

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 409**

51 Int. Cl.:

A23L 5/20 (2006.01)

A23B 9/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2014 PCT/GB2014/052083**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2015 WO15004448**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2014 E 14739528 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 3019030**

54 Título: **Tratamiento de una suspensión líquida de gluten para reducir o eliminar aflatoxinas**

30 Prioridad:

10.07.2013 US 201361844583 P
02.09.2013 GB 201315557

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.06.2019

73 Titular/es:

TATE & LYLE INGREDIENTS AMERICAS LLC
(100.0%)
5450 Prairie Stone Parkway
Hoffmann Estates, IL 60192, US

72 Inventor/es:

ARMENTROUT, RICHARD W.;
MATTHEW, SUSAN;
MCINTYRE, TIMOTHY y
FARLEY, EDWARD

74 Agente/Representante:

RIZZO , Sergio

ES 2 715 409 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de una suspensión líquida de gluten para reducir o eliminar aflatoxinas

[0001] Esta invención se refiere a la producción de una suspensión de gluten de granos o de gluten de maíz utilizando gas ozono.

- 5 **[0002]** El listado o la discusión de un documento aparentemente publicado anteriormente en esta memoria no debería interpretarse como un reconocimiento de que el documento forma parte del estado de la técnica o es un conocimiento general común.

10 **[0003]** Las aflatoxinas son una clase de toxinas fúngicas producidas por hongos de la especie *Aspergillus* que contaminan de forma esporádica el maíz y otros tipos de cultivos durante la producción, cosecha, almacenamiento o procesado. La contaminación de maíz con aflatoxinas se ha reconocido desde los años 70, y es un problema esporádico pero recurrente relacionado con la humedad, calor y otros factores de crecimiento del terreno y durante el almacenamiento. Tras la peor sequía en medio siglo en 2012, la contaminación por aflatoxinas del maíz apareció a niveles inusualmente altos en el corazón del cinturón del maíz estadounidense. Se ha demostrado que las aflatoxinas son potentes carcinógenos que pueden causar enfermedades hepáticas graves (por ejemplo, cáncer de hígado). El procesado por molienda húmeda de maíz contaminado concentra esta toxina en las fracciones de gluten, reduciendo el valor de este producto de alimento para el ganado alto en proteínas.

20 **[0004]** Se han utilizado varias estrategias para eliminar las aflatoxinas de productos alimenticios y similares. Estas incluyen extracción con disolventes (por ejemplo, los documentos de patente US 4,747,979, US 4,062,984, US 4,055,674, US 6,058,940 y US 7,273,628), tratamiento con álcali (por ejemplo, los documentos de patente US 4,035 518, RE30,386 y US 5,082,679), tratamiento con minerales o arcillas (por ejemplo, los documentos de patente US 8,221,807, US 6,045,834, US 5,149,549 y US 5,639,492), el uso de microorganismos, como la *B. subtilis* japonesa (por ejemplo, los documentos de patente US 4,931,398 y US 5,549,890), modificación genética (por ejemplo, los documentos de patente US 5,844,121 y US 5,942,661), radiación UV (por ejemplo, el documento de patente US 7,452,561), el uso de anticuerpos (por ejemplo, el documento de patente US 7,494,589), nanopartículas reactivas como adsorbentes destructivos para aflatoxinas (por ejemplo, los documentos de patente US 6,417,423 y US 6,653,519), transposición de ADN para producir ácidos nucleicos para la desintoxicación de aflatoxinas (por ejemplo, el documento US 6,500,639) y el uso de enzimas que metabolizan aflatoxinas (por ejemplo, los documentos de patente US 7,671,242 y US 7,695,751). El documento de patente US 3,592,641 se refiere a un proceso para disminuir el nivel de aflatoxinas en harinas de cacahuete y de semillas de algodón contaminados con aflatoxinas. En este proceso, la harina de semilla de algodón contaminada (6,6 % de contenido de humedad) y harinas de cacahuete (7,2 % de contenido de humedad) se hidratan hasta un nivel del 22 % y el 30 % respectivamente. Las harinas hidratadas se ponen en contacto con gas ozono en un recipiente cubierto a presión atmosférica y se calientan hasta temperaturas de 75 °C y 100 °C. La eliminación de aflatoxina fue considerablemente mayor a 100 °C que a 75 °C. Un método adicional que se ha investigado es el uso de ozono para eliminar aflatoxinas de productos alimenticios.

40 **[0005]** El tratamiento con ozono puede degradar por completo las micotoxinas, o causar modificaciones químicas, reduciendo su actividad biológica. En un sistema modelo, el ozono reacciona sobre el enlace doble 8,9 del anillo de furano de la aflatoxina B1 ("AFB1") mediante un ataque electrófilo, causando la formación de ozónidos primarios seguida por la reorganización en derivados de mono-ozónidos como aldehídos, cetonas y ácidos orgánicos, tal como se muestra en la Figura 1. Cabe señalar que la aflatoxina B1 por lo general se considera que es la más tóxica de las aflatoxinas conocidas (Boutrif, E. (1998) "Prevention of aflatoxin in pistachios"; *Food, nutrition and agriculture* 21).

45 **[0006]** Existen varios métodos para la producción de ozono, por ejemplo, descarga eléctrica en O₂ o aire (por ejemplo, una descarga coronal), electrólisis de agua, o métodos térmicos, fotoquímicos o radioquímicos.

