

## Pancreatic lipase enzymatic activity in broilers fed with *Roystonea regia* fruit meal included in the ration. Technical note

### Actividad de la enzima lipasa pancreática en pollos de ceba que consumen harina del fruto de *Roystonea regia* en la ración. Nota técnica

Yesenia Vives, Madeleidy Martínez-Pérez, Maryen Alberto and Yasmila Hernández

*Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba*  
Email: yesi@ica.co.cu

An amount of 40 male broilers was used for determining the activity of pancreatic lipase enzyme from broilers that consume *Roystonea regia* fruit (royal palm nut meal) meal in the ration. A completely randomized design was applied with four treatments, which consisted of replacing 0, 5, 10 and 15 % for royal palm nut meal. At 42 d, they were sacrificed to obtain the pancreas and enzymatic activity of pancreatic lipase was determined. Diet effect was observed in this indicator, which was higher in broilers consuming royal palm nut meal, compared to control diet (1983 vs. 2500, 2566, and 3283 mL of NaOH/min/mg of protein, respectively) ( $P < 0.05$ ). It is concluded that royal palm nut meal inclusion in diets for broilers increases the activity of pancreatic lipase enzyme to digest lipids in the gastrointestinal tract.

**Key words:** enzymatic activity, lipids, broilers fowl, royal palm nut meal

The search for alternative foods through unconventional raw materials, which largely allow import substitution, reduce competitiveness with human food and preserve the environment, has been one of the objectives set in Cuba for more than three decades. Royal palm, *Roystonea regia* (Kunth) O. F. Cook, is the most abundant plant from Arecaceae family in Cuba. Due to its properties, it has multiple uses: ornamental, industrial, medicinal and nutritional. It is also a provider of different products of economic importance, among which is royal palm nut.

The chemical composition of this fruit makes it to be considered as a good energy source, due to its high lipid content and, to a lesser extent, to its high fiber content (Oliva *et al.* 2018). Within its oil, oleic, lauric, palmitic and linoleic acids are predominant, containing 8 and 18 carbon atoms, mainly responsible for its energy source status. Royal palm nuts are one of the main alternative energy foods available in Cuba, where it is popular as an unconventional source of feed for pigs (Ly *et al.* 2017), but without concrete results in broilers.

As a high lipid source, to be digested in the gastrointestinal tract of broilers, royal palm nut needs lipolytic enzymes. Among them, pancreatic lipase is one of the most studied. This enzyme can be used as a

Se utilizaron 40 pollos de ceba machos para determinar la actividad de la enzima lipasa pancreática de pollos de ceba que consumen harina del fruto de *Roystonea regia* (harina de palmiche) en la ración. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con cuatro tratamientos, que consistieron en la sustitución de 0, 5, 10 y 15 % por harina de palmiche. A los 42 d, se sacrificaron para obtener los páncreas y se determinó la actividad enzimática de la lipasa pancreática. Se observó efecto de la dieta en este indicador, que fue mayor en los pollos que consumieron harina de palmiche, en comparación con la dieta control (1983 vs 2500, 2566, y 3283 mL de NaOH/min/mg de proteína, respectivamente) ( $P < 0.05$ ). Se concluye que la inclusión de harina de frutos de palmiche en dietas para pollos de ceba aumenta la actividad de la enzima lipasa pancreática para digerir los lípidos en el tracto gastrointestinal.

**Palabras clave:** actividad enzimática, lípidos, aves, harina de palmiche

La búsqueda de alimentos alternativos mediante materias primas no convencionales, que permitan en gran medida sustituir las importaciones, reducir la competitividad con la alimentación humana y preservar el medio ambiente, ha sido uno de los objetivos trazados en Cuba desde hace más de tres décadas. La palma real, *Roystonea regia* (Kunth) O.F. Cook, es la planta de la familia Arecaceae más abundante en Cuba. Por sus propiedades, tiene múltiples usos: ornamentales, industriales, medicinales y nutricionales. Es además, proveedora de distintos productos de trascendencia económica, entre los que se encuentra el palmiche.

