

SEMILLAS DE *Moringa oleífera* CULTIVADAS EN EL CHACO CENTRAL COMO FUENTE DE ENZIMAS PARA ALIMENTACION ANIMAL

Moringa oleífera SEEDS CULTURED IN CHACO CENTRAL AS A SOURCE OF ENZYMES FOR ANIMAL FEED

Yubero F¹

¹Dpto. de Físicoquímica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Asunción

RESUMEN. La moringa (*Moringa oleífera*) se cultiva en Paraguay con altos rendimientos y sus hojas constituyen uno de los forrajes más completos pues poseen un alto contenido de proteínas, vitaminas y minerales. Así mismo, los tenores de factores antinutricionales, como taninos y saponinas, son mínimos, prácticamente despreciables y no se han encontrado inhibidores de tripsina ni de lectina. En nuestro país no se han realizado estudios de evaluación del contenido de enzimas que puedan contener estos vegetales. Sin embargo, en 1987, Dahot y Memon habían demostrado la presencia de actividad lipasa en las semillas de este vegetal que también crece en el continente asiático. En este sentido este trabajo se desarrolló con el fin de determinar la actividad de enzimas (lipasa, ureasa y α -amilasa) presentes en las semillas de *Moringa oleífera* cultivadas en la Región del Chaco Central paraguayo con vista a su utilización en la industria de aditivos para alimentación animal. Los resultados demostraron que el extracto de semillas de Moringa obtenido a pH 7 presentó actividad lipasa, α -amilasa y ureasa mayor que a pH 5 sobre todo para α -amilasa y ureasa (Prueba t para muestras independientes $p < 0,05$) comparado con los estudios a pH 5 desarrollados por otros investigadores. Los resultados de la actividad de enzimas obtenidos con los extractos de semillas cultivadas en nuestro país se corresponden con el mayor porcentaje de nitrógeno soluble obtenido por Vázquez y Yubero en el año 2009 a pH 7. Este trabajo permitió conocer el alto potencial que tienen las semillas de Moringa cultivadas en el Paraguay a fin de utilizarlas como fuente de producción de enzimas, principalmente de lipasa y α -amilasa como suplemento de la alimentación animal.

Palabras clave: *Moringa oleífera* – semillas - enzimas – alimentación animal

ABSTRACT. Moringa (*Moringa oleífera*) is grown in Paraguay with high yields and its leaves are one of the most complete fodder because they have a high content of proteins, vitamins and minerals. Likewise, the tenors, such as tannins, saponins and anti-nutritional factors, are minimal, almost negligible and not found inhibitors of trypsin or lectin. In our country do not have been evaluation studies of the content of enzymes that may contain these vegetables. However, in 1987, Dahot and Memon had shown the presence of lipase activity in the seeds of this plant that also grows on the Asian continent. In this sense, this work was developed in order to determine the activity of enzymes (lipase, α -amylase and urease) present in *Moringa oleífera* seeds grown in the region of the central Chaco Paraguayo with a view to its use in feed additives industry. The results showed that the seeds of Moringa extract obtained at pH 7 presented lipase, α -amylase and urease activity greater than at pH 5 for α -amylase and urease (Independent samples t-test $p < 0,05$) compared with studies at pH 5 developed by other researchers.. The results of the enzymes activities obtained with extracts of seeds that are grown in our country correspond to the highest percentage of soluble nitrogen obtained by Vazquez and Yubero in 2009 at pH 7. This work allowed to know the high potential have the Moringa seeds grown in the Paraguay in order to empower them as a source of production of enzymes, mainly of lipase and α -amylase as a feed supplement.

Key words: *Moringa oleífera* – seeds - enzymes- animal feed

Dirección para correspondencia: Prof. Dra. Fátima Yubero. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, Ruta Mcal. Estigarribia km 10,5 - Campus Universitario - San Lorenzo - Paraguay

E-Mail: fyubero@qui.una.py

Recibido: 25 de abril de 2013 / **Aceptado:** 13 de junio de 2013

INTRODUCCIÓN

La Moringa es un vegetal con numerosas especies distribuidas por zonas áridas y semiáridas de Asia, África y Madagascar. La especie más conocida es *Moringa oleífera* y su principal utilidad es de complemento alimenticio. Es un árbol de crecimiento muy rápido, resistente a la sequía, aunque con tendencia a perder las hojas en periodos de estrés hídrico. En Paraguay, se cultiva desde el año 2004 con buenos rendimientos la variedad de *Moringa oleífera* Lamb. (1).

