



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112015021239-5 B1



(22) Data do Depósito: 12/03/2014

(45) Data de Concessão: 31/08/2021

(54) Título: MÉTODO PARA PROPAGAR UM ORGANISMO QUE PODE CONVERTER UM OU MAIS MONOSSACARÍDEOS EM UM PRODUTO BIOQUÍMICO

(51) Int.Cl.: C12P 7/08.

(30) Prioridade Unionista: 13/03/2013 US 13/798,617.

(73) Titular(es): POET RESEARCH INCORPORATED.

(72) Inventor(es): NEELAKANTAM V. NARENDRANATH.

(86) Pedido PCT: PCT US2014024014 de 12/03/2014

(87) Publicação PCT: WO 2014/159529 de 02/10/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 01/09/2015

(57) Resumo: PROPAGAR UM ORGANISMO E MÉTODOS E COMPOSIÇÕES RELACIONADOS. A presente invenção é relacionada a métodos de propagar um ou mais organismos usando-se uma fonte de carbono que inclui xilose (por exemplo, xarope de xilose da matéria-prima lignocelulósica pré-tratada) e/ou uma fonte de nutriente que inclui um componente de resíduo de destilaria (por exemplo, resíduo de destilaria fino derivado de um processo de milho a etanol) no meio de propagação. Os organismos incluem aqueles que podem converter um ou mais monossacarídeos em um álcool por intermédio de fermentação, tal como levedura. A presente invenção também é dirigida a composições relacionadas.

“MÉTODO PARA PROPAGAR UM ORGANISMO QUE PODE CONVERTER UM OU MAIS MONOSSACARÍDEOS EM UM PRODUTO BIOQUÍMICO”

REFERÊNCIA CRUZADA AOS APPLICATIONS RELACIONADOS

[001]Este pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente Não Provisório U.S. Nº 13/798.617, depositado em 13 de Março de 2013 e intitulado “PROPAGAR UM ORGANISMO E MÉTODOS E COMPOSIÇÕES RELACIONADOS” pedido este que é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002]A presente invenção refere-se a propagar um ou mais organismos que podem converter um ou mais monossacarídeos em um álcool, tal como etanol, por intermédio de fermentação.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[003]Organismos que podem converter um ou mais monossacarídeos em um ou mais produtos bioquímicos tais como biocombustíveis são bem conhecidos. Por exemplo, tanto levedura geneticamente modificada (referida como GM) quanto levedura não geneticamente modificada (referida como não-GM) são organismos bem conhecidos que podem converter açúcares em álcoois tais como etanol e butanol por intermédio de fermentação.

[004]Frequentemente, tais organismos são propagados pelo fabricante de modo a produzir uma massa celular desejada por um usuário, por exemplo, um fabricante de etanol. Entretanto, muitos organismos são relativamente bastante caros quando comparados a outros. Por exemplo, muitas leveduras GM podem ser relativamente muito mais caras do que leveduras não-GM. Assim, em algumas situações, pode ser economicamente desejável para um fabricante de etanol adquirir tão pouco de uma levedura GM quanto possível e depois reproduzir a levedura para fornecer uma quantidade suficiente para fermentação.

[005]Entretanto, propagar a levedura pode ser desafiante. Por exemplo,

alguns organismos tais como *Saccharomyces cerevisiae* podem ser suscetíveis ao “efeito Crabtree” bem conhecido quando cultivados em glicose, mesmo sob condições altamente aeradas, se a concentração de glicose no meio for muito alta (por exemplo, excede 5 gramas por Litro). Se o nível de glicose se torna muito alto, a levedura pode começar a fabricar etanol através de uma via fermentativa ao invés de produzir mais levedura através de uma via de respiração (isto é, supressão da respiração por níveis altos de glicose). Para ajudar a impedir o efeito Crabtree, fabricantes de levedura frequentemente cultivam levedura por intermédio de um processo de alimentação descontínuo ou lento, onde a fonte de carbono (glicose) para produzir biomassa de levedura é introduzida em uma taxa que evita produção de etanol indevida.

[006]Entretanto, sistemas descontínuos podem ser relativamente caros e desafiante para fabricantes de etanol para controlar e manejar.

[007]Existe um desejo para desenvolver métodos de propagar organismos tais como levedura usando protocolos de processo contínuo ao invés de protocolos de processo descontínuo porque processos contínuos podem ser relativamente mais simples de controlar e podem ser mais tolerantes à variação em parâmetros de processo (por exemplo, com respeito a níveis variados de uma fonte de carbono e ao efeito Crabtree). Além disso, existe um desejo para usar componentes alternativos, mais acessíveis, e/ou mais econômicos usados em um meio de propagação (por exemplo, fonte de carbono, fonte de nutriente, e semelhantes).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[008]A presente invenção refere-se a métodos de propagar um organismo que usam uma fonte de nutriente incluindo um componente de resíduo de destilaria (por exemplo, resíduo de destilaria fino), preferivelmente derivado de um processo de milho a etanol. Surpreendentemente, incluir um componente de resíduo de destilaria como parte de (ou todo) uma fonte de nutriente de um meio de propagação pode fornecer resultados tão bons quanto, ou melhores, quando comparado a uma fonte de

nutriente convencional tal como extrato de levedura. Além disso, foi descoberto que quantidades muito baixas de massa celular inicial podem ser usadas em propagar um organismo tal como levedura (por exemplo, tão baixo quanto 1,0 grama de levedura por litro de meio, tão baixo quanto 0,02 gramas de levedura por litro de meio, ou ainda mais baixo).

[009]Também, incluir um componente de resíduo de destilaria no componente de nutriente de um meio de propagação permite o uso de um subproduto de um processo de milho a etanol em um processo de etanol lignocelulósico. Isto pode ser especialmente conveniente onde os dois processos são co-localizados.

[010]Além disso, a presente invenção refere-se a métodos de propagar um organismo que usam uma fonte de nutriente que inclui um componente de resíduo de destilaria (por exemplo, resíduo de destilaria fino) e uma fonte de carbono tendo xilose. Para organismos que podem usar xilose ao invés ou além de glicose para propagação, usar xilose pode evitar o efeito Crabtree observado com o uso de glicose. Por exemplo, o nível de xilose pode variar em uma faixa ampla (por exemplo, incluindo um nível correspondendo ao nível de glicose que induziria o efeito Crabtree), no entanto, propagação por intermédio de via respiratória aeróbica continua sem mudar para uma via fermentativa anaeróbica para produzir etanol a um grau indevido. Organismos que podem usar xilose desta maneira incluem algumas leveduras geneticamente modificadas. Vantajosamente, usar xilose pode impedir que a levedura “contaminante” (tal como *S. cerevisiae* do tipo selvagem) compita com o organismo que é alvejado para propagação.

[011]Além disso, porque o efeito Crabtree pode ser evitado usando xilose, a propagação pode ser realizada usando um processo contínuo.

[012]Finalmente, incluir xilose na fonte de carbono pode condicionar vantajosamente a levedura ao ambiente esperado na fermentação, o que pode ajudar a levedura desempenhar mais eficazmente.

[013]De acordo com um aspecto da presente invenção, um método de propagar um organismo que pode converter um ou mais monossacarídeos em um produto bioquímico, o método incluindo:

fornecer uma primeira massa celular do organismo;

fornecer uma fonte de carbono que pode suportar o crescimento da primeira massa celular do organismo, em que a fonte de carbono compreende pelo menos xilose;

fornecer uma fonte de nutriente que pode suportar o crescimento da primeira massa celular do organismo, em que a fonte de nutriente compreende um componente de resíduo de destilaria;

combinar pelo menos a fonte de carbono e a fonte de nutriente para formar um meio para propagar o organismo; e

combinar a primeira massa celular do organismo com a fonte de carbono e a fonte de nutriente para propagar a primeira massa celular do organismo por um período de tempo para formar uma segunda massa celular do organismo.

