

A temporary legume sprouts: An alternative for animal feeding¹

Germinados de leguminosas temporales: Una alternativa para la alimentación animal

¹Award of the Ministry of Science, Technology and Environment of Cuba

María F. Díaz Sánchez¹, María Á. Martín-Cabrejas², Madeleidy Martínez Pérez¹, Lourdes L. Savón Valdés¹, Yolanda Aguilera², Vanesa Benítez², Verena Torres Cárdenas¹, Gabriel Coto Valdés³, Acela González Conde¹, Mariela Sarmiento Menéndez¹ and Yasmila Hernández Herrera¹

¹Instituto de Ciencia Animal (ICA)

Apdo 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

²Instituto de Investigación de Ciencias de la Alimentación (CIAL), Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.

³Histoterapia Placentaria.

Email: mdiaz@ica.co.cu

The use of biological processes, such as germination, that manage to reduce the content of anti-nutritional factors (ANFs) and improve the nutritional value of legume grains from national production, can constitute an option for the production of animal food for small producers, family and backyard agriculture. The results presented in this proposal are related to the obtaining, chemical characterization and nutritional evaluation of temporary legume sprouts as an alternative for animal feeding. For this, it was worked on optimization of the germination process in *Vigna unguiculata* (vigna) var. INIFAT 94, *Canavalia ensiformis* (canavalia) var. White, *Lablab purpureus* (dolicho) var. Rongai, *Glicine max* (soybean) var. INCASOY 24 and *Mucuna pruriens* (mucuna) var. Ashen. The transformations that occur during the germination in the physical characteristics, chemical composition, amino acids profile, and (ANFs) content were studied, which constitutes a contribution to scientific knowledge. In addition, the biochemical and physiological effect caused by the intake of germinated and non-germinated grain meals was determined for the first time, in rat as an experimental model and in broilers as a species of economic interest. The obtained results showed that the transformations that occur during germination vary depending on the species and variation of germination used. Germination produced favorable changes in the protein and carbohydrate fraction, increased the total dietary fiber, the proportion of insoluble / soluble dietary fiber and the available starch content, with decrease in the α -galactosides content and increases in total soluble sugars. It proved to be an effective and promising method for the studied legumes when improve the amino acids balance and nutritional quality, reduce anti-nutritional factors, increase bioactive phenolic compounds and antioxidant activity, showing their potential for animal feeding and as a possible ingredient for the formulation of human food with high value-added. Nutritional studies of germinated grains in birds with inclusion levels in the ration of 20% of vigna, 30% of soybeans and 10% of canavalia and mucuna, showed favorable changes in the digestive physiology and health indicators of the animals, in the specific case of canavalia showed improvement in the immune response. The procedure and experimental sequence used provided methodologies for the selection, collection, characterization and evaluation of sprouts, which can be applied to other species and varieties of legumes with possibilities of use in animal feeding.

Key words: legumes, sprouts, chemical characterization, nutritional evaluation

El empleo de procesos biológicos, como la germinación, que logren reducir el contenido de factores antinutricionales (FANs) y mejorar el valor nutritivo de los granos de leguminosas de producción nacional, puede constituir una opción de producción de alimento animal para los pequeños productores, la agricultura familiar y de traspatio. Los resultados que se presentan en esta propuesta están relacionados con la obtención, caracterización química y evaluación nutricional de germinados de leguminosas temporales como alternativa para la alimentación animal. Para ello se trabajó en la optimización del proceso de germinación en *Vigna unguiculata* (vigna) var. INIFAT 94, *Canavalia ensiformis* (canavalia) var. Blanco, *Lablab purpureus* (dólico) var. Rongai, *Glicine max* (soya) var. INCASOY 24 y *Mucuna pruriens* (mucuna) var. Cenizo. Se estudiaron las transformaciones que ocurren durante la germinación en las características físicas, composición química, perfil de aminoácidos, y contenido de (FANs), lo que constituyó un aporte al conocimiento científico. Además, se determinó por primera vez, el efecto bioquímico y fisiológico que ocasiona el consumo de harinas de granos sin germinar y germinados, en rata como modelo experimental y en pollos de engorde como especie de interés económico. Los resultados obtenidos demostraron que las transformaciones que ocurren durante la germinación varían en dependencia de la especie y variante de germinación empleada. La germinación produjo cambios favorables en la fracción proteica y de carbohidratos, incrementó la fibra dietética total, la proporción de fibra dietética insoluble/soluble y el contenido de almidón disponible, con decrecimiento del contenido de α -galactósidos e incrementos de azúcares solubles totales. Resultó ser un método efectivo y prometedor para las leguminosas estudiadas al mejorar el balance de aminoácidos y la calidad nutricional, reducir los factores antinutricionales, aumentar los compuestos fenólicos bioactivos y la actividad antioxidante, lo que demuestra sus potencialidades para la alimentación animal y como posible ingrediente para la formulación de alimentos humanos de alto valor agregado. Los estudios nutricionales de los granos germinados en aves con niveles de inclusión en la ración de 20% de vigna, 30% de soya y 10% de canavalia y mucuna, mostraron cambios favorables en la fisiología digestiva e indicadores de salud de los animales, en el caso específico de canavalia se evidenció mejora en la respuesta inmune. El procedimiento y secuencia experimental utilizada aportaron metodologías para la selección, obtención, caracterización y evaluación de germinados, que puede aplicarse a otras especies y variedades de leguminosas con posibilidades de uso en la alimentación animal.

Palabras clave: leguminosas, germinados, caracterización química, evaluación nutricional

Introduction

Cuba in recent years invests 257 and 266 million USD annually in maize and soybean, respectively, which represents 95 % of animal food that is imported to satisfy the livestock demand, with priority for poultry and pig sector (AEC 2016). However, all the demand for animal food is not covered and national production of grains and alternative sources of animal food is required. Previous studies showed the important agronomic and nutritional potential of the temporary legumes as a source of food and were obtained technologies for the production of grains and forages (Díaz *et al.* 2001). In the case of *Vigna unguiculata*, it was demonstrated that in isoproteic diets of wheat - soybean it is possible to substitute 16 and 60 % of each one for non-germinated grain meal of this legume, which is equivalent to inclusion levels up to 20 % of the diet. However, the presence in these plants of toxic or anti-nutritional (ANFs) compounds, affects the availability and use of nutrients in animal feeding, mainly in monogastric species (Díaz *et al.* 2014 and 2016).

