



Efecto de *Moringa oleifera* en pruebas de fermentación ruminal *in vitro* y su repercusión en gases de efecto invernadero



Jorge Andrés Gómez-Chávez ^a

Yamicela Castillo-Castillo ^a

Francisco Castillo-Rangel ^a

Joel Domínguez-Viveros ^a

Perla Lucía Ordóñez-Baquera ^{a*}

^a Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de Zootecnia y Ecología. Periférico R. Almada Km 1 Chihuahua, Chih., México.

* Autor de correspondencia: plordonez@uach.mx

Resumen:

El ambiente ruminal se ha manipulado biotecnológicamente para mejorar la productividad animal y recientemente se buscan alternativas naturales, saludables y ecológicas para este fin. Se ha probado *Moringa oleifera* como alimento para el ganado porque sus hojas son ricas en minerales, proteína y metabolitos secundarios. El objetivo fue evaluar los cambios en la actividad ruminal por la presencia de *M. oleifera*. Se probaron tres tratamientos; TT (testigo 100% alfalfa), MB (15% Moringa-85% alfalfa) y MA (30% Moringa-70% alfalfa). El experimento se realizó *in vitro* con líquido ruminal ovino. Para pH y nitrógeno amoniacal (N-NH₃) no se observaron diferencias ($P>0.05$). La digestibilidad de la materia seca fue diferente ($P<0.05$) entre tratamientos. La producción de gas mostró diferencias ($P<0.05$) entre tratamientos. Para la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) se observaron diferencias ($P<0.05$). El CO₂ y CH₄ fueron diferentes entre tratamientos ($P<0.05$), siendo MB el menor para ambas variables. Se concluye que adicionar moringa a una ración de alfalfa no tiene efecto sobre el pH y N-NH₃, sin embargo, aumenta la digestibilidad de la materia seca, pero disminuye la concentración de AGV y la digestibilidad de fibras. Además, incluir

15 % de moringa a una ración de alfalfa puede reducir la producción de gases de efecto invernadero. Se recomienda seguir evaluando esta alternativa para la alimentación animal.

Palabras clave: *Moringa oleifera*, Fermentación ruminal, *Ovis aries*, Gases efecto invernadero.

Recibido: 23/05/2023

Aceptado: 04/11/2024

Introducción

La demanda global por productos de origen animal se ha incrementado en los últimos años⁽¹⁾. Debido al constante aumento de la población se han buscado alternativas en las que se produzca mayor cantidad de alimento de mejor calidad proteica y con mayor eficiencia. En la ganadería extensiva se usan los pastos nativos como principal fuente de alimento y durante el periodo de sequía es necesario usar suplementos alimenticios debido a que la calidad de estos pastos disminuye, lo que incrementa los costos de alimentación. Por ello, los ganaderos buscan fuentes alimenticias que sean accesibles tanto por su disponibilidad como por su bajo costo y que no impliquen competencia con el humano⁽²⁾.

Por otro lado, los rumiantes producen gases de efecto invernadero como el metano (CH₄) que es emitido a la atmósfera^(1,3). El uso de arbustivas y arbóreas en la alimentación animal puede ser una alternativa para incrementar la digestibilidad, mejorar el valor nutritivo de la dieta y buscar reducir la producción de metano⁽⁴⁾. Existen investigaciones enfocadas en probar que el uso de hojas de diversas plantas, así como el follaje de algunos árboles pueden servir como alimento, con nutrientes adecuados para lograr una producción económica y ecológicamente viable, que reduzca la producción de gases de efecto invernadero⁽¹⁾. El forraje de moringa (*Moringa oleifera*) es una de estas plantas⁽²⁾, ya que se caracteriza por tener facilidad de propagación y por la baja demanda de nutrientes y agua en su crecimiento⁽⁵⁾. Se ha demostrado que puede ser una buena fuente de proteína, lo que puede representar una alternativa para sustituir insumos proteicos convencionales en rumiantes⁽⁶⁾.

Moringa oleifera es un árbol delgado, perene, caducifolio, originario de la India, que se ha extendido a otras partes del mundo. A nivel mundial, es uno de los árboles de más rápido crecimiento que presenta alto rendimiento de biomasa, alto contenido de proteína bruta (>25%) y un balance de otros nutrientes en sus hojas⁽⁷⁾. También se considera uno de los árboles más útiles en el mundo, ya que todas sus partes pueden ser usadas como alimento, como medicamento o para propósitos industriales^(8,9,10). Las diferentes partes de *M. oleifera*

