



УДК 577.124.5;577.151.4

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КЕТОЗО-3-ЭПИМЕРАЗ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА D-АЛЛЮЛОЗЫ

© 2023 г. Н. С. Иванова*, А. А. Кульминская*, **, С. В. Швецова*, **, ***, #

*Курчатовский геномный центр – ПИЯФ, Россия, 188300 Гатчина, Орлова Роща, 1

**Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Россия, 188300 Гатчина, Орлова Роща, 1

***Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Россия, 195251 Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

Поступила в редакцию 13.10.2022 г.

После доработки 05.12.2022 г.

Принята к публикации 10.12.2022 г.

Редкие сахара привлекают все больше внимания в качестве безопасных для здоровья низкокалорийных подсластителей и функциональных соединений в пищевой, фармацевтической и медицинской промышленности. D-Аллюлоза, впервые обнаруженная в пшенице более 70 лет назад, обладает значительным потенциалом применения, однако ее широкое использование лимитируется высокой стоимостью получения. Реакции эпимеризации доступных сахаров, приводящие к получению D-аллюлозы, катализируют ферменты группы эпимераз, а именно кетозо-3-эпимеразы. Ключевыми задачами исследований ферментов семейства кетозо-3-эпимераз выступают установление точных механизмов их работы, повышение ферментативной активности и стабильности для достижения высокой эффективности ферментативного производства D-аллюлозы. В обзоре обобщены и представлены последние инновационные разработки по использованию кетозо-3-эпимераз, а также оптимизации процессов для получения D-аллюлозы; рассмотрены структурные особенности основных ферментов, используемых в производстве редкого сахара, варианты молекулярных модификаций биокатализаторов и перспективы практического использования обсуждаемых в работе ферментных путей.

Ключевые слова: редкие сахара, D-аллюлоза, D-фруктоза, D-кетозо-3-эпимераза, D-тагатозо-3-эпимераза, активный центр, структурные особенности ферментов

DOI: 10.31857/S0132342323040346, **EDN:** ODGVQI

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	348
D-АЛЛЮЛОЗА: СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И СВОЙСТВА	349
ФЕРМЕНТЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ D-АЛЛЮЛОЗЫ	350
ОБЩИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ СЕМЕЙСТВА D-КЕТОЗО-3-ЭПИМЕРАЗ	350
МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ КЕТОЗО-3-ЭПИМЕРАЗ	352
БИОИНЖЕНЕРИЯ КЕТОЗО-3- ЭПИМЕРАЗ	354
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	356
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	357

ВВЕДЕНИЕ

К редким сахарам относятся моносахариды с ограниченной доступностью в природе и, как правило, с почти неизвестными или плохо изученными биологическими функциями. Однако некоторые из них, в частности D-аллюлоза, зарекомендовали себя как безопасные для здоровья человека соединения и уже используются в качестве альтернативы обычному сахару в виде пищевой добавки, обладая подходящими для этих целей вкусовыми качествами, низкой калорийностью и рядом других характеристик. Возрастающий интерес пищевых производств к редким сахарам как потенциальным подсластителям или новым функциональным соединениям стимулирует поиск и разработку доступных и экономически выгодных способов их получения.

Один из подходов к получению редких сахаров – разработка индивидуальных ферментов, комплексных ферментных препаратов, а также мик-

Сокращения: CEP2 – семейство углеводов-эпимераз 2 (carbohydrate epimerases); DAE – D-аллюлозо-3-эпимераза; DFE – D-фруктозо-3-эпимераза; DTE – D-тагатозо-3-эпимераза.

Автор для связи: (эл. почта: shvetsova_sv@pnpi.nrcki.ru).

робных цельноклеточных систем. Для получения D-аллюлозы используют ферменты семейства кетозо-3-эпимераз, которые катализируют реакции эпимеризации различных сахаров (в основном D-фруктозы). Актуальность исследований этих ферментов обусловлена потребностью в высокоактивных, стабильных ферментных препаратах с узкой субстратной специфичностью. Детализированная информация о субстратной специфичности и особенностях ферментов семейства кетозо-3-эпимераз позволяет совершенствовать методики производства функциональных редких сахаров для эффективного и экологически чистого производства. Структурные исследования этих ферментов необходимы для понимания взаимосвязи между их структурной организацией и каталитическим механизмом, дают неоценимую информацию для разработки дальнейших стратегий модификации ферментов с целью улучшения их каталитической эффективности, а также позволяют понять точные механизмы синтеза редких сахаров.

В представленной обзорной статье суммированы современные достижения в области исследований структурно-функциональных особенностей кетозо-3-эпимераз для получения редкого сахара D-аллюлозы, проведена оценка актуальности развития исследовательских и промышленных процессов производства и внедрения этого редкого сахара в широкое потребление.

D-АЛЛЮЛОЗА: СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И СВОЙСТВА

D-Аллюлоза (синоним — D-псикоза) представляет собой моносахарид, кетогексозу, эпимер D-фруктозы, химическая структура которого отличается от структуры D-фруктозы положением гидроксильной группы при C3 [1]. Международное общество редких сахаров на симпозиуме в 2014 г. постановило отменить использование термина “псикоза” в отношении D-аллюлозы, поскольку D-аллюлоза служит изомеризованным и окисленным продуктом D-аллозы и D-аллита. Многие исследователи называют D-аллюлозу идеальным заменителем сахарозы из-за ее уникальных свойств: сладости, высокой растворимости, чрезвычайно низкой калорийности, а также способности вызывать низкий гликемический ответ [2, 3]. Добавление D-аллюлозы к продуктам питания улучшает желирующие свойства ингредиентов пищевых продуктов, их цвет и текстуру, а также усиливает антиоксидантные свойства [4]. В 2016 г. D-аллюлоза была одобрена в качестве безопасной пищевой добавки и пищевого ингредиента [5]. Согласно рейтингу токсичности, этот сахар занимает категорию “относительно безвредных”, что соотносится с самой низкой степенью токсичности [6]. В результате проведенных токсикологических исследований на животных не

было обнаружено каких-либо токсических эффектов D-аллюлозы, которые можно было бы противопоставить ее преимуществам [7, 8]. Кроме того, в 2012 г. Narada et al. продемонстрировали усиление действия известного антибактериального препарата метронидазола при совместном приеме с D-аллюлозой [9]. В обзоре Chung et al., посвященном гипогликемическим эффектам D-аллюлозы, рассмотрены эксперименты, демонстрирующие повышение уровня поглощения активных форм кислорода и внутриклеточного глутатиона *in vitro* [10, 11].

Наиболее хорошо изученная биологическая функция D-аллюлозы — ее способность подавлять гипергликемию. Проведенные клинические исследования показали, что употребление в день более 5 г D-аллюлозы при одновременном приеме 75 г мальтодекстрина снижает уровень глюкозы и инсулина в плазме крови у здоровых людей [12]. Hayashi et al. [13] продемонстрировали, что при длительном употреблении D-аллюлозы уровень глюкозы после стандартного приема пищи у пациентов с пограничным диабетом значительно снижался. Влияние D-аллюлозы на снижение уровней глюкозы и инсулина в крови, приводящее к замедлению увеличения массы тела, было подтверждено на животных моделях диабета 2-го типа [14, 15]. Так, было установлено, что 5%-ный раствор D-аллюлозы (в виде напитка) способен защищать от хронической недостаточности β -клеток поджелудочной железы, вызванной гипергликемией страдающих ожирением животных с диабетом 2-го типа [14]. Itoh et al. обнаружили, что добавление 5% аллюлозы в рацион мышам с дефицитом лептина в течение 15 недель снижало массу тела на 20%, а печени — на 15% [16]. Chen et al. сравнили эффект 4-недельного употребления крысами линии Wistar 5%-ного раствора D-аллюлозы с эффектом приема 5%-ных растворов глюкозы, фруктозы и целлюлозы. При употреблении D-аллюлозы профиль липидов в крови улучшился, а уровень антиоксидантов увеличился [17]. На уровне экспрессии генов D-аллюлоза ингибировала гены липогенеза и увеличивала экспрессию генов, участвующих в окислении жиров [17–19]. Тем не менее точный механизм, лежащий в основе антигиперлипидемии, до сих пор не ясен и требует дальнейших клинических исследований.

