

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2020-095

王义翘先生和BPEC对生物化学工程发展的巨大作用

苏志国

(中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100190)

摘要: 王义翘先生是美国麻省理工学院生物技术过程工程中心(BPEC)的创始人。在他的领导下, BPEC通过协同创新和生物化学工程(生化工程)的前沿探索, 取得了显著的成就。(1) 引领了生化工程进入生物制药新时代。与最初的生化工程概念相比, BPEC的重点发生了很大的转变, 目标分子不再局限于抗生素、化学品和燃料等小分子, 而是拓展到抗体、细胞因子、血液蛋白质和疫苗抗原等生物大分子, 解决这些生物药品大规模生产所遇到的工程科学问题。(2) 开启了动物细胞培养工程。当细胞生物学家忙于通过增加滚瓶的数量来扩大生产时, BPEC通过流体力学和传质分析, 最大限度地减少剪切应力和扩散限制, 成功地实现了动物细胞的生物反应器培养, 设计出大规模培养的最佳培养基组成和添加策略, 获得了蛋白质翻译后修饰随时间变化的规律, 提高了动物细胞反应器的目标蛋白质产量。(3) 创新了高质量生物大分子的分离纯化技术, 建立了亲和膜、反胶束、电辅助分离等新方法。利用准弹性光散射技术, 研究了蛋白质的再折叠和聚集机制, 发明了聚乙二醇稳定再折叠中间体的新技术。(4) 建立了生化工程协同创新和人才培养体系, 促进了BPEC成员之间密切合作和与生物技术企业的密切合作, 吸引和培养了众多在生化工程领域有建树的年轻人才。本文还对王义翘先生和BPEC对我国生化工程发展的启示和借鉴做了简要的评述。

关键词: 生化工程; 生物制药; 生物反应器; 生化分离工程; 生化制剂工程

中图分类号: Q819 **文献标志码:** A

Great impact of Professor Daniel I.C. Wang and BPEC on development of biochemical engineering

SU Zhiguo

(The State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract: Professor Daniel I.C. Wang was the founder of the Biotechnology Process Engineering Center (BPEC) at Massachusetts Institute of Technology (MIT). Under his leadership, BPEC has made remarkable achievements. It is a historical monument with great influence on the development of biochemical engineering. The historical background,

收稿日期: 2020-12-31 修回日期: 2021-02-04

基金项目: 国家自然科学基金 (21821005)。

引用本文: 苏志国. 王义翘先生和BPEC对生物化学工程发展的巨大作用[J]. 合成生物学, 2021, 2(4): 470-481

Citation: SU Zhiguo. Great impact of Professor Daniel I.C. Wang and BPEC on development of biochemical engineering[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(4): 470-481

outstanding contributions, innovative mechanisms, and significant impact of BPEC, led by Prof. Wang, were reviewed in this paper. (1) Leading biochemical engineering into a new era of biopharmaceuticals. With the development of genetic engineering in the 1970-1980s, a new era of modern biopharmaceuticals emerged. Professor Wang acutely felt that the production of biomacromolecule medicines by genetic engineering must solve a series of engineering science problems, which was the opportunity and challenge of biochemical engineering. He proposed to the National Science Foundation of the United States (NSF) for establishing BPEC at MIT. It was approved by the NSF in 1985. Compared with the initial concept of biochemical engineering at that time, the focus of BPEC had a great shift. The target molecules were no longer limited to microbial fermentation or bioconversion of antibiotics, chemicals and fuels. The mission of BPEC was to solve the engineering problems encountered by the large-scale production of various protein pharmaceuticals. In doing so, BPEC has successfully led biochemical engineering into the new era of biopharmaceuticals and established a unique position in the development of modern biotechnology. (2) Launching animal cell culture engineering. Animal cell culture is required for production of very complex biomacromolecules. While cell biologists were busy to scale up production by increasing the number of roller bottles, BPEC started engineering approach by design of bioreactors and control strategies. Successful bioreactor cultivation of mammalian cells was realized by minimization of shear stress and diffusion limitation. The culture nutritional composition was optimized by stoichiometric calculation. The strategy of nutritional medium addition was set up by metabolism analysis. Through intelligent cell culture control strategy and optimized reactor configuration, post-translational modification of the target protein was controlled at the optimal level to effectively avoid the loss of target protein. (3) Innovating separation and purification techniques for high quality biomacromolecules. Prof. Wang is one of the pioneers of biochemical separation engineering. He proposed biochemical separation engineering as another main direction of BPEC. Novel approaches such as affinity membrane, reversed micelles, electric-assisted separation were set up. He and his students discovered the mechanisms of protein refolding and aggregation. Using quasi-elastic light scattering technique, they were able to invent a novel technique of stabilizing refolding intermediates with polyethylene glycol. The smart work was published in *Nature Biotechnology*, and initiated various approaches of protein stabilization by different research groups. (4) Establishing a collaborative innovation and education system for biochemical engineering talents. Prof. Wang actively promoted the spirit of collaborative innovation, encouraged close collaborations among BPEC members, worked closely with biotechnology enterprises, and held lectures on downstream processing courses for R & D personnel of biotechnology companies in the US and other parts of the world. BPEC also attracted many young talents worldwide. Prof. Wang made the academic atmosphere of BPEC extremely active. The scientific exchange brought about brain storming to solve scientific and engineering problems. Numerous graduates and visiting scholars from BPEC have become successful professionals and entrepreneurs. (5) The influence of Prof. Wang and BPEC on biochemical engineering development in China. The influence of Prof. Wang and BPEC on biochemical engineering in China is the spirit of innovation. This spirit has been embodied to the strategic planning of the key laboratories and research directions from bioreactor to biocatalysis, from biological separation/purification to bioformulation, from equipment, media, and technologies to intelligent scale up productions. Biochemical engineering has become the support for sustainable development of life science and biotechnology in this country. Not only that, biochemical engineering researchers have integrated themselves into synthetic biology, gene editing, vaccine development and other frontier life science research, playing increasingly important roles.

