el punto de partida, es un tema central en la construcción de modelos. Este no es el

lugar para realizar una discusión detallada acerca del rol o papel que tienen los supuestos en un modelo matemático. Nos limitaremos a exponer los supuestos básicos para este modelo, sin discutir a fondo su pertinencia epistémica. Intentaremos que la pertinencia de estos, para efectos de la modelización del fenómeno de interés, resulte lo más natural posible. Trataremos, por tanto, que la justificación de estos sea exactamente lo contrario a un *tour de force*. El primero y más general de los supuestos es que no carece de valor teórico simplificar de forma radical la complejidad biológica con el objeto de obtener un dibujo simplificado de esta.

El modelo matemático se basa en el esquema de acoplamiento del ciclo metabólico - ciclo celular, propuesto por Burnetti et al.[10] descrito y representado en la Figura 1.7 del capítulo anterior.

Supondremos que las células de levadura admiten dos estados celulares, el estado de *compromiso* y el estado de *desarrollo*. Supondremos que la población de células puede segmentarse en cualquier instante en dos subpoblaciones suficientemente bien diferenciadas; la subpoblación de células que se encuentran en estado de *desarrollo* y la subpoblación de las células que se encuentran en el estado de *compromiso*. El estado de *compromiso* lo definiremos como la fase en que se encuentra una célula que se ha comprometido irremisiblemente con su progresión en el ciclo de división celular, vale decir, corresponde al estado de las células que en su mayoría responden *positivamente* al llamado a iniciar división celular y por lo tanto ya han atravesado el punto de restricción, más conocido como *Start*. A la concentración de biomasa de las células que se encuentran en este estado la denotaremos con la letra C y a la concentración de biomasa del resto de las células, o sea, las que no han pasado por el punto de restricción, y que por tanto han sido refractarias a las señales de inicio, la denotaremos con la letra D . Existe evidencia empírica de la existencia de estos estados [9] y de la importancia e interés que suscita para el estudio del YMC [46]. La comprensión del acoplamiento YMC-CDC y en particular el entendimiento de su conexión con los estados HOC y LOC podrían verse robustecidos en virtud de su consideración. De acuerdo con esto, asumimos que la relación de acoplamiento CDC-YMC y en concreto, la hipótesis de que el YMC controla el paso de las células por el *Start* [9], podría reconsiderarse sobre el trasfondo del modelo de los estados celulares de *compromiso* y *desarrollo*.

Supondremos también, que la limitación del crecimiento celular es una función bien conocida de la concentración de los nutrientes glucosa y oxígeno disuelto, de acuerdo a una cinética del tipo doble Monod [4, 50].

2.2.2. Las ecuaciones de cambio

Siguiendo el modelo mínimo de quimiostato [29], definiremos ecuaciones de equilibrio para las variables de estado concentración de células en estado de compromiso C , concentración de células en estado de desarrollo D , concentración de glucosa G y concentración de oxígeno disuelto O . Antes de eso definiremos la cinética del crecimiento celular. Supondremos que los

conjuntos de células C y D crecen de manera desigual. El ritmo del crecimiento celular para ambos grupos de células depende únicamente de las concentraciones de oxígeno y glucosa presentes en el cultivo. La velocidad de crecimiento tiene un límite que no se puede superar aunque se incremente de forma arbitraria la concentración de nutrientes. Este límite superior de la velocidad específica de crecimiento es usualmente denotado por μ_{max} . En este caso las tasas de crecimiento específico serán μ_{max} para las células en estado de desarrollo y ν_{max} para las células en estado de compromiso. Esto quiere decir que el incremento de la velocidad de crecimiento específico disminuye lentamente acercándose de forma asintótica a μ_{max} y ν_{max} respectivamente. El modelo más usual que representa este hecho es el creado por Jacques Monod [50], el año 1949, no obstante, nosotros usaremos una adaptación de este modelo para dos sustratos conocida como doble Monod [4]:

$$\mu(G, O) = \mu_{max} \left(\frac{G}{K_{G_D} + G} \right) \left(\frac{O}{K_{O_D} + O} \right), \quad (2.8)$$

donde μ_{max} es la tasa específica de crecimiento máxima para la subpoblación de células en estado de desarrollo. K_{G_D} y K_{O_D} son los valores de saturación media de la glucosa y el oxígeno disuelto asociados a las células en estado de desarrollo. De forma análoga la función de crecimiento para la subpoblación de células en estado de compromiso es:

$$\nu(G, O) = \nu_{max} \left(\frac{G}{K_{G_C} + G} \right) \left(\frac{O}{K_{O_C} + O} \right), \quad (2.9)$$

donde ν_{max} es la tasa específica de crecimiento máxima para la subpoblación de células en estado de compromiso. K_{G_C} y K_{O_C} son los valores de saturación media de la glucosa y el oxígeno disuelto asociados a las células en estado de compromiso.

Si supusiéramos que, sólo hubiesen células en estado de compromiso, entonces la tendencia a aumentar de C sólo se vería compensada por la tendencia a disminuir modulada por la tasa de dilución d :

$$\dot{C} = (\nu - d)C. \quad (2.10)$$

Sin embargo, sólo una fracción del total de las células se muestran dispuestas a iniciar el CDC. Por esta razón debemos incluir en el sistema una ecuación que represente la dinámica de la fracción de células refractarias al llamado a iniciar CDC. Si toda la población del cultivo consistiese sólo de células refractarias en estado de desarrollo D , el crecimiento de la población de células sólo se encontraría sujeto a la siguiente ecuación de cambio:

$$\dot{D} = (\mu - d)D. \quad (2.11)$$

Según la idea expuesta por Burnetti et al [10, 9] en cada YMC un grupo de células inicia de forma simultánea CDC llamando a las que se encuentran en una zona de desarrollo próximo al punto de restricción Start a comprometerse con el CDC junto a ellas. En consecuencia una fracción a de células en desarrollo responden positivamente al llamado a iniciar CDC. Las ecuaciones de cambio para las concentraciones de células C y D que representan este hecho son:

$$\dot{C} = (\nu D - d)C, \quad (2.12)$$

$$\dot{D} = (\mu - aC - d)D. \quad (2.13)$$

A fin de modelar la concentración de la glucosa se debe tener en cuenta que su ecuación de cambio, debe poseer dos términos principales que interactúan entre sí. El primero sería $(G_{in} - G)d$ y representa la diferencia entre las concentraciones de glucosa entrante G_{in} y saliente G a una tasa de dilución d . El segundo término sería $-\frac{\mu}{Y_{GD}}D - \frac{\nu}{Y_{GC}}C$ y representaría, en términos generales, el ritmo al cual las células consumen glucosa según sus respectivas tasas de crecimiento y según su rendimiento o eficiencia en la conversión masa de glucosa en biomasa:

$$\dot{G} = (G_{in} - G)d - \frac{\mu}{Y_{GD}}D - \frac{\nu}{Y_{GC}}C. \quad (2.14)$$

Finalmente, para la ecuación de cambio del oxígeno disuelto en el cultivo, debemos mencionar algunos supuestos importantes. En el modelo no consideraremos explícitamente el papel que desempeña al interior de la vasija el oxígeno presente en el espacio gaseoso. Tampoco consideraremos de forma explícita el oxígeno disuelto que abandona el cultivo en el efluente, ni consideraremos el oxígeno disuelto en el medio fresco que entra al bioreactor. Tampoco tomaremos por separado el oxígeno que entra en forma de aire al sistema. Sólo consideraremos el efecto final que podrían producir estos factores. Para efectos de este modelo la concentración de oxígeno disuelto en el medio líquido siempre tiende a un nivel de saturación máximo y la velocidad con la que este varía depende sólo de su velocidad de transferencia de masa al medio líquido. Para representar en tales términos la dinámica de la concentración de oxígeno disuelto usaremos el modelo de la diferencia entre la velocidad con la que el oxígeno se disuelve en el medio líquido y la velocidad con la que este es consumido por las células, esto es, la diferencia entre la tasa de transferencia del oxígeno (OTR) y la tasa de consumo del oxígeno disuelto (OUR) [10]:

$$\dot{O} = \text{OTR} - \text{OUR}.$$

La OTR está compuesta por la concentración de saturación del oxígeno en el medio líquido O^* , esto es, la concentración del oxígeno disuelto al cual el sistema se acerca; por la concentración del oxígeno disuelto en un instante cualquiera O y por el coeficiente de transferencia de masa del oxígeno k . $k(O^* - O)$ representa el ritmo al que varía la concentración del oxígeno disuelto en el medio. La tasa de consumo de oxígeno es $-(\frac{\mu}{Y_{OD}}D + \frac{\nu}{Y_{OC}}C)$ y representa el ritmo

al cual las células consumen oxígeno disuelto según su velocidad de crecimiento, modulado por el rendimiento de conversión en biomasa del oxígeno disuelto.

Resumiendo, las ecuaciones de cambio de nuestra propuesta para un modelo matemático de oscilaciones en el consumo de oxígeno en un cultivo continuo de levadura en condiciones de limitación de nutrientes, viene dado por:

$$\dot{C} = (\nu D - d)C, \quad (2.15)$$

$$\dot{D} = (\mu - aC - d)D, \quad (2.16)$$

$$\dot{G} = (G_{in} - G)d - \left(\frac{\mu}{Y_{G_D}}D + \frac{\nu}{Y_{G_C}}C\right), \quad (2.17)$$

$$\dot{O} = k(O^* - O) - \left(\frac{\mu}{Y_{O_D}}D + \frac{\nu}{Y_{O_C}}C\right). \quad (2.18)$$

2.3. Fundamentos de simulación numérica

2.3.1. Campos de vectores

El campo de vectores asociado al modelo mínimo de quimiostato [29] se refiere a la representación gráfica de las ecuaciones diferenciales en el espacio de las variables de estado, en este caso, la concentración de biomasa X y la concentración del sustrato limitante S . Para visualizar el campo de vectores [22, 32], se asigna un vector a cada punto del espacio de las variables de estado, donde la dirección y la magnitud del vector representan la tasa de cambio de X y S en ese punto. Es decir, en cada punto (X, S) se traza un vector que indica hacia dónde y con qué velocidad cambiarían las concentraciones de biomasa y sustrato. Usando las ecuaciones de equilibrio del modelo mínimo de quimiostato:

$$\dot{X} = (\mu - d)X, \quad (2.19)$$

$$\dot{S} = d(S_{in} - S) - \frac{\mu}{Y}X. \quad (2.20)$$

Podemos obtener las derivadas \dot{X} y \dot{S} en términos de X y S . El campo de vectores se construye trazando estos vectores en el espacio (X, S) . Para hacerlo, se eligen una serie de puntos en el espacio (X, S) y se calcula el vector correspondiente a cada punto utilizando las ecuaciones diferenciales. Por ejemplo, para un punto (X_1, S_1) , se calcula \dot{X}_1 y \dot{S}_1 usando las ecuaciones (1) y (2). Luego, se traza un vector desde el punto (X_1, S_1) en la dirección determinada por \dot{X}_1 y \dot{S}_1 , y con una longitud proporcional a la magnitud de estas derivadas. Este proceso se repite para varios puntos en el espacio de las variables de estado, lo que resulta en una serie de vectores que representan el campo de vectores asociado al modelo. La densidad de los vectores y su longitud relativa se pueden ajustar para mejorar la visualización y comprensión del campo de vectores [48]. El campo de vectores proporciona información visual

sobre las trayectorias de las soluciones del sistema de ecuaciones diferenciales. Por ejemplo, muestra cómo las concentraciones de biomasa y sustrato cambiarían en función de las condiciones iniciales y los parámetros del sistema. También revela la existencia de puntos fijos o de equilibrio, donde las derivadas son cero y los vectores apuntan hacia estos puntos. Analizando el campo de vectores, se pueden identificar características importantes del sistema, como puntos fijos, trayectorias estables o inestables, y regiones donde las concentraciones pueden crecer o disminuir. Estas observaciones cualitativas del campo de vectores pueden ayudar a comprender el comportamiento dinámico del modelo mínimo de quimiostato y proporcionar información sobre el crecimiento y la interacción de la biomasa y el sustrato en el sistema.

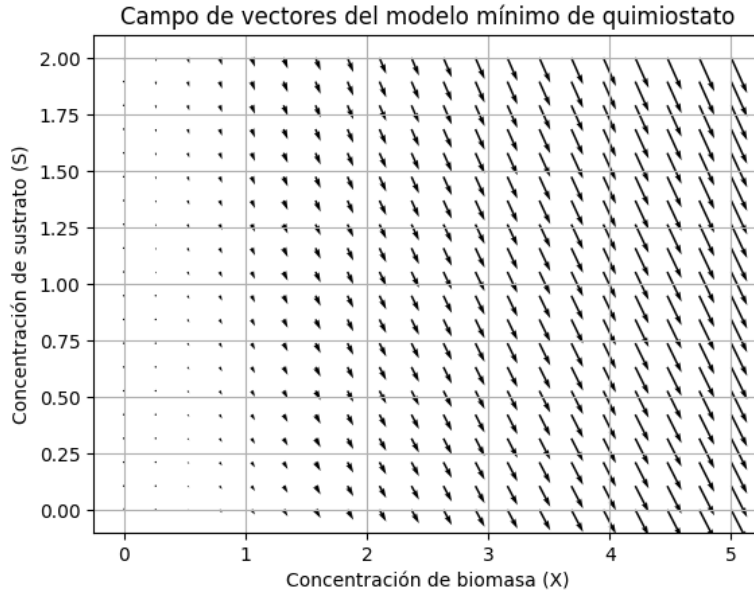


Figura 2.6: Campo de vectores del modelo mínimo. La dirección, el sentido y la magnitud de las flechas indican que el aumento en la concentración de biomasa X , implica una disminución de la concentración de sustrato limitante S .

La gráfica de la figura 2.6 muestra el campo de vectores asociado al modelo mínimo de quimiostato. En el eje x se representa la concentración de biomasa X y en el eje y se representa la concentración de sustrato limitante S . Cada flecha en el gráfico representa un vector que indica la dirección y magnitud de las derivadas \dot{X} y \dot{S} en cada punto del espacio de variables. El campo de vectores proporciona información visual sobre cómo cambian las concentraciones de biomasa y sustrato en función de sus valores iniciales y los parámetros del sistema. La dirección del vector indica el sentido en el cual las concentraciones están cambiando, mientras que la longitud del vector representa la velocidad o tasa de cambio en ese punto. En la gráfica, las flechas más largas indican una mayor velocidad de cambio de las concentraciones, mientras

que las flechas más cortas representan una tasa de cambio más lenta. Además, la orientación de las flechas muestra la dirección del cambio: hacia arriba o hacia abajo en el eje x indica un aumento o disminución de la concentración de biomasa, respectivamente, mientras que hacia la derecha o hacia la izquierda en el eje y indica un aumento o disminución de la concentración de sustrato, respectivamente.

El campo de vectores puede ayudar a identificar características importantes del sistema, como puntos fijos o de equilibrio, trayectorias estables o inestables, y regiones donde las concentraciones pueden aumentar o disminuir. Esto permite comprender mejor el comportamiento dinámico del modelo y obtener información cualitativa sobre la interacción entre la biomasa y el sustrato en el sistema de cultivo. En resumen, la gráfica del campo de vectores brinda una representación visual del modelo mínimo de quimiostato, mostrando cómo las concentraciones de biomasa y sustrato cambian en función de sus valores iniciales y los parámetros del sistema.

2.3.2. Diagramas de fase

Un diagrama de fases asociado al modelo mínimo de quimiostato es una representación gráfica que muestra las posibles trayectorias y estados de equilibrio del sistema en el espacio de las variables de estado, es decir, la concentración de biomasa X y la concentración de sustrato limitante S [32, 22, 48]. Para construir el diagrama de fases, se considera el comportamiento de las soluciones del sistema de ecuaciones diferenciales a lo largo del tiempo. Se exploran las diferentes combinaciones de concentraciones de biomasa y sustrato iniciales, y se estudia cómo evolucionan estas concentraciones en el tiempo. Las trayectorias en el diagrama de fases representan las soluciones del sistema de ecuaciones diferenciales y muestran cómo las concentraciones de biomasa y sustrato cambian a medida que el tiempo avanza. Cada punto en una trayectoria corresponde a un estado del sistema en un momento específico. La forma de las trayectorias proporciona información sobre las dinámicas y los patrones de comportamiento del sistema. Los puntos fijos o de equilibrio son estados estables en los que las concentraciones de biomasa y sustrato no cambian con el tiempo. Estos puntos se pueden identificar en el diagrama de fases como puntos en los que las trayectorias convergen o donde las derivadas \dot{X} y \dot{S} son cero. Los puntos fijos pueden ser atractores, lo que significa que las soluciones cercanas a ellos convergerán hacia ellos en el tiempo, o pueden ser repulsores, donde las soluciones cercanas se alejarán de ellos. Además de las trayectorias y los puntos fijos, el diagrama de fases también puede incluir regiones que representan diferentes comportamientos del sistema. Por ejemplo, puede haber regiones donde las concentraciones de biomasa y sustrato crecen indefinidamente, regiones donde las concentraciones disminuyen hacia cero o regiones donde las concentraciones oscilan periódicamente. El análisis del diagrama de fases permite comprender el comportamiento global del sistema y cómo diferentes parámetros o condiciones iniciales pueden influir en las trayectorias y los estados de equilibrio. También ayuda a identificar transiciones cualitativas, como bifurcaciones o cambios en las dinámicas del sistema.

En resumen, el diagrama de fases asociado al modelo mínimo de quimiostato proporciona una representación visual de las posibles trayectorias y estados de equilibrio del sistema en el espacio de las variables de estado. Permite analizar y comprender el comportamiento dinámico del sistema, incluyendo la existencia de puntos fijos, las dinámicas de las trayectorias y las regiones de comportamiento específicas (Figura 2.7).

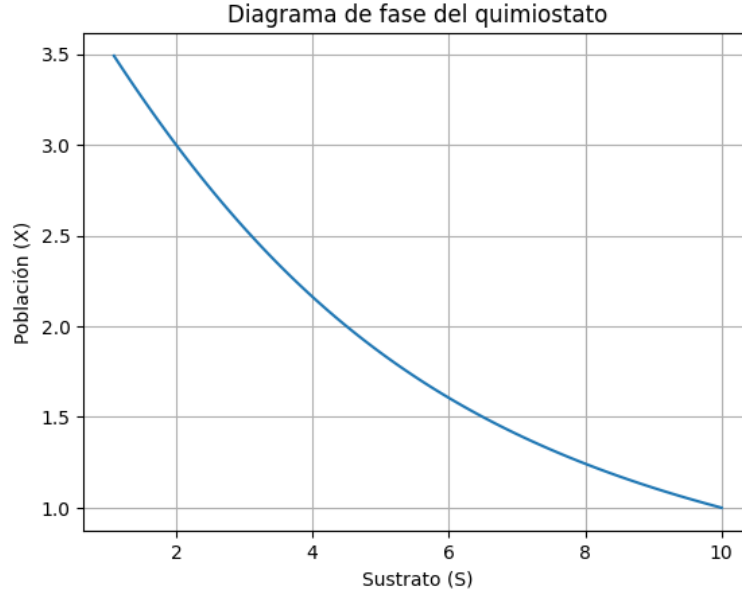


Figura 2.7: Diagrama de fases del modelo mínimo. El diagrama de fases de X y S muestra que a medida que aumenta la población X disminuye la concentración de sustrato S .

