

Hidrofobini i njihova biotehnoška primjena

Oraić, Mario

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:640310>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Mario Oraić

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

HIDROFOBINI I NJIHOVA BIOTEHNOLOŠKA PRIMJENA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Zagreb, 2023.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

5. srpnja 2023.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

22. rujna 2023.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	V
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. BIOTEHNOLOŠKA PRIMJENA HIDROFOBINA	5
2.1. Biološka uloga hidrofobina	5
2.2. Struktura hidrofobinskog monosloja	6
2.3. Ekspresija i izolacija hidrofobina	8
2.4. Biotehnološke primjene hidrofobina	9
2.4.1. Stabilizacija pjena i emulzija	9
2.4.2. Imobilizacija stanica pomoću fuzijskih hidrofobina	11
2.4.3. Modifikacija površina pomoću hidrofobina.....	13
2.4.4. Primjena hidrofobina u farmaceutskoj industriji.....	15
2.4.5. Uporaba hidrofobina kod enzimске razgradnje sintetskih poliestera.....	17
2.5. Zaključak.....	21
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XXIII

§ Sažetak

Hidrofobini su mali proteini koji su ekskluzivno nađeni u nitastim gljivama. Imaju ključnu ulogu u razvoju i razmnožavanju tih organizama kao i u mehanizmu infekcije kod parazitnih organizama. Podijeljeni su na 2 razreda. 1. razred hidrofobina stvara stabilne i inertne štapičaste monoslojeve na granicama hidrofobnih/hidrofilnih faza dok su hidrofobini 2. razreda kompaktniji i stvaraju neuređene strukture. Jedni su od najjačih površinski aktivnih tvari što otvara vrata za mnoge biotehnoške primjene. Stabilizacija pjena i emulzija je bitan aspekt prehrambene industrije u kojoj mogu doprinijeti hidrofobini smanjujući površinsku napetost između dvije faze. Također mogu pospješiti topljivost inače netopljivih lijekova i produljiti vrijeme djelovanja zahvaljujući stvaranju amfipatskog sloja na njihovoj površini ili stabilizaciji prilikom skladištenja. Veliku primjenu imaju i u modificiranju i funkcionalizaciji površina bilo kao samostalni ili u obliku fuzijskih proteina. Sve veća pažnja se pridodaje biorazgradnji sintetskih poliestera koji su globalni problem. Hidrofobini su se i ovdje pokazali kao korisne molekule koje stimuliraju razgradnju enzimima tako da ih imobiliziraju na površinu.

U ovome je radu opisana struktura trenutno poznatih hidrofobina kao i njihova biološka uloga i biotehnoška primjena.

§ 1. UVOD

Hidrofobini su skupina malih amfipatskih proteina koje proizvode nitaste gljive. Imaju od 70 do 350 aminokiselinskih ostataka, a zajedničko im je svojstvo samoorganizacija na hidrofilno-hidrofobnim granicama kao što su voda-zrak, voda-ulje i slično. Proučavajući njihovu primarnu strukturu može se uočiti obrazac od 8 cisteinskih ostataka koji su povezanih disulfidnom vezom u motivu C1-C6, C2-C5, C3-C4 i C7-C8. Osim obrasca disulfidnih veza i amfipatije, hidrofobini međusobno ne pokazuju značajnu sličnost u primarnoj strukturi po pitanju aminokiselinskog slijeda, ali svejedno pokazuju slične grafove hidropatije. Posljedica analognih grafova hidropatije leži u zajedničkom oblikovanju hidrofobnih i hidrofilnih domena što će biti elaborirano u ostatku teksta. Hidrofobini su podijeljeni u 2 razreda zbog razlika u primarnoj strukturi kao i različitih fizikalnih svojstava. 1. razred hidrofobina ima izrazito slabo očuvanu primarnu strukturu i razmak između cisteinskih ostataka dok 2. razred ima međusobno nešto sličniju primarnu strukturu i pravilnije razmake između cisteinskih ostataka¹² (slika 1).

1. razred hidrofobina

```

C# 1 23 4 5 67 8
EAS IGPNTCSIDYKPYCCSMSPGAG-SPG---LLNL--IPVLS-----ASLGCVVG---VIG-----SQCG-ASVKCCKDDVNTGNSFIIINAANCV-----
RodA QATEKCGDQAO-LSCCNKATYAGDVEDIDEGILAGT--LKNLIGGGS-GTEGLGLFNC-SNVDLQ--IPVIGIPIQALVNQCKQN-IACCONSPSDASGLIGLGLP-CIALGSL-----
MPG1 MAQQKCGAEK-VVSCCNKSKELKN--SKSGA-----EIP-----DVLSECKN--IPINLTIHQ--LIPINNFCS-DTVSCCS--G-EQIG-LVNIQ---CTPILS-----
RodB QAQNKCGERTT-LSCCNHVSQVGDTEAFNYGLLNG-----LLGNAISGPEGVGLSGCCKISVTA--IGVDDLNKQ---CQ-QNVACCDONKSVATGGLINATFACVALDSII-----
SC3 AAGTCTTGS--LSCCNQVSAS-SEP-----VTALGLLGLVLSLNLVIGISCSPLT---VIGVGG-----SGCS-AQTVCC-----NTQFNGLINIG---CTPENIL-----
Hyd3 NNQPACSAQSS-NVCCN-----LGLGLVQ-----LGLGLVQ-----LGLGLVQ-----LGLGLVQ-----LGLGLVQ-----LGLGLVQ-----LGLGLVQ-----
DewA AEGTTCNVGS--IACCNPAETNND--LLSGLLG---AGLLNG-----LSGNTGSAKAKASLIDQGLLALVDHTEGPVCK-NIVACCPEGTN-----CVAVDNAGAGTKAE

```

2. razred hidrofobina

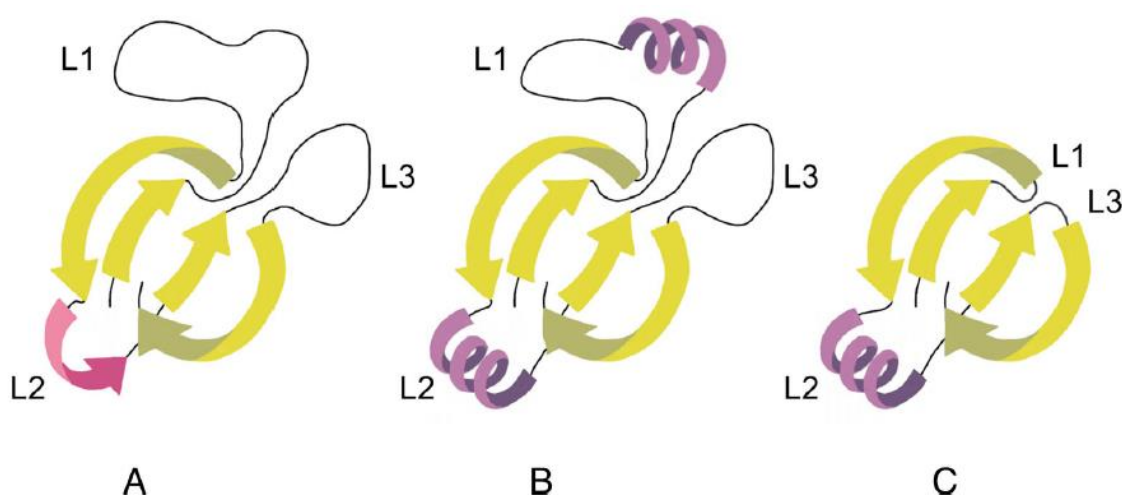
```

C# 1 23 4 5 67 8
Hyd5 NIFCSG--LYGTSYCCATDVLGVADLDCGNPSTFANAATDSAVCSAIGQR-ARCCVLPILDQGLICNTPTGVQD
MHP1 YTRCSG--LYGSAQCCATDVLGVADLDCGNPSTFANAATDSAVCSAIGQR-ARCCVLPILDQGLICNTPRAGVTP
NC2 YTRCSG--LYGTAQCCATDVLGVADLDCANPATLANATHESTCAIIGQR-ARCCVLPILDQGLICNTPRAGI--
CU YDRCYG-LLQKSPCCNIDILGVANLDCGHPVSVETSPSQQASCVDGGRSARCCCTSLGLGLAVCTDEVGI--
CFTH1 HQPCFAG-LYSNFOCCATDVLGVADLCKNSSAFMSGDNKSIKNAV-GQAKCCVLPFAGQAVLCCQDSIN---
CPPH1 HKECFSG-LYSNFOCCSINVGVANLCKTSSFAFTSQSKSACS---GGQPCCVVPAAGQVLCQABIG---
HCF6 VELCPAN---RVPCCLQLSFLGVADLDCASSSGLTSVSAEADCANDETT-ACCCLAPVLLGLGIFCSN-----

```

Slika 1. Aminokiselinska sekvenca odabranih hidrofobina iz 1. i 2. razreda. Očuvani cisteinski ostaci su prikazani žutom bojom i numerirani od 1 do 8. Crna linija prikazuje disulfidne veze između cisteinskih ostataka. Korištene oznake (s UniProtKB pristupnim brojevima): EAS, *N. crassa* (Q04571), RodA, *A. fumigatus* (P41746), MPG1, *M. grisea* (P52751), RodB, *A. fumigatus* (EAL91055), SC3 *S. commune* (EFI96359), Hyd3, *G. moniliformis* (AAO16869), DewA, *A. nidulans* (P52750), Hyd5, *G. moniliformis* (AAN76355), MHP1, *M. grisea* (AAD18059), NC2, putative class II hydrophobin, *N. crassa* (XP_959282), CU, *O. ulmi* (Q06153), CFTH1, *C. fusiformis* (Q9UVI4), CPPH1, *C. purpurea* (CAD10781), HCF6, *P. fulva* (Q9C2X0). Preuzeto i prilagođeno iz reference¹.