Keywords: biochemical engineering; biopharmaceuticals; bioreactors; bioseparation; bioformulation

2020年9月2日，麻省理工学院（MIT）发布讣告，生物化学工程先驱、MIT的学院教授（Institute Professor）王义翘（Daniel I.C. Wang）先生

离世，终年84岁。MIT在讣告中，特地提到了王义翘先生创建MIT生物技术过程工程中心（Biotechnology Process Engineering Center, BPEC）这

一重大贡献，因为BPEC的创建、运行和成功凝聚着王义翘先生的智慧、心血和成果，是一座在美国乃至世界生物技术发展中有重大影响的历史丰碑^[1]。

我于1990—1992年在MIT BPEC作访问学者，亲身体会到王义翘先生的远见卓识、敢为人先的精神理念、广阔深厚的专业功底，以及他领导下BPEC的尖端研究、协同创新、浓厚氛围与合作机遇，受益匪浅，并给予我后面的科研生涯和担任国家重点实验室主任工作以重大的影响。值此纪念王义翘先生之际，我从自己的视角记叙和评论BPEC的历史背景、突出贡献、创新机制和产生的影响，希望能让同行更多了解王先生的巨大贡献，汲取其中有参考价值的内涵。

1 引领生物化学工程进入生物制药新时代

生物化学工程（简称生化工程）学科起源于20世纪60年代，最初的侧重点是将化学工程技术应用于抗生素、食品和生物基化学品的发酵生产。随着70~80年代化石资源紧缺现象的出现，采用微生物和酶催化转化木质纤维素等可再生资源为生物燃料成为生化工程研究的热点。一些高校和科研单位相继建立了生物质转化研究中心，例如美国普渡大学在1978年就建立了著名的可再生资源工程实验室（LORRE），对农作物废弃物如秸秆纤维素转化为清洁能源开展了系统的研究。

但与此同时，生物领域基因工程的发展日新月异，一大批以前只能靠从天然组织或细胞中提取的生物大分子药物如疫苗抗原、蛋白质、细胞因子、多肽、核酸等，可以通过基因工程改造动物、植物和微生物细胞，然后通过大规模细胞培养获得，从而开辟了生物制药的新时代。很遗憾的是这一令人振奋的领域最初却没有工程科学家的参与。例如，由生物学家和投资人兴办的一些生物高技术公司采用的动物细胞培养方法是一个个装有细胞和培养液的瓶子，即所谓的“滚瓶”，其材料、设备和人工成本非常高，生产效率低下，还容易受到污染，批次重复性和产品质量难以保证。

当时，王义翘先生作为著名的生化工程教授，已经在微生物发酵领域取得了令人瞩目的成果，但他敏锐地感觉到，用基因工程方法生产生物大分子药物必须解决一系列前所未有的工程科学问题，这正是生化工程的机遇和挑战。在他的积极申请和推动下，美国国家基金会（NSF）1985年批准了麻省理工学院建立BPEC，成为世界上第1个由国家基金会资助的生化工程研究平台^[2]。

相比当时生化工程的主流观念，BPEC的设计思想有很大的转变。如前所述，20世纪80年代初的生化工程是化学工程的一部分，其主流是通过微生物和酶催化的方法，利用可再生资源来生产能源和化学品，解决石油煤炭日益紧张带来的巨大资源压力。但是，BPEC瞄准的主要是生物大分子，进入的是生物制药领域，在很多化工学者看来多少有些意外，甚至认为名不正言不顺。另一方面，生物领域的很多专家也持怀疑态度，他们认为化学工程师不懂生物，不懂生物制药，不适合加入基因工程药物的研发大军。对此，王义翘先生领导BPEC，用一系列的重大发现和发明论证了生化工程在基因工程药物开发中的重大作用，确立了生化工程在生物技术中独特的地位，即不仅研究化学产品的制造，还要研究包括蛋白质这样复杂生物药品的制造，而且其贡献不可替代。

2 开启动物细胞大规模培养工程的研究

笔者开始在MIT作访问学者的时候，BPEC已经运行5年，渡过了最困难的起步阶段，多项研究已经取得了重要进展，其中令我印象最深刻的是动物细胞培养工程。

对当时大多数生化工程研究者来说，动物细胞培养似乎遥不可及，因为动物细胞比微生物细胞复杂，需要更多的细胞生物学知识。动物细胞株的获得也比微生物菌株困难，特别是基因克隆表达方面还有大量未知的因素，技术上也远不成熟。还有一个非常重要的问题是，动物细胞培养需要昂贵的设备、材料、营养（培养基）和环境，工程科学研究需要进行规模放大，需要的硬件和材料远远超过细胞生物学的尺度和数量，没有经费上的重大投入几乎是不可能的。相比之下，

研究基因工程微生物细胞的培养已具有很好的条件，并且工业部门也在开发相应的产品，有比较多的合作意向和需要解决的问题。除此之外，还有人推测微生物细胞由于各种培养上的优点可以取代动物细胞作为基因工程产品的生产载体，没有必要去研究成本非常高的动物细胞培养工程。

我第一次拜会王义翘先生的时候，就问了他上面提到的问题。他回答说：你说的确实是当今大多数生化工程研究者的观点；但是作为一名学者，不能光看现在，要看长远。动物细胞虽然相比微生物细胞培养更为困难，但大量结构复杂的蛋白质难以用大肠杆菌通过基因工程表达，只有通过动物细胞表达才能成功。例如，促红细胞生成素只有用动物细胞才能做出具有生物活性的产品。但是动物细胞的大规模生产必须由化学工程师设计才能完成，因为这其中涉及更为复杂的反应控制，是前所未有的挑战，用生物反应器取代滚瓶将是激动人心和令人鼓舞的研究领域。关于经费问题，BPEC除了从NSF获得资助外，很大部分的研究经费来源于制药公司和生物技术企业，因为他们感觉到了动物细胞培养的重要和面临的难题，需要化学工程师的加入。所以，BPEC现在需要的是人才、强有力的团队和科学与技术上的创新，拿出扎扎实实的动物细胞培养工程研究的结果。

王先生在几次接待我国访问团和学者的时候都谈了上述观点，令我印象深刻。将动物细胞培养工程作为工程中心研究的重点，通过生物、化学和工程学的交叉、融合进行创新，是BPEC的亮点和成功之处。表1列出了王义翘先生指导的有关动物细胞规模化培养工程的几篇有代表性的研究生学位论文或发表的文章。

这些研究设计精心，衔接紧密，框架清晰，可以归纳为3个主要方面：

(1) 将化学工程的研究方法和理念应用于动物细胞培养中的流体力学分析，由此确定剪切环境对于动物细胞培养的作用和影响。其中胡维硕(Hu W. S.)的论文第1次对贴壁动物细胞在生物反应器中所受的传质影响和液相剪切影响进行了分析^[3]，阐述了在大规模培养中动物细胞出现死亡问题的原因。而邱紫文(Chiou T. W.)^[4]的论文则从细胞固定化反应器设计着手，通过纤维床的设计，使得贴壁动物细胞有效地与纤维进行接触，依附于纤维来保护自己免于液相剪切力的伤害，解决了以往贴壁细胞在反应器中失活的难题。