2.3.3. Diagramas de bifurcación

Un diagrama de bifurcación asociado al modelo mínimo de quimiostato es una representación gráfica que muestra cómo cambian las soluciones del sistema en respuesta a cambios en los parámetros del modelo. En particular, se enfoca en identificar y visualizar las bifurcaciones, que son cambios cualitativos en las dinámicas del sistema a medida que los parámetros varían [32, 22, 48]. En el contexto del modelo mínimo de quimiostato, los parámetros relevantes pueden ser la tasa de crecimiento específico μ , la tasa de dilución d , la concentración de sustrato en la entrada S_{in} , el rendimiento de biomasa respecto al sustrato Y , entre otros. Al modificar estos parámetros, se pueden observar cambios significativos en las trayectorias y los estados de equilibrio del sistema. El diagrama de bifurcación muestra cómo las soluciones del sistema varían en función de un parámetro específico, mientras se mantienen los demás parámetros constantes. Para construir el diagrama, se elige un parámetro como el eje x y se grafican

las soluciones correspondientes en el espacio de las variables de estado (por ejemplo, X y S) en el eje y . El diagrama de bifurcación puede revelar diferentes tipos de bifurcaciones, como bifurcaciones de equilibrio, bifurcaciones de Hopf, bifurcaciones transcriticals, bifurcaciones de silla-nodo, entre otras. Cada tipo de bifurcación está asociado con cambios específicos en el comportamiento del sistema. Por ejemplo, una bifurcación de equilibrio puede ocurrir cuando un punto de equilibrio cambia de estabilidad. En el diagrama de bifurcación, se observaría una rama estable y una rama inestable que se encuentran en un punto crítico llamado punto de bifurcación. Una bifurcación de Hopf puede ocurrir cuando una solución periódica emerge a partir de un punto de equilibrio estable a medida que un parámetro varía. En el diagrama de bifurcación, se verían regiones donde las trayectorias del sistema son periódicas.

En general, el diagrama de bifurcación proporciona una representación visual de cómo el comportamiento del sistema cambia cualitativamente a medida que los parámetros se modifican. Permite identificar puntos críticos, puntos de bifurcación y transiciones entre diferentes regímenes dinámicos. También es una herramienta útil para comprender la estabilidad, las oscilaciones y otras características emergentes del modelo mínimo de quimiostato en función de sus parámetros (Figura 2.8):

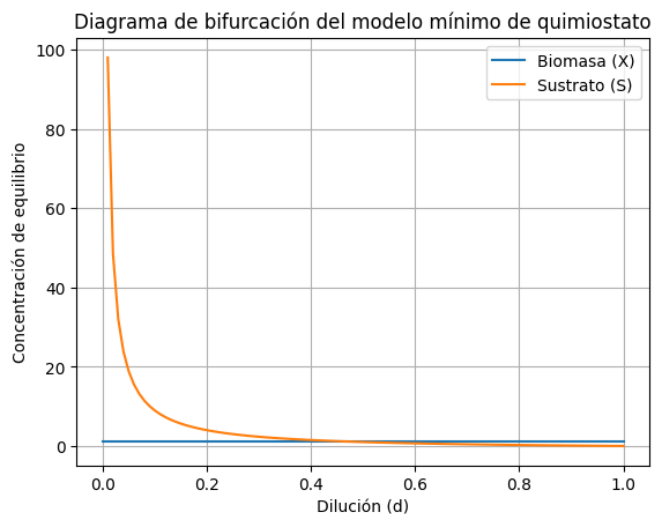


Figura 2.8: Diagrama de bifurcación del modelo mínimo. El diagrama de bifurcación del modelo mínimo muestra como las concentraciones de equilibrio de X y S varían en función de la variación del parámetro de dilución d . Cuando d crece observa que la concentración de equilibrio para S disminuye.

2.3.4. Diagrama de retorno

Un diagrama de retorno, también conocido como diagrama de retardo o diagrama de tiempo retrasado o gráfica de Poincaré [22] es una herramienta que se utiliza para visualizar la relación entre una variable de interés y su propio valor en un instante anterior o posterior en el tiempo. En el contexto del modelo mínimo de quimiostato, podemos construir un diagrama de retorno para la variable de interés, ya sea la concentración de biomasa X o la concentración de sustrato S . Para ilustrar esto, consideremos el caso de construir un diagrama de retorno para la concentración de biomasa X adelantada una unidad de tiempo. Las ecuaciones diferenciales del modelo mínimo de quimiostato son:

$$\dot{X} = (\mu - d)X, \quad (2.21)$$

$$\dot{S} = d(S_{\text{in}} - S) - \frac{\mu}{Y}X. \quad (2.22)$$

Si queremos construir un diagrama de retorno para X adelantada una unidad de tiempo, podríamos utilizar la siguiente relación:

$$X(t+1) = X(t) + \Delta t \cdot \dot{X}(t). \quad (2.23)$$

donde $X(t+1)$ representa el valor de X en el tiempo $t+1$, $X(t)$ representa el valor de X en el tiempo t , Δt es el paso de tiempo y $\dot{X}(t)$ es la tasa de cambio de X en el tiempo t . Para construir el diagrama de retorno, podemos seguir estos pasos:

1. Inicializar un arreglo vacío para almacenar los valores de X en diferentes instantes de tiempo.
2. Elegir un valor inicial para X , por ejemplo, $X_0 = 1,0$.
3. Para cada instante de tiempo t , calcular el valor de X adelantado una unidad de tiempo utilizando la relación mencionada anteriormente.
4. Almacenar el valor calculado de X en el arreglo.
5. Repetir los pasos 3 y 4 para diferentes instantes de tiempo.

Una vez que se hayan calculado los valores de X para diferentes instantes de tiempo, se pueden graficar en un diagrama de retorno, donde el eje x representa el valor actual de X y el eje y representa el valor de X adelantado una unidad de tiempo. El diagrama de retorno puede revelar patrones y comportamientos interesantes en la dinámica del sistema. Por ejemplo, se pueden observar perturbaciones, ciclos límite, atracciones hacia puntos fijos o comportamientos caóticos según la relación entre los valores actuales y futuros de la variable

de interés. Es importante tener en cuenta que el paso de tiempo Δt utilizado en el cálculo de X adelantado una unidad de tiempo puede influir en la precisión y la apariencia del diagrama de retorno. Un paso de tiempo demasiado grande puede ocultar detalles finos en el comportamiento dinámico del sistema, mientras que un paso de tiempo demasiado pequeño puede llevar a un mayor costo computacional. En resumen, un diagrama de retorno es una herramienta útil para explorar la relación entre una variable de interés y su valor adelantado o atrasado en el tiempo. En el contexto del modelo mínimo de quimiostato, podemos utilizar un diagrama de retorno para analizar la dinámica de la concentración de biomasa o sustrato en función de sus valores en instantes de tiempo anteriores o posteriores (Figura 2.9).

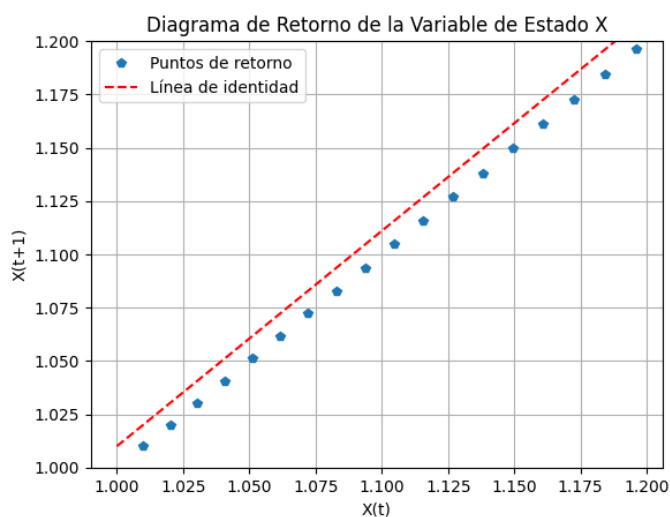


Figura 2.9: Diagrama de retorno. El alineamiento parejo a la línea de identidad y la regularidad en la distancia entre los puntos, indica un posible comportamiento periódico de X .

2.3.5. Soluciones numéricas

El método de Adams-Bashforth-Moulton [14] es un método numérico utilizado para aproximar las soluciones de ecuaciones diferenciales ordinarias. Es especialmente útil para resolver ecuaciones diferenciales que no tienen soluciones analíticas exactas o cuando no es factible encontrarlas. En el contexto del modelo mínimo de quimiostato, las ecuaciones diferenciales que describen la dinámica de las variables de estado (concentración de biomasa X y concentración de sustrato S) son:

$$\dot{X} = (\mu - d)X, \quad (2.24)$$

$$\dot{S} = d(S_{in} - S) - \frac{\mu}{Y}X. \quad (2.25)$$

El objetivo es encontrar las soluciones numéricas de estas ecuaciones diferenciales utilizando el método de Adams-Bashforth-Moulton. El método se basa en la aproximación de la derivada de la variable de estado utilizando diferencias finitas hacia atrás y hacia adelante en el tiempo. El método de Adams-Bashforth-Moulton se aplica en pasos de tiempo discretos. Dado un paso de tiempo h , las soluciones numéricas se calculan de la siguiente manera:

- Inicialización: Se conocen los valores iniciales de las variables de estado, es decir, X_0 y S_0 .
- Paso de Adams-Bashforth: Utilizando el método de Adams-Bashforth, se calcula una aproximación de las variables de estado en el siguiente paso de tiempo (t_{i+1}). Para hacer esto, se utiliza la información de los pasos de tiempo anteriores (t_i, t_{i-1}, \dots) y las aproximaciones previas de las variables de estado. Por ejemplo, para X , la aproximación en el siguiente paso de tiempo se calcula como:

$$X_{i+1}^{(AB)} = X_i + \frac{h}{2} (3(\mu_i - d_i)X_i - (\mu_{i-1} - d_{i-1})X_{i-1}). \quad (2.26)$$

- Paso de Adams-Moulton: Utilizando el método de Adams-Moulton, se mejora la aproximación obtenida en el paso anterior. Para esto, se utiliza la información adicional del paso de tiempo actual (t_{i+1}) y se corrige la aproximación de las variables de estado. Por ejemplo, para X , la corrección en el siguiente paso de tiempo se calcula como:

$$X_{i+1} = X_i + \frac{h}{2} ((\mu_{i+1} - d_{i+1})X_{i+1}^{(AB)} + (\mu_i - d_i)X_i). \quad (2.27)$$

- Repetir los pasos 2 y 3 para avanzar en el tiempo hasta alcanzar el instante final deseado.

Es importante destacar que el método de Adams-Bashforth-Moulton requiere conocer los valores de las tasas de crecimiento específico μ y las tasas de dilución d en cada paso de tiempo. Estos valores pueden ser constantes o depender de otras variables o condiciones del

sistema. Además, la elección del paso de tiempo h influye en la precisión y estabilidad del método, siendo necesario encontrar una elección adecuada para obtener resultados precisos y estables.

El método de Adams-Bashforth-Moulton es un método de paso múltiple, lo que significa que utiliza información de múltiples pasos anteriores para calcular las soluciones numéricas en cada paso de tiempo. Esto proporciona una aproximación más precisa en comparación con los métodos de paso único, como el método de Euler. Al aplicar el método de Adams-Bashforth-Moulton a las ecuaciones diferenciales del modelo mínimo de quimiostato, se obtendrán soluciones numéricas que representan la evolución de las variables de estado (concentración de biomasa y concentración de sustrato) en el tiempo. Estas soluciones permiten visualizar cómo varían las variables en función del tiempo y pueden proporcionar información sobre el comportamiento del sistema. Es importante destacar que las soluciones numéricas obtenidas mediante el método de Adams-Bashforth-Moulton son aproximaciones y no representan las soluciones exactas de las ecuaciones diferenciales. La precisión de las soluciones dependerá de la elección adecuada de los parámetros del método, como el paso de tiempo y el orden del método utilizado. Además, es fundamental tener en cuenta las condiciones iniciales y los valores de los parámetros del sistema al aplicar el método de Adams-Bashforth-Moulton. Pequeñas variaciones en estos valores pueden tener un impacto significativo en las soluciones numéricas obtenidas (Figura 2.10).

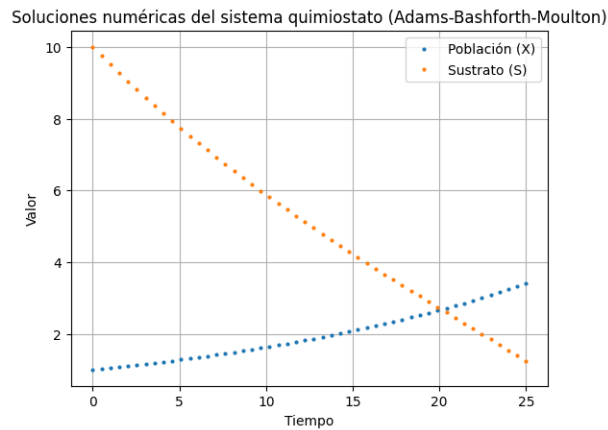


Figura 2.10: Soluciones numéricas. La gráfica muestra la evolución de la población microbiana X y la concentración de sustrato S a lo largo del tiempo. Se utilizan pasos de predicción y corrección para obtener las soluciones numéricas con el método Adams-Bashforth-Moulton, que se representan como puntos en la gráfica. Esto nos permite visualizar cómo cambian X y S en función del tiempo y comprender mejor la dinámica del sistema quimiostato.

2.3.6. Optimización de parámetros

Tras un detallado estudio de la variación de parámetros y el análisis de los diagramas de fase para identificar patrones oscilatorios en el sistema dinámico en cuestión, se da paso a una etapa crucial: la optimización de los parámetros. Para abordar este desafío, se utilizará el método de algoritmos genéticos, una poderosa técnica inspirada en la evolución biológica que permite encontrar conjuntos óptimos de parámetros para maximizar la probabilidad de producir oscilaciones en la variable de interés. Los algoritmos genéticos aplican principios de selección natural, cruce y mutación para buscar soluciones óptimas en espacios de búsqueda complejos y multidimensionales. Esta metodología ha demostrado su eficacia en una amplia gama de problemas de optimización y se espera que proporcione una herramienta poderosa para la optimización de parámetros en el presente estudio.

Algoritmos genéticos

Los algoritmos genéticos son métodos computacionales de búsqueda y optimización basados en los principios de la evolución biológica y la genética [23]. Son utilizados para resolver problemas complejos que involucran la optimización de una función objetivo, la selección de conjuntos de parámetros o la exploración de espacios de búsqueda amplios.[33] Estos algoritmos se inspiran en la teoría de la evolución de Charles Darwin y en los mecanismos genéticos de herencia y selección natural.

Un algoritmo genético simula la evolución de una población de soluciones candidatas a lo largo de múltiples generaciones. Cada solución candidata, también conocida como individuo, está representada por un conjunto de genes o cromosomas, que codifican la información necesaria para definir una solución al problema en cuestión. Estos genes pueden ser tratados como valores numéricos, cadenas de bits u otras representaciones según el tipo de problema.

Durante el proceso evolutivo, los algoritmos genéticos aplican operadores genéticos como la selección, el cruce (*crossover*) y la mutación para generar nuevas soluciones en cada generación. La selección favorece a los individuos más aptos, es decir, aquellos que presentan una mejor calidad o valor objetivo. El cruce combina los genes de dos individuos para crear descendientes con características heredadas de sus padres. La mutación introduce cambios aleatorios en los genes de los individuos para fomentar la exploración del espacio de búsqueda.

A medida que progresa el algoritmo, la población evoluciona y converge hacia soluciones más óptimas en términos de la función objetivo. Esto se logra mediante la reproducción diferencial de los individuos, donde los mejores individuos tienen una mayor probabilidad de ser seleccionados como padres y transmitir sus características favorables a las generaciones futuras. La evolución se repite durante un número predeterminado de generaciones o hasta que se cumpla un criterio de convergencia.

Los algoritmos genéticos han demostrado su eficacia en una amplia gama de problemas complejos, como la optimización de funciones matemáticas, el diseño de circuitos, la planificación de tareas, la optimización de rutas, entre otros [33]. Además, ofrecen ventajas en términos de robustez, capacidad de exploración y capacidad para encontrar soluciones cercanas al óptimo global en problemas multidimensionales o con múltiples óptimos locales.

En la implementación específica de este algoritmo genético, se utilizaron las siguientes librerías y funciones específicas:

- Random: Se utilizó para generar números aleatorios en la generación de la población inicial y en la mutación de los individuos.
- Numpy: Se empleó para realizar cálculos numéricos, como la creación de un vector de tiempo y la manipulación de matrices.
- Scipy.integrate.odeint: Se importó la función `odeint` de la sublibrería `Integrate` de Scipy. Esta función fue utilizada para resolver el sistema de ecuaciones diferenciales.

A continuación describimos el proceso de implementación del algoritmo genético en Python [72], adaptado para la optimización de parámetros de nuestro modelo:

1. Definición de la función de aptitud (*fitness*): Se usan las ecuaciones de nuestro modelo y los valores iniciales de sus parámetros para definir una función que evalúa la probabilidad de oscilación en la variable O . Los parámetros del sistema son pasados como entrada a esta función.
2. Inicialización de la población (*init_population*): Se definieron los rangos dentro de los cuales se generarán los individuos de la población inicial. Cada individuo representa un conjunto de parámetros aleatorios dentro de estos rangos.
3. Selección de padres (*select_parents*): Se utilizó la función de aptitud para evaluar la calidad de cada individuo en la población actual. Los individuos con mayor aptitud tienen una mayor probabilidad de ser seleccionados como padres para la siguiente generación. La información entregada por el sistema dinámico y los valores iniciales de los parámetros influyen en la evaluación de la aptitud de cada individuo.
4. Cruce de padres (*crossover*): Se utilizaron las combinaciones de valores de los parámetros heredados de los padres para generar dos descendientes.
5. Mutación de individuos (*mutate*): Se introdujeron cambios aleatorios en los valores de los parámetros de un individuo. Los valores iniciales de los parámetros del sistema y la información que entrega el sistema dinámico definen los rangos permitidos para la mutación.

