



Doctoral Thesis

Evaluation of a flat plate membrane reactor for secondary metabolite production using plant cell cultures

Author(s):

Lang, Jeffrey Alan

Publication Date:

1992

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000666319> →

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. 9811

**EVALUATION OF A FLAT PLATE
MEMBRANE REACTOR FOR SECONDARY
METABOLITE PRODUCTION USING
PLANT CELL CULTURES**

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

presented by

Jeffrey Alan Lang

Master of Science, Rutgers, The State University of New Jersey
born February 1, 1964
Citizen of the United States of America

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

Zürich, 1992

Abstract

A flat plate membrane reactor was evaluated for use in the culture of, and formation of secondary metabolites by, plant cells. *Coffea arabica* cells, producing purine alkaloids and used as a model cell line, or *Mucuna pruriens* cells producing catechols were used in all experiments. The cells were immobilized on top of the membrane and received liquid nutrients from medium which permeated the membrane from the recirculation stream. Oxygen was supplied to the cells by a humidified air stream which flowed over the immobilized layer.

An inoculation method was first developed to introduce stock suspension-cultured cells into the membrane reactor by pumping a dense suspension of cells onto the membrane. Greater than 95% of the cells were transferred and distributed uniformly over the entire membrane surface. The method could be used for suspensions containing cell aggregates up to about 5 mm diameter. Aggregates up to about 7.5 mm diameter could be inoculated with a larger diameter transfer line (a slight reactor design modification).

A pressure indexing system to regulate the medium permeate rate was developed. The pressure index (PI) was calculated from the differential pressures between the cell chamber and the medium recirculation line at the in- and outflow points to the membrane reactor. The pressure index varied linearly with the initial permeate flux rate and was found to be independent of the reactor design. An optimum of about $PI = 50$ for the *Coffea arabica* cells was found at which the cell growth and product formation were superior. The optimum for *Mucuna pruriens* was found to be $PI = 5$.

The maximum specific growth rate (μ_{max}) of *Coffea arabica* cells in the membrane reactor was found to be either $0.062 \pm 0.013 \text{ day}^{-1}$ or 0.127 day^{-1} . The former value was for an inoculum consisting of fine cells and some small aggregates up to about 3–4 mm diameter (FC). The latter value was for an inoculum consisting mostly of large aggregates of 3–7 mm (AGG). The maximum specific growth rate in parallel suspension cultures of *Coffea arabica* was 0.151 day^{-1} . It was determined

that the growth limiting substrate for the *Coffea* was oxygen. The gas composition could not be used as a manipulative variable to increase the level of purine alkaloid formation.

Biotransformation of theobromine precursor to caffeine by the *Coffea arabica* cells in the membrane reactor was compared to parallel suspension cultures. The maximum biotransformation rate occurred several days after precursor addition in the membrane reactor while it occurred immediately following precursor addition in suspension cultures under normal operating conditions. The system was modeled and it was determined that the biotransformation in the membrane reactor was limited by the diffusion of precursor in the cell layer. The effective diffusion coefficient for theobromine and caffeine ($4.761 \times 10^{-7} \pm 5.500 \times 10^{-8}$ cm²/sec) was within the range of that found for glucose in callus tissue by other groups. By pulsing the pressure index (effective diffusion coefficient 3× higher than under normal operating conditions), the diffusion limitation could be largely removed. The membrane reactor was superior to the suspension cultures in that the biotransformation rate was maintained higher for a much longer period of time.

Biotransformation of L-tyrosine to L-DOPA by *Mucuna pruriens* was also examined. When 2 mM L-tyrosine precursor was added on day 21 after inoculation to the membrane reactor with pressure index pulsing, 11% of the added precursor was transformed after 48 hours. The product was detected extracellularly. In parallel suspension cultures, no extracellular product was detected resulting from the biotransformation. The results were comparable to alginate immobilized cells studied by other groups.

Cell growth monitoring by direct measurement of cell fresh weight change, by measurement of medium conductivity change, and by determination of extracellular peroxidase activity were evaluated for use with the membrane reactor. The overall reactor design, construction, applicability, and practicality were also discussed.

Zusammenfassung

Die Anwendung eines Flachmembranreaktors für die Züchtung von Pflanzenzellen und die Bildung der Sekundärmetaboliten wurde untersucht. *Coffea arabica* Zellen, die Purinalkaloiden bilden und als Modell-Zelllinie gebraucht wurden, oder *Mucuna pruriens* Zellen, die Katechole bilden, wurden für die Versuche verwendet. Die Zellen wurden auf der Oberfläche der Membran immobilisiert und erhielten durch die Membran hindurch flüssige Nährstoffe aus dem Medium. Sauerstoff wurde zu den Zellen durch einen feuchten Luftstrom gebracht, der über die immobilisierten Zellschicht floss.

