

Получение гетерологичных продуцентов рамнолипидов для промышленного производства высокоэффективного биосурфактанта

© 2024. М. Н. Барамзин, аспирант, м. н. с.,
С. Г. Литвинец, к. с.-х. н., проректор,
Е. А. Мартинсон, к. т. н., директор института,
Вятский государственный университет,
610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, д. 36,
e-mail: usr22995@vyatsu.ru

Рамнолипиды – перспективные гликолипидные биосурфактанты микробного происхождения, которые можно использовать в качестве препаратов для биоремедиации почв в случаях загрязнения нефтепродуктами. Экспрессия кластера генов биосинтеза рамнолипидов у основного продуцента – *Pseudomonas aeruginosa* – регулируется сигналами кворум-сенсинга (QS). Сложная регуляция биосинтеза не позволяет добиться высокого выхода продукта. Получение гетерологичных продуцентов рамнолипидов является перспективным путём по преодолению сложной QS-зависимой регуляции биосинтеза рамнолипидов, а также позволяет избежать применения условно-патогенной *Pseudomonas aeruginosa* для промышленного получения рамнолипидов. На основе плазмидного вектора pAl2-T с конструкцией из нативного промотора и генами rhlAB были получены гетерологичные продуценты на основе *Escherichia coli* BLWT с продуктивностью трансформанта E14 $3,40 \pm 0,96$ г/л; и на основе *Pseudomonas viridiflava* AIC1223 – с продуктивностью трансформантов P5, P6, P8 $332,00 \pm 0,10$, $200,00 \pm 0,10$ и $180,00 \pm 0,10$ г/л, соответственно. Наличие в экспрессирующем векторе генов rhlAB позволяет получить монорамнолипиды, пригодные для дальнейшего использования в качестве агента солиubilизации гидрофобных загрязняющих веществ, таких как нефтепродукты, в почвах, что позволит интенсифицировать процессы биоремедиации.

Ключевые слова: рамнолипиды, гетерологичная экспрессия, псевдомонады, биосурфактанты, нефтедеструкторы, гликолипиды.

Obtaining heterological rhamnolipid producers for industrial production of highly-effective biosurfactant

© 2024. М. Н. Baramzin ORCID: 0009-0001-2138-2445¹
S. G. Litvinets ORCID: 0000-0001-8583-5274² E. A. Martinson ORCID: 0000-0002-0364-4106³
Vyatka State University,
36, Moskovskaya St., Kirov, Russia, 610000,
e-mail: usr22995@vyatsu.ru

Rhamnolipids are promising microbial glycolipid biosurfactants that can be used as preparations for soil bioremediation in oil pollution. The expression of the rhamnolipid biosynthesis gene cluster in the main producer, *Pseudomonas aeruginosa*, is regulated by quorum sensing signals (QS). Complex biosynthesis regulation does not allow achieving high product yields. The production of heterologous rhamnolipid producers is a promising way to overcome the complex QS-dependent regulation of rhamnolipid biosynthesis, and also avoids the use of opportunistic *Pseudomonas aeruginosa* for the industrial production of rhamnolipids. Heterologous *Escherichia coli* BLWT-based producers with a transformant E14 productivity of 3.40 ± 0.96 g/L were obtained on the basis of the plasmid vector pAl2-T with a construct from the native promoter and rhlAB genes, and *Pseudomonas viridiflava* AIC1223-based ones with the productivity of transformants P5, P6, P8 332.00 ± 0.10 , 200.00 ± 0.10 and 180.00 ± 0.10 g/L, respectively. The presence of rhlAB genes in the expression vector allows the obtaining monorhamnolipids for further use as an agent for the solubilization of soil hydrophobic pollutant (e. g. petroleum products), which will intensify bioremediation processes.

Keywords: rhamnolipids, heterologous expression, pseudomonads, biosurfactants, oil degraders, glycolipids.

Для ликвидации антропогенного воздействия на природу активно используются поверхностно-активные вещества (ПАВ).

Они нашли своё применение как компоненты диспергентов, применяемых для устранения разливов нефти и нефтепродуктов, в составе

препаратов для увеличения нефтеотдачи и т. д. [1, 2].

При этом возрастает актуальность поиска и применения препаратов, которые, принимая участие в ликвидации антропогенного ущерба, сами не наносят вреда окружающей среде. В промышленности сформировался чёткий тренд на «зелёные технологии», что требует новых, природоподобных веществ и технологий [3, 4].

Среди природных ПАВ особого внимания заслуживает группа веществ, получивших название биосурфактанты – амфифильные вещества, обладающие поверхностно-активными свойствами и при этом являющиеся природными соединениями, способными к биоразложению аборигенной микрофлорой [5–7]. Наиболее интересными, с точки зрения коммерческого использования, являются моно- и дирамнолипиды, которые уже сейчас в ряде стран используются в технологиях повышения нефтеотдачи для извлечения нефти, оставшейся в пластах после первичных и вторичных процедур добычи [8].

Условная патогенность для человека и растений основных продуцентов моно- и дирамнолипидов – псевдомонад, в достаточной мере ограничивает их промышленное применение, потому необходимо получение методами генной инженерии гетерологичных продуцентов рамнолипидов на основе безопасных микроорганизмов [9]. Данные безопасные гетерологичные продуценты могут позволить также получать рамнолипиды с индивидуальной структурой, с уникальными физико-химическими свойствами; а также могут открыть доступ к использованию необычных субстратов в качестве источника углерода для получения рамнолипидов [9].