50 **[0007]** El ozono (O₃) es un potente agente oxidante y ha habido varios informes en los que se ha utilizado la ozonólisis en la eliminación de toxinas de productos alimenticios. Por ejemplo, el ozono gaseoso se da a conocer para la desinfección de alimentos en los documentos de patente US 6,066,348, US 6,294,211, US 6,120,822, US 5,431,939, US 4,549,477, US 4,376,130, US 5,213,759 y US 5,011,699. Aunque el ozono se suele utilizar para tratar agua municipal, es considerablemente más estable en el aire (ozono gaseoso) que en solución. No obstante, el ozono acuoso también se ha dado a conocer para la desinfección de productos alimenticios discretos (en concreto, canales de aves de corral) en los documentos de patente US 5,227,184, US 4,849,237 y US 5,087,466, pero al parecer no se han utilizado con materia en partículas suspendida en un líquido.

55 **[0008]** Más en concreto, hay un número de informes iniciales que sugieren que el ozono puede utilizarse para reducir o erradicar las aflatoxinas de productos alimenticios secos (por ejemplo, Dollear et al. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 1968, 45(12), pp. 862-865). Más recientemente, se ha sugerido en el documento US 7,943,804 (solicitud de patente estadounidense n.º 2010/0240933) que el uso de ozono gaseoso durante 96 horas puede ser beneficioso para aumentar la extracción de luteína de maíz sin aflatoxinas y para algunos lotes de alfalfa. Aunque menciona el maíz sin aflatoxina, la misma patente sugiere que la ozonización disminuirá considerablemente cualquier aflatoxina en la fuente vegetal (por ejemplo, los granos de maíz). Solicitudes de

patente recientes adicionales (solicitudes de patente internacional WO2011/087853 y WO2011/087856) se refieren al uso de un flujo de gas ozono para tratar granos de maíz en un recipiente de almacenamiento seco.

5 **[0009]** Se han hecho afirmaciones similares por McDonough et al. en el *Journal of Stored Products Research* 47 (2011) 249 e254, donde se propone que la exposición de maíz a altas concentraciones gaseosas (47 800 partes por millón (ppm)) de ozono en un transportador de flujo continuo durante 1,8 minutos puede ser útil para la reducción de aflatoxinas. No obstante, la reducción de aflatoxinas fue descrita en el artículo como que no era suficiente para ser de valor comercial.

10 **[0010]** El ozono gaseoso también ha sido considerado por Prudente Jr. et al. en el *Journal of Food Science* 67(8) 2002, 2866, donde el estudio sugería que del 10 al 12 % en peso del ozono gaseoso era suficiente para reducir los niveles de aflatoxina un 92 % en granos de maíz. Sin embargo, el estudio mostró que la ozonización tenía un efecto significativo en los ácidos grasos del maíz contaminado.

[0011] Con todo lo anterior en mente, los presentes inventores han concebido un método improvisado para la descontaminación de granos (por ejemplo, maíz) que sea especialmente adecuado para granos contaminados con aflatoxinas.

15 **[0012]** El documento de patente WO 02/05665 A1 se refiere al uso de gas radical para reducir o eliminar sustancias químicas indeseadas, sustancias dañinas y/o plagas, que están contenidas en un material, en la superficie de un material o que se liberan de un material.

20 **[0013]** El documento de patente WO 2008/084407 A2 se refiere a un método para descontaminar granos, frutos secos o productos que contienen semillas y un método para acondicionar granos en un proceso de molienda para su descontaminación. En el método de descontaminación y/o acondicionamiento, el grano, fruto seco o producto que contiene semillas se pone en contacto con un producto de anolito acuoso, que puede estar sin diluir o puede estar diluido con agua no activada.

[0014] McKenzie, K.S. et al., *Food and Chemical Toxicology*, vol. 35, no. 8, 1 Agosto 1997, pp. 807-820 se refiere a la desintoxicación y degradación oxidativa de micotoxinas utilizando una fuente de ozono.

25 **[0015]** El documento de patente US 3 592 641 Ase refiere a un proceso para disminuir el nivel de aflatoxinas en harinas de cacahuete y de semillas de algodón contaminadas con aflatoxina.

[0016] En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para reducir la aflatoxina en un gluten de granos o gluten de maíz, comprendiendo el método los siguientes pasos:

30 (a) procesar por molienda húmeda los granos o granos de maíz contaminados con aflatoxinas para producir gluten de granos o gluten de maíz, y preparar una suspensión de gluten de granos o gluten de maíz; y
(b) tratar la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz con ozono;

donde la temperatura de la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz en el paso (b) es de 10 a 60 °C; donde la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz contiene del 10 al 20 % en peso de materia seca por litro; y

35 donde la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz se prepara a partir de una fracción de gluten de granos o de maíz procesada por molienda húmeda.

[0017] En las reivindicaciones dependientes se exponen varios modos de realización ventajosos y desarrollos adicionales del proceso conforme a la invención.

40 **[0018]** En un modo de realización de la invención, el método es un método para reducir la aflatoxina en un gluten de maíz, comprendiendo el método los siguientes pasos:

(a) procesar por molienda húmeda los granos de maíz contaminados con aflatoxinas para producir gluten de maíz, y preparar una suspensión de gluten de maíz; y
(b) tratar la suspensión de o gluten de maíz con ozono;

en el que la temperatura de la suspensión de gluten de maíz en el paso (b) es de 10 a 60 °C;

45 en el que la suspensión de gluten de maíz contiene del 10 al 20 % en peso de materia seca por litro; y

en el que la suspensión de gluten de maíz se prepara a partir de una fracción de gluten de granos o de maíz procesada por molienda en húmedo.

