

DOI: <https://doi.org/10.24275/rtediq.11.098>

Autoensamblaje de la hidrofobina de clase I (ABH4) de *Agaricus bisporus* en diferentes interfases

Rojas Osnaya Jesús*, Quintana Quirino Mariana, Nájera Hugo

Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa. Departamento de Ciencias Naturales. Laboratorio de Biofísicoquímica.
Av. Vasco de Quiroga 4871. Col. Santa Fe Cuajimalpa, Alcaldía Cuajimalpa, Ciudad de México. C.P. 05348, México.

*Autor para correspondencia: jrojas@cua.uam.mx

ORCID : 0000-0002-0289-1172

Recibido:

17/mayo/2025

Aceptado:

15/diciembre/2025

Palabras clave:

Hidrofobina,
superficies,
interfases

Keywords:

Hydrophobin,
surfaces,
interfaces

RESUMEN

Se realizó la extracción y purificación de la hidrofobina de clase I (ABH4) a partir del sombrero de *Agaricus bisporus*, así como la producción de fibrillas en las interfases sólido-líquido y agua-aceite. La extracción y purificación fueron eficientes para la ABH4, obteniéndose una banda de ~12 kDa. La ABH4 aumentó el ángulo de contacto en vidrio; mientras que, para cuarzo, teflón y silicio este disminuyó. Mediante microscopía electrónica de barrido y de fuerza atómica, se observó que ABH4 produjo diferentes estructuras tipo amiloide en la interfase sólido-líquido. Por otro lado, en la interfase agua-aceite, ABH4 logró encapsular aceite de aguacate produciendo micelas de tamaño entre 1 y 10 μm .

ABSTRACT

Hydrophobin class I (ABH4) was extracted and purified from the outer cap of *Agaricus bisporus*, producing fibrils at solid-liquid and water-oil interfaces. The extraction and purification were efficient for ABH4, obtaining a band of ~12 kDa. ABH4 increased the contact angle on glass, and decreased the contact angle on quartz, Teflon, and silicon. Scanning electron and atomic force microscopy showed that ABH4 produced distinct amyloid-like structures at the solid-liquid interface. ABH4 encapsulated avocado oil, at the oil-water interface, producing micelles ranging in size from 1 to 10 μm .

Introducción

Los hongos microscópicos y macroscópicos son organismos que desempeñan un papel importante en la naturaleza. Se ha reportado que existen más de 2000 especies en la naturaleza de los cuales solo el ~1% es aceptado para consumo humano. Los hongos más consumidos alrededor del mundo son *Lentinus edodes*, *Pleurotus spp.* y *Agaricus bisporus* (González *et al.*, 2020). Se ha informado que *A. bisporus* contiene un gran número de compuestos y proteínas, como: polisacáridos, pigmentos, lectinas, tirosinasas e hidrofobinas (Kulkarni *et al.*, 2017; Rojas-Osnaya y Nájera, 2025).

Las hidrofobinas son proteínas anfílicas activas de superficie, su peso molecular se encuentra entre 7 y 15 kDa. Se caracterizan por contener en su secuencia ocho cisteínas, se cataloga en las clases I y II, dependiendo de sus patrones de hidropatía y requerimientos de purificación. Las hidrofobinas de clase I requieren un tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) para poder disolver las estructuras estables llamadas varillas o "rodlets". Las de clase II no son capaces de producir varillas, por lo que se pueden disolver fácilmente con etanol 60% y también con 2% de dodecilsulfato de sodio (SDS) (Wu *et al.*, 2017; Rojas-Osnaya *et al.*, 2024).

Las funciones biológicas de las hidrofobinas están relacionadas con la interacción en superficies, actúan recubriendo y modificando la hidrofobicidad e hidrofiliidad de las superficies, también pueden interaccionar en interfases aire-agua, agua-aceite, agua-sólido. Estas interacciones permiten disminuir la tensión superficial del agua en la interfase agua-aire, permitiendo que las hifas de los hongos puedan interactuar con el exterior, también la unión a sustratos hidrofóbicos como las cutículas de los insectos para provocar la secreción de enzimas y proteínas para degradar la cutícula.

