

Cra. 7 # 74 – 64
Oficina 506
P.O. Box 21848
Bogotá, D.C.
Colombia

HUMBERTO RUBIO & CIA.
ABOGADOS - LAWYERS

Tel: (571) 3132408 - 3132423
3132410 - 3131759
Fax: (571) 3131647 - 3132367
E-mail: mail@rubiolawyers.com
Web: www.rubiolawyers.com

Señor

**SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y C
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y
E. S. D.**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-125171- -00010-0000

Fecha: 2013-01-11 14:52:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 40

Ref: Expediente No. **08-125171**
Patente de Invención: **“PRODUCCION DE
ISOPRENOIDES”**
Solicitud Internacional: **PCT/US2007/069807**
Titular: **AMYRIS, INC.**

**RECURSO DE REPOSICIÓN CONTRA LA
RESOLUCIÓN No. 71504 DE 26 DE NOVIEMBRE DE
2012, NOTIFICADA POR FIJACION EN LISTA DE 4
DE DICIEMBRE DE 2012, DESFIJADA EL 4 DE
ENERO DE 2013.**

HUMBERTO RUBIO CAMACHO, mayor de edad, domiciliado en Bogotá, D.C., con la Oficina 504 de la Carrera 7 No. 74-44 de ésta ciudad, Abogado en Ejercicio, portador de la Tarjeta Profesional No. 50.007 expedida por el Consejo Superior de la Judicatura, actuando en carácter de apoderado de la sociedad **AMYRIS, INC.**, domiciliada en 5885 Hollis St., Ste 100, Emeryville, California, Estados Unidos de America; reconocido por su despacho y encontrándome dentro de la debida oportunidad procesal, por medio del presente escrito interpongo **RECURSO DE REPOSICIÓN** contra la Resolución No. 71504 de 26 de Noviembre de 2012, notificada por fijación en lista de 4 de diciembre de 2012 y *desfijada* el 4 de Enero de 2013; con el propósito que sea revocada y en su lugar proferir otra, en que se **OTORGUE** el privilegio de la Patente de Invención denominada: **“PRODUCCION DE ISOPRENOIDES”**, conforme a los siguientes:

1. MOTIVOS DE INCONFORMIDAD.-

Base de la Negativa

- 1.1. Mediante la Resolución objeto del presente recurso, su despacho negó el privilegio de patente de invención: **"PRODUCCION DE ISOPRENOIDES"**, solicitada por mí representada la sociedad **AMYRIS, INC.,**.
- 1.2. En el acto administrativo en mención, en su artículo primero decide denegar la patente de invención a la creación titulada **"PRODUCCION DE ISOPRENOIDES"**.
- 1.3. Teniendo en cuenta lo anterior, respetuosamente nos permitimos indicar que no compartimos la interpretación realizada por el examinador con respecto al documento citado, en el cual se fundamento el rechazo de la presente solicitud, interpretación equivocada teniendo en cuenta las siguientes razones:

El examinador está sustentando el rechazo al capítulo reivindicatorio y manteniendo las objeciones de novedad con respecto a D1 (US2005266518) en virtud de que no considera como característica técnica el parámetro determinado por la velocidad de crecimiento específica máxima del cultivo contenida en la reivindicación 1 actual. Para dar mayor sustento a su dicho nos cita el documento "Examen de Forma y Fondo de solicitudes de Patentes de Invención y Modelos de Utilidad", página 72, <http://api.sic.gov/co/Biblioteca.html>. Particularmente, el examinador señala que el solicitante no proporciona información sobre las condiciones del medio de cultivo bajo las cuales se obtiene dicha velocidad, o un método por el cual determinar la cantidad de fuente de carbono para

alcanzar dicha velocidad, de manera que no hay información suficiente sobre la medida del parámetro para que pueda tomarse como una característica esencial del método. El examinador concluye que al no considerarse la velocidad de crecimiento máxima una característica esencial del método, D1 sí afecta la novedad de la solicitud y, en consecuencia, nos niega el derecho a una patente de invención.

Revisando el documento citado por el examinador, particularmente, el punto 2.6.5.9 *Definición por parámetros* encontramos que a la letra cita:

Una reivindicación de producto, por ejemplo un compuesto químico, se puede caracterizar por su estructura y elementos, por su fórmula química, como un producto de proceso, o excepcionalmente por sus parámetros.

Los parámetros son valores característicos de propiedades mensurables (por ejemplo el punto de fusión), o definidos como combinaciones matemáticas de varias variables.

El examinador no permitirá la caracterización de un compuesto químico solamente por sus parámetros, a menos que la invención no se pueda definir de otra manera. En cualquier caso, el parámetro tiene que poder ser determinado y medido sin ambigüedad por métodos estándar conocidos en el campo en cuestión, o descritos claramente en la solicitud.

Lo mismo aplica a una característica vinculada a un procedimiento, que es definido por parámetros.

Cuando se definan parámetros no claros o no usuales, el examinador debe pedir una clarificación de dichos parámetros. Por ejemplo, una comparación con parámetros conocidos, siempre que esto no extienda el contenido de la solicitud original (Art. 34). Los parámetros se deben poder determinar de una forma clara, precisa e inequívoca, por medio de procedimientos objetivos usuales en el arte. El método para medir los valores del parámetro debe incluirse en la reivindicación, salvo cuando la persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, conoce qué método debe ser usado, o cuándo todos los métodos llegan al mismo resultado.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, efectivamente, un examinador no puede permitir la caracterización de un compuesto químico solamente por sus parámetros, a menos, y esto se especifica claramente en el citado artículo, que no exista otra manera de definir la invención. En el caso que nos ocupa el parámetro relacionado con la velocidad de crecimiento máximo constituye precisamente la característica técnica esencial de la invención, sobre la cual recae la novedad y actividad inventiva de la invención y no existe otra manera de definir o reclamar la invención.

Adicionalmente, dicho artículo expresa también que dichos parámetros deben ser claramente definidos por métodos estándar conocidos en el campo en cuestión. El método para medir los parámetros debe incluirse en la reivindicación, salvo que la persona normalmente versada en la materia conozca que método debe ser usado, o cuándo todos los métodos lleguen al mismo resultado.

En relación con lo expuesto anteriormente, es imprescindible señalar que el método para determinar la velocidad de crecimiento máxima es ampliamente conocido en el campo al cual se dirige la presente invención. De tal manera que dicho método es conocido por una persona normalmente versada en la materia.

Basado en la materia contenida en la página 69, línea 18 hasta la página 71, línea 16, y página 88, líneas 3-21 del capítulo descriptivo de la presente solicitud, misma que era comúnmente conocida en el tiempo en que la invención fue realizada, una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica entendería como determinar las condiciones del cultivo para proveer 75% o menos de la velocidad de crecimiento específica máxima para las células huésped.

Especialmente en la página 70, línea 20 hasta la página 71, línea 16 del capítulo descriptivo se indica que la velocidad de crecimiento máxima se obtiene cuando las condiciones bajo investigación (por ejemplo, nivel o temperatura de sustrato) soportan la velocidad de crecimiento inicial más rápida. Por ejemplo, en un reactor de alimentación por lote, la condición inicial en donde los nutrientes son suministrados en exceso es tratada como las condiciones para la velocidad de crecimiento máxima. Un tratamiento teórico de la relación de la velocidad de crecimiento en el cultivo es bien conocido para aquellos experimentados en el arte y es denominado como la ecuación de Monod:

$$\mu = \mu_{\max} S / (K_s + S)$$

μ es la velocidad de crecimiento específica de los microorganismos.

$\mu_{\max}$ es la velocidad de crecimiento específica máxima de los microorganismos.

S es la concentración del sustrato limitante para el crecimiento.

K_s es la constante de velocidad media – el valor de S cuando $\mu/\mu_{\max} = 0.5$.

Empleando la ecuación de Monod, una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica puede determinar claramente dicha velocidad de crecimiento máxima ($\mu_{\max}$) para las células huésped al realizar curvas de crecimiento con concentraciones crecientes de sustrato (por ejemplo, fuente de carbono), y a partir de esta curva se puede determinar fácilmente la cantidad de la fuente de carbono que proporciona el 75% o menos de $\mu_{\max}$.

A fin de demostrar que esta técnica era bien conocida en base a la descripción y las referencias citadas en la misma, estamos anexando un pasaje del libro "Principles of Microbe and Cell Cultivation" del autor S. John Pirt ("Pirt"), el cual se cita en la página 70 del capítulo descriptivo originalmente presentado. Deseamos destacar que Pirt fue publicado en 1975 y que las técnicas que aquí se describen eran bien conocidas para una persona del oficio normalmente versada en la materia en el tiempo en que se realizó la invención. En las páginas 8-13 de Pirt, y particularmente en la sección 2.6 ("Effects on substrate concentration on growth rate"), hay una amplia discusión de la ecuación Monod, así como un gráfico ejemplar de la velocidad de crecimiento graficada como una función de la concentración del sustrato (véase Fig. 2.2 en la página 9), la cual se reproduce aquí abajo:

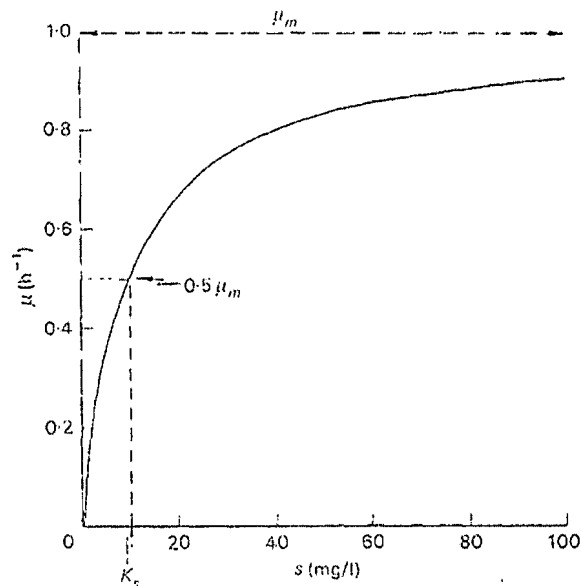


Fig. 2.2. Velocidad de Crecimiento específica (μ) gráfícada como una función de la concentración del sustrato (S) de acuerdo con la ecuación Monod $\mu = \mu_m S / (K_s + S)$, en donde $\mu_m = 1.0 \text{ h}^{-1}$ y $K_s = 10 \text{ mg/l}$. Nota, cuando $s = K_s$, $\mu = 0.5\mu_m$

Se destaca que no existen condiciones únicas y específicas para obtener dicha velocidad de crecimiento máxima, debido a que éstas están en función de la célula huésped bacteriana o fúngica y del sustrato empleado. No obstante, el empleo de la ecuación Monod permite determinar la cantidad de carbono necesaria para tener el 75% de la velocidad de crecimiento máxima.