[0019] En un modo de realización de la invención, el gluten de granos es un gluten derivado de un grano seleccionado del grupo que consiste en avena, arroz, o más en particular, cebada, trigo, espelta y centeno.

50 **[0020]** En un modo de realización de la invención, el tratamiento con ozono del paso (b) se lleva a cabo al inyectar gas ozono a través de la suspensión de gluten de granos o, más en concreto, de gluten de maíz.

[0021] En modos de realización adicionales de la invención, el método comprende además preparar gluten de granos o más en concreto, gluten de maíz a partir de la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz tratada.

55 **[0022]** En modos de realización adicionales de la invención, la suspensión de gluten de granos, o más en concreto, de gluten de maíz resultante (es decir, tras el tratamiento con ozono), tiene menos de 300 partes por mil millones de aflatoxina, tal como se mide por el contenido de aflatoxina B1 utilizando LC/MS (por ejemplo,

menos de 20 partes por mil millones, tal como menos de 100 partes por mil millones). En determinados modos de realización, la suspensión resultante de gluten de granos, o más en concreto, de gluten de maíz, tiene menos de 20 partes por mil millones de aflatoxina, tal como se midió por el contenido de aflatoxina B1 utilizando LC/MS.

5 **[0023]** Tal como se indicó anteriormente, la suspensión de gluten de granos, o más en concreto, de gluten de maíz contiene del 10 al 20 % en peso de materia seca por litro (por ejemplo, aproximadamente un 15 % en peso de materia seca por litro).

10 **[0024]** Tal como se ha indicado anteriormente, el paso (a) incluye procesar por molienda húmeda granos de grano o de maíz contaminados con aflatoxinas para producir gluten de granos o gluten de maíz antes de preparar la suspensión de gluten de granos o de gluten de maíz (es decir, el gluten de granos o el gluten de maíz utilizado para preparar la suspensión en el paso (a) se prepara al procesar por molienda húmeda los granos de grano o de maíz contaminados con aflatoxina. Preferiblemente, el gluten de granos o gluten de maíz preparado al procesarlo por molienda húmeda no se seca antes de preparar la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz en el paso (a). La suspensión de gluten de granos o más particularmente, de gluten de maíz se prepara a partir de una fracción de gluten de granos o de maíz procesada por molienda húmeda.

15 **[0025]** En un modo de realización adicional de la invención, la dosis de ozono total es de hasta aproximadamente 6,6 g de ozono por litro de suspensión de gluten de granos, o más en particular, de gluten de maíz (por ejemplo, 3,3 g de ozono por litro de suspensión de gluten de granos o gluten de maíz, tal como aproximadamente 2,8 g de ozono por litro de suspensión de gluten de granos o gluten de maíz, por ejemplo, de 20 **[0026]** En modos de realización de la invención adicionales, el método comprende además la adición, según proceda, de un agente antiespumante seco o un líquido en el paso (b) (por ejemplo, un agente antiespumante líquido).

25 **[0027]** En aún más modos de realización adicionales, la temperatura del paso (b) es de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 °C (por ejemplo, de aproximadamente 20 a 28 °C, como aproximadamente 27 °C).

30 **[0028]** En aún más modos de realización adicionales, la suspensión de gluten de granos, o más en concreto, de gluten de maíz está contaminada con 20 partes por mil millones (ppb) de aflatoxinas o más (por ejemplo, de aproximadamente 30 ppb a aproximadamente 100 ppb de aflatoxina, como de 40 a 50 ppb de aflatoxina). Por ejemplo, la materia seca de la suspensión de gluten de granos, o más en concreto, de gluten de maíz está contaminada con de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 ppb de aflatoxinas.

[0029] En modos de realización de la invención, el gluten de maíz preparado en el paso (b) contiene menos de 1 ppb de aflatoxina.

[0030] En modos de realización de la invención, el gluten de granos preparado en el paso (b) contiene menos de 1 ppb de aflatoxina.

35 **[0031]** En aún más modos de realización adicionales de la invención, el tratamiento de la suspensión de gluten de granos o, más en concreto, de gluten de maíz con ozono en el paso (b) dura aproximadamente de 15 minutos a 3 horas (por ejemplo, de aproximadamente 30 minutos a 2 horas).

40 **[0032]** En otros modos de realización, durante el paso (b) los agentes antiespumantes secos (es decir, sólidos) o líquidos se añaden según se requiera para evitar la formación de espuma durante la adición de gas a la suspensión de gluten de granos o de gluten de maíz.

[0033] En modos de realización de la invención, el componente líquido de la suspensión de gluten de granos o, más en concreto, de gluten de maíz, es agua.

[0034] La invención se describirá con más detalle a continuación, con la ayuda de las siguientes figuras.

La Figura 1 representa el mecanismo de reacción postulado para la ozonólisis de la aflatoxina B1.

45 La Figura 2 representa oxígeno fluyendo entre un electrodo y un cátodo produce ozono a partir de una descarga de corona.

La Figura 3 representa la concentración de ozono (%) frente al flujo de oxígeno (litros por minuto). Esta representación muestra que según asciende el flujo de oxígeno, la concentración de ozono en el oxígeno disminuye.

50 La Figura 4 representa la producción de ozono (g/h) frente al flujo de oxígeno (litros por minuto). Esta representación muestra que la producción general de ozono aumenta según aumenta el flujo de oxígeno.

La Figura 5 representa el efecto del tratamiento con ozono en las muestras de suspensión de gluten de maíz enriquecidas con aflatoxina B1.

