

EFFECT OF HYDROTHERMAL, SOAKING AND GERMINATION TREATMENTS ON THE CHEMICAL COMPOSITION OF WILD *Lupinus* SEEDS

EFFECTO DE TRATAMIENTOS HIDROTÉRMICO, REMOJO Y GERMINACIÓN EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE SEMILLAS DE *Lupinus* SILVESTRES

Juárez-Fuentes, B.¹; Lagunes-Espinoza, L.C.^{2*}; Bucio-Galindo, A.²; Delgado-Alvarado, A.³; Pérez-Flores, J.²; López-Upton, J.⁴

¹Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario 054. Carretera Villahermosa-Frontera km 14.5, 86270 Villa Ocuilzapotlán, Centro, Tabasco. ²Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, Posgrado en Producción Agroalimentaria en el Trópico. Periférico Carlos A. Molina s/n, 86500 H. Cárdenas, Tabasco, México. ³Colegio de Postgraduados, Campus Puebla, Área de Bioquímica de plantas. Boulevard Forjadores de Puebla No. 205 Santiago Momoxpan, San Pedro Cholula, Puebla, México. ⁴Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Área de Ciencia Forestal. Km. 36.5 carretera México-Texcoco 56230 Montecillo, Edo. de México, México.

*Autor para correspondencia: lagunes@colpos.mx

ABSTRACT

Objective: To evaluate the content of nutritional compounds (NC), polyphenols (CTP), and alkaloids (TA) in seeds of *Lupinus exaltatus* (*Le*) and *L. montanus* (*Lm*) (Fabaceae), before and after application of hydrothermal, soaking and germination treatments at different exposure times.

Design/methodology/approach: For treatment, a completely random design with factorial arrangement was applied, considering species and exposure time as factors. The NC were analyzed following AOAC methods; TA, CTP, Total Tannins (TT) and Condensed Tannins (CT) were determined by spectrometric methods. The means were compared by the Tukey test ($P \leq 0.05$).

Results: The cotyledons of the seeds of both species had a higher content of protein, lipids and total alkaloids than the seed coat. Hydrothermal treatment for 6 h at 95°C increased protein and fiber and decreased TA 82 (*Le*) and 62.7% (*Lm*) relative to control. Germination increased TP (54 and 84% in both species) and decreased TA 33.5% in *Le* and 35.4% in *Lm*. NC showed no variation after application of soaking treatment, while TT decreased in *Le*.

Study limitations/implications: The treatments applied did not reduce the concentration of total alkaloids to levels allowed for feeding ($<0.02\%$), so other treatments and times should be tested.

Findings/conclusions: Changes in chemical compounds in the seeds under study depend on the species and the time of exposure in each treatment evaluated. While a hydrothermal treatment increases protein and reduces ashes and TA ($>60\%$), germination increases protein, CTP and ash, but the reduction in TA is lower ($<40\%$).

Keywords: Fabaceae, protein, phenolic compounds, alkaloids, seed.



RESUMEN

Objetivo: Evaluar el contenido de compuesto nutricionales (CN), polifenoles (CFT) y alcaloides (AT) en semillas de *Lupinus exaltatus* (*Le*) y *L. montanus* (*Lm*) (Fabaceae) antes y después de la aplicación de tratamientos hidrotérmico, remojo, y germinación a diferentes tiempos de exposición.

Diseño/metodología/aproximación: Por tratamiento se aplicó un diseño completamente al azar con arreglo factorial, considerando especie y tiempo de exposición como factores. Los CN se analizaron por métodos descritos en AOAC; AT, CFT, taninos totales (TT) y taninos condensados (TC) por métodos espectrofotométricos. Las medias se compararon por la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Resultados: Los cotiledones de las semillas de ambas especies, presentaron mayor contenido de proteína, lípidos y alcaloides totales que la testa. El tratamiento hidrotérmico (6 h a 95 °C) incrementó proteína y fibra y disminuyó AT en 82 (*Le*) y 62.7% (*Lm*) relativo al control. La germinación incrementó los CFT (54 y 84%, respectivamente) y disminuyó los AT (33.5% en *Le* y 35.4% en *Lm*). Los CN no mostraron variación después de la aplicación de un tratamiento de remojo, mientras que los TT disminuyeron en *Le*.

