

科技自立自强之路

小菌混合菌株。严自正等研究者鉴定出 N1197A 为一大



冯丽妃/摄

V1 “大海捞针”觅良种

1969年2月6日,微生物所青年科研骨干尹光琳、徐婉娟和徐浩打起背包,匆匆赶往位于北京市朝阳门外的北京制药厂。他们是所里首批下厂、到一线开发 VC 二步发酵法的科学家。

VC,又称抗坏血酸,是包括人在内的许多动物的必需营养素。历史上,VC 长期缺乏引起的疾病曾是困扰世界数百年的谜题。15 世纪欧洲大航海时代,它引发的坏血病曾是海员们的噩梦,“出海百人去,返航十人归”的惨剧一直持续到 16 世纪下半叶。

但直到 20 世纪二三十年代,科学家才捕获这些疾病背后的“罪魁祸首”。1937 年,VC 的分离提取获得诺贝尔生理学或医学奖,VC 化学构造的揭示和人工合成则分享了同年的诺贝尔化学奖。

基础科学的进步叩开了产业发展的大门。1933 年,瑞士化学家塔德乌什·莱希施特(1950 年诺贝尔生理学或医学奖得主)发明了 VC 的工业生产工艺。瑞士罗氏制药公司采用“莱氏法”一跃成为行业巨头,并占领了全球 70% 的维生素市场。罗氏还与德国、日本等国的企业组建了“VC 联盟”,形成行业垄断。

彼时,VC 作为常备药品,应用范围日趋广泛。作为这一产业的“后来者”,1958 年,我国东北制药总厂采用莱氏法启动 30 吨规模 VC 生产线。此后,上海、北京、南京、石家庄、太原、西安等地的制药厂先后跟进,初步满足国内需求,改变了 VC 依赖进口的状况。

当然,这一过程并非一帆风顺。当时,北京制药厂的一个生产工艺环节经常发生噬菌体感染,便向微生物所寻求帮助。

微生物所紧密贴合国家需求,彼时课题任务主要瞄准工农业生产需求,在小麦锈病、棉花枯萎病、油菜花叶病、丙酮醇发酵、菌类饲料等研究方面做出了一批领先成果。例如,该所向微生物要食物——利用白地霉培养粮食代用品“人造肉”,得到广泛关注。

在帮助药厂培育抗噬菌体生产菌株的过程中,微生物所科学家薛禹谷和庄增辉发现,不光是噬菌体污染,生产中的化学过程导致的操作环境安全问题也很严重。

如何解决这一问题?有没有替代的方法?

微生物所的科学家第一时间寻找解决方案,徐浩和同事陆德如查阅文献后发现,生物发酵法或是新出路。随后,微生物所迅速与北京制药厂成立协作组,派遣科研人员下厂开展研究。

当时,莱氏法采用一步发酵法加化学方法生产 VC,即由葡萄糖加氢生成山梨醇,后者经黑醋菌发酵成为山梨糖,再经化学氧化转化成 VC。

协作组所要攻克的技术叫作二步发酵法,其核心在于第二步发酵,即在原有第一步发酵的基础上,用微生物将山梨糖转化成 VC 前体 2-酮基-L-古龙酸(以下简称 2-KGA),这样就能用生物氧化技术替代原来的化学氧化法,保障生产安全。

这次协作并没有具体计划,甚至没有设定完成年限。大家只知道,摆在他们面前的是一块“硬骨头”。

莱氏法工艺并不复杂,当时已很成熟,收率比较稳定,成本亦不高。而二步发酵法在世界范围内仍处于实验室研究起步阶段,工业化能不能成功还是未知数。

缺资料,没设备,他们样样都要从零开始。“就像农民种地要选用优质的种子,让微生物‘干活’首先要选择适合的菌种。”现已退休的微生物所原研究员、时任协作组负责人陶增鑫对《中国科学报》说。

微生物被称为地球生命的“暗物质”,它们无处不在。抓一把土,其中就有几千甚至上万种微生物,至今仍有 95% 的微生物尚未被认知。如何从海量微生物中找到一株适宜生产的菌种呢?

尹光琳、陶增鑫和微生物所的同事日复一日地坐在操作台前,大海捞针似的对着从各地搜集来的 670 多个土壤样品,一个进行微生物分离、培养、突变、发酵、筛选。7 个月过去,他们仍一无所获。正当大家快要泄气时,出现了一丝希望:一株菌株的发酵液中出现了 2-KGA 结晶,经检测含有大量的古龙酸。

为了找到一株产酸量较高的菌株,他们前前后后筛选了 4500 多株能够利用 L-山梨糖的细菌,1970 年 7 月,终于从样品中找到一株产酸量较高的优良菌株——N1197A。随后,他们又投入了新一轮的研究中——提高该菌株的产酸能力。

有趣的是,陶增鑫和微生物所科学家严自正后来发现,N1197A 实际上是一大一小两种菌的自然组合:小菌——氧化葡萄糖酸杆菌菌株发挥产酸作用;大菌——条纹假单胞杆菌菌株虽不产酸,但配合小菌发酵能显著提高其产酸能力。