Таким образом, получение гетерологичных продуцентов рамнолипидов является актуальным и перспективным для получения в промышленных масштабах рамнолипида – биосурфактанта с высокой эффективностью, что позволит создать качественные, высокоэффективные микробные биопрепараты на основе гетерологичных продуцентов.

Целью данной работы является получение гетерологичных продуцентов рамнолипидов на основе штаммов *Escherichia coli* BLWT, *Pseudomonas viridiflava* A1C1223.

Для достижения цели были выполнены следующие задачи: вырезаны из геномной ДНК *Pseudomonas aeruginosa* В-6643 вместе с промотором гены *rhlAB*, получены бактерио-трансформанты по генам *rhlAB*, при помощи

ПЦР подтверждено наличие вставки, проверена функциональная активность гетерологичной вставки индикаторным тестом, подтверждена продукция рамнолипидов при помощи ИК-Фурье спектроскопии.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили:

1. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (ВКПМ В-6643) (из коллекции Национального биоресурсного центра Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия) с известной продуктивностью 43,3 г/л рамнолипидов.

2. *Escherichia coli* BLWT – генно-инженерный штамм (из коллекции кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», Киров, Россия).

3. *Pseudomonas viridiflava* A1C1223 (из коллекции кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», Киров, Россия).

Также для исследования использовали полученные в ходе работы трансформанты E1–E21 на основе штамма *E. coli* BLWT и P1–P12 на основе штамма *P. viridiflava* A1C1223.

Условия постановки экспериментов.

Штаммы *P. aeruginosa* ATCC 9027 (ВКПМ В-6643), *E. coli* BLWT выращивали и поддерживали на LB-агаре при 37 °С, *P. viridiflava* A1C1223 на глюкозо-пептонном агаре при 25 °С. Трансформанты E1–E21 выращивали на LB-бульоне (триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl 5 г/л) при 37 °С. Трансформанты P1–P12 выращивали и поддерживали на LB-бульоне при 25 °С. Все работы с микробными культурами проводились в асептических условиях.

Выделение ДНК из *P. aeruginosa* ATCC 9027 (ВКПМ В-6643) осуществляли методом лизиса клеток в буфере, содержащем 2% цетилтриметиламмоний бромид, 1,4 М NaCl, 50 мМ Tris-HCl, 20 мМ ЭДТА [10]. Лизат инкубировали при 65 °С 35 мин в твёрдотельном термостате «Гном» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). ДНК очищали дважды при помощи хлороформа от примесей, затем ДНК осаждали холодным этанолом в виде натриевой соли.

Рестриктию генов кластера рамнолипидов вместе с нативным промотором осуществляли при помощи эндонуклеаз [11]. Из препарата геномной ДНК при помощи рестриктазы Bgl II и последующего электрофореза в 0,8% агарозном геле выделили генный кластер

рамнолипидов *ghlAB* с нативным промотором, фрагмент длиной 3673 пар нуклеотидов [11].

Лигирование в *pAl2-T* вектор осуществляли по методике [12]. Фрагменты ДНК были выделены из агарозного геля и использованы в качестве вставки в вектор *pAl2-T* «Евроген» в соответствии с протоколом лигирования компании «Евроген», приложенным к комплекту вектора. Условия лигирования: в пробирке Эппендорф на 0,5 мл смешивали: Т4 ДНК-лигаза – 1 мкл; буфер для лигазы 10x – 1 мкл, стерильная вода – 7,3 мкл, продукт – 0,5 мкл, вектор *pAl2-T* – 1 мкл. Смесь инкубировали 16 часов при 4 °С [12].

Для трансформации бактериальных культур использовали ночные культуры *E. coli* BLWT и *P. viridiflava* A1C1223 на жидкой среде LB. Трансформацию осуществляли химическим способом с использованием 0,1 М раствора CaCl_2 [13]. Трансформированные клетки инкубировали 1 ч при 37 °С, высевали на агаризованную среду LB с 0,01% ампициллина. На следующие сутки проводили отбор содержащих вставку белых колоний, которые пересеивали в жидкую среду LB.

Проверку наличия вставки осуществляли при помощи локус-специфической ПЦР, электрофорез производили в 0,8% агарозном геле, гель окрашивали раствором бромистого этидия [14]. Использовали пару праймеров: F: 5'-ATGCGGCGCGAAAGTCTGTTGG-3', R: 5'-TCAGGACGCAGCCTTCAGCCATC-3', температура отжига 54 °С, длина продукта составляет 2234 пары нуклеотидов (п. н.). ДНК выделяли по прежней методике с буфером, содержащем 2% СТАВ [10].

Для детекции рамнолипида в культуральной жидкости потенциальных гетерологичных продуцентов использовали индикаторный метод с использованием раствора цетилтриметиламмоний бромид (СТАВ) 4% и метиленового синего. Рамнолипиды образуют интенсивно окрашенный осадок от ярко-голубого до синего цвета при реакции с компонентами смеси за сутки [15].

