

UNIDAD IZTAPALAPA

**EFFECTO DE LAS FLUCTUACIONES INTERNAS EN EL  
CRECIMIENTO DEL CULTIVO DE *Azotobacter vinelandii*  
Y EN LA SÍNTESIS DE ALGINATO**  
TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN  
CIENCIAS (INGENIERÍA QUÍMICA) PRESENTA:  
M.C. Claudia T. Gallardo Rivera.

DIRECTOR: Dra. Elizabeth Salinas Barrios  
CODIRECTOR: Dr. Enrique Galindo Fentanes

## AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por permitirme disfrutar la experiencia de aprender.

A mi esposo Gabriel y mis hijos Fátima y Santiago:

Gracias amor mío por tu paciencia y comprensión. A mis hijos con amor.

A mi familia:

Por su amor y apoyo incondicional. Gracias madre mía, papá y Raquel.

A la familia Báez-González

Por su paciencia y apoyo especialmente a la Sra. Dominga González Palma.

Agradezco al CONACYT por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto.

A la Dra. Elizabeth Salinas Barrios:

Por su entrega y compromiso para la realización de este proyecto. Gracias por ser un ejemplo de amor y entusiasmo por la vida en todo momento. Le agradezco que además de fungir como mi asesora muchas veces fue mi madre.

Al Dr. Enrique Galindo Fentanes:

Agradezco al Dr. Enrique Galindo por la codirección y apoyo que me brindó durante la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Carlos F. Peña Malacara:

Por su apoyo incondicional en la realización de este proyecto.

A los miembros del Jurado:

Dr. Leonardo Dagdud Lima

Dr. Sergio Revah Moiseev

Dr. Mariano López de Haro

Dr. Carlos Peña Malacara

Por las observaciones que contribuyeron a enriquecer este trabajo.

### **Resumen**

Se presenta una descripción estocástica de los efectos debidos a las fluctuaciones internas en el crecimiento de la biomasa de *A. vinelandii* en un birreactor en términos de una ecuación maestra no lineal (*ME*). Se utiliza el método de desarrollo sistemático de van Kampen para obtener una solución analítica, pero aproximada de la *ME*. Se deduce el comportamiento temporal de los promedios de las concentraciones de biomasa, alginato y sacarosa, así como el de sus fluctuaciones alrededor de los valores medios, para diferentes valores de la tensión de oxígeno disuelto (*DOT*). Se optimizan los valores de algunos de los parámetros que aparecen en las ecuaciones estocásticas y dinámicas, de manera que el error estadístico promedio entre resultados teóricos y experimentales sea mínimo tanto para los promedios como para las fluctuaciones. Se comparan los resultados analíticos para estas cantidades con los valores experimentales reportados para *A. vinelandii*. Se encuentra que el error cuadrático promedio total varía entre 0.17- 0.29. Se discuten los alcances, ventajas y limitaciones de este enfoque.

### **Abstract**

A stochastic description of the effects of internal fluctuations on the biomass growth of *A. vinelandii* in a bioreactor, is given in terms of a nonlinear master equation (*ME*). We use van Kampen's systematic expansion method to obtain an approximate but analytic solution of the *ME*. We predict the time behavior of the average values of the concentrations of biomass, alginate and sucrose, as well as the fluctuations of biomass around its average value, for different values of dissolved oxygen tension (*DOT*). We optimize the values of some of the parameters involved in the stochastic and dynamic equations, so that the statistical average error between theoretical and experimental results for both, average and fluctuations, is a minimum. We compare our analytical results for these quantities with those reported experimental measurements for *A. vinelandii*. We find that the total quadratic average error varies between 0.17- 0.29. The scope, advantages and limitations of our approach are discuss.

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>PRODUCCIÓN DE ALGINATO POR <i>Azotobacter vinelandii</i></b>	<b>8</b>
2.1	Alginatos	9
2.1.2	Propiedades físicas	10
2.1.3	Propiedades reológicas	11
2.2	Proceso de fermentación con <i>Azotobacter vinelandii</i> para producir alginato	12
2.2.1	Sistema experimental	17
2.2.1.1	Velocidad específica de crecimiento	20
2.2.1.2	Efecto de la TOD constante en la producción de alginato	20
2.2.2	Ecuaciones macroscópicas para el proceso de fermentación	22
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTOS ESTOCÁSTICOS</b>	<b>27</b>
3.1	Fluctuaciones	30
3.2	Fundamentos de procesos estocásticos	30
3.2.1	Variable estocástica y momentos de la distribución	30
3.2.2	Densidad de probabilidad condicional	31
3.3	Procesos estocásticos	32
3.4	Proceso markoviano	33
3.5	Ecuación de Fokker- Planck	34
3.6	Ecuación Maestra	36
3.7	Ecuación de Langevin	38
<b>4</b>	<b>MOVIMIENTO BROWNIANO</b>	<b>40</b>
4.1	Descripción de Einstein	43
4.2	Ecuación de Smoluchowski	46
4.3	Ecuación de Langevin	47
4.4	Ecuación de Fokker- Planck	51
4.5	Ecuación Maestra para el movimiento Browniano	53
4.5.1	Formulación del modelo estocástico	53
4.5.2	Ecuación Maestra	54

<b>5</b>	<b>MODELO ESTOCÁSTICO PARA LA PRODUCCIÓN DE ALGINATO</b>	<b>57</b>
5.1	Modelo estocástico	60
5.1.1	Ecuación Maestra	61
5.2	Método de expansión sistemática de van Kampen	64
5.3	Ecuaciones para los momentos de $\Pi(\zeta, t)$	66
5.4	Varianza y fluctuación relativa	69
5.5	Resultados	70
<b>6</b>	<b>MODELO ESTOCÁSTICO PARA LA DISTRIBUCIÓN DE PESOS MOLECULARES</b>	<b>74</b>
6.1	Ecuación Maestra	76
6.2	Desarrollo sistemático de la ecuación Maestra	77
6.3	Primeros Momentos	80
6.4	Discusión	81
6.5	Ajuste de los datos experimentales de la DPM	81
	<b>CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS</b>	<b>85</b>
	<b>REFERENCIAS</b>	<b>88</b>
	<b>APÉNDICE A</b>	<b>98</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

La producción de alginato ocurre principalmente en algas como *Macrocystis pyrifera* y *Cystoseira C. agardh* lo sintetizan también bacterias como *Pseudomonas* y *Azotobacter vinelandii*. El alginato tiene diversas aplicaciones debido a su utilización como agente gelificante, espesante, estabilizante y emulsionante. Estas propiedades dependen de su composición química, sustituyentes orgánicos e inorgánicos y sus propiedades físicas: tales como el peso molecular, la actividad emulsionante, las propiedades reológicas, la formación de geles y la captación de metales pesados.

Los alginatos están constituidos por residuos de ácidos  $\beta$ -D-manurónico (M) y  $\alpha$ -L-gulurónico (G) (Gacesa, 1998; Rehm y Valla, 1997). En particular, los alginatos extraídos de algas cambian su composición química según el lugar donde se localice y el tejido. Dada la diversidad de su composición y el escaso control sobre ella, el cultivo de *Azotobacter vinelandii* es una fuente alternativa para su síntesis; debido a su inocuidad, es el más utilizado para el desarrollo de procesos biotecnológicos. De esta manera, es posible producir alginato con propiedades similares al obtenido por algas pero con características específicas, como es el caso, de los alginatos de alta pureza que son usados en el área farmacéutica y alcanzan un precio de USD \$40,000 / Kg (Rehm y Valla, 1997).

El cultivo de *Azotobacter* ha sido estudiado a través de un proceso de fermentación utilizando distintas velocidades de agitación; fuentes de carbono, temperaturas y tensión de oxígeno disuelto, TOD. La TOD es definida en función de la saturación de oxígeno en la solución, la cual es la concentración de oxígeno que puede disolverse en una solución cuando se burbujea aire (7.5 - 8 mg/L). Se ha evaluado el efecto de componentes del medio de cultivo; la preparación del inóculo y la influencia de las sustancias presentes en él. Así como otros aspectos relacionados con su fisiología y la modificación genética de la bacteria (Zapata-Vélez y Trujillo-Roldán, 2010; Mejía y col., 2009; Galindo y col., 2007; 2008; Peña y col., 2006; Priego-Jiménez y col., 2005; Trujillo-Roldán y col., 2004; Reyes y col., 2003; Segura y col., 2003; Trujillo-Roldán y col., 2001; Beale y Foster, 1996; Clementi y col., 1995; Brivonese y Sutherland, 1989; Annison y Couperwhite, 1986; Chen y col., 1985; Nigel y col., 1983). De los factores anteriores, la TOD es un parámetro clave en la producción de alginato y el peso molecular promedio. Cuando los niveles de TOD son bajos se promueve la formación de un polímero de reserva intracelular llamado polihidroxibutirato (PHB). En niveles intermedios (2% -5% de TOD) se favorece la síntesis de alginato y arriba del 5% la concentración de biomasa final es mayor respecto al 2% y el 3% de TOD (Horan y col., 1983).

Las variaciones en la concentración de oxígeno representan un problema que afecta los parámetros de producción, la producción en sí misma y la calidad del alginato. Por otro lado, los trabajos de escalamiento (De León-Rodríguez y col., 2010) sugieren que la limitación de oxígeno es crucial en estos parámetros (Mejía y col., 2009; Galindo y col., 2007). Trujillo-Roldán y col. (2001; 1999) han analizado el efecto de la TOD constante (en un intervalo del 3% al 5%) y oscilante en el cultivo de *Azotobacter vinelandii*, a través de un modelo macroscópico. Las concentraciones de biomasa, alginato y sacarosa (fuente de carbono) en la fase exponencial varían continuamente en el tiempo y obedecen leyes que se obtienen de principios generales de conservación así como de relaciones constitutivas fenomenológicas. Debe señalarse que esta descripción corresponde a una aproximación,

porque no toma en cuenta las fluctuaciones en los valores de las variables. Esta descripción es más precisa cuanto mayor sea el número de entidades en el sistema y mientras se aplique en una escala de tiempo grande comparado con tiempos microscópicos característicos. Experimentalmente el cultivo por lote se desarrolla en un bioreactor de 1 L, que opera a una temperatura de 29°C, una velocidad de agitación de 700 rpm y una velocidad de flujo del aire de 800 vvm [ml aire / (ml medio min)]. El cultivo por lote se define como aquel que se realiza sin intercambio de materia con los alrededores, salvo lo referente a los gases (aireación, producción de CO<sub>2</sub> y otros gases), los que se suministran y retiran del sistema en forma continua. En este cultivo se cargan inicialmente los nutrientes y luego se inocula con una determinada cantidad de células viables.

En este trabajo, se modifica el modelo macroscópico propuesto por Trujillo- Roldán (1999), al incorporar el término asociado con la producción de alginato en la ecuación que describe el consumo de sacarosa (Cap.2, Ec. 2.9). El conocimiento de la cinética del cultivo permite la predicción de las cinéticas de fermentación, la evaluación de las velocidades, los rendimientos y entrega información útil para establecer estrategias de producción y optimización del proceso (Acevedo y col., 2002). Los parámetros del modelo se optimizan y se comparan con los valores experimentales, reportados para el cultivo. Se encontró que el error cuadrático medio total varía entre 0.17%-0.29%.

La importancia de las variaciones de TOD en la dinámica del sistema descrito previamente (Sección 2.2.1), se determina con el cálculo del orden de magnitud de la fluctuación. La descripción macroscópica correspondiente es solo una aproximación, dado que no toma en cuenta las fluctuaciones en los valores de las variables. Las *fluctuaciones* son desviaciones alrededor de un valor promedio que ocurren en intervalos de tiempo pequeños o en un volumen pequeño; esto último se debe a la condición del límite termodinámico: cuando mayor es el número de entidades en un sistema,  $N$  (o el volumen,  $V$ ) y la relación  $N/V$  es finita las fluctuaciones son despreciables. Para introducir de manera natural el *concepto de fluctuaciones* Bogolyubov (1962) describe una jerarquía de tiempos de relajación, según la cual, el sistema pasa por tres etapas ó regímenes en su evolución al equilibrio. En el primer régimen la dinámica de las partículas en un intervalo de tiempo  $\tau_c$  (tiempo de colisión) se describe a través de un conjunto de ecuaciones para cada una; en consecuencia el número de variables implicadas es grande. Cuando el sistema relaja a un régimen cinético  $t > \tau_c$ , las variables se reducen y su dinámica se describe a través de una función de distribución para una partícula en un espacio fase. Si el sistema continúa relajándose alcanzará el régimen hidrodinámico, las variables se reducen aún más, y su dinámica se estudia a través del comportamiento promedio de las partículas utilizando las ecuaciones hidrodinámicas. En este régimen *la descripción es macroscópica (estadística) pero aproximada, porque las fluctuaciones alrededor de su valor promedio son y se mantienen pequeñas, de tal forma, que pueden ser despreciadas* (Zoltán y col., 2005; Salinas- Rodríguez, 1983; Gardiner, 1983). **El valor promedio esta asociado a una función de distribución.** Debido a lo anterior, el conocimiento de la magnitud de las fluctuaciones y el estudio de su efecto en la dinámica del sistema, determina la validez de una descripción exclusivamente macroscópica (Haken, 1975; Family y Landau, 1984; Salinas-Rodríguez y col., 1998).

En el sistema de estudio (Sección 2.2.1.) las fluctuaciones en la tensión de oxígeno disuelto, TOD, se deben a cambios rápidos en el tiempo, alrededor de un valor promedio. Cuyo valor (3%TOD) corresponde a la mayor producción de alginato sintetizado bajo las condiciones especificadas en el trabajo de Trujillo-Roldán y col., (2001) (Figs. 2.6, 2.8 y 2.9). La evolución de estas fluctuaciones influye en la reproducción del cultivo, el valor promedio del peso molecular ponderado en el peso,  $\overline{M_w}$  y su distribución de pesos moleculares, DPM asociada. La dinámica de estas fluctuaciones sólo se puede determinar a través de una descripción estocástica\*. La evolución de las fluctuaciones obtenida de un modelo estocástico es útil para explicar la incertidumbre de las curvas de crecimiento (Ponciano y col., 2005). En otros sistemas, como el cultivo de levadura *las fluctuaciones internas "inherentes al sistema"* tienen un origen desconocido, sin embargo, se pueden relacionar a la ruta metabólica de la célula. Otros fenómenos periódicos, tales como las oscilaciones en la ruta glicolítica pueden ser descritos mediante un modelo estocástico elemental para dos especies (Heinrich y col., 1977). En un cultivo continuo las fluctuaciones en la concentración de biomasa son útiles para controlar el nivel de biomasa, donde su inducción es deseable para identificar un comportamiento caótico y oscilatorio (Davey y col., 1996). En la actualidad el uso del modelo estocástico se ha incrementado respecto al modelo macroscópico debido a la heterogeneidad de los sistemas biológicos sobre un rango de escalas de organización (Darren, 2009). El modelo estocástico acoplado con un método estadístico riguroso facilita la comprensión de los procesos microbianos fundamentales.

Debido a lo anterior, el objetivo de este trabajo es proponer y desarrollar un modelo estocástico basado en una ecuación Maestra Markoviana no-lineal (van Kampen, 2003). En este contexto, los procesos de reproducción y muerte de bacterias son eventos estocásticos, que generan la evolución de la densidad de probabilidad condicional. Con este modelo, se predicen las cinéticas experimentales obtenidas por Trujillo- Roldán, y col., (2001) (Cap 2, Sec. 2.2.2) y la evolución de las fluctuaciones en la concentración de biomasa alrededor de los valores medios, de las cantidades correspondientes a la concentración de biomasa,  $x$  alginato,  $p$  y sacarosa,  $s_T$  para diferentes valores de TOD (3-5%) (Cap 5).

*Las fluctuaciones en la concentración de biomasa se suponen inherentes al sistema puesto que la reproducción y muerte de las bacterias ocurren en forma probabilística. Alguna causa que puede originarlas se atribuye a las fluctuaciones en la concentración de oxígeno, contenidas en los parámetros  $\beta$  y  $\gamma$  de las tasas de reproducción y muerte. Sus modelos correspondientes se suponen procesos estocásticos Markovianos y se incorporan en la ecuación Maestra a través de las densidades de probabilidad de transición.*

La contribución principal de esta tesis, ofrece un punto de vista alternativo para estudiar la producción de alginato sintetizado por *Azotobacter vinelandii*. Mediante un modelo estocástico basado en la ecuación Maestra Markoviana no-lineal, ***se obtiene el***

---

\* La descripción estocástica en términos de las variables macroscópicas es llamada mesoscópica. Este término fue introducido por van Kampen para describir un sistema utilizando las leyes macroscópicas y las fluctuaciones alrededor de las variables implicadas en estas.

**comportamiento de los valores medios** de las cantidades correspondientes a la concentración de biomasa, alginato y sacarosa. Estas cantidades, se comparan con los valores experimentales reportados para el cultivo; el error cuadrático medio total varía entre 0.17%-0.29%. Además se predice la evolución de las fluctuaciones en la concentración de biomasa alrededor de sus valores medios, para diferentes TOD (3%-5%). **Las fluctuaciones en la concentración de biomasa son fluctuaciones internas porque se generan por el mismo sistema. Se obtienen a partir del segundo momento de la distribución. En consecuencia, su evolución se encuentra en la evolución de la desviación estándar** que experimentalmente no es posible predecir; ya que únicamente se obtienen las desviaciones de cada punto experimental hasta donde se realizan los experimentos. La dinámica de las fluctuaciones es importante para determinar la reproducibilidad de los experimentos y sugerir modificaciones en la fermentación. El sistema analizado ha sido ampliamente estudiado desde el punto de vista experimental, sin embargo el uso de modelos matemáticos para su descripción es limitado. En la mayoría de los casos, se utilizan los modelos clásicos como la ecuación de Malthus- Verhulst y la ecuación de Leudeking- Piret para estudiar polímeros como la goma xantana, polisacáridos de *Pseudomonas sp* y el alginato (Shu y Yang, 1991; Weiss y Ollis, 1980; Leudeking y Piret, 1959). En particular, para la producción de alginato el consumo de sacarosa está asociado con la producción de biomasa y del polímero. En otros trabajos, modifican estos modelos e incorporan factores como la relación C/N, y el efecto de algunos componentes del medio. (Trujillo-Roldán y col., 1999; Parente y col., 1998; Clementi y col., 1995; Klimek y Ollis, 1980;).

El modelo estocástico es idealizado pero considera los aspectos esenciales del cultivo por lote de *Azotobacter vinelandii*. Las hipótesis y características más importantes se mencionan a continuación:

i) En el cultivo por lote todas las bacterias se reproducen a intervalos regulares; no existen sustancias inhibitoras del crecimiento y la composición del medio es simple en cuanto a las fuentes de carbono y nitrógeno. El cultivo sintetiza alginato,  $p$  asociado a su crecimiento y consume sacarosa,  $s_T$  como la fuente de carbono.

ii) El inóculo contiene un número inicial de bacterias,  $n_0(t_0)$  que esencialmente crecen y adquieren la madurez metabólica para reproducirse.

iii) En el bioreactor (1 L) las bacterias se encuentran homogéneamente distribuidas en un medio de cultivo Burk modificado, esto es, **en una primera aproximación se considera que el número de bacterias,  $n$  no es función de la posición.**

iv) La variable aleatoria que caracteriza el sistema es el número de bacterias  $n$  presentes en el bioreactor al tiempo  $t$ . Se define por un espacio de estados cuyos valores están comprendidos desde el número de bacterias presentes en el inóculo hasta el número de bacterias presentes al término de la fase exponencial  $\{n_0(t_0), \dots, n_i(t_i)\}$ , y la densidad de probabilidad condicional  $p_n = P(n, t | n_0, t_0)$ .  $p_n$  representa la probabilidad de encontrar  $n$  bacterias a un tiempo  $t$ , dado que se tenían  $n_0$  al tiempo inicial  $t_0$ .

v) En este trabajo la ecuación Maestra se obtiene en base a una ecuación logística (Ec. 5.4). La evolución de  $p_n$  se debe a los procesos de reproducción y muerte, que ocurren durante la fase exponencial, y se representan a través de las correspondientes probabilidades de transición  $G(n)$  y  $R(n)$ . En general estas funciones aleatorias dependen de  $n$ . La ecuación Maestra como una ecuación de balance que gobierna la evolución temporal de la densidad de probabilidad condicional, tiene una interpretación física más directa. Aunque la ecuación Maestra es una ecuación integro diferencial su forma explícita depende del sistema físico particular.

vi) En los modelos que caracterizan los procesos de reproducción y muerte se desprecia la edad de las bacterias, esto es una simplificación esencial para suponer que son procesos estocásticos Markovianos. Los cuales se identifican porque el estado actual del sistema depende únicamente del estado inmediato anterior.

vii) La reproducción de las bacterias ocurre por un proceso de duplicación. La muerte puede asociarse a procesos de competencia, lisis celular y el agotamiento de la energía relacionada con los procesos de mantenimiento; estos últimos no tienen relación con el crecimiento celular. Se *supone* que  $n$  bacterias solo pueden reproducir una o morir una en un intervalo de tiempo asociado con las densidades de probabilidad de transición. Esto se conoce como proceso de un solo paso.

viii) *Las fluctuaciones en la concentración de biomasa se suponen inherentes al sistema puesto que la reproducción y muerte de las bacterias ocurre en forma probabilística.* Se considera que son originadas debido a las fluctuaciones en la concentración de oxígeno que están contenidas en los parámetros de los modelos para las tasas de reproducción y muerte,  $\beta$  y  $\gamma$  respectivamente.

ix) Para resolver en forma aproximada la ecuación Maestra- Markoviana no-lineal se considera que el sistema está cerca de equilibrio, esto permite utilizar el método de expansión sistemático de van Kampen. En este trabajo,  $n_0$  es una medida del tamaño del sistema que se denota por  $\Omega_0$ . Para obtener de la ecuación Maestra el comportamiento promedio y la ecuación para la evolución de las fluctuaciones, van Kampen propone una descomposición para  $n$  en dos contribuciones: la macroscópica y una fluctuante a las que pondera por medio de  $\Omega_0$  y  $\Omega_0^{1/2}$ , respectivamente.

En *el límite termodinámico*, se recupera el comportamiento promedio correspondiente a las cinéticas experimentales (Trujillo-Roldán y col., 2001). En esta condición *todas las bacterias se reproducen en promedio con la misma velocidad específica de crecimiento, esto significa que no hay diferencias en su estado fisiológico.*

En este caso particular, *el comportamiento de las fluctuaciones en la concentración de biomasa* sugiere la contribución de otros factores que podrían ser incluso externos al sistema, tales como la inyección del aire y el mezclado.

Para este propósito el trabajo se organizó de la siguiente manera. En el Capítulo 2 son descritas las generalidades de la producción de alginato por *Azotobacter vinelandii*. Sus principales propiedades así como los aspectos generales del proceso de fermentación. Se describe el modelo macroscópico propuesto por Trujillo-Roldán (1999), se presentan las características del sistema experimental estudiado y se muestra el efecto de la TOD constante sobre las cinéticas del cultivo.

En el Capítulo 3 se señala la importancia de los procesos estocásticos en la ingeniería y se describen los fundamentos de estos procesos. Se incluyen los desarrollos de la ecuación de Fokker- Planck, ecuación Maestra y se muestran las características más importantes que dan lugar a la ecuación de Langevin. En el Capítulo 4 se ejemplifican estas ecuaciones con el caso bien conocido del movimiento Browniano. Se describen sus fundamentos y se deduce la ecuación de difusión (Teoría de Einstein) así como las respectivas ecuaciones de Smoluchowski, de Langevin, de Fokker- Planck y por último, la ecuación Maestra.

En el Capítulo 5 se define el sistema de estudio de este trabajo, mediante la formulación del modelo estocástico basado en la ecuación Maestra. El modelo describe el comportamiento del cultivo de *Azotobacter vinelandii* basado en una ley de velocidad mecanística no-lineal, ecuación de Malthus- Verhulst; los procesos de reproducción y muerte del cultivo se representan a través de los modelos para las probabilidades de transición por unidad de tiempo. La ecuación Maestra no-lineal se resuelve *en forma aproximada* por el método de expansión sistemática de van Kampen. Se obtienen las fluctuaciones relativas y se comparan los resultados del modelo con los experimentales.

En el Capítulo 6 se formula un modelo estocástico a través de una Ecuación Maestra, EM, para describir la evolución del peso molecular del alginato, considerando el proceso de polimerización. A partir de la EM se obtiene la ecuación para el valor promedio de la distribución. En particular, se considera este proceso, porque es posible comparar los resultados del método teórico con los valores experimentales (Trujillo-Roldán y col., 2004). Este trabajo se encuentra bajo estudio.

## 2. PRODUCCIÓN DE ALGINATO POR *Azotobacter vinelandii*

En este capítulo se mencionan algunas de las propiedades del alginato así como la descripción macroscópica para su producción. Se presenta el sistema de estudio, cuyos resultados experimentales se encuentran ampliamente especificados en los trabajos de Trujillo-Roldán y col., 2004, Trujillo-Roldán y col., 2001 y Trujillo-Roldán, (1999).

## 2.1. Alginatos

El alginato pertenece a una familia de copolímeros binarios no ramificados, constituido por residuos de ácidos  $\beta$ -D-manurónico (M), y  $\alpha$ -L-gulurónico (G) unidos por enlaces glucosídicos  $\beta(1-4)$  (Gacesa, 1998; Rehm y Valla, 1997). Su estructura contiene bloques formados por residuos M, G y otros que contienen residuos MG (Sutherland, 1990) (Fig. 2.1).

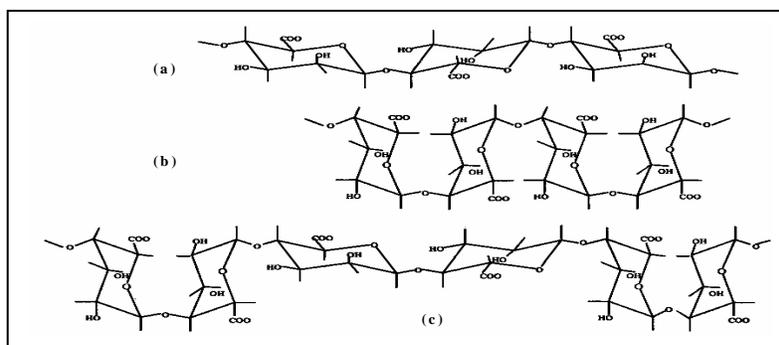


Fig.2.1 Estructuras secundarias de ácido alginico a) ácido polimanurónico (M). b) ácido poligulurónico (G). c) alginato (Sabra y col., 1999).

Las propiedades del alginato dependen de su composición química, sustituyentes orgánicos e inorgánicos y sus propiedades físicas: tales como el peso molecular (peso molecular promedio,  $\overline{M}_w$ ; índice de polidispersidad, IP), la actividad emulsionante, las propiedades reológicas, la formación de geles y la captación de metales pesados.

El alginato es un constituyente de la pared celular de las algas caféas (*Phaeophyceae*) y su extracción es rentable cuando su porcentaje es mayor al 40% en peso (Rehm y Valla, 1997). Los bloques M:G y las propiedades físicas varían significativamente según la especie de alga y su localización dentro de ella. Las especies de *Pseudomonas* y *Azotobacter* son las únicas fuentes procariotas que producen alginato semejante al sintetizado por algas. *Pseudomonas aeruginosa* fue reportada primero debido al daño que causa en las vías respiratorias en los pacientes; así como otras de sus especies *Pseudomonas mendocina* y *Pseudomonas syringae*. Sin embargo, *Azotobacter vinelandii* es la bacteria más utilizada para el desarrollo de procesos biotecnológicos debido a su inocuidad.

El alginato sintetizado por bacterias tiene usualmente un peso molecular más alto que el polímero producido por algas (48-186 KDa). Se ha reportado un peso molecular arriba de 4000 KDa para el polímero sintetizado por una mutante de *Azotobacter vinelandii* (Peña y col., 2002a). La ausencia del nitrógeno y la limitación de oxígeno, promueve en esta

bacteria la síntesis del polihidroxibutirato, PHB, mientras el medio no balanceado favorece la formación de quistes (Dhanasekar y col., 2003). El PHB es un polímero que podría utilizarse como un sustituto biodegradable de los plásticos derivados del petróleo (Lenz y Marchessault, 2005).

Las bacterias producen alginato rico en ácido manurónico y a diferencia de los que provienen de algas, éstos se encuentran parcialmente acetilados. El grado de acetilación de los polímeros bacteriales es variable, en particular, cuando el alginato es sintetizado por *Azotobacter vinelandii* tiene por cada 5.2 residuos de ácidos urónicos, uno acetilado (Gorin y Spencer, 1966). Davidson y col. (1977) encontraron que los grupos acetilos unidos a los residuos de ácido manurónico, actúan como grupos protectores que evitan la reacción de epimerización. Mediante esta reacción el residuo de ácido manurónico se transforma en gularónico; este último en presencia de iones calcio puede formar geles rígidos. El estudio del alginato microbiano se debe a tres razones fundamentales: el polímero es un componente estructural de las células; su estructura es de gran importancia en medicina porque son determinantes antígenos en la superficie celular y además es una fuente de polímeros con propiedades únicas (Sabra y col., 1999).

### 2.1.2 Propiedades físicas

Las propiedades más importantes del alginato son la viscosidad que imparte a las soluciones y sus propiedades gelificantes, ambas dependientes de la composición química del polímero (van den Berg y col., 1995; Rizzoti, 1994). En biopolímeros de origen microbiano los valores del peso molecular se encuentran entre  $1 \times 10^3$  y  $5 \times 10^7$  Da (Sutherland, 1994); pueden variar en función de las condiciones de cultivo, el método de aislamiento y su purificación (De Vuyst y Degeest, 1999).

En el sistema de estudio (Sección 2.2.1) el peso molecular del alginato se estima utilizando cromatografía de filtración en gel (GPC) (Trujillo-Roldán y col., 2001). Del cromatograma generado y la curva de calibración obtenida con estándares de pululano de *Aureobasidium pullulans* (rango de pesos moleculares entre 5800- 1, 600, 000 Da) se calcula el peso molecular promedio ponderado en el peso  $\overline{M}_w$  a partir del peso molecular ponderado en el número  $\overline{M}_n$  (Fig. 2.2). Definidos como,

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_i a_i}{\sum_i a_i M_i} \quad (2.1)$$

$$\overline{M}_w = \frac{1}{\overline{M}_n} \quad (2.2)$$

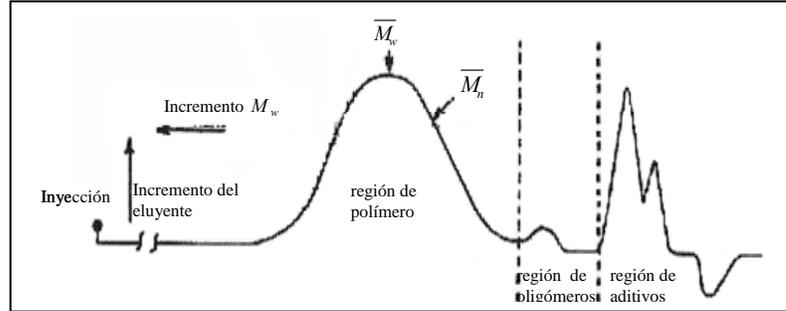


Fig. 2.2 Localización aproximada de los pesos moleculares promedio.

$\sum_i a_i$  es el área total que corresponde a la suma de las fracciones de pesos moleculares separadas. La fracción del peso molecular  $M_i$  es función del tiempo de retención y está asociada a un área  $a_i$ , que se obtiene cuando el área total se secciona en rebanadas del mismo ancho. La contribución de las áreas debidas a la presencia de los oligómeros y algunos carbohidratos se desprecia.

