

Łukasz P. Tymiński¹, Zuzanna Znajewska¹, Grażyna B. Dąbrowska^{1*}

¹Zakład Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Wpłynęło w maju, zaakceptowano we wrześniu 2018 r.

Streszczenie: Hydrofobiny stanowią rodzinę powierzchniowo czynnych białek wytwarzanych przez grzyby strzępkowe i pełniących wiele istotnych funkcji w ich cyklu rozwojowym. Białka o właściwościach i funkcjach podobnych do hydrofobin odkryto również u bakterii. Hydrofobiny charakteryzuje specyficzne ułożeniem reszt cysteinowych, które w sekwencji aminokwasowej tworzą cztery mostki dwusiarczkowe. Ta charakterystyczna budowa nadaje im hydrofobowe właściwości, dzięki czemu uzyskują zdolność do spontanicznego formowania się w amfipatyczne monowarstwy pomiędzy hydrofobowym a hydrofilowym środowiskiem. Unikatowe właściwości hydrofobin sprawiają, że cieszą się coraz większym zainteresowaniem pod kątem ich potencjalnego zastosowania w przemyśle. Opracowywane są nowe sposoby ich wykorzystania w różnych gałęziach gospodarki. Szerokie zastosowanie odnajdują w branży spożywczej, przemyśle farmaceutycznym, ale także w metodach biologii molekularnej.

1. Wprowadzenie. 2. Klasyfikacja hydrofobin. 3. Struktura genów i białek hydrofobin. 4. Formowanie się filmu hydrofobinowego. 5. Produkcja, wydzielanie i formowanie się hydrofobin w środowisku naturalnym. 6. Właściwości hydrofobin. 7. Zastosowanie hydrofobin w różnych dziedzinach. 8. Przemysłowa produkcja hydrofobin. 9. Podsumowanie

CHARACTERISTICS AND FUNCTIONS OF HYDROPHOBINS AND THEIR USE IN INDUSTRY

Abstract: Hydrophobins are surface active proteins produced by filamentous fungi. They play a role in fungal growth and their life cycle. Proteins with similar properties have been also found in prokaryotic organisms. Hydrophobins are characterized by a specific arrangement of cysteine residues, which form four disulfide bridges in the amino acid sequence. This construction gives hydrophobins their hydrophobic properties, allowing for their spontaneous assembly into amphipathic monolayers at hydrophobic-hydrophilic interfaces. These unique properties of hydrophobins make them more and more popular with regard to their potential application in industry. New ways of using hydrophobins in various branches of the business sector are being developed. Hydrophobins are already widely used in the food industry, pharmaceutical industry, as well as molecular biology.

1. Introduction. 2. Classification of hydrophobins. 3. Structure of hydrophobin genes and proteins. 4. Formation of hydrophobin film. 5. Production, secretion and formation of hydrophobins in the natural environment. 6. Properties of hydrophobins. 7. The use of hydrophobins in various fields. 8. Manufacturing of hydrophobins. 9. Summary

Słowa kluczowe: grzyby, hydrofobiny, stres, film hydrofobinowy

Key words: fungi, hydrophobins, stress, hydrophobin film

1. Wstęp

Hydrofobiny stanowią rodzinę białek charakteryzujących się niewielką masą cząsteczkową (od 7 do 15 kDa) i obecnością licznych cystein. Wytwarzane są głównie przez grzyby strzępkowe [9, 46, 66]. Charakterystyczną cechą hydrofobin jest specyficzne ułożeniem reszt cysteinowych, które w sekwencji aminokwasowej tworzą cztery mostki dwusiarczkowe (Ryc. 1) [9, 19]. Poza tym hydrofobiny w swojej sekwencji nie zawierają innych konserwowanych ewolucyjnie regionów [53]. Są to białka zewnątrzkomórkowe, powierzchniowo czynne, które pełnią wiele funkcji w rozwoju oraz cyklu życiowym grzybów [59]. Hydrofobiny są zaangażowane w powstawanie hydrofobowych struktur, takich jak grzybnia powietrzna, owocniki i zarodniki. Dzięki

tym białkom komórki grzybni posiadają właściwości hydrofobowe, co umożliwia im przyleganie do różnych powierzchni. Wykazano, że hydrofobiny mogą również pełnić funkcje cząsteczek sygnałowych [80, 84]. Najbardziej charakterystyczną cechą hydrofobin jest posiadanie zdolności do spontanicznego formowania się w amfipatyczne monowarstwy pomiędzy hydrofobowym a hydrofilowym środowiskiem [42]. Tak utworzone powierzchnie wykazują specyficzne właściwości fizyczne, posiadają zdolność zmiany charakteru różnych powierzchni z hydrofobowego na hydrofilowy i odwrotnie [64, 79, 80].

Pierwsze geny kodujące hydrofobiny zostały opisane u *Schizophyllum commune* w 1991 roku przez zespół Wesselsa podczas badań nad zmianami ekspresji genów w trakcie formowania się zarodni tego grzyba. Nazwa

* Autor korespondencyjny: dr hab. Grażyna B. Dąbrowska, Zakład Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń; e-mail: browsk@umk.pl

Bs1A	MKRKLLSSLAISALSGLLLVSAPTASFAAESTSTKAHTESTMRTQSTASLFATITGASKT
HFB2	-----
Bs1A	EWSFSDIELTYRPNTLLSLGVMFTLPSGFTANTKDTLNGNALRTTQILNNGKTVRVPLA
HFB2	-----MQFFAVALFATSALAAV C PTGLFSNPL C ----- C ATNV
	* * *
Bs1A	LDLLGAGEFKLKLNNKTLPAAGTYTFRAENKSLSIGNKFYAEASIDVAKRSTPPTQ PCGC
HFB2	LDLIGVD CKT -----P-----TIAVDTGAI FQAH C -----ASKGSKPL CC
	*** * * * * * * *
Bs1A	N-----
HFB2	VAPVADQALL C QKAIGTF

Ryc. 1. Porównanie sekwencji aminokwasowych hydrofobin

Porównanie sekwencji HFB2 *Trichoderma reesei* (nr GeneBank NCBI: XP_006962048.1) z bakteryjnym białkiem Bs1A *Bacillus subtilis* (WP_003243556.1) wykonane przy użyciu programu ClustalW.

„hydrofobiny” nawiązuje do obecnych w sekwencji tych białek licznych aminokwasów hydrofobowych [1, 79, 81, 83].

Białka pełniące podobne funkcje i wykazujące zbliżone właściwości do hydrofobin zostały odkryte również wśród organizmów prokariotycznych. Przykładem jest białko Bs1A wytwarzane przez Gram-dodatnie bakterie *Bacillus subtilis*. Chociaż białko to pełni u bakterii funkcje podobne do hydrofobin, jednak wykazuje istotne różnice w sekwencji aminokwasowej [3, 5, 6, 27, 71] (Ryc. 1). Homologia jest nieznaczna, nie występuje w sekwencjach aminokwasowych.

Początkowo nazwy poszczególnych hydrofobin pochodziły od nazw organizmów, u których zostały zidentyfikowane. Oprócz akronimów genów hydrofobin mających oczywiste pochodzenie, jak w przypadku *Agaricus bisporus* (gen hydrofobiny *ABH1*), pozostałe nazewnictwo koncentruje się bardziej na mutacjach w genach, powodujących zmiany w fenotypie dzikim. Przykładem mogą być mutacje w genach *rodA* (*Aspergillus nidulans*) i *eas* (*Neurospora crassa*), których konsekwencją jest utrata przez zarodniki grzybów właściwości hydrofobowych, co skutkuje zbijaniem się ich w konglomeraty [29].

