



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA**

**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y FUNCIONAL DEL  
AISLADO DE PROTEÍNA DEL HUITLACOCHÉ (*Ustilago maydis*  
D.C. CORDA)**

**TESIS DE MAESTRÍA**

**Que como requisito parcial para obtener el grado de:**

**MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA**

**Presenta:**

**KASSANDRA BONNET**

**Bajo la dirección de: DRA. CONSUELO SILVIA OLIVIA LOBATO  
CALLEROS**



**APROBADA**



**Maestría en  
Ciencia y Tecnología Agroalimentaria**  
Departamento de Ingeniería Agroindustrial Universidad Autónoma Chapingo



México, Estado de México, 30 de noviembre de 2021

**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y FUNCIONAL DEL AISLADO DE PROTEÍNA DEL HUITLACOQUE (*Ustilago maydis* D.C. CORDA)**

Tesis realizada por Kassandra Bonnet bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA**

DIRECTORA:



\_\_\_\_\_  
Dra. Consuelo Silvia Olivia Lobato Calleros

CODIRECTORA:



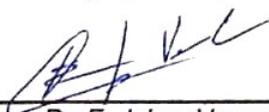
\_\_\_\_\_  
Dra. Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez

ASESORA:



\_\_\_\_\_  
Dra. Lardy Hernández Rodríguez

ASESOR:



\_\_\_\_\_  
Dr. E. Jaime Vernon Carter

## CONTENIDO

CONTENIDO .....	iii
LISTA DE CUADROS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
ABREVIATURAS USADAS .....	viii
DEDICATORIAS .....	ix
AGRADECIMIENTOS .....	xi
DATOS BIOGRÁFICOS.....	xiii
Datos personales .....	xiii
Desarrollo académico.....	xiii
1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
2.1 Generalidades de los hongos comestibles .....	4
2.2 Importancia económica de los hongos.....	5
2.3 Funcionalidad y compuestos bioactivos de hongos .....	5
2.4 Propiedades tecnofuncionales de proteínas de origen fúngico.....	6
2.5 Ustilago maydis (D. C. Corda) .....	7
2.6 Huitlacoche .....	7
2.6.1 Producción del huitlacoche .....	8
2.6.2 Marco cultural, histórico y gastronómico .....	8
2.6.3 Composición nutricional del huitlacoche .....	9
2.6.4 Bioactividad del huitlacoche .....	10
2.7 Literatura citada .....	11

3	ARTÍCULO CIENTÍFICO .....	14
3.1	Resumen .....	14
3.2	Palabras clave .....	14
3.3	Abstract.....	15
3.4	Keywords .....	15
3.5	Introducción .....	16
3.6	Materiales Y Métodos .....	18
3.6.1	Materiales .....	18
3.6.2	Acondicionamiento del huitlacoche .....	19
3.6.3	Análisis químico proximal.....	19
3.6.4	Solubilidad como función del pH.....	19
3.6.5	Obtención del aislado de proteínas del huitlacoche (APH) .....	20
3.6.6	Perfil de aminoácidos.....	21
3.6.7	Potencial zeta ( $\zeta$ ) del APH .....	22
3.6.8	Perfil colorimétrico .....	23
3.6.9	Propiedades biológicas Procesamiento térmico del APH .....	23
3.6.10	Propiedades tecnofuncionales .....	27
3.6.11	Análisis estadístico .....	30
3.7	Resultados y discusión .....	30
3.7.1	Composición químico proximal de la harina desgrasada de huitlacoche (HDH) .....	30
3.7.2	Solubilidad de proteínas como función del pH.....	31
3.7.3	Rendimiento proteínico del aislado de proteína del huitlacoche	31

3.7.4	Composición de aminoácidos de la harina desgrasada del huitlacoche (HDH) .....	33
3.7.5	Potencial $\zeta$ del APH .....	1
3.7.6	Perfil colorimétrico .....	2
3.7.7	Propiedades biológicas .....	3
3.7.8	Propiedades tecnofuncionales .....	10
3.8	Conclusiones .....	14
3.9	Literatura citada .....	15

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química proximal de la harina desgrasada de huitlacoche (HDH).....	30
Cuadro 2. Composición de aminoácidos de la proteína de huitlacoche comparada con otras proteínas (g 100 g <sup>-1</sup> de proteína).....	1
Cuadro 3. Perfil de color de la harina desgrasada (HDH) y el aislado de proteína (APH) de huitlacoche. ....	2
Cuadro 4. Digestibilidad proteínica relativa del aislado de proteína de huitlacoche crudo (APH), cocido (APH <sub>c</sub> ) y frito (APH <sub>f</sub> ).....	4
Cuadro 5. Capacidad (CE) y estabilidad (EE) espumante del aislado de proteína de huitlacoche crudo (APH). ....	12

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Solubilidad de proteínas de huitlacoche a pH alcalino (A) y pH ácido (B).....	31
Figura 2. Potencial $\zeta$ del aislado de proteína de huitlacoche (APH) como función del pH. ....	1
Figura 3. Color de la harina desengrasada de huitlacoche (HDH) (A) y aislado de proteína del huitlacoche (APH) (B). ....	2
Figura 4. Distribución de pesos moleculares (SDS-PAGE) del aislado de proteína no digerido de huitlacoche sin tratamiento térmico (APH) y del aislado de proteína digerido de huitlacoche crudo (APH <sub>crd</sub> ), cocido (APH <sub>cd</sub> ) y frito (APH <sub>fd</sub> ). ....	5
Figura 5. Actividad de inhibición del radical DPPH (A) y ABTS (B) del aislado de proteína de huitlacoche.....	7
Figura 6. Contenido de compuestos fenólicos totales del aislado de proteína de huitlacoche (APH), y aislado de proteína de huitlacoche digerido in vitro sin tratamiento térmico (APH <sub>crd</sub> ), cocido (APH <sub>cd</sub> ) y frito (APH <sub>fd</sub> ). ....	8
Figura 7. Contenido de flavonoides totales en aislados de proteína nativa de huitlacoche (APH) y aislados de proteína de huitlacoche crudo (APH <sub>crd</sub> ), cocido (APH <sub>cd</sub> ) y frito (APH <sub>fd</sub> ) digeridos in vitro. ....	10
Figura 8. Diámetro medio de las burbujas con APH al 0.5 y 1 % desde 0 hasta 60 min. ....	12
Figura 9. Estabilidad de la espuma usando aislado de proteína de huitlacoche (APH; 0.5 y 1%; pH=7) a los tiempos de 0, 15, 30 y 60 minutos. ....	13

## ABREVIATURAS USADAS

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

APH: Aislado de proteína del huitlacoche crudo

APH<sub>c</sub>: Aislado de proteína del huitlacoche cocido

APH<sub>r</sub>: Aislado de proteína del huitlacoche frito

BSA: albúmina sérica bovina

CE: Capacidad espumante

CFT: Compuestos fenólicos totales

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

EE: Estabilidad espumante

FT: Flavonoides totales

APH<sub>crd</sub>: Aislado de proteína de huitlacoche crudo digerido *in vitro*

APH<sub>cd</sub>: Aislado de proteína de huitlacoche cocido digerido *in vitro*

APH<sub>cf</sub>: Aislado de proteína de huitlacoche frito digerido *in vitro*

HDH: Harina desgrasada de huitlacoche

## DEDICATORIAS

A Dios que está presente y obrando desde el principio de todo, el Alfa y la Omega de mi existencia. Él siempre ha sido fiel a lo largo de este camino y mucho más allá. Él siempre ha sido mi fortaleza que me permitió superar los retos más grandes. Me lleva más allá de lo que pueda imaginar, cada día no deja de impresionarme. Mi corazón tiene un derrame de gratitud por Él. Este logro es para Él. Toda mi vida es para Él. En Él tengo mi identidad, tengo una historia que Él ya escribió y que cada día se manifiesta siempre glorificando su bendito nombre. Gracias Papa por todo lo que he aprendido, las hermosas conexiones que me has brindado, por todo tiempo en que vas puliendo mi carácter para cumplir tu propósito perfecto en mi vida. ¡GRACIAS PAPA!

A mi esposo Rival Valcin, mi mejor amigo en la tierra, por sus muestras de amor y atención motivándome a lo largo de este camino. Gracias por ser una bendición en mi vida.

A mis padres Pierre Abel Bonnet y Mimose Désulmé por su apoyo incondicional. Gracias por enseñarme el camino correcto y por luchar para darme lo mejor en esta tierra.

A mis hermanas Djoudline Bonnet, Jennica Bonnet, Guerdica Bonnet, Yourika Bonnet y Berline Bonnet Souriac junto con su familia Emmanuel Souriac, Malaïka Souriac, Seth Sheldon Souriac y Max Kaysen Souriac, por brindarme su alegría, su apoyo y por ser esta motivación por la cual, cada día me esfuerzo a dar lo mejor de mí.

A mis suegros Mariette Siméon y Servéus Valcin y cuñadas Angeline Valcin, House-Marline Valcin y Valencia Valcin por aportar afecto y más alegría a mi vida.

A la Pastora Flor De María Solis y Macias por ser esta personalidad inspirante, siempre lista en compartir momentos de bendición conmigo. Estoy agradecida con Dios por nuestra conexión y su ministerio.

A la familia Impact Centre Chrétien por medio de la cual Dios me permitió crecer en muchas áreas de mi vida. Agradezco a Dios por la gracia derramada sobre esta familia y por la vida de los pastores Yvan y Modestine Castanou, Yann y Célia Manfoundou y la hermana Ruth Nestor.

A mis primos que amo mucho y que contribuyeron al equilibrio necesario para llegar a este logro.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Consuelo Silvia Olivia Lobato Calleros por su confianza en permitirme integrar su grupo de investigación siendo directora de este trabajo y por sus valiosos apoyos que contribuyeron fuertemente a mi buen desempeño académico.

A la Dra. Blanca Hernández Rodríguez por su paciencia, amabilidad y apoyo en la codirección de este proyecto. Gracias por su disposición en guiarme en la mejora constante de este proyecto, sus correcciones y por tiempos de aprendizaje que marcarán mi desempeño profesional.

A la Dra. Landy Hernández Rodríguez y el Dr. E. Jaime Vernon Carter por su confianza, amabilidad y sus provechosas aportaciones en las asesorías brindadas en la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar los estudios de esta maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo y particularmente al departamento de Ingeniería Agroindustria por tantas oportunidades que conllevan a mi preparación profesional.

Al programa de maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria por los financiamientos de adquisición de reactivos y materiales de laboratorio y por el valioso apoyo del Dr. Teodoro Espinosa Solares, Ingeniera Flor, Areli y los docentes de este programa.

A Dr. Juan Carlos Cuevas Bernardino, una bendición que me motivó e impulsó hacia la comunidad chapinguera y particularmente hacia esta línea de investigación. Gracias por la conexión.

A mis amigos Dr. Absalon Pierre, Elvia Joaquín Cruz y Daniel Vega por su amistad y apoyo.

Al Dr. Maximino Huerto Bravo y su familia por su amistad, amabilidad y apoyo que son de mucha consideración para mí.

A todos mis compañeros de la maestría Alejandra, Maricela, Nicolas, Gelimer, José Gabriel, Susana Yareth, Mayra, Juan Manuel, Lizbeth y Azucena, por los tiempos de convivencia, las alegrías compartidas y los momentos de apoyo.

De manera particular, gracias a Lizbeth y Azucena. Su amistad ha sido de bendición para mí.

A mis compañeros de los laboratorios de alimentos funcionales 1 y 2, Juan José, Vianney, Karla, Jairo, Adriana, Diana Edith y Diana Itzel por la convivencia, amistad y apoyo.

## **DATOS BIOGRÁFICOS**

### **Datos personales**

Nombre: Kassandra Bonnet

Fecha de nacimiento: 22 de octubre de 1992

Lugar de nacimiento: Jacmel, Département du Sud-Est, Haïti.

CURP: BOXK921022MNENXS02

Profesión: Ingeniero en Industrias Alimentarias. Fungió como asistente de investigación y luego como responsable del laboratorio CHIBAS (Centre Haïtien d'Innovation sur les Biotechnologies et l'Agriculture Soutenable) en colaboración con la Facultad de Ciencias Agronómicas y del medio ambiente (Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Environnement) de la Universidad Quisqueya, desarrollando proyectos de innovación e inocuidad en la cadena de suministro del maíz, sorgo y cacahuates.

### **Desarrollo académico**

Bachillerato: Institution Madeleine Morano (IMM) des Sœurs Salésiennes de Jacmel (2008-2012).

Licenciatura: Ingeniería en Industrias Alimentarias, Instituto Tecnológico Superior del Oriente del Estado de Hidalgo (ITESA) (2014-2017).

## 1 INTRODUCCIÓN GENERAL

El interés hacia el consumo de proteínas vegetales y fúngicas, como una alternativa para sustituir a las proteínas de origen animal se ha incrementado significativamente en estas últimas décadas (González et al., 2021). Esta tendencia se ha justificado por factores como el alto costo y el impacto ambiental de producción de proteínas animales, en comparación con aquellas vegetales y fúngicas, lo que propicia la búsqueda de alternativas más sostenibles y de menor riesgo para los consumidores (Kumar et al., 2017).

Dependiendo de la fuente vegetal, las proteínas pueden presentar deficiencias en algunos aminoácidos esenciales. Tal es el caso de los cereales y las leguminosas, que presentan un bajo contenido de aminoácidos azufrados (cisteína y metionina) y lisina (; González et al., 2021; Sá et al., 2020). Sin embargo, además del costo reducido de producción y el suministro abundante, las proteínas de origen vegetal y fúngico, constituyen una alternativa clave, por su alta calidad nutricional y la bioactividad que podrían presentar sus hidrolizados enzimáticos (Bach et al., 2017).

Las proteínas fúngicas han sido ampliamente utilizadas en alimentos nutraceuticos, debido a los beneficios que proveen a la salud de los consumidores. Además, los péptidos derivados de los hongos les confieren propiedades antioxidantes, antitumorales, antivirales, inmunomoduladoras y antihipertensivas (Xu et al., 2011; Zhou et al., 2020).

El hongo bitrófico *Ustilago maydis* D.C. Corda pertenece al orden Ustilaginales, reconocido como el agente de infestación del maíz (*Zea mays ssp. mays*) y teozintle (*Zea mays ssp. parviglumis*). Las agallas o tumores resultantes de esta enfermedad se conocen bajo la denominación de huitlacoche, siendo un manjar

de la gastronomía mexicana (Valverde et al., 2015; Valverde et al., 2012). Este alimento ha sido el tema de numerosas investigaciones, las cuales se han orientado hacia sus cualidades nutraceuticas (Juárez-Montiel et al., 2011; Valdez-Morales, Carlos, Valverde, Ramirez-Chavez, et al., 2016). Por otro lado, el huitlacoche constituye una importante fuente de proteína, cuyo contenido oscila entre 10 - 25 % en base seca (Amador-Rodríguez et al., 2015). Sin embargo, existe una deficiencia informativa relacionada con las propiedades fisicoquímicas y tecnofuncionales de la proteína que lo constituye. La importancia del conocimiento de estas propiedades radica en el hecho de que, éstas podrían aprovecharse en la promoción de la salud de los consumidores, así como en el diseño de alimentos procesados funcionales.

Con base en lo anterior, se generó la siguiente hipótesis: La caracterización fisicoquímica, biológica y tecnofuncional del aislado de proteína del huitlacoche revelará la presencia de péptidos bioactivos con actividad antioxidante y evidenciará propiedades tecnofuncionales aplicables en matrices alimenticias específicas.

Para comprobar la hipótesis de esta investigación se planteó como objetivo general: (a) determinar las características fisicoquímicas, propiedades tecnofuncionales y digestibilidad relativa de aislado de proteína de huitlacoche y (b) evaluar el efecto de la digestibilidad *in vitro* sobre el potencial antioxidante del aislado de proteína de huitlacoche crudo y de aquellos sometidos a tratamiento térmico.

Para el cumplimiento de este objetivo general, se plantearon como objetivos específicos: (a) establecer los parámetros para aislar la proteína del huitlacoche con base en su solubilidad, (b) determinar las propiedades fisicoquímicas del

aislado de proteína de huitlacoche, (c) evaluar la calidad nutricional de la proteína del huitlacoche mediante el perfil de aminoácidos, (d) analizar el efecto del tratamiento térmico sobre la digestibilidad *in vitro*, actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales del aislado de proteína de huitlacoche, (d) evaluar el efecto de la digestión *in vitro* sobre la actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales del aislado de proteína de huitlacoche, (e) analizar la capacidad de retención de agua y aceite, capacidad y estabilidad de formación de espuma del aislado de proteína de huitlacoche, así como la microestructura por microscopía óptica de las espumas formadas.

Este documento consta de tres capítulos. El presente capítulo corresponde a la introducción, que presenta las ventajas del consumo de las proteínas fúngicas, considerando al huitlacoche como una posible fuente. El segundo capítulo presenta el estado del arte realizado sobre la importancia económica, composición química, cualidades biológicas y tecnofuncionales de los hongos y termina con los antecedentes del huitlacoche considerando su sistema de producción y su importancia cultural y nutricional. Finalmente, en el tercer capítulo se presenta un artículo científico en el cual se aborda el estudio de las propiedades fisicoquímicas, tecnofuncionales y digestibilidad relativa del aislado de proteína del huitlacoche (*Ustilago maydis* D.C. Corda), así como la actividad antioxidante del aislado crudo y de aquellos sometidos a tratamiento térmico, previamente a su digestión *in vitro*.

## 2 REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Generalidades de los hongos comestibles

Últimamente, los hongos comestibles han recibido un interés particular en el ámbito de la investigación, industria de alimentos y por parte de los consumidores, debido a las diversas cualidades nutricionales y farmacológicas que presentan (González et al., 2021).