contienen minerales importantes, además de ser una buena fuente de proteína, vitaminas y aminoácidos. También se ha reportado que tiene propiedades agronómicas benéficas como lo es la tolerancia a la sequía, la alta producción de biomasa y el alto contenido de proteína cruda, lo que la vuelve competitiva con forrajes de alta calidad^(8,11) además de que en sus hojas contiene muchos compuestos activos como flavonoides, saponinas, taninos, alcaloides⁽⁸⁾. Se ha usado *M. oleifera* para alimentación de ganado, ya que las hojas son ricas en minerales esenciales para la ganancia de peso y para la producción de leche, además de ser una excelente fuente de proteína que puede mejorar la síntesis de proteína microbiana en el rumen⁽¹²⁾. También se analizó su efecto nutricional en ovejas, donde tuvieron una mejora en la producción y calidad de la leche⁽¹²⁾. Sin embargo, no se han reportado estudios sobre el uso de moringa cultivada en el estado de Chihuahua y la repercusión de su uso como alimento sobre la producción animal. Por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de hojas de *Moringa oleifera* cultivada en la región centro del estado de Chihuahua sobre diferentes parámetros de fermentación ruminal *in vitro*, para tener un primer acercamiento de la viabilidad del uso de esta arbustiva como alimento para ganado en esta región.

Material y métodos

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH), ubicado en el Km 1 del Periférico Francisco R. Almada de la ciudad de Chihuahua, Chihuahua, México (28°35'10.9" N; 106°6'26.6" O; altitud 1,440 msnm).

Suplemento de moringa

Se obtuvo a partir de una plantación de árboles de *M. oleifera* ubicada en la región centro del estado de Chihuahua, México. Se colectaron las hojas de la planta, se secaron a la sombra y posteriormente se maceraron para obtener alimento en polvo⁽¹³⁾.

Caracterización del perfil bromatológico

Se realizó la caracterización bromatológica de las hojas de *M. oleifera* y de la alfalfa (tratamiento testigo) por medio de un análisis proximal. Se midió fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) con el método descrito por Van Soest *et al*⁽¹⁴⁾ adaptado para el equipo "Ankom 200 Fiber Analyzer" (Ankom Technology, Fairport NY). La proteína cruda (PC), materia seca (MS), ceniza y EE se determinaron de acuerdo a los métodos estándares de la "Association of Official Analytical Chemistry"⁽¹⁵⁾. Los minerales se analizaron por absorción atómica y el perfil de aminoácidos por cromatografía.

Animales y alimentación

El líquido ruminal se obtuvo de tres ovinos fistulados en rumen, de raza Pelibuey (45 ± 3 kg). Previo al proceso de fistulación, los animales se vacunaron (Lapibac; Lapisa®) y desparasitaron (Levax ADE; BioZoo®). Posteriormente se adaptaron a la dieta (forraje de alfalfa) por 15 días. Se ofreció el alimento dos veces al día (0800 y 1700 h). Una vez terminado el periodo de adaptación los animales se dietaron durante 24 h y posteriormente se tomaron las muestras de líquido ruminal de los tres animales directamente de la cánula para realizar las pruebas de fermentación *in vitro*.

Tratamientos y diseño experimental

Una vez caracterizado el perfil bromatológico de *M. oleifera* (Cuadro 1), se establecieron tres tratamientos, buscando que tuvieran valores isoprotéicos; TT (Testigo: 100% alfalfa), MB (Moringa bajo: 15% moringa y 85% alfalfa) y MA (Moringa alto: 30% moringa y 70% alfalfa). En la prueba de fermentación *in vitro*, se utilizó un diseño completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo. Se tuvieron tres repeticiones para cada tiempo de fermentación (6, 12, 24 y 48 h). El análisis de producción de gas se realizó de acuerdo a la técnica de Theodorou⁽¹⁶⁾, para ello se pesaron directamente 2 g del sustrato en tubos de vidrio de 100 ml con tapón de butilo y agrafe. Para el análisis del resto de las variables estudiadas se pesaron 0.5 g del sustrato en bolsas FN57 (Ankom™) con un tamaño de poro de 25 μ m y posteriormente cada bolsa se selló y se colocó en frascos de 250 ml. El inóculo microbiano ruminal se preparó utilizando dos partes de una solución buffer⁽¹⁷⁾ y una parte de líquido ruminal. El líquido ruminal se recolectó de los tres ovinos Pelibuey fistulados previamente, directamente de la cánula antes de la alimentación. El inóculo se filtró con muselina y se dispensó en condiciones de anaerobiosis con CO₂ (15 ml para producción de gas y 40 ml para el resto de parámetros); se selló inmediatamente y se colocó en una incubadora con agitación a 120 rpm y temperatura controlada a 39 °C. Se prepararon tres repeticiones sin sustrato como control para la producción de gas.