Limitaciones del estudio/implicaciones: Los tratamientos aplicados no lograron reducir la concentración de alcaloides totales a niveles permitidos para alimentación ($< 0.02\%$), por lo que otros tratamientos y tiempos deberán ser probados.

Hallazgos/conclusiones: Los cambios en los compuestos químicos en las semillas en estudio dependen de la especie y del tiempo de exposición en cada tratamiento evaluado. Mientras que un tratamiento hidrotérmico incrementa proteína y reduce cenizas y AT ($> 60\%$), el de germinación incrementa proteína, CFT y cenizas pero la reducción en AT es menor ($< 40\%$).

Palabras clave: Fabaceae, proteína, compuestos fenólicos, alcaloides, semillas.

Larenas *et al.*, 2013), germinación (Jiménez-Martínez *et al.*, 2012), fermentación o extrusado, solos o combinados. Con mutagénesis se han obtenido genotipos de *L. albus* L., *L. luteus* L. y *L. angustifolius* L. con bajo contenido de alcaloides ($< 0.2 \text{ g kg}^{-1}$) (Gladstones, 1998) y ahora son usados en alimentación animal (Jezierny *et al.*, 2010; Kohajdava *et al.*, 2011). Sin embargo, los alcaloides pueden tener diferentes roles benéficos en el ciclo de vida de las plantas, entre ellos defensa ante el ataque de plagas (Wang *et al.*, 2003), por lo que el uso de técnicas postcosecha económicas con el objetivo de reducirlos o eliminarlos antes de su uso en alimentación puede ser una forma más sustentable de manejar el problema (Khattab *et al.*, 2009).

En las especies de lupino silvestres mexicanas, estudios sobre el efecto de métodos de procesamiento tradicional para disminuir las concentraciones de alcaloides han sido exitosamente aplicados solo en *L. campestris* Cham. & Schtdl. (Jiménez-Martínez *et al.*, 2009; Jiménez-Martínez *et al.*, 2010). No obstante, en lupino, así como en otras fabáceas, la aplicación de procesos tradicionales para la eliminación de compuestos no deseables produce un efecto reductor que depende de diferentes factores como la concentración del fitoquímico, el método de procesamiento, tiempo de exposición y del genotipo (Trugo *et al.*, 2000; Mubarak, 2005; Wang *et al.*, 2008), y puede también afectar el contenido de nutrientes (Valdés-Miramontes *et al.*, 2015). Por lo que la evaluación de esos métodos tradicionales para cada especie particular es requerida. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de tratamientos hidrotérmico,

INTRODUCCIÓN

El género *Lupinus* (Fabaceae), está ampliamente distribuido en el mundo, y en México se encuentra en la Sierra Madre Occidental y en el eje transvolcánico. Las semillas de las especies mexicanas, que son silvestres, tienen contenidos de proteína similares a las de las especies del mismo género mejoradas en Europa (35-44%) (Jiménez-Martínez *et al.*, 2010; Kohajdava *et al.*, 2011; Guemes-Vera *et al.*, 2012), y por lo tanto podrían ser usadas en México como una alternativa proteica para la alimentación animal. La principal limitación para su uso es el alto contenido de alcaloides quinolizidínicos (QA) que contienen, considerados tóxicos porque inhiben la absorción de compuestos nutricionales o causan el rechazo del alimento (Muzquiz *et al.*, 2006).

La reducción de los alcaloides en los lupinos silvestres puede ser realizada ya sea por aplicar mutagénesis o por métodos simples de procesamiento de sus semillas, como la cocción (Jiménez-Martínez *et al.*, 2009), remojo (Carvajal-

remojo, y germinación en la composición de semillas de *L. exaltatus* Zucc. y *L. montanus* H.B.K.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico, tratamientos aplicados y análisis químicos

Semillas de *L. exaltatus* y *L. montanus* fueron recolectadas en agosto de 2012 en los municipios de Chalchicomula de Sesma y Tlachichuca, Puebla, México (18° 52' 23" N, 97° 18' 49" W, a 3066 y 3442 m de altitud, respectivamente). Antes de cada tratamiento, se realizó el análisis químico proximal, el contenido de compuestos fenólicos totales y de alcaloides totales a las semillas enteras, testa y cotiledones.

