

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) A PARTIR DE RESIDUOS DEL BENEFICIO DE CAFÉ

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con el campo técnico de la ingeniería química, en especial, con procesos de generación de polihidroxialcanoatos (PHA's) a partir de residuos agroindustriales.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) ha ganado considerable atención en los últimos años debido a la creciente demanda de alternativas sostenibles a los plásticos convencionales derivados del petróleo.

Los PHAs son polímeros biodegradables producidos mediante la fermentación microbiana de azúcares y ácidos grasos, ofreciendo una solución prometedora para mitigar la contaminación plástica. Los avances recientes en estrategias biotecnológicas han permitido una producción de PHAs más viable económicamente y escalable, haciéndolos adecuados para diversas aplicaciones industriales (Alves et al., 2023; Gahlawat et al., 2020).

Investigadores han destacado los beneficios ambientales de los PHAs, incluida su biodegradabilidad universal y su potencial para reemplazar plásticos de un solo uso, que contribuyen significativamente a la degradación ambiental (Meereboer et al., 2020; Vicente et al., 2023). A medida que la tendencia global hacia materiales sostenibles continúa, el desarrollo y optimización de los procesos de producción de PHAs sigue siendo un área crítica de investigación (Zytner et al., 2023).

En cuanto a los microorganismos productores de PHAs, se ha documentado que la bacteria Gram-negativa *Cupriavidus necator* (*C. necator*) puede acumular altos niveles de PHAs.

El PHA producidos por *C. necator*, suele ser el poli(3-hidroxibutirato) (PHB), un poliéster lineal de ácido 3-hidroxibutírico que posee características termoplásticas naturales y propiedades mecánicas similares a las de los poliésteres sintéticos (McAdam et al., 2020).

En cuanto a la fuente de carbono requerida para el proceso de cultivo, la literatura señala que su costo es un obstáculo para la producción de PHAs, ya que puede

representar hasta el 50% del costo total del biomaterial (Riedel & Brigham, 2020; Zytner et al., 2023).

Una alternativa para abordar esta dificultad consiste en explorar sustratos alternativos de bajo costo o de origen residual (Ascencio-Galván et al., 2024; Dorado et al., 2024).; Así, la investigación sobre el uso de sustratos y residuos económicos, así como la optimización de condiciones de operación y modos de operación, son cruciales para construir una producción sostenible de PHAs (Ascencio-Galván et al., 2024; Dorado et al., 2024).

Actualmente, varios estudios se centran en la búsqueda de sustratos alternativos para reducir costos, evaluando el uso de materiales de desecho como son melazas, vinazas, aceite de oliva, residuos de aceite de cocina, ácido láctico y almidón (Dorado et al., 2024; Fook et al., 2024; González-Rojo et al., 2023; Hernández-Herreros et al., 2024; Razzaq et al., 2024).

Aunque estos estudios antes mencionados han arrojado resultados prometedores en cuanto a la síntesis de PHA usando fuentes de carbono de bajo costo como sustrato en el cultivo de microorganismos como *C. necator*, aún no se ha evaluado el uso de residuos agroindustriales abundantes en Colombia y que requieren avanzar en procesos sostenibles para mantener o incrementar sus cuotas de exportación como lo es el café.

El beneficio del café se centra en la obtención del grano, descartando los demás componentes del fruto como son la pulpa y cáscara, que está impregnada con el mucílago que recubre al grano y que facilita procesos de fermentación.

En estudios previos de caracterización del mucílago de café se encontró que los carbohidratos totales constituyen entre 7.5% a 9.82% del peso del mucílago fresco, compuestos por un 49.7% de azúcares reductores, 29.8% de azúcares no reductores, 7.3% de fibra, 15% de sustancias no fibrosas y 0.93% de proteína (Puerta-Quintero & Ríos-Arias, 2011). Esto sugiere que el residuo de café tiene en su composición un balance nutricional apropiado en carbono y nitrógeno para la producción fermentativa de PHAs en *C. necator*, que acumula el biopolímero como una estrategia de reserva energética ante la limitación de nitrógeno ambiental durante el crecimiento (Ahn et al., 2015).

Así mismo, los cultivadores de café realizan una disposición final de estos residuos en pilas al aire libre, lo que desencadena procesos de descomposición que favorecen la proliferación de insectos y otros organismos, malos olores y lixiviados (Orrego et al., 2018).

En la literatura de patentes, por ejemplo, se observa el documento WO2014032633A1 que describe un método para la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) utilizando un sustrato de aceite vegetal o aceite

comestible, preferiblemente aceite de fritura, en el cual se cultiva la cepa bacteriana *Cupriavidus necator* H16. Durante el proceso, el aceite es convertido en PHA, mientras que se producen enzimas lipolíticas extracelulares que son aisladas parcialmente del medio de cultivo antes de que se complete la producción de PHA.

