



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2014 00269

(22) Data de depozit: 07.04.2014

(41) Data publicării cererii:
29.05.2015 BOPI nr. 5/2015

(71) Solicitant:
• TRANSPROIECT ORGANIC SRL,
SAT MALIC, ALEEA IRIS NR. 1, AP. 3,
COMUNA MALIUC, TL, RO

(72) Inventatori:
• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• DOBRONAUTEANU EMANUEL
CORNELIU, INTRAREA BITOLIA NR. 28,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A FURAJELOR DIN
SUBPRODUSE DE LA FABRICAREA BIO-ETANOLULUI**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor furaje pentru monogastrice și/sau rumegătoare. Procedeu conform invenției constă în normalizarea vinasei la 15% substanță uscată, plasmoliza celulelor de drojdie și humificarea compușilor melanoidinici din vinasă, prin tratare cu lacază și omogenizare intermitentă sub presiune, uscarea borhotului de distilerie și a

drojdiei de fermentație, pentru a forma borhotul uscat de distilerie, cu produse solubile, amestecarea a 95 părți borhot uscat de distilerie cu 5 părți vinasă, densificarea amestecului prin presare, din care rezultă un furaj granulat.

Revendicări: 1



PROCEDEU DE OBȚINERE A FURAJELOR DIN SUBPRODUSE DE LA FABRICAREA BIO-ETANOLULUI

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unor furaje pentru monogastrice și/sau rumegătoare, prin valorificarea unor sub-produse de la fabricarea (bio)etanolului, respectiv borhot și vinasă.

Sunt cunoscute procedee de obținere a unor furaje pentru monogastrice și/sau rumegătoare din subproduse de la fabricarea (bio)etanolului. Borhotul rezultă în cazul utilizării cerealelor boabe ca materie primă, iar vinasă se formează atunci când se folosește melasa, din sfeclă-de-zahăr sau din trestie-de-zahăr. În cazul borhotului procedeu uzual de transformare în furaje este de a-l usca împreună cu drojdia de fermentație. Se formează borhot uscat de distilerie cu produse solubile (dried distillers grains with solubles, DDGS) în cazul procedurii de măcinare uscată uzual, și borhot uscat cu conținut proteic ridicat (high-protein distillers dried grains – HP-DDG), în cazul folosirii procedurii de măcinare umedă sau a variantei de prelucrare a măcinșului uscat pentru recuperarea unei părți din fibre și a germenilor de cereale. În cazul melasei procedeu uzual este de concentrarea prin evaporare.

Principala problemă tehnică în cazul utilizării ca furaje a subproduselor de la fabricarea bio-etanolului este cea a concentrării în aceste subproduse a unor contaminanți sau compuși potențial toxici formați în cursul industrializării – a se vedea de ex. trecerea în revistă Granby *et al.*, 2012, Potential contamination issues arising from the use of biofuel and food industry by-products in animal feed, în Animal feed contamination: effects on livestock and food safety, ed. Fink-Gremmels J., Pag: 514-539, Woodhead Publishing, Cambridge, UK. Micotoxinele formate în cereale în timpul vegetației se pot concentra până la de trei ori în borhot (Wu și Munkvold, 2008, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(11), 3900-3911). În vinasă se concentrează compușii melanoidinici, formați ca urmare a repetatelor tratamente termice, care reduc bio-disponibilitatea unor nutrienți și au un potențial mutagenic ridicat (Stemme *et al.* 2005, Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 89(3-6), 179-183), iar concentrarea prin evaporare amplifică formarea unor astfel de compuși.

Brevetul SUA 8 496 984 B2 descrie utilizarea materialului lignocelulozic micronizat, prezent în borhotul de la fabricarea bio-etanolului, ca și în alte subproduse, ca de ex. bagasa de trestie de zahăr, pentru a adsorbi micotoxinele

prezente în furaje. Micronizarea materialului lignocelulozic este realizată prin tratament enzimatic și/sau cu acizi minerali, urmat de măcinare umedă într-o moară cu disc și uscarea prin pulverizare.

Prin micronizare crește suprafața specifică a materialului lignocelulozic și se formează un strat adsorbant care are capacitatea ridicată de a fixa o gamă largă de micotoxine, în special pe cele dificil de legat, reprezentate de ochratoxină, deoxinivalenol și toxina T2.

