



T R A D I T I O N A L C H I N E S E M E D I C I N E
B I O L O G I C A L E N G I N E E R I N G
中 药 生 物 工 程

主编 高文远

上海科学技术出版社

SHANGHAI SCIENTIFIC & TECHNICAL PUBLISHERS

中药生物工程

Traditional Chinese Medicine Biological Engineering

主编◎高文远

上海科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

中药生物工程/高文远主编. —上海: 上海科学技术出版社, 2014. 1

ISBN 978-7-5478-2034-6

I. ①中… II. ①高… III. ①中药学-生物工程-研究 IV. ①R28

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 245582 号

本书出版受“上海科技专著出版资金”资助

上海世纪出版股份有限公司 出版、发行
上海科学技术出版社

(上海钦州南路71号 邮政编码200235)

新华书店上海发行所经销

上海中华商务联合印刷有限公司印刷

开本 787×1092 1/16 印张: 23.5 插页: 4
字数: 540千字

2014年1月第1版 2014年1月第1次印刷

ISBN 978-7-5478-2034-6/R·662

定价: 88.00元

本书如有缺页、错装或环损等严重质量问题,
请向工厂联系调换

Abstract

□ 内容提要 □

本书为一部系统论述中药生物工程的创新性学术专著,分别从组织和细胞培养、反应器工程、发酵工程、基因工程和分子标记技术5个方面详细论述了各种中药生物工程技术的概念、操作要求、发展现状以及在中药资源开发和保护方面的应用前景,介绍的大量技术具有重要的实用价值。

中药生物工程是个新兴的领域,是现代生物工程技术在中药领域的应用,是解决中药资源紧缺问题的重要途径。本书作者作为该领域的先行者,书中融入了其多年的原创性研究实践和思考。本书内容新颖,方法先进,图文并茂,基本反映了本领域的国际前沿动态。对从事中药生物工程研究与应用的人员有参考价值,也可供从事生物学、植物学和天然产物专业的科研人员参考和使用。

Editorial Committee

□ 编委会 □

主 编 高文远

副主编 王 娟

编 委 (按姓氏音序排列)

高文远 黄璐琦 李 霞

刘 辉 满淑丽 史炎彭

王 娟 王 琴 王 颖

尹双双 张 瑶 张静泽

张丽霞

随着经济的大发展，我国中药行业在经历了漫长的历史后，正面临着前所未有的发展机遇。随着科学技术的进步，中药行业在经历了漫长的历史后，正面临着前所未有的发展机遇。随着科学技术的进步，中药行业在经历了漫长的历史后，正面临着前所未有的发展机遇。

Preface

随着科学技术的进步，中药行业在经历了漫长的历史后，正面临着前所未有的发展机遇。随着科学技术的进步，中药行业在经历了漫长的历史后，正面临着前所未有的发展机遇。随着科学技术的进步，中药行业在经历了漫长的历史后，正面临着前所未有的发展机遇。

序

中国科学院

北京中医药大学

2013年8月8日

中药是中医防治疾病的物质基础。在“以人为本”思想主导下，人们要求采取各种方法与手段保证中药资源的可持续利用。

生物技术是当前发展最快的科学技术之一，中药生物工程是生物工程技术在中药领域的应用，对药用植物的资源保护和可持续利用具有重要意义。中药的生物工程包括可以直接生产药用植物活性成分的组织培养、细胞培养及器官培养，也包括可以鉴别中药基原和寻找近缘替代药用植物的基因工程技术，以及微生物转化中药活性成分的技术。此外，还可以把药用植物的功能基因克隆出来，通过微生物大量生产目的活性成分。

我一直从事中药资源的工作，对中药资源有着深厚的感情。正在开展的全国第四次资源普查工作将摸清我国中药资源的家底，也会发现越来越多的濒危中药材资源。近些年，中药材濒危资源的不断增加，中药材价格的不断增长，足以说明我国资源保护和可持续利用工作的紧迫性和重要性。随着我国中药工业和中药大健康产业的快速发展，野生资源的产量已经远远不能满足中药行业的需求，亟待发展先进的生物技术来解决中药资源的问题，走出一条创新的道路。

记得我早年在西藏调查药用植物的时候，一包香烟就可以换1 kg冬虫夏草，现在虫草的价格已经涨到了几十万元1 kg，这是个很好的例子。现在虫草作为工业用的原料已经远远不够用了，所以只能用通过组织培养来生产的虫草菌丝粉了。我们要有防患于未然的思想，不能等到药材都到像冬虫夏草这么濒危了才开展生物技术研究。在生物技术的应用方面，日本和韩国这些年发展很快，除了已经在人参的培养方面实现工业化外，这些年日本的三井化学公司在甘草等药材的组织培养方面下了很大的工夫，我们要有紧迫感，因为我国是世界上使用和出口中药材资源最多的国家，我们必须要在中药生物工程技术方面走在世界的