Para la aplicación de los tratamientos, 9 g de semilla sin daño de insectos, por triplicado, fueron seleccionados por especie. Los tratamientos fueron: **Hidrotérmico**, las semillas fueron colocadas en 200 mL de agua destilada (1:22, relación semilla/agua) y llevadas a ebullición (95 °C) por 2, 3 y 6 h. Cada 1.5 h el líquido se cambió completamente y el volumen inicial de agua fue adicionado a temperatura de ebullición. **Remojo**, las semillas fueron colocadas en agua destilada (1:22, relación semilla/agua) por 3, 6, 9 y 18 h y conservadas a temperatura ambiente (26 °C) sin agitación; el líquido fue cambiado cada 3 h. **Germinación**, las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1 % por 30 s y lavadas tres veces con agua destilada antes de escarificarlas manualmente. Enseguida se colocaron en cajas Petri entre papel filtro estéril y se pusieron a germinar bajo un fotoperiodo de 14 h luz y régimen de temperatura de 20/15 °C en una cámara de crecimiento (Lumistell, ICP-19). La germinación fue evaluada a los 3 y 6 d, después de siembra. Una semilla fue considerada germinada cuando la radícula alcanzó una longitud de >2 mm.

Después de cada tratamiento, las muestras fueron secadas a 50 °C, pulverizadas en un molino (Tekmar A-10), pesadas y almacenadas a 4 °C antes de su uso. El contenido de proteína (N×6.25), extracto etéreo, fibra cruda y cenizas fueron determinados por métodos AOAC (1995). Antes de la determinación de los compuestos fenólicos totales, taninos condensados y alcaloides totales se elimi-

naron las grasas de las harinas de acuerdo a Muzquiz et al. (1994). Los compuestos fenólicos totales fueron cuantificados por el método de Folin-Ciocalteu (Makkar et al., 1993) y los taninos condensados por el método de butanol en medio ácido (Porter et al., 1986). Los alcaloides totales fueron extraídos con diclorometano y cuantificados por espectrofotometría a 435 nm (Sreevidya y Mehrotra, 2003).

Para cada tratamiento se realizaron análisis de varianza para determinar el efecto de la especie (E), tiempo de exposición (TE) y la interacción E×TE. Para conocer las diferencias entre medias se aplicó la prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05$). Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico SAS[®], versión 9.3 (SAS Institute Inc., 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las semillas de las dos especies presentaron proporciones de testa y cotiledones similares.

La testa de *L. exaltatus* representó el 29.1% del peso total de la semilla, y la de *L. montanus* 28.4%; 100 g de testa contienen 66 y 68 g de fibra, respectivamente. Ambas especies mostraron un alto contenido de proteína y de alcaloides en sus semillas (Cuadro 1). Después de eliminar la testa, el contenido de proteína en los cotiledones se incrementó en *L. exaltatus* y *L. montanus* (de 43.0 a 55.6 y de 45.9 a 57.5 g 100 g⁻¹, respectivamente), y el de grasa en *L. exaltatus* (5.8 a 7.4 g 100 g⁻¹). Incrementos en el contenido de proteína después de la remoción de la testa han sido observados en *L. luteus* (38.2% to 52.5%) y *L. angustifolius* (32% a 41%) (Petterson, 2000). El contenido alto de proteína de las semillas evaluadas es similar al observado en las mismas especies mexicanas de otras regiones del país (Ruiz y Sotelo, 2001; Guemes-Vera et al., 2012), lo que corrobora su potencial como fuente proteica, sobre todo al remover la testa.

Cuadro 1. Composición química de semillas de *Lupinus* sp., y sus componentes (testa y cotiledones).

