

Получение гетерологичных продуцентов рамнолипидов на основе *Acetobacter aceti* AIC1824

© 2025. М. Н. Барамзин, аспирант, м. н. с.,

С. Г. Литвинец, к. с-х. н., проректор,

Вятский государственный университет,

610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, д. 36,

e-mail: usr22995@vyatsu.ru

Рамнолипиды солюбилизируют нефтяные загрязнения почв, делая их более доступными для разложения почвенными микроорганизмами. В отличие от химических поверхностно-активных веществ, рамнолипиды безопасны для окружающей среды. Целью данной работы является получение гетерологичных продуцентов рамнолипидов на основе *Acetobacter aceti* AIC1824 с использованием искусственного промотора и оптимизация условий культивирования продуцента. Данный путь позволит избежать использования в качестве продуцента рамнолипидов условно-патогенного вида *Pseudomonas aeruginosa*, который может быть применён для биоремедиации почв. Кластер генов *rhlAB* амплифицировали из генома *Pseudomonas aeruginosa* B-6643 путём полимеразной цепной реакции. В p-ALT2 вектор встроили конструкцию, состоящую из кластера генов *rhlAB* и искусственного промотора. Путём кальциевой трансформации вставку ввели в клетки *Acetobacter aceti* AIC1824. С помощью колориметрической системы отбора рекомбинантных клонов – бело-голубой селекции отобрали 20 трансформантов. Обнаружили целевую вставку при помощи полимеразной цепной реакции у 7 трансформантов. В ходе индикаторного теста характерный осадок обнаружен у двух трансформантов: A4 и A8. Установлены подходящие для культивирования трансформантов источники азота (пептон) и углерода (маннитол). Определён ряд параметров: оптимальное значение кислотности среды – pH 5, оптимальное значение температуры культивирования у трансформанта A4 – 30 °C, у трансформанта A8 – 25 °C. Количество образуемых в оптимальных условиях рамнолипидов составило для A4 – 139,3±20,1 мг/мл, для A8 – 13,0±1,0 мг/мл. Экспериментально показана высокая отмывающая способность в отношении сырой нефти рамнолипидов гетерологичных продуцентов: A4 – 93,9±1,5% и A8 – 96,7±1,5%.

Ключевые слова: рамнолипиды, гетерологичная экспрессия, биосурфактанты, оптимизация продуктивности, ацетобактерии, псевдомонады.

Heterologous rhamnolipid producers based on *Acetobacter aceti* AIC1824 obtaining

© 2025. M. N. Baramzin ORCID: 0009-0001-2138-2445, S. G. Litvinets ORCID: 0000-0001-8583-5274

Vyatka State University,

36, Moskovskaya St., Kirov, Russia, 610000,

e-mail: usr22995@vyatsu.ru

Rhamnolipids solubilize oil contaminants in soils, making them more accessible for decomposition by soil microorganisms. Unlike chemical surfactants, rhamnolipids are environmentally friendly. The aim of this work is to obtain heterologous rhamnolipid producers based on *Acetobacter aceti* AIC1824 using an artificial promoter and optimize the producer cultivation conditions. This approach will avoid the use of highly effective biosurfactants of the opportunistic *Pseudomonas aeruginosa* species as a rhamnolipid producer, which can be used for soil bioremediation. The *rhlAB* gene cluster was amplified from the *Pseudomonas aeruginosa* B-6643 genome by polymerase chain reaction. A construct consisting of the *rhlAB* gene cluster and an artificial promoter was inserted into the p-ALT2 vector. The insert was introduced into *Acetobacter aceti* AIC1824 cells by calcium transformation. A total of 20 transformants were selected by blue-white selection. The target insert was detected in 7 transformants by polymerase chain reaction. The indicator test revealed a characteristic precipitate in two transformants: A4 and A8. Glucose, mannitol and glycerol were used as substrates. Suitable nitrogen and carbon sources were determined: peptone and mannitol, respectively. We found that the overall optimal pH of the medium was 5; the optimal cultivation temperature was 30 °C for A4 and 25 °C for A8. The amount of rhamnolipids formed by the above in optimal conditions is 139.3±20.1 mg/mL for transformant A4 and 13.0±1.0 mg/mL for transformant A8. The high washrhamnolipid emulsifying activity of heterologous producers in relation to crude oil has been experimentally demonstrated: EI₂₄ for A4 was 93.9±1.5%, and for A8 – 96.7±1.5%.