前列。很高兴地看到近些年我们国内中药生物工程的产业化有所发展,出现了大连的普瑞康生物技术有限公司这样的企业,并且和北京同仁堂合作开发了生物技术产品上市,希望这样的企业越多越好。

高文远教授的课题组从事中药生物工程研究多年,在我国中药生物工程领域特别是组织培养方面处于领先水平。他们结合自己的科研成果撰写的《中药生物工程》一书,系统总结了该领域的世界学术和技术发展成果,对于中药生物工程的教学和科研都具有重要的意义。祝愿这朵中药科技之花将结出丰硕实践之果。乐为之序。

中国工程院院士
中国医学科学院药用植物研究所名誉所长
2013年8月7日于北京

中药生物工程... 中国科学院... 药用植物研究所... 2013年8月7日于北京

Foreword

前言

当前,第四次全国性的资源普查工作正在进行,对于我国中药现代化具有重要意义。普查将摸清我国中药资源的家底,根据普查结果将发现有多少濒危资源,多少可以栽培的资源等,为我国中药产业的发展提供重要参考。中药资源是我国中药产业的基石,随着我国中药工艺的快速发展,大型和超大型企业不断涌现、形成和发展,对我国的中药资源形成了很大的压力,近些年中药材濒危资源的不断增加,中药材价格的不断增长,足以表明我国资源保护和可持续利用工作的紧迫性和重要性。

我国是世界上使用和出口中药材资源最多的国家,大田栽培是目前提供中药材的主要途径。但我国是世界上人均可耕地面积最少的国家之一,必然会出现中药材栽培与农作物栽培争地的矛盾,从而导致中药材价格节节攀升。目前,三七、西洋参、石斛、天麻等的价格都在500元/kg以上,冬虫夏草的价格更是普通百姓难以企及的。此外,对于人参、红豆杉、长春花这些药用植物来说,或者生长年限长,或者有效成分含量很低,大田栽培难以满足这些药用植物的资源用量。同时,药用植物的大田栽培往往使用大量的农药,造成严重的农药残留和重金属残留问题。因此,土地资源有限的我国不能只寄希望于大田栽培手段来提供中药材及其活性成分,大力发展生物技术来解决中药材的资源问题对我国具有特殊而且重要的意义。

中药生物技术就是利用生物技术手段,对中药细胞、组织、个体进行改造,以加快繁殖速度、提高产量、改良品种和抗性等的技术。中药生物技术的应用,可以体现在以下几个方面:①培养药用植物的器官,部分替代野生或大田栽培的药用植物资源;②与大田栽培相结合,快速大量繁殖药用植物的种苗;③通过大规模培养技术,直接开发有特色的药品、保健品和化妆品,如韩国利用培养的人参不定根开发了系列保健品和化妆品,反应器规模达到30吨;

④ 采用发酵工程技术培养药用菌类植物,从中提取活性成分,如我国冬虫夏草、灵芝、云芝、猴头等药用真菌的发酵产品目前已投入市场;⑤ 有关代谢途径的基因工程研究,通过寻找次生代谢生物合成途径中的关键酶基因,进而对这些次生代谢产物的生物合成进行调控或将其转入微生物中生产所需要的次生代谢产物;⑥ 采用 DNA 指纹技术进行道地药材的鉴别和中药质量检验,如 2010 年版《中国药典》首次收录了蕲蛇和乌梢蛇的 DNA 鉴定方法,推广了药用动植物 DNA 条形码技术。因此,本书的出版既有重要的理论意义,又有重要的实用价值。

全书以生物技术在中药中的应用、发展现状以及产业化前景为重点,共分为 12 章。第一章介绍中药生物工程的范畴、研究进展和发展前景;第二、五、六、七章重点阐述药用植物大规模培养生产活性化合物,并对活性成分的次生代谢途径进行了探讨;第三、四、十章对分子亲缘关系、基因工程育种和分子标记技术在药用植物研究中的应用做了较为详细的论述;第八章介绍药用植物快繁技术的进展和应用;第九章对反应器设计与使用以及针对组织培养物的选择依据进行了详细论述;第十一、十二章主要介绍了微生物及菌类发酵培养在药用植物研究中的进展和应用。本书结构严谨流畅,图文并茂,在理论上力求反映本领域的国际前沿,对从事中药生物工程的科研人员有一定的参考价值,也可供从事生物学、植物学和天然产物专业的科研人员参考和使用。