В 2002 г. Matsuo et al. выявили низкую калорийность D-аллюлозы в сравнительном исследовании, в котором самцы крыс Wistar в течение 20 дней получали с пищей по 0.5–2.0 г сахарозы, фруктозы или D-аллюлозы. Крысы набирали вес при приеме сахарозы и фруктозы, но не D-аллюлозы [20]. В последующих экспериментах Matsuo et al. [21] исследовали метаболизм и секрецию D-аллюлозы. Было обнаружено, что D-аллюлоза частично абсорбируется и обнаруживается в моче и кале крыс через 24 ч после приема, а ее деструк-

ция происходит в толстой кишке. Диеты, содержащие 0–30% D-аллюлозы, приводили к зависимому от концентрации снижению прироста массы тела и увеличению уровней уксусной, пропионовой и масляной кислот [21]. Iida et al. представили доказательства очень низкой калорийности D-аллюлозы, измеряя расход энергии при переваривании углеводов у людей. Было показано, что расход энергии на углеводы не увеличивался при приеме D-аллюлозы в дозе 0.35 г/кг массы тела, а сбраживаемость сахара составляла лишь часть сбраживаемости фруктозоолигосахаридов [22].

Присутствие D-аллюлозы в ежедневном рационе оказывает положительное влияние на здоровье как животных, так и людей [12, 14, 17, 23]. Выявлены многочисленные преимущества D-аллюлозы по сравнению с обычными сахарами, сахарными спиртами и искусственными подсластителями [2–5]. Был опубликован ряд всеобъемлющих обзоров, посвященных безопасности D-аллюлозы [23–26]. Таким образом, учитывая разнообразие полезного действия D-аллюлозы, как *in vitro*, так и *in vivo*, и отсутствие негативных эффектов в метаболических и токсикологических исследованиях, D-аллюлоза в настоящее время по праву считается наиболее перспективным редким сахаром. Однако из-за высоких отпускных цен на D-аллюлозу ее использование в качестве подсластителя ограничено.

ФЕРМЕНТЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ D-АЛЛЮЛОЗЫ

В связи с неоспоримыми преимуществами D-аллюлозы в качестве подсластителя, разработка эффективного промышленного способа производства этого редкого сахара – весьма важная задача. Известно несколько химических способов получения D-аллюлозы: первый заключается в эпимеризации глюкозы или 1,2:4,5-ди-O-изопропилиден-β-D-фруктопиранозы с использованием молибдата в качестве катализатора в высокотемпературных условиях [27, 28]; второй метод – это изомеризация фруктозы в ходе многостадийных химических превращений [29]. Недавно был описан способ изомеризации D-глюкозы в D-фруктозу с использованием спермина, где в качестве побочного продукта получали D-аллюлозу [30]. Существенными недостатками упомянутых способов считаются многостадийность процессов очистки целевого продукта D-аллюлозы, синтез множества побочных токсичных продуктов, загрязняющих окружающую среду, высокая итоговая стоимость процессов, что затрудняет их использование в промышленных масштабах.

В качестве альтернативы химическим методам получения D-аллюлозы в настоящее время рассматривается использование ферментов, катализирующих реакции эпимеризации различных са-

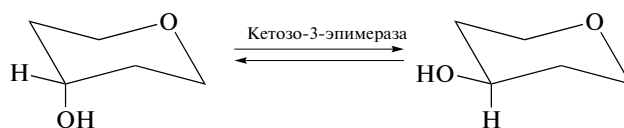


Рис. 1. Реакция эпимеризации, катализируемая кетозо-3-эпимеразой: обращение гидроксильной группы в хиральном центре (при C3). Гидроксильные группы в других положениях не показаны для ясности.

харов, приводящих к получению D-аллюлозы (рис. 1). Эти ферменты составляют группу эпимераз под общим названием кетозо-3-эпимеразы.

Первая такая кетозо-3-эпимераза была обнаружена и охарактеризована в 1993 г. у грамотрицательной почвенной бактерии *Pseudomonas cichorii* [31]. Отметим, что названия кетозо-3-эпимераз отражают тот субстрат, к которому фермент демонстрирует оптимальную специфичность. Поскольку оптимальным субстратом для кетозо-3-эпимеразы из *P. cichorii* была D-тагатоza, она была названа D-тагато-3-эпимераза (DTE, К.Ф. 5.1.3.31) [32]. В 2006 г. появилась публикация о второй кетозо-3-эпимеразе, D-аллюлозо-3-эпимеразе, из *Agrobacterium tumefaciens* (DAE, К.Ф. 5.1.3.30), для которой наиболее предпочтительным субстратом была D-аллюлоза [33], а в 2009 г. была охарактеризована третья кетозо-3-эпимераза, из *Rhodobacter sphaeroides*, продемонстрировавшая наивысшую активность по отношению к D-фруктозе и, соответственно, названная D-фруктозо-3-эпимеразой (DFE, К.Ф. 5.1.3.-) [34]. Позднее были обнаружены и охарактеризованы другие кетозо-3-эпимеразы из различных микроорганизмов, большинство из которых были D-аллюлозо-3-эпимеразами, за исключением L-рибулозо-3-эпимеразы (LRE, К.Ф. 5.1.3.-) из *Mesorhizobium loti*, для которой оптимальным субстратом была L-рибулоза [35].

ОБЩИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ СЕМЕЙСТВА D-КЕТОЗО-3-ЭПИМЕРАЗ

В настоящее время исследовано значительное количество ферментов, принадлежащих к семейству D-кетозо-3-эпимераз. Большинство ферментов этого семейства – бактериальные белки. Доступные данные об основных физико-химических и биохимических свойствах ферментов обобщены в табл. 1.

Ферменты семейства D-кетозо-3-эпимераз представляют собой, в большинстве случаев, тетрамеры, реже это димеры, молекулярная масса мономера которых составляет ~33–35 кДа. Большинство представленных в табл. 1 ферментов для проявления каталитической активности необходимы двухвалентные ионы Co^{2+} , Mn^{2+} и Mg^{2+} . Стоит отметить, что единственный фермент, не