In this context, the use of biological processes, such as germination, that manage to reduce the content of ANFs and improve the nutritional value of grains legumes of national production can constitute an option for small producers, family and backyard agriculture. The results presented in this proposal are related to the obtaining, chemical characterization and nutritional evaluation of temporary legume sprouts as an alternative for animal feeding, which will be described through five stages of research:

- Obtaining and physical-chemical characterization of legume sprouts.
- Biological evaluation of germinated and non-germinated grains using the rat as experimental model
- Impact of germination on the content of starch, dietary fiber and physical and chemical properties of non-conventional legumes.
- Changes in the content of anti-nutritional factors and antioxidant activity during the germination process
- Biological evaluation of germinated and non-germinated grains in broilers.

Main results

Obtaining and physical-chemical characterization of legume sprouts.

The studies corresponding to the optimization of the germination process in 5 legume species: *Vigna unguiculata* (vigna) cv. INIFAT 94, *Canavalia ensiformis* (canavalia) cv. White, *Lablab purpureus* (dolicho) cv. Rongai, *Glicine max* (soybean) cv. INCASOY 24 and *Mucuna pruriens* (mucuna) cv. Ashen were carried out through 21 experiments. In each of the species the legume grains were germinated for a period of 96 to 120 hours, under different lighting conditions: 12-hour lighting intervals, total lighting

Introducción

Cuba en los últimos años invierte anualmente 257 y 266 millones de USD en maíz y soya, respectivamente, que representa el 95% del alimento animal que se importa para satisfacer la demanda de la ganadería, con prioridad para el sector avícola y porcino (AEC 2016). No obstante, no se cubre toda la demanda de alimento animal y se requiere de producciones nacionales de granos y fuentes alternativas de alimento animal. Estudios previos indicaron el importante potencial agronómico y nutricional de las leguminosas temporales como fuente de alimento y se llegaron a obtener tecnologías de producción de granos y forrajes (Díaz *et al.* 2001). En el caso de *Vigna unguiculata* se demostró que en dietas isoproteicas de trigo - soya es posible sustituir 16 y 60% de cada uno por harina de granos sin germinar de esta leguminosa, lo que equivale a niveles de inclusión hasta 20% de la dieta. Sin embargo, la presencia en estas plantas de compuestos tóxicos o antinutricionales (FANs), afectan la disponibilidad y utilización de los nutrientes en la alimentación animal, fundamentalmente, en especies monogástricas (Díaz *et al.* 2014 y 2016).

En este contexto el empleo de procesos biológicos, como la germinación, que logren reducir el contenido de FANs y mejorar el valor nutritivo de los granos de leguminosas de producción nacional puede constituir una opción para los pequeños productores, la agricultura familiar y de traspatio. Los resultados que se presentan en esta propuesta están relacionados con la obtención, caracterización química y evaluación nutricional de germinados de leguminosas temporales como alternativa para la alimentación animal, los que serán descritos a través de cinco etapas de investigación:

- Obtención y caracterización físico - química de germinados de leguminosas.
- Evaluación biológica de granos germinados y sin germinar utilizando la rata como modelo experimental.
- Impacto de la germinación en el contenido de almidón, fibra dietética y propiedades físico químicas de las leguminosas no convencionales.
- Cambios en el contenido de factores antinutricionales y actividad antioxidante durante el proceso de germinación.
- Evaluación biológica de granos germinados y sin germinar en pollos de ceba

Principales resultados.

Obtención y caracterización físico-química de germinados de leguminosas

Se realizaron a través de 21 experimentos los estudios correspondientes a la optimización del proceso de germinación en 5 especies de leguminosas: *Vigna unguiculata* (vigna) cv. INIFAT 94, *Canavalia ensiformis* (canavalia) cv. Blanco, *Lablab purpureus* (dólico) cv. Rongai, *Glicine max* (soya) cv. INCASOY 24 y *Mucuna pruriens* (mucuna) cv. Cenizo. En cada una de las especies se germinaron los granos de leguminosas por

and total darkness.

The achieved results constitute the first studies of obtaining and characterization of temporary legume sprouts under Cuban conditions. A germination methodology of its grains was achieved that produces favorable changes in its physico-chemical properties, improves the quality of the resulting products and increases its functionality; which makes it an accessible and economical option for small and medium producers (Díaz *et al.* 2004, 2007a and 2009).

It was showed that the physical and chemical transformations that occur during germination depend on the legume species as well as on the conditions in which the germinative process is carried out. In all the species evaluated with the advance of the germination process the weight of the germinated grains, the radicle length and the germination percentage increased, which changed the chemical composition resulting from the germinated grains (Díaz *et al.* 2008).

Chemical composition. In vigna the three germination variants increased the protein and fiber contents with the advance of the germinative process. The most significant results were under total darkness conditions where crude protein (CP) increased in 25 %, respect to non-germinated vigna, and true protein (TP) and neutral detergent fiber (NDF) in 54 % and 57 % , respectively (Díaz *et al.* 2007a). In dolicho the variant of total darkness coincided in presenting the higher concentrations, with respect to the non-germinated grain, of CP (13 %), TP (8 %) and NDF and acid detergent fiber (ADF) (7 %) (Díaz *et al.* 2011). In canavalia the three variants increased the CP from 10 to 11%, regarding non-germinated control and the total illumination variant exceeded the TP in 31 %, while the NDF decreased in 8 % (Díaz *et al.* 2007b). In mucuna with intervals of illumination and total illumination the protein and fibrous indicators increased standing out the latter variant with values higher than the control without germinating in CP (24.7 %), TP (39.12 %) and NDF (32.13 %). In soybean there were variations in CP up to 15.8 % increase, compared to non-germinated control, and in cellulose up to 48 % decrease regarding to control (Díaz *et al.* 2012).

Dietary fiber. It is reported, for the first time, the total dietary fiber (TF), soluble (SF) and insoluble (IF) content and the protein join to these fractions in the germinated and non-germinated legumes studied. The TF levels in non-germinated grains were found between 312 g/kg DM (vigna) and 457 g/kg DM (soybean), higher than those reported in the literature on cereal seeds and other legumes. The IF content showed from 93 to 97% of the TF of the evaluated genotypes (Martín-Cabrejas *et al.* 2007).