La composición química de este fruto hace que se considere una buena fuente de energía, debido a su alto contenido de lípidos y, en menor medida, a su elevado contenido de fibra (Oliva *et al.* 2018). Predominan en su aceite los ácidos oleico, láurico, palmítico y linoleico, que contienen 8 y 18 átomos de carbono, responsables principales de su condición de fuente energética. El palmiche es uno de los principales alimentos energéticos alternativos que están disponibles en Cuba, donde es de popularidad como fuente no convencional de alimentación para el ganado porcino (Ly *et al.* 2017), pero sin resultados concretos en las aves.

Como fuente alta en lípidos, para ser digerida en el tracto gastrointestinal de las aves, el palmiche necesita

digestion marker of this fraction. Therefore, the objective of this study was to determine the enzymatic activity of pancreatic lipase in broilers consuming *Roystonea regia* fruit meal in the ration.

An amount of 40 male broilers, eight days old (HE21), housed in metal cages, was used. Animals received experimental diets, from 8 d to 42 d. These were formulated according to requirements established by NRC (1994) for this category. Control consisted of a conventional soy bean-corn diet. In the other three treatments, 5, 10 and 15 % royal palm nut meal was included, so that the isoproteic and isoenergetic diets were maintained for beginning, growth and finish periods. During all the experimentation time, broilers had free access to water and food.

Royal palm nut, in natura, was obtained from Mayabeque province. Drying process consisted of detaching royal palm nuts manually, and then expose them under the sun, spread on a drying plate, for five consecutive days.

Dry material was stored in bags, indoors, in buildings with adequate ventilation and low humidity level. Every five days, it was ground with the rest of the components of grain and cereal diet in the corresponding proportion, with the purpose of extending the shelf life of royal palm nut meal that becomes rapidly rancid, and decreases its biological quality and palatability (Oliva *et al.* 2018).

At 42 d of the experiment, ten broilers were weighed and slaughtered per treatment, according to the jugular vein bleeding method. For this, the traditional procedures (stunning, bleeding and evisceration) were followed, exactly two hours and thirty minutes after the animals had ingested food, with the purpose of taking pancreas samples and obtaining the pancreatic homogenate. Immediately, pancreas was removed from each broiler, and immersed in 4 mL/g of physiological saline, between 0 and 4 °C, for further transfer to the laboratory. The organs of three animals were manually homogenized. They were centrifuged at 5,000 rpm. for 10 min at 4 °C in a Thermoscientific IEC CL31R refrigerated centrifuge. The pellet was discarded and the supernatant was stored in small aliquots at -80 °C.

Protein concentration was determined by the method of Bradford (1976) on a UV-vis Rigol spectrophotometer, Ultra-3400 series. Concentrations were calculated by interpolating absorbance values of samples in the standard curve of bovine serum albumin (BSA) (0.01-5 mg/mL). This was standardized for all homogenates under study at 3mg/mL, for which the corresponding dilutions were made in each case. All analyzes were performed in triplicate.

To achieve maximum reliability in enzymatic activity determination, the authors worked on the linear range proposed for the enzyme, for which an incubation time of five minutes was used (León

de enzimas lipolíticas. Entre ellas, la lipasa pancreática es una de las más estudiadas. Esta enzima se puede utilizar como marcador de la digestión de esta fracción. Por ello, el objetivo de este estudio fue determinar la actividad enzimática de la lipasa pancreática en pollos de ceba que consumen harina de frutos de *Roystonea regia* en la ración.

Se utilizaron 40 pollos de ceba machos, de ocho días de edad (HE21), alojados en jaulas metálicas. Los animales se sometieron a las dietas experimentales, desde los 8 d hasta los 42. Estas se formularon según los requerimientos establecidos por la NRC (1994) para esta categoría de aves. El control consistió en una dieta convencional soya-maíz. En los otros tres tratamientos se incluyó 5, 10 y 15 % de harina de palmiche, de manera que se mantuvieron las dietas isoproteicas e isoenergéticas para los períodos de inicio, crecimiento y acabado. Durante todo el tiempo de experimentación, los pollos tuvieron libre acceso al agua y al alimento.

El palmiche, in natura, se obtuvo de la provincia Mayabeque. El proceso de secado consistió en desprender las semillas de palmiche de forma manual, y luego se expusieron al sol extendidas en un plato de secado, durante cinco días consecutivos.