Especie	Componente de la semilla	Proteína	Fibra cruda	Grasa	Cenizas	Alcaloides totales
		g 100 g ⁻¹ MS				
<i>L. exaltatus</i>	Semilla entera	43.0d	27.0b	5.8b	4.2a	2.1c
	Testa	6.8e	66.3a	1.1c	2.2c	0.6d
	Cotiledones	55.6b	12.6c	7.4b	4.2b	2.8c
<i>L. montanus</i>	Semilla entera	45.9c	26.5b	10.0a	3.8b	4.2b
	Testa	7.0e	68.3a	1.3c	2.0c	0.8d
	Cotiledones	57.5a	16.7c	10.1a	4.0b	4.3a

Valores con la misma letra en una columna no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Los alcaloides totales fueron altos en semillas enteras (>2 %) y la remoción de la testa incrementó significativamente los contenidos en los cotiledones solo en *L. montanus* (de 4.3 a 4.8 %). Estos contenidos altos en alcaloides totales limitan el uso de estas semillas como alimento (Muzquiz *et al.*, 2006).

Composición química de las semillas después de los tratamientos hidrotérmico y de remojo

La aplicación de los tratamientos hidrotérmico y remojo, mostraron un efecto diferencial en la composición química de las semillas de *L. exaltatus* y *L. montanus* (Cuadro 2). El tratamiento hidrotérmico por 6 h aumentó el contenido de proteína y fibra en las semillas de ambas especies (Cuadro 2). En *L. exaltatus*, el incremento en proteína fue de 13.7% y de fibra 74.4% respecto al control (semillas sin tratamiento); mientras que en *L. montanus* esos compuestos se incrementaron 3.0% y 103%, respectivamente. Sin embargo, el contenido de cenizas disminuyó 28.5% en *L. exaltatus* y 39.4% in *L. montanus*, respecto al control. En *L. montanus* la disminución fue observada desde las 2 h de tratamiento.

En contraste, el tratamiento de remojo no afectó significativamente la composición química (proteína, cenizas, grasa y fibra) de las especies en estudio. El contenido de compuestos fenólicos totales (CFT), taninos totales y alcaloides totales disminuyeron significativamente ($P < 0.05$), respecto al control, en ambas especies después del tratamiento hidrotérmico (Figura 1). En semillas de *L. exaltatus* las reducciones fueron 75.2% y 82.1%, y en *L. montanus* de 80% y 62.7% para CFT y alcaloides totales, respectivamente.

Los resultados muestran que las especies respondieron diferencialmente a los tratamientos de calor, ya que en *L. exaltatus* la reducción en alcaloides totales fue mayor que en *L. montanus*. Además, la reducción observada no al-

canzó los valores encontrados en *L. elegans* (95%) y *L. campestris* (98%) después de aplicar un tratamiento de calor similar (Ruiz y Sotelo, 2001; Jiménez-Martínez *et al.*, 2009). Esta reducción en el contenido de alcaloides es principalmente porque estos compuestos son temolábiles (Muzquiz *et al.*, 2006) y se degradan después de un tratamiento de calor. La reducción; sin embargo, no fue suficiente para alcanzar niveles adecuados para su uso en alimentación animal (<0.02 %) (Muzquiz *et al.*, 2006). En contraste, la aplicación del tratamiento hidrotérmico incrementó el contenido de proteína y de fibra como ha sido observado en *L. campestris* y en *Brassica napus* (Mustafa *et al.*, 2000; Jiménez-Martínez *et al.*, 2009).

La aplicación de remojo por 18 h no cambió el contenido de compuestos nutricionales, como ha sido cuantificado para fibra y grasa en *L. albus* después de un remojo prolongado (144 h) (Erbas, 2010), o en *L. mutabilis* después de 42 h de remojo con tres cambios de agua por día

Cuadro 2. Efecto de tratamientos hidrotérmico, remojo y germinación en la composición química de las semillas de *Lupinus sp.*

