

## 气体成分对植物细胞悬浮培养的影响

周煜, 刘涤, 胡之璧

(上海中医药大学中药研究所, 上海 200032)

**摘要:** 气体成分对植物悬浮培养细胞的生长和次生代谢物的产量有深刻的影响。就有关氧、二氧化碳、乙烯和一些未知成分作用的研究进行了综述。

**关键词:** 气体成分; 植物细胞悬浮培养; 生长; 次生代谢物

**中图分类号:** Q945.19 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2001)01-0047-06

## Effects of gaseous components in plant cell suspension cultures

ZHOU Yu, LIU Di, HU Zhi-bi

(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

**Abstract:** Gaseous components, including oxygen, carbon dioxide, ethylene and some unidentified gaseous metabolites are proved to have profound effects on the growth and secondary metabolites' accumulation of plant cell suspension cultures. Wider investigation is needed in this area to optimize cultivation strategies for improving production.

**Key words:** Gaseous components; plant cell suspension culture; growth; secondary metabolites

植物组织和细胞的培养技术在本世纪初创始以来,从仅为生物学研究的一种手段,逐渐发展成工业化的生产方式。除了已广泛应用的良好快速繁殖,细胞培养还能用于生产植物含有的蛋白质、酶以及用途广泛的多种次生代谢产物。这不仅能解决资源短缺的困难,而且具有许多农业栽培所不具备的优点。由于悬浮培养最适合于工业化,尤其为人们关注。大量研究表明,各种气体成分对培养效果的影响相当大,不可忽视。

### 1 氧

作为氧化磷酸化代谢的最终电子受体,氧在能量代谢中起重要作用,又参与许多次生代谢产物的合成反应。因此,系统中的溶氧浓度对培养效果的影响很大。

#### 1.1 溶氧条件对悬浮培养细胞生长的影响

通过改变摇瓶转速调节溶氧,当低于一定转速时,长春花(*Catharanthus roseus*)悬浮细胞虽可

收稿日期: 1999-12-06

作者简介: 周煜(1972-),男,在读博士生,从事中药植物的生物工程研究。

存活,但不增殖;随着转速升高,细胞的生长速率提高,所达到最大鲜重亦增加<sup>[1]</sup>。在反应器中,通过改变气体散布器和通气速率调节溶氧浓度也得到类似的结果<sup>[2]</sup>。高溶氧浓度条件下,细胞同化培养基中糖的能力更强<sup>[3,4]</sup>。花菱草(*Eschscholtzia californica*)<sup>[5]</sup>与胡萝卜(*Daucus carota*)<sup>[6]</sup>悬浮培养细胞生长和溶氧的关系与长春花一致。

总之,维持细胞的存活和增殖对溶氧浓度有一定的要求,一定范围提高溶氧浓度能提高细胞生长速度。

在细胞培养周期的不同阶段,细胞的耗氧量随细胞的生理状态和浓度而变化。长春花细胞在气升式反应器中,单位质量细胞的摄氧量在生长对数期的中点最大;但单位体积培养物的摄氧量随着细胞浓度而增加,在对数生长期的后期达到最高<sup>[7]</sup>;摇瓶中,单位鲜重摄氧量的高峰出现在快速生长的初期<sup>[1]</sup>。亚欧唐松草(*Thalictrum minus*)细胞的耗氧高峰也出现在快速生长期<sup>[8]</sup>。欧亚槭(*Acer pseudoplatanus*)细胞在分裂前大量合成蛋白质,此时耗氧量最大<sup>[9]</sup>。

悬浮培养的落花生(*Arachis hypogaea*)细胞生长到平台期,用新鲜培养基稀释,2 h内细胞内蛋白质合成急剧加速,ATP水平增加3倍;而通入氧气也有相似的效果。有人据此认为:氧是细胞高密度培养时的限制性因素<sup>[10]</sup>。

过高的溶氧浓度对细胞生长有抑制作用。向摇瓶中通入的气体中氧超过70%,能抑制对长春花细胞的生长<sup>[11]</sup>。另外,低氧条件下生长了相当一段时间之后,长春花细胞就不能适应较高溶氧的环境<sup>[12]</sup>。气升式反应器中的溶氧太高会导致光合自养的红叶藜(*Chenopodium rubrum*)悬浮细胞进行光呼吸作用<sup>[13]</sup>。

