

Chemical composition and *in vitro* protein digestibility of processed *Mucuna pruriens* seeds

Composición química y digestibilidad *in vitro* de proteínas de semillas procesadas de *Mucuna pruriens*

M. Martínez-Pérez¹, L.A. Sarmiento-Franco², R.H. Santos-Ricalde², C.A. Sandoval-Castro²

¹Instituto de Ciencia Animal, Km 47 ½ Carretera Central, San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba

²Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Apdo. 4-116, Itzimna, 97100. Km 15.5 Carretera Merida-Xmatkuil, Mérida, Yucatán, México.

Email: luis.sarmiento@correo.uady.mx

Mucuna pruriens is a tropical legume with a great potential for animal feeding, however it also contains antinutritional properties. In order to determine the chemical composition and *in vitro* protein digestibility of processed *Mucuna pruriens* seeds this experiment was developed. The experiment was conducted at the Animal Nutrition laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Yucatan, Merida, Mexico. Five treatments consisted in: seed soaking in water 24 and 48 hours or in sodium bicarbonate 0.1 % and 0.2 % and the raw legume were used. The pH-stat® methodology for determining the degree of hydrolysis of the protein was used. MS, ash and gross energy (GE), fibrous fractionation, tannin content and total phenols were analyzed. Data were analyzed by ANOVA with five treatments and four replications each. Dry matter was lower and the protein fraction in water treatments after 24 and 48 hours and 0.2% bicarbonate were increased comparing to the raw legume. An increment in degree of protein hydrolysis from all treatments compared to the raw legume was observed (5.52 vs 8.17, 8.38, 8.99 and 8.62 %, respectively) (P < 0.001). The results show that in *Mucuna pruriens* seeds soaking in water and cooking as well as soaking in 0.1-0.2 % NaHCO₃ and pressure cooking are equally effective methods to improve *in vitro* protein digestibility.

Key words: *pH-stat method*; *seed processing*; *velvet bean*

Tropics are abundant in forage resources that are feasible to use in animal feed. They have advantages from the agronomic and nutritional standpoint. In the international literature it has been reported a great number of resources including Legumes, which represent sources of protein and certain minerals and vitamins (Díaz *et al.* 2014). In this sense, the grains of *Mucuna pruriens*, a legume widely studied in the literature, is noted for having concentrations between 250–350 g crude protein (CP)/kg dry matter (DM) (Chikagwa *et al.* 2009), 31.2–39.5 % of starch (Vadivel and Pugalenthi 2010) and 2.74 % to 3.41 % of ash (Adebowale *et al.* 2005). However, their inclusion in non-ruminant feeds is limited due to the high content of fiber (NDF: 21.3 %) (Pugalenthi *et al.* 2005) and the presence of several antinutritional factors (ANF) (Safwat *et al.* 2014).

In order to reduce some of these limitations,

Mucuna pruriens es una leguminosa tropical que tiene gran potencial para la alimentación animal, sin embargo, también contiene propiedades antinutricionales. Para determinar la composición química y la digestibilidad *in vitro* de proteínas de semillas procesadas de *Mucuna pruriens*, se desarrolló este experimento. El experimento se realizó en el laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Yucatán, Mérida, México. Cinco tratamientos consistieron en: remojo de las semillas en agua a las 24 y 48 horas o en bicarbonato de sodio al 0.1 % y 0.2 % y se utilizaron leguminosas crudas. Se utilizó la metodología pH-stat® para determinar el grado de hidrólisis de la proteína. Se analizaron MS, cenizas y energía bruta (EB), fraccionamiento fibroso, contenido de taninos y fenoles totales. Los datos se analizaron mediante ANOVA con cinco tratamientos y cuatro repeticiones cada uno. La materia seca fue menor y la fracción de proteína en tratamientos de agua después de 24 y 48 horas y 0.2 % de bicarbonato aumentaron en comparación con la leguminosa cruda. Se observó un incremento en el grado de hidrólisis de proteínas de todos los tratamientos en comparación con la leguminosa cruda (5.52 vs 8.17, 8.38, 8.99 y 8.62 %, respectivamente) (P < 0.001). Los resultados muestran que las semillas de *Mucuna pruriens* sumergidas en agua y cocinadas, así como sumergidas en 0.1-0.2 % de NaHCO₃ y cocinadas a presión son métodos igualmente efectivos para mejorar la digestibilidad *in vitro* de la proteína.

