اختصارات:

5-HT: 5-hydroxytryptamine; ۵-هیدروکسی تریپتامین
ACTH: Adrenocorticotropic hormone; هورمون آدرنوکورتیکوتروپین هیپوفیزی
BLA: Basolateral amygdala; هسته قاعده ای- جانبی آمیگدال
cAMP: Cyclic adenosine monophosphate.
CB1: Cannabinoid receptor type 1; گیرنده های کانابینوئیدی نوع یک
CB2: Cannabinoid receptor type 2; گیرنده های کانابینوئیدی نوع دو
CRH: Corticotropin-releasing hormone; هورمون رهاسازی کورتیکوتروپین
GRP,55: G protein-coupled receptor 55
HPA: The hypothalamic-pituitary-adrenal ***axis;*** محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال
NMDA: N-methyl-D-aspartate
PVN: paraventricular nucleus; هسته مجاور بطنی

Abstract

Exposure to stressful conditions activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and leads to systemic release of stress hormones including norepinephrine and glucocorticoids. The Limbic system of brain including the hippocampus and the amygdala plays an important role in memory formation and these regions are rich with stress hormone receptors. Stress is a potent modulator of hippocampal and amygdala-dependent memory. Memory formation is one of the fundamental processes of brain that without memory we cannot perform even simple stereotype behaviors. Therefore, in the current review we explain different brain regions and neurotransmitters that may be involved in the effect of stress on memory formation.

Key words: Stress; Amygdala; Hippocampus; Neurotransmitters; Learning and memory

بهره‌گیری از قدرت تکامل در بیوتکنولوژی با استفاده از روش تکامل سازشی آزمایشگاهی (ALE= Adaptive Laboratory Evolution)

نوروز بگ اوغلی و حمید مقیمی*

دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی، بخش زیست‌فناوری میکروبی

چکیده

تکامل سازشی آزمایشگاهی به دلیل سادگی و تاثیرگذاری بالا برای بهبود بخشی به ویژگی‌های سویه‌های مهم صنعتی از جمله مصرف منبع کربن، مقاومت به شرایط نامناسب محیطی و مقاومت به مهارکننده های شیمیایی استفاده می شود. عدم نیاز به دانستن اساس ژنتیکی فنوتیپ های مورد نظر این روش را به یک روش قدرتمند برای توسعه‌ی سویه‌های میکروبی، حتی وقتی اطلاعات بسیار اندکی در مورد ژنتیک آنها وجود دارد، تبدیل کرده است. گر چه روش‌های انجام ALE سال‌های متمادی همچنان ثابت باقی مانده است ولی پیشرفت‌های جدید با افزایش سرعت تکامل و تسهیل آنالیز نوید بخش بهبود فرآیند تکامل آزمایشگاهی سویه‌های جهش یافته است. هدف این مقاله‌ی معرفی و بررسی پیشرفت‌های اخیر در زمینه تکامل سازشی آزمایشگاهی و بررسی چگونگی بهره‌گیری از آن در اهداف زیست‌فناورانه است.

واژه های کلیدی: تکامل سازشی آزمایشگاهی، مهندسی سویه، زیست فناوری

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: hmoghimi@ut.ac.ir

مقدمه

تکامل سازشی آزمایشگاهی یک روش علمی مهم برای بررسی پدیده‌ی تکامل در یک سیستم آزمایشگاهی کنترل شده است. اساس روش‌های تکامل آزمایشگاهی ریشه در کارهای آنتونی لیون هوک[1] ، پاستور[2] ، رابرت کخ[3] و بویژه چارلز داروین[4] (با ارایه‌ی نظریه‌ی انتخاب طبیعی) دارد. اولین آزمایش مربوط به تکامل آزمایشگاهی حدود یک قرن پیش توسط دکتر ویلیام دالینگر[5] انجام شد (Dragosits & Mattanovich, 2013). او پروتوزئرهای (Protozoa) سریع الرشد را مدت ۷ سال کشت داد تا اثر افزایش تدریجی دما بر آنها را مشاهده کند. دمای محیط ابتدا ۱۶°C بود و بتدریج به ۲۳°C افزایش داده شد. در این نقطه بسیاری از افراد جمعیت از بین رفتند به همین دلیل دمای محیط به مدت سه ماه ثابت نگه داشته شد تا سرعت نسل‌زایی به حالت طبیعی خود بازگردد. پس از آن دما مجدداً به تدریج افزایش داده شد و پس از ۷ سال این پروتوزئرها قادر به تحمل دمای ۷۰°C شدند (Bennett & Hughes, 2009). با این وجود دوران طلایی تکامل سازشی آزمایشگاهی به ۲۵ سال اخیر مربوط می‌شود که کارهای فزاینده‌ای در این زمینه انجام شده است (Bennett, Dao, & Lenski, 1990).