本书的编写,引用了国内外公开发表的学术论文,在此对这些原文作者致以诚挚的谢意。

由于时间仓促及水平有限,书中难免有不尽如人意的地方,诚望读者批评指正。

著 者

2013 年 8 月 1 日

Contents

□ 目 录 □

第一章 概论	1
第一节 中药生物工程的研究内容	1
一、细胞培养.....	1
二、组织和器官培养.....	2
三、快速繁殖.....	4
四、反应器工程.....	5
五、发酵工程.....	5
六、基因工程.....	6
七、分子标记技术.....	6
第二节 中药生物工程的发展方向	6
一、药用植物产业化大规模培养.....	6
二、转基因技术生产次生代谢产物.....	7
三、次生代谢途径的基因工程.....	7
四、分子标记技术.....	7
第二章 药用植物活性成分的次生代谢途径	10
第一节 概述	10
一、植物化学成分与次生代谢产物.....	10
二、次生代谢物的定义、类型及来源.....	10
三、次生代谢物的主要合成途径.....	11
第二节 各类化学成分的次生代谢途径	11
一、萜类.....	11
二、甾体类.....	16
三、苯丙烷类化合物.....	22
四、生物碱.....	27

五、人参皂苷	33
六、基于皂苷的重楼及其近缘属亲缘关系研究	36
第三章 中药资源的分子亲缘关系	54
第一节 概述	54
第二节 中药亲缘关系研究的历史与发展	54
第三节 中药分子亲缘研究意义及基本理论	58
一、中药分子系统及亲缘学研究意义	58
二、中药分子亲缘学研究理论方法	59
第四节 中药分子亲缘关系研究及进展	63
一、药用植物分子系统学研究	63
二、药用植物亲缘关系研究	66
三、药用植物遗传多样性研究	69
四、药用植物分子亲缘地理学研究	73
五、其他方面研究	75
第五节 问题与展望	75
一、存在问题	75
二、展望	76
第四章 药用植物基因工程育种	79
第一节 概述	79
第二节 药用植物基因工程育种一般程序及常用技术	80
一、目的基因的获得	80
二、载体的构建	85
三、DNA 重组用酶	87
四、受体材料的选择	88
五、转基因方法	89
六、转化体的筛选和鉴定	93
七、转化体的安全性评价	94
第三节 基因工程育种在药用植物中的应用	95
一、基因工程育种实例	95
二、药用植物其他常用育种方法	97
第四节 转基因植物的生物安全性及前景	102
一、转基因植物安全性问题	102
二、药用植物转基因育种的前景	104
第五章 药用植物的细胞培养及工业化生产	108
第一节 概述	108

第二节 药用植物愈伤组织的诱导与培养	108
一、愈伤组织的诱导及影响因素	109
二、愈伤组织的生长	110
三、愈伤组织发生的形态学和细胞学	112
第三节 细胞悬浮培养	112
一、培养系统	112
二、悬浮细胞培养周期	113
三、细胞培养的基本程序	114
四、培养设备和装置	115
五、悬浮培养细胞的同步化	117
六、悬浮细胞培养中细胞生长的计算	117
七、影响悬浮培养细胞分散度的因素以及提高细胞分散度的方法	118
八、影响悬浮细胞培养的因素	119
第四节 药用植物细胞培养的工业化生产	121
一、人参细胞悬浮培养及工业化生产人参皂苷	123
二、紫草细胞培养与工业化生产紫草宁	125
三、甘草细胞培养与工业化生产	127
四、西洋参细胞培养与工业化生产	128
第六章 药用植物的大规模器官培养生产活性化合物	137
第一节 概述	137
第二节 药用植物不定根培养	137
一、药用植物不定根培养的方式	138
二、不定根培养周期	142
三、药用植物不定根生产代谢产物研究进展	142
第三节 不定根培养的影响因素	147
一、植物激素对不定根培养的影响	147
二、外植体对不定根培养的影响	147
三、接种量对不定根培养的影响	148
四、蔗糖对不定根培养的影响	148
五、盐强度对不定根培养的影响	149
六、氮源对不定根培养的影响	149
七、磷源对不定根培养的影响	149
八、起始 pH 对不定根培养的影响	150
九、金属离子对不定根培养的影响	150
十、补料对不定根培养的影响	150
第四节 诱导子及前体对次生代谢产物调控的影响	150
一、植物代谢调控	150