Tratamiento	Tiempo (h)	<i>L. exaltatus</i>				<i>L. montanus</i>			
		Proteína	Fibra cruda	Grasa	Cenizas	Proteína	Fibra cruda	Grasa	Cenizas
g 100 g ⁻¹ MS									
Control	0	43.0±0.6	27.0±3.2	5.8±0.8	4.2±0.1	45.9±0.8	26.5±0.8	10.0±0.8	3.8±0.1
Remojo ^a	3	43.5±1.3	30.1±1.0	4.5±0.5	4.2±0.3	43.6±0.8	28.7±1.3	7.3±0.3	4.0±0.01
	6	42.9±2.0	28.4±0.7	6.8±2.6	4.0±0.1	42.2±0.7	26.8±1.2	7.0±0.0	4.2±0.2
	9	43.7±1.1	28.2±0.5	5.2±0.1	3.9±0.1	41.6±0.1	29.5±0.0	7.7±0.1	4.9±0.7
	18	44.4±0.2	28.2±0.8	4.4±0.6	3.6±0.4	44.7±0.0	25.6±0.9	9.0±0.0	4.0±0.0
	Hidrotérmico ^b	2	43.3±2.4	27.0±1.8	7.8±0.5	4.2±0.2	48.7±1.0	42.6±0.7	9.9±0.2
	3	44.1±1.7	35.9±0.3	7.5±0.1	3.6±0.2	50.2±0.5	48.7±0.7	8.3±0.1	2.7±0.0
	6	48.9±0.5	47.1±0.3	5.7±0.4	3.0±0.3	47.3±1.8	53.8±2.0	8.6±0.1	2.3±0.1
Germinación ^c	3 dds	52.2±0.2	28.2±1.0	4.3±0.0	4.9±0.1	54.1±0.5	25.5±0.7	6.0±0.6	4.6±0.1
	6 dds	46.8±0.1	27.2±0.2	4.3±0.1	5.1±0.3	55.4±0.1	21.6±0.02	6.0±0.4	4.8±0.0

Cada valor representa la media±desviación estándar de tres repeticiones para cada determinación, dds=días después de siembra. ^asemillas remojadas en agua destilada, ^bsemillas remojadas en agua destilada a 95°C, ^csemillas desinfectada con hipoclorito de sodio al 1%, lavadas tres veces con agua destilada, manualmente escarificadas y germinadas en un fotoperiodo de 14 h y régimen de temperatura de 20 °C/15 °C.