La producción total de gas se midió con un transductor de presión FESTO® (SIEMENS). El pH se midió con un potenciómetro electrónico inmediatamente después de la toma de muestras. La digestibilidad de la FDN y FDA se evaluó utilizando el método IVTD - Daisy (*in vitro* True Digestibility Method)⁽¹⁸⁾. La determinación de FDN y FDA se llevó a cabo al final de cada tiempo de incubación, el procesamiento se realizó en el analizador de fibra Ankom® 2000 de acuerdo con los métodos descritos por Van Soest *et al*⁽¹⁴⁾. El cálculo de N-NH₃ se determinó por espectrofotometría⁽¹⁹⁾. La determinación de ácidos grasos volátiles (AGV) se realizó por cromatografía de gases con detección de ionización de flama. Se usó un cromatógrafo de gases Claurus 400® (Perkin Elmer) adaptado con una columna Varian capilar CP-wax58 (FFAP) CB (15 m \times 0.53 mm, 0.5 μ m)⁽²⁰⁾. La determinación de CH₄ y

CO₂ se calculó a partir de las concentraciones de AGV mediante el uso del método de ecuaciones propuesto por Wolin⁽²¹⁾.

Análisis estadísticos

Los datos se analizaron con un diseño completamente aleatorizado mediante el procedimiento GLM (SAS ver. 9.4), para las variables pH y PG se consideraron medidas repetidas en el tiempo y el análisis se realizó mediante el Proc MIXED de SAS versión 9.4⁽²²⁾.

Resultados y discusión

Análisis bromatológico del suplemento de Moringa

Los resultados del análisis bromatológico que se realizó al suplemento de moringa se describen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Análisis bromatológico del suplemento de *Moringa oleifera*

Variable	%
Materia seca	93.87
Ceniza	15.68
Extracto etéreo	5.99
FDA	14.85
FDN	26.42
Proteína cruda	16.97
Ca	3.23
P	0.27
Mg	0.8
K	1.35
Mn, ppm	120.4
Cu, ppm	18.64
Zn, ppm	20.63

Los valores obtenidos varían respecto a lo reportado, ya que la PC fue menor y el contenido de EE fue mayor (Cuadro 1), con respecto a lo reportado en otros estudios⁽²³⁻²⁷⁾. El contenido de PC tuvo un valor aceptable (16.97 %) para su inclusión en la dieta de rumiantes en diferentes etapas de alimentación (NRC), pero es menor con respecto a la alfalfa⁽²⁸⁾, que es uno de los principales forrajes henificados utilizados en dietas de ganado lechero. Sin embargo, en el norte de México es común el uso de heno de avena en la alimentación de ganado de carne, lo cual sugiere que la moringa puede representar una alternativa al uso del heno de avena, que presenta un valor de PC inferior⁽²⁸⁾. El contenido de ceniza fue mayor (15.68 %) a lo reportado en otros estudios^(8,11,23). Esto sugiere que en las hojas secas de

moringa se almacenan una cantidad considerable de ellos. El calcio, magnesio, cobre y potasio tuvieron valores mayores comparados con lo reportado en la literatura^(25,27,29). El valor del calcio, fue mayor incluso a lo reportado para el heno de avena y alfalfa⁽³⁰⁾; esto le da un valor importante a *M. oleifera* ya que este mineral es de gran importancia para la regulación de diferentes procesos⁽³¹⁾, aspectos productivos y para el mantenimiento de la estructura ósea y dental⁽²⁹⁾.

A continuación, se presenta el perfil de aminoácidos encontrado en el suplemento de moringa (Cuadro 2).

Cuadro 2: Perfil del contenido de aminoácidos del suplemento de *Moringa oleifera*

Aminoácido	g/100 g
Alanina	0.87
Glicina	0.63
Valina	0.53
Leucina	0.56
Isoleucina	0.52
Treonina	0.54
Serina	0.76
Prolina	0.69
Aspartato	1.93
Metionina	0.11
Glutamato	6.05
Fenilalanina	0.75
Lisina	0.43
Histidina	0.53
Triptofano	0.27
Cisteína	0.04

El glutamato, aspartato, alanina, leucina y serina, tuvieron una concentración mayor a lo reportado⁽³²⁾. Por su parte, el contenido de alanina fue similar y de leucina fue menor con respecto a lo encontrado en la literatura⁽³²⁾. Sin embargo, los datos reportados otros estudios^(1,5,8,25) son inconsistentes. Todos los valores de los aminoácidos están por debajo de lo reportado por estos autores a excepción del glutamato y el aspartato; esto pudo deberse a que la moringa analizada por ellos se cultivó en condiciones de humedad, altura y temperatura muy diferentes a las que se presentan en la zona de cultivo de *M. oleifera* utilizada en este estudio, de tal manera que el comportamiento bioquímico de la planta pudo haber generado concentraciones distintas de estos metabolitos. Si bien estos aminoácidos, a excepción de la leucina, son no esenciales, sí representan una buena fuente de nitrógeno para el metabolismo microbiano y, por lo tanto, para la síntesis de proteína microbiana⁽³³⁾.