回顾 VC 二步发酵法开发的过程,微生物所所长钱韦介绍,今天工业微生物的育种培养策略已经发生质变。科学家可以利用分子生物学技术,根据研究需要设计改造大肠杆菌、芽孢杆菌、酵母菌、梭菌等常用“底盘微生物”,使其成为能够“干活”的生产用菌,从而告别了冗长艰苦的菌种分离培养过程。

但是,从提高微生物转化应用的多样性来看,钱韦认为,当前的微生物“底盘”技术思路过于单一,而分离培养微生物、在了解新生命的基础上加以改造,仍是微生物学的核心技术和立学之本。因此,当时的发现对今天的研究仍有重要的启示意义。

工人接触时间稍长就会头晕乏力、呕吐、白血球下降,严重时甚至昏倒在苯提取平台上,工厂加强局部通风、发放营养菜、定期检查工人白血球的变化仍不能彻底解决安全问题……你很可能很难想象,这是上世纪五六十年代我国某药厂生产维生素 C(以下简称 VC)的场景。

今天,VC 每片价格低至几分钱,几乎是每个家庭的药箱中必备的常见药。可回溯到上世纪五六十年代,我国一些药厂的 VC 生产却曾面临严峻挑战。

为了一劳永逸地解决安全生产问题,中国科学院微生物研究所(以下简称微生物所)的科学家在制药厂里扎了根,用微生物细胞生物氧化代替化学氧化,研发出更加绿色、更低成本的 VC 人工合成方法——二步发酵法。

这一领跑全球的“东方诀窍”,创下改革开放初期中国最大的民口单项技术出口交易额纪录,使我国 VC 生产摆脱了困境,为夹缝中求生的中国 VC 产业成长为国际巨头打开了一扇大门。

而今天,微生物所科学家开发的另一种维生素家族药物——维生素 B5(以下简称 VB5)的绿色生产技术,正在引领全球相关产业技术的又一次革新。



严自正(左)和陶增鑫在工厂做实验。



尹光琳(左)在实验中。

V2 “晚一步,前面的工夫可能就白费了”

拿到菌种只是第一步,怎样才能提高它的产酸率、将它从试管中稳定放大到工业发酵罐中去?这是等待协作组科学家解答的另一个关键问题。

“跟人一样,细菌种子‘壮’一点,干起活来才有劲。”陶增鑫打了个比方。

要培养出健康的微生物,培养基成分比例、酸碱度高低、灭菌是否彻底……每一步都要把握好“火候”。“假如培养基营养很好,但是高压灭菌不彻底,就会造成‘草盛豆苗稀’;灭菌过头了,培养基营养成分被破坏了,‘种子’吃不好,也没法好好‘干活’。”他说。

为找到适合细菌生长、提高细菌产量的条件,他们需要反复做实验,摸索工艺条件。为加快研究速度,他们先用摇瓶做条件实验,不管工作量多大,都是交叉进行。“一旦有好的结果,我们会立刻将它用到发酵罐上,然后在罐上反复实验,终于使 2-KGA 产量大幅提高。”严自正回忆说。

严自正在 1970 年 8 月接替尹光琳进入协作组。她仍记得用发酵罐做流加实验的最紧张阶段,连续九天每晚只睡两三个小时。流加实验的目的是寻找适宜菌种生长的条件,研究者需要在实验过程中持续添加试剂或调节实验条件,并观察实验结果的变化。只有等一次测定结果出来后,才能确定下一次流加时间和流加量,因此往往要连续工作十几个小时。

“否则,工艺不成熟怎么能推广给厂家?”陶增鑫说。

回忆起那段日以继日的紧张工作时光,他直言:“这个研究不仅中国在搞,日本、法国、德国都在搞。在这样的国际赛跑中,如果别人先搞出来,你晚了一步,前面的工夫可能就白费了。”

那时,微生物所的研究人员每星期回家一次,平时和厂里的单身职工一样住集体宿舍,和厂里的职工一起轮班;从打扫卫生、刷瓶子到看发酵罐,样样都干。他们还负责给厂里的技术员讲解微生物发酵原理,反复向年轻的工人师傅强

V3 蜚声国际 逆袭世界

3 年协作实验落幕,VC 二步发酵法的火种在国内各地点燃。

东北制药总厂选育出“908”菌种、上海医药工业公司选育出“2980”菌种、太原药厂选育出“152”菌种……后来经验证,这些药厂的主力工作菌种都来自 N1197A 的小菌。各地制药厂在中试中陆续获得合格的 VC 成品,菌种产酸总收率超过 40%,成本略低于莱氏法。

那么,新工艺能否全面取代旧工艺?1973 年 5 月,原燃料化学工业部(以下简称燃化部)组织全国 16 家单位,成立上海、北京两个科技会战组,在上海、北京、东北设立 3 个生产性中试点,对新工艺进行进一步检验、提升。