Keywords: rhamnolipids, heterologous expression, biosurfactants, productivity optimization, acetobacter, pseudomonads.

Бактерия *Pseudomonas aeruginosa* продуцирует рамнолипиды – высокоэффективные и безопасные биосурфактанты, которые обладают выраженной эмульгирующей способностью [1]. Рамнолипид проявляет высокую стабильность в широких диапазонах температур и значений кислотности среды [2]. Рамнолипиды могут использоваться для биоремедиации загрязнённых нефтепродуктами почв [3, 4]. Во внешней среде рамнолипид эмульгирует нефтепродукт, что увеличивает его биодоступность для ферментативных систем автохтонных почвенных микроорганизмов [4]. При помощи клеток продуцента рамнолипидов возможно произвести биоремедиацию *in situ*, добавив их в почву, что позволит избежать использования вредных для окружающей среды химических поверхностно-активных веществ [4].

Рамнолипиды существуют в виде смеси мономеров и димеров с разной длиной остатков жирных гидроксикислот [5–7]. Рамнолипиды в смеси присутствуют в виде множества гомологов, обладающих различными поверхностно-активными свойствами [8]. Известно более 50 различных структурных вариантов рамнолипидов [7].

Одним из возможных путей производства рамнолипидов является гетерологичная экспрессия кластера генов биосинтеза рамнолипидов *rhlAB* в различных непатогенных микроорганизмах [9]. В качестве гетерологичных продуцентов используются граммотрицательные бактерии. Для трансформации могут применяться как синтетические [9], так и нативные промоторы [10].

В качестве субстратов для получения рамнолипидов чаще всего выступают сахара: глюкоза [11], многоатомные спирты: глицерин [12, 13], отходы растительных производств: тростниковая патока, пальмовый шлам [14]; также перспективно использование растительных масел [15]. Кроме этого, используются субстраты, содержащие соли различных органических кислот, например: ацетат, пропионат [16]. Отходы производства биодизеля и глицерина также являются одним из дешёвых субстратов для получения рамнолипидов [13].

В данной работе решались следующие задачи: получение гетерологичных продуцентов рамнолипидов на основе *Acetobacter aceti* AIC1824 с использованием экспрессирующего вектора с искусственным промотором, оптимизация продукции рамнолипидов и оценка отмывающей способности рамнолипидов в отношении сырой нефти.

Объекты и методы исследования

Используемые штаммы: *Pseudomonas aeruginosa* B-6643 (коллекция микроорганизмов ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт»), *Acetobacter aceti* AIC1824 (коллекция микроорганизмов кафедры микробиологии Вятского государственного университета).

Штамм *Acetobacter aceti* AIC1824 был выбран в качестве гетерологичного продуцента, потому что является граммотрицательной бактерией филума *Pseudomonadota*, что указывает на возможную близость метаболических путей, ведущих к синтезу предшественников рамнолипидов; а также он обладает высокой скоростью роста и нетребовательностью к питательным субстратам для роста и развития.

Выделение ДНК из микроорганизмов. В ходе работы выделяли ДНК из клеток при помощи буферного раствора с pH 8,3 с 2% цетилтриметиламмония бромида [17]. Клетки суспендировали в 500 мкл буферного раствора и инкубировали при 65 °C в течение 30 мин в термостате «Гном» (ДНК-технология, Россия). После этого дважды очищали препарат ДНК хлороформом. Затем препарат ДНК осаждали холодным этанолом в виде натриевой соли.

Получение плазмиды, содержащей вставку с генным кластером *rhlAB*. Проводили ПЦР с ДНК *P. aeruginosa* B-6643 при помощи праймеров: F: 5'-ATG-CGG-CGC-GAA-AGT-CTG-TTG-G-3', R: 5'-TCA-GGA-CGC-AGC-CTT-CAG-CCA-TC-3', температура отжига 54 °C, длина продукта составляет 2234 пары нуклеотидов (п. н.).