A la luz de los argumentos anteriores, una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica podría determinar fácilmente las condiciones del cultivo para proveer 75% o

menos de la velocidad de crecimiento máxima de las células huésped. Por lo tanto, esta característica debe ser considerada como una característica esencial que distingue los métodos reclamados de los métodos que se describen en D1.

En consecuencia, las **reivindicaciones**, si resultan lo suficientemente novedosas, cumpliendo las exigencias dispuestas en los artículos 14 y 18 de la Decisión 484 de la Comunidad Andina y por tanto a ellas también debe ser extendido el privilegio de la patente otorgado.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, consideramos que la decisión contenida en la resolución, motivo de la actual impugnación, resulta equivocada e injusta, se puede establecer que dicha resolución de ninguna manera considera la importancia y el alcance del objeto de la solicitud en referencia, su Despacho tampoco considero la invención en su conjunto. La presente solicitud cumple con lo estipulado en la Decisión 486, y se refiere a una invención patentable a la luz de lo dispuesto por la mencionada norma comunitaria.

2. PETICIONES.-

a) Pretensión Principal.

De acuerdo a lo señalado en el transcurso de este recurso, solicito respetuosamente a su despacho, tener en cuenta los argumentos anteriormente propuestos y con base a ello, proceder a **REVOCAR PARCIALMENTE** la Resolución No. 71504 de 26 de noviembre de 2012 y su lugar proferir otra en la que se **OTORQUE TOTALMENTE** el privilegio de la patente de invención denominada **MÉTODO PARA EL ANCHO DE BANDA CONTROLADO POR RED PARA LA MEDICIÓN DE CELDAS VECINAS EN UN SISTEMA E-UTRAN.**

b) Pretensiones Subsidiarias.

- 1).- **REVOCAR** la Resolución No. 71504 de 26 de noviembre de 2012, y en su lugar proferir otra en la que otorguen las reivindicaciones parcialmente, todo de conformidad con los documentos que hacen parte esencial del trámite.
- 2).- **REVOCAR** la Resolución No. 71504 de 26 de noviembre de 2012, y en su lugar proferir otra en la que si su Despacho, no obstante la claridad de la invención, considera que es necesaria alguna precisión o profundidad, se requiera a mi representada con las explicaciones pertinentes, pues reiteramos que la invención solicitada encaja dentro de las normas vigentes, por lo tanto en aras de los principios de equidad y justicia deberá ser otorgada, como respetuosamente lo solicito.

3.- PRUEBAS.-

- 3.1. Todos y cada uno de los documentos que reposan en el expediente citado en la referencia.
- 3.2. Resolución No. 71504 de 26 de noviembre de 2012.
- 3.3. La actuación surtida.
- 3.4. Pasaje del libro "Principles of Microbe and Cell Cultivation" del autor S. John Pirt ("Pirt"), junto con su traducción al Castellano.

4.- FUNDAMENTOS DE DERECHO.-

Las disposiciones legales que invoco como fundamento para promover el presente recurso son los artículos 14, 14, 18, y 34 y demás aplicables de la Decisión 484 de la Comunidad Andina, en los artículos pertinentes del

Código Contencioso Administrativo, y en las demás disposiciones vigentes.

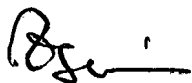
5.- OPORTUNIDAD.-

La Resolución recurrida fue notificada por fijación en lista el 4 de diciembre de 2012, por lo tanto me encuentro dentro de la debida oportunidad legal, consagrada en el Código Contencioso Administrativo.

4.- NOTIFICACIONES.-

Mí representada y el suscrito recibiremos notificaciones en la Secretaría de su Despacho o en mi Oficina de Abogado, situada en la Carrera 7 No. 74-44 de Bogotá.

Atentamente,



HUMBERTO RUBIO CAMACHO

C.C. 17'192.042 de Bogotá

**T.P. 50.007 Consejo Superior
de la Judicatura**

COD. 4134

S. John Pirt

**Principles of
Microbe and Cell
Cultivation**

Blackwell Scientific Publications
OXFORD LONDON EDINBURGH MELBOURNE

PRINCIPLES OF
MICROBE AND CELL
CULTIVATION

S. JOHN PIRT

Professor of Microbiology
Queen Elizabeth College
University of London

BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS
OXFORD LONDON EDINBURGH MELBOURNE

© 1975 Blackwell Scientific Publications
Osney Mead, Oxford OX2 0EL
85 Marylebone High Street, London W1M 3DE
9 Forrest Road, Edinburgh EH1 2QH
P.O. Box 9, North Balwyn, Victoria, Australia

All rights reserved. No part of this publication
may be reproduced, stored in a retrieval system,
or transmitted, in any form or by any means,
electronic, mechanical, photocopying, recording
or otherwise without the prior permission of
the copyright owner.

ISBN 0 632 08150 3 ✓

First published 1975

Published in the U.S.A. by
Halsted Press, a Division of
John Wiley & Sons, Inc.
New York

Set in 10 on 12 point Monotype Times New Roman

Printed in Great Britain by
William Clowes & Sons, Limited
London, Beccles and Colchester

Contents

Preface	ix
CHAPTER 1. Introduction	I
Nature of a microbial culture. Historical development	
CHAPTER 2. Parameters of growth and analysis of growth data	4
Parameters. Growth rate. Validity of exponential growth law. Growth yield. Metabolic quotient. Effect of substrate concentration on growth rate. Saturation constant (K_s) values. Definition of the lag period before growth. Limits to maximum biomass concentration	
CHAPTER 3. Estimation of biomass	15
Factors influencing choice of method. Mass and volume measurement. Mass of a cell component. Growth yields. Metabolic rates. Light scattering. Cell and organelle counts. Staining methods	
CHAPTER 4. Batch culture and plug-flow culture	22
Open and closed systems. Growth phases of a simple batch culture. Single point estimates of growth. Mathematical model of a simple batch culture. Variations in the growth curve of a simple batch culture. Plug-flow culture. Applications of plug-flow culture	
CHAPTER 5. Chemostat culture	29
History. Theory of the chemostat. Rate of output of biomass in a chemostat. Distribution of residence times in a chemostat. Deviations from chemostat theory. Duration of transient states after a step change in dilution rate. Special purposes of chemostat culture	
CHAPTER 6. Elaborations on the chemostat	42
Introduction. Turbidostat. Chemostat with feedback of biomass. Chemostats in series. Chemostats in series with biomass feedback	
CHAPTER 7. Death of cells in growing cultures	57
Definitions of dead and dormant cells. Death rate. Production of dead cells at the time of division. Effects of cell death on growth	

CHAPTER 2

Parameters of growth and analysis of growth data

2.1 Parameters

The qualitative observation of whether or not growth occurs in a culture is useful for many purposes. The further information obtained when the growth is measured quantitatively is often presented in the form of a graph of biomass against time. The data may be rendered more meaningful and concise if it is analysed in terms of the various growth parameters: specific growth rate or doubling time of the biomass, growth lag, growth yield, metabolic quotients for substrate utilization and product formation, substrate affinity and maximum biomass.

The growth parameters are defined with reference to the growth of a simple homogeneous batch culture. Such a system is supposed to consist of a well-mixed batch of inoculated medium. It is assumed that the mixing is adequate to disperse the biomass and that the medium is free from concentration gradients. A heterogeneous culture such as a colony growing on a surface clearly is more complex (Chapter 23).

2.2 Growth rate

2.2.1 Specific growth rate

The requisite conditions for growth of biomass in a culture are: (i) a viable inoculum, (ii) an energy source, (iii) nutrients to provide the essential materials from which the biomass is synthesized, (iv) absence of inhibitors which prevent growth, (v) suitable physicochemical conditions.

If all the requirements for growth are satisfied, then during an infinitely small time interval (dt) one expects the increase in biomass (dx) to be proportional to the amount (x) present and to the time interval; that is

$$dx = \mu x \cdot dt \tag{2.1}$$

hence

$$dx/dt = \mu x \tag{2.2}$$

The differential coefficient (dx/dt) expresses the population growth rate. The

parameter μ which represents the rate of growth per unit amount of biomass ($1/x$)(dx/dt), is termed the *specific growth rate* and has the dimension of reciprocal time ($1/t$). It is analogous to the compound interest rate on an investment—thus a specific growth rate of 0.1 h^{-1} is equivalent to a compound interest rate of 10% per hour.

When μ is constant, integration of Eqn 2.2 gives

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \tag{2.3}$$

where x_0 is the biomass when $t = 0$. The plot of $\ln x$ against time will be a straight line with slope, μ . If the logarithms are converted to the base 10 then Eqn 2.3 becomes

$$\log x = \frac{\mu t}{2.30} + \log x_0 \tag{2.4}$$

By putting Eqn 2.3 in the form

$$\ln (x/x_0) = \mu t \tag{2.5}$$

it follows that

$$x = x_0 e^{\mu t} \tag{2.6}$$

Growth which accords with this law is called constant exponential or logarithmic growth. The basic measure of the growth rate is the specific growth rate. The other measures which are given below can be related to the specific growth rate.