6. Optimización de parámetros (*optimize_parameters*): Se usó la función de aptitud para evaluar la calidad de cada individuo en cada generación. El objetivo es encontrar el conjunto de parámetros que maximice la probabilidad de oscilación en la variable O del sistema, utilizando la información entregada por el sistema dinámico y los valores iniciales de los parámetros.
7. Obtención de los parámetros óptimos: Al finalizar la ejecución del algoritmo genético, se devuelve el individuo con la mejor aptitud encontrado durante todas las generaciones, es decir, el conjunto de parámetros óptimos. Estos parámetros se imprimen en la pantalla para su visualización.

En resumen, el proceso inicia con la fase de inicialización en la que se definen y asignan valores a los parámetros iniciales. A continuación, se procede a la evaluación de individuos en la población mediante la función de aptitud. La decisión sobre la mejor aptitud condiciona la selección de individuos para el cruce. Durante la fase de cruce, se generan descendientes combinando los valores de los parámetros de los padres seleccionados. Posteriormente, se lleva a cabo la fase de reemplazo, donde los nuevos individuos reemplazan a los antiguos en la población. Este ciclo se repite hasta que se cumple la condición de finalización, momento en el cual se obtienen los parámetros óptimos y concluye el algoritmo. Por lo tanto, en este caso particular, la implementación específica del algoritmo genético consistió en definir funciones para calcular la aptitud de los individuos, inicializar la población, seleccionar padres, realizar el cruce y la mutación, y encontrar los parámetros óptimos mediante la optimización de la aptitud a lo largo de múltiples generaciones. Los rangos de los parámetros y los valores específicos del algoritmo genético fueron configurados previamente. Al final del proceso, se obtuvieron los parámetros óptimos que maximizaron la probabilidad de oscilación en el parámetro O . A continuación se puede ver un diagrama de flujo del proceso de depuración de parámetros:

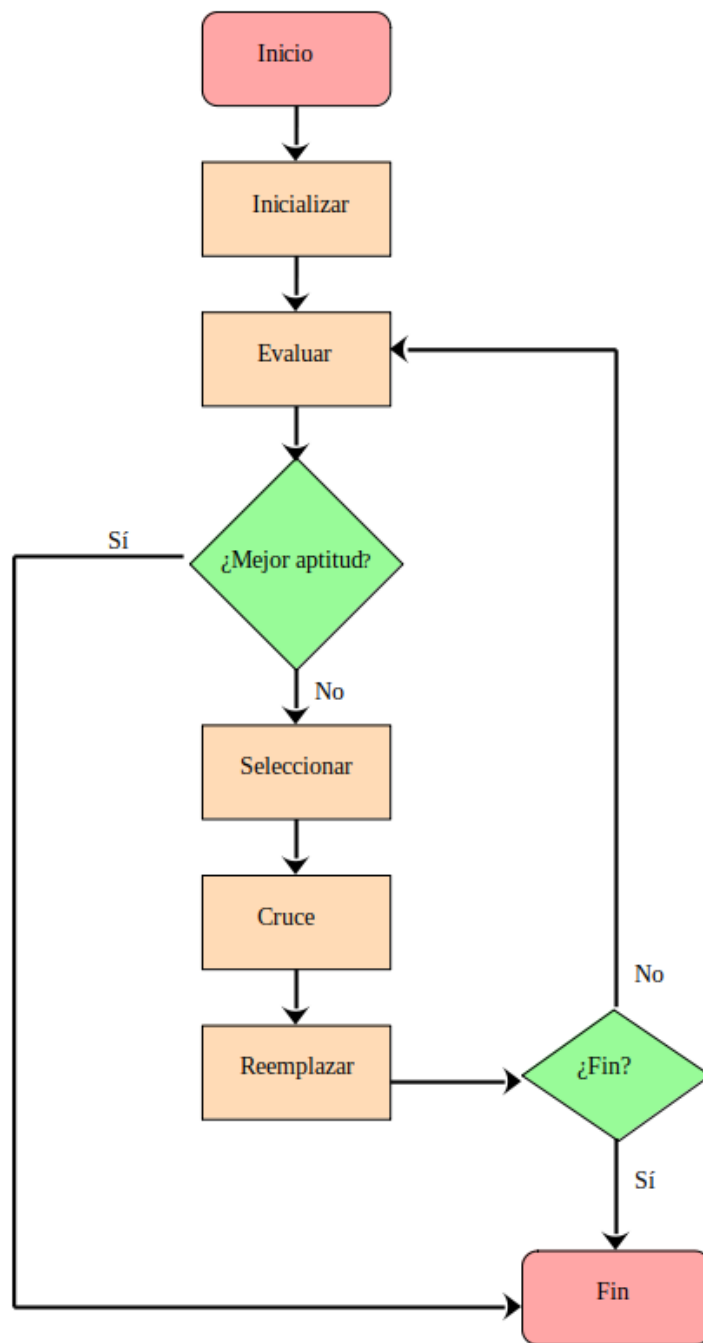


Figura 2.11: Diagrama de flujo del algoritmo genético que fue usado en la depuración de los parámetros de nuestro modelo.

2.3.7. Concordancia con los datos experimentales

En esta etapa del estudio, se llevó a cabo un ajuste de curva utilizando un algoritmo de minimización del error cuadrático medio en relación a la curva de datos experimentales. Este proceso tiene como objetivo encontrar una mejor correspondencia entre la curva teórica generada por el modelo equipado de los parámetros generados y los datos experimentales obtenidos de la literatura [10, 9].

Para realizar el ajuste de curva, se utilizaron técnicas de optimización numérica que permitieron ajustar los parámetros y coeficientes del modelo para minimizar la diferencia cuadrática entre la curva teórica y los datos experimentales [61]. Esto se realizó mediante la comparación de los valores calculados por el modelo con los datos experimentales, ajustando los parámetros del modelo de manera iterativa hasta alcanzar el mejor ajuste posible.

El algoritmo de minimización del error cuadrático medio buscó los valores óptimos de los parámetros y coeficientes del modelo que minimicen la diferencia entre la curva teórica y los datos experimentales. Esto permitiría obtener una curva ajustada que se acerque lo más posible a los datos reales, lo cual proporcionaría una representación más precisa del comportamiento del sistema.

Es importante destacar que el ajuste de curva se realizó en conjunto con las simulaciones numéricas y la optimización previamente descritas. El ajuste de curva permitiría mejorar aún más, la concordancia entre el modelo y los datos experimentales, proporcionando una validación adicional al estudio y una mejor adaptación del modelo a las oscilaciones en el consumo de oxígeno observadas en un cultivo continuo de levadura en condiciones de limitación de nutrientes.

Ajuste de curva

El ajuste de curva a datos experimentales es un proceso fundamental en la ciencia y la ingeniería que busca encontrar una función matemática que se ajuste de manera óptima a un conjunto de datos obtenidos mediante experimentos. Este proceso es de gran importancia para extraer información significativa de los datos y comprender la relación entre las variables involucradas en el fenómeno estudiado. Los aspectos matemáticos involucrados en el ajuste de curva se basan en la minimización de la diferencia entre los valores predichos por el modelo y los datos experimentales [61].

Una técnica comúnmente utilizada en el ajuste de curva es el método de mínimos cuadrados. Este método se basa en minimizar la suma de los errores al cuadrado entre los valores observados y los valores predichos por el modelo. Dado un conjunto de datos experimentales $(x_i, y_i)_{i=1}^n$, donde x_i es la variable independiente y y_i es la variable dependiente, se busca

encontrar los parámetros y coeficientes de un modelo matemático $f(x; \theta)$ que minimicen la siguiente función objetivo:

$$S(\theta) = \sum_{i=1}^n (y_i - f(x_i; \theta))^2,$$

donde θ representa los parámetros y coeficientes del modelo que se ajustan a los datos. La minimización de $S(\theta)$ se puede lograr mediante técnicas de optimización numérica que buscan encontrar los valores óptimos de θ que minimicen la diferencia cuadrática entre la curva teórica y los datos experimentales.

Existen diferentes enfoques para realizar el ajuste de curva, como el ajuste lineal, el ajuste polinomial, el ajuste de curvas no lineales, entre otros [6]. Cada enfoque tiene sus propias características y suposiciones, y la elección del método adecuado depende del problema específico y de las características de los datos experimentales.

El ajuste de curvas no lineales puede presentar desafíos adicionales en comparación con el ajuste lineal, ya que las soluciones pueden no ser únicas y el proceso de optimización puede requerir inicializaciones adecuadas y consideraciones adicionales. Por lo tanto, es importante contar con métodos robustos y herramientas computacionales adecuadas para realizar el ajuste de curvas no lineales de manera precisa y eficiente.

2.4. Estudios previos

Una de las técnicas de modelamiento matemático más ampliamente utilizada en los estudios considerados es el esquema estructurado segregado. Este enfoque se emplea para analizar sistemas complejos divididos en subcomponentes o compartimentos. Cada subcomponente se modela por separado, teniendo en cuenta las interacciones entre ellos. Por ejemplo, en el estudio realizado por Porro et al.[60], se investigaron las oscilaciones sostenidas observadas en cultivos continuos de *Saccharomyces cerevisiae*. Estas oscilaciones se producen dentro de un rango bien definido de tasas de dilución y valores de oxígeno disuelto. El período de las oscilaciones está relacionado con los tiempos de generación de las células madre y las células hijas. Se propuso un modelo que explicaba el surgimiento de estas oscilaciones, a partir de los cambios en los parámetros del ciclo celular, debido al crecimiento alternativo de células madres e hijas en glucosa y etanol.

Otra técnica empleada es, el modelamiento vía sistemas de ecuaciones diferenciales. Cazador et al. [12] propusieron un modelo matemático basado en ecuaciones diferenciales que describían las interacciones entre las diferentes especies químicas y biológicas presentes en el cultivo de levadura. A través de simulaciones numéricas y análisis teóricos, examinaron cómo

las interacciones entre las especies y los procesos bioquímicos podrían dar lugar a oscilaciones en el cultivo. Se identificaron varios mecanismos potenciales, como la retroalimentación positiva y negativa, que podrían desempeñar un papel en la generación de las oscilaciones observadas. Se usa una versión modificada del modelo clásico de quimostato de Monod, para relacionar el comportamiento de una sola célula con las oscilaciones observadas experimentalmente. En este modelo, se consideran dos fases principales o estados de la célula, para tener en cuenta los cambios observados experimentalmente en el crecimiento celular: la fase de brotación y la fase de no brotación. En este estudio, se consideran supuestos simples adicionales al modelo con el objetivo de obtener información práctica y manejable sobre las relaciones entre las modificaciones metabólicas durante el ciclo celular, el control de la división y la ocurrencia de las oscilaciones. Se toma en cuenta, el metabolismo celular asumiendo una diversificación en el coeficiente de rendimiento durante el ciclo celular. Además, en el rango oscilatorio, se supone que la masa celular es constante, en el momento de la formación de una nueva célula (budding) y que depende de la concentración del sustrato limitante en el momento de la división. Al variar los valores de los parámetros en un rango adecuado, se obtuvieron oscilaciones sostenidas, que pueden ser comparadas con las oscilaciones experimentales observadas.

El análisis teórico basado en sistemas de ecuaciones diferenciales se encuentra presente con el trabajo de Cazzador [11], en el que se utiliza una versión modificada del modelo clásico de quimostato de Monod, para relacionar el comportamiento de una sola célula con las oscilaciones observadas experimentalmente. En este modelo, se consideran dos fases principales o estados de la célula para tener en cuenta los cambios observados experimentalmente en el crecimiento celular: la fase de brotación y la fase de no brotación. Para ello, se asigna una especie de estructura de dos compartimentos a la biomasa total. El modelo obtenido permite analizar las propiedades locales de los estados estacionarios predichos bajo varias suposiciones, tanto en los coeficientes de rendimiento como en las tasas de crecimiento específicas. Se derivan las condiciones necesarias para la inestabilidad local y se muestra la existencia de ciclos límite estables mediante simulación por computadora. En cuanto a los cambios cualitativos en los parámetros metabólicos, este análisis concuerda con los resultados obtenidos mediante la simulación de modelos complejos estructurados y segregados. Sin embargo, el período de oscilación es demasiado largo en comparación con el experimental, lo que puede deberse principalmente a las suposiciones simplificadoras sobre la evolución dinámica de las tasas de transferencia entre los dos compartimentos. Hasta ahora, la utilidad del modelo parece estar restringida a la identificación de las relaciones entre la regulación del ciclo celular y el desencadenante de la oscilación.

Continuando con las técnicas de modelamiento matemático en el campo de las oscilaciones en cultivos continuos de levadura, cabe mencionar el trabajo de Bellgardt y sus colaboradores [7]. En este trabajo se exploró la presencia de bifurcaciones y oscilaciones en los cultivos continuos de levadura. El objetivo principal del estudio fue comprender las condiciones bajo las cuales los cultivos continuos de levadura pueden exhibir comportamientos bifurcativos, es

decir, la capacidad de cambiar entre diferentes estados estables, y oscilaciones periódicas. En su investigación se utilizó un enfoque experimental, similar al utilizado por Cazzador et al. [12], realizando cultivos continuos de levadura y monitoreando las variables clave. Sin embargo, Bellgardt se centró específicamente en investigar la respuesta de los cultivos a cambios en la tasa de dilución y en la disponibilidad de oxígeno. A través del análisis de los datos experimentales, Bellgardt encontró evidencia de comportamientos bifurcativos y oscilaciones en los cultivos continuos de levadura. Estos fenómenos fueron especialmente notables, cuando se alteraron las condiciones de cultivo, como cambios en la tasa de dilución o en la concentración de oxígeno. Para comprender los mecanismos subyacentes a estas observaciones, Bellgardt también desarrolló modelos matemáticos que describían la dinámica de los cultivos de levadura. Estos modelos consideraban factores como, la cinética de crecimiento, la producción y el consumo de metabolitos, y las interacciones entre las diferentes especies químicas presentes. A través de simulaciones numéricas y análisis teóricos, Bellgardt demostró cómo la combinación de factores como la retroalimentación positiva y negativa, y los cambios en las tasas de reacción, podían dar lugar a bifurcaciones y oscilaciones en los cultivos continuos de levadura.

En conclusión, el estudio de Bellgardt en 1997 proporcionó una comprensión más profunda de los fenómenos bifurcativos y las oscilaciones en los cultivos continuos de levadura. Mediante un enfoque experimental y matemático, el autor investigó las condiciones que pueden llevar a estos comportamientos y desarrolló modelos para explicar los mecanismos subyacentes. Este trabajo, ha contribuido significativamente al campo de la dinámica de los cultivos de levadura y ha sentado las bases para investigaciones posteriores en esta área.

Otra técnica usada, es el enfoque cibernético, que utiliza la teoría de control y sistemas de retroalimentación para modelar y analizar sistemas complejos. El modelo cibernético es una metodología que permite simular la competencia dinámica entre diferentes vías metabólicas disponibles en un sistema biológico. En este caso, el modelo cibernético se utiliza para estudiar la dinámica de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en cultivos por lotes y continuos. En el estudio de Jones et al. [35], se aplicó un modelo cibernético para simular la competencia dinámica entre diferentes vías metabólicas en cultivos de levadura. En los cultivos por lotes, se observó el patrón diauxico, donde la glucosa es fermentada completamente a etanol, durante la primera fase de crecimiento exponencial, seguida de una fase de latencia intermedia y una segunda fase de crecimiento exponencial que consume etanol. En los cultivos continuos, a diferentes tasas de dilución, se observaron oscilaciones sostenidas en todas las concentraciones medidas, como la masa celular, glucosa, etanol y oxígeno disuelto, así como en la cantidad de carbohidratos de almacenamiento intracelular, como glucógeno y trehalosa, la fracción de células en yema y el pH del cultivo. El modelo cibernético utilizado en este estudio es estructurado y no segregado, lo que significa que tiene en cuenta todas las vías metabólicas disponibles y su competencia dinámica. Este modelo logró predecir con precisión todos los aspectos observados experimentalmente, como la duración de la fase de latencia intermedia, la producción y consumo secuencial de etanol en los cultivos por lotes, así como la generación

espontánea de oscilaciones y las variaciones en el período y amplitud de las oscilaciones en los cultivos continuos, cuando se modifican la tasa de dilución o la velocidad de agitación.

En el trabajo de Boczko y colaboradores [8], se emplean diferentes técnicas de modelamiento matemático para investigar la dinámica del ciclo celular y el agrupamiento en levaduras. El objetivo principal es proporcionar una explicación para las oscilaciones periódicas en el consumo de oxígeno observadas en poblaciones de levadura. En el estudio, se desarrollan modelos de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODE, por sus siglas en inglés) del ciclo celular. Estos modelos consideran tanto retroalimentaciones de crecimiento positivas, como negativas dentro del ciclo celular. Se presentan pruebas rigurosas y simulaciones que demuestran que estas retroalimentaciones pueden generar agrupamientos o "clustering" de las poblaciones dentro del ciclo celular. Los modelos son analizados, tanto para perturbaciones aleatorias como estocásticas. Además de los modelos basados en ODE, también se emplean modelos de ecuaciones diferenciales estocásticas (SDE, por sus siglas en inglés) y modelos de ecuaciones diferenciales aleatorias (RDE, por sus siglas en inglés) para abordar la dinámica y el agrupamiento en el ciclo celular de levaduras. Los resultados obtenidos en el estudio indican que el fenómeno de agrupamiento o clustering es robusto y es probable que se observe en la naturaleza. Dado que el agrupamiento implica un número entero de conjuntos, esto lleva a un comportamiento periódico con periodos que son casi divisores enteros del periodo del ciclo celular.

El estudio de Morgan et al. [51] trató sobre un modelo dinámico de los ciclos celulares en un gran cultivo de células de levadura. Este modelo incorporó puertas de control del ciclo celular y cambios en el modo metabólico que son activados por umbrales de recursos. Para analizar el modelo, se emplearon técnicas de análisis matemático y simulaciones numéricas. En primer lugar, se realizó un estudio analítico para demostrar la existencia de conjuntos abiertos de valores de parámetros, para los cuales el modelo posee soluciones periódicas estables que exhiben oscilaciones metabólicas con agrupamiento del ciclo celular. Este análisis proporcionó una base teórica para comprender las posibles causas de las oscilaciones observadas en los experimentos. Además del estudio analítico, se realizaron simulaciones numéricas del modelo para obtener evidencia adicional. Estas simulaciones demostraron que las soluciones periódicas estables, que representan las oscilaciones metabólicas y el agrupamiento temporal de las células, existen para conjuntos amplios de valores de parámetros. Estas simulaciones brindaron una confirmación numérica de los resultados teóricos y respaldaron la idea de que las puertas de control del ciclo celular junto con recursos críticos pueden ser un mecanismo robusto para producir los fenómenos observados experimentalmente.