(2) 将化学计量学的思维和概念应用于动物细胞培养中营养成分的设计，将培养基组成与最终细胞组分和代谢产物的关联分析，成功建立了动物细胞培养过程中化学计量学方法的理念和方法。这项研究对后来无血清培养基的设计至关重要，而无血清培养基的设计是近年来动物细胞培养的一次革命。这项研究主要由谢良志(Xie L. Z.)完成^[5]。他从细胞培养代谢的过程出发，设计了类似于微生物次生代谢产物控制的分批补料培养方法，将动物细胞反应器控制提高到代谢工程的水平^[6]，为生物技术工业部门进行动物细胞培养过程控制补料策略奠定了基础。

(3) 将过程科学中的动态分析方法应用于反应器中的动物细胞培养，获得了蛋白质翻译后修饰随时间变化的规律。与以往实验室培养动物细胞的器皿不同，在生物反应器内，细胞受到各种剪切和营养限制，会导致部分细胞发生突变，产生糖基化不均一的蛋白质产物。王先生的团队发现糖基化受三羧酸循环活性(TCA cycle activity)的影响，但不受糖酵解(glycolysis)的影响，控制核苷酸糖的浓度是获得均一糖基化的关键。这项研究是王先生指导博士生Nyberg G.完成的^[7]。他们通过智能化动

表1 王义翘先生指导的有关动物细胞规模化培养工程有代表性的研究

Tab. 1 Representative research on large-scale culture of animal cells under guidance of Prof. Wang

Prof. Wang's student	Year of graduation / publication	Research project or topic	Reference
Hu W. S.	1986	Use of surface impeller to improve oxygen transfer in cell culture	[3]
Chiou T. W.	1990	A fiber-bed bioreactor for anchorage-dependent animal cell cultures	[4]
Xie L. Z.	1997	Stoichiometric medium design and nutritional control in fed-batch cultivation of animal cells	[5-6]
Nyberg G.	1998	Glycosylation site occupancy heterogeneity in Chinese hamster ovary cell culture	[7]

物细胞培养控制策略和优化的反应器设计,将核苷酸糖(nucleotide sugar)浓度控制在优化的水平上,有效避免或减少目标蛋白质的损失。

从以上3个方面可以看出王先生独具匠心的设计。虽然细胞生物学家已经做了大量动物细胞培养的研究,但却缺少规模化条件下和动态条件下的探索。动物细胞大规模培养需要生物反应器,而反应器不同于培养皿和滚瓶,存在着时空多尺度效应。王先生带领BPEC从反应器流体力学分析开始,进入规模化反应器的理性设计;从培养基组分与细胞组成和代谢的对应分析,进入微观结构规律的考察;从环境变化的作用进入到基因和代谢层次的影响,发现导致糖基化不均匀的影响因素。整个研究框架实现了从基因到产品整个过程的系统化,构建了动物细胞培养工程的理论研究和技术开发的平台。

图1是王先生指导邱紫文在1990年设计的动物细胞纤维床反应器^[4]。从中可以看出,设计者充分利用气升环流生物反应器的构思,将反应器分为两个区域:中心提升管为供氧区,这里可以通过气体喷嘴的设计提升液体流动并向液体供氧;反应器的环隙为细胞生长区,这里动物细胞固定在有机纤维上,避免直接通入气泡造成的损伤,同时又能从向下流动的培养液中获得溶解氧。这项研究得到很多生物技术公司的重视,也得到了生物反应器制造厂家的重视。在纤维床的基础上,各种新型的固定化动物细胞反应器得到了迅速的发展。

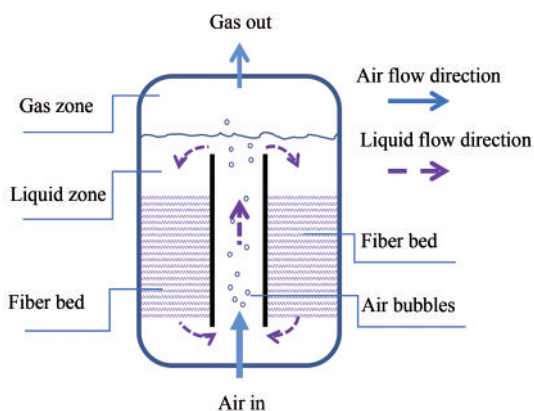


图1 王义翘先生指导研究生设计的培养动物细胞的纤维床反应器

Fig. 1 Fiber bed bioreactor for animal cell culture that was designed by Prof. Daniel Wang and his students

多年以后,动物细胞大规模培养已经取代了基因工程微生物菌体培养的地位,成为生物制药工程界最重要的方向和创新主流,特别是用中国仓鼠卵(CHO)细胞生产的多个单克隆抗体药物,销售额已经全面超过化学药物,进入全球药物市场的前列。动物细胞大规模培养从最初的滚瓶、微球载体培养,发展到流加、灌注培养,从有载体培养发展到无载体悬浮培养,再到各种一次性反应袋培养和膜分离耦合培养,成为生化工程最活跃的研发领域^[8]。而这一切进展的科学基础,离不开BPEC在20世纪90年代到本世纪初开发的一系列动物细胞培养工程和理论,例如反应器内剪切力对动物细胞的作用,动物细胞在反应器内的代谢,培养基组分的动态需求与供给,时空条件下基因表达与糖基化的规律等。

3 激发生物大分子分离纯化工程的创新思维

生物化学工程最明显的特点之一是主要研究对象为超大的生物分子如各种酶、蛋白质药物、核酸药物、疫苗等。采用基因工程,细胞工程以及近年来的合成生物学工程等手段,已经能够在各种细胞或组织中表达生产这些生物大分子。但是从细胞和组织培养液中获得纯净的生物大分子需要进行一系列的分离纯化,去除各种各样的杂质,包括杂蛋白、宿主核酸、脂多糖(热原)以及其他容易引起免疫反应或副作用的组分。特别是用于医药工程的疫苗、抗体、细胞因子等,对安全性的要求极高,必须达到高纯度高活性。因此分离纯化的成本常常占整个生物大分子生产成本的70%~90%。

