

УДК 579.66:57.083.1

ПРАКТИЧЕСКИЕ УСПЕХИ ЛАБОРАТОРНОЙ ЭВОЛЮЦИИ

© 2025 г. Я. Е. Дунаевский^{1,*}, О. А. Кудрявцева², С. М. Агроскин²,
А. А. Гаспарян², М. А. Белозерский¹

¹НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

²Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: dun@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 15.06.2024 г.

После доработки 29.06.2024 г.

Принята к публикации 05.07.2024 г.

Адаптивная лабораторная эволюция (ALE) — это инновационный подход к созданию эволюционировавших штаммов микробов с желаемыми характеристиками и производству продуктов с высокой добавленной стоимостью. ALE также используется как инструмент для более глубокого понимания генетических и/или метаболических путей эволюции. В представленном обзоре предпринята попытка проанализировать результаты работ, объясняющих и демонстрирующих возможности микроорганизмов, как модельных объектов для проведения лабораторных эволюционных экспериментов, все чаще используемых для изучения адаптации, оценки динамики эволюции и проверки различных эволюционных гипотез. Вместе с тем ALE показала себя как многообещающий и эффективный метод, который при использовании для биотехнологических целей, уже привел к получению новых полезных микробиологических штаммов. При этом надо отметить, что имеющиеся на сегодняшний день успехи не только иллюстрируют мощь и универсальность этого подхода, но и выявляют ряд вопросов, остающихся пока без ответа, а сделанные на основании ALE выводы, требуют осторожности в интерпретации полученных результатов.

Ключевые слова: лабораторная эволюция, метаболическая инженерия, микроорганизмы, оптимизация штаммов, стрессовая адаптация

DOI: 10.31857/S0555109925010017 **EDN:** CYUQUL

Адаптивная лабораторная эволюция (ALE) — это инновационный подход к исследованию эволюционных сил, влияющих на фенотипы, стабильность и производительность штаммов, а также к созданию эволюционировавших штаммов микробов с желаемыми характеристиками и обеспечивающими производство продуктов (аминокислоты, этанол, липиды и пр.) с достаточно высокой добавленной стоимостью. В своей простейшей форме эксперименты ALE состоят из длительного культивирования клеток в выбранной среде с целью естественного отбора тех, которые приобретают полезные мутации. Использование эволюции в качестве движущей силы для выбора желаемых изменений — альтернатива концепции рациональной инженерии. В данном случае доверие к естественному отбору позволяет проводить

оптимизацию штамма и обогащение мутантов с повышенной приспособленностью, не требуя при этом предварительного знания генетических изменений, необходимых для подобного действия, поскольку ALE генерирует новые фенотипы посредством случайных мутаций с последующей селекцией или скринингом [1]. Таким образом, ALE лучше всего подходит в тех случаях, когда имеется штамм, который необходимо улучшить, но на данный момент исследователь не знает, как это лучше сделать. Успех экспериментов ALE обусловлен способностью к адаптации, адаптивными мутациями, позволяющими мутантным штаммам превзойти своего предка (исходный штамм) и доминировать в популяции. Внедрение сравнительно дешевых технологий высокопроизводительного секвенирования нового поколения, которые

позволяют выявить изменения в геномах экспериментальных линий по сравнению с предковой популяцией, резко повысило интерес к лабораторной эволюции. Отслеживание мутаций, лежащих в основе фенотипических изменений, дало возможность детального молекулярного анализа новых фенотипов. В настоящее время ALE стала ценным инструментом метаболической инженерии, используемым для разработки и оптимизации штаммов с фенотипическими улучшениями, возникающими в результате случайных мутаций и естественного отбора, а не рациональной инженерии, так как из-за сложности биологических структур имеющаяся на сегодняшний день база данных часто недостаточна для обоснования рационального дизайна [1].

Микробные клетки всегда имели особое значение для биотехнологического использования, позволив реализовать ряд промышленных, клинических и сельскохозяйственных проектов, включая производство биотоплива [2, 3], товарный химический синтез [4], производство лекарств, функциональных кисломолочных продуктов и т.п. [5–7]. Микроорганизмы хорошо подходят для исследований ALE по ряду причин: короткое время генерации, что позволяет изучать их эволюцию на протяжении относительно большого числа поколений за относительно небольшой промежуток времени, простота поддержания больших размеров популяций и возможность сохранять популяции для последующего изучения, так как многие используемые виды можно хранить в состоянии анабиоза, а затем оживлять, что позволяет как бы вернуться “в прошлое” и напрямую сравнивать эволюционировавший штамм с его предком [8]. В большинстве эволюционных экспериментов используются одноклеточные организмы, такие как *Escherichia coli* или *Saccharomyces cerevisiae*, с быстрым ростом, коротким временем размножения, небольшим геномом, адаптирующиеся к среде с определенными питательными веществами и/или определенными внешними воздействиями, и статусом модельных организмов, обеспечивающим необходимую базу знаний для интерпретации результатов эволюции. Успех проводимых экспериментов ALE показал, что классическая генетическая инженерия может быть успешно дополнена искусственным лабораторным отбором микробных клеток с целью создания потенциально надежных и оптимизированных систем производства микробов, то есть эволюция в пробирке стала использоваться как средство эволюционной инженерии. Этот подход предполагает инокуляцию микроорганизмов в определенные селективные условия для долгосрочной адаптации на протяжении многих поколений — длящейся неделями, месяцами или даже годами — посредством непрерывного увеличения селективного давления (например, концентрации определенного соединения или путем использования стрессовых усло-

вий роста). Приспособленность популяции формируется конкуренцией за ограниченные ресурсы и способностью успешно передавать полезные мутации следующим поколениям [9, 10]. В настоящее время методология ALE предполагает использование методов, включающих: 1) последовательный перенос, основанный на повторении субкультивирования на свежей среде через регулярные промежутки времени; 2) перенос колоний, прием, часто используемый, когда последовательный перенос жидкой культуры не применим, в частности, когда клетки агрегируют или образуют биопленку в жидкой культуре; 3) непрерывное культивирование в биореакторах, работающих в хеостатном или турбидостатном режиме культивирования. При использовании ALE в биопроизводстве, а также в фундаментальных исследованиях важно определить, какой подход наиболее эффективен для достижения поставленных целей. Все достоинства и недостатки этих методов подробно рассмотрены в обзоре [11].

Помимо академического интереса, исследования ALE дали уже ряд важных практических результатов. Основные прикладные применения ALE как у дрожжей, так и у бактерий, в основном сводятся к двум направлениям: 1) эволюционная инженерия увеличения скорости роста, использования определенного субстрата и образования продуктов и 2) эволюционная инженерия устойчивости к стрессу. Следует отметить, что такое разделение довольно условно, так как часто эти два направления пересекаются (например, увеличение продукции биотоплива и преодоление токсичности высоких концентраций этанола). В представленном обзоре предпринята попытка проанализировать результаты работ, объясняющих и демонстрирующих возможности микроорганизмов как модельных объектов для проведения лабораторных эволюционных экспериментов, используемых для изучения адаптации и оценки динамики эволюции, а также возможности ALE как многообещающего и эффективного метода, задействованного для биотехнологических целей.