La Ec. (2.3) indica una relación entre  $\overline{M_w}$  y  $\overline{M_n}$

$$IP = \frac{\overline{M_w}}{\overline{M_n}} \quad (2.3)$$

que define al índice de polidispersidad,  $IP$  el cual representa la dispersión de la distribución de pesos moleculares. Cuando la distribución es monodispersa el  $IP$  es de 1 si es polidispersa el  $IP > 2$ .

### 2.1.3. Propiedades reológicas

El alginato posee capacidad viscosizante y puede formar geles debido a su estructura química. Se utiliza como estabilizador de emulsiones porque el tamaño de las moléculas y su naturaleza polimérica, provocan un aumento en la viscosidad y reducen la movilidad de las gotas. Estas propiedades dependen del peso molecular así como de los grupos funcionales presentes. En los alginatos el grado de acetilación y el contenido en ácido D- manurónico y L-gulurónico determina las diferencias estructurales y funcionales (Sutherland, 1994; Clementi y col., 1997). Sus propiedades reológicas y el proceso de formación del gel dependen principalmente del peso molecular del alginato y el contenido relativo de los residuos M y G (Braek y col., 1986). En general la viscosidad de los biopolímeros en solución está influenciada por factores como la concentración del polímero, temperatura, pH y fuerza iónica. La solución de alginato puede comportarse como fluido newtoniano o pseudoplástico según el valor de  $\overline{M_w}$ , la distribución de pesos

moleculares, DPM y el grado de acetilación (Peña y col., 2006; Trujillo-Roldán y col., 2001; 2004). En los fluidos newtonianos ( $\tau = \eta\dot{\gamma}$ ) el esfuerzo cortante ( $\tau$ ) es proporcional a la velocidad de corte ( $\dot{\gamma}$ ) y la viscosidad es independiente de la deformación provocada. En contraste, los fluidos pseudoplásticos se caracterizan por experimentar una disminución en su viscosidad con el incremento de la velocidad de corte (Bird y col., 2002). El comportamiento pseudoplástico de las soluciones puede ser descrito con la ley de Ostwald-de Waele,  $\tau = K\dot{\gamma}^n$ , donde  $K$  es el índice de consistencia y  $n$  el índice de pseudoplasticidad ( $n < 1$  para fluidos pseudoplásticos). La pseudoplasticidad de sus soluciones aporta propiedades sensoriales y de textura en los alimentos.

## 2.2. Proceso de fermentación con *Azotobacter vinelandii* para producir alginato

El cultivo de *Azotobacter vinelandii* sintetiza alginato asociado a su crecimiento, mediante un proceso de fermentación aerobia, donde consume la fuente de carbono (sacarosa). Al término de la fase exponencial el alginato se caracteriza por un  $\overline{M}_w$  asociado a una DPM. Durante esta fase aumenta su valor debido al proceso de polimerización que ocurre en el interior (periplasma) de las bacterias. Cuando la fermentación concluye, el  $\overline{M}_w$  cae como resultado del proceso de depolimerización realizado por la enzima alginasa. (Peña y col., 2006; Priego-Jimenez y col., 2005; Reyes y col., 2003; Chezé y col., 2002; Clementi, 1997; Annison y Couperwhite, 1986; Chen y col., 1985). Estudios con la cepa SML2 (mutada en el gen que expresa la alginasa) muestran que la alginasa no es esencial para la producción de alginato. En la cepa silvestre la acción de esta enzima es evidenciada por una caída en el peso molecular promedio que se estima a partir de una distribución de pesos moleculares, DPM. Ambos procesos (polimerización y depolimerización) son altamente dependientes de la TOD (Trujillo-Roldán y col., 2004).

Galindo y col. (2008) han estudiado ampliamente la producción de alginato, así como los factores que influyen en ella y la calidad del polímero. A través de los parámetros de fermentación como: el oxígeno disuelto, el bióxido de carbono (Galindo y col., 2007; Clementi, 1997), el mezclado, los componentes del medio de cultivo y la evaluación de diferentes cepas mutantes con mejores características para producir alginato. Una de sus aportaciones más relevantes, demostró que *la concentración de oxígeno en el medio de cultivo, así como la velocidad a la que crecen los microorganismos determinan de manera importante el tamaño y distribución de las moléculas de alginato* (Zapata-Vélez y Trujillo-Roldán, 2010). Esto es relevante porque el peso molecular impacta directamente en la viscosidad de las soluciones, y por lo tanto, en la calidad del producto (Galindo y col., 2008). Por otra parte, se ha estudiado el efecto de la forma de inoculación (células lavadas e inóculo convencional) sobre la síntesis y composición del alginato producido por *Azotobacter vinelandii* (Trujillo-Roldán y col., 2003). Los autores encontraron que el peso molecular del alginato es mayor (1200 KDa) en los cultivos en donde se empleó como inóculo a las células lavadas respecto al peso molecular del alginato aislado de los cultivos inoculados convencionalmente (350 KDa).

El alginato de buena calidad es aquel que se caracteriza por la formación de geles flexibles y resistentes. La viscosidad de la solución donde se resuspende aumenta en la medida que el tamaño de la molécula (medido como el peso molecular) y la proporción de grupos acetilos se incrementa (Galindo y col., 2008). Clementi y col. (1998) estudiaron el comportamiento reológico de polímeros producidos por *Azotobacter vinelandii* DSM 576 considerando distintas concentraciones (0.3-1.5 w/v), temperaturas (278.16-308.16K) y velocidades de corte ( $1.1-1400\text{ s}^{-1}$ ). Todas sus dispersiones muestran el comportamiento pseudoplástico. Su viscosidad depende de cómo se agita el fluido. Usualmente, mientras más se agite el medio de cultivo (que contiene el alginato) será menor su viscosidad: por esta razón, se trata de una viscosidad “aparente” pues su valor se determina cuando se conocen las condiciones de agitación. i.e la velocidad de deformación, depende de la velocidad de rotación del sistema de agitación y su geometría (Galindo y col., 2008).

La aireación y el mezclado son parámetros críticos para la producción óptima del polímero, el primero proporciona oxígeno al cultivo y el otro mantiene cierta homogeneidad en los parámetros fisicoquímicos. La producción de alginato así como su peso molecular están fuertemente influenciadas por la TOD y la velocidad de agitación; bajo condiciones de fijación (Sabra y col., 2000) y no-fijación de nitrógeno (Trujillo-Roldán y col., 2001); Peña y col., 2000). Cuando la TOD es del 5 %, se ha encontrado que el cultivo produce más alginato (4.5 g/L) que el obtenido con un valor de TOD bajo (0.5%) (1g/L); la velocidad de agitación utilizada en ambos casos fue de 300 rpm (Peña y col., 2000). Por otra parte, cuando se cambia la velocidad de agitación de 300 a 700 rpm, manteniendo constante la TOD (3 %) hay una disminución en el peso molecular del polímero (340 KDa). Las observaciones microscópicas a 300 rpm indican la presencia de agregados celulares (un orden de magnitud mayor que las células individuales); si el tamaño de los agregados es mayor a  $1000\ \mu\text{m}$  podrían existir en su interior gradientes de oxígeno (Peña y col., 2002b). En otras palabras, la morfología de la célula depende de las condiciones hidrodinámicas de cultivo. En cultivos mal mezclados la bacteria forma agregados multicelulares, los cuales incrementan su tamaño conforme el cultivo progresa. Bajo condiciones de un mezclado más eficiente (alta velocidad de agitación) la bacteria se desarrolla de manera individual (Galindo y col., 2008). Estudios con una cepa no-mucoide L  $\Lambda$  21 de *Azotobacter vinelandii*, derivada de la cepa parental ATCC9046, revelan que el alginato no interviene en la formación de los agregados celulares. i.e porque sus propiedades como agente tensoactivo ejercen un efecto negativo sobre el tamaño de las estructuras. Su diámetro equivalente, se reduce cuando éstos son tratados con proteasas, esto sugiere que las proteínas intervienen en el proceso de agregación (Coronado E. y col., 2008).

El bioreactor se utiliza con dos objetivos, proporcionar oxígeno a las células cultivadas en suspensión y mantener las condiciones ambientales elementales (como son temperatura, oxígeno disuelto y pH) en los niveles que sean óptimos para la producción del metabolito de interés (Galindo y col., 2008). Lo anterior ocurre cuando en el interior del bioreactor (que contiene medio de cultivo) se burbujea y dispersa aire (mezcla de N y O<sub>2</sub>). Mediante el uso de impulsores se rompen las burbujas de aire en burbujas lo más pequeñas posibles con el propósito de aumentar el área disponible, para facilitar la transferencia de oxígeno de las burbujas de gas al seno del líquido. En la condición de saturación de

oxígeno (7.5-8 mg /L), la bacteria tomará del medio, el oxígeno disuelto que se expresa en términos de la TOD. Oosterhuis y Kossen (1984) determinaron en un bioreactor de gran escala que los microorganismos están sometidos a ambientes fluctuantes de TOD debido a un mezclado ineficiente. Cerca de los impulsores los valores de TOD fluctuaban entre 14 y 22% y pueden alcanzar un valor hasta de 3% de TOD próximo a las paredes; mientras que en las zonas distantes a los impulsores (zonas muertas) su valor llega hasta 0% de TOD. El grado de homogeneidad del medio de cultivo ante una perturbación se calcula a través del tiempo de circulación, el cual se define como la frecuencia con la que pasan los microorganismos a través de una región determinada del bioreactor. Se ha reportado que la distribución de los tiempos de circulación varía con el tamaño del bioreactor y las propiedades reológicas del medio (Oosterhuis y Kossen (1984). Para simular dichos gradientes, Trujillo- Roldán y col. (2001) realizaron un estudio de escalamiento descendente, debido al impacto que la TOD tiene sobre la producción y calidad del alginato. En este estudio *Azotobacter vinelandii* fue cultivado en un bioreactor de 1 L bajo condiciones de TOD constante y oscilante. Las oscilaciones de oxígeno disuelto generadas por un simulador se crean mediante cambios al azar o periódicos en la presión parcial de oxígeno a la entrada del bioreactor. La finalidad es simular el tránsito de los microorganismos de las zonas bien mezcladas (cresta de la onda; valor máximo de TOD) a las zonas de mezclado deficiente (valle de la onda; valor mínimo de TOD). El periodo es el tiempo utilizado en cruzar un valle y una cresta de la onda, y corresponde al tiempo de circulación promedio en el bioreactor industrial. Considerando lo anterior, Trujillo- Roldán y col. (2001) propone que la TOD oscile con periodos de 1200 a 2400 s, y determina que hay ligeras diferencias en el crecimiento del cultivo y la producción de alginato. En contraste, pequeños cambios de la amplitud promedio de la onda afecta drásticamente el peso molecular promedio del alginato. Estos datos muestran que un pobre control en la fermentación podría disminuir la calidad del polímero en términos de su peso molecular. Otros autores (De León-Rodríguez y col., 2010) simulan los gradientes de TOD en un sistema de escalamiento descendente de un compartimento (1-CSDS). Diseñan y caracterizan los gradientes (utilizando ondas cuadradas y sinusoidales) en un bioreactor 1 L (tanque agitado); mediante un controlador de TOD acoplado al tanque cambian la presión parcial del gas a la entrada, a través de un algoritmo de control derivativo-proporcional-integral (feedback). Sus resultados muestran que el 1-CSDS puede ser modelado como un sistema dinámico de primer orden. El 1-CSDS exhibe un intervalo permanente entre la respuesta del sistema y el setpoint. Su velocidad de respuesta es más rápida en generar oscilaciones de TOD cuando el setpoint se asocia con la onda cuadrada. Utilizando periodos arriba de  $100 \text{ s}^{-1}$  el sistema generó oscilaciones simétricas.

Por otra parte, los trabajos de escalamiento sugieren que la limitación de oxígeno es crucial para la producción de alginato de peso molecular alto (Galindo y col., 2007). Cuando se simula en un bioreactor (14 L) la evolución del consumo de potencia observado en matraces agitados (Peña y col., 2008), es posible reproducir a nivel de fermentador los pesos moleculares promedio obtenidos en los matraces; esto podría atribuirse a la similitud de los perfiles de TOD y la velocidad de transferencia de oxígeno. Mejía y col. (2009) analizan en un proceso de fermentación la influencia del oxígeno suministrado en dos etapas (condición de limitación y no limitación). Utilizan una cepa mutada en la producción de PHB (cepa AT6) y la cepa silvestre ATCC 9046. Los resultados muestran, que la cepa

AT6 sintetiza al término de la segunda etapa la mayor producción de alginato, 9.5 g/L, no reportado hasta el 2010. El alginato producido incluye fracciones de bajo peso molecular en la etapa 1 (generadas bajo condiciones de no limitación de oxígeno) semejantes a las sintetizadas por la cepa ATCC 9046 en condiciones de limitación de oxígeno (etapa 2). La baja producción (4.8 g/L) del cultivo con la cepa ATCC 9046 esta asociada a una alta producción de PHB, esto confirma, que las rutas de síntesis de PHB y el alginato compiten por la fuente de carbono. Por otro parte, el incremento del rendimiento de polihidroxibutirato/ sacarosa  $Y_{PHB/s}$  (0.03-0.44,) en la segunda etapa (cepa silvestre ATCC 9046) evidencia que el PHB se produce bajo condiciones de limitación de oxígeno. i.e la bacteria utiliza la fuente de carbono para mantener la producción de PHB. En contraste, el mayor peso molecular promedio (950KDa) se obtuvo con el cultivo de la cepa silvestre. Se sugiere que el valor más bajo, 400KDa, podría deberse a la transcripción de *alg8*, *alg 44*, *algX* o *algK* o incluso el daño de la actividad de las enzimas que codifican estos genes en la cepa mutada AT6. Es importante señalar, que al término de la etapa 1 el cultivo de la cepa AT6 tiene un remanente del 29.2% de sacarosa, lo que indica que es otro el nutriente responsable de la limitación del crecimiento de biomasa.

El consumo específico de potencia es otro de los parámetros operacionales más importantes en la fermentación de microorganismos aeróbicos (Nielsen y Villadsen, 1994). Puede correlacionarse con la velocidad de transferencia de oxígeno, la velocidad de remoción del bióxido de carbono, el grado de mezclado así como dispersiones (Peña y col., 2007). El trabajo de Reyes y col. (2003) ha revelado que el uso de la potencia inicial como criterio de escalamiento, no reproduce, en términos del peso molecular del alginato (Bioreactor 1 L), el comportamiento observado en matraces agitados. En el bioreactor el peso molecular promedio del polímero ( $1.1 \times 10^3$  KDa) es menor comparado con el correspondiente en matraz agitado ( $1.9 \times 10^3$  KDa). La razón de esto puede residir en el hecho que la evolución de la potencia en matraces agitados sea considerablemente diferente a la que se observa en el bioreactor. Estos autores han propuesto, que una caída drástica en la potencia podría ocurrir en el matraz agitado como una consecuencia del incremento en la viscosidad del medio durante la producción de alginato por *Azotobacter vinelandii*. En otro estudio, Peña y col. (2007) caracterizaron la evolución del consumo de potencia específica y la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) en un medio de fermentación no-Newtoniano. Durante la producción de alginato por *Azotobacter vinelandii* (en matraces agitados), el consumo de potencia se incrementó exponencialmente de 0.21 a  $1.4 \text{ kWm}^{-3}$ ; debido a un aumento de viscosidad del medio. Este incremento en la viscosidad está asociado con la concentración y el peso molecular promedio del alginato. Sin embargo, al final de la fermentación cuando estas variables muestran su valor máximo, se observa una ligera caída en el consumo de la potencia. Esto es poco usual debido a que el número de Reynolds aumenta como resultado del incremento en el consumo de potencia. Lo anterior, se explica a través del fenómeno “fuera de fase” caracterizado por el hecho de que una gran cantidad de fluido permanece al fondo del matraz lo que reduce la potencia de entrada y la capacidad de transferencia de oxígeno. Dado que la producción de alginato muestra elevada viscosidad y comportamiento no-newtoniano el fenómeno “fuera de fase” es útil porque muestra la relación del incremento en la viscosidad con el incremento del estado fuera de fase. El alginato aislado de matraces agitados tiene un índice de polidispersidad menor que

el sintetizado en un bioreactor sin control de TOD y pH, esto sugiere, que las concentraciones de oxígeno pueden ser más homogéneas en los cultivos en matraces.

En cultivos aeróbicos, la actividad celular está acoplada a la velocidad de consumo de oxígeno, por esta razón, la OTR es un excelente indicador del metabolismo celular. Fenómenos biológicos tales como la limitación de oxígeno o de otro nutriente, y el crecimiento diáuxico pueden ser identificados por la evolución de la OTR. La influencia de la OTR en el peso molecular del alginato fue estudiada por Díaz-Barrera y col. (2007). En cultivos por lote sin control de TOD y utilizando diferentes velocidades de agitación, muestran que cuando la OTR es constante durante el crecimiento celular la TOD es cercana a cero; esto significa que los cultivos se desarrollan limitados de oxígeno. La OTR influye en el peso molecular del alginato, ya que su peso molecular promedio se incrementa cuando la  $OTR_{max}$  disminuye. Peña y col. (2007) reportaron que la OTR (modificada por cambios en los volúmenes de llenado) no afecta la concentración de alginato y el crecimiento celular en los cultivos desarrollados en matraces agitados. Las diferencias observadas respecto al trabajo de Díaz- Barrera y col. (2007) pueden atribuirse al uso de la fuente de nitrógeno. Estos autores utilizaron acetato de amonio en un medio de cultivo cuya relación C/N es de 54, mientras que Peña y col., (2007) usaron extracto de levadura con una relación C/N de 21. Dado que la relación C/N está involucrada en el control de la respiración de *Azotobacter vinelandii* (Oelze 2000), la velocidad de consumo de oxígeno celular aumenta cuando C/N es incrementada (Díaz- Barrera y col., 2007). En base a esta evidencia, es posible que las diferencias en la producción de biomasa y alginato pudieran ser debido a una diferente relación C/N.

Zapata-Vélez y Trujillo- Roldán. (2010) analizan el efecto de la fuente de nitrógeno en el crecimiento de *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046 (bacteria fijadora de nitrógeno) en términos de la producción de alginato y el peso molecular promedio; utilizando nitrógeno orgánico (peptona, triptona y extracto de levadura) e inorgánico (acetato de amonio y sulfato de amonio). En particular, cuando la bacteria en cultivo sumergido (matraz agitado) fija nitrógeno se obtiene el menor peso molecular promedio (625-110KDa) y la menor concentración de alginato ( $1.7 \pm 0.2$  g/L). A diferencia de los cultivos con nitrógeno orgánico (peptona) la concentración de biomasa es mayor ( $7.2 \pm 0.4$  g/L) así como el peso molecular promedio ( $1520 \pm 110$  KDa). Sus resultados sugieren que la bacteria sacrifica la ruta de producción de alginato para proteger el complejo polimerasa. Con una relación C/N (sulfato de amonio), 14, se obtiene la mayor productividad (Este parámetro sugiere la viabilidad de la producción del metabolito a nivel industrial), esto contrasta con el valor ( $0.006$  galginato/g biomasa h) obtenido de cultivos diazotrópicos, donde se desarrollan las bacterias más pequeñas respecto a las cultivadas con cualquier otra fuente de nitrógeno y se encuentra la más baja  $\mu$ . Además la reacción de conversión de  $N_2$  a  $NH_4^+$  es muy costosa en términos de ATP. Otro proceso metabólico que ayuda a determinar diferencias en la productividad del alginato y su peso molecular promedio (Sabra y col., 2001), es la protección de la nitrogenasa, debido a la alta velocidad de respiración de la bacteria. Por otro lado, cuando disminuye la C/N se observa un incremento en la viscosidad del cultivo. Estos resultados evidencian que el medio de cultivo y en particular el que tiene la fuente de nitrógeno, juegan un papel importante en la producción y calidad del alginato.

Otro aspecto importante en la producción de alginato (Clementi, 1997) es el estudio de los componentes en el medio de cultivo. El uso de diferentes fuentes de nitrógeno, incrementa hasta un 30% el rendimiento de alginato en experimentos realizados a una temperatura de 30°C y 35°C (Clementi y col., 1995; Chen y col., 1985). Para favorecer su síntesis se sugiere disminuir la cantidad de nitrógeno pero mantener balanceado el medio. Dhanasekar y col. (2003) han señalado que la ausencia del nitrógeno promueve la síntesis del polihidroxibutirato, PHB y el medio no balanceado favorece la formación de quistes. Pero bajo condiciones aerobias el cultivo produce alginato (polímero extracelular) y PHB (polímero intracelular) (Galindo y col., 2007). En lo que se refiere a las fuentes de carbono, las más utilizadas para producir alginato son: glucosa, sacarosa, manosa y sorbitol (Salgavi y Salgavi, 1992; Brivonese y Sutherland, 1989). En algunos casos, cuando la fuente de carbono es superior a 20g/L el crecimiento del cultivo se inhibe (Clementi y col., 1995). Por otro lado, Brivonese y Sutherland, (1989) utilizan una concentración de fosfatos de 7.5 g/L en un medio rico en nitrógeno donde utilizan glucosa como fuente de carbono. Sus resultados muestran una producción de alginato en un intervalo de 6-5.5 mg/ ml, mientras el PHB alcanzó una concentración máxima equivalente al 30% del peso seco celular. En estos estudios, el rendimiento tiene un valor de 0.12 considerando la contribución del PHB en la biomasa seca y se eleva a 0.27 cuando se incluye el alginato. Sin embargo, éste es marcadamente menor que el observado para la mayoría de las bacterias (0.5). Lo anterior sugiere que existe un complejo mecanismo de control en las rutas involucradas en la producción de alginato. El ácido (3N-morfolino)-propano-sulfónico (MOPS) es uno de los componentes en el medio de cultivo que se utiliza con frecuencia para mantener el pH constante durante la fermentación con *Azotobacter vinelandii*. Peña y col. (2006) han estudiado la influencia de MOPS sobre la calidad de alginato en términos de su composición química y el comportamiento reológico de sus soluciones reconstituidas. El grado de acetilación del alginato es significativamente influenciado por la concentración del MOPS. La mayor acetilación se alcanzó cuando la concentración de MOPS adicionada al medio fue de 13.6mM; las soluciones de alginato muestran una alta viscosidad, aunque es menos pronunciado el comportamiento pseudoplástico. Estos cambios en las propiedades funcionales del alginato permitirían utilizarlo en aplicaciones específicas en el campo de los alimentos y la industria farmacéutica. El MOPS no influye en la producción de alginato. En otras palabras, no hay diferencias significativas en la concentración final de biomasa y alginato para todas las concentraciones de MOPS examinadas (Peña y col., 2006). Estos resultados en general están de acuerdo con estudios previos (Horan y col., 1981) donde una concentración de MOPS de 50 mmol L<sup>-1</sup> no afecta la producción de alginato respecto al control experimental que no contiene MOPS. En contraste otros autores (Clementi y col., 1995) han propuesto que la producción de alginato está influenciada por el MOPS ya que debido a un mejor control de pH, la concentración de alginato se incrementó al doble respecto al control. Las contradicciones observadas respecto a la influencia del MOPS en la producción de alginato podrían deberse a diferencias en la composición del medio. Horan y col. (1981) usan un medio limitado de fosfatos, mientras Clementi y col. (1995) utilizaron en el medio un exceso de fosfatos.

### **2.2.1 Sistema experimental**

El proceso de fermentación aerobia con *A.vinelandii*, se desarrolló en un bioreactor discontinuo de 1 L en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (Trujillo-Roldán y col.,

2004; Trujillo-Roldán y col., 2001). Aquí el grupo del Dr. Galindo ha realizado experimentos utilizando la cepa parental de *A. vinelandii* ATCC 9046. Estudiaron el efecto de las sustancias presentes en el inóculo, así como de la TOD en la producción de alginato. Brivonese y Sutherland (1989), encontraron que a niveles menores del 2% TOD (con el agotamiento de al menos un nutriente) se favorece la formación de polihidroxibutirato (PHB) hasta un 70% en relación al peso seco de las células. En niveles intermedios de TOD (2% y 5%) se promueve la producción de alginato, y a niveles superiores (5% de TOD) la biomasa aumenta (Trujillo-Roldán y col., 2001; Jarman y col., 1978). Este Grupo, realizó un estudio de escalamiento descendente, para simular las oscilaciones de TOD que ocurren en bioreactores a gran escala; a través del efecto de la TOD constante y oscilante. Sus resultados, con la TOD constante (3%) sugieren una mejora en la producción del alginato, mientras que utilizando la TOD oscilante se afecta el  $\overline{M}_w$ . Las oscilaciones de tipo sinusoidal son generadas a través de un algoritmo de control, la oscilación original se modifica formando patrones aleatorios. Se presume que la magnitud de estas variaciones tiene relación con la demanda de oxígeno requerida por el cultivo en las diferentes etapas de su desarrollo (Trujillo-Roldán, 1999) (Fig. 2.4). Encontraron que el  $\overline{M}_w$  se afecta con la amplitud y el periodo tomando como eje de oscilación 3% de TOD.

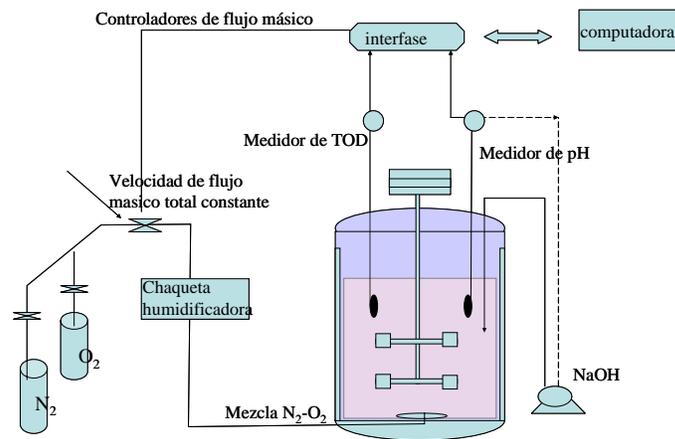


Fig 2.4 Representación esquemática del sistema de fermentación (Trujillo- Roldán y col., 2004; Trujillo- Roldán y col., 2001).

La producción de alginato ocurre en un proceso de fermentación aerobia que consta de dos etapas: el desarrollo del inóculo y la etapa de producción. Durante estas etapas ocurre el crecimiento, la reproducción y la muerte de las bacterias debido a la naturaleza aleatoria de estos eventos. Pero debido a la dificultades relacionadas con el seguimiento de estos procesos, *se supone en el sistema que durante el desarrollo del inóculo las bacterias esencialmente crecen y adquieren la madurez metabólica para reproducirse* (Fig. 2.3). Experimentalmente el inóculo se desarrolla en tres etapas elementales, la etapa de propagación de la cepa de *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046 en tubos inclinados (a 4°C con medio Burk modificado solidificado con agar (18 g/L) sin extracto de levadura). La etapa de resiembra en cajas Petri (por duplicado a 29°C; con pH 7.2; por 72h) con el objeto

de aislar las colonias de interés. Y la etapa de inoculación del cultivo en el matraz (agitado por 24h a 200 rpm y 29°C) para obtener el inóculo (3 g/l de biomasa) del bioreactor. El mantenimiento de la cepa se realizó con resiembras mensuales como ha sido descrito previamente por Peña y col. (2000) (Trujillo-Roldán y col., 2001). Trujillo- Roldán y col. (2003) implementaron una nueva forma de inocular el bioreactor utilizando células lavadas (libres de alginato), dado que la síntesis del alginato en él, afecta el peso molecular promedio,  $\overline{M}_w$ , y la distribución de pesos moleculares.

*En la fase exponencial se supone que las bacterias se reproducen a intervalos regulares por un proceso de duplicación. Su muerte puede ser debido a causas asociadas con los procesos de competencia, lisis celular y el agotamiento de la energía que se relaciona con los procesos de mantenimiento. No existen sustancias inhibitoras del crecimiento y la composición del medio es simple en cuanto a las fuentes de carbono y nitrógeno. El cultivo sintetiza alginato asociado a su crecimiento y consume sacarosa como la fuente de carbono (Trujillo-Roldán y col., 2001).*

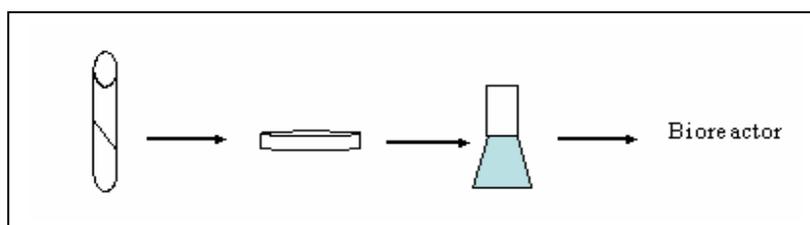


Fig 2.3 Desarrollo del inóculo

El medio de cultivo utilizado en este sistema se llama Burk modificado y tiene la composición siguiente:

Sacarosa	20 g/l,
Extracto de levadura	3 g/l,
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.66 g/l,
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.16 g/l,
MOPS	1.42 g/l,
CaSO <sub>4</sub>	0.05 g/l,
NaCl	0.2 g/l,
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.2 g/l
NaMoO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0.0029 g/L
FeSO <sub>4</sub>	0.027 g/l.

Cuando se usa el inóculo lavado, *A. vinelandii* ATCC 9046 sintetiza en el bioreactor una única familia de alginato en la fase exponencial para cada TOD constante (3 -5%). Esta familia evoluciona en el tiempo hasta alcanzar un valor máximo en  $\overline{M}_w$ , que al término de la fase exponencial disminuye drásticamente debido a un proceso de depolimerización realizado por la enzima alginasa.

Conti y col. (1994) proponen que la depolimerización se debe a una lisis celular que aumenta la cantidad de enzimas extracelulares de alta actividad liasa. Por otro lado, Trujillo-Roldán y col. (2004) evidencian que la depolimerización solo ocurre al término de la fase exponencial, mediante la comparación del cultivo con la mutante SML2 (incapaz de producir alginasa) y la cepa silvestre ATCC9046.

### **2.2.1.1 Velocidad específica de crecimiento**

La velocidad específica de crecimiento,  $\mu$  representa una velocidad global de reproducción del cultivo, que está constituida por la velocidad de incorporación de nutrientes y su velocidad de transformación.  $\mu$  es una variable de respuesta dado que su valor es resultado de las condiciones ambientales determinadas por la fermentación. Algunas de ellas pueden ser, la composición del medio de cultivo, la temperatura, el pH y la presencia de agentes tensoactivos. El efecto de la composición del medio es tanto cualitativo como cuantitativo. La naturaleza de los nutrientes influye en el valor de  $\mu$  en especial en el caso de las fuentes de carbono, energía y nitrógeno.

Monod en 1949 estudió en  $\mu$  el efecto cuantitativo de la fuente de carbono y energía. La aplicación de esta ecuación se ha extendido a otros nutrientes (Ec. 2.5). El valor de la constante de saturación es del orden de unidades o decenas de partes por millón (mg/L) así cuando la concentración de sustrato es de gramos o decenas de gramos por litro,  $\mu$  se hace prácticamente igual a la velocidad específica de crecimiento máxima,  $\mu_{max}$ . La relación de Monod se aplica para el caso de crecimiento no inhibido, y no siempre representa adecuadamente los datos experimentales, en especial cuando el medio de cultivo es complejo y contiene varias fuentes de carbono y nitrógeno. En estos casos pueden resultar más adecuados otros modelos de crecimiento, entre los que destaca la ecuación logística y sus modificaciones (Acevedo y col., 2002).

### **2.2.1.2 Efecto de la TOD constante en la producción del alginato**

El proceso de síntesis de alginato se estudió en un intervalo de TOD del 1 - 5%. En el bioreactor (1 L) cuando la TOD es del 3% se obtiene la mayor producción (Trujillo-Roldán y col., 2001). La TOD se mantiene constante mediante controladores de flujo másico que varían las proporciones de nitrógeno y oxígeno en el gas; pero mantienen constante la velocidad de flujo másico total (0.8 vvm). Esto se logra utilizando un algoritmo que controla el “setpoint” (Fig. 2.6). En este caso el setpoint adquirió los valores de 1, 3 y 5% de TOD.