Таблица 1. Свойства ферментов семейства кетозо-3-эпимераз

Организм	Молекулярный вес, кДа	$T_{опт}$, °C	pH _{опт}	Ионы	$T_{1/2}$, мин	K_m , мМ	k_{cat}^* , мин ⁻¹	k_{cat}/K_m	Соотношение равновесных концентраций	Удельная активность, ед./мг	Ссылки
<i>Agrobacterium</i> sp. ATCC 31749	132 (тетрамер)	55–60	7.5–8.0	Co ²⁺	267 (55°C, 0.1 мМ Co ²⁺) 64 (50°C)	110	6450	58.6	30 : 70 (55°C)	90.5 (50 мМ D-фруктоза)	[46]
<i>A. tumefaciens</i> ^a	132 (тетрамер)	50	8.0	Mg ²⁺		24	2068	85	33 : 67 (40°C)	8.89 (55.5 мМ D-фруктоза)	[33]
<i>Arthrobacter globiformis</i> M30	128 (тетрамер)	70	7.5–8.0	Mg ²⁺	н.д.	37.5	2509	66.9	27 : 73 (70°C)	н.д.	[47]
<i>Bacillus</i> sp. КСТС 13219	66 (димер)	55	8.0	Mn ²⁺	36000 (50°C)	130	22070	169.4	28.5 : 71.5	127.2	[41]
Метагеном из горячего источника	136 (тетрамер)	80	7.0	Co ²⁺	9900 (60°C)	141.4	2519	17.8	31 : 69	7	[42]
<i>Caballeronia fortuita</i>	132 (тетрамер)	65	7.5	Co ²⁺	63 (60°C)	81.9	9433	78.5	29.4 : 70.6	270	[48]
<i>Clostridium</i> sp.	130 (тетрамер)	65	8.0	Co ²⁺	15 (60°C)	279	16372	58.7	28 : 72 (65°C)	250	[44]
<i>C. botetiae</i>	139 (тетрамер)	55	7.0	Co ²⁺	156 (55°C, 0.4 мМ Co ²⁺) 408 (60°C)	59.8	3540	59	32 : 68 (60°C)	150.7	[36, 49]
<i>C. cellulolyticum</i> H10 ^b	132 (тетрамер)	55	8.0	Co ²⁺	0.1 мМ Co ²⁺) 108 (50°C)	53.5	3354.5	62.7	32 : 68 (55°C)	287	[37]
<i>C. scindens</i> 35704	139 (тетрамер)	60	7.5	Mn ²⁺	~120 (50°C, 1 мМ Co ²⁺)	40.1	350	8.7	28 : 72 (50°C)	171	[36, 50]
<i>Desmospora</i> sp. 8437	132 (тетрамер)	60	7.5	Co ²⁺	130 (без ионов, 60°C)	549	63573	116	30 : 70 (60°C)	252.1	[36, 51]
<i>Dorea</i> sp. CAG317	128 (тетрамер)	70	6.0	Co ²⁺	~30 (60°C)	153	30447	199	30 : 70 (70°C)	803.5	[36]
<i>Flavonifractor plautii</i>	132 (тетрамер)	65	7.0	Co ²⁺	130 (60°C)	323	20520	64	31 : 69	8.22 ^в	[45]
<i>Halanaerobium congolense</i>	138 (тетрамер)	70	8.0	Mg ²⁺	96 (70°C)	н.д.	н.д.	н.д.	33 : 67	183.54 ^г	[43]
<i>Novibacillus thermophilus</i>	130 (тетрамер)	70	7.0	Co ²⁺	47.8 (60°C)	29.7	9275	312.3	28.3 : 71.7	н.д.	[52]
<i>Pirellula</i> sp.	69 (димер)	60	7.5	Co ²⁺	360 (60°C)	74.7	2832	37.9	30 : 70	н.д.	[38]
<i>Paenibacillus senegalensis</i>	33.5 (мономер)	55	8.0	Co ²⁺	140 (60°C)	366.7	2455.2	6.7	30 : 70	25.2	[53]
<i>Pseudomonas</i> sp. ST-24	68 (димер)	60	7.5	Не требуются	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	20 : 80 (30°C)	н.д.	[32]
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> SK011	64 (димер)	40	9.0		н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	23 : 77 (40°C)	н.д.	[34]
<i>Rhodopirellula ballica</i>	60 (димер)	60	8.0		52.3 (60°C)	78.13	894.29	11.45	23.1 : 76.9	11.7	[54]
<i>Ruminococcus</i> sp.	132 (тетрамер)	60	7.5–8.0	Mn ²⁺	96 (60°C)	216	3562	16	28 : 72 (60°C)	8.95 (без ионов)	[55]
<i>Sinorhizobium</i> sp.	68 (димер)	50	8.0	Mn ²⁺	934 (40°C)	54.7	3000	54.6	30.1 : 69.9	н.д.	[39, 56]
<i>Staphylococcus aureus</i>	134 (тетрамер)	70	8.0	Mg ²⁺	120 (70°C)	59.3	1374	23.2	28.3 : 71.7 (60°C)	н.д.	[57]
<i>Thermoclostridium caenicola</i>	66 (димер)	65	7.5	Co ²⁺	816 (50°C)	94.5	12270	130	29.2 : 70.8 (50°C)	н.д.	[40]
<i>Treponema primitia</i> ZAS-1	33 (мономер)	70	8.0	Co ²⁺	~30 (50°C)	279	17573	63	28 : 72 (70°C)	227.5 (278 мМ D-фруктоза)	[58]

Примечание: н.д. — нет данных.
* k_{cat} [мин⁻¹] = k_{cat} [с⁻¹] × 60.

^a В статье Patel et al. [59] описан химерный белок D-аллүлозо-3-эпимераза + N-конец дрожжевого гомолога SUMO (Smt3), обладающий большей термостабильностью, лучшей каталитической эффективностью и продуктивностью в сравнении с диким типом.

^б Кристаллическая структура и механизм катализа описаны в статье Chan et al. [60].

^в Относительная активность D-фруктозы составляет 44,1% от активности в отношении D-аллүлозы (20 ед./мг).

^г Относительная активность D-фруктозы составляет ~60% от активности в отношении D-аллүлозы (305.9 ед./мг).

требующий кофактора для проявления активности — это D-тагатозо-3-эпимераза из *Pseudomonas* sp. ST-24 [32]. В основном pH-оптимум лежит в нейтрально-слабощелочной области — pH 7.0–9.0. Однако pH-оптимум у D-аллюлозо-3-эпимеразы из *Dorea* sp. CAG317 находится в слабокислой области (pH 6.0), что способствует подавлению неферментативных реакций, приводящих к образованию побочных продуктов [36].

В основном эти ферменты действуют в достаточно широком диапазоне температур 40–80°C, но высокой температурной стабильностью отличается ограниченное число ферментов: D-тагатозо-3-эпимеразы из *Clostridium cellulolyticum* H10 (время полужизни 408 мин при 60°C, оптимум 55°C) [37], *Pirellula* sp. (360 мин при 60°C, оптимум 60°C) [38], *Sinorhizobium* sp. (934 мин при 40°C, оптимум 50°C) [39], *Thermoclostridium caenicola* (816 мин при 50°C, оптимум 65°C) [40], а также ферменты D-аллюлозо-3-эпимераза из *Bacillus* sp. (600 ч при 50°C, оптимум 55°C) [41] и D-аллюлозо-3-эпимераза из метабенома горячего источника в Татапани (DaeM, 165 ч при 60°C, оптимум 80°C) [42]. Для остальных ферментов время полужизни находится в диапазоне 15–267 мин; для 12 из 16 ферментов внутри диапазона этот показатель не превышает 120 мин.

Поскольку реакции эпимеризации, катализируемые кетозо-3-эпимеразами, обратимы, для преимущественного получения конечного продукта необходимо учитывать равновесные концентрации исходного субстрата и продукта. Так, оптимальное соотношение равновесных концентраций D-аллюлозы к D-фруктозе у ферментов из *A. tumefaciens* составляет 33 : 67 [33], *Halanaerobium congolense* — 33 : 67 [43], *Clostridium bolteae* — 32 : 68 [44], *C. cellulolyticum* — 32 : 68 [37], DaeM — 31 : 69 [42] и *Flavonifractor plautii* — 31 : 69 [45]. В целом равновесные концентрации D-аллюлозы к D-фруктозе для D-аллюлозо-3-эпимераз находятся в диапазоне 20–33%, примерно в половине представленных в табл. 1 случаев — менее 30%.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ КЕТОЗО-3-ЭПИМЕРАЗ

Согласно классификации углеводов-эпимераз, предложенной в 2015 г. Van Overtveldt et al. [61] на основе анализа свойств, гомологий первичных последовательностей, идентичности третичных структур и механизмов действия, кетозо-3-эпимеразы относятся к семейству CEP2 (carbohydrate epimerases, К.Ф. 5.1.3), которые действуют по механизму протонирования/депротонирования. Семейство CEP2 включает такие ферменты, как D-тагатозо-3-эпимераза (К.Ф. 5.1.3.31), D-психозо-3-эпимераза (К.Ф. 5.1.3.30), L-рибулозо-5-фосфат-3-эпимераза (К.Ф. 5.1.3.22), L-рибулозо-3-эпимераза, D-тагатуронат-3-эпимераза.

