

Estudio preliminar sobre factores inhibidores de enzimas proteolíticas en la harina de pejibaye (*Bactris gasipaes*)

Mario Murillo R. y Alex Kroneberg
Escuela de Zootecnia, Universidad de Costa Rica.

Julio F. Mata*
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Costa Rica.

José G. Calzada*
Centro de Investigación en Productos Naturales, Escuela de Química, Universidad de Costa Rica.

Víctor Castro
Escuela de Química, Universidad de Costa Rica.

(Recibido para su publicación el 9 de marzo de 1983)

Abstract: Signs of malnutrition were observed in mice fed raw pejibaye (*Bactris gasipaes*) meal as a substitute of corn in the feed. No problems appeared when the animals were fed the same mixtures previously autoclaved. An aqueous extract of pejibaye meal inhibited the caseinolytic action of porcine pancreatine. The inhibiting effect disappeared when boiling the extract for one hour upon dialysis. Apparently a relatively low molecular weight protease inhibitor is present in raw pejibaye meal.

En los últimos años la alimentación animal ha venido sufriendo grandes cambios debido a la poca disponibilidad y a los altos precios de las materias primas utilizadas tradicionalmente. Esto ha causado gran impacto en la producción animal, pues cada vez es más difícil conseguir a un costo razonable una buena alimentación de los animales.

Para el caso de los monogástricos, especialmente aves y cerdos, la disponibilidad de productos energéticos tales como maíz, sorgo, semolina o grasas no alcanzará para satisfacer las estimaciones que sobrepasan las 390.000 t para 1985 y 570 000 t para 1990 de concentrados para animales (Murillo, 1981) en que la porción energética constituye más del 60% del total de la dieta. Con base en tales consideraciones es clara la necesidad de buscar nuevas fuentes energéticas capaces de llenar los requerimientos de los animales a un precio adecuado. El pejibaye usado entero o como subproducto de la extracción de aceites, podría llenar el faltante de tales materias primas, considerando su gran valor nutritivo, alta productividad por hectárea y otras cualidades que

hace de esta fruta un producto de gran potencial.

Los factores antinutricionales están ampliamente distribuidos en la naturaleza, sobre todo en una serie de alimentos que se usan para consumo animal o que estos tienen la posibilidad de ingerir. Entre los factores que se presentan con mayor regularidad están los inhibidores enzimáticos; por ejemplo inhibidores de enzimas proteolíticas presentes en la soya, frijol marino, papa etc. (National Academy of Science, 1973).

Tomando en cuenta algunas observaciones preliminares sobre la respuesta animal al consumo de la harina de pejibaye y considerando la escasa información que existe en la literatura referente a su composición química y uso; el presente trabajo tuvo por objeto el evaluar la presencia de posibles factores antinutricionales del pejibaye y aportar algunos datos sobre la composición química de la harina y de las frutas obtenidas en el país.

MATERIAL Y METODOS

La fruta utilizada en la elaboración de la harina fue preparada a partir de frutas enteras

* Investigadores del CONICIT.

CUADRO 1

Composición química de la fruta entera y de diferentes componentes para variedades rojas y amarillas de pejibaye

Descripción de la muestra	Humedad	Proteína	Grasa	Fibra cruda %	Cenizas	Extracto libre de Nitrógeno %
Var. roja entera	55,6	4,3	11,9	3,2	2,2	78,5
Var. amarilla entera	61,0	6,3	14,8	5,9	2,5	70,3
Pulpa var. roja	56,1	5,5	10,0	1,2	2,1	81,2
Pulpa var. amarilla	63,1	6,4	17,9	1,3	2,8	71,5
Coquito var. roja	46,8	5,8	14,5	17,4	2,4	59,9
Coquito var. amarilla	46,3	7,1	14,3	20,1	2,4	56,0
Mezcla var. amarilla y roja más las raquillas	66,1	6,3	8,9	7,6	3,2	73,9

(coquito, pulpa y cáscara) de pejibaye de variedades rojas y amarillas cuya composición química referente a cada una de las partes constitutivas se expone en el Cuadro 1. Posteriormente con la harina se llevó a cabo una serie de experimentos cuya metodología se detalla a continuación.

Experimento 1: Efecto de diferentes niveles de harina de pejibaye como sustituto de maíz en dietas para ratones jóvenes.

Niveles de 10% hasta 50% de harina de pejibaye secada a 25°C fueron utilizados en sustitución del maíz a partir de una dieta basal cuya composición se detalla en el Cuadro 2.