## 1.2 溶氧条件对悬浮培养细胞形态和分化的影响

长春花细胞鲜重与干重之比随摇瓶转速增加而提高,说明细胞含水量较大<sup>[1]</sup>;这也许与细胞在高溶氧时消耗较多的糖而导致环境的渗透压降低有关。高的容量传递系数( $K_L$ )在后期使细胞聚集成团的较大<sup>[2]</sup>。摇瓶中生长的胡萝卜悬浮细胞的生物量随着转速和通氧的增加而增加,但细胞数量变化不大,说明在高氧浓度条件下细

胞个体的质量较大<sup>[14]</sup>。

胡萝卜培养细胞分化有2种形式:形成胚胎(embryogenesis)或形成根(rhizogenesis)。用增加搅拌和通气的方法调节溶氧,发现悬浮细胞在溶氧浓度高时趋向于根的发生,低溶氧条件有利于胚胎发生<sup>[14]</sup>。但是,在不改变剪切力的条件下,低溶氧不利于胚胎发生;不仅使体细胞胚的发生频率降低,而且细胞的分化推迟<sup>[15]</sup>。

## 1.3 氧对次生代谢产物生产的影响

氧促进某些次生代谢产物的产生。黄连(*Coptis japonica*)<sup>[16]</sup>和亚欧唐松草<sup>[7]</sup>细胞的黄连素(berberine)含量随溶氧增加;增加 $K_L$ 促进紫草(*Lithospermum erythrorhizon*)细胞中紫草宁(shikonin)的合成<sup>[17]</sup>;溶氧在20%~50%之间时,金花小檗(*Berberis wilsonae*)悬浮细胞中黄连素、非洲防己碱(columbamine)和树根碱(jatrorrhizine)的含量随溶氧而提高<sup>[17]</sup>。溶氧在10%~50%之间,狭叶毛地黄(*Digitalis lanata*)细胞转化 $\beta$ -甲基洋地黄毒苷( $\beta$ -methyl digitoxin)的能力与溶氧正相关<sup>[18]</sup>。降低溶氧导致海巴戟(*Morinda citrifolia*)细胞的蒽醌(anthraquinone)产量下降<sup>[19]</sup>。

高密度培养被认为是解决次生产物单位产量过低的重要技术途径之一<sup>[20]</sup>。但是,细胞浓度高往往导致所需产物的含量下降<sup>[21,22]</sup>。而提高溶氧浓度能使某些产物在高密度培养时的产量增加<sup>[23]</sup>。

有证据表明氧参与某些产物的合成:长春花在溶氧低于15%条件下,阿玛碱合成被抑制,升高溶氧至某一浓度,阿玛碱迅速大量合成;降低溶氧浓度,阿玛碱合成又停止<sup>[12]</sup>;而合成阿玛碱的有关酶的活性在不同氧浓度时区别不大<sup>[4]</sup>。所以氧可能是直接作为这类生物碱合成中的底物,而不是通过影响基础代谢或调节有关酶的活性来促进它们的合成。

氧浓度还影响长春花细胞生物碱的积累时间和组成; $K_L$ 低于 $4.5 \text{ h}^{-1}$ 时,蛇根碱(serpentine)在细胞生长停止后才能逐渐积累,提高 $K_L$ 使蛇根碱的积累时间提前;值得注意的是,提高 $K_L$ 使蛇根碱增加的同时,却降低了阿玛碱的含量;原

因可能是阿玛碱在高氧浓度时易被氧化成蛇根碱<sup>[2]</sup>。

高溶氧对另一些次生产物的积累不利,如高溶氧使三角叶薯蓣(*Dioscorea deltoidea*)薯蓣皂甙元(diosgenin)含量减少<sup>[24]</sup>。

## 2 二氧化碳(CO<sub>2</sub>)

### 2.1 CO<sub>2</sub>对培养细胞生长的作用

光合自养的悬浮培养细胞对CO<sub>2</sub>要求较高。气升式反应器中光合自养的红叶藜细胞需要10%~15%的CO<sub>2</sub>以维持生长<sup>[33]</sup>。