El material seco se almacenó en sacos, bajo techo, en naves con adecuada ventilación y bajo nivel de humedad. Cada cinco días se molió con el resto de los componentes de la dieta de granos y cereales en la proporción correspondiente, con el propósito de alargar la vida útil de la harina de palmiche que se enrancia con rapidez, y disminuye su calidad biológica y palatabilidad (Oliva *et al.* 2018).

A los 42 d del experimento, se pesaron y sacrificaron diez pollos por tratamiento, según el método de desangrado de la vena yugular. Para ello se siguieron los procedimientos tradicionales (aturdimiento, desangrado y eviscerado), exactamente dos horas y treinta minutos después de que los animales hubiesen ingerido alimento, con el propósito de tomar las muestras del páncreas y obtener el homogenado pancreático. Inmediatamente, a cada pollo se le extrajo el páncreas, y se sumergió en 4 mL/g de solución salina fisiológica, entre 0 y 4 °C, para su traslado al laboratorio. Los órganos de tres animales se homogeneizaron manualmente. Se centrifugaron a 5000 r.p.m. durante 10 min a 4 °C en una centrifuga refrigerada marca Thermoscientific IEC CL31R. Se descartó el pellet y se almacenó el sobrenadante en pequeñas alícuotas a -80 °C.

La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford (1976) en un espectrofotómetro UV-vis Rigol, serie Ultra-3400. El cálculo de las concentraciones se realizó mediante la interpolación de los valores de absorbancia de las muestras en la curva estándar de seroalbumina bovina (BSA) (0.01-5 mg/mL). Esta se estandarizó para todos los homogenados en estudio a 3 mg/mL, para lo que se realizaron las diluciones correspondientes en cada caso. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Para lograr la máxima fiabilidad en la determinación

*et al.* 2014). Lipase activity was determined by the method proposed by Tietz and Fiereck (1966). The necessary volume of NaOH (50 mM) was determined, to neutralize released fatty acids, after enzymatic degradation. The system was kept under moderate agitation at 37 °C and 3 mL of olive oil were used as substrate. Enzyme activity was expressed as mL of NaOH/min/mg of protein.

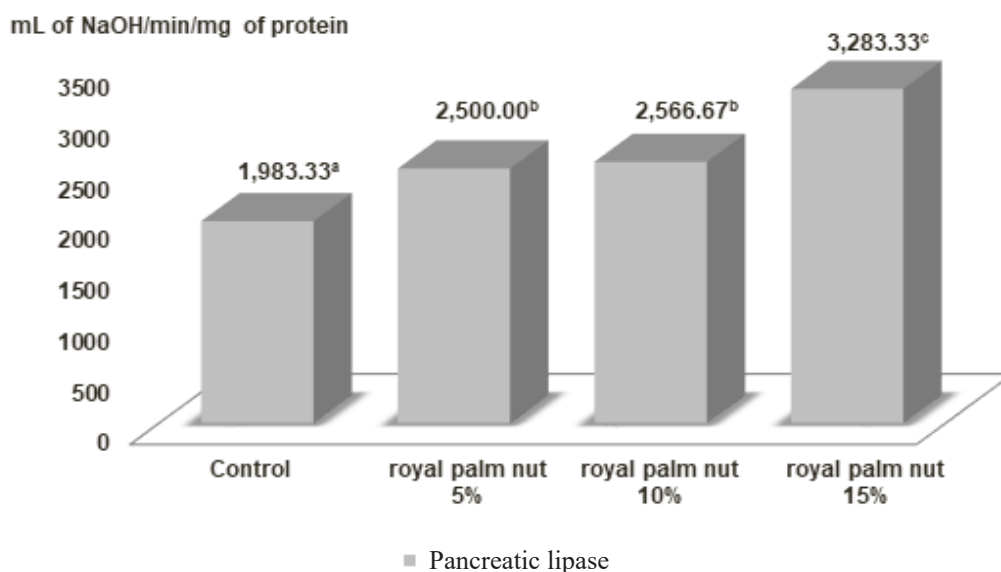
For the statistical analysis of results, a completely randomized design was used, with four treatments and three repetitions (three pancreases each). Differences between means were determined according to Duncan (1955) test in the necessary cases. Infostat (di Rienzo *et al.* 2012) statistical package was used.