Finalmente, Stowers et al. [67], emplearon diversas técnicas de modelamiento matemático para investigar la estructura de las poblaciones de levadura de brote en respuesta a un mecanismo de retroalimentación. Los investigadores utilizaron un enfoque teórico para comprender cómo este mecanismo de retroalimentación, basado en la comunicación entre células,

acopla el crecimiento y la división celular, lo que da como resultado densidades de población no estacionarias y multimodales. Para estudiar la progresión del ciclo celular de los conjuntos de células en respuesta a este mecanismo, se realizaron simulaciones numéricas. Estas simulaciones permitieron modelar y analizar cómo las oscilaciones en la estructura de la población de la levadura en brote se reflejan en cambios observables en variables ambientales, como el oxígeno disuelto. Mediante estas simulaciones, los investigadores pudieron explorar diferentes escenarios y evaluar los resultados obtenidos. Además de las simulaciones numéricas, se presentaron datos experimentales que respaldan el modelo propuesto. Estos datos fueron obtenidos a partir de experimentos en los que se monitorea la dinámica de las poblaciones de levadura de brote en condiciones específicas. La comparación entre los datos experimentales y los resultados de las simulaciones numéricas y el análisis teórico permitió validar el modelo propuesto y fortalecer las conclusiones del estudio.

En conclusión, las técnicas de modelamiento matemático empleadas en las investigaciones descritas incluyen el esquema estructurado segregado, el modelamiento vía sistemas de ecuaciones diferenciales, el enfoque cibernético y diversas técnicas de análisis teórico y simulaciones numéricas. Estas técnicas permitieron comprender mejor la dinámica de los cultivos de levadura, y explicar fenómenos observados experimentalmente, como las oscilaciones en el crecimiento celular, el consumo de nutrientes y la competencia entre diferentes vías metabólicas. Los modelos matemáticos desarrollados proporcionan una base teórica sólida para investigar las interacciones y los mecanismos subyacentes en estos sistemas y permiten predecir y analizar el comportamiento de las poblaciones celulares en diferentes condiciones. Además, la comparación entre los resultados de las simulaciones numéricas y los datos experimentales valida y fortalece los modelos propuestos. En general, estas técnicas de modelamiento matemático son herramientas poderosas para la investigación en biología y contribuyen a una mejor comprensión de los sistemas biológicos complejos.

2.5. ¿Dónde estamos ahora?

De acuerdo con investigaciones previas, el estudio de las oscilaciones en el consumo de oxígeno de la levadura en cultivos continuos y bajo condiciones de limitación de nutrientes, continúa siendo un campo con posibles líneas de investigación a desarrollar. A pesar de los avances realizados en esta área, han surgido nuevas preguntas y aspectos por explorar [46]. Concretamente, elaborar un modelo segregado estructurado basado en nuevas investigaciones [9, 21], podría mejorar la comprensión del fenómeno de las oscilaciones en el consumo de oxígeno en cultivos continuos de levadura con limitación de nutrientes, relacionando ciclo celular (CDC) con ciclo metabólico de la levadura (YMC).

Capítulo 3

Metodología

3.1. ¿Cómo se realizó la búsqueda y validación de parámetros?

En general, las dinámicas asociadas a este modelo pueden variar dependiendo de los valores específicos de los coeficientes y las condiciones iniciales. Las variables de estado pueden interactuar y afectarse mutuamente, lo que da lugar a diferentes comportamientos dinámicos. Algunas de las posibles dinámicas incluyen:

- Estabilidad: Si los coeficientes y las condiciones iniciales están equilibrados, el sistema puede alcanzar un estado estable en el que las concentraciones de las variables de estado se mantienen constantes a lo largo del tiempo.
- Oscilaciones: Dependiendo de los valores de los coeficientes y las condiciones iniciales, el sistema puede exhibir oscilaciones periódicas en las concentraciones de las variables de estado. Estas oscilaciones pueden ser regulares o irregulares, y podrían indicar la presencia de un comportamiento cíclico en el cultivo de levadura.
- Transitoriedad y convergencia: En algunos casos, el sistema puede mostrar un comportamiento transitorio antes de converger hacia un estado estable. Durante este período transitorio, las concentraciones de las variables de estado pueden cambiar significativamente antes de alcanzar un equilibrio.
- Sensibilidad a las perturbaciones: El sistema puede ser sensible a las perturbaciones en los coeficientes o las condiciones iniciales. Pequeños cambios en estos valores pueden tener un impacto significativo en las dinámicas del sistema y en las concentraciones finales de las variables de estado.

Es importante tener en cuenta que nuestro modelo es un sistema dinámico de 4 ecuaciones, 2 de ellas no-lineales, y 15 parámetros. En virtud de esto, este sistema da pie a una infinidad de dinámicas enormemente complejas y diferentes. Se pueden vislumbrar de mejor manera las dinámicas específicas del sistema y realizar un análisis más detallado de estas, con

la asignación de valores numéricos a los coeficientes y a las condiciones iniciales. Además, es conveniente tener en cuenta que la presencia de términos no lineales en las ecuaciones puede dar lugar a comportamientos dinámicos complejos, como bifurcaciones y caos en ciertos rangos de valores de los coeficientes.

Nuestro objetivo principal en esta sección es encontrar el conjunto de parámetros y coeficientes del modelo que propicien oscilaciones en el consumo de oxígeno en el cultivo de levadura. Las oscilaciones en el consumo de oxígeno pueden ser indicativas de fenómenos como el ciclo celular, la regulación metabólica o las interacciones entre las células y el ambiente.

Para lograr este objetivo, se requiere realizar un análisis detallado del sistema de ecuaciones diferenciales y explorar diferentes combinaciones de parámetros y coeficientes que puedan conducir a oscilaciones en el consumo de oxígeno. Algunos enfoques comunes para lograr esto incluyen:

- **Análisis teórico:** Mediante técnicas matemáticas y análisis teórico, se pueden estudiar las propiedades del sistema dinámico. Esto implica analizar las ecuaciones en su forma no lineal y determinar condiciones suficientes para la existencia de oscilaciones estables. Esto podría implicar el uso de métodos analíticos, como el análisis de estabilidad lineal, el análisis de bifurcaciones y la teoría de sistemas dinámicos.
- **Simulaciones numéricas:** Utilizando métodos numéricos y software de simulación, se pueden explorar diferentes combinaciones de parámetros y coeficientes del modelo para encontrar conjuntos que produzcan oscilaciones en el consumo de oxígeno. Se pueden realizar simulaciones de las ecuaciones diferenciales en el tiempo y analizar los resultados para identificar patrones oscilatorios.
- **Optimización:** Se pueden emplear técnicas de optimización para encontrar el conjunto óptimo de parámetros y coeficientes que maximicen la probabilidad de generar oscilaciones en el consumo de oxígeno. Esto podría involucrar la definición de una función objetivo que cuantifique la presencia de oscilaciones y el uso de algoritmos de optimización para encontrar los valores óptimos.

Es importante tener en cuenta que encontrar el conjunto exacto de parámetros y coeficientes que generen oscilaciones en el consumo de oxígeno puede ser un desafío, ya que implica explorar un espacio de búsqueda amplio y complejo. Además, la selección de los parámetros y coeficientes también debe estar respaldada por evidencia experimental y conocimiento biológico.

En el presente estudio, se aborda la búsqueda del conjunto de parámetros y coeficientes del modelo que generen oscilaciones en el consumo de oxígeno en un cultivo de levadura en un quimiostato. Dada la complejidad del sistema y la naturaleza dinámica de las interacciones entre las variables de estado, se ha optado por realizar simulaciones numéricas y emplear

técnicas de optimización para abordar este objetivo. Estas metodologías permitirán explorar un amplio espacio de búsqueda y encontrar las combinaciones óptimas que promuevan oscilaciones en el consumo de oxígeno [36, 75].

En primer lugar, se realizaron simulaciones numéricas de las ecuaciones diferenciales que describen el sistema dinámico. Estas simulaciones se llevarán a cabo utilizando Python [72], en particular, librerías especializadas en la solución numérica de ecuaciones diferenciales, como Numpy [55]. Se implementó el algoritmo de integración numérica, Adams-Bashforth-Moulton, para obtener las soluciones numéricas de las ecuaciones a lo largo del tiempo. Las condiciones iniciales y los valores iniciales de los parámetros y coeficientes se establecerán de acuerdo con datos experimentales previos y conocimiento biológico [28, 45].

Previamente, se utilizaron herramientas de visualización y análisis para examinar las trayectorias de las variables de estado del sistema en el tiempo, en la búsqueda de patrones oscilatorios en el consumo de oxígeno. Se simularon, campos de vectores, espacios de fases, diagramas de bifurcación y mapas de Poincaré, con el objeto de seleccionar del espacio de posibilidades numéricas, aquellos conjuntos de parámetros que propiciaran comportamientos oscilatorios en la demanda de oxígeno y/o en las restantes variables de estado del sistema (C , D y G) [19].

Una vez identificados los patrones oscilatorios, se procedió a la etapa de optimización de los parámetros escogidos. Se definirá una función objetivo que cuantifique la presencia y la calidad de las oscilaciones en el consumo de oxígeno. Esta función objetivo estará diseñada para maximizar la probabilidad de encontrar conjuntos de parámetros y coeficientes que generen oscilaciones estables y robustas.

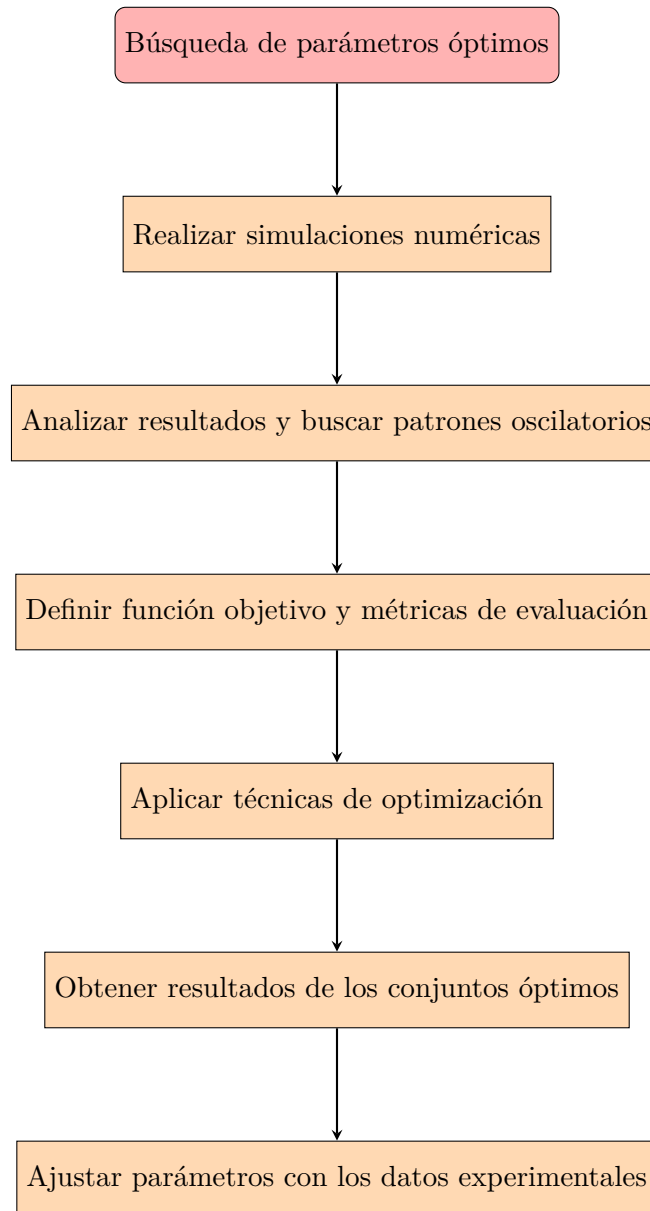
Para realizar la optimización, se pueden emplear técnicas de optimización numérica, como algoritmos genéticos, algoritmos de enjambre de partículas o métodos de gradiente descendente [17, 39]. Estos algoritmos exploran el espacio de búsqueda de parámetros y coeficientes de manera iterativa, ajustando los valores en cada iteración para mejorar la función objetivo y converger hacia el conjunto óptimo que genere las oscilaciones deseadas en el consumo de oxígeno. En este trabajo usamos la técnica de los algoritmos genéticos.

Es importante destacar que la selección de los algoritmos de optimización y la definición de la función objetivo se realizarán con base en la naturaleza específica del sistema y las características buscadas en las oscilaciones. Estos aspectos se fundamentarán en los conocimientos previos en los conocimientos previos relacionados con el cultivo de levadura y los fenómenos de consumo de oxígeno [70, 60, 10, 21, 35].

En resumen, esta sección se centrará en la búsqueda del conjunto óptimo de parámetros y coeficientes que produzcan oscilaciones en el consumo de oxígeno en un cultivo de levadura.

Esto se abordará mediante simulaciones numéricas para explorar las dinámicas del sistema y técnicas de optimización para encontrar los conjuntos de parámetros que maximicen la probabilidad de generar oscilaciones. Este enfoque permitirá obtener una comprensión más profunda de las dinámicas del sistema y sus implicaciones biológicas.

A continuación se muestra un diagrama con los pasos de la búsqueda y optimización de parámetros.



3.1.1. Descripción de los métodos

En nuestra investigación, utilizamos un enfoque metodológico progresivo para analizar y comprender los patrones oscilatorios en un sistema quimiostato. Comenzamos con la selección cuidadosa de parámetros, seguida del análisis del campo de vectores y los diagramas de fase para comprender la dinámica general del sistema. Luego, nos enfocamos en las bifurcaciones y los diagramas de retorno para identificar patrones oscilatorios y comprender mejor las características temporales del sistema. Utilizamos métodos numéricos para obtener soluciones detalladas y validar nuestros hallazgos. Finalmente realizamos un proceso de ajuste de curva con el único conjunto de datos disponibles [9]. Este enfoque nos permitió explorar en profundidad los patrones oscilatorios en el sistema propuesto (2.15)- (2.18) y ensayar un primer intento de ajuste a las curva experimental.

En primer lugar describimos el comportamiento del campo de vectores asociado a las variables de estado C y O . Creemos en la importancia de obtener una imagen panorámica de la dinámica del sistema antes de embarcarnos en un enfoque más específico y cuantitativo. El campo de vectores nos proporcionó una representación visual de las direcciones y magnitudes de los vectores de velocidad en cada punto del espacio de fase, permitiéndonos comprender las interacciones entre las células en estado de compromiso y el oxígeno disuelto. Esperamos que este enfoque inicial nos brindara una comprensión intuitiva de cómo las variables de estado se comportan y evolucionan en el tiempo, y nos permitió identificar patrones, tendencias y posibles oscilaciones en el sistema [68, 2, 32]. A partir de esta panorámica general, pudimos establecer supuestos y seleccionar rangos de parámetros y coeficientes para futuros análisis más detallados y rigurosos. En última instancia, este enfoque nos proporcionó un contexto idóneo para la búsqueda de los parámetros y coeficientes óptimos que mejor describieran la dinámica de nuestro sistema, y nos permitió vislumbrar, tal vez, de manera más profunda las relaciones causales entre las variables de estado.

Es importante volver a mencionar que la obtención de esta panorámica general de nuestro sistema se encuentra restringida por la elección inicial de los parámetros. Conscientes de esta premisa, se procedió a realizar una selección inicial de los parámetros mediante una heurística que involucró una combinación de ensayo y error, así como consideraciones de orden biológico. Esta aproximación heurística permitió establecer valores iniciales que reflejaran de manera razonable los procesos biológicos subyacentes en el sistema en estudio. Al comprender que los sistemas biológicos son inherentemente complejos y multifactoriales, se consideró fundamental esta elección inicial basada en una combinación de conocimiento biológico y un proceso iterativo de ajuste. Esta elección, aunque no exenta de incertidumbre, sienta las bases para una exploración sistemática y rigurosa de los parámetros óptimos que mejor representen la dinámica de nuestro sistema, y permitió una comprensión más profunda de las relaciones causales y las oscilaciones presentes en el mismo.

La utilización de diagramas de fase es una herramienta fundamental en el análisis de

sistemas dinámicos, ya que permite profundizar en las propiedades cualitativas y el comportamiento a largo plazo de dichos sistemas. En este estudio, después de haber empleado el campo de vectores como una primera aproximación para comprender la dinámica general del sistema respecto de las variables de interés, utilizó los diagramas de fase como una segunda herramienta para explorar con mayor detalle las interacciones entre las variables de estado y las trayectorias del sistema en el espacio de fase.

Los diagramas de fase ofrecen una representación visual de las trayectorias que las variables de estado siguen a medida que evolucionan en el tiempo. Cada punto en el diagrama de fase corresponde a un estado del sistema en un momento específico, y las trayectorias muestran cómo esos estados cambian y se relacionan entre sí a medida que el tiempo avanza. Estos diagramas permiten identificar regiones de estabilidad, puntos de equilibrio, ciclos límite y otros comportamientos característicos del sistema [68, 2].

Al combinar la información obtenida del campo de vectores con los diagramas de fase, se obtuvo una comprensión más completa y detallada de las propiedades cualitativas del sistema en estudio. Los diagramas de fase nos permitieron visualizar las trayectorias en el espacio de fase y analizar cómo los valores iniciales, los parámetros y los coeficientes elegidos influyen en el comportamiento a largo plazo del sistema. Además, nos proporcionaron una herramienta poderosa para identificar patrones, bifurcaciones y estructuras emergentes en el sistema [68, 25].

Con el objetivo de identificar posibles estados del sistema que favorezcan la presencia de oscilaciones, avanzamos en el estudio de bifurcaciones y en la construcción de un gráfico de Poincaré para la variable del oxígeno disuelto O . Este análisis nos permitió examinar cómo cambia el comportamiento del sistema a medida que se varía un parámetro específico, lo que nos proporcionó información valiosa sobre las transiciones entre diferentes estados y la estabilidad del sistema [47, 49]. En nuestro caso, el parámetro que variáramos fue la dilución d , lo cual nos permitió identificar valores críticos de d donde pudieran ocurrir cambios significativos en la dinámica del sistema.

Por otro lado, la construcción de un gráfico de Poincaré para el oxígeno disuelto nos permitió investigar la variabilidad y los patrones recurrentes en la dinámica del sistema. Este enfoque, ampliamente utilizado en el análisis de series temporales y fenómenos oscilatorios, nos proporcionó información valiosa sobre las características de las oscilaciones presentes en el sistema [1, 59, 37]. Al estudiar la relación entre los valores actuales y desfasados del oxígeno disuelto, logramos identificar patrones cíclicos y detectar cambios en la variabilidad del sistema.

Un diagrama de bifurcaciones es una representación gráfica que nos permite observar cómo cambian las soluciones de un sistema dinámico a medida que se varía un parámetro específico

[25]. Este tipo de diagrama es utilizado para visualizar los cambios cualitativos en el comportamiento del sistema en función del valor del parámetro.

