

УДК 579.24 + 579.66

Ю. Г. Максимова<sup>a,b</sup>, А. А. Гарина<sup>c</sup>, Д. М. Васильев<sup>a</sup>, А. Ю. Максимов<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

<sup>b</sup> Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

<sup>c</sup> Пермский национальный исследовательский технический университет, Пермь, Россия

## ОПТИМИЗАЦИЯ СРЕДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ АМИДАЗОСОДЕРЖАЩИХ БАКТЕРИЙ

Изучены ростовые характеристики грамотрицательных амидазосодержащих бактерий штаммов *Acinetobacter guillouiae* 11h, *Pseudomonas monteilii* 5, *Alcaligenes faecalis* 2 при культивировании на среде с различными концентрациями глюкозы, сахарозы, ацетамида и ацетата натрия в качестве источника углерода. Цель работы – оптимизация синтетической минеральной среды по источнику углерода. Определено, что наилучшим субстратом роста для проявления амидазной активности штаммов является ацетамид, причем по совокупности таких характеристик, как урожай биомассы, экономический коэффициент потребления субстрата и ферментативная активность; оптимальной концентрацией ацетамида для *A. guillouiae* 11h является 0.025 М, для *A. faecalis* 2 – 0.1М. Изучена динамика роста *A. faecalis* 2 на ацетамиде в различных концентрациях. Показано, что концентрация ацетамида 0.025 М была недостаточной для интенсивного роста бактерий, а 0.5 М – ингибирующей.

**Ключевые слова:** амидазная активность; урожай биомассы; экономический коэффициент потребления субстрата; культивирование.

Yu. G. Maksimova<sup>a,b</sup>, A. A. Garina<sup>c</sup>, D. M. Vasilyev<sup>a</sup>, A. Yu. Maksimov<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm, Russian Federation

<sup>b</sup> Perm State University, Perm, Russian Federation

<sup>c</sup> Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russian Federation

## OPTIMIZATION OF CULTURE MEDIA FOR AMIDASE CONTAINING BACTERIA

The growth characteristics of Gram-negative amidase containing bacteria of *Acinetobacter guillouiae* 11h, *Pseudomonas monteilii* 5, *Alcaligenes faecalis* 2 under cultivation in the medium with different concentrations of glucose, sucrose, acetamide and sodium acetate as a carbon were studied. The aim of the work was to optimize the synthetic mineral medium by the source of carbon. It has been determined that the best growth substrate for the manifestation of the amidase activity of the strains was acetamide. With a combination of characteristics such as the biomass yield, the economic coefficient of substrate consumption and enzymatic activity, the optimal acetamide concentration for *A. guillouiae* 11h was 0.025 M, for *A. faecalis* 2 – 0.1 M. The growth dynamics of *A. faecalis* 2 on acetamide in different concentrations was studied. It was shown that the 0.025 M acetamide was insufficient for intensive growth of bacteria, and 0.5 M was inhibitory.

**Key words:** amidase activity; biomass yield; economic coefficient of substrate consumption; cultivation.

Штаммы бактерий, клетки которых содержат амидазу (КФ 3.5.1.4.), могут быть использованы в качестве биокатализаторов процессов трансформации амидов в соответствующие карбоновые кислоты [Sharma, Sharma, Bhalla, 2009]. В промышленности амидазы вместе с нитрилгидратазами могут быть вовлечены в синтез коммерчески значимых органических кислот (акриловой, р-аминобензойной, пиразиновой, никотиновой) через биотрансформацию нитрилов [Banerjee, Sharma, Banerjee, 2002; Перцович и др., 2005]; изоникоти-

новой [Mehta et al., 2015], 2-хлороникотиновой [Jin et al., 2013], никотиновой [Cantarella et al., 2008], акриловой [Jebasingh et al., 2013] кислот напрямую из соответствующих амидов. Амидазы, проявляющие R-стереоспецифичность, могут являться биокатализатором для синтеза D-аминокислот и хиральных интермедиатов лекарственных средств [Zheng et al., 2014; Ruan et al., 2016]. С помощью S-селективных амидаз может быть осуществлено разделение рацемических смесей, например, рацемического 3-пиперидинкарбоксамиды с накоплени-

ем *R*-продукта [Nojiri, Taoka, Yasohara, 2014]. Ацилтрансферазная активность амидаз требуется главным образом для синтеза востребованных в фармацевтической промышленности гидроксамовых кислот [Fournand, Bigey, Arnaud, 1998; Bhatia et al., 2014].