La premezcla vitamínica suplió por kg de dieta: vitamina A 556 U.I.; vitamina D₃ 167 U.I.; vitamina E 140 U.I.; tiamina 4 mg; riboflavina 1.5 mg; piridoxina 1.5 mg; niacina 11.1 mg; ácido pantoténico 10 mg; biotina 20 mg; ácido fólico 0.5 mg; vitamina B₁₂ 6.0 mg; colina 0.19% ; B.H.T. 1% ; azúcar CSP 10 g.

La premezcla mineral suplió por kg de dieta: manganeso 22.2 mg; hierro 10 mg; zinc 55.6 mg; carbonato de calcio CSP 1 kg.

Experimento 2: Efecto de fracciones lipo e hidrosolubles de harina de pejibaye en dietas para ratones.

Los extractos se obtuvieron al someter la harina de pejibaye a extracción con los siguientes disolventes: éter de petróleo, éter etílico, metanol y agua. Una vez eliminado el disolvente a los residuos se le agregó a la dieta en cantidades equivalentes a 100 y 200% de sustitución

de maíz. El extracto acuoso se suplió como agua de bebida. La dieta fue la misma utilizada en el Experimento 1.

Experimento 3: Respuesta animal al consumo de harina de pejibaye con y sin tratamiento térmico sobre el consumo de alimento, ganancia de peso, conversión alimenticia y efecto diurético.

Se utilizaron 14 ratas blancas recién destetadas, que consumieron agua y alimento *ad libitum*, distribuidas individualmente en jaulas metabólicas durante 18 días; la harina de pejibaye se secó a 60°C y luego se calentó en autoclave a una temperatura de 125°C durante una hora.

La dieta control fue a base de sorgo y soya y la harina de pejibaye se adicionó a niveles de 50 y 100% de sustitución del sorgo.

Los porcentajes de ingredientes constitutivos de la dieta y su composición química se muestran en el Cuadro 3.

Experimento 4: Determinación cualitativa de factores inhibidores de proteasas.

Como fuente de proteasas se utilizó pancreatina porcina (Merck). Como sustrato se usó caseína (BHD) al 1% disuelta en NaCl 0.15 M y pH = 7,2 (fosfatos 0.01 M).

La determinación de actividad caseinolítica se llevó a cabo según el método caseinolítico (Methods in Enzymology, 1960) y en presencia de 1 ml de un extracto saturado de la harina de pejibaye en la disolución de pH = 7,2.

CUADRO 2

Dieta basal utilizada en la evaluación de diferentes niveles de harina de pejibaye como sustituto de maíz en dietas para ratones recién destetados

Ingredientes	Porcentaje
Maíz	80,52
Soya	14,07
Vitaminas	1,0
Minerales	1,0
Sal	0,56
Colina	0,19
Fosfato dicálcico	2,66

La acción inhibidora del extracto se eliminó tanto por diálisis (12000 daltons) contra agua destilada, como por 80 minutos de cocción a 100°C.

RESULTADOS

Experimento 1: Los resultados obtenidos al sustituir harina de pejibaye por maíz, relativos a consumo de alimento, ganancia de peso, conversión alimenticia y mortalidad se muestran en el Cuadro 4.

Al comparar los diferentes niveles de sustitución se observa para cualquiera de los parámetros evaluados, a excepción de la conversión alimenticia, que el nivel de sustitución de 10% la dieta control no mostraron diferencias entre sí; y que a medida que se aumentó el nivel de harina de pejibaye, los animales mostraron respuestas inferiores a los alimentados con la dieta basal.

Observaciones permanentes sobre los animales experimentales indicaron ciertos cambios externos entre los que se puede citar: erizamiento del pelo en la cabeza y la espalda; irritación de las partes del cuerpo desprovistas de pelo, depresión y apatía, heces suaves, respiración forzada, aparente dolor abdominal, determinado por el rechamamiento de dientes y arqueo de la espalda.

Experimento 2: Al someter 200 g de harina de pejibaye a la acción de los solventes, las cantidades residuales fueron cuantificadas. Los porcentajes obtenidos fueron de 13 por ciento de residuo para extracción con éter de petróleo, 2,23 para el éter etílico y 2,84 por ciento de re-

CUADRO 3

Composición y porcentaje de materias primas utilizadas en el experimento 3

Ingrediente	Porcentaje de harina de pejibaye como sustituto del sorgo		
	0	50	100
Sorgo	81,42	58,92	0
Soya	13,17	16,03	16,03
Pejibaye	—	19,64	78,56
Vitaminas*	1,0	1,0	1,0
Minerales*	1,0	1,0	1,0
Sal	0,56	0,56	0,56
Colina	0,19	0,19	0,19
Fosfato dicálcico	2,66	2,66	2,66
Proteína calculada (%)	13,3	13,3	13,3
Calcio %	0,65	0,65	0,65
Fósforo %	0,58	0,58	0,58

* Iguales a las utilizadas en el experimento 1.

siduo se obtuvo al someter los 200 gramos de harina a la acción del metanol.