Las hojas de Moringa constituyen uno de los forrajes más completos, ricas en proteínas, vitaminas y minerales, con buena palatabilidad, que favorece el consumo por los diferentes animales de renta como cerdos, aves, incluso carpas, tilapias y otros peces herbívoros. La Moringa posee cualidades nutricionales sobresalientes, y es considerada como uno de los mejores vegetales perennes como alternativa de ingrediente para sustituir parcialmente la harina de pescado en alimentos balanceados para tilapia por su alto contenido en proteínas y carbohidratos, estudios similares fueron realizados en tilapias cultivadas en agua de mar (2).

Los tenores de factores antinutricionales, como taninos y saponinas, son mínimos, prácticamente despreciables y no se ha demostrado la presencia de inhibidores de tripsina y de lectina. En materia seca contiene un 10% de azúcares y la energía metabolizable en las hojas es de 9.5 MJ/kg masa seca (1).

En ensayos realizados en diversos estudios con ganado vacuno, porcino, ovino, caprino u avícola son coincidentes en la mejoría importante en el rendimiento de la ganancia de peso y en la producción de leche. Estos resultados han sido más eficientes en animales con dieta deficiente comparada con otros estudios similares en animales con dieta equilibrada. El extracto de semillas de la especie oleífera del Asia posee actividad lipasa (3), una enzima hidrolítica cuya acción es desdoblar los enlaces éster de los triacilglicéridos principalmente.

De acuerdo a la resolución N° 84/93 del Mercado Común del Sur (4) las enzimas o preparaciones enzimáticas son sustancias de origen animal, vegetal o microbiano que actúan como coadyuvantes tecnológicos favoreciendo las reacciones químicas deseables en alimentos. En este sentido, la búsqueda de nuevas fuentes de enzimas con aplicaciones industriales como mejoradores de alimentos hace posible la utilización de recursos naturales existentes en el país como la *Moringa oleífera*.

Las enzimas son catalizadores biológicos de alta eficiencia, que participan en la degradación de sustratos como los almidones o etilcarbamatos y actúan como mejoradores de los caracteres organolépticos y físicos de un alimento (5). Numerosas semillas de vegetales pueden contener actividad amilolítica o lipásica como las leguminosas por ejemplo. Algunas enzimas amilolíticas industriales pueden incrementar la digestibilidad *in vitro* del almidón y es posible usarlas como aditivos en dietas con una concentración mediana o alta de granos para rumiantes a fin de evaluar cambios en la respuesta productiva y la fermentación ruminal en borregos alimentados con grano de sorgo tratado con amilasas industriales (6).

Las enzimas tienen aplicaciones en la industria de bebidas, como en la transformación y producción de aromas y de productos intermedios. Entre las enzimas más utilizadas se encuentran las α - β amilasa, invertasa, proteasa, glucosa isomerasa, lipasa, lactasa, glucosa oxidasa, pectinasa y otras. Son catalizadores de interés en la industria alimentaria las lipasas, amilasas y ureasas, utilizadas con diversos fines (5).

Los alimentos ricos en almidón, como frutas (plátano), tubérculos (papas) y cereales (trigo, arroz, maíz, cebada, sorgo, avena, mijo y centeno), contienen un gran número de enzimas, cuya actividad continúa aun después de cosechados y almacenados; entre las más importantes se encuentran varias hidrolasas, tales como proteasas, lipasas y carbohidrasas, que forman parte de los sistemas metabólicos propios de cada especie.

Entre estas enzimas se destaca a las amilasas como componentes de las proteínas citoplasmáticas divididas en dos grandes grupos: la α -amilasa y la β -amilasa. El tratamiento de granos de sorgo con glucoamilasa de *Aspergillus niger* ha incrementado la digestión ruminal del almidón (7).