Desde el punto de vista nutricional, la composición química de los hongos comestibles provee una atracción particular para su consumo, por estar conformado por 8 - 14 % de materia seca, de la cual 20 - 25 % corresponde al contenido de proteína (Marçal et al., 2021). Bach et al. (2017) reportaron la presencia de todos los aminoácidos en *Pleurotus ostreatus*. En cuanto a los carbohidratos, representan el 50 - 65 % de la materia seca incluyendo azúcares simples y polisacáridos ( $\beta$ -D-glucanos, quitina y sustancias pécticas), 4 - 9% de fibra soluble, 22 - 30 % de fibra insoluble. Adicionalmente, los mismos autores reportan una proporción de 2 - 3 % de lípidos con un contenido elevado de ácidos linoléico y oléico. El contenido de minerales de los hongos oscila entre 6 a 11 % y los componentes mayoritarios son calcio, potasio, fósforo, magnesio, hierro, zinc, selenio, sodio y cobre. En cuanto a las vitaminas, poseen un contenido importante de tiamina (B<sub>1</sub>), riboflavina (B<sub>2</sub>), niacina (B<sub>3</sub>), folatos (B<sub>9</sub>), cobalamina (B<sub>12</sub>), vitamina C y vitaminas liposolubles como la A, D y E (Cano & Romero, 2016; Marçal et al., 2021).

## 2.2 Importancia económica de los hongos

En 2015, el mercado mundial de hongos comestibles tuvo un valor de 35 mil millones de dólares (Marçal et al., 2021). En 2019, la producción mundial se estimó en 11.89 millones de toneladas (FAOSTAT, 2021). Cano & Romero (2016) reportaron para la producción de los hongos comestibles cultivados en México, una estimación de 39,708 toneladas anuales, siendo el decimoctavo productor a nivel mundial, con una generación anual de divisas de más de 4,000 millones de dólares.

## 2.3 Funcionalidad y compuestos bioactivos de hongos

Otro aspecto de interés particular en los hongos es su bioactividad debido a la presencia de compuestos con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, antivirales, antidiabéticas, antitumorales, inmunomoduladoras, protectoras cardiovasculares, anticolesterolémicas, desintoxicantes, hepatoprotectoras y anticancerígenas. Los compuestos bioactivos más destacados son los compuestos fenólicos, flavonoides, carotenoides,  $\beta$ -D-glucanos, glicopéptidos, sesquiterpenos, antraquinonas, terpenoides, glicopéptidos, terpenoides, esteroides, tocoferol y ácido ascórbico (Martinez-Medina et al., 2021; Valverde et al., 2015).

Haciendo hincapié en las proteínas fúngicas, son reconocidas por su potencial nutracéutico. Se trata de proteínas y péptidos con funciones biológicas importantes como inmunomoduladora, inactivadora de ribosomas, antimicrobiana, antitumoral y antioxidante (Xu et al., 2011). Además de las funciones anteriores, los péptidos bioactivos derivados de proteínas fúngicas han demostrado actividad antihipertensiva (Zhou et al., 2020).

Considerando todas las cualidades mencionadas, aunado con la alta calidad de la proteína, los hongos pueden ser producidos y consumidos como una alternativa a las proteínas de la carne, tomando en cuenta que su composición química varía entre las diferentes especies existentes (Cano & Romero, 2016).

#### **2.4 Propiedades tecnofuncionales de proteínas de origen fúngico**

Existe una gran variedad de hongos con alto contenido proteico en base seca como el *Cordyceps militaris* con 29 % de proteína, la trufa (Género *Tuber*) 20 - 27%, *Lentinus tuberregium* 25 %, *Lentinula edodes* 9.87 - 28.78 % y *Tricholoma matsutake* 20.3 % (Yu et al., 2021). Generalmente, los estudios realizados con este macronutriente se relacionan con los beneficios farmacológicos y nutracéuticos de los compuestos bioactivos que derivan de ellos, por lo que, el aspecto tecnofuncional del aislado de estas proteínas para su aplicación en la industria de alimentos, es un área poco explorada.

Cruz et al. (2018) reportaron una alta capacidad de retención de aceite y capacidad de formación y estabilidad de espuma en aislados de proteína de tres cepas distintas de *Pleurotus ostreatus*. Por otra parte, Yu et al. (2021) estudiaron las propiedades tecnofuncionales de fracciones aisladas de proteína del *Cordyceps militaris* (albúmina, globulina y glutenina), en donde la fracción de glutenina demostró una capacidad espumante y emulsificante favorable, mientras que las otras dos fracciones, presentaron elevada solubilidad. Adicionalmente, destacaron la importancia de la hidrofobicidad superficial y despliegue de la cadena polipeptídica, como factores que favorecen las propiedades tecnofuncionales de las proteínas.

## 2.5 *Ustilago maydis* (D. C. Corda)

El *Ustilago maydis* (D. C. Corda) es un hongo patógeno biotrófico que pertenece al orden Ustilaginales. Este hongo requiere de los tejidos vivos de su huésped para completar su ciclo de vida. Se trata de un hongo heterotálico con un sistema de apareamiento tetrapolar y un ciclo de vida dimórfico. Tiene una fase de vida saprofítica asexual, en cuyo ciclo de vida asexual puede crecer como una levadura y una fase parasitaria, en la cual, se pueden generar esporas sexuales que sufren meiosis al germinarse (Valverde et al., 2015; Valverde et al., 2012).

El *U. maydis* (D. C. Corda) es el responsable de la enfermedad del carbón en el maíz y su planta progenitora teozintle. Para colonizar a su huésped, requiere la supresión de los factores de defensa de la planta y crear el entorno adecuado para su proliferación. Posteriormente, asimila los nutrientes como fuente de carbono y nitrógeno, dando lugar al desarrollo del micelio, colonizando los tejidos vegetales. El desarrollo de este hongo en el tejido vegetal se aprecia por la hipertrofia de células vegetales o formación de tumores o agallas en las cuales las células vegetales se dividen y se agrandan en respuesta a las señales fúngicas. En los tumores se forman grandes agregados de hongos sin ocasionar la muerte celular programada en el tejido celular circundante. De manera conjunta, la inducción del crecimiento tumoral se acompaña de la acumulación de antocianinas, lo que resulta en una pigmentación roja de los tejidos infectados (Valverde et al., 2012).

## 2.6 Huitlacoche

El huitlacoche constituye las agallas o tumores formados debido a la infestación de la mazorca del maíz (*Zea mays ssp. mays*) y teozintle (*Zea mays ssp. parviglumis*) por *Ustilago maydis* (D.C. Corda) bajo condiciones ambientales específicas (Aguayo-González et al., 2016). Naturalmente la producción del

huitlacoche puede aumentar en ambientes con humedad relativa de 72 - 80 % y temperatura de 27.2 a 30.7 °C (Garcilazo Rahme et al., 2020).

### 2.6.1 Producción del huitlacoche

El periodo de mayor producción del huitlacoche en México es en los meses de julio y agosto, obteniéndose entre 300 a 500 toneladas (Juarez-Montiel et al., 2011) y docenas de toneladas adicionales en el resto del año. Se comercializa en fresco, enlatado y liofilizado (Valdez et al., 2012). Algunos factores importantes a considerar en la producción del huitlacoche son: la producción eficiente del inoculante, el momento de la inoculación y cosecha, las características del híbrido de maíz y la cepa del *U. maydis* D. C. Corda (Juarez-Montiel et al., 2011). du Toit and Pataky (1999) demostraron que tras la inoculación de *U. maydis* D. C. Corda, la incidencia de formación de las agallas en las mazorcas fue más susceptible 10 días después de la emergencia de la seda en un área protegido de los factores de polinización. Garcilazo Rahme et al. (2020) evaluaron el rendimiento potencial por hectárea del huitlacoche producido en 8 genotipos maíz con base en el porcentaje de incidencia, índice de severidad y los análisis químico-proximales, utilizando la cepa MA-Um1 de *U. maydis*. Los resultados obtenidos, demostraron que el huitlacoche producido con maíz blanco cremoso criollo alcanzó un mayor rendimiento potencial con un porcentaje de incidencia del 73.90 % y por otra parte, el huitlacoche producido con maíz blanco criollo demostró un mayor contenido de proteína ( $15.30 \pm 0.20$  %), utilizando un factor de conversión de 4.28.

### 2.6.2 Marco cultural, histórico y gastronómico

El consumo de huitlacoche se remonta desde épocas prehispánicas en las fue conocido por los aztecas como “cuitlacohtli”, una combinación de las palabras “cuitla” que significa tierra, basura o excremento y “cochtli” cuyo significado es dormido (Garcilazo Rahme et al., 2020). Por otro lado, hoy en día el huitlacoche

es considerado como un platillo exótico de la cocina mexicana, dotado de cualidades nutricionales atrayentes. Fue introducido en los mercados de Japón, China, algunos países miembros de la Comunidad Europea como Francia, España y Alemania. Debido a la aceptación emergente de este alimento por parte de los países de Norteamérica y siendo considerado en Estados Unidos como comida gourmet con un elevado precio de venta, se condujo a un interés en la producción extensiva. A nivel internacional, ha sido apreciado por su sabor característico provisto por el sabor umami y otros componentes volátiles como hexanal, octanal, decanal, (E, E)-nona-2,4-dienal, (E)-undeca-2-enal, vainillina y sotolón. Además, el huitlacoche es un alimento con alto potencial nutracéutico (Juarez-Montiel et al., 2011; Valverde et al., 2015).

### **2.6.3 Composición nutricional del huitlacoche**

Desde el punto de vista nutricional, el huitlacoche tiene un contenido de proteína que varía entre 10 - 25% en base seca (Amador-Rodríguez et al., 2015). Este contenido proteico, es superior al del maíz que aproximadamente es el 10 % (Valverde et al., 2015). Adicionalmente, se ha demostrado que el huitlacoche contiene casi todos los aminoácidos esenciales y una gran parte de los no-esenciales, destacando a la lisina que representa el 14.84 % del total de los aminoácidos presentes, seguido de la glicina, leucina y ácido aspártico que representan en conjunto el 29.97 % del total de aminoácidos. Además, se han identificado en el huitlacoche tres de los cuatro aminoácidos que desempeñan una función importante en la generación del sabor umami, ácido glutámico, ácido aspártico y ácido tricolómico. Los principales ácidos grasos del huitlacoche son el ácido oleico y linoleico que representan el 40 y 30 % del total de ácidos grasos, respectivamente. Este contenido en ácidos grasos esenciales, podría atribuirse al maíz, el cual es uno de los cereales más abundante en ácidos grasos esenciales insaturados (Juarez-Montiel et al., 2011).

Valdez-Morales et al. (2010) reportaron glucosa y fructosa como los monosacáridos más abundantes del huitlacoche. De igual manera, encontraron un alto contenido de  $\beta$ -glucanos y fibra dietética soluble e insoluble.

#### **2.6.4 Bioactividad del huitlacoche**

El huitlacoche posee un potencial nutracéutico que le caracteriza como un alimento de alta calidad. Por sus  $\beta$ -glucanos, se cataloga dentro de los alimentos con propiedades antitumorales e inmunoestimulantes, anti-oncogénicas y anti-angiogénicas, además de mejorar la respuesta de los macrófagos y células asesinas. Por otra parte, la presencia de antocianinas en las agallas del huitlacoche constituye un indicador que confirma la infestación del sustrato por el *U. maydis*. Estos compuestos bioactivos, son polifenoles con propiedades antioxidantes (Juarez-Montiel et al., 2011). Valdez-Morales et al. (2016) evaluaron el contenido de compuestos fenólicos totales y la actividad de inhibición del radical DPPH del huitlacoche, producido en distintos genotipos de maíz y reportaron un rango de 434.2 a 921.8 mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de harina liofilizada y un promedio de 318.6  $\mu$ mol equivalentes de trolox por 100 g de harina liofilizada, obteniendo una correlación de 65 % entre el contenido fenólico total y la actividad antioxidante por DPPH.

Estas investigaciones abrieron la pauta para profundizar con estudios sobre la bioactividad del huitlacoche, analizando un componente químico específico del alimento, particularmente la proteína. La importancia del estudio de esta macromolécula radica en el hecho de que ésta, podría revelar la presencia de péptidos con bioactividad pertinente en la promoción de la salud de los consumidores. Por otra parte, además del aprovechamiento biológico de esta proteína, podrían aplicarse como ingredientes tecnofuncionales en matrices alimenticias específicas. Apoyándose en esta hipótesis, se propuso aislar la

proteína del huitlacoche y caracterizarla desde el aspecto fisicoquímico, biológico y tecnofuncional.

## 2.7 Literatura citada

- Aguayo-González, D. J., Acosta-Ramos, M., Pérez-Cabrera, L. E., Guevara-Lara, F., & García Munguía, A. M. (2016). Producción natural de huitlacoche [*Ustilago maydis* (DC) Corda] en el estado de Aguascalientes. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(5), 1043-1050.
- Amador-Rodríguez, K. Y., Martínez-Bustos, F., Pérez-Cabrera, L. E., Posadas-Del-Río, F. A., Chávez-Vela, N. A., Sandoval-Cardoso, M. L., & Guevara-Lara, F. (2015). Effect of huitlacoche (*Ustilago maydis* DC Corda) paste addition on functional, chemical and textural properties of tortilla chips. *Food Science and Technology (Campinas)*, 35(3), 452-459. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.6697>
- Bach, F., Helm, C. V., Bellettini, M. B., Maciel, G. M., & Haminiuk, C. W. I. (2017). Edible mushrooms: a potential source of essential amino acids, glucans and minerals [<https://doi.org/10.1111/ijfs.13522>]. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(11), 2382-2392. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ijfs.13522>
- Cano, E., & Romero, L. (2016). Valor económico, nutricional y medicinal de hongos comestibles silvestres. *Revista Chilena de Nutrición*, 43, 75-80. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182016000100011>
- Cruz, A., Villanueva, R., Garín-Aguilar, M., Leal-Lara, H., & Valencia del Toro, G. (2018). Functional properties of flours and protein concentrates of 3 strains of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Journal Food Science and Technology*, 55. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3312-x>
- du Toit, L., & Pataky, J. (1999). Effects of Silk Maturity and Pollination on Infection of Maize Ears by *Ustilago maydis*. *Plant Disease*, 83, 621-626. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.7.621>
- Food and Agriculture Organization Statistical (FAOSTAT). (2020). FAOSTAT - Data - Crops - Visualized - Mushrooms and truffles. Consultado 10/06/2021. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Garcilazo Rahme, O., Tello Salgado, I., Mata, G., Parraguirre Lezama, C., Valencia de Ita, M. d. I. A., & Romero Arenas, O. (2020). Evaluation of Eight Genotypes of Corn for the Commercial Cultivation of Huitlacoche in Nopalucan, Puebla, Mexico. *Agriculture*, 10(11), 535. <https://www.mdpi.com/2077-0472/10/11/535>
- González, A., Nobre, C., Simões, L. S., Cruz, M., Loredo, A., Rodríguez-Jasso, R. M., Contreras, J., Texeira, J., & Belmares, R. (2021). Evaluation of

- functional and nutritional potential of a protein concentrate from *Pleurotus ostreatus* mushroom. *Food Chemistry*, 346, 128884. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128884>
- Juarez-Montiel, M., Ruiloba de Leon, S., Chavez-Camarillo, G., Hernandez-Rodriguez, C., & Villa-Tanaca, L. (2011). Huitlacoche (corn smut), caused by the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, as a functional food. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28(2), 69-73. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2011.01.001>
- Juárez-Montiel, M., Ruiloba de León, S., Chávez-Camarillo, G., Hernández-Rodríguez, C., & Villa-Tanaca, L. (2011). Huitlacoche (corn smut), caused by the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, as a functional food. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28(2), 69-73. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.riam.2011.01.001>
- Kumar, P., Chatli, M. K., Mehta, N., Singh, P., Malav, O. P., & Verma, A. K. (2017). Meat analogues: Health promising sustainable meat substitutes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(5), 923-932. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.939739>
- Marçal, S., Sousa, A. S., Taofiq, O., Antunes, F., Morais, A. M. M. B., Freitas, A. C., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R., & Pintado, M. (2021). Impact of postharvest preservation methods on nutritional value and bioactive properties of mushrooms. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 418-431. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.007>
- Martinez-Medina, G. A., Chávez-González, M. L., Verma, D. K., Prado-Barragán, L. A., Martínez-Hernández, J. L., Flores-Gallegos, A. C., Thakur, M., Srivastav, P. P., & Aguilar, C. N. (2021). Bio-functional components in mushrooms, a health opportunity: Ergothionine and huitlacoche as recent trends. *Journal of Functional Foods*, 77, 104326. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104326>
- Sá, A. G. A., Moreno, Y. M. F., & Carciofi, B. A. M. (2020). Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 170-184. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.011>
- Valdez-Morales, M., Barry, K., Fahey, G. C., Domínguez, J., de Mejia, E. G., Valverde, M. E., & Paredes-López, O. (2010). Effect of maize genotype, developmental stage, and cooking process on the nutraceutical potential of huitlacoche (*Ustilago maydis*). *Food Chemistry*, 119(2), 689-697. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.015>
- Valdez-Morales, M., Carlos, L. C., Valverde, M. E., Ramirez-Chavez, E., & Paredes-Lopez, O. (2016). Phenolic Compounds, Antioxidant Activity and Lipid Profile of Huitlacoche Mushroom (*Ustilago maydis*) Produced in Several Maize Genotypes at Different Stages of Development. *Plant Foods Human Nutrition*, 71(4), 436-443. <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0572-3>

