

Evaluación de la disposición de *Genipa americana* en la producción de gas *in vitro*

Evaluation of the readiness of *Genipa americana* for *in vitro* gas production

Jerónimo Herrera-Pérez¹ , Paulino Sánchez-Santillán^{1*} , Álvaro Lorenzo-Rojas¹ , Isaac Almaraz-Buendía² , María Benedicta Bottini-Luzardo¹ 

¹Universidad Autónoma de Guerrero, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2. Carretera federal Acapulco-Pinotepa Nacional Km 197, CP. 41940. Cuajinicuilapa, Guerrero, México.

²Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias. Av. Universidad km. 1, CP. 43600, Tulancingo, Hidalgo, México

*Autor de correspondencia: sanchezsantillanp@gmail.com

Artículo científico

Recibido: 04 de marzo 2024

Aceptado: 29 de noviembre 2024

RESUMEN. Los protocolos de la técnica de producción de gas *in vitro* se pretenden estandarizar al tiempo de evaluar especies arbóreas para alimentación de rumiantes. El objetivo fue determinar el efecto de la disposición de muestra en el biodigestor, así como caracterizar *in vitro* hojas y frutos maduros e inmaduros de *Genipa americana*. En un vial, la muestra se colocó de forma directa o en una bolsa de poli-seda; 40 mL de medio de cultivo anaerobio, bajo flujo de CO₂ y 10 mL de fluido ruminal fresco como inóculo. Los viales se incubaron 72 h a 39 °C. La producción de biogás se midió a 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 y 72 h y la degradación de materia seca (DMS) a las 72 h. El análisis estadístico fue un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 x 2, con tipo de muestra (hoja, fruto inmaduro y maduro) y disposición (directo o en bolsa) como factores. La producción de biogás no presentó interacción entre factores ($P > 0.05$); pero la DMS presentó interacción ($P \leq 0.05$). La producción de biogás no mostró diferencias en la disposición de la muestra ($P > 0.05$), a excepción de las 2 h ($P \leq 0.05$). Las hojas presentaron menor producción de biogás acumulado ($P \leq 0.05$). La DMS fue diferente en la disposición de los frutos maduros e inmaduros ($P \leq 0.05$), mientras en hojas no hubo diferencias por disposición ($P \leq 0.05$). La disposición de la muestra afectó los valores de la DMS y la producción de biogás a las 2 h en los frutos.

Palabras clave: Arbórea, biogás, degradación materia seca, fruto, hojas.

ABSTRACT. The protocols of the *in vitro* gas production technique are intended to be standardized when evaluating tree species for feeding ruminants. The objective was to determine the effect of sample arrangement in the biodigester, as well as to characterize *in vitro* mature and immature leaves and fruits of *Genipa americana*. In a vial, the sample was placed directly or in a poly-silk bag; 40 mL of anaerobic culture medium, under CO₂ flow and 10 mL of fresh rumen fluid as inoculum. The vials were incubated 72 h at 39 °C. Biogas production was measured at 2, 4, 6, 8, 10, 10, 12, 24, 48, and 72 h and dry matter degradation (DMD) at 72 h. The statistical analysis was a completely randomized design with a 3 x 2 factorial arrangement, with type of sample (leaf, immature and mature fruit) and disposition (direct or bagged) as factors. Biogas production showed no interaction between factors ($P > 0.05$); but DMD showed interaction ($P \leq 0.05$). Biogas production showed no interaction between factors ($P > 0.05$); but DMD showed interaction ($P \leq 0.05$). Biogas production did not show differences in sample arrangement ($P > 0.05$), except for 2 h ($P \leq 0.05$). Leaves presented lower cumulative biogas production ($P \leq 0.05$). DMD was different in the arrangement of mature and immature fruits ($P \leq 0.05$), while in leaves there were no differences by arrangement ($P \leq 0.05$). Sample arrangement affected the values of DMD and biogas production at 2 h in fruits.

Keywords: Arboreal, biogas, dry matter degradation, fruit, leaves.

Como citar: Herrera-Pérez J, Sánchez-Santillán P, Lorenzo-Rojas A, Almaraz-Buendía I, Bottini-Luzardo MB (2024) Evaluación de la disposición de *Genotipa americana* en la producción de gas *in vitro*. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios Núm. Esp. IV: e4035. DOI: 10.19136/era.a11nIV.4035.