Влияние ALE на увеличение скорости роста, использование определенного субстрата и образование продуктов. Эффективность использования источника питательных веществ является важным аспектом роста микроорганизмов и для промышленных целей может определяться такими факторами, как стоимость субстрата или повышенная скорость его биоконверсии. В многочисленных исследованиях были проанализированы адаптивные изменения микробных популяций под давлением отбора питательных веществ. Показано, что ALE может значительно увеличить скорость роста штамма даже в часто используемых средах культивирования, в которых можно было бы ожидать, что рост уже близок к оптимальному. Например, простой эксперимент ALE продолжительностью

около 1 мес за примерно 2000 поколений в среде с минимальным содержанием глюкозы привел к увеличению скорости роста широко используемого лабораторного штамма *E. coli* K-12 MG1655 на 60% [12]. Были идентифицированы ключевые, воспроизводимо возникающие мутации, которые обеспечивают более высокие темпы роста эволюционировавшего штамма *E. coli* K-12 MG1655 в условиях среды с минимальным содержанием глюкозы, однако интересно, что подавляющее большинство этих мутаций не обнаруживались в выявленной гипермутирующей линии. По-видимому, это можно рассматривать как указание на то, что существует множество генетических изменений, способных обеспечить одинаковое увеличение приспособляемости.

Этот же штамм *E. coli* K-12 MG1655 слабо растет на глицерине как единственном источнике углерода. Было показано, что субоптимальный рост на глицерине может приблизиться к своему теоретическому максимуму за 700 генераций в ходе лабораторной эволюции [13]. А ALE в сочетании с метаболической инженерией позволила за 1300 поколений создать эволюционировавший штамм *E. coli* W, способный превратить дешевый и малоценный глицерин в продукт с добавленной стоимостью — γ -аминомасляную кислоту (ГАМК). Мутационное профилирование, анализ ферментативной кинетики и транскриптомный анализ адаптированного штамма с метаболической системой, оптимизированной для использования глицерина, позволили расшифровать молекулярную основу адаптации, связанную с мутацией гена глицеролкиназы (*glpK*). Кроме того, рационально разработанная инактивация ряда несущественных метаболических генов, включая гены *ackA* (acetate kinase), *mgsA* (methylglyoxal synthase), и *gabT* (4-aminobutyrate aminotransferase) в адаптированном к глицерину штамме, улучшила конечный результат, увеличив титр ГАМК и удельную продуктивность в 3,9 и 4,3 раза соответственно, по сравнению с диким типом. Это свидетельствует о том, что адаптивная эволюция является надежным методом использования микробов для эффективного повышения ценности малоценных химических веществ [14].

Адаптивная эволюция *E. coli* K-12 в ходе длительного экспоненциального роста в процессе периодического выращивания и серийного пассажа на минимальной среде с добавлением α -кетоглутарата, лактата или пирувата за 45–75 сут показала, что ALE приводит к фенотипу, характеризующемуся максимальным темпом роста, который, однако, может не соответствовать наивысшему выходу биомассы. Адаптивная эволюция вызывала некоторые изменения в росте на альтернативных субстратах, общие для всех штаммов. Так, для всех эволюционировавших штаммов наблюдалось снижение роста на цитрате и значительное увеличение

роста на глицерине и лактате. Эти результаты позволяют предположить, что рост на одном субстрате может приводить либо к увеличению, либо к снижению функциональности другого субстрата [15], также как возрастание стрессоустойчивости к одному ингибитору (уксусной кислоте) может снижать устойчивость к другому (молочной кислоте) [16].

Галактоза является распространенным сахаром в непищевых культурах, поэтому представляет интерес создание штаммов, способных эффективно использовать галактозу в качестве источника углерода. Однако дрожжи *S. cerevisiae*, которые часто используются в промышленной биотехнологии, растут на галактозе вдвое медленнее, чем на глюкозе, несмотря на структурное сходство между ними. Показано, что селекция на улучшенное использование галактозы (увеличение специфической скорости роста на галактозе на 24%) может быть достигнута путем 62-суточного серийного переноса культур (≈ 400 поколений) на свежую среду с галактозой в качестве единственного источника углерода. Сравнительный анализ генома эволюционировавших мутантов не выявил мутаций в генах, связанных с метаболизмом галактозы, однако при этом у них был специфически повышен метаболизм резервных углеводов (трегалозы и гликогена). Мутации были идентифицированы в белках сигнального пути Ras/PKA, который регулирует метаболизм резервных углеводов. Авторы считают, что одна из этих идентифицированных мутаций в положении 112 RAS2, приводящая к замене аспартата на тирозин, вызывала увеличение удельной скорости роста на галактозе. Вероятно, в процессе ALE могут быть задействованы непредсказуемые пути для приспособления к увеличению использования галактозы [17].

Saccharomyces cerevisiae обычно является предпочтительным микроорганизмом для производства этанола, поскольку может производить большие количества этанола, более устойчив, по сравнению с бактериями, благодаря более высокой толерантности к этанолу [18], и имеет при этом статус безопасного организма. Используя стратегию ALE, удалось показать, что способность к ферментации двух линий *S. cerevisiae* уже после 100 поколений могла быть значительно улучшена в результате эволюции с использованием этанола в качестве селективного фактора. Это касалось как способности выживать при высоких концентрациях этанола, так и более высокой скорости ферментации в синтетическом бульоне, содержащем 200 г/л глюкозы [19]. Кроме того, ALE рассматривается как возможность использования представителей рода *Saccharomyces* для увеличения производства ароматических соединений [20], улучшения показателей ферментации у полиплоидных штаммов и гибридов и повышения устойчивости к высоким уровням этанола [21, 22],

сокращению времени ферментации как реакции на осмотический стресс [23], получения стрессоустойчивых дрожжей [24]. Методы адаптивной эволюции стали применяться для улучшения дрожжей, используемых для приготовления вина и сакэ, а также использоваться в пивоварении для увеличения использования сахара [25, 26] и улучшения вкусового профиля [27].

Есть несколько примеров, которые свидетельствуют о том, что в процессе ALE может сравнительно быстро появиться новый признак. Неспособность использовать цитрат в качестве источника углерода в аэробных условиях является определяющей характеристикой *E. coli* как вида. Однако экспериментальная культура *E. coli* может развить такую способность в результате тандемной дубликации, которая захватывает аэробно экспрессируемый промотор для экспрессии ранее молчащего переносчика цитрата [28], или выработать способность использовать неприродный источник углерода 1,2-пропандиол, которая обусловлена шестью мутациями, 5 из которых находились в кодирующей области генома, а одна в промоторной части [29]. Кроме того, штамм с дефицитом биосинтеза глутатиона смог развить компенсаторные мутации для восстановления этой функции [30].

Гидролизаты лигноцеллюлозной биомассы содержат глюкозу и ксилозу, которые можно ферментировать в биотопливо. Бактерии, несмотря на естественную способность потреблять ксилозу, не могут этого сделать в присутствии глюкозы из-за срабатывания механизма углеродной катаболитной репрессии, который позволяет организмам осуществлять последовательную утилизацию источников углерода, начиная с наиболее легко усваиваемых. Это приводит к общему снижению производительности, а также не полному использованию ксилозы из-за накопления этанола в результате утилизации глюкозы. Была предпринята попытка улучшить утилизацию ксилозы и совместную ферментацию ксилозы с глюкозой в этанол с использованием ALE у *E. coli*. Это исследование показало, что адаптации к ксилосе достаточно, чтобы обеспечить совместное использование глюкозы и ксилозы в минимальной среде. Скорость производства этанола у эволюционировавшего штамма была в 3 раза выше, чем у родительского штамма, со значительным совместным использованием глюкозы и ксилозы. Скорость потребления глюкозы и ксилозы также увеличилась в 3.4 и 3 раза соответственно. Данные по анализу протеома указывают на значительную активацию белков цикла трикарбоновых кислот, белков, связанных с дыханием, и некоторых транспортеров, которые могут играть роль в увеличении общего потребления сахара и совместном использовании сахаров [31].

