

ẢNH HƯỞNG CỦA SÓNG SIÊU ÂM ĐẾN SỰ TRÍCH LY FLAVONOID TỪ LÁ CHÙM NGÂY

Lê Xuân Hiếu¹, Nguyễn Huỳnh Bạch Sơn Long¹, Bùi Văn Miên²

¹Khoa Công nghệ hóa và thực phẩm, Trường Đại học Lạc Hồng

²Trường Đại học Văn Hiến

MienBV@vhu.edu.vn

Ngày nhận bài: 10/11/2016; Ngày duyệt đăng: 04/12/2016

TÓM TẮT

Chùm ngây (*Moringa oleifera* Lam) là một loại cây có giá trị cao, giàu chất dinh dưỡng và có hoạt chất sinh học cao, được trồng và sử dụng làm thực phẩm, dược phẩm phổ biến ở nhiều nước nhiệt đới và cận nhiệt đới đặc biệt là ở Việt Nam. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành khảo sát ảnh hưởng của sóng siêu âm đến quá trình trích ly dịch lá chùm ngây nhằm thu hồi hàm lượng flavonoid cao. Nghiên cứu đã sử dụng sóng siêu âm trong suốt quá trình trích ly với dung môi. Đồng thời khảo sát các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình trích ly lá chùm ngây; khảo sát ảnh hưởng của dung môi, nhiệt độ, thời gian cũng như công suất sử dụng sóng siêu âm tới quá trình trích ly. Kết quả thu được: dung môi trích ly là cồn với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/6; nhiệt độ trích ly là 50°C trong khoảng thời gian 60 phút, công suất sóng siêu âm là 400 w. Hàm lượng thu hồi flavonoid 3,65%.

Từ khóa: Cây Chùm ngây, *Moringa oleifera* Lam, isoflavon, sóng siêu âm, enzyme pectinase.

ABSTRACT

Effect of ultrasound waves in extracting flavonoid of *Moringa oleifera* Lam leaves

Moringa oleifera Lam is a high-value crops, rich nutrient and high biological active substances grown and used for food, common pharmaceuticals in many tropical and subtropical countries especially in Vietnam. In this study, the effects of ultrasonic extraction process *Moringa oleifera* leaves have been surveyed to recover high flavonoid content. The ultrasound is used during extraction with solvents. In addition, factors affecting the extraction process leaves blank the beam are examined; the effect of solvent, temperature, time and capacity is investigated to use ultrasonic extraction process. The results are the alcoholic extraction solvent, material ratio/solvent of 1/6; extraction temperature of 50°C for about 60 minutes, ultrasonic power of 400 w. And Recovery flavonoid content is 3,65%.

Keywords: moringa leaves, *Moringa oleifera* Lam, isoflavones, ultrasound, enzyme pectinase.

1. Đặt vấn đề

Chùm ngây (*Moringa oleifera* Lam) là một loại cây mà tất cả các bộ phận của nó đều có giá trị cao trong sản xuất thực phẩm cũng như dược phẩm. Chùm ngây được ví như là cây độ sinh, các bộ phận lá, trái, hoa và quả non của nó đều được sử dụng làm nguồn thực phẩm như rau xanh ở một số nước, đặc biệt ở Ấn Độ, Pakistan, Philippin, Hawaii và một bộ phận ở Châu Á [1, 2, 3, 6]. Lá chùm ngây là nguồn thực phẩm giàu β -carotene, protein, vitamin C, canxi, kali, sắt,... Ngoài ra nó còn là nguồn cung cấp các chất chống oxi hóa tự nhiên; chứa một số hợp chất chống oxi hóa tự nhiên như acid ascorbic,

flavonoid, phenolic và carotenoid vì thế giúp kéo dài thời gian sử dụng của các thực phẩm giàu chất béo [7]. Theo báo cáo của Khawaja Tahir Mahmood và cộng sự (2010), trong lá chùm ngây hàm lượng đậm cao gấp 2 lần sữa, vitamin C cao gấp 7 lần vitamin C có trong quả cam, vitamin A gấp 4 lần trong cà rốt, hàm lượng kali cao gấp 3 lần trong chuối...