- Valverde, M. E., Hernández-Pérez, T., & Paredes-Lopez, O. (2012). Huitlacoche – A 21st Century Culinary Delight Originated in the Aztec Times. *Hispanic Foods: Chemistry and Bioactive Compounds*, 83–100. doi:10.1021/bk-2012-1109.ch007
- Valverde, M. E., Hernández-Pérez, T., & Paredes-López, O. (2015). Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. *International Journal of Microbiology*, 2015, 376387. <https://doi.org/10.1155/2015/376387>
- Xu, X., Yan, H., Chen, J., & Zhang, X. (2011). Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnology Advances*, 29(6), 667-674. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.003>
- Yu, X.-Y., Zou, Y., Zheng, Q.-W., Lu, F.-X., Li, D.-H., Guo, L.-Q., & Lin, J.-F. (2021). Physicochemical, functional and structural properties of the major protein fractions extracted from *Cordyceps militaris* fruit body. *Food Research International*, 142, 110211. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110211>
- Zhou, J., Chen, M., Wu, S., Liao, X., Wang, J., Wu, Q., Zhuang, M., & Ding, Y. (2020). A review on mushroom-derived bioactive peptides: Preparation and biological activities. *Food Research International*, 134, 109230. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109230>

### 3 ARTÍCULO CIENTÍFICO

## CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA, BIOLÓGICA Y TECNOFUNCIONAL DEL AISLADO DE PROTEÍNA DEL HUITLACOCHÉ (*Ustilago maydis* DC CORDA)

### 3.1 Resumen

Se aisló proteína de huitlacoche para su caracterización fisicoquímica, biológica y tecnofuncional. El aislado de proteína de huitlacoche (APH) se obtuvo mediante una extracción a pH 10, seguida de precipitación a pH 3.5 y estuvo formado por proteínas en un rango de peso molecular entre 15 – 41 kDa. Aislados de proteína de huitlacoche crudo (APH), cocido (APH<sub>c</sub>) y frito (APH<sub>f</sub>) se sometieron a un proceso de digestión *in vitro* y se evaluó su digestibilidad relativa, los contenidos de compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT), así como el potencial antioxidante empleando los radicales libres DPPH y ABTS. El APH<sub>f</sub> presentó una mayor digestibilidad ( $83.0 \pm 0.2$  %) en comparación con el APH ( $70.67 \pm 0.79$  %) y el APH<sub>c</sub> ( $75.23 \pm 0.16$  %). La actividad de captación de los radicales DPPH y ABTS estuvo relacionada con el contenido de CFT y FT. La actividad antioxidante y el contenido de CFT y FT fueron afectados negativamente por el tratamiento térmico (cocción y fritura) y positivamente por la hidrólisis enzimática por las enzimas digestivas. La proteína de huitlacoche fue rica en aminoácidos esenciales y en cuanto a aminoácidos no esenciales, se destacaron la alanina, ácido glutámico y ácido aspártico que fueron predominantes y que propician propiedades tecnofuncionales importantes. El APH demostró una elevada capacidad de retención de agua, así como una capacidad y estabilidad de formación de espuma prometedora para su uso como ingrediente en matrices alimenticias. Los resultados demostraron el potencial nutracéutico y tecnofuncional del APH.

### 3.2 Palabras clave

*Ustilago maydis* DC Corda, proteína de huitlacoche, propiedades fisicoquímicas, digestibilidad relativa, actividad antioxidante, capacidad espumante.

## PHYSICOCHEMICAL, BIOLOGICAL AND TECNOFUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF HUITLACOCHÉ PROTEIN ISOLATE (*Ustilago maydis* DC CORDA)

### 3.3 Abstract

Huitlacoche protein was isolated for its physicochemical, biological and technofunctional characterization. Huitlacoche protein isolate (APH) was obtained by a protein extraction at pH 10, followed by a precipitation at pH 3.5, and it was made up of proteins in a molecular weight range of 15 – 41 kDa. Huitlacoche protein isolates from raw (APH), cooked (APH<sub>c</sub>) and fried (APH<sub>f</sub>) huitlacoche were subjected to an *in vitro* digestion process and the relative digestibility, total phenolic (CFT) and flavonoids (FT) content, as well as the antioxidant properties using the free DPPH and ABTS radicals were evaluated. APH<sub>f</sub> showed higher digestibility ( $83.0 \pm 0.2 \%$ ) compared to APH ( $70.67 \pm 0.79 \%$ ) and APH<sub>c</sub> ( $75.23 \pm 0.16 \%$ ). DPPH and ABTS radical scavenging activity was directly related to CFT and FT content. The antioxidant activity and CFT and FT content were all affected negatively by heat treatment (cooking and frying) and positively by enzymatic hydrolysis by digestive enzymes. Huitlacoche protein was rich in essential amino acids, and some non-essential amino acids as alanine, glutamic acid and aspartic acid were predominant and provided important technofunctional properties. APH showed a high-water holding capacity, as well as a foaming capacity and stability promising for use as an ingredient in food matrices. The results demonstrated the nutraceutical and technofunctional potential of APH.

### 3.4 Keywords

*Ustilago maydis* DC Corda, Huitlacoche protein, physicochemical properties, relative digestibility, antioxidant activity, foaming capacity.

### **3.5 Introducción**

En las últimas décadas, se ha incrementado el interés hacia el consumo de proteínas de origen distinto al animal (González et al., 2021; Momen et al., 2021) a pesar de contener todos los aminoácidos esenciales (Kumar et al., 2021). Como fuentes proteínicas alternativas se han considerado los vegetales como cereales, pseudocereales y semillas (Kumar et al., 2021), así como los hongos (González et al., 2021) que presentan numerosas ventajas de impacto ambiental, económico, nutricional y funcional, en cuanto a la disminución de los riesgos de padecimiento de enfermedades metabólicas severas como diabetes, cáncer y trastornos relacionados con el corazón (Kumar et al., 2017; Kumar et al., 2021), y por la presencia de compuestos bioactivos que les confieren actividad antioxidante (Montesano et al., 2020; Zhou et al., 2020).

La producción de proteínas de origen fúngico, se ha desarrollado como una alternativa frente a la amenaza del crecimiento exorbitante de la población, el cambio climático y el desarrollo agrícola insostenible. Todo ello se debe a las múltiples ventajas de producción de los hongos, como su corto ciclo de reproducción y desarrollo, múltiples fuentes, alto contenido de aminoácidos esenciales, alto valor nutricional y además es productible con una menor huella ambiental en comparación con las proteínas de origen animal y vegetal (Yu et al., 2021).

Las proteínas fúngicas presentan compuestos bioactivos con actividades antiinflamatorias, antitumorales, antibacterianas, antioxidantes, antivirales y antidiabéticas (Cano & Romero, 2016). Proteínas bioactivas con aplicaciones farmacéuticas como lectinas, proteínas inmunomoduladoras y proteína inactivadoras de ribosomas han sido reportadas en los hongos (Yadav & Negi, 2021).

Se ha demostrado que la función biológica de las proteínas es atribuida a los péptidos bioactivos derivados de ellas, los cuales pueden ser liberados sin perder sus bioactividades. Además, los péptidos procedentes de hidrolizados de proteínas, son más susceptibles de presentar una mayor actividad en comparación con sus proteínas de origen (Zhou et al., 2020).

Es importante mencionar las cualidades tecnofuncionales de las proteínas fúngicas tales como su propiedad emulsificante (Zou et al., 2021), capacidad de retención de agua y aceite y capacidad y estabilidad de espuma (Cruz et al., 2018), además de su bajo costo de producción (González et al., 2021; Yu et al., 2021).

El *Ustilago maydis* (DC Corda) es un hongo basidiomiceto patógeno biotrófico que causa el carbón de maíz (López García et al., 2017), caracterizado por la formación de agallas o tumores en la mazorca del maíz (*Zea mays* ssp. *mays*) y teozintle (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) (Aguayo-González et al., 2016). Con respecto a su consumo, la demanda del huitlacoche en México exhibe una tendencia creciente. Se ha registrado una tasa de producción anual de 400 a 500 toneladas (AYDOĞDU & GÖLÜKÇÜ, 2017). Esta demanda se debe a las cualidades sensoriales características del huitlacoche (Juarez-Montiel et al., 2011).

Desde el punto de vista nutricional, el contenido proteínico del huitlacoche varía entre 10 – 25 % en base seca (Amador-Rodríguez et al., 2015). Se considera que la proteína de huitlacoche contiene casi todos los aminoácidos esenciales, destacando la lisina, un aminoácido deficiente en la proteína del maíz y que representa el 14.84 % del total de aminoácidos del huitlacoche (Juarez-Montiel

et al., 2011). En cuanto a las propiedades biológicas, el huitlacoche es una fuente importante de compuestos fenólicos (Amador-Rodríguez et al., 2015; León-Ramírez et al., 2014) y ha demostrado propiedad antioxidante (Aydoğdu & Gölükçü, 2017).

A pesar de las cualidades del huitlacoche, es perceptible una carencia informativa respecto a las características biológicas y tecnofuncionales de su proteína, las cuales, podrían considerarse en el diseño de alimentos nutraceuticos y como un nuevo ingrediente funcional en la industria de alimentos. Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue obtener el aislado de proteína del huitlacoche para evaluar sus propiedades fisicoquímicas, biológicas y tecnofuncionales.

### **3.6 Materiales Y Métodos**

#### **3.6.1 Materiales**

Las muestras de huitlacoche, provenientes de la variedad de maíz Asgrow 7573, fueron obtenidas con un productor del municipio de Tetecala (18° 43' 39" Norte, 99° 23' 52" Oeste y 994 msnm), de la ciudad de Tetecala en el Estado de Morelos, México. El ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, etanol y metanol se compraron a J.T. Baker® (Xalostoc, Estado de México, México). Las enzimas utilizadas para determinar la digestibilidad *in vitro*, el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH), trolox, ácido gálico y quercetina se obtuvieron de Sigma-Aldrich México (Toluca, Estado de México, México). Los reactivos de electroforesis fueron adquiridos en Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, EUA). El aceite de soya (Nutrioli, Ragasa Industrias, S.A. de C.V., Monterrey, Estado de Nuevo León, México) se obtuvo del supermercado local del Estado de México.

### **3.6.2 Acondicionamiento del huitlacoche**

Una vez colectada la muestra de huitlacoche se lavó, se desinfectó con una disolución de hipoclorito de sodio al 2 % (p/v), se secó a 50 °C hasta lograr un contenido de humedad de 8 % (p/p), se trituró en una licuadora (Osterizer, 465-42, EUA), se tamizó en una malla No. 80 (Manufacturers of Industrial and Commercial Supplies, St. Louis, MO, EUA), se desgrasó con éter de petróleo a través de un equipo soxhlet durante 6 horas a 70 °C, se envasó y se selló herméticamente en bolsas de polietileno, para su posterior almacenamiento en congelación a -20 °C.

### **3.6.3 Análisis químico proximal**

Se realizó el análisis químico proximal de la harina desgrasada de huitlacoche (HDH) (AOAC, 2000). El extracto etéreo se determinó por el método de Soxhlet AOAC 920.39; el contenido de proteína por el método de Kjeldahl (N x 6.25) AOAC 954.01 y el porcentaje de cenizas por AOAC 942.05. Los carbohidratos totales se calcularon por diferencia {100 - (% extracto etéreo + % proteína + % cenizas)}. Los resultados se expresaron en base seca. Al aislado de proteína de huitlacoche se le determinó el contenido de proteína total empleando el método de Kjeldahl mencionado.

### **3.6.4 Solubilidad como función del pH**

Se determinó el porcentaje de proteína soluble de harina desgrasada de huitlacoche (HDH) a valores de pH de 3 a 6 y de 9 a 11. Con este propósito, dispersiones de HDH en agua destilada (0.04 mg mL<sup>-1</sup>) fueron ajustadas al pH correspondiente con NaOH 1 M y/o HCl 1 M usando un potenciómetro (Conductronic PC45, Conductronic, Puebla, Puebla, México) y se agitaron durante 60 min. Luego, se centrifugaron (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG,

Hamburgo, Alemania) a 8801 ×g durante 15 min y se filtró el sobrenadante (Whatman No. 42), el cual fue utilizado para la determinación de proteína soluble.

El contenido de proteína soluble se determinó mediante el método de Lowry modificado por Peterson (1977). Con este propósito, 20 µL de muestra fueron diluidos en 980 µL de agua destilada fueron mezclados con 1 mL de una solución compuesta por Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10 %, KOCO(CHOH)<sub>2</sub>COONa•4H<sub>2</sub>O al 0.2 %, CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O al 0.1%, dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 % (p/v) y NaOH 0.8 N. Luego, se agitó y se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente (20 ± 2 °C). Posteriormente, se mezcló con 0.5 mL de Folin Ciocalteu-fenol 0.3 N y se desarrolló la reacción durante 30 min, en oscuridad y a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 750 nm con el espectrofotómetro Genesys 10S UV–VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA.). Se construyó una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de concentración de 0.01 – 0.1 mg mL<sup>-1</sup> ( $y = 4.5568x + 0.0436$ ;  $R^2 = 0.9967$ , en donde  $y$  es la absorbancia y  $x$  la concentración de BSA). Los resultados se expresaron como porcentaje de proteína disuelta respecto a la cantidad inicial presente en la disolución previamente preparada. Se calculó el porcentaje de solubilidad utilizando la ecuación 1 (Zhang et al., 2020).

$$\text{Proteína soluble (\%)} = \frac{\text{Equivalente de BSA en el sobrenadante (mg)}}{\text{Contenido de proteína cruda en la muestra (mg)}} * 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

### 3.6.5 Obtención del aislado de proteínas del huitlacoche (APH)

El aislado de proteína del huitlacoche (APH) se obtuvo con base en la metodología descrita por Chin et al. (2019) con ligeras modificaciones. Para solubilizar la proteína, la dispersión de HDH en agua (1:30, p:v) se ajustó a pH 10 con NaOH 1 M usando el potenciómetro Conductronic PC45, se mantuvo en agitación constante durante 2 h a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania) a 8000 ×g

durante 15 min a temperatura ambiente ( $20 \pm 2$  °C) con el fin de separar las sustancias insolubles. Se filtró el sobrenadante (Whatman No. 42), se precipitó la proteína ajustando el valor de pH a 3.5 con HCl 1 M y se mantuvo en agitación constante durante 1 h a temperatura ambiente ( $20 \pm 2$  °C). Posteriormente, se centrifugó (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania) a  $8000 \times g$  durante 15 min a temperatura ambiente y la proteína precipitada se lavó tres veces con agua destilada en una proporción de 1:10 (p:v). El agua se aciduló previamente a pH 3.5 con HCl 1 M. El aislado de proteína de huitlacoche (HPH) obtenido se secó a 35 °C durante 24 h en una estufa (Riossa Digital HCF-62, Ciudad de México, México), se molió manualmente en un mortero y se almacenó en un tubo de 50 mL, bajo protección de la luz a -20 °C hasta su análisis posterior.

El rendimiento de APH (RP) a partir de la HDH, se calculó utilizando la ecuación 2 reportada por (Sofi et al., 2020).

$$RP (\%) = \frac{A * B}{C * D} * 100 \quad (Ec. 2)$$

Donde A es el peso del APH obtenido (g), B el contenido de proteína en el APH (%), C el peso de la HDH (g) y D es el contenido de proteína en la HDH (%).

### 3.6.6 Perfil de aminoácidos

Se determinó la composición de aminoácidos del APH, de acuerdo con lo descrito por Reis et al. (2020) con ligeras modificaciones. Los aminoácidos se extrajeron de 2 g de HDH en 3 mL de ácido tricloroacético (1.6 % p v<sup>-1</sup>), Se agitó la muestra durante 2 min y se centrifugó dos veces a  $7000 \times g$  durante 4 min a 4 °C. Se filtró el sobrenadante con papel Whatman No. 1. Antes de la derivatización de los extractos en la precolumna, se adicionó el estándar interno L-norvalina (50 mmol L<sup>-1</sup>) a la suspensión de HDH (40 µL de estándar interno +9.960 mL de suspensión de HDH). Una alícuota de esta suspensión (500 µL) se neutralizó con 300 µL de NaOH (0.1 mol L<sup>-1</sup>). Tras la homogeneización, se mezclaron 5 µL de suspensión neutralizada con 30 µL de tampón de borato (AccQ.Fluor®, Milford, MA, EUA) y 15 µL de carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil (AQC), se dejó

reposar durante 1 min y posteriormente se calentó en un baño de agua a 55 °C durante 10 min. El extracto se filtró utilizando una membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0.22 µm de tamaño de poro (Minisart SRP 4<sup>®</sup>, Sartorius, Gottingen, Alemania) y se analizó por HPLC.

Para separar los aminoácidos se utilizó un cromatógrafo de líquidos (HPLC Nexera, SHIMADZU<sup>®</sup> Scientific Instruments, Kioto, Japón), con una columna de fase reversa (C18 Luna, Phenomenex<sup>®</sup>, California, EUA) acoplado a un detector QDa. El sistema de disolventes consistió en acetato de sodio de 0.01 mol L<sup>-1</sup> ajustado a pH 4.8 con ácido acético y acetonitrilo en elución en gradiente. El volumen de inyección fue de 2 µL y la elución en gradiente se realizó a un caudal de 0.9 mL min<sup>-1</sup> de la siguiente manera: inicial-2.5 min/0-0 % B; 2.8-4.5 min/0-3 % B; 4.5-10.0 min/3-30 % B; 10.0-11.0 min/30-100 % B; 11.0-11.75 min/100-100 % B; 11.75-12.5 min/100-0 % B, y nuevamente se reequilibró en las condiciones iniciales para otros 2.5 min, con una duración total del ciclo de 15 min hasta la siguiente inyección. La concentración de aminoácidos se calculó por medio de la interpolación en las respectivas curvas analíticas y la recuperación del estándar interno también se utilizó en los cálculos. Los resultados se expresaron en g de aminoácido 100 g<sup>-1</sup> de proteína.