在化学工程中,分离工程被认为是最重要也是研究最多的领域之一。但是对于生物大分子来说,其空间或三维立体结构容易发生变化,导致生物活性的丧失。因此,加热精馏、有机溶剂萃取、蒸发结晶这类化工中常用的分离手段在大分子生物化工中几乎无法应用,但各种尺度的过滤(膜分离)、色谱分离(蛋白质色谱)却大量使用。同时,还需要一些新的单元操作,如细胞破碎、

蛋白质折叠、蛋白质修饰与组装等，但是这些生物工业操作最初是从生物化学家建立的实验室方法直接拓展的，并没有上升到工程科学的水平。

王义翘先生是生化分离工程的开拓者之一。他很早就研究过用化工中泡沫浮选的方法从微生物发酵液中分离蛋白质^[9]。建立BPEC以后，他积极主张将生化分离工程作为动物细胞培养工程以外的另一个主攻方向，其中一个侧重点就是蛋白质的重新折叠（refolding）。这实际上也与生物产业的需求密切相关，因为在当时除了动物细胞表达基因工程产品以外，用大肠杆菌表达基因工程蛋白质生产细胞因子正如火如荼地展开。但是大肠杆菌系统一个致命缺点是目标蛋白质很容易聚集在一起形成一种被称为包涵体（inclusion body）的无活性颗粒。而要获得有活性的蛋白质，必须用变性剂对包涵体进行溶解，再通过各种手段去除变性剂，让蛋白质重新折叠成有活性的三维结构形式。但重新折叠的过程常常形成错误折叠和絮凝体沉淀，使得活性蛋白质的收率大大下降，而这其中的规律尚不知晓。

王先生指导研究生Cleland进行蛋白质折叠规律的研究。他们很聪明地选择了牛碳酸酐酶作为研究对象，因为这个酶没有二硫键，省略了二硫键存在下进行折叠引起的麻烦，从而有利于探索蛋白质折叠恢复活性的动力学。与生物学家的探索不同，他们采用了化学动力学的方法探索在折叠产物形成的路途中存在的各种中间体 [I]，如图2所示。其中 [I₁]、[I₂]、[I₃] 代表不同的中间体。这些中间体不稳定，可能变成错误折叠，而

错误折叠和中间体也容易聚集。聚集体增多到一定阶段溶液出现浑浊，生成蛋白质絮凝物发生沉淀，是折叠失败的主要原因。因此，他们提出了稳定中间体、避免错误折叠和聚集体产生的策略。其中的一个发明就是用聚乙二醇作为保护剂。他们发现，聚乙二醇分子能够与碳酸酐酶折叠过程中的中间体形成相互作用，导致中间体被稳定。这种稳定作用与聚乙二醇的浓度和分子量相关。在有盐酸胍变性剂存在的条件下，低浓度的聚乙二醇可以有效减少聚集体的形成。采用聚乙二醇为保护剂，他们不仅成功折叠了碳酸酐酶，还成功折叠了核糖核酸酶RNase，组织纤溶酶原激活剂tPA和γ-干扰素^[10]。

这项创新成果发表在 *Nature Biotechnology* 上^[11]。由于这个期刊的读者有很多生物学家和基因工程学家，亦有很多生物技术公司的研究人员，所以产生了非同一般的影响。蛋白质折叠在历史上是生物化学家的研究领域，生物技术企业遇到包涵体蛋白质折叠的难题时习惯上也是找生物化学家来解决。但是工业大生产的条件与实验室的容器操作差距很大，如何控制好局部蛋白质和变性剂的浓度至关重要，化学工程师则擅长处理这方面的难题，而MIT建立的聚乙二醇辅助蛋白质折叠的策略更适合大规模操作。因此，各种辅助蛋白质折叠的人工“伴侣”（保护剂）随后被生化工程师挖掘和开发，应用于包涵体蛋白质的折叠复性，解决了多种基因工程蛋白质的制备难题，并将蛋白质折叠复性发展成为生物化工的一项独特的单元操作^[12-13]。

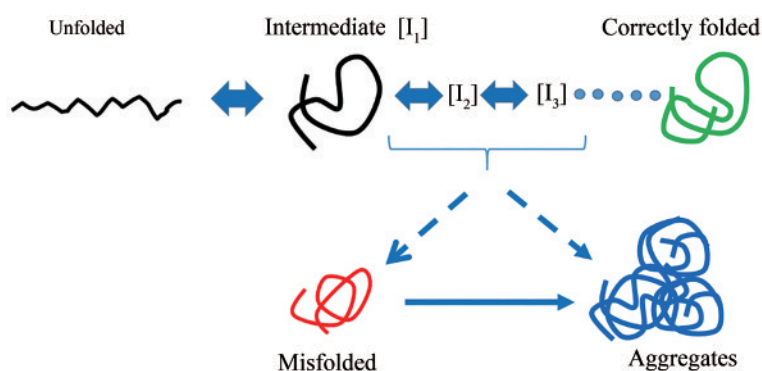


图2 蛋白质折叠过程机理：中间产物的存在及其形成错误折叠和聚集的可能

Fig. 2 Process mechanism of protein refolding: formation of intermediates and possibility of misfolding and aggregation

4 建立协同创新体系，推动生化工程成果转化和人才培养

4.1 BPEC是麻省理工学院教授合作创新的平台

BPEC能取得成功，与王义翘先生积极倡导的协同创新精神密切相关。在他的组织下，BPEC汇聚了MIT一批杰出科学家，例如：生物医学工程专家、血液透析膜理论奠基人Clark K. Colton，代谢工程专家、在合成生物学领域做出重大贡献的Gregory Stephanopoulos，工业微生物学先驱、青霉素和头孢菌素生物合成途径的发现者Arnold Demain，蛋白质学专家、NIH MERIT奖获得者Jonathan King，分离基因的发现者、1993年诺贝尔医学奖获得者Philip Sharp等。虽然他们都有各自的研究方向，但通过BPEC平台使他们得以关注生化工程，结合各自的强项，开展协同创新，使MIT的生命科学和生物技术研究领先于同行，极大推动了美国生物制药工程科学的迅猛发展。

王先生以身作则，积极与BPEC的教授们合作，例如与电化学专家Alan Grodzinsky教授合作将电化学方法第一次应用于动物细胞大规模培养中^[14]，与生物系蛋白质专家Jonathan King教授合作阐述蛋白质聚集体的形成机制^[15]，与代谢工程专家Gregory Stephanopoulos教授合作研究动物细胞培养过程代谢通路变化的规律等^[16]。