二、诱导子	151
三、前体	154
第五节 药用植物不定根培养的工业化生产	156
一、人参不定根培养及工业化生产人参皂苷	156
二、紫锥菊不定根培养及工业化生产咖啡酸及其衍生物	158
三、贯叶连翘不定根培养及工业化生产金丝桃素	159
第六节 药用植物茎、芽培养活性产物	160
一、原球茎培养	161
二、再生植株培养	164
三、胚状体培养	166
第七节 器官培养的展望	169
第七章 药用植物转基因组织和器官培养	172
第一节 概述	172
第二节 研究历史、特点与发展趋势	172
一、发根农杆菌介导的毛状根培养	173
二、根癌农杆菌介导的冠瘿组织的培养	174
三、转基因组织和器官培养存在的问题与发展趋势	174
第三节 药用植物转基因组织和器官培养的主要技术环节	175
一、农杆菌菌种的保存与培养(包括菌种所含质粒的改造)	175
二、药用植物无菌培养体系的建立	175
三、转化(菌种的活化、外植体的选择、接菌方式)	176
四、除菌及筛选	176
五、转化的证实	176
六、转基因组织和器官培养体系的建立	177
七、转基因组织和器官的生长与活性成分积累的调控技术	177
八、摇瓶培养与反应器培养技术	177
第四节 药用植物转基因组织和器官培养的研究与应用	178
一、转基因组织和器官培养的研究	178
二、转基因组织和器官培养的应用	184
第五节 药用植物转基因组织和器官培养的实例	190
一、毛状根培养的实例(丹参)	190
二、冠瘿组织培养的实例(西洋参)	191
三、毛状根与冠瘿组织共培养的实例(Dubiosia 的杂交种与颠茄)	196
四、双转化毛状根培养的实例(桔楼)	199
五、绿色毛状根培养的实例(长春花)	200
第八章 药用植物快速繁殖及大田生产	206
第一节 概述	206

112	第二节 药用植物扦插快繁技术	206
113	一、繁材的选择和预处理	207
113	二、扦插时间	207
120	三、扦插快繁技术在药用植物中的应用举例	208
120	四、注意事项	209
120	第三节 药用植物组织培养快繁技术	210
120	一、材料的选择	210
130	二、芽的诱导和增殖	211
130	三、生根培养	211
130	四、炼苗及移栽	211
130	五、组织培养常见生长调节剂及其主要作用	212
130	六、常用培养基及其配方	212
130	七、组织培养快繁技术的应用	213
130	第四节 药用植物人工种子技术	216
130	一、人工种子的结构	216
130	二、人工种子的制作	217
130	三、体细胞胚的获得和培养	217
130	四、人工种子的应用	218
130	五、人工种子技术存在的主要问题	220
130	第五节 药用植物原生质体培养及融合技术	221
130	一、原生质体的制备	221
130	二、原生质体融合	222
130	三、杂种细胞的筛选和鉴定	222
130	四、原生质体及其融合技术在药用植物快繁中的应用	223
130	第六节 药用植物离体快繁技术的应用及大田生产	225
130	一、药用植物离体快繁技术的应用	225
130	二、药用植物快繁苗的大田生产	227
130	第七节 药用植物离体无性快繁的影响因素和常见问题	232
130	一、影响药用植物离体快繁的主要因素	232
130	二、药用植物快速繁殖的常见问题	233
130	第九章 反应器在药用植物大规模培养中的应用	237
130	第一节 概述	237
130	第二节 反应器的理论基础	237
130	一、反应器的分类	237
130	二、反应器的体积	238
130	三、培养介质的流变学特性	242
130	四、反应器内的多相流动形态及培养液性质	244

五、反应器内的质量传递	244
六、反应器内的热量传递	247
七、反应器内存在的剪切应力问题	247
八、反应器流动模型	250
九、反应器的放大	252
十、过程参数检测与控制	258
第三节 反应器的种类及选择	261
一、植物细胞培养用反应器的设计基本要求	261
二、各类反应器	261
三、反应器的比较与选择	266
四、反应器的放大	267
第十章 中药的 DNA 分子鉴定	269
第一节 概述	269
第二节 中药 DNA 分子鉴定的发展及意义	269
一、传统的中药鉴定方法及存在问题	269
二、DNA 分子标记鉴定的发展	271
三、中药 DNA 分子标记鉴定的目的与意义	273
第三节 常规 DNA 分子标记及在中药鉴定中的应用	274
一、DNA 分子标记鉴定中药材的流程	274
二、中药分子标记鉴定的应用进展	275
第四节 中药 DNA 条形码鉴定	281
一、中药 DNA 条形码鉴定的流程	281
二、中药 DNA 条形码鉴定的研究进展	285
第五节 问题与展望	292
一、DNA 分子标记鉴定中存在的问题	292
二、展望	293
第十一章 微生物技术在中药加工炮制、提取中的应用	297
第一节 概述	297
第二节 微生物发酵在中药炮制中的应用	297
一、中药发酵炮制技术的历史与起源	298
二、发酵炮制中药的品种	298
三、微生物在中药炮制中的作用	299
四、中药发酵炮制加工现状	300
五、存在的问题	303
第三节 微生物在中药活性成分分离提取中的应用	303
一、微生物发酵提取中药有效成分的特点	304