Composición nutricional de tratamientos

La composición nutricional de los tres tratamientos usados en la fermentación *in vitro* se presenta en el Cuadro 3.

Cuadro 3: Composición de las dietas usadas en las pruebas de fermentación *in vitro*

Variable (%)	TT	MB	MA
Materia seca	89.4	90.1	90.7
Ceniza	11	11.7	12.4
Extracto etéreo	2.08	2.7	3.3
FDA	29	26.9	24.8
FDN	36.1	34.6	33.2
Proteína cruda	21.2	20.6	19.9
Ca	1.4	1.7	1.9
P	0.26	0.3	0.3
Mg	0.32	0.4	0.5
K	3.03	2.8	2.5

TT= tratamiento testigo (100% alfalfa) MB= tratamiento moringa bajo (15% moringa 85% alfalfa) MA= tratamiento moringa alto (30% moringa 70% alfalfa).

Fermentación ruminal *in vitro*

Se realizó con los tres tratamientos antes descritos. Los resultados de las variables evaluadas a partir de la fermentación ruminal *in vitro* se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4: Variables evaluadas en las pruebas de fermentación *in vitro*

Variable	TT	MB	MA	Valor de P
pH	6.74 ^a	6.86 ^a	6.76 ^a	≥ 0.05
Digestibilidad de la MS, %	63.88 ^a	66.65 ^{ab}	67.87 ^b	<0.05
FDN, %	24.64 ^a	30.96 ^{ab}	32.09 ^b	<0.01
FDA, %	17.80 ^a	22.53 ^{ab}	23.54 ^b	<0.01
PG	49.06 ^a	51.18 ^{ab}	55.93 ^b	<0.05
Ácido acético, mmol/L	63.9 ^a	42.3 ^b	31.2 ^c	<0.05
Ácido propiónico, mmol/L	30.6 ^a	21.0 ^b	11.1 ^c	<0.05
Ácido butírico, mmol/L	9.3 ^a	4.6 ^b	4.2 ^b	<0.05
TAGV, mmol/L	103.9 ^a	67.9 ^b	46.5 ^c	<0.05
Producción de CO ₂ , % molar	51.7 ^a	48.5 ^b	51.9 ^a	<0.05
Producción de CH ₄ , % molar	28.6 ^a	26.0 ^b	32.3 ^c	<0.05
NH ₃ , mmol/ml	14.6 ^a	14.9 ^a	15.1 ^a	>0.05

TT= tratamiento testigo (100% alfalfa) MB= tratamiento moringa bajo (15% moringa 85% alfalfa) MA= tratamiento moringa alto (30% moringa 70% alfalfa).

Para pH no se observaron diferencias entre tratamientos, tiempo o su interacción ($P \geq 0.05$; Cuadro 4). Esto coincide con lo previamente reportado^(34,35,36) donde evaluaron el efecto de extractos de hojas de moringa en diferentes cinéticas de fermentación y no observaron diferencias entre tratamientos. Estos resultados garantizan la viabilidad de la microbiota ruminal⁽³⁷⁾. Por otro lado, para digestibilidad de la materia seca (MS) se observaron diferencias entre tratamientos ($P < 0.05$), la cual fue mayor para el tratamiento MA (30 % moringa). Esto difiere a lo reportado por otros investigadores⁽³⁸⁾ quienes encontraron una disminución en la digestibilidad conforme se aumenta la concentración de moringa en las raciones de alimentos, sin embargo, coincide con Morsy *et al*⁽⁶⁾ quienes observaron que, al aumentar la proporción del extracto de moringa, la digestibilidad aumenta. Este incremento en digestibilidad está relacionado a los cambios en la cantidad de FDN y FDA, los cuales disminuyeron a medida que incrementó el nivel de moringa en la dieta (Cuadro 3), permitiendo observar el impacto que tiene la adición de este ingrediente sobre una dieta integral. Esta diferencia en la digestibilidad de la materia seca puede estar relacionado con diferencias en la composición de las comunidades bacterianas⁽⁶⁾ que pudieran haber sido impactadas por la presencia e incremento de moringa en la dieta. La producción de gas (PG) mostró diferencias entre tratamientos y fue mayor para el tratamiento MA ($P < 0.05$; Cuadro 4); sin embargo, este incremento no tuvo el impacto deseado sobre los productos terminales de la fermentación, en donde el total de ácidos grasos volátiles (TAGV) fue menor para el tratamiento MA (Figura 1). Esto se relaciona directamente a la producción de CO₂ (Figura 2) que mostró el mismo comportamiento que el TAGV, disminuyendo a medida que se incrementó el nivel de moringa en la dieta ($P < 0.05$). Por su parte, la producción de metano (CH₄) no mostró el mismo comportamiento; se puede observar que el tratamiento MB fue menor que los otros tratamientos ($P < 0.05$, Figura 3). Finalmente, para NH₃ no se observaron diferencias entre tratamientos, tiempo o su interacción ($P > 0.05$; Cuadro 4).