### 3.6.7 Potencial zeta ( $\zeta$ ) del APH

Se midió el potencial  $\zeta$  a dispersiones acuosas de APH (0.05 % p/v), cuyo pH se ajustó a valores en el rango de 2 a 6 usando NaOH 1 M o HCl 1 M y utilizando un potenciómetro (Conductronic PC45, Puebla, México). Se utilizó un equipo Zetasizer Nano ZS90, que convierte las medidas de la movilidad electroforética en valores de potencial  $\zeta$  utilizando el modelo matemático Smoluchowski (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido) (López-Monterrubio et al., 2020).

### 3.6.8 Perfil colorimétrico

El color del APH se determinó utilizando un colorímetro Chroma-meter (modelo CR 400/410, Hunter Associates Laboratory, Reston, VA, EUA). Los parámetros obtenidos fueron:  $L^*$  = brillo o luminosidad (100 = blanco perfecto a 0 = negro);  $a^*$  = verdor/enrojecimiento [negativo (verde) a positivo (rojo)];  $b^*$  = amarillez/azulado [negativo (azul) a positivo (amarillo)] (Zang et al., 2021).

### 3.6.9 Procesamiento térmico del APH

Con la finalidad de evaluar el efecto del tipo de procesamiento térmico del huitlacoche sobre la digestibilidad de la fracción proteínica y la actividad antioxidante, se llevaron a cabo los procedimientos que se describen a continuación. Se aplicaron los procesos de cocción (70 °C, 15 min) del huitlacoche en agua destilada, en una relación 1:3 (p:v) y fritura (150 °C, 15 min), en aceite de soya (150 mL) para 1 kg de huitlacoche, utilizando una parrilla de gas. Posteriormente, las muestras de huitlacoche sometidas a cada uno de los tratamientos térmicos fueron empleadas para obtener los aislados de proteína correspondientes: cocido (APH<sub>c</sub>) y frito (APH<sub>f</sub>), aplicando la metodología de obtención del aislado proteínica de la sección 3.6.5., con un tratamiento previo de secado a 50 °C por 24 h desgrasado del huitlacoche seco.

#### 3.6.9.1 Digestibilidad relativa

La digestibilidad relativa *in vitro* se determinó en aislados de proteína obtenidos a partir de huitlacoche crudo, cocido y frito. Con este objetivo, se utilizó el método multienzimático descrito por Martínez-Velasco et al. (2018) con ligeras modificaciones. Tripsina pancreática porcina (tipo IX, 15310 U mg<sup>-1</sup> de proteína), quimotripsina pancreática b bovina (tipo II, 48 U g<sup>-1</sup> de sólido), y proteasa bacteriana (tipo XIV, 4.4 U mg<sup>-1</sup> de sólido) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) se utilizaron para la digestión enzimática. A una muestra de APH (63.8 mg) se añadieron 10 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 8 con NaOH 1 M y

utilizando un potenciómetro (Conductronic PC45, Puebla, México). Posteriormente, se añadió 1 mL de disolución acuosa enzimática (1.58 mg de tripsina y 3.65 mg de quimotripsina) y se permitió la digestión durante 10 min a 37 °C. Después de la adición de 1 mL (1.48 mg) de disolución de proteasa bacteriana, la digestión prosiguió durante 9 min a 55 °C. Posteriormente, la reacción se detuvo colocando la suspensión en un baño de agua a 85 °C por 5 min. El valor de pH se registró y fue utilizado para estimar la digestibilidad relativa *in vitro* de las proteínas de acuerdo con la ecuación 3:

$$DPR (\%) = 234.84 - 22.56 X \quad (Ec. 3)$$

Donde DPR es la digestibilidad proteínica relativa y X es el pH de las dispersiones.

Se obtuvieron los aislados de proteína digerida de huitlacoche crudo, cocido y frito, asignándoles los códigos de APH<sub>crd</sub>, APH<sub>cd</sub> y APH<sub>fd</sub>, respectivamente.

### 3.6.9.2 Distribución de pesos moleculares del APH por SDS-PAGE

La distribución de pesos moleculares del APH se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, de acuerdo con el método propuesto por (Laemmli, 1970). Se utilizó un gel de separación (12 % p/v) de acrilamida, superpuesto a un gel de concentración de acrilamida (4 % p/v). Se mezclaron 40 µL de dispersiones acuosas de APH (6.57 mg mL<sup>-1</sup>), APH<sub>crd</sub> (6.82 mg mL<sup>-1</sup>), APH<sub>cd</sub> (5.12 mg mL<sup>-1</sup>) y APH<sub>fd</sub> (5.03 mg mL<sup>-1</sup>) con 10 µL de una solución amortiguadora (pH 6.8, SDS 20 g L<sup>-1</sup>, glicerol 25 mL L<sup>-1</sup>, β-mercaptoetanol 10 mL L<sup>-1</sup>, azul de bromofenol 0.20 g L<sup>-1</sup>). Las series de muestras se cargaron en pozos del gel, montado en un equipo de electroforesis (Mini-PROTEAN®, Tetra Cell, 4-Gel System, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, EUA). El gel se tiñó con nitrato de plata (2 g L<sup>-1</sup>) para revelar las bandas de proteína (Switzer et al., 1979). Se realizó una curva estándar a partir de distancias de migración (mm) de estándares de peso molecular de proteínas en un rango de 15.229 - 56.276 kDa (Cat. 161-0305, Bio-Rad®; Hercules, CA, EUA) y el logaritmo de sus pesos

moleculares (Shapiro et al., 1967) ( $y = -0.0016x + 1.8388$ ;  $R^2 = 0.9847$ ; en donde  $y$  es el logaritmo de los valores de peso molecular y  $x$  la distancia de migración de estándares).

### 3.6.9.3 Actividad antioxidante por DPPH

Se determinó la actividad antioxidante, empleando el radical libre DPPH, del APH sin digerir, el cual se consideró como control, y de los productos de la digestión *in vitro* del APH obtenido a partir del huitlacoche: crudo (APH<sub>crd</sub>), cocido (APH<sub>cd</sub>) y frito (APH<sub>fd</sub>). El método que se siguió fue el descrito por Cheison et al. (2007) con ligeras modificaciones. Los ensayos se realizaron agregando 1.5 mL de una disolución de DPPH 0.08 mM en metanol al 80 % (v/v) y posteriormente se adicionaron 0.5 mL de la dispersión acuosa proteínica (0.8 mg<sub>proteína</sub> mL<sup>-1</sup>). Para preparar el control, se sustituyó la dispersión proteínica por agua destilada y para el blanco, la disolución de DPPH se sustituyó por metanol al 80 % (v/v). Se agitaron las mezclas y se dejaron reposar en oscuridad durante 60 min. Transcurrido este periodo, se midió la absorbancia a 515 nm con el espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Se preparó una curva estándar de Trolox (0 - 100 µM;  $y = 0.9347x - 5.1279$ ;  $R^2 = 0.9918$  en donde  $y$  es el porcentaje de inhibición y  $x$ , la concentración de trolox) y la actividad antioxidante de los aislados APH, APH<sub>crd</sub>, APH<sub>cd</sub> y APH<sub>fd</sub> (0.8 mg mL<sup>-1</sup>) se expresó como µmol equivalentes de Trolox (ET) g<sup>-1</sup> de muestra seca.

### 3.6.9.4 Actividad antioxidante por ABTS

La determinación de actividad antioxidante empleando el radical libre ABTS, se realizó para los aislados APH, APH<sub>crd</sub>, APH<sub>cd</sub> y APH<sub>fd</sub>, utilizando el procedimiento informado por Re et al. (1999), con algunas modificaciones. Se mezclaron 5 mL de ABTS 7 mM con 88 µL de persulfato de potasio 140 mM. La mezcla se mantuvo en la oscuridad por 16 h antes de su uso. Al final de este periodo, la disolución se diluyó con etanol, hasta obtener una absorbancia de  $0.700 \pm 0.002$

a 734 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV–VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para los ensayos, se mezclaron 960  $\mu\text{L}$  de la disolución del radical ABTS con 40  $\mu\text{L}$  de las dispersiones acuosas de los aislados ( $0.8 \text{ mg mL}^{-1}$ ), se dejó reaccionar durante 6 min y se midió la absorbancia a 734 nm, utilizando el agua destilada como control. Se preparó una curva estándar de Trolox ( $0 - 500 \mu\text{M}$ ;  $y = 0.1248x - 0.2928$ ;  $R^2 = 0.9995$  en donde  $y$  es el porcentaje de inhibición y  $x$ , la concentración de trolox). La actividad antioxidante se expresó como  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox (ET)  $\text{g}^{-1}$  de muestra seca.

#### 3.6.9.5 Compuestos fenólicos totales (CFT)

Se determinó la concentración de compuestos fenólicos totales (CFT) de los aislados APH, APH<sub>crd</sub>, APH<sub>cd</sub> y APH<sub>fd</sub>. Con este objetivo, se utilizó el método descrito por Singleton y Rossi (1965) modificado por Gómez-Maldonado et al. (2020). En primer lugar, se colocaron 250  $\mu\text{L}$  de dispersiones acuosas de los aislados ( $0.6 \text{ mg}_{\text{proteína}} \text{ mL}^{-1}$  para APH y  $0.638 \text{ mg}_{\text{proteína}} \text{ mL}^{-1}$  para APH<sub>crd</sub>, APH<sub>cd</sub> y APH<sub>fd</sub>) en un tubo conteniendo 200  $\mu\text{L}$  de Folin-Ciocalteu y 1250  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Tras la agitación de la mezcla, se dejó reposar 3 min. Posteriormente, se adicionaron 300  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio (15 % p/v), se dejó incubar a temperatura ambiente por 30 min y se leyó la absorbancia a 760 nm con el espectrofotómetro Genesys 10S UV–VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA.). Adicionalmente, se preparó una curva estándar de ácido gálico ( $0 - 60 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $y = 0.0136x - 0.0135$ ;  $R^2 = 0.9991$  en donde  $y$  es la absorbancia obtenida a 760 nm y  $x$  la concentración de ácido gálico en  $\text{mg L}^{-1}$ ). El contenido de compuestos fenólicos totales se expresó como  $\text{mg}$  equivalentes de ácido gálico (EAG)  $\text{g}^{-1}$  de muestra seca.

### 3.6.9.6 Flavonoides totales (FT)

Se determinó el contenido de flavonoides totales de los aislados APH, APH<sub>crd</sub>, APH<sub>cd</sub> y APH<sub>fd</sub>, siguiendo la metodología descrita por Gomes et al. (2017). Se transfirieron 250  $\mu\text{L}$  de dispersiones acuosas de los aislados ( $0.6 \text{ mg}_{\text{proteína}} \text{ mL}^{-1}$  para APH y  $0.638 \text{ mg}_{\text{proteína}} \text{ mL}^{-1}$  para APH<sub>crd</sub>, APH<sub>cd</sub> y APH<sub>fd</sub>) a un tubo de ensayo, se adicionó 1 mL de agua destilada, 50  $\mu\text{L}$  de nitrato de sodio al 5 % (p/v) y se dejó reposar durante 6 min. Posteriormente, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de cloruro de aluminio al 10 % (p/v) y transcurridos 5 min, se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de NaOH al 10 % (p/v) y se completó a un volumen de 2.5 mL, con 650  $\mu\text{L}$  de metanol. Se dejó incubar por 30 min y se leyó la absorbancia a 425 nm con el espectrofotómetro Genesys 10S UV–VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA.). Se preparó una curva estándar de quercetina ( $0 - 50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $y = 0.0014x - 0.0053$ ;  $R^2 = 0.9915$  en donde  $y$  es la absorbancia a 425 nm y  $x$ , la concentración de quercetina en  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los resultados se reportaron como  $\mu\text{g}$  equivalentes de quercetina  $\text{g}^{-1}$  de muestra seca.

### 3.6.10 Propiedades tecnofuncionales

#### 3.6.10.1 Capacidad de retención de agua y aceite

Se evaluaron la capacidad de retención de agua (CRA) y aceite (CRAC) del APH de acuerdo con lo descrito por López-Monterrubio et al. (2020).

Para determinar la CRA, se colocó la muestra seca de APH ( $\sim 1.0 \text{ g}$ ,  $P_0$ ) en un tubo de centrifuga y se pesó junto con el tubo ( $P_1$ ). Posteriormente, se adicionaron 10 mL de agua destilada a la muestra de APH, se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 1 M o HCl 1M y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Se dejó reposar la muestra a temperatura ambiente durante 30 min y se centrifugó a 3000  $\times\text{g}$  durante 20 min (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania). Se descartó el sobrenadante y se pesó el tubo de centrifuga junto con el sedimento

(P<sub>2</sub>). La CRA fue expresada en g de agua absorbida g<sup>-1</sup> de muestra y se calculó de acuerdo con la ecuación 4.

$$CRA = \frac{P_2 - P_1}{P_0} \quad (Ec. 4)$$

En donde, P<sub>0</sub> es el peso de APH, P<sub>1</sub>, el peso de APH junto con el tubo de centrifuga y P<sub>2</sub> es el peso del tubo de centrifuga junto con el sedimento.

La CRAC se determinó colocando la muestra seca de APH. Se realizó previamente el cambio del pH de 3.5 a 7.0 en la muestra que se secó posteriormente a 35 °C durante 24 h, se molió y se procedió a la determinación de la CRAC. Se colocó la muestra (~ 1.0 g, P<sub>0</sub>) en un tubo de centrifuga. Posteriormente, se pesó junto con el tubo (P<sub>1</sub>). Luego, se adicionaron 5 mL de aceite de soya a la muestra de APH y se mezcló durante 5 min en vórtex. Las mezclas de aceite y APH reposaron durante 30 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 3000 ×g durante 20 min (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania). Se descartó el sobrenadante de aceite de soya y se pesó el tubo de centrifuga (P<sub>2</sub>) junto con el sedimento. El CRAC expresado en g de aceite g<sup>-1</sup> de muestra, se calculó de acuerdo con la ecuación 5.

$$CRAC = \frac{P_2 - P_1}{P_0} \quad (Ec. 5)$$

En donde, P<sub>0</sub> es el peso de APH, P<sub>1</sub>, el peso de APH junto con el tubo de centrifuga y P<sub>2</sub> es el peso del tubo de centrifuga junto con el sedimento (López-Monterrubio et al., 2020).

### 3.6.10.2 Capacidad (CE) y Estabilidad (EE) espumante

Se utilizó el método descrito por (Das et al., 2021) para determinar la capacidad y estabilidad espumante con ligeras modificaciones. Un volumen de 30 mL de APH (0.5 y 1.0% p/v; pH 7) fue homogenizada a 10 000 rpm por 1 min con un

homogeneizador Ultra-Turrax® (T50 basic IKA Works, Inc., Wilmington, DE, EUA.), lo cual permitió incorporar el aire a la dispersión. Posteriormente, la mezcla homogeneizada se transfirió rápidamente a una probeta de 250 mL. Se midió el volumen total de la espuma a diferentes intervalos de tiempo (0, 0.5, 5, 15, 30, 45 y 60 min). Se calculó la capacidad y estabilidad espumante utilizando las ecuaciones 6 y 7, respectivamente.

$$CE (\%) = \frac{V_H - V_{NH}}{V_{NH}} \times 100 \quad (Ec. 6)$$

En donde,  $V_H$  es el volumen de la muestra homogeneizada y  $V_{NH}$  es el volumen de muestra inicial no homogeneizada.

$$EE (\%) = \frac{V_t}{V_0} \times 100 \quad (Ec. 7)$$

En donde,  $V_0$  es el volumen de la muestra homogeneizada al tiempo 0 y  $V_t$  es el volumen de la muestra homogeneizada, a intervalos de tiempo.

### 3.6.10.3 Morfología de las burbujas de aire

La morfología de las burbujas de aire a diferentes intervalos de tiempo fue observada a una magnificación de 4×, a través de un microscopio óptico (Olympus BX53F Optical Co., Ltd., Tokio, Japón) conectado a una cámara AxioCam ERc 5 s camera (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Alemania) y un software Motic Images Plus 2.0 (Motic, Corp., Ltd., Chengdu, China). El diámetro medio de las burbujas de las espumas fue estimado mediante el software ImageJ 1.53k (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Maryland, EUA) y se utilizó la ecuación 8 para calcular el diámetro medio de las burbujas (Liu & Binks, 2021).

$$d_{(1,0)} = \frac{\sum_{i=1}^n d_i}{n} \quad (Ec. 8)$$

En donde,  $d_i$  es el diámetro de burbuja y  $n$  es el número de burbujas.

### 3.6.11 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, así como también las distintas determinaciones. Los datos se sometieron a un análisis de varianza de clasificación simple y en casos pertinentes, a una comparación de medias por Tukey. La significancia se estableció en  $p \leq 0.05$ . Los resultados se expresaron como valores medios  $\pm$  desviación estándar. Se utilizó el paquete estadístico Minitab® 19.1.1 (Minitab Inc., 2019, Pennsylvania, EUA).

## 3.7 Resultados y discusión

### 3.7.1 Composición químico proximal de la harina desgrasada de huitlacoche (HDH)

En el cuadro 1, se presenta la composición química proximal de la HDH en base seca (b.s.). El contenido de proteína se encontró dentro del rango reportado por otros autores. Aydoğdu y Gölükçü (2017) reportaron  $12 \pm 0.1$  % (p/p) de proteína para muestras de huitlacoche en base seca, mientras que Garcilazo Rahme et al. (2020) encontraron en muestras de huitlacoche producidas a partir de diferentes genotipos de maíz, valores de  $10.20 \pm 0.16$  a  $15.30 \pm 0.30$  % (p/p) de proteína cruda en base seca. Estos mismos autores reportaron valores para carbohidratos totales que se encontraron en un rango de  $76.32 \pm 0.02$  a  $83.85 \pm 0.02$  % (p/p). El contenido de cenizas se encontró dentro del rango reportado por Valdez-Morales et al. (2010), el cual fue de 5.3 a 7.7 % (p/p).