ALE использовалась в тандеме с другими методами метаболической инженерии для дальнейшего стимулирования использования субстратов.

В работе [42] ранее сконструированные штаммы *S. cerevisiae* с повышенной экспрессией гетерологичных генов, участвующих в метаболизме ксилозы, были получены в результате двухфазного процесса. Отбор ALE для анаэробной ферментации ксилозы привел к получению штамма с более быстрым ростом, но с нежелательными побочными продуктами метаболизма, а последующее ALE на этом штамме в условиях периодического культивирования улучшило эти фенотипические дефекты. Последний штамм рос в 5 раз быстрее, чем первоначальный прародитель уже после 60 поколений эволюции, что подчеркивает впечатляющую скорость, с которой ALE может добиться значительных улучшений физиологических и биохимических параметров у экспериментального штамма.

ALE в решении проблемы устойчивости к стрессу. Стресс возникает, когда изменения во внешней или внутренней среде интерпретируются организмом как угроза его гомеостазу. Способность организма реагировать соответствующим образом на потенциально стрессовые изменения окружающей среды требует правильного распознавания этих изменений и активации реакции на стресс. Прямая эволюционная адаптация *E. coli* к pH окружающей среды, развивавшаяся на протяжении 2000 поколений, исследована в работе Хьюз с соавт. [43], а в работе Кисимото с соавт. [44] описаны подробные результаты двухлетнего эксперимента по лабораторной термоадаптивной эволюции *E. coli*. Штамм *E. coli* с улучшенным верхним температурным пределом (до 45.9°C) был получен после 523 дней серийного переноса, что эквивалентно 7560 поколениям, в среде с ограниченным количеством питательных веществ. Выявленная двухфазная динамика приспособленности, то есть фаза быстрого восстановления роста, за которой следовала фаза постепенного увеличения роста, наблюдалась при различных температурах на протяжении всего эволюционного процесса. При этом анализ полногеномной последовательности показал, что вклад фиксированных мутаций в приспособленность штамма изменялся с полезного на нейтральный (частота несинонимичных мутаций по сравнению с частотой синонимичных мутаций менялась с высокого значения почти до единицы), в то время как скорость его роста постоянно увеличивалась.

Соединения, обладающие потенциальной биотехнологической ценностью, часто не могут эффективно метаболизироваться или производиться в живых системах из-за токсичности. Например, многие карбоновые кислоты являются многообещающими биовозобновляемыми источниками энергии, но вызывают повреждение собственных мембран, а попытки рационально спроектировать обеспечение большей целостности мембран не смогли улучшить производство карбоновых кислот. Ройс с соавт. [45] решили эту проблему с помощью эксперимента ALE с *E. coli* и окта-

новой кислотой, в ходе которого были получены штаммы, имеющие улучшенную толерантность не только к октановой кислоте, но также к некоторым другим карбоновым кислотам и изомерам бутанола (гексановой кислоте, декановой кислоте, н-бутанолу и изобутанолу), с сопутствующим пятикратным увеличением титра продукции. Характеристика мембраны эволюционировавшего штамма показала, что она значительно изменила поляризацию (текучесть), целостность (утечку) и состав по сравнению с предковой мембраной. Это свидетельствует о том, что смягчение стресса может одновременно улучшить производственные свойства и что определенные классы стрессоров вызывают схожие физиологические реакции, которые приводят к тому, что определенные мутации оказываются полезными в различных средах. В другом исследовании знание метаболизма *S. cerevisiae* привело к эксперименту ALE, предназначенному для усиления толерантности к осмотическому стрессу, где за 200 поколений удалось подтолкнуть метаболическое состояние эволюционировавших дрожжей (по сравнению с предковым штаммом) в сторону производства глицерина и отказа от этанола, что обеспечило появление штаммов с улучшенными свойствами для производства вина с низким содержанием алкоголя [46].

Исследование Каспета с соавт. [47] является успешным примером результатов ALE, объясняющих молекулярные механизмы адаптации, в результате которой были созданы штаммы дрожжей с улучшенной термотолерантностью, растущие на 50% быстрее при 40°C, что выгодно с точки зрения повышения эффективности процесса и снижения производственных затрат. Мутационная конвергенция в независимо эволюционировавших повторях показала изменение стеролового состава клеток с эргостерола на фекостерол, вызванное мутациями в гене стеролдесатуразы C-5, а также повышенную экспрессию генов, участвующих в биосинтезе стерола, что оптимизировало текучесть мембран при повышенных температурах роста. Кроме того, были обнаружены крупные перестройки хромосомы III и мутации в генах, связанных с устранением повреждений ДНК и дыханием, но они в меньшей степени способствовали термотолерантному фенотипу. ALE также можно использовать для повышения толерантности к множеству стрессоров одновременно, как продемонстрировало исследование, в котором штамм промышленных дрожжей был выведен для улучшения толерантности как к ингибиторам, высвобождаемым при предварительной обработке биомассы, так и к высокой температуре. Это позволило создать как надежный штамм для производства этанола, способный расти и ферментировать недетоксифицированный гидролизат ели при 39°C с выходом этанола, так и коммерчески выгодный за счет снижения затрат на охлаждение [48].

Как уже отмечалось выше, при производстве биотоплива *E. coli* этанол является основным фактором стресса, препятствующим росту и выработке конечного продукта. После культивирования 1000 поколений в условиях 5%-го этанолового стресса удалось получить 6 толерантных к этанолу штаммов, показавших примерно двукратное увеличение удельной скорости роста по сравнению со своим предком. В этих штаммах обнаружено возрастание уровня транскрипции генов, участвующих в транспорте ионов железа и путях биосинтеза некоторых аминокислот, включая триптофан, гистидин, валин, лейцин и изолейцин, что позволяет предположить участие их продуктов в формировании переносимости этанола [49]. С помощью серийных переносов был выделен мутант штамма *E. coli*, толерантный к повышенным уровням изобутанола. Используя полногеномное секвенирование с последующей репарацией и нокаутом генов, идентифицированы пять мутаций, которые в первую очередь ответственны за повышенную толерантность к изобутанолу [50].

Ингибирование конечным продуктом метаболизма в периодических культурах с контролируемым pH является основным ограничивающим фактором для образования бактериальной биомассы в индустрии заквасок, а также во многих других биотехнологических процессах. Разработанный авторами стрессостат был применен в качестве нового инструмента адаптивной эволюции для отбора вариантов с повышенной устойчивостью к конечному продукту. Во время роста микробов концентрация ингибирующего конечного продукта увеличивалась *in situ* за счет метаболизма субстрата, потребление которого возрастало каждый раз, когда возникала мутация. Это приводит к более высокой концентрации конечного продукта, увеличивая стрессовое состояние культуры. Стрессостатное культивирование позволило отобрать варианты *Lactococcus lactis* с улучшенным ростом при высоких концентрациях лактата. Эти варианты также давали больше биомассы при периодическом культивировании с контролируемым уровнем pH [51].