[014]De acordo com um outro aspecto da presente invenção, um método de propagar um organismo que pode converter um ou mais monossacarídeos em um produto bioquímico, o método incluindo:

fornecer uma primeira massa celular do organismo;

fornecer uma fonte de carbono que pode suportar o crescimento da primeira massa celular do organismo, em que a fonte de carbono compreende um ou mais monossacarídeos;

fornecer uma fonte de nutriente que pode suportar o crescimento da primeira massa celular do organismo, em que a fonte de nutriente compreende um componente de resíduo de destilaria;

combinar pelo menos a fonte de carbono e a fonte de nutriente para formar um meio para propagar o organismo, em que a primeira massa celular está presente

em uma quantidade menor do que 1,0 grama de organismos por litro de meio; e

combinar a primeira massa celular do organismo com a fonte de carbono e a fonte de nutriente para propagar a primeira massa celular do organismo por um período de tempo para formar uma segunda massa celular do organismo.

[015]De acordo com um outro aspecto da presente invenção, uma composição inclui:

uma primeira massa celular de um organismo que pode converter um ou mais monossacarídeos em um produto bioquímico, em que o organismo está presente em uma quantidade de menos do que 1,0 grama de organismos por litro da composição;

xilose em uma quantidade na faixa de 0,1 a 10 por cento em peso da composição; e

um componente de resíduo de destilaria em uma quantidade na faixa de 5 a 35 gramas de sólidos por litro da composição.

[016]Em formas de realização preferidas, o organismo inclui *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificado, especialmente *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificado que pode converter xilose e glicose a etanol.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[017]A FIGURA 1 mostra um fluxograma de um sistema de propagação de acordo com a presente invenção para propagar um organismo que pode converter um ou mais monossacarídeos em um produto bioquímico.

[018]A FIGURA 2 mostra um fluxograma de um sistema de propagação de acordo com a presente invenção para propagar um organismo que pode converter um ou mais monossacarídeos em um produto bioquímico no contexto de um sistema de etanol lignocelulósico que é co-localizado com um sistema de grão a etanol.

[019]As FIGURAS 3A e 3B mostram uma tabela e gráfico, respectivamente, do etanol produzido por uma cepa geneticamente modificada de *S. cerevisiae* em meios contendo vários níveis de xilose suplementada com extrato de levedura,

peptona ou com resíduo de destilaria fino como uma fonte de nutriente.

[020]As FIGURAS 4A e 4B mostram uma tabela e gráfico, respectivamente, do etanol produzido depois da fermentação por uma cepa geneticamente modificada de *S. cerevisiae* em meios com 11 por cento p/v de xilose suplementada com resíduo de destilaria fino em vários níveis.

[021]A FIGURA 5A mostra um gráfico que ilustra o crescimento celular de uma cepa geneticamente modificada de *S. cerevisiae* usando xilose pura como a fonte de carbono e resíduo de destilaria fino de uma biorrefinaria de milho-etanol como uma fonte de nutriente.

[022]A FIGURA 5B mostra um gráfico que ilustra o crescimento celular de uma cepa geneticamente modificada de *S. cerevisiae* usando solução de xilose do pré-tratamento com ácido diluído da biomassa lignocelulósica como a fonte de carbono e resíduo de destilaria fino de uma biorrefinaria de milho-etanol como uma fonte de nutriente.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[023]A presente invenção refere-se a propagar um organismo que pode converter um ou mais monossacarídeos em um produto bioquímico. Propagar um tal organismo pode ser útil em muitos contextos. Por exemplo, a propagação pode ser usada para reproduzir uma população inicial (por exemplo, “iniciadora”) do organismo de modo a gerar uma população grande do organismo que é suficiente para o uso na fermentação para fabricar um produto de fermentação. Um fluxograma de processo exemplar é ilustrado na Figura 1. Como mostrado na Figura 1, uma primeira massa celular do organismo 100, uma fonte de carbono 105, e uma fonte de nutriente 110 são combinadas em um sistema de propagação 115 de modo que a primeira massa celular 100 possa reproduzir e formar uma segunda massa celular 120. A segunda massa celular 120 depois pode ser usada em um sistema de fermentação 125 para converter um ou mais monossacarídeos (por exemplo, de uma biomassa

lignocelulósica pré-tratada) 130 em um produto de fermentação 135 que inclui um produto bioquímico tal como um biocombustível (por exemplo, etanol, butanol, e semelhantes).

[024]Organismos que podem converter um ou mais monossacarídeos em um produto bioquímico são bem conhecidos e incluem, por exemplo, bactérias e/ou fungos tais como levedura. Os produtos bioquímicos de produto podem variar dependendo das condições que são fornecidas. Em muitas formas de realização, os produtos bioquímicos incluem biocombustíveis tais como etanol, butanol, e semelhantes. Em formas de realização preferidas, o organismo inclui um ou mais organismos etanologênicos (isto é, “etanologenes”). Como usado aqui, um “etanologene” refere-se a um microorganismo que pode converter um ou mais monossacarídeos (por exemplo, glicose, xilose, e semelhantes) em pelo menos etanol. O organismo etanologênico pode ser um organismo procariótico e/ou um organismo eucariótico tal como *Escherichia coli*, *Klebsiella oxitoca*, *Zymomonas mobilis*, *Clostridium thermocellum*, *Saccharomyces cerevisiae*, e/ou *Pichia stipitis*. Em formas de realização preferidas, um etanologene inclui a levedura capaz de metabolizar pelo menos xilose a etanol. Um exemplo de levedura que pode metabolizar pelo menos xilose a etanol inclui levedura recombinante geneticamente modificada. Em formas de realização preferidas, tal levedura geneticamente modificada inclui *Saccharomyces cerevisiae* recombinante geneticamente modificada. De acordo com uma forma de realização, o etanologene é uma cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* alterada para converter (isto é, fermentar) xilose e glicose a etanol (isto é, uma levedura geneticamente modificada derivada de um organismo como descrito na Patente U.S. Nº 7.622.284).

[025]Como usado aqui, uma “fonte de carbono” refere-se a um ou mais compostos que incluem pelo menos um átomo de carbono e podem ser usados por um organismo tal como um etanologene para crescer e/ou reproduzir para criar uma massa celular aumentada do etanologene. Fontes de carbono exemplares incluem

monossacarídeos tais como glicose, frutose, galactose, manose, xilose, e semelhantes; dissacarídeos tais como lactose, maltose, sacarose, celobiose e semelhantes; oligossacarídeos; polissacarídeos tais como celulose, hemiceluloses, amido, xilano e semelhantes; substratos de carbono único incluindo apenas um átomo de carbono tal como metanol; e polióis tais como glicerol, mas não limitados a estes.

[026]Em uma forma de realização preferida, a fonte de carbono inclui pelo menos xilose. Em algumas formas de realização, a fonte de carbono pode incluir substancialmente toda xilose com pouca a nenhuma glicose. Xilose para o uso na presente invenção pode ser obtida de muitas fontes diferentes. Preferivelmente, pelo menos uma porção da xilose usada em um método de propagar etanogene de acordo com a presente invenção inclui solução de xilose que é obtida do tratamento de uma matéria-prima tal como matéria-prima lignocelulósica que deve ser fermentada pelo etanogene para fabricar etanol. Tratar a matéria-prima lignocelulósica em uma maneira que produz uma solução de xilose é bem conhecido e é divulgado em, por exemplo, U.S. Serial Número 12/717.002 tendo data de depósito em 3 de Março de 2010; Pat. U.S. Nº 5.424.417 (Torget *et al.*), Pat. U.S. Nº 6.022.419 (Torget *et al.*), em que as totalidades dos ditos documentos são incorporadas aqui por referência para todos os propósitos.