- 5 Las enzimas lipolíticas aisladas son reutilizadas en el sustrato de aceite para acelerar el crecimiento bacteriano y optimizar el proceso de fermentación y extracción de PHA.

De acuerdo con el estado de la técnica citado, la presente invención aporta una solución a la problemática asociada con la producción sostenible de polihidroxibutirato (PHB), a partir de la generación de valor de residuos agroindustriales derivados del beneficio del café.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION.

La presente invención revela un procedimiento para la producción fermentativa de polihidroxibutirato (PHB) a partir del microorganismo *Cupriavidus necator* mediante la valorización de residuos de café.

El procedimiento emplea extracto de pulpa y mucílago de café como sustrato, donde dicho proceso comprende el desarrollo de las etapas que se exponen a continuación:

- 20 Un pretratamiento que incluye la reducción de tamaño del residuo en húmedo, preferiblemente mediante trituración, en una razón sólido-líquido de 1.25.

La separación de fragmentos de cáscara y partículas mayores a 1 mm, preferiblemente, mediante filtración,

La dilución del extracto resultante hasta alcanzar una concentración de sólidos disueltos de 2° Brix.

El procedimiento aporta dentro de sus ventajas técnicas el aprovechamiento de la relación Carbono/Nitrógeno natural del residuo del beneficio de café como un sustrato adecuado.

En la modalidad preferida de la invención, el sustrato (extracto de pulpa y mucílago de café) puede encontrarse en estado fresco o haber sido sometido a fermentación natural bajo condiciones ambientales hasta por 48 o 72 horas, sin afectar significativamente la producción de PHB, mejorando las condiciones de flexibilidad en el almacenamiento y transporte del residuo, manteniendo su capacidad como sustrato para la producción de PHB.

En la modalidad preferida de realización, el medio de cultivo está compuesto, además del extracto de pulpa y mucílago de café diluido a 2° Brix, por un suplemento que consiste en una mezcla de minerales empastillados que incluye:

- Cloruro de calcio (80 mg/L),
- 5 • Fosfato de sodio (40 mg/L),
- Sulfato ferroso (5 mg/L),
- Sulfato de zinc (7.5 mg/L), y
- Cloruro de manganeso (0.5 mg/L),

El medio de cultivo proporciona los elementos traza necesarios para el óptimo
10 crecimiento del microorganismo *Cupriavidus necator* y la acumulación intracelular de PHB.

La relación Carbono/Nitrógeno natural del extracto de pulpa y mucílago de café
aportada por el procedimiento objeto de divulgación favorece la acumulación
intracelular de PHB al proveer, al mismo tiempo, una fuente de carbono abundante
15 y limitar el nitrógeno disponible en el medio.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS.

Figura 1. Gráficas de la acumulación de biomasa y glucosa en cultivos de *C. necator*
con residuos de café y medio MSM. (a) cultivo T1 (0 h de exposición ambiental de
20 pulpa y mucílago), (b) cultivo T2 (48 h de exposición ambiental de pulpa y mucílago),
(c) cultivo T3 (72 h de exposición ambiental de pulpa y mucílago) y (d) cultivo en
medio MSM (control).

Figura 2. Acumulación (%) de PHA y concentraciones máximas (g/L) de biomasa y
PHA en cultivos de *C. necator* con residuos de café y medio MSM (control).

25 Figura 3. Detección de PHB después de 96 h mediante microscopía 100x utilizando
tinción con negro Sudán(a) cultivo T1 (0 h de exposición ambiental de pulpa y
mucílago), (b) cultivo T2 (48 h de exposición ambiental de pulpa y mucílago), (c)
cultivo T3 (72 h de exposición ambiental de pulpa y mucílago) y (d) cultivo en medio
MSM (control).

30 Figura 4. Espectros de FTIR para las muestras de biopolímero obtenido en cultivos
de *C. necator* con residuos de café y medio MSM. (a) cultivo T1 (0 h de exposición
ambiental de pulpa y mucílago), (b) cultivo T2 (48 h de exposición ambiental de
pulpa y mucílago), (c) cultivo T3 (72 h de exposición ambiental de pulpa y mucílago)
y (d) cultivo en medio MSM (control).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION.

La presente invención revela un procedimiento simplificado para la producción de polihidroxicanoatos (PHA's), en particular, para la producción de polihidroxi-
5 polihidroxi-
butirato (PHB) en cultivos sumergidos de *C. necator* mediante la valorización de residuos de café, caracterizado por utilizar extracto de pulpa y mucílago de café como sustrato.