На сегодняшний день существуют убедительные структурные доказательства того, что кетозо-3-эпимеразы действуют по механизму депротонирования/репротонирования в положении C3, что подразумевает наличие кетогруппы в положении C2 после раскрытия кольца кетозы и иона двухвалентного металла в активном центре фермента для стабилизации промежуточного соединения *цис*-эндиолата. Решены кристаллические структуры L-рибулозо-3-эпимеразы из *Mesorhizobium loti* (PDB: 3VYL) [62], D-тагатозо-3-эпимеразы из *Pseudomonas cichorii* (PcDTE; PDB: 2QUL) [63], D-аллюлозо-3-эпимеразы из *Agrobacterium tumefaciens* (PDB: 2HK0, 2HK1) [64], D-аллюлозо-3-эпимеразы из *Clostridium cellulolyticum* (PDB: 3VNI, 3VNJ, 3VNI, 3VNL, 3VNM) [60], D-тагатозо-3-эпимеразы из *Rhodobacter sphaeroides* (RsDTE) [65], D-аллюлозо-3-эпимеразы из *Arthrobacter globiformis* [66] и др. В деталях возможный механизм реакции депротонирования/репротонирования, катализируемой углеводов-эпимеразами семейства CEP2, представлен на рис. 2 и обсуждается ниже. Депротонирование и репротонирование происходят при участии двух консервативных каталитических остатков глутаминовой кислоты. Рентгеновские структуры других углеводов-эпимераз в комплексах с моносахаридами в кольцевой форме способствовали уточнению механизмов раскрытия сахарных колец, катализируемых ферментами [67–78].

Наиболее подробно молекулярный механизм катализа эпимеризации D-фруктозы в D-аллюлозу исследован для используемой в промышленности D-тагатозо-3-эпимеразы из *P. cichorii* (PcDTE, PDB: 2QUL) [63, 79] (рис. 2). D-Тагатозо-3-эпимераза из *P. cichorii* (PcDTE), обладающая широкой субстратной специфичностью, эффективно катализирует эпимеризацию не только D-тагатозы до D-сорбозы, но и D-фруктозы до D-аллюлозы. Субстрат (D-фруктоза) располагается в каталитическом центре фермента, который содержит ион металла, координируемый четырьмя аминокислотными остатками (Glu152, Asp185, His211 и Glu246) [63, 79] (рис. 2а и 2б). Еще три остатка (Glu158, His188 и Arg217) образуют водородные связи с молекулами воды вблизи сайта связывания металла. В процессе связывания D-фруктозы субстрат заменяет молекулу воды в активном центре фермента, при этом остаток His188 отдает протон атому O2, а остатки Glu152 и Glu256 удаляют протоны из O3 и C3 соответственно с образованием промежуточного эндиолата-*цис*-эндиолата, имеющего плоскую структуру O2–C2–C3–O3, стабилизированную остатками His188, Arg217 и ионом металла (рис. 2а и 2б). Затем происходит перенос протона от остатка Glu246 к кислородному атому O3 и от Glu152 к C3 с образованием D-аллюлозы (рис. 2а и 2б).

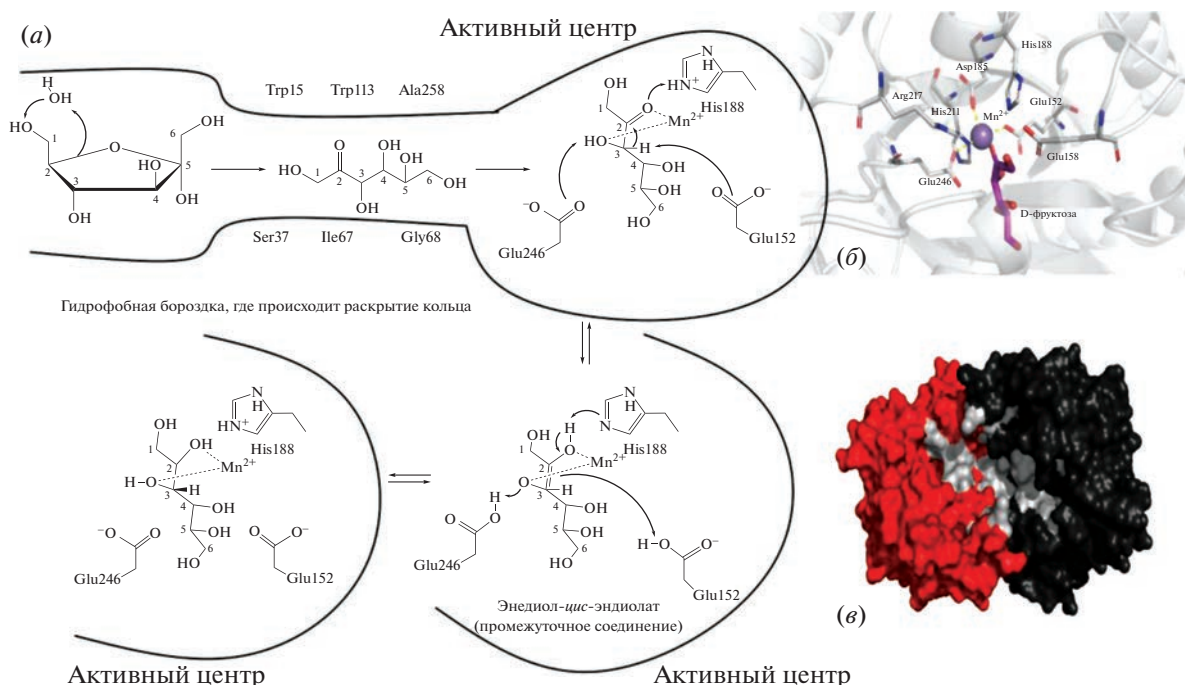


Рис. 2. Молекулярный механизм катализа реакции эпимеризации и структурные особенности D-тагато-3-эпимеразы из *P. cichorii*. (а) – Схема молекулярного механизма катализа реакции эпимеризации D-фруктозы в D-аллюлозу; (б) – структура D-тагато-3-эпимеразы из *P. cichorii* (PDB ID: 2qun), визуализированная в программе PyMol. Каталитические остатки и остатки, координирующие ион Mn^{2+} (Glu152, Glu158, Asp185, His188, His211, Arg217, Glu246), показаны в скелетном отображении (серый цвет); ион металла, Mn^{2+} , изображен в виде сиреневой сферы; субстрат (D-фруктоза) обозначен фиолетовым цветом. Взаимодействие атомов аминокислотных остатков с ионом металла указано желтой пунктирной линией; (в) – D-тагато-3-эпимераза из *P. cichorii* (PDB ID: 2qun), димерная структура, образованная цепью А (красный цвет) и цепью В (черный цвет). Аминокислотные остатки, составляющие гидрофобную бороздку на доступной растворителю поверхности в интерфейсе субъединиц, выделены серым (Trp15, Ile67, Trp113, Pro114, Pro117, Leu119, Phe157, Trp160, Ala258 и Trp262 обеих цепей).

Более поздние структурные исследования этого же фермента с различными лигандами [80] выявили дополнительные особенности молекулярного механизма, а именно катализ кетозо-3-эпимеразой раскрытия фуранозного и/или пиранозного кольца исходного сахарного остатка для прохождения последующей реакции эпимеризации. Исследователи предположили, что субстрат в кольцевой форме связывается с каталитическим центром фермента, в котором аминокислотные остатки или молекула воды действуют как кислотно-основной катализатор раскрытия кольца. Субстрат в форме фуранозного кольца приближается к гидрофобной бороздке димерного фермента, образованной остатками Trp15, Ser37, Ile67, Gly68, Trp113 и Ala258 (рис. 2а и 2в). Молекула воды в ней переносит протон от О3 к О6, способствуя раскрытию фуранозного кольца и смещая положение равновесия между линейной и кольцевой формами к линейной, после чего молекула сахара в линейной форме перемещается к активному центру (рис. 2а).

Ранее было показано, что ферменты D-тагато-3-эпимераза из *P. cichorii* и D-аллюлозо-3-эпимераза из *A. tumefaciens* имеют похожую организа-

цию активного центра белка (рис. 3). Ферменты представляют собой гомотетрамеры, каждая мономерная субъединица которых характеризуется α/β -бочкообразной структурой (TIM-barrel fold). Активный центр белка расположен в гидрофобной бороздке между двумя субъединицами тетрамера. Оба фермента металлозависимы и содержат в активном центре ион металла, который координируется четырьмя аминокислотными остатками (Glu152, Asp185, His211 и Glu246 в случае D-тагато-3-эпимеразы из *P. cichorii*; Glu150, Asp183, His209 и Glu244 в случае D-аллюлозо-3-эпимеразы из *A. tumefaciens*) [63, 79]. Еще три остатка (Glu158/156, His188/185 и Arg217/215) образуют водородные связи с молекулами воды вблизи сайта связывания металла.