Figura 1. Producción total de ácidos grasos volátiles

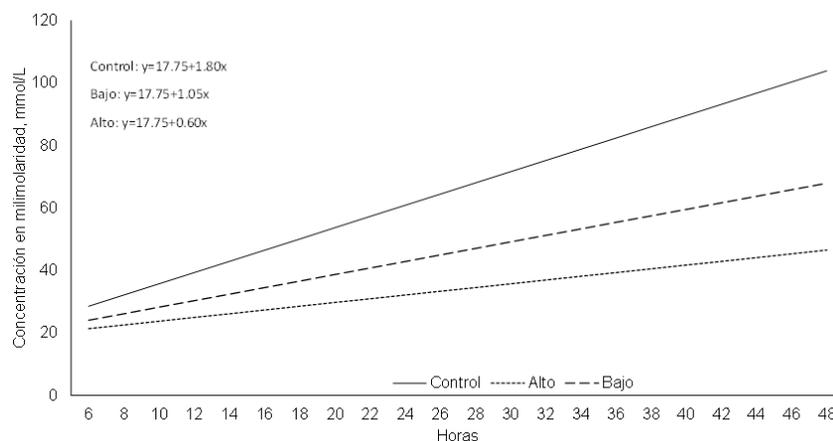
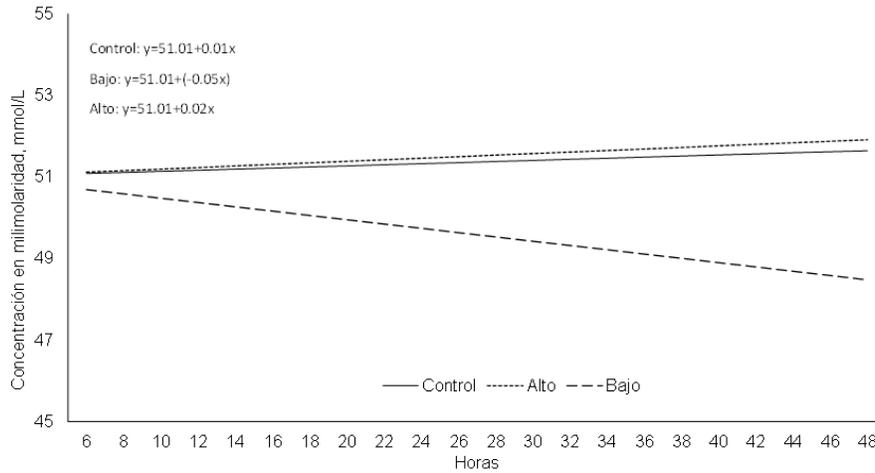
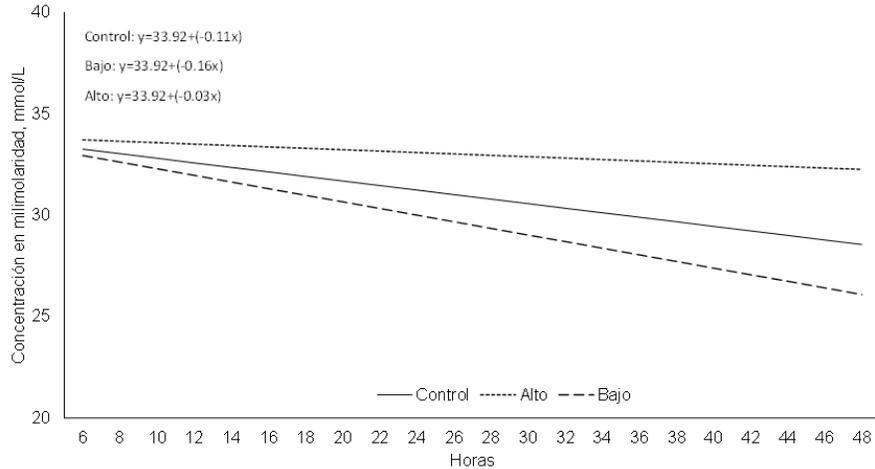