En los cereales se han determinado por electroforesis más de diez moléculas con actividad amilolítica, indicativo de que estas enzimas poseen varias isoenzimas. La α -amilasa es una endohidrolasa con acción aleatoria sobre los enlaces internos α (1,4) de la amilosa y de la amilopectina con lo cual se producen dextrinas; se le otorga la denominación de enzima licuante por inducir o favorecer la rápida reducción de la viscosidad de las soluciones de almidón. presencia provoca la rápida reducción de la viscosidad de las soluciones de almidón. Es capaz de romper las uniones glucosídicas adyacentes a ambos lados del enlace α (1,6) de la amilopectina, aunque no ataca específicamente este enlace. Por su parte la α -

amilasa hidroliza los enlaces α (1,4), actividad que la clasifica como una exoenzima.

Una de las funciones más importantes de estas enzimas es la transformación del almidón durante el proceso de la panificación; su acción se inicia al mezclar todos los ingredientes en estado húmedo, produciendo maltosa y en menor cantidad glucosa debido a que la harina de trigo contiene más β que α -amilasa. Estos monosacáridos y disacáridos sirven como sustrato para las levaduras en la producción de anhídrido carbónico y de etanol, así como para efectuar las reacciones de oscurecimiento no enzimático durante la cocción confiriendo la coloración característica a los panificados. Ambas enzimas se inactivan en la etapa del horneado, pero la α -amilasa es más termorresistente que la β -amilasa y ambas contribuyen a la textura del alimento.

Tabla 1. Fuentes comerciales de preparaciones enzimáticas (8)

VEGETAL	
Malta	α - amilasa, β -amilasa, β -glucanasa
Trigo	β - amilasa
-	Bromelina
Higo	Ficina
Papaya	Papaína
Soya	Lipoxigenasa
ANIMAL	
Estómago porcino	Pepsina
Páncreas	Tripsina, lipasa
Estómago de rumiantes	Renina
Estómago de rumiantes	Lipasa
Hígado bovino	Catalasa

Las lipasas o triacyl-glycerol acylhydrolasas (EC 3.1.1.3) son un grupo de enzimas versátiles cuya actividad se presenta en los tejidos embrionarios de semillas especialmente en aquellas que presentan gran cantidad de triacilgliceroles y su actividad en las semillas de plantas aumenta rápidamente durante la germinación. Si bien las enzimas pueden obtenerse de varias fuentes, animales, vegetales o de microorganismos, el aprovechamiento del extracto de las fuentes vegetales se puede lograr eliminando previamente los factores antinutricionales que favorecerían la digestibilidad de otros cereales.

Las enzimas exógenas de interés industrial favorece la eliminación de factores antinutricionales, y el incremento del valor nutricional por degradación de los componentes de cereales (glucanasas, xilanasas) y suplementación de enzimas digestivas propias del animal (proteasas, amilasas, glucanasas, galactosidasas, fitasas). Como resultado en alimento destinado para las aves se evidencia, a) un aumento de la flexibilidad en la formulación de dietas, b) incremento del valor energético

de los cereales y c) incremento de la digestibilidad, crecimiento y conversión del alimento (5).

La investigación se realizó a fin de determinar la actividad de enzimas (lipasa, ureasa y α -amilasa) presentes en las semillas de *Moringa oleífera* Lamb. cultivadas en la Región del Chaco Central paraguayo con el propósito de implementar su utilización en la industria de aditivos para alimentación animal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas de *Moringa oleífera* Lamb. fueron colectadas a partir de cultivos procedentes de la región de Loma Plata, región central del Chaco Paraguayo. Las semillas separadas se conservaron en recipientes de plástico y en forma manual se procedió a separar la cascarilla que rodea a las mismas. Luego de este procedimiento, fueron pesadas y molidas empleando molino manual, de 100 g de semillas secas de Moringa las que luego fueron puestas en contacto con 300 mL de una solución de fosfato tamponado 100 mM, a pH 7 a temperatura ambiente (9). Bajo las condiciones señaladas se procedió a una agitación de 5 minutos en agitador orbital Cole Parmer Mod. 51704 y sonicación con un equipo de ultrasonido SONICOR Mod. SC-152TH respectivamente. De aquí el extracto se centrifugó en una centrífuga refrigerada Sigma Mod. 2K15. Así mismo se prepararon extractos en 100 mM de buffer acetato a pH 5 y a temperatura ambiente.

Los valores de pH 5 y 7, fueron elegidos debido a que se pudo observar que a un pH cercano a 7 se obtiene un mayor rendimiento en la extracción de nitrógeno soluble de las semillas. A este pH entonces, se podría obtener una mayor rentabilidad en la extracción de las proteínas contenidas en la semilla de *Moringa oleífera* por el método de solubilización para su utilización en la industria alimentaria (1).