[027]Tratar a matéria-prima lignocelulósica para fornecer uma xilose para o uso em propagar um organismo de acordo com a presente invenção será descrito por referência à FIGURA 2. A FIGURA 2 ilustra um fluxograma de uma biorrefinaria que inclui uma instalação de produção de etanol lignocelulósico (que produz etanol a partir de açúcares obtidos pré-tratando-se o material lignocelulósico) co-localizado com uma instalação de produção de etanol à base de milho (que produz etanol a partir do amido contido em grãos de milho), Co-localizar as duas instalações de produção de etanol pode permitir que certos sistemas de plantas sejam compartilhados tais como, por exemplo, sistemas para desidratação, armazenamento, desnaturação e transporte de

etanol, sistemas de geração de energia/combustível-a-energia, sistemas de manejo e controle de planta, e outros sistemas, fibra de milho (um componente do grão de milho), que pode ser feita disponível quando o grão de milho é preparado por moagem (por exemplo, por fracionamento) na instalação de produção de etanol à base de milho, podem ser fornecidos à instalação de produção de etanol lignocelulósico como uma matéria-prima. Fontes de combustível ou energia tais como metano ou lignina da instalação de produção de etanol lignocelulósico podem ser usadas para fornecer energia a qualquer uma ou ambas as instalações co-localizadas.

[028]De acordo com outras formas de realização alternativas, uma biorrefinaria (por exemplo, uma instalação de produção de etanol lignocelulósico) pode ser co-localizada com outros tipos de usinas e instalações, por exemplo uma usina de energia elétrica, uma instalação de tratamento de resíduos, uma serraria, uma usina de fabricação de papel ou uma instalação que processa produtos agrícolas.

[029]Como mostrado na FIGURA 2, uma matéria-prima lignocelulósica 260 é pré-tratada no sistema 265 de modo a criar uma solução de xilose 270 que pode ser usada em um sistema de propagação 115 de acordo com a presente invenção.

[030]A matéria-prima exemplar 260 inclui biomassa de todos os tipos tais como material de fibra de um ou mais de grãos e/ou um ou mais substratos lignocelulósicos tais como madeiras duras, gramíneas, madeira mole, papel e polpa residuais, resíduos municipais, resíduos agrícolas tais como palhas, espigas de milho, palha de milho, e misturas destes. A matéria-prima lignocelulósica é bem conhecida e inclui celulose, hemicelulose e lignina. Em uma forma de realização preferida, a matéria-prima para produzir xilose inclui material da planta do milho, tais como espigas de milho, cascas e folhas e hastes. Por exemplo, o material da planta pode incluir (em peso) até 100 por cento de espigas, até 100 por cento de cascas/folhas, aproximadamente 50 por cento de espigas e aproximadamente 50 por cento de cascas/folhas, aproximadamente 30 por cento de espigas e aproximadamente 50 por cento de

cascas/folhas e aproximadamente 20 por cento de hastes, ou quaisquer outras combinações de espigas, cascas/folhas e hastes da planta do milho. Tipicamente, hastes de milho incluem a metade superior ou porção de três quartos da haste. De acordo com uma forma de realização alternativa, o material da planta lignocelulósico pode incluir fibra do grão de milho (por exemplo, em alguma combinação com outro material da planta). Em formas de realização exemplares, o material da planta lignocelulósico da biomassa (da planta do milho) inclui (em peso) celulose em cerca de 30 a 55 por cento, hemicelulose em cerca de 20 a 50 por cento, e lignina em cerca de 10 a 25 por cento. Em algumas formas de realização, o material da planta lignocelulósico da biomassa (espigas, cascas/folhas e porções da haste da planta do milho) inclui (em peso) celulose em cerca de 35 a 45 por cento, hemicelulose em cerca de 24 a 42 por cento, e lignina em cerca de 12 a 20 por cento.

[031]O sistema de pré-tratamento 265 pode incluir um ou mais sub-sistemas para preparar e pré-tratar a matéria-prima 260. Um sub-sistema de preparação de biomassa pode incluir um aparelho para recepção/d Descarregamento da biomassa, limpeza (isto é remoção da matéria estranha), trituração (isto é moagem, redução ou densificação) e transporte e condução para processamento na instalação. De acordo com uma forma de realização exemplar, a biomassa na forma de espigas de milho e forragem pode ser liberado para a biorrefinaria e armazenado (por exemplo, em fardos, pilhas ou caixas, etc.) e manejado para o uso na instalação.

[032]De acordo com outras formas de realização exemplares, um sub-sistema de preparação da biorrefinaria pode ser configurado para preparar qualquer um de uma variedade ampla de tipos de biomassa (isto é material da planta) para tratamento e processamento em etanol e outros bioprodutos na usina. De acordo com uma forma de realização preferida, a biomassa inclui material da planta da planta do milho que é preparado e limpo em um sub-sistema de preparação (não mostrado).

[033]Depois da preparação, a biomassa pode ser pré-tratada de acordo com

técnicas bem conhecidas para criar açúcares C5 e/ou C6. Por exemplo, a biomassa pode ser misturada com água em uma pasta fluida para facilitar a quebra (por exemplo, por hidrólise) da biomassa nos açúcares C5 e/ou C6. Em algumas formas de realização, o sistema de pré-tratamento 265 pode incluir adicionar um ácido à biomassa preparada para facilitar a quebra da biomassa para separação em um componente líquido (corrente C5 da qual açúcares C5 fermentáveis podem ser recuperados) e um componente com alto teor de sólidos (corrente C6 da qual açúcares C6 fermentáveis podem ser acessados).

[034]De acordo com uma forma de realização preferida, um ácido pode ser aplicado à biomassa em um vaso de reação sob condições de operação determinadas (isto é concentração ácida, pH, temperatura, tempo, pressão, carga de sólidos, taxa de fluxo, fornecimento de água ou vapor de processo, etc.) e a biomassa pode ser agitada/misturada no vaso de reação para facilitar a quebra da biomassa. De acordo com formas de realização exemplares, um ácido tal como ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido acético, etc. (ou uma formulação/mistura de ácidos) pode ser aplicado à biomassa. De acordo com uma forma de realização particularmente preferida, ácido sulfúrico é aplicado à biomassa no pré-tratamento.

[035]Em formas de realização exemplares, o componente líquido (corrente C5) inclui água; açúcares dissolvidos (tais como xilose, arabinose e glicose) que podem ser feitos disponíveis para fermentação em etanol e/ou propagação de um etanogene; ácidos e outros componentes solúveis recuperados da hemicelulose. De acordo com uma forma de realização exemplar, o componente líquido pode compreender aproximadamente 5 a 7 por cento de sólidos (isto é sólidos colocados em suspensão/residuais tais como hemicelulose, celulose e lignina parcialmente hidrolisadas). De acordo com uma forma de realização particularmente preferida, o componente líquido incluirá pelo menos 2 a 4 por cento de xilose (em peso); de acordo com outras formas de realização, o componente líquido incluirá não menos do que 1 a 2

por cento de xilose (em peso). Em algumas formas de realização, o pré-tratamento da biomassa pode produzir um componente líquido que inclui (em peso) xilose em não menos do que 1,0 por cento e um componente com alto teor de sólidos que compreende (em peso) celulose (da qual glicose pode ser feita disponível) em não menos do que 40 por cento.

[036] Pelo menos uma porção da xilose criada no sistema 265 pode ser transferida para o sistema de propagação 115 por intermédio da corrente 270 e usada como uma fonte de carbono como descrito aqui para propagar um organismo. Como mostrado na FIGURA 2, a corrente de xilose 270 do sistema de pré-tratamento 265 pode ser opcionalmente tratada no sistema 275 de modo a, por exemplo, remover e/ou recuperar subprodutos, tais como sólidos, ácidos orgânicos, furfural, e/ou semelhantes.

[037] Em muitas formas de realização, alguma da xilose criada no sistema 265 será transferida para o sistema de fermentação 125, junto com pelo menos uma porção dos açúcares C6 criados no sistema 265, e convertida em etanol pelos organismos produzidos no sistema 115.

[038] O produto de fermentação do sistema de fermentação 125 é depois fornecido a um sistema de destilação 280, onde o etanol é recuperado.

[039] Referindo-se à FIGURA 1 novamente, xilose pode ser fornecida como parte (ou todo) da fonte de carbono 105 em uma quantidade de modo a ajudar a reproduzir (propagar) uma população desejada de um organismo (por exemplo, etanologene) dentro de uma quantidade de tempo desejada. A quantidade de xilose fornecida pode depender de fatores tais como o tipo e quantidade de outras fontes de carbono presentes, o tipo e quantidade de fonte de nutriente presente, pH, temperatura, período de tempo desejado para propagação, e semelhantes. Em algumas formas de realização, a xilose é fornecida em uma quantidade na faixa de 0,1 a 10 por cento em peso de meio, preferivelmente 0,5 a 5 por cento em peso de meio (o meio é debatido abaixo).