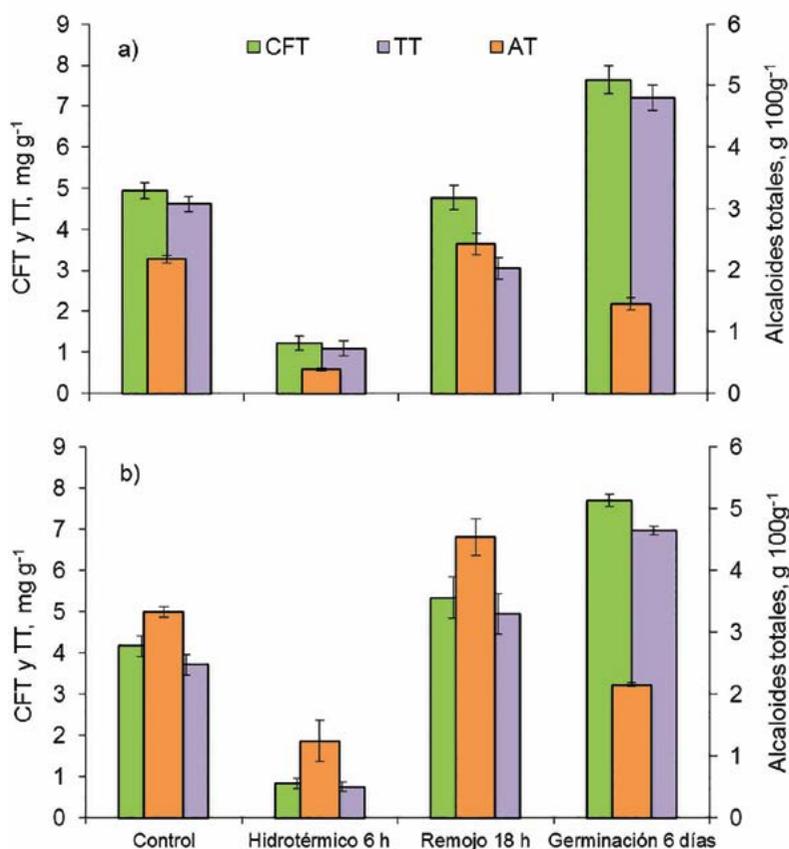


Figura 1. Efecto de tratamientos hidrotérmico, remojo y germinación en los compuestos fenólicos totales (CFT), taninos totales (TT) y alcaloides totales (AT) en semillas de *L. exaltatus* (a) y *L. montanus* (b).

(Carvajal-Larenas et al., 2013). Al final del tratamiento de remojo, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al control en el contenido de taninos totales (una reducción de 33.8 %) en *L. exaltatus* (Figura 1a). En contraste en *L. montanus*, alcaloides totales, CFT y taninos totales aumentaron 36.3%, 28.1% y 33.5%, respectivamente respecto al control (Figura 1b).

Los taninos condensados fueron solo 0.002 mg g⁻¹ en *L. exaltatus* y 0.020 mg g⁻¹ en *L. montanus* después de este tratamiento (Cuadro 3).

Composición química de las semillas después de la germinación

Después de seis días de germinación, los contenidos de proteína y de cenizas se incrementaron en ambas especies respecto al control (Cuadro 2). Esos incrementos fueron 8.8 y 21.4% para *L. exaltatus*, y 20.6% y 26.3% para *L. montanus*, respectivamente.

En cambio, el contenido de grasa disminuyó 25.8% en *L. exaltatus* y 40.0% en *L. montanus* ($P < 0.05$). Las semillas de *L. montanus* mostraron una reducción de 18.4% en el contenido de fibra, respecto a las semillas control. Los contenidos de compuestos fenólicos totales y taninos totales incrementaron, mientras que los alcaloides totales disminuyeron después de 6 d de germinación. De acuerdo a la Figura 1, la concentración final de polifenoles totales se incrementó 54.7% en semillas de *L. exaltatus* y 84.8% en *L. montanus* respecto al control.

Los taninos totales se incrementaron 56.2% en *L. exaltatus* y 87.8% en *L. montanus*. En contraste, el contenido de alcaloides totales disminuyó 33.5 y 35.4% en *L. exaltatus* y *L. montanus*, respectivamente. En *L. angustifolius* la germinación incrementa los contenidos de proteína y polifenoles, lo que se asocia al incremento en la síntesis de aminoácidos para apoyar la división celular durante el proceso germinativo (Rumiyati et al., 2012). En *L. campestris* (Jiménez-Martínez et al., 2012), se observa también un incremento en estos compuestos después de germinación. Las semillas control de las especies en estudio presentan contenidos de taninos totales más altos que los determinados en *L. albus* (0.72 %), *L. barkeri* (0.84 %) y *L. montanus* (0.92 mg g⁻¹) (Guemes-Vera et al., 2012), y con la germinación estos se incrementaron debido a la actividad metabólica de las semillas al iniciar el proceso de germinación. Aun cuando en los germinados de los lupinos en estudio se observa una reducción en el contenido de alcaloides, esta no fue suficiente para recomendar su utilización en alimentación ya que el límite permitido es 0.02% (Muzquiz et al., 2006), por lo que otros

Cuadro 3. Efecto de tratamientos hidrotérmico, remojo y germinación en la concentración de taninos condensados en semillas de *Lupinus silvestres*.

Tratamiento	Tiempo (h)	Taninos condensados (mg g ⁻¹)	
		<i>L. exaltatus</i>	<i>L. montanus</i>
Control	0	0.077±0.001	0.050±0.000
Remojo ^a	18	0.062±0.010	0.114±0.080
Hidrotérmico ^b	6	0.002±0.001	0.020±0.003
Germinación ^c	6 dds	0.50±0.014	0.20±0.030

Cada valor representa la media±desviación estándar de tres repeticiones; dds: días después de siembra. ^asemillas remojadas en agua destilada, ^bsemillas remojadas en agua destilada a 95 °C, ^csemillas desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1%, lavadas tres veces con agua destilada, manualmente escarificadas y germinadas en un fotoperiodo 14 h y régimen de temperatura de 20 °C/15 °C.

tratamientos y tiempos deberán ser evaluados en estas especies mexicanas.