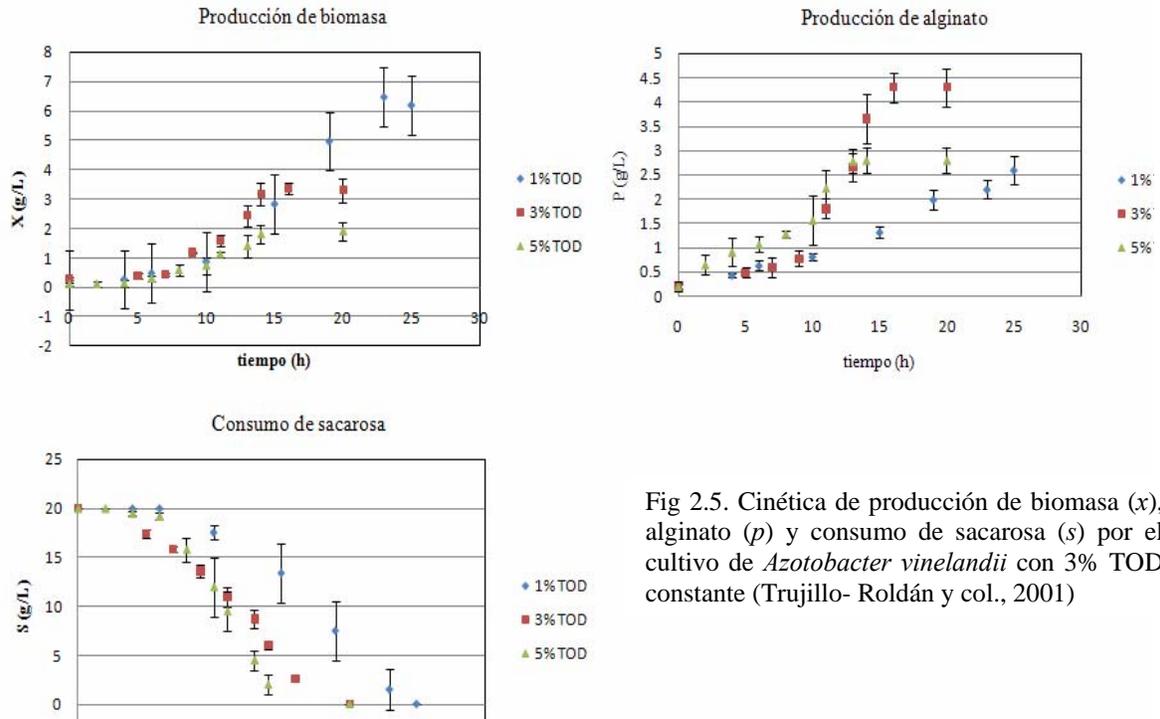


Fig 2.5. Cinética de producción de biomasa ( $x$ ), alginato ( $p$ ) y consumo de sacarosa ( $s$ ) por el cultivo de *Azotobacter vinelandii* con 3% TOD constante (Trujillo- Roldán y col., 2001)

En la Fig. 2.6 se observa que el “setpoint” no es estrictamente constante. Se presume que la magnitud de estas variaciones tiene relación con la demanda de oxígeno requerida por el cultivo en las diferentes etapas de su desarrollo (Trujillo-Roldán, 1999).

Fig. 2.6. Perfil típico de TOD en cultivo con *Azotobacter vinelandii*

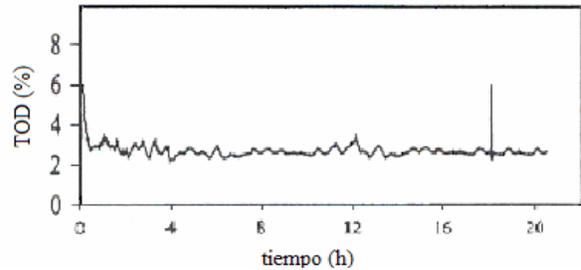
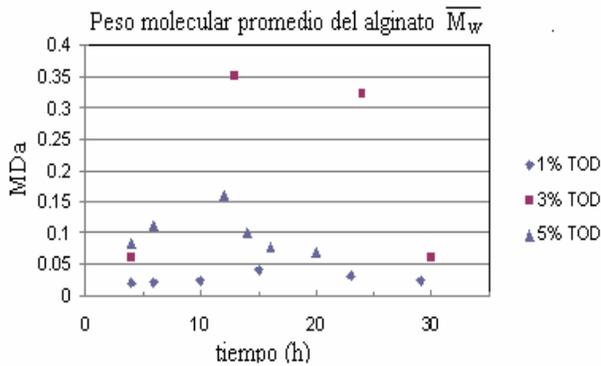


Fig. 2.7 Evolución del  $\overline{M}_w$  con diferentes porcentajes de TOD (Trujillo-Roldán y col., 2001).

Cuando el inóculo se lava y la TOD es del 3% se obtiene un  $\overline{M}_w$  con un valor de 944,000 Da y el  $IP$  en un rango entre 5 y 6.73. Sin embargo, la producción del polímero (3.5 g/L) es menor respecto al sintetizado con el inóculo no lavado (4.8 g/L). En 2001 Trujillo- Roldán y col., sugieren que la TOD constante de 3% mejora la producción del alginato.

Para representar las oscilaciones de TOD (bioreactor de 1L) que ocurren en bioreactores a gran escala, Trujillo-Roldán y col. (2001), proponen oscilaciones de tipo sinusoidal, generadas a través de un algoritmo de control, las cuales presentan patrones aleatorios que modifican la oscilación original y afectan el  $\overline{M}_w$ . En las Figs. 2.8 y 2.9 se pueden observar estos perfiles experimentales, que se modifican notablemente al variar la amplitud de onda, B y el periodo, T propuesto en el algoritmo de control.

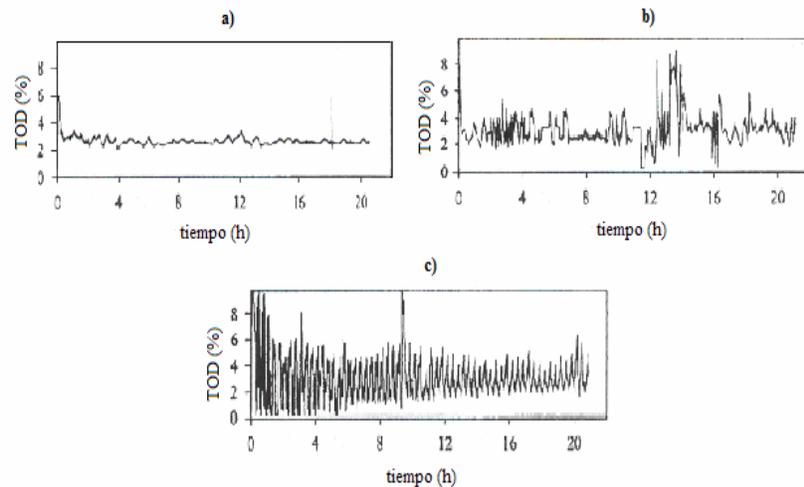


Fig. 2.8 Perfiles de TOD oscilante experimentales con un periodo, T, de 1200s y una amplitud de onda, B, de a) 0%, b) 1% y c) 2.2% respectivamente (Trujillo-Roldán y col., 2001).

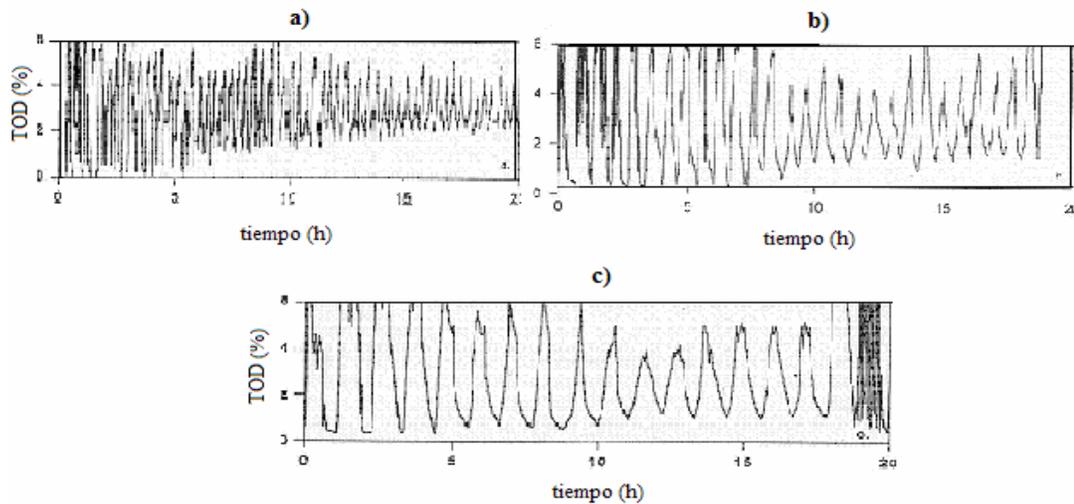


Fig. 2.9 Perfiles de TOD oscilante experimentales obtenidos con periodos de onda de a) 1200s, b) 2400s y c) 4000s respectivamente (Trujillo-Roldán y col., 2001).

### 2.2.2 Ecuaciones macroscópicas para el proceso de fermentación

El modelo determinista constituido por las ecuaciones macroscópicas tiene la finalidad de reproducir los resultados experimentales de las cinéticas, para establecer estrategias de producción y la optimización del proceso. Las cinéticas obtenidas con este modelo corresponden a los patrones de comportamiento para la producción de biomasa, el

alginate y el consumo de la sacarosa. La TOD utilizada se considera en un caso constante y en otro caso como oscilante (Trujillo-Roldán y col., 2001).

### ***Ecuación de Malthus Verhurst- Pearl***

Describe el cambio de biomasa en el tiempo debido a dos contribuciones, la reproducción de las bacterias y su muerte. En la fase exponencial, las bacterias se reproducen, y otras mueren por procesos desconocidos, pero que podría asociarse, por ejemplo, a la competencia que existe por el sustrato, la lisis celular y el agotamiento de la energía relacionada con los procesos de mantenimiento. (Criado-Sancho y Casas-Vázquez, 2004; Klimerk y Ollis, 1980).

$$\underbrace{\frac{dx}{dt}}_{\text{tasa de crecimiento de biomasa}} = \underbrace{\mu x}_{\text{reproducción de biomasa}} - \underbrace{\frac{\mu}{x_m} x^2}_{\text{pérdida de biomasa debido a procesos de competencia}} \quad (2.4)$$

En esta ecuación  $x$  representa la concentración de biomasa (g/L),  $x_m$  (g/L) la concentración máxima de biomasa obtenida en el cultivo y  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ ) la velocidad específica de crecimiento que es función del sustrato limitante y la TOD.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S(t)}{(K_s + S(t))} \frac{Z}{(K_o + Z)} \quad (2.5)$$

De acuerdo con los datos experimentales de Trujillo-Roldán y col., (2001) y Trujillo-Roldán, (1999) el cultivo de *Azotobacter vinelandii* muestra mayor afinidad por la fuente de carbono que por el oxígeno en el medio (TOD). Esta afinidad está representada en  $K_s$  y  $K_o$  respectivamente (Nielsen y Villadsen, 1994). Aquí  $S(t)$  es la solución de la ecuación para la sacarosa y la TOD se ha renombrado como  $Z$  por simplificación en la notación. Los valores de TOD constante se encuentran en el intervalo de 1%-5%.

### ***Ecuación para el consumo de sacarosa***

Esta ecuación se obtiene a partir de un balance de masa suponiendo que la fuente de carbono se consume totalmente. Se desprecia la contribución de la sacarosa utilizada para el proceso de mantenimiento y la formación de productos como el PHB y el  $\text{CO}_2$  (Moat y Foster, 1996; Pirt, 1975).

$$s_T = s_x + s_p \quad (2.6)$$

La sacarosa total es igual a la sacarosa consumida ( $s_T = s_c$ ).  $s_x$  y  $s_p$  se refieren a la sacarosa consumida para la formación de biomasa y alginate respectivamente.

Aplicando la derivada temporal a cada uno de los términos tenemos

$$\frac{ds_T}{dt} = \frac{ds_x}{dt} + \frac{ds_p}{dt} \quad (2.7)$$

Para la formulación de medios de cultivo y el estudio cuantitativo de los procesos de fermentación, es conveniente definir el rendimiento de un nutriente en células,  $Y_{x/s}$  como la masa celular obtenida por unidad de nutriente total consumido y  $Y_{p/s}$  como la masa de alginato sintetizada por unidad de nutriente total consumido

$$Y_{x/s} = -\frac{dx}{ds_x} \quad Y_{p/s} = -\frac{dp}{ds_p} \quad (2.8)$$

de la Ec. (2.7) se sigue que

$$-\underbrace{\frac{ds_T}{dt}}_{\text{tasa de consumo de sacarosa}} = \underbrace{\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dx}{dt}}_{\text{consumo de sacarosa para la producción de biomasa}} + \underbrace{\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dp}{dt}}_{\text{consumo de sacarosa para la producción de alginato}} \quad (2.9)$$

Para mostrar explícitamente el consumo de la fuente de carbono, se coloca el signo menos del lado izquierdo de la ecuación (g sacarosa/h L). En el trabajo de Trujillo- Roldán (1999) se desprecia el consumo de sacarosa orientado a la producción de alginato, esto reduce la expresión anterior a

$$-\underbrace{\frac{ds_T}{dt}}_{\text{tasa de consumo de sacarosa}} = \underbrace{\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dx}{dt}}_{\text{consumo de sacarosa para la producción de biomasa}} \quad (2.10)$$

### ***Ecuación de Leudeking- Piret*** (Leudeking y Piret, 1959)

Esta ecuación relaciona la tasa de producción de alginato con una constante de proporcionalidad  $\alpha$  asociada al crecimiento (g alginato/ g biomasa) y la producción del polímero con una constante  $\beta$  asociada al cultivo. La ecuación de Leudeking- Piret describe la tasa de producción de alginato generado por el crecimiento y la concentración instantánea de biomasa

$$\underbrace{\frac{dp}{dt}}_{\text{tasa de producción de alginato}} = \underbrace{\alpha \frac{dx}{dt}}_{\text{producción de alginato asociada al crecimiento}} + \underbrace{\beta x}_{\text{producción de alginato no asociada al crecimiento}} \quad (2.11)$$

Es un modelo no estructurado porque no considera los mecanismos celulares internos. La Ec. (2.11) ha sido aplicada con éxito a fermentaciones de muy distintas características: metabolitos primarios y secundarios, cultivos de hongos por lotes y continuo. Su generalidad tal vez se deba a que contiene un término asociado al crecimiento y otro no

asociado. Puede representar bien, distintas situaciones según sean los valores relativos de  $\alpha$  y  $\beta$  (Acevedo y col., 2002; Deavin y col., 1997).

El valor de  $\beta$  y  $\alpha$  depende del sistema de estudio. Algunos de los factores que influyen en la producción del alginato son descritos previamente en la Sección 2.2 y 2.2.1.  $\alpha$  (g alginato / g biomasa) tiene un valor experimental para cada TOD (3% y 5%). En este trabajo, se realiza un ajuste numérico de los resultados experimentales en donde  $\alpha$  es función de  $Z$ , en el caso constante tiene un valor determinado por las condiciones experimentales

$$\alpha = 0.457 + 0.864 * Z - 0.091 * Z^2 \quad (2.12)$$

$Z$  oscila de acuerdo a este modelo de onda sinusoidal que varía alrededor del setpoint,  $Z_0$  (Trujillo-Roldán y col., 2001)

$$TOD = Z_0 + B \text{sen}\left(\frac{2\pi t}{T}\right) \quad (2.13)$$

Esta expresión es utilizada por los controladores de flujo másico cuando varían las proporciones de nitrógeno y oxígeno del gas para determinado periodo y amplitud de onda. El sistema de ecuaciones diferenciales acopladas Ecs. (2.4), (2.10), y (2.11) con  $\beta = 0$ , fue resuelto numéricamente por Trujillo-Roldán y col., (2001). Mediante el algoritmo Runge-Kutta, comparan los resultados simulados con los experimentales y obtienen una similitud cualitativa de las cinéticas relacionadas con la producción de la biomasa, el alginato y el consumo de sacarosa.

En el caso particular de una amplitud de onda,  $B$ , de 2.2% y un periodo,  $T$ , de 1200s, los valores experimentales siguen la misma tendencia en las cinéticas Fig. 2.10.

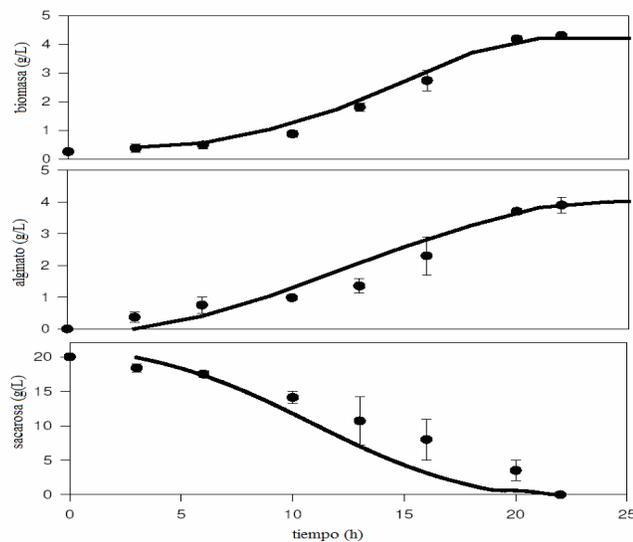


Fig. 2.10 Predicciones (línea continua) de las cinéticas de crecimiento de *Azotobacter vinelandii*, de la producción de alginato y del consumo de sacarosa realizada a un periodo de 1200 s y a una amplitud de 2,2% de TOD. (●) representan los resultados experimentales (Trujillo-Roldán y col., 2001).

**Modelo para el peso molecular promedio,  $\overline{M}_w$**  (Trujillo-Roldán y col., 2001)

La influencia de la amplitud de onda, B en  $\overline{M}_w$  se muestra en la Fig. (2.11). El modelo propuesto para  $\overline{M}_w$  es

$$\overline{M}_w = \phi_{(z_0)} \frac{dx}{dt} \quad (2.14)$$

donde  $\phi_{(z_0)}$  se obtiene mediante un ajuste numérico del sistema de Ecs. (2.4), (2.10), y (2.11) con  $\beta = 0$ , utilizando los resultados experimentales (Fig. 2.11).

El modelo determinista es válido bajo las siguientes consideraciones: i) El bioreactor está perfectamente mezclado, solo existen variaciones temporales en la concentración de oxígeno disuelto, TOD. ii) El desarrollo y composición del cultivo es el mismo en cada etapa de su crecimiento. iii) Se desprecia la fuente de carbono utilizada para el proceso de mantenimiento y generación de productos como el PHB y el CO<sub>2</sub>. iv) El modelo reproduce el comportamiento del cultivo en la fase exponencial, donde sintetiza alginato como un metabolito primario. Su población crece en forma competitiva. v) Se describen únicamente balances de masa porque el bioreactor es isotérmico y está perfectamente mezclado. vi) Los rendimientos se suponen constantes y su valor se relaciona con los rendimientos globales  $Y_{xs}$  y  $Y_{ps}$ . vii). El substrato limitante en la  $\mu$  es la sacarosa, la TOD es un substrato que influye en su consumo. viii) La TOD, constante puede tomar valores de 1%- 5%, mientras que la TOD oscilante varía se acuerdo a la Ec. (2.13). ix) El  $\overline{M}_w$  se calcula a partir de una relación experimental que es proporcional a la tasa de crecimiento de la bacteria..

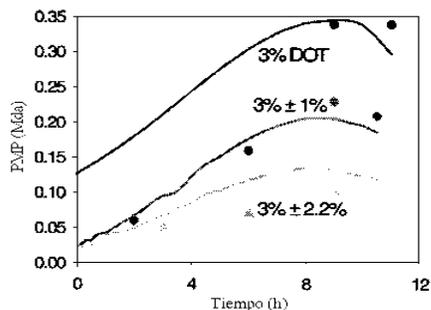
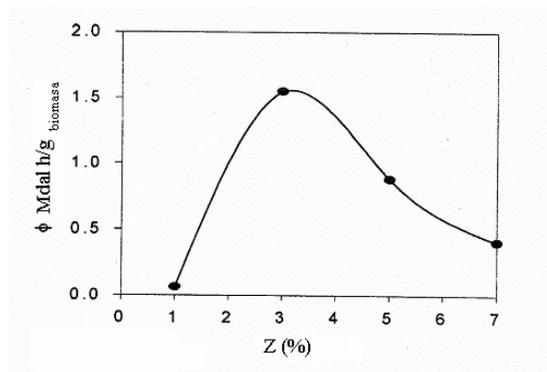


Fig. 2.11 Efecto de la amplitud de onda, B en la evolución del  $\overline{M}_w$  (T, 1200s)(Trujillo-Roldán y col., 2001)

Fig. 2.12  $\phi_{(z_0)}$  función de Z (Trujillo-Roldán y col., 2001).



### 3. FUNDAMENTOS ESTOCÁSTICOS

En ingeniería los sistemas se caracterizan a través de variables y parámetros macroscópicos que pueden obtenerse en forma empírica, experimental o de primeros principios. Las variables asociadas al sistema representan cantidades promedio y sus valores a un tiempo arbitrario  $t$ , se determinan cuando se conoce su condición inicial. En la descripción macroscópica los sistemas se estudian en equilibrio ó fuera de él, en un estado transitorio ó estacionario. La descripción estocástica ha sido desarrollada para sistemas fuera de equilibrio, diferenciando ‘que tan lejos se encuentra del equilibrio’. Para el caso de fluctuaciones cercanas al equilibrio, éstas son pequeñas y su efecto es despreciable mientras más grande es el número de partículas ó el volumen del sistema, en donde debe cumplirse que  $N/V$  es finita; en este caso se recupera la descripción macroscópica. Sin embargo, las fluctuaciones pueden ser de gran importancia, como en el caso de una transición de fase, en donde se amplifican y son el factor dominante en la dinámica del sistema (van Dongen, 1985). La importancia de las fluctuaciones alrededor de un valor promedio es la diferencia fundamental entre la descripción estocástica y la descripción macroscópica. El comportamiento de las fluctuaciones incorpora más información acerca del sistema a través de las correlaciones y los momentos de orden superior (van Kampen, 2003). Su influencia se determina con el cálculo del orden de magnitud de la fluctuación relativa,  $\gamma$  que depende de las características de un sistema particular (Kutalik y col., 2005).

Ponciano y col. (2005) utilizaron una descripción estocástica para el estudio de la dinámica de crecimiento microbiano donde los procesos de crecimiento y reproducción de la población son eventos estocásticos que se describen mediante una ecuación maestra (Lande y col., 2003). En 2005 Wei-Yin y Sankar, representan el esparcimiento de una enfermedad a través de un modelo estocástico que describe tres clases de poblaciones. La relacionada con la conversión de susceptibles a infectados y la conversión de infectados a curados. La ecuación estocástica (Ec. Maestra no-lineal) es resuelta con el método de expansión sistemático de van Kampen para obtener los momentos de la distribución de probabilidad del número de bacterias. Por otro lado Song-Tien y col. (2005) modelan la desinfección térmica de bacterias, donde el único evento es el proceso de muerte que representan a través de la ecuación Maestra no lineal. Estudios similares realizados por Davey y col. (1996) en un cultivo de levadura muestran la presencia de fluctuaciones substanciales en la velocidad de crecimiento en condiciones aerobias. Sus resultados sugieren que las fluctuaciones en la velocidad de crecimiento,  $\mu$ , son inherentes al sistema biológico y no se deben a las propiedades del sistema de control.

En la actualidad el uso del modelo estocástico se ha incrementado respecto al modelo macroscópico debido a la heterogeneidad de los sistemas biológicos sobre un rango de escalas de organización. Describen adecuadamente la dinámica de redes bioquímicas a nivel celular con el apoyo de métodos y algoritmos sofisticados que ajustan el modelo (Darren, 2009). Debido a que las poblaciones de células exhiben variaciones fenotípicas substanciales, cuya heterogeneidad puede ser esencial en muchos procesos biológicos; el ruido puede relacionarse con la expresión genética. Elowitz y col. (2002) construyeron una cepa de *Escherichia coli* que puede detectar el ruido y otra que lo discrimina. El proceso bioquímico de la expresión genética (ruido interno) y las fluctuaciones de otros componentes celulares (ruido externo) contribuyen substancialmente a la variación global. La velocidad de transcripción, la dinámica regulatoria y los factores genéticos controlan la

amplitud del ruido. Los resultados revelan como el bajo número de copias intracelulares de moléculas puede limitar la precisión de la regulación genética. Dong y col. (2010) estudian la variabilidad de la expresión genética cuando relacionan el ruido interno medido en una célula, con la variación de la expresión dentro de una población celular. Los niveles del ruido son significativamente correlacionados con las variaciones de expresión genética condicional. Para acoplar las escalas macro y meso en las reacciones químicas estocásticas Lars y Lötstedt (2007) utilizan la ecuación de Fokker Planck para la densidad de probabilidad del estado molecular; donde suponen que la mayoría de las especies moleculares tiene una distribución normal con una varianza pequeña. Los resultados de la aproximación numérica con el modelo preservan propiedades de la solución analítica como la probabilidad total constante y no negatividad.

En otros sistemas biológicos donde se estudia la dinámica de crecimiento microbiano, las fluctuaciones internas tienen un origen desconocido, sin embargo, se pueden relacionar con la ruta metabólica de la célula; son útiles para controlar el nivel de biomasa en un cultivo continuo, donde su inducción es deseable para identificar un comportamiento caótico y oscilatorio (Davey y col., 1996). En muchos de estos sistemas existen fenómenos periódicos, tales como las oscilaciones que ocurren en la ruta glicolítica que son descritas mediante un modelo elemental para dos especies (Heinrich y col., 1977). Pradyumna y col. (1992) estudiaron el efecto de las fluctuaciones de glucosa en el proceso de fermentación (fed-batch) con *Saccharomyces cerevisiae*. La operación del bioreactor con velocidades de dilución de 0.2 y 0.1 h<sup>-1</sup> produce oscilaciones en la fracción del gas removido (CO<sub>2</sub>) y la fracción generada de la población celular. Las fluctuaciones en el suministro de glucosa debido a un pobre mezclado se simuló mediante una alimentación intermitente de nutrientes con un pulso de 5s y otro pulso que varía desde 3-39s de acuerdo al método de Monte Carlo. Estas fluctuaciones producen una respuesta caótica en los niveles de CO<sub>2</sub> que indica una completa alteración de la sincronización. La eliminación de las oscilaciones de CO<sub>2</sub> fue consistente con la medida de la fracción de las células que salen. Estos resultados sugieren que *la sincronización no puede ser establecida en un fermentador a gran escala debido a los inherentes gradientes de concentración.*

Por otra parte, para identificar la dinámica de interacción de diferentes procesos en un sistema biológico complejo, se requiere la computación del tiempo asociado a cada evento considerando sus funciones biológicas. Uno de tales eventos puede ser la reacción entre las moléculas dentro del citoplasma de una célula. Preetam y col. (2006) desarrollan una formulación matemática para la estimación del tiempo de reacción entre dos moléculas dentro de la célula basado en el estado del sistema. Se derivan expresiones para el promedio y el segundo momento del tiempo por reacción, para ser usado en la simulación fundamentada en el evento estocástico. Otras descripciones estocásticas se centran en los reactores de polimerización (Prandit y col., 1993; Salinas- Rodríguez y col., 1991; van Dongen y Ernst, 1987; Tambe y col., 1985a; Tambe y col., 1985b), en reactores químicos (Fan y col., 1995; Tambe y col., 1985a), en columnas de burbujas (Soria y col., 2002; Salinas-Rodríguez y col., 1998); en lechos fluidizados (Rodríguez y col., 2001), en biopelículas (Rodríguez y col., 2003; Goel y Richter, 1974) y en procesos de imbibición espontánea (Shandelle y col., 2003; Rodríguez y col., 2001), entre otros.

En este capítulo se describen algunos de los conceptos fundamentales de procesos estocásticos y se deducen las ecuaciones asociadas a la evolución de la probabilidad (van Kampen, 2003; Gardiner, 1983; Reichl, 1998).

### 3.1 Fluctuaciones

Las fluctuaciones son desviaciones,  $\delta x(t)$  alrededor de un valor medio, esto es,

$$\delta x(t) = x(t) - \langle x \rangle \quad (3.1)$$

Para medir la importancia de las fluctuaciones en un sistema se define la fluctuación relativa  $\gamma$ , donde  $\sigma$  es la desviación estándar definida en la Ec. (3.7) y  $\langle x \rangle$  es el valor promedio de la variable aleatoria  $x$

$$\gamma \equiv \frac{\sigma}{\langle x \rangle} \quad (3.2)$$

Para el caso  $\gamma \ll 1$  las fluctuaciones son importantes.

### 3.2 Fundamentos de procesos estocásticos

#### 3.2.1. Variable estocástica y momentos de la distribución

Una variable estocástica es un objeto  $X$  que se define a través de un conjunto de estados,  $X = \{x_1(t_1), x_2(t_2), \dots, x_n(t_n)\}$ , y una densidad de probabilidad asociada a éste. La variable puede ser discreta o continua en un rango de valores. Si se considera un conjunto de estados multidimensional se tendría un vector  $\mathbf{X}$  (van Kampen, 2003).

Las propiedades de la densidad de probabilidad en un rango unidimensional continuo,  $P(x)$ , son:

$$\begin{aligned} \text{i) } & P(x) \geq 0 \\ \text{ii) } & \int_{-\infty}^{\infty} P(x) dx = 1 \end{aligned} \quad (3.3)$$

iii)  $P(x)dx$  es la *probabilidad* de que la variable  $X$  se encuentre entre el valor  $x$  y  $x + dx$ . Cuando  $P(x)$  se normaliza respecto a una unidad de volumen la densidad de probabilidad es una densidad numérica.

En base a la definición de variable estocástica se define el promedio de una función  $f(X)$  en el mismo espacio de estados,

$$\langle f(X) \rangle = \int f(x)P(x)dx \quad (3.4)$$

Generalizando, el momento n-ésimo de  $X$  se escribe como,

$$\langle X^n \rangle = \int X^n P(x)dx \quad (3.5)$$

La varianza o dispersión se expresa por

$$\sigma^2 = \langle (X - \langle X \rangle)^2 \rangle = \langle X^2 \rangle - \langle X \rangle^2 \quad (3.6)$$

y la desviación estándar como

$$\sigma = (\langle X^2 \rangle - \langle X \rangle^2)^{1/2} \quad (3.7)$$

Un caso particular pero muy importante de distribución es la **distribución Gaussiana**, la cual está dada por

$$P(x, t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2(t)}} \exp\left[-\frac{(x - \langle x(t) \rangle)^2}{2\sigma^2(t)}\right] \quad (3.8)$$

Esta distribución queda completamente determinada por sus dos primeros momentos. Los de orden superior están dados en función de estos dos primeros.

### 3.2.2 Densidad de probabilidad condicional

Si se considera una variable estocástica  $X$ , la cual tiene  $r$  componentes; la densidad  $P_r$ , asociada a  $X$ , es llamada la distribución de probabilidad conjunta de las  $r$  variables  $X_1, X_2, \dots, X_r$ . El proceso estocástico está caracterizado, cuando se conoce toda la jerarquía de funciones de densidad de probabilidad conjunta.