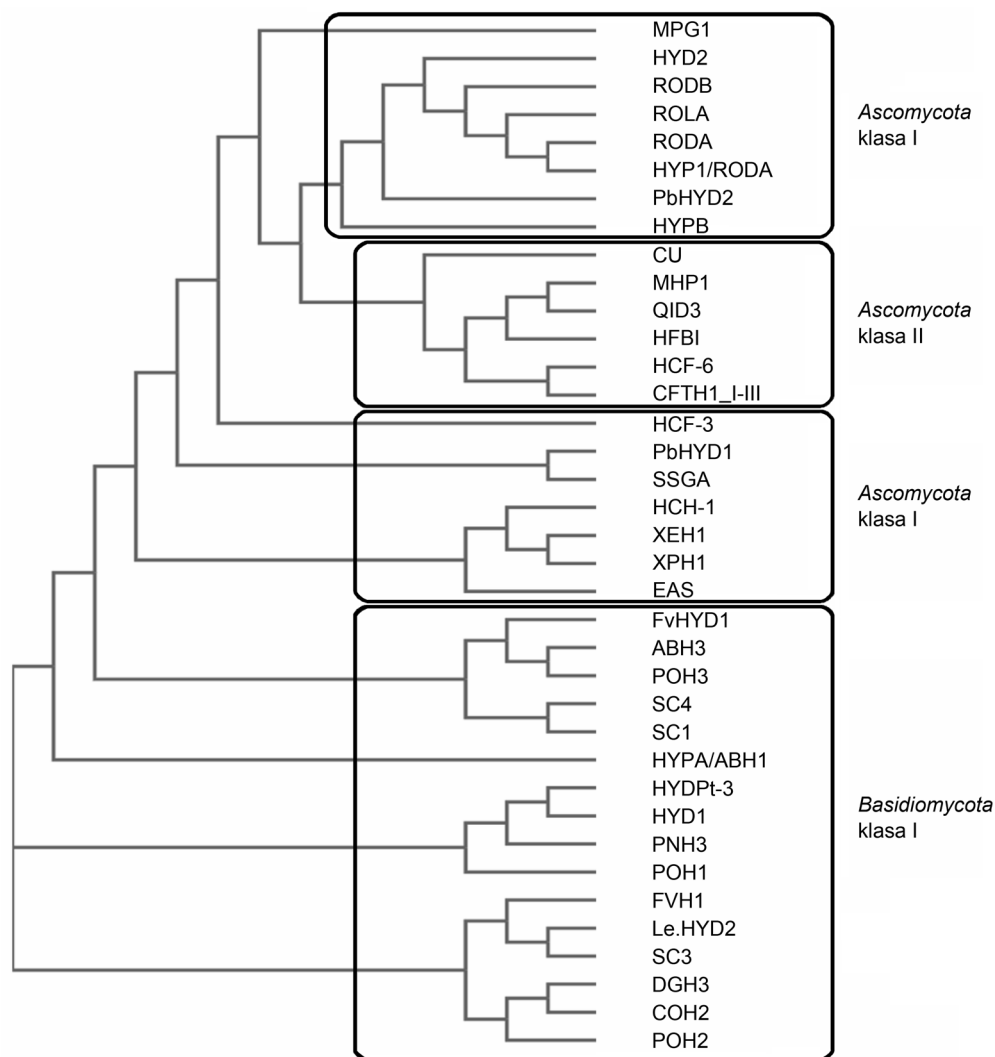
W wyniku przeszukania sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych w bazie NCBI (National Center for Biotechnology Information) (www.ncbi.nlm.nih.gov) za pomocą hasła „hydrophobin” otrzymuje się ponad 700 sekwencji nukleotydowych i ponad 6000 sekwencji aminokwasowych kodujących hydrofobiny (luty 2018). Wpisując takie samo hasło w bazie UniProt (www.uniprot.org) otrzymuje się prawie 3000 wyników, w tym ponad 1200 bezpośrednio odnoszących się do hydrofobin (luty 2018). Są to sekwencje zidentyfikowane u grzybów z typów workowców (*Ascomycota*) i podstawczaków (*Basidiomycota*) [34]. Na przykład u saprofitycznych

grzybów *Trichoderma* spp. w bazie NCBI obecnie jest zdeponowanych 25 sekwencji nukleotydowych kodujących hydrofobiny (luty 2018). Niektóre źródła podają dowody na występowanie hydrofobin również u przedstawicieli typu sprężniowców (*Zygomycota*). de Vries i wsp. w pracy z 1993 roku dowiedli, że białka o podobnych właściwościach do hydrofobin występują także u pleśniaka białego (*Mucor mucedo*) [20].

W środowisku naturalnym podczas wzrostu grzybów hydrofobiny są uwalniane do wolnej wodnej przestrzeni otaczającej grzybnię. W sytuacjach ograniczonego dostępu do składników odżywczych lub w czasie stresu fizjologicznego obecność hydrofobin wpływa na zmianę napięcia powierzchniowego wody. Białka te obniżają napięcie powierzchniowe prawie dwukrotnie z 70 mN/m do mniej niż 30 mN/m [33]. Takie zjawisko pomaga strzępkom powietrznym przełamywać barierę woda-powietrze, a co za tym idzie, rozsiewać spory w celu kolonizacji nowych przestrzeni. Hydrofobiny grzybów nawet ze sobą spokrewnionych posiadają specyficzne właściwości i pełnią wyspecjalizowane funkcje, niekoniecznie ściśle powiązane z momentem cyklu życiowego, w którym są wytwarzane [12, 26].

2. Klasyfikacja hydrofobin

Bazując na różnicach w rozpuszczalności, ułożeniu reszt cysteinowych oraz właściwościach fizycznych, hydrofobiny zostały podzielone na klasę I i klasę II [53]. Białka należące do klasy I są bardzo słabo rozpuszczalne w wodnych roztworach. Jedynie silne stężone kwasy, jak kwas trifluorooctowy (TFA) lub kwas mrówkowy mogą zdysocjować te białka [33, 34]. Monowarstwowy składający się z hydrofobin klasy pierwszej zawierają wysoce uporządkowane struktury rdzenia białkowego, zwane



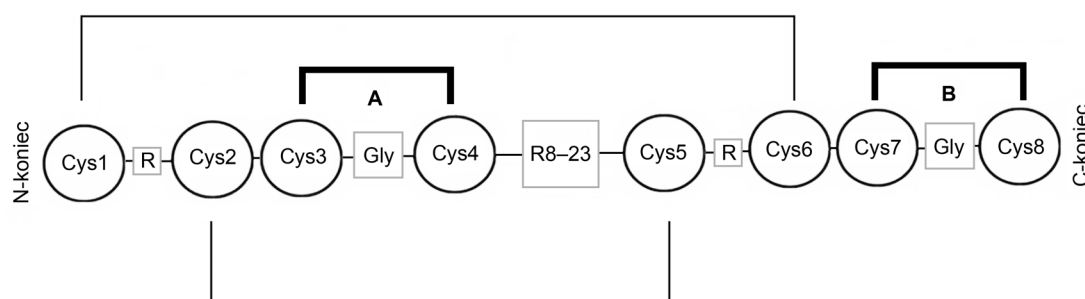
Ryc. 2. Analiza filogenetyczna przykładowych hydrofobin

Zilustrowano analizę filogenetyczną hydrofobin I i II, wytwarzanych przez przedstawicieli należących do *Ascomycota* i *Basidiomycota*. Drzewo filogenetyczne wykonane w programie ClustalW na podstawie sekwencji aminokwasowych zdeponowanych w GeneBank NCBI: MHP1 *Magnaporthe grisea* (XP_003714057.1), HYD2 *Gibberella moniliformis* (AAO16868.1), RODB *Aspergillus fumigatus* (XP_753093.1), ROLA *Aspergillus oryzae* (XP_001824881.1), RODA *Emericella nidulans* (XP_682072.1), HYP1/RODA *A. fumigatus* (XP_001259730.1), PbHYD2 *Paracoccidioides brasiliensis* (XP_010762860.1), HYPB *A. fumigatus* (XP_001727202.1), CU *Ophiostoma ulmi* (CAB02148.1), MHP1 *M. grisea* (XP_003714057.1), QID3 *Trichoderma harzianum* (P52755.1), HFBI *Trichoderma reesei* (XP_006964181.1), HCF-6 *Cladosporium fulvum* (CAC27407.1), CFTH1_I-III *Claviceps fusiformis* (Q9UVI4.1), HCF-3 *C. fulvum* (CAD92803.1), PbHYD1 *P. brasiliensis* (ACF72690.1), SSGA *Metarhizium anisopliae* (XP_007825920.1), HCH-1 *Cladosporium herbarum* (Q8NIN9.1), XEH1 *Xanthoria ectaneoides* (CAC08469.1), XPH1 *Xanthoria parietina* (CAC43386.1), EAS *Neurospora crassa* (XP_963300.1), FvHYD1 *Flammulina velutipes* (ADX07307.1), ABH3 *Agaricus bisporus* (XP_006461631.1), POH3 *Pleurotus ostreatus* (NCBI: CAA76494.1), SC4 *Schizophyllum commune* (XP_003038794.1), SC1 *S. commune* (XP_003038791.1), HYPA/ABH1 *A. bisporus* (XP_006457847.1), HYDpt-3 *Pisolithus tinctorius* (AAC95356.1), PNH3 *Pholiota nameko* (BAB84547.1), FVH1 *Flammulina velutipes* (ANH11478.1), Le.HYD2 *Lentinula edodes* (AAG00901.1), SC3 *S. commune* (KIJ48515.1), DGH3 *Dictyonema glabratum* (CAC86006.1), COH2 *Coprinus cinereus* (XP_001834449.1), POH2 *P. ostreatus* (CAA74987.1).

powierzchniami rurkowatymi. Białka te dają pozytywne wyniki w reakcji z barwnikami, takimi jak czerwień Kongo i tioflawina T, które powszechnie używane są do uwidaczniania złóż amyloidów [44]. Hydrofobiny klasy II są rozpuszczalne w wodnych roztworach organicznych rozpuszczalników, takich jak etanol lub sól sodowa kwasu dodecylosiarkowego (SDS, Sodium Dodecyl Sulfate) [29]. Hydrofobiny klasy I zostały opisane zarówno u grzybów typu *Ascomycota* jak i *Basidiomycota*, a białka klasy II jak dotąd zostały znalezione tylko u przedstawicieli *Ascomycota* [33] (Ryc. 2). Należy

zwrócić uwagę na to, że w miarę coraz niższych kosztów sekwencjonowania każdego roku poznawane są kolejne genomy grzybów, dlatego też obecny podział może stać się nieaktualny. Przeszukiwanie baz danych potwierdza, że hydrofobiny klasy II występują tylko u *Ascomycota* jako jednolita grupa w drzewie filogenetycznym [23, 59] (Ryc. 2). Przypuszcza się, że białka klasy II wyewoluowały niezależnie od hydrofobin klasy I, co jest przykładem konwergencji [29].