در طول تکامل سازشی آزمایشگاهی یک میکروارگانیسم برای مدت زمان چند هفته تا چند سال تحت شرایط کاملا معینی کشت داده می‌شودکه امکان انتخاب فنوتیپ های بهبود یافته را فراهم می‌کند. اهمیت استفاده از میکروارگانیسم‌ها در مطالعات تکاملی عبارتند از: ۱) بسیاری از میکروارگانیسم‌ها نیازمندی‌های تغذیه‌ای ساده‌ای دارند؛ ۲) براحتی در آزمایشگاه قابل کشت هستند؛ ۳) سلول‌های میکروبی عموماً بسیار سریع رشد می‌کنند؛ و ۴) کنترل شرایط محیطی آن‌ها راحت‌تر است (Paquin & Adams, 1983). تاثیر گذاری بالای سازوکارهای ALE در بهینه‌سازی سویه‌های تولید کننده ثابت شده است. بر خلاف سازوکارهای دست‌کاری‌های هدفمند برخی از آنزیم‌های ویژه، ALE امکان بروز جهش‌های غیرقابل مشاهده در ژن‌های مختلف را به موازات هم فراهم می‌کند.

بنابراین ALE یکی از گسترده ترین ابزارهای استفاده شده برای کاربردهای زیست فناورانه، بهبود بازده محصول و کاهش هزینه‌ها در فرایندهای صنعتی است (Wollner, Krzeminski, Nelson, & Cell, 1992). اخیرا ALE به عنوان یک روش مهم به جمع روش‌های موجود برای مهندسی متابولیک مانند دستکاری ژنتیکی، سیستم‌های بیانی جدید، مدل سازی متابولیسم باکتریایی، ابزارهای آنالیز شبکه و روش‌های بهبود یافته‌ی تخمیر اضافه شده است. این تکنولوژی‌ها برای افزایش تولید سوخت‌های زیستی و ترکیبات ویژه با موفقیت به کار گرفته شده‌اند. این مسئله درهای جدیدی را به سوی سوخت و سازهای زیستی باز می‌کند که وابستگی مارا به فراورده های نفتی کاهش می‌دهد (Çakar, Turanlı-Yıldız, Alkım, & Yılmaz, 2012).

روش‌های انجام ALE

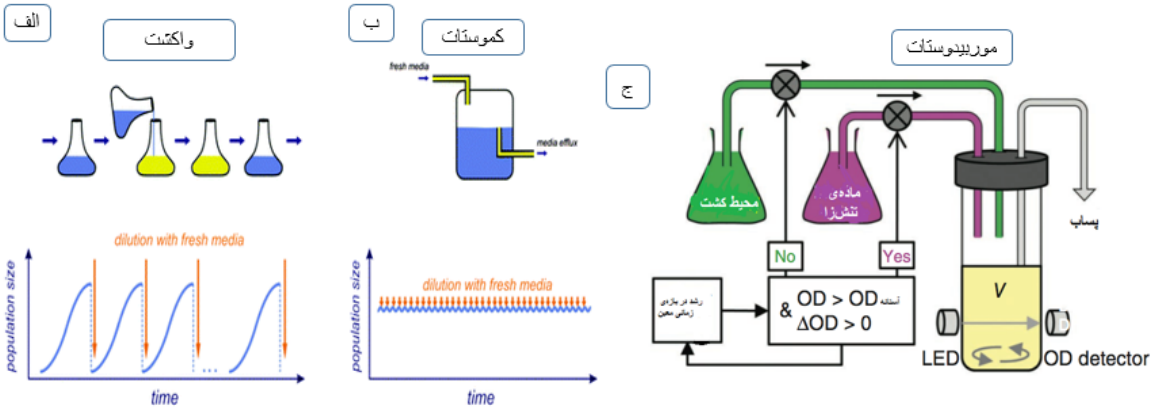
روش‌های متعددی برای انجام تکامل سازشی آزمایشگاهی وجود دارد از جمله متداول‌ترین این روش ها می توان از واکشت‌های متوالی در فلاسک های ارلن مایر، کشت کموستات (chemostat) و موربیدوستات (morbidostat) نام برد. در روش واکشت متوالی (شکل۱ الف) میکروارگانیسم ابتدا در یک فلاسک با میزان معینی از عامل تنش‌زا (stressor) کشت داده می‌شود و سپس در فواصل زمانی معینی (برحسب روز یا کدورت) میزان معینی از محیط کشت اولیه به یک فلاسک جدید که حاوی میزان بالاتری از عامل تنش‌زا است انتقال داده می‌شود. روش متداول دیگر روش کشت پیوسته (شکل۱ ب) در بیوراکتور است که در اینجا ماده‌ی تنش‌زا و محیط جدید به صورت پیوسته به راکتور افزوده می‌شوند. مزیت‌ها و معایب روش-های واکشت متوالی و کموستات در جدول۱ ارائه شده است (Palsson, 2015).