[040] Além de uma fonte de carbono, uma fonte de nutriente também é incluída para ajudar a propagar organismos tais como etanologenes. Como usado aqui, uma “fonte de nutriente” refere-se a um ou mais materiais que podem ser usados por um organismo tal como um etanologene para cultivar e/ou reproduzir para criar uma massa celular aumentada do etanologene. Fontes convencionais de fontes de nutriente são bem conhecidas e incluem, por exemplo, extrato de levedura. Nutrientes convencionais que podem ser usados para propagação de organismos tais como levedura podem ser comercialmente obtidos sob o nome comercial GO-FERM da Scott Laboratories Ltd, Pickering, ON, Canada.

[041] De acordo com a presente invenção, a fonte de nutriente inclui um componente de resíduo de destilaria. O resíduo de destilaria é bem conhecido e é um subproduto da destilação de um produto de fermentação. Por exemplo, um processo bem conhecido para fabricar resíduo de destilaria é um com processo de grão a etanol e será explicado com respeito à FIGURA 2. Como mostrado na FIGURA 2, o grão tal como milho, cevada, trigo, e/ou sorgo 200 é preparado no sistema 205 de modo que ele possa ser fermentado no sistema 210 em um produto de fermentação que inclui um ou mais produtos bioquímicos tais como etanol. Qualquer um do grão integral pode ser usado ou apenas uma ou mais porções do grão podem ser usadas. Por exemplo, o sistema 205 pode moer grãos integrais para fermentação ou fracionar os grãos em uma ou mais porções separadas antes da moagem. O resíduo de destilaria também pode ser derivado de matéria-prima lignocelulósica que foi fermentada e destilada e é referido aqui como “resíduo de destilaria integral celulósico.” O resíduo de destilaria derivado pelo menos em parte de uma ou mais fontes de grão tais como grãos de milho é preferido. Depois da moagem, o material de grão moído pode ser processado ainda para quebrar polissacarídeos e/ou oligossacarídeos em um ou mais monossacarídeos tais como glicose que pode ser fermentada por, por exemplo, levedura. Métodos de quebrar polissacarídeos tais como amido em glicose são bem conhecidos e

incluem por exemplo, água quente, tal como água quente que inclui um ácido adicionado tal como ácido sulfúrico, e/ou pré-tratamento enzimático. Depois da fermentação 210, o produto de fermentação é destilado no sistema 215, onde o etanol 220 é removido da massa fermentada em uma coluna de destilação. Depois que o etanol 220 é removido, o resíduo remanescente é removido como resíduo de destilaria 230.

[042]O resíduo de destilaria 230 é conhecido como “resíduo de destilaria integral.” O resíduo de destilaria integral 230 pode ser opcionalmente processado ainda por intermédio de um ou mais sistemas 240 para refinar o resíduo de destilaria integral antes de ser liberado ao sistema de propagação 115. Por exemplo, o resíduo de destilaria integral 230 pode ser submetido a um processo de separação sólido-líquido para produzir uma corrente sólida de resíduo, também conhecida como torta úmida, e uma corrente líquida de resíduo, também referida como resíduo de destilaria fino. O resíduo de destilaria fino pode ser processado ainda para aumentar a concentração de sólidos por evaporação resultando em solúveis de destiladores condensados ou xarope.

[043]Também, o resíduo de destilaria fino pode ser refinado ainda removendo-se pelo menos uma porção dos sólidos colocados em suspensão do resíduo de destilaria fino por intermédio de centrifugação para produzir resíduo de destilaria fino “purificado”. É observado que em muitos processos de etanol proveniente de milho convencionais, o xarope é misturada novamente com a corrente sólida separada ou torta úmida e alimentado a um secador de tambor rotativo para remover a umidade remanescente. Os sólidos secos resultantes são tipicamente referidos como Grãos e Solúveis de Destiladores Secos ou “DDGS”, e podem ser vendidos como alimentação para animais.

[044]Entretanto, de acordo com a presente invenção, tais resíduos de destilaria do processo de produção de grão a etanol, incluindo o resíduo de destilaria integral, resíduo de destilaria fino, e/ou xarope podem formar um componente de resíduo de destilaria para ser usado como pelo menos parte da fonte de nutriente para propagar

organismos tais como levedura. Usar pelo menos um componente de resíduo de destilaria fornece uma fonte de nutriente alternativa ou adicional quando comparado a, por exemplo, extrato de levedura e pode tirar vantagem de processos de grão a etanol e de etanol lignocelulósico co-localizados usando-se pelo menos uma porção de um subproduto (resíduo de destilaria integral) de um processo como uma entrada para o outro processo. Os Requerentes observaram que usar um componente de resíduo de destilaria pode propagar a levedura tanto como, ou ainda melhor, do que outras fontes de nutrientes tais como extrato de levedura.

[045]Em algumas formas de realização, a fonte de nutriente inclui um componente de resíduo de destilaria que inclui resíduo de destilaria integral, resíduo de destilaria fino, xarope derivado de resíduo de destilaria fino, e qualquer combinação destes. Preferivelmente, o componente de resíduo de destilaria inclui xarope derivado de resíduo de destilaria fino, resíduo de destilaria fino, ou combinações destes.

[046]O componente de resíduo de destilaria pode ser fornecido em qualquer quantidade de modo a ajudar a reproduzir (propagar) e gerar uma população desejada de organismo (por exemplo, etanogene) dentro de uma quantidade de tempo dada. A quantidade de componente de resíduo de destilaria fornecida pode depender de fatores tais como o tipo e quantidade de outras fontes de nutrientes presentes, o tipo e quantidade de fontes de carbono presentes, pH, temperatura, período de tempo desejado para propagação, e semelhantes. Em algumas formas de realização, a fonte de nutriente inclui resíduo de destilaria fino derivado de grão de milho integral em uma quantidade na faixa de 5 a 35 gramas de sólidos por litro do meio (o meio é debatido abaixo).

[047]Propagar um organismo que pode converter um ou mais monossacarídeos em um produto bioquímico de acordo com a presente invenção será descrito abaixo por referência a um etanogene tal como levedura geneticamente modificada para fabricar etanol a partir de material derivado de material lignocelulósico de pré-

tratamento. Entretanto, como explicado acima, a presente invenção não é limitada a propagar tal levedura.

[048]Como mostrado na FIGURA 1, propagar um etanologene inclui combinar pelo menos a fonte de carbono 105 e a fonte de nutriente 110 para formar um meio para facilitar o crescimento de uma quantidade suficiente de etanologene (isto é massa celular de etanologene) para inoculação (isto é inóculo etanologene a ser fornecido) a um sistema de fermentação 125. A primeira massa celular do organismo (por exemplo, etanologene) 100 pode ser incluída enquanto o meio está sendo formado, depois que o meio é formado, ou ambos.

[049]De acordo com uma forma de realização exemplar o meio de crescimento para o sistema de propagação 115 inclui água, uma fonte de nutriente 110 tendo um componente de resíduo de destilaria (por exemplo, resíduo de destilaria fino), uma fonte de carbono 105 incluindo xilose, e, opcionalmente, um ou mais agentes adicionais (não mostrados).

[050]Agentes adicionais opcionais para propagar levedura são bem conhecidos e incluem, por exemplo, agentes fornecidos com um etanologene tais como antibióticos, enzimas suplementares ou acessórias, materiais para ajustar e manter o pH, nutrientes ou outros componentes fornecendo benefícios nutricionais ou outros ao organismo. Nutrientes adicionais opcionais incluem, por exemplo, extrato de levedura, ureia, fosfato de diamônio, sulfato de magnésio, sulfato de zinco ou outros sais, etc.