The germination increased the TF from 6 % (mucuna) to 14 % (vigna), except in soybean that

un período de 96 a 120 horas, en diferentes condiciones de iluminación: intervalos de iluminación de 12 horas, iluminación total y oscuridad total.

Los resultados alcanzados constituyen los primeros estudios de obtención y caracterización de germinados de leguminosas temporales en las condiciones de Cuba. Se logró una metodología de germinación de sus granos que produce cambios favorables en sus propiedades físico-químicas, mejora la calidad de los productos resultantes y aumenta su funcionalidad; que la convierte en una opción accesible y económica para pequeños y medianos productores (Díaz *et al.* 2004, 2007a y 2009).

Se demostró que las transformaciones físicas y químicas que se producen durante la germinación, dependen tanto de la especie de leguminosa como de las condiciones en que se realiza el proceso germinativo. En todas las especies evaluadas con el avance del proceso de germinación se incrementó el peso de los granos germinados, la longitud de la radícula y el porcentaje de germinación, lo que dio lugar a cambios en la composición química resultante de los granos germinados (Díaz *et al.* 2008).

Composición química. En vigna las tres variantes de germinación incrementaron los contenidos de proteína y fibra con el avance del proceso germinativo. Los resultados más significativos se encontraron en condiciones de oscuridad total donde la proteína bruta (PB) aumentó en 25%, respecto a vigna sin germinar, y la proteína verdadera (PV) y la fibra detergente neutra (FDN) en 54% y 57%, respectivamente (Díaz *et al.* 2007a). En dólico la variante de oscuridad total coincidió en presentar las concentraciones superiores, respecto al grano sin germinar, de PB (13%), PV (8%) y FDN y fibra detergente ácido (FDA) (7%) (Díaz *et al.* 2011). En canavalia las tres variantes incrementaron la PB de 10 a 11%, respecto al control sin germinar y la variante de iluminación total superó en 31% la PV, mientras que la FDN disminuyó en 8% (Díaz *et al.* 2007b). En mucuna con intervalos de iluminación e iluminación total aumentaron los indicadores proteicos y fibrosos, sobresaliendo esta última variante con valores superiores al control sin germinar en PB (24.7%), PV (39.12 %) y FDN (32.13 %). En soya se produjeron variaciones en la PB de hasta 15.8 % de incremento, en relación con el control sin germinar, y en celulosa de hasta 48 % de disminución en relación con el control (Díaz *et al.* 2012).

Fibra dietética. Se informa, por primera vez, el contenido de fibra dietética total (FT), soluble (FS) e insoluble (FI) y la proteína unida a estas fracciones en las leguminosas estudiadas germinadas y sin germinar. Los niveles de FT en los granos sin germinar se encontraron entre 312 g/kg MS (vigna) y 457 g/kg MS (soya), superiores a los informados en la literatura en semillas de cereales y otras leguminosas. El contenido de FI representó del 93 al 97 % de la FT de los genotipos evaluados (Martín-Cabrejas *et al.* 2007).

La germinación incrementó la FT de 6 % (mucuna) a 14 % (vigna), excepto en soya que decrece en 10 % como

decreased in 10 % as a consequence of the decrease in IF. For all the germination variants the highest levels of TF and IF were presented in total darkness. It was evidenced that a significant percentage of protein still remains attached to the total fiber, which showed between 23 and 43 % of the total protein and approximately 90 % is associated with the insoluble fraction (Martín-Cabrejas *et al.* 2007).

Soluble carbohydrates. Constitute the first determinations of soluble carbohydrates in these species of germinated and non-germinated legumes. The results showed that the non-germinated grains differ in the amount of total sugars from 38.4 (dolicho) to 63.7 g/kg of DM (mucuna) and in content of oligosaccharides derived from galactose (GOS) from 21.7 (mucuna) to 36.6 g/kg of DM (vigna) (Martín-Cabrejas *et al.* 2007). The oligosaccharides profile varied with the species under study. The germination process increased the total soluble sugars from 20 to 61 % and reduced the GOS content from 98 to 63 %. The effect of germination for soluble sugars was more marked in dolicho, canavalia and mucuna, while the GOS reduction was higher in canavalia (98 %) and vigna (94 %) (Martín-Cabrejas *et al.* 2007). These results are superior to the GOS reductions obtained by soaking, cooking and comparable to the fermentative processes or the addition of exogenous enzymes.

Amino-acids. Constitute the first determinations of the amino acid content of sprouts in these legumes. A good amino acid balance was found with concentrations of acceptable essential amino acids that varied depending on the species and variation of germination used. In soybean there were important increases in cysteine and arginine, aspartic acid in vigna, arginine in canavalia, cysteine, valine, methionine, leucine, tyrosine, lysine, histidine, phenylalanine and arginine in dolicho and methionine in mucuna (Díaz *et al.* 2013).

With the information generated, a database was created (Camelo *et al.* 2007 and Díaz *et al.* 2008) and from the integration of the results, the first mathematical models were obtained to predict the performance of the different species and varieties of legumes in the germination process (Díaz *et al.* 2008).

Through the application of principal component analysis, it was determined that the indicators with higher contribution to variability, during the germination process by species and variants of germination studied, were: % DM, root development, TF, IF, ash, CP, TP and total sugars (Díaz *et al.* 2008). The application of the statistical model of impact measuring (Torres *et al.* 2013) allowed the grouping of the 15 new products or variants of obtained food, through germination processes, into 4 groups (Díaz *et al.* 2013 and 2014). Table 1 shows the chemical composition of the clusters obtained by multivariate analysis.

consecuencia de la disminución en la FI. Para todas las variantes de germinación los mayores niveles de FT y FI se presentaron en oscuridad total. Se evidenció que un porcentaje significativo de la proteína aún permanece unido a la fibra total, el cual representó entre el 23 y 43 % de la proteína total y aproximadamente el 90 % se encuentra asociado a la fracción insoluble (Martín-Cabrejas *et al.* 2007).

Carbohidratos solubles. Constituyen las primeras determinaciones de carbohidratos solubles en estas especies de leguminosas germinadas y sin germinar. Los resultados mostraron que los granos sin germinar difieren en la cantidad de azúcares totales desde 38.4 (dólico) a 63.7 g/Kg de MS (mucuna) y en contenido de oligosacáridos derivados de la galactosa (GOS) de 21.7 (mucuna) a 36.6 g/Kg de MS (vigna) (Martín-Cabrejas *et al.* 2007). El perfil de oligosacáridos varió con la especie en estudio. El proceso de germinación incrementó el total de azúcares solubles de 20 a 61 % y redujo el contenido de GOS de 98 a 63 %. El efecto de la germinación para los azúcares solubles fue más marcado en dólico, canavalia y mucuna, mientras que la reducción de GOS fue superior en canavalia (98 %) y vigna (94 %) (Martín-Cabrejas *et al.* 2007). Estos resultados son superiores a las reducciones de GOS obtenidas por remojo, cocción y comparables a los procesos fermentativos o a la adición de enzimas exógenas.