یک روش جدید برای انجام ALE که به صورت خودکار انجام می‌شود روش موربیدوستات (شکل۱ ج) است. این روش از یک سیستم کشت میکروبی کنترل شونده با کامپیوتر استفاده می‌کند که می‌تواند یک فشار انتخابی ثابتی از عامل تنش‌زا را فراهم کند. این روش شکل تغییر یافته‌ای از روش توربیدوستات (turbidostat) است.

[1] Antonie van Leeuwenhoek
[2] Louis Pasteur
[3] Robert Koch
[4] Charles Darwin
[5] William Dallinger

جدول ۱- مقایسه‌ی روش واکشت متوالی و کموستات برای انجام ALE

	کموستات	پاساژ متوالی
مزایا	سرعت رشد ثابت چگالی جمعیتی ثابت امکان کنترل غذا رسانی امکان کنترل شرایط محیطی از جمله pH و فشار نسبی اکسیژن	آسان بودن عملیات کم هزینه بودن امکان کنترل برخی از شرایط محیطی مانند دما
معایب	مهم ترین عیب این روش گران بودن آن است.	تنوع چگالی جمعیتی سرعت رشد نوسانی تغییرات شرایط محیطی از جمله pH و فشار نسبی اکسیژن



شکل ۱ - سه روش رایج برای انجام تکامل سازشی آزمایشگاهی. (الف) روش واکشت متوالی. (ب) روش کموستات و (ج) روش موربیدوستات که فرم تغییر یافته ای از روش توربیدوستات است.

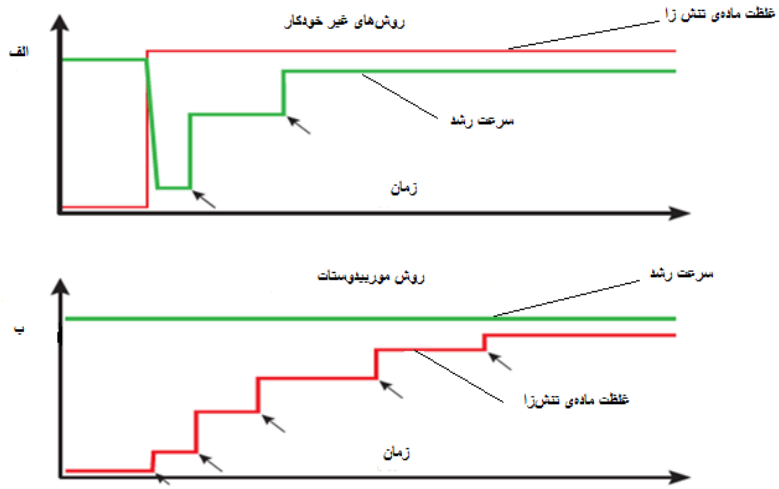
در هردو روش محیط جدید با سرعت مشابهی که محیط حاوی سلول‌ها خارج می‌شوند به سیستم وارد می‌شود و این سرعت می‌تواند به وسیله‌ی اندازه‌گیری چگالی سلولی تنظیم شود.

در این روش یک لوپ بیشتر استفاده شده است که مربوط به غلظت عامل تنش‌زاست به صورتی که اگر سرعت رشد بیشتر باشد سیستم با افزایش غلظت عامل تنش‌زا، سرعت را به حالت ثابت باز می‌گرداند.

موربیدوستات امکان انجام تکامل خودکار در یک بازه‌ی زمانی طولانی مدت را فراهم می‌کند. همان طور که در شکل نشان داده شده است این سیستم به یک لامپ LED و یک آشکارساز مجهز است که چگالی نوری (OD= Optical Density) را اندازه‌گیری می‌کند و به یک کامپیوتر مجهز شده است. زمانیکه اختلاف جذب خوانده شده بیشتر از صفر و وجذب نهایی بیشتر از جذب آستانه (OD_{THR}) باشد سیستم اجازه‌ی ورود عامل تنش‌زا به محیط کشت را صادر می‌کند (Toprak et al., 2013).

مقایسه روش‌های غیرخودکار (واکشت متوالی و کموستات) و روش خودکار (موربیدوستات) از نظر الگوی سازگاری میکروارگانیسم به عامل تنش‌زا:

همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است در تکامل سازشی با روش‌های غیرخودکار، ابتدا به دلیل افزودن ناگهانی عامل تنش‌زا رشد میکروارگانیسم کاهش پیدا می‌کند ولی به تدریج با سازگار شدن بیشتر، سرعت رشد میکروارگانیسم به حالت طبیعی نزدیک می‌شود. ولی در روش خودکار سرعت رشد میکروارگانیسم همواره ثابت باقی می‌ماند زیرا افزودن عامل تنش‌زا هماهنگ با فرایند تکامل انجام می‌گیرد.



