

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2026-063

工业生物制造的跨尺度协同设计：路径选择、放大验证与数据反馈

于杰森, 杨良嵘, 党懿茜, 李金倩, 刘会洲

(中国科学院过程工程研究所, 绿色过程与工程重点实验室, 北京 100190)

摘要: 工业生物制造的关键问题, 是将分子尺度获得的菌株性能转化为放大后仍稳定、可控制且具全流程竞争力的生产表现。本文依照“设计候选形成-过程约束检验-反馈再设计”的逻辑, 梳理合成生物学与过程工程的协同。首先, 从标准化组装和宿主资源约束出发, 阐明设计-构建-测试-学习 (Design-Build-Test-Learn, DBTL) DBTL循环如何整合多位点编辑与基因组尺度代谢模型, 将遗传设计转化为氧需求、辅因子平衡、副产物形成及遗传稳定性等可检验的工程变量。继而, 以反应、混合、传质和分离之间的接口承接这些变量, 分析工业放大造成的溶氧、底物和pH时空波动如何改变代谢通量与群体感应调控, 并影响补料、供氧、产物回收及全流程经济和环境表现。设计端由此提出候选路径及其约束, 过程端通过动态暴露试验和全流程评价检验候选, 再将性能失配反馈至路径与底盘设计。在这一脉络上, 本文以“路径-尺度-数据”框架连接逆生物合成、计算流体力学与缩尺度试验、过程分析技术及模型辅助决策, 并以1, 3-丙二醇和 β -法呢烯说明两类细胞-过程耦合策略。最后, 提出结合生产指标、放大性能保持率、供氧裕量、批次变异、模型误差及边界一致的经济与环境指标评价工程成熟度。

关键词: 合成生物学; 过程工程; DBTL循环; 跨尺度建模; 数字孪生; 生物制造; 逆生物合成分析; 生命周期评价

中图分类号: Q819; TQ02 文献标志码: A

Cross-scale co-design for industrial biomanufacturing: pathway selection, scale-up validation and data feedback

YU Jiemiao, YANG Liangrong, DANG Yiqian, LI Jinqian, LIU Huizhou

(CAS Key Laboratory of Green Process and Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract: Synthetic biology has advanced genetic circuit design and metabolic pathway engineering, yet industrial translation remains limited by scale-dependent heterogeneity and process variability. A central challenge in industrial

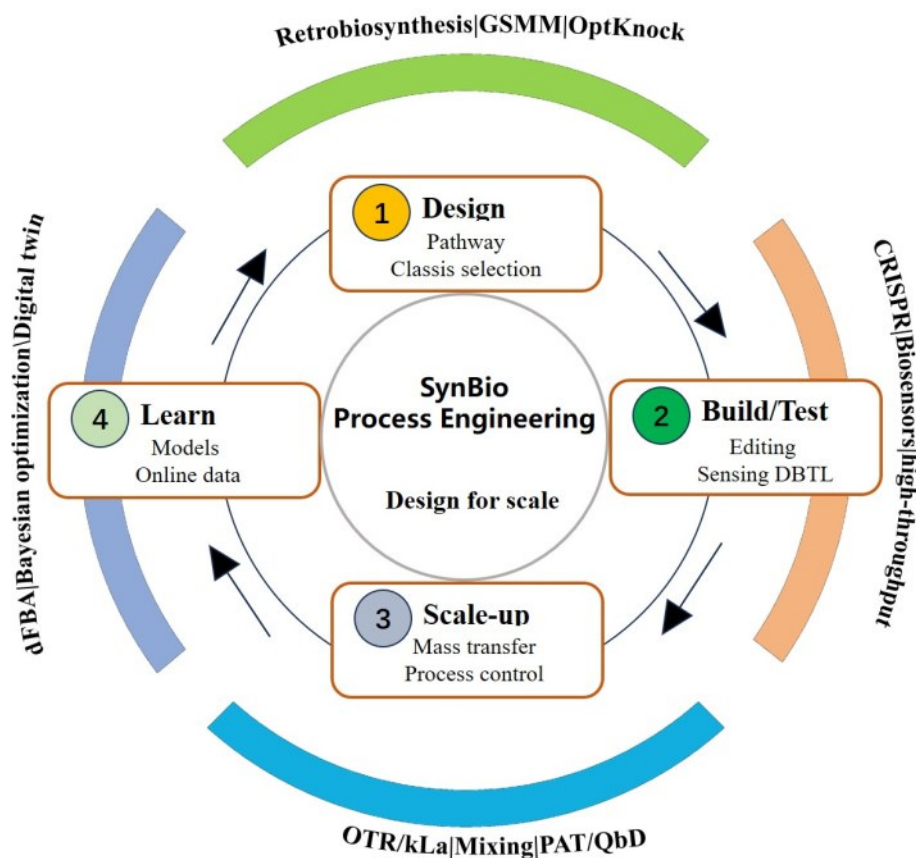
收稿日期: 2026-07-20 修回日期: 2026-10-26

基金项目: 京津冀环境综合治理国家科技重大专项资助 (2025ZD1203400); 国家自然科学基金 (22138012, 22421003, 22378398, 92475204, 22408372, 22408371, 22508392, 22278407)

引用本文: 于杰森, 杨良嵘, 党懿茜, 李金倩, 刘会洲. 工业生物制造的跨尺度协同设计: 路径选择、放大验证与数据反馈[J]. 合成生物学, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-063

Citation: YU Jiemiao, YANG Liangrong, DANG Yiqian, LI Jinqian, LIU Huizhou. Cross-scale co-design for industrial biomanufacturing: pathway selection, scale-up validation and data feedback[J]. Synthetic Biology Journal, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-063

biomanufacturing is translating strain performance achieved at the molecular scale into production that remains stable, controllable, and competitive after scale-up. This review follows a sequence of generating design candidates, testing them against process constraints, and feeding the results back into redesign. First, starting from standardized assembly and host resource constraints, we examine how the design-build-test-learn (DBTL) cycle integrates multiplex genome editing and genome-scale metabolic models to translate genetic designs into testable engineering variables, including oxygen demand, cofactor balance, by-product formation, and genetic stability. We then connect these variables to the interfaces among reaction, mixing, mass transfer, and separation. Spatial and temporal fluctuations in dissolved oxygen, substrate, and pH during scale-up can alter metabolic fluxes and quorum-sensing regulation, with consequences for feeding, oxygen supply, product recovery, and process-wide economic and environmental performance. Accordingly, pathway and chassis designs provide candidates and their operating constraints; dynamic-exposure experiments and whole-process evaluation test those candidates and return performance gaps to the next design cycle. Building on this logic, a pathway – scale – data framework connects bioretrosynthesis, computational fluid dynamics and scale-down experiments, process analytical technology, and model-assisted decision-making. The cases of 1,3-propanediol and β -farnesene illustrate two strategies for coupling cellular design with process engineering. Finally, engineering readiness is evaluated using production metrics, scale-up performance retention, oxygen-supply margin, batch variability, model error, and economic and environmental indicators assessed within consistent system boundaries.



Keywords: synthetic biology; process engineering; DBTL cycle; multi-scale modeling; digital twin; biomanufacturing; retrosynthetic biology analysis; life cycle assessment

合成生物学的工程化价值不在于工具数量本身，而在于能否把分子设计转化为跨尺度可预测、可控制、可验证的制造过程。现有研究已建立标准化元件、设计-构建-测试-学习（Design-Build-Test-Learn, DBTL）循环、规律成簇间隔短回文重复序列（clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR）相关编辑和基因组尺度代谢模型等设计能力^[1-13]。真正的瓶颈则发生在这些能力与工业反应器的非均一环境、下游分离和系统经济性相遇之处。

实验室筛选得到的高性能菌株进入工业反应器后，常因混合与传质非均一而出现性能衰减。溶氧梯度、pH波动和底物分布不均会重排代谢流，并可能加剧产物抑制^[14]。以 kLa 等单一传质参数为依据的传统放大准则可以描述部分氧传递限制，却不足以表征细胞在时空波动环境中的暴露历史^[15]。生命周期评价同样表明，环境绩效对原料体系、工艺路径和操作参数高度敏感^[16]。因此，细胞层面的最优设计不能直接等同于过程尺度的最优表现；放大研究需要把反应器环境、细胞响应和全生命周期边界置于同一评价框架。

实现合成生物学与过程工程的深度融合，需要围绕可传递的接口变量协同设计。若底盘细胞设计忽视工艺约束，其性能可能在放大过程中衰减；若过程工程不能识别细胞代谢状态的变化，也难以实现系统优化。路径层向过程层传递氧需求、辅因子平衡、毒性和分离难度；反应器层向细胞层回传溶解氧（dissolved oxygen, DO）、pH、底物和剪切暴露历史；数据层通过过程分析技术与模型更新闭环反馈。近年来，逆生物合成、计算流体力学（computational fluid dynamics, CFD）与代谢模型耦合、数字孪生及蛋白质设计等方法的发展，为整合分子设计与过程优化提供了工具基础。

1 设计端：元件、菌株与可检验的工程候选

1.1 标准化组装与细胞资源约束

合成生物学以标准化、模块化和抽象分层为

工程基础，将遗传元件组织为可组合的功能模块与系统^[17-19]。标准化首先解决构建接口与组装效率问题，而元件进入宿主后仍需共享转录、翻译和代谢资源。因此，设计端向过程端传递的应是给定宿主和培养条件下测得的表达、生长、底物消耗及产物形成信息。以下依次讨论组装与资源约束、DBTL实验反馈、组合编辑和代谢模型，使工具选择对应明确的设计问题。

BioBrick、MoClo和BASIC等方法提高了遗传构建效率^[20-22]，但相同的表达输出未必意味着相同的宿主负担。Ceroni等利用大肠杆菌体内的细胞表达能力监测系统，识别出输出相当而资源负担不同的构建设计；低负担设计获得了更好的整体表现^[23]。这一证据说明，单独比较启动子强度或终点荧光值可能漏掉对宿主表达能力的占用。菌株筛选应同时记录目标产物、宿主生长和资源负担的变化，并在预期培养条件下重新测量。该研究支持将细胞资源约束纳入设计，但并未给出适用于所有宿主与工业尺度的统一阈值。资源约束也可以成为调控输入。Ceroni等进一步利用对异源表达负担产生响应的宿主启动子，构建了基于dCas9的反馈系统，使外源表达随负担变化自动调整，并在分批蛋白生产中改善了宿主表达能力、生长与产量^[24]。这一策略的启示是，短时最大表达与整个培养周期的总产出并不总是一致；适度限制表达可能减少资源耗竭。其向工业制造的迁移仍需检验控制回路本身的资源消耗、响应速度、遗传稳定性，以及在不同供氧和补料条件下是否保持有效。

资源负担的传递机制可进一步从细胞经济性解释。Weiße等将能量、游离核糖体和蛋白质分配的权衡纳入模型，说明外源表达与宿主生长相互影响^[25]。Gyorgy等用同一质粒上的双报告基因发现，即使两个模块之间没有直接调控连接，共享转录与翻译资源也会使其输出耦合；改变RBS强度或拷贝数，会改变两种蛋白可实现的表达组合^[26]。因此，提高某一限速酶表达后，应同时检查其他通路酶与宿主蛋白合成是否下降。此处的约束来自特定体系的模型与实验，不宜将其线性关系直接推广至所有宿主。对工业菌株，更有意义的是比较不同补料、供氧与生长阶段下的资源

分配是否改变候选设计的排序。

1.2 DBTL 闭环与支撑工具

DBTL 循环的价值在于把工业过程约束持续反馈至菌株设计，而不只是提高构建通量。如图1所示，**Design**阶段应把氧需求、底物波动、产物毒性和下游分离难度写入设计约束；**Build**阶段据此构建耐受性与动态调控模块；**Test**阶段利用 scale-down 装置重现细胞在工业反应器中经历的溶氧、底物和 pH 暴露历史；**Learn**阶段整合菌株表型、过程分析技术（process analytical technology, PAT）数据与机理模型，解析“基因型-操作条件-尺度”的耦合关系，并把结果反馈至下一轮设计。**OptForce**（最优代谢驱动力设计/最优代谢通量干预方法）、**OptKnock**（最优敲除/优化基因敲除方法）及相关代谢工程工具为**Design**阶段提供候选操作集合^[27-30]；**Gibson**组装和基于生物传感器的筛选分别支撑**Build**与**Test**阶段^[31, 32]。