Klasa I hydrofobin ze względu na typ grzybów, które je wytwarzają, podzielona jest na dwie podgrupy



Ryc. 3. Schematyczne przedstawienie struktury hydrofobin z regionami hydrofobowymi. Elementy hydrofobowe oznaczono literami A i B, w oparciu o [20].

– klasa Ia reprezentowana przez *Ascomycota* oraz klasa Ib, reprezentowana przez *Basidiomycota*. Klasę Ia cechuje większe zróżnicowanie długości sekwencji genów kodujących te białka. Hydrofobowość większości białek klasy Ib jest średnio wyższa o 60% w porównaniu z hydrofobinami klasy Ia i klasy II [23, 59].

3. Struktura genów i białek hydrofobin

W sekwencjach aminokwasowych kodujących hydrofobiny obecnych jest 8 konserwowanych ewolucyjnie reszt cysteinowych. Hydrofobiny klasy I składają się ze 100–125 aminokwasów i mogą ulegać glikozylacji. Białka należące do klasy II hydrofobin są znacznie krótsze i zawierają średnio od 50 do 100 reszt aminokwasowych w łańcuchu polipeptydowym [55, 65]. Poza konserwowanymi resztami cysteinowymi, hydrofobiny wykazują tylko niewielkie homologie na poziomie aminokwasowym. Pomimo to, tworzą bardzo podobny wzór hydrofobowy (Ryc. 3) [52, 53, 86].

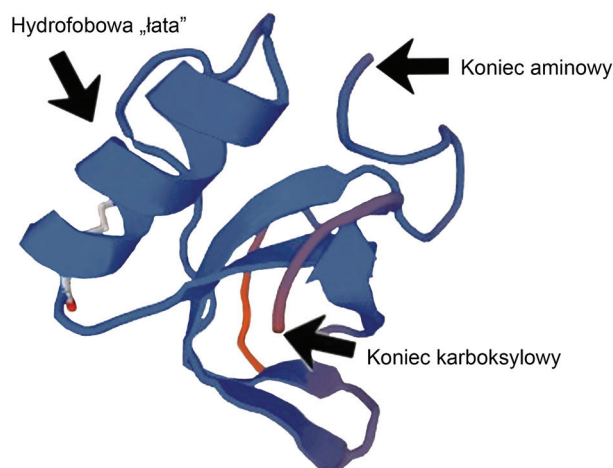
Hydrofobiny są białkami charakteryzującymi się unikatową konformacją poprzez specyficzne ułożenie hydrofobowych, hydrofilowych i obojętnych aminokwasów [53]. W swojej strukturze białka te zawierają cztery mostki dwusiarczkowe pomiędzy ośmioma resztami cysteinowymi: Cys1-Cys6, Cys2-Cys5, Cys3-Cys4 oraz Cys7-Cys8 [61]. Taki układ tworzy dwie pary pętli oddzielonych regionem łącznikowym pomiędzy 8 a 23 resztą aminokwasową (R8-R23) (Ryc. 3).

Słabo konserwowane reszty aminokwasowe (R) znajdują się pomiędzy aminokwasami hydrofobowymi. Pierwsza pętla zazwyczaj zawiera 5–9 reszt aminokwasowych. Wielkość drugiej pętli jest mniej konserwowana, jednak zawsze zawiera przynajmniej jedną resztę glicyny (Gly), która zwykle przylega do hydrofobowych aminokwasów (Ryc. 3). W hydrofobinach klas I i II obecne są części hydrofobowe (A i B), które w trzeciorzędowej strukturze przyjmują postać dwóch β -harmonijek położonych pomiędzy resztami cysteinowymi Cys3-Cys4 i Cys7-Cys8. Hydrofilowa część przyjmująca konformację α -helisy pomiędzy resztami

cysteinowymi Cys4-Cys5 obecna jest tylko u białek klasy II [10, 30].

Badania nad strukturą białka HFBI – hydrofobiny klasy II (wyizolowanego z *Trichoderma reesei*) – prowadzone metodą krystalizacji, wykazały trójwymiarową strukturę tych cząsteczek przyjmującą globularny kształt o średnicy wynoszącej 2 nm [86]. W tej cząsteczce rdzeń stanowią dwa β -skrety (struktura „spinki do włosów”), które wiążą się ze sobą i formują antyrównoległą β -harmonijkę, ta zaś organizuje się w strukturę o beczkowatym kształcie, zwaną „łata hydrofobową” [35, 52] (Ryc. 4).

Badania z wykorzystaniem spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, Nuclear Magnetic Resonance) nad hydrofobinami EAS wyizolowanym z *N. crassa* i SC3 z *S. commune* (rozszczepka pospolita) należącymi do klasy I (HFBI), wykazały bardzo podobne ułożenie mostków dwusiarczkowych do tych obecnych w hydrofobinach HFBI, chociaż cechujące się większą różnorodnością [35, 52]. Mostki dwusiarczkowe są istotnym elementem struktury hydrofobin, jednak hydrofobiny klasy I zachowują swoją funkcjonalność nawet po usunięciu mostków bądź ich zablokowaniu [52].



Ryc. 4. Model hydrofobiny HFBI *T. reesei*. Model *T. reesei* QM6a wykonany w programie SWISS-MODEL z wykorzystaniem sekwencji z Genebank NCBI (numer dostępu XP_006962048.1).

4. Formowanie się filmu hydrofobinowego

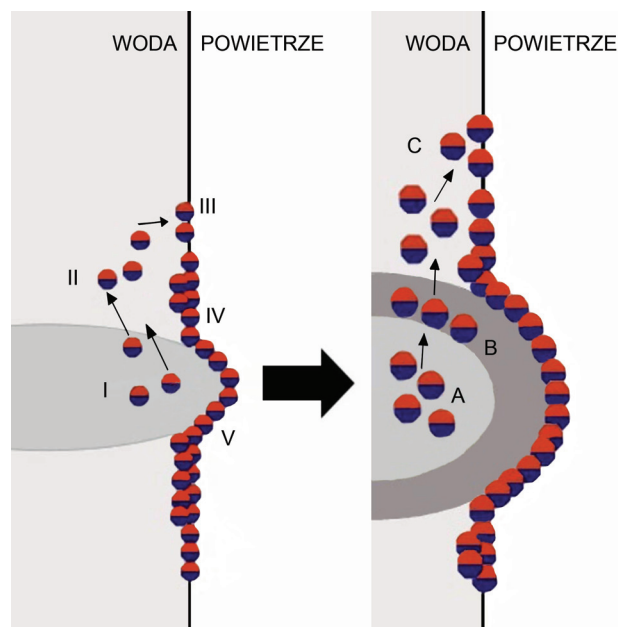
W środowisku naturalnym hydrofobiny występują w postaci monomerów wolno rozproszonych w roztworach, jednak bardziej prawdopodobnym jest formowanie się tych białek w słabo związane oligomery. Opisywane jest tworzenie się oligomerów, ich wzajemne relacje i kinetyka, których ostateczne formowanie się w warstwy następuje, gdy znajdują się na granicy faz pomiędzy powietrzem i wodą lub pomiędzy olejem a wodą [30]. Oligomery tworzą się w roztworze, są to głównie dimery lub tetramery, które układają się tak, że hydrofobowe regiony białek są niedostępne dla wodnego rozpuszczalnika. Formowanie się i wewnętrzna konwersja pomiędzy oligomerycznymi formami hydrofobin prowadzi do ich zagęszczania. Jest to proces przebiegający podobnie jak formowanie się warstw białek na granicy faz [48, 49]. Białko HFBIII *T. reesei* wykazuje mniejsze zdolności do oligomeryzacji, niż inne formy, a zatem ma wyższy wskaźnik wejścia i polimeryzacji [17, 52].

Oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe są stosunkowo słabe, jednakże bardzo istotne, gdyż odpowiadają za dynamikę tworzenia się kompletnych warstw hydrofobowych. W przeciwieństwie do amfipatycznych detergentów i środków powierzchniowo czynnych, w nadmiernych stężeniach hydrofobiny tworzą struktury polimeryczne [30, 59].