Ngoài ra, trong lá chùm ngây còn có các chất có hoạt tính sinh học quý như hợp chất zeatin, nhóm flavonoid (kaempferol, quercetin, rutin) có tác dụng chống lão hóa mạnh mẽ, có thể ngăn ngừa và điều trị một số căn bệnh nguy hiểm như tiểu đường, bệnh về tim mạch và gan [6, 7]. Vì

thể, nó được biết đến như một cây thần dược và được sử dụng như nguồn thực phẩm để phòng chống suy dinh dưỡng và điều trị các căn bệnh tại các nước nghèo và các nước đang phát triển. Mặc dù chùm ngây đã có từ rất lâu tại một số nước như Ấn Độ, Hy Lạp, Ý, Châu Phi, Nam Mỹ,... tuy nhiên trước đây ở Việt Nam nó chưa được chú ý nhiều, chỉ khoảng 10 năm gần đây nó mới được quan tâm và biết đến là một loại cây có chứa hoạt tính sinh học và hàm lượng chất dinh dưỡng cao rất tốt cho sức khỏe con người.

Các kết quả nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã tiến hành trích ly lá chùm ngây với dung môi nước, còn 48%, 64%, 72%, 96% và với sự hỗ trợ xử lý nguyên liệu bằng enzyme pectinase trước khi trích ly. Kết quả cho thấy khi trích ly lá chùm ngây bằng dung môi nước có xử lý bằng enzyme pectinase trước khi trích ly thu được hiệu quả trích ly cao nhất ở cả hai hàm mục tiêu là protein và flavonoid. Khi trích ly có sự hỗ trợ của enzyme thì hàm lượng protein thu được tăng lên 1,1% (4,871%) so với mẫu đối chứng (3,773%), hàm lượng flavonoid tăng gần 0,2% (0,617%), so với mẫu đối chứng (0,431%). Do đó, chọn phương pháp trích ly bằng nước 50°C có xử lý enzyme với nồng độ 0,1% v/w trước khi trích ly trong khoảng thời gian 60 phút cho hiệu quả trích ly cao nhất. Enzyme pectinase hoạt động tốt nhất ở điều kiện pH 4,5 và nhiệt độ 50°C để thu hồi dịch trích và cố định cho các nghiên cứu ảnh hưởng của sóng siêu âm đến quá trình trích ly dịch lá chùm ngây.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu, dụng cụ thiết bị

Lá chùm ngây được lấy từ cây đã trưởng thành có độ tuổi từ 3 – 4 năm, cây cao từ 3 - 5m có đường kính lớn hơn 0,1 m trồng tại xã Xuân Bắc, huyện Xuân Lộc, tỉnh Đồng Nai, Việt Nam. Sử dụng lá bánh tẻ, không nhàu nát, úa, sâu bệnh...

Dung môi: còn thực phẩm, được pha từ còn có nồng độ 96% xuống các nồng độ còn 48%, 64% và 72%.

Enzyme Pectinex Ultra SP-L Emzyme: Chế phẩm enzyme Pectinex® Ultra SP-L của công ty TNHH thương mại dịch vụ Nam Yang, $T_{opt} =$

50°C, pH = 4,5.

Nước sử dụng theo tiêu chuẩn TCVN-5502-2003 Bộ Khoa học và Công nghệ ban hành năm 2003.

Thiết bị tạo sóng siêu âm Ultrasonic Generator, tầm rung HWD-1P có công suất 600W, tần suất sóng siêu âm 28/40 KHZ. Hệ thống điều khiển kỹ thuật số, quá trình thao tác nhanh, có chức năng cài đặt thời gian, hiển thị dòng điện, điều chỉnh tần suất quét, công suất và bảo vệ quá dòng.