Для подтверждения наличия рамнолипидов в культуральной жидкости использовали ИК-Фурье спектроскопию. Производили снятие спектров на приборе марки SILAB i-Red 7800u-L (Beijing Beifen-Ruili Analytical Instrument (Group) Co., Ltd, Китай). Для подготовки проб производили трёхкратную экстракцию рамнолипидов этилацетатом из бесклеточной культуральной жидкости трансформантов [16]. Далее упаривали органическую фазу. Выполняли сушку осадка

в вакуумной сушилке LABCONCO (Labconco Corporation, США). Препарат для ИК-Фурье спектроскопии изготавливали в форме таблетки при помощи ручного пресса: 1,5 мг содержащей рамнолипиды просушенной смеси и 148,5 мг KBr [17].

Определение количества образуемого рамнолипида путём взвешивания осадка после выпаривания экстракта из культуральной жидкости осуществляли гравиметрически на прецизионных весах Adventurer OHAUS AR2140 (Ohaus, США).

Статистическая обработка данных. Массу экстрагированного рамнолипида после вакуумной сушки измеряли трижды. Вычисляли среднее значение и его стандартное отклонение. Рассчитывали по коэффициенту Стьюдента для сухой массы рамнолипида доверительный интервал при объёме выборки $n=3$ и значении доверительной вероятности: $P=0,95$.

Результаты и обсуждение

Результаты получения гетерологичных продуцентов рамнолипидов на основе штамма *E. coli* BLWT. Из лизата *P. aeruginosa* ATCC 9027 (ВКПМ В-6643) при помощи буфера с 2% цетилтриметиламмоний бромидом была выделена ДНК. При помощи рестриктазы *Bgl* II был получен фрагмент длиной 3673 п. н., содержащий промотор и гены *ghlAB* кластера биосинтеза рамнолипидов, который в дальнейшем был лигирован в плазмидный вектор *pAl2-T* и использован при кальциевой трансформации бактерий *E. coli* BLWT. Проведение бело-голубой селекции суточных колоний позволило отобрать колонии E1–E21, как потенциально имеющие гетерологичную вставку. Наличие вставки было подтверждено при помощи ПЦР с использованием пары праймеров к границам структурных генов рамнозилтрансферазы *ghlAB* с искомой длиной фрагмента: 2234 п. н. (рис. 1). Наличие вставки подтверждено у трансформанта E14.

Индикаторный тест на наличие целевых продуктов – рамнолипидов выявил наличие интенсивно окрашенного осадка с метиленовым синим и цетилтриметиламмоний бромидом у трансформанта E14 (рис. 2, см. цв. вкладку IV).

Количественная оценка синтезируемых трансформантом E14 рамнолипидов. Сухая масса экстракта составила $1,70 \pm 0,48$ мг. С учётом объёма изначальной пробы культуральной жидкости 0,5 мл, отобранной для дальнейшей

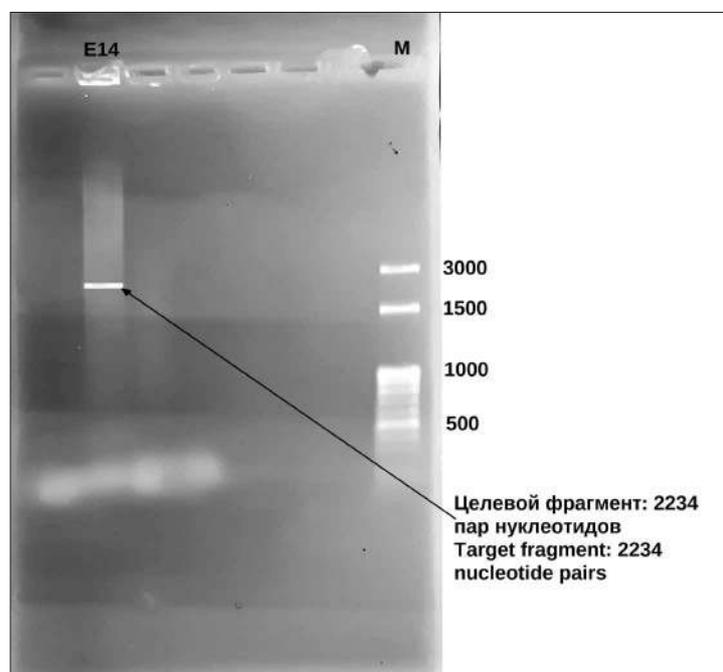


Рис. 1. Электрофореграмма результатов ПЦР на наличие вставки в виде структурных генов *rhlAB* у трансформанта E14
Fig. 1. Electrophoregram of PCR results for the presence of an insertion in the form of *rhlAB* structural genes in E14