Capítulo 4

Resultados

4.1. Búsqueda de parámetros

Los valores de los parámetros y de las condiciones iniciales es determinante en la dinámica del sistema. Para nuestro modelo dado por el sistema (2.15)-(2.18), hemos supuesto que los siguientes valores constituyen un conjunto de candidatos apropiados para generar oscilaciones autosostenidas en la variable de estado del oxígeno disuelto O .

Parámetro	Valor
d	0,1
μ_{\max}	0,18
ν_{\max}	0,65
K_{G_D}	0,1
K_{O_D}	0,1
K_{G_C}	0,005
K_{O_C}	0,005
G_{in}	10
Y_{G_C}	0,7
Y_{G_D}	0,1
Y_{O_C}	0,1
Y_{O_D}	0,7
k	1,2
O_{sat}	10
a	0,05

Tabla 4.1: Parámetros iniciales.

Es razonable pensar que, el conjunto de parámetros y las condiciones iniciales propuestas, podrían generar oscilaciones sostenidas en la variable de estado del oxígeno disuelto. La combinación de una alta tasa de transferencia de masa del oxígeno, un consumo relativamente bajo de este por parte de las células y una eliminación continua de estas; puede llevar a oscilaciones periódicas en la concentración de oxígeno disuelto. Los parámetros propuestos en conjunto con las condiciones iniciales elegidas, presentan características que sugieren la presencia de oscilaciones sostenidas en la concentración de oxígeno disuelto, por las razones que detallamos a continuación.

Al considerar los valores de los parámetros y coeficientes, podemos observar que el coeficiente k es mayor que 1, indicando una tasa de transferencia de masa del oxígeno relativamente alta. Además, los coeficientes Y_{O_D} y Y_{O_C} son tales que $\frac{\mu}{Y_{O_D}}$ es menor que 1 y $\frac{\nu}{Y_{O_C}}$ es mayor que 1, lo cual implica que el consumo de oxígeno por las células en estado de desarrollo es relativamente bajo en comparación con el consumo de oxígeno de las células en estado de compromiso, lo cual es coherente con la hipótesis de que la sincronía de células comprometidas con el CDC más el metabolismo propio de las células que inician CDC incrementan la tasa de consumo de oxígeno.

En cuanto a los demás parámetros, se observa que el coeficiente de dilución d es mayor que 0, lo que implica una eliminación continua de las células del quimiostato. Por otro lado los valores de μ_{\max} y ν_{\max} indican tasas de crecimiento máximas de las células en desarrollo y en estado de compromiso, respectivamente, que difieren entre sí de tal manera que se propicie un crecimiento mayor en la concentración de biomasa de células en el estado de compromiso.

Los coeficientes K_{G_D} , K_{O_D} , K_{G_C} y K_{O_C} están asociados con la cinética de crecimiento celular y la afinidad por los sustratos. Estos coeficientes determinan cómo las células responden a la disponibilidad de glucosa y oxígeno en el medio de cultivo. Un valor alto de estos coeficientes indica una mayor afinidad de las células por los sustratos correspondientes, de tal manera que, al haber una mayor afinidad de las células en estado de desarrollo con los sustratos respectivos, este grupo de células ejerce un gran impacto sobre la disponibilidad de estos.

Cuando se combinan tasas de crecimiento máximas diferenciadas, coeficientes de cinética de crecimiento y afinidad por sustratos adecuados, junto con una transferencia de masa de oxígeno significativa y rendimientos en consumo de oxígeno disímiles acompañados de bajo consumo, se pueden esperar oscilaciones sostenidas en la concentración de oxígeno disuelto.

Estas oscilaciones ocurren como resultado de la retroalimentación positiva y negativa entre las variables del sistema. Por ejemplo, un aumento en la concentración de células en estado de compromiso puede conducir a un mayor consumo de oxígeno, lo que reduce la concentración de oxígeno disuelto. A su vez, una disminución en la concentración de oxígeno puede afectar

la tasa de crecimiento de las células en desarrollo y, por lo tanto, influir en la concentración de células en estado de compromiso. Estas interacciones dinámicas pueden generar oscilaciones periódicas en la concentración de oxígeno disuelto.

4.2. Análisis y búsqueda de patrones oscilatorios

4.2.1. Campo de vectores para nuestro modelo

La figura 4.1 representa el campo de vectores para C y O generado por nuestro modelo (2.15)-(2.18), tomando como condiciones iniciales $C = 1$, $D = 1$, $G = 1$ y $O = 1$. Los parámetros usados aparecen al pie de la figura. Para producir la figura se han usado el módulo `matplotlib.pyplot` de la biblioteca `matplotlib` en conjunto con la librería `NumPy`, ambas de Python.

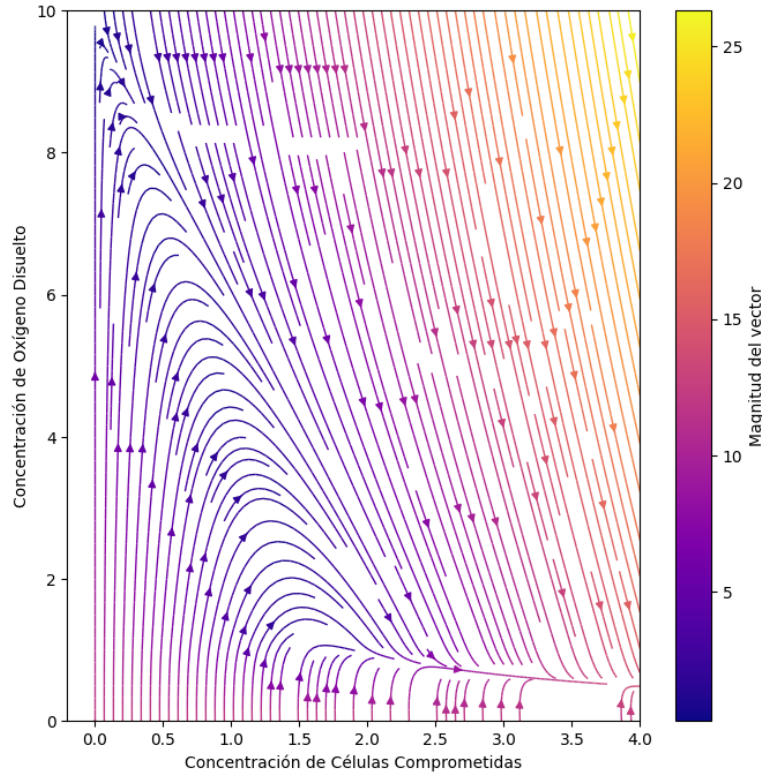


Figura 4.1: Campo de vectores de C y O . Parámetros: $d = 0,1$; $\mu_{\max} = 0,18$; $v_{\max} = 0,65$; $K_{G_D} = 0,1$; $K_{O_D} = 0,1$; $K_{G_C} = 0,005$; $K_{O_C} = 0,005$; $G_{in} = 10$; $Y_{G_C} = 0,7$; $Y_{G_D} = 0,1$; $Y_{O_C} = 0,1$; $Y_{O_D} = 0,7$; $k = 1,2$; $O_{sat} = 10$; $a = 0,05$.

Si hacemos un barrido desde izquierda a derecha podemos observar que para valores bajos de O los vectores indican un incremento sostenido de esta variable. A medida que subimos, el panorama es distinto. Si nos situamos en el primer tercio vertical y nos movemos hacia la derecha se puede apreciar como las flechas giran y cambian de dirección y magnitud ya a partir de $O = 1$. Si subimos al segundo y tercer tercio de la imagen el cambio de dirección y sentido de las flechas ocurre para valores más bajos de C , concretamente para valores de $C < 1$. Esto parece indicar que una mayor disponibilidad de oxígeno disuelto está asociado con una tendencia al aumento en el consumo de este, que se ve fortalecido, a su vez, con el aumento en la concentración de células en estado de compromiso. A su vez, el aumento en la concentración de estas células, muestra un incremento en la velocidad de caída en la concentración del oxígeno disuelto, tal como se puede inferir de la magnitud, dirección y sentido de los vectores en el cuarto superior derecho del diagrama.

La dinámica que muestra el campo de vectores sugiere una relación entre el oxígeno disuelto y la concentración de células en estado de compromiso. Se destaca que un mayor nivel de oxígeno disuelto está asociado con un aumento en el consumo, especialmente cuando se observa el cuarto superior derecho del diagrama. Esto recalca una interdependencia y retro-alimentación entre estas dos variables, y sugiere que el análisis debe centrarse en los rangos en los que esta interacción es más notoria.

4.2.2. Diagramas de fase para nuestro modelo

Reproducimos los diagramas de fase de tres variables de estado clave, células comprometidas, células en desarrollo y oxígeno disuelto, en tres escenarios: células comprometidas vs células en desarrollo, células comprometidas vs oxígeno disuelto y células en desarrollo vs oxígeno disuelto. Nuestro objetivo principal fue explorar los patrones oscilatorios presentes en el consumo de oxígeno y su relación con las células en sus diferentes estados a mediano y largo plazo [53]. A través de este análisis, buscamos obtener una comprensión más profunda de las dinámicas del sistema y de su relevancia para nuestra investigación [71, 24]. Para generar los diagramas se utilizó la función `odeint` del módulo `scipy.integrate` de la biblioteca SciPy en conjunto con la biblioteca NumPy, ambas de Python.

En el diagrama de fase representado por la figura (4.2), se observa una estructura en forma de espiral con una circunferencia central hacia la cual parece converger la trayectoria. Esta configuración es característica de un atractor tipo espiral, que es comúnmente encontrado en sistemas dinámicos no lineales. El comportamiento en espiral sugiere la presencia de oscilaciones amortiguadas en las variables de estado representadas en el diagrama: las células comprometidas (C) y las células en desarrollo (D). La convergencia hacia la circunferencia central indica que las oscilaciones están acotadas y tienden a un estado estacionario. La circunferencia representa un ciclo límite estable, que corresponde a una solución periódica en el sistema. Esto significa que las células comprometidas y las células en desarrollo exhi-

ben oscilaciones regulares y repetitivas en sus concentraciones a medida que el tiempo avanza.

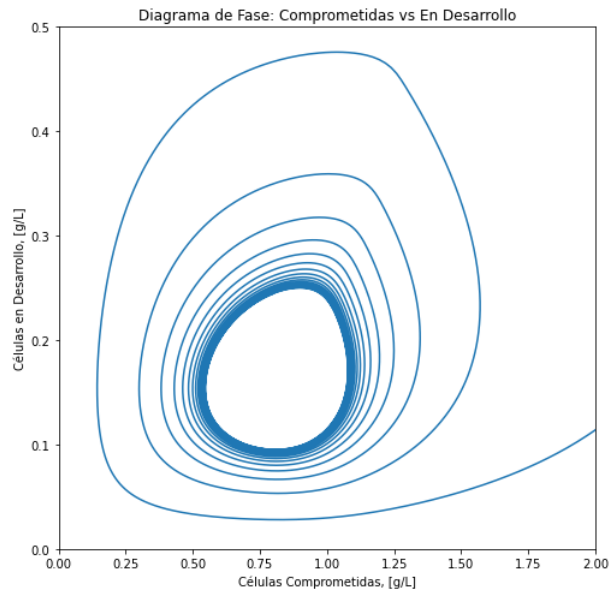


Figura 4.2: Diagrama de fase: Comprometidas v/s En Desarrollo. Se observa una estructura espiral con una circunferencia central, indicando oscilaciones amortiguadas en las células comprometidas y en desarrollo. La convergencia hacia la circunferencia muestra un ciclo límite estable, revelando oscilaciones regulares y repetitivas. Esto sugiere un mecanismo de autorregulación en el sistema.

En el diagrama de fase de concentración de células en estado de compromiso vs. oxígeno disuelto (Figura 4.3), se observa una trayectoria más compleja y dinámica que la anterior. Inicialmente, la trayectoria describe una vuelta ovalada y horizontal en el costado inferior derecho de la gráfica, indicando un estado de equilibrio estable en el cual la concentración de células en estado de compromiso y el nivel de oxígeno disuelto crecen de manera proporcional. A medida que la trayectoria se desplaza dando vueltas hacia el centro de la gráfica, se producen vueltas más pequeñas con la misma forma ovalada, lo que sugiere oscilaciones amortiguadas en las variables.

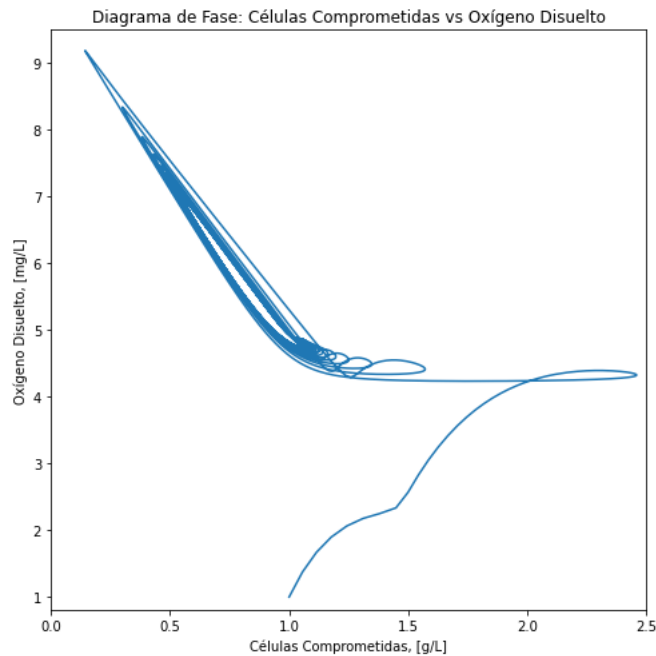


Figura 4.3: Diagrama de fase: Comprometidas v/s Oxígeno Disuelto. Este diagrama de fase muestra una trayectoria compleja y dinámica en el espacio de las concentraciones de células en estado de compromiso y oxígeno disuelto. Se observa una evolución desde un estado de crecimiento lineal hacia oscilaciones amortiguadas, seguido de una estabilización en torno a un ciclo límite principal. Estos patrones sugieren interacciones y retroalimentaciones entre las variables de interés.

La convergencia de las vueltas hacia el centro de la gráfica indica una disminución gradual en la concentración de células comprometidas. Este comportamiento puede ser atribuido a un mecanismo de retroalimentación negativa en el que el aumento de la concentración de células comprometidas conduce a un mayor consumo de oxígeno, lo que a su vez disminuye la disponibilidad de oxígeno disuelto en el entorno celular, limitando así el crecimiento, a su vez, de las células comprometidas.

Sin embargo, el cambio de dirección de la trayectoria y la formación de un óvalo alargado inclinado en aproximadamente -45° revelan una estabilización de la trayectoria en torno a un ciclo límite en el que el aumento en la disponibilidad de oxígeno disuelto está correlacionado con una disminución en la concentración de células en estado de compromiso.

En el diagrama de fase de células en desarrollo v/s oxígeno disuelto (Figura 4.4), se observa una trayectoria en forma de espiral que se arremolina desde las regiones exteriores hacia el centro del diagrama. Esta dinámica sugiere una relación entre las células en desarrollo y

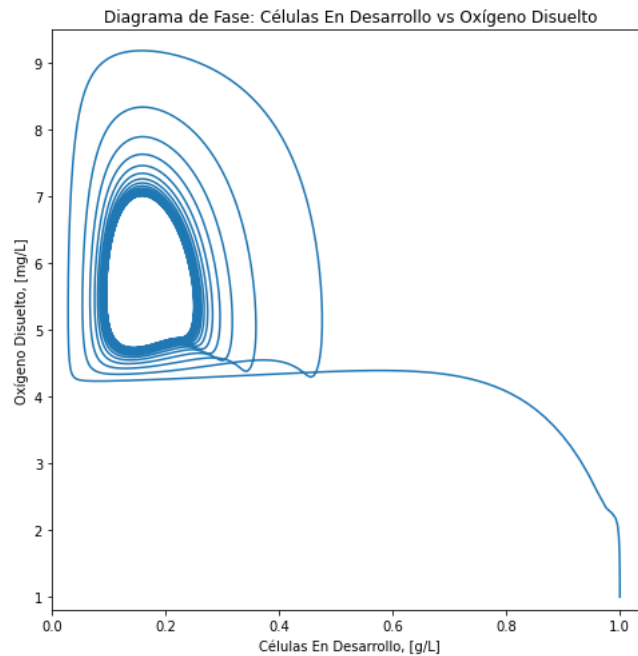


Figura 4.4: Diagrama de fase: En Desarrollo v/s Oxígeno Disuelto. El diagrama de fase muestra una trayectoria en forma de espiral que se arremolina hacia el centro, indicando una relación entre las células en desarrollo y el nivel de oxígeno disuelto. A medida que las células en desarrollo aumentan, se consume más oxígeno y su disponibilidad disminuye. Esto afecta el crecimiento de las células en desarrollo y puede estar influenciado por las células en estado de compromiso.

el nivel de oxígeno disuelto en el entorno. A medida que las células en desarrollo aumentan en concentración, se produce un mayor consumo de oxígeno disuelto, lo que a su vez reduce su disponibilidad en el medio. Luego, mientras disminuye el oxígeno disuelto en el medio el crecimiento de la concentración de células en desarrollo se detiene, para luego disminuir bruscamente, permitiendo una vez que esta concentración es extremadamente pequeña, un aumento abrupto en la concentración del oxígeno disuelto. Este último fenómeno podría ser indicativo de la acción de algún mecanismo externo sobre las células en estado de desarrollo.

4.2.3. Diagramas de bifurcación para nuestro modelo

Al analizar el diagrama de bifurcaciones, podemos identificar patrones y cambios cualitativos en las soluciones del sistema. Por ejemplo, podemos observar la aparición de bifurcaciones, donde una solución estable se divide en múltiples soluciones estables o inestables. También podemos detectar transiciones en el comportamiento del sistema, como la aparición de oscilaciones o la entrada en un estado caótico. Para producir el diagrama se utilizó la función `odeint` del módulo `scipy.integrate` de la biblioteca SciPy en conjunto con la biblioteca NumPy, ambas de Python.

El siguiente diagrama de bifurcaciones (Figura 4.5) nos muestra los valores estables de la variable O a medida que se hace variar el valor de la tasa de dilución d ¹. Estos valores muestran una gran variabilidad en el rango que va desde 0,1 hasta 0,175 aproximadamente. Desde 0,175 hasta 0,4 los valores de O se estabilizan en $O = 10$. Esto sugiere dos cosas. La primera es, que el abigarrado desorden de los valores estables de O desde $d = 0$ hasta $d = 0,175$, sugieren la posibilidad de la existencia de oscilaciones en O . Por el contrario, desde $d = 0,175$ hasta $d = 0,4$ la existencia de oscilaciones en la variable O , es improbable.