Другие известные кетозо-3-эпимеразы демонстрируют 25–80% гомологии аминокислотных последовательностей между собой и обладают очень похожими трехмерными структурами. Остатки, расположенные в каталитических центрах и взаимодействующие с О1, О2 и О3 кетозы, строго консервативны, что указывает на один и тот же каталитический механизм. Однако хорошо заметно, что в структурах есть неконсервативные

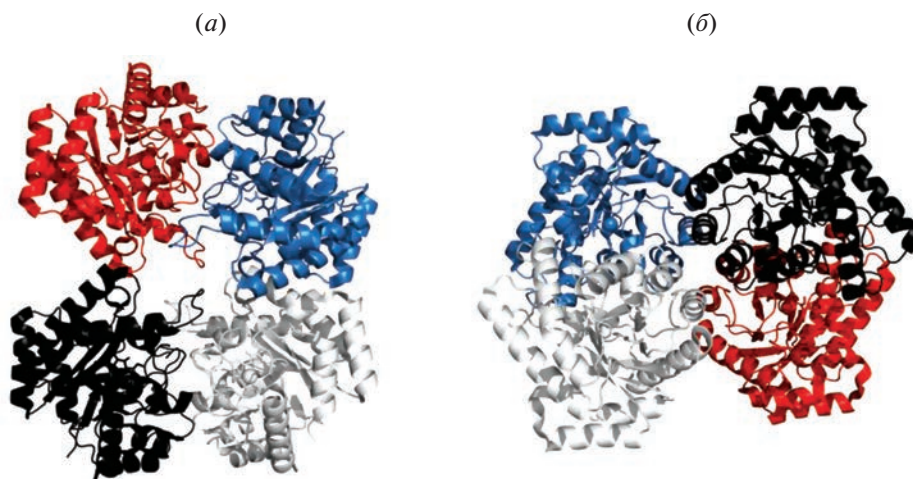


Рис. 3. Общий вид на тетрамерные структуры D-тагатозо-3-эпимераз: (а) – D-тагатозо-3-эпимераза из *P. cichorii* (PDB ID: 2qun); (б) – D-тагатозо-3-эпимераза из *A. tumefaciens* (PDB ID: 2hk1). Цепь А выделена красным цветом, цепь В – белым, цепь С – голубым, цепь D – черным.

аминокислотные остатки, образующие гидрофобную полость, которая охватывает О4, О5 и О6 кетозы, что и указывает на различную субстратную специфичность [81].

БИОИНЖЕНЕРИЯ КЕТОЗО-3-ЭПИМЕРАЗ

Как было показано ранее, большинство ферментов семейства кетозо-3-эпимераз отличается сравнительно низким диапазоном температурной стабильности, что наряду с относительно невысокими выходами целевого продукта препятствует широкому использованию нативных форм кетозо-3-эпимераз в промышленном производстве D-аллюлозы. В поисках решения этих проблем исследователи активно ищут модификации, которые, будучи введены в структуры ферментов, смогут привести к улучшению их термостабильности и каталитической активности. Условно такие изменения в структурах кетозо-3-эпимераз можно разделить на две группы по локализации вносимых замен: аминокислотные остатки, составляющие интерфейс, и остатки, находящиеся вблизи активного центра. К первой группе чаще всего относятся мутации, стабилизирующие структуру и повышающие термостабильность ферментов за счет образования новых водородных связей между отдельными субъединицами; ко второй – мутации, влияющие на каталитическую активность и аффинность к субстрату. Обобщенные данные об известных модификациях ряда кетозо-3-эпимераз приведены в табл. 2.

В 2013 г. Bosshart et al. предложили внесение замен аминокислотных остатков, расположенных в интерфейсе субъединиц мультимерных ферментов, для повышения их термостабильности [82]. В дальнейшем эта стратегия часто ис-

пользовалась для улучшения свойств ферментов семейства D-тагатозо-3-эпимераз. Bosshart et al. в работе 2015 г. применили к D-тагатозо-3-эпимеразе из *P. cichorii* метод итеративного насыщающего мутагенеза: 50 а.о. в радиусе 10 Å от С3-атома D-фруктозы были отобраны для дальнейшего скрининга и мутагенеза. Полученная мутантная форма продемонстрировала в 8.6 раз более высокую каталитическую активность. Однако такое улучшение сопровождалось ухудшением термостабильности фермента: снижение температуры, при которой происходит 50%-ное падение активности, составило 11.8°C. Соотношение k_{cat}/K_m осталось практически неизменным по сравнению с таковым у нативной формы фермента, т.к. вместе с ростом значения числа оборотов в секунду росло и значение K_m [83]. Zhang et al. в работе 2018 г. сконструировали мутантную форму F154Y/E191D/I193F фермента из *Dorea* sp. схожим методом, заменив остатки, находящиеся в интерфейсе субъединиц. За счет появления новых водородных связей и повышения стабильности структуры гидрофобной полости на поверхности субъединиц время полужизни фермента было увеличено в 5 раз, а температура плавления – на 17.5°C [84].

Другой рациональный подход к внесению замен – отбор вблизи каталитического центра неконсервативных аминокислотных остатков, потенциально участвующих в распознавании субстрата. Так, в D-аллюлозо-3-эпимеразе из *Clostridium bolteae* внесение замен Y68I/G109P позволило сократить расстояние между активным центром и D-фруктозой, а также способствовало формированию новой водородной связи, что значительно увеличило время полужизни фермента и его каталитическую активность. Отметим, что по отдельности замены обладали про-

Таблица 2. Мутантные формы ферментов семейства кетозо-3-эпимераз

Организм	Внесенные замены	$T_{\text{опт}}, ^\circ\text{C}$	pH _{опт}	$T_{\text{пл}}, ^\circ\text{C}$	$T_{1/2}, \text{мин}$	$K_m, \text{мМ}$	$k_{\text{cat}}, \text{мин}^{-1}$	k_{cat}/K_m	Соотношение равновесных концентраций	Относительная активность, %	Ссылка
<i>Staphylococcus aureus</i>	Дикий тип	70	8.0	67	120 (70°C)	н.д.	н.д.	н.д.	28.3 : 71.7 (60°C)	100	[57]
	V105A	70	8.0	н.д.	н.д.	37.8	3296	87.2	38.9 : 61.1 (60°C)	168	
	S209C	70	8.0	70	195 (70°C)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	[86]
	S188D/M190F	70	8.0	71.5	222 (70°C)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	
	S209C/S188D/M190F	70	8.0	74.2	274 (70°C)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	V105A/S209C/S188D/M190F	70	8.0	74.6	280 (70°C)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	[86]
	Дикий тип	50	8.0	60.5	62 (50°C)	44	4300	99	н.д.	100	
	I33L	52.5	8.0	64.8	202 (50°C)	42	4200	101	н.д.	н.д.	
	S213C	55	8.0	63.6	445 (50°C)	40	4200	105	н.д.	н.д.	
	I33L/S213C	57.5	8.0	68.1	1853 (50°C)	31	4100	134	н.д.	н.д.	
<i>Rhodospirella baltica</i>	Дикий тип	60	8.0	45.7	52.3 (60°C)	78.1	894.3	11.45	23.1 : 76.9	100	[54]
	L144F	60	8.0	58.3	102.7 (60°C)	72.1	1251.7	17.36	28.6 : 71.4	156	
	Дикий тип	70	6.0	56.64	36 (60°C)	н.д.	н.д.	н.д.	22.8 : 77.2	100	[84]
	F154Y/E191D/I193F	75	6.0	74.18	185.4 (60°C)	164.4–186.5	н.д.	134.2–172.1	29.6 : 70.4	98.3	
<i>Halanaerobium congolense</i>	Дикий тип	70	8.0	73	66 (70°C)	н.д.	н.д.	н.д.	33 : 67*	100	[43]
	Y7H/C66L/I108A	70	8.0	74.5	228 (70°C)	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	345	
	Y7H/C66L/I108A/R156C/K260C	70	8.0	79.5	312 (70°C)	н.д.	н.д.	н.д.	33 : 67*	н.д.	
<i>Clostridium botteae</i>	Дикий тип	55	7.0	61.1	156 (55°C)	59.8	3543	59.2	н.д.	100	[85]
	Y68I	60	7.0	60.3	122.8 (55°C)	46	3764	81.7	н.д.	153.8	
	G109P	60	7.0	66.7	327.4 (55°C)	86.1	2656	30.9	н.д.	72.8	
	Y68I/G109P	60	7.0	63.5	264 (55°C)	49.1	3620	73.7	н.д.	100	

Примечание: н.д. – нет данных.