这里介绍一个具体的合作实例。前面提到的蛋白质折叠复性研究取得了重大进展，其中就包括了王先生与BPEC其他教授的合作。一个典型的例子是对于有二硫键蛋白质的体外折叠，采用Cleland的PEG保护法难以解决二硫键错配造成的

失败。对此，王义翘先生与胶体化工专家Alan Hatton教授合作，发明了一个新的蛋白质折叠过程——反胶团折叠^[17]，如图3所示。

该过程使用化工萃取中的反胶团（reversed micelles）体系装载变性的蛋白质，让变性的蛋白质分子通过胶团彼此分离，独立地重新折叠。这些反胶团是由表面活性剂AOT稳定的水相液滴，悬浮在异辛烷中。通过调整条件，使每个反胶团只装载一个蛋白质分子，而不会与其他蛋白质发生作用而产生聚集。以牛胰核糖核酸酶A（RNase A）为模型体系，验证该创新思维的可行性。结果表明，变性的RNase A可以从含有盐酸胍的缓冲溶液中转移到反胶团中（图3第1个箭头），实现胶团溶液对蛋白质的稳定包裹。然后，通过与不含变性剂的水溶液接触，反胶束中的变性剂浓度降低，变性的蛋白质开始进行自我折叠（图3第2个箭头），但仍然保留在胶团中。经过24 h，反胶团中的蛋白质全部折叠为与天然酶相近的三维结构，加入谷胱甘肽还原和氧化试剂，分子内部重新形成了二硫键，恢复了天然的生物活性。此时通过将反胶团与1.0 mol/L KCl水溶液接触，恢复了天然生物活性的RNase A就从反胶团进入到水溶液中（图3第3个箭头），完成了整个折叠的单元操作。

反胶团折叠变性的蛋白质是BPEC在生物大分子分离纯化工程领域又一个创新。虽然由于蛋白质和蛋白质之间、表面活性剂和蛋白质之间的作用导致折叠过程收率低等原因^[2]，这项创新迄今为止还没有被生物工业采用，但它基于折叠过程动力学建立的隔离每个蛋白质分子、避免多个蛋白质彼此接触发生分子间二硫键聚集的巧妙思维一直影响着生化分离科学和技术的研究。

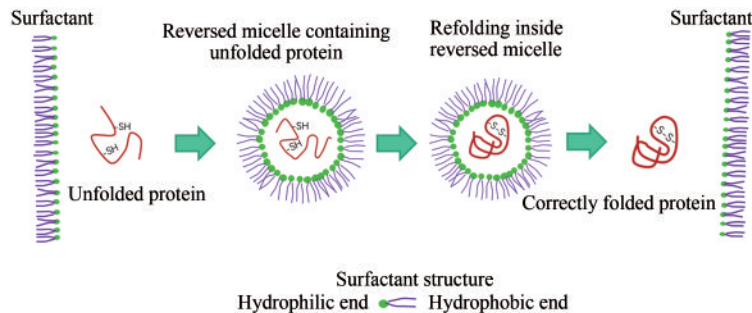


图3 反胶团折叠蛋白质的过程设计

Fig. 3 Process design of protein refolding in a reversed micelle

4.2 BPEC 与生物技术企业的紧密合作促进成果转化

王义翘先生非常重视与生物技术企业开展紧密的合作，将这种合作作为 BPEC 发展的特色之一。经常有来自生物技术公司如 Genentech、Amgen、Biogen、Sepracor、Genzyme 的专家到 BPEC 考察并做学术交流。很多 BPEC 教授也是这些合作公司的顾问或参与者。例如，王先生本人就是 Biogen 公司科学委员会的起始成员 (original member)，对该公司成功生产复杂生物药起了重要作用，该公司已成为美国最著名的生物制药公司之一。BPEC 的生化工程基础研究也得到各大生物技术公司的认可和积极支持，他们将工业化遇到的难点和困难进行反馈，BPEC 从中提取关键基础科学问题进行研究，不仅使成果得到了应用，而且使学术探索与生物技术工业的前沿紧密结合。

我在 BPEC 的课题就是一项与工业部门紧密结合的研究。这项研究是关于亲和膜的特性，是膜分离向生物吸附分离的发展，其创新的思路是在膜表面偶联上亲和配基，用于选择性吸附溶液中的生物大分子。这项研究是与 Sepracor 公司合作开展的。Sepracor 公司正在投资生产亲和膜，希望将这一新技术产品应用到工业部门，急需解决亲和膜相关的科学问题，包括分离机理、控制因素、过程模型和自动化控制等。Colton 教授是我的直接领导者，他获得了 NSF 对这项研究的资助，并且充分信任我，给我配置研究助手，先后有来自德国的研究生 Gregor Daun^[18]、来自法国的博士后 Catherine Charcosset^[19] 和来自印度并刚刚获得美国西北大学博士学位的 Sujatha Karoor^[20] 与我一起工作。我还多次到 Sepracor 公司，利用那里的设施和条件开展实验，并与那里的科研人员进行交流。

我们的研究取得了一系列的新发现和新发展：以 Protein A 作为配基成功实现对稀溶液中单抗的捕捉，吸附效率远超过亲和色谱；第一次考察和表征了中空纤维微孔膜偶联 Protein A 前后的结构变化和配基分布，采用透过曲线分析法建立吸附模型并用贝塞尔函数解析了模型的偏微分方程，得到了理论透过曲线^[21]。图 4 是我们当时提出的

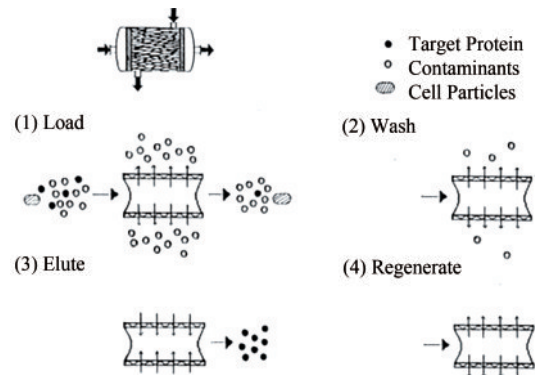


图 4 亲和膜吸附分离蛋白质基本原理和操作

Fig. 4 Principle and operation of affinity membrane for adsorption separation of proteins

亲和膜分离的概念，其原理是微孔膜作为载体的亲和吸附，和亲和色谱一样包括进料、淋洗、洗脱和再生。亲和膜作为膜分离科学的研究对象，20 多年来已经取得了许多重要进展，例如其快速吸附的性能已经在生物体液选择性清除有害物质中获得了应用^[22]。