55 La Figura 6 representa el efecto del tratamiento con ozono en las muestras de suspensión de gluten de maíz enriquecidas con aflatoxina B1 a 80 °F (26,7 °C).

La Figura 7 representa el uso de distintas materias primas gaseosas para la producción de ozono y su efecto en la reducción de aflatoxinas.

La Figura 8 representa el índice de inactivación de aflatoxina comparado con la tasa de destrucción de bacterias por ozono en una suspensión de gluten de maíz utilizando oxígeno como la materia prima para la producción de ozono.

La Figura 9 representa el índice de inactivación de aflatoxinas comparado con la tasa de destrucción de bacterias por ozono en una suspensión de gluten de maíz utilizando aire como la materia prima para la producción de ozono.

[0035] Tal como se ha descrito anteriormente, varios estudios publicados sugieren que el tratamiento de granos de maíz con ozono en la fase gaseosa puede desintoxicar el maíz contaminado con aflatoxinas. Con base en estos informes, en un esfuerzo para remediar la contaminación por aflatoxinas en varias fracciones procesadas por molienda húmeda, los inventores trataron harina de gluten seco y granos de maíz enteros con ozono en fase gaseosa. No obstante, al contrario que estos informes anteriores, los inventores descubrieron que una exposición uniforme de la harina de gluten seco o granos de maíz enteros contaminados con aflatoxinas al ozono en fase gaseosa no tiene un efecto detectable en el nivel de aflatoxinas en los materiales tratados. Estos estudios están expuestos a continuación en los Ejemplos Comparativos del 1 al 5. Estos estudios muestran que se requiere una cantidad significativa de ozono para realizar la retirada deseada de aflatoxinas mientras se utiliza ozono en fase gaseosa, o que dicha retirada no puede reproducirse de manera fiable.

[0036] Con base en la poca estabilidad del ozono en líquidos, y en la falta de efecto del ozono en la fase gaseosa más estable sobre la contaminación por aflatoxinas, se anticipó que el tratamiento con ozono de la suspensión de gluten de maíz tampoco conseguiría reducir la contaminación por aflatoxinas. Por consiguiente, fue sorprendente descubrir que incluso una exposición relativamente breve de la concentración de gluten de maíz al ozono eliminaba de manera fiable y reproducible altos niveles de aflatoxinas, tal como se muestra en los Ejemplos 1 a 4 a continuación.

[0037] Tal como se ha señalado anteriormente, el ozono se suele utilizar como desinfectante en agua donde la carga orgánica es muy baja en comparación con la concentración de gluten. No obstante, los inventores han demostrado que la dosis de ozono requerida para eliminar cualquier aflatoxina detectable de la suspensión de gluten de maíz es significativamente menor que la cantidad requerida para destruir todos los microbios detectables en las muestras. Dicho de otro modo, la contaminación por aflatoxinas en la suspensión de gluten de maíz es más sensible a la destrucción por ozono que las bacterias vivas (por ejemplo, véase el Ejemplo 4).

[0038] Cuando se utiliza en la presente memoria, el término "aflatoxina(s)" se refiere a micotoxinas de origen natural que son producidas por muchas especies de hongos del género *Aspergillus*, siendo las más destacadas el *Aspergillus flavus* y el *Aspergillus parasiticus*. Al menos 14 tipos distintos de aflatoxina se producen en la naturaleza. Las aflatoxinas comunes incluyen la aflatoxina B1 (considerada la más tóxica y está producida por el *Aspergillus flavus* y el *Aspergillus parasiticus*), las aflatoxinas G1 y G2 (producidas exclusivamente por el *A. parasiticus*), las aflatoxinas M1 (encontradas en el medio de fermentación del *Aspergillus parasiticus*) y M2 (ambas descubiertas originalmente en la leche de vacas alimentadas con granos enmohecidos como metabolitos de otras aflatoxinas).

[0039] En modos de realización del presente documento, el nivel de aflatoxinas puede medirse con base en el nivel de aflatoxina B1 utilizando técnicas de LC/MS tal como se detalla a continuación.

[0040] Cuando se utiliza en la presente memoria, el término "suspensión de gluten de maíz" puede hacer referencia a una suspensión que comprende almidón, fibra y proteínas de gluten de maíz con hasta un 50 % en peso (por ejemplo, un 30 % en peso, tal como un 20 %, por ejemplo un 15 %) de materia seca por litro y el resto un líquido, como agua.

[0041] De manera alternativa, el término "suspensión de gluten de maíz" puede hacer referencia simplemente a una suspensión que contiene gluten de maíz con hasta un 50 % en peso (por ejemplo, un 30 % en peso, como un 20 %, por ejemplo un 15 %) de materia seca por litro y el resto un líquido, como agua.

[0042] Cuando se utiliza en la presente memoria, el término "gluten de maíz" se refiere a proteínas de maíz. Para evitar dudas, cabe señalar que el gluten de maíz no contiene gluten en sí (esto es, la composición de proteínas de gliadina y glutenina que se encuentra en el trigo, la cebada y el centeno), sino que contiene proteínas del maíz. Cuando se utiliza en el presente documento, el término "harina de gluten de maíz" puede referirse a una harina que comprende almidón, fibra y proteínas del gluten de maíz. De manera alternativa, este término puede hacer referencia solamente a las proteínas del gluten de maíz.

[0043] Cuando se utiliza en el presente documento, el término "suspensión de gluten de granos" se refiere a una suspensión que contiene proteínas de grano. Las proteínas de grano pueden ser gluten cuando el método conlleve el tratamiento de cebada, trigo, espelta y centeno o las proteínas del grano pueden ser un equivalente al gluten que se encuentra en la avena o el arroz.