[051]A razão de fonte de nutriente para fonte de carbono é selecionada para cultivar uma massa celular desejada de organismo tal como uma massa celular de tamanho suficiente de levedura para fermentação em um processo de etanol lignocelulósico. Fatores em selecionar a razão de fonte de nutriente para fonte de carbono incluem o(s) tipo(s) e quantidade(s) de fontes de nutrientes, o(s) tipo(s) e quantidade(s) de fontes de carbono, tipos e quantidades de agente(s) de meio de crescimento adicional(is), os tipos e quantidades iniciais de organismos, o período de tempo

alvejado para crescer o organismo, pH, temperatura, e semelhantes. Considerações adicionais incluem se é desejado condicionar os organismos durante a propagação ao ambiente esperado durante a fermentação. Condicionar organismos ao ambiente de fermentação pode vantajosamente ajudar os organismos a operar (por exemplo, converter açúcar a etanol) mais eficazmente.

[052]Em formas de realização exemplares, o resíduo de destilaria compreende resíduo de destilaria fino e a razão em peso de xilose para sólidos de resíduo de destilaria fino está na faixa de 0,05 a 20, preferivelmente de 0,1 a 10, mais preferivelmente de 0,2 a 5, e ainda mais preferivelmente de 0,5 a 2,5.

[053]A propagação do organismo pode começar quando o organismo está presente no meio de crescimento e condições desejadas estão presentes. Condições para considerar quanto à propagação de um organismo tal como um etanogene incluem, por exemplo, quantidade de ingredientes, pH, período de tempo para o crescimento do organismo, velocidade de agitação (se agitação estiver presente), exposição a oxigênio (aeração), temperatura, e semelhantes.

[054]Em formas de realização preferidas, a primeira massa celular (por exemplo, massa celular inicial) do organismo está presente em uma quantidade menor do que 10,0 gramas de etanogenes por litro de meio, preferivelmente menos do que 5,0 gramas de etanogenes por litro de meio, e ainda mais preferivelmente menos do que 0,1 grama de etanogenes por litro de meio.

[055]A massa celular pode ser propagada, dependendo das condições, por um período de tempo para produzir uma massa celular desejada. Tipicamente, a massa celular desejada é um tamanho suficiente para fermentar o açúcar em um álcool (por exemplo, etanol) dentro de um período de tempo economicamente desejável. Períodos de tempo exemplares incluem de 12 a 48 horas, ou ainda 16 a 24 horas. Em formas de realização exemplares, a massa celular desejada (por exemplo, secundária ou final) do etanogene está presente em uma quantidade na faixa de 0,5 a 40

gramas de etanologenes por litro de meio dentro de um período de tempo na faixa de 8 a 48 horas, em que o período de tempo começa quando a primeira massa celular dos etanologenes é combinada com a fonte de carbono e a fonte de nutriente para propagar a primeira massa celular dos etanologenes. Preferivelmente, a massa celular desejada (por exemplo, secundária ou final) do etanologene está presente em uma quantidade na faixa de 1 a 20 gramas de etanologenes por litro de meio dentro de um período de tempo na faixa de 12 a 48 horas, em que o período de tempo começa quando a primeira massa celular dos etanologenes é combinada com a fonte de carbono e a fonte de nutriente para propagar a primeira massa celular dos etanologenes.

[056]De acordo com formas de realização onde o organismo inclui levedura, o sistema de propagação preferivelmente leva em consideração o crescimento seletivo da levedura que pode usar xilose como uma fonte de carbono (isto é levedura que propagará em um meio que inclui xilose) mesmo se outra levedura estiver presente (por exemplo, como um contaminante); em um meio que fornece xilose como uma única fonte de carbono (isto é um meio que não contém quantidades substanciais de glicose), levedura que é capaz de propagar usando xilose como uma fonte de carbono propagará e levedura adicional/contaminante que pode não ser tão capaz de propagar usando xilose como uma fonte de carbono (tais como as formas mais comuns de levedura que tipicamente propagam em um meio contendo glicose) não propagará na mesma taxa (ou de nenhuma maneira).

[057]O pH do meio de crescimento pode estar em um pH que ajuda a reproduzir (propagar) e gerar uma população desejada de organismo (por exemplo, etanologene) dentro de uma quantidade de tempo desejada. Em algumas formas de realização, o pH está entre 4 e 8, preferivelmente entre 5 e 7, e ainda mais preferivelmente entre 5 e 6. Técnicas para ajustar e manter o pH de um meio de crescimento para propagar organismos tais como um etanologene são bem conhecidas e incluem, por exemplo, adicionar um ou mais materiais ácidos e/ou adicionar um ou mais materiais

alcalinos.

[058]A temperatura do meio de crescimento pode estar em uma temperatura que ajuda a reproduzir (propagar) e gerar uma população desejada de organismo (por exemplo, etanologene) dentro de uma quantidade de tempo desejada. Em algumas formas de realização, a temperatura está em uma temperatura na faixa de 15 °C a 50 °C, preferivelmente de 20 °C a 40 °C, e ainda mais preferivelmente de 25 °C a 40 °C.

[059]A propagação de acordo com a presente invenção de um organismo (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) pode ser realizada de acordo com um processo contínuo, processo descontínuo, um processo em batelada, ou combinações destes. Preferivelmente, processo contínuo como certos benefícios associados com este. Em algumas formas de realização tais como aquelas que propagam *Saccharomyces cerevisiae*, xilose é fornecida em uma quantidade como a fonte de carbono tal que o “efeito Crabtree” bem conhecido não é uma preocupação ainda que um processo contínuo possa ser realizado sem produzir uma quantidade indevida de etanol. Isto é, em algumas formas de realização níveis relativamente altos de xilose, diferente de glicose, não fazem com que o processo propagação mude de uma via respiratória para uma via anaeróbica de modo a gerar etanol ao invés de reproduzir e aumentar a massa celular. Um processo contínuo pode ser altamente desejável visto que ele pode ser relativamente mais fácil de manejar e controlar quando comparado a um processo contínuo ou descontínuo.

[060]Em formas de realização preferidas, o meio de crescimento é aerado e/ou agitado (excitado) para pelo menos uma porção do processo de propagação de modo a ajudar a fornecer níveis de oxigênio suficientes por todo o meio de modo a promover a respiração aeróbica e, portanto, reprodução do organismo ao invés de, por exemplo, produção de fermentação anaeróbica de etanol. Em algumas formas de realização, se oxigênio suficiente não for fornecido ao meio de propagação, o processo pode mudar para uma via anaeróbica e promover a fermentação de modo a

produzir álcool a um grau indevido. Preferivelmente, a propagação é aerada durante a duração inteira da propagação. Métodos de aeração e agitação são bem conhecidos. Velocidades de mistura exemplares incluem de 100 a 750 rpm. Taxas de aeração exemplares incluem de 0,5 a 1 unidade volumétrica de ar por unidades volumétricas de meio por minuto (vvm). Em algumas formas de realização, o vaso de propagação é cerca de 10 vezes menor do que o vaso de fermentação se a aeração não for utilizada. Em algumas formas de realização, o vaso de propagação é cerca de 20 a 30 vezes menor do que o vaso de fermentação se a aeração for utilizada.

[061]De acordo com formas de realização exemplares onde o organismo inclui levedura, para cultivar (inocular) a levedura no sistema de propagação a temperatura pode ser mantida em uma faixa de cerca de 28 a 32 graus Celsius e o pH está em uma faixa de cerca de 5,2 a 5,8 por um tempo de pelo menos 12 horas. Por exemplo, o inóculo de levedura pode ser incubado sob condições incluindo uma temperatura de cerca de 30 graus Celsius e um pH de cerca de 5,5 por cerca de 17 horas.