În exemplificările invenției nu este descrisă legarea aflatoxinelor de adsorbantul realizat prin micronizarea materialului lignocelulozic. Se consideră că aceste micotoxine produse de fungii din grupul *Aspergillus Section Flavi* sunt adsorbite de pereții celulari ai drojdiilor de fermentație, prezenți în borhotul în care se regăsește și drojdia de fermentație, și implicit nu vor mai determina efecte negative. Situațiile dramatice de contaminare a laptelui cu aflatoxine, care urmează după anii secetoși, și care sunt o consecință directă a utilizării în hrana vacilor lactante a borhotului uscat de distilerie cu produse solubile din porumb, a cărui contaminare semnificativă cu aflatoxine este favorizată de secetă (Piva *et al.*, 2006, în *Mycotoxin Factbook: Food & Feed Topics*, eds Barug *et al.*, 3rd World Mycotoxin Forum, Noordwijk, Netherlands, p.139-153), arată că această legare de pereții celulari ai drojdiilor nu este eficientă în cazul unor nivele ridicate de aflatoxine. Digestia materialului lignocelulozic micronizat în rumen, sub acțiunea microorganismelor simbiote celulozolitice, poate determina eliberarea micotoxinelor adsorbite, deci adsorbantul propus nu este foarte potrivit pentru rumegătoare.

Brevetul SUA 8 507 019 B2 se referă la utilizarea ca adsorbant specific pentru micotoxine a leonarditului, un lignit oxidat care conține 90% substanțe humice, cu cel puțin 45% acid humic, și ioni metalici, oxizi și minerale argiloase. Adsorbentul este eficient în limitarea sindromului estrogenic produs de zearalenonă la scroafe și reduce adsorbția fumonisinei și a aflatoxinelor în cazul puilor de găină.

Utilizarea unui cărbune fosil ca sursă de acizi humici generează însă riscul introducerii unor elemente potențial toxice (metale grele) în lanțul alimentar, deci este necesară utilizarea unor surse de substanțe humice cu risc redus de contaminare.

O altă problemă majoră în utilizarea borhotului ca furaj, în special a celui rezultat din procedeul de măcinare uscată, este cea determinată de dimensiunile reduse ale particulelor. Aceste dimensiuni reduse creează probleme de manipulare la transport, depozitare și utilizare și ridică costul transportului. Brevetul SUA 7 695

747 B2 prezintă un procedeu de aglomerare care implică extrudarea borhotului și a reziduului lichid de la distilare, urmată de uscarea cu microunde a extrudatului. Extrudarea tinde însă să ducă la expandarea unor compuși din componența borhotului și a reziduului solubil / drojdiilor de fermentație, care fac ca densificarea prin extrudare să nu fie foarte pronunțată. Sunt necesare procedee de densificare avansată, prin care să se crească semnificativ masa volumică a furajelor realizate pe baza subproduselor de la fabricarea bio-etanolului din cereale.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza un procedeu de obținere a furajelor din sub-produse de la fabricarea (bio)etanolului, prin care să se realizeze o densificare superioară și o inactivare semnificativă a contaminanților prezenți în respectivele subproduse, micotoxine din borhotul de cereale și compuși melanoidinici din vinasă.

Este un alt obiect al acestei invenții de a realiza adsorbția micotoxinelor din borhot și/sau a compușilor melanoidinici din vinasă în structuri care nu sunt metabolizate în sistemul digestiv al animalelor domestice.

Procedeul conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

- ✓ Normalizarea vinasei la 15% substanță uscată, din care cel puțin 10% din substanța uscată totală, respectiv 1,5% din total vinasă, este reprezentată de drojdie, prin evaporare sub vid;
- ✓ Plasmoliza celulelor de drojdie și humificarea compușilor melanoidinici din vinasă, prin tratare cu laccază, 0,1 părți preparat enzimatic cu o activitate de 120 LAMU/g la 1000 părți vinasă, timp de 18 ore la temperatura de 55°C, și omogenizare intermitentă sub presiune, la fiecare 6 ore, într-un omogenizator cu piston, 5 cicluri la 150 MPa;
- ✓ Uscarea pe uscător cu valț a borhotului de distilerie și a drojdiei de fermentație, pentru a forma borhotul uscat de distilerie cu produse solubile, DDGS, cu o umiditate reziduală de max. 12%;
- ✓ Amestecarea borhotului uscat de distilerie cu vinasă plasmolizată și humificată, în proporție de 95 părți borhot uscat de distilerie la 5 părți vinasă;
- ✓ Densificarea amestecului borhot uscat – vinasă plasmolizată și humificată, prin presare într-o presă de peleți cu matrițe orizontale, pentru a forma peleți cu lungimea de aprox. 15 mm și diametrul de 5...8 mm.