Palabras claves: pH-stat método; procesamiento de semillas; frijol terciopelo

Los trópicos son abundantes en recursos forrajeros factibles para usar en la alimentación animal. Tienen ventajas tanto desde el punto de vista agronómico como nutricional. En la literatura internacional se ha reportado una gran cantidad de recursos incluyendo las legumbres, las cuales representan fuentes de proteínas y ciertos minerales y vitaminas (Díaz *et al.* 2014). En este sentido, los granos de *Mucuna pruriens*, una leguminosa ampliamente estudiada en la literatura, se caracteriza por tener concentraciones entre 250-350 g de proteína cruda (PC)/kg de materia seca (MS) (Chikagwa *et al.* 2009), 31.2- 39.5 % de almidón (Vadivel y Pugalenthi 2010) y 2.74% a 3.41% de ceniza (Adebowale *et al.* 2005). Sin embargo, su inclusión en alimentos para no rumiantes es limitada debido al alto contenido de fibra (FDN: 21.3 %) (Pugalenthi *et al.* 2005) y la presencia de varios factores anti- nutricionales (FAN) (Safwat *et al.* 2014).

Para reducir algunas de estas limitaciones, se han

different processing methods such as seed germination, shelling, roasting, soaking in water or alkaline solutions and cooking have been used (Chaparro *et al.* 2009). It is necessary to know its chemical composition and digestibility to be recommended as animal food. However, the *in vivo* determination of digestibility is laborious and costly process and requires the use of large quantities of food, then various methods have been proposed for the *in vitro* estimation (Lemos and Nunes 2008). Among them, pH-stat method has been used to analyze the degree of hydrolysis of different substrates with satisfactory results (Rutherford 2010). Itzá (2012) studied the protein digestibility of four autoclaved legumes and concluded that the method was reliable for predicting the digestive utilization of proteins of legumes as compared to an *in vivo* assay in mice.

Considering the above, the objective of this study was to determine the chemical composition and *in vitro* protein digestibility of processed *Mucuna pruriens* seeds.

Materials and Methods

The experiment was conducted at the Animal Nutrition laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Yucatan, Merida, Mexico. The experimental treatments consisted of 500 g of seeds *Mucuna pruriens* var. ceniza which were subjected to different processing methods:

- Raw *Mucuna pruriens* seeds (MPS).
- MPS soaking in water for 24 and 48 hours and cooking at 100°C for 1 hour.
- MPS soaking in 0.1% NaHCO₃ (pH 8.5) and 0.2 % NaHCO₃ (pH 8.6) for 4 hours and pressure cooking (autoclaving) at 121°C for 30 minutes (Chaparro *et al.* 2009 and Vadivel *et al.* 2011, respectively).

Four samples were processed by treatment, dried in oven at 60 °C for 48 hours, ground to particle size of 1 mm in hammer mill and stored in plastic bags until chemical analysis in laboratory.

Chemical analysis. Each chemical analysis was performed in duplicate. For individual sample the content of dry matter (DM) (AOAC 2005) and nitrogen (N) in Leco equipment were determined; with the latter the crude protein (CP) content (Nx6.25) was calculated.

A pool of four samples were prepared weighing 75 g each, homogenized and then DM, ash and gross energy (GE) were determined according to AOAC (2005). Fibrous fractionation (neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and lignin were performed according to Daenlon *et al.* (2013), tannin content (Herald *et al.* 2014) and total phenols (Margraf *et al.* 2015) were also analyzed.