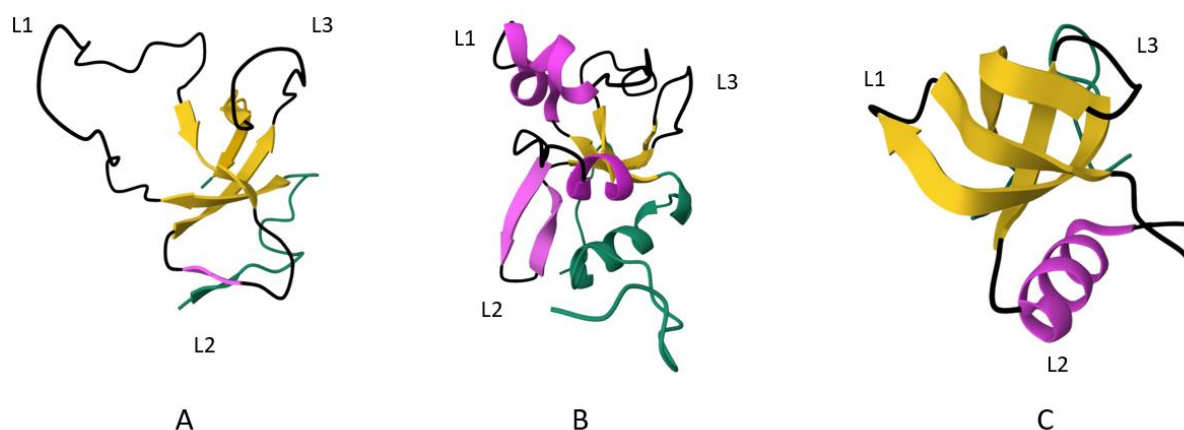
Iako hidrofobini pokazuju značajne razlike u primarnoj strukturi, imaju slične tercijarne strukture što je posljedica pravilno raspoređenih disulfidnih veza te hidrofobnih i hidrofilnih površinskih dijelova. Tako u topljivom obliku, oba razreda imaju centralni motiv četverolančane β -bačve. Takva jezgra β -bačve je premoštena s 3 petlje (L1-L3). L1 i L3 petlja su kraće kod 2. razreda hidrofobina što im daje kompaktniju strukturu, dok su kod 1. razreda one duže te mogu imati neuređenu sekundarnu strukturu ili motiv α -zavojnice. L2 petlja kod 1. razreda hidrofobina može imati sekundarnu strukturu β -ploče ili α -zavojnice, dok je kod 2. razreda uglavnom uočena struktura α -zavojnice (slika 2). N i C krajevi hidrofobina su često neuređeni, iako postoje primjeri gdje zauzimaju sekundarnu strukturu β -ploče ili α -zavojnice³.



Slika 2. Shematski prikaz 3D strukture 1. razreda (A i B) i 2. razreda (C) hidrofobina. Struktura četverolančane β -bačve je prikazana žuto, α -zavojnice su prikazane ljubičasto dok je β -ploča prikazana ružičasto. Preuzeto i prilagođeno iz reference³.

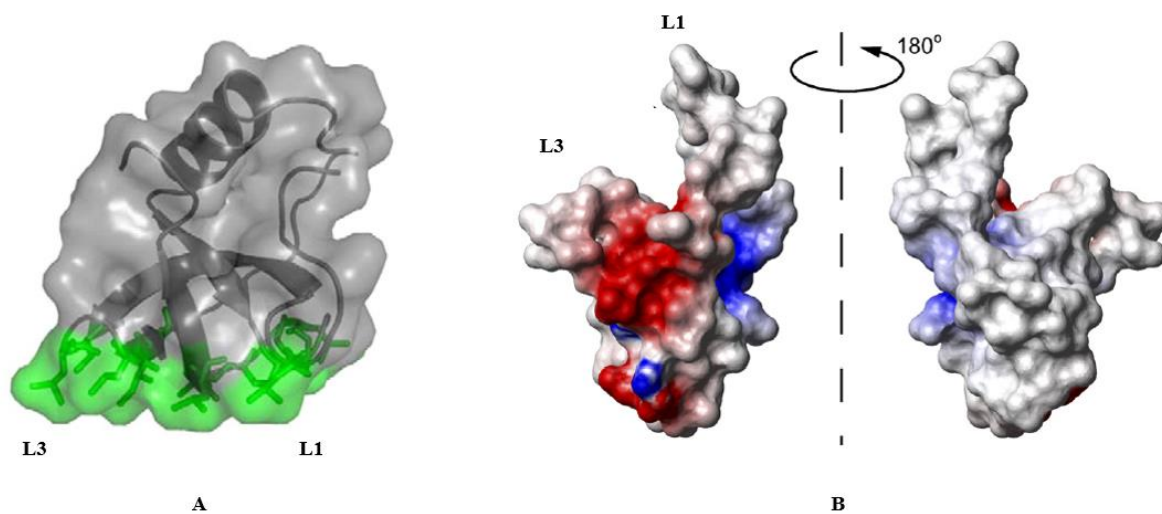
Primjer hidrofobina 1. razreda sa neuređenim i dugačkim L1 i L3 je EAS iz gljive *N. crassa*. Njegova L2 petlja ima sekundarnu strukturu β -ploče koja je u interakciji vodikovim vezama sa strukturom β -ploče na N-kraju (Slika 3 A). Tercijarna struktura EAS, *N. crassa* je eksperimentalno dobivena otopinskom NMR tehnikom i utočnjena računalnom simulacijom. Primjer hidrofobina 1. razreda sa uređenim sekundarnim strukturama u L2 je DewA iz gljive *A. nidulans*. L1 petlja DewA je relativno dugačka s 2 motiva α -zavojnice dok je L3 petlja kraća i neuređena. L2 ima sekundarnu strukturu dvolančane β -ploče kao i jedne kraće α -zavojnice. N-kraj je dugačak te se djelomično sastoji od α -zavojnice, a djelomično je neuređen (slika 3 B).

Tercijarna struktura DewA, *A. nidulans* je eksperimentalno dobivena otopinskom NMR tehnikom i utočnjena računalnom simulacijom. Predstavnik 2. razreda hidrofobina je HFBII iz gljive *T. reesei*. Kao i većina hidrofobina 2. razreda, ima kompaktniju tercijarnu strukturu sa kratkim L1 i L3 petljama dok L2 petlja ima sekundarnu strukturu α -zavojnice. N i C krajevi su kod HFBII kraći i neuređeni (Slika 3 C) što nije slučaj kod svih hidrofobina 2. razreda. Tercijarna struktura je eksperimentalno dobivena difrakcijom rendgenskog zračenja .



Slika 3. Tercijarne strukture hidrofobina EAS, *N. crassa* (A), DewA, *A. nidulans* (B) i HFBII, *T. reesei* (C). Centralni motiv β -bačve je prikazan žutom bojom. L1-L3 crnom bojom, sekundarne strukture β -ploče i α -zavojnice ljubičastom bojom dok su N i C krajevi prikazani zeleno. Preuzeto i prilagođeno iz reference²²

Važno je uočiti preraspodjelu polarnih i nabijenih aminokiselina od onih hidrofobnih kod tercijarne strukture hidrofobina. Hidrofobini s jedne strane posjeduju većinu polarnih i nabijenih aminokiselina dok na drugoj strani, koja se još zove „hidrofobna mrlja“, prevladavaju nenabijene i hidrofobne aminokiseline. Kod 2. razreda hidrofobina, pozicija i aminokiselinski ostaci takve hidrofobne mrlje su očuvani kroz evoluciju, a ona se nalazi između L1 i L3 petlji te sadrži gotovo pola svih hidrofobnih aminokiselina u proteinu. Također je građena isključivo od alifatskih aminokiselina bez aromatskih čiji razlog nije potpuno jasan⁴ (slika 4 A). Kod 1. razreda hidrofobina nije uočena tolika konzerviranost u preraspodjeli hidrofobnih i hidrofilnih aminokiselina što se tiče lokacije hidrofobnog dijela. Razlog tome se vjerojatno nalazi u varijabilnosti u veličini i strukturi L1 i L3 petlji što za posljedicu ima drugačiju lokaciju „hidrofobne mrlje“ kod hidrofobina 1. razreda. (slika 4 B).



Slika 4. A) Struktura hidrofobina 2. razreda HFBII, *T. reesei*. Hidrofobna mrlja je prikazana zeleno, dok je ostala hidrofилна površina prikazana sivo. Preuzeto i prilagođeno iz reference⁴. B) Elektrostatska površina hidrofobina 1. razreda EAS, *N. crassa*. Nenabijeni aminokiselinski ostaci su prikazani sivo dok su pozitivno i negativno nabijeni prikazani redoslјedom plavom i crvenom bojom. Preuzeto i prilagođeno iz reference².