2.2. Quy trình công nghệ

Tiến hành tách lá cây chùm ngây ra khỏi xương, xử lý sơ bộ loại bỏ lá hư, tạp chất, rửa sạch đất cát, vi sinh vật bám trên bề mặt lá bằng nước sạch. Dùng máy xay nguyên liệu nhỏ với kích thước nhỏ hơn 0,5 mm tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình thẩm thấu dung môi vào nguyên liệu dễ dàng hơn, làm tăng khả năng trích ly các chất hòa tan vào dung môi. Tiến hành khảo sát điều kiện trích ly với các loại dung môi: nước, cồn, tỷ lệ cồn: nước (1:1, 2:1, 3:1); nhiệt độ 30 – 70°C, thời gian 30 – 120 phút, tỷ lệ nguyên liệu dung môi 1:5; 1:5,5; 1:6; 1:6,5; 1:7. Sử dụng sóng siêu âm trong suốt quá trình trích ly để tìm ra các yếu tố ảnh hưởng trên. Công suất sóng siêu âm được khảo sát ở các mức $w = 300 \div 500w$, $\Delta w = 50$. Tiến hành lọc và xác định hàm lượng flavonoid để chọn ra được điều kiện trích ly cho hàm lượng thu hồi flavonoid cao nhất.

2.3. Phương pháp phân tích

- Xác định hàm ẩm theo TCVN 7040: 2002. Tiến hành sấy vật liệu bằng thiết bị sấy memmert UNB500 ở 105°C đến khối lượng không đổi.

- Xác định hàm lượng tro theo TCVN 7038 : 2002. Tiến hành nung mẫu trong lò nung memmert, ở nhiệt độ 600°C tới khi mẫu chỉ còn lại tro trắng.

- Xác định hàm lượng protein bằng phương pháp Kjeldahl theo TCVN 7598: 2007. Tiến hành vô cơ hóa mẫu trong tủ hút với H_2SO_4 đậm đặc tới khi dung dịch trong suốt sau đó cất đậm bằng máy cất đậm BEHR S5.

- Xác định hàm lượng chất béo bằng hệ thống chiết soxhlet SER148/3, với dung môi hexan, theo TCVN 8103-2009.

- Xác định hàm lượng đường khử bằng phương pháp Acid Dinitro - Salicylic (DNS) theo TCVN 4295: 2009. Phương pháp này dựa trên cơ sở phản ứng tạo màu giữa đường khử với thuốc thử acid dinitrosalicylic (DNS). Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỉ lệ thuận với nồng độ đường khử trong một phạm vi nhất định. So màu tiến hành ở bước sóng 540nm.

- Hàm lượng flavonoid được xác định dựa theo chất chuẩn rutin bằng phương pháp quang phổ UV-VIS. Sử dụng máy UV-VIS 1800, dải đo 190 nm-900 nm, hãng Shimadzu (Nhật Bản), tiến hành đo ở bước sóng 510 nm. Dựa vào sự tương quan giữa độ hấp thụ của rutin chuẩn + $AlCl_3$ 10% + NaOH 4% + $NaNO_2$ 5% tại bước sóng hấp thụ 510 nm với nồng độ rutin ($\mu g/ml$) tương ứng trong các điều kiện xác định. Xây dựng đường chuẩn rutin $y = f(x)$ với trục tung (y) là mật độ quang, trục hoành (x) là nồng độ rutin ($\mu g/ml$) bằng phương pháp bình phương cực tiểu; Dựa vào đường chuẩn $y = ax+b$, tính hàm lượng flavonoid; Hàm lượng flavonoid trong nguyên liệu được tính theo công thức:

$$F = (X \cdot V \cdot 100 \cdot f_{mẫu}) / m \cdot 106 (\%)$$

Với: m: lượng mẫu đem thí nghiệm (g); V: thể tích định mức dung dịch thí nghiệm; X: nồng độ rutin trong dung dịch mẫu ($\mu g/ml$); $f_{mẫu}$: hệ số pha loãng mẫu

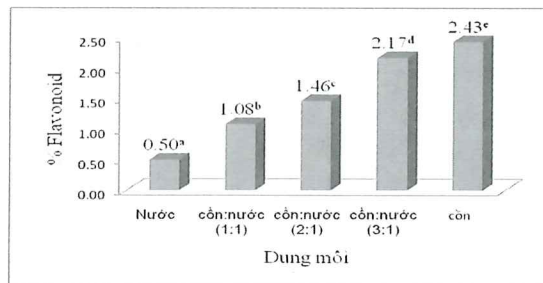
- Số liệu thu được được xử lý bằng chương trình Statgraphics Plus, Microsoft office excel.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Khảo sát chọn dung môi