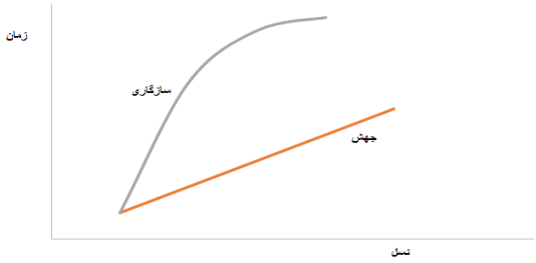
شکل۲ – مقایسه‌ی روش‌های غیرخودکار و خودکار برای انجام ALE . (الف) سازگاری سرعت رشد و افزایش غلظت مهارکننده در روش‌های واکشت متوالی و کموستات، (ب) سازگاری سرعت رشد و افزایش غلظت مهارکننده در روش موریبیدوستات. دراینجا عامل تنش‌زا با خط قرمز نشان داده شده است . هرکدام از پیکان‌های سیاه‌رنگ نشان دهنده‌ی محل‌های وقوع جهش هستند.

سازگاری و جهش در طی تکامل سازشی

در فرایند مقایسه‌ی مستقیم یک سویه‌ی تکامل یافته با سویه‌ی والدی وحشی، سازگاری سویه تکامل یافته از طریق فراوانی آن در کل جمعیت قابل مشاهده است.

ارزیابی رقابتی معمولاً در کشت‌های بسته انجام می‌شود و برای همه‌ی مراحل رشد شامل فاز تاخیری، فاز نمایی و فازسکون متعادل هستند (Lenski et al., 1998). بنابراین برای کاربرد در بیوتکنولوژی، عواملی مانند سرعت بیشینه-ی رشد، ضریب پایداری در غلظت‌های مختلف ترکیبات شیمیایی خاص و بازده زیست توده مطلق معیارهای مناسبی برای ارزیابی سازگاری هستند (Kao & Sherlock, 2008). یکی از عوامل مهم در جستجو برای فنوتیپ‌های بهبود یافته با ALE مدت زمان صرف شده برای آزمایش گزینش است. بررسی آزمایش‌های انجام شده در این زمینه نشان می‌دهد که تعداد نسل‌های متداول برای ALE بین ۱۰۰ تا ۲۰۰۰ نسل است که معمولا چندین هفته تا چندین ماه به طول می‌انجامد. فارغ از زمان لازم برای تجمع فنوتیپ‌های بهبود یافته، درجه‌ی سازگاری یکی از عوامل مهم در استفاده از ALE برای مهندسی سویه است (Beaumont, Gallie, Kost, Ferguson, & Rainey, 2009). بر اساس مطالعات انجام شده در طول ۱۰۰ تا ۵۰۰ نسل اول، سازگاری ۵۰ تا ۱۰۰ درصد قابل دسترسی است.

در برخی از موارد ALE می‌تواند موجب سازگاری تا بیش از ۱۰۰۰ درصد نیز شود (Tremblay et al., 2011). همان طور که در شکل ۳ نشان داده شده است سرعت سازگاری سویه‌های میکروبی در نسل‌های اولیه بالاتر بوده، ولی بتدریج به دلیل پیچیده شدن شبکه متابولیکی علی رغم افزایش خطی میزان وقوع جهش‌ها سرعت آن کاهش می-یابد (Nielsen, 1998).



شکل ۳ – نمودار افزایش سازگاری در طول تکامل سازشی. در این شکل میزان سازگاری و جهش در نسل‌های متوالی نشان داده شده است. همان طور که دیده می‌شود سرعت سازگاری در نسل‌های اولیه بیشتر بوده و سپس کاهش می‌یابد در حالی که وقوع جهش به طور پیوسته ادامه دارد.

در آزمایش‌های انجام شده ALE انواع مختلفی از جهش‌ها شناسایی شده اند :چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی(SNP_S) ، دخول‌ها و حذف‌های کوچک مقیاس (Indels) ، عناصر ترانسپوزونی و دخول و حذف‌های بزرگ (Takemoto, Nacher, & Akutsu, 2007). فراوانی جهش‌ها در ALE به

این شرح است: جهش‌های چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (۶۱٪) ، حذف‌ها (۲۹٪) ، دخول (۷٪) و توالی‌های ترانسپوزونی (۳٪). تعداد و نوع جهش‌ها به فشار انتخاب و دوره‌ی گزینش بستگی دارد. بعد از ایجاد فنوتیپ جدید کلون‌هایی از جمعیت نهایی جداسازی می‌شوند تا توالی ژنومی آنها از طریق روش های نوین تعیین ترداف ژنی تعیین شده و با توالی‌های ژنومی اولیه مقایسه شود (Conrad, Lewis, & Palsson, 2011).