Для лигирования был использован pAl2-T вектор компании Евроген. Лигирование выполнялось по инструкции, приложенной к данному вектору [18]. В помещённой в ванночку со льдом пробирке на 1,5 мл были смешаны неочищенный ПЦР-продукт; искусственный промотор со следующей структурой: 5'-TTG-ACA-AGC-GCG-GCG-GAC-GAT-CCG-TAT-AAT-CTC-AAG-GAC-3'; буфер для T-4 ДНК-лигазы: 2 мкл; T-4 ДНК-лигаза: 2 мкл. Смесь выдерживали 16 ч при температуре 14 °C.

Химическая трансформация ночной культуры *A. aceti* AIC1824 при помощи CaCl_2 . Отделяли клетки из ночной культуры *A. aceti* AIC1824 на глюкозо-пептонном бульоне при помощи центрифугирования при 3500 об./мин в течение 5 мин. К клеткам добавляли 20 мкл лигата и 200 мкл 1М CaCl_2 , 50 мкл 50 мМ трис-HCl, смесь инкубировали при 28 °C в термостате в течение 40 мин. После инкуба-

ции полученную культуру рассеивали по чашкам Петри с агаризованной средой глюкозо-пептонный агар с дрожжевым экстрактом с добавлением ампициллина.

Культивирование трансформантов выполнялось в термостате ТС-80 (Казанский завод медицинской аппаратуры, Россия) в течение 6 суток при 28 °С в стеклянных пробирках с глюкозо-пептонным бульоном следующего состава (г/л): пептон – 1, глюкоза – 1, дрожжевой экстракт – 0,5.

Подтверждение наличия вставки. Наличие вставки подтверждалось при помощи ПЦР с праймерами F: 5'-ATG-CGG-CGC-GAA-AGT-CTG-TTG-G-3', R: 5'-TCA-GGA-CGC-AGC-CTT-CAG-CCA-TC-3', температура отжига 54 °С, длина продукта составляет 2234 п. н. Затем производили гель-электрофорез в 0,8% агарозном геле в трис-ацетатном буфере. Гель окрашивали 0,01% раствором бромистого этидия.

Выделение и очистка рамнолипидов [20, 21]. Осаждение клеток из полученных культур проводили при помощи центрифугирования (MiniSpin, Eppendorf, Германия) в течение 5 мин при 13400 об./мин. Затем бесклеточную культуральную жидкость переносили в отдельную пробирку на 1,5 мл, подкисляли до pH 2 при помощи 1 М HCl. После этого добавляли равный объём этилацетата, суспендировали на Microspin FV-2400 (Биосан, Латвия) в течение 5 мин и центрифугировали в течение 5 мин при 13400 об./мин. Верхнюю органическую фазу собирали в чистые пластиковые пробирки, из которых затем выпаривали этилацетат в термостате «Гном» при 75 °С.

Метод качественного определения рамнолипидов с метиленовым синим и цетилтриметиламмония бромидом [22]. В пробирку эппендорф с 200 мкл культуральной жидкости анализируемой культуры добавляли 800 мкл раствора метиленового синего и 2% цетилтриметиламмония бромида. Через 4 ч наблюдали образование голубого осадка на дне и стенках пробирки.

ИК-Фурье спектроскопия [4]. Экстракты рамнолипидов в открытых пробирках подвергали вакуумной сушке в сушилке LABCONCO (Labconco, США) в течение 2 ч. После сушки пробирки закрывали плёнкой Parafilm, чтобы избежать адсорбции экстрактом влаги из воздуха. Высушенные экстракты рамнолипидов в количестве 1,5 мг смешивали с 148,5 мг KBr и прессовали при помощи ручного пресса в таблетки. Затем на приборе марки SILAB i-Red 7800u-L (Beijing Beifen-Ruili Analytical

Instrument, Китай) получали ИК-спектры экстрактов.

Массу рамнолипидов определяли гравиметрически с помощью весов Adventurer OHAUS AR2140 (Ohaus, США) в трёх параллельных повторениях.