***In vitro* protein digestibility.** The technique based on the pH-stat method, which measures the degree of

utilizado diferentes métodos de procesamiento, como la germinación de las semillas, descascarillado, el tostado, el remojo en agua o en soluciones alcalinas y la cocción (Chaparro *et al.* 2009). Es necesario conocer tanto su composición química como su digestibilidad para ser recomendado como alimento para animales. Sin embargo, la determinación *in vivo* de la digestibilidad es un proceso laborioso y costoso que requiere el uso de grandes cantidades de alimento, por lo que se han propuesto varios métodos para la estimación *in vitro* (Lemos y Nunes 2008). Entre ellos, el método pH-stat se ha utilizado para analizar el grado de hidrólisis de diferentes sustratos con resultados satisfactorios (Rutherford 2010). Itzá (2012) estudió la digestibilidad de proteínas de cuatro leguminosas tratadas en autoclave y concluyó que el método era confiable para predecir la utilización digestiva de proteínas de leguminosas en comparación con un ensayo *in vivo* en ratones.

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar la composición química y la digestibilidad *in vitro* de proteínas de semillas procesadas de *Mucuna pruriens*.

Materiales y Métodos

El experimento se realizó en el laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Yucatán, Mérida, México. Los tratamientos experimentales consistieron en 500 g de semillas *Mucuna pruriens* var. ceniza que fueron sometidos a diferentes métodos de procesamiento:

- Semillas crudas de *Mucuna pruriens* (SMP).
- SMP remojadas en agua durante 24 y 48 horas y cocinadas a 100°C por 1 hora.
- SMP remojadas en NaHCO₃ al 0,1 % (pH 8.5) y NaHCO₃ al 0.2 % (pH 8,6) durante 4 horas y cocción a presión (autoclave) a 121°C durante 30 minutos (Chaparro *et al.* 2009 y Vadivel *et al.* 2011, respectivamente).

Se procesaron cuatro muestras por tratamiento, se secaron en estufa a 60 °C durante 48 horas, se molieron hasta tamaño de partícula de 1 mm en un molino de martillos y se almacenaron en bolsas de plástico hasta el análisis químico en el laboratorio.

Análisis químico. Cada análisis químico se realizó por duplicado. Para la muestra individual, se determinó el contenido de materia seca (MS) (AOAC 2005) y nitrógeno (N) en equipo Leco; con este último se calculó el contenido de proteína cruda (PC) (Nx6.25).

Se preparó un grupo de cuatro muestras que pesaban 75 g cada una, se homogeneizaron y luego se determinó la MS, la ceniza y la energía bruta (EB) de acuerdo con AOAC (2005). El fraccionamiento fibroso (fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) y lignina se realizaron según Daenlon *et al.* (2013), los contenidos de taninos (Herald *et al.* 2014) y fenoles totales (Margraf *et al.* 2015) también fueron analizados.

Digestibilidad *in vitro* de proteínas. Se utilizó la técnica basada en el método pH-stat, la cual mide el grado de hidrólisis de la proteína (GHP) a partir de

hydrolysis of the protein (DHP) from the processed legume seeds (Tibbetts *et al.* 2011) was used. A 736 Stat Titrino device, (Metrohm, Herisau, Switzerland), that automatically titled and controlled to maintain a stable pH, was used.

Pancreatin and trypsin (SIGMA Trypsin T0303-1G, P-1750 Pancreatin of porcine pancreas) according to the methodology described by Itza (2012) were used. A solution of the two previously mentioned enzymes (0.8 mg/mL trypsin and 20 mg/mL pancreatin) was prepared, which was adjusted to pH 8 and 37°C.

Two hundred milligrams of each protein sample of raw and processed velvet bean seeds were weighed, added 25 mL of bidistilled water to ensure an aqueous suspension of 8 mg protein/mL. An adjustment to pH 8.0 and 37°C under constant stirring was carried out. Then, 0.5 mL of the enzyme solution to protein suspension was added and the enzymatic activity was measured for 900 seconds of incubation at pH-stat. An alkaline solution of 0.1 N sodium hydroxide sufficient to maintain the pH at 8 was added; the PC Control program was used to manage the Titrant.