INTRODUCCIÓN

El aumento en la demanda de alimentos de origen animal, concomitante con la conservación del medio ambiente, genera la necesidad de idear nuevas estrategias para la producción animal. Dado que el alimento constituye un insumo para los sistemas de producción animal, se requiere comprender la relación entre la calidad del alimento, su influencia en la producción animal y el medio ambiente. De modo que, el conocimiento acumulado de la fisiología gastrointestinal y su influencia en la utilización de nutrientes contribuya a orientar el desarrollo de técnicas de evaluación de alimentos hacia aquellas que imitan el destino de los nutrientes del alimento (Amanzougarene y Fondevila 2020). En este sentido, las técnicas de laboratorio para la evaluación de alimentos desempeñarán un papel importante en los futuros sistemas de producción animal (Krishnamoorthy *et al.* 2005). Las técnicas de fermentación *in vitro* que implican incubaciones de sustratos con fluido ruminal se utilizan ampliamente para evaluar el valor nutritivo de los alimentos para rumiantes. Además, las mediciones basadas en esta técnica complementan los análisis de laboratorio estándar de la composición química y, por lo tanto, ofrecen una alternativa rápida y menos costosa a la determinación de la digestibilidad de los nutrientes *in vivo* (Amanzougarene y Fondevila 2020, Yáñez-Ruiz *et al.* 2016). En años recientes se busca desarrollar y mejorar estas técnicas para predecir con precisión la ingesta y digestibilidad de los alimentos. La estandarización de los protocolos de evaluación de alimentos es una premisa importante para considerar, ya que estos varían entre los laboratorios que utilizan técnicas de medición de la producción de gas (Suassuna *et al.* 2023).

Genipa americana L. se conoce como tejoruco y jenipapeiro. Es un árbol de la familia Rubiaceae de origen amazónico que se extiende por América Latina, caracterizado por presentar un tallo recto de 10 a 12 m de altura. Es un árbol caducifolio con estípulas interpeciolares lampiñas, caedizas y acuminadas. A lo largo de sus ramas crecen hojas verticiladas obovadas o oblongas de estructuras simples y complejas. En las axilas de las hojas se encuentran flores bisexuales de color blanco amarillento con un ligero olor que forman racimos terminales en las cimas. El periodo de floración abarca los meses de mayo a septiembre. Los frutos tienen forma de baya globosa de color verde a café, según el estado de maduración (CONABIO 2024). A partir de los 6 años comienzan a producir frutos durante marzo y abril. Este árbol requiere un clima húmedo o seco, temperaturas entre 18 a 28 °C (Rojas-Rodríguez y Torres-Córdoba 2019). De manera local en el municipio de San Luis Acatlán, Guerrero, México se observa que los frutos y hojas son consumidos por rumiantes; sin embargo, en la literatura no hay evaluaciones nutricionales de esta especie. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la disposición de la muestra en el biodigestor en la prueba de producción de biogás *in vitro*, así como determinar la producción de gas y degradación de la materia seca *in vitro* de hojas y frutos de *Genipa americana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2 de la Universidad Autónoma de Guerrero; ubicada en el municipio de Cuajinicuilapa, Guerrero, México.

Muestras

Las muestras evaluadas fueron frutos y hojas de *Genipa americana* L.; recolectadas en San Luis Acatlán, Guerrero, México (Temperatura media 26 °C). Los frutos se obtuvieron directamente de las ramas del árbol y fueron de color verde (inmadura) y café (madura). En total se recogieron 30 frutos inmaduros y 30 frutos maduros de manera aleatoria de tres árboles. En el caso de las hojas verdes, se recolectaron aleatoriamente alrededor de 500 g de hojas de los mismos árboles que se recolectaron los frutos.

Análisis bromatológico

Las muestras se deshidrataron en una estufa (Riossa®, H-41 México) a 55°C durante 72 h. Después, se procesaron inicialmente en un molino manual (Molino de grano “Estrella” capacidad 1 kg, 30 cm x15.5 cm) para reducir el tamaño de las partículas, y posteriormente en un molino Thomas-Wiley Mill (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) con una criba de 1 mm Ø. A las muestras se determinó el contenido de proteína cruda (PC) con el método 942.05 de micro Kjeldahl; las cenizas se estimaron por incineración con el método 942.05 (AOAC 2005). Para la determinación de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) se siguió la metodología de Van-Soest *et al.* (1991); se utilizaron bolsas de poli-seda (7 x 4 cm) selladas con hilo cáñamo. La materia orgánica (MO) se estimó al restar a 100 el porcentaje de cenizas (Tabla 1).