Одним из путей получения больших количеств высокоактивной амидазы является клонирование и сверхэкспрессия гена этого фермента, как это было сделано для гена энантиоселективной амидазы из *Klebsiella oxytoca* КСТС 1686, клонированного в *Escherichia coli* [Guo et al., 2015], для трех амидаз семейства сигнатурных амидаз ("*signature amidase*") из *Delftia tsuruhatensis* ZJB-05174, гены которых были клонированы в *E. coli* JM109 [Wu, Zheng, Zheng, 2016], для гена амидазы *Parvibaculum lavamentivorans* ZJB14001, клонированного в *E. coli* BL21 [Wu, Zheng, Zheng, 2017], однако до сих пор наиболее распространенной остается традиционная технология скрининга природных источников с последующей селекцией активных штаммов микроорганизмов и подбором условий их выращивания. Для получения активного биокатализатора необходима разработка и оптимизация сред культивирования. В случае минеральной синтетической среды важен обоснованный выбор предпочтительных источников углерода и азота, при введении которых в среду будет получена максимально возможная биомасса с требуемой ферментативной активностью. Для *Alcaligenes denitrificans* – нитрилутилизующих бактерий с нитрилизационной активностью, оптимизированная среда культивирования включала 10 г/л ацетата аммония в качестве источника углерода и азота и кукурузный экстракт в качестве питательной добавки [Полтавская и др., 2004]. При промышленном производстве штамма-продуцента высокоактивной нитрилгидратазы *Rhodococcus rhodochrous* M33 двустадийная система культивирования на глюкозе и ацетате позволила получить биокатализатор с активностью свыше 5000 ед/мл [Дебабов, Яненко, 2011]. Бактериальные клетки с активной амидазой также являются перспективным биокатализатором, что обуславливает интерес к поиску новых штаммов и интенсификации процесса их выращивания.

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы явилась оптимизация по углеродному субстрату минеральной среды культивирования штаммов грамотрицательных бактерий, обладающих амидазной активностью.

## Материалы и методы исследования

Штаммы грамотрицательных бактерий *A. guillouiae* 11h, *P. monteilii* 5, *A. faecalis* 2, изолированные из активного ила биологических очистных сооружений г. Перми [Демаков и др., 2015], культивировали на жидкой минеральной среде, содержащей (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1.0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  – 1.6;  $\text{NaCl}$  – 0.5;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.5,  $\text{CaCl}_2$  – 0.005;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.01;

$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.01;  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  – 0.01, pH 7.2±0.2. Оптимизацию ростовой среды проводили по источнику углерода. В среду асептически добавляли один из источников углерода: глюкозу, сахарозу, ацетамид, ацетат натрия в концентрации 0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1 М. Ацетамид являлся также и источником азота, в остальных случаях таковым служил 0.01 М хлорид аммония.

Культивирование проводили в колбах Эрленмейера объемом 100 мл в 20 мл минеральной среды в течение 7 дней при температуре 25°C на шейкере со скоростью перемешивания 140 об/мин.

Биомассу центрифугировали 10 мин при 13 000 об/мин, высушивали до постоянного веса, взвешивали на аналитических весах и определяли урожай клеток, который выражали в мг АСБ/мл.

Реакцию трансформации 100 мМ раствора акриламида проводили в калий-фосфатном буфере (pH 7.2±0.2) в течение 1 ч при 25°C, реакцию оставляли добавлением концентрированной HCl до конечной концентрации 5%. Концентрацию акриловой кислоты в реакционной смеси определяли методом ВЭЖХ [Максимова и др., 2015]. Амидазную активность выражали в мкмоль/мг/мин.

Экономический коэффициент потребления субстрата рассчитывали по формуле:  $Y = X/C$ , где  $Y$  – экономический коэффициент,  $X$  – количество образовавшейся биомассы (масса сухих клеток в мг),  $C$  – количество потребленного субстрата в мг [Ждан-Пушкина, 1983].