Aminoácidos. Constituyen las primeras determinaciones del contenido de aminoácidos de germinados en estas leguminosas. Se encontró buen balance aminoacídico con concentraciones de aminoácidos esenciales aceptables que variaron en dependencia de la especie y variante de germinación empleada. En soya se produjeron incrementos importantes de cisteína y arginina, en vigna de ácido aspártico, en canavalia de arginina, en dólico de cisteína, valina, metionina, leucina, tirosina, lisina, histidina, fenilalanina y arginina y en mucuna de metionina (Díaz *et al.* 2013).

Con la información generada se creó una base de datos (Camelo *et al.* 2007 y Díaz *et al.* 2008) y a partir de la integración de los resultados, se obtuvieron los primeros modelos matemáticos para predecir el comportamiento de las diferentes especies y variedades de leguminosas en el proceso de germinación (Díaz *et al.* 2008).

Mediante la aplicación de análisis de componentes principales se determinaron que los indicadores con mayor contribución a la variabilidad, durante el proceso de germinación por especies y variantes de germinación estudiadas, fueron: % MS, desarrollo radicular, FT, FI, ceniza, PB, PV y azúcares totales (Díaz *et al.* 2008). La aplicación del modelo estadístico de medición de impacto (Torres *et al.* 2013) permitió agrupar los 15 nuevos productos o variantes de alimentos obtenidos, a través de los procesos de germinación, en 4 grupos (Díaz *et al.* 2013 y 2014), La tabla 1 muestra la composición química de las agrupaciones obtenidas por análisis multivariado.

Table 1. Physico-chemical composition of the groups obtained by multivariate analysis.

Indicators, %	Group I		Group II		Group III	Group IV	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	Mean	S.D.
DM	32.57	4.50	37.21	8.39	47.07	27.73	1.93
Germination	99.07	0.97	84.66	11.62	54.09	95.09	1.83
Radicle, cm	5.82	0.64	4.73	1.37	2.59	8.37	2.40
Ash	3.76	0.23	4.39	0.63	3.36	6.84	0.09
CP	35.70	0.91	26.89	2.30	29.21	46.57	1.51
LW	28.15	1.86	21.84	2.53	27.48	36.39	1.96
NDF	29.31	4.05	27.76	4.93	23.26	23.31	1.82
ADF	13.29	0.42	13.18	2.69	10.41	16.01	0.43
Lignin	2.08	0.49	1.84	1.19	1.87	4.70	0.59
Cellulose	10.98	0.30	11.18	2.48	8.29	8.60	0.77
Ca	0.43	0.11	0.37	0.11	0.42	0.58	0.04
P	0.32	0.07	0.36	0.10	0.34	0.22	0.01
Mg	0.29	0.13	0.38	0.13	0.46	0.39	0.05
Insoluble fiber, g/kg DM	330.38	20.73	377.31	37.98	415.20	440.77	33.01
Soluble fiber, g/kg DM	15.83	10.26	19.99	12.40	37.20	28.07	5.40
Total fiber, g/kg DM	346.20	16.20	397.31	48.78	452.40	468.80	30.15
Total sugars, g/kg DM	85.75	14.15	85.31	11.33	143.20	67.03	13.97
Totals GOS, g/kg DM	3.17	2.36	3.43	1.22	8.04	4.89	1.15
Group I:	Canavalia with its three germination variants and Vigna total darkness						
Group II:	Dicho with its three variants, Mucuna total darkness and illumination intervals, Vigna total illumination and illumination intervals						
Group III:	Mucuna total illumination						
Group IV:	Soybean with its three variants						

Biological evaluation of germinated and non-germinated grains using the rat as experimental model

It was worked with vigna and dolicho because they are two species of different chemical composition, whose products resulting from the germination process are part of groups I and II, which are the most representative. The achieved results contribute to the knowledge of the changes that occur in the digestive physiology, protein metabolism, morphometry and morphology of organs from the digestive tract, accessory organs, thymus and thyroid; as well as in the blood hematology and biochemistry of experimental rats that intake non-germinated and germinated grains of temporary legumes. A methodology for the biological evaluation of germinated grain meal of temporary legumes is provided based on its impact on the protein metabolism and the digestive physiology of the rat as an animal model. (Savón *et al.* 2008 and 2015).

Impact of germination on the content of starch, dietary fiber and physical and chemical properties of non-conventional legumes

From the obtained results it was decided to continue deepening in the studies of chemical characterization and nutritional value using the germination variant with

Evaluación biológica de granos germinados y sin germinar utilizando la rata como modelo experimental

Se trabajó con vigna y dólico por ser dos especies de composición química diferentes, cuyos productos resultantes del proceso de germinación forman parte de los grupos I y II, que son los más representativos. Los resultados alcanzados contribuyen al conocimiento de los cambios que se producen en la fisiología digestiva, metabolismo proteico, morfometría y morfología de órganos del tracto digestivo, órganos accesorios, timo y tiroides; así como en la hematology y bioquímica sanguínea de ratas experimentales que consumen granos no germinados y germinados de leguminosas temporales. Se aporta una metodología para la evaluación biológica de harina de granos germinados de leguminosas temporales basada en a su impacto en el metabolismo proteico y la fisiología digestiva de la rata como modelo animal. (Savón *et al.* 2008 y 2015).

Impacto de la germinación en el contenido de almidón, fibra dietética y propiedades físico químicas de las leguminosas no convencionales

A partir de los resultados obtenidos se decidió continuar profundizando en los estudios de caracterización química

illumination intervals, in function of the light hours of Cuba, since it constituted the option of higher possibility of application in the social practice. The amount of total starch (TS), available (AS) and resistant (RS) in germinated and non-germinated legumes was studied. The TS content of the non-germinated legumes ranged from 264.4 - 463.1 mg/g DM. The AS represented between 81 and 90 % of the TS. After germination the content of TS was reduced from 12 to 42%. However, the available starch content increased with respect to non-germinated legumes, representing between 86 and 95 % of the TS. The obtained results constitute a contribution since they showed the advantages of the germination process, when improvement the starch availability, so that if it is required as an energy source, it can be an option (Benítez *et al.* 2013 and Díaz *et al.* 2015).