Dwie klasy hydrofobin, reprezentowane przez białko SC3 z *S. commune* [19, 76] oraz białko HFBIII z *T. reesei* [40, 41] najlepiej obrazują różnice w mechanizmach polimeryzacji. Trudniej rozpuszczalna klasa I (białko SC3) wykazuje bardziej złożony sposób asocjacji i polimeryzacji niż bardziej stabilny film białkowy tworzony przez hydrofobiny klasy II [40, 41, 52, 72]. Przede wszystkim, klasa I tworzy etap pośredni ze zwiększoną liczbą tworzonych struktur w formie α -helisy przed rozwinięciem się struktur zdominowanych przez formy β -harmonijki. Proces ten jest powolny, a jego wynikiem są powstające podłużne warstwy białka [77]. Dla porównania odkładanie się i krzyżowe wiązanie białek klasy II hydrofobin jest procesem szybkim i nie wykazuje żadnych zmian w konformacji [18, 35, 40, 41], a powstające wiązania krzyżowe powodują niemalże natychmiastowe powstanie filmu białkowego. Przypuszczalnie mechanizmy pośrednie podobne HFBI dotyczą większości hydrofobin [35, 40, 41, 72].

5. Produkcja, wydzielanie i formowanie się hydrofobin w środowisku naturalnym

Jak już wcześniej wspomniano, hydrofobiny pełnią istotną rolę w rozwoju grzybów strzępkowych. Jedną z najważniejszych funkcji jest wspomaganie takich



Ryc. 5. Schematycznie pokazane formowanie się filmu hydrofobinowego
Ilustrację wykonano w oparciu o [14].

struktur jak strzępki powietrzne i spory w kolonizowaniu nowych środowisk. Ekspresja genów hydrofobin prowadzi do wydzielania tych białek na zewnątrz komórki do środowiska, co następuje w wierzchołku rosnącej strzępki (I) (Ryc. 5I). Następnie hydrofobiny są odkładane w postaci monomerów lub w niektórych przypadkach w formie dimerów i trimerów (Ryc. 5II) [14, 28, 47]. Wydzielone na zewnątrz strzępki poszczególne cząsteczki zaczynają odkładać się na granicy faz między wodą a powietrzem (Ryc. 5III), gdzie dzięki swojej zdolności do samostannego układania się w monowarstwy i wytwarzania wiązań krzyżowych pomiędzy nimi, tworzą białkowy film (Ryc. 5IV). Zredukowane w ten sposób napięcie powierzchniowe umożliwia ostateczne wydostanie się strzępki ponad powierzchnię wody (Ryc. 5V) [13, 86].

Tak uformowana warstwa ma kilka podstawowych właściwości (Ryc. 5VI). Jest amfipatyczna, elastyczna, posiada dużą wytrzymałość oraz stanowi skuteczne ograniczenie transportu dużych cząsteczek. W wydzielaniu hydrofobin na zewnątrz grzybni najprawdopodobniej uczestniczą pęcherzyki, które formują się w szczytowych częściach strzępek. Wciąż niejasny jest mechanizm przedostawania się monomerów hydrofobin poza ścianę komórkową [82].

Wyróżnić można trzy prawdopodobne nagromadzenia hydrofobin (Ryc. 5). Pierwsze reprezentuje wewnętrzne nagromadzenie hydrofobin, którego stężenie zależy od ekspresji kodujących je genów (Ryc. 5A). Następnie wzrasta nagromadzenie potencjalnie reaktywnych białek na powierzchni błony komórkowej, ale poniżej ściany komórkowej (Ryc. 5B). Gradient stężeń

hydrofobin zapewnia przepływ monomerów tych białek do środowiska wodnego lub dowolnego innego środowiska zewnętrznego (Ryc. 5C) [8, 14].

6. Właściwości hydrofobin

Hydrofobiny uważane są za najbardziej powierzchniowo czynne białka spośród wszystkich dotąd odkrytych [60]. Wszystkie hydrofobiny mają zdolność otaczania różnych powierzchni i obniżania napięcia powierzchniowego. W porównaniu do innych surfaktantów o mniejszej masie cząsteczkowej potrzebna jest mniejsza ilość hydrofobin do osiągnięcia określonego niskiego napięcia powierzchniowego [60]. Najważniejszą właściwością hydrofobin jest zdolność samodzielnego formowania się filmu białkowego złożonego z tych cząsteczek na powierzchniach hydrofobowych lub hydrofilowych oraz powierzchniach międzyfazowych pomiędzy różnymi ośrodkami [10]. Te wytrzymałe, uporządkowane i lepko-sprężyste błony są bardzo istotne w procesie rozrastania się grzybni [30]. W przypadku hydrofobin klasy II błony powierzchniowe powstające na granicy faz woda-powietrze, składające się z filmu hydrofobinowego, przyjmują postać pojedynczych warstw. W przypadku białek klasy I częstym jest formowanie się błon wielowarstwowych [35].

Film hydrofobinowy najczęściej przyjmuje formę powierzchni rurkowatych, a zdolność do jej formowania na granicy faz woda-powietrze jest jedną z najwcześniejszych obserwacji dokonanych podczas badań nad hydrofobinami klasy I [81]. Włókna rurkowate wykazują duże analogie do włókien amyloidowych, które są białkami o zmienionej konformacji. Wszystkie amyloidy, podobnie do hydrofobin, posiadają w swojej budowie charakterystyczną strukturę β -harmonijki. Szczególnie charakterystyczna jest agregacja we włókna amyloidowe białek klasy II [56]. Badania prowadzone nad hydrofobiną HGFI pochodzącą z żagwicy listkowatej (*Grifola frondosa*) oraz hydrofobinami wytwarzanymi przez bocznika ostrygowatego (*Pleurotus ostreatus*) z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych (AFM, Atomic Force Microscope) wykazały, że długość włókien rurkowatych wynosi od 50 do 105 nm, a szerokość waha się w zakresie od 19 do 24 nm. Powierzchnie rurkowate przyjmują formę podwójnej warstwy [23, 41, 49, 88, 89]. W 2013 roku Stanimirova i wsp. [68] przeprowadzili szereg doświadczeń mających na celu wykazanie zmian w ciśnieniu powierzchniowym podczas formowania się filmu hydrofobinowego. Przy użyciu urządzenia zwanego rynną Langmuir'a-Blodgett'a (Langmuir-Blodgett trough) analizowano białko HFBII *T. reesei*. Stopniowo zwiększano ciśnienie wywierane na roztwór zawierający hydrofobiny, a za pomocą mikroskopii sił atomowych obrazowano powstający

film hydrofobinowy i wzajemne relacje pomiędzy cząsteczkami [52].

Eksperymenty badające zdolności hydrofobin do pokrywania różnych powierzchni, prowadzone na płytkach mikrotitracyjnych z barwnikiem nieorganicznym stosowanym jako marker (np. Ponceau S), wykazały znaczne właściwości adhezyjne hydrofobin [25]. Jednak w zależności od klasy hydrofobiny wykazują istotne różnice w zdolności do wiązania się tych cząsteczek do podłoża [3]. Hydrofobiny klasy I przylegają do powierzchni bardzo silnie, natomiast białka należące do klasy II są w stanie oddzielić się od podłoża znacznie łatwiej.

Pomiar kąta zwilżania (WCA, Water Contact Angle) podczas pokrywania warstwą hydrofobin powierzchni płyt miki oraz szkła silikonowanego daje różne wyniki, od znaczącego wzrostu na powierzchni miki do silnej redukcji na powierzchni szkła. Im mniejszy kąt zwilżania, tym hydrofobina wykazuje większe właściwości hydrofobowe [24, 70].

Hydrofobiny nie wykazują właściwości toksycznych, cytotoksycznych czy immunogennych u ludzi, jeżeli dostają się do organizmu podczas spożywania grzybów jadalnych. Jednakże poprzez otaczanie struktur takich jak spory, hydrofobiny stanowią tarczę dla antygenów, a tym samym chronią je przed ludzkim układem immunologicznym [32].

Powierzchniowe warstwy rurkowate pełnią kluczową rolę w maskowaniu immunogenności spor [22, 32]. Poprzez otaczanie powierzchni spor nadają im immunologiczną obojętność i powodują, że charakterystyczne i powtarzalne wzorce molekularne związane z elementami budowy i metabolizmu patogenów (PAMP, Pathogen Associated Molecular Patterns) nie są rozpoznawane przez komórki układu odpornościowego nieswoistego oraz swoistego. Co za tym idzie, hydrofobinowe warstwy zapobiegają aktywacji układu immunologicznego gospodarza, przeciwdziałają powstawaniu stanów zapalnych i uszkodzeniu tkanek. Przyпуска się, że powierzchnie rurkowate, które pokrywają spory zarówno grzybów będących patogenami, jak i tych nie wywołujących chorób, w taki sam sposób zabezpieczają je przed rozpoznaniem przez układ odpornościowy [28, 41, 87].