کاربردهای ALE در زیست فناوری

روش تکامل سازشی آزمایشگاهی کاربردهای فراوانی در زیست فناوری دارد که مهمترین آن عبارتند از : فعال‌کردن مسیرهای نهفته برای مصرف سوبستراهای غیرمعمول و یا تولید محصول غیرمعمول، افزایش مصرف سوبسترا و بهبود سرعت رشد و تولید محصول، سازگارکردن سویه‌های باکتریایی با شرایط محیطی مانند افزایش مقاومت به استرس‌هایی که معمولاً در فرایندهای صنعتی اتفاق می‌افتند (Portnoy, Bezdan, & Zengler, 2011).

استفاده از روش تکامل سازشی برای فعال کردن مسیرهای نهفته: تعداد روز افزون ترکیبات شیمیایی که در حال تحقیق توسط سیستم‌های زیستی و از منابع تجدیدپذیر تولید می‌شوند نه تنها وابستگی مارا به سوخت‌های فسیلی کاهش می‌دهند بلکه ما را به یک جامعه زیست پایدار نزدیک می‌کند. مهندسی متابولیک و زیست شناسی سنتزی نیروهای محرکه برای رسیدن به این اهداف هستند. در حال حاضر یکی از چالش‌برانگیزترین جنبه‌ی این فرایند تولید ترکیبات نامعمولی است که به عنوان سوخت‌ها و محصولات زیستی استفاده می‌شوند. تولید این ترکیبات در *Saccharomyces cerevisiae* و *Escherichia coli* نسبت به روش شیمیایی دارای مزیت-هایی مانند هزینه‌ی پایین تولید، انتخابی بودن واکنش و کارآیی بالاست. با این وجود طراحی و ساخت فرایندهای بیوسنتزی خصوصا برای مسیرهای نامعمول اغلب نیازمند بهینه‌سازی‌های زیادی است. ALE برای بهینه‌سازی مسیرهای نامعمول جهت تولید سوخت‌های زیستی و سایر ترکیبات شیمیایی می تواند بسیار مفید باشد (Schmid et al., 2001). برای مثال باکتری *E.coli* فاقد فعالیت فومارات ردوکتاز برای تولید اتانول توانایی استفاده از گلیسرول را ندارد در حالی که گلیسرول به عنوان یکی از محصولات جانبی تولید بیودیزل یکی از سوبستراهای جذاب برای تولید اتانول به شمار می رود. در مطالعه انجام شده توسط Hu H, Wood TK به منظور فعال کردن سیستم فومارات هیدروژن لیاز باکتری، *E.coli* به مدت سه ماه تحت سازش با غلظت‌های افزایشی گلیسرول قرار داده شد . نتیجه‌ی این پژوهش ایجاد یک سویه‌ی بهبود یافته بود که می-توانست نسبت به سویه‌ی والدی خود بیشتر از ۲۰ برابر هیدروژن و اتانول تولید کند (Hu & Wood, 2010).

استفاده از روش تکامل سازشی برای بهینه‌سازی فنوتیپ

مهندسی سویه‌های باکتریایی برای تولید بیشتر محصولات صنعتی نیازمند دستکاری‌های ژنتیکی مختلفی است که منجر به کاهش چشمگیر سازگاری سویه می‌شود. استمرار این کاهش سازگاری باعث افت تولید محصول می‌شود. تحقیقات نشان می‌دهد که ALE نه تنها با این اثر مقابله می‌کند بلکه باعث سازگاری فیزیولوژیکی سویه‌ی مهندسی شده نیز می‌شود. استفاده از ALE به‌ویژه در سویه‌هایی مهم است که تولید محصول وابسته سرعت رشد است. تحقیقات نشان داده است که سازگاری طرح‌های مهندسی متابولیک وابسته به رشد می‌تواند منجر به افزایش چشمگیر در تولید محصول اصلی و کاهش محصولات جانبی شود. تحقیقات نشان داده است که نگهداری سویه در مرحله نمایی برای چندین نسل می‌تواند منجر به ایجاد فنوتیپی با بهبود چشمگیر در سرعت رشد می‌شود (Fong et al., 2005).

استفاده از روش تکامل سازشی برای سازگاری محیطی

کاهش سازگاری پس از دستکاری ژنتیکی اغلب در نتیجه-ی عدم تعادل کوفاکتورها (Kwon, Kim, Lee, & Kim, 2011) و اکی‌والانت‌های (Portnoy et al., 2010) احیایی و یا نوآرایی تنظیمی (Portnoy, Herrgård, & Palsson, 2008) اتفاق می‌افتد. یک استراتژی برای مقابله با کاهش سازگاری افزودن مواد غذایی بیشتر برای تامین بلوک‌های سازنده‌ی مورد نیاز سویه‌های مهندسی شده است. این در حالی است که این روش فراهم کردن مواد غذایی برای میکروارگانیسم می‌تواند خصوصیات فیزیولوژیکی میکروارگانیسم مانند الگوی تخمیر را تغییر داده و هزینه‌ی فرایند را بالا ببرد. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهند که ALE می‌تواند در سازگاری میکروارگانیسم نسبت به نبود