It was evidenced that the germination with illumination intervals has significant impact in both fractions of the alimentary fiber and improves the relation IF/SF. The content of total sugars was increased, mainly in the IF fraction, due to the liberation of cellulose sugars, and how these changes in the TF vary the physical and chemical properties. After germination, the oil retention capacity, water retention and absorption capacity and gelling capacity were improved, as a result of the increase of the dietary fiber fraction and the percentage of available starch. However, the emulsifying and foaming capacities decrease due to the hydrolysis of proteins during germination (Benítez *et al.* 2011 and 2013). The profile of sugar composition of the IF and SF fractions in these germinated and non-germinated legumes showed similarity. The IF is constituted, mainly, by glucose, uronic acids and arabinose and the SF by glucose and arabinose, followed by uronic acids. The changes that occur in fiber fractions are focused on increases in polysaccharides, cellulose and peptic substances (Benítez *et al.* 2013).

Changes in the content of anti-nutritional factors and antioxidant activity during the germination process

Protease inhibitors. The studied legumes show important contents of enzymatic inhibitors that vary depending on the species (Aguilera *et al.* 2011 and 2013). The levels of trypsin inhibitors and chymotrypsins in non-germinated grains ranged between 1.42-6.87 mg/g DM and 0.67-1.62 mg/g DM, respectively. Germination reduced the content of trypsin inhibitors in dolicho (53%) and canavalia (76 %), while in vigna it increased in 61 %. In chymotrypsin inhibitors, reductions were significant in mucuna (58 %) and dolicho (36 %).

Lectins. Haemagglutinating activity was found without previous treatment of blood cells with trypsin, in canavalia (5.1 mg/100 mg DM of lectin) and germination managed to reduce lectin levels in 50 %. The rest of

y valor nutritivo utilizando la variante de germinación con intervalos de iluminación, en función de las horas luz de Cuba, ya que constituía la opción de mayor posibilidad de aplicación en la práctica social. Se estudió la cantidad de almidón total (AT), disponible (AD) y resistente (AR) en las leguminosas germinadas y sin germinar. El contenido de AT de las leguminosas sin germinar osciló de 264.4 – 463.1 mg/g de MS. El AD representó entre 81 y 90 % del AT. Tras la germinación se redujo del 12 al 42 % el contenido de AT. Sin embargo, el contenido de almidón disponible aumentó respecto a las leguminosas no germinadas, representando entre el 86 y el 95 % del AT. Los resultados obtenidos constituyen un aporte ya que demostraron las ventajas del proceso de germinación, al mejora la disponibilidad del almidón, de manera que si se requiere como fuente de energía puede ser una opción (Benítez *et al.* 2013 y Díaz *et al.* 2015).

Se evidenció que la germinación con intervalos de iluminación tiene impacto significativo en ambas fracciones de la fibra alimentaria y mejora la relación FI/FS. Se incrementó el contenido de azúcares totales, principalmente en la fracción de FI, debido a la liberación de azúcares celulósicos, y cómo estos cambios en la FT varían las propiedades físicas y químicas. Tras la germinación se mejoró la capacidad de retención de aceite, la capacidad de retención y absorción de agua y la capacidad gelificante, como consecuencia del incremento de la fracción de fibra dietética y del porcentaje de almidón disponible. Sin embargo, las capacidades emulsionante y espumante decrecen debido a la hidrólisis de las proteínas durante la germinación (Benítez *et al.* 2011 y 2013).

El perfil de la composición de azúcares de las fracciones de FI y FS en estas leguminosas germinadas y sin germinar presentó similitud. La FI está constituida, principalmente, por glucosa, ácidos urónicos y arabinosa y la FS por glucosa y arabinosa, seguidas de los ácidos urónicos. Los cambios que se producen en las fracciones de fibra se centran en aumentos de los polisacáridos, celulosa y sustancias pépticas (Benítez *et al.* 2013).

Cambios en el contenido de factores antinutricionales y actividad antioxidante durante el proceso de germinación

Inhibidores de proteasas. Las leguminosas estudiadas muestran importantes contenidos de inhibidores enzimáticos que varían dependiendo de la especie (Aguilera *et al.* 2011 y 2013). Los niveles de inhibidores de tripsina y quimotripsinas en los granos sin germinar oscilaron entre 1.42-6.87 mg/g MS y 0.67-1.62 mg/g MS, respectivamente. La germinación redujo el contenido de inhibidores de tripsina en dólico (53 %) y canavalia (76 %), mientras en vigna se incrementó en 61 %. En los inhibidores de quimotripsina, las reducciones fueron significativas en mucuna (58 %) y dólico (36 %).

Lectinas. Se encontró actividad hemaglutinante sin previo tratamiento de las células de la sangre con

legumes did not showed haemagglutinating activity, in this first test, therefore it was worked with trypsinized rat cells and was found activity in dolicho of 10.2 mg/100mg DM of lectin and the germination process decreased the levels in 75.5 % (Aguilera *et al.* 2011 and 2013).

Phytic acid. The content of inositols total phosphates (ITP) did not show high differences between the evaluated species, except in canavalia. Vigna, dolicho and mucuna have the highest concentrations of phytic acid (~8.4 mg / g DM). The most abundant inositol phosphate was the PI6 that constitutes approximately 78 % of the ITP content and varied from 74 % in mucuna and dolicho to 82 % in vigna and canavalia. The germination reduced from 6 to 18 % the ITP content being more relevant in vigna and the PI6 content decreased from 18 to 37 %. Canavalia showed the lowest phytic acid content after the germination process (5.7 mg/g DM) (Aguilera *et al.* 2011 and 2013).

Phenolic compounds. In non-germinated grains the total polyphenols content ranged from 0.72 mg / g DM in dolicho to 37.36 mg / g DM in mucuna, while the lowest value of catechins was found in canavalia (0.02 mg/g DM) and the highest in vigna (0.10 mg/g DM). Regarding proanthocyanidins canavalia, mucuna and dólico showed similar values and vigna reached the highest content (0.50 mg/ DM). The germination process increased the contents of total polyphenols and catechins in all legumes except in vigna and the proanthocyanidins were only increased in canavalia and mucuna.