Debido a la naturaleza anfipática de las hidrofobinas, es fundamental para muchas aplicaciones biotecnológicas como: estabilizar la espuma y emulsiones en productos alimenticios, inmovilizar enzimas, péptidos, células, anticuerpos, o moléculas inorgánicas en superficies (Wösten y Scholtmeijer, 2015; Rojas-Osnaya *et al.*, 2024). Por lo que el objetivo de este trabajo fue extraer y purificar a la hidrofobina de clase I (ABH4) del hongo *Agaricus bisporus* y la producción de fibrillas en las interfases sólido-líquido y agua-aceite.

Metodología

Extracción de ABH4

Agaricus bisporus (Familia: Agaricaceae, Clase: Agaricomycetes) se cultivó durante 16 días a 25 °C y se recolectó hasta que la formación del cuerpo fructífero se llevó a cabo (18 a 21 días) (Monte Blanco, México) (Kabel *et al.*, 2017). Se compró en un mercado local, la parte del sombrero se lavó, cortó y congeló a -80 °C. Posteriormente, se fragmentó en una licuadora, utilizando una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1 M adicionado con 1 % de SDS a pH 7 y 100 °C.

El material se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a 4 °C, el precipitado se lavó con agua destilada hasta eliminar el SDS, para después ser liofilizado y almacenado a 4 °C. Al sombrero liofilizado se le adicionó TFA concentrado y se mantuvo en agitación durante 4 horas a 4 °C, después se centrifugó a 8,000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Al sobrenadante se le adicionaron 5 mL de etanol al 60 %, y se le colocó un flujo de aire utilizando una bomba de pecera durante toda la noche para eliminar el TFA.

Se centrifugó a 8,000 rpm por 10 minutos a 4 °C para retirar el material no disuelto, el sobrenadante se liofilizó y almacenó a 4 °C. El liofilizado se disolvió en agua desionizada y se ajustó el pH a 7 adicionando 0.1 M de NaOH. La cuantificación de la proteína soluble se realizó a 280 nm (Lugones *et al.*, 1996).

Purificación de ABH4

El sombrero liofilizado se disolvió en agua desionizada y se ajustó el pH a 7, este se inyectó en columna de exclusión molecular (SEC) Superdex™ 200 16/600. La elución se llevó a cabo a un flujo isocrático de 1 mL min⁻¹ utilizando una solución amortiguadora de 0.1 M de fosfato de sodio adicionado con 0.15 M de NaCl y pH 7. La cromatografía se llevó a cabo en un FPLC (ÅKTA Purifier 100, GE Healthcare) (Rojas-Osnaya y Nájera, 2025).

Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes

A las fracciones obtenidas por SEC se les realizó un análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se utilizaron estándares de masa molecular de amplio intervalo como referencia, el gel se tiñó con azul de Coomassie R-250 y se analizó con el programa ImageJ 1.52 (Schneider *et al.*, 2012).

Determinación de la actividad superficial de ABH4 por ángulo de contacto

Se midió el ángulo de contacto θ (°) de una gota de agua desionizada (1 μ L) sobre teflón, silicio, vidrio y cuarzo previamente recubiertas con ABH4 (108 μ g mL⁻¹), las cuales se dejaron secar por 12 horas. Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ 1.52 para determinar el ángulo de contacto, las mediciones se realizaron por triplicado (Schneider *et al.*, 2012). El análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey Kramer ($p < 0.05$) se realizó utilizando el software NCSS 2007 (Utah, EE. UU).

Análisis de las fibrillas tipo amiloide mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se agitó ABH4 (108 μ g mL⁻¹) utilizando un vortex durante 2 minutos y se incubó a 37 °C durante 4 horas. Se depositaron 15 μ L de esta solución sobre teflón, silicio, vidrio y cuarzo. Las muestras se secaron a 37 °C durante 12 horas y se analizaron en un microscopio electrónico de barrido Hitachi TM3030 Plus (Tokio, Japón).