Кривую роста *A. faecalis* 2 снимали на планшетном ридере Tecan Infinite M1000 (Tecan, Швейцария) при культивировании на жидкой минеральной среде с 0.025, 0.05, 0.1, 0.5 М ацетамидом в 24-луночном полистероловом планшете (Eppendorf) в течение 76 ч.

Статистическая обработка результатов выполнена с помощью пакета программ Microsoft Excel 2008. Результаты представлены как среднее значение не менее чем трех независимых экспериментов ± стандартная ошибка среднего ( $M \pm m$ ,  $n=3-4$ ).

## Результаты и их обсуждение

Рост *A. guillouiae* 11h и *A. faecalis* 2 наблюдали только на среде с ацетамидом и ацетатом натрия, на глюкозе и сахарозе данные штаммы не росли. Определены урожай, амидазная активность и экономический коэффициент потребления субстрата при росте *A. guillouiae* 11h и *A. faecalis* 2 на ацетамиде как наилучшем субстрате роста для этих штаммов (таблица). Показано, что наибольшая активность наблюдается у клеток *A. guillouiae* 11h, выращенных на 0.025 М ацетамиде (рис. 1) и у *A. faecalis* 2 на 0.1 М ацетамиде (рис. 2). При этом максимальный урожай был получен при росте *A. guillouiae* 11h и *A. faecalis* 2 на среде с 0.5 М ацетамидом. Однако экономический коэффициент потребления субстрата при росте на 0.5 М ацетамиде был невысок и составлял 13 и 22% для *A. guillouiae* 11h и *A. faecalis* 2 соответственно.

Нами была показана обратная зависимость между урожаем и амидазной активностью *A. guillouiae* 11h и *A. faecalis* 2, что может быть связано со снижением экспрессии оперона, кодирующего нитрилгидратазу и амидазу, в условиях активного роста. Эти данные согласуются с результатами, полученными при оптимизации среды культивирования амидазосодержащего штамма *Geobacillus subterraneus* RL-2a, когда при росте на сахарозе, крахмале, фруктозе, мальтозе, галактозе, маннитоле повышенный урожай биомассы сочетался со снижением амидазной активности, а арабиноза, ацетат и цитрат натрия в среде культивирования приводили к повышению амидазной активности штамма в сочетании с низким урожаем [Mehta et al., 2016].

*P. monteilii* 5 использовал как источник энергии простые сахара, ацетамид и ацетат натрия. Показано, что в данном случае оптимальным источником углерода являлась глюкоза в концентрации 0.025 М, при которой урожай и активность были сопоставимы, а экономический коэффициент наибольший (рис. 3). Только при росте *P. monteilii* 5 на 0.5 и 1 М ацетамиде наблюдали амидазную активность, на порядок и более превышающую такую при росте на глюкозе, но в данном случае экономический коэффициент потребления субстрата был очень мал (таблица).

Изучали динамику роста *A. faecalis* 2 на ацетамиде в различных концентрациях. Было показано, что 0.05 М ацетамид обеспечивал наибольший прирост биомассы с лаг-фазой, составляющей 10 ч, и длительной логарифмической фазой, наблюдавшейся до 50 ч роста, после чего происходило постепенное снижение оптической плотности (рис. 4). Скорость роста в лог-фазе составляла 0.019 ч<sup>-1</sup>. При росте на 0.1 М ацетамиде лог-фаза была более короткая – 10 ч со скоростью роста 0.033 ч<sup>-1</sup>. После 26 ч роста оптическая плотность медленно нарастала, при этом скорость роста составила 0.007

ч<sup>-1</sup>. Концентрация ацетамида 0.025 М была недостаточной для интенсивного роста бактерий, а 0.5 М – ингибирующей.