异养细胞对CO<sub>2</sub>也有一定要求。Stuart & Street 发现生长活跃的欧亚槭高密度细胞培养物释放出某些气态物质,这些物质具有显著的促进低密度培养物生长的作用;这些物质能被KOH吸收,但加入CO<sub>2</sub>的尝试未达到预期的促进生长的效果<sup>[25]</sup>。后来研究证明,如果通入气体中CO<sub>2</sub>浓度较高(5%),将抑制悬浮细胞生长<sup>[26]</sup>,而稍低的浓度(1%)能促进生长,并且这种促进作用不是因为CO<sub>2</sub>对培养基pH值的影响<sup>[27]</sup>。

亚欧唐松草细胞对无CO<sub>2</sub>的环境较敏感;用KOH吸收摇瓶中CO<sub>2</sub>将导致细胞褐变和死亡;在鼓泡式反应器中通入2%CO<sub>2</sub>,能阻止褐变;通入乙烯能促进亚欧唐松草细胞褐变,碱吸收CO<sub>2</sub>加强了乙烯的这种作用<sup>[28]</sup>。

为保证细胞对氧的要求,经常采用较强烈的通气。但这反而对细胞生长不利<sup>[29,30]</sup>。Hegarty 等人发现:高通气速率抑制长春花细胞生长;同时供给外源的CO<sub>2</sub>能抵销这种抑制作用;但CO<sub>2</sub>浓度过高又抑制生长<sup>[31]</sup>。

所以,一定浓度的CO<sub>2</sub>对有的植物细胞生长是有利的或必需的,过高则抑制生长。CO<sub>2</sub>浓度影响糖代谢过程中的几个关键酶的活性,这可能与其作用的机制有关<sup>[32]</sup>。同位素标记的<sup>14</sup>C<sub>2</sub>被PEP羧化酶固定,产物转入三羧酸循环<sup>[33,34]</sup>,这可以解释CO<sub>2</sub>使长春花细胞的生物量增加的现象<sup>[11]</sup>。

### 2.2 CO<sub>2</sub>的作用与时间的关系

CO<sub>2</sub>对生长的促进作用表现在培养前期:一定分压的CO<sub>2</sub>(20 mbar)能缩短延滞期;如果在此

时将通入气体中的CO<sub>2</sub>用碱吸收,悬浮培养细胞的生长将受到抑制;但在后期去除CO<sub>2</sub>对生长影响不大;此外,PEP羧化酶的活性亦在前期较高<sup>[32,33,36]</sup>。细胞培养的起始浓度较高时,CO<sub>2</sub>的作用便不明显<sup>[11,23]</sup>,原因可能是,此时细胞本身产生的CO<sub>2</sub>已能满足需要。

### 2.3 CO<sub>2</sub>对次生代谢产物的影响

气升式反应器中的*Thalictrum rugosum*悬浮细胞培养液中通入CO<sub>2</sub>,细胞生长变化不大,但黄连素的产量增加了;同时通入CO<sub>2</sub>与乙烯,细胞生物量稍有减少,但黄连素产量更大<sup>[37]</sup>。用KOH吸收摇瓶中的CO<sub>2</sub>,亚欧唐松草细胞的黄连素产量降低;向鼓泡式反应器中通入CO<sub>2</sub>,黄连素产量提高<sup>[28]</sup>。

CO<sub>2</sub>对长春花阿玛碱产量影响不大,但去除CO<sub>2</sub>导致阿玛碱大量分泌到胞外,可能是由于CO<sub>2</sub>对培养液pH的降低的结果<sup>[38]</sup>。

## 3 乙 烯

作为气体形式的植物激素,乙烯能在多种植物的悬浮培养细胞中产生<sup>[39]</sup>。通透不良的封口使悬浮培养长春花细胞的摇瓶中积累较多的乙烯<sup>[40]</sup>。

### 3.1 乙烯对生长的影响

一般而言,悬浮细胞的生长不需要乙烯<sup>[41]</sup>。乙烯对细胞的生长往往表现出不利影响。加入乙烯利(etheal)会导致亚欧唐松草细胞的褐变<sup>[28]</sup>。间歇通入高浓度(3%~5%)乙烯能使大豆(*Glycine max*)悬浮细胞达到同步生长;可能是乙烯使细胞停留于S期<sup>[42]</sup>。