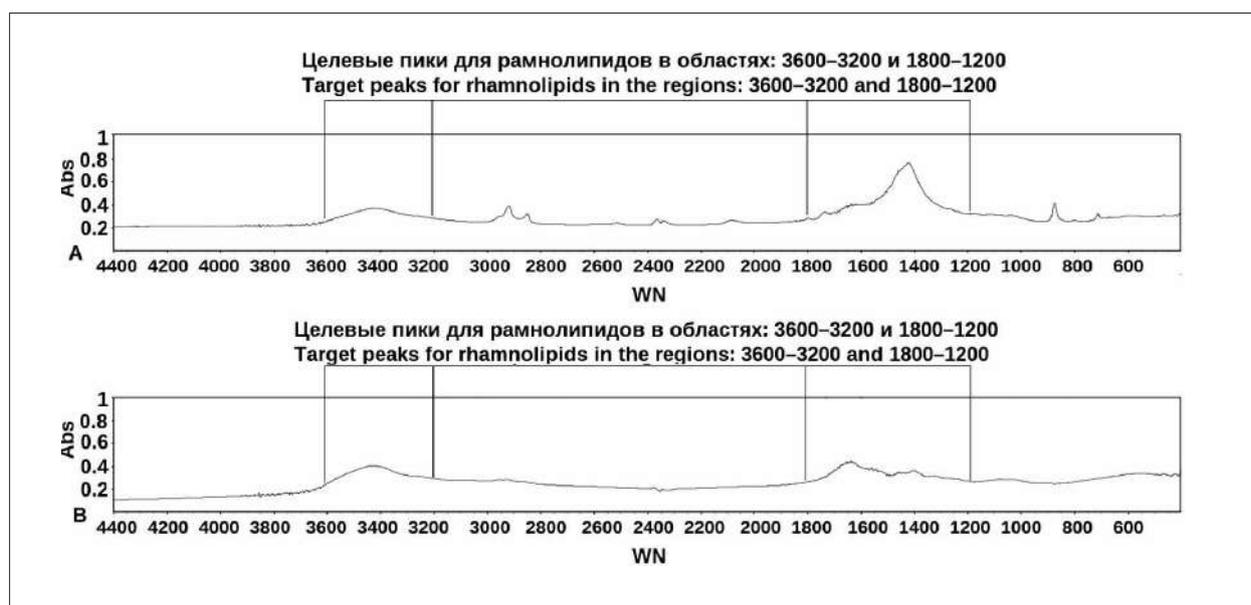


Рис. 3. Результаты ИК-Фурье спектроскопии экстрактов рамнолипидов:
 А – *P. aeruginosa* ATCC 9027 (ВКПМ В-6643), В – трансформант E14
Fig. 3. Results of FT-IR spectrometry of rhamnolipid extracts:
 А – *P. aeruginosa* ATCC 9027 (VKPM V-6643), В – transformant E14

экстракции, продуктивность трансформанта E14 составила $3,40 \pm 0,96$ г/л. Наличие рамнолипидов в экстракте было подтверждено методом ИК-Фурье спектроскопии, экстракт культуральной жидкости трансформанта E14 проявлял пики в областях $3600\text{--}3200$ и $1800\text{--}1200$ cm^{-1} (рис. 3), которые являются характерными для рамнолипидов [17].

Результаты получения гетерологичных продуцентов на основе штамма *P. viridiflava* A1C1223. Трансформация *P. viridiflava* A1C1223 плазмидным вектором pAl2-T, лигированным фрагментом длиной 3673 п. н., содержащим промотор и гены *rhlAB* кластера биосинтеза рамнолипидов, дала следующие результаты. По итогам бело-голубой селекции

М. Н. Барамзин, С. Г. Литвинец, Е. А. Мартинсон
«Получение гетерологичных продуцентов рамнолипидов
для промышленного производства высокоэффективного
биосурфактанта». С. 135.

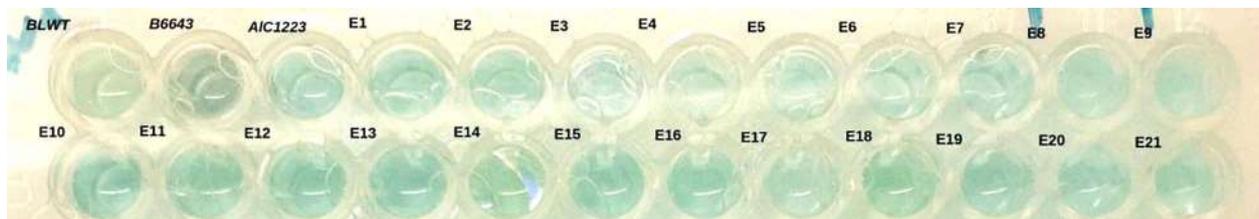


Рис. 2. Результаты индикаторного анализа наличия рамнолипидов в культуральной жидкости у исходных штаммов (обозначенных В-6643, BLWT, AIC1223) и трансформантов E1–E21 при помощи реактива со СТАВ и метиленовым синим. Положительная реакция у E14 и у *P. aeruginosa* ATCC 9027 (ВКПМ В-6643) в виде образования синего осадка

Fig. 2. Results of indicator analysis of the presence of rhamnolipids in the culture liquid of the strains used and E1–E21 using a reagent with STAB and methylene blue. A positive reaction in E14 and *P. aeruginosa* ATCC 9027 in the form of the formation of blue precipitate