The DPH was determined from the volume of 0.1 N NaOH used to maintain pH 8 and calculated from the equation described by Meinschmidt *et al.* (2016):

$$\text{DPH (\%)} = (h/h_{\text{tot}}) \times 100$$

Where:

h_{tot} is the total number of peptide bonds per equivalent protein and depends on the amino acid composition of the protein substrate. The value of 7.8 for soybean reported by Meinschmidt *et al.* (2016) as a standard value for the legume studied was used and, h is the number of hydrolyzed peptide bonds that was calculated according to:

$$h = V_b \times N_b \times (1/\alpha) \times (1/PM)$$

where:

V_b is the base intake in mL, N_b ; normality of the titrant, α ; the degree of dissociation of the α -NH₂ group which is 1.3 to 37 °C and pH 8.0 (Itza 2012), MP; protein mass in the reaction mixture.

Experimental design and statistical analysis. Data were analyzed by ANOVA with five treatments and four replications for each. For analysis of the results INFOSTAT computerized statistical package (Balzarini *et al.* 2001) version 5.1 on Windows XP was used. The comparison of means was performed through the Duncan (1955) test, if necessary.

Results and Discussion

Table 1 shows the chemical composition of processed velvet bean seeds. Values are in the range reported by Ezeagu *et al.* (2003), Dahouda *et al.* (2009) and Nwaoguikpe *et al.* (2011).

The lower values of FDA, FDN and lignin in the treatment with 0.1 and 0.2 % bicarbonate could be explained by the results reported by Vadivel and Pugalenth (2010) using similar methodology for

las semillas de leguminosas procesadas (Tibbetts *et al.* 2011). Se utilizó un dispositivo 736 Stat Titrino, (Metrohm, Herisau, Suiza), que automáticamente tituló y controló para mantener un pH estable.

Se utilizaron pancreatina y tripsina (SIGMA Tripsina T0303-1G, Pancreatina P-1750 de páncreas porcino) de acuerdo con la metodología descrita por Itza (2012). Se preparó una solución de las dos enzimas mencionadas anteriormente (0,8 mg / mL de tripsina y 20 mg/mL de pancreatina), que se ajustó a pH 8 y 37°C.

Se pesaron 200 miligramos de cada muestra de proteína de semillas de frijol terciopelo crudas y procesadas, se añadieron 25 mL de agua bidestilada para asegurar una suspensión acuosa de 8mg de proteína/mL. Se realizó un ajuste a pH 8,0 y 37°C bajo agitación constante. Luego, se añadieron 0,5 mL de la solución de enzima a la suspensión de proteína y se midió la actividad enzimática durante 900 segundos de incubación a pH-stat. Se añadió una solución alcalina de hidróxido sódico 0,1 N suficiente para mantener el pH a 8; el programa PC Control se usó para administrar el Titrant.

El GPH se determinó a partir del volumen de NaOH 0,1 N utilizado para mantener el pH 8 y se calculó a partir de la ecuación descrita por Meinschmidt *et al.* (2016):

$$\text{GPH (\%)} = (h/h_{\text{tot}}) \times 100$$

Where:

h_{tot} es el número total de enlaces peptídicos por proteína equivalente y depende de la composición de aminoácidos del sustrato de proteína. Se utilizó el valor de 7.8 para la soya reportado por Meinschmidt *et al.* (2016) como valor estándar para la leguminosa estudiada y, h es el número de enlaces peptídicos hidrolizados que se calculó de acuerdo con:

$$h = V_b \times N_b \times (1/\alpha) \times (1/PM)$$

where:

V_b es el consumo base en mL, N_b ; normalidad del valorante, α ; el grado de disociación del grupo α -NH₂ que es de 1.3 a 37°C y pH 8.0 (Itza 2012), MP; masa proteica en la mezcla de reacción.

Diseño experimental y análisis estadístico. Los datos se analizaron mediante ANOVA con 5 tratamientos y 4 repeticiones para cada uno. Para el análisis de los resultados, se utilizó el paquete estadístico computarizado INFOSTAT (Balzarini *et al.* 2001) versión 5.1 en Windows XP. La comparación de las medias se realizó a través de la prueba de Duncan (1955), si es necesario.

Resultados y Discusión

La tabla 1 muestra la composición química de las semillas de frijol terciopelo procesadas. Los valores están en el rango reportado por Ezeagu *et al.* (2003), Dahouda *et al.* (2009) y Nwaoguikpe *et al.* (2011).