自动化平台可以扩大DBTL循环中可实验探索的范围。**Carbonell**等建立了集成构建、测试与学习的自动化流程，用于提高微生物精细化学品生产性能^[1]。但自动化没有消除组合空间随设计变量增加而迅速扩大的问题。启动子、核糖体结合位点（ribosome binding site, RBS）、拷贝数、基

因排列与宿主背景的组合，仍会受到实验周期和检测成本限制^[33]。因此，DBTL 需要在有限预算下优先选择信息增益较高且符合工业约束的候选设计。缩减组合空间需要明确保留哪些设计信息。**Jeschek**等提出**RedLibs**方法，通过设计较小的RBS组合文库减少筛选负担，并在紫色杆菌素分支通路中优化产物选择性^[34]。其价值在于提高有限实验预算内的搜索效率，而不是穷尽全部最优解。工业导向的DBTL可据此先筛选酶表达配比，再把少量候选放入供氧或底物波动试验；若实验室产量排序在扰动下发生逆转，应将这种差异作为下一轮筛选目标，而非继续扩大同一恒定条件下的文库。

1.2.1 CRISPR 多重编辑:DBTL的构建工具

CRISPR-Cas 系统使多位点组合改造成为可执行的构建策略^[6, 35-40]。对工业菌株而言，评价重点因此从“能否完成编辑”转向“编辑后能否稳定生产”。多基因敲除、激活或抑制会改变资源分配、辅因子平衡和适应度，并可能表现为耗氧速率（oxygen uptake rate, OUR）峰值偏移、副产物积累、批次波动或长期遗传稳定性下降。**Lian**等在酿酒酵母中实现了多位点组合编辑^[41]，利用**CRISPR-AID**系统，不仅能够通过单步工程改造使β-胡萝卜素的产量提高至原来的3倍，还能够通过对多个代谢工程靶点进行组合优化，使酿酒酵母

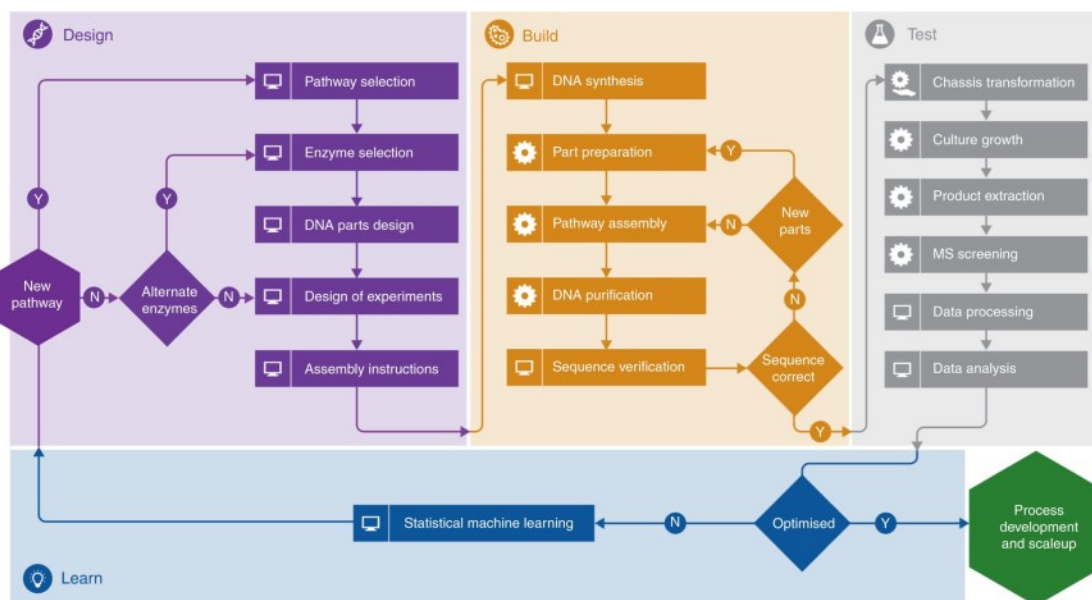


图1 融合过程约束与数据反馈的DBTL闭环^[1]。

Fig. 1 DBTL loop integrating process constraints and data feedback^[1].

表面展示的内切葡聚糖酶水平提高至原来的2.5倍(图2)。面向工业应用,多位点工程菌株应同时报告编辑效率、生长-生产权衡、长期遗传稳定性以及scale-down条件下的过程表现。

Jakociunas等在酿酒酵母中实施多位点代谢工程,展示了组合编辑用于通路优化的可行性^[42]。但过程表现还取决于编辑后的资源分配、氧需求及生长-生产权衡。生长受损的菌株可能对补料和溶氧扰动更加敏感;长期培养也可能选择出生产功能减弱而生长占优的亚群。因此,评价不能只关注短期编辑效率和产量,还应联合考察过程扰动耐受性与长期遗传稳定性。长期稳定性还涉及群体选择,不能仅靠编辑位点正确来证明。Williams和Murray通过整合酶介导的终末分化,将繁殖与高负担表达分配给不同细胞状态,提高了大肠杆菌中高负担或有毒功能的持续性^[43]。Lv等则把产物响应与必需氨基酸合成相连接,并结

合脂质通路负反馈,在其酵母体系中延缓了柚皮素生产表型的丢失^[44]。前者限制失活突变的传播,后者改变生产细胞与非生产细胞的竞争关系,代表不同的稳定化机制。迁移到工业过程时,仍需检验培养基补充或交叉供养是否削弱选择耦合,以及分化比例、生产持续时间和种子扩大过程是否兼容;特定传代条件下的稳定性不能直接替代生产批次证据。

1.2.2 基因组尺度代谢模型:DBTL的设计与学习工具

基因组尺度代谢模型(genome-scale metabolic model, GSMM)把基因操作映射为代谢通量、耗氧速率和副产物形成等过程变量^[13, 45-55]。在协同设计中,模型的任务是把反应器条件转化为边界约束,再以scale-down和中试数据检验预测。通量平衡分析(flux balance analysis, FBA)在工业条件外推时需进一步考虑动态边界、酶容量及参数

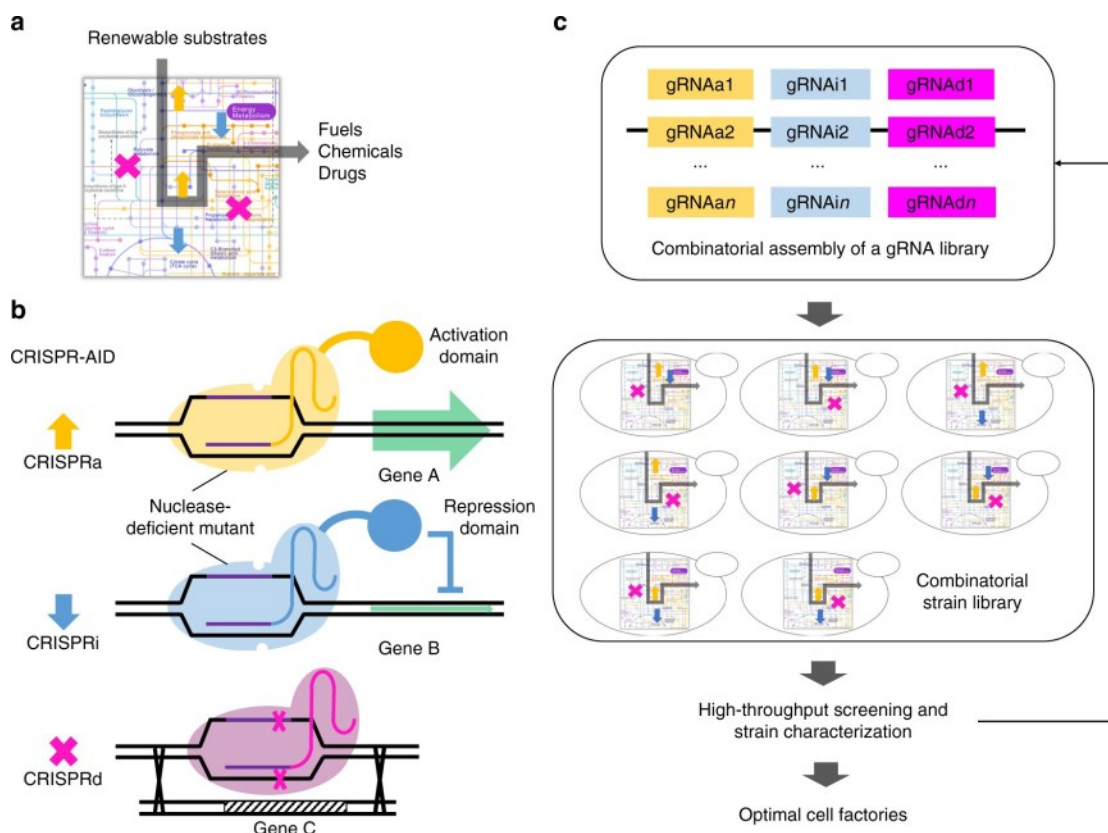


图2 CRISPR-AID用于组合代谢工程的设计^[41], a: 微生物细胞工厂的可持续生物制造。b: CRISPR-AID三功能基因调控系统的构建。c: 基于CRISPR-AID的组合代谢工程。

Fig. 2 Design of CRISPR-AID for combinatorial metabolic engineering^[41], a: Sustainable Biomanufacturing Using Microbial Cell Factories. b: Development of the Trifunctional CRISPR-AID Gene Regulation System. (c: CRISPR-AID-Based Combinatorial Metabolic Engineering.)

不确定性。

FBA利用化学计量与稳态约束,通过优化求解可行的代谢通量分布^[50, 56-60]。OptKnock和OptForce等方法据此提出候选基因操作方案^[27, 28]。其主要瓶颈是目标函数、稳态假设与边界条件常不能代表工业反应器中的动态暴露。因此,模型应用应报告版本、约束来源、灵敏度、外部验证和失效条件,而不把单一最优通量解等同于可放大的工艺方案。酶容量约束为上述模型提供了更具体的分子接口。Sánchez等提出GECKO方法,将反应通量上限与酶丰度及催化周转数相联系,并用酿酒酵母模型说明蛋白质资源约束能够改善部分表型预测、缩小可行通量范围^[61]。这有助于区分“化学计量上允许”与“现有酶量能够支持”的产率。应用时,体外测得或预测的催化常数需匹配温度、pH和底物条件;蛋白质组的覆盖度与酶活性状态也会影响有效容量。因而,增加酶约束并不自动提高所有工况的准确性,仍应检验模型是否同时解释生长、底物消耗、耗氧和产物形成,并把高敏感参数列为优先测量对象。

2 过程端:工业约束、细胞响应与全流程评价

2.1 流程分解与模块化的工程思维

过程工程通过划分反应、分离、换热和混合等单元操作,明确各单元的输入、输出与操作窗口,再处理单元之间的耦合。合成生物学的模块化设计采用相近的分解逻辑。对于生物制造,上游菌株、中游发酵和下游分离不能被视为彼此独立的模块;它们应通过氧需求、底物与产物浓度、杂质谱及分离负荷等变量连接。把这些变量写成接口规格,可使模块化从结构划分转向跨尺度约束传递^[17]。这些接口会随细胞状态变化,因而更接近“软接口”。以1,3-丙二醇(1,3-propanediol, 1,3-PDO)为例,供氧、还原力分配、产物浓度和下游分离负荷相互制约。菌株开发涉及NADH与NADPH相关反应的调整,不能以单一辅因子的平衡概括所有开发阶段。供氧和补料需要与菌体生长及产物合成的能量、还原力需求相匹配^[62]。