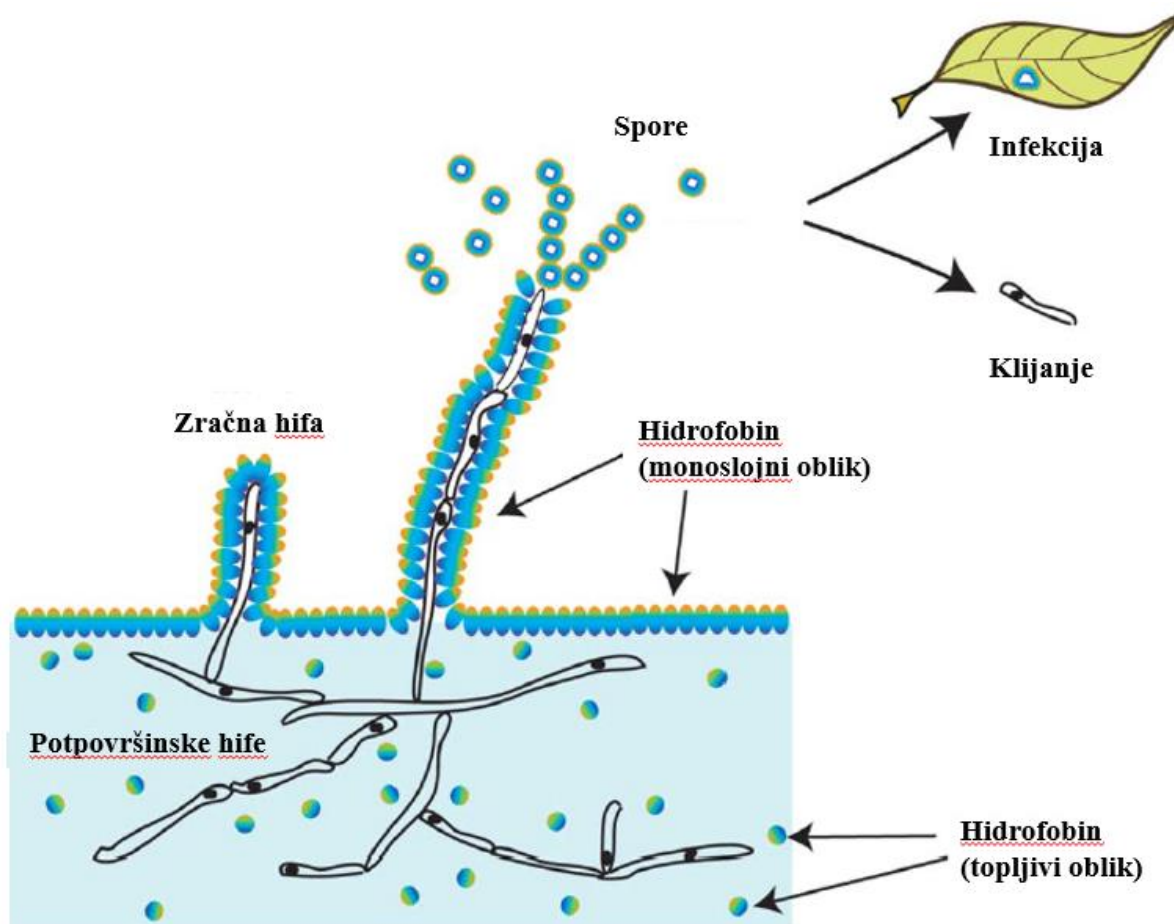
§ 2. BIOTEHNOLOŠKA PRIMJENA HIDROFOBINA

2.1. Biološka uloga hidrofobina

Hidrofobini su proteini koji se nalaze samo u nitastim gljive. Međutim, Hogley i sur. su otkrili protein BslA u bakteriji *B. subtilis* koji se razlikuje u tercijarnoj strukturi naspram hidrofobina prvog i drugog razreda, ali pokazuje slična fizikalno-kemijska svojstva. Njihova slična uloga potencijalno ukazuje na paralelnu evoluciju ovih funkcionalnih homologa u organizmima koji su davno imali zajedničkog predka⁵. U daljnjem radu će fokus biti isključivo na hidrofobinima iz gljiva.

Hidrofobini su se evolucijski razvili u nitastim gljivama kao prilagodba na širenje hifa u zrak (nastajanje zračnih hifa), odnosno u svrhu probijanja hidrofobno-hidrofilne barijere zrak-voda. Geni za hidrofobine su najizraženiji u rastućim hifama koje ih otpuštaju u monomernom topljivom obliku u okolinu. Pri kontaktu s hidrofobnom površinom (zrak), dolazi do njihove samoorganizacije i formiranja amfipatskog monosloja. Takav amfipatski monosloj ima sposobnost mijenjanja močivosti površine, odnosno promjene hidrofobne u hidrofilnu površinu i obrnuto. Posljedica takvog svojstva, na primjeru zrak-voda je efektivno smanjenje površinske napetosti sa 75 na 27 mN m⁻¹ što ovisi o vrsti hidrofobina i njihovoj koncentraciji, ali ih čini i jednim od najjačih površinski aktivnih tvari⁴.

Kako su stanične membrane hidrofilne na vodenoj strani, one mogu interagirati sa hidrofilnom površinom monosloja hidrofobina na vodenoj strani i širiti se u hidrofobni zrak pošto je površina monosloja sa zračne strane također hidrofobna. Iako takav monosloj na površini hifa onemogućuje prolazak vode, dovoljno je porozan za izmjenu plinova. Dodatna svrha mu je oblaganje spora što im omogućava širenje zrakom kao i površinsku adheziju koja omogućava prijanjanje na površinu domaćina u svrhu infekcije ili klijanja¹ (slika 5).



Slika 5. Shematski prikaz uloge hidrofobina u životnom ciklusu nitastih gljiva. Plavi dio hidrofobina naznačuje njihovu hidrofilnu površinu, dok crveni njihovu hidrofobnu površinu. Preuzeto i prilagođeno iz reference¹

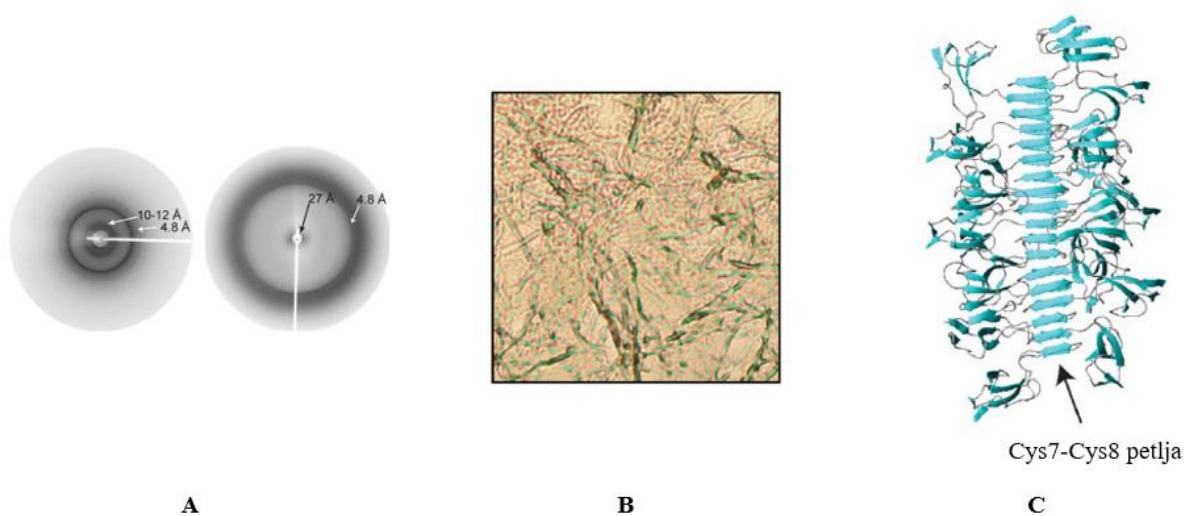
2.2. Struktura hidrofobinskog monosloja

Jedno od prvih opažanja pri otkriću hidrofobina je upravo stvaranje amfipatske monoslojne membranske strukture. Hidrofobini 1. razreda se dodatno razlikuju od hidrofobina 2. razreda po tome što hidrofobini 1. razreda formiraju takozvanu štapičastu (engl. „rodlet“) strukturu koja je analogna amiloidnim vlaknima. Kwan i sur. su korištenjem difrakcije rendgenskog zračenja i NMR-a pokazali sličnost amiloidne strukture sa strukturom štapića kod hidrofobina 1. razreda EAS, *N. crassa*. Difrakcijom rendgenskog zračenja su dobili karakterističnu refleksiju na 4.8 Å što odgovara razmaku β -lanaca u β -pločama, ali nedostaje refleksija na 10-12 Å što ukazuje na

naslagane β -ploče tipične u amiloidnim vlaknima⁶ (slika 6). Ovaj eksperiment indicira da strukturna jezgra EAS hidrofobina ostaje intaktna.

Takve štapićaste strukture kod hidrofobina 1. razreda tipično nastaju prilikom sušenja otopine s hidrofobinima ili prilikom sabijanja ili „sazrijevanja“ membrane. Formiranje stabilnih monoslojeva hidrofobina 1. razreda ide kroz dvije međustrukture: α -zavojito stanje i β -pločasto I stanje te sazrijevanjem nastaje stabilno β -pločasto II stanje. Svojstva takvog konačnog monosloja su visoka stabilnost i inertnost prema otapanju s detergentima i alkoholima pri bilo kojoj temperaturi ili pH vrijednosti³. Sazrijele štapićaste strukture su topive jedino u žestokim uvjetima kao što su u mravlja kiselina ili 100%-na TFA (2,2,2-trifluorooctena kiselina).

Hidrofobini 2. razreda, zbog različite strukture, imaju i drugačija svojstva kada su u monoslojnom obliku. U vodenoj otopini preferentno egzistiraju kao dimeri i tetrameri, a u čvrstom monoslojnom obliku postoje u više konformacija, ali bez ponavljajućih β -strukture i štapićastog („rodlet“) oblika kao što je karakteristično za hidrofobine 1. razreda. Za njih je karakteristično formiranje heksagonalnih ponavljajućih jedinica koje spontano nastanu na međupovršini zrak-voda bez međustruktura kao kod 1. razreda. Također, monoslojna struktura na međupovršini nije stabilna kao kod 1. razreda te je topljiva u prisustvu detergenta ili etanola³.



Slika 6. A) Difrakcija rendgenskog zračenja EAS „štapićaste“ strukture. (A, lijevo) Rezultat dobiven iz neporavnatih peletiranih štapića. Difuzna vrpca na 10-12 Å je vjerojatno rezultat međuslojnih razmaka. (A, desno) Rezultat dobiven iz uzorka djelomično poravnatih štapića pripremljenih u kapilari pod utjecajem magnetskog polja. Vrpca na 27 Å u oba uzorka odgovara dimenziji hidrofobinskog monomera. Preuzeto i prilagođeno iz reference⁶. B) Zlatnozelena birefringencija primijećena kada se EAS štapići oboje Congovim crvenilom i promatraju između

okomitih polarizatora. Preuzeto i prilagođeno iz reference². C) Hipotetski model EAS štapića predviđen molekularnim protein-protein uklapanjem (engl. „docking“) programom HADDOCK. Preuzeto i prilagođeno iz reference¹.