Procedeul propus prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Reduce conținutul de compuși melanoidinici solubili din vinasă, care au potențiale efecte dăunătoare, prin oxidarea / humificarea catalizată de laccază a melanoidinelor solubile;
- ✓ Formează structuri humice prin condensarea aminoacizilor / peptidelor din plasmolizatul de drojdie cu acizii humici rezultați din oxidarea melanoidinelor din vinasă, care au capacitate ridicată de absorbție a micotoxinelor în complecși de absorbție, care nu sunt digerați de animalele domestice, rumegătoare sau monogastrice;
- ✓ Favorizează procesul de densificare prin peletizare, datorită prezenței în vinasă plasmolizată și humificată a unor componente, respectiv a fragmentelor de perete celular de drojdie și a unor polipeptide, care reacționează cu materialul lignocelulozic, stabilizând structura peletelor;
- ✓ Densifică semnificativ furajul rezultat în final, reducând costurile de transport, manipulare și depozitare.

În continuare se prezintă un exemplu de realizare care ilustrează invenția fără a o limita.

Exemplu. 75 litri de vinasă rezultată de la fabricarea (bio) etanolului din melasă de sfeclă de zahăr se concentrează prin evaporare prin folosirea unui Evaporator 25l/h Simax[®] (Kavalier, Sazava, Cehia). Se verifică substanța uscată, cu ajutorul unui refractometru digital Rudolph J257 (Rudolph Research Analytical, Hackettstown, NJ, USA) și conținutul de biomasă de drojdie, prin centrifugare la 10.000 x g, timp de 15 min., urmată de cântărirea eprubetelor de centrifugare, după uscare la masă constantă la 105°C. Vinasă se normalizează la 15% substanță uscată, din care cel puțin 10% din substanța uscată totală, respectiv 1,5% din total vinasă, este reprezentată de drojdie. Rezultă 52 kg de vinasă concentrată, care se trece într-un vas de sticlă Simax[®] de 100 litri (Kavalier, Sazava, Cehia), prevăzut cu manta de termostatare și agitare mecanică. Se tratează cu un preparat de laccază, 0,1 g preparat enzimatic cu o activitate de 120 LAMU/g la 1000 g vinasă.

Preparatul de laccază folosit este Denilite[®] II S (Novozyme A/S, Bagsvaerd, Danemarca), care are o activitate de 120 LAMU/g. O unitate LAMU este definită ca fiind cantitatea de enzimă care transformă 1 μmol de siringaldazină per min la pH 7.5 și 30°C, cu formare de tetrametoxi-azo-bis (metilen-chinonă), care este cuantificată prin absorbție la 530 nm.

Se menține timp de 18 ore, la temperatura de 55°C. La fiecare 6 ore, respectiv la 6 și 12 ore și la finalizarea oxidării enzimatică, se procedează o omogenizare sub presiune. Se folosește un omogenizator cu piston, GEA Niro Soavi Arriete NS2006 (GEA Niro Soavi, Parma, Italia), prevăzut cu o valvă tip „muchie de cuțit”, 5 cicluri la 150 MPa.

În paralel se usucă pe un uscător cu valțuri GMF Gouda D5/5 (Andritz Separation Gouda, Waddinxveen, Olanda), care are o suprafață activă de 0,75 mp, un diametru de 500 mm și o lungime de 500 mm, o cantitate de 4000 kg de borhot de distilerie care conține și drojdie de fermentație, pentru a se obține circa 1000 kg de borhot uscat de distilerie cu produse solubile, DDGS, cu o umiditate de max. 12%.