7. Zastosowanie hydrofobin w różnych gałęziach przemysłu

Hydrofobiny pełnią bardzo różnorodne funkcje biologiczne, dlatego też znajdują szerokie przemysłowe wykorzystanie. W oparciu o właściwości amfipatyczne i zdolność do samoorganizowania się w warstwy hydrofobinowe, białka te mogą znaleźć zastosowanie jako: biosurfaktanty, emulgatory, elementy biomateriałów,

biosensorów i elektrod. Mogą też pełnić istotne funkcje w takich sektorach przemysłu jak: spożywczy, kosmetyczny, nanotechnologiczny, farmaceutyczny i browarniczy. Hydrofobiny posiadają zdolność modyfikowania hydrofobowych i hydrofilowych powierzchni, np. teflonu i szkła [33, 57].

Ze względu na brak właściwości toksycznych, cytotoxycznych i immunogennych hydrofobiny mogą stać się powszechnie wykorzystywanymi składnikami powierzchniowo czynnymi w przemyśle spożywczym [14, 51, 54, 67, 73]. Białka te posiadają zdolność stabilizowania kropli oleju i mogą działać tak samo jak powszechnie stosowane emulgatory w przetwórstwie spożywczym czy podczas rafinacji olejów [63, 67]. Zdolności emulgacyjne hydrofobin mogą być badane i porównywane razem z typowymi emulgatorami spożywczymi, takimi jak kazeinian sodu, przy użyciu emulsji oleju sojowego. Hydrofobiny klasy II wykazują większą aktywność emulgacyjną i dłuższy okres stabilizacji kropli oleju niż białka klasy I [14, 24, 67].

Ze względu na wysoką elastyczność powierzchniową błon formowanych przez hydrofobiny, są one cenione za swoje właściwości, które przyczyniają się do długotrwałego stabilizowania różnych faz w produktach spożywczych. Na przykład białka te potrafią stabilizować rozproszone pęcherzyki powietrza w lodach [2, 61]. Do takich zastosowań w cukrownictwie często wykorzystywane jest bakteryjne białko BslA z *B. subtilis* [69]. Dzięki obecności tego białka ustabilizowane pęcherzyki powietrza pełnią rolę izolatora, co spowalnia proces roztopiania się lodów. Ponadto proces stabilizacji pęcherzyków powietrza ogranicza powstawanie kryształków lodu, co zapewnia gładką konsystencję produktu. Zastosowanie białka Bs1A może pozwolić producentom zmniejszyć zawartość tłuszczów nasyconych, a więc i kaloryczność lodów [31, 69]. Zdolność do formowania pian może być znacznie większa dla białek klasy II niż klasy I. Ta zależność niesie ze sobą potencjalne nowe zastosowania w przemyśle spożywczym. Piany i bańki utworzone dzięki stabilności białka HFBI potrafią utrzymać się przynajmniej przez 4 miesiące. W niektórych przypadkach, przy niewielkim stężeniu (do 0,1% masowego), tak utworzona piana może pozostać stabilna nawet do kilku lat [21].

Zdolność do łatwego pienienia się hydrofobin niesie też negatywne efekty w postaci tendencji do nadmiernego pienienia się, gazowania i w efekcie wybuchania niektórych napojów, na przykład piwa. Głównym czynnikiem powstawania takiego efektu jest białko klasyfikowane do klasy II hydrofobin wytwarzanych przez *Fusarium culmorum*, grzyba będącego patogenem wywołującym infekcje u jęczmienia. Grzyby z rodzajów *Fusarium*, *Nigrospora* i *Trichoderma* wytwarzają hydrofobiny z dużą wydajnością, a obecność tych grzybów w gazowanych napojach powoduje ich wybuchanie [7, 37, 59, 62].

Amfipatyczne właściwości hydrofobin są również wykorzystywane w wielu technikach izolacji białek. Zdolność do łączenia się docelowego białka z hydrofobinami jest wykorzystywana w izolacji metodą wodnych układów dwufazowych (ATPS, Aqueous Two-Phase Systems) [14, 46]. Najbardziej efektywnie działającymi hydrofobinami wykorzystywanymi w tej metodzie są hydrofobiny klasy II. Białko HFBI jest używane jako marker dla endoglukanazy celulozy I (EGI, Cellulase Endoglucanase I), a przyłączanie się hydrofobiny do tego enzymu i powstawanie kompleksu EGI-HFBI jest najłatwiejszą, najszybszą i najtańszą metodą izolacji EGI [15, 39, 46, 54]. Zdolność przyłączania się hydrofobin do różnych białek może być wykorzystywana do unieruchamiania enzymów i przeciwciał. Unieruchomienie lipazy przez hydrofobiny z *P. ostreatus* prowadzą do wzmożonej aktywności tego enzymu oraz jego większej stabilności termicznej [38, 45, 54]. Unieruchomienie związków smakowych może być stosowane w przemyśle spożywczym do wspomagania dłuższego utrzymywania się aromatów w jedzeniu i napojach [67].

Pokrywanie powierzchni biosensorów i elektrod przez hydrofobiny może przyczynić się do zwiększenia ich hydrofobowości, a co za tym idzie zahamowania ich denaturacji i zachowania długotrwałej aktywności [4, 85]. Hydrofobiny znajdują również zastosowanie w nanotechnologiach. Pokrycie filmem hydrofobinowym węglowych nanorurek wielościennych, (MWNT, Multi-Walled Nanotubes) pozwoliło zwiększyć ich wrażliwość, poszerzyć zakres liniowy, obniżyć granicę wykrywalności, a co za tym idzie przyspieszyć reakcję wykrywania glukozy [74, 75]. Pokrycie powierzchni elektrod hydrofobiną HYDPt1 z *Pleurotus ostreatus* powoduje, że stają się one stabilne w szerszym zakresie pH. Hydrofobinowy film również skutecznie zapobiega utlenianiu się substratów elektrod [39].

Hydrofobiny są też wykorzystywane do zwiększania biokompatybilności implantów medycznych w zminimalizowaniu reakcji ze strony układu immunologicznego [55, 82]. Powszechnie wykorzystywane polimery pokryte warstwą hydrofobin SC3 w procesie powlekania obrotowego wykazują się zmniejszonym współczynnikiem tarcia o ok. 70–80% w porównaniu do polimerów niepowlekanych. Właściwość tę wykorzystuje się do produkcji materiałów medycznych takich jak cewniki [43, 90]. Zdolność do samoorganizowania się warstw hydrofobinowych została wykorzystana w produkcji aplikowanych doustnie nierozpuszczalnych w wodzie leków. Dodatek hydrofobiny SC3 do zawiesiny cyklosporyny A i nifedypiny zwiększył biodostępność tych leków odpowiednio dwu- i sześciokrotnie [22].

Hydrofobiny klasy II są również wykorzystywane do stymulowania wzrostu komórek na podłożach stałych [5]. Białko HFBI umożliwia łatwe przyleganie

Tabela I
Systemy ekspresyjne prokariotyczne i eukariotyczne wykorzystywane w produkcji hydrofobin i ich wydajność

	Organizm	Pochodzenie hydrofobiny	Nazwa białka	Wydajność [mg/l]	Źródło
Układ prokariotyczny	<i>Escherichia coli</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	Hyd2	10	[24]
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	HFBI	600	[20, 63]
Układ eukariotyczny	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	DewA	33	[70]
	<i>Pichia pastoris</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	HFBI	120	[29]
	<i>Pichia pastoris</i>	<i>Grifolia frondosa</i>	HFBI	90	[14, 78]
	<i>Pichia pastoris</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	RodA i RodB	200–300	[7]

kolagenu do hydrofobowej powierzchni poli(dimetylosiloksanu) (PDMS, Polydimethylsiloxane) – polimeru wykorzystywanego m.in. do produkcji soczewek kontaktowych. Kompleks HFBI-kolagen umożliwia przyleganie i wzrost ludzkich embrionalnych komórek macierzystych, z których różnicowanie nastawione jest na powstawanie nerki. Natomiast kompleks białka HFBI-surowica krwi wspomaga powstawanie neutralnych komórek macierzystych [28, 43, 91].

Gromadzenie się hydrofobinowych warstw na granicy faz pomiędzy hydrofobowymi i hydrofilowymi cieczami może być wykorzystywane do stabilizowania różnych emulsji. Szczególne zastosowanie znajduje zdolność hydrofobin do stabilizowania emulsji w przypadku produkcji kremów i maści [74].