Los valores más bajos de FDA, FDN y lignina en el tratamiento con 0.1 y 0.2 % de bicarbonato podrían explicarse por los resultados informados por Vadivel y Pugalenth (2010) que usan una metodología similar para

processing mucuna seeds. These authors argued that it might be due to the soaking in the alkaline solution improving the seed permeability because of the cuticle degradation and the subsequent heat applied by pressure cooking (autoclaving).

procesar semillas de mucuna. Estos autores argumentaron que podría deberse al remojo en la solución alcalina que mejora la permeabilidad de la semilla debido a la degradación de la cutícula y el posterior calor aplicado por cocción a presión (autoclave).

Table 1. Chemical composition of processed *Mucuna pruriens* seeds

Indicator (%)	Raw	Water		NaHCO ₃	
		24 h	48 h	0.1%	0.2%
DM	93.28	90.53	90.17	92.16	92.37
Ash	3.97	2.61	2.45	3.90	3.88
Gross Energy (MJ/kg)	16.45	16.45	16.36	16.33	16.59
ADF	13.49	13.05	14.77	11.16	8.96
NDF	19.75	27.22	23.87	20.40	15.00
Lignin	0.14	0.13	0.15	0.06	0.03
Total phenols	2.68	2.46	2.38	3.34	3.16
Tannin	0.38	0.37	0.50	0.62	0.56

The average concentration of total phenolics and condensed tannins in all treatments are lower than those reported by Adebawale *et al.* (2005), however, they are in the range reported by Pugalenthil *et al.* (2005) and Chikagwa *et al.* (2009). Chaparro *et al.* (2009) explain that the total phenolic content varies depending on several factors such as genotype, agronomic practices, maturity at harvest, post-harvest storage as well as the weather and growing conditions.

The DM was lower in water treatment after 24 and 48 hours, which was expected due to the high humidity level that the velvet beans were submitted (table 2). The protein fraction in water treatment after 24 and 48 hours and 0.2 % bicarbonate was increased in comparison to raw legume (table 2). According to Bergeson *et al.* (2016) the boiling process increases the protein content in both immature and mature seeds. In addition, water cooking, with or without pressure, increases the quality and digestibility of protein and carbohydrates and reduces protease inhibitors, amylase and lectins (Savón and Scull 2006).

La concentración promedio de fenoles totales y taninos condensados en todos los tratamientos es inferior a los informados por Adebawale *et al.* (2005), sin embargo, están en el rango informado por Pugalenthil *et al.* (2005) y Chikagwa *et al.* (2009). Chaparro *et al.* (2009) explican que el contenido fenólico total varía dependiendo de varios factores, como el genotipo, las prácticas agronómicas, la madurez en la cosecha, el almacenamiento posterior a la cosecha, así como el clima y las condiciones de crecimiento.

La MS fue más baja en el tratamiento del agua después de 24 y 48 horas, lo que se esperaba debido al alto nivel de humedad al que fueron sometidos los frijoles terciopelo (tabla 2). La fracción de proteína en el tratamiento del agua después de 24 y 48 horas y 0.2 % de bicarbonato se incrementó en comparación con la leguminosa cruda (tabla 2). De acuerdo con Bergeson *et al.* (2016) el proceso de ebullición aumenta el contenido de proteína en las semillas tanto verdes como maduras. Además, la cocción con agua, con o sin presión, aumenta la calidad y la digestibilidad de las proteínas y los carbohidratos, y reduce los inhibidores de la proteasa, la amilasa y las

Table 2. Dry Matter (DM) and Crude Protein (CP) content of processed *Mucuna pruriens* seeds

Processed method	DM (%)	CP (%)
Raw	93.70 ^a	26.35 ^d
Water, 24 hours	90.91 ^c	27.24 ^{ab}
Water, 48 hours	90.72 ^c	27.52 ^a
0.1% NaHCO ₃	93.06 ^{ab}	26.52 ^{cd}
0.2% NaHCO ₃	92.06 ^b	26.97 ^{bc}
S.E.	0.36	0.16
P- value	0.0001	0.0005

^{a,b,c,d} Values with different letters within the same column differ significantly