Cuadro 1. Composición química proximal de la harina desgrasada de huitlacoche (HDH).

<b>Parámetros</b>	<b>% (b.s.)</b>
Cenizas	$5.83 \pm 0.08$
Extracto etéreo	$0.28 \pm 0.10$
Proteína total (N x 6.25)	$13.89 \pm 0.67$
Carbohidratos totales	$80.00 \pm 0.41$

### 3.7.2 Solubilidad de proteínas como función del pH

Los valores de pH de solubilización y de precipitación son parámetros cruciales que se tienen que establecer para una extracción alcalina de proteína, siendo la más utilizada por su simplicidad, rapidez y bajo costo (Momen et al., 2021). La mayor concentración de proteína soluble en la HDH se obtuvo a pH 10.0 y la menor a pH 3.5 (figura 1). La menor solubilidad se debió a la cercanía del pH al punto isoeléctrico de la proteína (figura 2), en el cual las cadenas polipeptídicas tienden a formar agregados macromoleculares que resultan en una baja solubilidad (Martínez-Velasco et al., 2018). González et al. (2021) obtuvieron valores similares para muestras de harina desgrasada del *Pleurotus ostreatus*, obteniendo una mayor solubilidad a pH 12.0 y una menor a pH 4.0. Comúnmente, valores de pH de solubilización que oscilan entre 8.0 a 12.0 y pH de precipitación de entre 4.0 a 5.0 son utilizados para los procesos de extracción de proteínas vegetales (Momen et al., 2021).

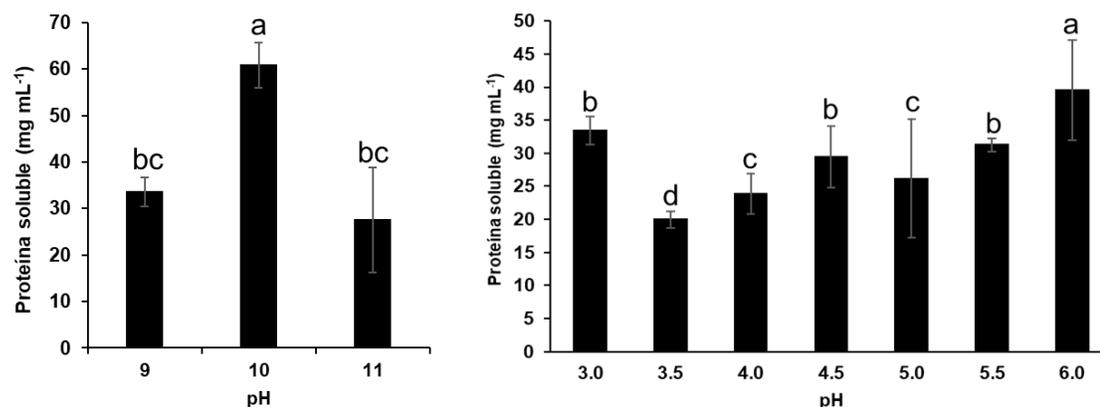


Figura 1. Solubilidad de proteínas de huitlacoche a pH alcalino (A) y pH ácido (B). Medias con superíndices distintos fueron significativamente distintas ( $P < 0.05$ ).

### 3.7.3 Rendimiento proteínico del aislado de proteína del huitlacoche

El rendimiento del aislado de proteína del huitlacoche fue de  $10.08 \pm 0.93$  % (b.s.). González et al. (2021) reportaron un rendimiento de 17% (b.s.) para el aislado de proteína de *Pleurotus ostreatus*. El rendimiento obtenido de APH fue menor que el mencionado para *Pleurotus ostreatus* probablemente debido a que no coincidió

exactamente con el punto isoeléctrico de la proteína de huitlacoche como se podrá observar más adelante en la figura 2. Por consiguiente, este rendimiento podría incrementarse al considerar al punto isoeléctrico como pH de precipitación para la extracción. Por otra parte, el APH obtenido presentó un contenido de proteína de  $70.45 \pm 1.15$  %. Zou et al. (2021) informaron un porcentaje de 67.31% de proteína en el aislado de proteína del hongo *Phlebopus portentosus*.

Considerando el contenido proteínico del APH ( $70.45 \pm 1.15$  %) y la representación porcentual promedio de los carbohidratos en el huitlacoche que es aproximadamente del 80 % en base seca (Garcilazo Rahme et al., 2020), es probable que el aislado proteínico analizado en este trabajo, contuviera una cierta proporción de polisacáridos, que podría ser los  $\beta$ -glucanos (Juarez-Montiel et al., 2011) y la quitina (Pakizeh et al., 2021), dado que en los macrohongos, la quitina forma parte de una red compleja de biopolímeros (proteína-glucano-quitina) (Martinez-Medina et al., 2021). Los  $\beta$ -glucanos por su parte, son solubles en condiciones alcalinas, sin embargo, se precipitan con etanol (Liu et al., 2021). En cuanto a la quitina, se puede modificar en quitosano por la N-desacetilación, que se puede llevar a cabo mediante un tratamiento de hidrólisis alcalina (Pakizeh et al., 2021). Por otro lado, se ha demostrado que el quitosano puede formar coacervados con proteínas vegetales a pH 7 debido a su naturaleza catiónica (Muhoza et al., 2022). Además, la solubilidad del quitosano está relacionada con los grupos aminos a lo largo de su cadena. A valores de pH inferiores a 6, estos grupos son totalmente protonados, lo que consecuentemente, incrementa altamente su solubilidad (Oladzadabbasabadi et al., 2021). Con base en ello, probablemente el APH podría contener una proporción residual de este polisacárido, el cual pudiera influir en la carga superficial del APH a diferentes valores de pH. Sin embargo, habría que evaluar el contenido de quitosano en el APH en futuros estudios.

### 3.7.4 Composición de aminoácidos de la harina desgrasada del huitlacoche (HDH)

La composición de aminoácidos de un alimento determina en gran medida su calidad proteínica, porque participan directa e indirectamente en las vías bioquímicas de crecimiento, mantenimiento y actividades metabólicas a nivel celular (Kumar et al., 2022). Por esto, se consideró importante analizar la composición de aminoácidos de la proteína del huitlacoche (Cuadro 2). El contenido de aminoácidos esenciales de la proteína del huitlacoche superó a los reportados para la proteína del maíz (dos Santos-Donado et al. 2021). Por otra parte, los resultados de este análisis demostraron la presencia de todos los aminoácidos esenciales en la proteína del huitlacoche, aunque ninguno de los valores superó los recomendados por la FAO/OMS/UNU (2002) para consumo diario de adultos. Los contenidos de leucina, treonina, valina, fenilalanina, alanina, ácido glutámico y serina fueron comparables a los de la proteína del hongo *Pleurotus eryngii* (Tagkouli et al., 2020) (Cuadro 2). Sin embargo, valores mayores fueron reportados para la proteína del hongo *Phlebotus portentosus* (Zou et al., 2021).

El contenido de lisina, aminoácido esencial, fue bajo relativamente en relación al informado para *Pleurotus eryngii* y *Phlebotus portentosus*, lo cual podría deberse a su inestabilidad estructural por el tratamiento térmico, llevando a cabo una serie de reacciones como la reacción de Maillard en la que, las cadenas laterales de los residuos de lisina reaccionan de forma cruzada con las moléculas de azúcar, para producir cadenas laterales de lisina glucosilada que no son digeribles y así propician una disminución en la biodisponibilidad de este aminoácido en la proteína contenida en la HDH (Boland & Hill, 2020). De esta manera, la glicosilación de las cadenas laterales de los residuos de lisina, tiende a disminuir la digestibilidad de la proteína, al obstaculizar los sitios de escisión de las proteasas (Li et al., 2021). Schmitz-Schug et al., (2011) demostraron una disminución considerable de lisina, al someter el alimento a un tratamiento

térmico por un tiempo prolongado. Además de la lisina, otros aminoácidos, pero en menor medida, son susceptibles de participar en la reacción de glicosilación inducida por la reacción de Maillard. Esta reacción se puede llevar a cabo en el grupo imidazol de la histidina, grupo indol del triptófano, grupo guanidina de la arginina y en el extremo N-terminal de la proteína (Wang et al., 2017), lo que podría explicar los bajos contenidos de histidina, triptófano y arginina (Cuadro 2).

La composición de los aminoácidos desempeña un papel importante en las propiedades tecnofuncionales de la proteína. De tal manera que, los aminoácidos hidrofílicos promueven la solubilidad, mientras que los aminoácidos hidrofóbicos se correlacionan negativamente con las interacciones proteína-agua. Además, disminuyen la tensión interfacial, permitiendo de esta forma, una capacidad emulsionante y espumante más fuerte (Zou et al., 2021). En la proteína del huitlacoche, los aminoácidos hidrofílicos predominantes fueron la treonina, asparagina, glutamina y serina ( $6.28 \pm 0.00$  g  $100$  g<sup>-1</sup> de proteína). Entre los aminoácidos hidrofóbicos, cabe destacar el contenido de alanina que fue más elevado ( $6.14 \pm 0.00$  g  $100$  g<sup>-1</sup> de proteína) que aquel de la proteína del *Pleurotus eryngii* ( $3.03 \pm 0.34$  g  $100$  g<sup>-1</sup> de proteína) y del maíz ( $0.15 \pm 0.00$  g  $100$  g<sup>-1</sup> de proteína), seguido por los contenidos de leucina, valina y fenilalanina ( $12.78 \pm 0.00$  g  $100$  g<sup>-1</sup> de proteína).

El contenido de aminoácidos ácidos (ácidos glutámico y aspártico;  $2.3 \pm 0.00$  g  $100$  g<sup>-1</sup> de proteína) fue mayor que el contenido de aminoácidos básicos (lisina, arginina e histidina;  $0.29 \pm 0.00$  g  $100$  g<sup>-1</sup> de proteína). Una desproporción similar entre el contenido de aminoácidos ácidos y básicos, fue reportado para el aislado de proteína de *Phlebopus portentosus* (Zou et al., 2021).

Cuadro 2. Composición de aminoácidos de la proteína de huitlacoche comparada con otras proteínas (g 100 g<sup>-1</sup> de proteína)

Aminoácidos	Huitlacoche	Recomendación de consumo en adultos FAO/OMS/UNU *		<i>Pleurotus eryngii</i> ***		Maíz **	<i>Phlebopus portentosus</i> * ***
	(g 100 g <sup>-1</sup> de harina)	(g 100 g <sup>-1</sup> de proteína)	(g 100 g <sup>-1</sup> de proteína)	(g 100 g <sup>-1</sup> de harina)	(g 100 g <sup>-1</sup> de proteína)	(g 100 g <sup>-1</sup> de proteína)	(g 100 g <sup>-1</sup> de proteína)
<b>Aminoácidos esenciales</b>							
Leucina <sup>a</sup>	0.42 ± 0.00	3.06 ± 0.00	1.90	0.40 ± 0.04	2.64 ± 0.24	0.01 ± 0.00	9.254 ± 0.28
Isoleucina <sup>a</sup>	0.06 ± 0.00	0.43 ± 0.00	1.30	0.13 ± 0.00	0.88 ± 0.05	0.01 ± 0.00	5.97 ± 0.00
Lisina <sup>d</sup>	0.04 ± 0.00	0.27 ± 0.00	1.60	0.31 ± 0.03	2.02 ± 0.19	0.08 ± 0.00	7.164 ± 0.56
Histidina <sup>d</sup>	<1.55 ± 0.00	0.01 ± 0.00	1.60	0.11 ± 0.00	0.71 ± 0.05	0.02 ± 0.00	3.881 ± 0.84
Treonina <sup>b</sup>	0.19 ± 0.00	1.37 ± 0.00	0.90	0.22 ± 0.02	1.44 ± 0.10	0.01 ± 0.00	5.672 ± 0.28
Triptófano <sup>e</sup>	0.04 ± 0.00	0.26 ± 0.00	0.90	0.17 ± 0.01	1.10 ± 0.09	0.03 ± 0.00	-
Valina <sup>a</sup>	0.22 ± 0.00	1.61 ± 0.00	1.80	-	-	<0.18 ± 0.01	6.866 ± 0.28
Metionina <sup>a</sup>	<1.49 ± 0.00	0.01 ± 0.00	-	0.02 ± 0.00	0.10 ± 0.02	<0.35 ± 0.03	0.896 ± 0.28
Cisteína <sup>b</sup>	<1.21 ± 0.00	0.01 ± 0.00	-	-	-	-	1.791 ± 0.00
Metionina + cisteína	0.27 ± 0.00	0.02 ± 0.00	1.70	0.40 ± 0.04	0.10 ± 0.02	<1.18 ± 0.09	2.687 ± 0.21
Fenilalanina + tirosina		2.48 ± 0.00	1.90		3.96 ± 0.45	-	9.254 ± 0.21
Fenilalanina <sup>e</sup>		1.97 ± 0.00	-		2.59 ± 0.23	0.01 ± 0.00	5.075 ± 0.28
<b>Aminoácidos no esenciales</b>							
Alanina <sup>a</sup>	0.85 ± 0.00	6.14 ± 0.00	0.30	0.46 ± 53.00	3.03 ± 034	0.15 ± 0.00	7.463 ± 0.28
Arginina <sup>d</sup>	<1.74 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.50	0.03 ± 2	0.20 ± 0.14	-	6.567 ± 0.00
Asparagina <sup>b</sup>	0.47 ± 0.00	3.41 ± 0.00	-	-	-	0.09 ± 0.00	-

*Continuación*

Glutamina <sup>b</sup>	0.11 ± 0.00	0.76 ± 0.00	-	-	-	0.01 ± 0.00	-
Ácido aspártico <sup>c</sup>	0.09 ± 0.00	0.68 ± 0.00	0.90	0.15 ± 0.02	1.00 ± 0.12	0.15 ± 0.00	11.343 ± 0.00
Ácido glutámico <sup>c</sup>	0.23 ± 0.00	1.62 ± 0.00	1.80	0.55 ± 4	3.60 ± 0.26	0.14 ± 0.00	12.537 ± 0.56
Glicina <sup>a</sup>	0.09 ± 0.00	0.65 ± 0.00	0.20	0.13 ± 0.02	0.86 ± 0.10	0.03 ± 0.00	5.672 ± 0.28
Prolina <sup>a</sup>	0.05 ± 0.00	0.35 ± 0.00	0.60	0.14 ± 0.02	0.94 ± 0.10	-	4.776 ± 0.00
Serina <sup>b</sup>	0.10 ± 0.00	0.74 ± 0.00	0.50	0.11 ± 0.03	0.74 ± 0.17	0.02 ± 0.00	5.672 ± 0.28
Tirosina <sup>e</sup>	0.07 ± 0.00	0.51 ± 0.00	0.50	0.21 ± 0.03	1.38 ± 0.22	0.03 ± 0.00	4.179 ± 0.00

\* (FAO/OMS/UNU, 1985)

\*\* (dos Santos-Donado et al. 2021)

\*\* (Tagkouli et al., 2020)

\*\*\*\* (Zou et al., 2021)

<sup>a</sup> Aminoácidos hidrofóbicos: Gly, Ala, Val, Leu, Pro, Met y Ile.<sup>b</sup> Aminoácidos hidrofílicos: Ser, Thr, Cys, Asn y Gln<sup>c</sup> Aminoácidos ácidos: Glu y Asp.<sup>d</sup> Aminoácidos básicos: Lys, Arg y His.<sup>e</sup> Aminoácidos aromáticos: Tir, Fen y Trp.

### 3.7.5 Potencial $\zeta$ del APH

En la figura 2, se presenta el comportamiento del potencial  $\zeta$  del aislado de proteína de huitlacoche (APH) como función del pH. De acuerdo con este análisis, se observó una carga neta cero correspondiente al punto isoeléctrico de la proteína a un valor de pH de 2.8. Los resultados indicaron que a valores de pH inferiores a 2.8, los grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ) de las cadenas laterales de la proteína se encontraron predominantemente protonados ( $-\text{NH}_3^+$ ), así como los grupos carboxilo de las cadenas laterales se encontraron predominantemente como grupos  $-\text{COOH}$ . A valores de pH superiores al pka de las cadenas laterales del Glu y Asp (3.65 y 4.25, respectivamente), los grupos carboxilo ( $-\text{COOH}$ ) muy probablemente se disociaron en forma de carboxilatos ( $-\text{COO}^-$ ), es decir se formaron grupos cargados negativamente (Nelson et al., 2005). El cambio de potencial  $\zeta$  del APH osciló entre  $+6.87 \pm 0.27$  a pH = 2.0 y  $-22.38 \pm 0.97$  a pH = 6.0. Se observó un mayor contenido de cargas superficiales negativas con respecto a las positivas, lo cual coincide con los resultados de la concentración de aminoácidos Glu y Asp (sección 3.7.4). Yu et al. (2021) reportaron valores similares de potencial  $\zeta$  en un rango de 14.1 mV (pH = 3.0) a  $-17.6$  mV (pH = 6.0) para la glutelina aislada del hongo entomopatógeno *Cordyceps militaris*.

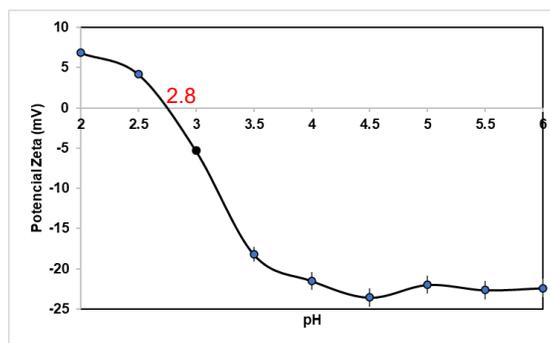


Figura 2. Potencial  $\zeta$  del aislado de proteína de huitlacoche (APH) como función del pH.