这次中试证明了二步发酵法菌株的稳定性,3 个试点连续投料 48 批,总收率达 45%,成本大幅低于旧工艺。

与莱氏法相较,新工艺最大的优点是安全环保,完全去除了毒性较大的苯、液氯和发烟硫酸,减少了 90% 的易燃易爆的丙酮。特别是苯的去除,避免了工人中毒的危害,极大改善了劳动条件和生产安全状况。

新工艺还大幅降低了原料成本。按照东北、上海、北京 3 个厂 1973 年的总产量 570 吨计算,可节约化工原料 10281 吨,化工原料用量仅为旧工艺的 59.5%。同时,当时的丙酮原料来自粮食,制取 1 公斤丙酮需要约 4 公斤粮食,新工艺可间接节约工业用粮 3117 吨,相当于 6234 亩平均亩产 1000 斤粮食农田的总产量。

关键生物技术的突破和生产优势,让新工艺在全国很快得到推广。

在 1974 年 7 月燃化部组织的中试鉴定会上,上海第二制药厂和上海医药工业研究院的参与者笑着对严自正说:“我们吃了个现成饭!”

1976 年,上海第二制药厂首先在全国扩建 VC 二步发酵法生产车间。微生物所协助该厂进一步研究菌种生长规律和发酵条件,在 50 吨大罐中扩大试验,总收率达 47%。

1979 年,上海、北京、宜昌等地的制药厂也纷纷投产,发酵率达 78%。而当时,国际上日本武田制药厂、瑞士霍夫曼公司的生物发酵研究仍停留在实验室阶段,发酵率在 20% 上下。至此,经过 10 年的持续攻关,中国 VC 二

V4 接力棒仍在传递

今天,微生物所维生素药物产业链创新的接力棒,仍在传递。针对现代企业生产中的新问题,微生物所新一代的科学家开发出新的绿色生物发酵法,替代行业污染严重的化学法。他们还继承老一辈科学家的精神,把车间当成了家。

当前,全球 VB5 市场需求每年约两万吨,中国是第一大生产国,产能占全球的 80%,但 VB5 企业经常因高污染被限产或停产。VB5 参与脂肪、糖类能量转化,协助中枢神经系统发育,广泛应用于动物饲料和临床治疗。采用化学方法生产 VB5 已有 80 多年历史,但需使用甲醛、异丁醛和丙烯酸等易燃易爆原料,且生产过程中会产生剧毒的含氧废水。

过去 30 多年,荷兰、德国等企业一直在尝试用生物发酵法取代化学法,但未能突破一个关键技术瓶颈,即具有细胞毒性的副产物杂质含量一直在 15% 以上的高水平徘徊,严重影响提取效率和生产成本。

反观中国,微生物所研究员温廷益团队对野生大肠杆菌进行了近 30 轮代谢工程改造,将杂质含量降到 2% 以下。

凭借明显的技术优势,2022 年 4 月,温廷益团队开发的 VB5 生物发酵法,以 9000 万元的价格转让给国内维生素龙头企业黑龙江新和成生物科技有限公司(以下简称新和成)。2023 年 4 月,该企业已建成产量达 2500 吨的全球首条 VB5 生物发酵绿色生产线。

新发酵法以源于玉米的葡萄糖为原材料,目前转化率超 30% 以上,成本低于化学法。“与化学合成法相比,新工艺水消耗减少 92%,能耗减少 16%,使用可再生资源作为原材料,产品质量优异。”新和成相关负责人表示。

截至 2023 年 10 月,半年间,该公司利用生物发酵法生产的 VB5 已达 1500 余吨,产品出口北美、东南亚等地区,已占全球 VB5 销售份额的 10%。因为尝到甜头,他们计划下一步将产能扩大到年产 8000 吨。

“未来,如果把生产中发酵剩余的菌渣做成肥料或类似豆粕的培养基原料综合循环利用,成本会更有优势,而且不会造成环境污染。”温廷益说。

“50 多年前,我们的老一辈科学家在落后的条件下,从实际产业需求出发,进驻工厂,做出领先全球的技术,反向输出给西方发达国家。从科技自立自强的角度来讲,这也是今天我们要学习的。”微生物所青年研究组长刘树文感慨道。

为推动产业落地,刘树文在企业菌种验证和中试阶段,把行军床支在车间,值守在发酵罐旁,夜以继日地工作了 35 天,与企业研发团队解决了一系列技术问题,直到最终实现量产。

“微生物所有一句老同志传下来的话——基础研究是立足之本,应用转化是强所之道。”钱韦说,微生物领域的基础研究、关键技术突破都离不开企业,要始终瞄准国家的重大需求和社会经济发展的要求。

这个“东方诀窍”,让国产 VC 逆袭国际市场

维生素绿色生产法攻关应用纪实

本报记者冯丽妃

①陶增鑫的国家发明奖获奖证书。②温廷益(前中)、钱韦(后排右二)、刘树文(后排右三)等在合作企业考察指导 VB5 生产线运行情况。除署名外,本版图片由微生物所提供