Al considerar un subconjunto  $s < r$  de variables con valores  $x_1, x_2, \dots, x_r$ , se define la densidad de probabilidad marginal,  $P_s$  como,

$$P_s(x_1, \dots, x_s) = \int P_r(x_1, \dots, x_s, x_{s+1}, \dots, x_r) dx_{s+1} \dots dx_r \quad (3.9)$$

La densidad de probabilidad condicional  $P_{s|r-s}(x_1, \dots, x_s | x_{s+1}, \dots, x_r)$ , denota que las variables  $X_{s+1}, \dots, X_r$ , y sus valores  $x_{s+1}, \dots, x_r$  están condicionados a los valores  $x_1, x_2, \dots, x_s$ . De esta manera,  $P_r$  se relaciona con  $P_s$  a través de la Regla de Bayes

$$P_r(x_1, \dots, x_r) = P_{r-s}(x_{s+1}, \dots, x_r) P_{s|r-s}(x_1, \dots, x_s | x_{s+1}, \dots, x_r) \quad (3.10)$$

o bien, en su forma más conocida,

$$P_{s|r-s}(x_1, \dots, x_s | x_{s+1}, \dots, x_r) = \frac{P_r(x_1, \dots, x_r)}{P_{r-s}(x_{s+1}, \dots, x_r)} \quad (3.11)$$

Si se supone que  $r$  variables pueden subdividirse en los subgrupos  $(X_1, \dots, X_s)$  y  $(X_{s+1}, \dots, X_r)$ , se dice que estos conjuntos son independientes estadísticamente cuando  $P_r$  se factoriza de la forma siguiente,

$$P_r(x_1, \dots, x_r) = P_s(x_1, \dots, x_s)P_{r-s}(x_{s+1}, \dots, x_r) \quad (3.12)$$

### 3.3 Procesos estocásticos

Un proceso estocástico se define como una función aleatoria,  $Y_X(t)$  que depende de dos variables, la variable estocástica  $X$  y una variable determinista, el tiempo. El proceso ocurre cuando se genera un conjunto de cantidades  $Y$  que se derivan de  $X$  a través de  $f(X, t)$

$$Y_X(t) = f(X, t) \quad (3.13)$$

En particular, si  $X$  toma uno de sus valores posibles  $x$ , se obtiene una realización del proceso,

$$Y_x(t) = f(x, t) \quad (3.14)$$

Cuando se obtiene el conjunto de realizaciones posibles tenemos un proceso estocástico.

A partir de la Ec. (3.14) pueden definirse los promedios, en base a la densidad de probabilidad  $P_X(x)$ ,

$$\langle Y(t) \rangle = \int Y_x(t) P_X(x) dx \quad (3.15)$$

En general la forma de los  $n$ -ésimos momentos para  $n$  valores del tiempo,  $t_1, t_2, \dots, t_n$  se escribe como

$$\langle Y(t_1)Y(t_2)\dots Y(t_n) \rangle = \int Y_x(t_1)Y_x(t_2)\dots Y_x(t_n)P_X(x)dx \quad (3.16)$$

En particular, una función de gran importancia es la función de autocorrelación

$$\langle\langle Y(t_1)Y(t_2) \rangle\rangle = \langle Y(t_1)Y(t_2) \rangle - \langle Y(t_1) \rangle \langle Y(t_2) \rangle \quad (3.17)$$

la cual equivale a la varianza cuando  $t_1=t_2$

$$\langle\langle Y(t)^2 \rangle\rangle = \sigma^2(t) \quad (3.18)$$

Por otra parte, la densidad de probabilidad  $P_1(y, t)$  para el proceso estocástico  $Y_x(t)$  está dada por

$$P_1(y, t) = \int \delta \{y - Y_x(t)\} P_X(x) dx \quad (3.19)$$

En forma análoga a la Sección 3.2.2,  $P_{l|k}(y_{k+1}, t_{k+1}; \dots; y_{k+l}, t_{k+l} | y_1, t_1; \dots; y_k, t_k)$ , se escribe como

$$P_{l|k}(y_{k+1}, t_{k+1}; \dots; y_{k+l}, t_{k+l} | y_1, t_1; \dots; y_k, t_k) \equiv \frac{P_{k+l}(y_1, t_1; \dots; y_k, t_k; y_{k+1}, t_{k+1}; \dots; y_{k+l}, t_{k+l})}{P_k(y_1, t_1; \dots; y_k, t_k)} \quad (3.20)$$

en donde se satisface la condición de que  $P_{l|k}$  sea positiva y esté normalizada,

$$\int P_{l|k}(y_2, t_2 | y_1, t_1) dy_2 = 1 \quad (3.21)$$

Si  $P_k$  depende únicamente de la diferencia en el tiempo, esto es,

$$P_k(y_1, t_1 + \tau; y_2, t_2 + \tau; \dots; y_k + \tau) = P_k(y_1, t_1; y_2, t_2; \dots; y_k, t_k) \quad (3.22)$$

se dice que el proceso es un **proceso estacionario**. Donde es una condición necesaria pero no suficiente que  $P_k(y_1, t_1)$  sea independiente del tiempo.

Si todas las distribuciones  $P_k$  son Gaussianas, Ec.(3.8), se dice que el proceso es un **proceso Gaussiano**. Entonces está completamente especificado por el valor medio  $\langle Y(t) \rangle$  y su segundo momento  $\langle Y(t_1)Y(t_2) \rangle$ .

Es importante señalar que un proceso estocástico puede determinarse de diversas maneras: a través de la densidad de probabilidad, ó sus momentos, de la jerarquía de funciones de probabilidad condicional, o mediante la función generadora de momentos.

### 3.4 Proceso Markoviano

Una clase muy importante de proceso estocástico es el llamado **proceso Markoviano**. En este proceso, el estado actual del sistema depende únicamente del estado inmediato anterior. Los eventos ocurren en un orden  $t_1 < t_2 < t_3 < \dots < t_n$  que se representa a través de la densidad de probabilidad condicional,  $P_{l|1}(y_n, t_n | y_{n-1}, t_{n-1})$ ,

$$P_{l|n}(y_n, t_n | y_{n-1}, t_{n-1}; \dots; y_2, t_2; y_1, t_1) = P_{l|1}(y_n, t_n | y_{n-1}, t_{n-1}) \quad (3.23)$$

La Ec. (3.23) queda completamente especificada a través de las probabilidades  $P_1(y_1, t_1)$  y  $P_{||}(y_2, t_2 | y_1, t_1)$ ; porque toda la jerarquía de funciones de distribución puede construirse mediante estas dos funciones.

Así, la densidad de probabilidad condicional para tres estados, se puede expresar utilizando la jerarquía de funciones, tomando en cuenta que  $t_1 < t_2 < t_3$

$$\begin{aligned} P_3(y_1, t_1; y_2, t_2; y_3, t_3) &= P_1(y_1, t_1) P_{||}(y_2, t_2 | y_1, t_1) P_{||}(y_3, t_3 | y_2, t_2) \\ &= P_2(y_1, t_1; y_2, t_2) P_{||}(y_3, t_3 | y_2, t_2; y_1, t_1) \end{aligned} \quad (3.24)$$

Integrando sobre  $y_2$  esta ecuación,

$$P_2(y_1, t_1; y_3, t_3) = P_1(y_1, t_1) \int dy_2 P_{||}(y_2, t_2 | y_1, t_1) P_{||}(y_3, t_3 | y_2, t_2) \quad (3.25)$$

dividiendo entre  $P_1(y_1, t_1)$  obtenemos

$$P_{||}(y_3, t_3 | y_1, t_1) = \int dy_2 P_{||}(y_2, t_2 | y_1, t_1) P_{||}(y_3, t_3 | y_2, t_2) \quad (3.26)$$

La Ec. (3.26) es la llamada **ecuación de Chapman- Kolmogorov**. Es una ecuación integral para la probabilidad condicional de un proceso Markoviano y es una condición necesaria y suficiente para que el proceso estocástico sea Markoviano. Esto implica que el estado actual del sistema depende únicamente del estado inmediato anterior. En un proceso estocástico no- Markoviano se necesita conocer toda la historia para determinar el estado del sistema.

### 3.5 Ecuación de Fokker- Planck

La ecuación de Chapman- Kolmogorov (Ec. 3.26), se puede reescribir como

$$P(y, \Delta t | x) = \int P(y, \Delta t | z) P(z, t | x) dz \quad (3.27)$$

donde las variables son mudas, y  $y > z > x$ . Restando en ambos lados de la ecuación  $P(y, t | x)$  y recordando la definición de derivada,

$$\frac{\partial}{\partial t} P(y, t | x) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{P(y, \Delta t | x) - P(y, t | x)}{\Delta t},$$

obtenemos,

$$\frac{\partial}{\partial t} P(y, t | x) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{1}{\Delta t} \left\{ \int P(y, \Delta t | z) P(z, t | x) dz - P(y, t | x) \right\} \quad (3.28)$$

multiplicando esta ecuación por una función arbitraria  $R(y)$ , la cual decae suficientemente rápido a cero, e integrando sobre todos los valores de  $y$  (Rodríguez, 2007),

$$\int dy R(y) \frac{\partial}{\partial t} P(y, t | x) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{1}{\Delta t} \left\{ \int dy R(y) \int P(y, \Delta t | z) P(z, t | x) dz - \int dy R(y) P(y, t | x) \right\} \quad (3.29)$$

$R(y)$  se desarrolla en series de Taylor alrededor de  $z$ .

$$R(y) = R(z) + (y - z)R'(z) + \frac{1}{2}(y - z)^2 R''(z) + \dots \quad (3.30)$$

en donde  $R'(z)$  y  $R''(z)$  significa derivada y doble derivada de  $R$  respecto a  $z$ . Es importante señalar que se considera que las fluctuaciones son pequeñas. Introduciendo la Ec. (3.30) en el miembro derecho de la Ec. (3.29) y re-etiquetando  $y \rightarrow z$  en su segundo término (recordando que  $y$  es una variable muda), obtenemos

$$\begin{aligned} \int dy R(y) \frac{\partial}{\partial t} P(y, t | x) &= \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{1}{\Delta t} \left\{ \int dz P(z, t | x) \right. \\ &\left[ R(z) \int dy P(y, \Delta t | z, t) + R'(z) \int dy (y - z) P(y, \Delta t | z, t) + \right. \\ &\left. \left. \frac{R''(z)}{2} \int dy (y - z)^2 P(y, \Delta t | z, t) + \dots \right] - \left[ \int dz R(z) P(z, t | x) \right] \right\} \end{aligned} \quad (3.31)$$

en donde la segunda y tercera integral están dadas por

$$\lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{1}{\Delta t} \int dy (y - z) P(y, \Delta t | z, t) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{1}{\Delta t} \langle z \rangle \equiv A(z) \quad (3.32)$$

$$\lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{1}{\Delta t} \int dy (y - z)^2 P(y, \Delta t | z, t) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{1}{\Delta t} \langle z^2 \rangle \equiv B(z) \quad (3.33)$$

Introduciendo estas definiciones en la Ec. (3.31) obtenemos

$$\int dy R(y) \frac{\partial}{\partial t} P(y, t | x) = \int dz P(z, t | x) \left[ R'(z) A(z) + \frac{1}{2} R''(z) B(z) + \dots \right] \quad (3.34)$$

Integrando por partes se obtiene

$$\begin{aligned} \int dy R(y) \frac{\partial}{\partial t} P(y, t | x) &= \\ &- \int dy R(y) \frac{\partial}{\partial y} [A(y) P(z, t | x)] + \frac{1}{2} \int dy R(y) \frac{\partial^2}{\partial y^2} [B(y) P(z, t | x)] \end{aligned} \quad (3.35)$$

el miembro derecho se resta a ambos lados de la ecuación, como el integrando debe ser cero, se obtiene

$$\frac{\partial}{\partial t} P(y, t|x) = -\frac{\partial}{\partial y} [A(y)P(y, t|x)] + \frac{1}{2} \frac{\partial^2}{\partial y^2} [B(y)P(y, t|x)] \quad (3.36)$$

En esta ecuación se ha sustituido  $P(y, t|x)$  por  $P(y, t)$  por simplificar la notación, sin embargo, hay que recordar que es una ecuación para la densidad de probabilidad condicional. La ecuación (3.36) es llamada **Ecuación de Fokker-Planck**. Los coeficientes  $A(y)$  y  $B(y)$  son los coeficientes de arrastre y de difusión, respectivamente.  $B(y)$  está asociado a la magnitud de las fluctuaciones. En el caso, que ambos coeficientes sean no lineales se dice que la Ecuación de Fokker-Planck es no lineal, aunque en el sentido matemático siempre es lineal. Esta ecuación se reduce a la llamada **Ecuación de Difusión** cuando  $A(y)$  es cero y  $B(y)$  es constante,

$$\frac{\partial}{\partial t} P(y, t) = \frac{B}{2} \frac{\partial^2}{\partial y^2} P(y, t) \quad (3.37)$$

### 3.6 Ecuación Maestra

La ecuación maestra es una ecuación de balance para la densidad de probabilidad condicional que se construye bajo la condición de conservación de la probabilidad a partir de la ecuación de Chapman- Kolmogorov, Ec. (3.36).

$$P_{||}(y_3, t_3 | y_1, t_1) = \int P_{||}(y_3, t_3 | y_2, t_2) P_{||}(y_2, t_2 | y_1, t_1) dy_2 \quad (3.38)$$

Suponiendo que los tiempos  $t_2$  y  $t_3$ , con  $t_3 > t_2 > t_1$ , son cercanos entre sí, esto es  $\tau = t_3 - t_2$  es pequeño, se realiza una expansión del término  $P_{||}(y_2, t_2 | y_1, t_1)$  para representar pequeños saltos de la variable estocástica alrededor de  $\tau$ , esto es,

$$P_{||}(y_2, t_2 | y_1, t_1) = A\delta(y_2 - y_1) + \tau W(y_2 | y_1) \quad (3.39)$$

Aquí  $A$  es la constante de normalización. El primer término del miembro derecho es la densidad de probabilidad de que en intervalo  $\tau$  no exista un salto de  $y_1$  a  $y_2$ .  $W(y_2 | y_1)$  es la probabilidad de transición por unidad de tiempo de saltar de  $y_1$  a  $y_2$ .

$$\int dy_2 P_{||}(y_2, t_2 | y_1, t_1) = A \int \delta(y_2 - y_1) dy_2 + \int \tau W(y_2 | y_1) dy_2 \quad (3.40)$$

Tomando en cuenta que la probabilidad se conserva,

$$1 = A + \tau \int W(y_2 | y_1) dy_2 \quad (3.41)$$

y de la Ec. (3.41) se sigue que

$$A = 1 - \tau a_0(y_1) \quad (3.42)$$

en donde

$$a_0(y_1) \equiv \int W(y_2 | y_1) dy_2 \quad (3.43)$$

Sustituyendo la Ec. (3.42) en la Ec. (3.39) se obtiene

$$P_{\parallel}(y_2, t_2 | y_1, t_1) = (1 - \tau a_0(y_1)) \delta(y_2 - y_1) + \tau W(y_2 | y_1) \quad (3.44)$$

Siguiendo un procedimiento similar para  $P_{\parallel}(y_3, t_3 | y_2, t_2)$

$$P_{\parallel}(y_3, t_3 | y_2, t_2) = (1 - \tau a_0(y_2)) \delta(y_3 - y_2) + \tau W(y_3 | y_2) \quad (3.45)$$

se sustituye en la Ec. (3.36)

$$\begin{aligned} P_{\parallel}(y_3, t_2 + \tau | y_1, t_1) &= \int dy_2 \delta(y_3 - y_2) P_{\parallel}(y_2, t_2 | y_1, t_1) - \\ & - \tau \int dy_2 a_0(y_2) \delta(y_3 - y_2) P_{\parallel}(y_2, t_2 | y_1, t_1) + \tau \int dy_2 W(y_3 | y_2) P_{\parallel}(y_2, t_2 | y_1, t_1) \end{aligned} \quad (3.46)$$

aplicando las propiedades de la función delta de Dirac,

$$\begin{aligned} P_{\parallel}(y_3, t_2 + \tau | y_1, t_1) &= P_{\parallel}(y_3, t_3 | y_1, t_1) - \tau a_0(y_3) P_{\parallel}(y_3, t_3 | y_1, t_1) + \\ & + \tau \int dy_2 W(y_3 | y_2) P_{\parallel}(y_2, t_2 | y_1, t_1) \end{aligned} \quad (3.47)$$

Restando en la ecuación el primer término del miembro izquierdo y recordando la definición de derivada obtenemos

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial t} P_{\parallel}(y_3, t_3 | y_1, t_1) &= \lim_{\tau \rightarrow 0} \frac{P_{\parallel}(y_3, t_2 + \tau | y_1, t_1) - P_{\parallel}(y_3, t_3 | y_1, t_1)}{\tau} = \\ & - \int dy_2 W(y_2 | y_3) P_{\parallel}(y_3, t_3 | y_1, t_1) + \int dy_2 W(y_3 | y_2) P_{\parallel}(y_2, t_2 | y_1, t_1) \end{aligned} \quad (3.48)$$

Reetiquetando  $y_3 \rightarrow y$   $y_1 \rightarrow y_0$   $y_2 \rightarrow y'$   $t_3 \rightarrow t$   $t_2 \rightarrow t'$ , obtenemos

$$\frac{\partial}{\partial t} P(y, t | y_0, t_0) = - \int dy' \{ W(y | y') P_{\parallel}(y, t | y_0, t_0) - W(y' | y) P_{\parallel}(y', t' | y_0, t_0) \} \quad (3.49)$$

Esta la forma integro-diferencial de la ecuación de Chapman- Kolmogorov llamada **Ecuación Maestra**. Su forma discreta está dada por

$$\frac{\partial}{\partial t} P_y(t) = \sum_{y'} [W_{yy'} P_{y'}(t) - W_{y'y} P_y(t)] \quad (3.50)$$

Para resolverla se necesita de la condición inicial

$$P(y, t | y_0, t_0) = \delta(y - y_0) \quad (3.51)$$

y modelos para las probabilidades de transición,  $W(y|y')$ ,  $W(y'|y)$ . En la Ec. (3.49), el primer término de lado derecho se refiere a la ganancia de probabilidad  $P(y, t)$  debido a la transición del estado  $y'$  al estado  $y$ . El segundo término representa la pérdida de probabilidad por la transición del estado  $y$  al estado  $y'$  (Fig .3.1).

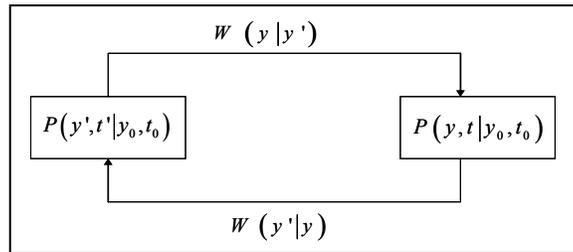


Fig 3.1 Representación esquemática de los términos de ganancia y pérdida de probabilidad.

*La ecuación Maestra es una ecuación de balance para la probabilidad condicional  $P(y, t | y_0, t_0)$ , es una ecuación lineal e irreversible. Contiene dos escalas de tiempo una es mesoscópica y la otra microscópica. La primera está asociada con la evolución en el tiempo de  $P(y, t | y_0, t_0)$ , la escala microscópica se relaciona con las probabilidades de transición que dependen de las propiedades intrínsecas del sistema. Las probabilidades de transición  $W(y|y')$  y  $W(y'|y)$  deben conocerse fenomenológicamente o bien deben deducirse de primeros principios a partir de la teoría cinética. En algunos casos, no es necesario resolver la ecuación maestra para obtener información importante, multiplicándola por  $y^n$  podemos obtener ecuaciones para los momentos, las cuales son más sencillas de resolver que la ecuación original.*

### 3.7 Ecuación de Langevin

El método de Langevin se utiliza cuando se sabe que las fluctuaciones afectan la dinámica de un sistema cuyo comportamiento macroscópico está bien determinado. Este método consiste en tres etapas:

1. Escribir las ecuaciones de movimiento macroscópicas  $F_D$
2. Agregar a estas ecuaciones una fuerza fluctuante  $F(t)$ , llamada fuerza de Langevin. Las propiedades que debe satisfacer esta fuerza son:

- i.  $F(t)$  es aleatoria y varía rápidamente en el tiempo comparada con la variación macroscópica. Esto se ejemplifica en la Fig. 3.2, en donde la fuerza macroscópica, fuerza de arrastre en el caso de una partícula inmersa en un fluido, apenas muestra cambios, mientras la fuerza fluctuante ya lo habrá hecho muchísimas veces.
- ii. Los dos primeros momentos de  $F(t)$  están dados por

$$\langle F(t) \rangle = 0 \quad (3.52)$$

$$\langle F(t)F(t') \rangle = \Gamma \delta(t-t') \quad (3.53)$$

en donde  $\Gamma$  es una constante que indica la magnitud de la correlación. El tiempo de duración de una colisión es tan pequeño (anchura del pico) que se utiliza una función delta,  $\delta$ . El promedio es sobre un conjunto estadístico, esto es, sobre las realizaciones del ruido y sobre las condiciones iniciales de la variable estocástica que nos indica que tenemos a un sistema cerca de equilibrio mediante una distribución Gaussiana llamada también ruido Gaussiano.

La correlación  $\langle F(t)F(t') \rangle$  es precisamente el **teorema de Fluctuación-Disipación**. Este teorema proporciona una expresión explícita de la constante de rozamiento,  $\zeta$  en términos de la función de correlación de la fuerza fluctuante  $F(t)$  en la situación de equilibrio.  $\zeta$  es un parámetro que representa la velocidad de aproximación al equilibrio del sistema. Cuando la interacción del sistema y  $F(t)$  es grande se alcanza el equilibrio muy rápidamente.

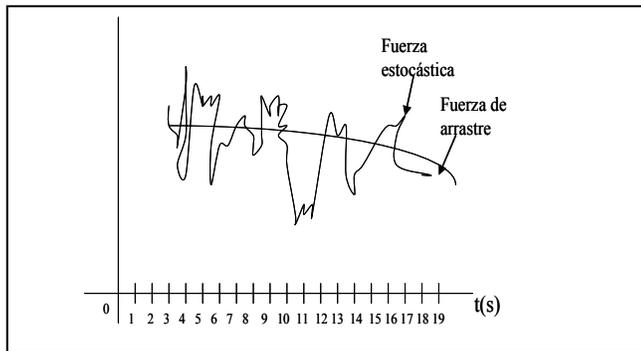


Fig. 3.2 Las fuerzas estocásticas y de arrastre que experimenta la partícula varían en diferentes escalas.

La **ecuación de Langevin** consiste de la suma de la ecuación macroscópica y la fuerza estocástica junto con las propiedades de ésta última. *Esta ecuación tiene dos contribuciones, una determinista y una aleatoria* y debido a la diferencia de escalas temporales son independientes. La ecuación resultante es por lo tanto una **ecuación diferencial estocástica, EDE**.

En el siguiente capítulo se ejemplifican los conceptos introducidos en este capítulo, mediante el llamado Movimiento Browniano.

## 4. MOVIMIENTO BROWNIANO

El movimiento Browniano ocurre en un sistema en equilibrio, que está formado por partículas de tamaño entre  $10^{-6}m$  y  $10^{-7}m$  inmersas en un fluido (gas ó líquido). En este sistema, las partículas ejecutan un movimiento aleatorio y continuo debido a las colisiones de las moléculas del fluido en su superficie.

En 1828 el botánico inglés R. Brown observó que en una solución de agua los granos de polen de una hierba, realizaban un movimiento errático continuo y sugirió que esto se debía a causas físicas y no biológicas. Este fenómeno fue descubierto por Gleichen y Needham desde 1767, sin embargo, Brown hizo primero una investigación en forma detallada. De su trabajo concluyó que este tipo de movimiento es característico de cualquier suspensión en la que las partículas suspendidas tienen dimensiones muy pequeñas (Braun, 1986). La explicación cuantitativa se dió hasta el desarrollo de la teoría cinética. Este tipo de movimiento fue estudiado ampliamente, descartando el efecto de causas externas y fue hasta 1905, cuando Einstein propuso su explicación. En su trabajo, Einstein contrastó las predicciones de las leyes de la termodinámica con las de la teoría cinética. Se interesó por las conclusiones que se obtendrían si el movimiento browniano se tratara de explicar por medio de una hipótesis atómica. Desde 1902, había trabajado en la teoría microscópica de la termodinámica (mecánica estadística) y en el transcurso de sus investigaciones, se encontró con la necesidad de estudiar las fluctuaciones que ocurren en las cantidades termodinámicas alrededor de sus valores de equilibrio.

Por otro lado, se tenían los siguientes resultados:

- La partícula Browniana realiza un movimiento fluctuante, azaroso, en zigzag.
- Maxwell había mostrado que existía una distribución de velocidades para un sistema en equilibrio.
- El movimiento dependía de las propiedades del fluido en el que están suspendidas las partículas y no de las propiedades de las partículas.
- La velocidad de las partículas se incrementa con la temperatura y al disminuir su tamaño.
- Cualquier cuerpo que se encuentre en un fluido recibe una multitud de impactos de las moléculas que componen ese medio. Debido al azar, la cantidad de impactos al que está sujeto un cuerpo grande tiene que ser igual en todas las direcciones, por lo que no hay desplazamiento. Sin embargo, los objetos más pequeños, como la partícula Browniana son empujados en diferentes direcciones según la frecuencia de colisiones que recibe desde un lado o desde otro. Esto es, si la partícula suspendida está sujeta a los choques al azar de las partículas de fluido, es altamente improbable que dos de ellas choquen sobre la partícula en sentidos diametralmente opuestos con la misma magnitud en sus velocidades, por lo que no puede ser que se anule este efecto.
- La frecuencia de colisiones que experimenta una partícula en un fluido es del orden de  $10^{15}s^{-1}$ . Con la colisión de las partículas del fluido sobre la partícula suspendida cambia su velocidad en una cantidad extremadamente pequeña, el efecto acumulativo de todas las colisiones resulta en desviaciones de sus valores medios debido al número extraordinariamente grande de colisiones.

- La partícula suspendida experimenta un cambio finito en su trayectoria. Estos cambios son impredecibles tanto en magnitud como en dirección ya que dada la cantidad de colisiones, no es posible seguir el efecto individual de cada una de ellas.

Del hecho de que los movimientos moleculares son caóticos, se deduce solamente, que en promedio, el número de choques es igual para las distintas direcciones. Pero en un sistema tan estadístico como un fluido, son inevitables las desviaciones de los valores medios. Tales desviaciones de los valores medios de unas u otras magnitudes, que se realizan en un pequeño volumen o durante pequeños intervalos de tiempo, se llaman **fluctuaciones**. Entonces, debido a estas fluctuaciones del número de choques, se originan los movimientos azarosos característicos de las partículas en suspensión. Es importante enfatizar que los movimientos de las partículas brownianas no son movimientos moleculares. Se observa no el resultado del choque de una molécula, sino el resultado del predominio del número de choques en una dirección sobre la otra. El movimiento browniano sólo descubre claramente la misma existencia del movimiento molecular desordenado. De esta manera, el movimiento browniano se explica, porque se origina una fuerza resultante de determinada dirección, como resultado de la desigualdad del número de choques de las moléculas con la partícula en distintas direcciones. Como las fluctuaciones son momentáneas, después de un intervalo corto de tiempo cambia la dirección de la resultante y junto con ella cambia la dirección del desplazamiento de la partícula. De aquí que el caos observado en los movimientos brownianos refleje el caos de los movimientos moleculares (Braun, 1986; Salinas-Rodríguez, 1990). La explicación de este fenómeno fue dada, en 1905 por Einstein y en 1906 por Smoluchowski.

La teoría de Einstein y Smoluchowski se confirma experimentalmente con los trabajos de Perrin (1908), que consisten en el análisis del comportamiento de un subsistema. Definido por cada partícula en suspensión diluida a través de fotografías tomadas a intervalos de tiempo de 30s (Fig. 4.1).

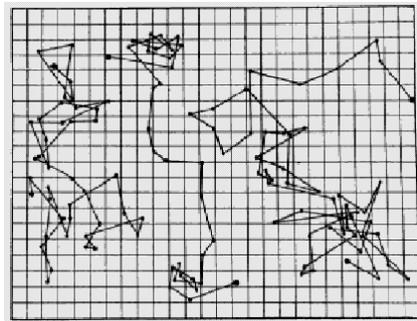


Fig. 4.1 Manuscritos Perrin 1913.

A continuación se dará una breve explicación de la teoría de Einstein así como otras descripciones para el estudio de este movimiento, como son las basadas en la Ecuación de Langevin, la ecuación de Fokker-Planck y la Ecuación Maestra. Comenzaremos por definir el concepto de fluctuación.

Es importante señalar que desde un punto de vista estadístico, no se tienen únicamente variables estocásticas, como existe una variación en el tiempo tenemos un

proceso estocástico. Por otro lado, el movimiento Browniano consiste de un número muy grande de eventos colectivos y en consecuencia se puede considerar que estos eventos son independientes entre sí.

#### 4.1 Descripción de Einstein

En 1905, Einstein propone que el comportamiento de las partículas brownianas en suspensión diluida puede describirse a través de propiedades colectivas no deterministas. En el contexto de una descripción estadística, que se fundamenta en el número extremadamente grande de colisiones al que está sujeta cada partícula. Las partículas no interactúan entre sí y se comportan como moléculas de un gas ideal. Las colisiones representan eventos con probabilidades independientes, y forman parte del evento colectivo generado por las fluctuaciones que originan, cuando chocan las moléculas en la superficie de las partículas.

En la descripción macroscópica estadística de Einstein la evolución del número de partículas en un elemento de volumen (densidad numérica) obedece una ecuación de conservación. Su flujo difusivo, depende del gradiente en la densidad numérica y el coeficiente de transporte,  $D$ . Como la densidad numérica es proporcional a la densidad de probabilidad, función de la posición y el tiempo, la ecuación de conservación se expresa en estos nuevos términos. La solución es una función aleatoria de la que obtenemos los momentos, el desplazamiento medio y el desplazamiento cuadrático medio

En la descripción macroscópica estadística de Einstein el número de partículas en un elemento de volumen ( $d\mathbf{X}$ ) cambia con la posición,  $\mathbf{X}$  y el tiempo  $t$ . Esta es la densidad numérica  $n(\mathbf{X}, t)$

$$n(\mathbf{X}, t) = \int n(\mathbf{X}_0, t_0) P(\mathbf{X}, t | \mathbf{X}_0, t_0) d\mathbf{X}_0 \quad (4.1)$$

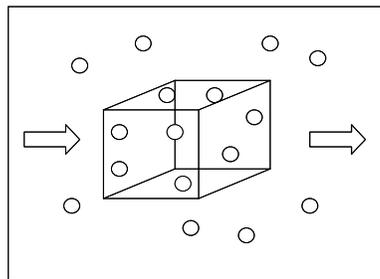


Fig. 6.3.1.1 Elemento de volumen de una suspensión diluida formada por las partículas y el fluido

Como  $n(\mathbf{X}, t)$  se conserva se satisface la ecuación de continuidad,

$$\frac{\partial n(\mathbf{X}, t)}{\partial t} + \nabla \cdot \mathbf{J}(\mathbf{X}, t) = 0 \quad (4.2)$$

donde  $\mathbf{J}$  es el flujo de masa y obedece la ley de Fick

$$\mathbf{J}(\mathbf{X}, t) = -D \nabla n(\mathbf{X}, t) \quad (4.3)$$

Por otra parte, como  $n(\mathbf{X}, t)$  es proporcional a la densidad de probabilidad de encontrar la partícula en  $\mathbf{X}$  al tiempo  $t$ ,

$$P(\mathbf{X}, t) \equiv \frac{n(\mathbf{X}, t)}{N} = \frac{1}{N} \int n(\mathbf{X}_0, t_0) P(\mathbf{X}, t | \mathbf{X}_0, t_0) d\mathbf{X}_0 \quad (4.4)$$

Aquí  $N$  representa el número total de partículas.