Оптимизация условий для продукции рамнолипидов. Вначале проанализировали сочетание трёх источников углерода (глюкоза, глицерин, маннитол) с 4 источниками азота (пептона, гидролизата казеина, калия нитрата и сульфата аммония), отобрали сочетание (пептон с маннитолом), дающее максимальный выход продукта. На среде с пептоном и маннитолом анализировали зависимость продукции рамнолипидов от кислотности среды (pH 4, 5, 6, 7) и температуры культивирования (25, 27, 30 °С).

Оценку отмывающей способности проводили по методике определения индекса эмульгирования EI₂₄ [23]. Для проведения эксперимента при помощи культур А4 и А8 были наработаны рамнолипиды на пептонно-глюкозном бульоне, которые экстрагировались этилацетатом. После упаривания этилацетата экстракт растворялся в 50 мл дистиллированной воды. Был приготовлен ряд проб с воздушно-сухим песком в количестве 5 г на пробу, с добавлением сырой нефти в количестве 5 мл (3,3 г) на пробу. Определяли компоненты смесей песка и нефти до смешения и исходные массы смесей песка и нефти (до добавления рамнолипидов). Данные пробы смешивались с раствором рамнолипидов в пропорции 1 объём смеси песка и нефти к 5 объёмам раствора рамнолипидов. Эксперимент проводили в трёх повторениях, все пробы после смешения с раствором рамнолипидов выдерживались по 24 ч. В качестве контроля вместо раствора рамнолипидов использовали дистиллированную воду. Жидкость сливалась, выполнялась сушка песка. Определялась масса смеси. Отмывающую способность оценивали по убыли массового содержания нефти в образце смеси.

Статистическая обработка полученных данных. Отмывающую способность растворов рамнолипидов и массу экстрагированных рамнолипидов определяли трижды, рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение. Значимость различий оценивали с помощью коэффициента Стьюдента при уровне доверительной вероятности P=0,95.

Результаты и обсуждение

Полученные трансформанты проверяли на наличие вставки кластера генов *rhlAB*, для