2.3. Ekspresija i izolacija hidrofobina

Za komercijalnu uporabu hidrofobina, što je opisano u slijedećim poglavljima, potrebna je proizvodnja na velikoj skali.

Askolin i sur. su prvi predstavili metodu za proizvodnju i pročišćavanje HFBI (hidrofobina 2. razreda) na skali od 0,6 g L⁻¹. Za proizvodnju HFBI su koristili *T. reesei* gljivu koju su modificirali ugradnjom plazmida pEA10 s *hfb1* genima i uzgajali na hranjivoj podlozi od glukoze što se pokazalo izvrsnim za prekomjernu ekspresiju *hfb1* gena. Zbog amfipatske naravi hidrofobina, HFBI je bio vezan za staničnu membranu te ga je trebalo odvojiti. Za to su koristili metodu od 3 koraka koja se sastoji od ekstrakcije micelija s 1% SDS pri pH = 9 nakon čega je uslijedilo taloženje SDS-a s kalijev kloridom (KCl) i daljnje pročišćavanje kromatografijom temeljenoj na hidrofobnim interakcijama. U konačnici, počevši s 419 g suhog micelija koji teoretski sadrži 6,4 g HFBI, uspjeli su izolirati 0,23 g HFBI što je iskorištenje od 3,6%. Problem ove metode su predstavljala 2 asparaginska ostatka na N-kraju HFBI (Asn-2 i Asn-4) koja su podlijegala deamidaciji u aspartat preko sukcinimidinskog intermedijara. Iako su pokazali da fizikalna svojstva tako sličnih molekula nisu bitno različita, molekule koje se koriste u medicinskoj primjeni najčešće moraju biti čiste bez primjesa te je trebalo dodatno pročistiti dobivenu smjesu što je rezultiralo iskorištenjem od svega 1,2%⁷.

Khalesi i sur. su predložili metodu ekstrakcije hidrofobina koja se temelji na razdvajanju hidrofobnih molekula u otopini koristeći stupove pjene. Ideja ove metode bila je propuhivati plinoviti ugljikov dioksid kao hidrofobni plin kroz tekući uzorak sa hidrofobinima (HFBI u ovom slučaju). Zahvaljujući svojstvu samoorganizacije na hidrofobno-hidrofilnim površinama, hidrofobna mrlja hidrofobina bi se vezala na nepolarne mjehuriće ugljikova dioksida što bi rezultiralo stvaranju pjene. Skupljanjem takve pjene dolazi do pročišćavanja hidrofobina iz uzorka kao i njihova koncentriranja (s 0,1 mg/ml na 0,57 mg/ml)⁸.

Izolacija hidrofobina prvog razreda se pokazala znatno zahtjevnijom te nije pronađen postupak koji bi efikasno izolirao i pročistio hidrofobina 1. razreda na velikoj skali. Također za izolaciju monomernih vrsta su potrebne jake kiseline poput mravlje i trifluoroctene kiseline

(TFA). Pokazalo se i da uvođenje rekombinantne plazmidne DNA s genima za hidrofobine 1. razreda u organizme gljiva ne dovodi do značajno veće ekspresije, a uvođenjem *sc3* gena u *S. commune* iznenađujuće utišava ekspresiju. Kod ekspresije hidrofobina u *E. coli* koja služi kao modalna bakterija, nastaje problem zbog stvaranja inkluzijskih tijela od agregiranih hidrofobina ili nepravilnog smatanja¹.

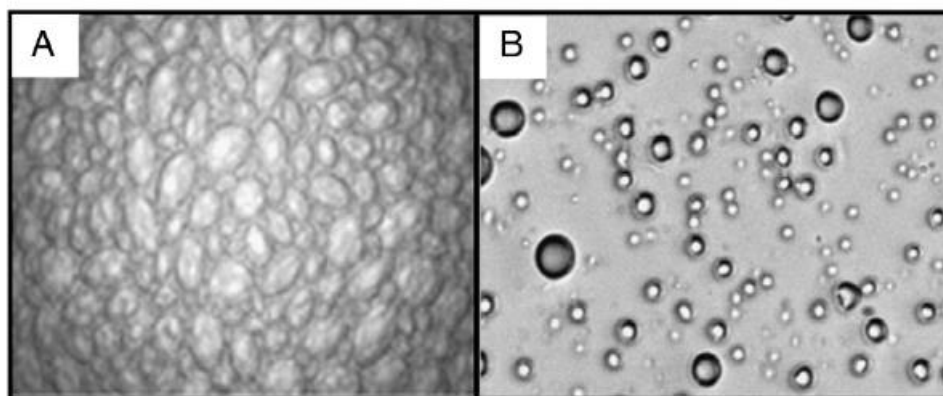
2.4. Biotehnološke primjene hidrofobina

Zahvaljujući amfipatskoj prirodi i stabilnosti, hidrofobini donose brojne prednosti i potencijalne uporabe u različitim sferama biotehnologije. Hidrofobini kao jedni od najjačih poznatih površinski aktivnih tvari mogu mijenjati močivost površina i njihovu hidrofilitnost/hidrofobnost što je poželjno svojstvo u stabilizaciji pjena u prehrambenoj industriji, poboljšavanje topljivosti slabo topljivih lijekova u farmaceutskoj industriji, ili pak modeliranju površina i davanja im novih svojstava samostalno ili u obliku fuzijskih proteina.

2.4.1. Stabilizacija pjena i emulzija

Hidrofobini su osim svoje biološke svrhe u gljivama, našli ulogu i u prehrambenoj industriji kao sredstva za stvaranje pjena i emulzija. Pjene i emulzije možemo naći u svakodnevnoj primjeni kao što su majoneza, pivo, sladoledi itd. To su prirodno nestabilne heterogene smjese te su potrebne dodatne površinski aktivne molekule koje bi smanjile površinsku napetost između dvije faze što dovodi do stabilizacije takvog sustava⁹.

Hidrofobini su već pokazali svojstvo samoorganizacije na granici hidrofobnih/hidrofilnih površina te su se pokazali kao najbolje površinski aktivne tvari u smislu reduciranja površinske napetosti. Amfipatski sloj koji stvaraju između dvije faze je izrazito stabilan i elastičan zahvaljujući njihovom međusobnom povezivanju. Pošto su to mali proteini, njihova difuzija na granicu dviju faza je brza što dovodi do formiranja sitnih kapljica zraka ili ulja što je za neke proizvode povoljno, dok su za druge potrebne veće čestice što bi se moglo postići optimiranjem uvjeta ili dodatkom nekih drugih površinski aktivnih tvari (Slika 7)



Slika 7. Prikaz zračnih ćelija od otprilike 150 μm (A) i od otprilike 2 μm (B) koje su stabilizirane hidrofobinom 2. razreda HFBII. Preuzeto iz reference¹⁰.

Također je pokazano da zbog male veličine čega ne ometaju površinsku strukturu dispergirane faze i ne utječu na okus emulzija i pjena što je idealno za prehrambenu industriju. Pošto ih proizvode neke jestive gljive također su društveno prihvatljivi za korištenje. Problem dolazi kod njihova pročišćavanja za koje je potreban SDS, a kod hidrolobina 1. razreda jaka trifluorooctena kiselina (TFA) što predstavlja barijeru za ulazak na tržište te su potrebne nove metode izolacije koje ne koriste štetne tvari¹⁰.

Hidrolobini su odgovorni i za šikljanje piva, odnosno pojavu prekomjernog pjenjenja piva. Neke vrsta gljiva koje se koriste u pivarskoj industriji proizvode i hidrolobine. U bocama hidrolobini stvaraju stabilnu emulziju mjehurića ugljikova dioksida. Otpuštanjem tlaka u boci (otvaranjem čepa) dolazi do naglog širenja mjehurića pri čemu dolazi do „nano-eksplozija“ čime se stvaraju novi nukleacijski centri i dolazi do naglog pjenjenja¹¹ (slika 8).



Slika 8. Prikaz umjetno proizvedenog šikljanja piva dodatkom micelijskog ekstrakta *T. reesei* koji sadrži HFBI hidrofobin. Preuzeto iz reference¹¹

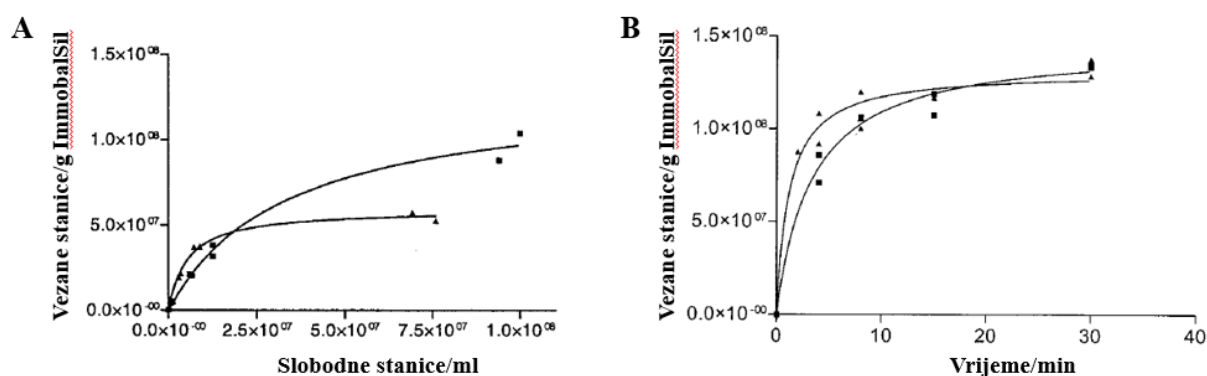
Hidrofobini kao jedni od najjačih surfaktanata imaju potencijalnu primjenu u stabilizaciji mnogih prehrambenih proizvoda, no toliko snažno izraženo površinski aktivno svojstvo može dovesti i do problema koji su teško rješivi kao što vidljivo na primjeru šikljanja piva.