La ecuación de conservación se puede reescribir como

$$\frac{\partial P(\mathbf{X}, t | \mathbf{X}_0, t_0)}{\partial t} + D \nabla^2 P(\mathbf{X}, t | \mathbf{X}_0, t_0) = 0 \quad (4.5)$$

con la condición inicial

$$P(\mathbf{X}, t | \mathbf{X}_0, t_0) = \delta(\mathbf{X} - \mathbf{X}_0) \quad (4.6)$$

en donde

$$\delta(\mathbf{X} - \mathbf{X}_0) = \begin{cases} 0 & \mathbf{X} = \mathbf{X}_0 \\ 1 & \mathbf{X} \neq \mathbf{X}_0 \end{cases} \quad (4.7)$$

y las condiciones a la frontera

$$\begin{aligned} x \rightarrow -\infty & \quad P \rightarrow 0 \\ x \rightarrow +\infty & \quad P \rightarrow 0 \end{aligned} \quad (4.8)$$

La Ec. (4.5) es la Ecuación de Difusión, Ec. (3.37) con  $B = 2D$  (Ver Apéndice A).

La solución de la Ec. (4.5) está dada por una distribución Gaussiana

$$P(X, t | X_0, t_0) = \frac{1}{(4\pi Dt)^{1/2}} \exp \left[ -\frac{(\langle X \rangle - \langle X_0 \rangle)^2}{4D(t - t_0)} \right] \quad (4.9)$$

Esta distribución tiene un máximo en el origen y una anchura creciendo de acuerdo a la raíz cuadrática media. Los momentos se obtienen multiplicando por  $X$  y  $X^2$  e integrando sobre todos los valores de  $X$  (definidos en el Cap. 3, Ec.(3.5)). En una dimensión,

$$\langle x(t) \rangle = 0 \quad (4.10)$$

$$\langle x(t)x(t') \rangle = 2D(t-t') \quad (4.11)$$

$$\sigma = \sqrt{\langle x^2(t) \rangle} = \sqrt{2Dt} \quad (4.12)$$

El primer momento indica que la posición promedio de la partícula en cualquier intervalo de tiempo es cero porque en promedio, la probabilidad de que la partícula se desplace hacia la derecha o hacia la izquierda es la misma. El segundo momento (para  $t = t'$ ) indica un comportamiento difusivo de la partícula debido al efecto colectivo de las fluctuaciones originadas por la colisión de las moléculas de fluido en su superficie.

El comportamiento de la partícula se puede entender, de acuerdo a la evolución al equilibrio del sistema que ocurre en varias escalas de tiempo.

i) En un intervalo de tiempo,  $t$ , mucho menor al tiempo de colisión,  $\tau_c$ , entre una molécula y otra ( $10^{-15} s$ ) la partícula actúa como partícula libre. El número de colisiones es insuficiente para causar el movimiento de la partícula.

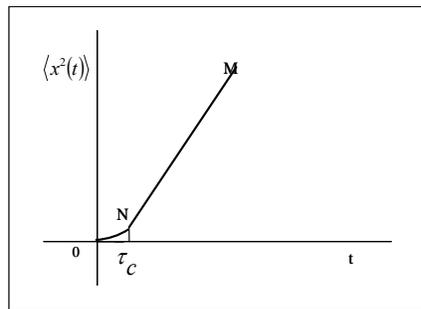


Fig. 4.2 Intervalos de tiempo definidos por Einstein

ii) Cuando  $t_0 > t > \tau_c$  la partícula se mueve en el fluido y cambia la distribución de velocidades (Fig. 4.3) hasta alcanzar una de equilibrio, la llamada distribución de Maxwell-Boltzmann ( $t = \tau_v$ ). Esta distribución no se modifica con el tiempo y es independiente de la condición inicial. La velocidad y el desplazamiento de la partícula cambian su comportamiento a irreversible.

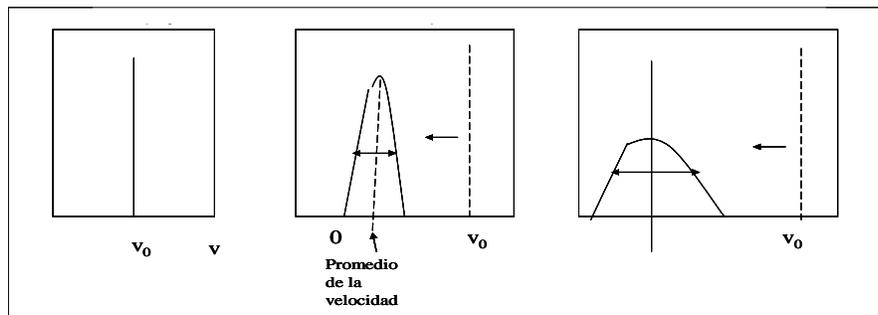


Fig. 4.3 Evolución de la distribución de velocidades de una partícula con una distribución inicial  $v_0$

En esta figura se tiene la distribución en diferentes tiempos:

(a)  $t = 0$ (b)  $t_\theta > t > \tau_c$ (c)  $t = \tau_v$ 

$\tau_c$  es el tiempo de colisión;  $t_\theta$  es el tiempo hidrodinámico y  $\tau_v$  es el tiempo en el límite asintótico .

iii) En el intervalo de tiempo,  $t_\theta \geq 10^{-9} s$  las partículas están distribuidas en forma uniforme y alcanzan el límite asintótico (Fig. 4.4).

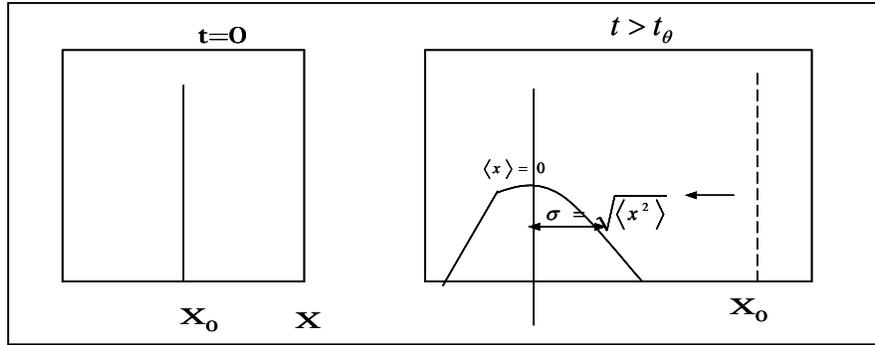


Fig. 4.4 Hacia una distribución de equilibrio en términos de la posición (Braun, 1986).

## 4.2 Ecuación de Smoluchowski

En 1906 Smoluchowski incorporó el efecto de un campo externo en la ecuación de difusión (Ec. 4.2)

$$\frac{\partial n(\bar{X}, t)}{\partial t} + \nabla \cdot \bar{J}_T(\bar{X}, t) = 0 \quad (4.13)$$

en donde

$$\bar{J}_T(\bar{X}, t) = -D \nabla n(\bar{X}, t) + n(\bar{X}, t) \bar{v}_T \quad (4.14)$$

$\bar{v}_T$  es la velocidad terminal, la cual relaciona la competencia entre la fuerza externa  $\bar{F}_E$  y la fuerza de arrastre de Stokes

$$\bar{F}_D = \zeta \bar{v}, \quad (4.15)$$

con

$$\zeta = 6\pi\mu a \quad (4.16)$$

$\bar{v}$  es la velocidad de la partícula. Entonces,

$$\bar{F}_D + \bar{F}_E = 0 \quad (4.17)$$

Bajo esta condición, las partículas sedimentan a una velocidad constante

$$\vec{v}_T = \frac{\vec{F}_E}{\zeta} \quad (4.18)$$

La ecuación de Smoluchowski es una ecuación donde el cambio temporal y espacial de la densidad numérica de partículas se debe al flujo difusivo y el flujo convectivo,

$$\frac{\partial n(\vec{X}, t)}{\partial t} = -D \nabla^2 n(\vec{X}, t) + \frac{n(\vec{X}, t)}{m\zeta} \nabla \cdot \vec{F}_E \quad (4.19)$$

En particular, cuando el campo externo es la fuerza de gravedad  $\vec{F}_E$

$$\vec{F}_E = m\vec{g} \quad (4.20)$$

y si se está en estado estacionario,

$$n(z) = n_0 e^{-\left| \frac{mg_z(z-z_0)}{RT} \right|} \quad (4.21)$$

es la ecuación barométrica, la cual indica una disminución de la densidad de las partículas con la altura. El factor al que está elevada la exponencial relaciona el efecto de la energía potencial sobre la energía térmica. Por otra parte, como en equilibrio termodinámico para una dimensión, se sigue que

$$D = \frac{k_B T}{m\zeta} \quad (4.22)$$

tenemos precisamente la relación de Stokes- Einstein.

### 4.3 Ecuación de Langevin

En 1908, Langevin parte de un análisis determinista para describir la dinámica de una partícula que se mueve dentro de un fluido viscoso en régimen de flujo reptante ( $Re < 0.1$ ). Realizó las siguientes hipótesis:

- La partícula Browniana es considerada como una esfera de radio  $a$ .
- La fuerza hidrodinámica que actúa sobre la esfera está dada por la relación de Stokes,

$$\vec{F}_D = -\zeta \vec{v} = -\zeta \frac{d\vec{x}}{dt} \quad (4.23)$$

$\vec{F}_D$  es la fuerza que tiene que ejercer la partícula sobre el fluido para moverse,  $\zeta$  está definida por la Ec. (4.16).

- La partícula Browniana inmersa en el fluido experimenta fuerzas debidas a las colisiones que sufre por las partículas del fluido. En vista de la gran cantidad de colisiones que ocurren en cada instante esta segunda fuerza  $\vec{F}(t)$  varía en forma azarosa y violenta, por lo tanto es una fuerza fluctuante.  $\vec{F}(t)$  puede ser indistintamente positiva o negativa y su magnitud es tal que mantiene el movimiento de la partícula que en su ausencia, la fuerza viscosa detendría.
- Considerando las dos contribuciones, la ecuación de movimiento está dada como la suma de  $\vec{F}_D$  y de  $\vec{F}(t)$

$$m \frac{d\vec{v}}{dt} = \vec{F}(t) + \vec{F}_D = \vec{F}(t) - \zeta \vec{v} \quad (4.24a)$$

$$\frac{d\vec{x}}{dt} = \vec{v} \quad (4.24b)$$

- En estas ecuaciones se reconocen dos escalas de tiempo muy distintas: la escala en la que varía la fuerza de Stokes (que es para casos típicos del orden de  $10^{-9}$  s) y la escala en la que varía la fuerza debida a las colisiones (que es del orden de  $\tau_c \sim 10^{-15}$  s).
- Las propiedades de la fuerza fluctuante son (Ver Cap. 3, Ecs. 3.52 y 3.53) :

$$\langle F(t) \rangle = 0 \quad (4.25a)$$

$$\langle F(t)F(t') \rangle = \Gamma \delta(t-t') \quad (4.25b)$$

La Ec. (4.25a) nos indica que debido a la aleatoriedad de  $F(t)$  su valor medio se anula siempre ( $t \gg \tau_c$ ), independientemente de la velocidad y la posición de las partículas. La Ec. (4.25b) nos dice que la correlación es instantánea y a distintos tiempos es nula. La fuerza fluctuante corrige la solución analítica para la velocidad cuyo valor es constante a un tiempo  $t \rightarrow \infty$  (Fig. 4.5), esto es,  $\lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{\tau} \int_t^{t+\tau} F(s) ds \rightarrow 0$ ; cuando se ignora su presencia, el movimiento de la partícula se debe únicamente a la fuerza de arrastre.

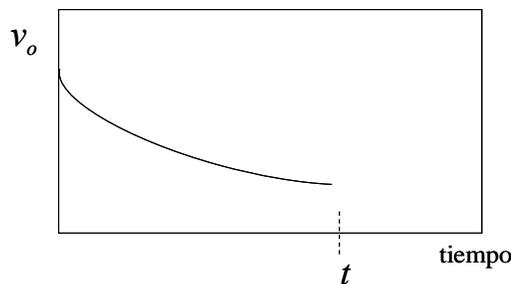


Fig. 4.5 Valor de la velocidad cuando el intervalo de tiempo,  $t \rightarrow \infty$

El sistema de ecuaciones (4.24) y (4.25) es lo que se conoce como **Ecuación de Langevin**, la cual es una ecuación diferencial estocástica, EDE. La fuerza que experimenta una partícula determina la trayectoria y la velocidad que tiene, esto significa que si la fuerza aplicada es fluctuante, tanto la posición como la velocidad de la partícula son también cantidades estocásticas. En consecuencia, la solución del problema radica en poder determinar las distribuciones tanto de la posición como de la velocidad de la partícula, ó en su defecto, los momentos asociados con esta distribución; pues en estas circunstancias no hay manera de determinar los valores precisos de la posición y de la velocidad en cada instante (Braun, 1986).

Considerando la proyección del radio vector  $\vec{x}$  sobre el eje X, las Ecs. (4.24) se reescriben como

$$\frac{dv}{dt} = \frac{1}{m} F(t) - \gamma v(t) \quad (4.26a)$$

$$\frac{dx}{dt} = v \quad (4.26b)$$

y 
$$\gamma \equiv \zeta / m \quad (4.27)$$

Para encontrar el desplazamiento  $x$  que la partícula browniana recibe por la acción de los choques de las moléculas, es necesario resolver esta ecuación para  $x$ .

El sistema de Ecs. (4.26) es un sistema de ecuaciones lineales inhomogéneas que se resuelven con la condición inicial,

$$v(0) = v_0 \quad (4.28)$$

Su solución es

$$v(t) = v_0 e^{-\gamma(t-t_0)} + \frac{1}{m} \int F(t') e^{-\gamma(t-t')} dt' \quad (4.29)$$

Los momentos se obtienen promediando sobre el conjunto estadístico la Ec. (4.29) y de las propiedades de la fuerza fluctuante. Este promedio se realiza sobre el ruido y las condiciones iniciales, en equilibrio, de las partículas (distribución de Maxwell- Boltzmann).

El primer momento para la velocidad se calcula usando el promedio sobre conjunto estadístico y la propiedad  $\langle F(t) \rangle = 0$  (Ec. 4.25a),

$$\langle v(t) \rangle_{v_0} = v_0 e^{-\gamma(t-t_0)} \quad (4.30)$$

Siguiendo un procedimiento similar, el segundo momento resulta ser

$$\begin{aligned}
\langle v(t)^2 \rangle_{v_0} &= \langle v_0^2 e^{-\gamma(t-t_0)} \rangle + \int_0^t dt' e^{-\gamma(t-t')} \int_0^{t'} dt'' e^{-\gamma(t-t'')} \langle F(t') F(t'') \rangle \\
&= v_0^2 e^{-\gamma(t-t_0)} + \frac{\Gamma}{2\gamma} (1 - e^{-2\gamma t})
\end{aligned} \tag{4.31}$$

donde se han utilizado las propiedades (4.25) de la fuerza fluctuante. Considerando el teorema de equipartición de la energía cinética,

$$\frac{1}{2} m \langle v^2 \rangle = \frac{k_B T}{2} \tag{4.32}$$

y tomando el límite termodinámico,  $t \rightarrow \infty$ , se obtiene de (4.31) y (4.32)

$$\frac{\Gamma}{2\gamma} = \frac{k_B T}{m} \tag{4.33}$$

Esta relación es la forma más sencilla del teorema de fluctuación disipación. El ruido  $\Gamma$  queda completamente especificado por la temperatura y viscosidad del fluido.  $\Gamma$  representa el efecto de las fluctuaciones que mueve a la partícula y  $2k_B T \zeta$  el efecto de frenado debido a que está inmersa en un fluido con determinada viscosidad.

Para calcular el desplazamiento cuadrático medio sustituimos la Ec. (4.26b) en la Ec. (4.26a) obteniendo una ecuación para  $x$

$$m \frac{d^2 x}{dt^2} = F(t) - \zeta \frac{dx}{dt} \tag{4.34}$$

Multiplicando esta ecuación por  $x$  y realizando trabajo algebraico se obtiene la ecuación,

$$\frac{m}{2} \frac{d^2 x^2}{dt^2} - \frac{m}{2} \left( \frac{dx}{dt} \right)^2 = x F(t) - \frac{1}{2} \zeta \frac{d}{dt} x^2 \tag{4.35}$$

Tomando el promedio tenemos

$$\frac{m}{2} \frac{d}{dt^2} \langle x^2 \rangle - \frac{m}{2} \left\langle \left( \frac{dx}{dt} \right)^2 \right\rangle = \langle x F(t) \rangle - \frac{1}{2} \zeta \frac{d}{dt} \langle x^2 \rangle \tag{4.36}$$

Considerando que  $x$  y  $F(t)$  no están correlacionados  $\langle x F(t) \rangle = 0$ , y haciendo uso de la Ec. (4.33) esta ecuación se reduce a

$$m \frac{d^2}{dt^2} \langle x^2 \rangle + \frac{\zeta}{2} \frac{d}{dt} \langle x^2 \rangle = \frac{k_B T}{2} \tag{4.37}$$

Esta es una ecuación diferencial ordinaria de segundo orden inhomogénea, para resolverla es necesario un cambio de variable dado por,

$$Z \equiv \frac{d}{dt} \langle x^2 \rangle \quad (4.38)$$

Así la Ec. (4.37) se reescribe,

$$m \frac{d}{dt} Z + \zeta Z = \frac{k_B T}{2} \quad (4.39)$$

y su solución es

$$Z = \frac{2k_B T}{\zeta} [1 - e^{-\gamma t}] = \frac{d}{dt} \langle x^2 \rangle \quad (4.40)$$

Integrando obtenemos

$$\Delta \langle x^2 \rangle \equiv \langle x^2 \rangle - \langle x_0^2 \rangle = \frac{2k_B T}{\zeta} \left[ t - \frac{1}{\gamma} (1 - e^{-\gamma t}) \right] \quad (4.41)$$

La Ec. (4.41) es el valor del desplazamiento cuadrático medio de la partícula Browniana como función del tiempo.  $\gamma$  es el inverso del tiempo de relajación de la partícula. Así, si estamos a tiempos largos,  $t \gg \gamma^{-1}$  y  $e^{-\gamma t} \rightarrow 0$

$$\langle x^2 \rangle = \frac{2k_B T}{\zeta} t \quad (4.42)$$

De la relación de la Teoría de Einstein, Ec. (4.11), sabemos que

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt \quad (4.43)$$

Igualando estas expresiones obtenemos la relación de Stokes-Einstein

$$D = \frac{k_B T}{\zeta} \quad (4.44)$$

#### 4.4 Ecuación de Fokker- Planck.

La ecuación de Fokker- Planck

$$\frac{\partial}{\partial t} P(y, t|x) = \frac{\partial}{\partial y} A(y) P(y, t|x) + \frac{1}{2} \frac{\partial^2}{\partial y^2} B(y) P(y, t|x) \quad (4.45)$$

para la partícula Browniana se obtiene de acuerdo al desarrollo de la Sección 3.5. Los coeficientes de arrastre y de difusión,  $A(y)$  y  $B(y)$  están definidos por las Ecs. (3.32) y (3.33) como

$$A(y) \equiv \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{1}{\Delta t} \langle y \rangle \quad (4.46a)$$

$$B(y) \equiv \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{1}{\Delta t} \langle y^2 \rangle \quad (4.46b)$$

Considerando la ecuación de Langevin en su forma general,

$$\frac{dy}{dt} = -\beta y(t) + F(t) \quad (4.47)$$

y promediándola sobre las realizaciones del ruido, obtenemos

$$\langle \Delta y(t) \rangle = -\langle \beta y \Delta t \rangle + \int_t^{t+\Delta t} dt \langle F(t) \rangle = -\beta y \Delta t \quad (4.48)$$

Multiplicando por  $y$  la Ec. (4.47) y promediando obtenemos, después de pasos algebraicos, la expresión para el segundo momento

$$\begin{aligned} \langle \Delta y(t)^2 \rangle &= \left\langle \left( -\beta y \Delta t + \int_t^{t+\Delta t} dt \langle F(t) \rangle \right)^2 \right\rangle \\ &= \langle \beta^2 y^2 \Delta t^2 \rangle - 2\beta y \Delta t \int_t^{t+\Delta t} dt \langle F(t) \rangle + \int_t^{t+\Delta t} dt' \int_t^{t+\Delta t} dt \langle F(t) F(t') \rangle \end{aligned} \quad (4.49)$$

Aplicando las propiedades de la fuerza fluctuante, Ec. (4.25). da lugar a

$$\langle \Delta y(t)^2 \rangle = \beta^2 y^2 (\Delta t)^2 + \Gamma \Delta t \quad (4.50)$$

De las Ecs. (4.46), (4.48) y (4.50) se obtienen las expresiones para los coeficientes:

$$A(y) = -\beta y \quad \text{y} \quad B(y) = \Gamma \quad (4.51)$$

Los valores de estos coeficientes se sustituyen en la Ec. (4.45), con el resultado:

$$\frac{\partial}{\partial t} P(y, t|x) = -\beta \frac{\partial}{\partial y} [y P(y, t|x)] + \frac{\Gamma}{2} \frac{\partial^2}{\partial y^2} P(y, t|x) \quad (4.52)$$

con la condición inicial

$$P(y, t | y_0, 0) = \delta(y - y_0) \quad (4.53)$$

La Ec. (4.52) es la ecuación de Fokker-Planck para movimiento Browniano, que se resuelve usando el método de las características (van Kampen, 2003). Su solución es

$$P(y, t | y_0, t_0) = \frac{1}{\sqrt{2\pi \langle (y(t) - \langle y(t) \rangle)^2 \rangle}} \exp \left[ -\frac{(y(t) - \langle y(t) \rangle)^2}{2 \langle (y(t) - \langle y(t) \rangle)^2 \rangle} \right] \quad (4.54)$$

Esta distribución es llamada proceso de **Ornstein-Uhlenbeck**. Describe un proceso **Markoviano, Gaussiano y estacionario**, su solución es la misma que se tiene para el caso de la Ecuación de Langevin.

De (4.47), promediando sobre el conjunto estadístico y resolviendo las ecuaciones, como se realizó en la sección anterior, Ecs. (4.28) y (4.30), se sigue que,

$$\langle y(t) \rangle = y_0 e^{-\beta t} \quad (4.55)$$

$$\sigma^2 \equiv \langle (y(t) - \langle y(t) \rangle)^2 \rangle = -\frac{\Gamma}{\beta} (1 - e^{-\beta t}) \quad (4.56)$$

Por otra parte a tiempos largos  $t \rightarrow \infty$ , la Ec. (4.54) se reduce a

$$P(y) = \sqrt{\frac{\beta}{\pi \Gamma}} \exp \left[ -\frac{\beta y^2}{\Gamma} \right] \quad (4.57)$$

## 4.5 Ecuación Maestra para el movimiento Browniano

### 4.5.1 Formulación del modelo estocástico.

El sistema está formado por partículas Brownianas en suspensión diluida, contenidas en un volumen constante  $V$ . Cada partícula en suspensión es un sistema cerrado que ejecuta un número de pasos  $m$  de longitud constante  $l$ . Aquí pueden ocurrir dos eventos con la misma probabilidad, que la partícula se mueva hacia la derecha o hacia la izquierda.

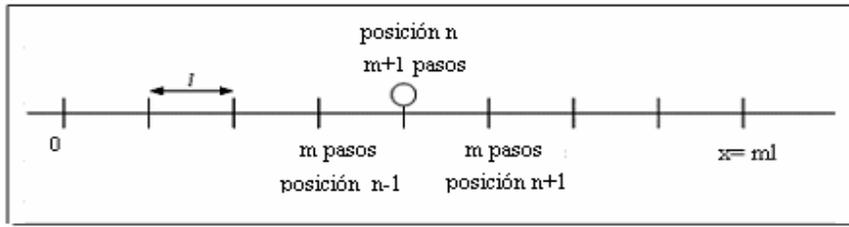


Fig. 4.6 Esquema del movimiento unidimensional de una partícula en suspensión diluida

Después de  $m$  pasos el desplazamiento de la partícula se define por,

$$x = ml \quad (4.58)$$

cada paso ocurre en un intervalo de tiempo discreto  $\tau$  que se relaciona con el tiempo continuo a través de

$$t = m\tau \quad (4.59)$$

$m$  es una variable estocástica que se define a través del espacio muestral  $m = \{0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots\}$  y la densidad de probabilidad  $\tilde{P}(n, t)$  que en términos del tiempo continuo se expresa como

$$\tilde{P}(n, t) \equiv P\left(n, \frac{t}{\tau}\right) \quad (4.60)$$

#### 4.5.2 Ecuación Maestra

La ecuación Maestra para  $\tilde{P}(n, t)$  se construye considerando la ganancia y la pérdida de la probabilidad del estado  $n$  debido a las transiciones hacia otros estados. El estado  $n$  se refiere a la posición de la partícula. Estos procesos se especifican a través de modelos para las probabilidades de transición.

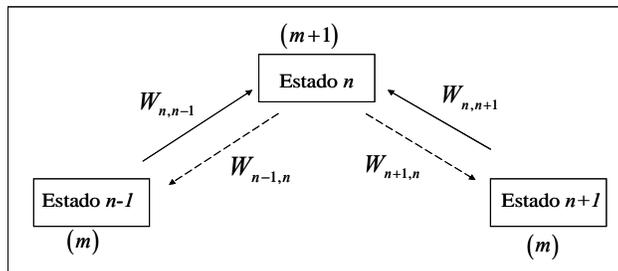


Fig.4.7 Esquema de la construcción de la ecuación Maestra

Supongamos que al tiempo  $t+\tau$  el sistema se encuentra en el estado  $n$ .  $\tau$  se escoge lo suficientemente pequeño de manera que un intervalo  $(t, t+\tau)$  solo exista a lo mas un salto de la partícula Browniana hacia la derecha o hacia la izquierda. En esta condición el número de pasos solo puede cambiar en uno. Lo cual es equivalente a considerar a este

proceso como un proceso estocástico Markoviano de un solo paso. Las probabilidades de cada evento, determinado por el número de pasos que da la partícula hacia la derecha o el número de pasos hacia la izquierda en el intervalo  $(t, t+\tau)$  es inversamente proporcional al volumen  $V$  puesto que hemos supuesto que las partículas se encuentran distribuidas uniformemente en  $V$ .

La probabilidad de que la partícula se encuentre en el estado  $n$  después de haber ejecutado  $m+1$  pasos, es la ganancia de probabilidad, que se determina a través de la probabilidad de transición del estado  $n-1$  al estado  $n$ ,  $\tau\widetilde{W}_{n,n-1}$  y la probabilidad correspondiente del estado  $n+1$  al estado  $n$ ,  $\tau\widetilde{W}_{n,n+1}$ .

$$P(n, m+1) = \tau\widetilde{W}_{n,n-1}P(n-1, m) + \tau\widetilde{W}_{n,n+1}P(n+1, m) \quad (4.61)$$

Los estados  $n-1$  y  $n+1$  se alcanzan después de que la partícula realiza  $m$  pasos.  $\widetilde{W}_{n,n\pm 1}$  se define como

$$\widetilde{W}_{n,n\pm 1} \equiv \frac{1}{\tau} W_{n,n\pm 1} \quad (4.62a)$$

y debe cumplir con la condición de normalización

$$\widetilde{W}_{n,n-1} + \widetilde{W}_{n,n+1} = 1 \quad (4.62b)$$

La probabilidad de que después de  $m$  pasos la partícula se encuentre en el estado  $n$  (pérdida) está asociada con la probabilidad de transición del estado  $n$  al estado  $n-1$ ,  $\tau\widetilde{W}_{n-1,n}$  y la respectiva del estado  $n$  al estado  $n+1$ ,  $\tau\widetilde{W}_{n+1,n}$

$$P(n, m) = [\widetilde{W}_{n-1,n} + \widetilde{W}_{n+1,n}] \tau P(n, m) \quad (4.63)$$

Considerando la definición de  $\widetilde{P}(n, t)$  (Ec. 4.60) su evolución en el tiempo se obtiene con

$$\lim_{\tau \rightarrow 0} \left[ \frac{P(n, m+1) - P(n, m)}{\tau} \right] = \{W_{n,n-1}P(n-1, m) + W_{n,n+1}P(n+1, m)\} - [W_{n-1,n} + W_{n+1,n}]P(n, m) \quad (4.64)$$

de donde se sigue,

$$\frac{d}{dt} \widetilde{P}(n, t) = \{W_{n,n-1}P(n-1, t) + W_{n,n+1}P(n+1, t)\} - \{W_{n-1,n} + W_{n+1,n}\}P(n, t) \quad (4.65)$$

Si  $W_{n,n-1} = g_{(n-1)}$  y  $W_{n,n+1} = \gamma_{(n+1)}$ ,

$$\frac{d}{dt} \tilde{P}(n,t) = g_{(n-1)} P(n-1,t) + \gamma_{(n+1)} P(n+1,t) - (\gamma_{(n+1)} + g_{(n-1)}) P(n,t) \quad (4.66)$$

En el caso que  $\gamma_{(n+1)} = g_{(n-1)}$  la probabilidad de transición de que la partícula ejecute un paso hacia la derecha o hacia la izquierda es la misma,

$$\frac{d}{dt} \tilde{P}(n,t) = P(n-1,t) + P(n+1,t) - 2P(n,t) \quad (4.67)$$

La ecuación se resuelve utilizando el método de las características y su solución es

$$\tilde{P}(n,t) = e^{-2t} \sum_{l=0}^{\infty} \frac{t^{2l+n}}{(l+n)!!} \quad (4.68)$$

Cuando  $t \rightarrow \infty$   $n \rightarrow \infty$  con  $\frac{n^2}{t} = 0$

$$\tilde{P}(n,t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi t}} e^{-\frac{n^2}{4t}} \quad (4.69)$$

Esta solución es la misma que se obtuvo mediante la ecuación de Langevin y la ecuación de Fokker-Planck.

## 5. MODELO ESTOCÁSTICO PARA LA PRODUCCIÓN DE ALGINATO

La producción de alginato ha sido descrita usualmente por ecuaciones macroscópicas para la concentración de biomasa, sacarosa y alginato (Cap 2). La cinética de fermentación de *Azotobacter vinelandii* se reproduce utilizando una ley de velocidad mecanística no-lineal llamada ecuación de Malthus-Verhulst; la síntesis de alginato se describe por la ecuación de Leudeking- Piret y el consumo de la sacarosa se asocia con la evolución de estas dos cantidades. En estos modelos los valores de los parámetros involucrados constituyen un problema clave (Acevedo y col., 2002).

En este capítulo, la producción de alginato se representa a través de un modelo estocástico, basado en la ecuación Maestra Markoviana no-lineal (Rodríguez y col., 2003; van Kampen, 2003). Se describe la evolución de la densidad de probabilidad condicional de la variable aleatoria  $n$  (iv) debido a los procesos de reproducción y muerte de las bacterias; estos procesos son caracterizados a través de las densidades de probabilidad de transición (Ecs. 5.8 y 5.9). Dada la no-linealidad de la EM que imparte el modelo del proceso de muerte, esta ecuación, se resuelve en forma aproximada utilizando el método de expansión sistemática de van Kampen; bajo la suposición que el sistema se encuentra cerca de equilibrio (Sección 5.2). Se obtiene la ecuación para la evolución de los valores promedio de  $n$ ,  $a$ , y  $p$  (Ecs. 5.4, 5.52 y 5.53) que corresponden a las cinéticas experimentales obtenidas por Trujillo-Roldán y col. (2001) (Gallardo y col., 2006), así como la ecuación para la evolución de las fluctuaciones en la concentración de biomasa (Ecs. 5.28). Con esta última, se determinan los momentos de la distribución de probabilidad que se utilizan para calcular la evolución de la desviación estándar, esto es, la evolución de las fluctuaciones de la concentración de biomasa alrededor del valor medio  $\langle n(t) \rangle$ . Por otro lado, en las ecuaciones macroscópicas se optimizan los parámetros involucrados respecto a los valores experimentales y se determina el error estadístico.