La respuesta animal a la adición de los residuos de extracción se muestran en el Cuadro 5.

No se observaron diferencias significativas en el consumo de alimento entre los animales que consumieron las dietas que contenían los diferentes extractos, pero sí fueron éstos estadísticamente diferentes respecto a los animales que consumieron el extracto acuoso. Con respecto a la ganancia de peso se presentaron diferencias entre todos los tratamientos. Se observa un mayor efecto depresivo del crecimiento en los animales que consumieron el extracto acuoso de pejibaye como agua de bebida.

Experimento 3: Los resultados obtenidos al alimentar a las ratas con harina de pejibaye sin someter y sometida a tratamiento térmico con autoclave, se presentaron en el Cuadro 6. Durante el período experimental no hubo muertes; pero sí algunos de los síntomas reportados en el experimento 1 fueron observados en ratas que consumieron el pejibaye sin el tratamiento térmico.

Con respecto a la ganancia de peso no hubo diferencias significativas entre la dieta control y la que contenía 50% de harina de pejibaye autoclavado. Sí hubo diferencias para los otros tratamientos, siendo numéricamente inferiores las ganancias para los tratamientos en que la harina de pejibaye no recibió el tra-

CUADRO 4

*Consumo de alimento, ganancia de peso, conversión alimenticia y mortalidad de ratones que consumieron diferentes niveles de harina de pejibaye como sustituto de maíz en la dieta**

Parámetro Evaluado	% de harina de pejibaye como sustituto de maíz					
	0	10	20	30	40	50
Consumo de alimento (g)	103,6 ^a	103,8 ^a	64,1 ^b	49,8 ^c	29,7 ^d	12,6 ^e
Ganancia de peso (g)	4,25 ^a	3,25 ^a	-1,25 ^b	-3,30 ^c	-4,63 ^d	-5,13 ^e
Conversión alimenticia	40,1 ^a	42,7 ^b	-21,8 ^c	-20,1 ^d	-8,0 ^e	-2,7 ^f
Mortalidad No.	0	0	2	1	5	8
%	0	0	25	13	63	100

* 48 animales en total, 24 machos, y 24 hembras de 1 1/2 meses de edad; el período experimental fue de 42 días; valores con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí ($p \leq 0,05$).

CUADRO 5

Respuesta de ratones jóvenes a la adición de residuos obtenidos por la acción de varios solventes sobre pejibaye crudo a una dieta control a base de maíz y sorgo

Tipo de extracto	Sustitución de maíz (%)	Ganancia de peso (g)	Consumo de alimento (g)
Eter petróleo	100	4,5	62,25
Eter petróleo	200	2,0	59,40
Eter etílico	100	3,5	64,25
Eter etílico	100	-1,1	64,25
Metanol	100	2,1	66,20
Metanol	200	0,13	67,20
Extracto acuoso		-4,7	55,20
Control (maíz soya)		1,6	66,10

44 ratones sin sexar de 40 días de edad. El período experimental fue de 15 días; la harina de pejibaye fue secada a 25°C; 105 animales consumieron el extracto acuoso de pejibaye como agua de bebida.

tamiento térmico. El consumo de alimento se afectó considerablemente al consumir las ratas harina de pejibaye sin autoclavar. No se observaron diferencias en consumo para la dieta control, comparado en el nivel de 100% harina de pejibaye autoclavada. Respecto a la conversión alimenticia, no se presentaron diferencias significativas entre la dieta control y la que contenía 50% de harina de pejibaye autoclavada. Fueron notorias las conversiones negativas para las ratas que consumieron el pejibaye sin el tratamiento térmico.

Con respecto al volumen de orina excretada no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

Experimento 4: Después de calentar el extracto acuoso de la harina de pejibaye por 10 minutos a 100°C, se observó que aún persistía la actividad inhibitora. A partir de 20 minutos hasta 60 minutos de calentamiento no se obtuvieron resultados que permitieran relacio-