### 3.2 乙烯对次生代谢产物的影响

乙烯及其前体能刺激小果咖啡(*Coffea arabica*)悬浮细胞中生物碱的产生<sup>[43]</sup>。高密度培养的*Thalictrum rugosum*细胞通入乙烯,能提高黄连素的单位产量<sup>[37]</sup>。然而,去除乙烯或加入乙烯合成的抑制剂对长春花细胞的阿玛碱产量影响不大<sup>[38]</sup>。

## 4 其它气体成分

Thomas & Murashige 检测到许多种植物组

织培养物释放出二氧化碳、乙烯、乙烷、乙醛、乙醇等的挥发性成分,而且不同植物在不同时间放出的各种气体成分差异很大<sup>[44]</sup>。有人发现低温保藏的胡萝卜细胞能释放甲烷、乙烷、丙烷、异丁烷、戊烷和一些未鉴定的气体成分<sup>[45]</sup>。

Schlatmann 等人比较了普通通气搅拌罐、循环气体的通气搅拌罐、摇瓶和鼓泡式反应器中长春花的阿玛碱生产,结果循环气体的通气搅拌罐与摇瓶中细胞生长良好,阿玛碱产量较高;但普通通气搅拌罐与鼓泡式反应器中阿玛碱产量低,而且大部分存在于细胞外<sup>[46]</sup>。说明剪切力不是影响生物碱产量的因素,而培养物产生的废气对培养效果具有实质性的影响。他们将反应器的废气循环回反应器中,长春花高密度悬浮细胞产生比普通反应器更多的阿玛碱;但将废气中的 CO<sub>2</sub> 和乙烯同时或者分别去除,对阿玛碱生产仍具有促进作用<sup>[38]</sup>。证明 CO<sub>2</sub> 和乙烯不是促进阿玛碱产生的因子,而有其它一些尚不明确的气体成分能促进生物碱的合成。

目前,气体成分对植物细胞培养影响的研究仍处于初级阶段,它们的作用机理还不明确。深入探索有关机理对优化培养条件、提高培养效率有重大意义。

#### 参考文献:

- [1] Snape J B, Thomas N H. How suspension cultures of *Catharanthus roseus* respond to oxygen limitation; small-scale tests with applications to large-scale cultures [J]. *Biotechnol. Bioeng.* 1989, **34**: 1058~1062
- [2] Lechie F, Scragg A H. An investigation into the role of initial K<sub>L</sub> on the growth and alkaloid accumulation by cultures of *Catharanthus roseus* [J]. *Biotechnol. Bioeng.* 1991, **37**: 364~370
- [3] Pareilleux A, Vinas R. Influence of the aeration rate on the growth yield in suspension cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don [J]. *J. Ferment. Technol.* 1983, **61**: 429~433
- [4] Schlatmann J E, Moreno P R H, Vinke J L, et al. Effect of oxygen and nutrient limitation on ajmalicine production and related enzyme activities in high density cultures of *Catharanthus roseus* [J]. *Biotechnol. Bioeng.* 1994, **44**: 461~468
- [5] Taticek R A, Moo-Young M, Legge R L. The scale-up of plant cell culture; Engineering considerations [J]. *Plant Cell Tissue and Org. Cult.* 1991, **24**: 139~158
- [6] Jay V, Genestier S, Courduroux J C. Bioreactor studies on the effect of dissolved oxygen concentrations on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota* L.) cell cultures [J]. *Plant cell Rep.* 1992, **11**: 605~608
- [7] Bond P A, Fowler M W, Scragg A H. Growth of *Catharanthus roseus* cell suspensions in bioreactors: on-line analysis of oxygen and carbon dioxide levels in inlet and outlet gas streams [J]. *Biotechnol. Lett.* 1988, **10**: 713~718
- [8] Kobayashi Y, Fukui H, Tabata M. Effect of oxygen supply on berberine production in cell suspension cultures and immobilized cells of *Thalictrum minus* [J]. *Plant cell Rep.* 1989, **8**: 255~258
- [9] Givan C V, Collin H A. Studies on the growth in culture of plant cells; changes in respiration rate and nitrogen content associated with the growth of *Acer pseudoplatanus* L cells in suspension culture [J]. *J. Exp. Bot.* 1967, **18**: 321~331
- [10] Verma D P S, Marcus A. Oxygen availability as a control factor in the density dependent regulation of protein synthesis in cell culture [J]. *J. Cell Sci.* 1974, **41**: 331~337
- [11] Tate J L, Payne G F. Plant cell growth under different levels of oxygen and carbon dioxide [J]. *Plant Cell Rep.* 1991, **10**: 22~25
- [12] Schlatmann J E, Vinke J L, Ten Hoopen H J G, et al. Relation between dissolved oxygen concentration and ajmalicine production rate in high-density cultures of *Catharanthus roseus* [J]. *Biotechnol. Bioeng.* 1995, **45**: 435~439
- [13] Fischer U, Santore U J, Husemann W, et al. Semi-continuous cultivation of photoautotrophic cell suspension cultures in a 20 l airlift-reactor [J]. *Plant Cell Tissue Org. Cul.* 1994, **38**: 123~134
- [14] Kessell R H J, Carr A H. The effect of dissolved oxygen concentration on the growth and differentiation of carrot (*Daucus carota*) tissue [J]. *J. Exp. Bot.* 1972, **23**: 996~1007
- [15] Yamada Y, Sato P. Production of berberine in cul-