Tabla 1. Composición química de vainas maduras e inmaduras, y de las hojas verdes de *Genipa americana*

Componente	Proteína cruda (%)	Fibra detergente neutro (%)	Fibra detergente ácido (%)	Cenizas (%)	Materia orgánica (%)
Fruta madura	4.8	22.1	12.6	3.5	96.5
Fruta inmadura	4.9	23.0	13.5	3.6	96.4
Hojas	11.0	35.5	23.1	5.7	94.3

Ensayo *in vitro*

La colocación de la muestra en un vial serológico fue de dos formas: a) 0.5 g de una muestra se agregó directamente al vial serológico; o b) en bolsa de poli-seda (7 x 4 cm) se colocaron 0.5 g, se sellaron con hilo cáñamo y se introdujeron al vial. En cada vial se agregaron 40 mL de medio de cultivo, bajo flujo de CO₂, para mantener condiciones de anaerobiosis. El medio de cultivo se preparó según Cobos y Yokoyama (1995) modificado por Cañaverall-Martínez *et al.* (2020). Los viales se sellaron con un tapón de neopreno y un arillo de aluminio con centro removible y se consideró un biodigestor. Los biodigestores se colocaron en una incubadora (Ecoshel 9082) a 39 °C por 20 min.

La inoculación de los biodigestores fue con 10 mL de fluido ruminal fresco. El fluido ruminal se recolectó y se colocó en un termo de plástico de 1 L (IGLOO) para trasladarlo al laboratorio, donde se filtró con manta. El fluido ruminal se obtuvo de una vaca Suiz-Bu de 450 kg provista de cánula ruminal alimentado previamente al libre pastoreo en praderas de pasto pangola; este se manejó de acuerdo con el reglamento interno de bioética y bienestar animal de la UAGro con fundamento en la norma oficial NOM_062-ZOO-1999 (SAGARPA 2001). Los biodigestores se incubaron 72 h a 39°C.

La producción de biogás se midió a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 y 72 h por desplazamiento del émbolo de una jeringa de vidrio (Cañaverall-Martínez *et al.* 2020). Al terminó de las 72 h de incubación, la muestra residual colocada directamente en el vial, se filtró con ayuda de una bomba de vacío (Felisa FE-1500L); mientras, la muestra colocada en una bolsa de poli-seda se sacó del vial. Así, tanto las bolsas como los filtros se colocaron en una estufa a 55 °C por 24 h. Trascurrido el tiempo, las muestras se secaron en una estufa y se colocaron en un desecador por 30 min para determinar la degradación de materia seca (DMS). Las bolsas (4 x 7 cm) y filtros (11 cm Ø) se elaboraron con tela de poli-seda con tamaño de poro de 50 µm.

Estimadores de la cinética de degradación de la materia seca *in vitro*

En tubos de ensayo (18 x 150 mm) se colocaron 0.2 g de una muestra (tres repeticiones por muestra) y 8 mL de medio de cultivo (Cañaverall-Martínez *et al.* 2020), bajo flujo de CO₂ para crear condiciones de anaerobiosis, se colocó un tapón de hule (No. 1). Los tubos de ensayo se introdujeron en una incubadora a 39°C por 20 min; posteriormente, se inocularon con 2 mL de líquido ruminal fresco, bajo flujo de CO₂. Los tubos de ensayo se incubaron a 39 °C por 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h. Al término de cada horario de incubación, el residuo se filtró (poli-seda, 7 cm Ø) y se llevaron a peso constante a 55°C por 24 h; la degradación de la materia seca (DMS) se determinó por diferencia de peso.

Los estimadores de la cinética de degradación *in vitro* se calcularon mediante un procedimiento de regresión no lineal usando la ecuación $P = a + b [1 - e^{-c \cdot t}]$ donde: P = degradación *in vitro* en el tiempo t (%); a = fracción degradable rápidamente soluble; b = la fracción lenta o potencialmente degradable; c = velocidad a la que b se digiere; t = tiempo (h) de incubación (Ørskov y McDonald 1979).