De los extractos obtenidos a pH 5 y 7 fueron tomados alícuotas del sobrenadante a fin de evaluar la actividad lipasa por el método turbidimétrico en presencia de 10 mM de deoxicolato de sodio a pH 9 en el cual se produce la hidrólisis de la trioleína en presencia de lipasa (10). Para las medidas de actividad lipasa se utilizó una solución buffer de deoxicolato 10 mM agregando 1 mL de trioleína agitando el sistema a fin de lograr una emulsión homogénea. Se leyeron las absorbancias de esta emulsión (buffer deoxicolato + sustrato trioleína). Todos los reactivos utilizados durante los ensayos experimentales fueron de calidad analítica. La actividad lipasa fue expresada en U/L.

Las medidas de la actividad de la ureasa de las semillas de *Moringa oleífera* Lamb. se determinaron por el método discontinuo para lo cual se prepararon tubos correspondientes al blanco de reactivo, estándar de ureasa y muestra que en este caso consistía en el extracto crudo obtenido tanto a pH 5 y 7. Las medidas de actividad se expresaron en Absorbancia/min. Cabe resaltar que las medidas de actividad ureasa son un indicador en el control de calidad de la harina de soja. La disminución de la actividad ureasa está altamente correlacionada con la eliminación de los inhibidores de tripsina y de otros factores antinutritivos (11).

Para determinar las medidas de la actividad α -amilasa de las semillas de *Moringa oleífera* Lamb. se siguió el método de Caraway modificado por el cual la muestra fue incubada con un sustrato de almidón y se determinó la disminución del color azul, después de agregar yodo comparando con un control siendo proporcional a la actividad de la amilasa de la muestra (12). Las medidas de actividad se expresaron en Unidades Amilolíticas/dL.

Las muestras de extracto fueron determinadas por duplicado para cada medida de actividad enzimática aplicándose la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la distribución normal de los datos seguido de la prueba t para muestras independientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La medición de las actividades de la lipasa, ureasa y α -amilasa a pH 5 - 7, realizadas mínimamente por duplicado con las muestras de extracto crudo sometidas a la homogeneización en tiempos de 5 y 60 minutos, fueron iguales en ambos casos, razón por la cual, se decidió trabajar con tiempo de 5 minutos tanto para la agitación y sonicación en la obtención del extracto crudo. Todas las actividades de enzimas fueron determinadas tanto a pH 5 y 7.

La medición de la actividad de la lipasa fue realizada utilizando diluciones 1:1000 para los extractos iniciales a pH 5 y 7. Los resultados se observan en la Figura 1.

A partir de la harina de las semillas sin cascarrilla de la especie vegetal *Moringa oleífera* se obtuvo un extracto crudo en buffer fosfato 100 mM, pH 7 y a pH 5 a 25°C pues de acuerdo a estudios realizados previamente por Dahot y colaboradores la mayor

actividad lipasa se daba a pH 5. Este estudio sin embargo determinó que los extractos acuosos de las semillas presentaron una mayor actividad a pH 7 aunque las diferencias encontradas a pH 5 y 7 no fueron significativas (prueba t para muestras independientes $p < 0,05$).

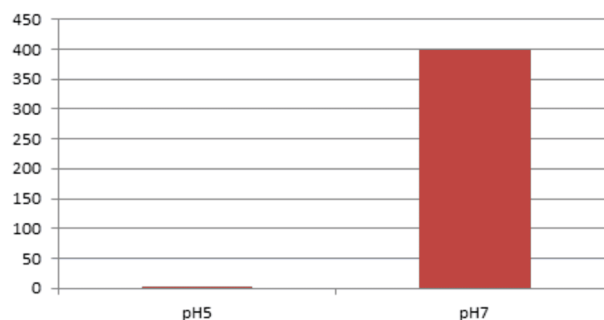


Figura 1. Actividad lipasa (U/L)10⁶ del extracto de semillas de *Moringa oleífera* Lamb. a pH de 5 y 7

Así mismo, para las medidas de actividad ureasa fueron realizadas diluciones 1:10 para las determinaciones a pH 5 y pH 7, los resultados se demuestran en la Figura 2.