* Время достижения плато для дикого типа составляет 5 ч, для мутантной формы Y7H/C66L/I108A/R156C/K260C – 3 ч.

тивоположным эффектом: активность мутантной формы Y68I составляла 168% от нативной, но и время ее полужизни в сравнении с диким типом уменьшалось почти в 1.3 раза; активность G109P составляла лишь ~73% от активности нативного фермента, а время полужизни возрастало более чем в 2 раза. Одновременное внесение этих замен позволило компенсировать нежелательные эффекты и получить мутантную форму, улучшенную по обоим показателям [85]. При проведении структурного анализа фермента из *Staphylococcus aureus* было установлено, что остаток V105 входит в группу остатков, составляющих гидрофобное окружение субстрата и отвечающих за его распознавание. Исследователи выбрали этот остаток в качестве стартовой точки для рационального редизайна белка. Одна из полученных мутантных форм, V105A, проявила каталитическую активность по отношению к D-фруктозе, превышающую активность фермента дикого типа на 68%. Далее были внесены группы замен S209C, S188D/M190F и S188D/M190F/S209C — все эти остатки располагаются у поверхности активного центра фермента. Внесение этих замен улучшило термостабильность фермента [57].

Некоторые исследователи скомбинировали два подхода, выбрав в качестве мишеней для мутаций остатки, как входящие в интерфейс (либо служащие повышению структурной стабильности иным образом), так и приближенные к активному центру. Zhu et al. внесли в D-аллюлозо-3-эпимеразу из *Halanaerobium congolense* одновременно две группы замен: Y7H/C66L/I108A — остатки, отвечающие за распознавание субстрата, и R156C/K260C — остатки, способные формировать дисульфидный мостик. Замены первой группы позволили увеличить активность фермента на 245%, а замены второй группы повысили время его полужизни в 5.7 раз по сравнению с диким типом (в ~1.7 раз в сравнении с мутантной формой Y7H/C66L/I108A) [43].

Кроме того, для изменения свойств кетозо-3-эпимераз были применены такие методы, как случайный мутагенез и анализ В-факторов. В 2020 г. Mao et al. выделили группу подвижных остатков с высоким значением В-фактора. Несмотря на то что многие полученные мутантные формы продемонстрировали более высокое время полужизни по сравнению с диким типом, прирост в каталитической активности большинства из них был достаточно скромным; форма L144F, однако, продемонстрировала улучшение и термостабильности, и активности фермента за счет увеличения интенсивности гидрофобных взаимодействий [54]. Choi et al. в результате случайного мутагенеза *A. tumefaciens* выявили мутантные формы S213C и I33L с повышенной термостабильностью. Этот эффект они объяснили увеличением количества водородных связей и появлением

стэкинг-взаимодействий в молекулярном окружении внесенных замен [86].

Известно, что в слабощелочной среде помехой производству D-аллюлозы могут служить побочные неферментативные реакции, продукты которых необходимо удалять по окончании процесса [36]. Однако в литературе мы не нашли задокументированных попыток изменить оптимальный pH для проведения реакций катализа ферментами данного семейства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то что промышленные производства D-аллюлозы уже существуют в разных странах, описано и используется немало ферментов для синтеза этого редкого сахара, вопросы по повышению эффективности этих производств, увеличению выходов, стабильности и каталитической активности кетозо-3-эпимераз по-прежнему остаются открытыми и требующими неординарных решений. С одной стороны, существующая детализированная информация о структуре и молекулярном механизме действия кетозо-3-эпимераз активно используется при попытках повысить термостабильность и каталитическую активность этих ферментов. С другой стороны, все еще не преодолена проблема высокой себестоимости ферментативного производства целевой D-аллюлозы, которую пытаются решать путем иммобилизации ферментов, использования микробных целлюлозных систем синтеза, а также дешевых источников доступных сахаров, подвергающихся эпимеризации. Расширение потенциала кетозо-3-эпимераз для производства D-аллюлозы на коммерческом уровне требует дополнительных усилий, касающихся как разработки методов конечной очистки целевого моносахарида, так и способов улучшения ферментов на молекулярном уровне. Для успешной модификации кетозо-3-эпимераз необходимо применение передовых научных методов на стыке биофизики, биохимии, молекулярной биологии, химии и генетики.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме “Функциональная и структурная организация сложных, мультикомпонентных систем и их динамика” (регистрационный номер 121060200127-6).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Karabinos J.V. // Adv. Carbohydr. Chem. 1952. V. 7. P. 99–136.
[https://doi.org/10.1016/s0096-5332\(08\)60083-1](https://doi.org/10.1016/s0096-5332(08)60083-1)
2. Oshima H., Kimura I., Izumori K. // Food Sci. Technol. Res. 2006. V. 12. P. 137–143.
<https://doi.org/10.3136/fstr.12.137>
3. Fukada K., Ishii T., Tanaka K., Yamaji M., Yamaoka Y., Kobashi K., Izumori K. // Bull. Chem. Soc. Jpn. 2010. V. 83. P. 1193–1197.
<https://doi.org/10.1246/bcsj.20100148>
4. O'Charoen S., Hayakawa S., Ogawa M. // Int. J. Food Sci. Technol. 2014. V. 50. P. 194–202.
<https://doi.org/10.1111/ijfs.12607>
5. Zhang W., Yu S., Zhang T., Jiang B., Mu W. // Trends Food Sci. Technol. 2016. V. 54. P. 127–137.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.06.004>
6. Mu W., Zhang W., Feng Y., Jiang B., Zhou L. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 94. P. 1461–1467.
<https://doi.org/10.1007/s00253-012-4093-1>
7. Nishii N., Nomizo T., Takashima S., Matsubara T., Tokuda M., Kitagawa H. // J. Vet. Med. Sci. 2016. V. 78. P. 1079–1083.
<https://doi.org/10.1292/jvms.15-0676>
8. Yagi K., Matsuo T. // J. Clin. Biochem. Nutr. 2009. V. 45. P. 271–277.
<https://doi.org/10.3164/jcbrn.08-191>
9. Harada M., Kondo E., Hayashi H., Suezawa C., Suguri S., Arai M. // Parasitol. Res. 2012. V. 110. P. 1565–1567.
<https://doi.org/10.1007/s00436-011-2660-5>
10. Chung M.-Y., Oh D.-K., Lee K.W. // J. Agric. Food Chem. 2012. V. 60. P. 863–869.
<https://doi.org/10.1021/jf204050w>
11. Muraoka K., Yu X., Cao W.M., Imachi H., Chen K., Muraoka T., Kitanaka N., Li J., Ahmed R.A.M., Matsumoto K., Nishiuchi T., Tokuda M., Ishida T. // Life Sci. 2007. V. 81. P. 592–599.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.06.019>
12. Iida T., Kishimoto Y., Yoshikawa Y., Hayashi N., Okuma K., Tohi M., Yagi K., Matsuo T., Izumori K. // J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo). 2008. V. 54. P. 511–514.
<https://doi.org/10.3177/jnsv.54.511>
13. Hayashi N., Iida T., Yamada T., Okuma K., Takehara I., Yamamoto T., Yamada K., Tokuda M. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2010. V. 74. P. 510–519.
<https://doi.org/10.1271/bbb.90707>
14. Hossain M.A., Kitagaki S., Nakano D., Nishiyama A., Funamoto Y., Matsunaga T., Tsukamoto I., Yamaguchi F., Kamitori K., Dong Y., Hirata Y., Muraoka K., Toyoda Y., Tokuda M. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011. V. 405. P. 7–12.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.12.091>
15. Baek S.H., Park S.J., Lee H.G. // J. Food Sci. 2010. V. 75. P. H49–H53.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01434.x>
16. Itoh K., Mizuno S., Hama S., Oshima W., Kawamata M., Hossain A., Ishihara Y., Tokuda M. // J. Food Sci. 2015. V. 80. P. H1619–H1626.
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.12908>
17. Chen J., Huang W., Jiang B. // FASEB J. 2017. V. 31. P. 798.1.
https://doi.org/10.1096/fasebj.31.1_supplement.798.1
18. Ochiai M., Onishi K., Yamada T., Iida T., Matsuo T. // Int. J. Food Sci. Nutr. 2014. V. 65. P. 245–250.
<https://doi.org/10.3109/09637486.2013.845653>
19. Iwasaki Y., Sendo M., Dezaki K., Hira T., Sato T., Nakata M., Goswami C., Aoki R., Arai T., Kumari P., Hayakawa M., Masuda C., Okada T., Hara H., Drucker D.J., Yamada Y., Tokuda M., Yada T. // Nat. Commun. 2018. V. 9. P. 113.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02488-y>
20. Matsuo T., Suzuki H., Hashiguchi M., Izumori K. // J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo). 2002. V. 48. P. 77–80.
<https://doi.org/10.3177/jnsv.48.77>
21. Matsuo T., Tanaka T., Hashiguchi M., Izumori K., Suzuki H. // Asia Pac. J. Clin. Nutr. 2003. V. 12. P. 225–231.
22. Iida T., Hayashi N., Yamada T., Yoshikawa Y., Miyazato S., Kishimoto Y., Okuma K., Tokuda M., Izumori K. // Metabolism. 2010. V. 59. P. 206–214.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.07.018>
23. Kimura T., Kanasaki A., Hayashi N., Yamada T., Iida T., Nagata Y., Okuma K. // Nutrition. 2017. V. 43–44. P. 16–20.
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.06.007>
24. Hofer S.J., Davinelli S., Bergmann M., Scapagnini G., Madeo F. // Front. Nutr. 2021. V. 8. P. 717343.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2021.717343>
25. Mooradian A.D., Smith M., Tokuda M. // Clin. Nutr. ESPEN. 2017. V. 18. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2017.01.004>
26. Lê K.A., Robin F., Roger O. // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 2016. V. 19. P. 310–315.
<https://doi.org/10.1097/mco.0000000000000288>
27. Bilik V., Tihlarik K. // Chem. Pap. 1973. V. 28. P. 106–109.
https://chempap.org/file_access.php?file=281a106.pdf
28. McDonald E.J. // Carbohydr. Res. 1967. V. 5. P. 106–108.
[https://doi.org/10.1016/0008-6215\(67\)85014-6](https://doi.org/10.1016/0008-6215(67)85014-6)
29. Doner L.W. // Carbohydr. Res. 1979. V. 70. P. 209–216.
[https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)87101-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)87101-3)
30. Kumar S., Sharma S., Kansal S.K., Elumalai S. // ACS Omega. 2020. V. 5. P. 2406–2418.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03918>
31. Izumori K., Khan A.R., Okaya H., Tsumura T. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1993. V. 57. P. 1037–1039.
<https://doi.org/10.1271/bbb.57.1037>
32. Itoh H., Okaya H., Khan A.R., Tajima S., Hayakawa S., Izumori K. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1994. V. 58. P. 2168–2171.
<https://doi.org/10.1271/bbb.58.2168>
33. Kim H.-J., Hyun E.-K., Kim Y.-S., Lee Y.-J., Oh D.-K. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 981–985.
<https://doi.org/10.1128/aem.72.2.981-985.2006>