8. Przemysłowa produkcja hydrofobin

Odkąd możliwe stało się pozyskiwanie hydrofobin w niewielkich ilościach z naturalnych źródeł, wzrosło zainteresowanie produkcją zrekombinowanych białek na znacznie większą skalę [11, 30, 38, 45, 54]. Chociaż hydrofobiny w środowisku naturalnym wytwarzane są przez grzyby strzępkowe to z powodzeniem udaje się je otrzymać wykorzystując do tego inne systemy ekspresyjne, zarówno prokariotyczne jak i eukariotyczne. Stosowane są różne metody otrzymywania hydrofobin jak homologiczna bądź heterologiczna ekspresja genów [7]. W przemysłowej produkcji tych białek często wykorzystuje się syntezę metodą „fed-batch” polegającą na przeprowadzaniu procesu fermentacji w specjalnie do tego zaprojektowanych reaktorach, dzięki którym można precyzyjnie kontrolować stężenie dostarczanych substratów. Pozwala to na zoptymalizowanie procesu wytwarzania na najbardziej wydajnym poziomie [50].

Otrzymane w taki sposób hydrofobiny wykazują właściwości bardzo zbliżone do białek wytwarzanych przez grzyby w środowisku naturalnym, np. hydrofobiny FcHyd5p (klasa II) i FcHyd3p (klasa I) z *F. culmorum* produkowane w systemie ekspresyjnym *Pichia pastoris* (drożdże metylotrofowe) wykazują podobne

właściwości jak białka produkowane naturalnie przez tego grzyba [14, 63]. Niekiedy występują też problemy z pozyskiwaniem hydrofobin. Przykładem jest homologiczna nadprodukcja białka SC3 u *S. commune*, która jest naturalnie hamowana przez wyciszenie genu. W przypadku wprowadzenia do komórek *S. commune* więcej niż jednej kopii genu kodującego białko SC3 dochodzi do wyciszenia genu poprzez metylację kodującego DNA, co doprowadza do zahamowania wytwarzania białka SC3 [36]. Tabela I przedstawia przykładowe wykorzystanie systemów ekspresyjnych prokariotycznych i eukariotycznych w produkcji hydrofobin oraz wydajność, jaką można w ten sposób osiągnąć.

Otrzymywanie funkcjonalnych hydrofobin odbywa się najwydajniej z wykorzystaniem prokariotycznego systemu ekspresyjnego, jeżeli w wektorze ekspresyjnym umieści się gen kodujący hydrofobinę z *T. reesei*. Przedstawicielem grupy drożdży metylotrofowych są grzyby *P. pastoris*, zdolne do wykorzystywania metanolu jako jedynego źródła węgla. Są one popularną platformą do ekspresji białek heterologicznych łączącą wysoką efektywność produkcji protein z łatwością operowania tym systemem ekspresji [8, 16]. Układ eukariotyczny jest mniej wydajny, jednak w przypadku *P. pastoris* transformowanej genem z *A. fumigatus* wydajność jest tylko dwukrotnie mniejsza. Ze względu na łatwość hodowli i szybki wzrost, *T. reesei* może być również skutecznie wykorzystywana jako nośnik innej hydrofobiny pochodzącej z *A. fumigatus*, aczkolwiek uzyskana wydajność jest najniższa z porównywanych.

9. Podsumowanie

Hydrofobiny stanowią rodzinę niewielkich białek wytwarzanych głównie przez grzyby strzępkowe. Chociaż coraz częściej izolowane są białka o podobnych właściwościach do hydrofobin z organizmów prokariotycznych. Cechą charakterystyczną sekwencji aminokwasowych hydrofobin jest obecność licznych reszt cysteinowych. Hydrofobiny biorą udział w cyklu rozwojowym grzybów oraz są ważnym czynnikiem pozwalającym

przetrwają warunki stresowe. Białka te posiadają właściwości hydrofobowe, zdolność do spontanicznego formowania się w stabilny film białkowy oraz zdolność do obniżania napięcia powierzchniowego.

Unikatowe właściwości hydrofobin sprawiają, że cieszą się one coraz większym zainteresowaniem pod kątem ich potencjalnego zastosowania w przemyśle. Opracowywane są nowe sposoby ich wykorzystania w różnych gałęziach gospodarki. Szerokie zastosowanie odnajdują w branży spożywczej, gdzie mogą z powodzeniem zastępować powszechnie wykorzystywane m.in. stabilizatory i emulgatory. Poza sektorem spożywczym często hydrofobiny wykorzystywane są w przemyśle farmaceutycznym, ale także w metodach biologii molekularnej.

Hydrofobiny z naturalnych źródeł otrzymywane są w niewielkich ilościach, jednak z powodzeniem można je pozyskiwać wykorzystując do tego celu inne systemy ekspresyjne. Prowadzi się coraz to nowe badania nad hydrofobinami i rozwojem metod ich otrzymywania. Wydaje się obiecującym rozszerzenie badań odnośnie prokariotycznych białek homologicznych do hydrofobin i ich potencjalnego zastosowania.

Podziękowania

Praca sfinansowana z działalności statutowej UMK.

Piśmiennictwo

1. Arnauteli S., MacPhee C.E., Stanley-Wall N.R.: Just in case it rains: building a hydrophobic biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Curr. Opin. Microbiol.* **34**, 7–12 (2016)
2. Asghari A.K., Norton I., Mills T., Sadd P., Spyropoulos F.: Interfacial and foaming characterisation of mixed protein-starch particle systems for food-foam applications. *Food Hydrocoll.* **53**, 311–319 (2016)
3. Askolin S., Linder M., Scholtmeijer K., Tenkanen M., Penttilä M., de Vocht M.L., Wösten H.A.B.: Interaction and comparison of a class I hydrophobin from *Schizophyllum commune* and class II hydrophobins from *Trichoderma reesei*. *Biomacromolecules*, **7**, 1295–1301 (2006)
4. Bilewicz R., Witomski J., Van der Heyden A., Tagu D., Palin B., Rogalska E.: Modification of electrodes with self-assembled hydrophobin layers. *J. Phys. Chem. B.* **105**, 9772–9777 (2001)
5. Brandani G.B., Schor M., Morris R., Stanley-Wall N., MacPhee C.E., Marenduzzo D., Zachariae U.: The bacterial hydrophobin BslA is a switchable ellipsoidal janus nanocolloid. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids*, **31**, 11558–11563 (2015)
6. Bromley K.M., Morris R.J., Hobbey L., Brandani G., Gillespie R.M.C., McCluskey M., Zachariae U., Marenduzzo D., Stanley-Wall N.R., MacPhee C.E.: Interfacial self-assembly of a bacterial hydrophobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 5419–5424 (2015)
7. Bruns S., Kniemeyer O., Hasenberg M., Aimaniananda V., Nietzsche S., Thywissen A., Jeron A., Latgé J.-P., Brakhage A.A., Gunzer M.: Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS Pathog.* **6**, e1000873 (2010)
8. Camattari A., Goh A., Yip L.Y., Tan A.H.M., Ng S.W., Tran A., Liu G., Liachko I., Dunham M.J., Rancati G.: Characterization of a panARS-based episomal vector in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* for recombinant protein production and synthetic biology applications. *Microb. Cell Fact.* **15**, 139 (2016)
9. Chaplin M.F., Kennedy J.F. (w) Carbohydrate Analysis: A Practical Approach. Red.: M.F. Chaplin, J.F. Kennedy, IRL Press, Oxford (1994), s. 1–324.
10. Cicatiello P., Dardano P., Pirozzi M., Gravagnuolo A.M., De Stefano L., Giardina P.: Self-assembly of two hydrophobins from marine fungi affected by interaction with surfaces. *Bio-technol. Bioeng.* **114**, 2173–2186 (2017)
11. Collén A., Persson J., Linder M., Nakari-Setälä T., Penttilä M., Tjerneld F., Sivars U.: A novel two-step extraction method with detergent/polymer systems for primary recovery of the fusion protein endoglucanase I-hydrophobin I. *Acta Biochim. Biophys. – Gen. Subj.* **1569**, 139–150 (2002)
12. Cooper A., Kennedy M.W.: Biofoams and natural protein surfactants. *Biophys. Chem.* **151**, 96–104 (2010)
13. Cox A., Aldred D.L., Russell A.B.: Exceptional stability of food foams using class II hydrophobin HFBII. *Food Hydrocoll.* **23**, 366–376 (2009)
14. Cox P. W., P. Hooley.: Hydrophobins: New prospects for biotechnology. *Fungal Biol. Rev.* **23**, 40–47 (2009)
15. Dagenais T.R.T., Giles S.S., Aimaniananda V., Latgé J.-P., Hull C.M., Keller N.P.: *Aspergillus fumigatus* LaeA-mediated phagocytosis is associated with a decreased hydrophobin layer. *Infect. Immun.* **78**, 823–829 (2010)
16. Daly R., Hearn M.T.: Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* **18**, 119–138 (2005)
17. Danov K.D., Kralchevsky P.A., Radulova G.M., Basheva E.S., Stoyanov S.D., Pelan E.G.: Shear rheology of mixed protein adsorption layers vs their structure studied by surface force measurements. *Adv. Colloid Interface Sci.* **222**, 148–161 (2015)
18. de Vocht M.L. de Reviakine I., Wösten H.A.B., Brisson A., Wessels J.G.H., Robillard G.T.: Structural and functional role of the disulfide bridges in the hydrophobin SC3. *J. Biol. Chem.* **275**, 28428–28432 (2000)
19. de Vocht M.L., Reviakine I., Ulrich W.-P., Bergsma-Schutter W., Wösten H.A.B., Vogel H., Brisson A., Wessels J.G.H., Robillard G.T.: Self-assembly of the hydrophobin SC3 proceeds via two structural intermediates. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **11**, 1199–1205 (2002)
20. de Vries O.M.H., Fekkes M.P., Wösten H.A.B., Wessels J.G.H.: Insoluble hydrophobin complexes in the walls of *Schizophyllum commune* and other filamentous fungi. *Arch. Microbiol.* **159**, 330–335 (1993)
21. Dimitrova L.M., Boneva M.P., Danov K.D., Kralchevsky P.A., Basheva E.S., Marinova K.G., Petkov J.T., Stoyanov S.D.: Limited coalescence and Ostwald ripening in emulsions stabilized by hydrophobin HFBII and milk proteins. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **509**, 521–538 (2016)
22. Ebbole D.J.: Hydrophobins and fungal infection of plants and animals. *Trends Microbiol.* **5**, 405–408 (1997)
23. Gandier J.-A., Master E.R.: *Pichia pastoris* is a suitable host for the heterologous expression of predicted class I and class II hydrophobins for discovery, study, and application in biotechnology. *Microorganisms*, **6**, 3–23 (2018)
24. Gravagnuolo A.M., Morales-Narváez E., Matos C.R.S., Longobardi S., Giardina P., Merkoçi A.: On-the-spot immobilization of quantum dots, graphene oxide, and proteins via hydrophobins. *Adv. Funct. Mater.* **25**, 6084–6092 (2015)
25. Grove S.N., Bracher C.E., Morre D.J.: An ultrastructural basis for hyphal tip growth in *Pythium ultimum*. *Am. J. Bot.* **57**, 245–255 (1970)