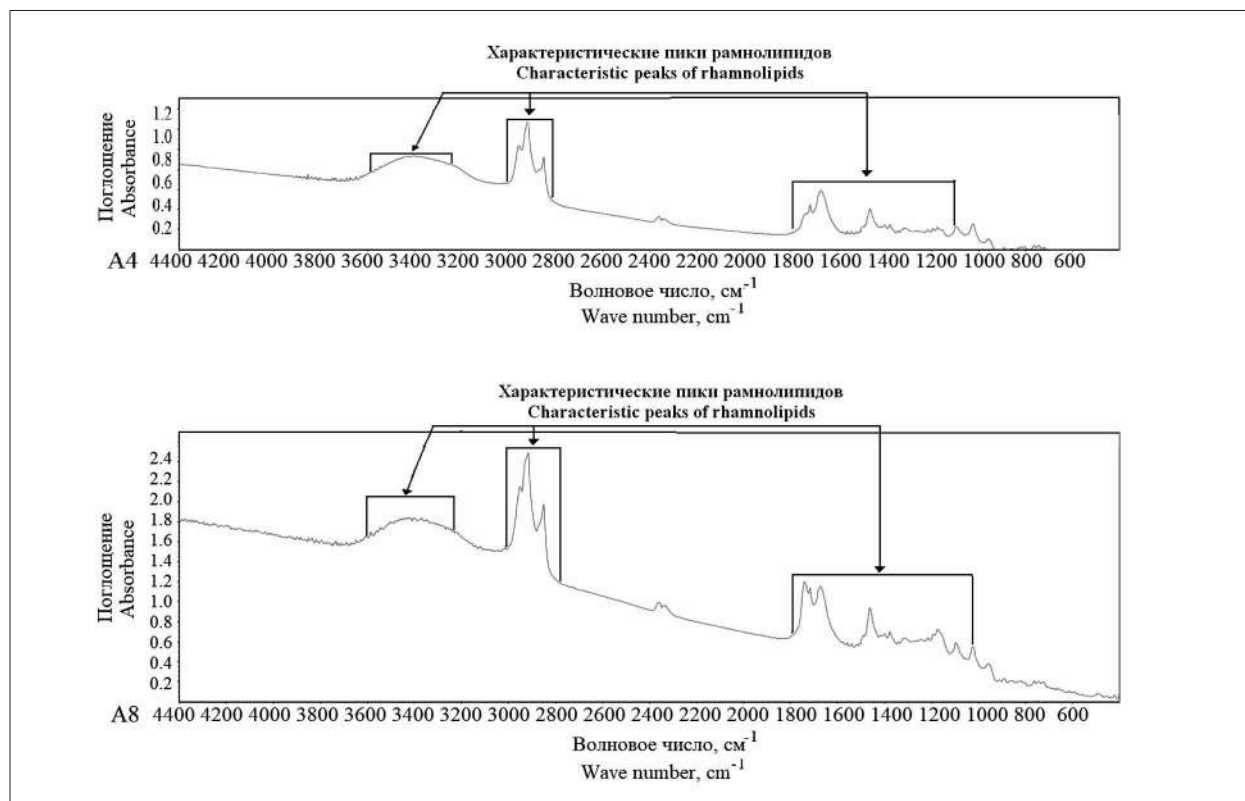


Рис. ИК-спектры полученных экстрактов из культуральных жидкостей трансформантов А4 и А8
Fig. IR spectra of the extracts obtained from the culture fluids of the A4 and A8 transformants

подтверждённых трансформантов проводили качественную оценку с использованием цетилтриметиламмония бромид и метиленового синего путём наблюдения образования голубого осадка на стенках и на дне пластиковой пробирки, а секреция целевых продуктов подтверждалась ИК-Фурье спектрометрией.

Были получены 20 культур трансформантов: А1–А20, которые были проверены на наличие вставки при помощи ПЦР-анализа. Положительный результат показали 7 из них: А3, А4, А8, А13, А14, А18, А19.

Содержащие целевую вставку трансформанты были отобраны для качественного теста с использованием цетилтриметиламмония бромид и метиленового синего на появление специфического осадка. Характерный осадок выявлен в образцах бесклеточной культуральной жидкости трансформантов А4 и А8.

Были получены ИК-спектры высушенных экстрактов из культуральных жидкостей трансформантов А4 и А8 (рис.).

Полученные ИК-спектры содержат характеристические пики (рис.), которые подтверждают присутствие в анализируемых пробах рамнолипидов: -ОН (3600–3200 см⁻¹), -С-Н (3000–2800 см⁻¹), С=О (1800–1600 см⁻¹), -С-Н (1500 см⁻¹), -ОН-С-Н (1300 см⁻¹), С-О (1050 см⁻¹).

На следующем этапе исследований была измерена продуктивность трансформантов А4 и А8 на различных субстратах. Для этого были выбраны сахар глюкоза, многоатомные спирты (маннитол и глицерин). Глюкозу и многоатомные спирты добавляли в жидкую питательную среду с дрожжевым экстрактом и одним из четырёх источников азота в таком количестве, чтобы концентрация анализируемого субстрата составила не менее 5% от массы. В качестве источников азота использовали пептон, гидролизат казеина, калия нитрат, аммония сульфат. Был проведён анализ изменения продукции рамнолипидов в зависимости от выбора источника углерода и источника азота (табл. 1).

Пептон и маннитол были определены в качестве подходящих источников азота и углерода для получения рамнолипидов при использовании продуцентов А4 и А8.

Проанализировано изменение выхода рамнолипидов у продуцентов в зависимости от температуры (25–30 °С) и кислотности среды (рН 4–7) (табл. 2).

Максимальные значения продуктивности наблюдались у продуцента А4: при температуре 30 °С и рН 5, у продуцента А8: при 25 °С и рН 5. При этом при температуре 30 °С, при всех значениях рН, у обоих продуцентов фиксировались высокие значения продуктивности.