2.4.2. Imobilizacija stanica pomoću fuzijskih hidrofobina

Hidrofobini su svoju primjenu našli i u modeliranju površina kao samostalni ili fuzijski proteini što njima, a i površinama daje nova svojstva. Veliku pozornost dobivaju i u okviru imobilizacije stanica na površine čime se povećava koncentracija stanica što rezultira efikasnijom uporabom stanica u razne svrhe.

Nakari-Setala i sur. su tako pokazali imobilizaciju stanica kvasca na hidrofobne materijale bazirane na siliciju. U stanice kvasca su stavili rekombinantni gen koji kodira za HFB1-Flo1 fuzijski protein, gdje je HFB1 hidrofobin 2. razreda, a Flo1 je protein prirodno nađen u kvascu koji služi u signalizacijskim procesima na površini stanične membrane. HFB1-Flo1 fuzijski protein je dizajniran na način da se HFB1 nalazi unutar Flo1 na mjestu između Ser-26 i Ser-319 gdje se nalazila lektinska domena. Na taj način je i dalje omogućena normalna lokalizacija na površini stanične membrane, a umjesto vezanja šećera i velike glikozilacije takvog proteina, omogućena je dostupnost hidrofobne površine fuzijskog proteina koja može interagirati sa hidrofobnim materijalima. U radu su pokazali jednostavno odvajanje

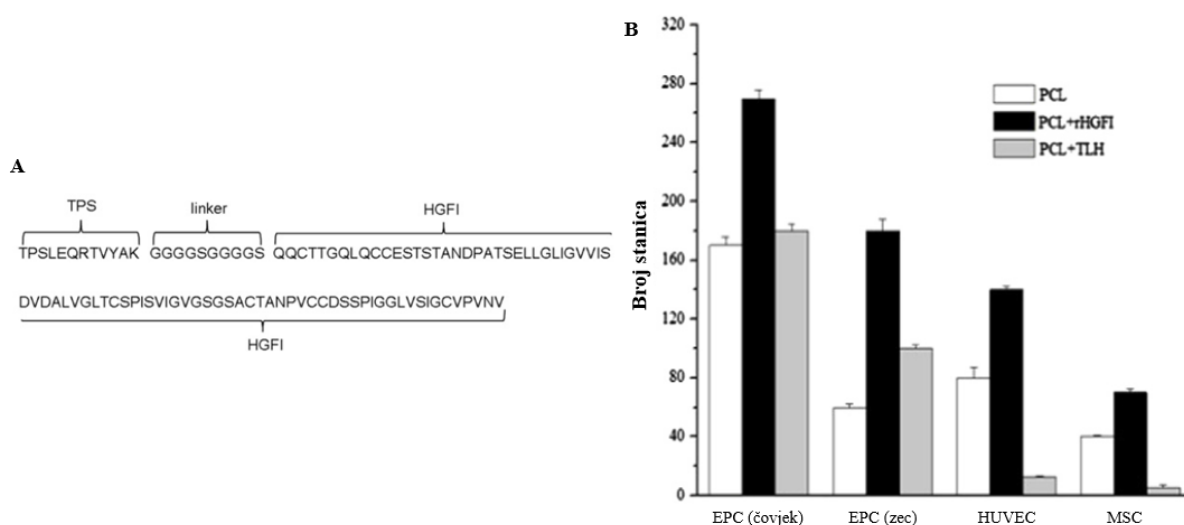
modificiranih od nemodificiranih stanica ekstrakcijom. Modificirane stanice pokazuju veću hidrofobnost te tako prelaze u sloj s detergenom dok nemodificirane hidrofilijske stanice ostaju u vodenom sloju. Adsorpcijskim eksperimentima je uočeno efikasnije vezanje modificiranih stanica na hidrofobnu površinu Immobasil pri nižim koncentracijama, dok nemodificirane stanice pokazuju jači afinitet pri višim koncentracijama (slika 9 A). Kinetičkim eksperimentima je pak uočeno brže vezanje modificiranih stanica samo pri niskim vremenima (slika 9 B). Ovime je pokazano da hidrofobne interakcije u slučaju HFB1 nisu jedine značajne što ne negira primjenu ostalih hidrofobina u ovu svrhu¹².



Slika 9. A) adsorpcijska izoterma stanica na Immobasil podlozi. Kontrolne stanice H2155 (crni kvadrati) i modificirane VTT-C-99315 stanice koje eksprimiraju HFB1-Flo1 fuzijski protein (crni trokuti). Vrijeme trajanja eksperimenta je 2 h na 4°C. B) Adsorpcija kontrolnih stanica H2155 (crni kvadrati) i modificiranih VTT-C-99315 stanice koje eksprimiraju HFB1-Flo1 fuzijski protein (crni trokuti) na Immobasil kao funkcija vremena. Preuzeto i prilagođeno iz reference¹².

Niu i sur. su pokazali korisnost hidrofobina kod vezanja ljudskih endotelnih progenitroskih stanica (EPS) na poli(ε-kaprolakton) (PCL) kao potencijalnog kandidata za izradu okvira za tkivno inženjerstvo. Mali stanično specifični peptid TPS (TPSLEQRTVYAK) ima sposobnost vezanja na EPS no postizanjem njegove imobilizacije na površinu potencijalno bi došlo do specifičnog koncentriranja EPS stanica. Autori rada su tako napravili fuzijski protein između hidrofobina 2. razreda HGFI i peptida TPS uvođenjem rekombinantnog plazmida u organizam *P. pastoris*. Fuzijski protein je dizajniran na način da je na N-kraju HGFI dodan linker (GGGGSGGGGS) na koji je vezan TPS te je tako dobiven TPS-linker-HGFI (TLH) fuzijski protein (slika 10 A). U njihovom prethodnom radu je pokazano kako rHGFI stvara film na površini PCL-a i veže stanice s velikim afinitetom. Autori su pokazali da TLH modificiran PCL

ima manji afinitet za stanice od rHGFI modificiranog PCL-a, ali pokazuje veću specifičnost prema ljudskim EPC stanicama (slika 10 B). Razlog manjeg afiniteta prema stanicama kod TLH-PCL naspram rHGFI-PCL je u tome što rHGFI ima hidrofilnu površinu okrenutu prema otopini sa stanicama te može stvarati jače interakcije, dok TPS-linker prekriva hidrofilnu površinu HGFI te dolazi do specifičnijih interakcija sa ljudskim EPC stanicama preko TPS dijela fuzijskog proteina¹³.



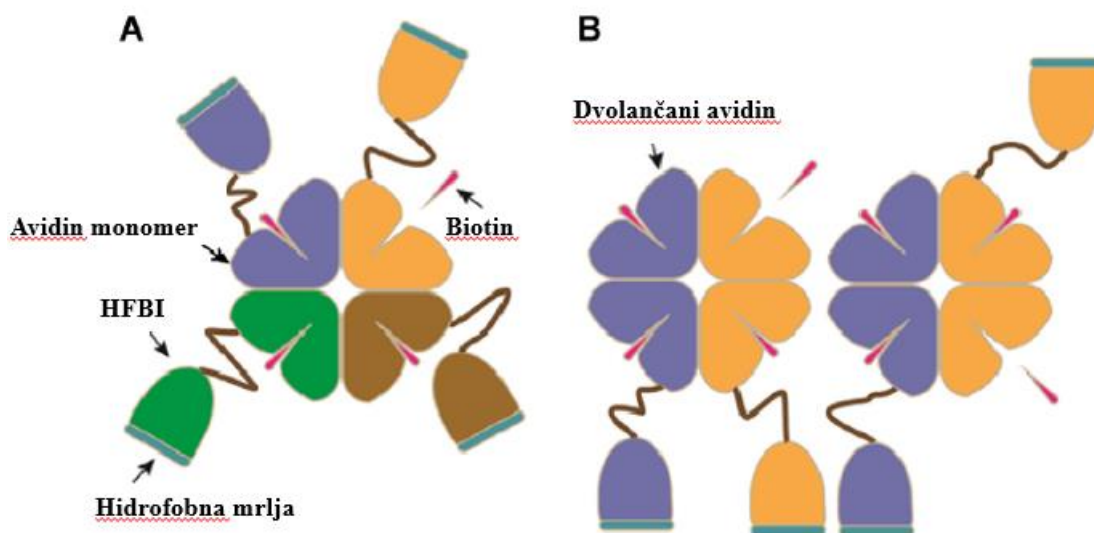
Slika 10. A) Aminokiselinska sekvenca TLH fuzijskog proteina B) stupčasti dijagram dobiven statističkim računom koji pokazuje broj stanica EPC (čovjek), EPC (zec), HUVEC (endotelne stanice ljudske pupčane vene) i MSC (mezenhimske matične stanice) na PCL, PCL-rHGFI i PCL-TLH. Preuzeto i prilagođeno iz reference¹³.

2.4.3. Modifikacija površina pomoću hidrofobina

Kurppa i sur. su pokazali korisnost fuzijskih proteina s hidrofobinima u funkcionalizaciji površina na primjeru proteina avidina koji ima veliki afinitet ($K_d \sim 10^{-15}$ M) za vezanje biotina. Tako vezani biotin potom može biti modificiran i/ili vezan za druge kemijske vrste, no takav fuzijski protein može služiti i u specifičnom vezanju i izolaciji molekula s biotinom, npr. u kromatografske svrhe.