La descripción de la realización de la presente invención no pretende limitar su alcance, sino servir como un ejemplo particular de la misma. Se espera que una
10 persona versada en la materia comprenda que las modalidades equivalentes no se apartan del espíritu y alcance de la presente invención en su forma más amplia.

El procedimiento objeto de la invención comprende el desarrollo de las etapas que se describen a continuación:

- La reducción de tamaño del residuo en húmedo, preferiblemente, mediante
15 trituración en húmedo en una razón sólido-líquido de 1.25;
- La separación de fragmentos de cáscara y partículas mayores a 1 mm mediante filtración;
- La dilución en agua del extracto resultante hasta alcanzar una concentración de sólidos disueltos de 2° Brix.

20 El procedimiento involucra el aprovechamiento de la relación Carbono/Nitrógeno natural del residuo del beneficio de café como un sustrato adecuado que requiere un pretratamiento simple para la producción fermentativa de PHB mediante el microorganismo *Cupriavidus necator* DSM 428.

Dado que los residuos pueden pasar un tiempo considerable (por ejemplo siendo
25 acopiados o transportados) antes de un posterior tratamiento, se evaluaron tres tiempos de fermentación al aire libre (0, 48 y 72 h) antes de ser usados para la preparación del medio.

Es de esperarse que durante este tiempo de exposición a la atmósfera genere procesos fermentativos de tipo ácido láctico y otros, que pueden reducir los
30 azúcares fermentables disponibles en el residuo (Elhalis et al., 2023).

El residuo de café fue sometido a un pretratamiento antes de ser utilizado como base para el medio de cultivo, el cual es complementado con elementos traza necesarios para el óptimo crecimiento del microorganismo.

El biomaterial fue extraído y cuantificado, además de ser caracterizado mediante
35 espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

Por lo tanto, el extracto de pulpa y mucílago de café utilizado como sustrato en el procedimiento objeto de la presente descripción puede encontrarse en estado fresco o haber sido sometido a una etapa previa de fermentación natural, sin afectar significativamente la producción de PHB.

5 En la modalidad preferida de la invención, el medio de cultivo está compuesto por el extracto de pulpa y mucílago de café diluido a 2° Brix y suplementado con una mezcla de minerales empastillados que incluye:

- Cloruro de calcio (80 mg/L),
- Fosfato de sodio (40 mg/L),
- 10 • Sulfato ferroso (5 mg/L),
- Sulfato de zinc (7.5 mg/L), y
- Cloruro de manganeso (0.5 mg/L),

Este medio de cultivo proporciona los elementos traza necesarios para el óptimo crecimiento del microorganismo *Cupriavidus necator* y potenciar la acumulación intracelular de PHB.

En este sentido, la relación Carbono/Nitrógeno natural del extracto de pulpa y mucílago de café favorece la acumulación intracelular de PHB al proveer, una fuente de carbono abundante, mientras limita el nitrógeno disponible en el medio.

A su vez, la fermentación de los residuos del beneficio del café (cáscara, pulpa y mucílago) bajo condiciones ambientales mejora la flexibilidad en el almacenamiento y transporte del residuo, manteniendo su capacidad como sustrato para la producción de PHB.

Las figuras 1a – 1c muestran el comportamiento de la biomasa y el consumo de glucosa durante los cultivos sumergidos de *C. necator* en matraces agitados magnéticamente, correspondientes a los tiempos de exposición ambiental de los residuos del beneficio de café y que fueron utilizados como sustrato de bajo costo, así: T1 (0 h), T2 (48 h) y T3 (72 h).

En el cultivo con extracto fresco, no se observó una fase de latencia, iniciándose inmediatamente la fase exponencial, que se extendió entre las primeras 24 horas de cultivo, seguida por una fase estacionaria a partir de 24 horas. La concentración máxima de biomasa alcanzada fue de 6.3 g/L a las 60 horas. Al final del cultivo (96 horas), la concentración residual de glucosa fue de 0.2 g/L, equivalente al 3.95% de la concentración inicial. La producción y acumulación de PHB se cuantificó al finalizar el cultivo, registrándose una concentración de 3.6 g/L, correspondiente a un contenido intracelular de PHB del 56.3% (Figura 2). En los cultivos

correspondientes a T2 y T3, al igual que en T1, no se observó una fase de latencia, iniciándose directamente la fase exponencial. En T2, esta fase se prolongó hasta las 24 horas, momento a partir del cual comenzó la fase estacionaria.

La concentración máxima de biomasa alcanzada fue de 5.7 g/L a las 24 horas. Al final del cultivo (96 horas), la concentración residual de glucosa fue de 0.3 g/L, equivalente al 16.74% de la concentración inicial. La producción y acumulación de PHB alcanzaron valores de 1.7 g/L y 30.5%, respectivamente, (Figura 2).