Antioxidant capacity. The germination process modified the antioxidant activity depending on the species, as well as the content of phenolic compounds. For this reason, a correlation analysis between both was carried out, constituting the first studies of this type in these legumes (Aguilera *et al.* 2013). In general, the samples with higher phenolic content showed higher antioxidant capacity (79.6 μ mol Trolox/g DM in mucuna) with a high correlation coefficient ($r = 0.96$).

Biological evaluation of germinated and non-germinated grains in broilers.

It was worked with broiler for being a species of short biological cycle that demands high nutritional value foods and allows in a short period of time the obtaining of results. Different experiments were carried out to determine the effect of non-germinated and germinated grain meals on the nutritional value and digestive physiology of the animals, when 30 % of soybean, 20 % of vigna and 10 % of mucuna and canavalia are included in the diets, replacing the imported soybean cake of the control diet. All the diets were isoproteic and isoenergetic (Martínez *et al.* 2013 and Díaz *et al.* 2016).

With soybean, the apparent fecal retention of nitrogen decreased in the chickens which intake non-germinated soybeans grains, with respect to the control that did not differ from those that did with the sprout. The apparent

tripsina, en canavalia (5.1 mg/100 mg MS de lectina) y la germinación logró reducir los niveles de lectina en 50 %. El resto de las leguminosas no mostraron actividad hemaglutinante, en este primer ensayo, por ello se trabajó con células de ratas tripsinizadas y se encontró actividad en dólico de 10.2 mg/100 mg MS de lectina y el proceso de germinación disminuyó los niveles en 75.5 % (Aguilera *et al.* 2011 y 2013).

Acido Fítico. El contenido de inositoles fosfatos totales (IFT) no presentó grandes diferencias entre las especies evaluadas, excepto en canavalia. Vigna, dólico y mucuna poseen las mayores concentraciones de ácido fítico (~8.4 mg/g MS). El inositol fosfato más abundante fue el IP6 que constituye aproximadamente el 78 % del contenido de IFT y varió de 74 % en mucuna y dólico hasta 82 % en vigna y canavalia. La germinación redujo del 6 al 18 % el contenido de IFT siendo más relevante en vigna y el contenido de IP6 decreció del 18 al 37 %. Canavalia presentó el menor contenido de ácido fítico después del proceso de germinación (5.7 mg/g MS) (Aguilera *et al.* 2011 y 2013).

Compuestos fenólicos. En los granos sin germinar el contenido de polifenoles totales varió de 0.72 mg/g MS en dólico a 37.36 mg/g MS en mucuna, mientras el menor valor de catequinas se encontró en canavalia (0.02 mg/g MS) y los mayores en vigna (0.10 mg/g MS). En relación con las proantocianidinas canavalia, mucuna y dólico presentaron valores similares y vigna alcanzó el mayor contenido (0.50 mg/g MS). El proceso de germinación incrementó los contenidos de polifenoles totales y catequinas en todas las leguminosas excepto en vigna y las proantocianidinas sólo se incrementaron en canavalia y mucuna.

Capacidad antioxidante. El proceso de germinación modificó la actividad antioxidante dependiendo de la especie, al igual que con el contenido de compuestos fenólicos. Por esta razón se llevó a cabo un análisis de correlación entre ambos, constituyendo los primeros estudios de este tipo en estas leguminosas (Aguilera *et al.* 2013). De forma general, las muestras con mayor contenido fenólico presentaron mayor capacidad antioxidante (79.6 de μ mol Trolox/g de MS en mucuna) con alto coeficiente de correlación ($r=0.96$).

Evaluación biológica de granos germinados y sin germinar en pollos de ceba

Se trabajó con pollos de ceba por ser una especie de ciclo biológico corto que demanda de alimentos de alto valor nutritivo y permite en breve período de tiempo la obtención de resultados. Se realizaron diferentes experimentos para determinar el efecto de las harinas de granos sin germinar y germinadas en el valor nutritivo y fisiología digestiva de los animales, cuando se incluye en las dietas 30 % de soya, 20 % de vigna y 10 % de mucuna y canavalia, en sustitución de la torta de soya importada, de la dieta control. Todas las dietas fueron isoproteicas e isoenergéticas (Martínez *et al.* 2013 y Díaz *et al.* 2016).

retention of organic matter (OM) was higher in the control group and in which the germinated legume was substituted with respect to the non-germinated legume (64.14 and 65.23 vs 60.86 %). Decrease in live weight (LW) was observed with the inclusion of grain meals in the ration. The full gastrointestinal tract (GIT) was higher with the inclusion of germinated and non-germinated soybean with respect to the control and empty was only with the non-germinated legume. The full small intestine increased with the inclusion of the non-germinated grain, however, empty it did with the germinated and raw soy, respect to the control. An increase in the relative weight of the pancreas was observed with the inclusion of non-germinated soybean compared to the rest of the treatments (4.92 vs. 3.14 and 3.62 g/kg LW).

With vigna the apparent retentions of DM and OM did not differ between the three treatments. However, the nitrogen retention in chickens that intake non-germinated vigna grains was lower respect to the rest of treatments that did not differ between them (47.13 vs 56.07 and 57.71 %). There were no differences between treatments in the live weight and in the different filled sections of the GIT. The relative weight of the empty small intestine, as well as its length, increased with the inclusion of the non-germinated grain in relation to the rest of the treatments. An increase in the weight of the liver and pancreas was observed with the inclusion of non-germinated vigna grains, in comparison with the rest of the treatments (29.77 vs 26.60 and 27.06 g/kg LW and 3.23 vs 2.35 and 2.67 g/kg LW, respectively).

With mucuna to the morphometric indicators of the GIT, Pearson correlation was performed and later multivariate analysis by the principal components method. There was a correlation between the 27 variables under study. Of these, eight explained the measures related to the weights of the different full and empty sections, as well as the content of the digesta, with eigenvalues higher than 1. The production of short chain fatty acids (SCFA) in the caecum was lower with the inclusion of non-germinated grain meal in comparison to the rest of the treatments that did not differ among themselves (176.44 vs 208.30 and 211.20meq/L). There were not differences for the immunological organs, blood indicators and the main components of the carcasses and live weight (Díaz *et al.* 2016 and Martínez *et al.* 2016).