34. Zhang L., Mu W., Jiang B., Zhang T. // *Biotechnol. Lett.* 2009. V. 31. P. 857–862.
<https://doi.org/10.1007/s10529-009-9942-3>
35. Uechi K., Takata G., Fukai Y., Yoshihara A., Morimoto K. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2013. V. 77. P. 511–515.
<https://doi.org/10.1271/bbb.120745>
36. Zhang W., Li H., Zhang T., Jiang B., Zhou L., Mu W. // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2015. V. 120. P. 68–74.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.05.018>
37. Mu W., Chu F., Xing Q., Yu S., Zhou L., Jiang B. // *J. Agric. Food Chem.* 2011. V. 59. P. 7785–7792.
<https://doi.org/10.1021/jf201356q>
38. Li C., Li L., Feng Z., Guan L., Lu F., Qin H.-M. // *Food Chem.* 2021. V. 357. P. 129746.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129746>
39. Zhu Z., Li C., Liu X., Gao D., Wang X., Tanokura M., Qin H.-M., Lu F. // *RSC Adv.* 2019. V. 9. P. 2919–2927.
<https://doi.org/10.1039/c8ra10029b>
40. Chen J., Chen D., Ke M., Ye S., Wang X., Zhang W., Mu W. // *Mol. Biotechnol.* 2021. V. 63. P. 534–543.
<https://doi.org/10.1007/s12033-021-00320-z>
41. Patel S.N., Kaushal G., Singh S.P. // *Microb. Cell Fact.* 2021. V. 20. P. 60.
<https://doi.org/10.1186/s12934-021-01550-1>
42. Patel S.N., Kaushal G., Singh S.P. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2020. V. 86. P. e02605-19.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02605-19>
43. Zhu Z., Li L., Zhang W., Li C., Mao S., Lu F., Qin H.-M. // *Enzyme Microb. Technol.* 2021. V. 149. P. 109850.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109850>
44. Mu W., Zhang W., Fang D., Zhou L., Jiang B., Zhang T. // *Biotechnol. Lett.* 2013. V. 35. P. 1481–1486.
<https://doi.org/10.1007/s10529-013-1230-6>
45. Park C.-S., Kim T., Hong S.-H., Shin K.-C., Kim K.-R., Oh D.-K. // *PLoS One.* 2016. V. 11. P. e0160044.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160044>
46. Tseng W.-C., Chen C.-N., Hsu C.-T., Lee H.-C., Fang H.-Y., Wang M.-J., Wu Y.-H., Fang T.-Y. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 112. P. 767–774.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.036>
47. Yoshihara A., Kozakai T., Shintani T., Matsutani R., Ohtani K., Iida T., Akimitsu K., Izumori K., Gullapalli P.K. // *J. Biosci. Bioeng.* 2017. V. 123. P. 170–176.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.09.004>
48. Li S., Chen Z., Zhang W., Guang C., Mu W. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 138. P. 536–545.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.112>
49. Jia M., Mu W., Chu F., Zhang X., Jiang B., Zhou L.L., Zhang T. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 98. P. 717–725.
<https://doi.org/10.1007/s00253-013-4924-8>
50. Zhang W., Fang D., Xing Q., Zhou L., Jiang B., Mu W. // *PLoS One.* 2013. V. 8. P. e62987.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062987>
51. Zhang W., Fang D., Zhang T., Zhou L., Jiang B., Mu W. // *J. Agric. Food Chem.* 2013. V. 61. P. 11468–11476.
<https://doi.org/10.1021/jf4035817>
52. Jia D.-X., Sun C.-Y., Jin Y.-T., Liu Z.-Q., Zheng Y.-G., Li M., Wang H.-Y., Chen D.-S. // *Enzyme Microb. Technol.* 2021. V. 148. P. 109816.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109816>
53. Yang J., Tian C., Zhang T., Ren C., Zhu Y., Zeng Y., Men Y., Sun Y., Ma Y. // *Biotechnol. Bioeng.* 2019. V. 116. P. 745–756.
<https://doi.org/10.1002/bit.26909>
54. Mao S., Cheng X., Zhu Z., Chen Y., Li C., Zhu M., Liu X., Lu F., Qin H.-M. // *Enzyme Microb. Technol.* 2020. V. 132. P. 109441.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109441>
55. Zhu Y., Men Y., Bai W., Li X., Zhang L., Sun Y., Ma Y. // *Biotechnol. Lett.* 2012. V. 34. P. 1901–1906.
<https://doi.org/10.1007/s10529-012-0986-4>
56. Oh D.-K., Kim N.-H., Kim H.-J., Park C.-S., Kim S.-W., Ko M., Park B., Jung M., Yoon K.-H. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 23. P. 559–563.
<https://doi.org/10.1007/s11274-006-9265-7>
57. Zhu Z., Gao D., Li C., Chen Y., Zhu M., Liu X., Tanokura M., Qin H.-M., Lu F. // *Microb. Cell Fact.* 2019. V. 18. P. 59.
<https://doi.org/10.1186/s12934-019-1107-z>
58. Zhang W., Zhang T., Jiang B., Mu W. // *J. Sci. Food Agric.* 2016. V. 96. P. 49–56.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.7187>
59. Patel S.N., Sharma M., Lata K., Singh U., Kumar V., Sangwan R.S., Singh S.P. // *Bioresour. Technol.* 2016. V. 216. P. 121–127.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.053>
60. Chan H.-C., Zhu Y., Hu Y., Ko T.-P., Huang C.-H., Ren F., Chen C.-C., Ma Y., Guo R.-T., Sun Y. // *Protein Cell.* 2012. V. 3. P. 123–131.
<https://doi.org/10.1007/s13238-012-2026-5>
61. Van Overtveldt S., Verhaeghe T., Joosten H.-J., van den Bergh T., Beerens K., Desmet T. // *Biotechnol. Adv.* 2015. V. 33. P. 1814–1828.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.10.010>
62. Uechi K., Sakuraba H., Yoshihara A., Morimoto K., Takata G. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2013. V. 69. P. 2330–2339.
<https://doi.org/10.1107/s0907444913021665>
63. Yoshida H., Yamada M., Nishitani T., Takada G., Izumori K., Kamitori S. // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 374. P. 443–453.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.09.033>
64. Kim K., Kim H.-J., Oh D.-K., Cha S.-S., Rhee S. // *J. Mol. Biol.* 2006. V. 361. P. 920–931.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.06.069>
65. Qi Z., Zhu Z., Wang J., Li S., Guo Q., Xu P., Lu F., Qin H.-M. // *Microb. Cell Fact.* 2017. V. 16. P. 193.
<https://doi.org/10.1186/s12934-017-0808-4>
66. Yoshida H., Yoshihara A., Gullapalli P.K., Ohtani K., Akimitsu K., Izumori K., Kamitori S. // *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* 2018. V. 74. P. 669–676.
<https://doi.org/10.1107/s2053230x18011706>
67. Carrell H.L., Glusker J.P., Burger V., Manfre E., Tritsch D., Biellmann J.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. P. 4440–4444.
<https://doi.org/10.1073/pnas.86.12.4440>
68. Carrell H.L., Hoier H., Glusker J.P. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 1994. V. 50. P. 113–123.
<https://doi.org/10.1107/s0907444993009345>
69. Collyer C.A., Henrick K., Blow D.M. // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 212. P. 211–235.
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90316-e](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90316-e)