26. Haas Jimoh Akanbi M., Post E., Meter-Arkema A., Rink R., Robillard G.T., Wang X., Wösten H.A.B., Scholtmeijer K.: Use of hydrophobins in formulation of water insoluble drugs for oral administration. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **75**, 526–531 (2010)
27. Hogleya L., Ostrowski A., Francesco R.V., Keith B. M., Portera M., Prescottt A.R., MacPhee C.E., van Aaltena D.M.F., Stanley-Walla N.R.: BslA is a self-assembling bacterial hydrophobin that coats the *Bacillus subtilis* biofilm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**, 13600–13605 (2013)
28. Hou S., Yang K., Qin M., Feng X.-Z., Guan L., Yang Y., Wang C.: Patterning of cells on functionalized poly(dimethylsiloxane) surface prepared by hydrophobin and collagen modification. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 918–922 (2008)
29. Houmadi S., Ciuchi F., De Santo M.P., De Stefano L., Rea I., Giardina P., Armenante A., Lacaze E., Giocondo M.: Langmuir-blodgett film of hydrophobin protein from *Pleurotus ostreatus* at the air-water interface. *Langmuir*, **24**, 12953–12957 (2008)
30. Hungund B., Habib, C., Hiregoudar V., Umloti S., Wandkar S., Tennalli G.: Production and characterization of hydrophobins from fungal source. (w) Biotechnology and Biochemical Engineering. Select Proceedings of ICACE, red. B.D. Prasanna, N.G. Sathyanarayana, V.V. Praven, Springer SBM, Singapore, 2016, s. 48–53
31. Kaufman G., Liu W., Williams D.M., Choo Y., Gopinadhan M., Samudrala N., Sarfati R., Yan E.C.Y., Regan L., Osuji C.O.: Flat drops, elastic sheets, and microcapsules by interfacial assembly of a bacterial biofilm protein, BslA. *Langmuir*, **33**, 13590–13597 (2017)
32. Kerr S.C., Fischer G.J., Sinha M., McCabe O., Palmer J.M., Choera T., Lim F.Y., Wimmerova M., Carrington S.D., Yuan S., Lowell C.A., Oscarson S., Keller N.P., Fahy J.V.: FleA expression in *Aspergillus fumigatus* is recognized by fucosylated structures on mucins and macrophages to prevent lung infection. *PLoS Pathog.* **12**, 1005555 (2016)
33. Kershaw M.J., Wakley G., Talbot N.J.: Complementation of the mpg1 mutant phenotype in *Magnaporthe grisea* reveals functional relationships between fungal hydrophobins. *EMBO J.* **17**, 3838–3849 (1998)
34. Khalesi M., Gebruers K., Derdelinckx G.: Recent advances in fungal hydrophobin towards using in industry. *Protein J.* **34**, 243–255 (2015)
35. Kisko K.: Characterization of hydrophobin proteins at interfaces and in solutions using X-rays. Academic Dissertation. Acad. Diss. University of Helsinki, Faculty of Science, Department of Physics. (2008)
36. Kottmeier K., Günther T.J., Weber J., Kurtz S., Ostermann K., Rödel G., Bley T.: Constitutive expression of hydrophobin HFBI from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and its pre-purification by foam separation during cultivation. *Eng. Life Sci.* **12**, 162–170 (2012)
37. Kubicek C.P., Baker S., Gamauf C., Kenerley C.M., Druzhinina I.S.: Purifying selection and birth-and-death evolution in the class II hydrophobin gene families of the Ascomycete *Trichoderma/Hypocrea*. *BMC Evol. Biol.* **8**, 4–20 (2008)
38. Kulkarni S., Nene S., Joshi K.: Production of hydrophobins from fungi. *Process Biochem.* **61**, 1–11 (2017)
39. Kupski L., Pagnussatt F.A., Buffon J.G., Furlong E.B.: Endoglucanase and total cellulase from newly isolated *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*: production, characterization, and thermal stability. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **172**, 458–468 (2014)
40. Kwan A.H., Macindoe I., Vukasin P.V., Morris V.K., Kass I., Gupte R., Mark A.E., Templeton M.D., Mackay J.P., Sunde M.: The Cys3-Cys4 loop of the hydrophobin EAS is not required for rodlet formation and surface activity. *J. Mol. Biol.* **382**, 708–720 (2008).
41. Ley K., Christofferson A., Penna M., Winkler D., Maclaughlin S., Yarovsky I.: Surface-water interface induces conformational changes critical for protein adsorption: implications for monolayer formation of EAS hydrophobin. *Front. Mol. Biosci.* **2**, 1–12 (2015)
42. Li B., Wang X., Li Y., Paananen A., Szilvay G., Qin M., Wang W., Cao Y.: Single-molecule force spectroscopy reveals self-assembly enhanced surface binding of hydrophobins. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* (2018)
43. Li X., Hou S., Feng X., Yu Y., Ma J., Li L.: Patterning of neural stem cells on poly(lactic-co-glycolic acid) film modified by hydrophobin. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **74**, 370–374 (2009)
44. Lienemann M., Grunér M.S., Paananen A., Siika-Aho M., Linder M.B.: Charge-based engineering of hydrophobin HFBI: effect on interfacial assembly and interactions. *Biomacromolecules*, **16**, 1283–1292 (2015)
45. Linder M., Szilvay G.R., Nakari-Setälä T., Söderlund H., Penttilä M.: Surface adhesion of fusion proteins containing the hydrophobins HFBI and HFBI from *Trichoderma reesei*. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **11**, 2257–2266 (2002)
46. Linder M.B., Qiao M., Laumen F., Selber K., Hyytiä T., Nakari-Setälä T., Penttilä M.E.: Efficient purification of recombinant proteins using hydrophobins as tags in surfactant-based two-phase systems. *Biochem.* **43**, 11873–11882 (2004)
47. Linder M.B., Szilvay G.R., Nakari-Setälä T., Penttilä M.E.: Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 877–896 (2005)
48. Linder M.B.: Hydrophobins: Proteins that self assemble at interfaces. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **14**, 356–363 (2009)
49. Lo V.C., Ren Q., Pham C.L.L., Morris V.K., Kwan A.H., Sunde M.: Fungal hydrophobin proteins produce self-assembling protein films with diverse structure and chemical stability. *Nanomaterials*, **4**, 827–843 (2014)
50. Michelz Beitel S., Fontes Coelho L., Sass D.C., Contiero J.: Environmentally friendly production of D(-) lactic acid by *Sporolactobacillus nakayamae*: investigation of fermentation parameters and fed-batch strategies. *Int. J. Microbiol.* **2017**, 4851612 (2017)
51. Murray B.S., Dickinson E., Wang Y.: Bubble stability in the presence of oil-in-water emulsion droplets: influence of surface shear versus dilatational rheology. *Food Hydrocoll.* **23**, 1198–1208 (2009)
52. Niu B., Gong Y., Gao X., Xu H., Qiao M., Li W.: The functional role of Cys3-Cys4 loop in hydrophobin HGFI. *Amino Acids.* **46**, 2615–2625 (2014)
53. Niu B., Li B., Wang H., Guo R., Xu H., Qiao M., Li, W.: Investigation of the relationship between the rodlet formation and Cys3-Cys4 loop of the HGFI hydrophobin. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **150**, 344–351 (2017)
54. Niu B., Wang D., Yang Y., Xu H., Qiao M.: Heterologous expression and characterization of the hydrophobin HFBI in *Pichia pastoris* and evaluation of its contribution to the food industry. *Amino Acids.* **43**, 763–771 (2012)
55. Palomo J.M., Peñas M.M., Fernández-Lorente G., Mateo C., Pisabarro A.G., Fernández-Lafuente R., Ramírez L., Guisán J.M.: Solid-phase handling of hydrophobins: immobilized hydrophobins as a new tool to study lipases. *Biomacromolecules*, **4**, 204–210 (2003)
56. Pawłowska B.K., Sobieszcańska B.M.: Amyloidy, białka powszechne wśród drobnoustrojów. *Post. Mikrobiol.* **56**, 77–87 (2017)
57. Portaccio M., Gravagnuolo A.M., Longobardi S., Giardina P., Rea I., De Stefano L., Cammarota M., Lepore M.: ATR FT-IR spectroscopy on Vmh2 hydrophobin self-assembled layers for teflon membrane bio-functionalization. *Appl. Surf. Sci.* **351**, 673–680 (2015)