[062]Um sistema de propagação de acordo com a presente invenção pode ser realizado em um ou mais estágios. Por exemplo, onde levedura é o organismo a ser propagado, o sistema de propagação pode incluir pelo menos dois estágios. Em um primeiro estágio, uma cultura de levedura pode ser cultivada em um inóculo de levedura inicial. No primeiro estágio de propagação, o inóculo de levedura inicial é introduzido em um vaso e diluído (por exemplo, por 250x). No vaso, o inóculo de levedura inicial e uma porção da fonte de carbono (por exemplo, componente líquido incluindo xilose e/ou outros açúcares), uma porção da fonte de nutriente (por exemplo, resíduo de destilaria fino), e água podem ser fornecidos junto com agentes opcionais (debatidos acima). De acordo com formas de realização exemplares, a temperatura pode ser mantida em uma faixa de cerca de 26 a 37 graus e o pH em uma faixa de cerca de 3,5 a 6,5 por um tempo de pelo menos 24 horas. Por exemplo, a levedura pode ser cultivada no primeiro estágio de propagação sob condições incluindo uma temperatura

de cerca de 30 graus Celsius e um pH de cerca de 5,5 por cerca de 24 horas.

[063]No segundo estágio de propagação, o inóculo de levedura do primeiro estágio de propagação é diluído (por exemplo, por 10x), tipicamente depois de ser transferido para um outro vaso. No vaso, o inóculo de levedura do primeiro estágio de propagação e uma porção da fonte de carbono (isto é componente líquido incluindo xilose e/ou outros açúcares), uma porção da fonte de nutriente (por exemplo, resíduo de destilaria fino), e água podem ser fornecidos junto com agentes opcionais (debatidos acima). De acordo com formas de realização exemplares, a temperatura pode ser mantida em uma faixa de cerca de 26 a 37 graus e o pH em uma faixa de cerca de 3,5 a 6,5 por um tempo de pelo menos 24 horas. Por exemplo, a levedura pode ser cultivada no segundo estágio de propagação sob condições compreendendo uma temperatura de cerca de 30 graus Celsius e um pH de cerca de 5,5 por cerca de 24 horas.

[064]De acordo com uma forma de realização particularmente preferida a massa celular da levedura crescerá por cerca de 200 a 500 vezes no primeiro estágio e cerca de 20 a 40 vezes no segundo estágio.

[065]Depois da propagação, a massa celular de etanogene é fornecida a um sistema de fermentação tal como sistema 125 de modo a fermentar uma biomassa tal como material lignocelulósico pré-tratado e produzir etanol.

[066]A presente invenção será agora ilustrada ainda por referência aos Exemplos abaixo.

Exemplo 1

[067]Um sistema de crescimento e fermentação de levedura foi usado neste exemplo para avaliar o efeito do resíduo de destilaria fino como uma fonte de nutriente ao invés de extrato de levedura. Este exemplo mediu o etanol produzido por uma cepa geneticamente modificada de *S. cerevisiae* em meios contendo vários níveis de xilose suplementada com extrato de levedura, peptona ou com resíduo de destilaria fino

como fonte de nutriente. O etanogene foi levedura geneticamente modificada (cepa nº RN1016 obtida da DSM, Heerlen, Netherlands). O experimento foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Cada frasco continha 50 mL de um meio experimental: Extrato de levedura estéril, meio de Peptona (YP) ou meio de resíduo de destilaria fino. O resíduo de destilaria fino usado foi coletado de uma biorrefinaria de etanol proveniente de milho de trituração a seco por processo BPX™ localizada em Scotland, SD. Várias quantidades de uma solução a 50 por cento p/p de xilose foram adicionadas ao meio de YP estéril (extrato de levedura e peptona, cada um em concentração final de 10 g/L), para obter as concentrações de xilose como observado. Adicionalmente, várias quantidades da solução de xilose a 50 por cento p/p foram adicionadas a um conjunto diferente de frascos contendo resíduo de destilaria fino para obter as concentrações de xilose como observado. Depois que xilose foi adicionada aos reatores, o pH de cada reator foi ajustado para 5,5. Para impedir a contaminação bacteriana, Lactoside247, um produto antimicrobiano comercialmente disponível da Lallemand Ethanol Technology of Milwaukee, WI, foi adicionado aos reatores para uma concentração final de 8 ppm. Ureia foi adicionada em 62,5 mg/L (~1,04 mM) aos reatores contendo resíduo de destilaria fino. Os meios nos frascos foram inoculados em 0,5 a 0,6 g (levedura seca) da cultura preparada por litro e os frascos foram incubados a 32 graus Celsius em um agitador de banho de água, operando em uma taxa aproximada de 150 rpm. Amostras foram removidas periodicamente e analisadas quanto a açúcares, ácidos orgânicos & composição de etanol usando cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Os dados do Exemplo 1 são mostrados na tabela na Figura 3A e o gráfico mostrado na Figura 3B.

Exemplo 2

[068]No exemplo 2, o nível ideal de resíduo de destilaria fino foi identificado. Este exemplo mediu o etanol produzido depois da fermentação por uma cepa geneticamente modificada de *S. cerevisiae* e xilose residual em meios com 11 por cento p/v

de xilose suplementada com resíduo de destilaria fino em vários níveis. Os valores são médias de fermentações em duplicata. O etanogene foi levedura geneticamente modificada (cepa nº RN1016 obtida da DSM, Heerlen, Netherlands). Xilose foi mantida constante em cerca de 11 por cento p/v e o nível de resíduo de destilaria fino foi variado - 0 por cento, 20 por cento, 40 por cento, 60 por cento e 80 por cento. O pH dos meios nos frascos foi ajustado para 5,5 depois que xilose foi combinada com água de composição em frascos Erlenmeyer de 125 mL. O antimicrobiano Lactoside247 e Ureia foram adicionados aos frascos em 8 ppm e 62,5 mg/L, respectivamente. Os meios nos frascos foram inoculados em 0,5 - 0,6 g (levedura seca) da cultura preparada por litro e os frascos foram incubados a 32 graus Celsius em um agitador de banho de água em uma taxa de aproximadamente 150 rpm. Amostras foram removidas periodicamente e analisadas quanto a açúcares, ácidos orgânicos & composição de etanol usando HPLC. Os dados do Exemplo 2 são mostrados na tabela na Figura 4A e no gráfico mostrado na Figura 4B.

Exemplo 3

[069] Sistema de propagação de levedura foi usado neste exemplo para mostra os meios usados para a propagação de levedura geneticamente modificada capaz de metabolizar açúcares C5 tais como xilose. O etanogene foi levedura geneticamente modificada (cepa nº RN1016 obtida da DSM, Heerlen, Netherlands). A cultura de levedura foi cultivada em meio de YP (12,5 g/L de extrato de levedura & 10 g/L de peptona) suplementado com 2 % p/v de glicose e 1 % p/v de xilose a 30° C durante a noite. Depois de 17 h, a cultura foi transferida para 1500 mL de meios de propagação de levedura (Aprox. em 15 g de sólidos secos/L de resíduo de destilaria fino de biorrefinaria de etanol proveniente de milho, xilose pura ou solução de xilose do pré-tratamento com ácido diluído de biomassa lignocelulósica diluída a 2 % p/v de xilose, e 0,24 g/L de ureia) em um reator Bioflo310 em uma taxa de 0,02 g (levedura seca)/L. Ureia não é necessária se o pH do meio de propagação for ajustado com hidróxido de

amônio. A levedura foi aerobicamente propagada usando o protocolo de propagação padrão (pH inicial de 5,5; agitação, 450 rpm; aeração, 0,5 vvm; temperatura, 31,1 °C) por 24 h. Os conteúdos do propagador depois são transferidos para o fermentador. Os dados do Exemplo 3 são mostrados no gráfico na Figura 5A para xilose pura como a fonte de carbono e o gráfico mostrado na Figura 5B para solução de xilose a partir do pré-tratamento com ácido diluído de biomassa lignocelulósica como a fonte de carbono.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para propagar um organismo que pode converter um ou mais monossacarídeos em um produto bioquímico, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o método compreende:

fornecer uma primeira massa celular do organismo;

fornecer uma fonte de carbono que pode suportar o crescimento da primeira massa celular do organismo, em que a fonte de carbono compreende xilose;

fornecer uma fonte de nutriente que pode suportar o crescimento da primeira massa celular do organismo, em que a fonte de nutriente compreende um componente de resíduo de destilaria e em que o componente de resíduo de destilaria compreende resíduo de destilaria fino que é um subproduto de fermentação de um material de grão;

combinar pelo menos a fonte de carbono e a fonte de nutriente para formar um meio para propagar o organismo, em que a razão em peso de xilose para sólidos de resíduo de destilaria fino está na faixa de 0,5 a 2,5; e

combinar a primeira massa celular do organismo com a fonte de carbono e a fonte de nutriente para propagar a primeira massa celular do organismo por um período de tempo para formar uma segunda massa celular do organismo.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o organismo compreende um ou mais etanologenes.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a primeira massa celular está presente em uma quantidade menor do que 1,0 grama de etanologenes por litro de meio.

4. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a primeira massa celular está presente em uma quantidade menor do que 0,1 grama de etanologenes por litro de meio.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a segunda massa celular dos etanologenes está presente em uma quantidade na

faixa de 1 a 20 gramas de etanologenes por litro de meio dentro de um período de tempo na faixa de 12 a 48 horas, em que o período de tempo começa quando a primeira massa celular dos etanologenes é combinada com a fonte de carbono e a fonte de nutriente para propagar a primeira massa celular dos etanologenes.

6. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o um ou mais etanologenes compreende levedura capaz de metabolizar pelo menos xilose a etanol.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a levedura compreende levedura geneticamente modificada capaz de metabolizar pelo menos xilose a etanol.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a levedura geneticamente modificada compreende *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o material de grão compreende pelo menos uma porção de material de grão de milho integral.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o componente de resíduo de destilaria compreende resíduo de destilaria fino e o resíduo de destilaria fino é fornecido em uma quantidade na faixa de 5 a 35 gramas de sólidos por litro do meio.

11. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a xilose é fornecida em uma quantidade na faixa de 0,1 a 10 por cento em peso de meio.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a primeira massa celular do organismo é combinada com a fonte de carbono e a fonte de nutriente para propagar a primeira massa celular do organismo para formar uma segunda massa celular do organismo de acordo com um processo contínuo.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a fonte de carbono compreende solução de xilose que é um subproduto de pré-tratar o substrato lignocelulósico com pelo menos água.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o substrato lignocelulósico pré-tratado é derivado de espigas de milho, palha de milho, ou combinações destes.

15. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o organismo é exposto a condições aeróbicas durante pelo menos uma porção do período de tempo.

16. Método para propagar um organismo que pode converter um ou mais monossacarídeos em um produto bioquímico, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o método compreende:

fornecer uma primeira massa celular do organismo;

fornecer uma fonte de carbono que pode suportar o crescimento da primeira massa celular do organismo, em que a fonte de carbono compreende xilose;

fornecer uma fonte de nutriente que pode suportar o crescimento da primeira massa celular do organismo, em que a fonte de nutriente compreende um componente de resíduo de destilaria e em que o componente de resíduo de destilaria compreende resíduo de destilaria fino que é um subproduto de fermentação de um material de grão;

combinar pelo menos a fonte de carbono e a fonte de nutriente para formar um meio para propagar o organismo, em que a primeira massa celular está presente em uma quantidade menor do que 1,0 grama de organismos por litro de meio e em que a razão em peso de xilose para sólidos de resíduo de destilaria fino está na faixa de 0,5 a 2,5; e

combinar a primeira massa celular do organismo com a fonte de carbono e a fonte de nutriente para propagar a primeira massa celular do organismo por um período de tempo para formar uma segunda massa celular do organismo.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o organismo compreende *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada.