En T3, la fase exponencial presentó un comportamiento similar, extendiéndose hasta las 24 horas, seguida de una fase estacionaria de 24 horas, y se alcanzó una concentración máxima de biomasa de 2.0 g/L a las 48 horas. La concentración final de glucosa fue de 0.3 g/L, lo que representa un 24.03% de la concentración inicial. El contenido intracelular de PHB registrado fue de 0.5 g/L (23.6%). El contenido de PHB fue confirmado visualmente mediante microscopía y tinción con negro de Sudán (Figura 3). Este análisis cualitativo permitió observar el contenido de la acumulación intracelular del polímero tras 96 horas de cultivo.

Como se observa en los resultados, el cultivo con extracto fresco presenta el mayor crecimiento de biomasa, seguido por el cultivo T2 y, finalmente, el cultivo T3. Este comportamiento es de esperarse dada la mayor concentración de azúcares fermentables en el extracto preparado con los residuos que no han sido objeto de fermentación al aire libre. Una tendencia similar se evidencia en la concentración y acumulación de PHB, alcanzándose los valores más altos en el cultivo con preparado con el residuo fresco. Por el contrario, el cultivo en medio MSM mostró un menor crecimiento y producción de PHB en comparación con el cultivo T1. Las condiciones limitadas del medio preparado con residuos frescos de café parecen favorecer significativamente la acumulación de biopolímero, al disponer de azúcares fermentables en alta concentración, se favoreció un crecimiento más rápido y una mayor producción de PHB.

Los resultados obtenidos con el cultivo a T1 son comparables, e incluso competitivos, con diversos residuos como sustratos documentados en la literatura. Trabajos previos con melaza de remolacha han reportado contenidos intracelulares de PHB del 52.89% (Ertan et al., 2021), mientras que la paja de trigo ha alcanzado hasta un 65% (Dahman y Ugwu, 2014). Sin embargo, ambas fuentes requieren intensivos pretratamientos químicos o físicos, incrementando los costos del proceso. En contraste, el extracto fresco de mucílago y pulpa no requiere un tratamiento previo complejo, lo que facilita su uso directo y destaca su potencial como una alternativa económica y sostenible. Adicionalmente, la producción de PHB alcanzada en T1 supera la reportada para otros residuos, como la melaza de caña de azúcar, que usando la cepa *C. necator* DSM 545 alcanza contenidos de

PHB de 44% (Beaulieu et al.,1995) y usando la cepa *C. necator* alcanza un 27% (Sen et al., 2019).

La concentración residual de glucosa al final del proceso fue significativamente baja, indicando que *C. necator* pudo metabolizar de manera efectiva y adecuada los azúcares presentes en el medio. Además de los azúcares fermentables como glucosa y fructosa, sino también ácidos orgánicos, minerales como potasio, calcio y magnesio, y pequeñas cantidades de aminoácidos esenciales, los cuales favorecen tanto el crecimiento celular como la acumulación del biopolímero (Esquivel y Jiménez, 2012; Murthy y Naidu, 2012; Pandey et al., 2000). Estos nutrientes, que podrían estar ausentes o degradados en otros residuos, ofrecen condiciones favorables para la producción de PHB.

La figura 1d muestra el comportamiento de la biomasa y el consumo de glucosa en el crecimiento de *C. necator* en un matraz agitado magnéticamente utilizando el medio Mineral Salts Medium (MSM) como medio de cultivo como control de la capacidad de acumulación de PHB en un medio estándar. Se puede observar que la fase de latencia finalizó a las 48h después de iniciar el cultivo.

Posteriormente, el cultivo entró a la fase exponencial entre las 48 y 72h de cultivo, seguido de una fase estacionaria entre las 72 y 84h. La máxima concentración de biomasa fue de 2.5 g/L a las 72h y el contenido de glucosa al final del cultivo fue de 11.1 g/L que corresponde al 65.48% de la concentración inicial. La acumulación de PHB se cuantificó al final del cultivo, teniendo una concentración máxima de 2.5 g/L y un porcentaje de acumulación de 25.6%, tal como se muestra en la figura 2.

Durante el cultivo con MSM no se observó limitación de crecimiento celular por ausencia de fuente de carbono ya que el contenido de glucosa al finalizar el cultivo sigue siendo elevado, correspondiendo a más del 50% del contenido inicial. Este comportamiento ya ha sido reportado en diversos estudios, como lo es el caso de (Dorado et al., 2024; Franz et al., 2011) en el que indican que a mayores concentraciones de glucosa el crecimiento celular no se ve limitado por el agotamiento de la fuente de carbono, contrario al caso en el que se utilizan bajas concentraciones de glucosa en donde si se ve una limitación del crecimiento por consumo de azúcar. Aunque se evidenció que el contenido de glucosa al final del cultivo es elevado, se puede observar que a las 48h el cultivo entró a su fase exponencial, esto puede deberse a ser un medio limitado en nutrientes con una baja concentración de nitrógeno, para así favorecer la acumulación de PHB (Ahn et al, 2015).