L-серин в настоящее время активно используется в косметической и фармацевтической промышленности и имеет самый высокий теоретический выход из глюкозы среди всех аминокислот. Однако фактический выход, достигнутый посредством ферментации, считается одним из самых низких [52], так как токсичность L-серина по отношению к ряду различных клеточных процессов препятствует получению высоких титров в *E. coli*. Несмотря на то, что L-серин имеет широкое применение и большой рыночный потенциал, высокая стоимость и низкий выход сильно ограничивают его использование. Чувствительный к серину производственный штамм *E. coli* подвергали ALE при повышенных концентрациях L-серина.

Наиболее перспективный штамм, полученный с помощью этого подхода, показал повышение толерантности к L-серину с 3 до 100 г/л и трехкратное увеличение выхода L-серина. Авторы отмечают, что полученный титр аналогичен самому высокому уровню продукции, зарегистрированному для любого организма, и это подчеркивает потенциал ALE для промышленной биотехнологии. Анализ влияния ключевых мутаций выявил, что мутации в гене гомосериндегидрогеназы *thrA* оказались важны для толерантности к L-серину [53].

Исследования ALE могут моделировать в лабораторных условиях развитие устойчивости к антибиотикам и чувствительности к лекарствам, тем самым указывая на механизмы, посредством которых могут возникать опасные устойчивые штаммы бактерий. Селективное давление сублетальных концентраций даптомицина приводило с течением времени к накоплению мутаций у *Staphylococcus aureus*, что коррелировало с постепенным снижением восприимчивости к антибиотику. Одноточечные мутации, приводящие к заменам аминокислот, найдены в трех различных белках: *mprF*, лизилфосфатидилглицеринсинтетазе; *uucG*, гистидинкиназе; и *groV* и *groC*, субъединицах β и β' РНК-полимеразы. Анализ последовательностей *mprF*, *uucF*, *uucG*, *groV* и *groC* в клинических изолятах, которые показали увеличение устойчивости к даптомицину в результате лечения, выявил точечные мутации в *mprF* и вставку нуклеотидов в *uucG*, что подтверждает роль этих генов в снижении чувствительности к даптомицину [65]. ALE, использующая конкуренцию между микроорганизмом, продуцирующим антибиотики, *Streptomyces clavuligerus* и устойчивым к лекарствам патогеном, метициллин-резистентным штаммом *Staphylococcus aureus* N315, оказалась эффективна для обеспечения конститутивного биосинтеза известного антибиотика голомицина, который не продуцируется в обнаруживаемых количествах неэволюционировавшим штаммом дикого типа при выращивании в идентичных условиях. На каждом последовательном пассаже продуцент антибиотиков получал свежего целевого патогена, который ранее не контактировал с продуцентом. Это гарантировало, что продуцент антибиотиков сталкивается с одинаковым давлением отбора в течение каждого цикла и что только продуцент, а не патоген, подвергается последовательному пассажу и последующей адаптивной эволюции. Более того, повторное секвенирование генома показало, что эволюционировавший штамм потерял большую плазмиду размером 1.8 Мб, составляющую 21% генома *Streptomyces clavuligerus*, и приобрел пять одонуклеотидных полиморфизмов в генах, которые влияют на биосинтез вторичных метаболитов [66]. Хотя точная регуляторная программа, контролирующая биосинтез голомицина у *S. clavuligerus*, пока не известна, можно предпо-

ложить, что ALE, использующая конкуренцию микроорганизмов, способна стать платформой для создания мутантов, которые будут производить повышенное количество известных антибиотиков, а также для поиска новых антибактериальных соединений против других патогенов, а не только *S. aureus*.

Интересно отметить, что длительное воздействие кислотного стресса в эволюционных линиях *Salmonella enterica* через 70 сут ALE приводило к перекрестной резистентности к антибиотикам с различными механизмами действия (ципрофлоксацину, гентамицину и меропенему), ранее успешно используемым для лечения инфекций человека, вызванных этим патогеном. В этом случае обеспечивалась перекрестная адаптация против антибиотического стресса в популяциях *S. enterica*, эволюционировавших в уксусной кислоте. Повышение значения минимальной ингибирующей концентрации ципрофлоксацина по отношению к *S. enterica* в 3 раза указывает на наличие определенных механизмов, способствующих снижению эффективности антибиотиков через адаптивные реакции *S. enterica* в условиях кислотного стресса, что, в конечном счете, может повлиять на общую эффективность лечения антибиотиками.

Конкретные механизмы, связанные с перекрестной резистентностью, еще только предстоит выяснить. Однако авторы предполагают, что мутации, выявленные в двухкомпонентной системе *rhoP/Q*, регулирующей вирулентность и устойчивость *S. enterica* к стрессу, а также в ряде других генов, связанных со стрессом, наряду с делециями генов, способствуют более широкому адаптивному ответу, приводящему к повышению устойчивости к множественным стрессорам, включая антибиотики [60]. Однако в экспериментах ALE с *E. coli* K-12 W3110 толерантность к бензоату и салицилату у эволюционировавших штаммов (после 2000 поколений) сопровождалась потерей толерантности к хлорамфениколу и тетрациклину. Предполагается, что в микробиоме кишечника генетическая адаптация к салицилату или бензоату может включать утрату или подавление индуцируемых систем множественной лекарственной устойчивости, и адаптированный к салицилатам микробиом толстой кишки может быть более уязвим к терапии высокими дозами антибиотиков [54].

Вследствие сложной и часто неизвестной молекулярной основы даже индивидуальной стрессоустойчивости, устойчивость к множественным стрессам трудно рационально сконструировать генетическими средствами. Классическим эмпирическим методом разработки микробных штаммов является физический или химический мутагенез с последующим прямым отбором на плотной культуральной среде, обеспечивающей селективное давление для улучшенных мутантов, такое как высокие концентрации соли и металлов,

высокие или низкие температуры и pH. Однако основным недостатком этого простого метода является тот факт, что повторяющиеся циклы мутации и отбора на плотных средах обычно приводят к образованию высокоспециализированных, но дефектных мутантных штаммов [67]. Другими словами, полученные мутанты могут обладать одним значительно улучшенным свойством в условиях селекции, но при этом иметь значительно более низкие скорости роста, чем дикий тип. В отличие от повторяющихся циклов мутации и отбора колоний на плотных средах, ALE предполагает более систематический подход: повторные периодические культивирования могут выполняться в присутствии селективного давления или, альтернативно, длительное хеостатное культивирование может осуществляться в селективных условиях. Такое культивирование может осуществляться с использованием штамма дикого типа или, для увеличения генетического разнообразия, химически/физически мутагенизированного штамма. Спонтанный или индуцированный мутагенез исходной моноклональной популяции может привести к образованию более приспособленных вариантов в результате селективного давления, оказываемого на протяжении всего культивирования, и скорректировать некоторые дефекты, свойственные генетической инженерии [9]. Эти более приспособленные варианты будут выживать, и расти лучше, чем исходные клетки в условиях отбора. Таким образом, в хеостате или серийных периодических культурах отношение числа приспособленных клеток к общему числу клеток в культуре будет периодически увеличиваться, и более приспособленные клетки будут доминировать в культуре [68]. Отмечено, что ALE может не только противодействовать значительному снижению приспособленности клеток в результате генетических модификаций, но и привести к заметному улучшению физиологической приспособленности сконструированных штаммов. Особенно актуально использование лабораторной адаптации оказалось для улучшения темпов роста [69]. ALE также смогла помочь в оптимизации роста штаммов, сильно измененных в результате применения генетической инженерии, как было продемонстрировано в случае штамма *E. coli*, у которого удалено почти 25% генома [70].