Tiến hành khảo sát với hai loại dung môi nước và cồn. Do hai dung môi này có tính an toàn cao và cồn thì dễ tách ra trong quá trình sấy cũng như là cô đặc. Khối lượng mẫu 50g; Thời gian trích ly 60 phút; Nhiệt độ trích ly 50°C; các thông số khảo sát (A1: nước; A2: cồn: nước tỷ lệ 1:1; A3: cồn: nước tỷ lệ 2:1; A4: cồn: nước tỷ lệ 3:1 và A5: cồn 96%) với chỉ tiêu theo dõi là hàm lượng flavonoid (%).

Thực nghiệm cho thấy, với các loại dung môi khác nhau và theo các tỉ lệ khác nhau thì

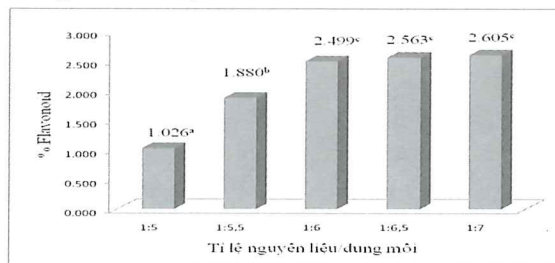


Chú thích: a, b, c, d, e ($p < 0,05$) khác biệt có ý nghĩa thống kê, số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại

Hình 1: Ảnh hưởng của dung môi đến hàm lượng thu hồi flavonoid

hàm lượng flavonoid thu được có sự khác biệt ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%. Theo Hình 1 cho ta thấy dung môi cồn cho hàm lượng flavonoid cao nhất (2,43%) và dung môi nước (0,5%) là thấp nhất. Mặt khác, theo các tỉ lệ giữa hai loại dung môi thì ta nhận thấy khi lượng cồn tăng lên cũng sẽ làm tăng hàm lượng flavonoid thu được, hiện tượng này xảy ra là do flavonoid có khả năng hòa tan tốt trong môi trường cồn [11], vì thế ta sử dụng dung môi là cồn sẽ cho khả năng trích ly cao hơn.

3.2. Ảnh hưởng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi dùng để trích ly flavonoid



Chú thích: a, b, c, ($p < 0,05$) khác biệt có ý nghĩa thống kê

Hình 2: Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đến hàm lượng thu hồi flavonoid

Xác định tỷ lệ nguyên liệu và dung môi thích hợp cho khả năng thu hồi protein và flavonoid cao. Các thông số cố định là loại dung môi sử dụng lấy kết quả thí nghiệm 2 làm cơ sở; khối lượng mẫu 50g; nhiệt độ trích ly 50°C; thời gian trích ly 60 phút. Các thông số khảo sát là Tỉ lệ nguyên liệu: dung môi B1 (1:5); B2 (1:5,5); B3 (1:6); B4 (1:6,5); B5 (1:7). Với chỉ tiêu theo dõi

là hàm lượng flavonoid (%).

Tiến hành trích ly bằng dung môi cồn với các tỷ lệ nguyên liệu và cồn khác nhau (như trên), từ đó xác định được tỷ lệ nguyên liệu: cồn cho hiệu suất thu hồi chất chiết cao.