产物的理化性质直接影响下游分离模块的设计。有机酸的毒性与其解离状态、培养液pH及浓度有关^[63]。产物积累可能增加补碱需求,并使盐负荷、后续酸化与分离成本发生变化。因此,耐受性改造、pH操作窗口和产物移除策略应同步考虑,而不能仅凭提高菌株产量判断全流程收益。衣康酸生产提供了直接的菌株-分离耦合实例。Hosseinpour Tehrani等把玉米黑粉菌的代谢与形态改造同原位结晶结合,在报告条件下达到220 g/L衣康酸当量^[64]。原位析出降低了产物抑制,却增加了固体负荷、混合以及菌体与钙盐分离的难度;文章也指出提高产率和后续纯化仍需继续优化。由此,接口规格应同时记录总产物、溶解相浓度、固相比比例及回收率,避免仅凭滴度判断发酵与分离方案优劣。

2.2 规模化放大:传质与混合对工业过程的约束

García-Ochoa和Gómez系统梳理了生物反应器放大中的氧传递原理^[15]。在常见好氧微生物和搅拌式反应器中,氧的低溶解度使氧传递速率(oxygen transfer rate, OTR)成为重要放大约束。图3所示串联阻力说明,液膜、主体混合和细胞边界层共同影响有效氧供。工程分析需把体积传质系数kLa、供氧容量裕量、混合时间与细胞暴露分布映射到代谢状态,而非只保持单一放大准则。

Junker比较了30 L至19,000 L发酵设备的放大参数^[14]。表1显示,估算混合时间由30 L设备的3.4 s增至19,000 L设备的53.7 s,而设计单位体积功率输入下降。较长混合时间会延长细胞经历局部底物峰值、饥饿或低氧环境的时间,并可能改变副产物形成与生长状态^[65]。表1、表2分别列出混合与通气工况以及氧传递相关参数;其中水体功率测量与经验相关式项不能直接视为实际发酵液中的kLa实测值。上述数据应作为尺度约束的依据,并通过细胞响应和scale-down试验验证其生物学后果。

在高密度发酵中,细胞浓度与比耗氧速率共同决定体积耗氧需求。细胞和培养基性质还可能改变气液传递行为,因此不能直接以清水测得的kLa代表实际培养条件^[15]。高产菌株若伴随耗氧需

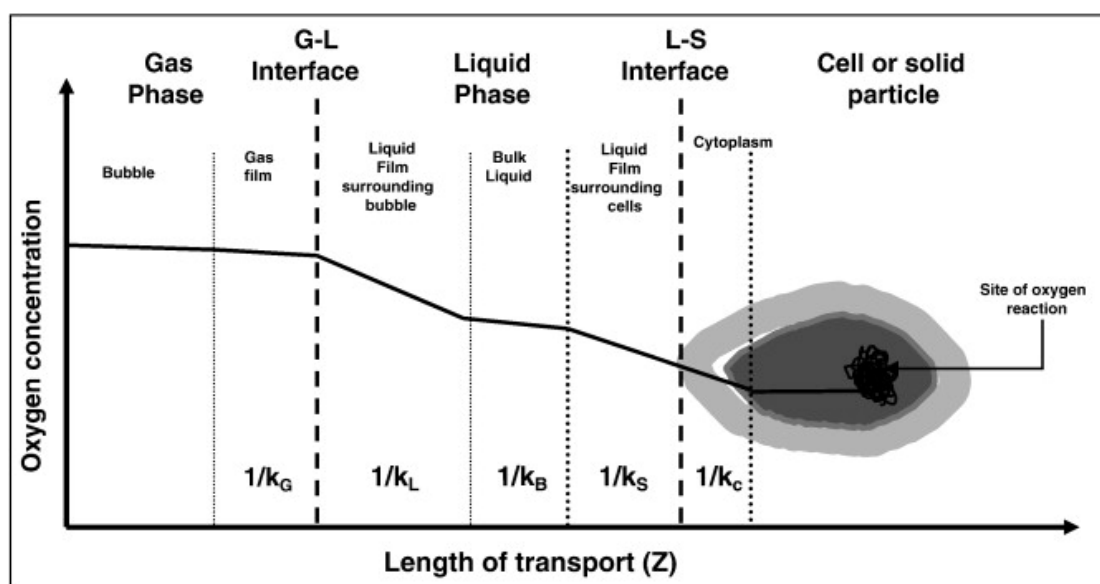


图3 生物反应器氧传递过程示意及7个串联传质阻力分析^[15]。氧从气泡传递到细胞的步骤与阻力：(i) 从气泡内部和气膜传递；(ii) 穿过气液界面；(iii) 扩散通过气泡周围相对滞流的液膜；(iv) 在主体液相中传输；(v) 扩散通过细胞周围相对滞流的液膜；(vi) 穿过液-细胞界面；(vii) 穿过细胞质运输至生化反应位点。

Fig. 3 Schematic of oxygen transfer process in bioreactors and analysis of seven series mass transfer resistances^[15]. Steps and resistances of oxygen transfer from bubble to cell: (i) transfer through bubble interior and gas film; (ii) crossing the gas-liquid interface; (iii) diffusion through the relatively stagnant liquid film surrounding the bubble; (iv) transport in the bulk liquid phase; (v) diffusion through the relatively stagnant liquid film surrounding the cell; (vi) crossing the liquid-cell interface; (vii) transport through the cytoplasm to the biochemical reaction site.

求上升，可能更早触及反应器供氧能力边界。菌株筛选应同时比较产物形成、耗氧与副产物变化，并在相应培养体系中验证可用的供氧容量。传质问题的生物学后果还取决于时间尺度。当混合或循环时间与底物摄取、氧耗竭和代谢调节的时间尺度接近时，平均浓度相同的培养体系仍可能产生不同的瞬时通量与副产物累积。Delvigne等将放大与缩尺度视为连接流体力学和系统生物学的实验过程，而非单一几何或功率相似问题^[66]。因此，除了平均DO和 kLa ，还应比较细胞进入低氧或高底物区域的频次、停留时间及状态切换次序；局部扰动是否导致可恢复适应或持续性能损失，需要由目标菌株的动态响应判断。缩尺度试验还必须保留进入扰动前的培养历史。Takors指出，大尺度微环境异质性与细胞响应之间仍存在需要实验解析的联系^[67]。Brand等进一步发现，在其大肠杆菌双室试验中，先经历低比生长速率葡萄糖限制的细胞，相比直接由高生长速率分批培养进入振荡的细胞，累积了更多短链有机酸和糖酵解相关氨基酸^[68]。因此，仅复现相同的波动幅度和周期

仍可能得到不同结果；预培养方式、比生长速率、细胞密度和扰动开始时刻均应纳入试验设计。

装置设计则决定能否分辨暴露过程中的局部响应。Junne等把搅拌罐与带多处取样口的活塞流模块连接，在枯草芽孢杆菌补料培养中观察到底物与DO振荡引起的摄糖、乙醇形成及氨基酸代谢变化^[69]。多点取样使研究者能够区分循环中的短时变化与主罐平均值。该结果支持按关键代谢时间尺度设计缩尺度装置，但其参数不能直接套用到不同菌种；应先识别目标工业过程的主要暴露类型，再选择能重现相关响应的最简装置。Meadows等以 β -法呢烯为例，通过重编程中心碳代谢降低路径氧需求^[70]。图4概括了引入非天然代谢反应后，单位产物氧需求下降及生产性能改善之间的联系。该案例说明，在给定氧传递边界下调整路径，可以直接缓解反应器约束。

2.3 代谢通量分析：工艺状态的定量窗口

MFA (Metabolic Flux Analysis) 把胞外速率、

表1 不同规模发酵设备的混合时间、单位体积功率输入与通气参数^[14]Table 1 Mixing time, power input per unit volume and aeration parameters of fermentors at different scales^[14]

Scale (nominal volume)	Mixing time, T_{mix} from Eq. 1 (s)	Design P_O/V_L (hp/1000 l)	P_O/V_L (observed in water) (hp/1000 l at rpm)	P_g/V_L at Q_{max} and N_{max} (observed in water) (hp/1000 l at lpm)	Q_{max}/V_L (vvm at working $V_L \text{ min}^{-1}$)	Superficial gas velocity, $V_s =$ $4Q_{\text{max}}/(\pi D_T^2)$, (cm/s)	Gas flow number, $N_A =$ $Q_{\text{max}}/N_{\text{max}} D_T^3$
30 l	3.4	50.0	NI	NI	1.5	0.66	0.032 (R)
100 l	13.4	40.0	NI	NI	1.6	1.5	0.050 (A)
280 l	20.1	41.7	23.9 at 450 (R) 18.9 at 450 (M)	18.8 at 300 (R) 16.7 at 300 (M)	1.67	2.0	0.078 (R) 0.030 (M)
800 l	29.2	12.5	15.0 at 335 12.5 at 300 (R) 16.3 at 335* 12.1 at 300 (M) 11.2 at 335 8.7 at 300 (A)	10 at 600 (R) 8.8 at 600 (M) 7.8 at 600 (A)	1.0	2.0	0.063 (R) 0.027 (M) 0.027 (A)
1000 l	30.9	13.3	7.7 at 300 (R) 5.1 at 300 (A)	4.3 at 1200 (R) 4.9 at 600 3.5 at 1200 (A) 4.6 at 600	1.6	3.4	0.140 (R) 0.079 (A)
1200 l	32.3	16.7	10.1 at 282 (A)	6.8 at 1200 (A) 7.1 at 600	1.33	3.0	0.044 (A)
1900 l	36.2	10.0	13.9 at 225 (R) 10.0 at 225 (M)	6.8 at 1500 (R) 8.0 at 1500 (M)	1.0	2.8	0.088 (R) 0.043 (M)
19000 l	53.7	4.0	4.4 at 142 (R) 4.4 at 150 (M) 4.4 at 150 (A)	2.0 at 15000 (R) 4.1 at 15000 (M) 3.2 at 15000 (A)	1.0	8.1	0.300 (R) 0.130 (M) 0.120 (A)

注: Power measurements performed at 25°C in water and at ambient pressure. Un-aerated conditions not maintainable at top speed for certain fermentors marked with an asterisk due to drive overheating. No power measurement devices installed at 30 l or 100 l scales. R, Rushton; M, Maxflo T; A, A315. NI, Power measuring device not installed.

$$T_{\text{mix}} = 17.5 \log_{10}(V_L) - 19.4(V_L \text{ 以 } L \text{ 计, } 10 \text{ L 至 } 60,000 \text{ L}; r^2 = 0.876) \text{ (Eq. 1)}$$

同位素标记与网络约束转化为胞内通量,是连接菌株设计与过程状态诊断的工具^[59, 71]。图5从数据与求解方式区分FBA、化学计量通量分析和同位素通量分析。¹³C-MFA测量标记底物形成的质量同位素分布(mass isotopomer distributions, MIDs),利用气相色谱-质谱或核磁共振等数据反演代谢通量。其结果取决于网络结构、标记方案、稳态或动态假设、测量误差及参数可辨识性^[72, 73]。工业应用应同时报告模型边界、拟合质量和不确定性;同位素实验通常用于离线约束与验证,不能直接等同于快速在线状态测量。

动态FBA(dynamic flux balance analysis, dFBA)把FBA嵌入时间步进框架,使细胞代谢模型能够接收随时间变化的过程边界。Mahadevan等

用该方法模拟了大肠杆菌二次生长中的代谢切换^[74]。图6展示状态更新、通量求解及其与过程操作的接口。将模型与持续测量结合,可为补料决策提供预测依据;但数值时步更新并不单独构成物理闭环。只有进一步连接状态校正、设备执行和响应验证,才形成数据反馈链。

2.4 生命周期评价:可持续性作为设计的前置约束

生命周期评价(life cycle assessment, LCA)通过明确功能单位、系统边界、分配方法和能源结构,比较原料、发酵与分离的环境负荷。LCA在协同框架中的作用,是将环境约束前置至路径和底盘选择阶段^[16]。下游分离的能耗与产物浓度、杂质及分离方法相关,较高滴度并不保证全流程