[0044] Cuando se utiliza en la presente memoria, el término "grano" puede hacer referencia a cualquier grano o cultivo de cereales. Por ejemplo, el grano puede seleccionarse del grupo que consiste en avena, arroz o más en concreto, cebada, trigo, espelta y centeno.

5 **[0045]** Cuando se utiliza en la presente memoria, el término "ozono" se refiere a un gas portador que contiene una proporción de gas ozono. Los gases portadores típicos son gases que contienen oxígeno de manera que el ozono pueda producirse *in situ*, por ejemplo oxígeno o aire.

10 **[0046]** Cuando se utiliza en el presente documento, el término "agente antiespumante" hace referencia a un aditivo químico que reduce y dificulta la formación de espuma en líquidos de procesos industriales. Este aditivo químico puede ser un sólido o un líquido y, para los propósitos de la invención actual, preferiblemente un aditivo seguro para los alimentos. Pueden encontrarse ejemplos de dichos aditivos seguros para los alimentos en la web de la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) (<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=173.340>).

[0047] El método expuesto en la presente memoria es un método para reducir la aflatoxina en un gluten de granos o gluten de maíz, comprendiendo el método los siguientes pasos:

15 (a) procesar por molienda húmeda los granos o granos de maíz contaminados con aflatoxinas para producir gluten de granos o gluten de maíz, y preparar una suspensión de gluten de granos o gluten de maíz; y
(b) tratar la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz con ozono;

20 donde la temperatura de la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz en el paso (b) es de 10 a 60 °C; donde la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz contiene del 10 al 20 % en peso de materia seca por litro; y
donde la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz se prepara a partir de una fracción de gluten de granos o de maíz procesada por molienda húmeda.

[0048] Preferiblemente, el método se refiere al tratamiento del gluten de maíz.

25 **[0049]** Normalmente, siguiendo el método anterior, la suspensión tratada de gluten de granos, o más preferiblemente, de gluten de maíz, tiene menos de 20 partes por mil millones de aflatoxinas, tal como se midió por el contenido de aflatoxina B1 utilizando LC/MS. La aflatoxina B1 en general se considera que es la más tóxica de las aflatoxinas conocidas y se suele encontrar en el maíz, convirtiéndolo en un buen marcador para la carga total de aflatoxinas de una muestra.

30 **[0050]** Tal como se ha analizado anteriormente, la suspensión de gluten de granos, o más preferiblemente, de gluten de maíz contiene del 10 al 20 % en peso de materia seca por litro (por ejemplo, aproximadamente un 15 % en peso de materia seca por litro). Este nivel de sólidos cargados en el líquido (normalmente agua), permite el paso del ozono a través de un recipiente de reacción, asegurando que se distribuye la dosis requerida de ozono.

35 **[0051]** El gluten de granos o gluten de maíz se prepara procesando por molienda húmeda granos de maíz o cereales contaminados con aflatoxinas. Cuando se utiliza en la presente memoria, el término "molienda húmeda" se refiere a un proceso en el que el material de alimentación (es decir, cereales (tales como avena, arroz, cebada, trigo, espelta o centeno) o granos de maíz) se remojan en agua para ablandar el material de alimentación, antes de molerlo. Pueden utilizarse los procesos de molienda húmeda convencionales, como la molienda húmeda de maíz tradicional.

40 **[0052]** Normalmente, el gluten de granos o gluten de maíz preparado al procesarlo por molienda no se secó antes de preparar la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz. La suspensión de gluten de granos o más en concreto, de gluten de maíz se prepara a partir de una fracción de gluten de granos o de maíz procesada por molienda húmeda.

45 **[0053]** Pueden añadirse agentes antiespumantes secos o líquidos durante la aplicación de gas ozono a la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz (es decir, el paso (b)) según se requiera para evitar la formación de espuma durante la adición de gas a la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz.

50 **[0054]** Normalmente, la dosis de ozono total es de hasta aproximadamente 6,6 g de ozono por litro de suspensión de gluten de granos, o más preferiblemente, de gluten de maíz (por ejemplo, hasta aproximadamente 3,3 g de ozono por litro de suspensión de gluten de granos o gluten de maíz, como hasta aproximadamente 2,80 g de ozono por litro de suspensión de gluten de granos o gluten de maíz, por ejemplo, de aproximadamente 1,80 g a aproximadamente 2,50 g de ozono por litro de suspensión de gluten de granos o gluten de maíz). De manera alternativa, la dosis de ozono total es de aproximadamente 6 000 partes por millón (ppm) por litro de suspensión de gluten de granos, o más preferiblemente, de gluten de maíz, como aproximadamente 4 000 ppm por litro de suspensión de gluten de granos o de gluten de maíz (por ejemplo, de aproximadamente 1 600 ppm a
55 aproximadamente 2 800 ppm por litro de suspensión de gluten de granos, o más preferiblemente, de gluten de maíz). De manera todavía alternativa, la dosis de ozono puede suministrarse durante desde aproximadamente 30 minutos hasta aproximadamente 2 horas como un flujo de ozono en un gas portador, donde el contenido de ozono equivale a de aproximadamente 1,25 g por hora hasta aproximadamente 3,3 g por hora. Normalmente, el

ozono se suministrará en un gas portador. Cuando el ozono se genera *in situ* el gas portador es un gas que puede utilizarse para generar ozono, por ejemplo, aire u oxígeno.