Таблица 1 / Table 1

Продукция рамнолипидов двумя штаммами трансформантов в зависимости от разных сочетаний в среде источников азота и углерода, мг/мл / Rhamnolipid production by two transformant strains depending on different combinations of nitrogen and carbon sources in the medium, mg/mL

Продуцент Producer	Источник углерода (5% от массы) Carbon source (5% by weight)	Продукция рамнолипидов при использовании различных источников азота (1% от массы) Rhamnolipid production using different nitrogen sources (1% by weight)			
		пептон Peptone	гидролизат казеина Casein hydrolysate	калия нитрат Potassium nitrate	аммония сульфат Ammonium sulfate
A4	Глюкоза / Glucose	3,8±0,8	5,1±0,4	6,3±1,2	2,0±0,9
	Глицерин / Glycerol	6,5±0,6	3,5±1,0	8,0±0,9	7,1±1,7
	Маннитол / Mannitol	7,0±1,0	7,0±0,4	6,0±1,7	6,5±1,3
A8	Глюкоза / Glucose	3,1±1,0	4,3±0,3	3,5±1,0	4,1±2,6
	Глицерин / Glycerol	3,8±0,9	3,5±0,5	2,1±0,7	2,8±1,1
	Маннитол / Mannitol	4,3±0,6	3,6±0,4	2,8±0,7	1,8±0,4

Таблица 2 / Table 2

Продукция рамнолипидов на маннитно-пептонной среде в зависимости от разных сочетаний температур и кислотности среды, мг/мл / Rhamnolipid production on mannitol-peptone medium depending on different combinations of temperatures and acidity of the medium, mg/mL

Продуцент Producer	Температура, °C Temperature, °C	Продукция рамнолипидов при различных значениях pH среды Rhamnolipid production at different pH values			
		4	5	6	7
A4	25	1,6±0,5	2,3±0,8	12,0±1,6	7,0±1,6
	27	3,0±1,0	1,6±0,5	6,6±0,5	9,8±0,7
	30	9,1±0,7	139,3±20,1	58,3±0,5	37,1±0,7
A8	25	6,1±2,3	13,0±1,0	5,0±1,0	8,6±1,8
	27	1,8±0,7	4,8±0,5	1,6±0,5	9,1±0,4
	30	5,8±0,4	5,6±0,5	9,8±0,4	7,8±0,8

Таблица 3 / Table 3

Результаты тестирования раствора рамнолипидов на отмывающую способность (на примере отмывки песка от нефти) / Results of testing a rhamnolipid solution for its emulsifying activity: case study of sand washing from oil

Раствор рамнолипидов продуцента Rhamnolipid solutions of producer	Концентрация рамнолипидов в растворе, мг/мл Rhamnolipids concentrati on in the solution, mg/mL	Убыль массы смеси, г Mixture mass loss, g	Отмывающая способность, EI ₂₄ , % Emulsifying activity, EI ₂₄ , %
A4	8	3,100±0,130	93,9±1,5
A8	22	3,190±0,050	96,7±1,5
Контроль (дистиллирован- ная вода) / Control (dis- tilled water)	0	0,070±0,004	2,12±0,13

сировались значения продуктивности выше тех, которые отмечались до оптимизации условий культивирования.

Был проведён эксперимент по оценке отмывающей способности рамнолипидов. В результате были получены следующие результаты (табл. 3).

Средние значения отмывающей способности растворов рамнолипидов продуцентов A4 и A8 соответственно составили: 93,9±1,5%,

96,7±1,5%. Данные значения значительно превышают массу сырой нефти, вымытой дистиллированной водой: 2,12% от исходной массы сырой нефти в образце.

Полученные в ходе данной работы гетерологичные продуценты содержат в составе генетической конструкции искусственный промотор и кластер генов *rhlAB*. Генетические конструкции для производства рамнолипидов в основном включают в свою структуру кластер

генов *rhlAB*, который ответственен за биосинтез рамнолипидов [9]. Искусственные промоторы используются значительно реже, чем нативные [9, 10]. Искусственные промоторы обладают важным преимуществом – они не требуют наличия индукторов вне зависимости от того, добавляются они в среду или их способны образовывать сами гетерологичные продуценты [9].