Figura 2: Producción de CO₂**Figura 3: Producción de CH₄**

Las emisiones de CO₂ y CH₄ durante la fermentación ruminal causan una pérdida de energía de entre 2 y 12 %⁽³⁶⁾. La reducción de metano por presencia de *Moringa oleifera* también se ha reportado en otros estudios^(24,35,39). Resulta interesante notar también que, a niveles más altos de moringa, las concentraciones de metano aumentan. Está bien documentado que los metabolitos secundarios de algunas especies de plantas pueden mitigar la producción de CH₄ en la fermentación ruminal y *Moringa oleifera* es rica en metabolitos secundarios como taninos, saponinas y otros compuestos fenólicos que tiene propiedades antimicrobianas y antiprotozoarias que, en consecuencia, podrían estar modificando la composición de la microbiota y con ello la producción de CH₄⁽⁶⁾.

También se calculó el porcentaje molar de las concentraciones milimolares de los AGV para los tres tratamientos (Cuadro 5). El patrón de fermentación de las tres dietas fue principalmente acético, ya que este ácido fue el que se encontró en mayor proporción. Esto

coincide con lo reportado en la literatura donde se menciona que, en dietas a base de forrajes, la concentración de ácido acético suele estar entre el 60 y el 75 %⁽⁴⁰⁾. En cuanto al ácido propiónico, la literatura indica que su proporción en este tipo de dietas varía entre el 15 % y el 19 %⁽⁴⁰⁾. Sin embargo, en este experimento se obtuvo una proporción mayor, siendo la más baja de 23.82 % en el tratamiento MA y la más alta de 30.93 % en MB. La proporción de ácido butírico también coincide con lo reportado en la literatura⁽⁴⁰⁾, aunque se encuentra en los niveles más bajos del rango esperado, que varía entre el 8 y el 16 %.

Cuadro 5: Comparativo de la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) en mmol/L y su conversión a porcentaje molar

	TT		MB		MA	
	mmol/L	%	mmol/L	%	mmol/L	%
Total AGV	103.9	100	67.9	100	46.6	100
Ácido acético	63.9	61.5	42.3	62.3	31.2	66.95
Ácido propiónico	30.6	29.45	21	30.93	11.1	23.82
Ácido butírico	9.3	8.95	4.6	6.77	4.2	9.01

TT= tratamiento testigo (100% alfalfa) MB= tratamiento moringa bajo (15% moringa 85% alfalfa) MA= tratamiento moringa alto (30% moringa 70% alfalfa).

Conclusiones e implicaciones

Casi todos los parámetros de fermentación se vieron afectados por la presencia de *Moringa oleifera*, a excepción de pH y N-NH₃. Si bien, las concentraciones obtenidas de FDN, FDA y TAGV, no fueron las esperadas, se encuentran en proporciones aceptables para alimento de rumiantes. Sin embargo, algunas de las variables tuvieron comportamientos deseables, como lo es digestibilidad de la materia seca, producción de gas, dióxido de carbono y metano. Cabe recalcar que tanto el CO₂ como el CH₄ tuvieron una disminución en el tratamiento de moringa al 15 % (MB) que pudo deberse a la presencia de los metabolitos secundarios propios de esta planta que, a su vez, afectan a la población de protozoarios y de microorganismos metanogénicos. De forma similar, al aumentar la cantidad de moringa al 30 % también se pueden estar aumentando los factores antinutricionales propios de *M. oleifera*, mismos que pueden afectar la microbiota ruminal. Debido a lo anterior, se propone realizar análisis de la población ruminal, para identificar a los microorganismos presentes, así como las rutas metabólicas activas para buscar su relación con estos resultados.

Agradecimientos

A CONAHCyT por los recursos otorgados para la realización de esta investigación como parte del proyecto “Cambios en el metatranscriptoma ruminal por el uso de *Moringa oleifera* como nueva alternativa natural en la suplementación animal”, con clave 287765, aprobado

en la convocatoria Ciencia Básica-2016-01. A la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua por facilitar las instalaciones para llevar a cabo el proyecto de investigación. A la MC Nohemí Gabriela Cortés López por el apoyo técnico brindado durante el desarrollo experimental.

Conflictos de interés

Todos los autores declaran que no existen conflictos de interés de ninguna índole en la publicación del presente documento.