Caracterización del biopolímero

Las muestras del biopolímero obtenido en todos los cultivos se analizaron por FTIR (Figura 4) para confirmación de los grupos funcionales característicos del PHB. Para

investigar en profundidad las señales internas del material, los espectros se deconvolucionaron utilizando funciones gaussianas. En este sentido, los cuatro espectros correspondientes a los cultivos con residuos de café y MSM mostraron similitudes en bandas clave, lo que confirma que las muestras comparten la composición básica de poliésteres como el PHB. En la banda 2920–2960 cm⁻¹ se observó la vibración de estiramiento C-H, típica de cadenas alifáticas, en 1720–1725 cm⁻¹ la vibración de estiramiento del carbonilo, típica de los ésteres y entre 1000–1100 cm⁻¹ el estiramiento C-O-C, también característico de ésteres. Se observó la vibración de estiramiento O-H posiblemente debido a humedad o alcoholes residuales de la extracción.

El polímero de los cultivos T1 mostraron mayor número de picos intensos en la región baja (700–400 cm⁻¹), lo que podría sugerir una estructura más ordenada o mayor cristalinidad contrario a lo observado en el polímero obtenido en medio MSM, con menos bandas intensas en la región de 1000–500 cm⁻¹, indicando menor cristalinidad.

Se presenta a continuación la descripción de una modalidad particular de realización de la invención que no limita su alcance.

Microorganismo, medio de cultivo y condiciones de cultivo

Suspensiones celulares de *C. necator* DSM 428 proveniente de la Colección Alemana de Microorganismos (*The Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH*), crioconservadas (1,5 mL) a -80°C en solución de glicerol (20%) fueron reactivadas y cultivadas en condiciones estériles en 20 mL de caldo nutritivo (PanReac AppliChem, ITW Reagents, Monza, Italia) como medio semilla, en matraces de 100 mL agitados a 150 rpm. El pH fue ajustado a 6,8, la temperatura a 28°C y el tiempo de cultivo fue 24 horas.

Residuos de despulpado de café separado en tres tiempos de exposición ambiental (0, 48 y 72 h) posterior al proceso de beneficio, se redujeron de tamaño en un molino de cuchillas en una razón sólido-líquido de 1.25, siendo luego filtrado para remoción del material particulado mayor a 1 mm compuesto mayormente por cáscaras. Así se obtuvo un extracto de pulpa y mucílago con alto contenido de azúcares que se usó como base para la preparación del medio de cultivo. Este extracto se diluyó hasta 2° brix con agua destilada y se enriqueció con nutrientes traza que fueron previamente prensados y empastillados con la siguiente composición:

Elemento traza	Cantidad (mg)
Calcio (como cloruro)	80

Fósforo (como fosfato de sodio)	40
Hierro (como sulfato ferroso)	5
Zinc (como sulfato de zinc)	7.5
Manganeso (como cloruro de manganeso)	0.5

Tabla 1. Elementos traza para preparación de 200 ml de medio de producción.

El medio se ajustó a un pH de 6.8 y se autoclavó durante 15 minutos a 121 °C, dejado enfriar e inoculado con cultivo del medio semilla de *C. necator* en una
5 proporción de 10% v/v.

Los cultivos de 120 mL se llevaron a cabo en matraces de 500 mL agitados magnéticamente a 300 rpm durante 96 h. Los cultivos se realizaron por triplicado.

Como control se realizaron cultivos en idénticos volúmenes y relación de inóculo con un medio MSM preparado como se indica a continuación:

10

Compuesto	Cantidad (g)
Glucosa	4.60
Fosfato de sodio dibásico heptahidratado (Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O)	1.809
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	0.405
Sulfato de amonio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	0.27
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.054
Citrato de sodio	0.01593
Sulfato ferroso	0.00945
Cloruro de calcio dihidratado (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	0.0027
Elementos traza (ml)	0.27

Tabla 2. Compuestos y cantidades para una preparación de 270 ml de medio MSM.

Compuesto	Cantidad (g)
Ácido Bórico (H3BO3)	0.03
Cloruro de cobalto (II) hexahidratado (CoCl2.6H2O)	0.02
Sulfato de zinc heptahidratado (ZnSO4.7H2O)	0.01
Cloruro de manganeso (II) tetrahidratado (MnCl2.4H2O)	0.003
Molibdato de sodio (NaMoO4.2H2O)	0.003
Cloruro de níquel (II) hexahidratado (NiCl2.6H2O)	0.002
Sulfato de cobre (II) pentahidratado (CuSO4.5H2O)	0.001

Tabla 3. Compuestos y cantidades para una preparación de 100 ml de elementos traza para medio MSM.