El modelo estocástico es idealizado pero considera los aspectos esenciales del cultivo por lote de *Azotobacter vinelandii*. Las hipótesis y características más importantes se mencionan a continuación:

i) En el cultivo por lote todas las bacterias se reproducen a intervalos regulares; no existen sustancias inhibitoras del crecimiento y la composición del medio es simple en cuanto a las fuentes de carbono y nitrógeno. El cultivo sintetiza alginato,  $p$ , asociado a su crecimiento y consume sacarosa,  $s_T$ , como la fuente de carbono.

ii) El inóculo contiene un número inicial de bacterias,  $n_0(t_0)$  que esencialmente crecen y adquieren la madurez metabólica para reproducirse.

iii) En el bioreactor (1 L) las bacterias se encuentran homogéneamente distribuidas en un medio de cultivo Burk modificado, esto es, en una primera aproximación se considera que el número de bacterias,  $n$ , no es función de la posición.

iv) La variable aleatoria que caracteriza al sistema es el número de bacterias  $n$  presentes en el bioreactor al tiempo  $t$ . Se define por un espacio de estados cuyos valores están comprendidos desde el número de bacterias presentes en el inóculo hasta el número

de bacterias presentes al término de la fase exponencial  $\{n_0(t_0), \dots, n_i(t_i)\}$ , y la densidad de probabilidad condicional  $p_n = P(n, t | n_0, t_0)$ .  $p_n$  representa la probabilidad de encontrar  $n$  bacterias a un tiempo  $t$ , dado que se tenían  $n_0$  al tiempo inicial  $t_0$ .

v) En este trabajo la ecuación Maestra se deduce considerando una ecuación logística. La evolución de  $p_n$  se debe a los procesos de reproducción y muerte, que ocurren durante la fase exponencial, y se representan a través de las correspondientes probabilidades de transición  $G(n)$  y  $R(n)$ . En general estas funciones aleatorias dependen de  $n$ .

La ecuación Maestra, EM, es la versión diferencial de la ecuación de Chapman-Kolmogorov. Sin embargo, mientras que ésta es no lineal y solo expresa el carácter Markoviano de un proceso, la ecuación Maestra tiene una interpretación física más directa como una ecuación de balance que gobierna la evolución temporal de la densidad de probabilidad condicional. Aunque la ecuación Maestra es una ecuación integro diferencial su forma explícita depende del sistema físico particular.

vi) En los modelos que caracterizan los procesos de reproducción y muerte se desprecia la edad de las bacterias, esto es una simplificación esencial para suponer que son procesos estocásticos Markovianos. Los cuales se identifican porque el estado actual del sistema depende únicamente del estado inmediato anterior.

vii) La reproducción de las bacterias ocurre por un proceso de duplicación. La muerte puede asociarse a procesos de competencia, lisis celular y el agotamiento de la energía relacionada con los procesos de mantenimiento; estos últimos no tienen relación con el crecimiento celular. Se supone que cada bacteria que pertenece a  $n$  solo puede reproducirse o morir en uno, en un intervalo de tiempo asociado con las densidades de probabilidad de transición (proceso de un solo paso).

viii) Las fluctuaciones internas en la concentración de biomasa se suponen inherentes al sistema puesto que la reproducción y muerte de las bacterias ocurre en forma aleatoria. Se considera que son originadas debido a múltiples factores, experimentalmente la concentración de oxígeno es un factor importante para el crecimiento de las bacterias; por esta razón, este factor está contenido en los parámetros de los modelos para las tasas de reproducción y muerte,  $\beta$  y  $\gamma$ , respectivamente.

ix) Para resolver en forma aproximada la ecuación Maestra- Markoviana no-lineal se considera que el sistema está cerca de equilibrio, esto permite utilizar el método de expansión sistemático de van Kampen. Donde  $n_0$  es una medida del tamaño del sistema que se denota por  $\Omega_0$ . van Kampen propone una descomposición para  $n$  en dos contribuciones: la macroscópica y una fluctuante a las que asigna un peso característico correspondiente a  $\Omega_0$  y  $\Omega_0^{1/2}$ ; para obtener la ecuación para el comportamiento promedio y la ecuación para la evolución de las fluctuaciones.

En el límite termodinámico, se recupera el comportamiento promedio correspondiente a las cinéticas experimentales (Trujillo-Roldán y col., 2001). En esta condición todas las bacterias se reproducen en promedio con la misma velocidad específica de crecimiento, es decir no existen diferencias en su estado fisiológico.

En este caso particular, *el comportamiento de las fluctuaciones en la concentración de biomasa* sugiere la contribución de otros factores que podrían ser incluso externos al sistema, tales como la inyección del aire y el mezclado.

### 5.1 Modelo estocástico

La reproducción del cultivo depende del número de bacterias  $n(t)$  presentes a un tiempo  $t$ ,  $n(t)$  es una variable estocástica definida a través de un espacio de estados  $\{n_0(t_0), \dots, n_i(t_i)\}$  y la densidad de probabilidad condicional  $p_n = P(n, t | n_0, t_0)$ . La distribución  $P(n, t | n_0, t_0)$  está normalizada respecto a  $\Omega_0$ . Este último parámetro representa el tamaño del sistema y corresponde al número de bacterias presentes en el inóculo. La proporcionalidad de  $P(n, t | n_0, t_0)$  con  $n(t)$  está a través de

$$n(t) = P(n, t | n_0, t_0) \Omega_0 \quad (5.1)$$

La evolución de  $P(n, t | n_0, t_0)$  obedece una EM (Cap. 3) que tiene la forma de una ecuación diferencial y a diferencias finitas de la ecuación de Chapman- Kolmogorov, Ec. (3.26), esto es, tiene como condición necesaria que el proceso estocástico sea Markoviano.

De acuerdo al Cap. 4, Ec. (4.65)

$$\partial_t P(n, t | n_0, t_0) = \{W_{n,n-1}P(n-1, t) + W_{n,n+1}P(n+1, t)\} - \{W_{n+1,n} + W_{n-1,n}\}P(n, t | n_0, t_0) \quad (5.2)$$

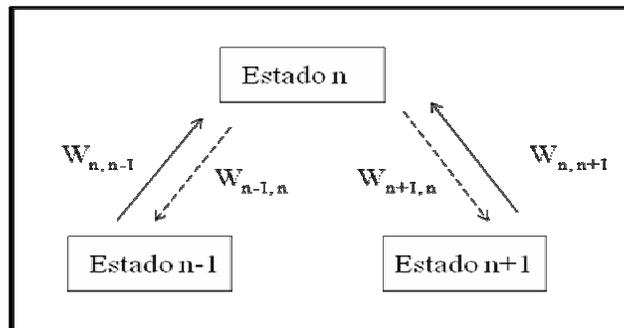


Fig. 5.1 Esquema para construcción de la Ecuación Maestra.

El primer término representa la ganancia de la densidad de probabilidad debido a las transiciones de los estados  $n+1$  y  $n-1$  al estado  $n$ , y el segundo término indica la pérdida debido a la transición del estado  $n$  a los estados  $n+1$  y  $n-1$ . Las probabilidades de transición por unidad de tiempo  $W_{n,n\pm 1}$  y  $W_{n\pm 1,n}$  son positivas y es en ellas en donde se encuentra el mecanismo de la transición de un estado a otro.

Para un proceso Markoviano de un solo paso, únicamente se tienen pasos entre estados adyacentes, entonces

$$W_{n,n} = -(R_n + G_n) \quad (5.3)$$

$R_n$  y  $G_n$  denotan las probabilidades de transición por unidad de tiempo de muerte y reproducción de las bacterias (Fig. 5.2).

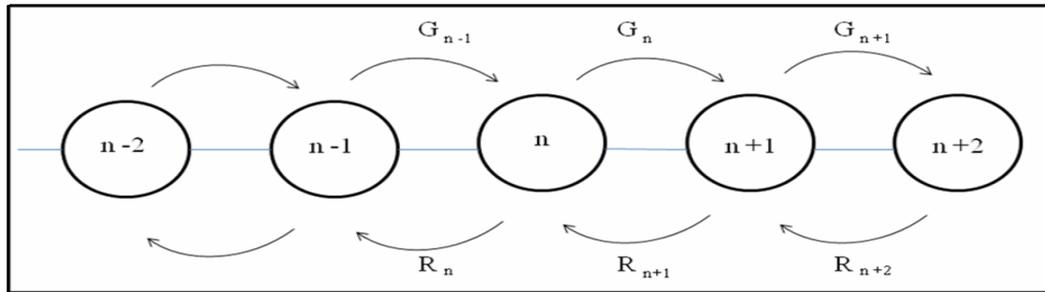


Fig.5.2 Procesos de un solo paso y sus probabilidades de transición

El nombre de “un solo paso” no implica que es imposible para  $n$  el salto de dos o más unidades en el tiempo  $\Delta t$ , pero la probabilidad de que esto pase es del orden de  $\mathcal{O}(\Delta t^2)$ , o en algunos casos de orden mayor  $\mathcal{O}(\Delta t)$ . Por lo tanto, predominan los de orden  $\Delta t$ .

Es importante recordar (Cap.3, Sección 3.6) que en la EM existen dos escalas temporales, una está asociada con los eventos que dan lugar a la forma explícita de las densidades de probabilidad de transición que ocurre en tiempos microscópicos. La otra escala está relacionada a la evolución de  $P(n, t | n_0, t_0)$  y es de orden mesoscópico.

### 5.1.1 Ecuación Maestra

A partir de la ecuación de Malthus-Verhulst puede obtenerse la EM, asociada tomando en cuenta el significado de cada término

$$\frac{dn}{dt} = g(n) - r(n) = \beta n - \gamma n(n-1) \quad (5.4)$$

En el caso específico de la ecuación logística (Goel y Richter-Dyn, 1974) utilizada para describir el crecimiento de una población (Cap. 2, Sección 2.2.2), el primer término indica la reproducción y el segundo término la muerte, a través de las constantes  $\beta$  y  $\gamma$  respectivamente.

En esta Subsección se deducirá la EM asociada a esta ecuación considerando que se tiene una población de  $n$  bacterias al tiempo  $t$  tal que,

i) La probabilidad de que se reproduzcan las bacterias en el tiempo  $t \rightarrow t + \Delta t$  es  $W_{n,n+1} \Delta t$ ,

ii) La probabilidad de que mueran las bacterias en el tiempo  $t \rightarrow t + \Delta t$  es  $W_{n-1,n} \Delta t$ ,

iii) La probabilidad de que no ocurra ningún cambio en el número de bacterias en el tiempo  $t \rightarrow t + \Delta t$  es  $(1 - (W_{n,n+1} + W_{n-1,n}) \Delta t)$ ,

iv) La probabilidad de que ocurra más de un nacimiento o muerte en el tiempo  $t \rightarrow t + \Delta t$  es nula.

En un intervalo de tiempo  $\Delta t$  la probabilidad de encontrar  $n$  bacterias al tiempo  $t + \Delta t$  está dada por,

$$P(n, t + \Delta t) = [W_{n,n+1} P(n+1, t) - W_{n-1,n} P(n, t)] \Delta t \quad (5.5)$$

El primer término del lado derecho se refiere a la ganancia de probabilidad del estado  $n$  por la transición del estado  $n+1$  al estado  $n$ . El segundo término representa la pérdida de probabilidad dada la transición del estado  $n$  al estado  $n-1$ .

Similarmente,  $P(n, t)$  está dada por

$$P(n, t) = [W_{n+1,n} P(n, t) - W_{n,n-1} P(n-1, t)] \Delta t \quad (5.6)$$

en donde primer término del lado derecho indica la pérdida de probabilidad por la transición del estado  $n$  al estado  $n+1$ . El segundo término se refiere a la ganancia por la transición del estado  $n-1$  al estado  $n$ .

Restando la Ec. (5.5) de la Ec. (5.6) y tomando el límite cuando  $\Delta t \rightarrow 0$ ,

$$\lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{P(n, t + \Delta t) - P(n, t)}{\Delta t} = [W_{n,n+1} P(n+1, t) - W_{n-1,n} P(n, t)] - [W_{n+1,n} P(n, t) - W_{n,n-1} P(n-1, t)] \quad (5.7)$$

Reagrupando los términos y tomando el límite  $\Delta t \rightarrow 0$ , se obtiene la EM que gobierna la evolución temporal de la densidad de probabilidad condicional,  $P(n,t)$ , que es precisamente la Ec. (5.2).

Para resolver esta ecuación es necesario incorporar modelos en las probabilidades de transición por unidad de tiempo, definidas como

$$W_{n+1,n} \equiv G(n) = \Omega_0 g(n) \quad (5.8)$$

$$W_{n-1,n} = R(n) = \Omega_0 r(n) \quad (5.9)$$

La ganancia de probabilidad del estado  $n$  se debe a los procesos de muerte

$$W_{n,n+1}P(n+1,t) = \gamma(n+1)n P(n+1,t) \quad (5.10)$$

y reproducción que ocurre en el estado adyacente  $n-1$ , hacia el estado  $n$ ,

$$W_{n,n-1}P(n-1,t) = \beta(n-1)P(n-1,t) \quad (5.11)$$

Las pérdidas de probabilidad del estado  $n$  hacia los estados  $n+1$  y  $n-1$ , correspondientes a estos procesos son

$$W_{n+1,n}P(n,t) = \beta n P(n,t) \quad (5.12)$$

y

$$W_{n-1,n}P(n,t) = \gamma(n-1)n P(n,t) \quad (5.13)$$

Las probabilidades de transición son cantidades extensivas porque son una medida del tamaño del sistema.  $r(n)$  es la velocidad de muerte de las bacterias que se debe a la competencia entre ellas. Es proporcional a  $n(n-1)$ ;  $g(n)$  representa la velocidad de reproducción y es proporcional al número de bacterias presentes.

De acuerdo a lo anterior, la EM (5.2) para un proceso Markoviano de un solo paso se reescribe como,

$$\frac{\partial}{\partial t} P(n,t) = [\gamma(n+1)n P(n+1,t) - \beta(n-1)P(n-1,t)] - [\beta n - \gamma(n-1)n]P(n,t) \quad (5.14)$$

O bien

$$\dot{P}_n = (R_{n+1}P_{n+1} - G_{n-1}P_{n-1}) - (R_n - G_n)P_n \quad (5.15)$$

Si se introducen los operadores de ascenso y descenso  $E^{\pm 1}$  definidos como

$$E^{\pm 1} f(n) \equiv f(n \pm 1) \quad (5.16)$$

en donde  $f(n)$  es una función arbitraria de  $n$ , la EM se reescribe en forma más compacta como

$$\frac{\partial p_n}{\partial t} = \beta(E^{-1} - 1)np_n + \frac{\gamma'}{\Omega_0}(E^+ - 1)n(n-1)p_n \quad (5.17)$$

en donde  $\beta$  y  $\gamma \equiv \frac{\gamma'}{\Omega_0}$  son constantes fijas asociadas a la velocidad de reproducción y muerte.

## 5.2 Método de expansión sistemática de van Kampen

La EM (Ec. 5.15) es una ecuación no lineal, debido a que el proceso de muerte se describe con un modelo no lineal en  $n$ . La EM se resuelve en forma aproximada utilizando el método de expansión sistemático de van Kampen (2003) en potencias de  $\Omega_0^{-1}$ , bajo la suposición que el sistema se encuentra cerca de equilibrio;  $\Omega_0$  es una medida del tamaño del sistema ( $n_0$ ). van Kampen propone una descomposición para  $n$  en dos contribuciones: la macroscópica,  $\Phi(t)$  y una fluctuante,  $\zeta$ , a las que asigna un peso característico correspondiente a  $\Omega_0$  y  $\Omega_0^{1/2}$ . Considerando lo anterior, se obtiene la ecuación para el comportamiento promedio y la ecuación para la evolución de las fluctuaciones.

Para este fin es necesario notar que las probabilidades de transición por unidad de tiempo  $r(n)$  y  $g(n)$  (Ec. 5.4) son independientes de  $\Omega_0$ .

$$n = \Omega_0 \Phi(t) + \Omega_0^{1/2} \zeta \quad (5.18)$$

$\Omega_0^{1/2}$  denota el peso característico para las fluctuaciones que ocurren en un sistema cerca del equilibrio. Por la ecuación anterior,  $p_n$  se transforma en una densidad de probabilidad  $\Pi(\zeta, t)$

$$p_n(t) = P\left(\Omega_0 \Phi(t) + \Omega_0^{1/2} \zeta, t\right) \equiv \Pi(\zeta, t) \quad (5.19)$$

Por el principio de la conservación de probabilidad se sigue que,

$$p_n(t) = \Omega_0^{-\frac{1}{2}} \Pi(\zeta, t) \quad (5.20)$$

$$\frac{\partial p_n}{\partial n} = \Omega_0^{-\frac{1}{2}} \frac{\partial \Pi}{\partial \zeta} \quad (5.21)$$

Por lo tanto

$$\frac{\partial \Pi}{\partial t} = \frac{\partial p_n}{\partial t} + \Omega_0 \frac{d\Phi}{dt} \frac{\partial p_n}{\partial n} \quad (5.22)$$

Sustituyendo la Ec. (5.21) en la Ec. (5.22) y reescribiendo el resultado obtenemos

$$\frac{\partial p_n}{\partial t} = \frac{\partial \Pi}{\partial t} - \Omega_0^{\frac{1}{2}} \frac{d\Phi}{dt} \frac{\partial \Pi}{\partial \zeta} \quad (5.23)$$

Por otro lado los operadores de ascenso  $E^{+1}$  y descenso  $E^{-1}$ , Ec. (5.16), se pueden expresar como operadores diferenciales en términos de la nueva variable  $\zeta$  realizando un desarrollo en series de Taylor:

$$E^{\pm 1} = 1 \pm \Omega_0^{-\frac{1}{2}} \frac{\partial}{\partial \zeta} + \frac{1}{2} \Omega_0^{-1} \frac{\partial^2}{\partial \zeta^2} + \mathcal{O}\left(\Omega_0^{-\frac{3}{2}}\right) \quad (5.24)$$

Sustituyendo las Ecs. (5.18), (5.19) y (5.24) en la EM, Ec. (5.17), esta última se puede reescribir en potencias de  $\Omega_0$ . El miembro izquierdo está dado por la Ec. (5.23), los dos términos del miembro derecho estarán dados por,

$$\begin{aligned} \beta(E^{-1} - 1)np_n = & \Omega_0^{\frac{1}{2}} \left( -\beta\Phi(t) \frac{\partial}{\partial \zeta} \Pi \right) + \Omega_0^0 \left( -\beta \frac{\partial}{\partial \zeta} (\zeta \Pi) + \frac{\beta}{2} \Phi(t) \frac{\partial^2}{\partial \zeta^2} \Pi \right) + \\ & \mathcal{O}\left(\Omega_0^{-\frac{1}{2}}\right) \end{aligned} \quad (5.25)$$

$$\begin{aligned} \frac{\gamma}{\Omega_0} (E^{+} - 1)n(n-1)p_n = & \Omega_0^{\frac{1}{2}} \left( \gamma\Phi(t)^2 \frac{\partial \Pi}{\partial \zeta} \right) + \Omega_0^0 \left( 2\gamma\Phi(t) \frac{\partial}{\partial \zeta} (\Pi\zeta) + \frac{\gamma}{2} \Phi(t)^2 \frac{\partial^2}{\partial \zeta^2} (\Pi) \right) + \\ & \mathcal{O}\left(\Omega_0^{-\frac{1}{2}}\right) \end{aligned}$$

Igualando las Ecs. (5.23) y (5.25):

$$\begin{aligned}
-\Omega_0^{\frac{1}{2}} \frac{d\Phi}{dt} \frac{\partial \Pi}{\partial \zeta} + \Omega_0^0 \frac{\partial \Pi}{\partial t} = \Omega_0^{\frac{1}{2}} \left[ (-\beta\Phi(t) + \gamma\Phi(t)^2) \frac{\partial \Pi}{\partial \zeta} \right] + \\
\Omega_0^0 \left[ (-\beta + 2\gamma\Phi(t)) \frac{\partial}{\partial \zeta} (\Pi\zeta) + \frac{\Phi(t)}{2} (\beta + \gamma\Phi(t)) \frac{\partial^2 \Pi}{\partial \zeta^2} \right] + \mathcal{O} \left( \Omega_0^{-\frac{1}{2}} \right)
\end{aligned} \tag{5.26}$$

y reagrupando los términos con las mismas potencias en  $\Omega_0$  se obtiene a orden mayor  $\Omega_0^{\frac{1}{2}}$ , la ecuación macroscópica:

$$\frac{d\Phi}{dt} = \beta\Phi(t) - \gamma\Phi(t)^2 \tag{5.27}$$

y a orden  $\Omega_0^0$ , la ecuación de Fokker-Planck

$$\frac{\partial \Pi}{\partial t} = (-\beta + 2\gamma\Phi(t)) \frac{\partial}{\partial \zeta} (\Pi\zeta) + \frac{\Phi(t)}{2} (\beta + \gamma\Phi(t)) \frac{\partial^2 \Pi}{\partial \zeta^2} \tag{5.28}$$

Para el caso estacionario,

$$0 = \beta\Phi^s - \gamma(\Phi^s)^2 \tag{5.29}$$

$$\Phi^s = \frac{\beta}{\gamma} \tag{5.30}$$

En esta condición el proceso de reproducción domina sobre el proceso de muerte (Tabla 5.1).

TOD	$t_0 (h)$	$\phi_{\text{exp}}^s (g/L)$	$\beta_{\text{exp}} (h^{-1})$	$\gamma_{\text{exp}} (h^{-1})$
3	5	3.6	0.24	0.0666
	7			
5	2	1.7	0.31	0.1824
	4			

Tabla 5.1 Orden de magnitud de los procesos de reproducción y muerte (Gallardo y col., 2006; Trujillo-Roldán y col., 2001).

### 5.3 Ecuaciones para los momentos de $\Pi(\zeta, t)$

Los momentos de la distribución están definidos como

$$\langle \zeta^n \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} \zeta^n \Pi(\zeta, t) d\zeta \tag{5.31}$$

Para obtener la ecuación del primer momento es necesario multiplicar por  $\zeta$  la ecuación de Fokker-Planck, e integrar sobre los valores de  $\zeta$

$$\int_{-\infty}^{\infty} \zeta \frac{\partial \Pi}{\partial t} d\zeta = (2\gamma\Phi(t) - \beta) \int_{-\infty}^{\infty} \zeta \frac{\partial}{\partial \zeta} (\Pi \zeta) d\zeta + \frac{1}{2} (\beta\Phi(t) + \gamma\Phi(t)^2) \int_{-\infty}^{\infty} \zeta \frac{\partial^2 \Pi}{\partial \zeta^2} d\zeta \quad (5.32)$$

Integrando por partes el primer término del lado derecho de esta ecuación se obtiene,

$$(2\gamma\Phi(t) - \beta) \left[ \zeta^2 \Pi \Big|_{-\infty}^{\infty} - \int_{-\infty}^{\infty} \zeta \Pi d\zeta \right] = -(2\gamma\Phi(t) - \beta) \langle \zeta \rangle \quad (5.33)$$

en forma similar integrando por partes el segundo término se obtiene:

$$\frac{1}{2} (\beta\Phi(t) + \gamma\Phi(t)^2) \int_{-\infty}^{\infty} \zeta \frac{\partial^2 \Pi}{\partial \zeta^2} d\zeta = \zeta \frac{\partial \Pi}{\partial \zeta} \Big|_{-\infty}^{\infty} - \int_{-\infty}^{\infty} \frac{\partial \Pi}{\partial \zeta} d\zeta = -\frac{1}{2} (\beta\Phi(t) + \gamma\Phi(t)^2) \Pi \Big|_{-\infty}^{\infty} \equiv 0 \quad (5.34)$$

Agrupando las dos ecuaciones anteriores se sigue que

$$\frac{d \langle \zeta \rangle}{dt} = (\beta - 2\gamma\Phi(t)) \langle \zeta \rangle \quad (5.35)$$

Cuando  $\Phi$  no depende de  $t$  su solución es

$$\langle \zeta \rangle = \langle \zeta_0 \rangle e^{(\beta - 2\gamma\Phi)t} \quad (5.36)$$

En el estado estacionario,  $\Phi(t \rightarrow \infty) = \Phi^s = \frac{\beta}{\gamma}$ , la Ec. (5.36) resulta ser

$$\langle \zeta \rangle = \langle \zeta_0 \rangle e^{-2\beta t} \quad (5.37)$$

y las fluctuaciones decaen a cero a tiempos largos, esto es,  $\langle \zeta \rangle \rightarrow 0$ ,

$$\langle \zeta \rangle = 0 \quad (5.38)$$

La ecuación para el segundo momento se obtiene multiplicando la ecuación de Fokker-Planck por  $\zeta^2$  e integrando sobre todos los valores de  $\zeta$ ,

$$\int_{-\infty}^{\infty} \zeta^2 \frac{\partial \Pi}{\partial t} d\zeta = (2\gamma\Phi(t) - \beta) \int_{-\infty}^{\infty} \zeta^2 \frac{\partial}{\partial \zeta} (\zeta \Pi) d\zeta + \frac{1}{2} (\beta\Phi(t) + \gamma\Phi(t)^2) \int_{-\infty}^{\infty} \zeta^2 \frac{\partial^2 \Pi}{\partial \zeta^2} d\zeta \quad (5.39)$$

Integrando por partes el primer término del lado izquierdo:

$$(2\gamma\Phi(t) - \beta) \int_{-\infty}^{\infty} \zeta^2 \frac{\partial}{\partial \zeta} (\zeta \Pi) d\zeta = (2\gamma\Phi(t) - \beta) \left[ \zeta^3 \Pi \Big|_{-\infty}^{\infty} - 2 \int_{-\infty}^{\infty} \zeta^2 \Pi d\zeta \right] = 2(\beta - 2\gamma\Phi(t)) \langle \zeta^2 \rangle \quad (5.40)$$

de forma similar integrando por partes los dos términos del lado derecho, y agrupando con la Ec.(5.40) se obtiene

$$\frac{d\langle \zeta^2 \rangle}{dt} = 2(\beta - 2\gamma\Phi) \langle \zeta^2 \rangle + (\beta\Phi(t) + \gamma\Phi(t)^2) \quad (5.41)$$

Esta es una ecuación lineal no homogénea cuya solución está dada por

$$\langle \zeta^2 \rangle = \langle \zeta_0^2 \rangle e^{2(\beta - 2\gamma\Phi(t))t} + \frac{(\beta\Phi(t) + \gamma\Phi(t)^2)}{2(\beta - 2\gamma\Phi(t))} (1 - e^{2(\beta - 2\gamma\Phi(t))t}) \quad (5.42)$$

Cuando  $\Phi$  no depende de  $t$  se sigue que

$$\langle \zeta^2 \rangle = \langle \zeta_0^2 \rangle e^{-2\beta t} + \frac{\beta}{\gamma} (1 - e^{-2\beta t}) \quad (5.43)$$

En el estado estacionario,  $t \rightarrow \infty$  su solución corresponde a

$$\langle \zeta^2 \rangle \rightarrow \frac{\beta}{\gamma} \quad (5.44)$$

Las ecuaciones para el primer y segundo momento de  $\Pi(\zeta, t)$  describen el comportamiento temporal de  $\langle \zeta^2 \rangle$  alrededor de un estado macroscópico definido por  $\Phi(t)$ . La integración de la ecuación macroscópica de Malthus–Verhulst, Ec. (5.27) resulta en una expresión explícita para  $\Phi(t)$  que corresponde al valor medio de  $n(t)$

$$\langle n(t) \rangle = \frac{\Phi_0}{\left(1 - \frac{\Phi_0}{\Phi^s}\right) e^{-\beta(t-t_0)} + \frac{\Phi_0}{\Phi^s}} \quad (5.45)$$

en donde  $\Phi^s = \frac{\beta}{\gamma}$

Si  $\Phi_0 \ll \Phi^s$  esto es,  $\frac{\Phi_0}{\Phi^s} \ll 1$  la ecuación para  $\langle n(t) \rangle$  se reduce a la ecuación para el modelo lineal,

$$\langle n(t) \rangle = n_0 e^{\beta(t-t_0)} \quad (5.46)$$

Definiendo  $\lambda \equiv n_0 \frac{\gamma}{\beta} = \frac{\Phi_0}{\Phi_s}$  la ecuación para  $\langle n(t) \rangle$  se reescribe,

$$\Phi(t) = \frac{\Phi_0}{\lambda + (1-\lambda)e^{-\beta(t-t_0)}} = \langle n(t) \rangle \quad (5.47)$$

y para

$$\langle n(t)^2 \rangle = \frac{\Phi_0^2}{[\lambda + (1-\lambda)e^{-\beta(t-t_0)}]^2} \quad (5.48)$$

#### 5.4 Varianza y fluctuación relativa

La varianza se define por  $\sigma_n^2(t) \equiv \langle n(t)^2 \rangle - \langle n(t) \rangle^2$  y su expresión final puede obtenerse a partir de las Ecs. (5.45) y (5.48),

$$\begin{aligned} \sigma_n^2(t) = n_0 \frac{\Phi_0^2}{\{(1-\lambda)\exp[-\beta(t-t_0)] + \lambda\}^4} & \times \{(1-\lambda)^2 \exp[-2\beta(t-t_0)] \\ & + [\lambda - (1-\lambda)(1+2\gamma n_0(t-t_0))] \\ & \times \exp[-\beta(t-t_0) - \lambda^2]\} \end{aligned} \quad (5.49)$$

Cuando  $n_0 \ll \Phi^s$ ,  $\sigma_n^2(t)$  se reduce al modelo lineal

$$\sigma_n^2(t) = n_0 \exp \beta(t-t_0) \{1 - \exp[\beta(t-t_0)]\} \quad (5.50)$$

La fluctuación relativa se define como  $\chi_n(t) \equiv \frac{\sigma_n^2(t)}{\langle n(t) \rangle^2}$ , Ec. (3.2), usando las expresiones anteriores, Ecs. (5.48) y (5.50), se obtiene

$$\begin{aligned} \chi_n(t) = \frac{1}{n_0} \frac{1-\lambda}{[(1-\lambda) + \lambda \exp[\beta(t-t_0)]]^2} & \{(2\lambda-1)(1 - \exp[-\beta(t-t_0)]) \\ & - 2\lambda^2 \sinh(\beta t) - 2\gamma n_0(1-\lambda)(t-t_0)\} \end{aligned} \quad (5.51)$$

## 5.5 Resultados

En esta sección se comparan las predicciones del modelo estocástico con los datos experimentales de las cinéticas de *Azotobacter vinelandii*. Se considera el comportamiento temporal de las concentraciones de alginato  $p(t)$  y sacarosa  $s(t) \equiv s_T(t)$ , para diferentes valores de TOD. La dinámica de  $a(t)$  es descrita por la ecuación de Leudeking- Piret donde la producción de alginato ocurre únicamente en la fase exponencial, Cap.2 Sec. 2.2.2,

$$\frac{da}{dt} = \alpha \frac{d\Phi}{dt} \quad (5.52)$$

$\alpha$  es una constante empírica que varía con las condiciones de operación tal como la temperatura, pH, velocidad de agitación y aireación, etc. La evolución en el tiempo del consumo de sacarosa se describe por una ecuación para la conversión de sacarosa a biomasa y el producto, Ec. (2.9),

$$\frac{ds}{dt} = - \left[ \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{d\Phi}{dt} + \frac{1}{Y_{p/s}} \frac{da}{dt} \right] \quad (5.53)$$

El grupo de Ecs. (5.4), con  $x \equiv \frac{n}{V}$  siendo V el volumen, (5.52) y (5.53) representan la descripción completa de la cinética de cultivo de *Azotobacter vinelandii*, que corresponde a un proceso estocástico; dado que  $n$  es estocástica también lo son  $p$  y  $s$ . En el modelo, se asume que el tiempo inicial  $t_0 \neq 0$  para considerar que el desarrollo del cultivo está en la fase exponencial. Además los valores promedio obtenidos, se comparan con los resultados experimentales.