Significant effect of the inclusion of royal palm nut meal on the diet was observed, specifically on the activity of pancreatic lipase enzyme in broilers (figure 1). Treatment with the inclusion of 15 % royal palm nut meal increased significantly enzyme activity, compared to the rest of treatments. Treatments with 5 and 10 % did not differ from each other. Control treatment showed the lowest activity ( $P < 0.05$ ). This performance is probably associated with fat content in the diet, since it is known that type, origin and level of fat in the diet are important factors that affect secretion of lipolytic enzymes by pancreas (Barberá 2016).

de la actividad enzimática, se trabajó en el rango lineal propuesto para la enzima, para lo que se utilizó un tiempo de incubación de cinco minutos (León *et al.* 2014). La actividad de la lipasa se determinó mediante el método propuesto por Tietz y Fiereck (1966). Se determinó el volumen necesario de NaOH (50 mM) para neutralizar los ácidos grasos liberados, luego de la degradación enzimática. El sistema se mantuvo en agitación moderada a 37 °C y se emplearon 3 mL de aceite de oliva como sustrato. La actividad de la enzima se expresó como mL de NaOH/min/mg de proteína.

Para el análisis estadístico de los resultados, se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con cuatro tratamientos y tres repeticiones (tres páncreas cada uno). Las diferencias entre las medias se determinaron según Duncan (1955) en los casos necesarios. El paquete estadístico que se utilizó fue Infostat (Di Rienzo *et al.* 2012).

Se observó efecto significativo de la inclusión de la harina de palmiche en la dieta, específicamente en la actividad de la enzima lipasa pancreática en pollos de ceba (figura 1). El tratamiento con la inclusión de 15 % de harina de palmiche aumentó la actividad de la enzima de forma significativa con respecto al resto de los tratamientos. Los tratamientos con 5 y 10 % no difirieron entre sí. El control fue el tratamiento que mostró la menor actividad ( $P < 0.05$ ). Este comportamiento probablemente



a,b,c Values with different letters show significant differences ( $P < 0.05$ )  
SE±121.86,  $P=0.0001$ .

Figure 1. Enzymatic activity of pancreatic lipase in broilers consuming different levels of royal palm nut meal

According to Gonçalves *et al.* (2010), nutritional factors, such as secondary metabolites, can also modify pancreatic lipase activity. These authors stated that absence of polymeric flavonoids of high molecular weight, which have been attributed the action of inhibiting pancreatic lipase activity, when exercising a specific interaction with the enzyme, are usually present in fruits of intense colors such as grapes. Although royal

esté asociado con el contenido de grasa en la dieta, pues se conoce que el tipo, origen y nivel de grasa en la dieta son factores importantes que afectan la secreción de enzimas lipolíticas por el páncreas (Barberá 2016).

Según Gonçalves *et al.* (2010), factores nutricionales como los metabolitos secundarios, también pueden modificar la actividad de la lipasa pancreática. Estos autores plantearon que la ausencia de flavonoides

palm nuts show a blackish brown coloration, in the qualitative phytochemical screening performed on the meal of this fruit, the presence of secondary metabolites (Ly *et al.* 2017) was discarded, which would explain the results.

Barberá (2016) showed that changes in diet composition, involving different sources of lipids and fatty acids, can cause changes in lipase enzyme activity. While it is important to consider that pancreatic secretions respond to a food stimulus, the activity of these enzymes, once they enter the intestinal mucosa, can also be affected in broilers (León *et al.* 2014), as observed in the present study.

Increased activity of pancreatic lipase could increase lipid digestion, which may be beneficial for the animal, since it is known that these biomolecules perform several important biological functions in the body. It can be mentioned that, among these functions, they constitute structural components of membranes, as well as transportation means and storage of catabolic fuel. They also serve as a protective covering on cell surface, which is related to cell-cell recognition, species specificity and tissue immunity. They also have an intense biological activity, since some vitamins (A, B, D, E and K) and hormones are among them.