With canavalia the apparent fecal retention of the DM did not differ between treatments. However, the apparent fecal retention of nitrogen in the chickens that intake non-germinated grain meal was lower than for the germinated grain meal (46.91 vs. 69.29 %, respectively). There were not differences in the full and empty weights of the GIT organs of the chickens that intake the experimental diets. The relative weight of the pancreas increased in the animals that intake the non-germinated grain meal with respect to the rest of the treatments (2.37, 2.38 vs 2.86 g / kg LW). The

Con soya la retención fecal aparente del nitrógeno disminuyó en los pollos que consumieron granos de soya sin germinar, respecto al control que no difirió de los que lo hicieron con el germinado. La retención aparente de la materia orgánica (MO) fue superior en el grupo control y en el que se sustituyó la leguminosa germinada con respecto a la no germinada (64.14 y 65.23 vs 60.86 %). Se observó disminución del peso vivo (PV) con la inclusión de las harinas de granos en la ración. El tracto gastrointestinal (TGI) completo lleno fue mayor con la inclusión de soya germinada y sin germinar respecto al control y vacío sólo lo fue con la leguminosa sin germinar. El intestino delgado lleno incrementó con la inclusión del grano sin germinar, sin embargo, vacío lo hizo con la soya germinada y cruda, respecto al control. Se observó aumento del peso relativo del páncreas con la inclusión de granos de soya sin germinar en comparación con el resto de los tratamientos (4.92 vs 3.14 y 3.62 g/kg PV).

Con vigna las retenciones aparente de la MS y la MO no difirieron entre los tres tratamientos. Sin embargo, la retención de nitrógeno en los pollos que consumieron granos de vigna sin germinar fue menor respecto al resto de los tratamientos que no difirieron entre sí (47.13 vs 56.07 y 57.71 %). No se observaron diferencias entre tratamientos en el peso vivo y en las diferentes secciones llenas del TGI. El peso relativo del intestino delgado vacío, así como su longitud incrementaron con la inclusión del grano sin germinar en relación al resto de los tratamientos. Se observó aumento del peso del hígado y el páncreas con la inclusión de granos de vigna sin germinar, en comparación con el resto de los tratamientos (29.77 vs 26.60 y 27.06 g/kg PV y 3.23 vs 2.35 y 2.67 g/kg PV, respectivamente).

Con mucuna a los indicadores morfométricos del TGI, se les realizó correlación de Pearson y posteriormente análisis multivariado por el método de componentes principales. Existió correlación entre las 27 variables en estudio. De ellas, ocho explicaron las medidas relacionadas con los pesos de las diferentes secciones llenas y vacías, así como el contenido de la digesta, con valores propios mayores que 1. La producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) totales en ciego fue menor con la inclusión de harina de granos sin germinar en comparación con el resto de los tratamientos que no difirieron entre sí (176.44 vs 208.30 y 211.20meq/L). No se observaron diferencias para los órganos inmunológicos, indicadores sanguíneos y los principales componentes de las canales y peso vivo (Díaz *et al.* 2016 y Martínez *et al.* 2016).

Con canavalia la retención fecal aparente de la MS no difirió entre tratamientos. Sin embargo, la retención fecal aparente de nitrógeno en los pollos que consumieron harina de granos sin germinar fue menor que para la harina de granos germinados (46.91 vs. 69.29 %, respectivamente). No se hallaron diferencias en los pesos llenos y vacíos de los órganos del TGI de los pollos que

weight of the Bursa of Fabricius decreased with respect to the control in the chickens that intake of germinated canavalia grains. The weight of the thymus was higher in the control group and in that of the germinated legume respect to the control (4.71 and 3.23 vs 2.48 g/kg LW) (Savón and Díaz 2016).

The germination process used was an effective and promising method for the studied legumes when increasing the nutritional quality, reduce the anti-nutritional factors, increase the bioactive phenolic compounds and antioxidant activity, which shows their potential for animal feeding and as a possible ingredient for the formulation of human foods with high value- added. The nutritional studies showed increases in the digestibility and use of their grains in birds feeding and with the canavalia sprouts there was an improvement in the immune response. The procedure and experimental sequence used in this study provide a methodology of selection, collection, characterization and evaluation of sprouts that can be applied to other species and varieties of legumes with possibilities of use in animal feeding.

consumieron las dietas experimentales. El peso relativo del páncreas aumentó en los animales que consumieron la harina de granos sin germinar respecto al resto de los tratamientos (2.37, 2.38 vs 2.86 g/kg PV). El peso de la bolsa de Fabricio disminuyó respecto al control en los pollos que consumieron granos de canavalia germinada. El peso del timo fue superior en el grupo control y en el de la leguminosa germinada respecto al control (4.71 y 3.23 vs 2.48 g/kg PV) (Savón y Díaz 2016).

El proceso de germinación empleado resultó un método efectivo y prometedor para las leguminosas estudiadas al incrementar la calidad nutricional, reducir los factores antinutricionales, aumentar los compuestos fenólicos bioactivos y la actividad antioxidante, lo que demuestra sus potencialidades para la alimentación animal y como posible ingrediente para la formulación de alimentos humanos de alto valor agregado. Los estudios nutricionales manifestaron incrementos en la digestibilidad y aprovechamiento de sus granos en la alimentación de las aves y con los germinados de canavalia se evidenció mejora en la respuesta inmune. El procedimiento y secuencia experimental utilizada en este estudio aporta una metodología de selección, obtención, caracterización y evaluación de germinados que puede aplicarse a otras especies y variedades de leguminosas con posibilidades de uso en la alimentación animal.