58. Postulkova M., Riveros-Galan D., Cordova-Agiular K., Zitkova K., Verachtert H., Derdelinckx G., Dostalek P., Ruzicka M.C., Branyik T.: Technological possibilities to prevent and suppress primary gushing of beer. *Trends Food Sci. Technol.* **49**, 64–73 (2016)
59. Raffaini G., Milani R., Ganazzoli F., Resnati G., Metrangolo P.: Atomistic simulation of hydrophobin HFBI conformation in aqueous and fluorinated media and at the water/vacuum interface. *J. Mol. Graph. Model.* **63**, 8–14 (2016)
60. Richter M.J., Schulz A., Subkowski T., Böker A.: Adsorption and rheological behavior of an amphiphilic protein at oil/water interfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **479**, 199–206 (2016)
61. Sallada N.D., Dunn K.J., Berger B.W.: A structural and functional Role for Disulfide Bonds in a Class II Hydrophobin. *Biochemistry*, **57**, 645–653 (2018)
62. Sarlin T., Nakari-Setälä T., Linder M., Penttilä M., Haikara A.: Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of malt. *J. Inst. Brew.* **111**, 105–111 (2005)
63. Scholtmeijer K., Janssen M.I., Leeuwen M.B.M. van Kooten T.G., van Hektor H., Wosten H.A.B.: The use of hydrophobins to functionalize surfaces. In: *Bio-Medical Materials and Engineering*. IOS Press. 447–454 (2004)
64. Scholtmeijer K., Wessels J.G., Wösten H.A.: Fungal hydrophobins in medical and technical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 1–8 (2001)
65. Schor M., Reid J.L., MacPhee C.E., Stanley-Wall N.R.: The diverse structures and functions of surfactant proteins. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 610–620 (2016)
66. Schuurs T.A., Schaeffer E., Wessels J.G.: Homology dependent silencing of the SC3 gene in *Schizophyllum commune*. *G. Genetics*, **147**, 589–596 (1997)
67. Schwarzjans J.-P., Wibberg D., Winkler A., Luttermann T., Kalinowski J., Friehs K.: Integration event induced changes in recombinant protein productivity in *Pichia pastoris* discovered by whole genome sequencing and derived vector optimization. *Microb. Cell Factories*, **15**, 84 (2016)
68. Stanimirova R.D., Gurkov T.D., Kralchevsky P.A., Balashev K.T., Stoyanov S.D., Pelan E.G.: Surface pressure and elasticity of hydrophobin HFBI layers on the air–water interface: rheology versus structure detected by AFM imaging. *Langmuir*, **29**, 6053–6067 (2013)
69. Stanley-Walla N.R., MacPhee C.E.: Connecting the dots between bacterial biofilms and ice cream. *Phys. Biol.* **12**, 063001 (2015)
70. Sunde M., Pham C.L.L., Kwan A.H.: Molecular characteristics and biological functions of surface-active and surfactant proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 585–608 (2017)
71. Szilvay G.R., Nakari-Setälä T., Linder M.B.: Behavior of *Trichoderma reesei* hydrophobins in solution: interactions, dynamics, and multimer formation. *Biochem.* **45**, 8590–8598 (2006)
72. Szilvay G.R., Paananen A., Laurikainen K., Vuorimaa E., Lemmetyinen H., Peltonen J., Linder M.B.: Self-assembled hydrophobin protein films at the air–water interface: structural analysis and molecular engineering. *Biochem.* **46**, 2345–2354 (2007)
73. Tchienbou-Magaia F.L., Norton I.T., Cox P.W.: Hydrophobins stabilised air-filled emulsions for the food industry. *Food Hydrocoll.* **23**, 1877–1885 (2009)
74. Valo H.K., Laaksonen P.H., Peltonen L.J., Linder M.B., Hirvonen J.T., Laaksonen T.J.: Multifunctional hydrophobin: toward functional coatings for drug nanoparticles. *ACS Nano*, **4**, 1750–1758 (2010)
75. Wang K., Xiao Y., Wang Y., Feng Y., Chen C., Zhang J., Zhang Q., Meng S., Wang Z., Yang H.: Self-assembled hydrophobin for producing water-soluble and membrane permeable fluorescent dye. *Sci. Rep.* **6**, (2016)
76. Wang X., Graveland-Bikker J.F., de Kruijff C.G., Robillard G.T.: Oligomerization of hydrophobin SC3 in solution: from soluble state to self-assembly. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **13**, 810–821 (2004)
77. Wang X., Shi F., Wösten H.A.B., Hektor H., Poolman B., Robillard G.T.: The SC3 hydrophobin self-assembles into a membrane with distinct mass transfer properties. *Biophys. J.* **88**, 3434–3443 (2005)
78. Wang Z., Feng S., Huang Y., Li S., Xu H., Zhang X., Bai Y., Qiao M.: Expression and characterization of a *Grifola frondosa* hydrophobin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **72**, 19–25 (2010)
79. Wessels J.G., de Vries O.M., Asgeirsdóttir S.A., Springer J.: The *thn* mutation of *Schizophyllum commune*, which suppresses formation of aerial hyphae, affects expression of the SC3 hydrophobin gene. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2439–2445 (1991)
80. Wessels J.G.H.: Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**, 413–437 (1994)
81. Whiteford J.R., Spanu P.D.: Hydrophobins and the interactions between fungi and plants. *Mol. Plant Pathol.* **3**, 391–400 (2002)
82. Wösten H.A., de Vocht M.L.: Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochim. Biophys. Acta.* **1469**, 79–86 (2000)
83. Wösten H.A.: Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 625–646 (2001)
84. Wösten H.A.B., de Vries O.H.H., Wessels J.G.H.: Interfacial self-assembly of a fungal hydrophobin into a hydrophobic rodlet layer. *Plant Cell*, **5**, 1567–1574 (1993)
85. Wösten H.A.B., Scholtmeijer K.: Applications of hydrophobins: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 1587–1597 (2015)
86. Wu Y., Li J., Yang H., Shin H.-J.: Fungal and mushroom hydrophobins: A review. *J. Mushroom*, **15**, 1–7 (2017)
87. Wurster S., Thielen V., Weis P., Walther P., Elias J., Waaga-Gasser A.M., Dragan M., Dandekar T., Einsele H., Löffler J., Ullmann A.J.: Mucorales spores induce a proinflammatory cytokine response in human mononuclear phagocytes and harbor no rodlet hydrophobins. *Virulence*, **8**, 1708–1718 (2017)
88. Yamasaki R., Takatsuji Y., Asakawa H., Fukuma T., Haruyama T.: Flattened-top domical water drops formed through self-organization of hydrophobin membranes: a structural and mechanistic study using atomic force Microscopy. *ACS Nano*, **10**, 81–87 (2016)
89. Yu L., Zhang B., Szilvay G.R., Sun R., Jänis J., Wang Z., Feng S., Xu H., Linder M.B., Qiao M.: Protein HGFI from the edible mushroom *Grifola frondosa* is a novel 8 kDa class I hydrophobin that forms rodlets in compressed monolayers. *Microbiol. Read. Engl.* **154**, 1677–1685 (2008)
90. Zhao L., Xu H., Li Y., Song D., Wang X., Qiao M., Gong M.: Novel application of hydrophobin in medical science: a drug carrier for improving serum stability. *Sci. Rep.* **6**, 26461 (2016)
91. Żuchowska A., Kwiatkowski P., Jastrzębska E., Chudy M., Dybko A., Brzozka Z.: Adhesion of MRC-5 and A549 cells on poly(dimethylsiloxane) surface modified by proteins. *Electrophoresis*, **37**, 536–544 (2016)