我在 BPEC 报告亲和膜研究进展时候得到王义翘先生的好评。他提出了几个很好的建议，例如与亲和色谱作比较要注意浓度的选择，在建立模型的时候要考虑微孔膜的不均匀性，要重视亲和膜中膜污染的预防等。他还向 Charles Cooney 教授推荐我参加了 BPEC 组织的生物技术下游工艺 (Downstream Processing) 课程的助教工作，使我有机会与担任授课人的国际知名蛋白质分离纯化专家联系和交流，并结识了前来听课的美国生物技术企业的一些研发人员，从中学习到很多生物技术工业生产方面的知识。值得说明的是，下游工艺课程的设立也是王义翘先生加强与生物技术企业合作的一个举措，他是该系列课程的策划人之一，并担任破碎细胞和蛋白质折叠复性课程的主讲。

4.3 BPEC 是世界生化工程杰出人才培养的基地

20 世纪 80~90 年代是生化工程迅速崛起的时期。王义翘先生创建生物技术过程工程中心，在生物小分子研究的基础上拓展到生物大分子制药工程，吸引了大量青年人才到 BPEC 攻读研究生，也吸引了世界各地生化工程学者访问进修。优秀

的人才，前沿的课题加上杰出的教授，使BPEC的学术氛围异常活跃，产生的大脑风暴（brain storming）激发了创新的火花，使得许多科学难题被攻破，一批生化工程人才脱颖而出走向世界^[23]。在王先生担任主任的15年间，BPEC获得了博士和硕士学位的研究生数百人，各种时间段的访问学者近千。

王先生既是一位著名科学家，也是一位杰出的教育家。在他手下攻读学位的研究生都盛赞他学术严谨，和蔼可亲，教育有方。他指导的研究生毕业以后成绩斐然，有的在生化工程研究和教学取得了丰硕的成果，如美国明尼苏达大学的胡维硕（Hu Wei-Shou）教授、加拿大UBC的James Piret教授、美国佐治亚理工学院的Andreas Bommarius教授等；有的投身工业界在科技转化和产品开发上做出突出贡献，如美国博大公司（PerSeptive）的创始人、现Moderna公司（新冠mRNA疫苗开发者）董事、旗舰先驱公司（Flagship Pioneering）总裁Noubar Afeyan，北京神州细胞生物技术集团股份有限公司董事长兼总经理、北京义翘神州科技股份有限公司董事长、北京协和医科大学细胞工程研发中心主任谢良志等。

王先生不仅对自己的学生认真负责，而且对所有BPEC的学生和学者都一视同仁，给予亲切的关心和指导。一个典型例子是研究生Arun Chandavarkar的论文工作。

Arun的课题是蛋白质对微孔膜污染的动力学^[24]。微孔膜分离经常用于从蛋白质溶液中去除细胞和细胞碎片。由于微孔膜的孔道一般为0.1~0.45 μm，细胞和细胞碎片为微米级（1~20 μm），蛋白质分子尺寸是纳米级，因此蛋白质将穿过微孔膜。但是在大规模生产中却出现蛋白质被微孔膜截留、膜受到严重污染的情况。

Arun的导师是生物过程工程专家Charles Cooney教授，论文指导小组包括Clark Colton、William Dean、Gregory Stephanopoulos、Martin Yarmush等国际著名的膜分离、传质、反应和蛋白质科学专家。他们的高水平指导和Arun的才智与勤奋结合，获得了一系列新发现。如图5所示，其中（a）是用蠕动泵将含有牛血清白蛋白的溶液打循环，然后用0.2 μm的膜过滤不同循环时间的蛋白质溶液[图5(b)]。其结果如图5(c)所示，在没有经过泵循环时，获得的滤液和时间接近成正比；但是用泵循环5min以后再进行膜过滤的时候，就发现过滤速度迅速下降并产生了膜堵塞。但是Arun面临的一个关键问题是，堵塞微孔膜的罪魁祸首到底是什么，怎样去发现与表征？

王义翘先生虽然不是Arun的导师，也不是论文指导小组的成员，但他几乎每次都参加BPEC的午饭讨论会（BPEC内部的一种学术交流），熟悉每个研究组的进展并给予学术指导。对于Arun面临的难题，王先生推断在泵输送蛋白质溶液的过程中有超大的蛋白质聚集体产生，堵塞了膜孔道，是造成flux下降的罪魁祸首。王先生建议采用准弹性光散射（quasi-elastic light scattering, QLS）方法来测定溶液中蛋白质聚集体的形成，再结合还原型和非还原型电泳分析来确定聚集体生成的动力学。这个建议很有创意，因为如果单纯采用传统的电泳分析，只能确定白蛋白的二聚体或三聚体，但很难确定多聚体的存在。超速离心或蛋白质色谱可以证明聚集体存在，但在分析过程中容易造成聚集体的破坏。而QLS采用激光技术，不会造成聚集体的裂解，可以很快计算出溶液中出现的蛋白质聚集体的尺寸和数量，是一种先进、快速和相对准确的方法。

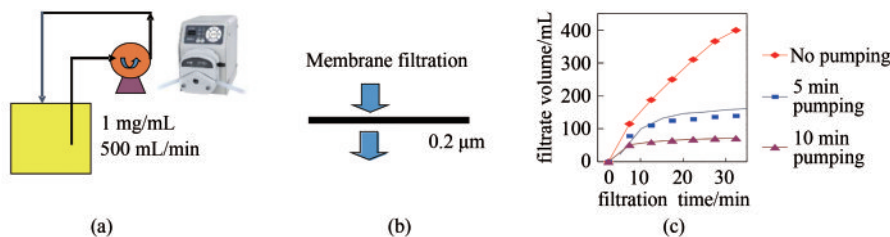


图5 不含细胞的纯蛋白质溶液通过微孔膜产生的过滤速度下降

Fig. 5 Flux decline of cell-free protein solution through a microporous membrane

在王先生的支持下，Arun掌握了QLS技术，将其应用于微孔膜堵塞机理的研究，终于获得突破。他发现不同的泵送系统和不同的膜分离模式对形成蛋白质聚集体影响非常大。工业部门常用的泵送系统容易使蛋白质溶液产生聚集体，泵送的次数越多、时间越长，溶液中的聚集体数量就越多。由于聚集体的本质是一种无规则的絮凝体，尺寸不仅大于微孔膜的孔道，而且由于其胶体的特性极易堵塞孔道并在膜表面形成浓度极化层。尽管形成的蛋白质絮凝体还不到全部蛋白质的5%，但却足以使膜过滤通量迅速下降。此外，失活的蛋白质等于增加了杂质的含量，给质量控制带来了麻烦。通过合理设计膜分离过程的设备、流程和操作模式，不仅可以避免膜分离过程中的污染现象，提高生产的效率，而且可以避免或减少蛋白质絮凝体的形成，确保产品的质量和安全性。