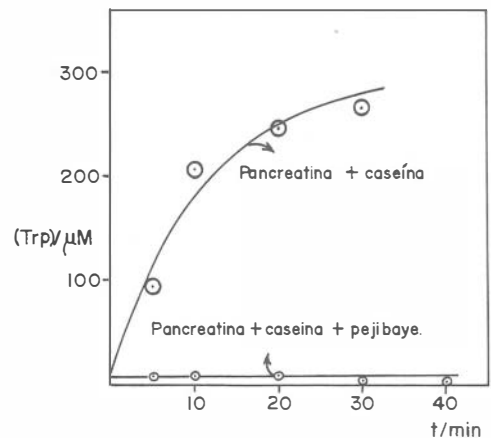
CUADRO 6

Diuresis, ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia de ratas alimentadas con harina de pejibaye con y sin tratamiento térmico durante 18 días

Pejibaye como sustituto de sorgo	Ganancia de (g)	Consumo alimento (g)	Conversión alimenticia	Diuresis ml
Control	45 ^a	217 ^b	4,9 ^a	56
100% pejibaye	16 ^c	101 ^d	-8,8 ^d	39
50% pejibaye	6 ^d	146 ^c	-82,7	36
100% pejibaye autoclavado	20 ^b	201 ^b	10,6 ^b	50
50% pejibaye autoclavado	46 ^a	198 ^a	4,6 ^a	30

Los valores diferentes de las letras son estadísticamente diferentes entre sí ($P \leq 0,05$).

nar el tiempo de calentamiento y la actividad enzimática. Sí se pudo constatar, que después de 60 minutos, el inhibidor enzimático pierde efectividad sobre la tripsina y quimotripsina, así como por diálisis. Los resultados de la actividad caseinolítica se muestran en la Figura 1.



Gráf. 1. Relación entre el tiempo de calentamiento del extracto acuoso de harina de pejibaye y la actividad enzimática.

DISCUSION

En los experimentos 1, 2 y 3 se pone de manifiesto que las pérdidas de peso y muertes observadas en los animales es el inhibidor de enzimas proteolíticas. En el experimento 4 algunos animales, a pesar de haber consumido dietas con alto contenido de harina de pejibaye sin el tratamiento térmico adecuado, no murieron aunque sí perdieron peso considerablemente; puso deberse a la selectividad del alimento, pues los primeros días consumían el maíz o sorgo y la soya de las dietas y posteriormente por la fuerza del hambre consumían el pejibaye, pero que al final del período de evaluación no alcanzaban a ingerir la misma cantidad que otros ratones. Aparentemente a un nivel de 10 por ciento de harina de pejibaye como sustituto del maíz o sorgo la concentración del inhibidor no es suficiente como para provocar pérdidas de peso y pobres conversiones.

La harina de pejibaye tratada térmicamente (autoclave) mostró en los animales mejores resultados en cuanto a ganancia de peso, y conversión alimenticia que los animales que consumieron la dieta control, posiblemente debido a una mejor utilización de la proteína y energía de la dieta.

El método de diálisis, es muy usado para determinar el tipo de inhibidor enzimático y es importante para determinar el grado de complejidad del tipo de enzima. Así por ejemplo la literatura apunta (National Academy of Science, 1973) que el inhibidor de enzimas proteolíticas presente en la soya, es dializable y tiene un peso molecular de 14 300. Para el frijol marino se menciona un inhibidor de enzimas proteolíticas de un peso molecular de 1 000. Esto permite suponer para el extracto acuoso de pejibaye la presencia de un factor inhibidor dializable con un peso molecular del orden de los

10 000. Se pudo observar en el curso de la investigación que la harina de pejibaye almacenada por mucho tiempo (más de 6 meses), al igual que la que se contaminó con hongos (*Rhizopus*) perdió capacidad inhibidora. Puede atribuirse este hecho a la destrucción de preservantes naturales que se encuentran en productos vegetales, que al desaparecer inducen a una eliminación del factor inhibidor.

RESUMEN

La harina de pejibaye utilizada como sustituto de maíz o sorgo en dietas para ratones produjo efectos adversos en cuanto a ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia. No se observaron problemas cuando los animales fueron alimentados con la harina de pejibaye previamente autoclavada. El extracto acuoso de harina de pejibaye inhibió la acción caseinolítica de la pancreatina porcina, efecto que desapareció al someter a tratamiento térmico la solución. Aparentemente existe un inhibidor de enzimas proteolíticas de bajo peso molecular en la harina de pejibaye.

REFERENCIAS

- Christensen, C.M. 1969. Grain Storage, the role of Fungi in quality loss. University of Minnesota Press.
- Methods in Enzymology. 1960. 2 da. Impresión. Vol. II. Academic Press p. 33-34.
- Murillo, M. 1981. Alimentos para animales y su industria en Costa Rica. Oficina de Publicaciones, Universidad de Costa Rica.
- National Academy of Science (N.A.S.). 1973. Toxicants occurring naturally in foods. National Academy of Science. 2 da ed. Washington. D.C.