La actividad ureasa es baja lo que indica que la concentración de factores antinutricionales a pH 5 y pH 7 es baja y difieren significativamente uno de otro valor de pH (prueba t para muestras independientes $p < 0,05$).

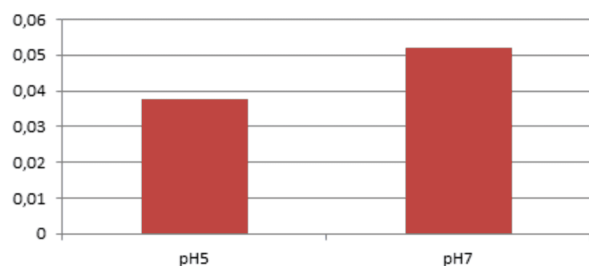


Figura 2. Actividad ureasa (Abs/min) del extracto de semillas de *Moringa oleífera* Lamb. a pH 5 y 7

La actividad de la α -amilasa a pH 7 fueron mayores comparando con las demás actividades enzimáticas, objetos del estudio, determinadas en la dilución 1:1000 como se observa en la Figura 3 (prueba t para muestras independientes $p < 0,05$).

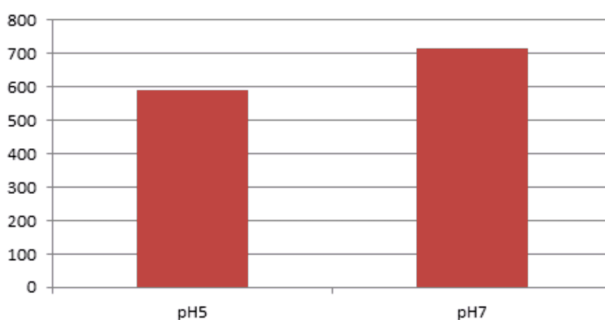


Figura 3. Actividad α -amilasa (en Unidades amilolíticas/dL) de semillas de *Moringa oleífera* Lamb. a los pH 5 y 7

En todos los ensayos se encontró una mayor actividad de enzimas lipasa, ureasa y α -amilasa en los extractos a pH 7, aunque estas diferencias fueron significativas en el caso de las determinaciones de α -amilasa y ureasa (Tabla 2). Es probable que se requieran más muestras para demostrar la diferencia significativa existente también con la actividad lipasa a pH 5 y 7 aunque resulta claro que a pH 7 se obtienen desde el punto de vista industrial las mejores condiciones de extracción. La actividad ureasa fue baja lo que constituye un indicador del bajo contenido de factores antinutricionales.

De conformidad a estudios realizados por otros investigadores, la actividad enzimática es variable en función al clima, especie o región en donde se desarrolla el vegetal en estudio.

Basado en los resultados obtenidos considerando la alta actividad enzimática de la lipasa y amilasa permite que los extractos puedan ser utilizados como materia prima para aditivos o suplementos alimenticios destinados a la alimentación de los animales con el objeto de mejorar la digestibilidad. La Moringa es de hecho un vegetal con escaso contenido de antinutrientes (1) por lo que sus proteínas, entre estas las enzimas podrían favorecer la textura de los

alimentos como así también aportar materia prima de alto valor biológico con el aporte de los extractos de la semilla.

CONCLUSIÓN

Fueron obtenidos extractos acuosos de las semillas de *Moringa oleifera* Lamb. a pH 5 y 7 condiciones favorecidas por la mayor cantidad de nitrógeno soluble (1). Las actividades enzimáticas de la lipasa, ureasa y α -amilasa fueron mayores a pH 7 que a pH 5 y significativamente superior para la ureasa y la α -amilasa (prueba t para muestras independientes $p < 0,05$).

A pH 7 los valores de actividad lipasa fueron en promedio 200.10^6 U/L, 0,052 Abs/min para la actividad ureasa y 717 Unidades Amilolíticas/dL de actividad α -amilasa. Por otro lado, al considerar que las semillas utilizadas fueron las cultivadas en la región central del Chaco Paraguayo la información obtenida con este estudio brinda la posibilidad de aplicar estos extractos bajo condiciones suaves y económicas de pH 7 al mejoramiento de la textura y palatabilidad de alimentos para animales tal como se aplica en los estudios realizados por Rivas-Vega y col, 2012 y otros investigadores.