### 3.7.6 Perfil colorimétrico

Se evaluaron los parámetros de color del HDH y del APH (figura 3) con la finalidad de observar el impacto del proceso de extracción alcalina en la coloración del APH, de acuerdo con la metodología descrita por Zang et al. (2021). En el cuadro 3, se presentaron los valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  de APH y HDH y se observó que, para la HDH, los tres parámetros demostraron valores ligeramente superiores. Ésto podría ser el resultado de una probable pérdida de polifenoles o de ciertos pigmentos, durante la extracción del APH. Por la coloración roja observada, se podría considerar la posible presencia de antocianinas en HDH y APH (Valverde et al., 2012). Valores cercanos para  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  ( $28.68 \pm 2.44$ ,  $1.86 \pm 0.15$  y  $7.00 \pm 0.52$ , respectivamente) fueron reportados para tortillas adicionadas con pasta de huitlacoche al 18 % en base seca (Amador-Rodríguez et al., 2019). Inicialmente, el huitlacoche fresco presenta una coloración ligeramente blanca con ciertas áreas grises con una tonalidad plateada. La tonalidad gris se atribuye a la presencia de micelio y esporas de coloración negra en el interior de la agalla. Conforme madura la agalla, esta coloración gris tiende a tonar a negro (Campos-Montiel et al., 2011). Por lo tanto, la proteína del huitlacoche conservó su coloración original después de la extracción.

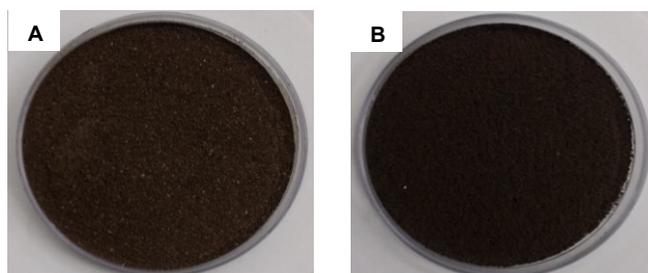


Figura 3. Color de la harina desengrasada de huitlacoche (HDH) (A) y aislado de proteína del huitlacoche (APH) (B).

Cuadro 3. Perfil de color de la harina desengrasada (HDH) y el aislado de proteína (APH) de huitlacoche.

Muestra	$L^*$	$a^*$	$b^*$
HDH	$33.30 \pm 0.81$	$3.04 \pm 0.04$	$13.28 \pm 0.07$
APH	$31.50 \pm 0.39$	$2.01 \pm 0.36$	$8.94 \pm 0.77$

### 3.7.7 Propiedades biológicas

#### 3.7.7.1 Digestibilidad *in vitro*

La digestibilidad *in vitro* permite determinar la disponibilidad de la proteína, para su absorción en el tracto intestinal (Kumar et al., 2022). Para este propósito, se determinó la digestibilidad proteica relativa (DPR) de aislados de proteína de huitlacoche sin tratamiento térmico (APH), cocido (APH<sub>c</sub>) y frito (APH<sub>f</sub>). La DPR obtenida (Cuadro 4) fue similar a la reportada para otros aislados de proteínas de origen vegetal, como el haba con  $65.98 \pm 0.47\%$  (Martínez-Velasco et al., 2018) y el huauzontle con  $83.0 \pm 0.2\%$  (López-Monterrubio et al., 2020). Varios trabajos de investigación han reportado una probable digestibilidad proteínica de entre 60 a 70 % para los hongos generalmente (Bano et al., 1988; Lavelli et al., 2018). De acuerdo con Adeleye et al. (2020) existe una relación positiva entre el tratamiento térmico y la digestibilidad relativa de las proteínas. En este sentido, el tratamiento térmico contribuye a incrementar el área superficial de las cadenas de proteína al promover el despliegue de las estructuras secundaria y terciaria, exponiendo los sitios de escisión para la proteólisis que, de otro modo, habrían sido inaccesibles para las proteasas (Adeleye et al., 2020). El tratamiento térmico tiende a aumentar la hidrofobicidad superficial de la proteína, ya que permite la exposición de los aminoácidos hidrofóbicos a la superficie, además del incremento de las láminas beta de las estructuras secundarias de la proteína. De igual manera, el tratamiento térmico preconiza la oxidación de las proteínas, resultantes en diversas modificaciones de aminoácidos, dando lugar a la reticulación de la proteína debido a la oxidación de aminoácidos básicos con grupos amino libres, oxidación del SH en enlaces S-S y/o reacciones de intercambio S-S inducidas por el SH, además de los puentes de hidrógeno, se pueden producir otros enlaces no-covalentes y enlaces cruzados de proteína-proteína. (Van de Vondel et al., 2022; Zhang et al., 2020). Por otro lado, la digestión *in vitro* promueve el desdoblamiento de la estructura de la proteína por el tratamiento térmico, favoreciendo la proteólisis (Adeleye et al., 2020; Lin et al., 2020).

Cuadro 4. Digestibilidad proteínica relativa del aislado de proteína de huitlacoche crudo (APH), cocido (APH<sub>c</sub>) y frito (APH<sub>f</sub>).

Muestra	Digestibilidad proteínica relativa (%)
APH	70.67±0.79 <sup>c</sup>
APH <sub>c</sub>	75.23±0.16 <sup>b</sup>
APH <sub>f</sub>	82.45±0.15 <sup>a</sup>

Medias con superíndices distintos fueron significativamente distintas (P<0.05)

### 3.7.7.2 Distribución de pesos moleculares

Con la finalidad de conocer los rangos de los pesos moleculares de los polipéptidos que conforman la proteína de huitlacoche y confirmar la liberación de péptidos tras el proceso de digestión *in vitro*, se evaluó la distribución de pesos moleculares del APH, así como de APH<sub>crd</sub>, APH<sub>cd</sub> y APH<sub>fd</sub>. La figura 4 presenta el perfil electroforético de todas las muestras analizadas. Para el APH, se observó bandas de peso molecular de 15.229 – 41.659 kDa con base en el estándar de pesos moleculares y para el APH<sub>crd</sub>, APH<sub>cd</sub> y APH<sub>fd</sub>, todas estas bandas se perdieron. Lo que indicó el menor peso molecular del APH<sub>crd</sub>, APH<sub>cd</sub> y APH<sub>fd</sub>, atribuido a la digestión *in vitro* de estas muestras, que resultó en la liberación de péptidos de pesos moleculares inferiores a 15.229 kDa. Durante la digestión, la tripsina hidroliza la proteína en los enlaces internos de la lisina o arginina, mientras que la quimiotripsina rompe los enlaces de los aminoácidos aromáticos o neutros (González et al., 2021). Algunas proteasas como Proteinasa pumAe (72 - 74 kDa), Proteinasa pumAi (35.3 - 36.6 kDa), Aminopeptidasa pumAPEi (58 kDa) y Dipeptidil aminopeptidasa pumDAPi (123 kDa) fueron reportadas en el *Ustilago maydis* (Juarez-Montiel et al., 2011) y podrían presentarse en el APH<sub>crd</sub>. En las muestras de APH<sub>cd</sub> y APH<sub>fd</sub>, estas enzimas podrían encontrarse en un estado desnaturalizado debido al tratamiento térmico aplicado previamente.

Por otra parte, el *Ustilago maydis* produce enzimas como la tirosinasa (EC 1.14.18.1) y lacasa (EC 1.10.3.2) que catalizan la polimerización de hidroxil y

monofenoles, los cuales demuestran propiedad antioxidante (Juarez-Montiel et al., 2011) y cuyo peso molecular oscila entre 13 – 220 y 10 – 390 kDa, respectivamente, dependiendo de la especie del hongo (Brenda-Ezymes.org). En estudios referentes a las proteínas de *Lentinus edodes* y *Pleurotus ostreatus*, se ha reportado la presencia de hidrofobinas, proteínas con pesos moleculares de 10 a 20 kDa y que permite invertir la naturaleza de una superficie de hidrofóbica a hidrofílica y viceversa y estabilizar emulsiones (Cox & Hooley, 2009). Además de estas proteínas, se han reportado las lectinas con un peso molecular de 12-190 kDa, en diversos hongos como *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* entre otros y tienen una amplia gama de aplicación en medicina, farmacología y agricultura (Erjavec et al., 2012; González et al., 2021), debido a sus propiedades antitumorales, antivirales e inmunoestimulantes (Motta et al., 2021). Con respecto al huitlacoche, habría que llevar a cabo estudios adicionales que permitirían confirmar la presencia de estas proteínas en estado aislado, con base en sus propiedades.

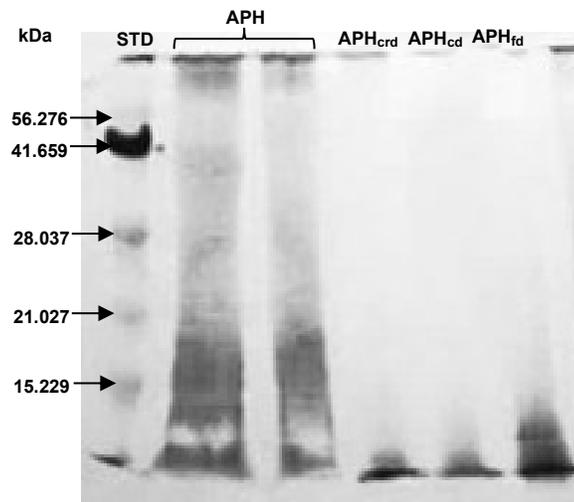


Figura 4. Distribución de pesos moleculares (SDS-PAGE) del aislado de proteína no digerido de huitlacoche sin tratamiento térmico (APH) y del aislado de proteína digerido de huitlacoche crudo (APH<sub>crd</sub>), cocido (APH<sub>cd</sub>) y frito (APH<sub>rd</sub>).

### 3.7.7.3 Actividad antioxidante (DPPH y ABTS)

La actividad antioxidante evaluada sobre los radicales libres DPPH y ABTS del APH<sub>crd</sub> fue mayor, seguido del APH. Las muestras APH<sub>cd</sub> y APH<sub>fd</sub>, presentaron valores menores y no mostraron diferencia significativa entre ellas (Figura 5). Además del contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales, la actividad antioxidante puede deberse a la presencia de algunos aminoácidos hidrofóbicos (Ala y Pro) y aromáticos (Tir, Fen y Trp) presentes en la proteína de huitlacoche, los cuales son susceptibles de incrementar la afinidad entre el péptido y el radical libre. Por otra parte, los aminoácidos como His, Met y Cis juegan una función importante en la actividad de captación de los radicales libres por los péptidos, debido a sus estructuras especiales: el grupo imidazol de la His le permite donar un protón H<sup>+</sup>, Met es propenso a una oxidación del sulfóxido de metionina y Cis puede donar el hidrógeno del azufre (Chalamaiah et al., 2012). Valdez-Morales et al. (2016) reportaron una menor actividad antioxidante sobre DPPH en harinas liofilizadas de huitlacoche producido a partir de diferentes genotipos de maíz (un promedio de 3.19  $\mu\text{mol}$  equivalentes de trolox (ET)  $\text{g}^{-1}$  de muestra seca). Por otra parte, Gaşecká et al. (2019) reportaron una disminución en la inhibición de los radicales DPPH y ABTS por los hongos comestibles, *Leccinum scabrum* (Bull.) y *Hericiium erinaceus* (Bull.) Pers., sometidos previamente a un tratamiento térmico. Este comportamiento adverso, se podría deber a la sensibilidad de los compuestos fenólicos al tratamiento térmico, dado que, de acuerdo con la literatura, bajo los tratamientos térmicos, los péptidos bioactivos mantienen estable su bioactividad (Singh & Vij, 2018). Por otra parte, de acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que la digestión *in vitro* de las proteínas permitió un incremento en la actividad antioxidante del APH. Este comportamiento podría atribuirse a la actividad de captación de los péptidos resultantes de la digestión *in vitro*. Goswami et al. (2021) reportaron un comportamiento similar en hidrolizados de proteínas del *Pleurotus ostreatus*. Con base en lo mencionado, se considera que los péptidos liberados por la digestión *in vitro* del APH, demostraron una función antioxidante, la cual podría tener un mejor aprovechamiento, al minimizar la aplicación de los tratamientos térmicos.

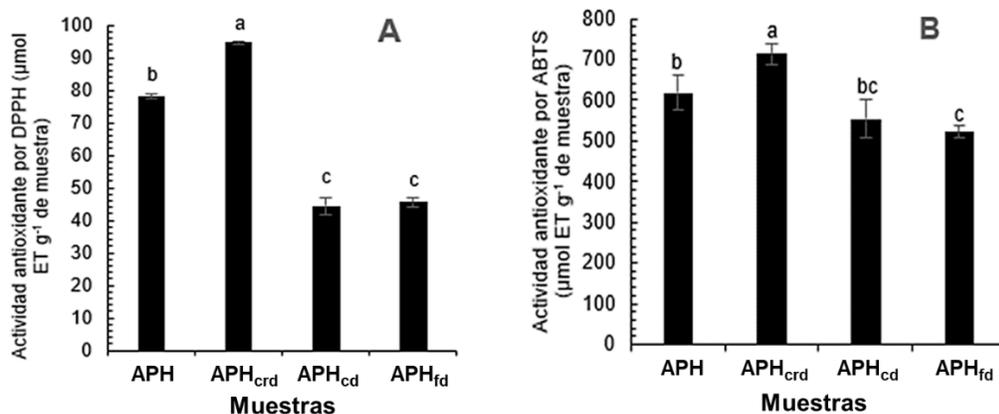


Figura 5. Actividad de inhibición del radical DPPH (A) y ABTS (B) del aislado de proteína de huitlacoche.

APH: aislado de proteína de huitlacoche crudo; APH<sub>crd</sub>, APH<sub>cd</sub> y APH<sub>fd</sub> aislado de proteína de huitlacoche crudo, cocido y frito digeridos *in vitro*, respectivamente.

<sup>z</sup> Medias con letras distintas fueron significativamente distintas ( $P < 0.05$ ).

#### 3.7.7.4 Compuestos fenólicos totales (CFT)

Conociendo el potencial antioxidante de los compuestos fenólicos, fue necesario analizar este parámetro, percibiéndolo como un factor influyente en la actividad antioxidante de las muestras analizadas, particularmente de los péptidos. En la figura 6, se muestra el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) de aislado de proteína no digerida de huitlacoche sin tratamiento térmico (APH) y de aislados de proteína digerida de huitlacoche crudo (APH<sub>crd</sub>), cocido (APH<sub>cd</sub>) y frito (APH<sub>fd</sub>), en donde, el APH y el APH<sub>crd</sub> presentaron el mayor contenido de CFT. Estos resultados coincidieron con el valor reportado por González et al. (2021) para proteína de *Pleurotus ostreatus*, el cual fue de  $24.2 \pm 0.8$  mg EAG g<sup>-1</sup> de muestra seca. Valdez-Morales et al. (2016), identificaron en el huitlacoche ácidos fenólicos como ácido cafeico, *p*-cumárico, *o*-cumárico, ácido sinápico y ferúlico. De igual manera, identificaron flavonoides como rutina, (+)-catequina, naringenina y quercetina. Los mismos autores consideraron que el contenido de estos compuestos varía con el genotipo de maíz, etapa de desarrollo y el proceso de cocción del huitlacoche.

Cabe mencionar, que el tratamiento térmico influyó negativamente en el contenido de CFT de las muestras, al igual que lo reportado por Gąsecka et al. (2019) para los hongos *Leccinum scabrum* (Bull.) y *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers., considerando que estos compuestos son sensibles a la temperatura. Lo anterior, explicó la reducción en los valores del contenido de CFT, obtenidos en los aislados de proteína de huitlacoche sometidos al proceso de digestión *in vitro* y de cocción (APH<sub>cd</sub>) o fritura (APH<sub>fd</sub>). Es importante mencionar que aun siendo afectadas por el tratamiento térmico, APH<sub>cd</sub> y APH<sub>fd</sub> presentaron valores de CFT mayores con respecto a los datos reportados por Valdez-Morales et al. (2016), para harina liofilizada de huitlacoche producida a partir de diferentes genotipos de maíz (4.34 - 9.22 mg equivalentes de ácido gálico (EAG) g<sup>-1</sup> de muestra seca). Todo lo anterior permitió evidenciar la presencia de polifenoles en todas los aislados proteínicos analizados, los cuales son termosensibles. Además de los péptidos, estos polifenoles participaron posiblemente en el potencial antioxidante reportado en este trabajo.

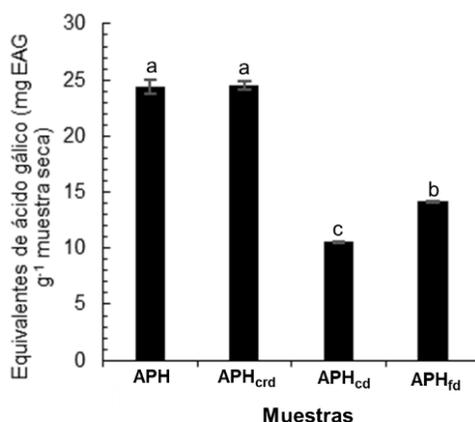


Figura 6. Contenido de compuestos fenólicos totales del aislado de proteína de huitlacoche (APH), y aislado de proteína de huitlacoche digerido *in vitro* sin tratamiento térmico (APH<sub>crd</sub>), cocido (APH<sub>cd</sub>) y frito (APH<sub>fd</sub>).

<sup>z</sup> Medias con superíndices distintos fueron significativamente distintas (P<0.05).