Análisis estadístico

La producción acumulada de biogás y la degradación de materia seca se analizaron en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 x 3, donde los factores fueron disposición de la muestra en el vial (directo o en bolsa) y tipo de muestra (fruto inmaduro, fruto maduro y hojas). Los estimadores de la cinética de degradación *in vitro* se analizaron mediante un diseño completamente al azar. La comparación de medias fue con la prueba de Tukey (p<0.05) usando el Software InsfoStat (Di-Rienzo *et al.* 2020).

RESULTADOS

En la Tabla 2 se muestran los valores de P para los factores principales y la interacción entre factores, donde muestra que los diferentes tiempos de producción acumulada de biogás no presentaron interacción entre factores, por lo que se analizaron por factor principal; pero la DMS mostró una interacción entre factores principales por lo que el análisis fue directamente entre las interacciones.

Tabla 2. Valores de P de la interacción entre disposición de la muestra en el biodigestor y el tipo de muestra de *Genipa americana*

Variable	Disposición	Tipo de muestra	Interacción
			Disposición*Tipo de muestra
Producción acumulada de biogás <i>in vitro</i>			
2 h	0.0113	0.0104	0.8652
4 h	0.1055	<0.0001	0.8588
6 h	0.2982	<0.0001	0.7645
8 h	0.2541	<0.0001	0.7449
10 h	0.1478	<0.0001	0.6917
12 h	0.1347	<0.0001	0.5418
24 h	0.0511	<0.0001	0.448
48 h	0.7321	<0.0001	0.3745
72 h	0.3197	<0.0001	0.3317
DMS	<0.0001	<0.0001	<0.0001

DMS: Degradación de la materia seca

La producción acumulada de biogás a las 2 h de fermentación fue mayor para la disposición sin bolsa, mientras que la DMS fue mayor en la disposición con bolsa ($P \leq 0.05$). En el resto de las mediciones de producción de biogás acumulado no mostraron diferencias en la disposición de la muestra en el biodigestor ($P > 0.05$), indicando que, a partir de las 2 h de incubación, la disposición de la muestra no tiene efecto sobre esta variable (Tabla 3).

Tabla 3. Producción acumulada de biogás y degradación de la materia seca *in vitro* de *Genipa americana* incubadas o no en bolsa de poli-seda para el proceso de fermentación ruminal

Variables	Con bolsa	Sin bolsa	EEM	p-valor
Producción acumulada de biogás <i>in vitro</i> (mL g MS ⁻¹)				
2 h	31.1	43.3	2.7	0.0113
4 h	71.1	83.8	6.0	0.1055
6 h	100.6	110.7	7.6	0.2982
8 h	114.0	125.6	8.5	0.2541
10 h	125.4	140.5	8.6	0.1478
12 h	137.6	153.4	9.2	0.1347
24 h	175.6	196.6	9.7	0.0511
48 h	220.8	224.3	9.5	0.7397
72 h	247.3	237.3	9.1	0.3197
DMS (%)	75.1	65.9	2.3	<0.0001

DMS: Degradación de materia seca; EEM: error estándar de la media

Las hojas de *Genipa americana* fue el tipo de muestra que menor producción de biogás acumulado produjo a lo largo del ensayo *in vitro* y mostró la menor DMS ($P \leq 0.05$); mientras que el estado de madurez de la fruta no influyó en la producción acumulada de biogás en todo el ensayo *in vitro*, ni en la DMS ($P > 0.05$, Tabla 4).

Tabla 4. Producción acumulada de biogás y degradación de la materia seca *in vitro* del tipo de muestra de *Genipa americana*.

	Fruta madura	Fruta inmadura	Hojas	EEM
Producción acumulada de biogás <i>in vitro</i> (mL g MS ⁻¹)				
2 h	42.8 ^a	42.1 ^a	26.7 ^b	2.7
4 h	92.3 ^a	98.3 ^a	41.7 ^b	6.0
6 h	126.4 ^a	132.1 ^a	58.5 ^b	7.6
8 h	140.9 ^a	152.0 ^a	66.4 ^b	8.5
10 h	156.0 ^a	163.9 ^a	78.9 ^b	8.6
12 h	167.7 ^a	181.8 ^a	87.0 ^b	9.2
24 h	212.0 ^a	222.3 ^a	124.0 ^b	9.7
48 h	246.7 ^a	260.0 ^a	161.0 ^b	9.5
72 h	266.2 ^a	277.4 ^a	183.3 ^b	9.1
DMS (%)	78.9 ^a	77.6 ^a	54.9 ^b	2.3

DMS: Degradación de materia seca; EEM: error estándar de la media. Letras iguales dentro de misma fila son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$).