Autori su priredili fuzijski protein građen od HFBI (hidrofobin 2. razreda) na čijem je C-kraju dodan linker (PGASTSTGMGPGGT) preko kojeg je sa C-kraja povezan avidin. Ovime su zapravo dobili 2 fuzijska proteina: HFBI-Avd i HFBI-dcAvd (slika 11.) Pokazano je da

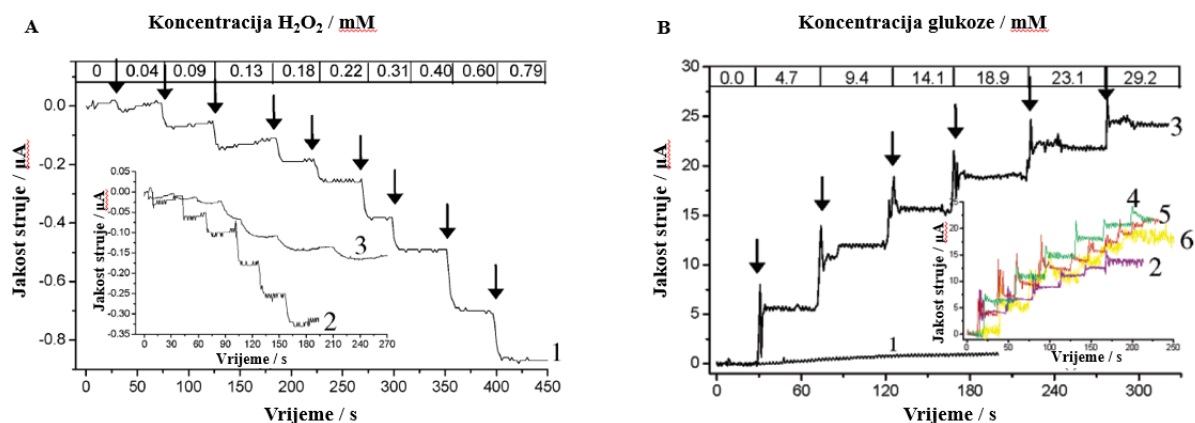
HFBI-dcAvd fuzijski protein efektivno stvara funkcionalne površine i gusto se pakira na polistirenu (PS) te specifično veže biotinizirani antigen bGH u omjeru 1:1 dok se divlji antigen GH u niskom omjeru može vezati nespecifično¹⁴.



Slika 11. A) shematski prikaz HFBI-Avd fuzijskog proteina B) Shematski prikaz HFBI-dcAvd fuzijskog proteina. Avidin u nativnoj formi tvori tetramernu strukturu te svaki od ovih fuzijskih proteina može maksimalno vezati 4 biotina. Preuzeto i prilagođeno iz reference¹⁴.

Hidrofobini su primjenu našli i u biosenzorima. Tako su Corvis i sur. pokazali uspješno vezanje elektroaktivnih enzima glukoza-oksidadze (GOX) iz organizma *A. niger* i peroksidaze iz hrena (HRP) na glatke ugljikove elektrode na kojima se nalazi sloj hidrofobina 1. razreda SC3 iz *S. commune*. GOX je flavoenzim koji katalizira reakciju oksidacije β -D-glukoze elementarnim kisikom u δ -glukonolakton koji spontano hidrolizira na vodikov peroksid i glukonsku kiselinu. HRP je enzim koji posjeduje hem prostetičku skupinu i koristi vodikov peroksid za oksidaciju mnogih organskih i anorganskih spojeva.

Elektronskom mikroskopijom je utvrđeno stvaranje uniformnog stabilnog filma adsorbiranog SC3 na glatkim ugljikovim elektrodama što je za očekivati kod hidrofobina 1. razreda. GOX i HRP se efektivno i čvrsto nekovalentnim interakcijama mogu vezati na sloj hidrofobina te zadržavati katalitičku ulogu i do nekoliko mjeseci u adsorbiranom obliku. Imobilizirani HRP pokazuje najveću aktivnost već 1. dan nakon nanošenja na sloj hidrofobina, dok je 19. dan aktivnost značajnije pala (slika 12 A). Imobilizirani GOX pokazuje najveću aktivnost nakon 36 dana od nanošenja na sloj hidrofobina, a i nakon 99 dana pokazuje izrazito veliku aktivnost (slika 12 B)¹⁵.



Slika 12. A) Rezultati hidrodinamičke amperometrije pri dodatku vodikova peroksida (prikazano strelicama) za SC3/HRP elektrodu. Krivulje 1-3 su dobivene za elektrodu nakon 1., 8. i 19. dana od funkcionalizacije elektrode. B) Rezultati hidrodinamičke amperometrije pri dodatku glukoze (strelicama prikazan dodatak od 150 μ L od 1 M otopine glukoze) za SC3/GOX elektrodu. Brzi odgovor struje na dodatak glukoze indicira na brz transport vodikova peroksida kroz SC3 sloj. Referenta krivulja 1 prikazuje podatke za elektrodu na koju je adsorbiran GOX u odsustvu SC3. Krivulje 2-6 su dobivene za elektrodu nakon 1., 27., 36., 68., i 99. dana nakon funkcionalizacije. Preuzeto i prilagođeno iz reference¹⁵.

Ovim eksperimentnom je pokazana izvrsna uloga hidrofobina kao modulatora površina u koncentriranju enzima na čvrste hidrofobne površine što je vidljivo na primjeru GOX-a koji se koristi u fermentacijskoj, prehrambenoj i tekstilnoj industriji kao i u medicinskoj i ekološkoj nadzornoj primjeni. HRP se koristi u organskim i biološkim sintezama kao i u spregnutim enzimskim katalizama i pročišćavanju otpadnih voda¹⁵. Imobilizacija takvih enzima može rezultirati katalitički aktivnim površinama koje relativno dugo zadržavaju svojstva, a lako ih je za prirediti. Također prilikom njihova korištenja u katalitičke svrhe dovoljno je isprati površine bez potrebe za izolacijom enzima što je dugotrajno i problem sa otopinskim enzimima.

2.4.4. Primjena hidrofobina u farmaceutskoj industriji

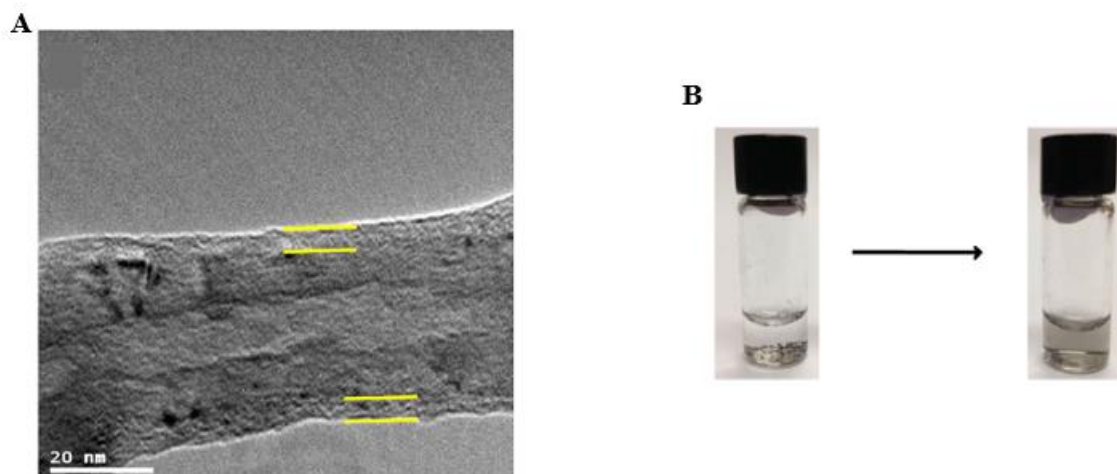
Zahvaljujući svojoj amfipatskoj prirodi, hidrofobini mogu značajno povećati topljivost i stabilizirati suspenziju inače netopljivih spojeva kao što su neki lijekovi.

Haas Jimoh Akanbi i sur. su tako testirali utjecaj hidrofobina 1. razreda SC3 na bioraspodjeljivost u suspenziji s netopljivim lijekovima nifedipin i ciklosporin A (CyA).

Pokazali su da otapanjem ovih lijekova u DMSO-u i etanolu te razrjeđivanjem vodenom otopinom hidrofobina SC3 nastaju mikročestice lijekova veličine oko 1 μm na čijoj se površini nalazi sloj SC3 hidrofobina. Kod nifedipina-SC3 (2:1 (w/w)) je Tioflavin T(ThT)-spektroskopijom uočeno nastajanje štapičaste strukture SC3 hidrofobina na površini čestica dok kod CyA-SC3 to nije uočeno što je vjerojatno zbog formiranja strukture α -zavojnice te nije došlo do prelaska u stabilnu β -pločastu strukturu. *In vivo* farmakokinetički eksperimenti sa CyA-SC3 formulacijom su doveli do sporijeg, ali dugotrajnijeg otpuštanja lijeka pa tako i konstantnije koncentracije CyA u krvi. Pošto je hidrofobin SC3 pokazao netoksičnost, ova metoda može služiti kao nadopuna za postojeće metode zbog svoje jednostavnosti, pogotovo kada je dugotrajniji učinak lijeka poželjniji¹⁶.

Valo i sur. su koristili hidrofobine u svrhu skladištenja i stabilizacije nanometarskih čestica lijekova na primjeru hidrofobnog lijeka itrakonazola. Prethodno je pokazano da se nanočestice itrakonazola mogu čuvati u matriksu od celuloznih nanovlakana. Nanočestice su priređene otapanjem itrakonazola u tetrahidrofuranu (THF) te taloženjem sa vodenom otopinom HFBI-DCBD fuzijskog proteina pri čemu dolazi do taloženja nanočestica s HFBI-DCBD slojem na površini. HFBI je hidrofobin 2. razreda dok je CBD domena koja veže celulozu, a DCBD se odnosi na duplu CBD domenu koje su preko peptidnog linkera povezane na HFBI u svrhu većeg afiniteta prema celuloznim nanovlaknima. Eksperiment je pokazao da smrzavanje sušenjem i skladištenjem ne dolazi do agregacije HFBI-DCBD-om obloženih nanočestica što omogućava dugoročno skladištenje. Ovaj način također služi dobivanju suhih prahova nanočestica za daljnju doradu ili skladištenje^{17,18}.