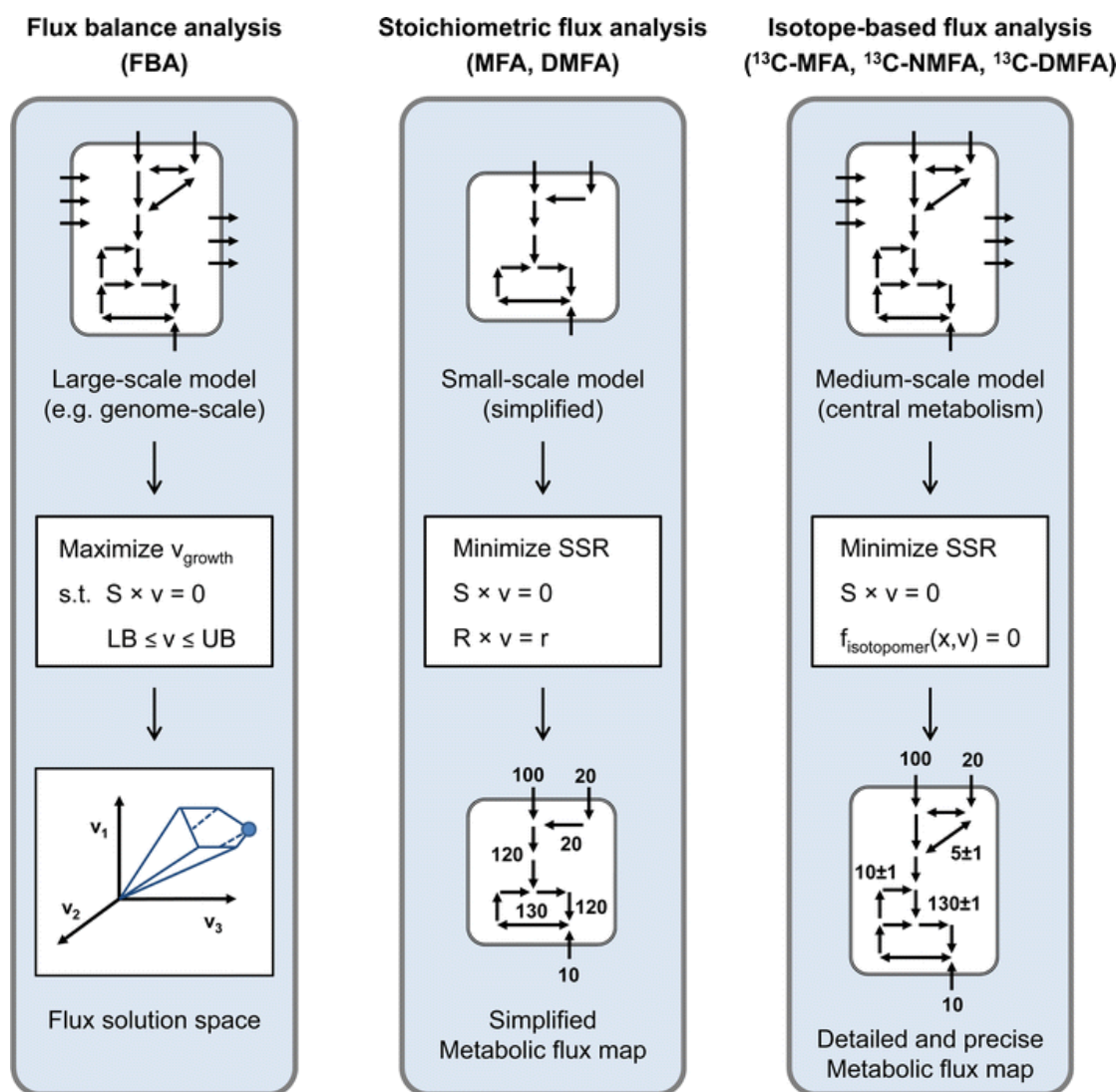


图5 三类通量分析方法的数据基础与求解目标比较^[59]。左：FBA在化学计量及边界约束下求取目标函数对应的通量解空间；中：化学计量通量分析利用胞外速率估计简化网络通量；右：同位素通量分析利用标记数据约束胞内通量。DMFA表示动态代谢通量分析，NMFA表示同位素非稳态分析，SSR为残差平方和。三栏反映预测与数据反演的区别，不表示所有方法均提供实时在线通量。

Fig. 5 Data requirements and solution objectives of three approaches to flux analysis^[59]. Left: FBA estimates feasible fluxes under stoichiometric and boundary constraints with a specified objective. Middle: stoichiometric flux analysis uses extracellular rates to estimate fluxes in simplified networks. Right: isotope-based analysis uses labelling measurements to constrain intracellular fluxes. DMFA, dynamic metabolic flux analysis; NMFA, isotopically non-stationary analysis; SSR, sum of squared residuals. These approaches differ in prediction and data-inference tasks and do not all provide real-time flux measurements.

承担经济和环境评价，并联合识别上游增产、氧供及下游分离之间的权衡。联合评价的作用在于识别设计变量的相反影响。提高滴度可能减少待处理液量，却也可能增加产物抑制、黏度或供氧压力；提高搅拌与通气可能改善生产强度，同时增加设备和运行负担。基于前述TEA与LCA边界^[16, 75]，本文建议在相同产品纯度、回收率口径

和产能利用率下比较方案，并分别改变碳源价格、电力结构、回收率和催化剂寿命等不确定参数。当方案排序随这些假设改变时，应报告竞争力成立的条件，而非仅给出一个最优成本或减排百分比。对尚无长期运行数据的路线，情景结果应视为开发决策依据，不能作为已经实现的工业绩效。

计算平台可以把这种权衡转化为可重复的情

景比较。BioSTEAM将稳态流程模拟、设备尺寸、公用工程消耗与不确定性下的TEA连接,可用于比较设计方案并生成环境评价所需的清单数据^[76]。不过,流程模型输出并不等于完成了LCA;分配规则、能源背景与产品生命周期边界仍需另行确定。Gaffey等对生物炼制LCA的方法学回顾指出,系统边界、土地利用、产品末端处置以及不确定性分析的缺失,会限制研究间的可比性^[77]。因此,本文建议先固定功能单位与边界,再分别报告物料能量参数、价格情景和环境方法学假设引起的排序变化;若优势依赖某一副产品分配规则或能源情景,应明确其成立条件。

2.5 群体感应动态调控:分布式过程控制的生物学实现

群体感应(quorum sensing, QS)能够将细胞密度相关信号转化为转录调控,是实现细胞内阶

段切换的一类机制^[78, 79]。以LuxI/LuxR为代表的信号合成与响应模块可用于工程化设计;图6则展示LasI/LasR与RhlI/RhlR相互连接的QS网络。对工业协同而言,关键是信号积累、混合和降解如何改变切换阈值,因而QS参数需要在相应反应器暴露条件下标定。

Doong、Gupta和Prather在大肠杆菌中结合QS与肌醇响应传感器,实现分层动态调控^[78]。图7展示其中肌醇传感器的结构与响应特征,而非完整的QS与代谢调控系统。其工程意义是将细胞密度信号与代谢物反馈结合,但由实验培养条件向工业尺度外推仍需重新验证。

QS网络可由并行、串联或相互影响的回路组成,群体响应不一定遵循单一信号-输出关系^[79]。在工艺放大中,信号积累与混合状态变化可能引起阈值和切换时序偏移;长期培养还需关注生产功能与生长优势之间的选择压力。因此, QS系统应联合评价扰动下的响应一致性、遗传稳定性与

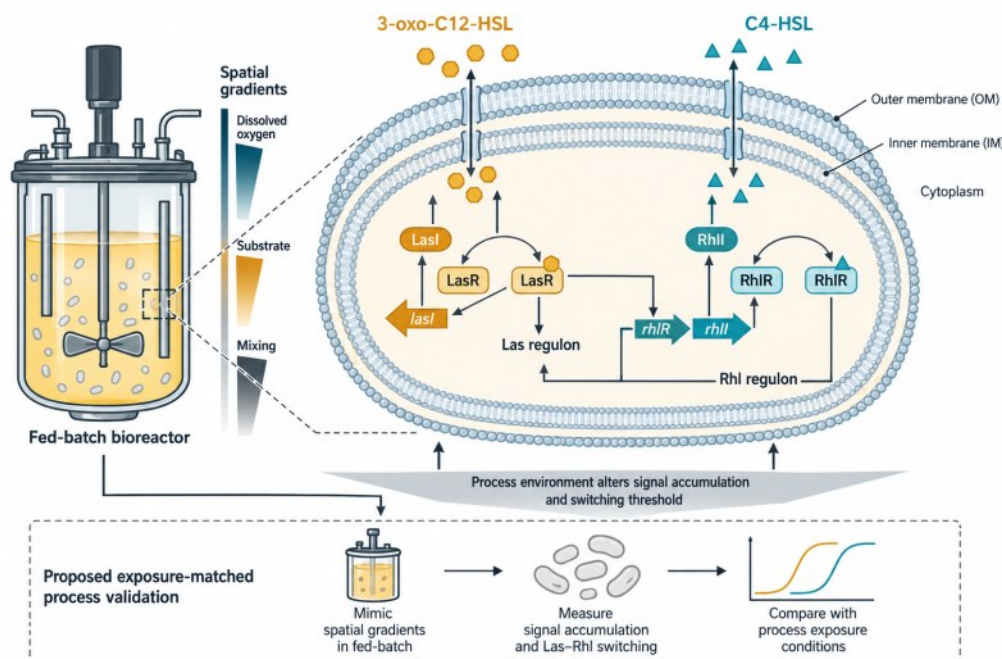


图6 群体感应的细胞-过程耦合示意^[79],补料分批生物反应器中溶解氧、底物浓度及混合程度的空间差异影响信号分子积累及Las-Rhl群体感应调控。通过模拟工艺环境梯度、检测信号积累及基因调控响应,评估环境非均一性对QS系统的影响;LasI/RhlI: 信号分子合成酶, LasR/RhlR: 转录调控蛋白

Fig. 6 Schematic of Quorum sensing at the cell-process interface^[79], Spatial variations in dissolved oxygen, substrate concentration, and mixing within fed-batch bioreactors affect signal molecule accumulation and Las-Rhl quorum-sensing regulation. By simulating process-related environmental gradients and measuring signal accumulation and gene regulatory responses, the effects of environmental heterogeneity on the QS system can be evaluated; LasI/RhlI: autoinducer synthases; LasR/RhlR: transcriptional regulators..

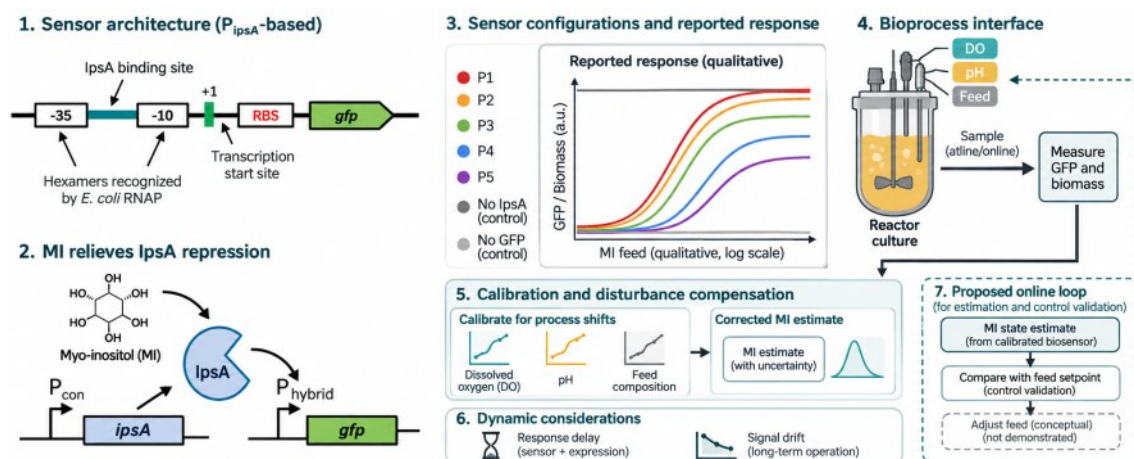


图7 IpsA 肌醇传感器及其过程接口^[78]，利用肌醇（MI）与转录调控蛋白 IpsA 的特异性结合，实现绿色荧光蛋白（GFP）的动态表达。MI 积累可解除 IpsA 对杂合启动子的转录抑制，不同启动子（P1-P5）通过调节 IpsA 表达水平改变传感器的响应强度与激活阈值。结合生物反应器中溶解氧、pH 及补料条件的监测，可进一步探索传感器校准、环境扰动补偿及在线反馈控制策略。

Fig. 7 Structure and response characteristics of an IpsA-based inositol biosensor^[78]. The system utilizes the specific interaction between myo-inositol (MI) and the transcriptional regulator IpsA to dynamically control green fluorescent protein (GFP) expression. MI accumulation relieves IpsA-mediated transcriptional repression of the hybrid promoter, while different promoters (P1-P5) modulate sensor response and activation thresholds by regulating IpsA expression. Integration with bioreactor monitoring of dissolved oxygen, pH, and feeding conditions provides a potential framework for sensor calibration, disturbance compensation, and online feedback control.