La mayor DMS se observó en el fruto sin importar el estado de madurez de este cuando se dispusieron las muestras en bolsa dentro del biodigestor, promediando 84.6%; en contraste, la hoja presentó la menor DMS en cualquier forma de disposición de la muestra en el biodigestor, promediando 54.9% (Tabla 5).

Tabla 5. Degradación de la materia seca de frutos maduros o inmaduro y hojas de *Genipa americana* incubadas o no en bolsa de poli-seda para el proceso de fermentación ruminal *in vitro*

Muestra	Disposición	DMS (%)
Fruta madura	Con bolsa	85.9 ^a
	Sin bolsa	71.9 ^b
Fruta inmadura	Con bolsa	83.2 ^a
	Sin bolsa	72.0 ^b
Hojas	Con bolsa	56.1 ^c
	Sin bolsa	53.7 ^c
Error estándar de la media		2.3

DMS: Degradación de materia seca. Letras iguales dentro de misma columna son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$).

Los estimadores de la cinética de degradación *in vitro* muestran que la fruta madura contuvo la mayor fracción degradable soluble (*a*), seguida de la fruta inmadura y posteriormente la hoja ($P \leq 0.05$). En el caso de la fracción potencialmente degradable (*b*), las hojas cuantificaron la mayor proporción ($P \leq 0.05$), mientras que las frutas sin importar su estado de madurez fisiológico promediaron 19.6% de *b*. La mayor tasa de degradación de *b* (*c*) la mostró la fruta inmadura, seguida por la fruta madura y por último la hoja ($P \leq 0.05$, Tabla 6).

Tabla 6. Estimadores de la cinética de degradación ruminal *in vitro* de frutos maduros o inmaduro y hojas de *Genipa americana*

Componente	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>
Hoja	29.9 ^c	31.6 ^a	0.01 ^c
Fruta inmadura	45.0 ^b	21.3 ^b	0.04 ^a
Fruta madura	48.5 ^a	18.0 ^b	0.03 ^b
Error estándar de la media	2.85	2.11	0.004

Letras iguales dentro de misma columna son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). *a*: fracción degradable rápidamente soluble. *b*: la fracción lenta o potencialmente degradable. *c*: velocidad a la que *b* se digiere.

DISCUSIÓN

Una diferencia entre colocar la muestra directamente en el vial y utilizar una bolsa previamente antes de introducirla al biodigestor es controlar la cantidad de muestra durante el proceso y mayor facilidad de manejo de la muestra. Sin embargo, el colocar la muestra de forma directa simplifica el proceso, pero hay un menor control dentro del biodigestor y puede haber pérdidas de muestra durante el proceso de filtración. En contraste, el colocar la muestra en una bolsa antes de introducirlo al biodigestor facilita la separación de sólidos y líquidos permitiendo un seguimiento más preciso de la degradación de la materia seca y la producción de gas. Esta técnica se usa en cultivos de microorganismos ruminales de larga duración (Rusitec), ya que es una variante de las técnicas de digestibilidad *in vitro* donde colocan la muestra a evaluar en bolsas de nylon porque el sistema tiene válvulas de entrada y salida (Vargas-Bayona *et al.* 2013). En general, el uso de una bolsa previamente a introducir al biodigestor suele ser preferible en aplicaciones de investigación y desarrollo, ya que ofrece mayor control sobre el proceso y facilita la monitorización de las variables; como es el caso del sistema *in vitro* semicontinuos (Rusitec) (Vargas-Bayona *et al.* 2013). Pero en aplicaciones a mayor escala o donde la simplicidad y los costos son críticos, se puede optar por cargar el sustrato directamente en el biodigestor, como rutinariamente se realizan las técnicas de producción de gas *in vitro* (Posada y Noguera 2005). El fundamento para elegir entre colocar el sustrato directamente en el biodigestor o utilizar una bolsa previa al medio de cultivo e inóculo se basa en varios factores, incluyendo los objetivos del proceso y las consideraciones prácticas como

el control del proceso, monitorización y análisis, facilidad de manejo, costos y recursos, separación de sólidos y líquidos como en la técnica Rusitec (Vargas-Bayona *et al.* 2013).