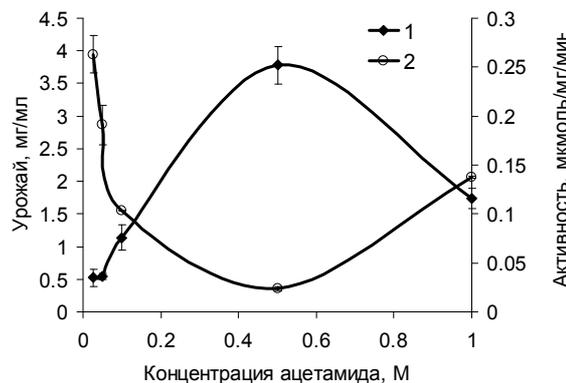


Рис. 1. Зависимость урожая биомассы (1) и амидазной активности (2) *A. guillouiae* 11h от концентрации ацетамида в среде культивирования

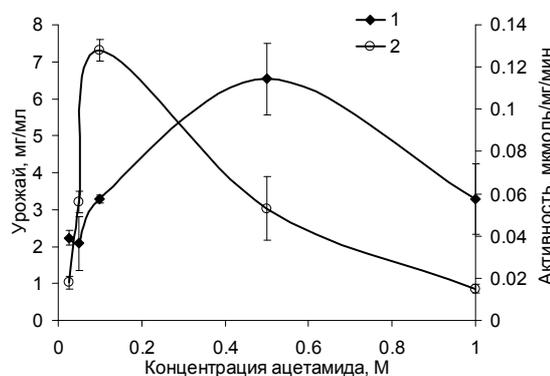


Рис. 2. Зависимость урожая биомассы (1) и амидазной активности (2) *A. faecalis* 2 от концентрации ацетамида в среде культивирования

**Ростовые характеристики и амидазная активность штаммов в зависимости от источника углерода в среде культивирования**

Источник углерода, М	Урожай, мг/мл	Экономический коэффициент потребления субстрата, %	Амидазная активность, мкмоль/мг/мин
<i>A. guillouiae</i> 11h, рост на ацетамиде			
0.025	0.52±0.13	38.3±15.9	0.263±0.019
0.050	0.54±0.05	19.0±3.1	0.191±0.020
0.100	1.14±0.19	20.5±5.8	0.103±0.000
0.500	3.78±0.29	13.1±1.2	0.024±0.002
1.000	1.74±0.15	2.9±0.4	0.138±0.001
<i>P. monteilii</i> 5, рост на глюкозе			
0.025	0.98±0.33	21.7±7.2	0.060±0.030
0.050	0.70±0.20	7.8±2.2	0.041±0.006
0.100	0.65±0.10	3.6±0.6	0.031±0.002
0.500	1.63±0.08	1.8±0.1	0.040±0.003
1.000	1.63±0.08	0.9±0.0	0.041±0.004

Окончание таблицы

Источник углерода, М	Урожай, мг/мл	Экономический коэффициент потребления субстрата, %	Амидазная активность, мкмоль/мг/мин
<i>P. monteilii</i> 5, рост на ацетамиде			
0.500	0.45±0.15	1.5±0.5	1.041±0.022
1.000	1.63±0.03	2.8±0.0	0.608±0.050
<i>A. faecalis</i> 2, рост на ацетамиде			
0.025	2.23±0.20	150.8±13.4	0.018±0.003
0.050	2.08±0.72	70.3±24.4	0.056±0.005
0.100	3.28±0.11	55.5±1.9	0.128±0.005
0.500	6.53±0.97	22.1±3.3	0.053±0.015
1.000	3.28±0.96	5.6±1.6	0.015±0.002

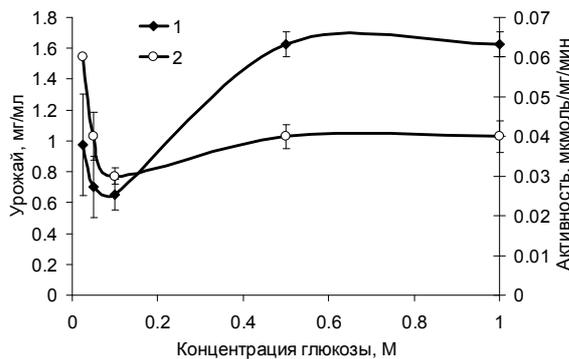


Рис. 3. Зависимость урожая биомассы (1) и амидазной активности (2) *P. monteilii* 5 от концентрации глюкозы в среде культивирования