二、酶在中药提取中的应用	304
三、微生物发酵法用于中药提取液的澄清纯化	306
第四节 微生物发酵在中药生物转化中的应用	306
一、黄酮类成分的微生物转化	307
二、生物碱的微生物转化	315
三、萜类化合物的微生物转化	317
四、甾体化合物的微生物转化	324
第五节 微生物技术在中药渣处理中的应用	328
一、利用酶技术对药渣有效成分进行再提取	328
二、利用中药渣生产食用菌	329
三、利用中药渣生产单细胞蛋白	329
四、利用中药渣生产其他生物制品	330
第十二章 菌类药用植物的发酵培养	333
第一节 概述	333
第二节 发酵在菌类药用植物研究中的应用	334
一、菌类药用植物发酵的历史和现状	334
二、发酵在菌类药用植物研究中的作用	335
第三节 菌类药用植物的发酵方式	337
一、固体发酵	337
二、液体发酵	338
三、多种菌种混合液体发酵	339
第四节 菌类药用植物发酵的培养基及培养基的优化	340
一、发酵生产采用的培养基	340
二、培养基的灭菌方式	342
三、发酵培养基的优化	343
第五节 菌类药用植物发酵条件及过程控制	344
一、发酵过程中 pH 的变化与控制	344
二、发酵温度与控制	344
三、发酵过程中溶解氧与控制	345
第六节 菌类药用植物发酵工程菌的选育	347
一、诱变育种	347
二、原生质体融合技术	348
三、杂交育种	349
第七节 冬虫夏草的发酵培养	349
一、冬虫夏草的固体发酵	350
二、冬虫夏草的液体发酵	350
三、冬虫夏草的有效成分及药理作用	352
四、问题与展望	353

第一章 概论

Chapter 1 General Introduction

中药生物技术就是利用生物技术手段,对中药细胞、组织、个体进行改造,以加快繁殖速度、提高产量、改良品质和抗性等的技术。生物技术在医药生产中的应用在我国已有半个多世纪,就药用植物领域而言主要是采用传统生物技术生产许多民间传统的中草药等,始终与人类的健康生活和防病治病息息相关。近年来,随着许多新兴的生物技术应用与开发,促进了医药工业的飞速发展,主要体现在如下几个方面:通过组织培养材料直接生产活性成分;与大田栽培相结合,快速大量繁殖药用植物的种苗;通过大规模培养技术,直接开发有特色的药品、保健品和化妆品(如韩国利用培养的人参不定根开发了系列保健品和化妆品,我国利用虫草发酵开发的补益药物金水宝胶囊以及以人参细胞为主要原料的丁家宜化妆品在国内市场上都有很好的销量);利用基因工程技术对中草药植物资源的改造与改良;利用发酵工程技术将中药加工成商品。中药生物技术正以其独特的优势、潜在的巨大经济效益和社会效益成为世界各国研究的热点。

第一节 中药生物工程的研究内容

一、细胞培养

作为获取高价值次生代谢物的一种手段,植物细胞培养有着广泛的应用前景。表1-1列举了近年通过药用植物细胞培养得到的天然产物。药用植物细胞培养研究的大部分内容是通过高产组织或细胞系的筛选与培养条件的优化等,以期降低成本及提高次生代谢产物的产量,或者通过对次生代谢产物生物合成途径的调控来达到相同的目的,如通过添加诱导子等手段来提高次生代谢产物含量并对次生代谢机制进行深入研究。

表1-1 药用植物细胞培养生产次生代谢产物

产 物	植 物 种 类
甲黄次苷(peruvoside)	黄花夹竹桃(<i>Thevetia peruviana</i>)
没药甾酮(guggulsterone)	没药(<i>Commiphora wightii</i>)
生物碱(total alkaloid),长春花碱(catharanthine),文多灵(vindoline)	长春花(<i>Catharanthus roseus</i>)
云南紫杉烷 C(taxuyunnanine C),紫杉醇(taxol)	中国红豆杉(<i>Taxus chinensis</i>)