2.2.2 Biomass doubling time

The relation between specific growth rate and the doubling time (t_d) of the biomass is obtained from Eqn 2.5 by putting $x = 2x_0$ and $t = t_d$, hence

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu} \tag{2.7}$$

2.2.3 Degree of multiplication

The degree of multiplication is given by x/x_0 and is equal to $e^{\mu t}$ (see Eqn 2.6). Alternatively, if the biomass undergoes n doublings or generations, we can write

$$x/x_0 = 2^n \tag{2.8}$$

therefore

$$n = 3.32 \log (x/x_0) \tag{2.9}$$

Often in culture experiments it is useful to use an inoculum size which is 10% of the final biomass, n will then be 3.32.

2.2.4. Reciprocal doubling time

Since the number of doublings of the biomass in time, t , will be t/t_d we can write

$$x = x_0 2^{t/t_d} \quad 2.10$$

Taking logarithms to the base 2, Eqn 2.10 becomes

$$\log_2 x = \log_2 x_0 + t/t_d \quad 2.11$$

the slope of which is $1/t_d$, that is the reciprocal doubling time. Some workers have preferred to express growth rates in terms of $1/t_d$ rather than specific growth rate. However, μ seems preferable since it occurs in the fundamental growth law (Eqn 2.2), and the convenience of this convention is shown by its universal adoption in the theory of continuous flow culture. It is important to make clear which convention is being followed.

2.3 Validity of exponential growth law

The law of constant exponential growth must be followed when the environmental conditions are constant and the constitution of the biomass remains constant. Conversely, if the growth does not accord with the law, it follows that either one or both of the two qualifying conditions are not being met. Bacterial and yeast cultures are well known to have exponential growth phases but the law is universal for all procaryotes and eucaryotes provided that the above stated conditions are met. The law has been demonstrated to apply to protozoan cultures (Phelps, 1936) and to animal cells in culture (Birch & Pirt, 1970). The applicability of the exponential growth law to mould cultures in homogeneous submerged culture has been established (Pirt & Callow, 1960). Growth of filamentous fungi can easily show divergence from the exponential either because they form pellets in which the biomass is not homogeneously dispersed in the medium or because oxygen supply becomes growth-limiting. Probably the most common first cause of failure to maintain constant exponential growth is a change in the environment. This is inevitable sooner or later in a batch culture. Further it is probable that any change in the environment will subsequently induce a change in the constitution of the biomass. A simple model of growing biomass indicates that, in response to a changed environment, the proportions of the various components of the biomass will automatically be adjusted so as to maximize the growth rate (Chapter 24).

2.4 Growth yield

The growth yield is defined by the quotient

$$\Delta x / \Delta s = Y \quad 2.12$$

where Δx is the increase in biomass consequent on utilization of the amount Δs of substrate. More rigorously the growth yield is expressed by the limit of $\Delta x / \Delta s$ as $\Delta s \rightarrow 0$, that is

$$Y = dx/ds \quad 2.13$$

It should be noticed that if x and s are the biomass and substrate concentrations respectively, then $Y = -dx/ds$, the negative sign being introduced because x and s vary in opposite senses.

The growth yield is important as a means of expressing the quantitative nutrient requirement of an organism. As such the growth yield was used by Raulin (1869) to express the nutrient requirements of a fungus; subsequent workers in mycology have tended to use the reciprocal of Y called the *economic coefficient*. Monod (1942) first showed that in bacterial cultures, when the conditions are maintained constant, the growth yield is a constant, reproducible quantity. Thus if x_0 and s_0 are the initial biomass and substrate concentrations respectively and x and s are the corresponding concentrations during the growth of the culture

$$x - x_0 = Y(s_0 - s) \quad 2.14$$

For a growth-limiting substrate, when the culture has reached its maximum biomass (x_m), $s \approx 0$ and we may write

$$x_m - x_0 = Ys_0 \quad 2.15$$

Hence, for a growth-limiting substrate, a plot of x_m against s_0 should be a straight line with slope, Y . Figure 2.1 is an example of the application of this relation to determine the growth yield of cultured animal (mouse) cells for choline.

2.5 Metabolic quotient

The rate of consumption of a substrate in a culture at a particular moment is given by

$$ds/dt = qx \quad 2.16$$

where x is the biomass and the coefficient q is known as a metabolic quotient, or specific metabolic rate. Well-known examples are q_{O_2} and q_{glucose} for oxygen and glucose consumption respectively. The metabolic quotient is analogous to an enzyme activity. If the biomass constitution is constant and the environment is constant then q must be constant.

We can write for the substrate consumed for growth in the small time interval dt

$$ds = \frac{\mu x}{Y} \cdot dt \quad 2.17$$

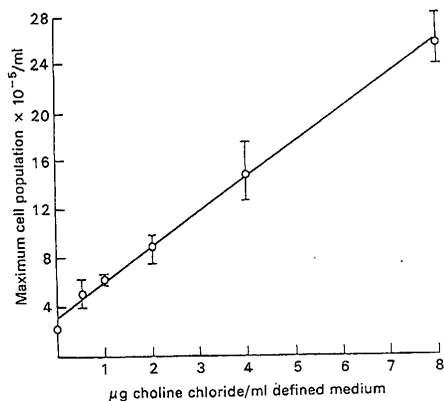


FIG. 2.1 The effect of choline concentration on the growth of mouse LS cells in culture. The points on the graph are the mean values; vertical lines represent the ranges of the results. (From Birch & Pirt, 1969)

hence

$$ds/dt = \mu x/Y \quad 2.18$$

and comparison of Eqn 2.18 and 2.16 shows that

$$q = \mu/Y \quad 2.19$$

Equation 2.19 is used to estimate the demands for substrates (especially oxygen) at different growth rates.

The use of metabolic quotients to express rates of product formation is considered in Chapter 16.

2.6 Effect of substrate concentration on growth rate

The occurrence of constant exponential growth in batch cultures shows that growth rate may be virtually unaffected by substrate concentration over a wide range; that is the growth process shows zero order kinetics. We might expect that substrate consumption would follow enzyme kinetics so that if s is the substrate concentration and q is the metabolic quotient

$$q = q_m s/(s + K_s) \quad 2.20$$

where K_s , called the *saturation constant*, is equivalent to a Michaelis-Menten

constant and q_m is the maximum value of q obtained when $s \gg K_s$. If we make the substitutions, $q = \mu/Y$ and $q_m = \mu_m/Y$, then it follows that

$$\mu = \mu_m s/(s + K_s) \quad 2.21$$

Equation 2.21 is often termed the Monod relation since Monod (1942) first showed empirically that the expression accorded well with the relation of bacterial growth rate to substrate concentration (Fig. 2.2). The K_s value is in-

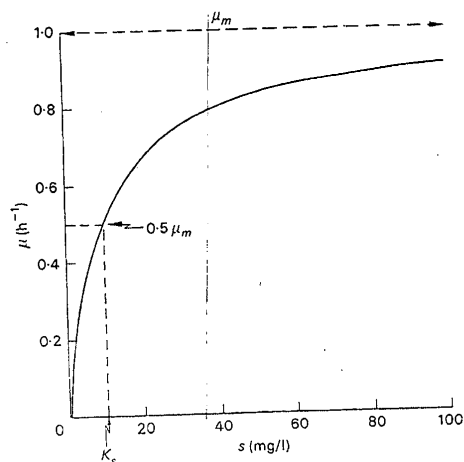


FIG. 2.2 Specific growth rate (μ) plotted as a function of substrate concentration (s) according to the Monod equation $\mu = \mu_m s/(s + K_s)$ where $\mu_m = 1.0 \text{ h}^{-1}$ and $K_s = 10 \text{ mg/l}$. Note, When $s = K_s$, $\mu = 0.5 \mu_m$.

versely related to the affinity of the organism for the substrate. Rearranging Eqn 2.21 we obtain

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{s\mu_m} + \frac{1}{\mu_m} \quad 2.22$$

hence a plot of $1/\mu$ against $1/s$ should give a straight line with an intercept on the abscissa at $-1/K_s$, and an intercept on the ordinate at $1/\mu_m$ (Fig. 2.3). The linearity of the double reciprocal plot forms a convenient test of the validity of the hyperbolic relation.

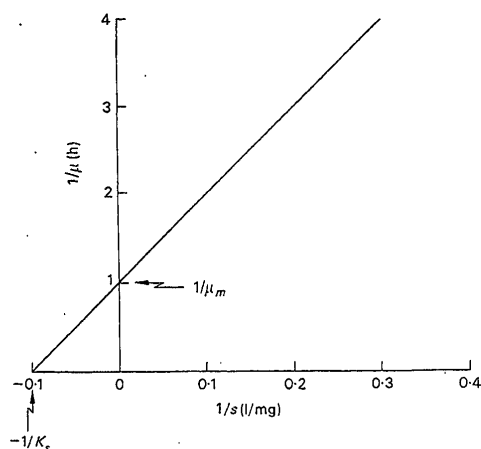


FIG. 2.3 Reciprocal plot of data for Fig. 2.2.

2.7 Saturation constant (K_s) values

Few determinations of K_s values have been made, because the values are extremely low—often below the sensitivity of chemical assay methods—and unless the sampling or assay is instantaneous the substrate level may fall substantially before the sample is assayed. The methods used to measure the values of s at different growth rates are as follows: (i) instantaneous measurement of the growth-limiting substrate in a chemostat culture at different growth rates as for oxygen (Johnson, 1967b); (ii) measurement of initial growth rates with different substrate concentrations in batch cultures; (iii) measurement of the growth rates at the end of a batch culture (Monod, 1942) and estimation of the substrate concentration from the biomass by means of Eqn 2.14; (iv) measurement of the critical dilution rates in chemostat cultures with different concentrations of the growth-limiting substrate in the feed medium (Dean & Rogers, 1967); (v) the steady state method of Button (1969), illustrated in Fig. 2.4.

