



Doctoral Thesis

Development and characterization of a membrane reactor for plant cell culture

Author(s):

Yoon, Kwang-Hun

Publication Date:

1991

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000613656> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 9547

**DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF
A MEMBRANE REACTOR
FOR PLANT CELL CULTURE**

A dissertation submitted to be
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZURICH
for the degree of Doctor of Technical Science

Presented by
YOON, KWANG-HUN
Master of Science, KAIST
born July 31, 1956
citizen of Korea (ROK)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. J.R. Bourne, referee
PD. Dr. T.W. Baumann, co-referee
Dr. J.E. Prenosil, co-referee

Zurich, 1991

vis.
J.R. Bourne.
18 Okt. 1991

ABSTRACT

Plant cell culture, an essential component of plant biotechnology, offers novel approaches to the production of useful natural compounds, the generation of useful genetic variability, and genetic transformation of crop plants. During the past decade or so, major advances have been made in this field and changed it from being an art to an industrial technology. The major problems encountered in developing large scale culturing systems are related to the specific characteristics of plant cells; for instance, shear sensitivity, slow growth, low productivity, and cell aggregation. The scope of this work was to develop a membrane reactor system and characterize it for plant cell cultures using *Coffea arabica* as a model system.

In preliminary experiments, the alkaloid productivity in the membrane reactor was found to be ninefold higher than that in comparable suspension cultures. Nutrient transport limitation was observed in the reactor operation when the inoculated cell layer was thicker than 3 mm. The results of the membrane reactor experiments indicate that cell growth was responsible for decreasing the effective diffusivity of nutrients that are essential for cell growth and alkaloid production.

The conductometry method was examined for monitoring the cell growth in the membrane bottom boats. It was found that there was a good linear relationship between the conductivity decrease and the cell mass increase.

A simple mathematical model for glucose transfer in the cell layer was developed. Glucose transfer in the cell layer was affected greatly by the effective diffusivity and medium concentration. Oxygen penetration depths were measured by using a microelectrode. Oxygen penetration depth in the cell layer is dependent on the wetness of the cell layer and the inoculated cell size.

To control the wetness of the cell layer the pressure indexing system of Lang et al. (1990) was adopted. Pressure index (PI) has a good relationship to the medium permeate flux.

In the constant pressure index operations, the best alkaloid productivity was 2.37 mg/l/day for PI = 50 operation. Based on the results of the constant pressure index operation, the variable pressure index operation mode was established for reactor optimization. For the variable pressure index operation in the batch mode the alkaloid productivity was 2.63 mg/l/day. Operation in the fed batch mode was adopted to alleviate nutrient transport limitations and much better results for the alkaloid productivity (3.57, 4.50, and 4.26 mg/l/day for the first, second, and last batch, respectively) were obtained.

ZUSAMMENFASSUNG

Pflanzenzellkulturen, ein essentieller Bestandteil der Pflanzen-Biotechnologie, bieten neue Wege zur Produktion nützlicher Naturstoffe. Sie eignen sich auch zur Erzeugung nützlicher genetischer Vielfalt und zur genetischen Transformierung von Nutzpflanzen. Während der letzten Jahre wurden auf diesem Gebiet bedeutende Fortschritte gemacht, so dass aus Laborversuchen eine industrielle Technologie entstanden ist. Die wichtigsten Probleme bei der Entwicklung von Kultivierungssystemen im Großmaßstab werden durch die spezifischen Eigenschaften von Pflanzenzellen, wie z.B. Scherempfindlichkeit, langsames Wachstum, geringe Produktivität und Bildung von Zellaggregaten verursacht. Das Ziel dieser Arbeit war es, ein Membran-Reaktorsystem für Pflanzenzellkulturen zu entwickeln, das einige von diesen Problemen bewältigen könnte. Zur Charakterisierung dieses Reaktors wurde *Coffea arabica* als Testkultur gewählt. Diese Zelllinie eignet sich als Testkultur, weil sie sehr gut charakterisiert ist, und ausserdem scheidet sie die einfach messbaren sekundären Metaboliten, Alkaloide, in das Medium aus.

In Voruntersuchungen wurde in dem von uns entwickelten Flach-Membranreaktor eine neunmal höhere Alkaloid-Produktivität festgestellt als in vergleichbaren Suspensionskulturen. Eine Limitierung des Nährstofftransportes wurde beim Betrieb des Reaktors beobachtet, wenn die Zellschicht dicker als 3 mm war. Die Ergebnisse der Experimente mit dem Membranreaktor zeigen, daß die Verminderung des effektiven Diffusionskoeffizienten der Nährstoffe, die für das Zellwachstum und die Alkaloid-Produktion essentiell sind, primär durch Zellwachstum verursacht wird.

Die früher entwickelte Leitfähigkeitsmethode für die Bestimmung der Zellbiomasse in Suspension wurde bei der Überwachung des Zellwachstums in den "Membrane Bottom Boats" getestet. Auch hier wurde ein guter linearer Zusammenhang zwischen Leitfähigkeitsabnahme und Zunahme der Zellmasse gefunden.

Ein einfaches mathematisches Modell für den Glucosetransport und die Sauerstoff-Penetration in der Zellschicht wurde entwickelt. Darin ist berücksichtigt, dass der Glucosetransport in der Zellschicht vom

effektiven Diffusionskoeffizienten und der Mediumkonzentration stark beeinflusst wird. Die Tiefe der Sauerstoff-Penetration in der Zellschicht ist von der Feuchtigkeit in der Schicht und von der Größe der inokulierten Zellaggregate abhängig. Das Modell erlaubt die Bestimmung der Grenzen der Schichtdicke für gegebene Reaktorbetriebsbedingungen oder die Anpassung dieser Betriebsbedingungen an die wachsende Zellschicht.

Um die Feuchtigkeit der Zellschicht zu kontrollieren, wurde das Konzept des "Pressure Index" (PI) von Lang et al. (1990) übernommen. Der "Pressure Index" zeigt einen guten Zusammenhang zum Medium-Permeatfluss.

Bei Betrieb mit konstantem "Pressure Index" war die höchste Alkaloid-Produktionsrate 2.37 mg/l/d bei PI = 50. Basierend auf den Ergebnissen aus dem Betrieb mit konstantem "Pressure Index" wurde zur Optimierung des Reaktors der Betrieb mit variablem "Pressure Index" eingeführt. Damit wurde versucht, die zunehmende Dicke der wachsenden Zellschicht zu berücksichtigen. Bei variablem "Pressure Index" war im Batch-Betrieb die Produktionsrate 2.63 mg/l/d. Fed-Batch-Betrieb wurde eingeführt, um die Limitierung durch den Nährstofftransport zu vermindern. In der Folge wurden viel bessere Ergebnisse bei der Alkaloid-Produktionsrate mit bis zu 4.50 mg/l/d erzielt .