- tured cells of *Coptis japonica* [J]. *Phytochem.* 1981, **20**: 545~547
- [16] Tabata M, Fujita Y. Production of shikonin by plant cell cultures [A]. In: *Biotechnology in Plant Science: Relevance to Agriculture in the Eighties*. Zaitlin M, Day P, Hollaender A. (eds.) [C]. Academic Press, New York, 1985
- [17] Breuling M, Alfermann A W, Reinhard E. Cultivation of cell cultures of *Berberis wilsonae* in 20-l airlift bioreactors [J]. *Plant Cell Rep.* 1985, **4**: 220~223
- [18] Spieler H, Alfermann A W, Reinhard E. Biotransformation of 6-methyl digitoxin by cell cultures of *Digitalis lanata* in airlift and stirred tank reactors [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1985, **23**: 1~4
- [19] Wagner F, Vagelman H. Cultivation of plant tissue cultures in bioreactors and formation of secondary metabolites [A]. In: *Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application*. Barz W, Reinhard E, Zenk M H. (eds) [C]. Berlin. Springer-Verlag, 1977.
- [20] Sahai O, Knuth M. Commercialization plant tissue culture processes: economics, problems, and prospects [J]. *Biotechnol. Prog.* 1985, **1**: 1~9
- [21] Su W W, Lei F, Su L Y. Perfusion strategy for rosmarinic acid production by *Anchusa officinalis* [J]. *Biotechnol. Bioeng.* 1993, **42**: 884~890
- [22] Moreno P R H, Schlatmann J E, Van der Heijden R, et al. Induction of ajmalicine formation and related enzyme activities in *Catharanthus roseus* cells: Effect of inoculum density [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1993, **39**: 42~47
- [23] Ten Hoopen H J G, Van Gulik W M, Schlatmann J E, et al. Ajmalicine production by cell cultures of *Catharanthus roseus*; from shake flask to bioreactor [J]. *Plant Cell Tissue and Org. Cult.* 1994, **38**: 85~91
- [24] Drapeau D, Blanch H W, Wilke C R. Growth kinetics of *Dioscorea deltoidea* and *Cartharanthus roseus* in batch culture [J]. *Biotechnol. Bioeng.* 1986, **28**: 1555~1563
- [25] Stuart R, Street H E. Studies on the growth in culture of plant cells. X. Further studies on the conditioning of culture media by suspensions of *Acer pseudoplatanus* L. Cells [J]. *J. Exp. Bot.* 1971, **22**: 96~106
- [26] Rajasekhar E W, Edwards S B, Wilson S B, et al. Studies on the growth in culture of plant cells. XI. The influence of shaking rate on the growth of suspension cultures [J]. *J. Exp. Bot.* 1971, **22**: 107~117
- [27] Gathercole R W E, Mansfield K J, Street H E. Carbon dioxide as an essential requirement for cultured sycamore cells [J]. *Physiol. Planta.* 1976, **37**: 213~217
- [28] Kobayashi Y, Fukui H, Tabata M. Effect on carbon dioxide and ethylene on berberine production and cell browning in *Thalictrum minus* cell cultures [J]. *Plant Cell Rep.* 1991, **9**: 496~499
- [29] Smart N J, Fowler M W. Mass cultivation of *Catharanthus roseus* cells using a nonmechanically agitated bioreactor [J]. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1984, **9**: 209~216
- [30] Scragg A H, Morris P, Allan E J, et al. Effect of scale-up on serpentine formation by *Catharanthus roseus* suspension cultures [J]. *Enz. Microb. Technol.* 1987, **9**: 619~624
- [31] Hegarty P K, Smart N J, Scragg A H, et al. The aeration of *Catharanthus roseus* L. G. Don suspension cultures in airlift bioreactors: the inhibitory effect at high aeration rates on culture growth [J]. *J. Exp. Bot.* 1986, **37**: 1911~1920
- [32] Ducos J P, Feron G, Pareilleux A. Growth and activities of enzymes of primary metabolism in batch cultures of *Cartharanthus roseus* cell suspension under different pCO<sub>2</sub> conditions [J]. *Plant Cell Tissue Org. Cul.* 1988, **13**: 167~177
- [33] Maurel B, Pareilleux A. Effect of carbon dioxide on the growth of cell suspensions of *Cartharanthus roseus* [J]. *Biotechnol. Lett.* 1985, **7**: 313~318
- [34] Maurel B, Pareilleux A. Carbon dioxide fixation and growth of heterotrophic cell suspensions of *Catharanthus roseus* [J]. *J. Plant Physiol.* 1986, **122**: 347~355
- [35] Nesius K K, Fletcher J S. Carbon dioxide and pH requirements of non-photosynthetic tissue culture cells [J]. *Physiol. Planta.* 1973, **28**: 259~263
- [36] Ducos J P, Pareilleux A. Effect of aeration rate and