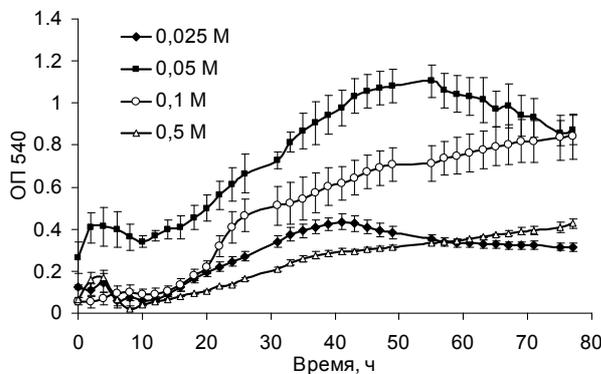


Рис. 4. Рост *A. faecalis* 2 на жидкой минеральной среде с ацетамидом

По данным научной литературы, амидазы могут быть как конститутивными [Egorova et al., 2004; Prasad, Sharma, Bhalla, 2005], так и индуцибельными ферментами [Sharma, Sharma, Bhalla, 2009], причем в качестве индукторов могут выступать акриламид, ацетамид, изобутирамид, кетопрофенамид, пропионамид и некоторые нитрилы. Нами было показано, что для проявления амидазной активности штаммов *A. faecalis* 2, *A. guillouiae* 11h и *P. monteilii* 5 необходимо присутствие ацетамида в ростовой среде, который является одновременно и субстратом роста, и индуктором. Данный факт подтверждает индуцибельный характер

амидазной активности изученных штаммов. По совокупности ростовых характеристик, включающих урожай, активность амидазы и экономический коэффициент потребления субстрата, оптимальной концентрацией ацетамида для *A. guillouiae* 11h является 0.025 М, для *A. faecalis* 2 – 0.1 М.

### Заключение

Таким образом, максимальная биомасса (2.08–6.53 мг/мл) была получена при росте *A. faecalis* 2 на 0.025–1 М ацетамиде, максимальная амидазная активность (0.6–1 мкмоль/мг/мин) при росте *P. monteilii* 5 на 0.5–1 М ацетамиде, наилучшие показатели экономического коэффициента (55.5–150.8%) при росте *A. faecalis* 2 на 0.025–0.1 М ацетамиде. По литературным данным, активность ациламидазы из *Rhodococcus erythropolis* TA37 по акриламиду составляла 0.35 мкмоль/мг/мин [Лавров и др., 2010], максимальная амидазная активность *G. subterraneus* RL-2a на оптимизированной среде – 0.6 мкмоль/мг/мин [Mehta et al., 2016], амидазная активность рекомбинантного штамма *E. coli* JM109 по акриламиду – 3.7 мкмоль/мг/мин [Wu, Zheng, Zheng, 2016]. Следовательно, изученные нами штаммы не уступают описанным аналогам и имеют перспективу использования как для биокаталитических целей, так и для целей биодеградации и очистки окружающей среды.

*A. guillouiae* и *A. faecalis* по российской классификации (СП 1.3.3118-13) не входят в группу опасных патогенов, но по европейской классификации (2000/54/EC) относятся к группе риска 2, что накладывает некоторые ограничения на практическое использование этих штаммов и требует в дальнейшем проведения тестов, доказывающих отсутствие у них вирулентности.

### Библиографический список

- Дебабов В.Г., Яненко А.С. Биокаталитический гидролиз нитрилов // Обзорный журнал по химии. 2011. Т. 1, № 4. С. 376–394.
- Демаков В.А. и др. Бактерии активного ила биологических очистных сооружений, трансформирующие цианопиридины и амиды пиридинкар-