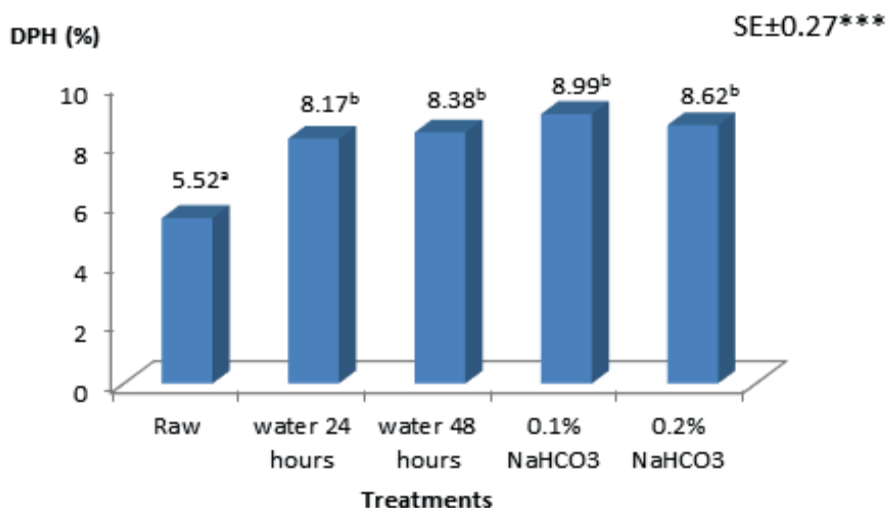
Figure 1 shows the degree of hydrolysis of protein under different velvet bean processing methods. The protein digestibility improved after soaking in water and alkaline solution, boiling and cooking pressure (autoclaving). These values are found to be similar when compared with those reported by Itza (2012) for velvet bean autoclaving at 30 minutes and higher than those reported by Barac *et al.* (2011) in *Pisum sativum* seeds (4.7 %) and soybean flour treated at 121°C in autoclaving for 40 minutes (7.9 %) by Wang *et al.* (2009). The differences between studies indicate that the species of legume and the different methods of processing are responsible for the variation of the indicator. Apparently the treatments used, modify the protein structures and eliminate ANF in *Mucuna pruriens*, so the enzymes used in the pH-stat digestion process probably broke the peptide bonds in the hydrolysis or digestion according to Wang *et al.* (2009).

Torres *et al.* (2013) notified differences in both the nutritional composition and *in vitro* digestibility of nutrients from different tropical legume beans and they were positively correlated. Khattab *et al.* (2009) stated that the heat treatment either by cooking or autoclaving, denatured proteins of legumes, their structure was opened and thus become less resistant to digestive proteases. Moreover, these physical methods reduce ANF (Pugalenti and Vadivel 2010) such as thermolabile proteases and phytates, among others, that interact with proteins of legumes forming insoluble complexes that block the action of digestive enzymes, so their reduction improves the digestibility of the protein fraction.

lectinas (Savón y Scull 2006).

La figura 1 muestra el grado de hidrólisis de proteína en los diferentes métodos de procesamiento del frijol terciopelo. La digestibilidad de la proteína mejoró después de sumergirla en agua y solución alcalina, hervirla y cocinarla (autoclave). Estos valores son similares en comparación con los informados por Itza (2012) para el proceso de autoclave del frijol terciopelo a los 30 minutos y más altos que los reportados por Barac *et al.* (2011) en semillas de *Pisum sativum* (4.7 %) y harina de soya tratada a 121°C en autoclave durante 40 minutos (7.9 %) por Wang *et al.* (2009). Las diferencias entre los estudios indican que las especies de leguminosas y los diferentes métodos de procesamiento son responsables de la variación del indicador. Aparentemente los tratamientos utilizados modificaron las estructuras proteicas y eliminaron FAN en *Mucuna pruriens*, por lo que las enzimas utilizadas en el proceso de digestión pH-stat probablemente rompieron los enlaces peptídicos en la hidrólisis o digestión según Wang *et al.* (2009).