Thực nghiệm cho thấy, hàm lượng flavonoid thu được ở các tỉ lệ nguyên liệu/dung môi tăng dần theo lượng dung môi, cụ thể như ở tỉ lệ 1:5 đến tỉ lệ 1:6 thì tăng lên, nhưng từ tỉ lệ 1:6 đến 1:7 thì hàm lượng flavonoid thu được khác biệt không có ý nghĩa thống kê (P -value > 0,05). Vì đối với cùng một lượng nguyên liệu, nếu ta tăng lượng dung môi sử dụng thì khả năng trích ly cũng tăng theo. Đó là do sự chênh lệch nồng độ của cấu tử cần trích ly trong lá chùm ngây và trong dung môi sẽ càng lớn. Ở các tỉ lệ nguyên liệu/dung môi thấp hơn thì các tế bào ở dạng ưu trương nhưng lượng dung môi dùng để trích ly ít, chênh lệch nồng độ của cấu tử cần thu hồi với dung môi còn thấp, mặt khác nồng độ của chất chiết có trong nguyên liệu và dung môi dần đạt đến trạng thái cân bằng. Vì vậy, các tế bào bị phá vỡ không triệt để, chất chiết thu hồi ít [5].

Từ đó ta thấy tỉ lệ nguyên liệu/cồn là 1:6 sẽ thích hợp cho trích ly.

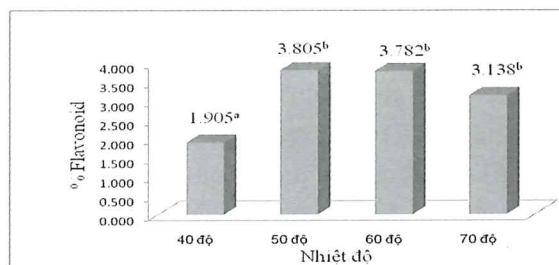
3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ trích ly đến hàm lượng thu hồi flavonoid

Do định hướng sử dụng kết quả nghiên cứu này để sản xuất một số sản phẩm thực phẩm dinh dưỡng nên chỉ tiến hành khảo sát với hai loại dung môi nước và cồn (cồn thực phẩm). Do hai dung môi này có tính an toàn cao và cồn thì dễ tách trong quá trình sấy cũng như cô đặc.

Nhiệt độ có ảnh hưởng nhiều đến khả năng trích ly (Hình 3).

Nhận thấy nhiệt độ càng tăng thì khả năng thu hồi chất chiết càng tăng. Khi nhiệt độ tăng độ nhớt giảm, chuyển động của các phân tử nước tăng. Dựa theo tính tan, pectin tồn tại hai dạng là protopectin không tan và pectin tan. Protopectin là phức chất giữa pectin với các polysaccharide khác như hemicelluloses, cellulose,... làm nên cấu trúc vách tế bào thực vật. Dưới ảnh hưởng của nhiệt độ protopectin không tan sẽ chuyển hóa thành pectin tan [5, 11]. Vì vậy, cồn sẽ thẩm thấu nhanh vào bên trong tế bào lá chùm ngây, làm cho diện tích tiếp xúc giữa tế bào và cồn tăng

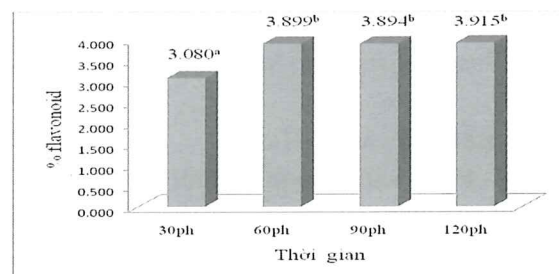
lên. Dẫn đến áp suất nội bào tăng, tế bào bị phá vỡ giải phóng các chất chiết hòa tan và khuếch tán từ lá chùm ngây vào cồn tăng lên [5]. Nhưng việc tăng nhiệt độ cũng sẽ gây tổn thất các cấu tử mất cảm với nhiệt độ trong dịch chiết. Hàm lượng thu hồi flavonoid ở nhiệt độ 50°C là 3,81% không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% so với 3,78% ở 60°C. Ngược lại, hàm lượng thu hồi flavonoid ở 40°C là 1,91% khác biệt ở mức ý nghĩa 5% so với nhiệt độ 50°C và 60°C (Hình 3). Tại nhiệt độ 70°C hàm lượng flavonoid là 3,14% bị giảm vì từ 60°C trở lên flavonoid sẽ kết hợp với các thành phần khác của thực vật nên lượng chất chiết qua lọc bị giảm đi. Từ kết quả trên, chọn nhiệt độ sử dụng sóng siêu âm ở 50°C là cho kết quả tốt nhất.