La biomasa fue cuantificada como peso seco celular en g/L. Las muestras del caldo de cultivo (2,0 mL) se centrifugaron a 6.000 rpm durante 6 minutos, tras lo cual los sobrenadantes se usaron para cuantificación de azúcares y amonio libre.

El pellet celular húmedo se secó a 70°C durante 24 horas para determinar su peso seco. La concentración de glucosa fue determinada mediante HPLC (Agilent Technologies 1200, Santa Clara, CA) utilizando una columna de intercambio iónico Aminex HPX-87H, empleando ácido sulfúrico 0.01N como fase móvil a 0,6 mL/min y 35 °C (Ochoa et al., 2020).

Para la detección cualitativa de polímero intracelular durante el cultivo, las células fueron teñidas con negro Sudan B, revelando la acumulación de PHAs como gránulos negros bajo el microscopio. La extracción del polímero involucró centrifugar el caldo de cultivo a 5.000 rpm durante 10 minutos para recolectar los pellets celulares, que luego se disolvieron en 5 mL de hipoclorito de sodio y 5 mL de cloroformo. Esta mezcla se agitó, se dejó a temperatura ambiente bajo agitación durante 20 horas y se centrifugó nuevamente. Se obtuvieron tres fases: la capa acuosa superior, una capa intermedia de desechos celulares y la fase orgánica inferior que contenía el cloroformo con el biopolímero disuelto.

El PHA fue precipitado añadiendo alcohol isopropílico, y el precipitado resultante se secó a 70°C durante 24 horas para la cuantificación del peso seco de PHA (Dorado et al., 2024; García et al., 2019). Para identificar los grupos funcionales y las unidades químicas en el polvo de PHA, se utilizó la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) (Shimadzu, IR Affinity-1). Los espectros se registraron en un rango de longitud de onda de 4000 cm⁻¹ a 500 cm⁻¹.

Caracterización de los extractos de café

Los extractos de pulpa y mucílago de café presentaron variaciones en cuanto al contenido de azúcar y acidez (Tabla 4). Esta disminución de azúcar y aumento de acidez en las muestras con mayor tiempo de exposición (48 y 72h) con respecto a la muestra con pulpa fresca puede deberse a la fermentación ácido láctica que se genera en la pulpa de café, en la cual, al tenerse un crecimiento microbiológico se reduce el contenido de azúcar y se eleva la acidez (Elhalis et al., 2023).

Propiedad	T1	T2	T3
Densidad (g/cm ³)	1.020	1.013	1.002
pH	4.83	3.95	3.86
Viscosidad (cP)	23.69	23.05	22.41
°Brix	5.80	3.30	2.70
Azucares fermentables (g/L)	67.21	40.78	38.61
Glucosa (g/L)	5.31	1.52	1.24
Amonio (ppm)	0	0	0
Fosfato (ppm)	100	40	30

Tabla 4. Propiedades físicas y químicas de los extractos de café a diferentes tiempos de exposición ambiental.

La mayor cantidad de azúcar se obtuvo en el extracto de pulpa fresca, algo que sin duda favorece su viabilidad como sustrato para el crecimiento de *C. necátor*. Por ende, este sustrato permite una mayor producción de PHA.

El contenido de sólidos disueltos (medido como °Brix) en los extractos preparados igualmente disminuyó según el tiempo de fermentación al aire libre, lo que se traduce en un menor contenido de nutrientes disponibles para el cultivo de microorganismos.

Se evidencia ausencia de amonio en los extractos de café, lo que a su vez también es ventajoso en términos de la limitación de nitrógeno requerida para impulsar la producción de PHAs.

Diversos estudios afirman que una mayor relación Carbono/Nitrógeno está asociada con una acumulación más significativa de biopolímero (Ahn et al., 2015). Así, en los

medios utilizados, el amonio provendrá de las adiciones de las sales que constituyen los elementos traza y del sulfato de amonio presente en el medio MSM.

La reducción del contenido de fosfato en los extractos de mucílago y pulpa de café entre la muestra fresca y aquellas expuestas a 48 y 72 horas puede explicarse por
5 varios factores relacionados con la degradación biológica y química del fosfato en presencia de microorganismos y procesos de fermentación natural (Orrego et al., 2018). Las bacterias y levaduras presentes en el mucílago sujeto a un tiempo de exposición prolongado, como T₂ y T₃, pueden utilizar por más tiempo compuestos fosforados como nutrientes en su metabolismo, lo que explicaría la reducción de los
10 fosfatos detectables.