生产表现。QS 属于细胞内调控，数字孪生则连接外部测量、模型和设备执行，两者可协同，但不能互作闭环实施的证据。动态调控的输入也不必限定为细胞密度。Zhang 等利用关键代谢中间体的响应构建动态传感-调控系统，以协调大肠杆菌中脂肪酸衍生产物的合成^[80]；Dahl 等则从毒性中间体引起的转录响应中筛选启动子，调节法呢基焦磷酸的积累并改善紫穗槐二烯生产^[81]。这些研究说明，密度信号适合安排阶段切换，而代谢物或应激信号可用于缓解细胞内部失衡。二者均需考虑传感器阈值、表达延迟和调控回路负担。当工业环境扰动快于转录响应时，细胞回路可能无法逐次跟踪波动；此时应联合采用路径耐受性设计与外部补料控制，而不是假定增加一个传感模块即可消除放大损失。

3 路径-尺度-数据的协同机制与验证流程

3.1 路径维度：全链条路线选择与底盘适配

路径维度要求在候选路线与底盘选择时同步

考虑工艺边界。摇瓶中表现优异的菌株可能在工业发酵中受到氧供、底物波动或分离负荷限制，因此路线搜索与工艺验证需要双向反馈。逆生物合成从目标产物回溯候选路径，过程侧的暴露与性能偏差再用于调整底盘和调控方案。两者共同决定哪些候选路线值得优先验证，而不是直接保证其能够放大。

3.1.1 逆生物合成分析：从目标出发的理性路径搜索

逆生物合成分析是支撑生物制造全链条正向设计的核心工具，其逻辑类似于有机化学中的逆合成分析：从目标产物出发，逐步逆向搜索可用的生物催化反应，直至将其连接至宿主的内源代谢中间体。这一方法不仅用于路径发现，也为工程菌株的设计提供量化决策依据，使候选路线在产物可达性、代谢负荷及工艺条件约束下可行。RetroPath2.0 利用反应规则构建候选生物合成路径，RetroPath RL 进一步将强化学习引入路径搜索，BNICE 则基于生化反应规则探索代谢路径^[82-84]。图8展示 RetroPath2.0 的输入与反应网络输出。这些工具为路线发现提供计算支撑，但候选排序还

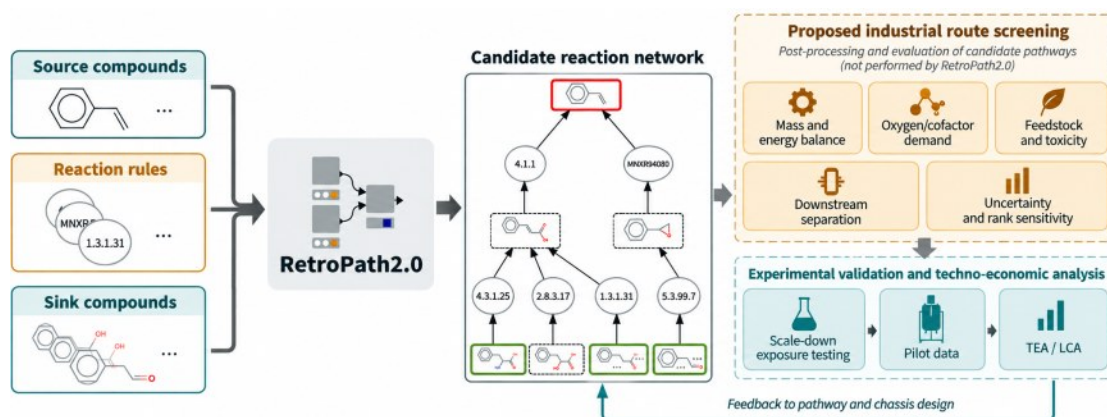


图8 RetroPath2.0的输入与反应网络输出示意^[82]。

Fig. 8 Inputs and reaction-network output of RetroPath2.0^[82].

需要结合酶、宿主与工艺边界，不能仅凭反应可达性决定工业适用性。工业适配性筛选应同时考虑关键酶的氧与辅因子需求、底物和产物毒性、原料可得性、宿主耐受性、分离负荷及生命周期边界。对缺乏参数的候选应明确不确定性，并检验约束变化是否改变路径排序。通过初筛的路线进入关键酶与底盘测试，再经scale-down及中试数据更新，形成路径选择与过程反馈的闭环。

路径排序应将化学计量可行性与过程可行性分别检验。碳收率较高的方案，若需要更高的ATP再生通量、供氧能力或辅因子再生投入，其全流程优势可能减弱。 β -法呢烯的中心碳代谢重构提供了相反方向的实例：设计直接降低了生产路径的能量和氧需求，从而缓解过程约束^[70]。据此，建议先用物料、能量及氧化还原平衡筛选不可行候选，再对可行方案比较生产强度、分离负荷和不确定性。该顺序能明确舍弃路线的原因，也避免把不同量纲的指标在权重依据不足时合成为一个总分。路线筛选还应把热力学可行性与酶实现性分开检验。Henry等的热力学约束通量分析在质量守恒之外引入反应自由能与代谢物活度约束，可排除在设定条件下不可行的通量方向^[85]；其结果仍依赖浓度范围、pH与自由能参数，不能被解释为不受工况影响的路线定论。Selenzyme进一步依据反应和序列相似性、来源物种与宿主的关系、预测溶解性等信息筛选候选酶^[86]。两类方法分别回答“路线是否允许”和“可能由哪些酶实现”。通过筛选后，仍需实测关键步骤的活性、选择性、辅因子偏好与失活，并将测量结果反馈至路径排

序，避免把数据库命中当作宿主内可运行的证据。

3.1.2 过程约束反馈下的底盘适配

工业放大中的逆向纠错，应把局部DO/pH暴露、底物峰值、剪切历史、代谢副产物、细胞状态和性能衰减等信息回传到菌株设计，进而调整底盘、酶、调控回路与操作参数。底盘选择因此既取决于分子产量潜力，也取决于传质适配、耐受性、遗传稳定性和分离成本。不同底盘的评价应服务全链条约束：大肠杆菌构建快但需考虑内毒素和应激耐受；酿酒酵母工艺成熟但高密度培养受氧供影响；*Yarrowia lipolytica*、谷氨酸棒杆菌和蓝细菌具有特定底物或产物优势，但编辑工具、遗传稳定性和放大数据可能不足。底盘选择应联合目标产物性质、氧需求、原料成本、下游分离与LCA，而不能按实验室产量单指标排序。

3.2 尺度维度：跨层变量传递与独立验证

生物制造横跨分子、细胞、反应器和工厂四个尺度，关键是建立跨层变量的映射及验证关系。分子模拟与动力学实验共同约束酶活性、底物亲和力和失活参数；GSMM与MFA将这些信息关联到细胞通量、生长与耗氧；CFD提供反应器中的DO、pH、底物及剪切暴露分布；工厂级模型接收产率、回收率、能耗、成本和环境负荷。每次参数传递都应说明测量或估计来源、适用条件及不确定性。跨尺度耦合首先要选择能够回答问题的细胞模型。dFBA适合将胞外物料衡算与受约束的代谢通量联系起来^[74]；若研究目标涉及秒级底物

切换、胞内代谢物积累或调控滞后,则仅依赖稳态通量解可能不足,需要由动态代谢测量约束的结构化动力学模型。Wang等总结的代谢-流体耦合路线将细胞轨迹、代谢物定量和过程性能联系起来^[87]。因此,模型复杂度应由目标响应的时间尺度和可获取数据决定,而不能以是否使用了GSMM或CFD作为深度的替代指标。

尺度映射需要同时说明流场可信度和生物学响应可信度。Haringa在工业反应器研究中,以计算粒子记录细胞沿流动路径经历的底物状态,并比较不同流场求解方法所得的轨迹统计和代谢响应^[88]。轨迹提供的是模型预测的暴露历史,不能直接等同于实测细胞命运。因此应先以混合与流体数据验证反应器模型,再检验轨迹分布对网格、湍流模型、摄取动力学和采样分辨率的敏感性,最后用独立培养实验验证产率、耗氧或副产物响应。Zhao等依据产黄青霉的过程模型及工业细胞轨迹信息,设计三室缩尺度系统,在实验室复现了底物过量、限制和饥饿三类代谢状态^[89]。该研究说明,缩尺度装置应由需要复现的暴露分布反向设计,而非预先选择一种装置后再用平均浓度匹配。转移至其他菌株时,还需重新确定状态边界与停留时间;三室结构本身并非通用答案。若简化装置已能重现决定性能的暴露与响应,则没有必要在每个在线控制周期重新运行全尺度CFD;在线任务可使用在相关工况下验证过的分室、降阶或混合模型^[87, 88]。

3.3 数据维度:参数获取、状态估计与反馈决策

数据驱动方法的协同作用不在于替代机理,而在于把不同尺度的数据组织成可更新的决策链:分子层模型提出可测试的酶变体;高通量与scale-down实验生成联合表型;PAT提供过程状态;混合模型量化预测与不确定性;数字孪生把建议反馈给控制和下一轮DBTL。下面各技术均以其在该链条中的接口作用展开。

3.3.1 蛋白质结构预测与智能酶设计

蛋白质结构预测为酶改造提供结构起点,但结构精度并不自动转化为工业条件下的催化性能^[90-93]。ProteinMPNN与ProGen等方法可用于候

选序列设计或排序^[94, 95]。在数据链中,其作用是提出可测试候选,并将温度、pH、溶剂及底物条件下测得的活性、失活、选择性和表达结果,转化为代谢与反应器模型可使用的参数。候选的工业适用性仍取决于功能测试与工艺耐受性验证。参数传递应区分结构预测、实验测量和模型估计,并显式传播不确定性,避免把单酶性能直接等同于细胞通量或反应器产率。催化周转数预测的争议表明,模型应用范围需要独立检验。Li等提出DLKcat,利用蛋白质序列和底物结构预测kcat,并用于酶约束代谢模型参数化^[96]。Kroll和Lercher对其数据与测试结果重新分析,指出训练集与测试集中高度相似的酶较多,对不熟悉酶家族和未见突变体的预测能力明显受限^[97]。因此,跨酶家族的总体相关性不能替代同一酶不同突变体的活性排序能力。用于工业酶筛选时,应按序列相似性或家族划分验证集,并与简单基线比较;对决定路线排序的关键kcat,应优先测量或进行区间敏感性分析。上述限制针对相应模型与评估设置,不意味着所有机器学习动力学预测均无价值。