Table 2.1 shows that the K_s values for carbon and energy sources are generally about 10^{-5} M. The values for phosphate, potassium and magnesium ions also are about 10^{-5} M and the value for oxygen is 10^{-6} to 10^{-5} M. The values for amino acids and vitamins are lower by one or more orders of

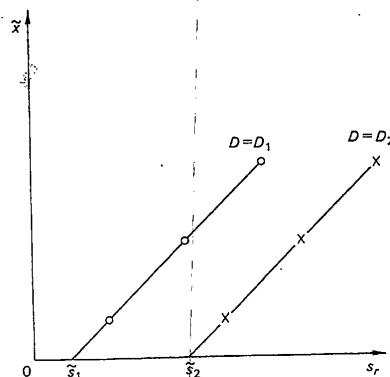


FIG. 2.4 Method of Button (1969) to determine the concentration of growth-limiting substrate ($\bar{s}$) at a given specific growth rate ($\mu = D$) in a chemostat. Each straight line is a plot of the steady-state biomass ($\bar{x}$) at a given dilution rate with different concentrations (s_r) of growth-limiting substrate in the feed medium. The straight line is represented by $\bar{x} = Y(s_r - \bar{s})$ where Y is the growth yield. On extrapolation of the line to $\bar{x} = 0$ we have $s_r = \bar{s}$.

magnitude. No K_s values for the trace elements are available and the validity of the Monod relation for trace element effects on growth rate has not been established. The K_s values are of the same order for both procaryotes and eucaryotes. For the high polymer starch it appears that, on a molar basis, the K_s value for *K. aerogenes* is about the same as for the monomer (Hernandez & Pirt, 1975). For the bacterial substrate of the protozoan *Tetrahymena* (Table 2.1) the K_s value on a weight basis is comparable to that of soluble small molecules.

In general, the results follow the Monod relation (Eqn 2.21). However, Shehata & Marr (1971) found that deviations from the Monod relation occur at the higher growth rates which, they suggested, indicates that the organism's affinity for the growth-limiting substrate varies with the growth rate.

2.8 Definition of the lag period before growth

There is often a lag before the specific growth rate of the biomass reaches its maximum value. The duration of this lag (L) is, for most purposes, conveniently defined by the method of Lodge & Hinshelwood (1943). In the plot of the

TABLE 2.1 Saturation constants (K_s values) for growth of organisms on diverse substrates

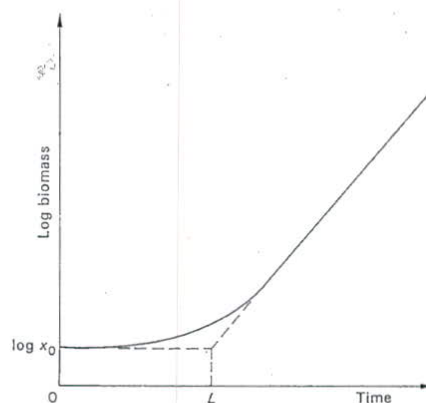
Organism (genus)	Substrate	K_s		Reference
		(mg/l)	(10^{-3} M)	
<i>Escherichia</i>	glucose	6.8×10^{-2}	3.8×10^{-2}	Shehata & Marr (1971)†
Unknown bacteria	phenol	9.0×10^{-1}	1.0	Jones <i>et al.</i> (1973)
<i>Escherichia</i>	mannitol	2.0	1.1	Monod (1942)
<i>Escherichia</i>	glucose	4.0	2.2	Monod (1942)
<i>Aspergillus</i>	glucose	5.0	2.8	Pirt (1973)
<i>Candida</i>	glycerol	4.5	4.9	Button & Garver (1966)
<i>Tetrahymena</i>	bacteria	12.0	—	Curds (1971)
<i>Escherichia</i>	lactose	20.0	5.9	Monod (1942)
<i>Saccharomyces</i>	glucose	25.0	14.0	Pirt & Kurowski (1970)
<i>Pseudomonas</i>	methanol	0.7	2.0	Harrison (1973)
<i>Pseudomonas</i>	methane	0.4	2.6	Harrison (1973)
<i>Klebsiella</i>	carbon dioxide	0.4	9×10^{-1}	Section 8.8
<i>Escherichia</i>	phosphate ions	1.6	1.7	Shehata & Marr (1971)†
<i>Klebsiella</i>	magnesium ions	5.6×10^{-1}	2.3	Dean & Rogers (1967)
<i>Klebsiella</i>	potassium ions	3.9×10^{-1}	1.0	Dean & Rogers (1967)
<i>Klebsiella</i>	sulphate ions	2.7	2.8×10^{-1}	Dean & Rogers (1967)
<i>Candida</i>	oxygen	4.5×10^{-1}	1.4	Button & Garver (1966)
<i>Candida</i>	oxygen	4.2×10^{-2}	1.3×10^{-1}	Johnsen (1967)
<i>Aspergillus</i> *	arginine	5.0×10^{-1}	2.9×10^{-1}	Pirt (1973)
<i>Escherichia</i> *	tryptophan	1.1×10^{-3}	5.4×10^{-3}	Novick (1958)
<i>Escherichia</i> *	tryptophan	4.9×10^{-4}	3.4×10^{-3}	Shehata & Marr (1971)
<i>Cryptococcus</i>	thiamine	1.4×10^{-7}	4.7×10^{-10}	Button (1969)

* Amino acid auxotroph

† The lower of the two values found

biomass logarithm (Fig. 2.5) the straight line is extrapolated to the initial mass level and the intercept on the time axis is the lag period, L . The slope of the culture is represented by

$$\ln x = \mu(t-L) + \ln x_0 \quad 2.23$$

Fig. 2.5 Definition of lag period, L .

2.9 Limits to maximum biomass concentration

The maximum density of biomass of any kind which can be reached in a given medium is determined by one of the following four conditions: (i) the amount of growth-limiting substrate supplied, (ii) the accumulation of an inhibitory product, (iii) the maximum packing density of the biomass, (iv) cell death. Bail (1929) proposed that the maximum bacterial density or 'M' concentration in a culture was determined by the requirement for *lebensraum* or biological space. This vague concept implied that the biological space exceeded the physical space occupied by the organisms. However, it is clear that the M concentrations suggested by Bail can be accounted for by either nutrient (especially oxygen) limitation or an inhibitory product in the cultures. Bail's idea is of historical interest since it held sway for a number of years among bacteriologists and we can see a parallel to it in the concept of 'contact inhibition' of growth in animal tissue cell cultures. Cells said to be subject to contact inhibition have been found to grow indefinitely in multilayer form when supplied continuously with nutrients (Kause & Miedema, 1965), also

Provided that there is no inhibition, the population remains viable, and there is an unlimited supply of nutrients, which might be arranged by diffusion

through a semi-permeable membrane, then the only limit to biomass concentration will be the maximum packing density of the organisms or cells in the biomass. This ultimate state is found in plant and animal tissues. The maximum packing density of the cells (number/cm³) is given by $10^{12}/v$ where v = individual cell volume in μm^3 . Some maximum packing densities calculated from this formula for various organisms are given in Table 2.2. These maximum possible population densities correspond to dry weights of about 10% (w/v).

TABLE 2.2 Maximum packing densities* of some microorganisms in number per cm³

Organism	Shape assumed	Radius (μm)	Length (μm)	v (μm^3)	Maximum (number/cm ³)
<i>Serratia marcescens</i> †	rod	0.5	1.7	1.34	7.5×10^{11}
<i>Klebsiella aerogenes</i> †	rod	0.86	5.4	12.5	8.0×10^{10}
<i>Bacillus megaterium</i> †	rod	1.2	7.6	34.4	2.9×10^{10}
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	sphere	3.5	—	179	5.6×10^9
Mouse L cells	sphere	10.0	—	4190	2.4×10^8

* Calculated from the formula, $10^{12}/v$, where v = cell volume in μm^3

† Dimensions from Powell (1963)

Estimation of biomass

3.1 Factors influencing choice of method

Biomass is a general term used to refer to the organism in culture. The alternative terms, organisms, cells, mycelium and plasmodium, imply special kinds of organization of the biomass. The biomass parameter measures the extent of growth and it enters into certain important derived parameters such as growth yields and metabolic quotients. Despite the fundamental importance of biomass, published studies on microbial cultivation often have not included an explicit statement of the amount of biomass formed, which seriously limits the quantitative interpretation of the results.

The methods used to measure biomass are based on eight types of measurements: mass, volume or linear extent, mass of a biomass component, mass of substrate consumed or product formed, metabolic rates, light scattering, cell and organelle counts, staining methods.

Choice of the method of measuring biomass is a crucial decision to make in the approach to a culture problem and often the limitations of the methods make the decision difficult. The factors which influence the choice are: (i) the properties of the biomass, (ii) the properties of the culture medium, (iii) the accuracy required, (iv) the sensitivity required, (v) the required speed of measurement.

Properties of the biomass which affect the choice are: whether it is filamentous or particulate, how easily it can be separated from the medium, and the age of the biomass or its growth rate. Separation of bacteria from stable suspensions by centrifugation can be tedious; it may be possible in the future to facilitate this step by means of chemical treatment to precipitate or flocculate the bacteria.

Properties of the medium which may affect the method of biomass assay include the viscosity, colour, presence of solids or dissolved matter which reacts like biomass in the assay, presence of storage products such as glycogen and poly- β -hydroxybutyrate in the biomass. The methods differ greatly in their sensitivity, speed and accuracy. A comparison of these attributes of the more commonly used methods for bacterial biomass estimation is given in Table 3.1. The least sensitive method is dry weight measurement and the most sensitive is a cell count.

CAPÍTULO 2

PARAMETROS DE CRECIMIENTO Y ANALISIS DE DATOS DE CRECIMIENTO

2. I Parámetros

La observación cualitativa de si se presenta crecimiento
5 o no en un cultivo es útil para muchos propósitos. La
información adicional obtenida cuando el crecimiento es
medido cuantitativamente es presentada frecuentemente en
forma de una gráfica de biomasa contra el tiempo. Los datos
10 pueden ser presentados de manera más significativa y concisa
sin son analizados en términos de los varios parámetros de
crecimiento: velocidad de crecimiento específica o tiempo de
duplicación de la biomasa, retardo de crecimiento,
rendimiento de crecimiento, cocientes metabólicos para
utilización de sustrato y formación de producto, afinidad de
15 sustrato y biomasa máxima.