Максимальная продуктивность гетерологичных продуцентов ограничивается биологическими возможностями продуцента в аспекте производства предшественников рамнолипидов, имеющих один метаболический путь с биосинтезом предшественников липополисахарида [9].

В ходе данной работы было определено, что выход рамнолипидов у гетерологичных продуцентов подчинён сложной зависимости, которая включает в себя природу компонентов среды, температуру и pH.

Заключение

Таким образом, трансформация *Acetobacter acetii* AIC1824 оказалась успешной. При помощи ПЦР было подтверждено наличие вставки кластера генов *rhlAB*. Наличие рамнолипидов в экстрактах культуральной жидкости подтверждено при помощи ИК-Фурье спектроскопии. Получены гетерологичные продуценты А4 и А8. Установлено, что гетерологичные продуценты обеспечивают максимальную продуктивность на среде, содержащей маннит и пептон. Оптимальным значением pH для культивирования продуцентов является 5,0. Оптимальная температура культивирования для А4 – 30 °С, для А8 – 25 °С. В оптимальных условиях значения продукции у гетерологичных продуцентов составили 139,3±20,1 и 13,0±1,0 мг/мл соответственно для трансформантов А4 и А8.

Рамнолипиды полученных гетерологичных продуцентов проявили высокую отмывающую способность в отношении сырой нефти, которая составила 93,9±1,5% для трансформанта А4 и 96,7±1,5% для трансформанта А8, что дает возможность в дальнейшем рассматривать их как высокоэффективное средство для очистки грунтов, загрязнённых нефтью и нефтепродуктами.

References

1. Adu S.A., Twigg M.S., Naughton P.J., Marchant R., Banat I.M. Glycolipid biosurfactants in skincare applications: challenges and recommendations for future ex-

ploitation // *Molecules*. 2023. V. 28. No. 11. P. 137–152. doi: 10.3390/molecules28114463

2. Cerqueira Dos Santos S., Araújo Torquato C., de Alexandria Santos D., Orsato A., Leite K., Serpeloni J.M., Losi-Guembarovski R., Romão Pereira E., Dyna A.L., Lopes Barboza M.G., Fernandes Arakawa M.H., Pires Bitencourt J.A., da Cruz Silva S., da Silva Sá G.C., Dias Rodrigues P., Quintella C.M., Faccin-Galhardi L.C. Production and characterization of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* isolated in the Amazon region, and potential antiviral, antitumor, and antimicrobial activity // *Sci. Rep.* 2024. V. 14. No. 1. Article No. 4629. doi: 10.1038/s41598-024-54828-w

3. Rahman K.S., Banat I.M., Thahira J., Thayumanavan T., Lakshmanaperumalsamy P. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant // *Bioresour. Technol.* 2002. V. 81. No. 1. P. 25–32. doi: 10.1016/S0960-8524(01)00105-5

4. Hosseini S., Sharifi R., Habibi A., Ali Q. Molecular identification of rhamnolipids produced by *Pseudomonas oryzae* during biodegradation of crude oil // *Front. Microbiol.* 2024. V. 15. Article No. 1459112. doi: 10.3389/fmicb.2024.1459112

5. Twigg M.S., Tripathi L., Zompra A., Salek K., Irerere V.U., Gutierrez T., Spyroulias G.A., Marchant R., Banat I.M. Identification and characterization of short chain rhamnolipid production in a previously uninvestigated, non-pathogenic marine pseudomonad // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 102. No. 19. P. 8537–8549. doi: 10.1007/s00253-018-9202-3

6. Tiso T., Ihling N., Kubicki S., Biselli A., Schonhoff A., Bator I., Thies S., Karmainski T., Kruth S., Willenbrink A.L., Loeschcke A., Zapp P., Jupke A., Jaeger K.E., Büchs J., Blank L.M. Integration of genetic and process engineering for optimized rhamnolipid production using *Pseudomonas putida* // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. V. 8. Article No. 976. doi: 10.3389/fbioe.2020.00976

7. Abdel-Mawgoud A.M., Lépine F., Déziel E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 86 No. 5. P. 1323–1336. doi: 10.1007/s00253-010-2498-2