Literatura citada:

1. Su B, Chen X. Current status and potential of *Moringa oleifera* leaf as an alternative protein source for animal feeds. *Front Vet Sci* 2020;7:53 <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00053>.
2. Quintanilla-Medina J, Joaquín-Cancino S, Martínez-González J, Limas-Martínez A, López-Aguirre D, Estrada-Drouaillet B, Hernández-Meléndez J. Usos de *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) en la alimentación de rumiantes. *Agroproductividad* 2018;11:89-93.
3. Grossi G, Goglio P, Vitali A, Williams A. Livestock and climate change: impact of livestock on climate and mitigation strategies, *Anim Front* 2019;9(1):69–76 <https://doi.org/10.1093/af/vfy034>.
4. Avila-Serrano NY, López-Garrido SJ, Galicia-Jiménez MM, González-Crespo GJ, Camacho-Escobar MA. Efecto de la incorporación de arbóreas a dietas de *Cynodon nlemfuensis* durante la fermentación ruminal *in vitro*. *Terra Latinoam* 2020;38(2):403-412.
5. Sánchez-Machado DI, Núñez-Gastélum JA, Reyes-Moreno C, Ramírez-Wong B, López-Cervantes J. Nutritional quality of edible parts of *Moringa oleifera*. *Food Anal Methods* 2010;3:175–180. <https://doi.org/10.1007/s12161-009-9106-z>.
6. Morsy TA, Gouda GA, Kholif AE. *In vitro* fermentation and production of methane and carbon dioxide from rations containing *Moringa oleifera* leave silage as a replacement of soybean meal: *in vitro* assessment. *Environ Sci Pollut Res* 2022;29:69743–69752. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20622-2>.
7. Babiker EE, Juhaimi FAL, Ghafoor K, Abdoun KA. Comparative study on feeding value of *Moringa* leaves as a partial replacement for alfalfa hay in ewes and goats. *Livest Sci* 2017;195:21-26.

8. Kashyap P, Kumar S, Riar CS, Jindal N, Baniwal P, Guiné RPF, Correia PMR, Mehra R, Kumar H. Recent advances in drumstick (*Moringa oleifera*) leaves bioactive compounds: composition, health benefits, bioaccessibility, and dietary applications. *Antioxidants* 2022;11-402. <https://doi.org/10.3390/antiox11020402>.
9. Premi M, Sharma HK. Effect of extraction conditions on the bioactive compounds from *Moringa oleifera* (PKM 1) seeds and their identification using LC–MS. *Food Meas* 2017;11:213–225. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9388-y>.
10. Teixeira EMB, Barbieri-Carvalho MR, Neves VA, Silva MA, Arantes-Pereira L. Chemical characteristics and fractionation of proteins from *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Food Chem* 2014;147:51-54.
11. Seradj AR, Morazan H, Fondevila M, Liang JB, De la Fuente G, Balcells J. *In vitro* and *in situ* degradation characteristics and rumen fermentation products of *Moringa oleifera* harvested at three different ages. *Trop Anim Sci J* 2019;42(1):39-45. <https://doi.org/10.5398/tasj.2019.42.1.39>.
12. Babiker EE, Juhaimi FAL, Ghafoor K, Mohamed HE, Abdoun KA. Effect of partial replacement of alfalfa hay with *Moringa* species leaves on milk yield and composition of Najdi ewes. *Trop Anim Health Prod* 2016;48:1427-1433.
13. Khan I, Zaneb H, Masood S, Yousaf MS, Rehman HF, Rehman H. Effect of *Moringa oleifera* leaf powder supplementation on growth performance and intestinal morphology in broiler chickens. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2017;101(1):114-121. doi: 10.1111/jpn.12634.
14. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 1991;74:3583–3597.
15. AOAC. Official methods of analysis. 16th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists. 1997.
16. Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Tech* 1994;48:185-197.
17. Menke KH, Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. *Anim Res Dev* 1988;28:7–55.