- боновых кислот // Микробиология. 2015. Т. 84, № 3. С. 369–378.
- Ждан-Пушкина С.М. Основы роста культур микроорганизмов: учеб. пособие / под ред. В.П. Гончаровой. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1983. 188 с.
- Лавров К.В. и др. Новая ациламидаза из *Rhodococcus erythropolis* TA37, способная гидролизовать N-замещенные амиды // Биохимия. 2010. Т. 75, вып. 8. С. 1111–1119.
- Макимова Ю.Г. и др. Трансформация амидов адгезированными клетками родококков, обладающими амидазной активностью // Прикладная биохимия и микробиология. 2015. Т. 51, № 1. С. 53–58.
- Перцович С.И. и др. Алифатическая амидаза из *Rhodococcus rhodochrous* – представитель семейства нитрилаз/цианидгидратаз // Биохимия. 2005. Т. 70, № 11. С. 1556–1565.
- Полтавская С.В. и др. Разработка и внедрение биокаталитического способа получения акриловой кислоты. I. Выделение штамма *Alcaligenes denitrificans*, трансформирующего акрилонитрил в акрилат аммония. Оптимизация среды культивирования // Биотехнология. 2004. № 1. С. 62–70.
- Banerjee A., Sharma R., Banerjee U.C. The nitrile degrading enzymes: current status and future prospects // Applied Microbiology and Biotechnology. 2002. Vol. 60. P. 33–44.
- Bhatia R.K. et al. Biotransformation of nicotinamide to nicotinyl hydroxamic acid at bench scale by amidase acyl transfer activity of *Pseudomonas putida* BR-1 // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2014. Vol. 108. P. 89–95.
- Cantarella M. et al. Amidase-catalyzed production of nicotinic acid in batch and continuous stirred membrane reactors // Enzyme and Microbial Technology. 2008. Vol. 42. P. 222–229.
- Egorova K. et al. Purification and properties of an enantioselective and thermoactive amidase from the thermophilic actinomycete *Pseudonocardia thermophila* // Applied Microbiology and Biotechnology. 2004. Vol. 65. P. 38–45.
- Fournand D., Bigey F., Arnaud A. Acyl transfer activity of an amidase from *Rhodococcus* sp. strain R312: formation of a wide range of hydroxamic acids // Applied and Environmental Microbiology. 1998. Vol. 64. P. 2844–2852.
- Guo F.-M. et al. Soluble and functional expression of a recombinant enantioselective amidase from *Klebsiella oxytoca* KCTC 1686 in *Escherichia coli* and its biochemical characterization // Process Biochemistry. 2015. Vol. 50. P. 1264–1271.
- Jebasingh S.E.J. et al. Biodegradation of acrylamide and purification of acrylamidase from newly isolated bacterium *Moraxella osloensis* MSU11 // International Biodeterioration & Biodegradation. 2013. Vol. 85. P. 120–125.
- Jin L.-Q. et al. Efficient biocatalytic hydrolysis of 2-chloronicotinamide for production of 2-chloronicotinic acid by recombinant amidase // Catalysis Communications. 2013. Vol. 38. P. 6–9.
- Mehta P.K. et al. Thermostable amidase catalyzed production of isonicotinic acid from isonicotinamide // Process Biochemistry. 2015. Vol. 50. P. 1400–1404.
- Mehta P.K. et al. Enhanced production of thermostable amidase from *Geobacillus subterraneus* RL-2a MTCC 11502 via optimization of physicochemical parameters using Taguchi DOE methodology // 3 Biotech. 2016. Vol. 6. P. 66.
- Nojiri M., Taoka N., Yasohara Y. Characterization of an enantioselective amidase from *Cupriavidus* sp. KNK-J915 (FERM BP-10739) useful for enzymatic resolution of racemic 3-piperidinecarboxamide // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2014. Vol. 109. P. 136–142.
- Prasad S., Sharma D.R., Bhalla T.C. Nitrile- and amide hydrolysing activity in *Kluyveromyces thermotolerans* MGBY 37 // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2005. Vol. 21. P. 1447–1450.
- Ruan L.-T. et al. Purification and characterization of R-stereospecific amidase from *Brevibacterium epidermidis* ZJB-07021 // International Journal of Biological Macromolecules. 2016. Vol. 86. P. 893–900.
- Sharma M., Sharma N.N., Bhalla T.C. Amidases: versatile enzymes in nature // Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. 2009. Vol. 8. P. 343–366.
- Wu Z.-M., Zheng R.-C., Zheng Y.-G. Exploitation and characterization of three versatile amidase superfamily members from *Delftia tsuruhatensis* ZJB-05174 // Enzyme and Microbial Technology. 2016. Vol. 86. P. 93–102.
- Wu Z.-M., Zheng R.-C., Zheng Y.-G. Identification and characterization of a novel amidase signature family amidase from *Parvibaculum lavamentivorans* ZJB14001 // Protein Expression and Purification. 2017. Vol. 129. P. 60–68.
- Zheng R.-C. et al. Industrial production of chiral intermediate of cilastatin by nitrile hydratase and amidase catalyzed one-pot, two-step biotransformation // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2014. Vol. 102. P. 161–166.