5 **[0055]** Normalmente, el recipiente de reacción es un tubo vertical hecho de vidrio o plástico resistente al ozono que recibe un chorro de gas portador (por ejemplo, oxígeno o aire que contiene ozono generado *in situ* cuando sea necesario) en el fondo del recipiente y permite que el gas salga a través de la parte superior del recipiente, opcionalmente hacia un sistema de limpieza que retire cualquier ozono residual. El ozono *in situ* puede generarse utilizando una o más de entre descargas eléctricas en el oxígeno o aire (por ejemplo, una descarga coronal), electrolisis del agua, o por métodos térmicos, fotoquímicos o radioquímicos. Preferiblemente, el ozono se genera por una descarga coronal en el oxígeno o aire.

10 **[0056]** Tal como se apreciará, en lugar de utilizar un recipiente de reacción tubular, es posible añadir una dosis fija de ozono en un recipiente que contenga suspensión de gluten de granos, o más preferiblemente, gluten de maíz; dicho recipiente se agita después para asegurar que el ozono se consume para reducir la carga de aflatoxinas en la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz

15 **[0057]** Para realizar la adición de gas ozono a la suspensión de gluten de granos, o más preferiblemente, de gluten de maíz, se descubrió que la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz tenía tendencia a generar espuma. Esto provocó problemas en contener la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz espumosa dentro del recipiente de reacción (por ejemplo, un tubo de reacción hecho de vidrio o plástico) utilizado para el proceso. A fin de reducir esta formación excesiva de espuma, se introdujo un agente antiespumante al recipiente según se requería. Por ejemplo, una parte del agente antiespumante puede añadirse al recipiente de reacción
20 antes de introducir el ozono en la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz y/o el agente antiespumante puede añadirse durante la aplicación de gas ozono a la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz. Aunque es posible utilizar agentes antiespumantes sólidos y líquidos, es preferible utilizar antiespumantes líquidos. Los antiespumantes líquidos adecuados incluyen la emulsión antiespumante FG-10 de Dow Corning.

25 **[0058]** Tal como se expone en el presente documento, el ozono es sensible a los cambios de temperatura, en concreto cuando se deposita en un líquido como el agua. Dado esto, el proceso normalmente se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 °C (por ejemplo, de aproximadamente 15 a aproximadamente 29 °C, de aproximadamente 20 a aproximadamente 28 °C, como a aproximadamente 27 °C) a fin de maximizar la vida media del ozono aplicada a la suspensión de gluten de granos, o más preferiblemente, de gluten de maíz. No obstante, el proceso también puede realizarse a una temperatura de aproximadamente
30 10 °C a aproximadamente 60 °C, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 60 °C (por ejemplo, de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 60 °C, de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 60 °C, de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C, de aproximadamente 53 °C a aproximadamente 55 °C, como a aproximadamente 54 °C).

35 **[0059]** Una ventaja de la invención actual es que la cantidad de ozono requerida para generar una reducción (por ejemplo, una eliminación completa) del nivel de aflatoxinas es mucho menor que la requerida cuando el tratamiento de granos, harinas de granos o más preferiblemente, granos de maíz o harina de maíz se lleva a cabo en la fase gaseosa. Por ejemplo, a continuación, en el Ejemplo 1, la cantidad de ozono requerida para reducir la cantidad de aflatoxina B1 en una suspensión de maíz hasta niveles por debajo de los detectables (es decir, <1 ppb) es aproximadamente la mitad de la dosis proporcionada en los Ejemplos Comparativos 5 y 6,
40 donde no se observó ningún cambio significativo en el nivel de aflatoxina B1 tras el tratamiento de harina de maíz seca con ozono gaseoso.

[0060] De acuerdo con las directrices de la FDA, el maíz y sus productos que contengan ≤20 ppb de aflatoxinas son considerados peligrosos para el consumo humano (o para algunos animales), mientras que el maíz y sus productos que contengan ≤100 ppb, ≤200 ppb y/o ≤300 ppb de aflatoxinas son considerados peligrosos para el
45 consumo animal, dependiendo de la edad, el tipo y el uso final del animal en cuestión. Por ejemplo, tal como se expone en la página web de la *Office of Indiana State Chemist* (Oficina del Químico Estatal de Indiana – <http://www.isco.purdue.edu/feed/mycotoxins.htm>), los animales inmaduros, las aves de corral inmaduras y los animales lecheros no deberían exponerse a productos para la alimentación animal de maíz y cacahuete que tengan ≤20 ppb de aflatoxinas; los bovinos reproductores, porcinos reproductores y aves de corral maduras no deberían exponerse a productos para la alimentación animal de maíz y cacahuete que tengan ≤100 ppb de
50 aflatoxinas; los porcinos en engorde no deberían exponerse a productos para la alimentación animal de maíz y cacahuete que tengan ≤200 ppb de aflatoxinas; y el ganado bovino de engorde no debería exponerse a productos para la alimentación animal de maíz y cacahuete que tengan ≤300 ppb de aflatoxinas. Se aplican directrices similares a otros granos.

55 **[0061]** Aunque el proceso descrito en la presente memoria puede utilizarse para mejorar las harinas de gluten de granos, o más en concreto, las harinas de gluten de maíz que no estén contaminadas con más de 20 ppb de aflatoxinas, se ha descubierto que el proceso actual es particularmente útil en la fabricación de harinas de gluten de granos o harinas de gluten de maíz que contienen una cantidad de aflatoxinas en el gluten de granos o el gluten de maíz que es peligrosa para el consumo humano y/o animal.