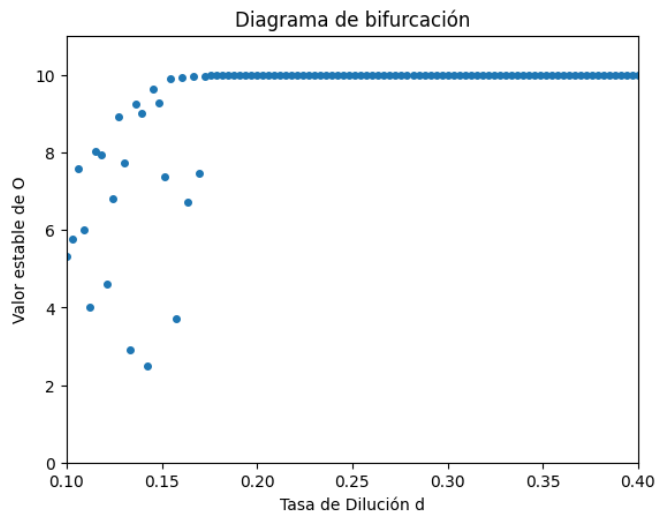


Figura 4.5: Diagrama de Bifurcación. El desorden de los valores estables de O desde $d = 0$ hasta $d = 0,175$, sugieren la posibilidad de la existencia de oscilaciones en O . Por el contrario, desde $d = 0,175$ hasta $d = 0,4$ la existencia de oscilaciones en la variable O , es improbable.

¹El algoritmo define un rango de valores para el parámetro de dilución d usando `np.linspace` que genera una secuencia de 100 valores equidistantes entre 0,1 y 0,4. Una vez que `odeint` resuelve el sistema de ecuaciones para un valor de d , la matriz resultante `sol` contiene las soluciones numéricas para cada variable del sistema en cada punto de tiempo. Para obtener los valores estables de la variable O , se extraen los valores finales de O de la última fila de la matriz `sol`, que corresponde al tiempo final de integración.

4.2.4. Gráfica de Poincaré aplicada a nuestro modelo

La gráfica de Poincaré es una herramienta de análisis utilizada para visualizar y estudiar la dinámica de sistemas dinámicos periódicos o que exhiben comportamientos oscilatorios [68]. En nuestro caso, la utilizaremos para analizar la variable O y detectar posibles oscilaciones en el sistema. Como explicamos, la idea detrás de la gráfica de Poincaré es tomar una variable de interés, en este caso O , y muestrear su valor en momentos específicos en el tiempo. En lugar de representar todos los puntos de la variable O a lo largo del tiempo, se toma una muestra selectiva. En la gráfica de Poincaré, se representa el valor actual de la variable O en el eje X , y se muestra el valor desfasado en una unidad temporal en el eje Y . Esto significa que para cada punto en la gráfica, se toma el valor actual de O y se grafica el valor de O en el próximo intervalo de tiempo. Al representar estos pares de valores (O_t, O_{t+1}) en la gráfica, se obtiene una representación visual de la dinámica del sistema. Si el sistema exhibe un comportamiento periódico u oscilatorio, los puntos en la gráfica de Poincaré se agruparán en una estructura característica, como una línea o una curva cerrada. Si el sistema no presenta oscilaciones, los puntos se dispersarán de manera más desordenada. [59]. Para generar los diagramas se utilizó la biblioteca NumPy en conjunto con el módulo matplotlib.pyplot de la librería matplotlib, ambas de Python.

La primera gráfica (Figura 4.6) usa una muestra de 100 iteraciones de los valores de O . Los puntos de coordenadas (O_t, O_{t+1}) forman claramente una línea recta. Esto sugiere la existencia de oscilaciones.

Ahora usamos una muestra de 1000 iteraciones de valores de O (Figura 4.7). En este caso los puntos de coordenadas (O_t, O_{t+1}) comienzan a dispersarse. Esto sugiere la presencia de inestabilidad en las oscilaciones de O .

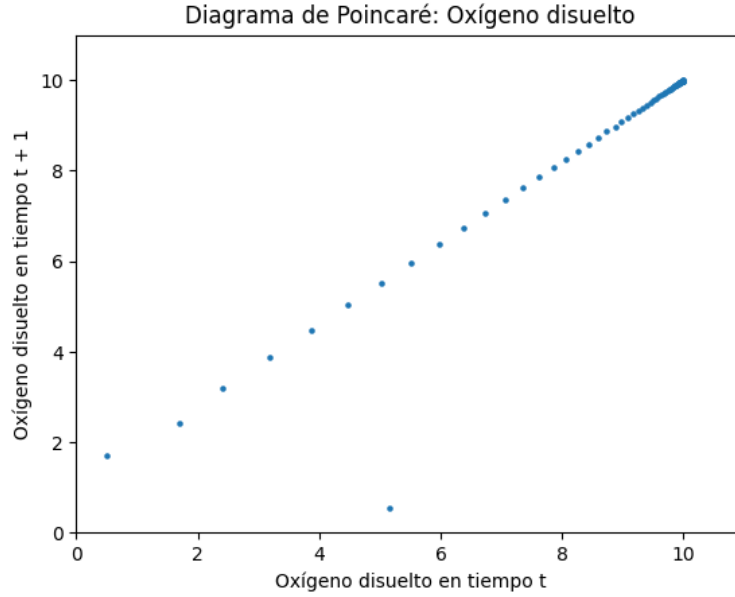


Figura 4.6: Diagrama de Poincaré. Los puntos de coordenadas (O_n, O_{n+1}) se encuentran perfectamente alineados. Se usó una muestra de 100 iteraciones. Este hecho indica una probabilidad altísima de oscilaciones en la variable O .

4.2.5. Soluciones numéricas para nuestro modelo

La figura 4.8 muestra las soluciones numéricas del sistema dinámico definido por las ecuaciones de nuestro modelo (2.15)-(2.18), implementado en Python, utilizando la librería Scipy. Esta librería proporciona métodos numéricos eficientes para resolver ecuaciones diferenciales ordinarias, como el método *odeint*² utilizado en este caso.

²El método *odeint* utilizado en Python pertenece a la librería Scipy [34]. Scipy es una librería científica ampliamente utilizada en Python para el procesamiento y análisis de datos científicos, incluyendo la resolución numérica de ecuaciones diferenciales ordinarias. En particular, *odeint* implementa un método de integración numérica de orden variable conocido como método de *Adams-Bashforth-Moulton* [27]. Este método combina pasos hacia adelante y hacia atrás para lograr una mayor precisión y estabilidad en la solución numérica de las ecuaciones diferenciales ordinarias. El método de *Adams-Bashforth-Moulton* es un enfoque popular en la resolución numérica de ecuaciones diferenciales y se ha utilizado ampliamente en diversos campos científicos, incluyendo la biología, la física y la ingeniería [3]. Su implementación en la librería Scipy proporciona una herramienta confiable y eficiente para resolver sistemas dinámicos complejos y comprender mejor las dinámicas de los sistemas biológicos.

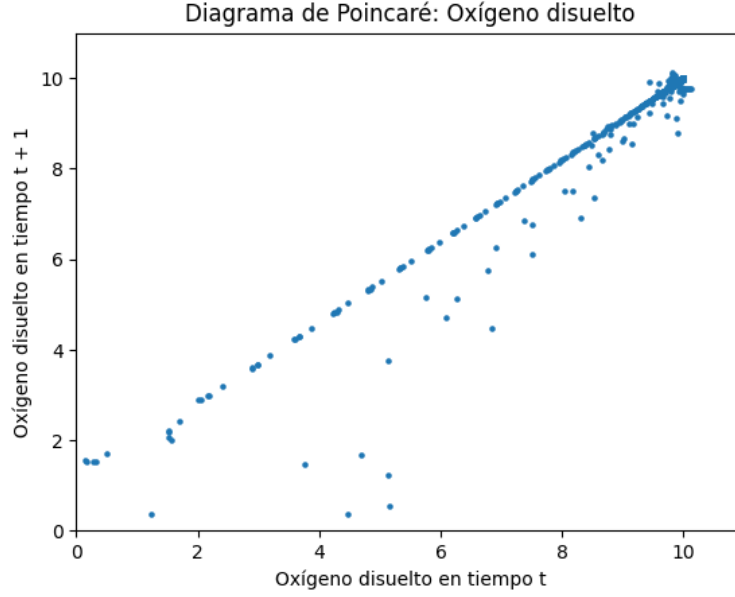


Figura 4.7: Diagrama de Poincaré. Con 1000 iteraciones aparece un conjunto de puntos alejados de la línea central. Este hecho sugiere la presencia de inestabilidad en las oscilaciones de O .

El sistema dinámico representa la dinámica de las variables de estado C (concentración de células en estado de compromiso), D (concentración de células en estado de desarrollo), G (concentración de glucosa) y O (concentración de oxígeno disuelto) en un cultivo de levadura en un quimiostato. Las ecuaciones diferenciales del sistema se definen en la función *ode-model*, que utiliza los parámetros y coeficientes proporcionados. El método *odeint* resuelve numéricamente las ecuaciones diferenciales a lo largo de un intervalo de tiempo especificado. En este caso, se utiliza un vector de tiempo t con una longitud de N_t y un intervalo de tiempo máximo de t_{max} . La condición inicial del sistema se establece en el vector X_0 .

La gráfica (Figura 4.8) muestra las concentraciones de las variables de estado en función del tiempo. En particular, se resalta la concentración de oxígeno disuelto (O), que es la variable de mayor interés. Se observan oscilaciones periódicas en la concentración de oxígeno disuelto, a lo largo del tiempo. Estos resultados respaldan la hipótesis planteada por Burnett et al. [10, 9], donde se propone que las oscilaciones en el oxígeno disuelto están relacionadas con un reclutamiento repentino de células en estado de compromiso por parte de células en la etapa final de su fase de desarrollo, a través de señales. Según Burnett et al. [10, 9] esta explosión repentina en el número de células en estado de compromiso conduce a un aumento acelerado en el consumo de oxígeno.

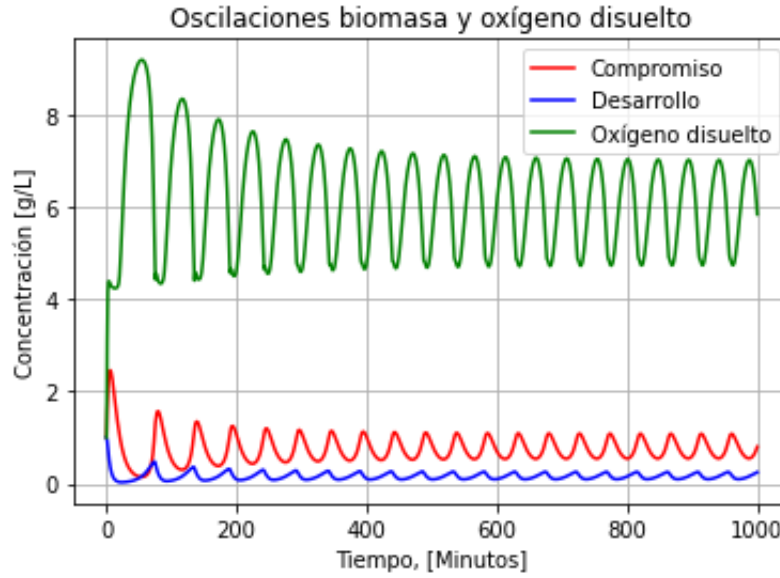


Figura 4.8: Soluciones numéricas. La gráfica muestra las oscilaciones de la concentración de células en estado de compromiso (rojo), células en estado de desarrollo (azul) y la concentración de oxígeno disuelto (verde) en el cultivo de levadura en un quimiostato. Los valores iniciales y los parámetros del sistema se han configurado de acuerdo con el modelo propuesto. Las oscilaciones en la concentración de oxígeno disuelto son evidencia de un reclutamiento repentino de células en estado de compromiso, lo que resulta en un aumento acelerado del consumo de oxígeno.

La implementación numérica y los resultados obtenidos mediante el uso de la librería Scipy respaldan la hipótesis propuesta, ya que las oscilaciones en la concentración de oxígeno disuelto son claramente evidentes a partir de la gráfica obtenida (Figura 4.8). Esto sugiere que el sistema dinámico modelado con los parámetros y coeficientes dados es capaz de generar las oscilaciones esperadas en el oxígeno disuelto, lo que es consistente con la hipótesis y con el trabajo previo de Burnetti et al. [10, 9].

Para obtener las gráficas de las figuras (4.9)-(4.12) se usaron las librerías NumPy, Pandas, Matplotlib y ipwidgets, todos de Python.

Las gráficas de la figura 4.9 muestran la variación de la tasa de obediencia a en las concentraciones de las células en estado de “Compromiso” y “Desarrollo” a lo largo del tiempo en el cultivo.

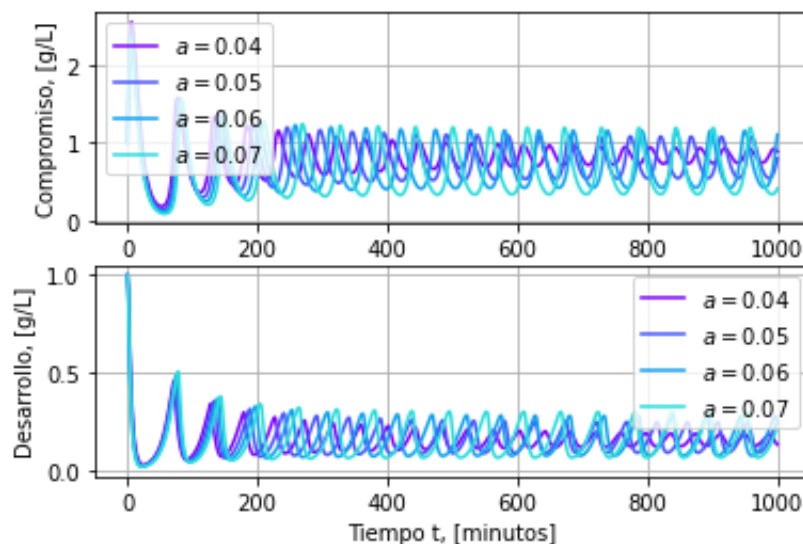


Figura 4.9: Variación del parámetro a . Las gráficas muestran cómo la variación de la tasa de obediencia a afecta las concentraciones de las células en estado de compromiso y desarrollo en un cultivo de levadura. Se observa que un aumento en a promueve el crecimiento de ambas poblaciones celulares a lo largo del tiempo. Estos resultados respaldan la hipótesis de reclutamiento de células en estado de compromiso por parte de las células en desarrollo.

En la gráfica superior (Figura 4.9), que representa la concentración de células en estado de compromiso en función del tiempo, se puede ver que a medida que el valor de a aumenta, la concentración de células en estado de compromiso también aumenta. Esto sugiere que una mayor tasa de obediencia a promueve un mayor crecimiento de las células en estado de compromiso. Por otro lado, en la gráfica inferior (Figura 4.9), que muestra la concentración de células en estado de desarrollo en función del tiempo, se puede apreciar una tendencia similar. A medida que el valor de a aumenta, la concentración de células en estado de desarrollo también aumenta. Esto indica que un aumento en la tasa de obediencia favorece el crecimiento de las células en estado de desarrollo.

Estos resultados son consistentes con la hipótesis planteada en el contexto del modelo y respaldada por trabajos previos, donde se sugiere que la tasa de obediencia a está relacionada

con la capacidad de reclutamiento de células en estado de desarrollo, por parte de las células en estado de compromiso. Un aumento en a permite una mayor comunicación y reclutamiento de células en estado de desarrollo, lo que resulta en un incremento en las concentraciones de ambas poblaciones celulares.

Al analizar las gráficas de la figura 4.10, se puede observar que el cambio en el parámetro a afecta principalmente a la amplitud de las oscilaciones en la concentración de oxígeno disuelto y glucosa. A medida que el valor de a aumenta, las oscilaciones en ambas concentraciones también aumentan en amplitud. Esto implica que un incremento en a conduce a oscilaciones más pronunciadas y marcadas tanto, en la concentración de oxígeno disuelto, como en la concentración de glucosa a lo largo del tiempo.

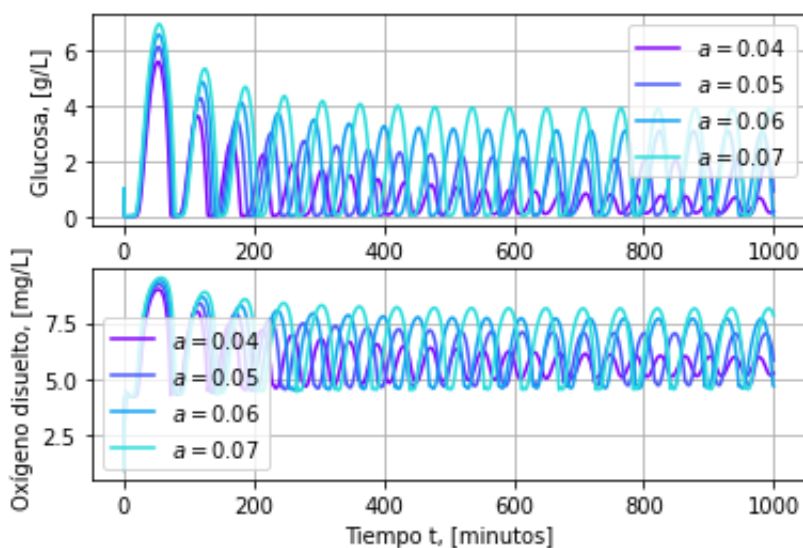


Figura 4.10: Variación del parámetro a . A medida que el valor de la tasa de obediencia a aumenta, se observa un incremento en la amplitud y pronunciación de las oscilaciones en las concentraciones de glucosa y oxígeno disuelto. Esta respuesta se debe a la intensificación de la competencia y el consumo de sustratos por parte de las células en estado de compromiso, influenciado por el parámetro a . En consecuencia, se generan oscilaciones más marcadas en las concentraciones de glucosa y oxígeno disuelto en el quimiostato.

Este comportamiento puede ser explicado por el efecto de la tasa de obediencia, representada por el parámetro a , en la interacción entre las células en estado de compromiso y en estado de desarrollo. A medida que a aumenta, la tasa de reclutamiento de células en estado de desarrollo, por parte de las células en estado de compromiso, se intensifica. Esto resulta en una mayor competencia y consumo de oxígeno y glucosa por parte de las células en estado de compromiso, lo que a su vez genera oscilaciones más pronunciadas en las concentraciones de

ambos sustratos en el cultivo de levadura.