## References

- Debabov V.G., Yanenko A.S. [Biocatalytic hydrolysis of nitriles]. *Obzornyy zhurnal po khimii*, V. 1, N 4 (2011): pp. 385–402. (In Russ.).
- Demakov V.A. et al. [Activated sludge bacteria transforming cyanopyridines and amides of pyridine-carboxylic acids]. *Microbiologiya*, V. 84, N 3 (2015): pp. 433–441. (In Russ.).
- Zhdan-Pushkina S.M. *Osnovy rosta kul'tur mikroorganizmov* [Fundamentals of the growth of cultures of microorganisms. Textbook]. Leningrad, Leningrad Universitet Publ., 1983, 188 p. (In Russ.).

- Lavrov K.V. et al. [A new acylamidase from *Rhodococcus erythropolis* TA37 can hydrolyze N-substituted amides]. *Biochimija*, V. 75, N 8 (2010): pp. 1006–1013. (In Russ.).
- Maksimova Yu.G. et al. [Transformation of amides by adherent rhodococcus cells possessing amidase activity]. *Prikladnaja biochimij i mikrobiologija*, V. 51, N 1 (2015): pp. 64–69. (In Russ.).
- Pertsovich S.I. et al. [Aliphatic amidase from *Rhodococcus rhodochromus* M8 is related to the nitrilase/cyanide hydratase family]. *Biochimija*, V. 70, N 11 (2005): pp. 1280–1287. (In Russ.).
- Poltavskaya S.V. et al. [Development and introduction of a biocatalytic process for the production of acrylic acid. I. Isolation of the strain of *Alcaligenes denitrificans*, transforming acrylonitrile into ammonium acrylate. Optimization of the culture medium]. *Biotechnologija*, N 1 (2004): pp. 62–70. (In Russ.).
- Banerjee A., Sharma R., Banerjee U.C. The nitrile degrading enzymes: current status and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, V. 60 (2002): pp. 33–44.
- Bhatia R.K. et al. Biotransformation of nicotinamide to nicotinyl hydroxamic acid at bench scale by amidase acyl transfer activity of *Pseudomonas putida* BR-1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, V. 108 (2014): pp. 89–95.
- Cantarella M. et al. Amidase-catalyzed production of nicotinic acid in batch and continuous stirred membrane reactors. *Enzyme and Microbial Technology*, V. 42 (2008): pp. 222–229.
- Egorova K. et al. Purification and properties of an enantioselective and thermoactive amidase from the thermophilic actinomycete *Pseudonocardia thermophila*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, V. 65 (2004): pp. 38–45.
- Fournand D., Bigey F., Arnaud A. Acyl transfer activity of an amidase from *Rhodococcus* sp. strain R312: formation of a wide range of hydroxamic acids. *Applied and Environmental Microbiology*, V. 64 (1998): pp. 2844–2852.
- Guo F.-M. et al. Soluble and functional expression of a recombinant enantioselective amidase from *Klebsiella oxytoca* KCTC 1686 in *Escherichia coli* and its biochemical characterization. *Process Biochemistry*, V. 50 (2015): pp. 1264–1271.
- Jebasingh S.E.J. et al. Biodegradation of acrylamide and purification of acrylamidase from newly isolated bacterium *Moraxella osloensis* MSU11. *International Biodeterioration & Biodegradation*, V. 85 (2013): pp. 120–125.
- Jin L.-Q. et al. Efficient biocatalytic hydrolysis of 2-chloronicotinamide for production of 2-chloronicotinic acid by recombinant amidase. *Catalysis Communications*, V. 38 (2013): pp. 6–9.
- Mehta P.K. et al. Thermostable amidase catalyzed production of isonicotinic acid from isonicotinamide. *Process Biochemistry*, V. 50 (2015): pp. 1400–1404.
- Mehta P.K. et al. Enhanced production of thermostable amidase from *Geobacillus subterraneus* RL-2a MTCC 11502 via optimization of physicochemical parameters using Taguchi DOE methodology. *3 Biotech.*, V. 6 (2016): pp. 66.
- Nojiri M., Taoka N., Yasohara Y. Characterization of an enantioselective amidase from *Cupriavidus* sp. KNK-J915 (FERM BP-10739) useful for enzymatic resolution of racemic 3-piperidinecarboxamide. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, V. 109 (2014): pp. 136–142.
- Prasad S., Sharma D.R., Bhalla T.C. Nitrile- and amide hydrolysing activity in *Kluyveromyces thermotolerans* MGBY 37. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, V. 21, (2005): pp. 1447–1450.
- Ruan L.-T. et al. Purification and characterization of R-stereospecific amidase from *Brevibacterium epidermidis* ZJB-07021. *International Journal of Biological Macromolecules*, V. 86 (2016): pp. 893–900.
- Sharma M., Sharma N.N., Bhalla T.C. Amidases: versatile enzymes in nature. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, V. 8 (2009): pp. 343–366.
- Wu Z.-M., Zheng R.-C., Zheng Y.-G. Exploitation and characterization of three versatile amidase superfamily members from *Delftia tsuruhatensis* ZJB-05174. *Enzyme and Microbial Technology*, V. 86 (2016): pp. 93–102.
- Wu Z.-M., Zheng R.-C., Zheng Y.-G. Identification and characterization of a novel amidase signature family amidase from *Parvibaculum lavamentivorans* ZJB14001. *Protein Expression and Purification*, V. 129 (2017): pp. 60–68.
- Zheng R.-C. et al. Industrial production of chiral intermediate of cilastatin by nitrile hydratase and amidase catalyzed one-pot, two-step biotransformation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, V. 102 (2014): pp. 161–166.