Por otra parte, se presentó mayor DMS cuando las muestras se incubaron dentro de las bolsas en comparación con la colocación directa de la muestra en el vial; pero, la producción de biogás no mostró diferencias ($p > 0.05$) a partir de las 2 h; en la fermentación hay una relación directa entre DMS y producción de biogás, ya que la degradación de sustratos orgánicos es el proceso principal que conduce a la generación de gases como el metano (CH_4) y el dióxido de carbono (CO_2) (Lorenzo y Obaya 2005). Sin embargo, esta relación puede no ser lineal ni directa en todos los casos y puede estar influenciada por varios factores como composición del sustrato, actividad microbiana, disponibilidad de nutrientes, inóculos, conversión de productos intermedios durante el proceso de fermentación o complejidad de las interacciones microbianas (Posada y Noguera 2005). Es probable que, a las 2 h, la disposición directa del sustrato propició que el tiempo de colonización del sustrato fuera menor que cuando se dispuso la muestra en bolsa porque esta actuó de barrera, lo que permitió iniciar el proceso de fermentación de carbohidratos que se reflejó en una mayor producción de biogás. Sin embargo, a medida que transcurrió el tiempo de fermentación (a partir de 4 h) es probable que los microorganismos terminaron de colonizar el sustrato y la producción de biogás no mostró diferencias en la disposición del sustrato (Ganeshan y Rajendran 2022). Mientras que Pizzani *et al.* (2006) reportan valores inferiores al presente estudio (55%) de la DMS de los frutos maduros; en tanto que Pinto *et al.* (2002) reportan valores superiores de la DMS de las hojas (77.26%). Las diferencias de los resultados entre el presente estudio y los obtenidos por estos autores se pueden asumir a la edad fisiológica de recolección de las muestras, ya que conforme madura fisiológicamente, su estructura celular cambia y esto afecta su digestibilidad (Hoffman *et al.* 2007).

La producción de biogás sirve como un indicador indirecto de la cantidad de los carbohidratos disponibles para fermentación. En las primeras 24 h se fermentan los carbohidratos no estructurales, de modo que el fruto sin importar el estado de madurez presentó mayor contenido de estos carbohidratos que las hojas. Pero la fermentación de los carbohidratos estructurales fue mayor en las hojas, ya que la producción de biogás a partir de las 24 h fue de $63 \text{ mL g}^{-1} \text{ MS}$ y para el fruto fue de 54.2 (inmaduro) y $55.1 \text{ mL g}^{-1} \text{ MS}$ (maduro), indicando que el contenido de los carbohidratos estructurales de las hojas es mayormente fermentable que de los frutos. De tal modo, que esto se justifica con los estimadores de la cinética de fermentación *in vitro*; ya que, las hojas mostraron la mayor fracción potencialmente degradable (*b*), mientras los frutos la fracción degradable soluble (*a*). La producción acumulada de biogás se puede asumir a las tasas de fermentación de los componentes (Tabla 6). Al respecto, Torres-Salado *et al.* (2018) evaluaron la producción de biogás total de hojas y vainas que se usan en la alimentación de rumiantes en el trópico, reportando valores inferiores al presente estudio, tanto en hoja ($133.3 \text{ mL g}^{-1} \text{ MS}$) como en vaina madura ($126 \text{ mL g}^{-1} \text{ MS}$) de *Leucaena leucocephala* y *Guazuma ulmifolia* (123.2 y $112.6 \text{ mL g}^{-1} \text{ MS}$ en hoja y vaina madura). Respecto a la tasa de producción de gas, Torres-Salado *et al.* (2018) publicaron tasas de 0.04 para las vainas maduras de *Samanea saman* y *Enterolobium cyclocarpum*; valores superiores a los reportados en el presente estudio en el fruto maduro, pero iguales al fruto inmaduro.

CONCLUSIONES

La disposición del sustrato sin o con bolsa en el biodigestor no presentó diferencias en la producción de biogás a partir de las 2 h de incubación; pero la degradación de la materia seca no fue contundente por el comportamiento según la disposición del sustrato, ya que hubo interacción con el tipo de muestra, lo que requiere de mayores estudios sobre la degradación de la materia seca, bajo las formas de disposición del sustrato en el biodigestor. Por otra parte, los frutos de *Genipa americana* mostraron mayor cantidad de carbohidratos fermentables y degradación de materia seca que las hojas.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no tienen intereses en competencia.