Большая часть практических работ по лабораторной эволюции с использованием грибов проделана с привлечением *Saccharomyces* sp. [71, 72], гораздо реже биотехнологически значимые задачи решают с привлечением других видов дрожжей, например, *Pichia pastoris*, *Rhodospiridium toruloides* [74], *Wickerhamomyces subpelliculosus* и *Kazachstania gamospora* [73, 75, 76]. Так, ALE явилась практическим подходом для повышения мультистрессовой толерантности *Pichia kudriavzevii* для стабильного и эффективного производства биоэтанола второ-

го поколения из лигноцеллюлозной биомассы. К одному из недостатков использования лигноцеллюлозных материалов для производства биоэтанола относится образование уксусной кислоты, высокие концентрации которой подавляют рост и метаболическую активность микроорганизмов, продуцирующих этанол. Применение стратегии ALE с использованием уксусной кислоты в качестве селективного давления позволило получить три эволюционировавших штамма *P. kudriavzevii*, продемонстрировавших значительно более высокую устойчивость к множеству стрессоров, включая тепловой шок, этанол, осмотический стресс, уксусную кислоту, муравьиную кислоту, фурфурол, 5-(гидроксиметил)фурфурол и ванилин. Эффективность ферментации у выведенных штаммов также была улучшена, что привело к получению более высокой концентрации и увеличению общего выхода этанола по сравнению с исходным штаммом [77].

Мицелиальные грибы при использовании ALE для биотехнологических целей практически не задействованы. Сложность их геномов и связанных с ними метаболических и клеточных процессов значительно замедлила темпы развития инженерии мицелиальных грибов. К сложностям работы с ними относятся медленный рост мицелия, низкий выход продукта и трудности последующей очистки, неоптимальный рост на альтернативных субстратах. Тем не менее, следует упомянуть несколько любопытных экспериментов, проведенных на *Penicillium commune* и *Penicillium* sp. [78], а также на *Mortierella elongata* в смешанной культуре с водорослью *Nannochloropsis oceanica* [79]. Долгосрочное сокультивирование гриба *M. elongata* с морской водорослью *N. oceanica* в процессе мутуалистических взаимодействий привело к включению интактных живых клеток водоросли в грибковые гифы. Этот симбиоз оставался стабильным в течение нескольких месяцев совместного культивирования и был, по-видимому, основан на обмене углеродом и азотом между клетками гриба и водоросли. В природных системах почти ни один вид не развивается изолированно от других видов. Поэтому понимание основополагающих принципов, управляющих микробными взаимоотношениями, должно дать новую информацию для микробной экологии и усилий по созданию синтетических микробиомов, эффективных для биотехнологических приложений.

В случае с *Penicillium* всего за несколько недель популяции диких штаммов, выделенные из сырной пещеры в Вермонте (США) и серийно пассированные на сырно-творожном агаре в лаборатории, снизили выработку пигментов, спор и микотоксинов, присущих фенотипам дикого типа, а также показали резкое ремоделирование состава летучих веществ. В работе авторы использовали термин “окультуренные фенотипы” вместо

“мутанты”, потому что не известен точный механизм, управляющий фенотипической эволюцией в этой системе [78]. Колонии считались окультуренными фенотипами, если у них был изменен цвет или текстура поверхности, что указывало на изменения в производстве пигментов или спор. Работа показала, что дикие плесени могут легко потерять свои свойства и быстро перейти к производству желаемых ароматических соединений, и что дикие изоляты *Penicillium* могут быть быстро окультурены для получения новых вкусов и улучшения эстетики ферментированных продуктов. Однако не был идентифицирован конкретный генетический механизм, контролирующий наблюдаемую эволюцию признаков у *Penicillium*, как и не был идентифицирован конкретный генетический механизм, лежащий в основе дегенерации культур *Aspergillus* при серийном пересеве [80, 81]. В случае *A. parasiticus* экспериментальные культуры демонстрировали измененную морфологию, снижение споруляции и неспособность вырабатывать обнаруживаемые уровни вторичных метаболитов поликетидов. Варианты были стабильными и не возвращались к родительским характеристикам после более чем десяти переносов [80]. У *A. flavus* показано, что способность продуцировать афлатоксин сохраняется в разной степени при неблагоприятных условиях культивирования, но не при конкуренции с другими грибами [81]. Следует отметить необходимость дальнейшей работы для характеристики генетических механизмов развития признаков, а также для подтверждения стабильности и безопасности окультуренных штаммов. Методы экспериментальной эволюции были также использованы, чтобы понять эволюцию вирулентности у *Batrachochytrium dendrobatidis*, грибкового патогена, вызывающего хитридиомикоз амфибий [82], а также повысить патогенность возбудителей заболеваний нежелательных животных (комаров) как средство биологической борьбы с вредителями, для чего был использован гриб *Beauveria bassiana* [83]. Кроме того, этот метод был применен для улучшения термотолерантности энтомопатогенного гриба *Metarhizium anisopliae* до устойчивого роста при 37°C [84] и патогена эктопаразита медоносных пчел *Metarhizium brunneum* [85] до температуры пчелиного улья (35°C). Внедрение методов лабораторной эволюции грибов должно послужить расширению ограниченного круга организмов-хозяев, которые смогут обеспечить коммерчески осуществимое и экологически устойчивое биопроизводство ферментов, химикатов, терапевтических средств, продуктов питания и материалов будущего. Приведенные примеры успешного использования ALE позволяют сделать вывод, что эта технология облегчает выбор штаммов для промышленного производства, а развитие связанных технологий ведет к ее быстрому применению в качестве важного инструмента для

реализации стратегий промышленной селекции микробов.

* * *

Стратегия ALE стала не только успешным инструментом для изучения эволюционных явлений, происходящих с микроорганизмами в контролируемых лабораторных условиях и помогающих понять основные молекулярные механизмы лабораторной эволюции, но и одновременно позволяет путем длительного культивирования в условиях определенного давления отбора или среды роста сделать штаммы с улучшенными фенотипами. Это включает изменения их метаболических путей, дающие возможность получить новые продукты или улучшить выход имеющихся коммерчески привлекательных продуктов биосинтеза. В области метаболической инженерии ALE оказалась полезна как для оптимизации роста на конкретном пищевом субстрате, повышения выхода продукта и производства новых веществ, так и для изучения толерантности к нестандартным (стрессовым) условиям, часто присущим промышленному использованию, что может быть полезно для снижения стоимости получаемых продуктов. Более того, при существующих ограничениях на использование ГМО можно рассматривать применимость ALE как подход к созданию штаммов, который соответствует нереккомбинантным предпочтениям в различных пищевых отраслях.

Анализ результатов использования ALE выявил многофункциональность этого метода: 1) он позволяет проводить лабораторные исследования эволюционных процессов, расширяя базу биологических знаний, которая обеспечивает успешную инженерию штаммов, путем выявления полезных мутаций, связанных с конкретным давлением отбора или тех, которые противодействуют целям производства; 2) этот метод дополняет рациональные подходы, улучшая свойства инженерного штамма, компенсируя дефекты приспособленности, часто возникающие в результате генетических манипуляций; и 3) ALE может заменить рациональные подходы, когда желаемый фенотип можно выбрать из-за преимуществ его приспособленности к конкретной среде [1].