Se amestecă borhotul uscat de distilerie cu vinasă plasmolizată și humificată, în proporție de 95 părți borhot uscat de distilerie la 5 părți vinasă, respectiv 950 kg borhot uscat, DDGS, cu 50 kg vinasă plasmolizată și humificată. Amestecul rezultat, de borhot uscat – vinasă plasmolizată și humificată, se densifică folosind o presă (moară) de peleți cu matrițe orizontale, model Kahl 14-175 (Amandus Kahl, Reinbek / Hamburg, Germania), la o putere specifică de 1 kW pentru 0,015 ...0,02 m², cu menținerea temperaturii amestecului de pelletizat la circa 65°C, pentru a forma peleți cu lungimea de aprox. 15 mm și diametrul de 5..8 mm, rezultând furajul granulat F.

S-a realizat un experiment prin care s-a testat desorbția contaminanților, potențiali prezenți în furajele rezultate din co-produsele de la fabricarea bio-etanolului, de structurile formate în furajul granulat F. Experimentele s-au realizat prin incubare în soluții test care simulează digestia la animalele monogastrice și la cele rumeătoare, folosind probe de furaj granulat F.

Pentru a simula trecerea prin tubul digestiv al animalelor monogastrice, respectiv cavitate bucală, stomac și duoden, s-a realizat incubarea în gradient de pH de 7,4, 2,0 și 8,4, cu adaos de amilază salivară, și, respectiv, pepsină și tripsină. 3 g de furaj F, măcinate până la o granulație de 20 mesh (0,85 mm), folosind o moară Retsch (Grindomix, Retsch, Haan, Germania), au fost incubate timp de 15 min, sub agitare și la 37°C, cu 30 ml de soluție salină 0,9%, pH 7,4, și 200 unități de α-amilază salivară (tip IX-A, Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, SUA). O unitate de amilază folosită este aceea cantitate de enzimă care eliberează 1 mg de maltoză din amidon în trei minute la pH 6,9 și la 20°C. S-a prelevat un alicot de 5 ml în care s-a determinat conținutul de micotoxine și de compuși melanoidinici solubili. pH soluției a fost redus la valoarea 3.0 prin adaos de HCl 1 M. S-au adăugat 25 ml soluție salină și 1000

unități pepsină (Sigma Aldrich, 1 unitate enzimatică produce o variație a absorbantei la 280 nm de 0,001 per min la pH 2,0 și 37°C, măsurată ca produși solubili în TCA, folosind hemoglobina ca substrat). S-a incubat timp de 3 ore, sub agitare și la 37°C, după care s-a prelevat un alicot de 5 ml în care s-a determinat conținutul de micotoxine și de compuși melanoidinici solubili. S-a modificat pH-ul la 8,4 cu NaOH 1 M, după care s-au adăugat 1000 unități de tripsină (Sigma Aldrich, o unitate determină într-un minut o variație de extincție la 253 nm de 0,001, atunci când substratul folosit este esterul etilic al N- α -benzoil-L-argininei, BAEE). S-a incubat timp de 3 ore, sub agitare și la 37°C, după care s-a prelevat un alicot de 5 ml în care s-a determinat conținutul de micotoxine și de compuși melanoidinici solubili.

Modelul experimental *in vitro* folosit pentru a simula trecerea prin tubul digestiv al rumegătoarelor a implicat utilizarea unor flacoane Wheaton de 125 ml, de fermentare, în care s-au introdus 3 g de furaj F măcinate și 30 ml soluție salină. Cele trei grame au fost incubate timp de 30 min, sub agitare și la 37°C, cu 25 ml de soluție salină 0,9% și 300 UI de α -amilază salivară (tip IX-A, Sigma Aldrich). S-a prelevat un alicot de 5 ml în care s-a determinat conținutul de micotoxine și de compuși melanoidinici solubili. Mediul rămas s-a barbotat timp de 10 min cu bioxid de carbon 99,8%, după care s-au introdus 30 ml fluid ruminal filtrat, prelevat de la juninci non-lactante canulate în rumen. S-a barbotat din nou timp de 10 min cu bioxid de carbon 99,8%, după care s-a incubat timp de 3 ore la 39°C în anaerobioză. S-a prelevat un alicot de 5 ml în care s-a determinat conținutul de micotoxine și de compuși melanoidinici solubili. S-a modificat pH-ul la 8,4 cu NaOH 1 M, după care s-au adăugat 1000 unități de tripsină (Sigma Aldrich). S-a incubat timp de 3 ore, sub agitare și la 37°C, după care s-a prelevat un alicot de 5 ml în care s-a determinat conținutul de micotoxine și de compuși melanoidinici solubili.