U novije vrijeme je sve modernija uporaba ugljičnih nanocjevčica u području dostave lijekova zbog velikog omjera površine naspram volumena i mase, veliki mehaničku snagu i dobru provodnost električne struje. Problem kod ugljičnih nanocjevčica je njihova niska topljivost kao i citotoksičnost zbog stvaranja aglomerata. Hidrofobini su ovdje također našli primjenu kao površinski aktivne tvari koje povećavaju topljivost ugljičnih nanocjevčica¹. Wang i sur. su pripremili suspenziju ugljičnih nanočestica obložene hidrofobinom HFBI u vodi snažnim miješanjem i ultrazvučnom obradom koja je stabilna najmanje 45 dana bez agregacije i taloženja¹⁹ (slika 13).



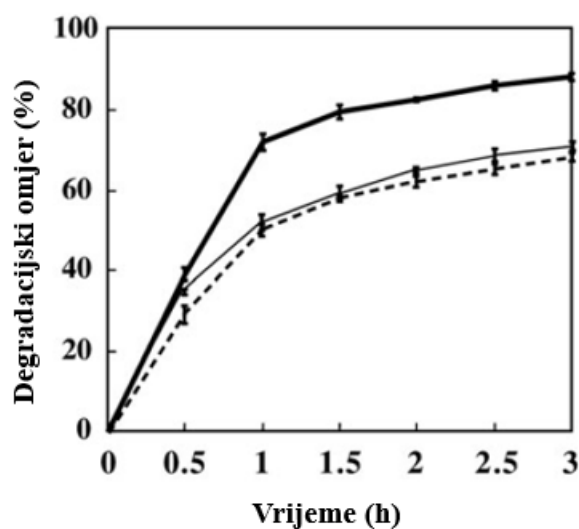
Slika 13. A) TEM slika površine ugljičnih nanocjevčica-HFBI kompleksa. Žute linije označavaju debljinu HFBI sloja. Preuzeto i prilagođeno iz reference¹⁹ B) (Lijevo) Vodena smjesa ugljičnih nanocjevčica (crni talog). (Desno) Suspenzija ugljičnih nanočestica nakon dodatka EAS hidrofobina i sonifikacije. Preuzeto i prilagođeno iz reference¹

2.4.5. Uporaba hidrofobina kod enzimске razgradnje sintetskih poliestera

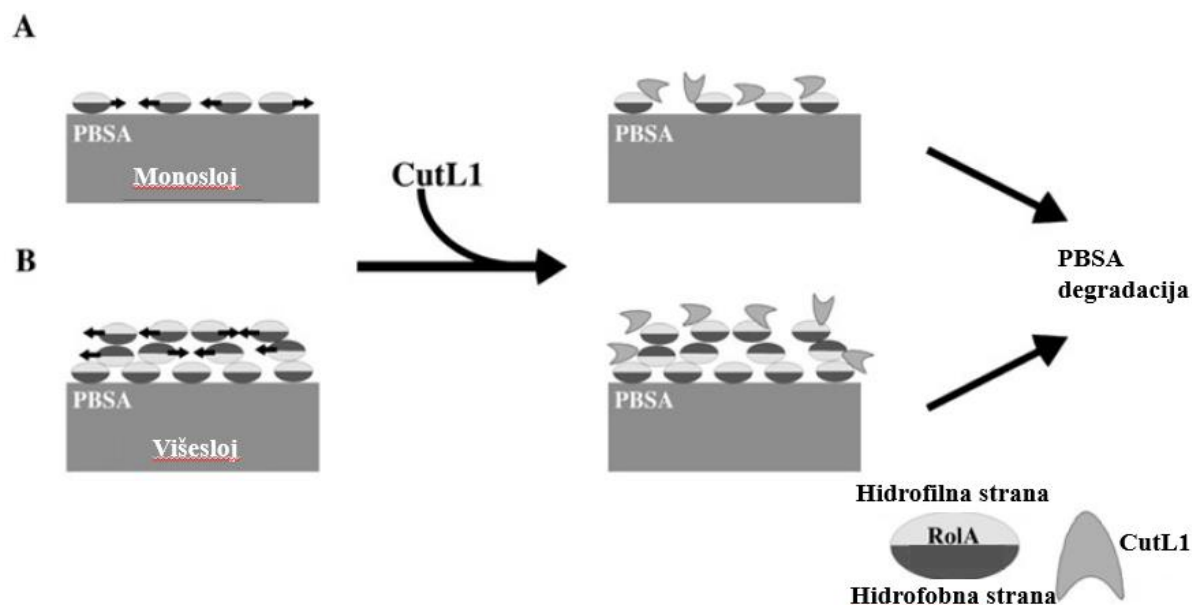
Poznato je da postoje enzimi koji mogu razgrađivati određene vrste plastike (poliestere). Jedan takav primjer je kutinaza CutL1 iz organizma *A. oryzae* koja može hidrolizirati esterske veze u plastici poli(butilen sukcinat adipat) PBSA. Kutinaze su hidrolaze koje su se evolucijske razvile u patogenim gljivama i imaju sposobnost razgradnje esterskih veza u kutinu, površinskog biljnog pokriva građenog od voskova i ugljikohidrata.

Zahvaljujući amfipatskoj prirodi hidrofobina i svojstvu mijenjanja močivosti i hidrofilnosti/hidrofobnosti površina, Takahashi i sur. su na primjeru hidrofobina RolA iz organizma *A. nidulans* pokazali da se njegovim premazivanjem PBSA i inkubacijom uvelike poboljšava efikasnost razgradnje pod djelovanjem CutL1. Bez inkubacije PBSA s RolA, odnosno simultanim dodatkom RolA i CutL1 u otopinu s PBSA mikročesticama nije zamijećeno povećanje efikasnosti hidrolize PBSA. Inkubacija od 16 sati je potrebna kako bi RolA stvorio stabilan monosloj ili polisloj na hidrofobnoj površini PBSA i tako efektivno promijenio površinu plastike u hidrofilnu (slika 14). QCM (engl. „quartz crystal microbalance“) analizom su pokazali malu ili nikakvu interakciju između RolA i CutL1 u topljivom obliku dok je interakcija između monoslojne strukture RolA i CutL1 izrazito jaka te RolA ima veliki afinitet prema otopljenom CutL1 ($K_D = 4.5 \times 10^{-8}$ M). Razlog tome je u promjeni

konformacije prilikom stvaranja sloja na površini PBSA što je tipično za hidrofine 1. razreda. FRAP (engl. „ferric reducing antioxidant power“) analizom je pokazano lateralno kretanje RoLA molekula na površini PBSA koristeći fluorescentno obilježeni FITC-RoLA (fluorescein izotiocijanat-RoLA). Izbjeljivanjem dijela površine PBSA prekrivene FITC-RoLA pokazana je brza regeneracije fluorescencije na tom području. Dodatkom CutL1 u otopinu, lateralno kretanje je inhibirano te je vraćeno svega 20% fluorescencije. Razlog tome može biti snažna interakcija između monoslojnog ili polislojnog RoLA s CutL1 no potrebna su daljnja istraživanja za potpuno razumijevanje tog mehanizma. Zbog smanjenog lateralnog kretanja RoLA s vezanim CutL1, stimulirana je PBSA hidroliza na mjestima gdje je CutL1 akumuliran (slika 15). Ovaj eksperiment baca novo svjetlo na biološko djelovanje hidrofobina, ne samo kao adhezijske molekule nego i kao proteini koji potencijalno interagiraju s hidrolitičkim enzimima koji su nužni za penetraciju u domaćina. Industrijski ova metoda može biti korisna u razgradnji PBSA plastike koristeći rekombinantne organizme koji simultano proizvode RoLA i CutL1 što je napravljeno kod rekombinantnog organizma *A. oryzae*²⁰.

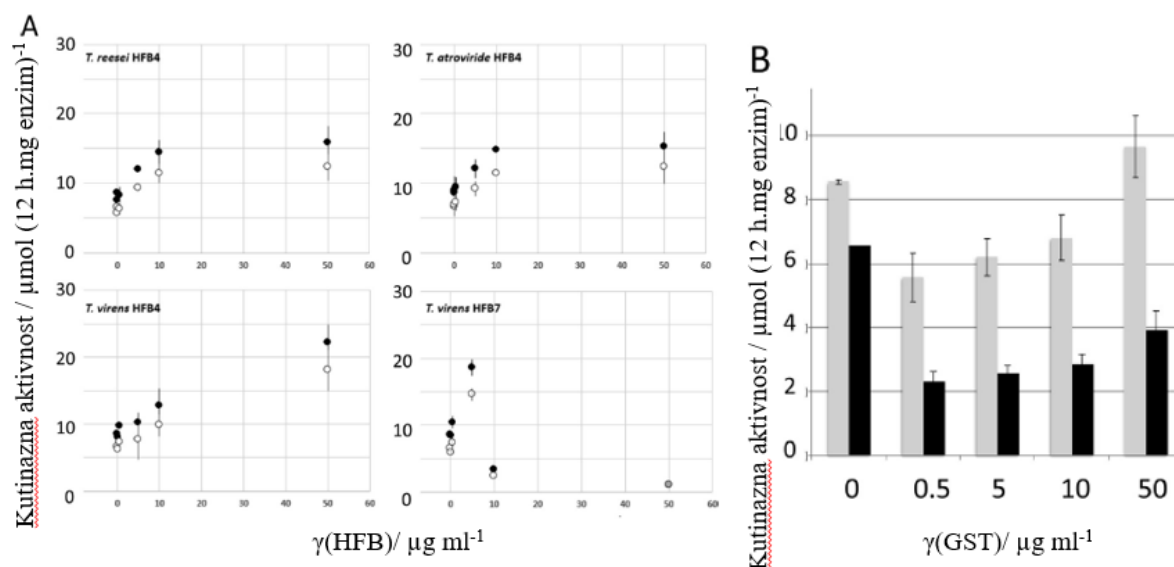


Slika 14. Utjecaj RoLA na razgradnju PBSA pomoću CutL1. PBSA mikročestice 0,1% (v/v) su inkubirane s CutL1 ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$) u prisustvu i odsustvu RoLA (2 ng ml^{-1}). Degradacijski omjer je definiran kao $P_D = \left(1 - \frac{C_a}{C_b}\right) \times 100\%$ gdje su C_a i C_b koncentracije PBSA mikročestica poslije i prije degradacije. Debla linija: PBSA prethodno inkubirana s RoLA 16 sati pri 30°C u puferu 10 mM Tris-HCl, pH=8. Tanka linija: RoLA i CutL1 su dodani simultano u reakcijsku smjesu s PBSA mikročesticama. Točkasta linija: Dodan je samo CutL1 u otopinu s mikročesticama PBSA. Preuzeto i prilagođeno iz reference²⁰.