CONCLUSIONES

Los cambios en compuestos químicos de las semillas de *L. exaltatus* y *L. montanus* dependen de la especie y del tiempo de exposición en cada tratamiento evaluado. Aun cuando la aplicación de un tratamiento hidrotérmico por 6 h disminuyó los alcaloides totales e incrementó los contenidos de proteína y fibra, la disminución no fue suficiente para alcanzar los niveles permitidos para uso en alimentación.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada a la primera autora para realizar estudios de posgrado.

LITERATURA CITADA

- AOAC. (1995). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. 16th Ed. Arlington, VA: AOAC.
- Carvajal-Larenas, F.E., Nout, M.J.R., Van Boekel, M.A.J.S., Koziol, M., & Linnemann A.R. (2013). Modeling of the Aqueous Debitting process of *Lupinus mutabilis* Sweet. LWT - Food Science and Technology 53: 507-516. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.03.017>
- Erbas, M. (2010). The Effects of Different Debitting Methods on the Production of Lupin Bean Snack from Bitter *Lupinus albus* L. Seeds. Journal of Food Quality 33: 742-757. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2010.00347.x>
- Gladstones J.S. (1998). Distribution, Origin, Taxonomy, History and Importance. Chapter 1. In: Gladstones, J.S.; Atlin, C.A., Hamblin, J., editors. Lupins as Crop Plants: Biology, Production and Utilization. Wallingford, UK: CAB International.
- Guemes-Vera, N., Martinez-Herrera, J., Hernandez-Chavez, J.F., Yanez-Fernandez, J., & Totosaus, A. (2012). Comparison of Chemical Composition and Protein Digestibility, Carotenoids, Tannins and Alkaloids content of Wild Lupinus Varieties Flour. Pakistan Journal of Nutrition 11: 676-682. <https://doi.org/10.1002/jfsa.3152>
- Jezierny, D., Mosenthin, R., & Bauer, E. (2010). The Use of Grain Legumes as a Protein Source in Pig Nutrition. A Review. Animal Feed Science and Technology 157:111-128. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.03.001>
- Jiménez-Martínez, C., Campos-Mendiola, R., Sánchez-Espíndola, M.E., Jiménez-Aparicio, A., Gutiérrez-López, G., & Dávila-Ortiz, G. (2009). Microstructural Changes in *Lupinus campestris* Seed in Response to Three Thermal Debitting Treatments. Journal of Science Food and Agriculture 89: 2399-2404. <https://doi.org/10.1002/jfsa.3735>
- Jiménez-Martínez, C., Cardador-Martínez, A., Martínez-Ayala, A.L., Muzquiz, M., Martín, P.M., & Dávila-Ortiz, G. (2012). Changes in Protein, Non nutritional Factors, and Antioxidant Capacity during Germination of *L. campestris* Seeds. International Journal of Agronomy Article ID 387407, 7 p. <https://doi.org/10.1155/2012/387407>
- Jiménez-Martínez, C., Mora-Escobedo, R., Cardador-Martínez, A., Muzquiz, M., Martín, P.M., & Dávila-Ortiz, G. (2010). Effect of Aqueous Acid and Alkaline Treatments on Antinutritional Factors Content and Protein Quality in *Lupinus campestris* Seed Flour. Journal of Agriculture and Food Chemistry 58: 1741-1745. <https://doi.org/10.1021/jf90288r>
- Khattab, R., Arntfield, S.D., & Nyachoti, C.M. (2009). Nutritional Quality of Legume Seeds as Affected by Some Physical Treatments, Part 1: Protein Quality Evaluation. LWT-Food Science and Technology 42: 1107-1112. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.02.004>