Experimente similare s-au realizat folosind borhot uscat de distilerie, prelevat din etapa de uscare, amestecat cu vinasă cu 15% substanță uscată, neplasmolizată și nehumificată, în proporție de 95 părți borhot uscat cu 15 părți vinasă. Amestecul rezultat a fost uscat în curent de aer la 40°C, adus la aceeași granulație de 20 mesh prin măcinare prin măcinare pe moară Retsch și utilizat ca referință în experimentele de desorbție *in vitro* prin incubare în medii care simulează trecerea prin tractul digestiv al animalelor de fermă, monogastrice și, respectiv, rumegătoare.

Pentru determinarea aflatoxinei din alicoturile prelevate filtratul a fost extras de trei ori cu câte 25 ml de cloroform. Frațiile cloformice au fost combinate, evaporate

la sec, reziduul fiind reluat în metanol și adus la 1 ml în flacon volumetric. Din acest extract s-au prelevat probe care au fost analizate pe un lichid cromatograf de înaltă presiune Agilent 6224 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SUA), folosind un amestec isocratic temar de apă, metanol și acetonitril, 50/40/10, pe o coloană ZORBAC Eclipse XBD-C18, 4,6 mm x 150 mm x 3,5 μm, cu detectare pe detector fluorescență (AOAC Official Method 994.08, 2000, 17th edition, volume II, AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA). Ca etalon s-a folosit un amestec de aflatoxine furnizat de Sigma Aldrich - Supelco (Sigma Aldrich, amestecul conține aflatoxină B₁ 1 μg/ml; aflatoxină B₂ 0.3 μg/ml; aflatoxină G₁ 1 μg/ml; aflatoxină G₂ 0.3 μg/ml), iar cuantificarea s-a făcut prin raportarea suprafeței picurilor corespunzătoare, din probele analizate cu cele ale etalonului.

Determinarea tricotecenelor, respectiv a 3-acetil deoxinivalenolului (ADON) și deoxinivalenolului (DON), din alicoturile prelevate s-a realizat după extracție repetată de trei ori în acetat de etil, evaporare la sec, reluare în acetonitril și determinare prin HPLC cu detector de fluorescență (Mateo *et al.*, 2002, J. Chromatogr., A, 955:245).

Determinarea compușilor melanoidinici solubili din alicoturile prelevate au fost determinați prin cromatografie de înaltă presiune cu detector refractometric diferențial (Shen *et al.*, 2007, Food Chem., 102, 281–287)

Au fost prelevate și probe de boabe de furaj granulat F inițial, reprezentative, care au fost măcinate până la o granulație de 20 mesh (0,85 mm) folosind o moară Retsch. In probe s-a determinat conținutul de aflatoxine totale, după extragere cu apă-clorură de metilen, 1:10 v/v, și respectiv tricotecene, după extragere în soluție acetonitril – apă (84:16, v/v), pre-purificare cu coloană de curățare multi-funcțională (Mycosep™, Romer Labs Inc., Union, MT, USA), și determinare prin HPLC cu detector de fluorescență, și, respectiv, cu detector refractometric diferențial .

Pentru a determina compușii melanoidinici totali, acizii humici (compuși melanoidinici solubili în soluții alcaline) și fulvici (compușii solubili), din furajul granulat F au fost prelevate probe, care au fost extrase cu pirofosfat de sodiu 0,1 M și hidroxid de sodiu 0,1 M. Supernatantul a fost acidificat la pH 2 cu HCl și menținut peste noapte la 24 ore la temperatura camerei. Pentru a separa acizi humici de acizii fulvici, soluția a fost centrifugată, iar precipitatul cu acizi humici a fost dizolvat cu hidroxid de sodiu 2 M (Yeomans și Bremner, 1988, Comm. Soil Sci. Plant Anal., 19:1467–1476). Conținutul de carbon în acizii humici și în acizii fulvici a fost determinat prin metoda Sims și Adonis, 1971, Soil Sci., 112:137–141.