Chú thích: a, b ($p < 0,05$) khác biệt có ý nghĩa thống kê, số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại

Hình 3: Ảnh hưởng của nhiệt độ sử dụng sóng siêu âm đến hàm lượng thu hồi flavonoid

3.4. Ảnh hưởng của thời gian trích ly đến hàm lượng thu hồi flavonoid



Chú thích: a, b ($p < 0,05$) khác biệt có ý nghĩa thống kê, số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại

Hình 4: Ảnh hưởng của thời gian sử dụng sóng siêu âm đến hàm lượng thu hồi flavonoid

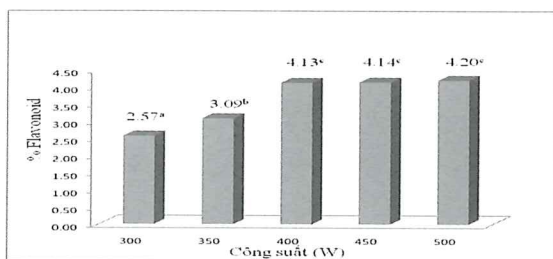
Kết quả hình 4 cho thấy, yếu tố thời gian cũng ảnh hưởng đến hàm lượng thu hồi flavonoid. Tại thời điểm 60 phút có hàm lượng thu hồi flavonoid cao. Vì thời gian 60 phút là thời gian để tế bào lá

chùm ngây hút nước tối đa, dẫn đến sự tiếp xúc giữa cón và tế bào lá chùm ngây là cực đại, nên flavonoid hòa tan vào cón cũng là cực đại. Thời gian trích ly quá dài cho thấy hàm lượng thu hồi flavonoid sẽ tăng không đáng kể. Khi tăng thời gian từ 60 phút lên 120 phút thì hàm lượng thu hồi flavonoid tăng không có sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% (từ 3,899% lên 3,915%) (Hình 4). Điều này có thể do sóng siêu âm có khả năng làm tăng tốc độ phá vỡ thành tế bào và mô thực vật cũng như tốc độ truyền khối, nên thời gian xử lý lá chùm ngây được rút ngắn. Từ kết quả nghiên cứu, chọn thời gian sử dụng sóng siêu âm là 60 phút.

3.5. Ảnh hưởng công suất sóng siêu âm đến hàm lượng thu hồi flavonoid

Xác định công suất sóng siêu âm thích hợp dùng để xử lý nguyên liệu nâng cao hiệu quả trích ly. Thông số cố định là tỷ lệ nguyên liệu với dung môi (kết quả thí nghiệm trước đó-3) với nguyên liệu: 50 g lá chùm ngây, nhiệt độ và thời gian sử dụng sóng siêu âm theo kết quả thí nghiệm 4. Thông số khảo sát: Công suất sóng siêu âm: $W1= 300 \div 500$ w, $\Delta W=50$. Chỉ tiêu theo dõi là hàm lượng thu hồi flavonoid (%)

Khảo sát điều kiện trích ly ở các mức công suất từ 300 đến 500 w ($\Delta w = 50$).



Chú thích: a, b, c ($p < 0,05$) khác biệt có ý nghĩa thống kê, số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại

Hình 5: Ảnh hưởng của công suất sóng siêu âm đến hàm lượng thu hồi flavonoid

Từ kết quả thực nghiệm cho thấy khi tăng công suất từ 300w đến 400w thì hàm lượng flavonoid trích ly ra được cũng tăng dần (2,57%

lên 4,13%). Tuy nhiên, theo kết quả Hình 5 thì không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa thống kê 5% từ công suất 400w đến 500w (4,13% lên 4,20%). Khi tăng công suất của sóng siêu âm quá cao thì hàm lượng flavonoid trong dịch trích ly thay đổi không đáng kể (Hình 5). Điều này có thể được giải thích là do hàm lượng chất chiết trong mẫu là có giới hạn. Ngoài ra, năng lượng sóng siêu âm quá cao, làm tăng cường sự phá hủy và cắt nhỏ thành tế bào của lá chùm ngây, từ đó tạo ra nhiều mảnh vụn nhỏ và cặn lơ lửng bít lỗ các mao quản của lá chùm ngây gây ra sự cản trở và hạn chế quá trình trích ly flavonoid từ lá chùm ngây. Như vậy công suất sóng siêu âm ở 400w thì cho hàm lượng thu hồi flavonoid hiệu quả nhất.