### 3.7.7.5 Flavonoides totales (FT)

Se evaluó el contenido de flavonoides totales en APH, APH<sub>crd</sub>, APH<sub>cd</sub> y APH<sub>fd</sub>, teniendo en cuenta que los flavonoides forman un subgrupo de polifenoles, al cual pertenecen las antocianinas (Neri-Numa et al., 2020). Los aislados de proteína no digerida (APH) y digerida (APH<sub>crd</sub>) de huitlacoche crudo presentaron el contenido más alto de flavonoides totales, al igual que para los CFT. Por otro lado, los aislados proteínicos de huitlacoche previamente sometidos a tratamientos térmicos (APH<sub>cd</sub> y APH<sub>fd</sub>), presentaron la misma proporción de FT, la cual fue menor con respecto al APH y APH<sub>crd</sub> (figura 7). Singh Chouhan et al. (2020) reportaron una proporción de FT de  $0.402 \pm 0.035 - 0.733 \pm 0.027$  mg equivalentes de quercetina g<sup>-1</sup> de extracto seco del hongo *Pleurotus florida* y Buruleanu et al. (2018) reportaron un valor de  $26.51 \pm 0.04$  mg de quercetina g<sup>-1</sup> de *Boletus edulis* en base seca. Estos contenidos fueron menores con respecto a los obtenidos para todas las muestras. Por otra parte, en las muestras de APH<sub>cd</sub> y APH<sub>fd</sub>, se observó una disminución en el contenido de FT por efecto de los tratamientos térmicos, al igual que los CFT. Sahni et al. (2020) reportaron  $7.70 \pm 0.02$  mg de quercetina g<sup>-1</sup> aislado de proteína de alfalfa, observando una reducción del 18.82 % al aplicar un tratamiento térmico previo a la alfalfa. Con base en lo anterior, el contenido de FT observado evidenció con más detalle, la posible contribución de los polifenoles, específicamente de los flavonoides, a la bioactividad evaluada.

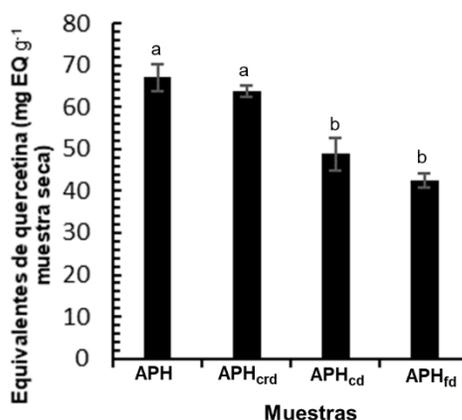


Figura 7. Contenido de flavonoides totales en aislados de proteína nativa de huitlacoche (APH) y aislados de proteína de huitlacoche crudo (APH<sub>crd</sub>), cocido (APH<sub>cd</sub>) y frito (APH<sub>fd</sub>) digeridos *in vitro*.

<sup>z</sup> Medias con superíndices distintos fueron significativamente distintas (P<0.05).

### 3.7.8 Propiedades tecnofuncionales

#### 3.7.8.1 Capacidad de retención de agua (CRA) y aceite (CRAC)

La capacidad de retención de agua y aceite de los aislados de proteína están relacionadas con la textura, la sensación bucal y la retención del sabor de los productos (Shevkani et al., 2015). De igual manera, puede afectar la vida útil del producto alimenticio (Osemwota et al., 2021). La CRA es la capacidad de la proteína para retener agua contra la gravedad (Shevkani et al., 2015). Por lo anterior, la incapacidad de una proteína para retener agua podría resultar en productos alimenticios rígidos y secos (Osemwota et al., 2021). La CRA del aislado de proteína de huitlacoche (APH) fue de  $3.09 \pm 0.25$  g de agua absorbida g<sup>-1</sup> de APH a pH 7. Valores de CRA de  $1.79 \pm 0.037$  –  $2.15 \pm 0.036$  g de agua absorbida g<sup>-1</sup> de concentrado de proteína fueron reportados para *Pleurotus ostreatus* (Cruz et al., 2018). Adicionalmente, se reportó un valor de  $3.3 \pm 0.2$  g de agua absorbida g<sup>-1</sup> a pH 7 para aislado de proteína del huauzontle (López-Monterrubio et al., 2020). Considerando que una CRA de 1.49 - 4.71 g de agua absorbida g<sup>-1</sup> de aislado de proteína de garbanzo es susceptible de utilizarse en

la formulación de alimentos viscosos como sopas y aderezos (Tontul et al., 2018), el APH representa opción para una aplicación similar.

Con respecto a la capacidad de retención de aceite, se puede mencionar que una mayor hidrofobicidad y el desdoblamiento de la proteína son propensos a una mayor capacidad de retención de aceite (Osemwota et al., 2021). La CRAC del APH fue de  $1.01 \pm 0.09$  g de aceite absorbido  $\text{g}^{-1}$  de APH a pH 7. Para concentrados de proteína del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*, se encontraron valores de  $1.73 \pm 0.045 - 2.14 \pm 0.059$  g de aceite absorbido  $\text{g}^{-1}$  (Cruz et al., 2018) y para el aislado de proteína del huauzontle  $1.6 \pm 0.1$  g de aceite absorbido  $\text{g}^{-1}$  a pH 7 (López-Monterrubio et al., 2020). Los valores anteriores fueron superiores a la CRAC del APH. Esto podría atribuirse al bajo contenido de aminoácidos hidrofóbicos del APH.

### 3.7.8.2 Capacidad (CE) y estabilidad (EE) espumante

La capacidad espumante de una proteína está relacionada con su capacidad de formación de dispersiones líquido-aire y la estabilidad espumante indica la capacidad de la espuma para mantener su estructura inicial durante un intervalo de tiempo definido (Amagliani et al., 2021). Se considera que las burbujas aumentan de tamaño, debido a la coalescencia y desproporción. Cuando se va drenando el líquido, las burbujas se comprimen y de esta forma, pasan de una estructura esférica a una poliédrica (Xu et al., 2020). En la figura 9 se observa este comportamiento en el tamaño de las burbujas a partir de los 30 minutos de formación de la espuma. Una mayor concentración de APH (1% p/v) confirió mayor estabilidad a la espuma, lo cual se aprecia a través de la morfología y el diámetro medio de las burbujas (figuras 8 y 9), presentando espumas formadas con APH al 1% p/v menor diámetro medio de burbuja inicial y con el tiempo de almacenamiento. Este comportamiento se confirmó mediante los valores de CE y EE. La dispersión de APH a 0.5 y 1 % (p/v a pH = 7.0) tuvo una capacidad espumante de  $52.43 \pm 2.32$  y  $67.50 \pm 10.61$  %, respectivamente y una estabilidad espumante de  $86.28 \pm 1.58$  y  $89.46 \pm 2.78$  %, respectivamente a los 60 min

(Cuadro 5). Yu et al. (2021) reportaron una CE de 50 % y una EE de 100 % a 90 min para albumina (1 % p/v) aislada del hongo *Cordyceps militaris*. Otro factor que proveyó estabilidad a la espuma es el pH al cual las dispersiones fueron ajustadas. A pH ácido, se incrementan las interacciones electrostáticas entre las cadenas de proteína, favoreciendo el desdoblamiento de la proteína y por ende, la exposición de la región hidrofóbica, lo cual en conjunto resulta en una desestabilización de las espumas (Figuroa-González et al., 2022).

Cuadro 5. Capacidad (CE) y estabilidad (EE) espumante del aislado de proteína de huitlacoche crudo (APH).

		EE (%) a diferentes intervalos de tiempos (min)					
Concentración de APH (% p/v)	CE (%)	0.5	5	15	30	45	60
0.5	52.43 ± 2.32	99.19 ± 1.41	98.37 ± 2.82	97.56 ± 4.22	92.72 ± 2.50	87.90 ± 0.17	86.28 ± 1.58
	67.50 ± 10.61	100.00 ± 0.00	98.44 ± 2.21	98.44 ± 2.21	95.45 ± 2.40	94.02 ± 0.38	89.46 ± 2.78

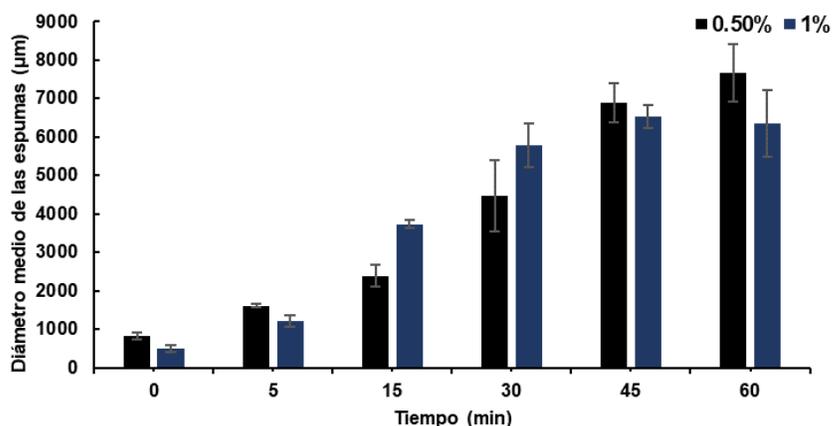


Figura 8. Diámetro medio de las burbujas con APH al 0.5 y 1 % desde 0 hasta 60 min.

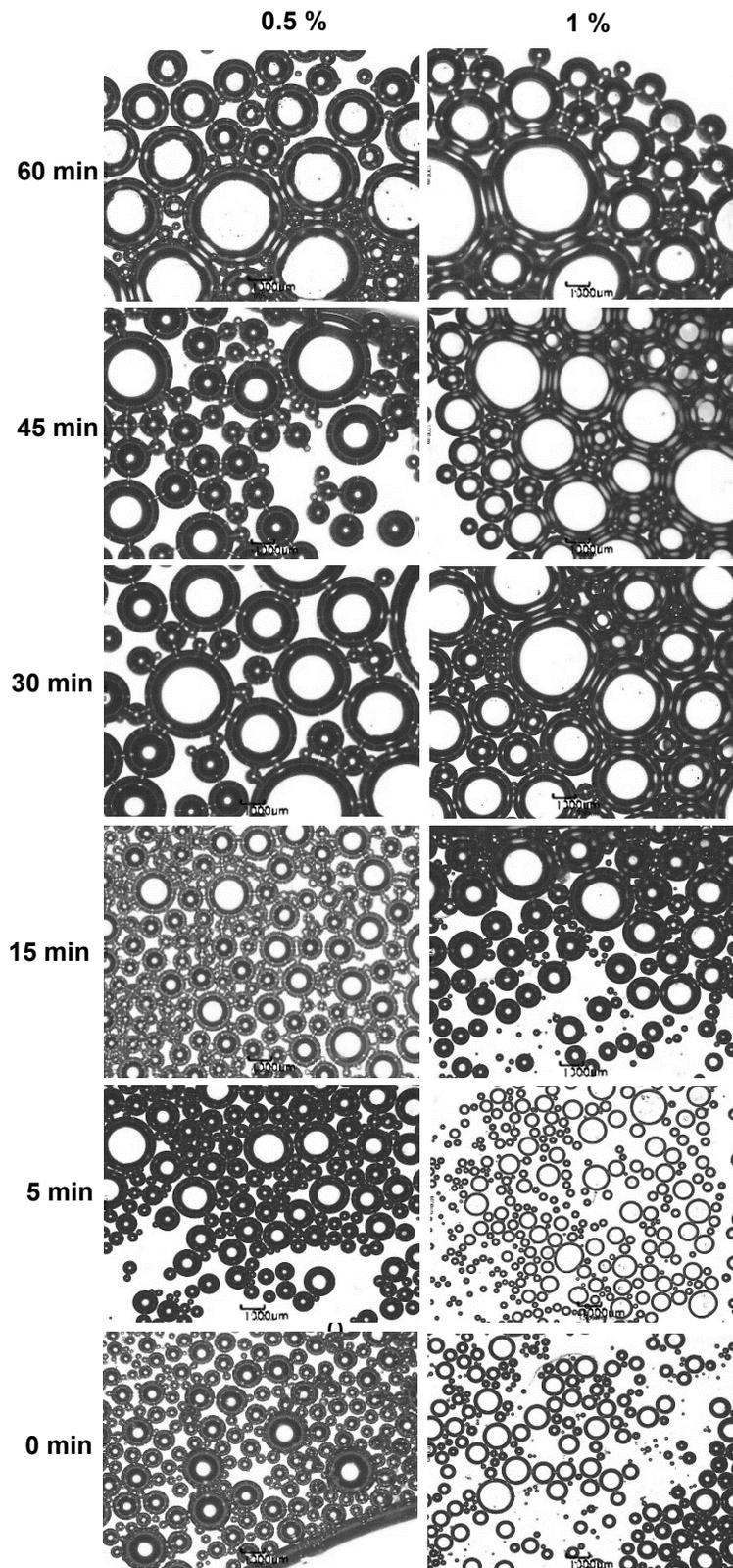


Figura 9. Estabilidad de la espuma usando aislado de proteína de huilacoche (APH; 0.5 y 1%; pH=7) a los tiempos de 0, 15, 30 y 60 minutos.

### 3.8 Conclusiones

Se obtuvo aislado de proteína (APH) a partir de harina de huitlacoche desgrasada, por un proceso de extracción alcalina a pH 10 y precipitación subsecuente a pH 3.5, con un rendimiento de  $10.08 \pm 0.93\%$ .

El perfil de aminoácidos de la proteína de huitlacoche, demostró además de la presencia de aminoácidos esenciales, la presencia de alanina y ácidos glutámico y aspártico, cuya contribución a las propiedades tecnofuncionales de las proteínas han sido reconocidas.

El aislado de proteína de huitlacoche previamente sometido al tratamiento de fritura demostró una mayor digestibilidad (APH<sub>f</sub>;  $83.0 \pm 0.2\%$ ) en comparación con el aislado crudo (APH;  $70.67 \pm 0.79\%$ ) y el cocido (APH<sub>c</sub>;  $75.23 \pm 0.16\%$ ).

El análisis de electroforesis evidenció los efectos de la digestión *in vitro* sobre la formación de péptidos de bajo peso molecular (menor a 15.229 kDa) derivados de las proteínas del huitlacoche con un rango de pesos moleculares entre 15.229 a 41.659 kDa. Los péptidos formados mostraron actividad antioxidante por DPPH y ABTS, posiblemente por sus contenidos en fenilalanina y alanina, los cuales propician una mayor afinidad entre los péptidos y los radicales libres.

Los contenidos de fenoles y flavonoides totales fueron todos afectados negativamente por el tratamiento térmico (cocción y fritura) y positivamente por la hidrólisis enzimática realizada durante la digestión *in vitro*. Todos estos indicadores demostraron las cualidades biológicas del APH pudiendo promover el diseño de alimentos nutraceuticos.

El APH exhibió una capacidad de retención de agua y capacidad y estabilidad espumante prometedora en el mejoramiento de la tecnofuncionalidad de ciertas matrices alimenticias en la industria de alimentos.

### 3.9 Literatura citada

- Aguayo-González, D. J., Acosta-Ramos, M., Pérez-Cabrera, L. E., Guevara-Lara, F., & García Munguía, A. M. (2016). Producción natural de huitlacoche [Ustilago maydis (DC) Corda] en el estado de Aguascalientes. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(5), 1043-1050.
- Amador-Rodríguez, K. Y., Martínez-Bustos, F., Pérez-Cabrera, L. E., Posadas-Del-Río, F. A., Chávez-Vela, N. A., Sandoval-Cardoso, M. L., & Guevara-Lara, F. (2015). Effect of huitlacoche (Ustilago maydis DC Corda) paste addition on functional, chemical and textural properties of tortilla chips. *Food Science and Technology (Campinas)*, 35(3), 452-459. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.6697>
- Amador-Rodríguez, K. Y., Pérez-Cabrera, L. E., Guevara-Lara, F., Chávez-Vela, N. A., Posadas-Del Río, F. A., Silos-Espino, H., & Martínez-Bustos, F. (2019). Physicochemical, thermal, and rheological properties of nixtamalized blue-corn flours and masas added with huitlacoche (Ustilago maydis) paste. *Food Chem*, 278, 601-608. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.008>
- Amagliani, L., Silva, J. V. C., Saffon, M., & Dombrowski, J. (2021). On the foaming properties of plant proteins: Current status and future opportunities. *Trends in Food Science & Technology*, 118, 261-272. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.10.001>
- AOAC (2000) Official Methods of Analysis. 17th Edition, The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, EUA. Methods 920.39, 954.01, 942.05.
- Aydoğdu, M., & Gölükçü, M. (2017). Nutritional value of huitlacoche, maize mushroom caused by Ustilago maydis. *Food Science and Technology*, 37(4), 531-535. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.19416>
- Bano, Z., Rajarathnam, S., & Steinkraus, K. H. (1988, 1988/01/01). Pleurotus mushrooms. Part II. Chemical composition, nutritional value, post - harvest physiology, preservation, and role as human food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 27(2), 87-158. <https://doi.org/10.1080/10408398809527480>
- Bach, F., Helm, C. V., Bellettini, M. B., Maciel, G. M., & Haminiuk, C. W. I. (2017). Edible mushrooms: a potential source of essential amino acids, glucans and minerals [<https://doi.org/10.1111/ijfs.13522>]. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(11), 2382-2392. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ijfs.13522>