Zuerst wurde eine Inokulationsmethode entwickelt, um Suspensionskulturen in den Reaktor zu bringen. Eine dicke Suspension wurde auf die Membranoberfläche gepumpt. Mehr als 95% der Zellen wurden hineingebracht und gleichmässig über die ganze Membranoberfläche verteilt. Diese Methode konnte für Aggregate bis 5 mm Durchmesser angewendet werden. Aggregate bis ca. 7.5 mm Durchmesser könnten mit einem grösseren Rohr inokuliert werden (eine kleine Änderung des Reaktors wäre dazu notwendig).

Zunächst wurde ein Druckindexsystem definiert damit die Medienpermeatrate zu regulieren. Der Druckindex (PI) wurde aus den gemessenen Druckunterschieden zwischen Reaktorgasphase und Flüssigzulauf einerseits und Reaktorgasphase und Ablauf andererseits berechnet. Der PI war linear proportional zur Anfangspermeatrate und unabhängig von der Reaktorkonstruktion. Ein Optimum wurde bei ca. $PI = 50$ für die *Coffea arabica* Zellen gefunden, bei welchem Wachstum und Produktbildung am besten waren. Das Optimum für *Mucuna pruriens* wurde bei $PI = 5$ gefunden. Die maximale spezifische Wachstumsrate (μ_{max}) für *Coffea arabica* Zellen im Membranreaktor wurde mit $0.062 \pm 0.013 \text{ d}^{-1}$ und 0.127 d^{-1} bestimmt. Der erste Wert war für eine Animpfung, die aus Einzelzellen und kleinen Aggregaten bis 3–4 mm Durchmesser (FC) bestanden hatte. Der zweite Wert wurde bei einer Animpfung mit meist grösseren Aggregaten (AGG) erhalten. Die maximale spezifische Wachstumsrate in parallelen Suspensionskulturen

von *Coffea arabica* war 0.151 d^{-1} . Sauerstoff war für *Coffea arabica* wachstumslimitierend. Die Purinalkaloidbildung konnte durch Variieren der Gasmischung nicht erhöht werden.

Die Biotransformation von Theobromin zu Koffein durch *Coffea arabica* Zellen im Membranreaktor wurde mit parallelen Suspensionskulturen verglichen. Im Membranreaktor fand man die maximale Transformationsrate einige Tage nach Zugabe von Theobromin, während sie in den Suspensionskulturen unter normalen Betriebsbedingungen sofort nach Zugabe auftrat. Das System wurde modelliert und es wurde herausgefunden, dass die Diffusionsrate von Theobromin in der Zellschicht für die Biotransformation limitierend war. Der effektive Diffusionskoeffizient für Theobromin und Koffein in der Zellschicht ($4.761 \times 10^{-7} \pm 5.500 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{sec}$) war innerhalb des Bereiches, welcher für Glukose in Oberflächenkulturen von anderen Gruppen gefunden wurde. Durch Pulsieren des Druckindex (Effektiver Diffusionskoeffizient $3 \times$ höher als unter normalen Betriebsbedingungen) konnte die Diffusionslimitierung zum grössten Teil eliminiert werden. Die Biotransformationsrate im Membranreaktor blieb viel länger höher als in den Suspensionskulturen.

Die Biotransformation von L-Tyrosin zum L-DOPA bei *Mucuna pruriens* wurde ebenfalls untersucht. Bei Zugabe von 2 mM L-Tyrosin am Tag 21 nach der Animpfung mit pulsierendem Druckindex wurden 11% innerhalb 48 Stunden transformiert. Das Produkt wurde extrazellulär gemessen. In parallele Suspensionskulturen wurden keine extrazellulären Produkte der Biotransformation gemessen. Die Resultate sind vergleichbar mit denen für alginatimmobilisierte Zellen von anderen Gruppen.

Die Bestimmung des Zellwachstums durch direkte Messung der Frischgewichtsänderung, durch Messung der Medienleitfähigkeitsänderung, und durch Bestimmung der extrazellulären Peroxidaseaktivität wurden untersucht. Die allgemeine Konstruktion, Anwendbarkeit und praktische Bedienbarkeit des Membranreaktors wurden auch diskutiert.