Los parámetros de crecimiento son definidos con
referencia al crecimiento de un simple cultivo por lotes
homogéneo. Se supone que tal sistema consiste de un lote bien
mezclado del medio inoculado. Se supone que la mezcla es
20 apropiada para dispersar la biomasa y que el medio está libre
de gradientes de concentración. Un cultivo heterogéneo, tal
como una colonia que crece sobre una superficie claramente es
más complejo (Capítulo 23).

2.2 Velocidad de crecimiento

2.2. I Velocidad de crecimiento específico

Las condiciones requeridas para el crecimiento de biomasa en un cultivo son: (i) un inoculo viable, (ii) una fuente de energía, (iii) nutrientes para proveer los materiales esenciales de los cuales la biomasa es sintetizada, (iv) ausencia de inhibidores que impiden el crecimiento, (v) condiciones fisicoquímicas apropiadas.

Si todos los requerimientos para el crecimiento son satisfechos, entonces durante un intervalo de tiempo infinitamente pequeño (dt) se espera que el incremento de biomasa (dx) sea proporcional a la cantidad (x) presente y al intervalo de tiempo; esto es

$$dx = \mu x \cdot dt \quad 2.1$$

de aquí

$$dx/dt = \mu x \quad 2.2$$

El coeficiente diferencial (dx/dt) expresa la velocidad de crecimiento de la población. El parámetro μ que representa la velocidad de crecimiento por cantidad unitaria de biomasa ($1/x$) (dx/dt), es denominado la velocidad de crecimiento específica y tiene la dimensión de recíproco de tiempo ($1/t$). es análogo a la velocidad de interés compuesto en una inversión-así de velocidad de crecimiento específica de $0.1h^{-1}$ es equivalente a la velocidad de interés al compuesto de 10%

por hora.

Cuando μ es constante, la integración de la ecuación 2.2 da

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad 2.3$$

5 en donde x_0 es la biomasa cuando $t = 0$. La grafica de $\ln$ de x contra el tiempo será una línea recta contendiente, μ . Si los logaritmos son convertidos a base 10, entonces la ecuación 2.3 se convierte en

$$10 \quad 2.4$$

Al poner la ecuación 2.3 en forma

$$\ln (x/x_0) = \mu t \quad 2.5$$

15 se sigue que

$$x = x_0 e^{\mu t} \quad 2.6$$

El crecimiento que está de acuerdo con esta ley es llamado crecimiento exponencial constante o crecimiento
20 logarítmico-aritmético. La medida básica de la velocidad de crecimiento es la velocidad de crecimiento específica. Las otras medidas que son dadas a continuación se pueden relacionar con la velocidad de crecimiento específica.

25

2.2.2 Tiempo de duplicación de biomasa

La relación entre velocidad de crecimiento específica y el tiempo de duplicación (t_d) de la biomasa es obtenida de la ecuación 2.5 al poner $x = 2x_0$ y $t = t_d$, de aquí

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu} \quad 2.7$$

10 2.2.3 Grado de multiplicación

El grado de multiplicación es dado por x/x_0 y es igual a $e^{\mu t}$ (véase ecuación 2.6). Alternativamente, si la biomasa sufre n duplicaciones o generaciones se puede escribir

$$\frac{x}{x_0} = 2^n \quad 2.8$$

15 por consiguiente

$$n = 3.32 \log \left(\frac{x}{x_0} \right) \quad 2.9$$

Frecuentemente en experimentos de cultivo, es útil usar un tamaño de inóculo que es el 10% de la biomasa final, n será entonces 3.32.

2.2.4 Tiempo de duplicación recíproco

Puesto que el número de duplicaciones en la biomasa en el tiempo, t , será t/t_d entonces se puede escribir

25

$$x = x_0 2^{\frac{t}{t_d}}$$

2.10

Tomando logaritmos a la base 2, la ecuación 2.10 se convierte en

$$\log_2 x = \log_2 x_0 + \frac{t}{t_d}$$

5 La pendiente de la cual es $1/t_d$, que es el tiempo de duplicación recíproco. Algunos trabajadores han preferido expresar las velocidades de crecimiento en términos de $1/t_d$ en lugar de la velocidad de crecimiento específica, sin embargo μ parece ser preferible puesto que ocurre en la ley
10 de crecimiento fundamental (ecuación 2.2) y la conveniencia de esta convención es mostrada por su adopción universal en la teoría de cultivo de flujo continuo. Es importante hacer claro cuál convención es seguida.

15 2.3 Validez de la ley de crecimiento exponencial

La ley de crecimiento exponencial constante debe ser seguida cuando las condiciones ambientales son constantes y la constitución de la biomasa permanece constante. Inversamente, si el crecimiento no está de acuerdo con la
20 ley, se sigue ya sea una u otra o ambas de las dos condiciones de calificación no se cumplen. Es bien conocido que los cultivos bacterianos y de levadura tienen fases de crecimiento exponencial pero la ley es universal para todos los procariontes y eucariontes a condición de que se
25 satisfagan las condiciones afirmadas anteriormente. Se ha

demostrado que la ley se aplica a cultivos de protozoarios (Phelps, 1936) y a células de animales en cultivo (Birch y Pirt, 1970). La posibilidad de aplicación de la ley de crecimiento exponencial a cultivos de hongos en cultivo sumergido homogéneo ha sido establecida (Pirt y Callow, 1960). El crecimiento de hongos filamentosos pueden fácilmente mostrar divergencia del exponencial ya sea debido a que forma pelotillas en las cuales la biomasa no está dispersada homogéneamente en el medio o debido a que el suministro de oxígeno se vuelve limitante del crecimiento. Probablemente la primera causa de falla más común para mantener el crecimiento exponencial constante es el cambio en el medio ambiente. Esto es inevitable más pronto o más tarde en un cultivo por lotes. Además, es probable que cualquier cambio en el medio ambiente inducirá subsecuentemente un cambio en la constitución de la biomasa. Un modelo simple de biomasa creciente indica que, en respuesta al medio ambiente cambiado, las proporciones de los varios componentes de la biomasa serán ajustadas automáticamente para maximizar la velocidad de crecimiento (Capítulo 24).

2.4 Rendimiento de cultivo

El rendimiento de cultivo es definido por el cociente

$$\frac{\Delta x}{\Delta s} = Y \quad 2.12$$

25

en donde Δx es el incremento de biomasa consecuente en la utilización de la cantidad Δs del sustrato. Mas rigurosamente, el rendimiento de cultivo es expresado por el límite de $\Delta x / \Delta s$ a medida que $\Delta s \rightarrow 0$, esto es

5

$$Y = \frac{dx}{ds} \quad 2.13$$

Se debe notar que si x y s son las concentraciones de biomasa y sustrato respectivamente, entonces $Y = -dx/ds$, el signo negativo es introducido debido a que x y s varían en
10 sentidos opuestos.

El rendimiento de cultivo es importante como medio para expresar el requerimiento de nutrientes cuantitativo de un organismo. Como tal, el rendimiento de cultivo fue usado por Raulin (1986) para expresar los requerimientos de nutrientes
15 de un hongo; trabajadores subsecuentes en micología han tendido a usar el recíproco de Y llamado el coeficiente económico. Monod (1942) mostro por primera vez que en cultivos bacterianos, cuando las condiciones son mantenidas constantes, el rendimiento de cultivo es una cantidad
20 constante reproducible. Así, si x_0 y s_0 son las concentraciones de biomasa y sustrato iniciales, respectivamente y x y s son las concentraciones correspondientes durante el crecimiento del cultivo

$$x - x_0 = Y(S_0 - S) \quad 2.14$$

25 Para un sustrato limitante del crecimiento, cuando el

cultivo ha llegado a su biomasa máxima (x_m), $s \approx 0$ y se puede escribir

$$x_m - x_0 = Ys_0 \quad 2.15$$

De aquí, para un sustrato limitante del crecimiento, una gráfica de x_m contra s_0 debe ser una línea recta con pendiente, Y . la Figura 2.1 es un ejemplo de la aplicación de esta relación para determinar el rendimiento de cultivo de células de animales cultivadas (ratón) para colina.

10

2.5 Cociente metabólico

La velocidad del consumo de un sustrato en un cultivo en un momento particular es dado por