It is concluded that the inclusion of royal palm nut meal in diets for broilers increases the activity of pancreatic lipase enzyme, which makes it possible to digest lipids in the gastrointestinal tract.

poliméricos de alto peso molecular, a los que se les ha atribuido la acción de inhibir la actividad de la lipasa pancreática, al ejercer una interacción específica con la enzima, suelen estar presentes en frutos de colores intensos como la uva. Aunque el fruto del palmiche presenta coloración pardo negruzca, en el tamizaje fitoquímico cualitativo realizado a la harina de este fruto, se descartó la presencia de metabolitos secundarios (Ly *et al.* 2017), lo que explicaría el resultado que se obtuvo.

Barberá (2016) demostró que los cambios en la composición de la dieta, que involucren diferentes fuentes de lípidos y ácidos grasos, pueden provocar modificaciones en la actividad de la enzima lipasa. Si bien es importante considerar que las secreciones pancreáticas responden a un estímulo alimentario, la actividad de estas enzimas, una vez que ingresan a la mucosa intestinal, también se puede afectar en pollos de engorde (León *et al.* 2014), como se observó en el presente estudio.

El incremento de la actividad de la lipasa pancreática pudiera aumentar la digestión de los lípidos, lo que puede ser beneficioso para el animal, ya que se conoce que estas biomoléculas desempeñan diversas funciones biológicas importantes en el organismo. Entre ellas se puede referir que constituyen componentes estructurales de las membranas, así como formas de transporte y almacenamiento del combustible catabólico. Se desempeñan además, como cubierta protectora sobre la superficie celular, lo que se relaciona con el reconocimiento célula-célula, la especificidad de especie y la inmunidad de los tejidos. Poseen también una intensa actividad biológica, ya que se encuentran entre ellas algunas vitaminas (A, B, D, E y K) y hormonas.

Se concluye que la inclusión de harina de frutos de palmiche en dietas para pollos de ceba aumenta la actividad de la enzima lipasa pancreática, la cual hace posible que se digieran los lípidos en el tracto gastrointestinal.

## References

- Barberá, A. 2016. Influencia de la matriz y tipo de grasa en la digestibilidad de lípidos y proteínas de algunos productos de la pesca. PhD Thesis. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural, Universitat Politècnica de València, València, España. p. 42
- Bradford, M.M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254, ISSN: 0003-2697, DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. 2012. InfoStat. version 2012, [Windows], Universidad Nacional de Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat. Available: <http://www.infostat.com.ar>
- Duncan, D.B. 1955. "Multiple Range and Multiple F Tests". *Biometrics*, 11(1): 1-42, ISSN: 0006341X, DOI: 10.2307/3001478
- Goncalves, R., Mateus, N. & De Freitas, V. 2010. "Study of the interaction of pancreatic lipase with procyanidins by optical and enzymatic methods". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(22): 11901-11906, ISSN: 0021-8561, DOI: 10.1021/jf103026x
- León, M. V, Colina, J.J., Rico, D., Araque, H., Rossini, M., Castañeda, M.V & de Arvelo, E.E.R. 2014. "Actividad de las enzimas tripsina y lipasa pancreáticas en cerdos alimentados con harina de pijiguao (*Bactris gasipaes* HBK) y lisina sintética". *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV*, 55(1): 11-17, ISSN: 0258-6576
- Ly, J., Ayala, L. & Delgado, E.J. 2017. "Valor nutritivo de palmiches en cerdos y factores que lo afectan". *Livestock Research for Rural Development*, 29(4), Available: <https://www.lrrd.cipav.org.co/lrrd29/4/ly29064.html>
- N.R.C. (National Research Council). 1994. *Nutrient requirements of poultry*. 9th Revised Ed. Ed. National Academies Press, Washington D.C., USA. p. 176, ISBN: 0309048923

Oliva, D., Martínez, M., Jiménez, L. & Ly, J. 2018. "Performance traits of growing pigs fed on diets of royal palm nut meal". Cuban Journal of Agricultural Science, 52(2): 1–8, ISSN: 2079-3480.

Tietz, N.W. & Fiereck, E.A. 1966. "A specific method for serum lipase determination". Clinica Chimica Acta, 13(3): 352–358, ISSN: 0009-8981, DOI: 10.1016/0009-8981(66)90215-4.

**Received: July 29, 2019**

**Accepted: January 8, 2020**