

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción fermentativa de polihidroxibutirato (PHB) a partir de *Cupriavidus necátor* caracterizado porque comprende las etapas de:
 - Proveer mucílago y extracto de pulpa de café como sustrato;
 - Reducir tamaño del sustrato en húmedo;
 - Separar fragmentos de cáscara y partículas sólidas;
 - Diluir el extracto resultante;
 - Cultivar el microorganismo *Cupriavidus necátor* en un medio que incluye el extracto diluido de pulpa y mucílago de café expuesto a condiciones ambientales entre 0 a 72 horas;
 - Separar la biomasa presente en el medio de cultivo;
 - Obtener el polihidroxibutirato (PHB)
2. El procedimiento de la reivindicación 1 caracterizado porque la reducción de tamaño del sustrato en húmedo se realiza mediante trituración en una relación sólido-líquido de 1.25.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 caracterizado porque la cepa de *Cupriavidus necátor* es *Cupriavidus necátor* DSM 428.
4. El procedimiento de la reivindicación 1 caracterizado porque la separación de fragmentos de cáscara y partículas se realiza mediante filtración.

5. El procedimiento de la reivindicación 1 caracterizado porque la dilución se realiza hasta una concentración de sólidos disueltos de 2° Brix.
6. El procedimiento de la reivindicación 1 caracterizado porque el medio de cultivo del microorganismo *Cupriavidus necátor DSM 428* comprende, además, una mezcla de minerales que incluye:
 - Cloruro de calcio (80 mg/L);
 - Fosfato de sodio (40 mg/L);
 - Sulfato ferroso (5 mg/L);
 - Sulfato de zinc (7.5 mg/L);
 - Cloruro de manganeso (0.5 mg/L).
7. El procedimiento de la reivindicación 1 caracterizado porque la separación de la biomasa presente en el medio de cultivo se realiza mediante centrifugación a 6.000 RPM durante 6 minutos.
8. El procedimiento de la reivindicación 1 caracterizado porque comprende, además, una etapa de lisis celular que incluye centrifugar el caldo de cultivo a 5.000 rpm durante 10 minutos; disolver los pellets en 5 mL de hipoclorito de sodio y 5 mL de cloroformo.
9. El procedimiento de la reivindicación 1 caracterizado porque comprende, además, una etapa de precipitación del PHB donde se añade alcohol isopropílico, y el precipitado resultante se seca a 70°C durante 24 horas.
10. El procedimiento de las reivindicaciones 1 y 6 caracterizado porque el medio de extracto diluido de mucílago y pulpa de café se ajusta a un pH de 6.8, se autoclava durante 15 minutos a 121 °C y se inocula con *Cupriavidus necátor DSM 428* en una proporción de 10% v/v.