$$ds \frac{dx}{dt} = qx \quad 2.16$$

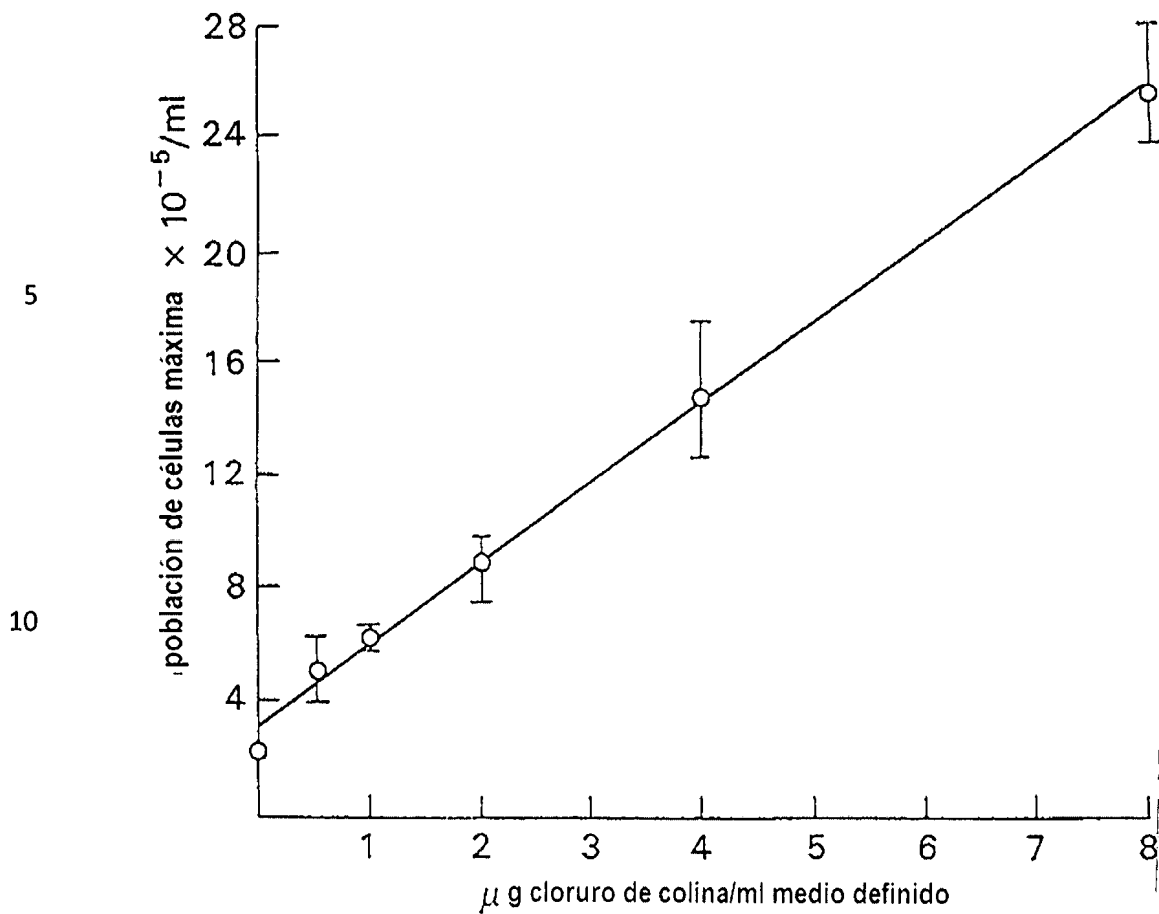
en donde x es la biomasa y el coeficiente q es conocido como cociente metabólico o velocidad metabólica específica. Ejemplos bien conocidos son q_{O_2} y $q_{glucosa}$ para el consumo de oxígeno y glucosa, respectivamente. El cociente metabólico es análogo a la actividad enzimática. Si la constitución de biomasa es constante y el medio ambiente es constante entonces q debe ser constante.

20

Se puede escribir para el sustrato consumido para el cultivo en el intervalo de tiempo pequeño dt

$$ds = \frac{\mu x}{Y} . dt \quad 2.17$$

25



15

Figura 2.1 El efecto de concentración de colina sobre el crecimiento de células LS de ratón en cultivo. Los puntos en la gráfica son los valores medios; las líneas verticales representan los intervalos de los resultados (De Birch y

20 Pirt, 1969).

de aquí

$$ds \frac{dx}{dt} = \frac{\mu x}{Y} \quad 2.18$$

y la comparación de la ecuación 2.18 y 2.16 muestra que

$$q = \frac{\mu}{Y} \quad 2.19$$

25

La ecuación 2.19 es usada para estimar las demandas para

sustratos (especialmente oxígeno) a diferentes velocidades de crecimiento.

El uso de cocientes metabólicos para expresar velocidades de formación de producto es considerado en el
5 Capítulo 16.

2.6 Efecto de concentración de sustrato sobre la velocidad del crecimiento

La presencia de crecimiento exponencial constante en
10 cultivos por lotes muestra que la velocidad de crecimiento puede estar virtualmente sin afectar por la concentración del sustrato en un amplio intervalo; esto es, el proceso de crecimiento muestra cinética de orden cero. Se podría esperar que el consumo de sustrato siguiera cinética enzimática de
15 tal manera que si s es la concentración del sustrato y q es el cociente metabólico

$$q = \frac{q_m s}{s + K_s} \quad 2.20$$

20 en donde K_s , llamada la constante de saturación es equivalente a la constante de Michaelis-Menten y q_m es el valor máximo de q obtenido cuando $s \gg K_s$. si se hacen las sustituciones, $q = \mu/Y$ y $q_m = \mu_m/Y$, entonces se sigue que

$$\mu = \mu_m \frac{s}{s + K_s} \quad 2.21$$

La ecuación 2.21 es denominada frecuentemente la relación de Monod, puesto que Monod (1942) mostro por primera vez empíricamente que la expresión estaba bien de acuerdo con la relación de velocidad de crecimiento bacteriano a la concentración del sustrato (Figura 2.2). El valor de K_s es inversamente relacionado a la afinidad del organismo para el sustrato. Rearreglando la ecuación 2.21 se obtiene

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{S\mu_m} + \frac{1}{\mu_m}$$

De aquí, una gráfica de $1/\mu$ contra $1/S$ debe dar una línea recta con una intersección en la abscisa a $1/K_s$, y la intersección en la ordinaria $1/\mu_m$ (Figura 2.3). La linealidad de la gráfica de doble recíproco forma una prueba conveniente de la validez de la relación hiperbólica.

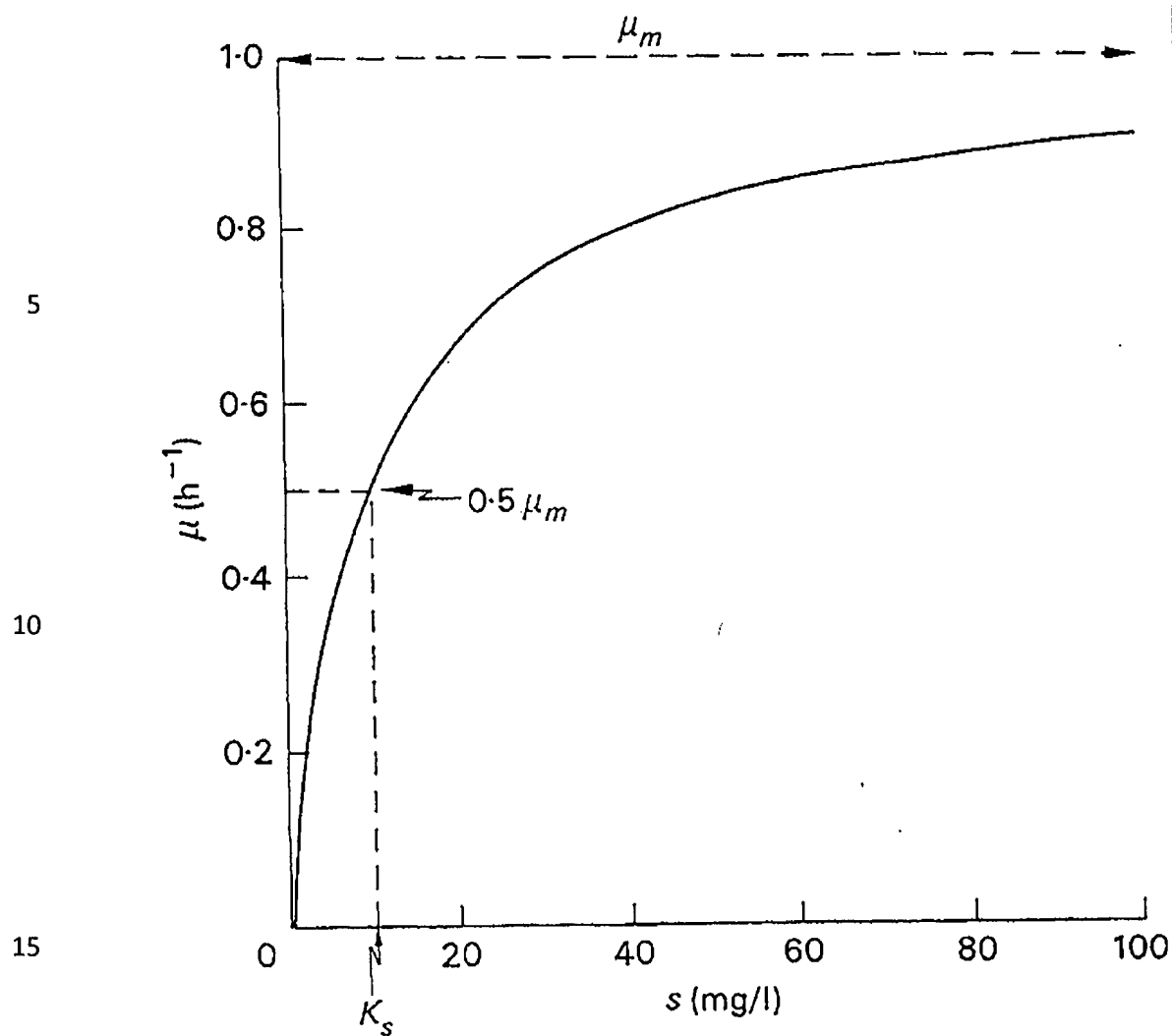


Figura 2.2 Velocidad de crecimiento específica (μ) graficada como función de concentración de sustrato (s) de acuerdo con la ecuación de Monod $\mu = \mu_m s / (s + K_s)$ en donde $\mu_m = 1.0 \text{ h}^{-1}$ y $K_s = 10 \text{ mg/l}$. Nótese que cuando $s = K_s$, $\mu = 0.5 \mu_m$.