Slika 15. Shematski prikaz lateralne mobilnosti RolA na površini PBSA. A: ako RolA formira monosloj, hidrofobni dijelovi RolA su vezani za površinu PBSA te se mogu lateralno gibati. B: Moguće je i da RolA formira amfipatsku višeslojnu strukturu gdje se molekule iz srednjeg i gornjeg sloja mogu lateralno gibati. Dodatkom CutL1, lateralno gibanje je inhibirano i dolazi do akumulacije CutL1 na površini PBSA što stimulira enzimsku razgradnju PBSA. Preuzeto i prilagođeno iz reference²⁰.

Espino-Rammer i sur. su također proučavali uporabu hidrofobina 2. razreda (HFB4 i HFB7) iz roda gljiva *Trichoderma* kao potencijalne površinski aktivne tvari za poboljšanje efikasnosti kutinaza u razgradnji poli(etilen-tereftalat) (PET) plastike koja je uglavnom rezistentnija u donosu na PBSA. HFB4 i HFB7 hidrofobini koje su koristili nisu bili u slobodnom obliku zbog netopljivosti i adhezije na staklene površine. Umjesto slobodnih hidrofobina, koristili su fuziju hidrofobina na N-kraju s GST-om (glutation-S-transferazom) na njegovom C-kraju što je dovelo do dobro topljivog fuzijskog proteina koji je zadržao površinski aktivna svojstva. Mjereći koncentraciju produkata katalitičke hidrolize MHET (mono-(2-hidroksietil)- tereftalat) ili TA (tereftalna kiselina), zaključili su da HFB4-GST fuzijski protein pokazuje djelovanje na katalitičku hidrolizu PET-a koje podsjeća na adsorpcijsku izotermu dok HFB7-GST fuzijski protein samo pri jako niskim koncentracijama pokazuje aktivacijsku ulogu, a pri višim koncentracijama ponaša inhibitorno (slika 16).



Slika 16. Uloga hidrofobina HFB4 iz *T. reesei*, *T. atroviride*, *T. vires* i HFB7 iz *T. vires* na hidrolizu PET-a pomoću kutinaze iz *H. insolens* (0.2 mg/ml). A) PET hidroliza prikazana količinom MHET ili TA u μmol nakon 12 sati po količini kutinaze (mg). B) stupčasti dijagram koji pokazuje efekt čistog GST-a na kutinaznu aktivnost. Preuzeto i prilagođeno iz reference²¹

HFB4-GST fuzijski protein iz organizama *T. atroviride*, *T. reesei*, *T. vires* je pri masenoj koncentraciji 50 $\mu\text{g/ml}$ doveo do povećanja enzimske aktivnosti od redom 2,4 , 2,5 i 3,4 puta, dok je HFB7-GST pokazao najveće povećanje enzimske aktivnosti pri masenoj koncentraciji 0,5 $\mu\text{g/ml}$ od 2,4 puta dok je veća koncentracija uzrokovala inhibiciju. GST se pokazao kao inhibicijsko sredstvo kutinaze iz *H. insolens*, no zanimljivo je da inhibicija opada povećanjem koncentracije GST-a i dolazi do povratka enzimske aktivnosti. Potencijalni mehanizam djelovanja HFB4 i HFB7 je različit od onoga kod RolA (hidrofobina 1. razreda) kod hidrolize PBSA pomoću CutL1. PET nije potrebno prethodno inkubirati s hidrofobinima (HFB4 i HFB7) što sugerira da ne dolazi do formiranja monosloja. Prepostavljeni mehanizam autora je nekovalentno vezanje korištenih hidrofobina na kutinazu što poboljšava vezanje kutinaze na hidrofobnu površinu PET-a. No, potrebna su dodatna istraživanja vezana za utjecaj hidrofobina 2. razreda na razgradnju PET-a pošto na primjerima HFB4 i HFB7 vidimo značajnu razliku u njihovom djelovanju²¹.

2.5. Zaključak

Hidrofobini su se u mnogim biotehnološkim sferama pokazali kao korisne površinski aktivne molekule pogotovo u svrhu funkcionalizacije površina i u obliku fuzijskih proteina. Fuzijski proteini s hidrofobinima imaju svijetlu budućnost u okviru staničnog inženjeringa i uzgajanja funkcionalnih tkiva kao i u funkcionalizaciji hidrofobnih površina u svrhu katalitičke aktivnosti i poboljšanja adsorpcije aktivnih ili štetnih tvari što bi se pokazalo korisnim za ekologiju. Na temelju primjera njihove potencijalne biotehnološke uloge, hidrofobini su proteini vrijedni daljnjeg istraživanja i razumijevanja u svrhu poboljšanja već postojećih ili otkrića novih biotehnoloških procesa.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. Q. Ren, A.H. Kwan, M. Sunde, *Biopolymers* **100** (2013) 601–612.
2. M. Sunde, A.H.Y. Kwan, M.D. Templeton, R.E. Beever, J.P. Mackay, *Micron* **39** (2008) 773–784.
3. H.A.B. Wösten, K. Scholtmeijer, *Appl Microbiol Biotechnol* **99** (2015) 1587–1597.
4. M.B. Linder, *Curr Opin Colloid Interface Sci* **14** (2009) 356–363.
5. L. Hobley, A. Ostrowski, F. V. Rao, K.M. Bromley, M. Porter, A.R. Prescott, C.E. MacPhee, D.M.F. Van Aalten, N.R. Stanley-Wall, *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** (2013) 13600–13605.
6. A.H.Y. Kwan, R.D. Winefield, M. Sunde, J.M. Matthews, R.G. Haverkamp, M.D. Templeton, J.P. Mackay, P. Butko, J.S. Goodwin, J.P. Stroud, Structural Basis for Rodlet Assembly in Fungal Hydrophobins, 2006.
7. S. Askolin, T. Nakari-Setälä, M. Tenkanen, *Appl Microbiol Biotechnol* **57** (2001) 124–130.
8. M. Khalesi, T. Venken, S. Deckers, J. Winterburn, Z. Shokribousjein, K. Gebruers, H. Verachtert, J. Delcour, P. Martin, G. Derdelinckx, *Ind Crops Prod* **43** (2013) 372–377.
9. B.S. Murray, *Curr Opin Colloid Interface Sci* **12** (2007) 232–241.
10. A.J. Green, K.A. Littlejohn, P. Hooley, P.W. Cox, *Curr Opin Colloid Interface Sci* **18** (2013) 292–301.
11. Z. Shokribousjein, S.M. Deckers, K. Gebruers, Y. Lorgouilloux, G. Baggerman, H. Verachtert, J.A. Delcour, P. Etienne, J.M. Rock, C. Michiels, G. Derdelinckx, *Cerevisia* **35** (2011) 85–101.
12. T. Nakari-Setälä, J. Azeredo, M. Henriques, R. Oliveira, J. Teixeira, M. Linder, M. Penttilä, *Appl Environ Microbiol* **68** (2002) 3385–3391.
13. B. Niu, Y. Huang, S. Zhang, D. Wang, H. Xu, D. Kong, M. Qiao, *Protein Expr Purif* **83** (2012) 92–97.
14. K. Kurppa, V.P. Hytönen, T. Nakari-Setälä, M.S. Kulomaa, M.B. Linder, *Colloids Surf B Biointerfaces* **120** (2014) 102–109.
15. Y. Corvis, A. Walcarius, R. Rink, N.T. Mrabet, E. Rogalska, *Anal Chem* **77** (2005) 1622–1630.
16. M. Haas Jimoh Akanbi, E. Post, A. Meter-Arkema, R. Rink, G.T. Robillard, X. Wang, H.A.B. Wösten, K. Scholtmeijer, *Colloids Surf B Biointerfaces* **75** (2010) 526–531.
17. H. Valo, M. Kovalainen, P. Laaksonen, M. Häkkinen, S. Auriola, L. Peltonen, M. Linder, K. Järvinen, J. Hirvonen, T. Laaksonen, *Journal of Controlled Release* **156** (2011) 390–397.
18. M.B. Linder, M. Qiao, F. Laumen, K. Selber, T. Hyytiä, T. Nakari-Setälä, M.E. Penttilä, *Biochemistry* **43** (2004) 11873–11882.
19. X. Wang, H. Wang, Y. Huang, Z. Zhao, X. Qin, Y. Wang, Z. Miao, Q. Chen, M. Qiao, *Biosens Bioelectron* **26** (2010) 1104–1108.
20. T. Takahashi, H. Maeda, S. Yoneda, S. Ohtaki, Y. Yamagata, F. Hasegawa, K. Gomi, T. Nakajima, K. Abe, *Mol Microbiol* **57** (2005) 1780–1796.
21. L. Espino-Rammer, D. Ribitsch, A. Przylucka, A. Marold, K.J. Greimel, E.H. Acero, G.M. Guebitz, C.P. Kubicek, I.S. Druzhinina, *Appl Environ Microbiol* **79** (2013) 4230–4238.

22. <https://www.rcsb.org/> (datum pristupa 28. lipnja 2023.)