70. Whitlow M., Howard A.J., Finzel B.C., Poulos T.L., Winborne E., Gilliland G.L. // *Proteins*. 1991. V. 9. P. 153–173.
<https://doi.org/10.1002/prot.340090302>
71. Fenn T.D., Ringe D., Petsko G.A. // *Biochemistry*. 2004. V. 43. P. 6464–6474.
<https://doi.org/10.1021/bi049812o>
72. Kovalevsky A.Y., Hanson L., Fisher S.Z., Mustyakimov M., Mason S.A., Forsyth V.T., Blakeley M.P., Keen D.A., Wagner T., Carrell H.L., Katz A.K., Glusker J.P., Langan P. // *Structure*. 2010. V. 18. P. 688–699.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2010.03.011>
73. Yoshida H., Yamaji M., Ishii T., Izumori K., Kamitori S. // *FEBS J.* 2010. V. 277. P. 1045–1057.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07548.x>
74. Yoshida H., Yoshihara A., Teraoka M., Terami Y., Takata G., Izumori K., Kamitori S. // *FEBS J.* 2014. V. 281. P. 3150–3164.
<https://doi.org/10.1111/febs.12850>
75. Yoshida H., Yoshihara A., Teraoka M., Yamashita S., Izumori K., Kamitori S. // *FEBS Open Bio*. 2012. V. 3. P. 35–40.
<https://doi.org/10.1016/j.fob.2012.11.008>
76. Munshi P., Snell E.H., van der Woerd M.J., Judge R.A., Myles D.A.A., Ren Z., Meilleur F. // *Acta Cryst. D Biol. Crystallogr.* 2014. V. 70. P. 414–420.
<https://doi.org/10.1107/s1399004713029684>
77. Langan P., Sangha A.K., Wymore T., Parks J.M., Yang Z.K., Hanson B.L., Fisher Z., Mason S.A., Blakeley M.P., Forsyth V.T., Glusker J.P., Carrell H.L., Smith J.C., Keen D.A., Graham D.E., Kovalevsky A. // *Structure*. 2014. V. 22. P. 1287–1300.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2014.07.002>
78. Terami Y., Yoshida H., Uechi K., Morimoto K., Takata G., Kamitori S. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 99. P. 6303–6313.
<https://doi.org/10.1007/s00253-015-6417-4>
79. Yoshida H., Yamada M., Nishitani T., Takada G., Izumori K., Kamitori S. // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2007. V. 63. P. 123–125.
<https://doi.org/10.1107/s1744309107001169>
80. Yoshida H., Yoshihara A., Ishii T., Izumori K., Kamitori S. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 100. P. 10403–10415.
<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7673-7>
81. Okada G., Hehre E.J. // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. P. 126–135.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)43100-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)43100-1)
82. Bosshart A., Panke S., Bechtold M. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2013. V. 52. P. 9673–9676.
<https://doi.org/10.1002/anie.201304141>
83. Bosshart A., Hee C.S., Bechtold M., Schirmer T., Panke S. // *Chembiochem*. 2015. V. 16. P. 592–601.
<https://doi.org/10.1002/cbic.201402620>
84. Zhang W., Zhang Y., Huang J., Chen Z., Zhang T., Guang C., Mu W. // *J. Agric. Food Chem.* 2018. V. 66. P. 5593–5601.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01200>
85. Zhang W., Jia M., Yu S., Zhang T., Zhou L., Jiang B., Mu W. // *J. Agric. Food Chem.* 2016. V. 64. P. 3386–3393.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01058>
86. Choi J.-G., Ju Y.-H., Yeom S.-J., Oh D.-K. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. P. 7316–7320.
<https://doi.org/10.1128/aem.05566-11>

Structural and Functional Features of Ketoso-3-Epimerases and Their Use in Production of D-Allulose

N. S. Ivanova*, A. A. Kulminskaya*, **, and S. V. Shvetsova*, **, ***, #

#E-mail: shvetsova_sv@pnpi.nrcki.ru

*Kurchatov Genomic Center – PNPI, mkr. Orlova Roshcha 1, Gatchina, 188300 Russia

**Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of NRC “Kurchatov Institute”, mkr. Orlova Roshcha 1, Gatchina, 188300 Russia

***Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, ul. Polytechnicheskaya 29, St. Petersburg, 195251 Russia

Rare sugars attract more and more attention as safe, low-calorie sweeteners and functional compounds in the food, pharmaceutical and medical industries. The potential of the rare sugar D-allulose has been proven in a large number of theoretical and applied works but the high cost of its production is a limitation factor for its large-scale production. Epimerization reactions of available sugars leading to the production of D-allulose are catalyzed by enzymes consisting the epimerase group, namely, ketose-3-epimerases. The key goals of ongoing studies on the ketose-3-epimerase family enzymes are focused on the exact mechanisms of their work, improvement of the enzymatic activity and stability in order to achieve high efficiency in the production of D-allulose. The present review summarizes the latest innovative developments in use of ketose-3-epimerases, as well as optimization of the enzymatic processes of D-allulose production. The structural features of the main enzymes used in the production of this rare sugar, variants of molecular modifications of biocatalysts and prospects for the practical use of the enzyme pathways discussed in this work are considered.

Keywords: rare sugars, D-allulose, D-fructose, D-ketose-3-epimerase, D-tagatose-3-epimerase, active site, structural features of enzymes