Aceleași tipuri de determinări, de micotoxine și compuși melanoidinici, s-au realizat și pe probe prelevate din amestec de borhot uscat de distilerie cu vinasă nehumificată și neplasmolizată. Rezultatele sunt prezentate în tabelele 1 și 2 de mai jos, valorile determinate fiind normalizate la cantitatea de probă luată în lucru. Furajul rezultat prin procedeul descris reduce semnificativ desorbția contaminanților în mediile care simulează digestia la monogastrice și, respectiv, rumegetoare.

Tab. 1. Desorbția contaminanților din furajul granulat F realizat conform exemplului în experimente de simulare a digestiei la animalele de fermă.

Contaminant	Conținut furaj granulat F1	Simulare monogastrice			Simulare rumegetoare		
		Cavitate bucală	Stomac	Duoden	Cavitate bucală	Rumen	Duoden
Aflatoxine totale, μg/kg	3,82 (100%)	0	0	0	0	10,99%	12,57%
Aflatoxină B ₁	1,28 (100%)	0	0	0	0	11,72%	14,84%
Tricotecene totale, μg/kg	415,9 (100%)	5,53%	8,80%	12,62%	6,18%	9,28%	12,94%
ADON, μg/kg	109,2 (100%)	4,40%	7,51%	11,72%	4,85%	9,52%	11,81%
DON, μg/kg	306,7 (100%)	5,93%	9,26%	14,57%	6,65%	10,60%	12,68%
Melanoidine totale	525,9 (100%)	1,52%	2,00%	2,28%	1,37%	2,28%	2,72%
Acizi humici	423,3 (100%)	0,66%	0,73%	0,85%	0,57%	0,90%	0,97%
Acizi fulvici	102,6 (100%)	5,07%	7,21%	8,19%	4,68%	7,99%	9,94%

Tab. 2. Desorbția contaminanților din borhotul de distilerie uscat amestecat cu vinasă nehumificată în experimente de simulare a digestiei la animalele de fermă.

Contaminant	Conținut furaj	Simulare monogastrice			Simulare rumegetoare		
		Cavitate bucală	Stomac	Duoden	Cavitate bucală	Rumen	Duoden
Aflatoxine totale, μg/kg	3,87 (100%)	0,00%	16,54%	21,19%	7,24%	36,69%	52,20%
Aflatoxină B ₁	1,24 (100%)	0,00%	19,35%	33,06%	0,00%	30,65%	54,03%
Tricotecene totale, μg/kg	415,9 (100%)	26,71%	53,21%	82,23%	25,44%	44,60%	80,81%
ADON, μg/kg	109,2 (100%)	31,78%	84,80%	89,10%	32,42%	39,56%	87,27%
DON, μg/kg	306,7 (100%)	24,91%	41,96%	79,78%	22,95%	46,40%	78,51%
Melanoidine totale	533,2 (100%)	20,26%	43,21%	58,48%	18,68%	51,22%	60,67%
Acizi humici	112,6 (100%)	2,49%	2,75%	3,20%	3,02%	4,26%	4,53%
Acizi fulvici	420,6 (100%)	25,01%	54,04%	73,28%	22,87%	63,79%	75,70%

Revendicare

1. Procedeu conform invenției **caracterizat prin aceea** că este alcătuit din următoarele etape: normalizarea vinasei la 15% substanță uscată, din care cel puțin 10% din substanța uscată totală, respectiv 1,5% din total vinasă, este reprezentată de drojdie, prin evaporare sub vid; plasmoliza celulelor de drojdie și humificarea compușilor melanoidinici din vinasă, prin tratare cu laccază, 0,1 părți preparat enzimatic cu o activitate de 120 LAMU/g la 1000 părți vinasă, timp de 18 ore la temperatura de 55°C, și omogenizare intermitentă sub presiune, la fiecare 6 ore, într-un omogenizator cu piston, 5 cicluri la 150 Mpa; uscarea pe uscător cu valț a borhotului de distilerie și a drojdiei de fermentație, pentru a forma borhotul uscat de distilerie cu produse solubile, DDGS, cu o umiditate reziduală de max. 12%; amestecarea borhotului uscat de distilerie cu vinasă plasmolizată și humificată, în proporție de 95 părți borhot uscat de distilerie la 5 părți vinasă; densificarea amestecului borhot uscat – vinasă plasmolizată și humificată, prin presare într-o presă de peleți cu matrice orizontale, pentru a forma peleți cu lungimea de aprox. 15 mm și diametrul de 5...8 mm.