3.3.2 数据辅助实验与工艺优化

Shields等利用贝叶斯优化选择化学反应实验条件,为有限预算下的实验设计提供了方法实例^[98]。向发酵迁移时,可用高斯过程回归(Gaussian process regression, GPR)等代理模型描述培养条件与响应,再由采集函数选择下一轮实验。将质量衡算或生长动力学等约束纳入模型,有助于限定候选操作范围;但化学反应中的优化效果不能直接外推为发酵收益,跨批次与跨尺度表现仍需独立验证。在菌株层面,Radivojević等的自动推荐工具ART用概率模型给出下一轮候选及其产量预测分布,并在多个代谢工程数据集上评估其作用^[99]。其决策意义是把预测不确定性纳入实验选择,而非把当前预测最高的候选直接视为最终优解。进入动态过程建模后,还需选择能够解释培养历史的结构。Mowbray等将候选动力学结构与强化学习结合,同时识别模型结构和时变参数^[100];但该研究的验证基于模拟案例,不能直接当作工业闭环控制效果。因此,实验推荐、动力学辨识和控制执行应分别评价,避免用同一组训练拟合误差替代三个环节的验证。

3.3.3 过程分析技术(PAT)与质量源于设计(QbD)

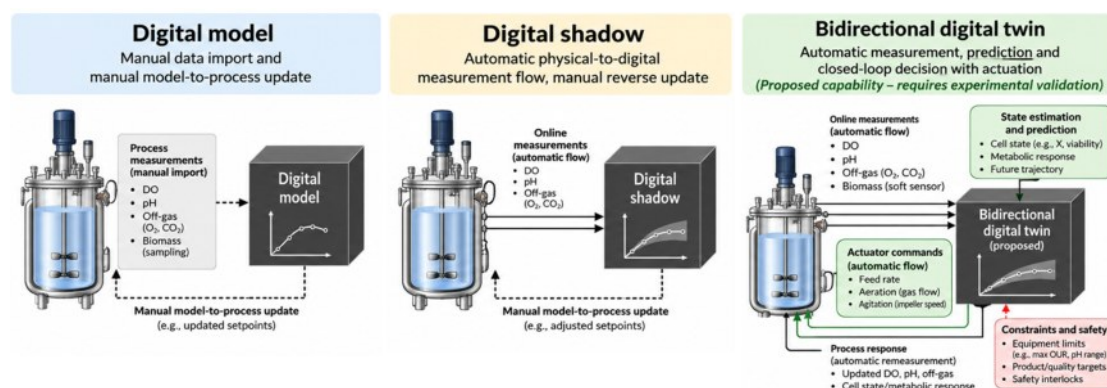
PAT为状态估计和模型更新提供测量基础。质量源于设计(quality by design, QbD)则要求通过实验界定质量属性、过程参数及其允许设计空间^[101-103]。两者结合的重点是形成可校准、可追溯的数据链,而非单纯增加传感器数量。测量值需保留采样条件、校准信息、时间戳及质量标记;离线和近线数据用于补充难以实时观测的状态。数据质量与延迟决定模型能够支持哪些控制任务。高通量培养数据进入上述链条前,也需要保留校准和处理步骤。Osthege等开发的bletl可整合BioLector微型培养数据,并结合校准模型和贝叶斯方法估计时变比生长速率及其不确定性^[104]。这一实例说明,原始散射光或荧光信号与生物量、生长速率之间存在测量模型,不能将传感读数直接作为无误差的生理变量。跨设备或跨尺度迁移时,应重新检查信号饱和、培养基背景及校准有效性,并保留原始数据、校准版本和处理记录,才能判断模型偏差来自生物变化还是测量变化。

3.3.4 数字孪生:协同框架的技术底座

数字模型不具有自动数据交换,数字阴影将物理过程数据自动输入模型,而双向数字孪生还将模型决策自动反馈至物理系统^[105]。图13比较前两类数据流,双向闭环则要求在此基础上增加可执行决策及响应回测。已有模型预测控制研究为细胞培养中的模型与操作耦合提供了实例^[106],但不能据此认定各类微生物过程均已实现完整数字孪生。以好氧分批补料为例,DO、pH及尾气O₂/CO₂提供在线输入,底物和生物量的离线或近线测量用于定期校正。质量衡算与混合模型据此估计底物、生物量和耗氧状态,并预测氧需求与底物积累。控制器在设备能力、DO窗口和补料变化率等约束内求取操作量,由设备控制系统调整补料及通气/搅拌。动作执行后的实测响应再次进入模型,更新状态并检查预测偏差,由此形成“测量-估计-预测-执行-再测量”的双向回路。预测时域本身也是闭环可用性的约束。Park等针对哺乳动物细胞培养的假设在线数据集比较了多步预测策略、输入特征和算法,以支持面向数字孪生的过程预测^[107]。该工作提供了预测层的方法依据,但

尚不能证明设备执行后的实际收益。控制应用应使预测时域覆盖测量与执行延迟,并分别检验短期偏差和多步误差累积;若离线预测使用了未来才可获得的变量,即使拟合准确,也不能直接转化为在线控制策略。已有研究也揭示了闭环实现与效果评价之间的距离。

Satwekar等将近线糖型分析、过程数据与模型辅助补料连接,用两个5 L细胞培养批次比较扰动后不干预和模型辅助控制的差异^[108]。研究以27%的半乳糖基化水平及±3个百分点死区为目标,控制批次第14天达到24.6%,但第6至14天的报告范围为15.4%-28.2%,因此终点落入目标范围不能证明整个期间均保持在范围内。此外,该试验平台仍包含人工整理模型输入和人工录入控制动作的环节,应视为具有人工参与的可行性演示,而非已实现全自动工业数字孪生。该研究的近线分析周转约210 min,按8 h间隔进行糖型监测,所对应的是小时级质量属性变化^[108]。这一时间窗不能直接迁移到微生物培养中秒至分钟级的氧或底物波动。工程实施需要先说明“要控制什么、允许多大延迟”,再选择传感器、状态估计方法与执行频率。对于难以快速直接测量的状态,可由可观测变量构建软测量,但必须通过独立数据检验可辨识性和预测误差。不同用途的数字模型可以共享信息,却未必适合采用同一采样和控制周期。在线操作调整与菌株再设计具有不同时间尺度:前者作用于本批过程,后者将跨批次持续出现的耗氧或副产物偏差反馈至DBTL。验证时应按独立批次、时间顺序及拟迁移工况划分数据,避免将同一批次高度相关的相邻采样点同时用于训练和测试。除预测误差外,还应比较闭环前后的越界时长、底物积累、质量属性及生产表现,并记录执行延迟、模型版本、操作动作与响应。传感失效、残差持续超限或进入未验证工况时,系统应退回经验证的常规控制或人工处置。Kritzinger等针对数字孪生技术的工程化应用成熟度完成了层级化界定,将其划分为三个递进发展层级。数字模型:模型独立存在,无自动数据流。数字阴影:传感器数据可自动输入模型,但模型预测和优化结果不反馈至物理系统(图9所示)。

图9 数字模型与数字阴影的数据交互方式比较^[105]Fig. 9 Data exchange in a digital model and a digital shadow^[105]

3.4 协同实施流程与建议评价指标

框架落地需要同时明确接口、指标和阶段门。表3给出建议的评价集，其中“联合评价”是路径、尺度与数据三维共同接受的系统考核，并非第四个并列维度。各项目应按产品、细胞或无细胞体系及开发阶段选择适用指标，对不适用项和证据缺口作出说明。

供氧容量裕量可定义为 $M_{O_2} = (OTR_{cap} - OUR_{demand}) / OUR_{demand}$ ，其中 $OUR_{demand} > 0$ 为设计耗氧需求， OTR_{cap} 为实际培养体系、设备能力及最低允许DO下评估的供氧容量，两者采用相同体积和时间基准。瞬时OTR在准稳态可接近OUR，不能由其差值推断设备容量储备。平均供氧裕量也不能替代局部暴露分析，微氧工艺须按其特定操作窗口评价。建议实施流程为：（1）定义产品、功能单位与工业边界；（2）把氧供、混合、原料、分离和法规要求转化为设计约束；

（3）联合筛选路径、底盘与操作窗口；（4）用scale-down复现目标暴露并更新模型；（5）在中试阶段评价各项放大性能保持率、批次变异和模型误差；（6）以边界一致的TEA与LCA完成阶段门决策；（7）将偏差回传下一轮DBTL。各阶段以预先规定的接受标准判断是否继续开发，不以单项高产替代其余证据。

4 分层案例分析：从概念验证到工业化证据

1,3-PDO生产是杜邦/杰能科合作开发的经典案例。Nakamura和Whited介绍了从葡萄糖出发的菌株与工艺开发，报道3.5 g/L/h的生产速率、135 g/L的最终浓度和51%的重量收率^[62]。尺度接口则包括高细胞密度补料、供氧、产物抑制与高浓度发酵

表3 三维协同框架的接口变量、量化指标与阶段门

TABLE 3 Interface variables, quantitative metrics, and stage gates for the three-dimensional framework

评价层面	接口变量	建议量化指标	阶段门
路径	氧/辅因子需求、毒性、原料与分离难度	理论/实测收率；碳与电子平衡；产物耐受阈值	候选路线满足质量守恒，并通过关键酶与底盘可行性验证
尺度	DO、pH、底物、剪切暴露；OUR/OTR	各项放大性能保持率 R_{scale} ；供氧容量裕量；批次CV	scale-down响应经验证；中试关键属性满足预设接受范围，保持率置信下限达到项目阈值
数据	PAT测量、模型状态、控制动作	RMSE/MAE；预测区间覆盖率；数据延迟；漂移率	外部数据验证通过，失效保护和人工接管边界明确
联合评价	滴度、速率、收率、回收率、成本与环境负荷	Titer-Rate-Yield；单位产品成本；全球变暖潜能值/能耗	TEA与LCA采用一致边界，系统方案满足预先设定的经济与环境目标

注：表3说明：变异系数（coefficient of variation, CV）描述批次间离散程度。对滴度、产率和生产强度分别定义 R_{scale} , $j=Q_j$ ，放大/ Q_j ，基准，并说明菌株、原料、培养方式及评价时段的可比性，不将不同指标任意合成总分。

液分离。评价时需区分不同开发阶段的辅因子使用、培养条件及指标计算基准。原料与分离目标改变时，协同方案也会改变。Zhang 等采用经适应性进化的巴氏梭菌，在立方米尺度以粗甘油联产 1,3-PDO 和有机酸，并将酸的催化酯化并入下游处理，借此简化 PDO 回收^[109]。这条路线不同于前述葡萄糖路线，其意义在于把部分副产物作为可回收产品处理，而不是单纯追求发酵阶段的最高主产物选择性。Liu 等对二醇生物合成与分离的综述同样强调，分离方案需匹配实际发酵液组成和产品要求^[110]。因此，在路径维度应比较碳源与联产选择性，在尺度维度检验杂质和回收负荷，在数据维度建立各产品及损失的物料衡算；经济优势还取决于酯产品销路、催化投入、最终纯度及副产品分配，不能仅凭联产总滴度判定。

在 β -法呢烯开发中，Meadows 等引入四个非天然代谢反应，重构胞质乙酰辅酶 A 供给，降低 ATP 需求和碳损失，并改善氧化还原平衡^[70]。在该研究的对照条件下，相同用于生产的糖量可形成多 25% 的法呢烯，而耗氧需求减少 75%；工程菌还在法呢烯体积分数超过 15% 的培养液中维持了两周稳定收率。这里的百分比具有各自的比较基准，不能换算成任意菌株或反应器的通用 OUR 降幅。其关键意义是通过改变路径的化学计量与能量需求，缓解工业供氧约束，而非仅在既定菌株上提高搅拌功率。两周收率稳定为该菌株在报告条件下的持续生产提供了证据，但仍不能替代不同装置中的性能保持率和多批次变异数据^[70]。降低需氧量也可能改变限制步骤，使碳源供给、散热、产物分相或回收成为新的约束。该案例对框架的贡献在于揭示“过程瓶颈反馈至路径设计”的因果链；数据维度仍应另行核查在线估计、决策执行与偏差校正，而不是从生产改善反推出自