Torres *et al.* (2013) notificaron diferencias tanto en la composición nutricional como en la digestibilidad *in vitro* de los nutrientes de diferentes granos de legumbres tropicales y estos fueron correlacionados positivamente. Khattab *et al.* (2009) afirmaron que el tratamiento térmico ya sea por cocción o autoclave, proteínas desnaturalizadas de legumbres, su estructura se abrió y por lo tanto se volvió menos resistente a las proteasas digestivas. Además, estos métodos físicos reducen FAN (Pugalenti y Vadivel 2010) como proteasas termolábiles y fitatos, entre otros, que interactúan con proteínas de leguminosas formando complejos insolubles que bloquean la acción de las enzimas digestivas, por lo que su reducción mejora la digestibilidad de la fracción proteica.



Bars exhibiting different letters are significantly different ($P < 0.001$)

Figure 1. Degree of protein hydrolysis (DPH) of processed *Mucuna pruriens* seeds

The results show that in *Mucuna pruriens* seeds soaking in water and cooking as well as soaking in 0.1-0.2 % NaHCO₃ and pressure cooking are equally effective methods to improve *in vitro* protein

Los resultados muestran que las semillas de *Mucuna pruriens* sumergidas en agua y cocidas, así como sumergidas en 0.1-0.2 % de NaHCO₃ y cocidas a presión son métodos igualmente efectivos para mejorar

digestibility.

la digestibilidad *in vitro* de la proteína.