- influence of pCO<sub>2</sub> in large-scale cultures of *Catharanthus roseus* cells [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1986, **25**: 101~105
- [37] Kim D I, Pedersen H, Chin C K. Cultivation of *Thalictrum rugosum* cell suspension in an improved airlift bioreactor; Stimulatory effect of carbon dioxide and ethylene on alkaloid production [J]. *Biotechnol. Bioeng.* 1991, **38**: 331~339
- [38] Schlatmann J E, Fonck E, Ten Hoopen H J G, et al. The negligible role of carbon dioxide and ethylene in ajmalicine production by *Catharanthus roseus* cell suspensions [J]. *Plant Cell Rep.* 1994, **14**: 157~160
- [39] Gamborg O L, Larue A G. Ethylene produced by plant cells in suspension cultures [J]. *Nature*, 1968, **220**: 604~605
- [40] Lee C W T, Shuler M L. Different shake flask closures alter gas phase composition and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell suspensions [J]. *Biotechnol. Tech.* 1991, **5**: 173~178
- [41] Mackenzie I A, Street H E. Studies on the growth in culture of plant cells. VIII. The production of ethylene by suspension cultures of *Acer pseudoplatanus* L. [J]. *J. Exp. Bot.* 1970, **21**: 824~834
- [42] Constabel F, Kurz W G W, Chatson K B, et al. Partial synchrony in soybean cell suspension culture induced by ethylene [J]. *Exp. Cell Res.* 1977, **105**: 263~268
- [43] Cho G H, Kim D I, Pedersen H, et al. Ethephon enhancement of secondary metabolite synthesis in plant cell culture [J]. *Biotechnol. Prog.* 1988, **4**: 184~188
- [44] Thomas D, Murashige T. Volatile emissions of plant tissue cultures. I. Identification of the major components [J]. *In vitro* 1979, **15**: 654~658
- [45] Benson E E, Withers L A. Gas chromatographic analysis of volatile hydrocarbon production by cryopreserved plant tissue cultures: A non-destructive method for assessing stability [J]. *Cryo-Lett.* 1987, **8**: 35~46
- [46] Schlatmann J E, Nuutila A M, Van Gulik W M, et al. Scale up of ajmalicine production by plant cell cultures of *Catharanthus roseus* [J]. *Biotechnol. Bioeng.* 1993, **41**: 253~262