برخی از مواد غذایی موثر باشد. این فرایند از طریق کاهش تدریجی ماده غذایی مورد نظر در طول واکشت‌های متوالی انجام می‌شود. البته در حین این فرایند میکروارگانیسم در مرحله رشد نمایی نگه داشته می‌شود. سویه‌های مهندسی شده ی *E.coli* که برای تولید اسیدهای آلی مهندسی شده بودند تحت شرایط کمبود مواد غذایی قرار داده شدند. بعد از یک دوره‌ی کوتاه این سویه ها برروی محیط فاقد آن مواد غذایی رشد بهتری داشتند (Park, Lee, Kim, & Lee, 2007). این سازگاری سویه‌ها به محیط رشد حداقل می-تواند باعث ساده‌تر شدن فرایندهای پایین دست شده ، مقاومت به محصول را افزایش داده و هزینه‌ی فرایندها در مقیاس‌های بزرگ را کاهش دهد. نکتهٔ حائز اهمیت دیگر در زمینه‌ی سازگاری با استرس‌های محیطی، توجه به تفاوت شرایط محیط کشت در مقیاس آزمایشگاهی و مقیاس صنعتی است به صورتی که محیط‌های مورد استفاده در مقیاس آزمایشگاهی محیط‌های معین و دارای ترکیبات شیمیایی مشخص و خالص هستند در حالی که محیط‌های مورد استفاده در فاز صنعتی اغلب ناخالصی‌هایی دارند که در حین فرایند می‌توانند برای رشد سویه و تولید محصول مشکل ساز باشند (Martinez et al., 2007). برای مثال باکتری *Zymomonas mobilis* قدرت بالایی برای تولید اتانول دارد ولی به دلیل وجود ترکیبات مهار کننده مانند فورفورال ، استیک اسید و هیدروکسی متیل فورفورال در شیرابه های لیگنوسلولوزی مورد استفاده به عنوان محیط کشت ارزان قیمت، رشد میکروارگانیسم مهار شده و تولید اتانول کاهش می‌یابد. ایجاد مقاومت در برابر این عوامل از طریق مهندسی ژنتیک مستقیم دشوار است، زیرا اساس ژنتیکی آنها کاملاً شناسایی نشده است. اما قرار دادن این میکروارگانیسم در برابر غلظت‌های فزاینده فورفورال و استیک اسید موجب ایجاد یک سویه مقاوم شد که مقاومت آن سه برابر بیشتر از حداقل غلظت بازدارنده است (Shui et al., 2015).

نتیجه‌گیری

امروزه در کنار سایر روش‌های موجود برای بهینه‌سازی سویه‌های میکروبی، روش تکامل سازشی آزمایشگاهی به عنوان یک روش کارآمد و نوید بخش ظهور کرده است. این روش نسبت به سایر روش‌های موجود بویژه مهندسی ژنتیک دارای مزیت‌هایی است که از آن جمله می‌توان به آسان و ارزان بودن این روش اشاره کرد اما مهم‌ترین مزیت روش تکامل سازشی وجود جهش‌ها و در نتیجه سازگاری-های موازی است که از اصل تغییرات وابسته داروین پیروی می‌کنند. بر خلاف منتقدان ALE که آن را روشی کورکورانه می‌دانند، این روش یک روش نیمه آگاهانه است و تاکنون موفقیت‌های قابل توجهی داشته است. در دهه-های اخیر ALE توجهات زیادی را به خود جلب کرده است اما عمده مطالعات ALE روی ارگانیسم‌های شناخته شده انجام شده است. البته در سال‌های اخیر این روش در حال تعمیم به سایر میکروارگانیسم‌های کمتر شناخته شده نیز هست و انتظار می‌رود که در سال‌های آینده نتایج قابل توجهی از مطالعات ALE روی سایر میکروارگانیسم‌ها گزارش شود.