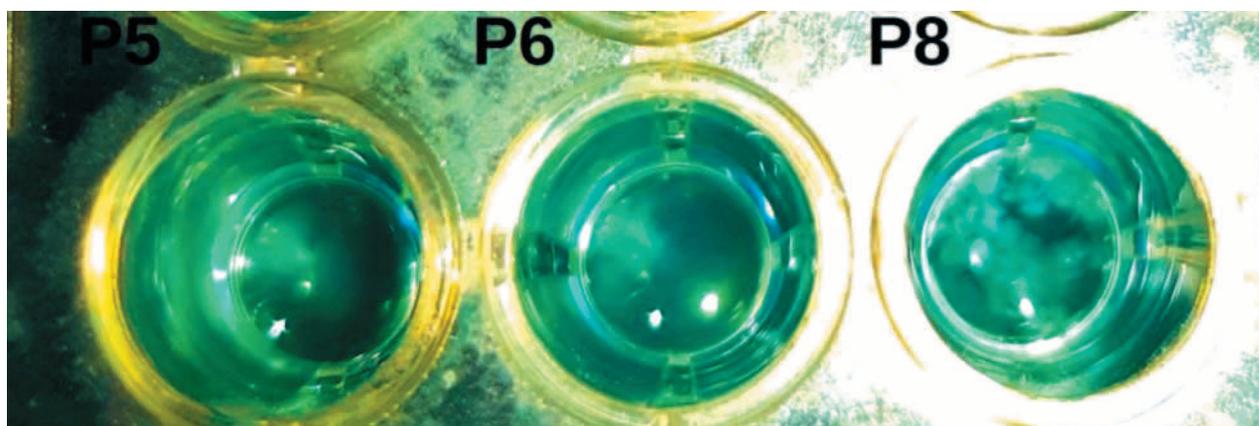


Рис. 5. Результаты индикаторного анализа наличия рамнолипидов в культуральной жидкости. Положительная реакция у трансформантов P5, P6, P8 в виде образования светло-синего осадка

Fig. 5. Results of indicator analysis of the presence of rhamnolipids in the culture fluid. Positive reaction in transformants P5, P6, P8 in the form of the formation of a light blue precipitate

были выбраны колонии P1–P12, как имеющие вставку, наличие вставки было подтверждено при помощи ПЦР с использованием пары праймеров к границам структурных генов рамнозилтрансферазы *rhIAB* с искомой длиной фрагмента у трансформантов P5, P6 и P8 (рис. 4).

В индикаторном тесте с метиленовым синим и цетилтриметиламмоний бромидом у трансформантов P5, P6 и P8 был подтверждён синтез целевых продуктов – рамнолипидов (рис. 5, см. цв. вкладку IV).

В результате гравиметрической оценки этилацетатных экстрактов культуральных жидкостей трансформантов P5, P6 и P8 сухая масса экстрактов составила $166,00 \pm 0,05$; $100,00 \pm 0,05$; $90,00 \pm 0,05$ мг соответственно. С учётом изначально отобранной для экстракции пробы 0,5 мл продуктивность трансформантов P5, P6 и P8 составляет, соответственно, $332,00 \pm 0,10$, $200,00 \pm 0,10$, $180,00 \pm 0,10$ г/л рамнолипидов. Методом ИК-Фурье спектроскопии по наличию характерных пиков в областях $3600\text{--}3200$ и $1800\text{--}1200$ cm^{-1} [17] подтверждено наличие рамнолипидов в полученных экстрактах (рис. 6).

Выводы

В результате проделанной работы был получен гетерологичный продуцент рамнолипидов трансформант E14 на основе генно-инженерного *E. coli* BLWT. Он обладает способностью к биосинтезу рамнолипидов, что подтверждается совпадениями в ИК-Фурье спектрах в характерных для рамнолипидов областях – $3600\text{--}3200$ cm^{-1} , $1800\text{--}1200$ cm^{-1} , экстрактов бесклеточных культуральных жидкостей исходного продуцента и полученного гетерологичного продуцента. Продуктивность трансформанта E14 составила $3,40 \pm 0,96$ г/л рамнолипида.

На основе штамма *P. viridiflava* AIC1223 по аналогичной методике были получены три гетерологичных продуцента рекомбинантных рамнолипидов трансформанты P5, P6, P8, у которых продуктивность составила, соответственно, $332,00 \pm 0,10$, $200,00 \pm 0,10$, $180,00 \pm 0,10$ г/л.

Существенная разница в продукции рамнолипидов у различных трансформантов может быть объяснена следующими причина-