Поступила в редакцию 10.03.2017

#### Об авторах

Максимова Юлия Геннадьевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН

#### About the authors

Maksimova Yuliya Gennad'evna, doctor of biology, Leading Researcher of the Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS

доцент кафедры микробиологии и иммунологии  
ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»  
**ORCID:** 0000-0003-1870-1369  
614081, Пермь, ул. Голева, 13;  
maks@iegm.ru; (342)2124476

Гарина Анна Алексеевна, студентка  
ФГБОУВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет»  
**ORCID:** 0000-0002-6149-3641  
614990, Пермь, Комсомольский проспект, д. 29;  
annagarina@rambler.ru

Васильев Дмитрий Михайлович, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии  
ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН  
**ORCID:** 0000-0001-6990-9472  
614081, Пермь, ул. Голева, 13;  
vasilyevdim@mail.ru; (342)2124476

Максимов Александр Юрьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии  
ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН  
доцент кафедры микробиологии и иммунологии  
ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»  
**ORCID:** 0000-0003-2591-3351  
614081, Пермь, ул. Голева, 13; almaks1@mail.ru  
(342)2124476

associate professor of the Department of Microbiology and Immunology  
Perm State University  
**ORCID:** 0000-0003-1870-1369  
13, Golev str., Perm, Russia, 614081;  
maks@iegm.ru; (342)2124476

Garina Anna Alekseevna, student  
Perm National Research Polytechnic University  
**ORCID:** 0000-0002-6149-3641  
29, Komsomolsky av., Perm, Russia, 614990;  
annagarina@rambler.ru

Vasilyev Dmitryi Michailovich, candidate of biology, junior scientist of the laboratory of molecular microbiology and biotechnology  
Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS  
**ORCID:** 0000-0001-6990-9472  
13, Golev str., Perm, Russia, 614081;  
vasilyevdim@mail.ru; (342)2124476

Maksimov Aleksandr Yur'evich, candidate of biology, senior scientist of the laboratory of molecular microbiology and biotechnology  
Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS  
associate professor of the Department of Microbiology and Immunology  
Perm State University  
**ORCID:** 0000-0003-2591-3351  
13, Golev str., Perm, Russia, 614081;  
almaks1@mail.ru; (342)2124476