ALE уже служит достаточно привлекательным инструментом в руках исследователей, но пока некоторые ограничения сдерживают ее использование. Например, эволюционный процесс часто требует много времени и труда, что является важной причиной, ограничивающей широкое использование этой технологии. ALE эффективна только для достижения эволюционно выбираемых фенотипов. Применение ALE для улучшения толерантности, получения ценных соединений и использования определенного субстрата является простым подходом для фенотипического улучшения, но полученные фенотипы могут оказаться контрпродуктив-

Таблица 1. Репрезентативные примеры недавних исследований ALE по повышению эффективности использования микроорганизмами субстратов

Исходный штамм	Время эволюции/количество поколений	Среда	Свойства эволюционировавшего штамма	Ссылка
<i>Escherichia coli</i> DSM01	40 дней	Ацетат натрия	В отличие от родительской линии способность к росту на среде, с ацетатом натрия	[32]
<i>E. coli</i> CY02	1300 поколений	Глицерин — 0.2%	Увеличение итогового титра ГАМК и удельной продуктивности в 3.9 и 4.3 раза соответственно	[14]
Мутант <i>E. coli fadE</i>	90 дней	Пеларгоновая кислота — 3 г/л	Эволюционировавший штамм с делецией <i>fadE</i> для предотвращения деградации пеларгоновой кислоты продуцировал азелаиновую кислоту в 12.8 раза больше по сравнению со штаммом дикого типа	[33]
<i>Gluconobacter oxydans</i>	420 дней	Ксилоза	Увеличение экспрессии гена мембраносвязанной глюкозодегидрогеназы в 40 раз; скорость конверсии ксилозы возросла в 4.1 раза	[34]
<i>Zymomonas mobilis</i>	200 дней	Глюкоза и ксилоза	Максимальная биомасса эволюционировавшего штамма увеличилась в 2 раза, а титр этанола в 4 раза	[35]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> JKH5	60 поколений	3 г/л уксусной кислоты, 1 г/л фурфурола и 1 г/л ванилина	Скорость роста увеличилась в 4 раза, биомасса в 5 раз	[36]
<i>Azotobacter vinelandii</i> OP	380 поколений	Ксилоза (2–8 г/л) и глюкоза (8–2 г/л)	Удельная скорость роста, скорость поглощения глюкозы и ксилозы у эволюционировавшего штамма увеличились в 2, 6.5 и 3.6 раза соответственно	[37]
<i>Halomonas bluephagenesis</i>	71 поколение	Возрастающая концентрация ацетата натрия 20–120 г/л	Улучшение роста клеток, потребление уксусной кислоты и толерантность к уксусной кислоте; улучшено производство поли(3-гидроксibuтирата) из уксусной кислоты на 24%	[38]
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	114 дней	Увеличивающееся содержание этанола 2–14%	Повышение толерантности к этанолу с 9% до 11.5% и устойчивость к SO ₂	[39]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8 дней	Окислительный стресс: возрастающая концентрация H ₂ O ₂ (0–200 мМ)	Увеличение продукции терпеноида β-кариофиллена в 4 раза	[40]
<i>S. cerevisiae</i> BN-91A	60 дней	20 г/л маннита	Скорость усвоения маннита увеличилась в 3 раза; увеличение выхода сесквитерпена валенсена	[41]

Таблица 2. Репрезентативные примеры недавних исследований ALE по повышению стрессоустойчивости микроорганизмов

Исходный штамм	Стрессор	Эволюционные условия	Свойства эволюционировавшего штамма	Ссылки
<i>Escherichia coli</i> K-12 W3110	Бензоат, салицилат	Среда с 20 мМ бензоата/10 мМ салицилата	Усиление толерантности к бензоату и салицилату; появление чувствительности к хлорамфениколу и тетрациклину	[54]
<i>Escherichia coli</i> YZFP	Монотерпен α -пинен	Среда, содержащая пинен от 0.5% до 2%	Повышение толерантности к пинену до 20 г/л и увеличение титра продукта на 31%	[55]
<i>Escherichia coli</i> M20	Изобутилацетат	Среда с изобутилацетатом 1.5 г/л и постепенное возрастание его концентрации	Штамм способен производить в 3.2 раза больше изобутилацетата	[56]
<i>Escherichia coli</i>	Гербицид паракват	Постепенное увеличение концентрации параквата в среде	Штаммы резко увеличивали толерантность к параквату (до 10 раз)	[57]
<i>Propionibacterium acidipropionici</i> DSMZ 4900	Пропионовая кислота	Увеличение концентрации пропионовой кислоты в среде с 10 г/л до 40 г/л	Штамм переносит 30 г/л пропионовой кислоты. Скорость производства пропионовой кислоты, концентрация и скорость роста штамма были улучшены в 3.2 и 1.5 раза соответственно	[58]
<i>Lactococcus lactis</i>	Лактат	Лактат как постоянное давление при избытке субстрата	Повышение максимальной скорости роста при концентрации лактата > 800 мМ; увеличенная биомасса в периодических культурах с контролируемым pH	[51]
<i>Actinobacillus succinogenes</i>	pH	Среда с янтарной кислотой	Удельная скорость роста и продукция янтарной кислоты увеличились в 3.25 и 2.95 раза соответственно в анаэробных условиях при pH 5.8	[59]
<i>Salmonella enterica</i>	pH	Среда с уксусной кислотой (до 30 мМ)	Увеличение скорости роста в присутствии 30 мМ уксусной кислоты; возрастание устойчивости к уксусной кислоте	[60]
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> WiKim33	Лиофилизация	Гетеротипический шок (тепловой и осмотический шок)	Высокая толерантность к замораживанию и повышенная стабильность при хранении	[61]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2-Фенилэтанол	Среда с возрастающей концентрацией 2-фенилэтанола от 0.4 г/л до 80 г/л	Увеличение толерантности к 2-фенилэтанолу и получение ароматического спирта на 11%	[62]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Селен	Среда с селенитом натрия (50–100 мкМ)	Усиление толерантности к селену, получение обогащенных селеном дрожжей	[63]
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113-7D	Фурфурол	Фурфуроловый стресс (от 1 до 3.8 г/л)	Повышение устойчивости к фурфуролу, повышение скорости конверсии этанола на 6.67% при концентрации фурфурола 4 г/л	[64]