En consecuencia, el procedimiento objeto de la presente descripción permite evidenciar que el extracto de mucílago y pulpa de café configuran una alternativa eficaz para la producción de PHB utilizando *C. necator*.

Este residuo agroindustrial destaca por su alta disponibilidad en regiones cafeteras
15 y la simplicidad de su pretratamiento, además de su elevado contenido de azúcares fermentables que favorecen, tanto el crecimiento microbiano como la acumulación intracelular de biopolímero.

El extracto fresco (T1) mostró los mejores resultados en biomasa (6.30 g/L) y acumulación intracelular de PHB (56.3%), superando tanto a los extractos
20 fermentados (T2 y T3) como al medio estándar MSM, lo que posiciona a este sustrato como una opción económicamente viable para procesos biotecnológicos.

Los espectros FTIR identificaron grupos funcionales clave como el carbonilo (C=O) y enlaces alifáticos (C-H), observándose mayor intensidad en el polímero obtenido con T1, lo que sugiere una estructura más ordenada.

25 La comparación con el medio estándar MSM evidenció que el uso de residuos de café no solo es competitivo en términos de rendimiento, sino que también promueve esquemas de economía circular, al aprovechar un subproducto abundante y de bajo costo.

En este contexto, el uso de extracto fresco de mucílago y pulpa de café representa
30 una alternativa sostenible para la producción de biopolímeros, permitiendo tanto la valorización de residuos agroindustriales como la reducción de costos en la producción de PHB. Estos hallazgos posicionan este enfoque como una solución viable para la integración de residuos del beneficio de café en procesos biotecnológicos sostenibles, contribuyendo a mitigar la contaminación plástica y
35 promover la transición hacia materiales más amigables con el medio ambiente.

Aunque la presente invención ha quedado descrita con las realizaciones preferentes mostradas, queda entendido que las modificaciones y variaciones que conserven el espíritu y el alcance de esta invención se entienden dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

5

10

15

20

25

Referencias

- Ahn, J., Jho, E. H., & Nam, K. (2015). Effect of C/N ratio on polyhydroxyalkanoates (PHA) accumulation by *Cupriavidus necator* and its implication on the use of rice straw hydrolysates. *Environmental Engineering Research*, 20(3), 246–253.
5 <https://doi.org/10.4491/eer.2015.055>
- Alves, A. A., Siqueira, E. C., Barros, M. P. S., Silva, P. E. C., & Houllou, L. M. (2023). Polyhydroxyalkanoates: a review of microbial production and technology application. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 20(3), 3409–3420.
10 <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04213-9>
- Ascencio-Galván, M. L., López-Agudelo, V. A., Gómez-Ríos, D., & Ramirez-Malule, H. (2024). A bibliometric landscape of polyhydroxyalkanoates production from low-cost substrates by *Cupriavidus necator* and its perspectives for the Latin American bioeconomy. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 12(2), 48.
15 <https://doi.org/10.7324/JABB.2024.159864>
- Dorado, I., Pineda, L., Ascencio-Galván, M. L., López-Agudelo, V. A., Caicedo, J. C., Gómez-Ríos, D., & Ramírez-Malule, H. (2024). Valorization of Dextrose from Cassava Starch and Sugarcane Vinasse as Polyhydroxyalkanoates by Submerged Cultures of *Cupriavidus necator*: A Physicochemical–Biotechnological Approach. *ChemEngineering*, 8(4), 73.
20 <https://doi.org/10.3390/chemengineering8040073>
- Elhalis, H., Cox, J., & Zhao, J. (2023). Coffee fermentation: Expedition from traditional to controlled process and perspectives for industrialization. In *Applied Food Research* (Vol. 3, Issue 1). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100253>
- Fook, L. Q., Tan, H. T., Lakshmanan, M., Zainab-L, I., Ahmad, A., Ang, S. L., & Sudesh, K. (2024). Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis from Waste Cooking Oils by *Cupriavidus necator* Strains Harbours phaC BP-M-CPF4. *Journal of Polymers and the Environment*.
25 <https://doi.org/10.1007/s10924-023-03166-5>
- Gahlawat, G., Kumari, P., & Bhagat, N. R. (2020). Technological Advances in the Production of Polyhydroxyalkanoate Biopolymers. *Current Sustainable/Renewable Energy Reports*, 7(3), 73–83. <https://doi.org/10.1007/s40518-020-00154-4>
30
- García, A., Pérez, D., Castro, M., Urtuvia, V., Castillo, T., Díaz-Barrera, A., Espín, G., & Peña, C. (2019). Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate [P(3HB)] of ultra-high molecular weight using fed-batch cultures of *Azotobacter vinelandii* OPNA strain. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 94(6), 1853–1860.
35 <https://doi.org/10.1002/jctb.5959>
- González-Rojo, S., Paniagua-García, A. I., & Díez-Antolínez, R. (2023). Biotransformation of starch-based wastewater into bioplastics: Optimization of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* DSM 545 using potato wastewater hydrolysate. *Water Research*, 247. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120766>
- Hernández-Herreros, N., Rivero-Buceta, V., Pardo, I., & Prieto, M. A. (2024). Production of poly(3-hydroxybutyrate)/poly(lactic acid) from industrial wastewater by wild-type *Cupriavidus necator* H16. *Water Research*, 249. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120892>
40
- McAdam, B., Fournet, M. B., McDonald, P., & Mojicevic, M. (2020). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and factors impacting its chemical and mechanical
45