动闭环已经完成（表 4）。1,3-PDO 较清楚地连接了路径设计、反应操作与下游加工， β -法呢烯突出以降低路径耗氧缓解放大约束。表 3 以 1,3-PDO 和 β -法呢烯生产为例，从路径与尺度接口、数据来源及评价重点等方面，梳理了不同生物制造案例的证据基础、数据缺口及技术局限，揭示了跨尺度数据整合与生产过程评价中存在的主要挑战。本文所整理的案例尚未充分呈现在线状态估计、自动执行与响应校正组成的数据闭环。因此，这些案例支持框架的解释与比较作用，但不能视为对全部量化指标的独立验证；技术放大、成本和环境绩效仍应分别评价。

5 结论与未来展望

本文的分析表明，合成生物学与过程工程应围绕可传递变量协同设计，而不应在菌株定型后再处理放大问题。标准化元件与 DBTL 循环提供设计基础，但上下文依赖性和组合空间增长仍限制预测能力^[33, 111]。单一 kLa、单位体积功率或混合时间准则也不足以描述工业反应器中的动态暴露^[14, 15]。路径、尺度与数据三维应通过明确的输入、输出和验证证据连接。路径维度应把氧需求、辅因子平衡、毒性、原料与分离负荷前置到候选路线及底盘筛选中，并通过边界一致的 TEA 与 LCA 评价权衡^[16, 75, 82-84]。尺度维度应以动态模型、CFD 与 scale-down 连接暴露和细胞响应，报告参数来源、不确定性及跨尺度独立验证^[14, 15, 74]。数据维度应以决策任务组织测量、模型和执行。蛋白质设计与机器学习用于提出候选及预测，PAT 提供适用于目标决策时间窗的观测，过程模型用于估计状态并形成受约束的操作建议。数字孪生的工

表 4 案例在路径-尺度-数据框架下的证据与边界

TABLE 4 Evidence and limitations of four cases within the pathway-scale-data framework

案例	路径与尺度接口	本稿呈现的数据及缺口	评价重点与证据边界
1,3-PDO	路径及辅因子调整与补料、供氧和分离窗口耦合	有葡萄糖路线开发和粗甘油联产—分离耦合证据；模型误差、自动控制动作及多批次稳定性仍需另行检验	联合评价生产与回收表现；常规 DO 控制不等同数字孪生
β -法呢烯	降低单位产物氧需求以缓解反应器约束	在报告工况下有两周稳定收率及高产物体积分数证据；跨装置保持率、多批次变异和自动闭环仍未系统呈现	降低路径需氧量可缓解供氧限制；检验限制步骤转移及新工况适用性

注：数据缺口指本稿所引证据尚未系统呈现的内容，不代表相关工业过程必然没有采用该技术。不同产品与成熟度阶段采用表 3 中适用的指标，不以产品名称统一赋予成熟度等级。

程价值需要通过真实控制动作及其响应评价；近线分析、人工参与的模型控制和全自动双向闭环应分别报告，不能仅凭使用了预测模型而等同处理^[105, 106, 108]。近期研究应优先补足三类证据：在具有代表性的动态暴露下检验菌株与模型，建立独立批次的控制效果和失效记录，以及在统一边界内比较成本与环境负荷^[66, 87-89, 108, 112, 113]。这些任务应按产品和开发阶段选择。资源负担反馈、轨迹驱动的缩尺度设计及模型辅助控制分别提供了可借鉴的研究路径，但各自在特定宿主、设备和条件下获得的结果，仍需经过目标工艺验证后才能用于工业决策。

参 考 文 献

- [1] CARBONELL P, JERVIS A J, ROBINSON C J, et al. An automated Design-Build-Test-Learn pipeline for enhanced microbial production of fine chemicals [J]. *Communications Biology*, 2018, 1.
- [2] CAMERON D E, BASHOR C J, COLLINS J J. A brief history of synthetic biology [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(5): 381-90.
- [3] GARDNER T S, CANTOR C R, COLLINS J J. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli* [J]. *Nature*, 2000, 403(6767): 339-42.
- [4] STRICKER J, COOKSON S, BENNETT M R, et al. A fast, robust and tunable synthetic gene oscillator [J]. *Nature*, 2008, 456(7221): 516-U39.
- [5] JACOB F, MONOD J. GENETIC REGULATORY MECHANISMS IN SYNTHESIS OF PROTEINS [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1961, 3(3): 318-+.
- [6] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity [J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-21.
- [7] CARVUNIS A R, IDEKER T. Siri of the Cell: What Biology Could Learn from the iPhone [J]. *Cell*, 2014, 157(3): 534-8.
- [8] DANINO T, MONDRAGÓN-PALOMINO O, TSIMRING L, et al. A synchronized quorum of genetic clocks [J]. *Nature*, 2010, 463(7279): 326-30.
- [9] BENNER S A, SISMOUR A M. Synthetic biology [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6(7): 533-43.
- [10] CHENG A A, LU T K. Synthetic Biology: An Emerging Engineering Discipline [M]//YARMUSH M L. *Annual Review of Biomedical Engineering*, Vol 14. 2012: 155-78.
- [11] KHALIL A S, COLLINS J J. Synthetic biology: applications come of age [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(5): 367-79.
- [12] ELOWITZ M B, LEIBLER S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators [J]. *Nature*, 2000, 403(6767): 335-8.
- [13] O'BRIEN E J, MONK J M, PALSSON B O. Using Genome-scale Models to Predict Biological Capabilities [J]. *Cell*, 2015, 161(5): 971-87.
- [14] JUNKER B H. Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2004, 97(6): 347-64.
- [15] GARCIA-OCCHOA F, GOMEZ E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview [J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(2): 153-76.
- [16] GONTIA P, JANSSEN M. Life cycle assessment of bio-based sodium polyacrylate production from pulp mill side streams: case study of thermo-mechanical and sulfite pulp mills [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2016, 131: 475-84.
- [17] ENDY D. Foundations for engineering biology [J]. *Nature*, 2005, 438(7067): 449-53.
- [18] HEINEMANN M, PANKE S. Synthetic biology - putting engineering into biology [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(22): 2790-9.
- [19] ANDRIANANTOANDRO E, BASU S, KARIG D K, et al. Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline [J]. *Molecular Systems Biology*, 2006, 2.
- [20] ENGLER C, KANDZIA R, MARILLONNET S. A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability [J]. *Plos One*, 2008, 3(11).
- [21] WEBER E, ENGLER C, GRUETZNER R, et al. A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs [J]. *Plos One*, 2011, 6(2).
- [22] STORCH M, CASINI A, MACKROW B, et al. BASIC: A New Biopart Assembly Standard for Idempotent Cloning Provides Accurate, Single-Tier DNA Assembly for Synthetic Biology [J]. *Acs Synthetic Biology*, 2015, 4(7): 781-7.
- [23] CERONI F, ALGAR R, STAN G, et al. Quantifying cellular capacity identifies gene expression designs with reduced burden [J]. *Nature Methods*, 2015, 12(5): 415-8.
- [24] CERONI F, BOO A, FURINI S, et al. Burden-driven feedback control of gene expression [J]. *Nature Methods*, 2018, 15(5): 387-93.
- [25] WEIßE A Y, OYARZÚN D A, DANOS V, et al. Mechanistic links between cellular trade-offs, gene expression, and growth

- [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(9): E1038-E47.
- [26] GYORGY A, JIMÉNEZ J I, YAZBEK J, et al. Isocost Lines Describe the Cellular Economy of Genetic Circuits [J]. Biophysical journal, 2015, 109(3): 639-46.
- [27] RANGANATHAN S, SUTHERS P F, MARANAS C D. OptForce: An Optimization Procedure for Identifying All Genetic Manipulations Leading to Targeted Overproductions [J]. Plos Computational Biology, 2010, 6(4).
- [28] BURGARD A P, PHARKYA P, MARANAS C D. OptKnock: A bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2003, 84(6): 647-57.
- [29] STEPHANOPOULOS G, SINSKEY A J. METABOLIC ENGINEERING - METHODOLOGIES AND FUTURE-PROSPECTS [J]. Trends in Biotechnology, 1993, 11(9): 392-6.
- [30] KEASLING J D. Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering [J]. Metabolic Engineering, 2012, 14(3): 189-95.
- [31] GIBSON D G, YOUNG L, CHUANG R Y, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases [J]. Nature Methods, 2009, 6(5): 343-U41.
- [32] ROGERS J K, TAYLOR N D, CHURCH G M. Biosensor-based engineering of biosynthetic pathways [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2016, 42: 84-91.
- [33] COUSSEMENT P, BAUWENS D, MAERTENS J, et al. Direct Combinatorial Pathway Optimization [J]. Acs Synthetic Biology, 2017, 6(2): 224-32.
- [34] JESCHEK M, GERNGROSS D, PANKE S. Rationally reduced libraries for combinatorial pathway optimization minimizing experimental effort [J]. Nature communications, 2016, 7: 11163.
- [35] SANDER J D, JOUNG J K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes [J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(4): 347-55.
- [36] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering [J]. Cell, 2014, 157(6): 1262-78.
- [37] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems [J]. Science, 2013, 339(6121): 819-23.
- [38] DOUDNA J A, CHARPENTIER E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. Science, 2014, 346(6213): 1077-+.
- [39] MALI P, YANG L H, ESVELT K M, et al. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9 [J]. Science, 2013, 339(6121): 823-6.
- [40] ZETSCHE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System [J]. Cell, 2015, 163(3): 759-71.
- [41] LIAN J Z, HAMEDIRAD M, HU S M, et al. Combinatorial metabolic engineering using an orthogonal tri-functional CRISPR system [J]. Nature Communications, 2017, 8.
- [42] JAKOCIUNAS T, SONDE I, HERRGÅRD M, et al. Multiplex metabolic pathway engineering using CRISPR/Cas9 in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Metabolic Engineering, 2015, 28: 213-22.
- [43] WILLIAMS R L, MURRAY R M. Integrase-mediated differentiation circuits improve evolutionary stability of burdensome and toxic functions in *E. coli* [J]. Nature communications, 2022, 13(1): 6822.
- [44] LV Y, GU Y, XU J, et al. Coupling metabolic addiction with negative autoregulation to improve strain stability and pathway yield [J]. Metabolic engineering, 2020, 61: 79-88.
- [45] NIELSEN J, KEASLING J D. Engineering Cellular Metabolism [J]. Cell, 2016, 164(6): 1185-97.
- [46] FEIST A M, HENRY C S, REED J L, et al. A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information [J]. Molecular Systems Biology, 2007, 3.
- [47] ORTH J D, CONRAD T M, NA J, et al. A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism-2011 [J]. Molecular Systems Biology, 2011, 7.
- [48] LEE S Y, KIM H U. Systems strategies for developing industrial microbial strains [J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(10): 1061-72.
- [49] MONK J M, LLOYD C J, BRUNK E, et al. iML1515, a knowledgebase that computes *Escherichia coli* traits [J]. Nature Biotechnology, 2017, 35(10): 904-8.
- [50] ORTH J D, THIELE I, PALSSON B O. What is flux balance analysis? [J]. Nature Biotechnology, 2010, 28(3): 245-8.
- [51] THIELE I, SWAINSTON N, FLEMING R M T, et al. A community-driven global reconstruction of human metabolism [J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(5): 419-+.
- [52] LU H Z, LI F R, SÁNCHEZ B J, et al. A consensus *S. cerevisiae* metabolic model Yeast8 and its ecosystem for comprehensively probing cellular metabolism [J]. Nature Communications, 2019, 10.
- [53] DUARTE N C, BECKER S A, JAMSHIDI N, et al. Global reconstruction of the human metabolic network based on