Análisis de las fibrillas tipo amiloide mediante microscopía de fuerza atómica (AFM)

Se agitó ABH4 (108 μ g mL⁻¹) utilizando un vortex durante 2 minutos y se incubó a 37 °C durante 4 horas. Se depositaron 15 μ L de esta solución sobre teflón, silicio, vidrio y cuarzo. Las muestras se secaron a 37 °C durante 12 horas y se analizaron en un Nanosurf NaioAFM (Liestal, Suiza), utilizando una punta (ContAl-G). Las imágenes fueron analizadas con el programa Gwyddion 2.65 para proporcionar información topográfica y morfológica de las superficies formadas por fibras de tipo amiloide.

Preparación y caracterización de emulsiones aceite en agua

Se prepararon 1 mL de las emulsiones utilizando como fase continua una solución de ABH4 (108 μ g mL⁻¹) y como fase dispersa aceite de aguacate (grado alimenticio). La concentración final del aceite fue de 1, 5 y 10%, posteriormente se sonicaron las soluciones en un baño de sonicación (40 KHz) por 30 minutos en un cuarto de temperatura (Cheng *et al.*, 2020). La estabilidad de las emulsiones se determinó visualmente, y se midió el índice de polidispersidad (IPD) por triplicado cada 24 horas utilizando un Zetasizer nano ZS90. Las emulsiones se analizaron en un microscopio óptico de campo claro (Primo Star 3, Carl Zeiss) con aumento de 100x. Las mediciones del diámetro de las micelas formadas en las emulsiones se realizaron analizando diez campos empleando el programa ImageJ 1.52.

Resultados y discusión

La figura 1 muestra las fracciones obtenidas por SEC analizadas por SDS-PAGE. Se observa que en las fracciones 45-49 se presenta una banda de ~12 kDa, estos resultados son similares a lo reportado en la literatura, donde el peso molecular de las hidrofobinas se encuentra entre 7-15 kDa (Wu *et al.*, 2017). Recientemente, se ha reportado la identificación, secuencia y el peso molecular (11.9 kDa) de la hidrofobina (ABH4) presente en el sombrero de *A. bisporus*. (Rojas-Osnaya y Nájera, 2025). Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a lo mencionado anteriormente.

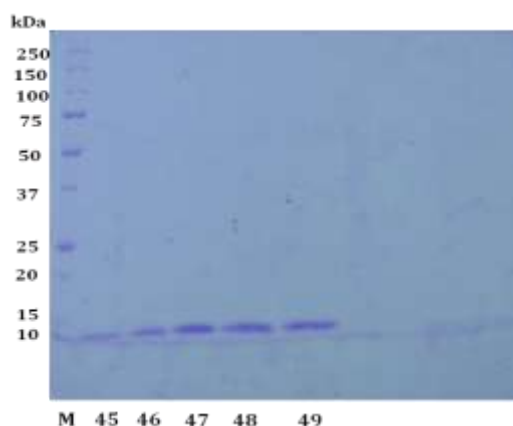


Figura 1. SDS-PAGE de ABH4 purificada del sombrero de *A. bisporus* mediante SEC (fracciones 45-49) y marcador de peso molecular (M).

En la tabla 1 se muestran los valores del ángulo de contacto de las superficies antes y después de recubrir con ABH4, mostrando diferencias significativas con respecto a los controles. El ángulo de contacto aumentó después del tratamiento con ABH4 en vidrio; mientras que, para las superficies de cuarzo, teflón y silicio el valor del ángulo de contacto disminuyó después del tratamiento.

Tabla 1. Actividad superficial de ABH4 sobre diferentes superficies.