References

- AEC 2016. Anuario Estadístico de Cuba. Oficina Nacional de Estadística e Información (ONEI). Edición 2016.
- Aguilera Y., M. F. Díaz, T. Jiménez, V. Benítez, T. Herrera, C. Cuadrado, M. Martín-Pedrosa & M. A. Martín-Cabrejas 2013. Changes in Nonnutritional Factors and Antioxidant Activity during germination of nonconventional legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:8120-25.
- Aguilera Y., V. Benítez, M.F. Díaz, T. Jiménez, S. Cantera, M. A. Martín-Cabrejas 2011. Mejora de la fracción de carbohidratos prebióticos en leguminosas temporales germinadas. *Nutr. clin. diet. hosp.* 61 (supl. 1): 75.
- Benítez V., S. Cantera, Y. Aguilera, T. Jiménez, R.T. Sarmento, M.F. Díaz & Martín-Cabrejas M.A. 2011. Evaluación de factores antinutricionales en leguminosas no convencionales: Efecto del proceso de germinación. *Nutr. clin. diet. hosp.* 2011; 31(supl. 1): 75.
- Benítez V., S. Cantera, Y. Aguilera, E. Mollá, R. M. Esteban, M. F. Díaz & M. A. Martín-Cabrejas 2013. Impact of germination on starch, dietary fiber and physicochemical properties in non-conventional legumes. *Food Research International*, 50(1):64–69.
- Camelo S., V. Torres, & M. F. Díaz 2007. Multivariate analysis of the chemical composition of seasonal legume grains. *Cuban Journal of Agricultural Science* 41(2):101.
- Díaz M. F., L. Savón, M. Martínez, V. Torres, G. Coto, M. A. Martín-Cabrejas, E. Lon Wo & M. Castro 2014. Leguminosas temporales como alternativa para la alimentación animal en el trópico. En: *Avances en Producción Sustentable de alimentos y Biotecnología Reproductiva*. Editores: Juan Eulogio Guerra Liera, Jorge A. Saltijeral Oaxaca y Alejandro Córdova Izquierdo. Universidad Autónoma de Sinaloa. México 2014. Pág 147.
- Díaz M. F., M. A. Martín-Cabrejas, A. González, V. Torres & A. Noda 2007a. Biotransformation of *Vigna unguiculata* during the germination process. *Cuban Journal of Agricultural Science* 41(2):161.
- Díaz M. F., Torres, V., González, A. & Noda, A. 2004. Biotransformations in the germination of *Vigna unguiculata*. *Cuban Journal of Agricultural Science* 38(1):87.
- Díaz M. F., G. Coto, M.A. Martín-Cabrejas, A. González. M. Sarmiento. V. Torres, A. Noda, Y. Aguilera & V. Benítez 2013. Efecto del proceso de germinación en la composición aminoacídica de leguminosas no convencional para la alimentación porcina. *INFOVET Especial No. 3*:36-40.
- Díaz M. F., M. Á. Martín-Cabrejas, G. Coto, A. González, V. Torres & A. Noda 2009. Germinados de Leguminosa. Una opción para la producción animal en Cuba. *Revista ACPA*, número 2: 54.
- Díaz M. F., M. Martínez, L. Savón y M. A. Martín-Cabrejas 2016. Germinados de leguminosas no convencionales: Una alternativa potencial para la alimentación animal. En: *Repensando la Ganadería*. Compiladores: Juan Eulogio Guerra Liera, Gustavo Ruiz Lang y Jorge A. Saltijeral Oaxaca. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. México 2016. Pág 51-66
- Díaz M. F., V. H. Vega, M. Á. Martín-Cabrejas & A. González 2012. Transformación de los granos de *Glycine max.* en diferentes variantes de germinación. Una alternativa para la alimentación porcina. *Revista Computadorizada de Producción*

- Porcina, Volumen 19 (número 2) 2012.
- Díaz M.F. L. Savón, V. Torres, E. Valiño, G. Coto, M. A. Martín-Cabrejas, A. González, M. Orta, I. Scull & A. Noda 2008. Mejora del valor nutritivo de leguminosas temporales por métodos biotecnológicos. Informe final de proyecto. Programa Nacional de Biotecnología Agropecuaria No 0300206. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba.
- Díaz M.F., C. Padilla, L. Aguirre, E. Lon-Wo, M. Castro & D.M. Cino 2001. Utilización de las leguminosas como alternativa en la alimentación de animales monogástricos. Informe final de proyecto. PNCT N0 008 "Producción de alimento animal por vías biotecnológicas". Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba.
- Díaz M.F., M.A. Martín- Cabrejas, A. González, V. Torres & A. Noda 2007b. Biotransformación de *Vigna unguiculata* y *Canavalia ensiformis* durante el proceso de germinación. Memoria del II Congreso Producción Animal 2007. Instituto de Ciencia Animal. Soporte electrónico
- Díaz, M.F., M.Á. Martín-Cabrejas, A. González, V. Torres, & A. Noda 2011. Biotransformation of *Lablab purpureus* during the germination process. Cuban Journal of Agricultural Science 45(4):433.
- Martín-Cabrejas, M. A., M. F. Díaz, Y. Aguilera, V. Benítez, E. Mollá & R. M. Esteban 2007. Influence of germination on the soluble carbohydrates and dietary fibre fractions in non-conventional legumes. Food Chemistry 107. 1045-1052.
- Martínez M., M. F. Díaz, Y. Hernández, M. Sarmiento & F. Sierra Dorvigny 2016. *Mucuna pruriens* grains meal, germinated and non-germinated, for broilers: their effect on physiological indicators. Aceptada para publicar: CJAS, 50.3 del 2016.
- Martínez M, M F Díaz, Y. Hernández, M. Sarmiento & F. Sierra 2013. Sustitución de pasta de soya comercial (*Glycine max*) por harina de frijol de soya germinada y sin germinar en dietas de pollos de engorde. Livestock Research for Rural Development. Volume 25. Article #120. Retrieved October 11. 2013. from <http://www.lrrd.org/lrrd25/7/mart25120.htm>.
- Savón L. & M. F. Díaz 2016. Canavalia germinated grain meal: Effect on gastrointestinal and lymphoid morphometric indexes of broilers. Enviada a: Livestock Research for Rural Development. 2016.
- Savón L, B. González, M. E. Arteaga, C. Forte, M. Orta, V. Torres & M. F. Díaz 2008. Avances en la evaluación biológica de harina de granos germinados de leguminosas temporales utilizando la rata como modelo experimental. Memoria Porcinocultura 2008, La Habana, Cuba. Soporte electrónico.
- Savón L., M. F. Díaz, E. Valiño, I. Scull, M. Martínez, L.E. Dihigo & P. Lezcano 2015. Utilización de alimentos biotransformados para especies monogástricas. 15 años de Experiencia del Instituto de Ciencia Animal. Conferencia Publicada en Memorias de Eventos. V Congreso de Producción Animal, PAT 2015, La Habana, Cuba.
- Torres V., Cobo Cuña R., Sánchez L. & Ruez, N. 2013. Statistical tool for measuring the impact of milk production on the local development of a province in Cuba. Livestock Research for Rural Development. V. 25, Number 9, 2013.

Received: January 15, 2017