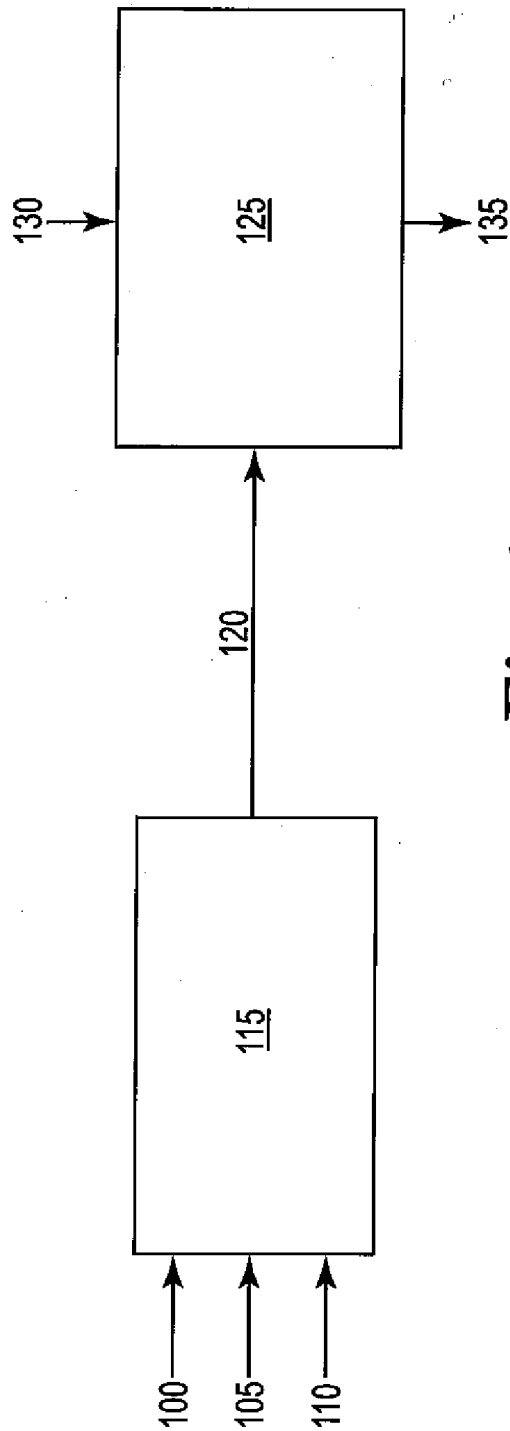


Fig. 1

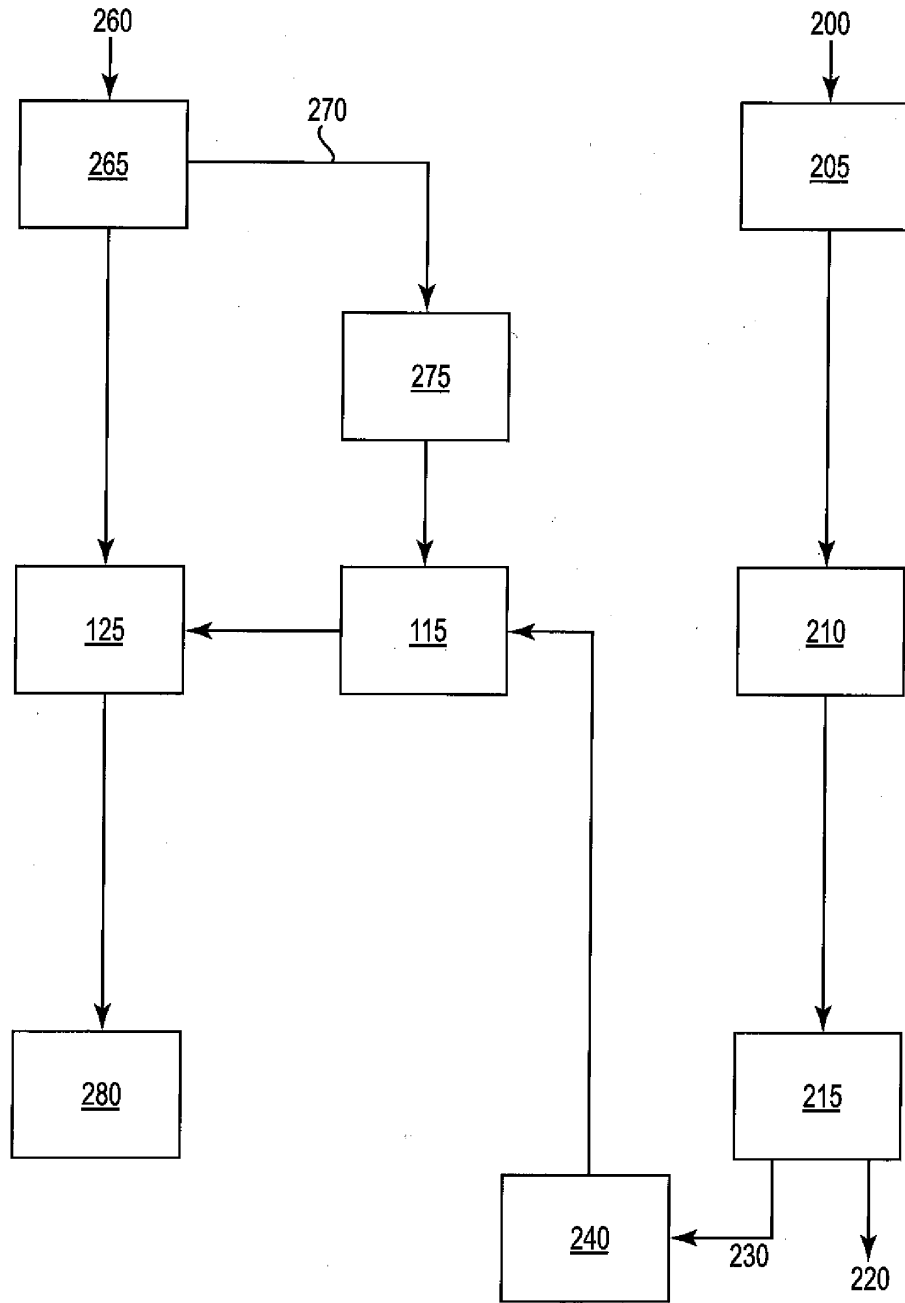


Fig. 2

XILOSE (% P/V)	ETANOL (% V/V)	
	MEIO YP	RESÍDUO DE DESTILARIA FINO
2.30	1.28	1.32
4.53	2.64	2.53
6.76	3.93	3.66
9.06	4.98	4.86
11.29	6.12	5.67
13.61	1.90	0.31
15.77	ND	0.00
17.61	ND	NT

ND - NÃO DETECTADO; NT - NÃO TESTADO

Fig. 3A

% DE RESÍDUO DE DESTILARIA FINO EM ÁGUA DE COMPOSIÇÃO	ETANOL (% P/V)	XILOSE RESIDUAL (% P/V)
0	0	9.48
20	2.48	5.55
40	6.17	0.13
60	6.35	0.00
80	6.38	0.01

Fig. 4A

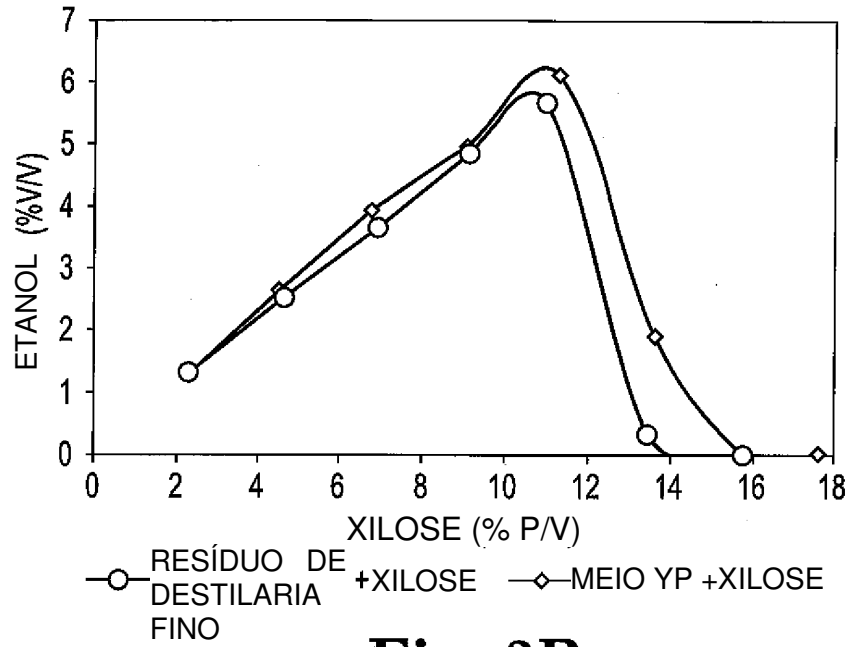


Fig. 3B



Fig. 4B

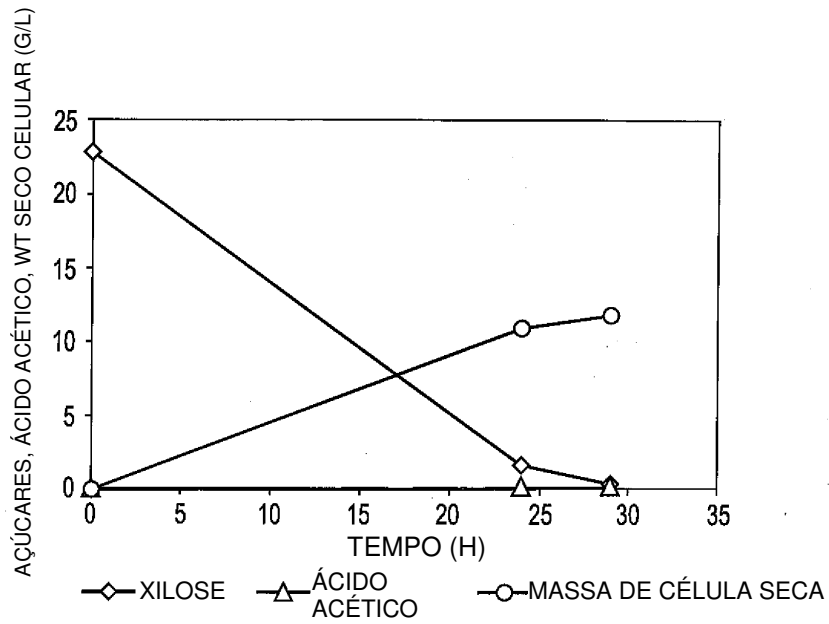


Fig. 5A

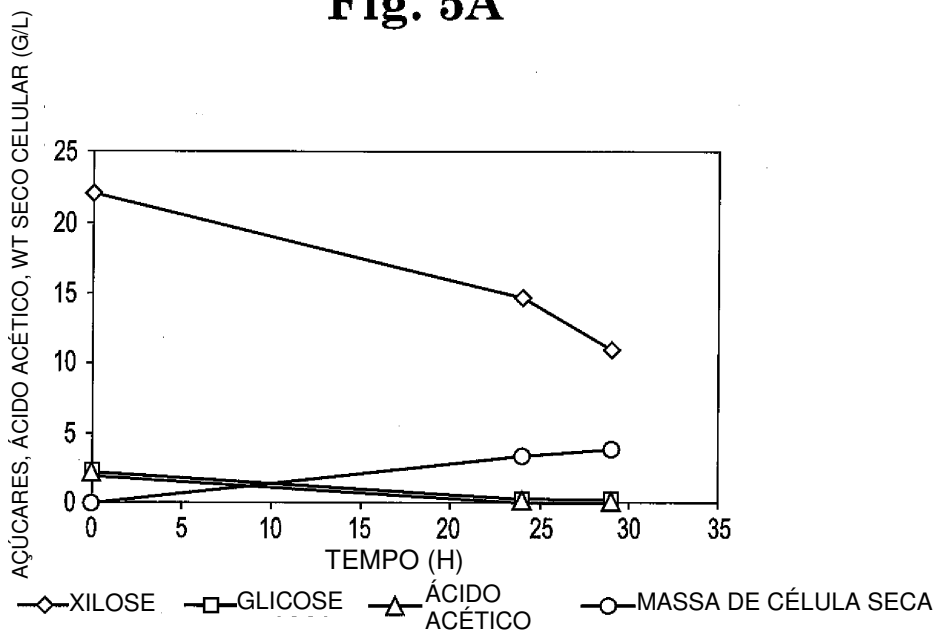


Fig. 5B