Bảng 1:

Thành phần dinh dưỡng của sản phẩm

Chỉ tiêu	Phương pháp phân tích	Kết quả
Hàm lượng ẩm	TCVN 7040 : 2002	81,9%
Hàm lượng tro	TCVN 7038 : 2002	1,96%
Hàm lượng protein	TCVN 7598 : 2007	2,77%
Hàm lượng đường khử	TCVN 4295: 2009	4,58%

6. Kết luận

Kết quả của nghiên cứu này đã tìm ra được một số yếu tố cũng như ảnh hưởng của sóng siêu âm trong quá trình trích ly lá chùm ngây. Qua đó cung cấp các thông số kỹ thuật cho việc xây dựng hoàn thiện quy trình trích ly flavonoid từ lá chùm ngây với sự hỗ trợ của sóng siêu âm. Từ những thực nghiệm đã cho thấy được khi trích ly có bổ sung thêm enzyme thủy phân pectinase với nồng độ $C=0,1\%$ nhằm phá vỡ cấu trúc tế bào, tạo điều kiện cho dung môi cón thẩm thấu và rút trích các chất trong lá chùm ngây tốt hơn, nhờ đó mà hàm lượng thu hồi flavonoid đạt 3,65%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Anwar F., Ashraf M., Bhanger M.I., 2005. Interprovenance variation in the composition of *Moringa oleifera* oilseeds from Pakistan. *Jam Oil Chem Soc* 82, pp.45-51.
- [2] Anwar F., Bhanger M.I., 2003. Analytical characterization of *Moringa oleifera* seed oil grown in temperate regions of Pakistan. *J Agric Food Chem* 51, pp.6558-6563.
- [3] Anwar F., Rashid U., 2007. Physico-Chemical Characteristics of *Moringa oleifera* seeds and seed oil from a wild provenance of Pakistan. *Pak. J. Bot* 39, pp.1443-1453.
- [4] Anwar F., Sajid Latif, Muhammad Ashraf and Anwarul Hassan Gilani, 2007. A Food Plant with Multiple Medicinal Uses. *Phytother Res* 21, pp.17-25.
- [5] Bosma R., Spronsen W.A.V., Tramper J., Wijffels R.H. Ultrasound, a new separation technique to harvest microalgae, *Journal of Applied Phycology* 15, pp.143-153.
- [6] D'souza J., Kulkarni A.R., 1993. Comparative studies on nutritive values of tender foliage of seedlings and mature plants of *Moringa oleifera* Lam. *J Econ Taxon Bot* 17, pp.479-485.
- [7] Nouman W., Siddiqui M. T., Basra S. M. A., 2012. *Moringa oleifera* leaf extract: An innovative priming tool for rangeland grasses. *Turk J Agric* 36, pp.65-75.
- [8] Khawaja Tahir Mahmood et al., 2010. *Moringa oleifera*: a natural gift-A review, *Journal Pharmaceutical Sciences and research*. Vol 2, pp.775-781.
- [9] Govardhan Singh R.S., Pradeep Negi S., Radha C., 2013. Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleifera* seed flour. *Journal of Functional Food* 5, pp.1883-1891.
- [10] Munyanziza, Sarwatt E., 2003. The evaluation of *Moringa oleifera* for food security and environmental rehabilitation in Tanzanian rural areas, *J.Trop For. Sci* 15, pp.450-456.
- [11] Paul C.W., Didia B.C., 2012. The Effect of Methanolic Extract of *Moringa oleifera* Lam Roots on the Histology of Kidney and Liver of Guinea Pigs. *Asian Journal of Medical Sciences* 4, pp.55-60.