Acknowledgements

This study was supported by TWAS-CONACYT, Mexico

Agradecimientos

Este estudio fue apoyado por TWAS-CONACYT, México

References

- Adebowale, Y.A., Adeyemi A. & Oshodi, A.A. 2005. Variability in the physicochemical, nutritional and antinutritional attributes of six *Mucuna* species. *Food Chem.* 89: 37-48.
- AOAC. 2005. Official methods of analyses. 18 th ed. Association of Official Analytical Chemist. Arlington, VA, USA.
- Balzarini, M., Casanoves F., DiRienzo, J.A., González L.A. & Robledo, C.W. 2001. Software estadístico: Infostat, versión 5.1. Manual de usuario. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Barać M., Čabrilo S., Pešić M., Stanojević S., Pavličević M., Mačej O. & Ristić N. 2011. Functional Properties of Pea (*Pisum sativum* L.) Protein Isolates Modified with Chymosin. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 8372-8387.
- Bergeson, T.L., Opio, C. & MacMillan, P.D. 2016. Crop ash filtrate influence on cooking time and sensory preferences for dried black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Afr. J. Food Sci.* 10: 132.
- Chaparro, S.P., Aristizabal I.D. & Gil, J.H. 2009. Reducción de factores antinutricionales de la semilla de vitabosa (*Mucuna deeringiana*) mediante procesos físico-químicos. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* 62: 5157-5164.
- Chikagwa-Malunga, S.K., Adesogan A.T., Sollenberger, L.E., Badinga, L.K., Szabo, N.J. & Littell, R.C. 2009. Nutritional characterization of *Mucuna pruriens* 1. Effect of maturity on the nutritional quality of botanical fractions and the whole plant. *Anim. Feed Sci. Tech.* 148: 34-50.
- Dahouda, M., Toléba, S.S., Youssao, A.K.I., Hambucker, A., Dangou-Sapoho, R., Martin, G.B., Fillet, M. & Hornick, J.L. 2009. Nutrient digestibility of *Mucuna (Mucuna pruriens* var. *utilis*) bean in guinea fowl (*Numida meleagris*, L): Effects of heat treatment and levels of incorporation in diets. *Brit. Poultry Sci.* 50: 564-572.
- Danleon, J.L., Guaita, M.S., Fay, P., Chiffle, S., Wawrzekiewicz & M., Fernández, M. 2013. Technical Note: Comparison of three analytical procedures to estimate the acid detergent fiber concentration in feeds of widespread use in Argentina. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 21: 131-134.
- Díaz, M. F., Savón, L., Martínez, M., Torres, V., Coto, G., Martín-Cabrejas, M. A., Lon Wo, E. & Castro, M. 2014. Leguminosas temporales como alternativa para la alimentación animal en el trópico. In: Avances en Producción Sustentable de alimentos y Biotecnología Reproductiva. Editores: Juan Eulogio Guerra Liera, Jorge A. Saltijeral Oaxaca y Alejandro Córdoba Izquierdo. Universidad Autónoma de Sinaloa. México 2014. Pág 147.
- Ezeagu, I.E., Maziya-Dixon, B. & Tarawali, G. 2003. Seed characteristics and nutrient and antinutrient composition of 12 *Mucuna* accessions from Nigeria. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 1: 129-139.
- Herald, T.J., Gadgil, P., Perumal, R., Bean, S.R. & Wilson, J.D. 2014. High-throughput micro-plate HCl-vanillin assay for screening tannin content in sorghum grain. *J. Sci. Food Agric.* 94: 2133-2136.
- Itzá, P.E. 2012. Determinación de la digestibilidad *in vitro* e *in vivo* de la proteína de cuatro leguminosas tratadas térmicamente en autoclave. Master Thesis. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México. 39 p.
- Khatab, R.Y., Arntfield, S.D. & Nyachoti, C.M. 2009. Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments, Part 1: Protein quality evaluation. *Food Sci. Tech.* 42: 1107-1112.
- Lemos, D. & Nunes, A.J.P. 2008. Prediction of culture performance of juvenile *Litopenaeus vannamei* by *in vitro* (pH-stat) degree of feed protein hydrolysis with species-specific enzymes. *Aquacult. Nutr.* 14: 181-191.
- Margraf, T., Karnopp, A.R., Rosso, N.D. & Granat, D. 2015. Comparison between folin-ciocalteu and prussian blue assays to estimate the total phenolic content of juices and teas using 96-well microplates. *J. Food Sci.* 8: 2397-2403.
- Meinlschmidt, P., Sussmann, D., Schweiggert-Weisz, U. & Eisner, P. 2016. Enzymatic treatment of soy protein isolates: effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties. *Food Sci. Nutr.* 4: 11-23.
- Nwaoguikpe, R.N., Braide, W., Ujowundu, C.O. 2011. The effects of processing on the proximate and phytochemical compositions of *Mucuna pruriens* seeds (velvet beans). *Pak. J. Nutr.* 10: 947-951.
- Pugalenti M., Vadivel V. & Siddhuraju, P. 2005. Alternative food/feed perspectives of an underutilized legume *Mucuna pruriens* var. *utilis*. A review. *Plant Food. Hum. Nutr.* 60: 201-218.
- Rutherford, S.M. 2010. Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of Proteins in Hydrolysates: A Review. *J. AOAC Int.* 93: 1515-1522.
- Safwat, A.M., Sarmiento-Franco, L. & Santos-Ricalde, R.H. 2014. Rabbit production using local resources as feedstuffs in the tropics. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 17: 161-171.
- Savón, L., Scull I. 2006. Avances en los métodos para disminuir el efecto de factores antinutricionales en alimentos para especies monogástricas. *Rev. Comp. Prod. Porcina* 13: 25-29.
- Tibbetts, S.M., Milley, J.E., Ross, N.W., Verreth, J.A.J. & Lallm, S.P. 2011. *In vitro* pH-Stat protein hydrolysis of feed ingredients for Atlantic cod, *Gadus morhua*. 1. Development of the method. *Aquaculture* 319: 398-406.
- Torres, J., Muñoz, L.S., Peters, M. & Montoya, C.A. 2013. Characterization of the nutritive value of tropical legume grains as alternative ingredients for small-scale pork producers using *in vitro* enzymatic hydrolysis and fermentation. *J. Anim. Physiol. An. N.* 97: 1066-1074.
- Vadivel, V. & Pugalenti, M. 2010. Evaluation of growth performance of broiler birds fed with diet containing different levels of velvet bean meal as an alternative protein ingredient. *Liv. Sci.* 127: 76-86.

Wang, H., Faris, R., Wang, T., Spurlock, M. & Gabler, N. 2009. Increased *in vitro* and *in vivo* digestibility of soy proteins by chemical modification of disulfide bonds. J. Am. Oil Chem. Soc. 86: 1093-1099.

Received: January 3, 2018