Las gráficas de la figura 4.11 muestran el efecto de la variación de la tasa de dilución d en las oscilaciones de las concentraciones de las células en estado de compromiso y desarrollo. Se observa que a medida que el valor de d aumenta, las amplitudes de las oscilaciones en ambas concentraciones disminuyen. Esto se debe a que una tasa de dilución más alta implica una eliminación más rápida de las células del sistema, lo que limita su acumulación y reduce las fluctuaciones en las concentraciones alcanzadas. Por otro lado, una tasa de dilución más baja permite que las células se acumulen y, por lo tanto, se observan amplitudes de oscilación más grandes.

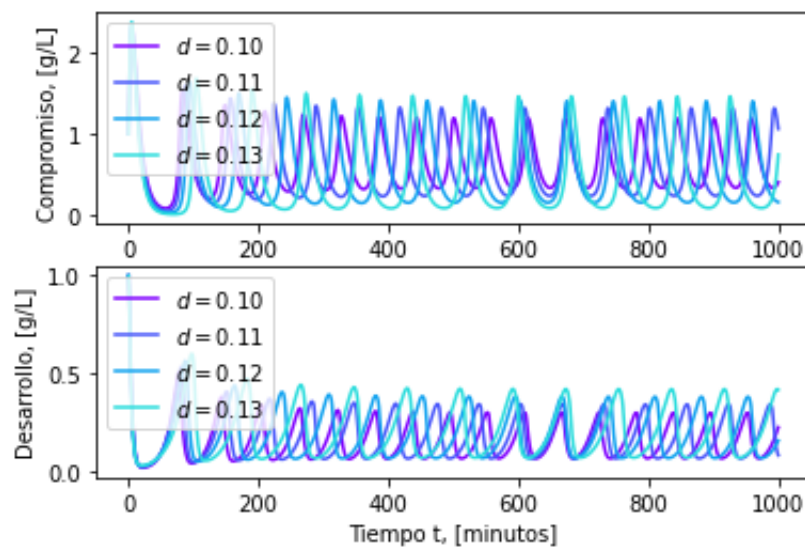


Figura 4.11: Variación del parámetro d . La variación de la tasa de dilución d afecta las amplitudes de las oscilaciones. Un mayor valor de d reduce las amplitudes, mientras que un valor más bajo las aumenta. Esto demuestra la influencia de la tasa de dilución en la dinámica del sistema.

Las gráficas de la figura 4.12 muestran el efecto de la variación de la tasa de dilución d en las oscilaciones de las concentraciones de glucosa y oxígeno disuelto. Se observa que a medida que el valor de d aumenta, las amplitudes de las oscilaciones en ambas concentraciones permanecen, prácticamente inalteradas. En cambio a una mayor tasa de dilución d , se puede observar un desfase en ambas familias de oscilaciones. Respecto de las oscilaciones del oxígeno disuelto es particularmente notable el aumento en el período de disponibilidad, de una concentración de oxígeno disuelto máxima, en la medida en que la tasa de dilución d aumenta.

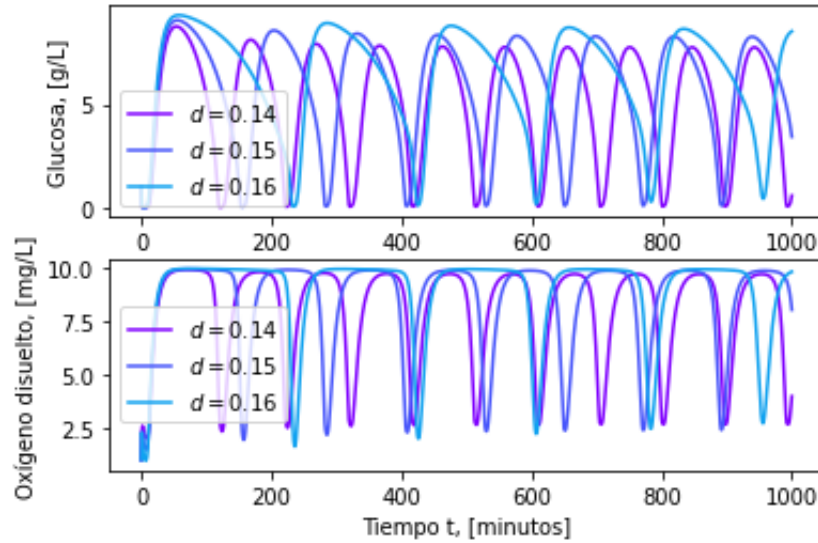


Figura 4.12: Variación del parámetro d . La variación de la tasa de dilución d prácticamente no afecta la amplitud de las oscilaciones de las concentraciones de oxígeno disuelto y glucosa. Si afecta los períodos de ambas oscilaciones, siendo más pronunciado este efecto en las oscilaciones de O . Un mayor valor de d incrementa el período de disponibilidad del oxígeno disuelto en una concentración máxima, para las células.

4.3. Optimización de parámetros

4.3.1. Algoritmos Genéticos para nuestro modelo

A continuación se presenta la tabla que muestra el conjunto de parámetros obtenidos aplicando la técnica de algoritmos genéticos:

Parámetro	Valor
d	0.1807
μ_{\max}	0.2054
ν_{\max}	0.6526
K_{G_D}	0.0726
K_{O_D}	0.1790
K_{G_C}	0.0006
K_{O_C}	0.0079
G_{in}	8.2470
Y_{G_C}	0.6846
Y_{G_D}	0.1425
Y_{O_C}	0.1300
Y_{O_D}	0.8129
k	1.4155
O_{sat}	7.008
a	0.0425

Tabla 4.2: Parámetros depurados después de un proceso evolutivo de 100 generaciones a partir de una población de 100 individuos.

Para producir las figuras (4.13) y (4.14) se usó el módulo `matplotlib.pyplot` de la librería `matplotlib` en conjunto con las librerías `NumPy` y la función `odeint` del módulo `scipy.integrate` de la biblioteca `SciPy`.

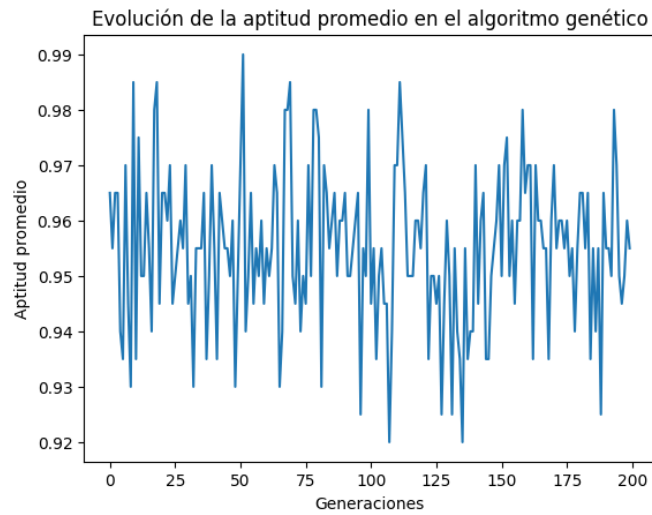


Figura 4.13: Evolución de la aptitud promedio. La gráfica muestra la evolución de la aptitud promedio de los individuos según el número de generaciones.

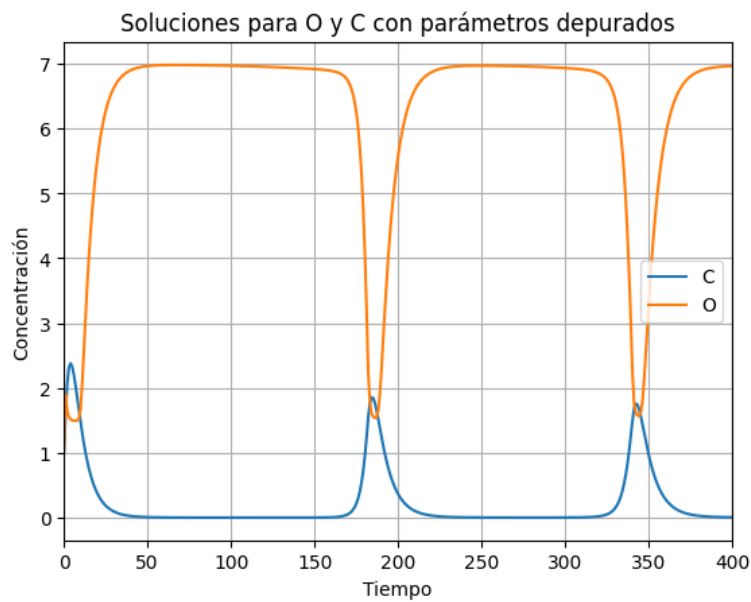


Figura 4.14: Soluciones numéricas con parámetros depurados. La gráfica muestra las soluciones de nuestro modelo de ecuaciones diferenciales usando los parámetros obtenidos con la técnica de optimización de algoritmos genéticos.

4.4. Ajuste de parámetros

Se utilizaron diferentes implementaciones del método de minimización de cuadrados previamente descrito. Para llevar a cabo esta tarea, se utilizaron diversas librerías de Python [72], como Numpy [55] y Scipy [73]. También se ensayó una implementación con Lmfit [54]. Este conjunto de datos experimentales se obtuvo del estudio de Anthony Burnetti, *Coupling of the Yeast Metabolic Cycle and the Cell Division Cycle in Populations and Single Cells* del año 2017, trabajo de tesis en el cual se conceptualiza y cuantifica por vez primera el estado de “Compromiso Celular” (Cell Commitment) [9]. En la primera columna se encuentran los valores de tiempo, mientras que en la segunda y tercera columna se registra la fracción de células comprometidas C y la concentración de oxígeno disuelto O .

Tiempo	Fracción Comprometida	Oxígeno Disuelto
15	0.720	6.7905
30	0.648	6.7703
45	0.548	6.7501
60	0.484	6.7602
75	0.388	6.7602
90	0.316	6.7891
105	0.248	6.7804
120	0.172	6.7508
135	0.308	6.6042
150	0.572	6.3860
165	0.888	6.6186
180	0.832	6.8079
195	0.724	6.8158
210	0.680	6.8079
225	0.628	6.7790
240	0.656	6.7652
255	0.504	6.7587
270	0.452	6.7385
285	0.392	6.7226
300	0.324	6.7385
315	0.256	6.7790
330	0.192	6.7790
345	0.220	6.7587
360	0.212	6.6656
375	0.532	6.3022
390	0.752	6.5146
405	0.644	6.8050
420	0.508	6.8079
435	0.472	6.7992
450	0.408	6.7631

Tabla 4.3: Valores experimentales de la fracción de células en estado de compromiso y concentración de oxígeno disuelto. Datos extraídos de Burnett, 2017 [9].

La Figura 4.15 muestra la curva de oxígeno disuelto versus la fracción de células comprometidas.

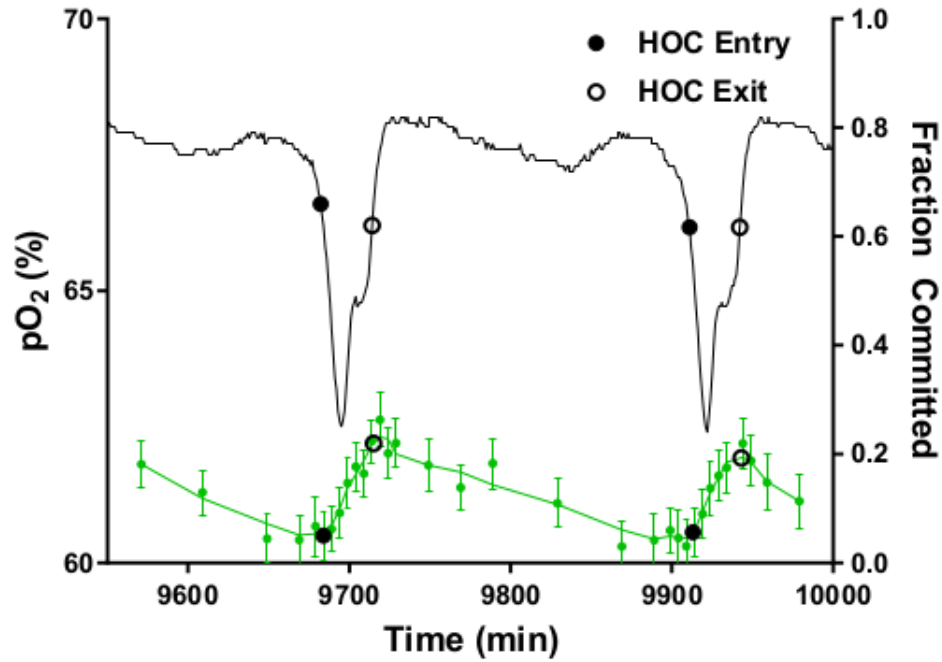


Figura 4.15: Fracción de Células en estado de Compromiso y Oxígeno Disuelto. La figura extraída de Burnetti, 2017 [9] muestra la curva de oxígeno disuelto (pO_2) (curva de color negro) en conjunto con la curva de la fracción de células en estado de compromiso (Fraction Committed) (curva de color verde). Los círculos rellenos y vacíos corresponden a los puntos en donde este grupo de células ingresa al HOC y egresa del HOC respectivamente.

A continuación se muestra una tabla con los parámetros resultante del ajuste de curva.

Parámetro	Valor
d	0.27016
μ_{\max}	0.28644
ν_{\max}	0.73060
K_{G_D}	0.10776
K_{O_D}	0.18152
K_{G_C}	0.00007
K_{O_C}	0.00903
G_{in}	7.90520
Y_{G_C}	0.24420
Y_{G_D}	0.07398
Y_{O_C}	0.14233
Y_{O_D}	0.72640
k	2.12896
O_{sat}	6.72159
a	0.05059

Tabla 4.4: Parámetros ajustados a los datos experimentales obtenidos de Burnetti, 2017 [9]

La figura 4.16 muestra una gráfica comparativa de los puntos experimentales y las curvas generadas por la implementación del modelo de los parámetros ajustados. Para generar esta figura se usó el módulo `matplotlib.pyplot` de la librería `matplotlib` en conjunto con las librerías `Numpy` y la función `solve_ivp` del módulo `scipy.integrate` de la biblioteca `SciPy`.

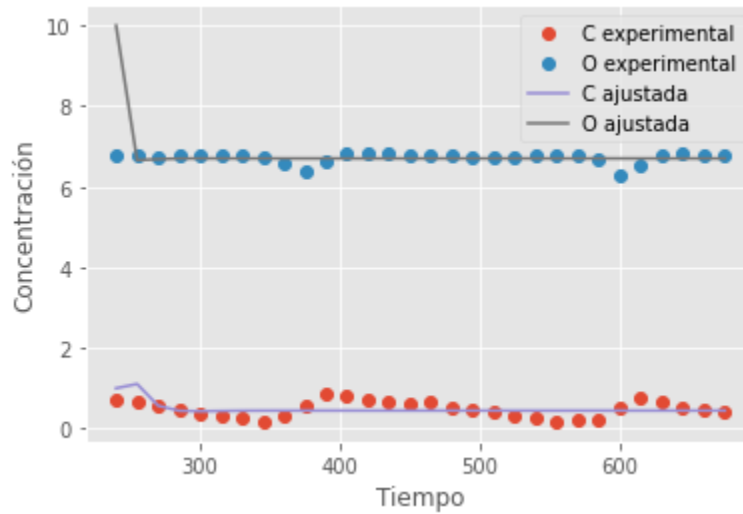


Figura 4.16: Parámetros Ajustados. La figura muestra el resultado del ajuste de curva. Los puntos de color rojo representan los valores experimentales de la fracción de células comprometidas. Los puntos de color azul representan los niveles experimentales de oxígeno disuelto. La línea de color púrpura representa la curva ajustada de la fracción de células comprometidas y la curva de color gris representa la curva ajustada del nivel de oxígeno disuelto.

4.5. Discusión de los resultados

En nuestro trabajo, hemos logrado combinar conocimiento biológico, como la hipótesis de Futcher [21] y el esquema simplificado de Burnetti [10, 9] (Células Comprometidas-Células Refractarias), en un modelo de ecuaciones diferenciales. Este modelo es capaz de reproducir las oscilaciones en el consumo de oxígeno y la dinámica poblacional de las células comprometidas en el ciclo de división celular (CDC).

Aunque el ajuste de curva realizado con parámetros optimizados respecto a un conjunto limitado de datos experimentales no ha sido completamente satisfactorio, creemos que esto se puede solucionar implementando nuevos ajustes de parámetros y considerando conjuntos más variados y ricos de datos.

Nuestro enfoque combina conocimiento biológico y modelización matemática para comprender las dinámicas complejas de los sistemas biológicos. Al incorporar la hipótesis de Futcher [21] y el esquema de Burnetti [10] en nuestro modelo, hemos logrado capturar las oscilaciones en el consumo de oxígeno y modelar la dinámica de las células comprometidas, hecho inédito en los estudios matemáticos de sistemas biológicos.

Es más, con la incorporación de esta idea hemos rescatado un aspecto que no había sido considerado como elemento crucial en investigaciones relacionadas con el comportamiento oscilatorio de los elementos presentes en un cultivo de levadura en condiciones de continuidad y limitación de nutrientes, pero cuya importancia investigadores como Burnetti [9] y Laxman [46] ya habían vislumbrado. Nos referimos a la existencia del estado celular de compromiso y la consecuente segregación poblacional relacionada con dicho estado.

Para mejorar nuestro modelo y obtener resultados más satisfactorios, proponemos combinar diferentes tipos de ajustes con conjuntos más diversos y extensos de datos experimentales. Esto nos permitirá afinar los parámetros y obtener una mejor correspondencia entre el modelo y los datos observados. Recientemente hemos obtenido los datos experimentales del trabajo de Tu et al. [70]. Este rico y variado conjunto de datos podría utilizarse para realizar un nuevo ajuste de curva, al menos, con respecto de los niveles de oxígeno disuelto.

Capítulo 5

Conclusión

5.1. Conclusiones

El modelo matemático produce oscilaciones en la concentraciones del oxígeno disuelto

Nuestro estudio demuestra que el modelo matemático (2.15)-(2.18) es capaz de producir oscilaciones en las variables de estado del sistema. Específicamente, hemos observado oscilaciones significativas en la concentración de oxígeno disuelto y las concentraciones relativas de las poblaciones de células en los estados de compromiso y desarrollo. Estas oscilaciones son el resultado de las complejas interacciones entre los elementos del modelo para cierta configuración de sus parámetros.