- Kohajdova, Z., Karvičova, J., & Schmidt, Š. (2011). Lupin Composition and Possible Use in Bakery-a Review. Czech Journal of Food Science 29: 203-211.
- Makkar, H.P.S., Blummel, M., Borowy, N.K., & Becker, K. (1993). Gravimetric Determination of Tannins and their Correlations with Chemical and Protein Precipitation Methods. Journal of Science Food and Agriculture 61:161-165.
- Mubarak, A.E. (2005). Nutritional Composition and Anti-nutritional Factors of Mung Bean Seeds (*Phaseolus aureus*) as Affected by Some Home Traditional Processes. Food Chemistry 89: 489-495. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.007>
- Mustafa, A.F., Cristensen, D.A., Mckinnon, J.J., & Newkirk, R. (2000). Effects of Stage of Processing of Canola Seed on Chemical Composition and *in vitro* Protein Degradability of Canola Meal and Intermediate Products. Canadian Journal of Animal Science 80: 211-214. <https://doi.org/10.4141/A99-079>
- Muzquiz, H., Varela, M.M., Guillamón, E.A.J., Goyoaga, E., Cuadrado, C., & Burbano, C. (2006). Factores No-nutritivos en Fuentes Proteicas de Origen Vegetal. Su Implicación en Nutrición y Salud. Brazilian Journal of Food and Technology III:87-98.
- Muzquiz, M., De la Cuadra, C., Cuadrado, C., Burbano, C., & Calvo, R. (1994). Herbicide-like Effect of Lupinus Alkaloids. Industrial Crops and Products 2: 273-280.
- Petterson, D.S. (2000). The Use of Lupins in Feeding Systems Review. Asian Australian Journal of Animal Science 13: 861-882. <https://doi.org/10.5713/ajas.2000.861>
- Porter, L.J., Hrstich, L.N., & Chang, B.G. (1986). The Conversion of Procyanidins and Prodelphinidins to Cyanidin and Delphinidin. Phytochemistry 25: 223-230.
- Ruiz, M.A., & Sotelo, A. (2001). Chemical Composition, Nutritive Value, and Toxicology Evaluation of Mexican Wild Lupin. Journal of Agriculture and Food Chemistry 49: 5336-5339. <https://doi.org/10.1021/jf010247v>
- Rumiyati, R., Anthony, J., & Vijay, J. (2012). Effect of Germination on the Nutritional and Protein Profile of Australian Sweet Lupin (*Lupinus angustifolius* L.). Food and Nutrition Sciences 3: 621-626. <https://doi.org/10.4236/fns.2012.35085>
- SAS Institute Inc. (2010). User's Guide: Statistics, version 9.3. Cary, N.C. USA: SAS Inst. Inc.
- Sreevidya, N., & Mehrotra, S. (2003). Spectrophotometric Method for Estimation of Alkaloids Precipitable with Dragendorff's Reagent in Plant Materials. Journal of AOAC Int 86: 1124-1127.
- Trugo, L.C., Donangelo, C.M., Trugo, N.M.F., & Bach, K.K.E. (2000). Effect of Heat Treatment on Nutritional Quality of Germinated Legumes Seeds. Journal of Agriculture and Food Chemistry 48: 2082-2086. <https://doi.org/10.1021/jf9913920>

- Valdés-Miramontes, E. H., López-Espinoza, A., Rodríguez-Macías, R., Salcedo- Pérez, E., & Ruiz-López, M. A., (2015), Effect of Thermal Treatment on the Chemical Composition and Minerals of Wild Lupins Seed. *Revista Chilena de Nutrición* 42: 186-190.
- Wang, N., Hatcher, D.W., & Gawalko, E.J. (2008). Effect of Variety and Processing on Nutrients and Certain Anti-nutrients in Field Peas (*Pisum sativum*). *Food Chemistry* 111: 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.047>
- Wang, T.L., Domoney, C., Hedley, C.L., & Casey, R. (2003). Can we Improve the Nutritional Quality of Legume Seeds? *Plant Physiology* 131: 886–891. <https://doi.org/10.1104/pp.102.017665>