منابع

1. Beaumont, H. J., Gallie, J., Kost, C., Ferguson, G. C., & Rainey, P. B. (2009). Experimental evolution of bet hedging. *Nature*, *462*(7269), 90-93.
2. Bennett, A. F., Dao, K. M., & Lenski, R. E. (1990). Rapid evolution in response to high-temperature selection. *Nature*, *346*(6279), 79-81.
3. Bennett, A. F., & Hughes, B. S. (2009). Microbial experimental evolution. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *297*(1), R17-R25.
4. Çakar, Z. P., Turanlı-Yıldız, B., Alkım, C., & Yılmaz, Ü. (2012). Evolutionary engineering of Saccharomyces cerevisiae for improved industrially important properties. *FEMS yeast research*, *12*(2), 171-182.
5. Conrad, T. M., Lewis, N. E., & Palsson, B. Ø. (2011). Microbial laboratory evolution in the era of genome-scale science. *Molecular systems biology*, *7*(1), 509.
6. Dragosits, M., & Mattanovich, D. (2013). Adaptive laboratory evolution–principles and applications for biotechnology. *Microbial cell factories*, *12*(1), 64.
7. Fong, S. S., Burgard, A. P., Herring, C. D., Knight, E. M., Blattner, F. R., Maranas, C. D., & Palsson, B. O. (2005). In silico design and adaptive evolution of Escherichia coli for production of lactic acid. *Biotechnology and bioengineering*, *91*(5), 643-648.
8. Hu, H., & Wood, T. K. (2010). An evolved Escherichia coli strain for producing hydrogen and ethanol from glycerol. *Biochemical and*

biophysical research communications, *391*(1), 1033-1038.

9. Kao, K. C., & Sherlock, G. (2008). Molecular characterization of clonal interference during adaptive evolution in asexual populations of Saccharomyces cerevisiae. *Nature genetics*, *40*(12), 1499-1504.
10. Kwon, Y.-D., Kim, S., Lee, S. Y., & Kim, P. (2011). Long-term continuous adaptation of Escherichia coli to high succinate stress and transcriptome analysis of the tolerant strain. *Journal of bioscience and bioengineering*, *111*(1), 26-30.
11. Lenski, R. E., Mongold, J. A., Sniegowski, P. D., Travisano, M., Vasi, F., Gerrish, P. J., & Schmidt, T. M. (1998). Evolution of competitive fitness in experimental populations of E. coli: what makes one genotype a better competitor than another? *Antonie Van Leeuwenhoek*, *73*(1), 35-47.
12. Martinez, A., Grabar, T., Shanmugam, K., Yomano, L., York, S., & Ingram, L. (2007). Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant Escherichia coli B. *Biotechnology letters*, *29*(3), 397-404.
13. Nielsen, J. (1998). Metabolic engineering: techniques for analysis of targets for genetic manipulations. *Biotechnology and bioengineering*, *58*(2-3), 125-132.
14. Palsson, B. Ø. (2015). *Systems biology: constraint-based reconstruction and analysis*: Cambridge University Press.
15. Paquin, C. E., & Adams, J. (1983). Relative fitness can decrease in evolving asexual populations of S. cerevisiae. *Nature*, *306*(5941), 368-371.
16. Park, J. H., Lee, K. H., Kim, T. Y., & Lee, S. Y. (2007). Metabolic engineering of Escherichia coli for the production of L-valine based on transcriptome analysis and in silico gene knockout simulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(19), 7797-7802.
17. Portnoy, V. A., Bezdan, D., & Zengler, K. (2011). Adaptive laboratory evolution—harnessing the power of biology for metabolic engineering. *Current opinion in biotechnology*, *22*(4), 590-594.
18. Portnoy, V. A., Herrgård, M. J., & Palsson, B. Ø. (2008). Aerobic fermentation of D-glucose by an evolved cytochrome oxidase-deficient Escherichia coli strain. *Applied and environmental microbiology*, *74*(24), 7561-7569.
19. Portnoy, V. A., Scott, D. A., Lewis, N. E., Tarasova, Y., Osterman, A. L., & Palsson, B. Ø. (2010). Deletion of genes encoding cytochrome oxidases and quinol monooxygenase blocks the aerobic-anaerobic shift in Escherichia coli K-12 MG1655. *Applied and environmental microbiology*, *76*(19), 6529-6540.
20. Schmid, A., Dordick, J., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., & Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, *409*(6817), 258-268.
21. Shui, Z.-X., Qin, H., Wu, B., Ruan, Z.-y., Wang, L.-s., Tan, F.-R., . . . Hu, G.-Q. (2015). Adaptive laboratory evolution of ethanologenic Zymomonas mobilis strain tolerant to furfural and acetic acid inhibitors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(13), 5739-5748.
22. Takemoto, K., Nacher, J. C., & Akutsu, T. (2007). Correlation between structure and temperature in prokaryotic metabolic networks. *BMC bioinformatics*, *8*(1), 303.
23. Toprak, E., Veres, A., Yildiz, S., Pedraza, J. M., Chait, R., Paulsson, J., & Kishony, R. (2013). Building a morbidostat: an automated continuous-culture device for studying bacterial drug resistance under dynamically sustained drug inhibition. *Nature protocols*, *8*(3), 555-567.
24. Tremblay, P. L., Summers, Z. M., Glaven, R. H., Nevin, K. P., Zengler, K., Barrett, C. L., . . . Lovley, D. R. (2011). A c-type cytochrome and a transcriptional regulator responsible for enhanced extracellular electron transfer in Geobacter sulfurreducens revealed by adaptive evolution. *Environmental microbiology*, *13*(1), 13-23.
25. Wollner, A., Krzeminski, K., Nelson, W., & Cell, J. (1992). Microbial competition: Escherichia coli mutants that take over stationary phase cultures. *Biol*, *116*, 889.