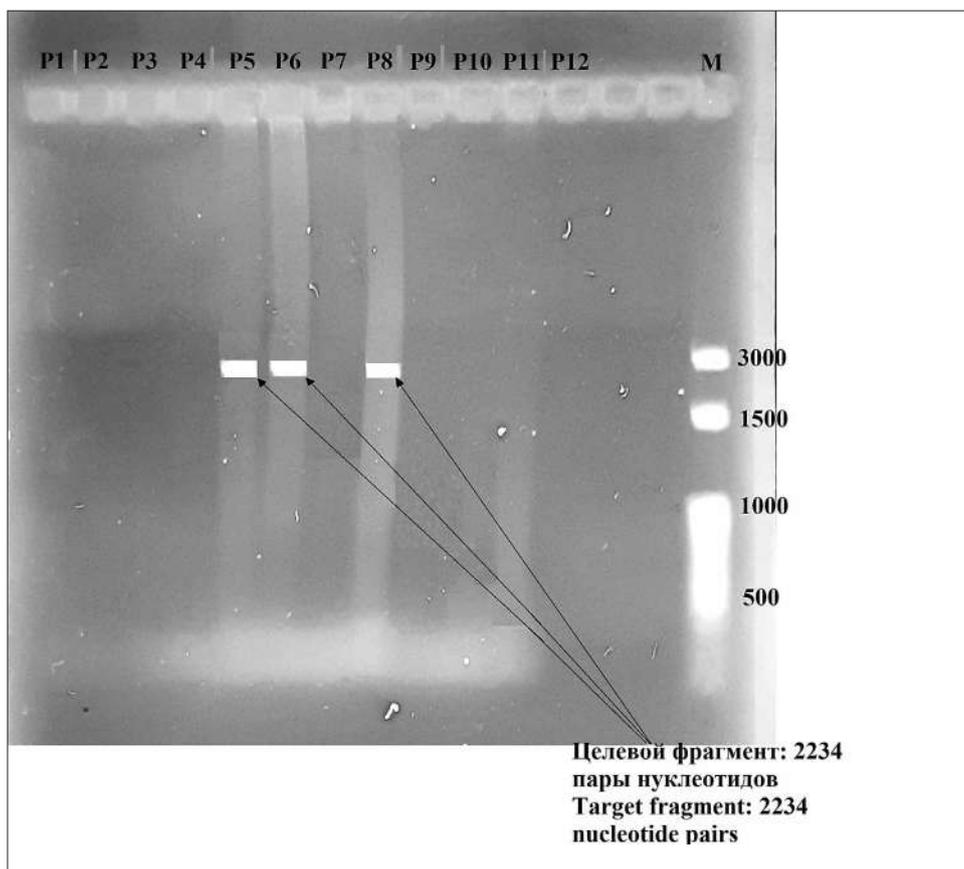


Рис. 4. Электрофореграмма результатов ПЦР на наличие вставки в виде структурных генов *rhIAB* у P1–P12. Целевой фрагмент подтверждён у трансформантов P5, P6, P8

Fig. 4. Electrophoregram of PCR results for the presence of an insert in the form of the *rhIAB* structural genes in P1–P12. P5, P6, P8 have the target fragment

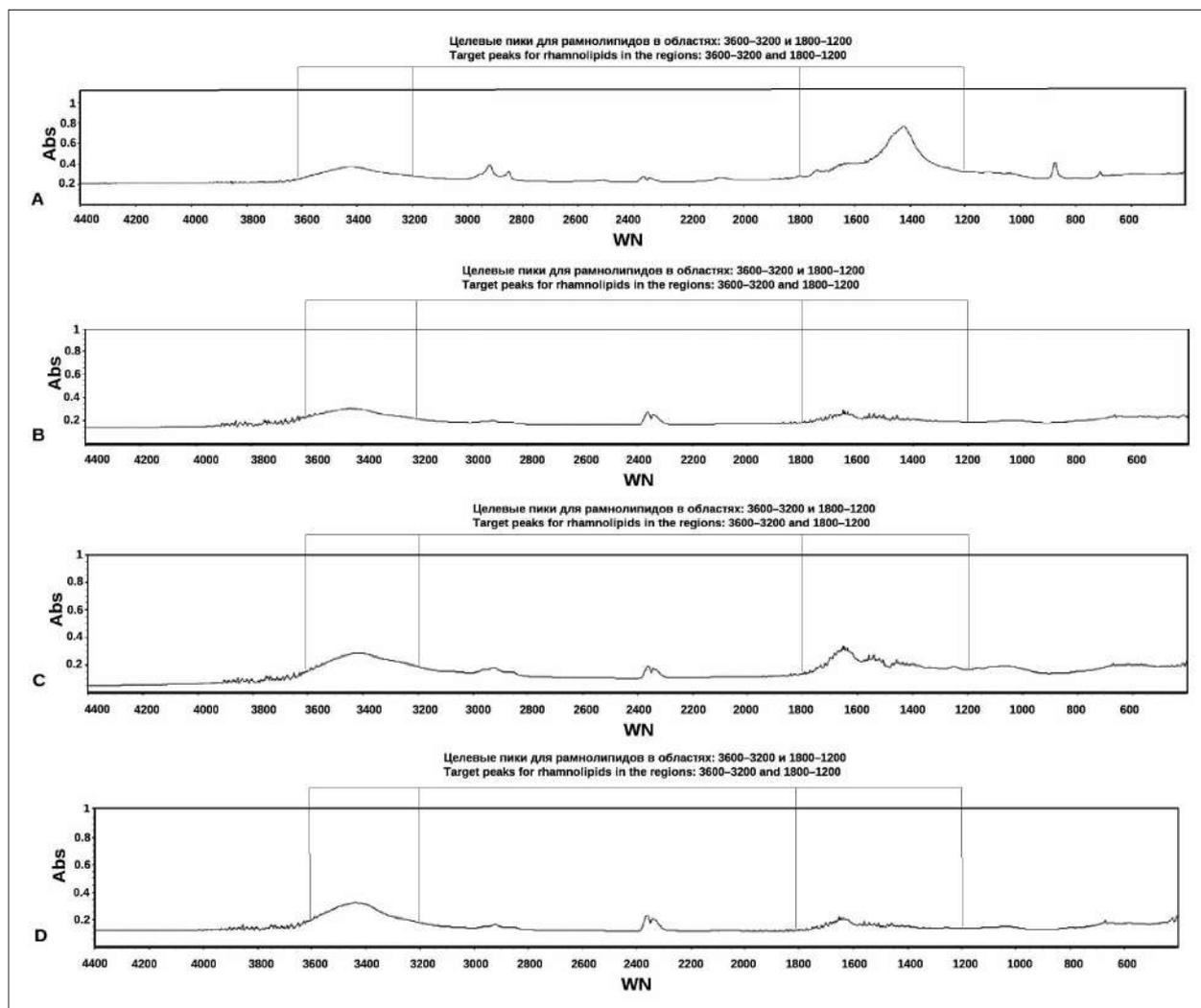


Рис. 6. Результаты ИК-Фурье спектрометрии экстрактов рамнолипидов:

A – *P. aeruginosa* ATCC 9027 (VKPM B-6643), B – трансформант P5,

C – трансформант P6, D – трансформант P8

Fig. 6. Results of FT-IR spectrometry of rhamnolipid extracts:

A – *P. aeruginosa* ATCC 9027 (VKPM V-6643), B – P5 transformant,

C – P6 transformant, D – P8 transformant

ми: бактерии *P. viridiflava* AIC1223 обладают большей генетической и метаболической близостью к основному продуценту, потому вставка в них работает эффективнее, чем в *E. coli* BLWT; разница в продуктивности у трансформантов P5, P6, P8 может быть объяснена тем, что при холодовом шоке в ходе трансформации могли возникнуть мутации, которые привели к различиям в уровнях активности вставки.

В дальнейшем для полученных трансформантов будут оптимизированы условия культивирования с целью получения максимальных выходов целевого продукта. Рамнолипиды и их продуценты станут основой технологии производства биопрепарата для ремедиации загрязнённых нефтепродуктами природных объектов.

Литература

1. Asadov Z.H., Huseynova K.A., Rahimov R.A., Ahmadova G.A., Zubkov F.I. Alkyl chain and head-group effect of mono- and diisopropylolalkylamine-polymethacrylic acid complexes in aqueous solution // J. Mol. Liq. 2017. V. 244. P. 533–539. doi: 10.1016/j.molliq.2017.09.042
2. Ren Z., Fu L., Chen W., Qiu X., Chen L., Liao K., Wei M., Shao M. Emulsions synergistic-stabilized by a hydroxyl sulfobetaine surfactant and SiO₂ nanoparticles and their potential application for enhanced oil recovery // RSC Adv. 2023. V. 13. No. 36. P. 25518–25528. doi: 10.1039/d3ra03427e
3. Giwa A., Chalermthai B., Shaikh B., Taher H. Green dispersants for oil spill response: A comprehensive review of recent advances // Mar. Pollut. Bull. 2023. V. 193. Article No. 115118. doi: 10.1016/j.marpolbul.2023.115118

4. Lv Y., Sun S., Chen X. Enhanced environment friendly surfactant production by the glycerolysis of castor oil using amino acid ionic liquid as a catalyst // *Ind. Crops Prod.* 2021. V. 170. Article No. 113680. doi: 10.1016/j.indcrop.2021.113680

5. Banat I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review // *Bioresour. Technol.* 1995. V. 51. No. 1. P. 1–12. doi: 10.1016/0960-8524(94)00101-6

6. Sarubbo L.A., Silva M. da G.C., Durval I.J.B., Bezerra K.G.O., Ribeiro B.G., Silva I.A., Twigg M., Banat I.M. Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives // *Biochem. Eng. J.* 2022. V. 181. Article No. 108377. doi: 10.1016/j.bej.2022.108377

7. Mulligan C.N. Environmental applications for biosurfactants // *Environ. Pollut.* 2005. V. 133. No. 2. P. 183–198. doi: 10.1016/j.envpol.2004.06.009

8. Banat I.M., Makkar R.S., Cameotra S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000. V. 53. No. 5. P. 495–508. doi: 10.1007/s002530051648

9. Wittgens A., Rosenau F. Heterologous rhamnolipid biosynthesis: advantages, challenges, and the opportunity to produce tailor-made rhamnolipids // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. V. 8. No. 1. Article No. 594010. doi: 10.3389/fbioe.2020.594010

10. Schenk J.J., Becklund L.E., Carey S.J., Fabre P.P. What is the “modified” CTAB protocol? Characterizing modifications to the CTAB DNA extraction protocol // *Appl. Plant. Sci.* 2023. V. 11. No. 3. Article No. e11517. doi: 10.1002/aps3.11517

11. Yan P., Zeng Y., Shen W., Tuo D., Li X., Zhou P. Nimble cloning: a simple, versatile, and efficient system for standardized molecular cloning // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. V. 7. No. 1. Article No. 460. doi: 10.3389/fbioe.2019.00460

12. Evrogen. Основные свойства pAL2-T вектора [Электронный ресурс] <https://evrogen.ru/kit-user-manuals/pAL2-T.pdf> (Дата обращения: 16.02.2024).