ными для приспособленности клеток (например, перепроизводство некоторых метаболитов), препятствуя эволюции отбора таких признаков. В этих случаях необходимо будет использовать изменение окружающей среды и/или генома исходного штамма таким образом, чтобы связать интересующее свойство с преимуществом роста, где исходно расточительное производство метаболитов должно теперь приносить пользу [86]. По сравнению с рациональной метаболической инженерией, которая напрямую вводит экзогенные гены или выключает исходные гены, ALE не может существенно изменить метаболизм за короткий период времени, но, если рационально сконструированный штамм используется в качестве исходного штамма для эволюции, он может значительно сократить эволюционный процесс, особенно для приобретения сложных фенотипов. Вместе с тем важным вопросом остается генетическая стабильность сконструированных промышленных штаммов. С широким использованием ALE анализ мутаций становятся все более важным для выяснения эволюционных механизмов и изучения взаимоотношений генотип-фенотип, а проблема того, как на выявленные генотипические и фенотипические изменения влияют различные условия, включая силу давления отбора, частоту мутаций и условия культивирования, остается предметом будущих исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, грант № 23-24-00318.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Данная статья не содержит исследований с участием животных или людей в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sandberg T.E., Salazar M.J., Weng L.L., Palsson B.O., Feist A.M. // *Metab. Eng.* 2019. V. 56. P. 1–16.
2. Kumar R., Kumar P. // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. P. 450.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00450>
3. Adegbeye M.F., Ojuederie O.B., Talia P.M., Babalola O.O. // *Biotechnol. Biofuels.* 2021. V. 14. P. 5.
<https://doi.org/10.1186/s13068-020-01853-2>
4. Cho J.S., Kim G.B., Eun H., Moon C.W., Lee S.Y. // *JACS Au* 2022. V. 2. P. 1781–1799.
5. Sanchez-Garcia L., Martín L., Mangues R., Ferrer-Miralles N., Vázquez E., Villaverde A. // *Microb. Cell Fact.* 2016. V. 15. P. 33.
<https://doi.org/10.1186/s12934-016-0437-3>
6. Martinez R.J., Liu L., Petranovic D., Nielsen J. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2012. V. 23. P. 965–971.
7. Rai A.K., Pandey A., Sahoo D. // *Trends Food Sci. Technol.* 2019. V. 83. P. 129–137.
8. Elena S.F., Lenski R.E. // *Nat. Rev.* 2003. V. 4. P. 457–469.
9. Cakar Z.P., Turanli-Yildiz B., Alkim C., Yilmaz U. // *FEMS Yeast Res.* 2012. V. 12. P. 171–182.
10. Dragosits M., Mattanovich D. // *Microb. Cell Fact.* 2013. V. 12. P. 64.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-64>
11. Hirasawa T., Maeda T. // *Microorganisms* 2022. V. 11. P. 92.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11010092>
12. LaCroix R.A., Sandberg T.E., O'Brien E.J., Utrilla J., Ebrahim A., Guzman G.I. et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. V. 81. P. 17–30.
13. Ibarra R., Edwards J., Palsson B. // *Nature.* 2002. V. 420. P. 186–189.
14. Kim K., Hou C.Y., Choe D., Kang M., Cho S., Sung B.H. et al. // *Metab. Eng.* 2022. V. 69. P. 59–72.
15. Fong S.S., Marciniak J.Y., Palsson B. // *J. Bacteriol.* 2003. V. 185. P. 6400–6408.
16. Sánchez-Adriá I.E., Sanmartín G., Prieto J.A., Estruch F., Fortis E., Rande-Gil F. // *LWT-Food Sci. Technol.* 2023. V. 184. P. 114957.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114957>
17. Hong K.K., Vongsangnak W., Vemuri G.N., Nielsen J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 12179–12184.
18. Almeida J.R.M., Modig T., Petersson A., Hähn-Hägerdal B., Lidén G., Gorwa-Grauslund M.F. // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2007. V. 82. P. 340–349.
19. Mavrommati M., Papanikolaou S., Aggelis G. // *Process Biochem.* 2023. V. 124. P. 280–289.
20. Tekarslan-Sahin S.H. // *Fermentation* 2022. V. 8. P. 372.
<https://doi.org/10.3390/fermentation8080372>
21. Voordeckers K., Kominek J., Das A., Espinosa-Cantú A., De Maeyer D., Arslan A. et al. // *PLoS Genet.* 2015. V. 11. P. e1005635.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005635>
22. Krogerus K., Holmström S., Gibson B. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2018. V. 84. P. e02302-17.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02302-17>
23. Ekberg J., Rautio J., Mattinen L., Vidgren V., Londeborough J., Gibson B.R. // *FEMS Yeast Res.* 2013. V. 13. P. 335–349.
24. Swamy K.B.S., Zhou N. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 103. P. 2067–2077.
25. Brickwedde A., Van den Broek M., Geertman J.A., Magalhães F., Kuijpers N.G.A., Gibson B. et al. // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. P. 1690.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01690>
26. Iattici F., Catallo M., Solieri L. // *Beverages* 2020. V. 6. P. 3.
<https://doi.org/10.3390/beverages6010003>

27. Gibson B., Vidgren V., Peddinti G., Krogerus K. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 45. P. 1103–1112.
28. Blount Z., Borland C., Lenski R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 7899–7906.
29. Lee D.H., Palsson B. // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. P. 4158–4168.
30. Veeravalli K., Boyd D., Iverson B.L., Beckwith J., Georgiou G. // Nat. Chem. Biol. 2011. V. 7. P. 101–105.
31. Dev C., Jilani S.B., Yazdani S.S. // Microb. Cell Fact. 2022. V. 21. P. 154.
<https://doi.org/10.1186/s12934-022-01879-1>
32. Seong W., Han G.H., Lim H.S., Baek J.I., Kim S.J., Kim D. et al. // Metab. Eng. Commun. 2020. V. 62. P. 249–259.
33. Lee Y., Sathesh-Prabu C., Kwak G.H., Bang I., Jung H.W., Kim D., Lee S.K. // Biotechnol. J. 2022. V. 17. P. e2000416.
<https://doi.org/10.1002/biot.202000416>
34. Jin C., Hou W., Yao R., Zhou P., Zhang H., Bao J. // Bioresour. Technol. 2019. V. 289. P. 121623.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121623>
35. Sarkar P., Mukherjee M., Goswami G., Das D. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 47. P. 329–341.
36. Hemansi H., Patel A.K., Saini J.K., Singhania R.R. // Bioresour. Technol. 2022. V. 344(Pt B). P. 126247.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126247>
37. Millán C., Peña C., Flores C., Espín G., Galindo E., Castillo T. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 36. P. 46.
<https://doi.org/10.1007/s11274-020-02822-5>
38. Zhang J., Jin B., Fu J., Wang Z., Chen T. // Molecules 2022. V. 27. P. 22.
<https://doi.org/10.3390/molecules2709302>
39. Catrileo D., Acuña-Fontecilla A., Godoy L. // Front. Microbiol. 2020. V. 11. P. 1–13.
40. Godara A., Kao K.C. // Microb. Cell Fact. 2021. V. 20. P. 106.
<https://doi.org/10.1186/s12934-021-01598-z>
41. Zhu C., You X., Wu T., Li W., Chen H., Cha Y. et al. // Green Chem. 2022. V. 24. P. 4614–4627.
42. Klimacek M., Kirl E., Krahulec S., Longus K., Novy V., Nidetzky B. // Microb. Cell Fact. 2014. V. 13. P. 37.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-37>
43. Hughes B.S., Cullum A.J., Bennett A.F. // Evolution 2007. V. 61. P. 1725–1734.
44. Kishimoto T., Iijima L., Tatsumi M., Ono N., Oyake A., Hashimoto T. et al. // PLoS Genet. 2010. V. 6. P. e1001164.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001164>
45. Royce L.A., Yoon J.M., Chen Y., Rickenbach E., Shanks J.V., Jarboe L.R. // Metab. Eng. 2015. V. 29. P. 180–188.
46. Tilloy V., Ortiz-Julien A., Dequin S. // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V. 80. P. 2623–2632.
47. Caspeta L., Chen Y., Ghiaci P., Feizi A., Buskov S., Hallström B.M. et al. // Science 2014. V. 346. P. 75–78.
48. Wallace-Salinas V., Gorwa-Grauslund M.F. // Biotechnol. Biofuels 2013. V. 6. P. 151.
<https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-151>
49. Horinouchi T., Tamaoka K., Furusawa C., Ono N., Suzuki S., Hirasawa T. et al. // BMC Genomics 2010. V. 11. P. 579.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-579>
50. Atsumi S., Wu T.Y., Machado I.M., Huang W.C., Chen P.Y., Pellegrini M. et al. // Mol. Syst. Biol. 2010. V. 6. P. 449.
<https://doi.org/10.1038/msb.2010.98>
51. Hartono S., Meijerink M.F.A., Abee T., Smid E.J., van Mastrigt O. // New Biotechnol. 2023. V. 78. P. 123–130.
52. Becker J., Wittmann C. // Curr. Opin. Biotechnol. 2012. V. 23. P. 718–726.
53. Mundhada H., Seoane J.M., Schneider K., Koza A., Christensen H.B., Klein T. et al. // Metab. Eng. 2017. V. 39. P. 141–150.
54. Creamer K.E., Ditmars F.S., Basting P.J., Kunka K.S., Hamdallah I.N., Bush S.P. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2017. V. 83. P. e02736-16.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02736-16>
55. Niu F.X., He X., Wu Y.Q., Liu J.Z. // Front. Microbiol. 2018. V. 9. P. 1623.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01623>
56. Matson M.M., Cepeda M.M., Zhang A., Case A.E., Kavvas E.S., Wang X. et al. // Metab. Eng. 2022. V. 69. P. 50–58.
57. Rychel K., Tan J., Patel A., Lamoureux C., Hefner Y., Szubin R. et al. // Cell Rep. 2023. V. 42. P. 113105.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113105>
58. Cavero-Olguin V.H., Rahimpour F., Dishisha T., Alvarez-Aliaga M.T., Hatti-Kaul R. // Process Biochem. 2021. V. 110. P. 223–230.
59. Zhang W., Tao Y., Wu M., Xin F., Dong W., Zhou J., et al. // Process Biochem. 2020. V. 98. P. 76–82.
60. Ghoshal M., Bechtel T.D., Gibbons J.G., McLandsborough L. // Front. Microbiol. 2023. V. 14. P. 1285421.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1285421>
61. Kim Y.Y., Kim J.C., Kim S., Yang J.E., Kim H.M., Park H.W. // Food Res. Int. 2024. V. 175. P. 113731.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113731>
- Xia H., Kang Y., Ma Z., Hu C., Yang Q., Zhang X., et al. // Microb. Cell Fact. 2022. V. 21. P. 269.
<https://doi.org/10.1186/s12934-022-01996-x>
62. Gong A., Liu W., Lin Y., Huang L., Xie Z. // Microbiol. Spectr. 2023. V. 11. P. e0132623.
<https://doi.org/10.1128/spectrum.01326-23>
63. Yao L., Jia Y., Zhang Q., Zheng X., Yang H., Dai J. et al. // Front. Microbiol. 2024. V. 14. P. 1333777.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1333777>