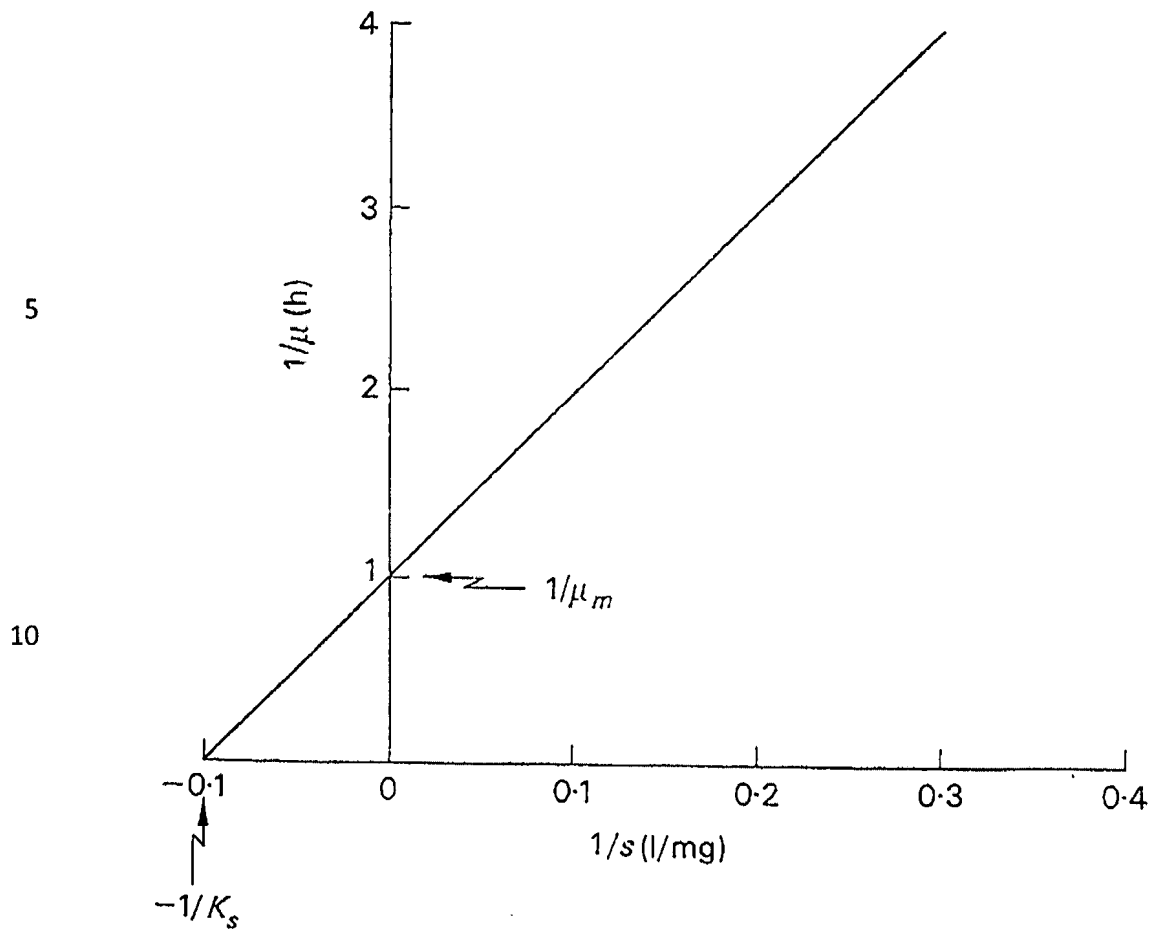


Fig. 2.3 Gráfica recíproca de datos para figura 2.2

2.7 Valores de constante de saturación (K_s)

Pocas determinaciones de valores de K_s se han hecho, debido a que los valores son extremadamente bajos, frecuentemente debajo de la sensibilidad de los métodos de análisis químicos y a no ser que la toma de muestras o análisis sea instantánea, el nivel de sustrato puede caer sustancialmente antes de que la muestra sea analizada. Los métodos usados para medir los valores de s a diferentes velocidades de crecimiento son como sigue: (i) medición

instantánea del sustrato limitante de crecimiento en un cultivo quimiostático a diferentes velocidades de crecimiento como para oxígeno (Johnson, 1967b); (ii) medición de velocidades de crecimiento iniciales con diferentes concentraciones de sustrato en cultivos por lotes; (iii) medición de las velocidades de crecimiento al final de un cultivo por lotes (Monod, 1942) y estimación de la concentración del sustrato de la biomasa por medio de la ecuación 2.14; (iv) medición de las velocidades de dilución críticas en cultivos quimiostáticos con diferentes concentraciones del sustrato limitante de crecimiento en el medio de alimentación (Dean y Rogers, 1967); (v) el método de estado estable de Button (1969), ilustrado en la Figura 2.4.

15

20

25

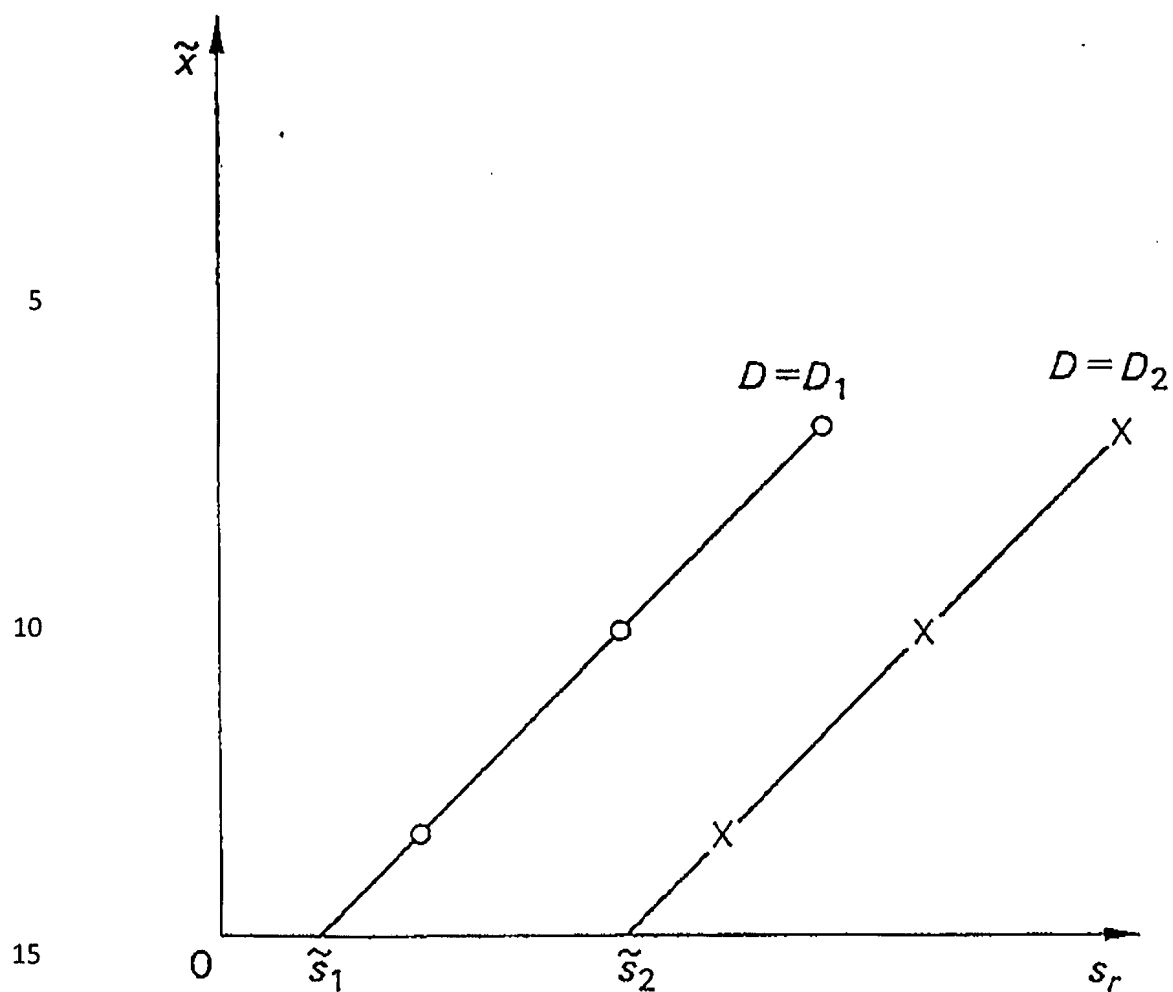


Figura 2.4 Método de Button (1969) para determinar la concentración del sustrato limitante de crecimiento ($\bar{s}$) a una velocidad de crecimiento específica dada ($\mu = D$) en un quimiostato. Cada línea recta es una gráfica de la biomasa de estado estable ($\bar{x}$) a una velocidad de dilución dada con diferentes concentraciones (s_r) del sustrato limitante del crecimiento en el medio de alimentación. La línea recta es representada por $\bar{x} = Y(s_r - \bar{s})$ en donde Y es el rendimiento de cultivo. En la extrapolación de la línea $\bar{x} = 0$ se tiene $s_r = \bar{s}$.

La Tabla 2.1 muestra que los valores de K_s para carbono y fuentes de energía son en general alrededor de 10^{-5} M. los valores para iones fosfato, potasio y magnesio también son de
5 alrededor de 10^{-5} M y el valor para oxígeno es 10^{-6} a 10^{-5} M. los valores para aminoácidos y vitaminas son más bajos por uno o más ordenes de magnitud. Ningún valor de K_s para los elementos en trazas está disponible y si la validez de la relación de Monod para efectos de elementos en trazas sobre
10 la velocidad de crecimiento no ha sido establecida. Los valores de K_s son del mismo orden tanto para procariontes como eucariontes. Para el polímero superior almidón se aprecia que, en una base molar, el valor de K_s para K. aerogenes es alrededor del mismo como para el monómero
15 (Hernández y Pirt, 1975). Para el sustrato bacteriano del protozoario Tetrahymena (Tabla 2.1) el valor de K_s en una base en peso es comparable a aquel de moléculas pequeñas solubles.

En general, los resultados siguen la relación de Monod
20 (Ecuación 2.21). Sin embargo, Shehata y Marr (1971) encontraron que se presentan desviaciones de la relación de Monod a las velocidades de crecimiento más altas que, sugirieron indican la afinidad de organismos por el sustrato limitante del crecimiento varia con la velocidad de
25 crecimiento.