13. Mandel M., Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection // *J. Mol. Biol.* 1970. V. 53. No. 1. P. 159–162. doi: 10.1016/0022-2836(70)90051-3

14. Garibyan L., Avashia N. Polymerase chain reaction // *J. Invest. Dermatol.* 2013. V. 133. No. 3. P. 1–4. doi: 10.1038/jid.2013.1

15. Eslami P., Hajfarajollah H., Bazsefidpar S. Recent advancements in the production of rhamnolipid biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* // *RSC Adv.* 2020. V. 10. No. 56. P. 34014–34032. doi: 10.1039/d0ra04953

16. Ramya Devi K.C., Sundaram R.L., Vajiravelu S., Vasudevan V., Gnanambal M.E.K. Structure elucidation and proposed *de novo* synthesis of an unusual mono-rhamnolipid by *Pseudomonas guguanensis* from Chennai Port area // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. No. 1. Article No. 5992. doi: 10.1038/s41598-019-42045-9

17. Leitermann F., Syldatk C., Hausmann R. Fast quantitative determination of microbial rhamnolipids from cultivation broths by ATR-FTIR Spectroscopy // *J. Biol. Eng.* 2008. V. 2. Article No. 13. doi: 10.1186/1754-1611-2-13

References

1. Asadov Z.H., Huseynova K.A., Rahimov R.A., Ahmadova G.A., Zubkov F.I. Alkyl chain and head-group effect of mono- and diisopropylolalkylamine-polymethacrylic acid complexes in aqueous solution // *J. Mol. Liq.* 2017. V. 244. P. 533–539. doi: 10.1016/j.molliq.2017.09.042

2. Ren Z., Fu L., Chen W., Qiu X., Chen L., Liao K., Wei M., Shao M. Emulsions synergistic-stabilized by a hydroxyl sulfobetaine surfactant and SiO₂ nanoparticles and their potential application for enhanced oil recovery // *RSC Adv.* 2023. V. 13. No. 36. P. 25518–25528. doi: 10.1039/d3ra03427e

3. Giwa A., Chalermthai B., Shaikh B., Taher H. Green dispersants for oil spill response: A comprehensive review of recent advances // *Mar. Pollut. Bull.* 2023. V. 193. Article No. 115118. doi: 10.1016/j.marpolbul.2023.115118

4. Lv Y., Sun S., Chen X. Enhanced environment friendly surfactant production by the glycerolysis of castor oil using amino acid ionic liquid as a catalyst // *Ind. Crops Prod.* 2021. V. 170. Article No. 113680. doi: 10.1016/j.indcrop.2021.113680

5. Banat I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review // *Bioresour. Technol.* 1995. V. 51. No. 1. P. 1–12. doi: 10.1016/0960-8524(94)00101-6

6. Sarubbo L.A., Silva M. da G.C., Durval I.J.B., Bezerra K.G.O., Ribeiro B.G., Silva I.A., Twigg M., Banat I.M. Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives // *Biochem. Eng. J.* 2022. V. 181. Article No. 108377. doi: 10.1016/j.bej.2022.108377

7. Mulligan C.N. Environmental applications for biosurfactants // *Environ. Pollut.* 2005. V. 133. No. 2. P. 183–198. doi: 10.1016/j.envpol.2004.06.009

8. Banat I.M., Makkar R.S., Cameotra S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000. V. 53. No. 5. P. 495–508. doi: 10.1007/s002530051648

9. Wittgens A., Rosenau F. Heterologous rhamnolipid biosynthesis: advantages, challenges, and the opportunity to produce tailor-made rhamnolipids // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. V. 8. No. 1. Article No. 594010. doi: 10.3389/fbioe.2020.594010

10. Schenk J.J., Becklund L.E., Carey S.J., Fabre P.P. What is the “modified” CTAB protocol? Characterizing modifications to the CTAB DNA extraction protocol // *Appl. Plant. Sci.* 2023. V. 11. No. 3. Article No. e11517. doi: 10.1002/aps3.11517

11. Yan P., Zeng Y., Shen W., Tuo D., Li X., Zhou P. Nimble cloning: a simple, versatile, and efficient system for standardized molecular cloning // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. V. 7. No. 1. Article No. 460. doi: 10.3389/fbioe.2019.00460
12. Evrogen. Basic properties of the pAL2-T vector [Internet resource] <https://evrogen.ru/kit-user-manuals/pAL2-T.pdf> (Accessed: 16.02.2024).
13. Mandel M., Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection // *J. Mol. Biol.* 1970. V. 53. No. 1. P. 159–162. doi: 10.1016/0022-2836(70)90051-3
14. Garibyan L., Avashia N. Polymerase chain reaction // *J. Invest. Dermatol.* 2013. V. 133. No. 3. P. 1–4. doi: 10.1038/jid.2013.1
15. Eslami P., Hajfarajollah H., Bazsefidpar S. Recent advancements in the production of rhamnolipid biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* // *RSC Adv.* 2020. V. 10. No. 56. P. 34014–34032. doi: 10.1039/d0ra04953
16. Ramya Devi K.C., Sundaram R.L., Vajiravelu S., Vasudevan V., Gnanambal M.E.K. Structure elucidation and proposed *de novo* synthesis of an unusual mono-rhamnolipid by *Pseudomonas guguanensis* from Chennai Port area // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. No. 1. Article No. 5992. doi: 10.1038/s41598-019-42045-9
17. Leitermann F., Sylatk C., Hausmann R. Fast quantitative determination of microbial rhamnolipids from cultivation broths by ATR-FTIR Spectroscopy // *J. Biol. Eng.* 2008. V. 2. Article No. 13. doi: 10.1186/1754-1611-2-13