Harnessing the power of evolution for biotechnology by adaptive laboratory evolution (ALE) approach

Bagoghli N. and Moghimi H.

Dept. of Microbial Biotechnology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Adaptive laboratory evolution (ALE) due to its simplicity and effectiveness have been used to improve important industrial straits properties such as carbon source utilization,

stability in unpleasant environmental conditions and tolerance to chemical inhibitors. No need for prior genetic knowledge of desired strain makes ALE as a powerful approach for strain development even for species with minimal genotypic information. While the procedures for adaptive laboratory evolution has remained similar for many years, recent advances promise for improving the experimental workflows for evolutionary engineering by accelerating the pace of evolution and simplifying the analysis of evolved strains. The aim of this review is highlighting recent advances in this area and evaluation of this technique application in biotechnology.

Key words: adaptive laboratory evolution, strain engineering, biotechnology

۲۰ سال با لیپیدومیکس؛ مروری بر جنبه‌های کاربردی و ابزاری

احمد فرهاد طالبی* و فاطمه قناعتیان

سمنان، دانشگاه سمنان، دانشکده زیست فناوری میکروبی

چکیده

لیپیدومیکس به عنوان شاخه جدیدی از علم گسترده اومیکس، اخیرا مورد توجه قرار گرفته است. این علم اگرچه در دهه‌های گذشته نادیده گرفته شده بود، اما به علت نقش موثری که در ایجاد فهم عمیق‌تری در دانش زیست شناسی سامانه‌ای و بیوشیمی کاربردی داشته است، توانسته جایگاه ویژه‌ای را در بین علوم دیگر اومیکس پیدا کند. مشارکت در ساختار غشایی و ساختمانی سلول، انتقال و تنظیم پیام‌رسانی سلولی و حفظ و ذخیره انرژی زیستی، همه مثال‌هایی از اهمیت چربی‌ها در سلول‌های زنده هستند که توسعه علم لیپیدومیکس به شناخت و کنترل عوامل مؤثر بر آنها کمک می‌کند. در این مقاله ضمن معرفی لیپیدومیکس و تعیین حدود آن، کاربردهای متنوع این علم در صنایع مختلف پزشکی، داروسازی، تغذیه و تولید سوخت زیستی مطرح می شود. ابزارها و روش‌های مختلف شناسایی و پردازش چربی‌ها شامل روش‌های مبتنی بر اسپکترومتری جرمی، طیف‌سنجی و کروماتوگرافی، روش‌های شیمیایی و تصویربرداری در گسترش بیشتر لیپیدومیکس سهم بسزایی داشته‌اند؛ این مجموعه به همراه ابزارهای کامپیوتری، بیوانفورماتیک و پایگاه‌های اطلاعاتی مفصلاً توضیح داده شده‌اند. تسلط بر حوزه‌های متنوع علم لیپیدومیکس به صورت معنی‌داری به توسعه پژوهش‌های کاربردی در زمینه بهبود کمیت و کیفیت روغن‌های زیستی، شناسایی علایم و نشانگرهای زیستی بیماری‌های مرتبط با چربی و شناسایی مسیرهای مختلف متابولیسم چربی و آنزیم‌های درگیر در آنها کمک کرده است.

واژه‌های کلیدی: لیپیدومیکس، اومیکس، اسپکترومتری، بیوانفورماتیک، چربی‌ها

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۳۳۳۶۵۴۳۱۴ ، پست الکترونیکی: aftalebi@semnan.ac.ir

مقدمه

چربی‌ها گروهی از مولکول‌های زیستی هستند که در زیرشاخه ای از علوم موسوم به "اومیکس[۶]" به عنوان لیپیدومیکس[۷]، بررسی می شوند. اومیکس به زمینه جدیدی از مطالعات زیست شناسی مانند لیپیدومیکس، ژنومیکس[۸]، پروتئومیکس[۹] و یا متابولومیکس[۱۰] گفته می‌شود که به ساختمان، کمیت و کیفیت مجموعه مولکول‌های زیستی و عملکرد و پویایی آن‌ها را در سلول ها می پردازد (۱).

در چند دهه گذشته کانون توجه بیشتر پژوهش‌های علوم زیستی مولکول‌های DNA، RNA و پروتئین ها بوده است و در این بین چربی‌ها به عنوان مجموعه‌ای از مولکول‌های ناهمگن با عملکرد کم سلولی دیده می‌شدند، در حالی که چربی‌ها نقش‌های متنوع و مهمی در سلول ایفا می‌کنند.

[6] Omics
[7] Lipidomics
[8] Genomics
[9] Proteomics
[10] Metebolomics