Muestra	Angulo de contacto θ (°)	
	Control	Recubierto con ABH4 (108 μ g mL ⁻¹)
Vidrio	16.90 $\pm$ 1.24 ^a	32.68 $\pm$ 1.37 ^b
Cuarzo	27.23 $\pm$ 1.47 ^a	11.91 $\pm$ 1.81 ^b
Teflón	129.58 $\pm$ 3.52 ^a	28.95 $\pm$ 1.48 ^b
Silicio	28.35 $\pm$ 1.05 ^a	8.27 $\pm$ 0.39 ^b

Letras diferentes indican significancia ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias Tukey. En la figura 2, se puede apreciar el comportamiento de las diferentes superficies antes (A, B, C y D) y después (E, F, G y H) del tratamiento con ABH4 en presencia de una gota de agua. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Lumsdon *et al.* (2005), quienes señalan que las hidrofobinas tienen la capacidad de modificar superficies hidrofílicas a hidrofóbicas y viceversa.

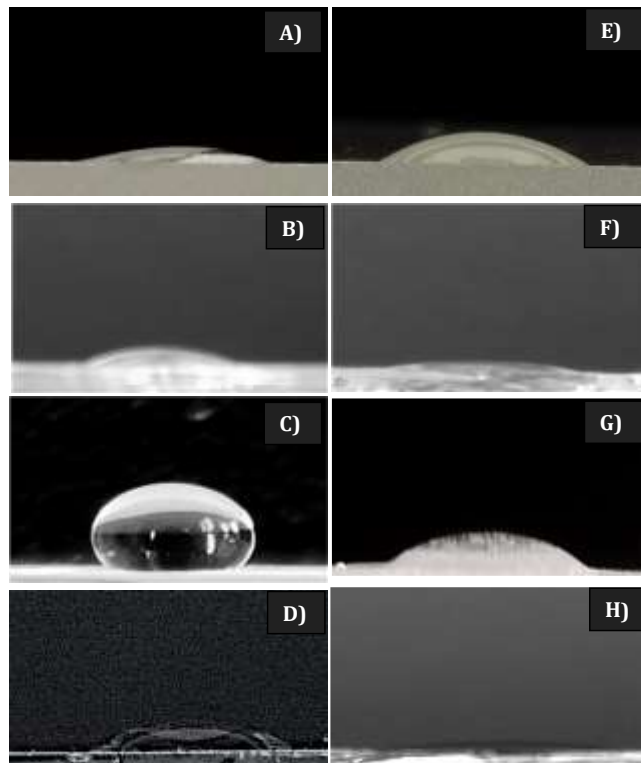


Figura 2. Actividad superficial de ABH4 sobre diferentes superficies. Controles (A, vidrio; B, cuarzo, C, teflón y D, silicio) y superficies tratadas (E, ABH4-vidrio, F, ABH4-cuarzo, G, ABH4-teflón y H, ABH4-silicio).

La producción de fibrillas tipo amiloide en la interfase sólido-líquido en diferentes superficies se estudiaron mediante SEM. En la figura 3A (vidrio) se encontraron estructuras fibrilares paralelas en forma de aguja cristalina con un tamaño de $\approx 3 \mu\text{m}$. También se observan estas estructuras fibrilares en teflón (3C); sin embargo, estas no se aprecian con forma paralela ni de forma aguja cristalina. Las fibrillas producidas en cuarzo (3B) y silicio (4D) presentaron estructuras amorfas distribuidas en ambas superficies. Estos resultados son similares con lo reportado en la literatura, donde señalan que las fibras tipo amiloide producidas por la hidrofobinas cambian su estructura dependiendo de la superficie en la que se encuentren (Rojas-Osnaya y Nájera, 2025).

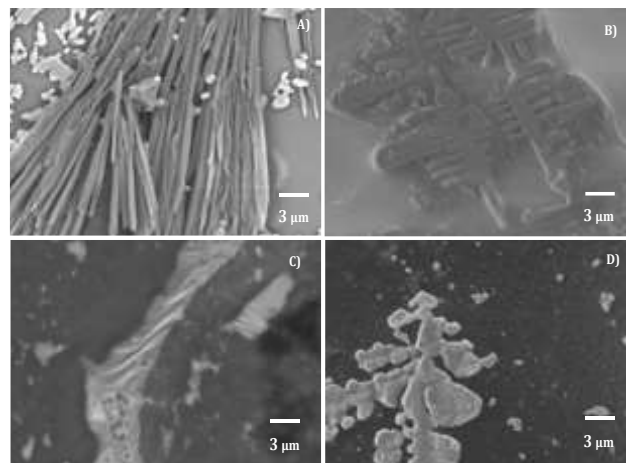


Figura 3. Micrografías SEM de fibrillas formadas por ABH4 sobre vidrio (A), cuarzo (B), teflón (C) y silicio (D) después de agitar durante 2 minutos e incubar a 37°C durante 4 horas.