Tabla 2. Prueba T de muestras independientes

		Prueba T para la igualdad de medias					
		v	l ₀	$\alpha_{0,4}$ (bilateral)	U ^{0,5} h ^{0,5} u ^{0,5} uy medias	E ^{0,5} Intervalo de confianza para la diferencia	
						$\hat{\mu}_1 - \hat{\mu}_2$	$\hat{\sigma}^e \cdot Y^h \alpha^h$
T^hyz¹ z Aj¹ ũ ũ-1	Í ŷ ¹ y ōzŷ z ¹ ũ ũŷ ¹ z ^h ŕŷ ¹ ũ ũ ¹	4,53	2	0,045	0,014500	0,005151	0,023849
	Se han asumido varianzas iguales	4,53	1,91	0,050	0,014500	0,004837	0,024163
Amilasa U. Amilolíticas/dl	No se han asumido varianzas iguales	6,21	2	0,025	142,5000	75,5151	209,4849
	Se han asumido varianzas iguales	6,21	1,27	0,066	142,5000	40,3898	244,6102
Lipasa U/L	No se han asumido varianzas iguales	3,03	2	0,094	300420225,000	10530885,214	590309564,786
	Se han asumido varianzas iguales	3,03	1	0,203	300420225,000	-326387349,802	927227799,802

BIBLIOGRAFÍA

- Vázquez Falcón R D, Yubero F. Extracción de las proteínas solubles de semilla de *moringa oleifera* a diferentes pH y elaboración de la curva de solubilidad respectiva. Tesis (Licenciada en Ciencia y Tecnología de Alimentos). San Lorenzo, Paraguay : Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción; 2009.
- Rivas-Vega y colaboradores. Sustitución parcial de la harina de sardina con *moringa oleifera* en alimentos balanceados para juveniles de tilapia cultivada en agua de mar: (*Oreochromismossombicus x Ocochromisniloticus*). Biotecnia(S.I.).2012. 14(2): 3-10.

- Dahot MU, Memon A R. Properties of moringa seed lipase. *Jour. of Scie. and Ind. Res. (Pakistan)*. 1987. 30 (11):832-838.
- Resolución N° 84/93 del Mercado Común del Sur (MERCOSUR) Definición de Funciones de Coadyuvantes de Tecnología.
- Grebechova R, Prieto Contreras L. Biosíntesis de las enzimas pectolíticas a partir de hongos de *aspergillus niger* y *aspergillus foetidus* para aplicación en industria de alimentos. *Rev. de Inves. (Col.)* 2006; 6 (002): 153-162.
- Mora-Jaimes G, Bárcena-Gama R, Mendoza-Martínez G D,

González-Muñoz S S, Herrera-Haro J G. 2002. Respuesta productiva y fermentación ruminal en borregos alimentada con grano de sorgo tratado con amilasas: especialidad de ganadería. *Revista Agrociencia*. (Méx.). 2002; 36: 31-39.

7. Buendía-Rodríguez G, Mendoza Martínez G, Bárcena Gama R, Ortega Cerrillo, M E, Solís Hernández J, Lara-Bueno A. Efecto de la glucoamilasa de *aspergillus niger* en la digestibilidad in vitro de maíz y sorgo, y en la productividad de borregos. *Agrociencia*. (Méx.). 2003; 37 (004): 317-322.

8. Badui Dergal S. Química de los alimentos. 3ª ed. México: Pearson Educación; 2000.

9. Yubero F, García M, Romero C. Derivado enzimático de lipasa de *moringa oleífera* inmovilizada sobre soporte de sílica-glutaraldehído. San Lorenzo: Dirección General Científica y Tecnológica : Facultad de Ciencias Químicas, UNA; 2008.

10. Shihabi Z, Bishop C. Simplified turbidimetric assay for lipase activity. *Clinical Chemistry*. (E.E.U.U.). [199?]; 17 (12)

11. Dudley-Cash WA. Calidad de la harina de soja. In: American Soybean Association. IV Jornadas sobre Control de calidad de la harina de soja y soja integral.; 2003.

12. Ruíz Bedolla E, Suárez Rocha J T, Moreno Ruíz G. Evaluación de cuatro métodos para la determinación de amilasa sérica. *Rev. Mex. de Pat. Clí.* (Méx.). 1990; 37 (3).