Arun的研究结果得到了答辩委员会专家的肯定和好评，获得了博士学位。由于BPEC与美国生物技术工业的紧密联系，他的研究结果也得到了各大生物制药公司的重视。这些公司的研究团队迅速采取相应的技术措施，改进膜分离过程的工艺设计，解决了以往效率低的技术瓶颈，减少了蛋白质溶液的失活，提升了过程的经济性和安全性。Arun在博士论文的致谢中写到：Professor Daniel Wang, although not on my thesis committee, was a great source of inspiration with his many thought provoking questions during the weekly group seminars^[24]。

可以说，卓越的人才培养业绩是王义翘先生生平的另一座丰碑，其高度和创建BPEC一样。因此MIT在讣告中用了这样的副标题：Longtime MIT professor launched the Biotechnology Process Engineering Center and influenced generations of students^[1]。

5 对我国生物过程科学技术发展的影响和启示

我国生物技术在20世纪80年代起步。国家高技术研究发展计划（863计划）将生物技术作为重点，

推动了国际交流合作，90年代赴美访问留学人数迅速增加。BPEC作为美国国家基金会资助的生物过程科技研发的重点单位，吸引了很多中国学者的注意。笔者在BPEC期间曾帮助联系我国生物代表团和一些个人的参观和访问，得到王义翘先生的大力支持。尽管工作非常繁忙，他总是抽出时间来接待我国来访者，介绍BPEC的发展经验和成果，回答客人感兴趣的问题，了解和倾听我国生物技术的进展，推荐MIT的相关教授和美国生物技术研究的重点大学、研究所和公司等，使来访者受益匪浅。从90年代开始，在BPEC从事研究的中国访问学生和研究生逐渐增加，他们中多数人学成之后回国效力，成为我国生物技术发展的中坚力量。

BPEC的成功经验为我国生物技术的发展起到了重要的参考和借鉴作用。由于麻省理工学院是美国大学化学工程教育和科研的发源地，我国化工界历来重视他们的科研动向。生物工程在国际上的兴起，MIT得到NSF的资助建立了BPEC，促进了我国化工领域科学研究向生物工程倾斜。各大化工院校和科研院所都对生物工程进行了布局。20世纪80年代，中国科学院化工冶金研究所（现过程工程研究所）所长、国际著名化工专家郭慕孙先生联合上海细胞生物化学研究所著名细胞生物学家施履吉先生向中科院、国家科委和国家计委提出建立生化工程国家重点实验室的建议；同期，华东化工学院（现华东理工大学）我国生物工程先驱者俞俊棠教授向国家教委、国家科委和国家计委提出建立生物反应器工程重点实验室的建议。这两项建议在1988年得到批准，国家计委将“生化工程国家重点实验室”和“生物反应器工程国家重点实验室”列入全国国家重点实验室建设的名单。各个重点高校化工学院也相继建立了生物工程（现生物工程）专业，一批省部级重点实验室如生物工程、工业生物催化、系统生物工程等获得了中科院、教育部和地方政府的支持。这些重点实验室在建立和发展中，都非常重视汲取同行成功的经验，BPEC作为国际领先的科研单位无疑是重点学习的对象，而我国的重点实验室在学习同行的同时，也突出了国家需求和与时俱进，强调了工程科学的创新。

生化工程国家重点实验室的建设和发展具有一定的代表意义。老一辈科学家积极推动生化工程的建设,申请到了国家重点实验室,但如何开展创新研究,却需要后继者进行努力。生化工程国家重点实验室和BPEC的定位相同,都是侧重于过程工程(process engineering),从基础到应用,从原料到产品,解决生物技术工业化的工艺、技术、装备、质量和经济性等关键科学问题。但在研究的大方向上,生化工程国家重点实验室除了生化反应工程和生化分离工程外,还包括了生化制剂工程。如图6所示,生化反应工程、生化分离工程和生化制剂工程是一个接力型的整体,包括了从原料到产品的整个过程。BPEC在布局上没有考虑制剂工程,可能是由于当时MIT化工系还有Robert Langer领导的专门从事各种缓释、控释技术的实验室,已经在国际上处于领先地位。对于我国来讲,制剂工程非常急需,而且与反应工程和分离工程相互连接。重点实验室将生化制剂工程作为主要方向之一,反映了国际前沿和国家需求,也便于向同行学习和提升。事实证明,这个研究方向的布局非常正确,已经取得了突飞猛进的发展^[25-26]。

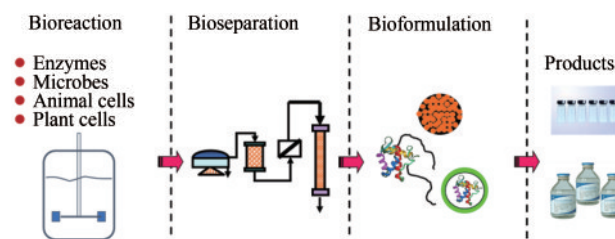


图6 生化工程国家重点实验室科研方向的结构

Fig. 6 Structure of research directions for State Key Laboratory of Biochemical Engineering

生化工程国家重点实验室学习了BPEC与时俱进、与生物技术前沿紧密结合的思想。实验室在成立初期,研究的重点是生物反应器和生物质工程。随着我国生物技术的迅猛发展和需求,实验室又将研究重点拓展到生物制药领域。与以往的小分子产物不同,生物制药的主要目标产物是有复杂空间结构的超大分子,如血液蛋白质、细胞因子、抗体、疫苗。对于化工背景的科研单位和研究人员来说,这方面研究基础薄弱。而当时很多生物学专家对于生化工程能起到的作用还不清

楚。面对挑战,实验室紧紧抓住生物制药中规模、质量、安全性和成本等涉及工程科学的关键问题,充分发挥膜分离、色谱分离和修饰反应的优势,在血液代用品、长效细胞因子药物、基因工程疫苗的分离纯化、聚乙二醇化、质量控制和规模化制备上做出了突出的贡献,成功实现了产业化,获得了各种奖励,并得到了生物领域专家的认可,促进了交流合作和科研成果从实验室到产业化链条的建立。