- characteristics. In *Polymers* (Vol. 12, Issue 12, pp. 1–20). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/polym12122908>
- Meereboer, K. W., Misra, M., & Mohanty, A. K. (2020). Review of recent advances in the biodegradability of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics and their composites. *Green Chemistry*, 22(17), 5519–5558. <https://doi.org/10.1039/D0GC01647K>
- Ochoa, S., García, C., & Alcaraz, W. (2020). Real-time optimization and control for polyhydroxybutyrate fed-batch production at pilot plant scale. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95(12), 3221–3231. <https://doi.org/10.1002/jctb.6500>
- Orrego, D., Zapata-Zapata, A. D., & Kim, D. (2018). Optimization and scale-up of coffee mucilage fermentation for ethanol production. *Energies*, 11(4).
<https://doi.org/10.3390/en11040786>
- Puerta-Quintero, G. I., & Ríos-Arias, S. (2011). Composición química del mucílago de café, según el tiempo de fermentación y refrigeración. *Cenicafé*, 62(2), 23–40.
<https://www.cenicafe.org/es/documents/2.pdf>
- Razzaq, S., Shahid, S., Farooq, R., Noreen, S., Perveen, S., & Bilal, M. (2024). Sustainable bioconversion of agricultural waste substrates into poly (3-hydroxyhexanoate) (mcl-PHA) by *Cupriavidus necator* DSM 428. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(8), 9429–9439.
<https://doi.org/10.1007/s13399-022-03194-6>
- Riedel, S. L., & Brigham, C. J. (2020). Inexpensive and waste raw materials for PHA production. In *The handbook of polyhydroxyalkanoates* (1 st Edition, pp. 1–19).
- Vicente, D., Proença, D. N., & Morais, P. V. (2023). The Role of Bacterial Polyhydroalkanoate (PHA) in a Sustainable Future: A Review on the Biological Diversity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(4), 2959.
<https://doi.org/10.3390/ijerph20042959>
- Żytner, P., Kumar, D., Elsayed, A., Mohanty, A., Ramarao, B. V., & Misra, M. (2023). A review on polyhydroxyalkanoate (PHA) production through the use of lignocellulosic biomass. *RSC Sustainability*, 1(9), 2120–2134. <https://doi.org/10.1039/D3SU00126A>
- Dahman, Y., & Ugwu, C. U. (2014). Production of green biodegradable plastics of poly(3-hydroxybutyrate) from renewable resources of agricultural residues. *Bioprocess and biosystems engineering*, 37(8), 1561–1568. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1128-2>
- Franz, A., Rehner, R., Kienle, A., & Grammel, H. (2012). Rapid selection of glucose-utilizing variants of the polyhydroxyalkanoate producer *Ralstonia eutropha* H16 by incubation with high substrate levels. *Letters in applied microbiology*, 54(1), 45–51.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03171.x>
- Beaulieu, M., Beaulieu, Y., Jolleville, J., Linard, M. É., Pandian, S., & Goulet, J. (1995). Influence of Ammonium Salts and Cane Molasses on Growth of *Alcaligenes eutrophus* and Production of Polyhydroxybutyrate. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 61, Issue 1).
- Ertan, F., Keskinler, B., & Tanriseven, A. (2021). Exploration of *Cupriavidus necator* ATCC 25207 for the Production of Poly(3-hydroxybutyrate) Using Acid Treated Beet Molasses. *Journal of Polymers and the Environment*, 29(7), 2111–2125.
<https://doi.org/10.1007/s10924-020-02020-2>
- Esquivel, P., & Jiménez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46(2), 488–495.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.028>

- Murthy, P. S., & Madhava Naidu, M. (2012). Sustainable management of coffee industry by-products and value addition - A review. In *Resources, Conservation and Recycling* (Vol. 66, pp. 45–58). <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2012.06.005>
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., & Soccol, V. T. (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 74(1), 69–80. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00142-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00142-X)
- Sen, K. Y., Hussin, M. H., & Baidurah, S. (2019). Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Cupriavidus necator* from various pretreated molasses as carbon source. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.006>