Las oscilaciones en el oxígeno disuelto se producen para valores de la tasa de dilución entre $d = 0,1$ y $d = 0,18$

Las oscilaciones en la concentración de oxígeno disuelto son susceptibles de producirse dentro de un rango específico de valores de la tasa de dilución del sistema, en concreto, entre $d = 0,1$ y $d = 0,18$. Este hecho coincide con el reporte de Porro et al.[60]. Durante este intervalo de tasa de dilución, hemos observado la presencia de oscilaciones periódicas en la concentración de oxígeno disuelto, lo que indica la existencia de un comportamiento dinámico complejo en el sistema. Estas oscilaciones son el resultado de las interacciones entre las variables del sistema, como la concentración de biomasa, de sustrato limitante y la concentración de oxígeno disuelto, para cierta configuración de sus parámetros. A medida que la tasa de dilución varía dentro del rango mencionado, se producen cambios en las condiciones de flujo de nutrientes y metabolitos en el sistema. Estos cambios, a su vez, afectan la dinámica del oxígeno disuelto y dan lugar a oscilaciones periódicas en su concentración.

El modelo propuesto da cuenta de una dinámica simplificada del proceso de sincronización de células, aún sin ser ajustado satisfactoriamente al único conjunto de datos disponible

El modelo propuesto captura de manera adecuada una dinámica simplificada del proceso de sincronización de células. Sin embargo, a pesar de su capacidad para describir ciertos aspectos del fenómeno estudiado, no ha logrado ajustarse satisfactoriamente al único conjunto de datos disponible para su validación. Si bien el modelo propuesto no se ha desarrollado con el objetivo de simular y comprender el proceso de sincronización de células para una única cepa de levaduras, se esperaría que una vez ajustados los parámetros con los datos experimentales, no desaparecieran las oscilaciones sostenidas en la disponibilidad de oxígeno disuelto. Para lograr este cometido se ha tenido en cuenta una serie de variables y parámetros que influyen en la dinámica de sincronización, y se ha formulado un sistema de ecuaciones que representa estas interacciones.

A pesar de su fundamentación teórica y la consideración de factores relevantes, al comparar los resultados generados por el modelo con el único conjunto de datos experimentales recopilados, se ha observado cierta discrepancia, cuando se intentó encontrar un conjunto de parámetros fieles al único conjunto de datos disponibles. Las simulaciones no lograron reproducir de manera completamente fiel el comportamiento observado en la experimentación por Burnetti [9], lo que al menos deja un interrogante abierta respecto a la idoneidad del proceso de ajuste de parámetros.

Esta conclusión resalta la necesidad de realizar mejoras, en primer lugar, en la cantidad y variedad de datos experimentales; en segundo lugar en la confección del protocolo de ajuste de parámetros, así como también, pero en menor medida, la realización de modificaciones en el modelo. Otra posibilidad es explorar enfoques alternativos de modelamiento matemático, con el propósito de modelar desde otra perspectiva, la dinámica de sincronización celular. También se hace relevante el considerar las características y riqueza de los datos disponibles, al momento de configurar un nuevo modelo.

5.2. Perspectivas

Ajustar el modelo a distintas cepas de levadura y al conjunto de datos obtenido recientemente del estudio de B. Tu [70]

Encontrar nuevos conjuntos de datos experimentales de distintas cepas de levadura para ajustar los parámetros del modelo a cada uno de ellos. De acuerdo con el estudio de Burnetti [10] existe acoplamiento YMC-CDC a lo largo de diferentes cepas. Se sugiere conseguir la data de la evolución en el tiempo de la concentración de oxígeno disuelto de cada cepa y realizar un ajuste de parámetros para cada una de ellas.

También sería pertinente ajustar en detalle el modelo al conjunto de datos del estudio de B. Tu [70], el cual fue recientemente conseguido.

Desarrollar la hipótesis de la existencia de una subpoblación de células en estado desarrollo

Se sugiere desarrollar la hipótesis de la existencia de una subpoblación de células en estado de desarrollo que sea coherente con el modelo de Fletcher-Burnetti [21, 9]. Esta hipótesis se basa en observaciones y análisis previos que sugieren la presencia de células en un estado particular funcionalidad durante el proceso de sincronización. Para abordar esta perspectiva, se propone diseñar experimentos específicos que permitan identificar y caracterizar las células en estado de desarrollo dentro de la población total. Estos experimentos podrían involucrar técnicas de marcado y seguimiento celular, así como análisis de expresión génica o perfiles metabólicos, similares a los usados por Burnett y Laxman et al.[9, 46].

Relacionar fase G_0 (Estado de reposo de células no gemadas) con células refractarias

Sería pertinente responder a preguntas como ¿qué fracción de las células en estado refractario se encuentran en estado de reposo? ¿Qué fracción de las células en estado refractario se encuentran en estado de desarrollo? ¿Cuál es la relación de las células en estado G_0 con las células en estado de desarrollo?

Relacionar el estado de desarrollo celular con YMC

Existe evidencia de que el YMC actúa como controlador de las células que entran al estado de compromiso, ya que estas parecen ingresar al HOC justo antes de comenzar CDC [9]. ¿Cuál es la relación específica entre las fases del YMC y la dinámica de las células en estado de desarrollo?

Explorar una dinámica que integre los estados de susceptibilidad y refractariedad

Considerar tres estados celulares: Refractarias, susceptibles y comprometidas para elaborar un modelo matemático que incorpore el conocimiento disponible acerca del rol que juegan los grupos de células que no acuden al llamado para iniciar CDC, en la producción de oscilaciones metabólicas.

Capítulo 6

Anexos

6.1. Códigos usados

Los códigos empleados para realizar las figuras y los análisis se encuentran en:
<https://github.com/gferradac/Tesis-2.0.git>

Bibliografía

- [1] Henry D. I. Abarbanel. *Analysis of observed chaotic data*. Springer Science and Business Media, 1996.
- [2] Kathleen T. Alligood, Tim D. Sauer, and James A. Yorke. *Chaos: an introduction to dynamical systems*. Springer, 1996.
- [3] U. M. Ascher and L. R. Petzold. *Computer Methods for Ordinary Differential Equations and Differential-Algebraic Equations*. SIAM, 1998.
- [4] F. G. Bader. Analysis of double-substrate limited growth. *Biotechnol. Bioeng.*, 20:183–202, 1978.
- [5] James A. Barnett, Richard W. Payne, and David Yarrow. *Yeast: Characteristics and Identification*. Cambridge University Press, 3rd edition, 2000.
- [6] Douglas M. Bates and Donald G. Watts. *Nonlinear Regression Analysis and its Applications*. Wiley, 1988.
- [7] K.H. Bellgardt. Analysis of synchronous growth of baker’s yeast. part i: Development of a theoretical model for sustained oscillations. *Journal of Biotechnology*, 35:19–33, 1994.
- [8] Erik M. Boczko, Tomas Gedeon, Chris C. Stowers, and Todd R. Young. Ode, rde and sde models of cell cycle dynamics and clustering in yeast. *Journal of biological dynamics*, 4:328–45, 2010.
- [9] Anthony J. Burnetti. *Coupling of the Yeast Metabolic Cycle and the Cell Division Cycle in Populations and Single Cells*. PhD thesis, University Program in Genetics and Genomics Duke University, 2017.
- [10] Anthony J. Burnetti, Mert Aydin, and Nicolas E. Buchler. Cell cycle start is coupled to entry into the yeast metabolic cycle across diverse strains and growth rates. *Molecular Biology of the Cell*, 27:64–74, 2016.
- [11] L. Cazzador. Analysis of oscillations in yeast continuous cultures by a new simplified model. *Bulletin of mathematical biology*, 53:685–700, 1991.

- [12] L. Cazzador, L. Mariani, E. Martegani, and L. Alberghina. Structured segregated models and analysis of self-oscillating yeast continuous cultures. *Bioprocess Engineering*, 5:175–180, 1990.
- [13] N. Chen, M. Hu, and R. Hofestädt. A systematic petri net approach for multiple-scale modeling and simulation of biochemical processes. *Applied biochemistry and biotechnology*, 164:338–52, 2011.
- [14] J.P. Corriou. *Numerical Methods and Optimization: Theory and Practice for Engineers*. Springer Optimization and Its Applications. Springer International Publishing, 2022.
- [15] Philip S. Crooke and Robert D. Tanner. Hopf bifurcations for a variable yield continuous fermentation model. *International Journal of Engineering Science*, 20(3):439–443, 1982.
- [16] Ph. Duboc, I. Marison, and U. Von Stockar. Physiology of *saccharomyces cerevisiae* during cell cycle oscillations. *Journal of Biotechnology*, 51:57–72, 1996.
- [17] A. E. Eiben and J. E. Smith. Introduction to evolutionary computing. *Natural Computing Series*, 2003.
- [18] G. Bard Ermentrout and Leah Edelstein-Keshet. Cellular automata approaches to biological modeling. *Journal of Theoretical Biology*, 160(1):97–133, 1993.
- [19] Igor N. Ferreira and Jennifer V. Ross. Analyzing oscillatory patterns in biological systems: A tutorial on fourier transform techniques. *Journal of Biological Dynamics*, 14(1):269–291, 2020.
- [20] R.K. Finn and Wilson R.E. Fermentation process control, population dynamics of a continuous propagator for microorganisms. *J. Agric. Food Chem.*, 2,2, 66-69.
- [21] Bruce Futcher. Metabolic cycle, cell cycle, and the finishing kick to start. *Genome Biology*, 7:107.1–107.5, 2006.
- [22] Alan Garfinkel, Jane Shevtsov, and Gina Guo. *Modeling Life: The Mathematics of Biological Systems*. Springer, 2017.
- [23] David E. Goldberg. *Genetic Algorithms in Search, Optimization, and Machine Learning*. Addison-Wesley, 1989.
- [24] Albert Goldbeter and Daniel E. Koshland. An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(11):6840–6844, 1981.
- [25] John Guckenheimer and Philip Holmes. *Nonlinear oscillations, dynamical systems, and bifurcations of vector fields*. Springer, 1983.

- [26] K.P. Haderer and J. Müller. *Cellular Automata: Analysis and Applications*. Springer Monographs in Mathematics. Springer International Publishing, 2017.
- [27] E. Hairer, S. P. Norsett, and G. Wanner. *Solving Ordinary Differential Equations I: Nonstiff Problems*. Springer-Verlag, 1993.
- [28] Ernst Hairer and Gerhard Wanner. Solving ordinary differential equations ii: Stiff and differential-algebraic problems. *Springer Series in Computational Mathematics*, 14, 1993.
- [29] Jérôme Harmand, Claude Lobry, Alain Rapaport, and Tewfik Sari. *The Chemostat. Mathematical Theory of Microorganism Cultures*. ISTE, London and Wiley, Hoboken, 2017.
- [30] Mostafa Herajy, Fei Liu, and Monika Heiner. Efficient modelling of yeast cell cycles based on multisite phosphorylation using coloured hybrid petri nets with marking-dependent arc weights. *Nonlinear Analysis: Hybrid Systems*, 27:191–212, 2018.
- [31] Enrique Herrero, Martí Aldea, and Carme Gallego. El ciclo celular de las levaduras: ¿un buen modelo eucariótico? *Organización y evolución del genoma eucariota.*, pages 115–128, 1996.
- [32] Morris W. Hirsch, Stephen Smale, and Robert L. Devaney. *Differential Equations, Dynamical Systems, and an Introduction to Chaos*. Academic Press, 3rd edition edition, 2012.
- [33] John H. Holland. *Adaptation in natural and artificial systems: an introductory analysis with applications to biology, control, and artificial intelligence*. 1992.
- [34] E. Jones, T. Oliphant, and P. Peterson. SciPy: Open source scientific tools for Python. <https://www.scipy.org/>, 2020. Accedido el 27 de mayo de 2023.
- [35] K.D. Jones and D. S. Kompala. Cybernetic model of the growth dynamics of *saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous cultures. *Journal of Biotechnology*, 71:105–31, 1999.
- [36] Mustaffa Kadir, Nor Azimah Mohd Zain, and Farediah Ahmad. Optimization of oscillatory oxygen consumption in yeast cultures using numerical simulations and metaheuristic algorithms. *Biochemical Engineering Journal*, 145:35–45, 2019.
- [37] Holger Kantz and Thomas Schreiber. *Nonlinear time series analysis*. Cambridge University Press, 2004.
- [38] H. Kaspar von Meyenburg. Energetics of the budding cycle of *saccharomyces cerevisiae* during glucose limited aerobic growth. *Archiv für Mikrobiologie*, 66, 1969.
- [39] James Kennedy and Russell Eberhart. Particle swarm optimization. *Proceedings of IEEE International Conference on Neural Networks*, 4:1942–1948, 1995.

- [40] M. Keulers, T. Suzuki, A. D. Satroutdinov, and H. Kuriyama. Autonomous metabolic oscillation in continuous culture of *saccharomyces cerevisiae* grown on ethanol. *FEMS Microbiology Letters*, 142:253–8, 1996.
- [41] R. R. Klevecz, J. Bolen, G. Forrest, and D. B. Murray. A genomewide oscillation in transcription gates dna replication and cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:1200–5, 2004.
- [42] Zheng Kuang, Ling Cai, Xuekui Zhang, Hongkai Ji, Benjamin P Tu, and Jeff D Boeke. High-temporal-resolution view of transcription and chromatin states across distinct metabolic states in budding yeast. *Nature Structural and Molecular Biology*, 21:854–863, 2014.
- [43] M. T. Küenzi and A. Fiechter. Regulation of carbohydrate composition of *saccharomyces cerevisiae* under growth limitation. *Archiv für Mikrobiologie*, 84:254–265, 1972.
- [44] Hannu Laaksonen, Jouni Hirvonen, and Timo Laaksonen. Cellular automata model for swelling-controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 380(1):25–32, 2009.
- [45] J. Derek Lambert. *Numerical Methods for Ordinary Differential Systems: The Initial Value Problem*. John Wiley & Sons, 1991.
- [46] S. Laxman, B.M. Sutter, and B.P. Tu. Behavior of a metabolic cycling population at the single cell level as visualized by fluorescent gene expression. *PLoS ONE*, 5, 2010.
- [47] Edward N. Lorenz. Deterministic nonperiodic flow. *Journal of the Atmospheric Sciences*, 20(2):130–141, 1963.
- [48] Stephen Lynch. *Dynamical Systems with Applications using Python*. Birkhäuser, 2018.
- [49] Robert M. May. Simple mathematical models with very complicated dynamics. *Nature*, 261(5560):459–467, 1976.
- [50] Jacques Monod. The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3:371–94, 1949.
- [51] Luke Morgan, Gregory Moses, and Todd Young. Coupling of the cell cycle and metabolism in yeast cell-cycle-related oscillations via resource criticality and checkpoint gating. *Letters in Biomathematics*, 5:113–128, 2018.
- [52] D.B. Murray, R.R. Klevecz, and D. Lloyd. Generation and maintenance of synchrony in *saccharomyces cerevisiae* continuous culture. *Exp Cell Res*, 287:10–5, 2003.
- [53] J. D. Murray. *Mathematical Biology I. An Introduction*. 2002.

- [54] Matthew Newville, Till Stensitzki, Daniel B. Allen, Antonino Ingargiola, and Esen E. Alp. Lmfit: Non-linear least-squares minimization and curve fitting for python. *Journal of Open Source Software*, 7(7):1237, 2022.
- [55] Travis E. Oliphant. Numpy: A guide to numpy. *Trelgol Publishing*, 1(1):1–105, 2006.
- [56] Lawrence Osborne. *The Accidental Connoisseur: An Irreverent Journey Through the Wine World*. North Point Press, 2004.
- [57] A. Panek. Function of trehalose in baker’s yeast (*saccharomyces cerevisiae*). *Arch Biochem Biophys*, 100:422–5, 1963.
- [58] Pratap R Patnaik. Oscillatory metabolism of *saccharomyces cerevisiae*: an overview of mechanisms and models. *Biotechnol Adv*, 3:183–92, 2003.
- [59] Arkady Pikovsky, Michael Rosenblum, and Jurgen Kurths. *Synchronization: A Universal Concept in Nonlinear Sciences*. Cambridge University Press, 2003.
- [60] Danilo Porro, Enzo Martegani, Bianca Maria Ranzi, and Lilia Alberghina. Oscillations in continuous cultures of budding yeast: A segregated parameter analysis. *Biotechnol Bioeng.*, 32:411–417, 1988.
- [61] William H. Press, Saul A. Teukolsky, William T. Vetterling, and Brian P. Flannery. *Numerical Recipes 3rd Edition: The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press, 2007.
- [62] W. Reisig. *Understanding Petri Nets: Modeling Techniques, Analysis Methods, Case Studies*. Springer Berlin Heidelberg, 2016.
- [63] J. B. Robertson, C. C. Stowers, E. Boczko, and C. H. Johnson. Real-time luminescence monitoring of cell-cycle and respiratory oscillations in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105:17988–93, 2008.
- [64] Roger Scruton. *Bebo, luego existo*. Rialp, 2017.
- [65] H. H. Silljé, E. G. ter Shure, A. J. Rommens, P. G. Huls, C. L. Woldringh, A. J. Verkleij, J. Boonstra, and C.T. Verrips. Effects of different carbon fluxes on g1 phase duration, cyclin expression, and reserve carbohydrate metabolism in *saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 179:6560–5, 1997.
- [66] Nikolai Slavov, Joanna Macinskas, Amy Caudy, and David Botstein. Supporting information for metabolic cycling without cell division cycling in respiring yeast. 11 2011.
- [67] Chris C. Stowers, Todd R. Young, and Erik M. Boczko. The structure of populations of budding yeast in response to feedback. *Hypotheses in the Life Sciences*, 1:71–84, 2011.

- [68] Steven H. Strogatz. *Nonlinear dynamics and chaos: with applications to physics, biology, chemistry, and engineering*. Westview Press, 2000.
- [69] B. P. Tu and S.L. McKnight. The yeast metabolic cycle: insights into the life of a eukaryotic cell. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 72:339–43, 2007.
- [70] Benjamin P. Tu, Andrzej Kudlicki, Maga Rowicka, and Steven L. McKnight. Logic of the yeast metabolic cycle: Temporal compartmentalization of cellular processes. *Science*, 310:1152–1158, 2005.
- [71] John J. Tyson, Kevin C. Chen, and Bela Novak. Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Current opinion in cell biology*, 15(2):221–231, 2003.
- [72] Guido Van Rossum and Fred L. Drake. *Python Programming Language*. Python Software Foundation, Wilmington, DE, USA, 3rd edition, 2009.
- [73] Pauli Virtanen, Ralf Gommers, Travis E. Oliphant, Matt Haberland, Tyler Reddy, David Cournapeau, Evgeni Burovski, Pearu Peterson, Warren Weckesser, Jonathan Bright, et al. Scipy 1.0: Fundamental algorithms for scientific computing in python. *Nature Methods*, 17(3):261–272, 2020.
- [74] Wikipedia. Gemación — wikipedia, la enciclopedia libre, 2024. [Internet; descargado 18-enero-2024].
- [75] Ying Xu, Chao Ma, Yiran Zhang, Yan Wang, and Hong Chen. Investigation of oscillatory oxygen consumption in yeast chemostat cultures: A dynamic optimization approach. *Biochemical Engineering Journal*, 157:107544, 2020.