8. Euston S.R., Banat I.M., Salek K. Congener-dependent conformations of isolated rhamnolipids at the vacuum-water interface: A molecular dynamics simulation // *Journal of Colloid Interface Science*. 2021. V. 585. P. 148–157. doi: 10.1016/j.jcis.2020.11.082

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

10. Baramzin M.N., Litvinets S.G., Martinson E.A. Obtaining heterologous rhamnolipid producers for industrial production of highly-effective biosurfactant // *Theoretical and Applied Ecology*. 2024. No. 2. P. 135–142 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2024-2-135-142

11. Beuker J., Barth T., Steier A., Wittgens A., Rosenau F., Henkel M., Hausmann R. High titer heterologous rhamnolipid production // *AMB Express*. 2016. V. 6. No. 1. Article No. 124. doi: 10.1186/s13568-016-0298-5
12. Zhao F., Wu Y., Wang Q., Zheng M., Cui Q. Glycerol or crude glycerol as substrates make *Pseudomonas aeruginosa* achieve anaerobic production of rhamnolipids // *Microb. Cell Fact.* 2021. V. 20. No. 1. Article No. 185. doi: 10.1186/s12934-021-01676-2
13. Baskaran S.M., Zakaria M.R., Mukhlis Ahmad Sabri A.S., Mohamed M.S., Wasoh H., Toshinari M., Hassan M.A., Banat I.M. Valorization of biodiesel side stream waste glycerol for rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* RS6 // *Environ. Poll.* 2021. V. 276. Article No. 116742. doi: 10.1016/j.envpol.2021.116742
14. Nasir M.S., Yahya A.R.M., Noh N.A.M. Agro-industrial wastes as potential substrates for rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* USM-AR // *Trop. Life Sci. Res.* 2024. V. 35. No. 1. P. 33–47. doi: 10.21315/tlsr2024.35.1.3
15. Habibah F.F., Ivansyah A.L., Ivan S., Hertadi R. Graphene quantum dots functionalised with rhamnolipid produced from bioconversion of palm kernel oil by *Pseudomonas stutzeri* BK-AB12MT as a photocatalyst // *RSC Advances*. 2023. V. 13 No. 5. P. 2949–2962. doi: 10.1039/d2ra05967c
16. Arnold S., Henkel M., Wanger J., Wittgens A., Rosenau F., Hausmann R. Heterologous rhamnolipid biosynthesis by *P. putida* KT2440 on bio-oil derived small organic acids and fractions // *AMB Express*. 2019. V. 9. No. 1. Article No. 80. doi: 10.1186/s13568-019-0804-7
17. Naktinis V.I., Maleeva N.E., Sanko V.F., Mirzabekov A.D. Two simple methods of DNA isolation from various sources using cetavlon // *Biokhimiia*. 1977. V. 42. No. 10. P. 1783–1790 (in Russian).
18. Evrogen. Basic properties of pAL2-T vector [Internet resource] <https://evrogen.ru/kit-usermanuals/pAL2-T.pdf> (Accessed: 05.09.2024).
19. Asif A., Mohsin H., Tanvir R., Rehman Y. Revisiting the mechanisms involved in calcium chloride induced bacterial transformation // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Article No. 2169. doi:10.3389/fmicb.2017.02169
20. George S., Jayachandran K. Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant from waste frying coconut oil using a novel *Pseudomonas aeruginosa* D // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 114. No. 2. P. 373–383. doi: 10.1111/jam.12069
21. Dabaghi S., Ataei S.A., Taheri A. Production of rhamnolipid biosurfactants in solid-state fermentation: process optimization and characterization studies // *BMC Biotechnology*. 2023. V. 23. No. 1. Article No. 2. doi: 10.1186/s12896-022-00772-4
22. Eslami P., Hajfarajollah H., Bazsefidpar S. Recent advancements in the production of rhamnolipid biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* // *RSC Advances*. 2020. V. 10. No. 56. P. 34014–34032. doi: 10.1039/d0ra04953
23. Cooper D.G., Goldenberg B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species // *Appl. Environ. Microbiol.* 1987. V. 53. No. 2. P. 224–229. doi: 10.1128/aem.53.2.224-229.1987