64. Friedman L., Alder J.D., Silverman J.A. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006. V. 50. P. 2137–2145.
65. Charusanti P., Fong N.L., Nagarajan H., Pereira A.R., Li H.J., Abate E.A., et al. // *PLoS One* 2012. V. 7. P. e33727.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033727>
66. Çakar Z.P., Seker U.O.S., Tamerler C., Sonderegger M., Sauer U. // *FEMS Yeast Res.* 2005. V. 5. P. 569–578.
67. Sauer U. // *Eng. Biotechnol.* 2001. V. 73. P. 130–166.
68. Portnoy V.A., Bezdan D., Zengler K. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011. V. 22. P. 590–594.
69. Choe D., Lee J.H., Yoo M., Hwang S., Sung B.H., Cho S. et al. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. P. 935.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08888-6>
70. Dunham M.J. // *Methods Enzymol.* 2010. V. 470. P. 487–507.
71. Giannakou K., Cotterrell M., Delneri D. // *Front. Genet.* 2020. V. 11 P. 916.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00916>
72. Gassler T., Baumschabl M., Sallaberger J., Egermeier M., Mattanovich D. // *Metab. Eng.* 2022. V. 69. P. 112–121.
73. Liu Z., Radi M., Mohamed E.T. T., Feist A.M., Dragone G., Mussatto S.I. // *Bioresour. Technol.* 2021. V. 333. P. 125171.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125171>
74. Semumu T., Gamero A., Boekhout T., Zhou N. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2022. V. 38. P. 48.
<https://doi.org/10.1007/s11274-021-03226-9>
75. Fernandes T., Osório C., Sousa M.J., Franco-Duarte R. // *J. Fungi* 2023. V. 9. P. 186.
<https://doi.org/10.3390/jof9020186>
76. Dolpatcha S., Phong H.X., Thanonkeo S., Klanrit P., Yamada M., Thanonkeo P. // *Sci. Rep.* 2023. V. 13. P. 21000.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-48408-7>
77. Bodinaku I., Shaffer J., Connors A.B., Steenwyk J.L., Biango-Daniels M.N., Kastman E.K. et al. // *Mbio* 2019. V. 10. P. e02445-19.
<https://doi.org/10.1128/mBio.02445-19>
78. Du Z.-Y., Zienkiewicz K., Pol N.V., Ostrom N.E., Benning C., Bonito G.M. // *Elife* 2019. V. 8. P. e47815.
<https://doi.org/10.7554/eLife.47815>
79. Kale S.P., Bhatnagar D., Bennett J.W. // *Mycol. Res.* 1994. V. 98. P. 645–652.
80. Horn B.W., Dorner J.W. // *Mycologia* 2002. V. 94. P. 741–751.
81. Voyles J., Johnson L.R., Rohr J., Kelly R., Barron C., Miller D. et al. // *Oecologia* 2017. V. 184. P. 363–373.
82. Valero-Jiménez C.A., van Kan J.A.L., Koenraad C.J.M., Zwaan B.J., Schoustra S.E. // *Evol. Appl.* 2017. V. 10. P. 433–443.
83. de Crecy E., Jaronski S., Lyons B., Lyons T.J., Keyhani N.O. // *BMC Biotechnol.* 2009. V. 9. P. 74.
<https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-74>
84. Han J.O., Naeger N.L., Hopkins B.K., Sumerlin D., Stamets P.E., Carris L.M. et al. // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. P. 10582.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-89811-2>
85. Wang G., Li Q., Zhang Z., Yin X., Wang B., Yang X. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2023. V. 50. P. kuac023.
<https://doi.org/10.1093/jimb/kuac023>

Practical Successes of Laboratory Evolution

Y. E. Dunaevsky^{a,*}, O. A. Kudryavtseva^b, S. M. Agroskin^b, A. A. Gasparyan^b, and M. A. Belozersky^a

^a*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

^b*Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

*e-mail: dun@belozersky.msu.ru

Adaptive Laboratory Evolution (ALE) represents a novel methodology for the generation of microbial strains with desired characteristics and the production of value-added products. Additionally, ALE is employed as a means of enhancing comprehension of the genetic and/or metabolic pathways of evolution. The objective of this review is to analyze the results of studies that elucidate and demonstrate the potential of microorganisms as model objects for laboratory evolutionary experiments. These experiments are becoming increasingly prevalent in the study of adaptation, the evaluation of evolutionary dynamics, and the testing of various evolutionary hypotheses. Concurrently, ALE has demonstrated itself to be a promising and efficacious methodology, which, when employed for biotechnological applications, has already resulted in the generation of novel and useful microbial strains. It is important to note that the current successes not only demonstrate the power and versatility of this approach but also highlight a number of unanswered questions. The conclusions drawn on the basis of ALE require a cautious interpretation of the results obtained.

Keywords: laboratory evolution, metabolic engineering, microorganisms, strain optimization, stress adaptation