- genomic and bibliomic data [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(6): 1777-82.
- [54] EDWARDS J S, PALSSON B O. The *Escherichia coli* MG1655 in silico metabolic genotype: Its definition, characteristics, and capabilities [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(10): 5528-33.
- [55] KEASLING J D. Manufacturing Molecules Through Metabolic Engineering [J]. *Science*, 2010, 33(6009): 1355-8.
- [56] VARMA A, PALSSON B O. METABOLIC FLUX BALANCING - BASIC CONCEPTS, SCIENTIFIC AND PRACTICAL USE [J]. *Bio-Technology*, 1994, 12(10): 994-8.
- [57] FONG S S, BURGARD A P, HERRING C D, et al. In silico design and adaptive evolution of *Escherichia coli* for production of lactic acid [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 91(5): 643-8.
- [58] EBRAHIM A, LERMAN J A, PALSSON B O, et al. COBRApy: CONstraints-Based Reconstruction and Analysis for Python [J]. *Bmc Systems Biology*, 2013, 7.
- [59] ANTONIEWICZ M R. Methods and advances in metabolic flux analysis: a mini-review [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42(3): 317-25.
- [60] THIELE I, PALSSON B O. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction [J]. *Nature Protocols*, 2010, 5(1): 93-121.
- [61] SÁNCHEZ B J, ZHANG C, NILSSON A, et al. Improving the phenotype predictions of a yeast genome-scale metabolic model by incorporating enzymatic constraints [J]. *Molecular systems biology*, 2017, 13(8): 935.
- [62] NAKAMURA C E, WHITED G M. Metabolic engineering for the microbial production of 1, 3-propanediol [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14(5): 454-9.
- [63] WARNECKE T, GILL R T. Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications - art. no. 25 [J]. *Microbial Cell Factories*, 2005, 4.
- [64] HOSSEINPOUR TEHRANI H, BECKER J, BATOR I, et al. Integrated strain- and process design enable production of 220 g L⁻¹ itaconic acid with *Ustilago maydis* [J]. *Biotechnology for biofuels*, 2019, 12: 263.
- [65] ENFORS S O, JAHIC M, ROZKOV A, et al. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors [J]. *Journal of Biotechnology*, 2001, 85(2): 175-85.
- [66] DELVIGNE F, TAKORS R, MUDDE R, et al. Bioprocess scale-up/down as integrative enabling technology: from fluid mechanics to systems biology and beyond [J]. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(5): 1267-74.
- [67] TAKORS R. Scale-up of microbial processes: impacts, tools and open questions [J]. *Journal of biotechnology*, 2012, 160(1-2): 3-9.
- [68] BRAND E, JUNNE S, ANANE E, et al. Importance of the cultivation history for the response of *Escherichia coli* to oscillations in scale-down experiments [J]. *Bioprocess and biosystems engineering*, 2018, 41(9): 1305-13.
- [69] JUNNE S, KLINGNER A, KABISCH J, et al. A two-compartment bioreactor system made of commercial parts for bioprocess scale-down studies: impact of oscillations on *Bacillus subtilis* fed-batch cultivations [J]. *Biotechnology journal*, 2011, 6(8): 1009-17.
- [70] MEADOWS A, HAWKINS K, TSEGAYE Y, et al. Rewriting yeast central carbon metabolism for industrial isoprenoid production [J]. *Nature*, 2016, 537(7622): 694-7.
- [71] WIECHERT W. 13C metabolic flux analysis [J]. *Metabolic Engineering*, 2001, 3(3): 195-206.
- [72] SAUER U. Metabolic networks in motion: 13C-based flux analysis [J]. *Molecular Systems Biology*, 2006, 2.
- [73] ZAMBONI N, FENDT S M, RÜHL M, et al. 13C-based metabolic flux analysis [J]. *Nature Protocols*, 2009, 4(6): 878-92.
- [74] MAHADEVAN R, EDWARDS J S, DOYLE F J, III. Dynamic flux balance analysis of diauxic growth in *Escherichia coli* [J]. *Biophysical Journal*, 2002, 83(3): 1331-40.
- [75] HERMANN B G, PATEL M. Today's and tomorrow's bio-based bulk chemicals from white biotechnology - A techno-economic analysis [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2007, 136(3): 361-88.
- [76] CORTES-PENˆA Y, KUMAR D, SINGH V, et al. BioSTEAM: A Fast and Flexible Platform for the Design, Simulation, and Techno-Economic Analysis of Biorefineries under Uncertainty [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, 8(8): 3302-10.
- [77] GAFFEY J, COLLINS M N, STYLES D. Review of methodological decisions in life cycle assessment (LCA) of biorefinery systems across feedstock categories [J]. *Journal of environmental management*, 2024, 358: 120813.
- [78] DOONG S J, GUPTA A, PRATHER K L J. Layered dynamic regulation for improving metabolic pathway productivity in *Escherichia coli* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(12): 2964-9.

- [79] WATERS C M, BASSLER B L. Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria [M]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2005: 319-46.
- [80] ZHANG F, CAROTHERS J M, KEASLING J D. Design of a dynamic sensor-regulator system for production of chemicals and fuels derived from fatty acids [J]. *Nature biotechnology*, 2012, 30(4): 354-9.
- [81] DAHL R H, ZHANG F, ALONSO-GUTIERREZ J, et al. Engineering dynamic pathway regulation using stress-response promoters [J]. *Nature biotechnology*, 2013, 31(11): 1039-46.
- [82] DELÉPINE B, DUIGOU T, CARBONELL P, et al. RetroPath2.0: A retrosynthesis workflow for metabolic engineers [J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 45: 158-70.
- [83] KOCH M, DUIGOU T, FAULON J L. Reinforcement Learning for Bioretrosynthesis [J]. *Acs Synthetic Biology*, 2020, 9(1): 157-68.
- [84] HENRY C S, BROADBELT L J, HATZIMANIKATIS V. Discovery and Analysis of Novel Metabolic Pathways for the Biosynthesis of Industrial Chemicals: 3-Hydroxypropanoate [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 106(3): 462-73.
- [85] HENRY C S, BROADBELT L J, HATZIMANIKATIS V. Thermodynamics-based metabolic flux analysis [J]. *Biophysical journal*, 2007, 92(5): 1792-805.
- [86] CARBONELL P, WONG J, SWAINSTON N, et al. Selenzyme: enzyme selection tool for pathway design [J]. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2018, 34(12): 2153-4.
- [87] WANG G, HARINGA C, TANG W, et al. Coupled metabolic-hydrodynamic modeling enabling rational scale-up of industrial bioprocesses [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(3): 844-67.
- [88] HARINGA C. An analysis of organism lifelines in an industrial bioreactor using Lattice-Boltzmann CFD [J]. *Engineering in Life Sciences*, 2023, 23(1): e2100159.
- [89] ZHAO J, MUAWIYA M, ZHUANG Y, et al. Developing rational scale-down simulators for mimicking substrate heterogeneities based on cell lifelines in industrial-scale bioreactors [J]. *Bioresource Technology*, 2024, 395: 130354.
- [90] JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold [J]. *Nature*, 2021, 596(7873): 583-+.
- [91] SENIOR A W, EVANS R, JUMPER J, et al. Improved protein structure prediction using potentials from deep learning [J]. *Nature*, 2020, 577(7792): 706-+.
- [92] TUNYASUVUNAKOOL K, ADLER J, WU Z, et al. Highly accurate protein structure prediction for the human proteome [J]. *Nature*, 2021, 596(7873): 590-+.
- [93] BAEK M, DIMAIO F, ANISHCHENKO I, et al. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network [J]. *Science*, 2021, 373(6557): 871-+.
- [94] DAUPARAS J, ANISHCHENKO I, BENNETT N, et al. Robust deep learning-based protein sequence design using ProteinMPNN [J]. *Science*, 2022, 378(6615): 49-55.
- [95] MADANI A, BEN K, GREENE E R, et al. Large language models generate functional protein sequences across diverse families [J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41(8): 1099-+.
- [96] LI F, YUAN L, LU H, et al. Deep learning-based kcat prediction enables improved enzyme-constrained model reconstruction [J]. *Nature Catalysis*, 2022, 5(8): 662-72.
- [97] KROLL A, LERCHER M J. DLKcat cannot predict meaningful k cat values for mutants and unfamiliar enzymes [J]. *Biology methods & protocols*, 2024, 9(1): bpae061.
- [98] SHIELDS B J, STEVENS J, LI J, et al. Bayesian reaction optimization as a tool for chemical synthesis [J]. *Nature*, 2021, 590(7844): 89-+.
- [99] RADIVOJEVIĆ T, COSTELLO Z, WORKMAN K, et al. A machine learning Automated Recommendation Tool for synthetic biology [J]. *Nature communications*, 2020, 11(1): 4879.
- [100] MOWBRAY M R, WU C, ROGERS A W, et al. A reinforcement learning-based hybrid modeling framework for bioprocess kinetics identification [J]. *Biotechnology and bioengineering*, 2023, 120(1): 154-68.
- [101] WHELAN J, CRAVEN S, GLENNON B. In situ Raman spectroscopy for simultaneous monitoring of multiple process parameters in mammalian cell culture bioreactors [J]. *Biotechnology Progress*, 2012, 28(5): 1355-62.
- [102] CRAVEN S, SHIRSAT N, WHELAN J, et al. Process model comparison and transferability across bioreactor scales and modes of operation for a mammalian cell bioprocess [J]. *Biotechnology Progress*, 2013, 29(1): 186-96.
- [103] RATHORE A S, BHAMBURE R, GHARE V. Process analytical technology (PAT) for biopharmaceutical products [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 398(1): 137-54.
- [104] OSTHEGE M, TENHAEF N, ZYLA R, et al. bletl - A Python package for integrating BioLector microcultivation devices in the Design-Build-Test-Learn cycle [J]. *Engineering in life sciences*, 2022, 22(3-4): 242-59.
- [105] KRITZINGER W, KARNER M, TRAAR G, et al. Digital Twin in manufacturing: A categorical literature review and

- classification; proceedings of the 16th IFAC Symposium on Information Control Problems in Manufacturing (INCOM), Bergamo, ITALY, F Jun 11-13 2018, 2018 [C]. 2018.
- [106] CRAVEN S, WHELAN J, GLENNON B. Glucose concentration control of a fed-batch mammalian cell bioprocess using a nonlinear model predictive controller [J]. Journal of Process Control, 2014, 24(4): 344-57.
- [107] PARK S-Y, KIM S-J, PARK C-H, et al. Data-driven prediction models for forecasting multistep ahead profiles of mammalian cell culture toward bioprocess digital twins [J]. Biotechnology and bioengineering, 2023, 120(9): 2494-508.
- [108] SATWEKAR A, GRACIEUX-SINGLETON M, CUMMINGS C, et al. Operationalizing digital twins in biomanufacturing through interoperable process analytical technology [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2026, 49(8): 2061-83.
- [109] ZHANG C, SHARMA S, MA C, et al. Strain evolution and novel downstream processing with integrated catalysis enable highly efficient coproduction of 1,3-propanediol and organic acid esters from crude glycerol [J]. Biotechnology and bioengineering, 2022, 119(6): 1450-66.
- [110] LIU Y, ZHANG C, ZENG A-P. Advances in biosynthesis and downstream processing of diols [J]. Biotechnology advances, 2024, 77: 108455.
- [111] ANDERSON J C, VOIGT C A, ARKIN A P. Environmental signal integration by a modular AND gate [J]. Molecular Systems Biology, 2007, 3.
- [112] XIE D M. Continuous biomanufacturing with microbes - upstream progresses and challenges [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2022, 78.
- [113] CHEN Z H, WANG L. Process simulation and evaluation of scaled-up biocatalytic systems: Advances, challenges, and future prospects [J]. Biotechnology Advances, 2024, 77.



通讯作者: 杨良嵘(1983-),女,研究员,博士,博士生导师。研究方向为新型绿色分离工艺与新型分离材料,外场强化反应分离技术等。

E-mail: lryang@ipe. ac. cn



第一作者: 于杰淼(1982-),男,副研究员,博士,硕士生导师。研究方向为新型绿色分离工艺与新型分离材料。

E-mail: jmyu@ipe. ac. cn

作者贡献声明:

杨良嵘、刘会洲:提出概念、基本框架、提出研究方向、设计论文框架;于杰淼、党懿茜、李金倩:文献调研与整理于杰淼、杨良嵘、刘会洲:起草论文、修订论文、审核论文于杰淼、杨良嵘、刘会洲:参与论文修订、论文最终版本修订

所有作者均已阅读并同意文章的已发布版本。

利益冲突:

作者刘会洲是本刊编委,在同行评议过程中未进行影响公平性的行为。其他作者没有利益冲突。