- Boland, M., & Hill, J. (2020). Chapter 1 - World supply of food and the role of dairy protein. In M. Boland & H. Singh (Eds.), *Milk Proteins (Third Edition)* (pp. 1-19). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815251-5.00001-3>
- Buruleanu, L. C., Radulescu, C., Georgescu, A. A., Danet, F. A., Olteanu, R. L., Nicolescu, C. M., & Dulama, I. D. (2018). Statistical Characterization of the Phytochemical Characteristics of Edible Mushroom Extracts. *Analytical Letters*, 51(7), 1039-1059. <https://doi.org/10.1080/00032719.2017.1366499>
- Cano, E., & Romero, L. (2016). Valor económico, nutricional y medicinal de hongos comestibles silvestres. *Revista Chilena de Nutrición*, 43, 75-80. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182016000100011>
- Chalamaiah, M., Dinesh kumar, B., Hemalatha, R., & Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*, 135(4), 3020-3038. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.100>
- Cheison, S.C, Wang, Z. & Xu, S.Y. (2007). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 3894-30904. DOI:10.1021/jf062936i
- Chin, Y. Y., Chew, L. Y., Toh, G. T., Salampeyy, J., Azlan, A., & Ismail, A. (2019). Nutritional composition and angiotensin converting enzyme inhibitory activity of blue lupin (*Lupinus angustifolius*). *Food Bioscience*, 31, 100401. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.04.002>
- Cruz, A., Villanueva, R., Garín-Aguilar, M., Leal-Lara, H., & Valencia del Toro, G. (2018). Functional properties of flours and protein concentrates of 3 strains of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Journal Food Science Technology*, 55. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3312-x>
- Cox, P. W., & Hooley, P. (2009, 2009/02/01). Hydrophobins: New prospects for biotechnology. *Fungal Biology Reviews*, 23(1), 40-47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbr.2009.09.001>
- Das, D., Mir, N. A., Chandla, N. K., & Singh, S. (2021). Combined effect of pH treatment and the extraction pH on the physicochemical, functional and rheological characteristics of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed protein isolates. *Food Chemistry*, 353, 129466. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129466>
- du Toit, L., & Pataky, J. (1999). Effects of Silk Maturity and Pollination on Infection of Maize Ears by *Ustilago maydis*. *Plant Disease*, 83, 621-626. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.7.621>

- Erjavec, J., Kos, J., Ravnikar, M., Dreo, T., & Sabotič, J. (2012). Proteins of higher fungi – from forest to application. *Trends in Biotechnology*, 30(5), 259-273. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.01.004>
- Figueroa-González, J. J., Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter, E. J., Aguirre-Mandujano, E., Alvarez-Ramirez, J., & Martínez-Velasco, A. (2022). Modifying the structure, physicochemical properties, and foaming ability of amaranth protein by dual pH-shifting and ultrasound treatments. *LWT*, 153, 112561. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112561>
- Food and Agriculture Organization (FAO). (1985). Food and agriculture organization of the United States/World health organization/United Nations University, energy and protein requirements report of a joint FAO/WHO/UNU meeting. Geneva: World Health Organization.
- Garcilazo Rahme, O., Tello Salgado, I., Mata, G., Parraguirre Lezama, C., Valencia de Ita, M. d. I. A., & Romero Arenas, O. (2020). Evaluation of Eight Genotypes of Corn for the Commercial Cultivation of Huitlacoche in Nopalucan, Puebla, Mexico. *Agriculture*, 10(11), 535. <https://www.mdpi.com/2077-0472/10/11/535>
- Gąsecka, M., Siwulski, M., Magdziak, Z., Budzyńska, S., Stuper, K., Niedzielski, P., & Mleczek, M. (2019). The effect of drying temperature on bioactive compounds and antioxidant activity of *Leccinum scabrum* (Bull.) Gray and *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers. *J Food Sci Technol*, 57. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04081-1>
- Gómez-Maldonado, D., Lobato-Calleros, C., Aguirre-Mandujano, E., Leyva-Mir, S. G., Robles-Yerena, L., & Vernon-Carter, E. J. (2020). Antifungal activity of mango kernel polyphenols on mango fruit infected by anthracnose. *LWT*, 126, 109337. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109337>
- Gomes, S. V. F., Portugal, L. A., dos Anjos, J. P., de Jesus, O. N., de Oliveira, E. J., David, J. P., & David, J. M. (2017). Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. *Microchemical Journal*, 132, 28-35. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.12.021>
- González, A., Nobre, C., Simões, L. S., Cruz, M., Loredó, A., Rodríguez-Jasso, R. M., Contreras, J., Texeira, J., & Belmares, R. (2021). Evaluation of functional and nutritional potential of a protein concentrate from *Pleurotus ostreatus* mushroom. *Food Chemistry*, 346, 128884. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128884>

- Goswami, B., Majumdar, S., Das, A., Barui, A., & Bhowal, J. (2021). Evaluation of bioactive properties of *Pleurotus ostreatus* mushroom protein hydrolysate of different degree of hydrolysis. *LWT*, *149*, 111768. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111768>
- Juárez-Montiel, M., Ruiloba de León, S., Chávez-Camarillo, G., Hernández-Rodríguez, C., & Villa-Tanaca, L. (2011). Huitlacoche (corn smut), caused by the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, as a functional food. *Revista Iberoamericana de Micología*, *28*(2), 69-73. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.riam.2011.01.001>
- Kandel, J., & Koltin, Y. (1978, 1978/09/01/). Killer phenomenon in *Ustilago maydis*: Comparison of the killer proteins. *Experimental Mycology*, *2*(3), 270-278. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0147-5975\(78\)80020-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0147-5975(78)80020-6)
- Kumar, M., Tomar, M., Potkule, J., Reetu, Punia, S., Dhakane, J., . . . Kennedy, J. F. (2021). Functional characterization of plant-based protein to determine its quality for food applications. *Food Hydrocolloids*, 106986. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106986>
- Kumar, M., Tomar, M., Potkule, J., Reetu, Punia, S., Dhakane-Lad, J., Singh, S., Dhumal, S., Chandra Pradhan, P., Bhushan, B., Anitha, T., Alajil, O., Alhariri, A., Amarowicz, R., & Kennedy, J. F. (2022). Functional characterization of plant-based protein to determine its quality for food applications. *Food Hydrocolloids*, *123*, 106986. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106986>
- Kumar, P., Chatli, M. K., Mehta, N., Singh, P., Malav, O. P., & Verma, A. K. (2017). Meat analogues: Health promising sustainable meat substitutes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(5), 923-932. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.939739>
- Lin, Y., Pangloli, P., Meng, X., & Dia, V. P. (2020, 2020/06/01/). Effect of heating on the digestibility of isolated hempseed (*Cannabis sativa* L.) protein and bioactivity of its pepsin-pancreatin digests. *Food Chem*, *314*, 126198. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126198>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lavelli, V., Proserpio, C., Gallotti, F., Laureati, M., & Pagliarini, E. (2018). Circular reuse of bio-resources: the role of *Pleurotus* spp. in the development of functional foods. *Food Functionality*, *9*(3), 1353-1372. <https://doi.org/10.1039/c7fo01747b>
- León-Ramírez, C., Sánchez-Arreguín, J., & Ruiz-Herrera, J. (2014). *Ustilago maydis*, a Delicacy of the Aztec Cuisine and a Model for Research. *Natural Resources*, *05*, 256-267. doi:10.4236/nr.2014.56024

- Li, S., Ye, A., & Singh, H. (2021). Impacts of heat-induced changes on milk protein digestibility: A review. *International Dairy Journal*, 123, 105160. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105160>
- Liu, Y., & Binks, B. P. (2021). Foams of vegetable oils containing long-chain triglycerides. *Journal of Colloid and Interface Science*, 583, 522-534. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.09.043>
- Liu, Y., Wu, Q., Wu, X., Algharib, S. A., Gong, F., Hu, J., Luo, W., Zhou, M., Pan, Y., Yan, Y., & Wang, Y. (2021, 2021/03/15/). Structure, preparation, modification, and bioactivities of  $\beta$ -glucan and mannan from yeast cell wall: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 173, 445-456. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.125>
- López-Monterrubio, D. I., Lobato-Calleros, C., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2020). Huauzontle (*Chenopodium nuttalliae* Saff.) protein: Composition, structure, physicochemical and functional properties. *Food Hydrocolloids*, 108, 106043. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106043>
- López García, E., Pérez López, A., Acosta Ramos, M., Ochoa Rosas, M. a. D. J. s., Rojas Martínez, R. I., & Espinosa Solares, T. (2017). Factores físicos y microbiológicos en el deterioro del huitlacoche en poscosecha. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(3), 545-558. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i3.30>
- Marçal, S., Sousa, A. S., Taofiq, O., Antunes, F., Morais, A. M. M. B., Freitas, A. C., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R., & Pintado, M. (2021). Impact of postharvest preservation methods on nutritional value and bioactive properties of mushrooms. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 418-431. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.007>
- Martinez-Medina, G. A., Chávez-González, M. L., Verma, D. K., Prado-Barragán, L. A., Martínez-Hernández, J. L., Flores-Gallegos, A. C., Thakur, M., Srivastav, P. P., & Aguilar, C. N. (2021). Bio-funcional components in mushrooms, a health opportunity: Ergothionine and huitlacoche as recent trends. *Journal of Functional Foods*, 77, 104326. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104326>
- Martínez-Velasco, A., Lobato-Calleros, C., Hernández-Rodríguez, B. E., Román-Guerrero, A., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2018). High intensity ultrasound treatment of faba bean (*Vicia faba* L.) protein: Effect on surface properties, foaming ability and structural changes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 44, 97-105. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.02.007>

- Momen, S., Alavi, F., & Aider, M. (2021). Alkali-mediated treatments for extraction and functional modification of proteins: Critical and application review. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 778-797. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.052>
- Motta, F., Gershwin, M. E., & Selmi, C. (2021). Mushrooms and immunity. *Journal of Autoimmunity*, 117, 102576. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102576>
- Muhoza, B., Qi, B., Harindintwali, J. D., Farag Koko, M. Y., Zhang, S., & Li, Y. (2022). Combined plant protein modification and complex coacervation as a sustainable strategy to produce coacervates encapsulating bioactives. *Food Hydrocolloids*, 124, 107239. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107239>
- Nelson, D. L., Cuchillo Foix, C. M., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger: Principios de bioquímica*. Barcelona, España. Omega. p.78.
- Neri-Numa, I. A., Cazarin, C. B. B., Ruiz, A. L. T. G., Paulino, B. N., Molina, G., & Pastore, G. M. (2020). Targeting flavonoids on modulation of metabolic syndrome. *Journal of Functional Foods*, 73, 104132. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104132>
- Oladzadabbasabadi, N., Mohammadi Nafchi, A., Ariffin, F., Wijekoon, M. M. J. O., Al-Hassan, A. A., Dheyab, M. A., & Ghasemlou, M. (2021). Recent advances in extraction, modification, and application of chitosan in packaging industry. *Carbohydrate Polymers*, 118876. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118876>
- Osemwota, E. C., Alashi, A. M., & Aluko, R. E. (2021). Comparative Study of the Structural and Functional Properties of Membrane-Isolated and Isoelectric pH Precipitated Green Lentil Seed Protein Isolates. *Membranes*, 11(9), 694. <https://doi.org/10.3390/membranes11090694>
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83(2), 346-356. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4)
- Pakizeh, M., Moradi, A., & Ghassemi, T. (2021, 2021/10/05/). Chemical extraction and modification of chitin and chitosan from shrimp shells. *European Polymer Journal*, 159, 110709. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110709>
- Re, R., Pellegrini, A., Proteggente, A., Pannala, M., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 1231–1237.

- Reis, G. C. L., Dala-Paula, B. M., Tavano, O. L., Guidi, L. R., Godoy, H. T., & Gloria, M. B. A. (2020, Nov). In vitro digestion of spermidine and amino acids in fresh and processed *Agaricus bisporus* mushroom. *Food Research International*, 137, 109616. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109616>
- Sá, A. G. A., Moreno, Y. M. F., & Carciofi, B. A. M. (2020). Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 170-184. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.011>
- Sá, A. G. A., Silva, D. C. d., Pacheco, M. T. B., Moreno, Y. M. F., & Carciofi, B. A. M. (2021). Oilseed by-products as plant-based protein sources: Amino acid profile and digestibility. *Future Foods*, 3, 100023. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100023>
- Sahni, P., Sharma, S., & Surasani, V. K. R. (2020). Influence of processing and pH on amino acid profile, morphology, electrophoretic pattern, bioactive potential and functional characteristics of alfalfa protein isolates. *Food Chemistry*, 333, 127503. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127503>
- Schmitz-Schug, I., Gianfrancesco, A., Kulozik, U., & Först, P. (2011). Influence of temperature and the physical state on available lysine in powdered infant formula. *Procedia Food Science*, 1, 1031-1038. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.154>
- Shapiro, A. L., Viñuela, E., & V. Maizel, J. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 28(5), 815-820. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-291X\(67\)90391-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-291X(67)90391-9)
- Shevkani, K., Singh, N., Kaur, A., & Rana, J. C. (2015). Structural and functional characterization of kidney bean and field pea protein isolates: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 43, 679-689. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.024>
- Singh, B. P., & Vij, S. (2018). In vitro stability of bioactive peptides derived from fermented soy milk against heat treatment, pH and gastrointestinal enzymes. *LWT*, 91, 303-307. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.066>
- Singh Chouhan, K. B., Tandey, R., Sen, K. K., Mehta, R., & Mandal, V. (2020). Microwave hydrodiffusion and gravity model with a blend of high and low power microwave firing for improved yield of phenolics and flavonoids from

- oyster mushroom. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 17, 100311. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100311>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144. <http://www.ajevonline.org/content/16/3/144.abstract>
- Sofi, S. A., Singh, J., Muzaffar, K., Majid, D., & Dar, B. N. (2020). Physicochemical characteristics of protein isolates from native and germinated chickpea cultivars and their noodle quality. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 22, 100258. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100258>
- Switzer, R. C., 3rd, Merril, C. R., & Shifrin, S. (1979). A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochemistry*, 98(1), 231-237. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90732-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90732-2)
- Tagkouli, D., Kaliora, A., Bekiaris, G., Koutrotsios, G., Christea, M., Zervakis, G. I., & Kalogeropoulos, N. (2020). Free Amino Acids in Three Pleurotus Species Cultivated on Agricultural and Agro-Industrial By-Products. *Molecules*, 25(17). <https://doi.org/10.3390/molecules25174015>
- Tontul, İ., Kasimoglu, Z., Asik, S., Atbakan, T., & Topuz, A. (2018). Functional properties of chickpea protein isolates dried by refractance window drying. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 1253-1259. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.135>
- Valdez-Morales, M., Barry, K., Fahey, G. C., Domínguez, J., de Mejia, E. G., Valverde, M. E., & Paredes-López, O. (2010). Effect of maize genotype, developmental stage, and cooking process on the nutraceutical potential of huitlacoche (*Ustilago maydis*). *Food Chemistry*, 119(2), 689-697. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.015>
- Valdez-Morales, M., Carlos, L. C., Valverde, M. E., Ramirez-Chavez, E., & Paredes-Lopez, O. (2016). Phenolic Compounds, Antioxidant Activity and Lipid Profile of Huitlacoche Mushroom (*Ustilago maydis*) Produced in Several Maize Genotypes at Different Stages of Development. *Plant Foods Human Nutrition*, 71(4), 436-443. <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0572-3>
- Valverde, M. E., Hernández-Pérez, T., & Paredes-López, O. (2015). Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. *International Journal of Microbiology*, 2015, 376387. <https://doi.org/10.1155/2015/376387>

- Van de Vondel, J., Lambrecht, M. A., & Delcour, J. A. (2022). Heat-induced denaturation and aggregation of protein in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds and whole meal. *Food Chemistry*, 372, 131330. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131330>
- Wang, L., Wu, M., & Liu, H.-M. (2017). Emulsifying and physicochemical properties of soy hull hemicelluloses-soy protein isolate conjugates. *Carbohydrate Polymers*, 163, 181-190. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.069>
- Xu, X., Yan, H., Chen, J., & Zhang, X. (2011). Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnology Advances*, 29(6), 667-674. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.003>
- Xu, Y., Yang, N., Yang, J., Hu, J., Zhang, K., Nishinari, K., Phillips, G. O., & Fang, Y. (2020). Protein/polysaccharide intramolecular electrostatic complex as superior food-grade foaming agent. *Food Hydrocolloids*, 101, 105474. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105474>
- Yadav, D., & Negi, P. S. (2021). Bioactive components of mushrooms: Processing effects and health benefits. *Food Research International*, 148, 110599. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110599>
- Yu, X.-Y., Zou, Y., Zheng, Q.-W., Lu, F.-X., Li, D.-H., Guo, L.-Q., & Lin, J.-F. (2021). Physicochemical, functional and structural properties of the major protein fractions extracted from *Cordyceps militaris* fruit body. *Food Research International*, 142, 110211. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110211>
- Zang, Z., Chou, S., Geng, L., Si, X., Ding, Y., Lang, Y., Cui, H., Gao, N., Chen, Y., Wang, M., Xie, X., Xue, B., Li, B., & Tian, J. (2021). Interactions of blueberry anthocyanins with whey protein isolate and bovine serum protein: Color stability, antioxidant activity, in vitro simulation, and protein functionality. *LWT*, 152, 112269. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112269>
- Zhang, F., Jiang, S., Feng, X., Wang, R., Zeng, M., & Zhao, Y. (2020). Physicochemical state and in vitro digestibility of heat treated water-soluble protein from Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Food Bioscience*, 34, 100528. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100528>
- Zhou, J., Chen, M., Wu, S., Liao, X., Wang, J., Wu, Q., Zhuang, M., & Ding, Y. (2020). A review on mushroom-derived bioactive peptides: Preparation and biological activities. *Food Research International*, 134, 109230. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109230>
- Zou, Y., Zheng, Q., Chen, X., Ye, Z., Wei, T., Guo, L., & Lin, J. (2021). Physicochemical and emulsifying properties of protein isolated from

Phlebopus portentosus. *LWT*, 142, 111042.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111042>