LITERATURA CITADA

- Amanzougarene Z, Fondevila M (2020) Fitting of the *in vitro* gas production technique to the study of high concentrate diets. *Animals* 10(10): Article 10. <https://doi.org/10.3390/ani10101935>
- AOAC (2005) Official methods of analysis. 18^{va} ed. Association of Official Analytical Chemist. <https://www.eoma.aoac.org/>. Fecha de consulta: 15 de febrero de 2023.
- Cañaveral-Martínez UR, Sánchez-Santillán P, Torres-Salado N, Sánchez-Hernández D, Herrera-Pérez J, Rojas-García AR (2020) Características de calidad, bromatológicas y fermentativas *in vitro* de ensilado de mango maduro. *Revista Mexicana de Agroecosistemas* 8(1): 82-90.
- Cobos MA, Yokoyama MT (1995) *Clostridium paratrifcum* var. *Ruminanitim*: Colonisation and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. In: Wallace RJ, Lahlou K (ed) Rumen ecology research planning. The International Livestock Research Institute. Addis Ababa, Ethiopia. pp. 152-161.
- CONABIO (2024) *Genipa americana*. Cuidad de México, México. http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/61-rubia5m.pdf. Fecha de consulta: 30 de mayo de 2024.
- Di-Rienzo J, Balzarini M, Gonzalez L, Cazanoves F, Tablada M, Walter C (2020) InfoStat [Software]. <https://www.infostat.com.ar/>. Fecha de consulta: 1 de marzo de 2023.
- Ganeshan P, Rajendran K (2022) Dynamic simulation and optimization of anaerobic digestion processes using MATLAB. *Bioresource Technology* 351: 126970. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126970>
- Hoffman PC, Lundberg LM, Shaver RD, Contreras-Govea FE (2007) El Efecto de la madurez en la digestibilidad del FDN (fibra detergente neutro). *Focus on Forage* 15(5): Article 5.
- Krishnamoorthy U, Rymer C, Robinson PH (2005) The *in vitro* gas production technique: Limitations and opportunities. *Animal Feed Science and Technology* 123-124: 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.015>
- Lorenzo AY, Obaya AMC (2005) La digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte I. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar 39(1): 35-48.

- Ørskov ER, McDonald I (1979) The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science* 92(2): Article 2. <https://doi.org/10.1017/S0021859600063048>
- Pinto R, Ramírez L, Kú Vera JC, Ortega L (2002) Especies arbóreas y herbáceas forrajeras del sureste de México. *Pastos y Forrajes* 25(3): 171-180.
- Pizzani P, Matute I, De Martino G, Arias A, Godoy S, Pereira L, Palma J, Rengifo M (2006) Composición fitoquímica y nutricional de algunos frutos de árboles de interés forrajero de los Llanos Centrales de Venezuela. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias* 47(2): 105-111.
- Posada SL, Noguera RR (2005) Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development* 14(4): 36.
- Rojas-Rodríguez F, Torres-Córdoba G (2019) Árboles del Valle Central de Costa Rica: Reproducción guaitil (*Genipa americana* L.). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú* 17(40): 58-60.
- SAGARPA (2001) Norma mexicana NOM_062-ZOO-1999. Que establece las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf. Fecha de consulta: 20 marzo de 2023.
- Torres-Salado N, Sánchez-Santillán P, Rojas-García AR, Herrera-Pérez J, Hernández-Morales J (2018) Producción de gases efecto invernadero *in vitro* de leguminosas arbóreas del trópico seco mexicano. *Archivos de Zootecnia* 67(257): 55-59.
- Van-Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74(10): Article 10. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Vargas-Bayona J, Mejía-Porras G, Bedoya-Mashuth J, Gómez-Patiño JF (2013) Estimación de la técnica *in vitro* de gases frente a otras técnicas de digestibilidad. *Spei Domus* 9(18): Article 18. <https://doi.org/10.16925/sp.v9i18.547>
- Yáñez-Ruiz DR, Bannink A, Dijkstra J, Kebreab E, Morgavi DP, O’Kiely P, Reynolds CK, Schwarm A, Shingfield KJ, Yu Z, Hristov AN (2016) Design, implementation and interpretation of *in vitro* batch culture experiments to assess enteric methane mitigation in ruminants—A review. *Animal Feed Science and Technology* 216: 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.03.016>