En la figura 4 se muestra la producción de fibras tipo amiloide en diferentes superficies analizadas por AFM. En esta figura se observan estructuras fibrilares paralelas y alineadas en vidrio (4A); mientras que, en cuarzo (4B), teflón (4C) y silicio (4D) se presentan aglomerados amorfos.

El análisis de AFM corrobora el tipo de estructura y morfología observados por SEM. Previamente se ha reportado que la AFM, proporciona información sobre propiedades estructurales de las fibrillas y procesos de fibrillogénesis, permitiendo una mejor caracterización de las fibras amiloides (Adamcik y Mezzenga, 2012).

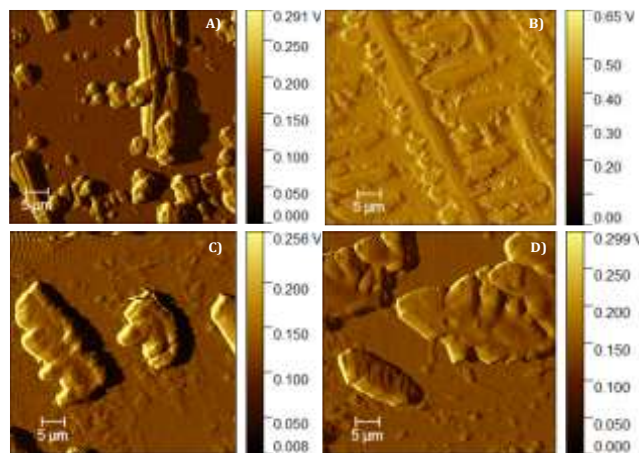


Figura 4. Micrografías AFM de fibrillas formadas por ABH4 sobre vidrio (A), cuarzo (B), teflón (C) y silicio (D), después de agitar durante 2 minutos e incubar a 37°C durante 4 horas.

Los resultados de estabilidad y determinación del IPD de las emulsiones se muestran en la figura 5A y 5B, respectivamente.

En la figura 5A se observa que las emulsiones de 1 y 5% de aceite de aguacate presentan estabilidad, ya que las fases continua y dispersa no se separan hasta después de 3 días. Las emulsiones presentan un aspecto blanquecino y translúcido con respecto al control lo cual se debe a que hay mayor dispersión de la luz. La emulsión de 10% se separó desde el primer día. Después de 6 días las tres emulsiones presentan completa separación de ambas fases. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Cheng et al. (2020), donde la hidrofobina (HGFI) obtenida de *Escherichia coli* a una concentración 0.1 mg mL⁻¹ logró encapsular 7% de aceite de oliva, la emulsión fue estable hasta 3 días. Respecto al IPD (figura 5B), las emulsiones de 5 y 10% presentaron un valor menor de IPD con respecto a la emulsión de 1%. No obstante, los tres sistemas presentaron un valor de IPD mayor a 0.3 lo que quiere decir, con base en la literatura, que las tres emulsiones presentan una distribución de tamaño de partículas heterogénea (Danaei et al., 2018).