60 **[0062]** Por consiguiente, el proceso descrito en la presente memoria es particularmente útil en cuanto a la suspensión de gluten de granos, o más en concreto, gluten de maíz que está contaminada con 20 partes por mil

- millones (ppb) de aflatoxinas o más (por ejemplo, de aproximadamente 30 ppb a aproximadamente 100 ppb de aflatoxinas, como de 40 a 50 ppb de aflatoxinas). Por ejemplo, la materia seca de la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz antes del procesamiento puede estar contaminada con aproximadamente de 100 a 500 ppb de aflatoxinas (por ejemplo, de 100 a 300 ppb). En la mejora de la suspensión de gluten de granos o maíz, el proceso actual es capaz de reducir la contaminación de aflatoxinas a menos de 1 ppb (es decir, menos de un nivel detectable de aflatoxinas).

[0063] La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos, entendiéndose que estos tienen como objetivo explicar la invención y no limitar su alcance de ninguna manera.

EJEMPLOS

10 Medición de Aflatoxina B1

[0064] Se adquirió una Aflatoxina B1 (estándar) y una Aflatoxina B1 marcada con ^{13}C (estándar interno para el enriquecimiento) de Romer Lab, St. Louis, Misuri, EE. UU. Las separaciones por LC-MS se llevaron a cabo en una HPLC Waters 2695 conectada con un espectrómetro de masas triple cuádruple Waters Quattro Micro. La ionización se llevó a cabo en el modo positivo con los siguientes parámetros.

Muestra	Ion precursor (m/z)	Transición primaria (m/z)	Energía de colisión (m/z)	Transición secundaria (m/z)	Energía de colisión (m/z)
Aflatoxina B1	313,1	241,1	49	285,0	37

- [0065]** Fase móvil: Disolvente A (ácido fórmico al 0,1 % con formiato de amonio 5 mM); disolvente B (acetonitrilo); Caudal: 1,0 mL/min; Columna: Phenomenex Gemini C₁₈ (150 x 4,6 mm), 5 µm; Temperatura: 40 °C; Volumen de inyección: 40 µL.

[0066] El programa de gradientes era el siguiente:

Tiempo (min)	Disolvente A (%)	Disolvente B (%)
0	90	10
14,0	3	97
15,0	3	97
15,1	10	90
16,0	10	90

20 Ejemplo comparativo 1

Estabilidad del ozono en aire y agua

- [0067]** La tabla 1 enumera las estabildades de vida media del ozono en gas y agua a distintas temperaturas. Los datos proporcionados a continuación se obtuvieron de Lenntech BV, Países Bajos (<http://www.lenntech.com/library/ozone/decomposition/ozone-decomposition.htm>)

Tabla 1

Aire		Disuelto en agua (pH 7)	
Temp. (°C)	Vida media	Temp. (°C)	Vida media
-50	3 meses		
-35	18 días	15	30 min
-25	8 días	20	20 min
20	3 días	25	15 minutos
120	1,5 horas	30	12 minutos
250	1,5 segundo	35	8 min

Ejemplo comparativo 2

[0068] El ozono gaseoso no es eficaz para reducir la aflatoxina en granos de maíz contaminado

[0069] Se obtuvieron tres muestras de maíz de la planta de Decatur, Illinois, y una de las muestras se eligió al azar para su utilización en esta prueba. La muestra utilizada se etiquetó: "28995 Heritage Grain, Dalton City"

[0070] Este envase de muestra elegido tenía 1 278 g de granos de maíz, que se transfirieron a una jarra de 4 L y se mezclaron cuidadosamente. La muestra se dividió después en dos partes, T0 y T4 según se detalla a continuación.

T0, muestra de control:	638	9
T4, experimental:	640	9

Protocolo:

[0071]

1. Un tubo de reacción de plástico con una fuente directa de la línea de suministro de ozono en la parte inferior se construyó con una pequeña cantidad de lana de vidrio para evitar que los granos y el polvo bloqueen el conducto de alimentación. La parte superior del tubo de reacción se tapó tras la adición de los granos al tubo y se instaló un conducto de escape para dirigir los gases de escape a una jarra que contiene suspensión de harina de gluten como un depurador.
2. Se produjo ozono utilizando un generador OZV-8 con una entrada de aire comprimido seco. El caudal del aire era de 1 litro por minuto (LPM). No había contrapresión medible. El generador se ajustó al voltaje máximo (ajuste = 10). Los datos proporcionados por el vendedor indican que 1,25 g/h de ozono se suministra en estas condiciones.
3. El generador se encendió y se detectó ozono en la parte superior del limpiador a los 5 minutos. El gas que contiene ozono se dejó fluir a través del tubo de reacción durante 4 horas. El tubo de reacción se enjuagó con aire (el generador se apagó) durante 5 minutos; en dicho punto el ozono no se volvió a detectar de la línea de suministro.

[0072] Las muestras T0 y T4 completas se molieron respectivamente en un molino Krupps y el maíz molido de cada muestra se mezcló cuidadosamente. Se tomaron muestras representativas (5 g) de cada una de las muestras de maíz molido y se extrajeron con acetonitrilo con una molienda de bolas adicional. Los extractos se analizaron mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC/MS). Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2

Muestra (N.º LIMS)	Tiempo de exposición (horas)	Gramos de harina expuestos	Aflatoxina residual (ppb)	Comentarios
338625	0	638	12,0	Sin exposición
338626	4	640	24,4	Ozono

[0073] Tal como puede verse de los resultados de la Tabla 2, el tratamiento de los granos de maíz enteros con ozono durante 4 horas (5 g de ozono) no fue eficaz. Además, hay una variabilidad considerable entre muestras de granos de maíz, incluso cuando proceden de un suministro de granos común mezclado cuidadosamente. Esta variabilidad puede resultar en la falsa conclusión de que la aflatoxina se ha reducido o eliminado, tal como puede observarse en el hecho de que la muestra expuesta al ozono tenía un nivel de aflatoxina residual más alto que el de control. Se especula que esta variabilidad puede justificar la reducción de aflatoxinas que se ha señalado anteriormente.