Dado que  $\Phi(t) \equiv \langle n(t) \rangle$ , (Ec. 5.45), la dinámica de  $a(t)$  y  $s(t)$  se obtiene a partir de las Ecs. (5.52) y (5.53). Los valores de los parámetros  $\{\beta, \gamma, Y_{x/s}, Y_{p/s}\}$  son parámetros de ajuste y se calculan a partir de una regresión no lineal, minimizando la función de error total. Esto último se logra al minimizar los errores cuadráticos de los valores predichos por el modelo, respecto a los datos experimentales disponibles. Los valores de los parámetros experimentales se muestran en la Tabla 5.1 y los valores óptimos en la Tabla 5.2.

TOD (%)	$\alpha$	$\beta_{\text{exp}} (h^{-1})$	$\phi_{\text{exp}}^s (g/L)$	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
3	1.31	0.24	3.6	0.19	0.25
5	1.61	0.31	1.7	0.10	0.13

Tabla 5.1 Valores de los parámetros experimentales (Trujillo-Roldán y col., 2001).

TOD (%)	$t_0$ (h)	$\beta_{op}$ ( $h^{-1}$ )	$\phi_{op}^s$ (g/L)	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
3	5	0.315	3.661	0.354	0.491
	7	0.378	3.627	0.357	0.574
5	2	0.345	1.942	0.198	0.261
	4	0.402	1.728	0.239	0.195

Tabla 5.2 Valores de los parámetros óptimos (Gallardo, y col., 2006).

$x(t)$ ,  $p(t)$  y  $s(t)$  vs.  $t$  son graficados en las Figs. 5.2 y 5.3 para los intervalos de tiempo 5-20 hr (TOD= 3%) y 2-20 hr (TOD= 5%).

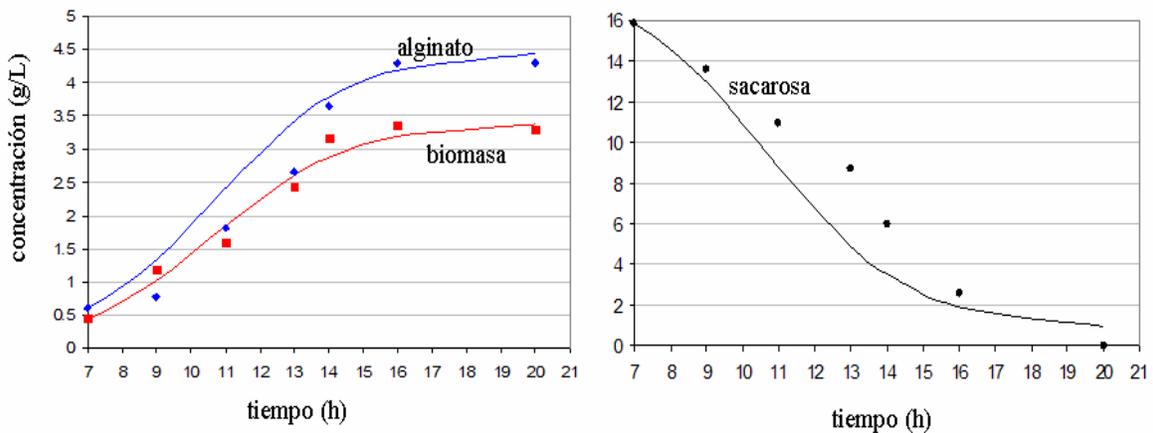


Fig. 5.2 Valores teóricos y experimentales de las concentraciones de biomasa, alginato y sacarosa para 3% de TOD (Gallardo, y col., 2006).

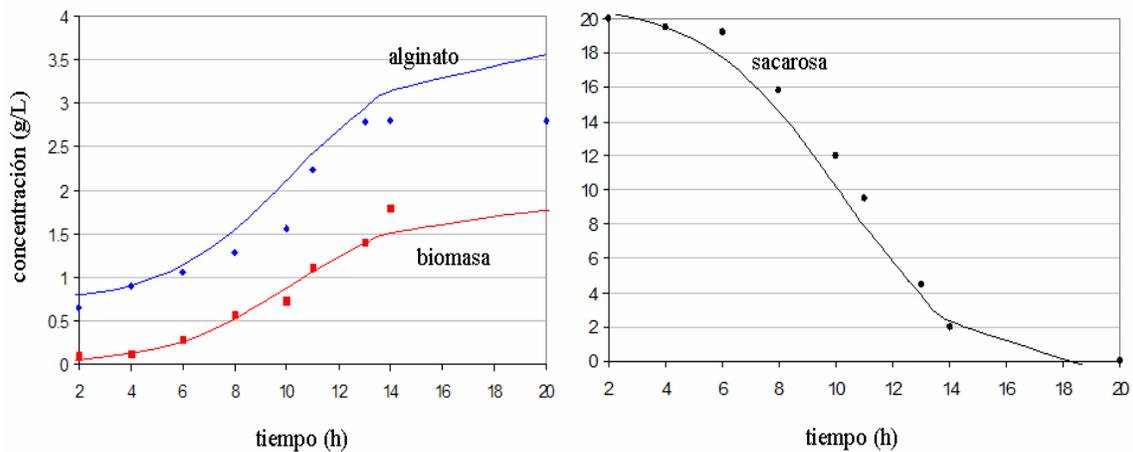


Fig. 5.3 Semejante a la Fig.5.2 para 5% TOD (Gallardo, y col., 2006).

El error cuadrático medio está definido como (Bevington y Robinson, 1992),

$$S = \left[ \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i^{teo} - x_i^{exp})^2 \right]^{1/2} \quad (5.54)$$

en donde  $x$  denota la concentración de biomasa, alginato y sacarosa y los superíndices  $teo$  y  $exp$  indican los valores del modelo y los experimentales. En la Tabla 5.3 se presenta el error promedio obtenido de la Ec. (5.54).

TOD (%)	$t_0$ (h)	$S_n$	$S_s$	$S_a$	$S_T = \frac{1}{3}(S_n + S_s + S_a)$
3	5	0.10	0.35	0.14	0.20
	7	0.13	0.26	0.11	0.17
5	2	0.01	1.31	0.18	0.50
	4	0.03	0.16	0.67	0.29

Tabla 5.3 Error promedio estadístico (Gallardo, y col., 2006).

De la Tabla 5.3, se observa que el modelo ajusta a los datos experimentales con un error cuadrático medio entre  $0.01 \leq S_n \leq 0.13$  para dos valores de TOD. En contraste, para la producción de alginato  $S_a$  y el consumo de sacarosa  $S_s$ , el error se incrementa dentro de los intervalos 0.06- 0.67 y 0.16-1.75, respectivamente. Por otra parte, los valores del error total  $S_T$  fueron menores para 7 y 4 horas que para 5 y 2 horas, lo cual significa, que la fase exponencial no necesariamente inició inmediatamente después de inocular el cultivo al bioreactor.

En las Figs. 5.4 y 5.5,  $\langle n(t) \rangle \pm \sigma_n(t)$  se grafica como una función del tiempo para el crecimiento del cultivo, cuando la TOD es del 3% y 5% respectivamente.

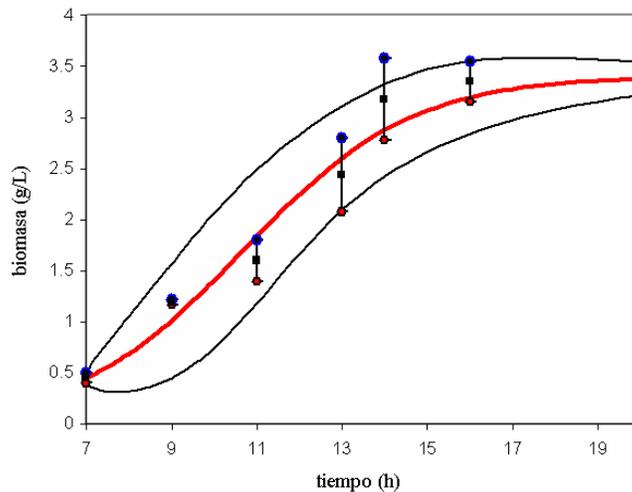


Fig. 5.4 Valores experimentales y promedios de la concentración de biomasa con su desviación estándar para 3% de TOD (Gallardo, y col., 2006; Trujillo- Roldán y col, 2001).

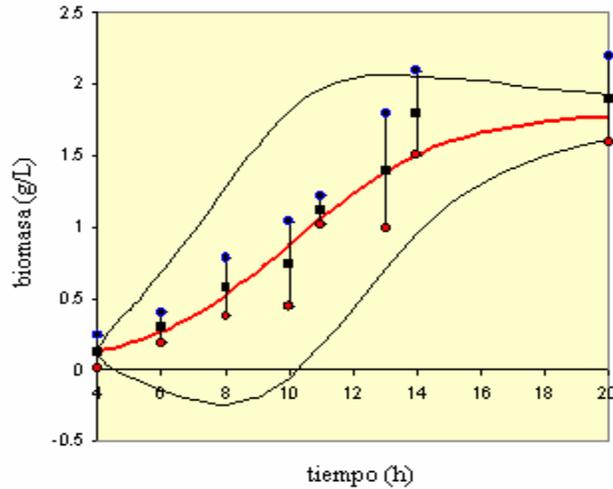


Fig. 5.5 Semejante a la Fig. 5.4 para 5% de TOD (Gallardo, y col., 2006; Trujillo- Roldán y col, 2001).

Las Figs. 5.4 y 5.5 indican los perfiles temporales del crecimiento del cultivo, en donde la desviación estándar, representa las fluctuaciones internas alrededor del valor medio, estas incertidumbres son causadas por la naturaleza discreta del sistema. Las curvas evidencian que las fluctuaciones observadas son comparables o más grandes que las fluctuaciones internas predichas por el modelo. Las desviaciones globales de los datos experimentales incluyen además de estas fluctuaciones internas, a las fluctuaciones debidas al ruido externo. Este último ruido es una medida del efecto de otros procesos implicados como pueden ser: la forma de alimentar aire al bioreactor, problemas de transferencia de nutrientes, estado metabólico del cultivo y los errores de medición debido a deficiencias instrumentales, las cuales no pueden despreciarse totalmente.

## 6. MODELO ESTOCÁSTICO PARA LA DISTRIBUCIÓN DE PESOS MOLECULARES

La distribución de pesos moleculares, DPM, es de gran importancia dentro de la producción del alginato, ya que a partir del peso molecular promedio que se obtiene de ella, podría evaluarse la calidad del alginato. En general se ha estudiado la DPM como se describe en el Capítulo 2, sin considerar la dinámica hacia una única distribución de pesos moleculares final.

La síntesis de alginato ocurre por un proceso de polimerización de los monómeros, asociados a los residuos de ácido manurónico y gulurónico al que continúa un proceso de depolimerización. Ambos procesos tienen lugar durante la fase exponencial y la fase estacionaria respectivamente donde por cada TOD se produce una familia de DPM.

Se considera como primer caso de estudio la cepa de *Azotobacter vinelandii* SML2 mutada en la expresión de la enzima alginasa, que es la encargada de depolimerizar el alginato. Aquí la ausencia de alginato en el inóculo aumenta el  $\overline{M_w}$  (944,000 Da) obtenido de una DPM menos dispersa, IP 5-6.73, respecto al valor de 250,000 Da (IP 6.3-10) que alcanza cuando el inóculo contiene alginato (Trujillo-Roldán y col., 2003).

De esta manera, se tiene el caso de estudio más sencillo en el cual los monómeros se consideran con igual reactividad y se polimerizan dando lugar a una distribución de oligómeros. El término oligómero ha sido designado a moléculas con un grado de polimerización ( $n < 10$ ) (Hiemenz, 1984) definido por

$$n = \frac{M}{M_0} \quad (6.1)$$

El grado de polimerización,  $n$  de un polímero se refiere al número de monómeros en una molécula, e indica la relación del peso molecular de la molécula de polímero,  $M$  respecto al peso molecular del monómero o unidad repetida  $M_0$ . Dado que los monómeros tienen igual reactividad se supone que el peso molecular que tienen los monómeros es idéntico.

El proceso de polimerización han sido analizados desde un punto de vista macroscópico (Hiemenz, 1984; Ziff, 1986; Flory, 1953). La distribución de oligómeros representa a una única familia de pesos moleculares asociada a una TOD constante. Su evolución temporal de tamaños  $c_k(t)$  con  $k=1,2,\dots$ , describe la concentración de oligómeros de tamaño  $k$  al tiempo  $t$ .

El objetivo de este capítulo es dar un enfoque estocástico que nos permita conocer no sólo la DPM sino también el efecto de las fluctuaciones. La idea básica consiste en suponer que el proceso de polimerización es un proceso estocástico Markoviano y en consecuencia su dinámica descrita a través de una ecuación Maestra (van Dongen y Ernst, 1990; Salinas-Rodríguez, 1992). El primer momento de esta ecuación resulta ser la ecuación para  $c_k(t)$ , conocida como **ecuación de Smoluchowski**. En las siguientes secciones se presenta el modelo estocástico y se obtiene la ecuación Maestra; a partir de ella se determinan las ecuaciones para los momentos. Para este propósito se utiliza la ecuación Maestra planteada

en el Capítulo 3 y se utiliza la expansión sistemática de van Kampen introducida en el Capítulo 5.

## 6.1 Ecuación Maestra

Si se denota  $A_i$  como un oligómero que contiene  $i$  monómeros, el mecanismo de reacción asociado a un proceso reversible arbitrario puede representarse como



$K_{ij}$  representa la tasa de polimerización y se considera como un proceso estocástico Markoviano, de tal forma que la ecuación para la densidad de probabilidad condicional es:

$$\partial_t P(\bar{\mathbf{m}}, t) = T_c \quad (6.3)$$

En esta ecuación  $T_c$  representa la contribución del proceso de polimerización que se define como aquel en donde los monómeros se pueden pegar unos a otros por un proceso semejante a la coagulación.

Considerando al sistema espacialmente homogéneo y confinado en un volumen  $V$ , y el cual consta de  $N$  monómeros, caracterizado por una distribución de tamaños  $\mathbf{m} \equiv \{m_k\}$ , en donde  $m_k$  denota el número de oligómeros con  $k$ -monómeros. Cada estado del sistema va a estar identificado con cada realización de esta distribución de tamaños, esto implica que  $\mathbf{m}$  es una variable estocástica y por lo tanto  $P(\mathbf{m}, t)$  representa la probabilidad de que el número de oligómeros al tiempo  $t$  esté dado por  $m_k$ . La probabilidad de transición  $W_{m m'}$  entre diferentes estados del sistema está determinada por el kernel  $K_{ij}$ , el cual, en general, es función de  $\mathbf{m}$ . Considerando al proceso de polimerización como Markoviano, la ecuación Maestra que describe la evolución de  $P(\mathbf{m}, t)$  está dada por (van Kampen, 2003; Gardiner, 1983)

$$\partial_t P(\mathbf{m}, t) = \sum_{m'} W_{m m'} P(\mathbf{m}', t) \quad (6.4)$$

### Polimerización

Se considera al proceso de polimerización como un proceso de un solo paso, esto es, sólo existe un evento de polimerización en un intervalo de tiempo  $\Delta t$ . Entonces, la polimerización de dos oligómeros en  $\Delta t$ , está asociado a los siguientes eventos elementales excluyentes:

- i) Polimerización de oligómeros del mismo tamaño
- ii) Polimerización de oligómeros de diferente tamaño
- iii) Ausencia de polimerización

Definiendo

$$\bar{m}_c = \{m_1, m_2, \dots, m_i + 1, \dots, m_j + 1, \dots, m_{i+j} - 1, \dots, m_k\} \quad (6.5)$$

como el estado asociado a la polimerización y considerando los tres eventos excluyentes, la  $P(\bar{m}_c, t)$  obedece la siguiente ecuación (Salinas-Rodríguez, 1992; Salinas-Rodríguez y Rodríguez, 1995)

$$\begin{aligned} P(\bar{m}, t + \Delta t) = & 1/2 V^{-1} \sum_{i, j=1}^{\infty} K_{i, j} P(\bar{m}_c, t) \left[ (m_i + 1 + \delta_{i, j}) (m_j + 1) \right] \Delta t + \\ & + \sum_{i, j=1}^{\infty} K_{i, j} P(\bar{m}, t) \left[ 1 - 1/2 V^{-1} (m_j - \delta_{i, j}) m_i \right] \Delta t \end{aligned} \quad (6.6)$$

Introduciendo el operador

$$A_{i, j} f(\bar{m}) \equiv f \left[ \left\{ m_k + (\delta_{i, k} + \delta_{j, k} - \delta_{i + j, k}) \right\} \right] f(\bar{m}) \quad (6.7)$$

la Ec. (6.6) puede reescribirse en forma compacta como

$$\partial_t P(\bar{m}, t) = T_c \equiv 1/2 V^{-1} \sum_{i, j=1}^{\infty} K_{i, j} A_{i, j} \left[ P(\bar{m}, t) (m_i - \delta_{i, j}) m_i \right] \quad (6.8)$$

Agrupando, de las Ecs. (6.8) se obtiene la ecuación Maestra que contiene el fenómeno de polimerización

$$\partial_t P(\bar{m}, t) = 1/2 V^{-1} \sum_{i, j=1}^{\infty} K_{i, j} A_{i, j} \left[ P(\bar{m}, t) (m_j - \delta_{i, j}) m_i \right] \quad (6.9)$$

## 6.2 Desarrollo sistemático de la ecuación Maestra

La ecuación Maestra (Ec. 6.9) es una ecuación diferencial en el tiempo y a diferencias finitas. Para resolverla en forma aproximada se debe proponer un modelo para la tasa de polimerización; se sugiere como condición inicial, que inicialmente se tienen monómeros. Mediante el desarrollo sistemático de van Kampen (2003) (Cap. 5) se encuentra su solución; en este caso, el volumen del sistema,  $V$  es el parámetro que controla la magnitud de las fluctuaciones,  $\Omega$ . En forma similar al Cap. 5, la variable contiene una parte macroscópica  $\phi_k$  de orden  $\Omega$  y una parte fluctuante  $\xi_k$  de orden  $\Omega^{1/2}$ , esto es,

$$m_k(t) \equiv \Omega \phi_k(t) + \Omega^{1/2} \xi_k(t) \quad (6.10)$$

Por lo tanto la distribución  $P(m,t)$  se reemplaza por  $\Pi(\xi,t)$ ,

$$P(m,t) = \Omega^{-\frac{1}{2}} \Pi(\xi,t) \quad (6.11)$$

Los operadores de diferencias  $\Delta_{i,j}$  y  $\Delta_{i,j}^*$  se pueden reescribir, a partir de la Ec. (6.10) como

$$\begin{aligned} \Delta_{i,j} &= \exp \left[ \Omega^{-1/2} \sum_{k=1}^{\infty} (\delta_{i,k} + \delta_{j,k} - \delta_{i+j,k}) \frac{\partial}{\partial m_k} \right] - 1 \\ &= \exp(\Omega^{-1/2} D_{i,j}) - 1 \end{aligned} \quad (6.12a)$$

y

$$\Delta_{i,j}^* = \exp(\Omega^{-1/2} D_{i,j}^*) - 1 \quad (6.12b)$$

en donde

$$D_{i,j} = \sum_{k=1}^{\infty} (\delta_{i,k} + \delta_{j,k} - \delta_{i+j,k}) \frac{\partial}{\partial \xi_k} \quad (6.13)$$

$D_{i,j}^* = -D_{i,j}$ . Cuando  $V \rightarrow \infty$ , se puede realizar un desarrollo en series de Taylor de las exponenciales que aparecen en las Ecs. (6.12) con el resultado,

$$\Delta_{i,j} = \Omega^{-1/2} D_{i,j} + \frac{1}{2} \Omega^{-1} D_{i,j}^2 + \theta(\Omega^{-3/2}) \quad (6.14a)$$

$$\Delta_{i,j}^* = \Omega^{-1/2} D_{i,j}^* + \frac{1}{2} \Omega^{-1} D_{i,j}^{*2} + \theta(\Omega^{-3/2}) \quad (6.14b)$$

Como  $\Pi(\xi,t)$ , se sigue que

$$\frac{\partial P(m,t)}{\partial t} = \Omega^{-1/2} \frac{\partial \Pi}{\partial t} + \sum_{k=1}^{\infty} \frac{\partial \Pi}{\partial \xi_k} \frac{\partial \xi_k}{\partial t} \quad (6.15)$$

La ecuación para  $\Pi(\xi,t)$  se obtiene de sustituir las Ecs. (6.10) - (6.15) en la Ec. (6.8) con el resultado

$$\begin{aligned}
\Omega^0 \frac{\partial \Pi}{\partial t} - \Omega^{-1/2} \sum_{k=1}^{\infty} \frac{\partial \Pi}{\partial \xi_k} \frac{\partial \phi_k}{\partial t} = & 1/2 \sum_{i,j=1}^{\infty} F_{i,j} \left\{ \Omega^0 \left( D_{i,j}^2 \phi_{i+j} + D_{i,j} \xi_{i+j} \right) + \right. \\
& + \Omega^{1/2} \left( D_{i,j} \phi_{i+j} \right) \left. \right\} \Pi + \\
& + 1/2 \sum_{i,j=1}^{\infty} K_{i,j} \left\{ \Omega^{1/2} \left( \phi_i \phi_j D_{i,j} \right) \Pi + \right. \\
& + 1/2 \sum_{i,j=1}^{\infty} K_{i,j} \Omega^0 \left\{ D_{i,j} \left( \phi_i \xi_j + \phi_j \xi_i \right) + \right. \\
& \left. \left. + \phi_i \phi_j D_{i,j}^2 \right\} \Pi + \theta \left( V^{-1/2} \right) \right.
\end{aligned} \tag{6.16}$$

A orden  $\Omega^0$ , se obtiene:

$$\begin{aligned}
\frac{\partial \Pi}{\partial t} = & 1/2 \sum_{i,j=1}^{\infty} F_{i,j} \left\{ \Omega^0 \left( D_{i,j}^2 \phi_{i+j} + D_{i,j} \xi_{i+j} \right) \Pi \right. \\
& \left. + 1/2 \sum_{i,j=1}^{\infty} K_{i,j} \left\{ D_{i,j} \left( \phi_i \xi_j + \phi_j \xi_i \right) + 1/2 \phi_i \phi_j D_{i,j}^2 \right\} \Pi \right.
\end{aligned} \tag{6.17a}$$

Con el orden dominante  $\Omega^{1/2}$  se genera la ecuación

$$\begin{aligned}
\sum_{k=1}^{\infty} \frac{\partial \Pi}{\partial \xi_k} \frac{\partial \phi_k}{\partial t} = & -1/2 \sum_{i,j=1}^{\infty} F_{i,j} D_{i,j} \phi_{i+j} \Pi + \\
& + 1/2 \sum_{i,j=1}^{\infty} K_{i,j} \left( \phi_i \phi_j D_{i,j} \right) \Pi
\end{aligned} \tag{6.17b}$$

Sustituyendo la Ec. (6.13) en la Ec. (6.17a) tenemos que

$$\begin{aligned}
\frac{\partial \Pi}{\partial t} = & 1/2 \sum_{i,j=1}^{\infty} F_{i,j} \left\{ - \sum_{k=1}^{\infty} \left( \delta_{i,k} + \delta_{j,k} - \delta_{i+j,k} \right) \frac{\partial}{\partial \xi_k} \xi_{i+j} + \right. \\
& + \phi_{i+j} \sum_{k,s=1}^{\infty} \left( \delta_{i,k} + \delta_{j,k} - \delta_{i+j,k} \right) \left( \delta_{i,s} + \delta_{j,s} - \delta_{i+j,s} \right) \frac{\partial^2}{\partial \xi_k \partial \xi_s} \left. \right\} \Pi \\
& + \sum_{k,j=1}^{\infty} \left\{ \sum_{i=1}^{\infty} K_{i,j} \phi_i \left( \delta_{i,k} + \delta_{j,k} - \delta_{i+j,k} \right) \frac{\partial}{\partial \xi_k} \left( \xi_j \Pi \right) + \right. \\
& \left. + 1/2 \sum_{i,j=1}^{\infty} \sum_{k,s=1}^{\infty} K_{i,j} \phi_i \phi_j K_{i,j} \left( \delta_{i,k} + \delta_{j,k} - \delta_{i+j,k} \right) \left( \delta_{i,s} + \delta_{j,s} - \delta_{i+j,s} \right) \frac{\partial}{\partial \xi_k} \frac{\partial}{\partial \xi_s} \Pi \right.
\end{aligned} \tag{6.18}$$

La Ec. (6.18) es la ecuación de Fokker-Planck lineal multivariada para  $\Pi(\xi, t)$  en donde los coeficientes de arrastre y de difusión dependen explícitamente de la tasa de

polimerización. Esta ecuación gobierna la evolución de las fluctuaciones en el peso molecular alrededor del valor medio.

Si ahora se sustituye la Ec. (6.13) en la Ec. (6.17b) se obtiene

$$\begin{aligned} \frac{\partial \phi_k}{\partial t} = & 1/2 \sum_{i,j=1}^{\infty} F_{ij} (\delta_{ik} + \delta_{jk} - \delta_{i+j,k}) \phi_{i+j} - \\ & - 1/2 \sum_{i,j=1}^{\infty} K_{ij} \phi_i \phi_j (\delta_{ik} + \delta_{jk} - \delta_{i+j,k}) \end{aligned} \quad (6.19)$$

que corresponde a la ecuación (macroscópica) de evolución para la parte sistemática del peso molecular. Desarrollando las deltas de Kronecker, se puede reescribir la Ec. (6.19) como

$$\begin{aligned} \frac{\partial \phi_k}{\partial t} = & \sum_{i,j=1}^{\infty} F_{ij} \phi_{i+j} - 1/2 \phi_k \sum_{i=1}^{\infty} F_{i,k-i} + \\ & + 1/2 \sum_{i+j=1}^{\infty} K_{ij} \phi_i \phi_j - \phi_k \sum_{j=1}^{\infty} K_{kj} \phi_j \end{aligned} \quad (6.20)$$

Esta es precisamente la **ecuación de Smoluchowski** para  $\phi_k(t) \equiv c_k(t)$  con  $k=1,2,\dots$ . A partir de esta ecuación puede obtenerse la evolución de los momentos  $c_k(t)$ , definidos por

$$\langle c^n \rangle = \sum_{k=1}^{\infty} k^n c_k(t) \quad (6.21)$$

en donde el momento cero  $\langle c^0 \rangle$  corresponde a la concentración total de oligómeros como función del tiempo. El primer momento  $\langle c^1 \rangle$  dividido entre el momento cero, corresponde al valor medio del peso molecular

$$\overline{PM} \equiv \frac{\langle c \rangle}{\langle c^0 \rangle} = \frac{\sum_{k=1}^{\infty} k c_k(t)}{\sum_{k=1}^{\infty} c_k(t)} \quad (6.22)$$

### 6.3 Primeros Momentos

A partir de la ecuación de Fokker-Planck es posible obtener ecuaciones para el promedio y las covarianzas, las cuales nos dan información acerca de las fluctuaciones en  $m_k$ . Estas cantidades están definidas como

$$\langle \zeta_k(t) \rangle \equiv \sum_{\{\zeta_k\}} \zeta_k \Pi\{\zeta, t\} \quad (6.23)$$

y

$$\langle \langle \zeta_k \zeta_s \rangle \rangle \equiv \langle \zeta_k \zeta_s \rangle - \langle \zeta_k \rangle \langle \zeta_s \rangle \quad (6.24)$$

La ecuación de evolución para el primer momento se obtiene de multiplicar la Ec. (6.18) por  $\zeta_k$  y sumar sobre todos los valores posibles,

$$\begin{aligned} \partial_t \langle \zeta_k(t) \rangle &= \partial_t \langle \zeta_k(t) \rangle_c + \partial_t \langle \zeta_k(t) \rangle_f \\ &= \sum_{j=1}^{\infty} A_{kj}(t) \langle \zeta_j \rangle + \sum_{i,j=1}^{\infty} B_{i+j,k} \langle \zeta_{i+j} \rangle \end{aligned} \quad (6.25)$$

en donde

$$A_{kj}(t) = \sum_{i=1}^{\infty} K_{ij} (\delta_{ik} + \delta_{jk} - \delta_{i+j,k}) C_i(t) \quad (6.26a)$$

$$B_{i+j,k} = F_{ij} (\delta_{ik} + \delta_{jk} - \delta_{i+j,k}) \quad (6.26b)$$

Similarmente, multiplicar la Ec. (6.18) por  $\zeta_k \zeta_s$  y sumando sobre todos los valores posibles, se obtiene una ecuación para el segundo momento, a la cual se le resta el producto de las ecuaciones para  $\zeta_k$  y  $\zeta_s$ , con el resultado (Salinas-Rodríguez, 1992),

$$\begin{aligned} \partial_t \langle \langle \zeta_k \zeta_s \rangle \rangle &= \partial_t \langle \zeta_k \zeta_s \rangle - \langle \zeta_k \rangle \partial_t \langle \zeta_s \rangle - \langle \zeta_s \rangle \partial_t \langle \zeta_k \rangle \\ &= \sum_{j=1}^{\infty} A_{kj} \langle \langle \zeta_k \zeta_s \rangle \rangle + \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^{\infty} B_{i+j,s} \langle \zeta_{i+j} \zeta_k \rangle \end{aligned} \quad (6.27)$$

## 6.4 Discusión

Es importante señalar que con esta metodología es posible obtener la evolución de la función de distribución de pesos moleculares. Sin embargo, se debe definir el proceso que caracteriza su evolución (modelo para la tasa de polimerización); un caso particular puede considerar las tasas constantes pero diferentes. Con el resultado se calculará el valor promedio a un tiempo determinado, lo que permite comparar los valores teóricos con los experimentales; o bien, con el ajuste obtenido, la función gamma (Secc.6.4.1). Este trabajo se encuentra bajo estudio.

### 6.4.1. Ajuste de los datos experimentales de la DPM.

Peña y col. (2000) y Trujillo Roldán y col. (2003) obtuvieron las distribuciones de peso molecular promedio, DPM durante el cultivo de *Aztobacter vinelandii* (cepa ATCC9046) utilizando una TOD de 3% (Fig. 6.1).

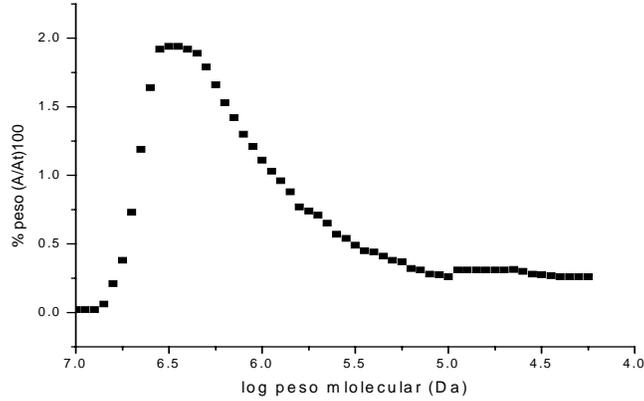


Fig. 6.1 Datos experimentales de la DPM obtenida con 3% TOD por Trujillo- Roldán y col, (2004)

El ajuste de estos datos es particularmente distinto al que se puede realizar utilizando cualquier software, ya que se incorporan las definiciones del peso molecular ponderado en el número,  $\overline{M}_n$  y el peso molecular ponderado en el peso,  $\overline{M}_w$  en los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$  (Ecs. 6.32-6.33).