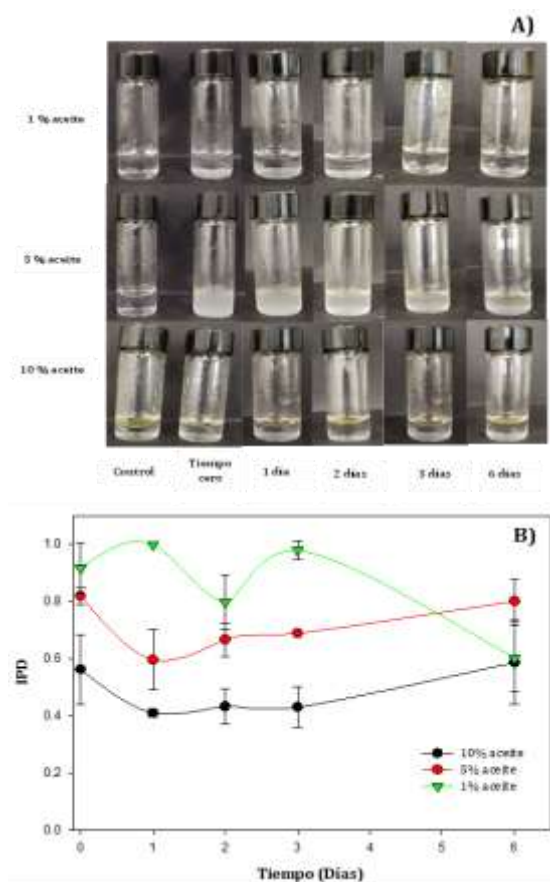


Figura 5. A. Estabilidad de las emulsiones producidas por ABH4 utilizando aceite de aguacate como fase dispersa a diferentes concentraciones. **B.** Determinación del IPD de las emulsiones producidas por ABH4 utilizando aceite de aguacate como fase dispersa a diferentes concentraciones.

En la figura 6, se presentan las micrográficas ópticas de las emulsiones y la frecuencia relativa de los diámetros de las mismas producidas por ABH4, utilizando aceite de aguacate como fase dispersa a diferentes concentraciones.

En la figura 6A, 6B y 6C se observa que las emulsiones presentaron micelas de diferente diámetro después de tres días, los cuales oscilaron entre 1 y 10 μ m, por lo que estos sistemas presentan micelas de tamaño heterogéneo. Las emulsiones de 5 y 10% de aceite presentaron un mayor porcentaje de micelas con diámetro de 1 a 5 μ m; mientras que, la emulsión de 1% presentó un mayor porcentaje de micelas con diámetro de 2 a 3 μ m. Estos resultados son similares con lo reportado por Cheng et al. (2020), quienes señalan que la hidrofobina (HGFI) de *E. coli* produjo micelas de un tamaño aproximado de 10 μ m.

En otro estudio, se ha reportado que las micelas con un tamaño menor a 10 μ m se consideran miniemulsiones (Sjöblom, 2006). En el presente trabajo, ABH4 de *A. bisporus* logró producir micelas de tamaño entre 1 y 10 μ m en las emulsiones, por lo que se puede decir que la hidrofobina de este estudio permite formar miniemulsiones.

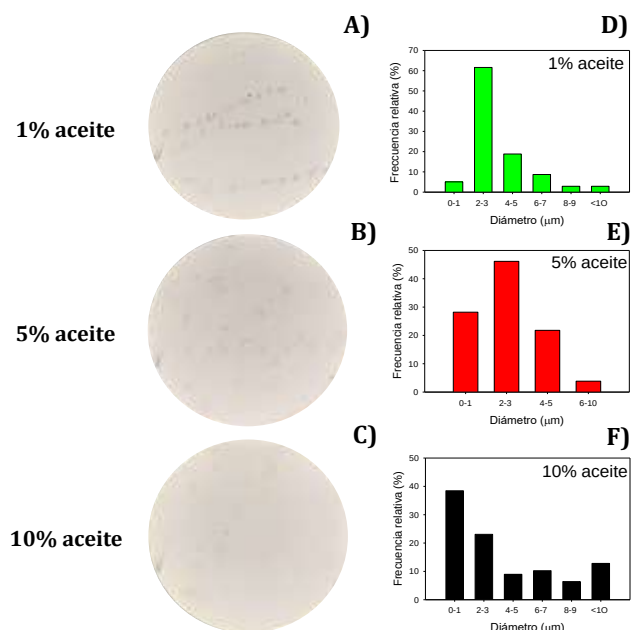


Figura 6. Micrográficas ópticas a 100x (A) 1%, (B) 5%, (C) 10% y frecuencia relativa de los diámetros (D) 1%, (E) 5%, (F) 10% de las emulsiones producidas por ABH4 utilizando aceite de aguacate como fase dispersa a diferentes concentraciones.