2.8 Definición del periodo de retardo antes del crecimiento

Hay frecuentemente un retardo antes de que la velocidad de crecimiento específica de la biomasa alcance su valor máximo. La duración de este retardo (L) es para la mayoría de los propósitos, definido convenientemente por el método de Lodge e Hinshelwood (1943). En la gráfica del logaritmo de biomasa (Figura 2.5) la línea recta es extrapolada al nivel de biomasa inicial y la intersección en el eje del tiempo es tomado como L. De aquí, el crecimiento es representado por

$$\ln x = \mu (t - L) + \ln x_0 \quad 2.23$$

Tabla 2.1 Constantes de saturación (valores Ks) para el crecimiento de organismos sobre diversos sustratos

	Organismo (genero)	Sustrato	K _s		Referencia
			(mg/l)	(10 ⁻⁵ M)	
5	<i>Escherichia</i>	Glucosa	6.8x10 ⁻²	3.8x10 ⁻²	Shehata y Marr (1971)
	Bacteria desconocida	Fenol	9.0x10 ⁻¹	1.0	Jones et al. (1973)
	<i>Escherichia</i>	Manitol	2.0	1.1	Monod (1942)
	<i>Escherichia</i>	Glucosa	4.0	2.2	Monod (1942)
	<i>Aspergillus</i>	Glucosa	5.0	2.8	Pirt (1973)
10	<i>Cándida</i>	Glicerol	4.5	4.9	Button y Garver (1966)
	<i>Tetrahymena</i>	Bacteria	12.0	-	Curds (1971)
	<i>Escherichia</i>	Lactosa	20.0	5.9	Monod (1942)
	<i>Saccharomycès</i>	Glucosa	25.0	14.0	Pirt y Kurowski (1970)
	<i>Pseudomonas</i>	Metanol	0.7	2.0	Harrison (1973)
	<i>Pseudomonas</i>	Metano	0.4	2.6	Harrison (1973)
15	<i>Klebsiella</i>	Dióxido de carbono	0.4	9x10 ⁻¹	Sección 8.8
	<i>Escherichia</i>	Iones de fosfato	1.6	1.7	Shehata y Marr (1971)
	<i>Klebsiella</i>	Iones de magnesio	5.6x10 ⁻¹	2.3	Dean y Rogers (1967)
	<i>Klebsiella</i>	Iones de potasio	3.9x10 ⁻¹	1.0	Dean y Rogers (1967)
20	<i>Klebsiella</i>	Iones de sulfato	2.7	2.8x10 ⁻¹	Dean y Rogers (1967)
	<i>Cándida</i>	Oxigeno	4.5x10 ⁻¹	1.4	Button y Garver (1966)
	<i>Cándida</i>	Oxigeno	4.2x10 ⁻²	1.3x10 ⁻¹	Johnson (1967)
	<i>Aspergillus*</i>	Arginina	5.0x10 ⁻¹	2.9 x10 ⁻¹	Pirt (1973)
	<i>Escherichia*</i>	triptófano	1.1x10 ⁻³	5.4 x10 ⁻³	Novick (1958)
25	<i>Escherichia*</i>	Triptófano	4.9x10 ⁻⁴	3.4 x10 ⁻³	Shehata y Marr (1971)
	<i>Cryptococcus</i>	tiamina	1.4x10 ⁻⁷	4.7 x10 ⁻¹⁰	Button (1969)

*Amino ácido auxotrófico

+ El más bajo de los dos valores encontrados

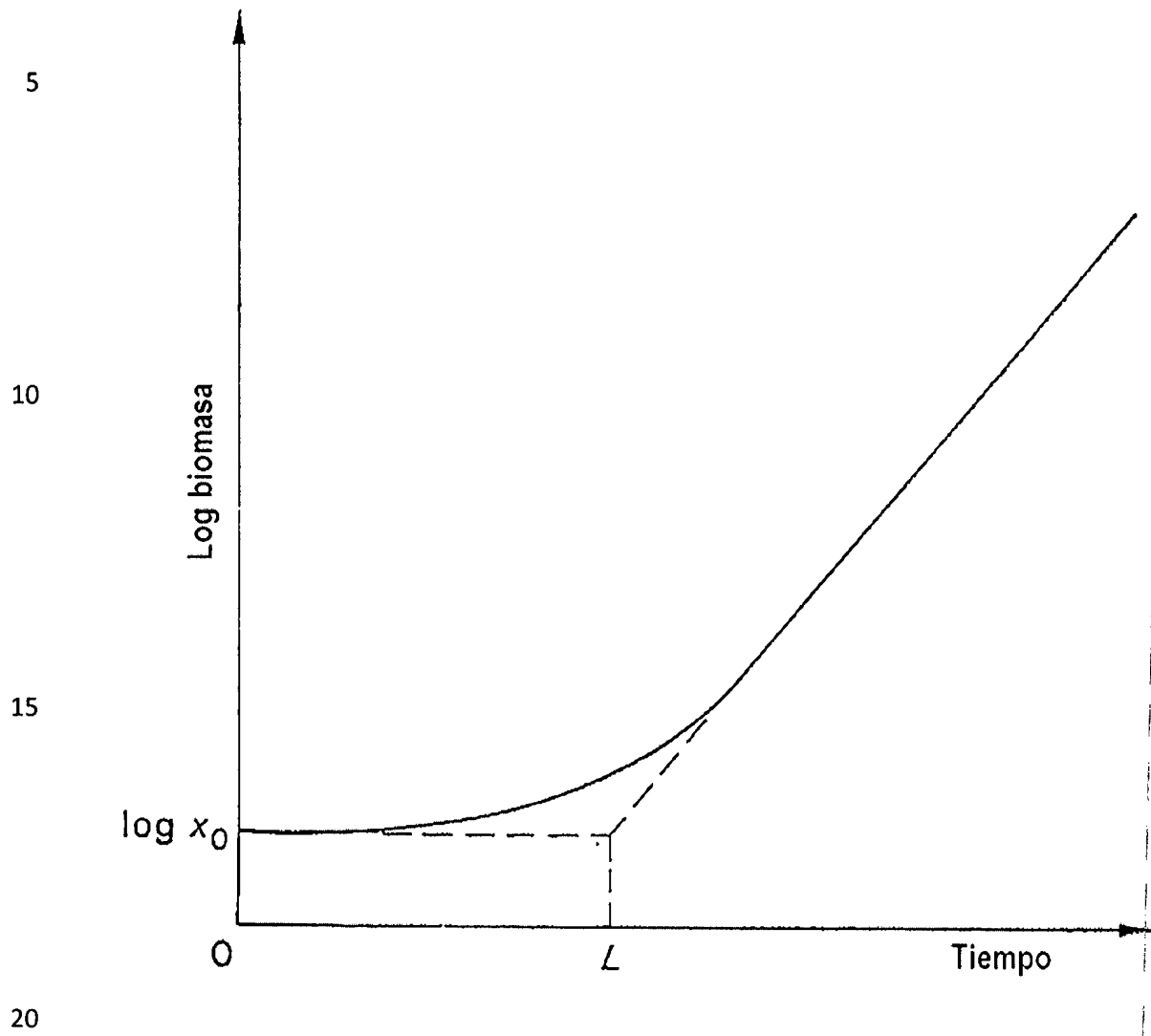


Fig. 2.5 Definición de período de retardo, L

2.9 límites a la concentración de biomasa máxima

La densidad máxima de biomasa de cualquier pH que puede ser alcanzada en un medio dado es determinada por una de las

siguientes cuatro condiciones: (i) la cantidad de sustrato limitante de crecimiento suministrado, (ii) la acumulación de un producto inhibidor, (iii) la densidad de empaque máxima de la biomasa, (iv) muerte celular. Bail (1929) propuesto que la

5 densidad bacteriana máxima o concentraciones "M" en un cultivo era determinada por el requerimiento lebensraum o espacio biológico. Este concepto vago implicaba que el espacio biológico excedía el espacio físico ocupado por los organismos. Sin embargo, es claro que las concentraciones M

10 sugeridas por Bail pueden ser tomadas en cuenta ya sea por la limitación de nutriente (especialmente oxígeno) o un productor inhibidor en los cultivos. La idea de Bail es de interés histórico puesto que es mantenida por un número de años entre los bacteriólogos y se puede ver un paralelo en el

15 concepto de "inhibición de contacto" del crecimiento en cultivos de célula de tejido animal. Se dice que las células son sometidas a inhibición de contacto se ha encontrado que crecen indefinidamente en forma de multicapa cuando son suministradas continuamente con nutrientes (Kruse y Miedema,

20 1965) también otras células se dice que tienen el crecimiento detenido al contacto, se ha encontrado que es inhibido por la producción de ácido (Ceccarina y Eagle, 1971); así, el concepto de que el contacto entre células de animales impiden su crecimiento ha sido desaprobado.

25 A condición de que no haya inhibición, la población

sigue siendo viable y hay un suministro ilimitado de nutrientes, lo que podría ser arreglado mediante difusión a través de una membrana semipermeable, entonces el único límite a la concentración de biomasa será la densidad de empaque máxima de los organismos o células en la biomasa. Este último estado es encontrado en tejidos de plantas y animales. La densidad de empaque máxima de las células (número/cm³) es dada por $10^{12}/v$ en donde v = volumen de célula individual en μm^3 . Algunas densidades de empaque máximas calculadas de esta fórmula para varios organismos son dadas en la tabla 2.2. Estas densidades de población posibles máximas corresponden a pesos secos de alrededor de 10% (peso/volumen).

15 TABLA 2.2 Densidades de empaque máximas* de algunos microorganismos en número por cm³

Organismo	Forma asumida	Radio (μm)	Longitud (μm)	$v(\mu\text{m}^3)$	Máximo (número/cm ³)
<i>Serratia marcescens</i> †	bastón	0.5	1.7	1.34	7.5×10^{11}
<i>Klebsiella aerogenes</i> †	bastón	0.86	5.4	12.5	8.0×10^{10}
<i>Bacillus megaterium</i> †	bastón	1.2	7.6	34.4	2.9×10^{10}
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	esfera	3.5	—	179	5.6×10^9
Mouse L cells	esfera	10.0	—	4190	2.4×10^8

* Calculado de la fórmula, $10^{12}/v$, en donde v = volumen de célula en μm^3
† Dimensiones de Powell (1963).