Correlacionando los datos experimentales de Trujillo-Roldán y col. (2004) a través de la función de distribución gamma,  $\Gamma(\alpha)$

$$\Gamma(\alpha) = \int_0^{\infty} t^{\alpha-1} e^{-t} dt \quad (6.28)$$

Introduciendo la variable  $y(x)$  que indica el valor experimental, % peso  $(A_i/AT)*100$  (Fig. 2.2) definida por

$$y(x) = \frac{(x-\gamma)^{\alpha-1}}{\Gamma(\alpha)\beta^{\alpha}} \exp\left(-\frac{x-\gamma}{\beta}\right) \quad (6.29)$$

donde  $x$  representa el peso molecular en Da; y  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  son parámetros de ajuste.  $\gamma$  se refiere a la intersección de  $y(x)$  con el eje  $x$  donde encontramos el peso molecular más bajo del alginato,  $x \geq \gamma$ . Los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$  se calculan con las ecuaciones para el primer y segundo momento,

$$\overline{M}_n = \int x y(x) dx \quad (6.30)$$

$$\overline{M}_w = \frac{\int x^2 y(x) dx}{\int x y(x) dx} \quad (6.31)$$

De aquí se sigue que

$$\overline{M}_n = \alpha\beta + \gamma \quad (6.32)$$

$$\overline{M}_w = \frac{\alpha(\alpha+1)\beta^2 + 2\alpha\beta\gamma + \gamma^2}{\alpha\beta + \gamma} \quad (6.33)$$

Resolviendo para  $\alpha$  y  $\beta$  se sigue que

$$\alpha = \frac{\overline{M}_n - \gamma}{\beta} \quad (6.34)$$

$$\beta = \frac{\overline{M}_w \overline{M}_n - 2\gamma(\overline{M}_w - \overline{M}_n) - \overline{M}_n^2}{(\overline{M}_n - \gamma)} \quad (6.35)$$

El valor de  $\gamma$  se encuentra dentro del intervalo  $5012 \leq \gamma \leq 10,000,000 \text{ Da}$ , que equivale al rango de valores en los que se encuentra el peso molecular.

Los parámetros se optimizan usando como criterio el porcentaje de Error total, %ET que se define como

$$\%ET = \frac{1}{N} \sum \%ERY \quad (6.36)$$

en donde N representa el número de datos experimentales y %ERY está dada por

$$\%ERY = \left| \frac{y_{\text{exp}} - y_{\text{sim}}}{y_{\text{exp}}} \right| * 100 \quad (6.37)$$

Se propone para  $\gamma$  la cota inferior 5012 Da y la cota superior 10,000,000 Da, con estos se calculan  $\alpha$  y  $\beta$ . En ambos casos, se utiliza el mismo  $\overline{M}_w$ , 300000Da,  $\overline{M}_n$ , 46153.85Da y el IP, 6.5 (Trujillo-Roldán y col., 2003) que corresponden a la cota inferior. Cuando  $\gamma$  es 5012 Da el %ET es de 233%, con la cota superior  $\Gamma(\alpha)$  se indetermina, esto sugiere utilizar valores menores a 10,000,000 Da. Se realizaron reducciones sucesivas a la mitad de la cota superior, y se encontró para un valor de  $\gamma$ , 9765.62 el menor %ET es de 205.58%. Arriba de este valor,  $\Gamma(\alpha)$  se indetermina.

Dado que aún el valor de %ET es muy grande se realiza un incremento sucesivo del valor de la cota inferior manteniendo  $\overline{M}_w$ ,  $\overline{M}_n$  y IP. Como resultado el %ET se redujo al 43% con una  $\gamma$  de 17542 Da. Tomando como referencia esta  $\gamma$  se calculan los otros parámetros (Ecs. 6.32 y 6.33),

$$\alpha = 0.6875 \quad \text{y} \quad \beta = 41618 \quad (6.38)$$

La relación proporcional de  $\beta$  y  $\gamma$  respecto a  $\alpha$  es

$$\frac{\beta}{\alpha} = 60535 \quad \frac{\gamma}{\alpha} = 25516 \quad (6.39)$$

Esta proporcionalidad cambia con los valores de los parámetros pero en este ejercicio se mantienen constantes. Los parámetros  $\beta$  y  $\gamma$  se recalculan proponiendo un valor de  $\alpha$  dentro del rango de 0.6 -2.9 que corresponden a los menores %ET determinados. El mejor ajuste se obtuvo cuando el %ET es del  $6.136 \times 10^{-15}$  con  $\alpha = 1$ ,  $\beta = 60535$  y  $\gamma = 25516$  (Fig. 6.2).

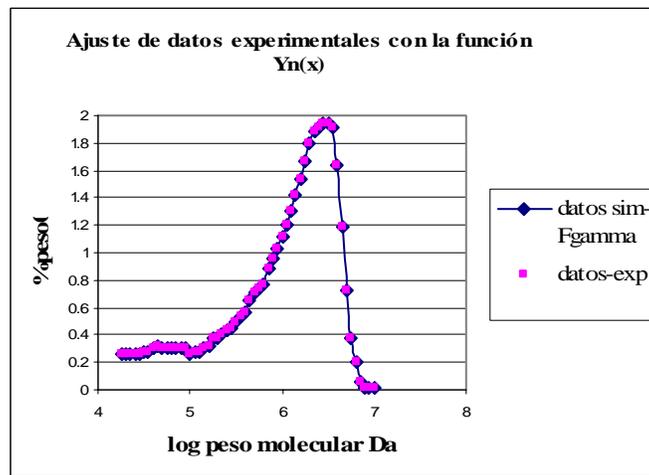


Fig. 6.2 Ajuste de los datos experimentales con la función de distribución gamma.

## CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

A continuación se enumeran las conclusiones principales obtenidas durante el desarrollo de este trabajo así como las limitaciones y perspectivas del mismo.

1. Se ha desarrollado un método alternativo a los existentes en la literatura, para describir la producción de alginato en un proceso de fermentación con *Azotobacter vinelandii*. La idea básica es suponer que los procesos de reproducción y muerte de las bacterias son procesos estocásticos Markovianos, cuya dinámica puede ser descrita en términos de una ecuación Maestra no-lineal. El modelo adquiere su carácter estocástico cuando los parámetros  $\beta$  y  $\gamma$  asociados con los procesos correspondientes contienen en su expresión la TOD fluctuante. Utilizando el método de expansión sistemática de van Kampen a partir de esta formulación estocástica no sólo se recupera la descripción macroscópica usual donde se predice el comportamiento de la producción de biomasa,  $x$  el alginato,  $p$  y el consumo de sacarosa,  $s$  también se obtienen las fluctuaciones alrededor de estas cantidades, para diferentes tensiones de oxígeno disuelto, TOD.

2. En los capítulos anteriores se han realizado modificaciones al modelo macroscópico propuesto por Trujillo- Roldán, (1999). Se incluye en la ecuación para el consumo de sacarosa el término asociado con la síntesis de alginato y se optimizan los parámetros del modelo. Los resultados analíticos para las cantidades  $x$ ,  $p$ ,  $s$  son comparados con los valores experimentales reportados para el cultivo de *Azotobacter vinelandii*. Se encontró que el error cuadrático medio total varía entre 0.17% -0.29%. Se obtienen las expresiones para la descripción macroscópica (Ecs. (5.24), (5.49) -(5.50)) como el primer momento de la distribución de probabilidad. La optimización de los parámetros es útil en la medida que se establece el efecto real de la evolución de las fluctuaciones internas en la reproducción del cultivo, la producción de alginato y el consumo de sacarosa.

3. Las fluctuaciones internas alrededor del valor medio se obtuvieron de la descripción estocástica. Se representan a través de la desviación estándar. Las Figs. 5.4 y 5.5 evidencian que las fluctuaciones observadas son comparables o más grandes que las fluctuaciones internas predichas por el modelo. Las desviaciones globales de los datos experimentales incluyen además de estas fluctuaciones internas, a las fluctuaciones debidas al ruido externo. Este último ruido es una medida del efecto de otros procesos implicados como pueden ser: la forma de alimentar aire al bioreactor, problemas de transferencia de nutrientes, estado metabólico del cultivo y los errores de medición debido a deficiencias en los instrumentos, las cuales no pueden despreciarse totalmente. Este enfoque permite exhibir las tendencias en el comportamiento de las fluctuaciones

4. Las limitaciones del modelo radican en suponer que todas las bacterias se reproducen en promedio con la misma velocidad y se encuentran homogéneamente distribuidas en el bioreactor. Su edad es despreciable, lo que es una simplificación esencial para considerar los procesos de reproducción y muerte de bacterias como procesos estocásticos Markovianos. Algunas de estas limitaciones podrían ser controladas en trabajos futuros a

través de generalizaciones del modelo estocástico para incluir la naturaleza estocástica del grupo de variables  $\Phi(t)$ ,  $a(t)$  y  $s(t)$ .

5. Dada la diversidad de factores que afectan al sistema, para continuar su estudio se propone el análisis de los experimentos utilizando los diagramas de Pareto. Con el objeto de identificar los factores más importantes, cuyo efecto combinado o individual influyen de manera significativa en el sistema. Considerando los resultados obtenidos en esta tesis, el factor seleccionado, se propone como un ruido externo cuya influencia se analizaría a través de ecuaciones diferenciales estocásticas.

6. En esta descripción los procesos de reproducción y muerte de las bacterias se han modelado exclusivamente a nivel fenomenológico, sin pretender deducir su forma explícita a partir de un análisis microscópico. Esto es en principio posible, sin embargo, es un problema difícil ya que no se consideran aspectos como el estado metabólico del cultivo que podría generar una distribución de velocidades; en estas condiciones deja de ser aplicable el concepto de velocidad específica.

7. En este trabajo se presentó también un modelo estocástico basado en la ecuación Maestra para la distribución de pesos moleculares del alginato. Donde se considera el fenómeno de agregación que da lugar al proceso de polimerización. Aunque sólo se presentó el modelo, se obtiene una ecuación para la dinámica de esta distribución y su solución está en proceso, por lo tanto, será factible compararla con resultados experimentales.

8. Por último, enfatizamos la generalidad del método introducido para estudiar la producción de alginato, así como su distribución de pesos moleculares. En principio este enfoque es aplicable a cualquier sistema físico en donde ocurren procesos asociados con el desarrollo de microorganismos que puedan ser modelados por un proceso estocástico Markoviano.

## REFERENCIAS

Acevedo, F., Gentina, J. y Illanes, A. (2002). Archivos de ingeniería bioquímica. Fundamentos de ingeniería bioquímica. Universitarias de Valparaíso. Chile.

Annison, G. y Couperwhite, I. (1986). Influence of calcium on alginate production and composition in continuous cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 25: 55-61

Bird, R. Steward, W. y Lightfoot, E. (2002). Transport phenomena. John Wiley y Sons, Inc. USA.

Beale, M., y Foster, J. (1996). Carbohydrate fluxes into alginate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* NCIB 8789: NMR Investigations of the triose pools. *Biochemistry*. 35: 4492-4501.

Bevington, P. y Robinson, D. (1992). Data reduction and error analysis for the physical sciences. Mc. Graw- Hill, New York

Bogolyubov, N.N. (1962) in Studies in Statistical Mechanics, Vol. 1, eds. J. de Boer and G. E. Uhlenbeck (North - Holland Pub., Amsterdam)

Braun, E. (1986). Movimiento browniano. Conaculta, México D.F.

Brivonese, A. y Sutherland, I.W. (1989). Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 30: 97-102.

Chen, W. P., Chen, J. Y., Chang, S.C. y Su, C.L. (1985). Bacterial alginate produced by a mutant of *Azotobacter vinelandii*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 49: 543-546.

Clementi, F., Mancini, M. y Moresi, M. (1998). Rheology of alginate from *Azotobacter vinelandii* in aqueous dispersions. *Journal of Food Engineering*. 36: 51-52.

Clementi, F. (1997). Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17: 327-361.

Clementi, F., Paolo, F., Mancini, F. y Moresi, M. (1995). Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Enz. and Microbiol Technol.* 17: 983-989.

Conti, E., Flabiani, A., O' Regan, M., y Sutherland, I. (1994). Alginate from *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. Production and properties. *Microbiology*. 140: 1125-1132.

Coronado, E, Galindo, E y Peña, C. (2008). The role of alginate in *Azotobacter vinelandii* aggregation in submerged culture. *Rev. Colomb. Biotechnol.* 10 :10-16

Criado-Sancho, M. y Casas Vázquez, J. (2004). Termodinámica de los procesos irreversibles. Pearson Addison Wesley. Madrid, España.

Darren J. W. (2009). Stochastic modelling for quantitative description of heterogeneous biological systems. *Nature Reviews Genetics*. **10**: 122-133

Davey, M., Davey, L., Woodward, M., Edmonds, N., Lee, W. y Douglas, B. (1996) Oscillatory, stochastic and chaotic growth rate fluctuations in permissively controlled yeast cultures. *Biosystems*. 39: 43-61.

Davison, I., Sutherland, I., y Lawson, C.(1977). Localization of O-acetyl groups of bacterial alginate. *Journal of General Microbiology*. 98: 603-606.

De León-Rodríguez, A., Galindo, E. y Ramírez, O.T. (2010). Design and characterization of a one-compartment scale-down system for simulating dissolved oxygen tension gradients. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85: 950-956.

De Vuyst, L. y Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS. Microbiol. Rev.* 23: 153-177.

Dhanasekar, R., Viruthagiri, T. y Sabarathinam, P.L. (2003). Poly (3- hydroxy butyrate) synthesis from a mutant strain *Azotobacter vinelandii* utilizing glucose in a batch reactor. *Biochemical engineering Journal*. 16: 1-18.

Dong, D., Xiaojian, S., Naiyang, D. y Zhang, Z . (2010) Gene expression variations are predictive for stochastic noise. *Nucl. Acids. Res.* 38

Elowitz, M.B., Levine, A.J., Siggia, E.D. y Swain, P.S. (2002). Stochastic gene expression in a single cell. *Science*. 297: 1183-2286.

Family, F. y Landau, D. P. (1984). Fundamentos de procesos estocásticos en: Kinetics of Aggregation and Gelation. Ed. Elsevier, Amsterdam.

Fan, L.T., Shen, B.C. y Chou, T. (1995). Stochastic Modeling of Transient Residence – Time Distributions during start-up. *Chem. Eng. Sc.* 50: 211-221.

Flory, P.J. (1953) Principles of Polymer Chemistry. Cornell University Press, Ithaca.

Gacesa, P. (1998). Bacterial alginate biosíntesis – Recent progress and future prospects. Review article. *Microbiology*. 114: 1133-1143.

Galindo, E. Peña, C. y Serrano-Carreón, L. (2008). Domesticar microorganismos en un biorreactor: los retos del bioingeniero en: Lopez-Munguía, A. Una ventana al quehacer científico. Instituto de Biotecnología de la UNAM 25 aniversario, cap 12. Mexico, D.F.. UNAM.: 131-143

Galindo, E., Peña, C. Núñez, C. Segura, D. y Espín, G. (2007). Review molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polydihydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial cell Factories*. 1-16

Gallardo, C., Salinas- Rodríguez, E., Zamora. J.M. y Rodríguez, R.F. (2006) Stochastic modeling of alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Revista Mexicana de Física*. 52: 51-56

García- Colín, Leopoldo. (2003). La física de los procesos irreversibles. Colegio Nacional. Tomo I. México, D.F.

Gardiner, W. (1983). Handbook of stochastic methods. Springer-Verlag. New York. Vol. 20.

Goel, N. y Richter-Dyn, N. (1974). Stochastic Models in Biology. Ed. Academic Press, New York.

Gorin, P.A y Spencer, J.F.T. (1966) Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*. *Canadian Journal of Chemistry*. 44: 993-998

Haken, H. (1975). Cooperative phenomena in systems far from thermal equilibrium and in nonphysical systems. *Rev. Mod. Phys.* 47: 67-121.

Hiemenz, P.C. (1984). Polymer chemistry the basic concepts. Marcel Dekker, INC., New York.

Horan, J, Jarman, T. y Dawes, E. (1983). Studies of some enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 129: 2985-2990.

Horan, J, Jarman, T. y Dawes, W. (1981). Effects of carbon source and inorganic phosphate concentration on the production of alginic acid by a mutant of *Azotobacter vinelandii* and on the enzymes involved in its biosynthesis. *J Gen Microbiol.* 129: 3473-3480.

Jarman, T.R., Deavin, L., Slocombe, S. y Righelato, R.C. (1978). Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolisaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *J. of Gen. Microbiol.* 107: 59-64.

Klimerk, J. y Ollis, D. F. (1980). Extracelular microbial polysaccharides: Kinetics of *Pseudomonas sp.*, *Azotobacter vinelandii*, and *Aureobasidium pullulans* batch fermentations. *Biotechnology and Bioengineering.* 22: 2321-2342.

Kutalik, Z., Razaza, M., y Baranyib, J. (2005). Connection between stochastic and deterministic modelling of microbial growth. *Journal of Theoretical Biology*. 232: 285–299.

Lande, R., Engen, S. y Saether, E. (2003) Stochastic population dynamics in ecology and conservation. Oxford University Press, New York, N.Y.

Lange- Chezé, H., Beunard, D., Pascal, D., Guillochon, D., Anne- Marie, C., Morcellet, M., Saude, N. y Guy-Alain, J. (2002). Production of microbial alginate in a membrane bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 656-661.

Lars Ferm y Per Lötstedt (2007) Numerical method for coupling the macro and meso scales in stochastic chemical kinetics. *BIT Numerical Mathematics* . 47: 735-762.

Lenz, W. y Marchessault, R. (2005). Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules*. 6: 1-8

Leudeking, R. y Piret, E.L. (1959). A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*. 1: 393-401.

Mejía M.A., Segura, D., Espín, G., Galindo, E. y Peña, C. (2009). Two-stage fermentation process for alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutant altered in poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) synthesis. *Journal of Applied Microbiology*. 55-61

Moat, A. y Foster, J. (1996). Microbial physiology. Td. Ed. Wiley edition Singapur.

Mourey, T.H., y Coll, H. (1995). Size exclusion cromathography with light scattering detection at two angles polystyrene: Cromatographic characterization of polymers. *Advances in chemistry series*, 247.

Nielsen, J. y Villadsen, J. (1994). Bioreaction engineering principles. Plenum Press. New York.

Nigel, J., Horan, Trevor, R., Jarman y Dawes E. (1983). Studies on some enzymes of alginic biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. *Journal of General Microbiology*. 129: 2985-2990.

Oosterhuis, N.M.G. y Kossen, N.W.F. (1984). Dissolved oxygen concentration profiles in a production-scale bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 26: 546-550.

Peña, C. Millan, M., y Galindo, E. (2008). Production of alginate by *Azotobacter vinelandii* in a stirred fermentor simulating the evolution power input observed in shake flasks. *Process Biochemistry*. 43: 775-778.

Peña, C. Cyril, P., Büchs, J., Galindo, E. (2007). Evolution of the specific power consumption and oxygen transfer rate in alginate- producing cultures of *Azotobacter vinelandii* conducted in shake flasks. *Biochemical Engineering Journal*. 36: 73-80.

Peña, C., Hernandez, L. y Galindo, E. (2006). Manipulation of the acetylation degree of *Azotobacter vinelandii* alginate by supplementing the culture medium with 3-(N-morpholino)-propane-sulfonic acid. *Lett.Appl.Microbiol.* 43: 200-204.

Peña, C., Miranda, L., Segura, D., Nunez, C., Espin, G. y Galindo, E. (2002a). Alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutants altered in poly-beta-hydroxybutyrate and alginate biosynthesis. *J Ind Microbiol.Biotechnol.* 29: 209-213.

Peña, C., Reyes, C., Sarralde-Corona, P., Corkidi, G. y Galindo, E. (2002b). Characterization of *Azotobacter vinelandii* in submerged culture by digital image analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 207: 173-177.

Peña, C., Trujillo- Roldán, M. A., y Galindo, E. (2000). Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb. Technol.* 27: 390-398.

Pirt, S. (1975). Principles of microbe and cell cultivation. Pirt Oxford: Blackwell scientific publications.

Ponciano, J., Frederick, P., Vandescasteele, J., Hess, T., Forney, L., Crawford, R. y Joyce, P. (2005). Use of stochastic models to assess the effect of environmental factors on microbial grown. *Applied and environmental microbiology*. 2355-2364.

Pradyumna, K. N., Thompson, B.G., Ward, D.B. y Gray, M.R. (1992). Effects of glucose fluctuations on synchrony in fed-batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. 8: 501-507.

Prandit, S., Juvekar, V.A., y Trivedi, M.K. (1993). Stochastic Simulation of Polymer Reactions. *Chem. Eng. Sc.* 48: 1237-1250.

Preetam, G., Samik, G., Kalyan, B., Sajal, D. y Simon Daefler. (2006). Stochastic Modeling of Cytoplasmic Reactions in Complex Biological Systems. *Lecture Notes in Computer Science*. 3980: 566-576

Priego-Jimenez, R. Peña, C. Ramirez, O. y Galindo, E. (2005). Specific growth rate determines the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii* *Biochemical Engineering Journal*. 25: 187-193.

Primer, A. (1997). HPLC for environmental analysis. Hewlett Packard.

Rizzoti, R. (1994). Les agents de texture: epaississant, gelifiants, stabilisants. *IAA*. 9: 563-573.

Rehm, B.H. y Valla, S. (1997). Bacterial alginates Biosynthesis and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 48: 281-288.

Reichl, L.E. (1998). A modern course in statistical physics. Wiley-Interscience. 2a edic. New York

Reyes, C., Peña, C. y Galindo, E. (2003). Reproducing shake flasks performance in stirred fermentors: production of alginates by *Azotobacter vinelandii*. *J. Biotechnol.* 105: 189-198.

Rodríguez R. F., (2007). Notas del curso de Física Estadística Avanzada. Instituto de Física, UNAM.

Rodríguez, E., Hayashi, J. A., Soria, A. y Zamora, J. M. (2001). A simple stochastic model of spontaneous imbibition in hele-shaw cells. *AIChE J.* 47: 1721-1730.

Rodríguez, R.F., Zamora, J.M., Salinas-Rodríguez, E. and Izquierdo, E. (2003). Stochastic modeling of some aspects of biofilm behavior. *Rev. Mex. de Fis.* 49: 132-143.

Sabra, W., Zeng, A.P. y Deckwer, W.D. (2001). Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 315-325.

Sabra, W., Zeng, A., Lunsdorf, H., Deckwer, W. (2000). Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (9): 4037-4044.

Sabra, W., Zeng, A., Sabry, S., Omar, S. y Deckwer, W. (1999). Effect of phosphase and oxygen concentrations on alginate production and stoichiometry of metabolis of *Azotobacter vinelandii* under microaerobic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 773-780.

Salinas-Rodríguez, E., Peña, C., Zamora, J.M., Rodríguez, R., Gallardo, C. y Galindo, E., (en proceso)“Distribución del Peso Molecular Promedio mediante Balance de Poblaciones”.

Salinas-Rodríguez, E., Rodríguez, R. F., Soria, A. y Aquino, N. (1998). Volume fraction correlation functions in a two-phase bubble column. *Int. J. Multiphase Flor.* 24: 93– 103.

Salinas-Rodríguez, E. y Rodríguez, R.F. (1995). Descripción Estocástica de sistemas dispersos. *Revista Mexicana de Física* 41, 431-450.

Salinas-Rodríguez, E. (1992). Descripción estocástica de fenómenos de agregación. Tesis de Doctorado, UAM-I

Salinas-Rodríguez, E., Rodríguez, R. F. y Zamora, J. M. (1991). Stochastic Dynamics of spatial effects in fragmentation clusters. *Rev. Mex. Fís.* 37: S51-S62.

Salinas-Rodríguez, E. (1990). Notas de Curso: Introducción a la Física Moderna, UAM-I

Salinas-Rodríguez, E. (1983) Fluctuaciones fuera de equilibrio en un flujo cortante. Tesis de Maestría en Ciencias. UNAM.

Salgavi, V. y Salgavi, V. (1992). Alginate production by *Azotobacter vinelandii* in batch culture. *J. of Gen. and Appl. Microbiol.* 38: 641-645.

Shandelle, M., King, A., Costantino, R., Cushing, M., Brian, D. y Desharnais, R. (2003) Explaining and predicting patterns in stochastic population systems. *The Royal Society.* 1549-1553.

Segura, D., Guzmán, J. y Espín, G. (2003). *Azotobacter vinelandii* mutants that overproduce poly- $\beta$ -hydroxybutyrate or alginate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 159-163.

Shu, C. H. y Yang, S. T. (1991) Kinetics and modeling of temperature effects on batch xanthan gum fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 37: 567-574.

Skaj-Braek, G., Smidsrad, O. Larsen, B. (1986). Taoloring of alginates by enzymatic modification in vitro. *J. Biol. Macromol.* 8: 330-336.

Song- Tien, C., Fan, L., Argorti, A., Vidal-Michael, R. y More, A. (2005). Stochastic modelling of thermal disinfection of bacteria according to the logistic law. *AIChE Journal.* 51: 2615-2618.

Soria, A., Salinas-Rodríguez, E., Zamora, J. M. y Rodríguez, R. F. (2002). A fluctuating hydrodynamic approach to correlation functions in two phase bubble columns, *Rev. Mex. Fis.* 48: 243-253.

Sutherland, I.W. (1994). Structure function relationships in microbial exopolisaccharide: *Biotechnol. Adv.* 12: 393-448.

Sutherland, I.W. (1990). Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides Ed. University Press. Cambridge.

Tambe, S.S., Kulkarni, B.D. y Doraiswamy, L.K. (1985a). A Stochastic Approach to the Analysis of Chemically Reacting Systems – I. The Role of Internal Fluctuations. *Chem. Eng. Sc.* 40: 1943-1949.

Tambe S.S., Ravikumar, B.D., Kulkarni, B.D. y Doraiswamy, L.K. (1985b). A Stochastic Approach to the Analysis of Chemically Reacting Systems – I. The Role of External Fluctuations. *Chem. Eng. Sc.* 40: 1951-1957.

Trujillo- Roldán, M. A., Moreno, S., Espín, G. y Galindo, E. (2004). The roles of oxygen and alginate-lyase in determining the molecular weight of alginate produce by *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 742-747.

Trujillo-Roldán, M. A., Peña, C., Galindo, E. (2003). Components in the inoculum determine the kinetics of *Azotobacter vinelandii* cultures and molecular weight of its alginate. *Biotechnol. Lett.* 25: 1251-1254.

Trujillo- Roldán, M.A., Peña, C., Ramírez O.T. y Galindo, E. (2001). Effect of oscillating dissolved oxygen tension on the production of alginate by *Azotobacter vinelandii*. *Biotechnol. Prog.* 17: 1042-1048.

Trujillo-Roldán, M.A. (1999). Efecto de las oscilaciones en el oxígeno disuelto sobre la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología. UNAM.

van Kampen, N. (2003). Stochastic Processes in Physics and Chemistry. North Holland, Amsterdam.

Van der Berg D.C.J., Robjin, G.W., Janssen, A. C., Juisieppin, M.L.F., Vreeker, R., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G., Ledebier, A.M., Verrips, C.T. (1995) Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the exopolysaccharide. *Appl. Microbiol. Biotech.* 50: 697-703.

van Dongen, P. G. y Ernst, M. H. (1985). Large-time behavior of the Smoluchowski equations of coagulation. *Phys. Rev.* A32: 670-672.

Wei-Yin, C. y Sankar, B. (2005). Stochastic modeling of nonlinear epidemiology. *Journal of theoretical biology.* 234: 433-470.

Weiss, M. y Ollas, D.F. (1980) Extracellular microbial polysaccharides I. Substrate, biomass and product kinetic equations for batch xanthan gum fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 12: 854-873.

Zapata-Vélez, A.M. y Trujillo-Roldán, M.A. (2010). The lack of a nitrogen source and/or the C/N ratio affects the molecular weight of alginate and its productivity in submerged cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Ann Microbiol.* 661-668.

Ziff, R.M. (1986) in Kinetics of aggregation and gelation, eds. F. Family, D.P. Landau. Elsevier science Publishers B.V., Amsterdam.

Zoltán, K., Razaz, M. y József, B. (2005). Connection between stochastic and deterministic modelling of microbial growth. *Journal of theoretical biology*. 232: 285-299.

## APÉNDICE A

## Apéndice A Deducción de la Ecuación de Difusión

En este apéndice se deduce la ecuación de conservación de probabilidad, Ec. (4.5), en una dimensión. Considerando que un número de partículas  $n$  se mueve en una dirección una distancia  $\Delta$  ó  $-\Delta$ . La probabilidad de que una partícula se encuentre entre la posición  $\Delta$  y  $\Delta+d\Delta$  es  $\phi(\Delta)d\Delta$ , de donde se sigue que

$$dn = n\phi(\Delta)d\Delta \quad (A1)$$

$\phi(\Delta)$  debe cumplir las siguientes propiedades (Gardiner, 1983):

i)  $\phi \neq 0$  cuando  $\Delta < x$ .

ii)  $\phi = 0$  cuando  $\Delta > x$ .

iii) Cuando la probabilidad es simétrica  $\phi(\Delta) = \phi(-\Delta)$

iv)  $\phi(\Delta)$  debe satisfacer la condición de normalización  $\int \phi(\Delta)d\Delta = 1$  (A2)

v)  $\langle \phi \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} \Delta \phi(\Delta) d\Delta = 0$

Por otro lado, la densidad numérica  $n(x,t)$  es proporcional a la densidad de probabilidad, a través de la Ec. (4.4)

$$P(x,t) \equiv \frac{n(x,t)}{N} \quad (A3)$$

además, en un intervalo de tiempo  $\tau$ , las densidades de probabilidad  $P(x, t+\tau)$  y  $P(x+\Delta, t)$  están relacionadas a través de

$$P(x, t+\tau)dx = dx \int_{-\infty}^{\infty} P(x+\Delta, t)\phi(\Delta) d\Delta \quad (A4)$$

Por definición de derivada parcial

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \lim_{\tau \rightarrow 0} \frac{P(x, t+\tau) - P(x, t)}{\tau} \quad (A5)$$

se sigue que

$$P(x, t+\tau) = P(x, t) + \tau \frac{\partial P}{\partial t} \quad (A6)$$

Realizando una expansión en series de Taylor del término  $P(x+\Delta, t)$

$$P(x + \Delta, t) = P(x, t) + \Delta \frac{\partial P}{\partial x} + \frac{\Delta^2}{2!} \frac{\partial^2 P}{\partial x^2} + \dots \quad (\text{A7})$$

multiplicando por  $\phi(\Delta)d\Delta$  e integrando sobre todos los valores posibles  $\Delta$

$$\int_{-\infty}^{\infty} P(x + \Delta, t) \phi(\Delta) d\Delta = P(x, t) \int_{-\infty}^{\infty} \phi(\Delta) d\Delta + \frac{\partial P}{\partial x} \int_{-\infty}^{\infty} \Delta \phi(\Delta) d\Delta + \frac{\partial^2 P}{\partial x^2} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{\Delta^2}{2!} \phi(\Delta) d\Delta \quad (\text{A8})$$

De la Ec. (A5), aplicando el límite cuando  $\tau \rightarrow 0$ , y de las propiedades iv) y v) de  $\phi(\Delta)$ , Ec. (A2) se obtiene la ecuación de Difusión, Ec. (4.5) en una dimensión (Berg, 1993),

$$\frac{\partial P(x, t)}{\partial t} + D \frac{\partial^2 P(x, t)}{\partial x^2} = 0 \quad (\text{A9})$$

donde se ha definido el coeficiente de difusión como

$$D = \frac{1}{\tau} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{\Delta^2}{2!} \phi(\Delta) d\Delta \quad (\text{A10})$$



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Casa abierta al tiempo

UNIDAD IZTAPALAPA

**EFFECTO DE LAS FLUCTUACIONES INTERNAS EN EL  
CRECIMIENTO DEL CULTIVO DE *Azotobacter vinelandii*  
Y EN LA SÍNTESIS DE ALGINATO**  
TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN  
CIENCIAS (INGENIERÍA QUÍMICA) PRESENTA:  
M.C. Claudia T. Gallardo Rivera

DIRECTOR: Dra. Elizabeth Salinas Barrios  
CODIRECTOR: Dr. Enrique Galindo Fentanes