6 结 语

本文从作者自己的视角,通过对历史的回顾和BPEC的科研实例,反映王义翘先生及其创立和领导的麻省理工学院生物技术过程工程中心的重大贡献。其中涉及的科研内容对今天的研究仍有参考价值。王义翘的深邃远见,将生化工程拓展到生物制药领域,率先开展了动物细胞培养工程和蛋白质分离纯化工程,为生物技术的发展起到了重大的支撑作用;他将众多教授汇聚在BPEC这一国家级科研平台上,学科交叉,知识融合,取得了众多协同创新的优秀成果;他开展与企业的合作,从大规模生产难题中提炼科学问题,再通过基础与应用结合的创新,突破了许多制约产业化的技术瓶颈,确立了生化工程在生物技术中不可替代的地位;他重视人才培养,建立学术交流机制,激发年轻一代的聪明才智,为生化工程的可持续发展做出了巨大贡献。

回顾王义翘先生和他领导BPEC对我国生化工程的影响,印象最为深刻的是与时俱进的创新精神。这种精神体现在建立了生化工程在我国生命科学和生物技术发展中独特的学术地位和领域,从生物反应器到生物催化,从生物分离纯化到生物药长效化和靶向化,从装备、介质、工艺到生物生产的管道化和智能化,成为生命科学和生物技术可持续发展的支撑。不仅如此,我国生化工程研究者也已融合到合成生物学、基因编辑学、疫苗合成学等前沿生命科学研究的**大军中,正在发挥着越来越重要的作用。

参 考 文 献

- [1] TRAFTON A. Longtime MIT professor launched the Biotechnology Process Engineering Center and influenced generations of students [EB/OL]. MIT News, 2020, September 2. <https://news.mit.edu/2020/daniel-wang-professor-dies-0902>.
- [2] HATTON T A, WANG D I C: A tribute to an inspirational leader and colleague [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 95(2): 262-269.
- [3] HU W S, MEIER J, WANG D I C. Use of surface aerator improve oxygen transfer in cell culture [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1986, 28(1): 122-125.
- [4] MURAKAMI S, CHIOU T W, WANG D I C. A fiber-bed bioreactor for anchorage-dependent animal cell cultures (II): scale-up potential [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1991, 37(8): 762-769.
- [5] XIE L Z. Stoichiometric medium design and nutritional control in fed-batch cultivation of animal cells [D]. MA, USA: Massachusetts Institute of Technology, 1997.
- [6] XIE L Z, WANG D I C. Fed-batch cultivation of animal cells using different medium design concepts and feeding strategies [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 95(2): 270-284.
- [7] NYBERG G. Glycosylation site occupancy heterogeneity in Chinese hamster ovary cell culture [D]. MA, USA: Massachusetts Institute of Technology, 1998.
- [8] YAO T, ASAYAMA Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues [J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2017, 16: 99-117.
- [9] GASNER L L, WANG D I C. Microbial cell recovery enhancement through flocculation [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1970, 12(6): 873-887.
- [10] CLELAND J. Mechanism of protein aggregation and refolding [D]. MA, USA: Massachusetts Institute of Technology, 1991.
- [11] CLELAND J L, BUILDER S E, SWARTZ J R, et al. Polyethylene glycol enhanced protein refolding [J]. *Biotechnology*, 1992, 10(9): 1013-1019.
- [12] HEBBI V, THAKUR G, RATHORE A S. Process analytical technology implementation for protein refolding: GCSF as a case study [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116: 1039-1052.
- [13] YAMAMOTO E, YAMAGUCHI S, NAGAMUNE T. Protein refolding is improved by adding nonionic polyethylene glycol monooleyl ethers with various polyethylene glycol lengths [J]. *Biotechnology Journal*, 2017, 12(5): 1600689.
- [14] CHANG Y H D, GRODZINSKY A J, WANG D I C. Nutrient enrichment and *in-situ* waste removal through electrical means for hybridoma cultures [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, 47(3): 319-326.
- [15] SPEED M A, KING J, WANG D I C. Polymerization mechanism of polypeptide chain aggregation [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1997, 54(4): 333-343.
- [16] FOLLSTAD B D, BALCARCEL R R, STEPHANOPOULOS G, et al. Metabolic flux analysis of hybridoma continuous culture steady state multiplicity[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 63(6): 675-683.
- [17] HAGEN A J, HATTON T A, WANG D I C. Protein refolding in reversed micelles[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, 35(10):955-965.
- [18] SU Z G, DAUN G, COLTON C K. Functionalized membranes for adsorption of proteins [C]// FURUSAKI S. *Biochemical Engineering for 2001*, Springer-Verlag Publishers, Tokyo, 1992: 533-538.
- [19] CHARCOSSET C, SU Z G, KAROOR S, et al. Protein A immunoaffinity hollow fiber membranes for immunoglobulin G purification: experimental characterization [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, 48(4): 415-427.
- [20] KAROOR S, MOLINA J, BUCHMANN C R, et al. Immunoaffinity removal of xenoreactive antibodies using modified dialysis or microfiltration membranes[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 81(2): 134-148.
- [21] SU Z G, COLTON C K. Crossflow membrane filtration [M]// HARRISON R. *protein purification process engineering (Chapter 4)*. New York: Macel Dekker, Inc., 1994.
- [22] SONG C F, LI Y G, WANG B C, et al. A novel anticoagulant affinity membrane for enhanced hemocompatibility and bilirubin removal [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, 197: 111430.
- [23] AFEYAN N B, COONEY C L. Professor Daniel I.C. Wang: A legacy of education, innovation, publication, and leadership [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 95(2): 206-217.
- [24] CHANDAVARKAR A. Dynamics of fouling of microporous membranes by proteins [D]. MA, USA: Massachusetts Institute of Technology, 1990.
- [25] XIA Y F, WU J, WEI W, et al. Exploiting the pliability and lateral mobility of Pickering emulsion for enhanced vaccination [J]. *Nature Materials*, 2018, 17(2):187-194.
- [26] XIE X L, HU Y X, YE T, et al. Therapeutic vaccination against leukaemia *via* the sustained release of co-encapsulated anti-PD-1 and a leukaemia-associated antigen [J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2021, 5(5): 414-428.



通讯作者：苏志国（1954—），男，博士，研究员。研究方向为生物化学工程。
E-mail: zgsu@ipe.ac.cn