Conclusiones

En este trabajo se logró purificar la hidrofobina ABH4 presente en el sombrero de *Agaricus bisporus* obteniendo una banda de ~12 kDa. Así mismo, se estudió el autoensamblaje de la ABH4 en diferentes interfaces y se observó que esta hidrofobina modificó las superficies hidrofóbicas a hidrofílicas y viceversa; produciendo estructuras cristalinas o amorfas en la interfase sólido-líquido. Por otro lado, en la interfase aceite-agua, ABH4 logró encapsular aceite de aguacate a diferentes concentraciones produciendo micelas de diferente tamaño.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada para la estancia posdoctoral de JRO.

Referencias

- Adamcik, J., & Mezzenga, R. (2012). Study of amyloid fibrils via atomic force microscopy. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(6), 369-376. doi.org/10.1016/j.cocis.2012.08.001
- Cheng, Y., Wang, B., Wang, Y., Zhang, H., Liu, C., Yang, L., ... & Wang, Z. (2020). Soluble hydrophobin mutants produced in *Escherichia coli* can self-assemble at various interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 573, 384-395. doi.org/10.1016/j.jcis.2020.04.012
- Danaei, M. R. M. M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., ... & Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57. doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057
- González, A., Cruz, M., Losoya, C., Nobre, C., Loredó, A., Rodríguez, R., ... & Belmares, R. (2020). Edible mushrooms as a novel protein source for functional foods. *Food & function*, 11(9), 7400-7414. doi.org/10.1039/D0FO01746A
- Kabel, M. A., Jurak, E., Mäkelä, M. R., De Vries, R. P. (2017). Occurrence and function of enzymes for lignocellulose degradation in commercial *Agaricus bisporus* cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 4363-4369. doi.org/10.1007/s00253-017-8294-5
- Kulkarni, S., Nene, S., & Joshi, K. (2017). Production of Hydrophobins from fungi. *Process biochemistry*, 61, 1-11. doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.012
- Lugones, L. G., Bosscher, J. S., Scholtmeyer, K., de Vries, O. M., & Wessels, J. G. (1996). An abundant hydrophobin (ABH1) forms hydrophobic rodlet layers in *Agaricus bisporus* fruiting bodies. *Microbiology*, 142(5), 1321-1329. doi.org/10.1099/13500872-142-5-1321
- Lumsdon, S. O., Green, J., & Stieglitz, B. (2005). Adsorption of hydrophobin proteins at hydrophobic and hydrophilic interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 44(4), 172-178. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.06.012
- Rojas-Osnaya, J., Quintana-Quirino, M., Espinosa-Valencia, A., Bravo, A. L., & Nájera, H. (2024). Hydrophobins: multitask proteins. *Frontiers in Physics*, 12, 1393340. doi.org/10.3389/fphy.2024.1393340
- Rojas-Osnaya, J., & Nájera, H. (2025). Assembly of Hydrophobin class I from *Agaricus bisporus* produced different amyloid-like fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1873(1), 141048. doi.org/10.1016/j.bbapap.2024.141048
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671-675. doi.org/10.1038/nmeth.2089
- Sjöblom, J. (Ed.). (2006). *Emulsions and emulsion stability* (Vol. 45). New York, NY, USA: Taylor & Francis.
- Wösten, H. A., & Scholtmeijer, K. (2015). Applications of hydrophobins: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 1587-1597. doi.org/10.1007/s00253-014-6319-x
- Wu, Y., Li, J., Yang, H., & Shin, H. J. (2017). Fungal and mushroom hydrophobins: A review. *Journal of Mushroom*, 15(1), 1-7. doi.org/10.14480/JM.2017.15.1.1