18. Ankom Technologies. *In Vitro* True Digestibility using the ANKOM DAISYII Incubator. 2023. https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/Method_3_InVitro_D200_D200I.pdf
19. Broderick GA, Kang JH. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluids and *in vitro* media. *J Dairy Sci* 1980;63:64-75.
20. Galyean ML. Laboratory procedures in animal nutrition research. Department on Animal and Food Sciences. Texas Tech University, Lubbock, TX, USA. 1980:161-162.
21. Wolin M J. A theoretical rumen fermentation balance. *J Dairy Sci* 1960;42:1452-1459.
22. SAS. SAS/STAT User's Guide: Statics (version 9.1). Cary, North Carolina, USA. 2004.
23. Sultana S. Nutritional and functional properties of *Moringa oleifera*. *Metabol Open* 2020;9(8):100061. doi: 10.1016/j.metop.2020.100061.
24. Soliva C, Kreuzer M, Foidl N, Foidl G, Machmueller A, Hess H. Feeding value of whole and extracted *Moringa olifera* leaves for ruminants and their effects on ruminal fermentation *in vitro*. *Anim Feed Sci Tech* 2005;118:47-62 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.10.005>.
25. Dhakar RC, Maurya S, Pooniya B, Bairwa N, Gupta M, Sanwarmal. Moringa: The herbal gold to combat malnutrition. *Chron Young Sci* 2011;2(3):119-125.
26. Kholif AE, Gouda GA, Morsy TA, Salem AZM, Lopez S, Kholif AM. *Moringa oleifera* leaf meal as a protein source in lactating goat's diets: Feed intake, digestibility, ruminal fermentation, milk yield and composition, and its fatty acids profile *Small Rumin Res* 2015;129:129-137. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.05.007>.
27. Olusanya RN, Kolanisi U, Van-Onselen A, Ngobese NZ, Siwela M. Nutritional composition and consumer acceptability of *Moringa oleifera* leaf powder (MOLP)-supplemented mahewu. *S Afr J Bot* 2020;129:175-180. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.04.022>.
28. Luo C, Donghai W, Na L, Haiqing L, Gaofei L, Zhijun C, *et al.* Analysis of chemical composition, amino acid content, and rumen degradation characteristics of six organic feeds. *Animals* 2022;12(6):682. <https://doi.org/10.3390/ani12060682>.
29. Okiki PA, Osibote IA, Balogun O, Oyinloye BE, Idris OO, Adelegan O, Olagbemide PT. Evaluation of proximate, minerals, vitamins and phytochemical composition of *Moringa oleifera* Lam. cultivated in Ado Ekiti, Nigeria. *Adv Biol Res* 2015;9(6):436-443.

30. Cofré P. Suplementación de calcio y fósforo a vacas en lactancia. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. 1986. <https://biblioteca.inia.cl/items/a7de0e93-9c21-457a-b356-e23d58425163>.
31. Wild KJ, Siegert W, Windisch WM, Südekum KH, Rodehutschord M. Meta-analysis-based estimates of efficiency of calcium utilization by ruminants. *Animal* 2021;15(8): 100315. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100315>.
32. Velázquez-Zavala M, Peon-Escalante IE, Zepeda-Bautista R, Jimenez-Arellanes MA. Moringa (*Moringa oleífera* Lam.): potential uses in agriculture, industry and medicine. *Rev Chapingo Ser Hort* 2016;22(2):95-116.
33. Hassan FU, Guo Y, Li M, Tang Z, Peng L, Liang X, Yang C. Effect of methionine supplementation on rumen microbiota, fermentation, and amino acid metabolism in *in vitro* cultures containing nitrate. *Microorganisms*. 2021;9(8):1717. doi: 10.3390/microorganisms9081717. PMID: 34442796; PMCID: PMC8397988.
34. Kholif AE, Gouda GA, Morsy TA, Matloup OH, Sallam SM, Patra AK. Associative effects between *Chlorella vulgaris* microalgae and *Moringa oleífera* leaf silage used at different levels decreased in vitro ruminal greenhouse gas production and altered ruminal fermentation. *Environ Sci Pollut Res* 2023;30:6001–6020. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22559-y>.
35. Parra-Garcia A, Elghandour MMY, Greiner R, Barbabosa-Pliego A, Camacho-Diaz LM, Salem AZM. Effects of *Moringa oleífera* leaf extract on ruminal methane and carbon dioxide production and fermentation kinetics in a steer model. *Environ Sci Pollut Res Int* 2019;26(15):15333-15344. doi: 10.1007/s11356-019-04963-z.
36. Pedraza-Hernández J, Elghandour MMY, Khusro A, Camacho-Diaz LM, Vallejo LH, Barbabosa-Pliego A, Salem AZM. Mitigation of ruminal biogases production from goats using *Moringa oleífera* extract and live yeast culture for a cleaner agriculture environment. *J Clean Prod* 2019;234:779-786. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.06.126>.
37. Cerrato M, Calsamiglia S, Ferret A. Efectos del tiempo a pH subóptimos y el número de ciclos sobre la fermentación microbiana ruminal en cultivo continuo. *ITEA* 2005;26(2):578-580.
38. Quintanilla-Medina JJ, López-Aguirre D, Martínez-González JC, Limas-Martínez AG, Lucero-Magaña FA, Ruíz-García S, Hernández-Meléndez J. Digestibilidad *in vitro* de dietas con diferentes niveles de inclusión de moringa (*Moringa oleífera*) para corderos en crecimiento. *Rev Investig Vet Perú* 2020;31(3):e16840. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i3.16840>.

39. Dey A, Shyam P, Poonam P. Potential of *Moringa oleifera* leaves in modulating *in vitro* methanogenesis and fermentation of wheat straw in buffalo. Indian J Anim Sci 2014;84:533-538.
40. Zavaleta E. Los ácidos grasos volátiles, fuente de energía en los rumiantes. <https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol1/CVv1c09.pdf>.