Ejemplo comparativo 3

[0074] *El ozono gaseoso no es eficaz en la reducción de aflatoxinas en harina de gluten seco contaminada utilizando una cantidad fija de ozono y cantidades variables de harina de gluten seco.*

Objetivos:

[0075]

1. Determinar si el tratamiento con ozono de la harina de gluten seca reducirá los niveles de aflatoxinas.
2. Determinar si aumentar las cantidades de harina seca influirá en los efectos de un nivel fijo de ozono.

Protocolo:

[0076]

1. Se utilizó una jarra cuadrada de plástico plegable de 4 L para capturar el gas que contiene ozono para someterlo a reacción con una harina de gluten seca. Para medir el volumen de la jarra, se midió el peso de la jarra vacía y se midió el peso de la jarra llena de agua:

Jarra con agua **4 204 g**
 Peso de la jarra vacía 80,84 g
 Peso del agua 4 123,16 g = 4 123,16 ml = 4,12 L

2. Se obtuvo harina de gluten de maíz seca con altos niveles de aflatoxina a partir de la planta de Lafayette (muestra: LIMS 338084, "STLX 5221, ugly GLM from Lafayette"). Se pesaron 477,30 g de harina en un tarro y se mezcló cuidadosamente para formar una harina madre. A partir de esta harina madre, las muestras en las cantidades indicadas a continuación en la Tabla 3 se pusieron en jarras de reacción de plástico.

3. Se utilizó aire comprimido para alimentar el generador de ozono OZV-8. El suministro de aire seco fue de ~1 LPM, con 0 psi y un ajuste de tensión de 10 (máx.). En estas condiciones, los datos del proveedor indican que se producen ~20,8 mg/L de ozono (1,25 g/h). El gas que contiene ozono fluye hacia dentro del tarro con la tapa abierta durante 15 minutos para expulsar aire en el recipiente y sustituir el volumen con gas que contiene ozono.
- 10 Tras 15 minutos, el generador de ozono se apagó, se cortó el suministro de aire comprimido al generador de ozono, se retiró la línea de alimentación de ozono a la jarra y se selló la jarra.

Ozono estimado en la jarra de reacción = 85,8 mg

4. Cada jarra de reacción sellada que contiene las cantidades de harina seca y gas que contiene ozono indicada a continuación en la Tabla 3 se mezcló cuidadosamente agitándolo vigorosamente durante ~5 min.
- 15 5. Cada una de las muestras se extrajo con acetonitrilo y mediante molienda de bolas antes del análisis por LC-MS de aflatoxinas.

[0077] Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3

Muestra (N.º LIMS)	Peso de la muestra de harina (g)	Dosis de ozono (mg/g harina)	Aflatoxina residual (ppb)	Comentarios
1 (338235):	15,11	5,68	26,8	
2 (338236):	50,13	1,71	24,0	
3 (338237):	102,43	0,84	28,6	
4 (338238):	250,01	0,34	31,4	
5 (338235):	59,56	0,00	28,0	Control, sin tratamiento por O ³
6 (338084):	N/A	0,00	32,8	Control, sin tratamiento por O ³

- 20 [0078] Con base en lo anterior, cantidades variables de harina de gluten de maíz seca expuestas a un nivel fijo de ozono en una jarra de reacción no afectan de manera significativa la contaminación por aflatoxinas. Esto se ve claramente para el ensayo de la Muestra 1 con la dosis más alta de ozono, que muestra claramente que el tratamiento estacionario de la harina de maíz seca no fue eficaz.

Ejemplo comparativo 4

- 25 [0079] *El ozono gaseoso no es eficaz en la reducción de la aflatoxina en harina de gluten seca utilizando exposición al flujo superficial.*

- [0080] En el Ejemplo Comparativo 3, se expusieron cantidades variables de harina de maíz seca a una cantidad fija de ozono en una jarra de 4 L con una mezcla que dio como resultado que no había indicaciones de una reducción de aflatoxina. El presente ejemplo considera si resulta algún cambio en el nivel de aflatoxinas cuando se expone una cantidad relativamente fija de harina seca a un flujo continuo de gas ozono sobre la superficie de la harina de maíz mezclándola periódicamente. Resultó difícil conseguir suficiente presión para empujar el gas que contiene ozono a través de una columna de harina, de manera que en su lugar este experimento se estableció como un sistema de "flujo horizontal".

Protocolo:

- 35 [0081] Un insuflador de vidrio poroso al final del tubo de suministro se ajustó a la base de un tubo de reactor de vidrio. El tubo del reactor tiene una tapa con un sistema de escape. Se retiró la tapa y se vertió la harina seca en el tubo. Después, el tubo se orientó de manera horizontal, con la harina extendida a lo largo de toda su longitud. Con la tapa del tubo cerrada, el insuflador de suministro está en la parte inferior del tubo del reactor y solo está cubierto parcialmente por harina. Si se cubre el insuflador, no hay flujo de gas a través del sistema. Con esta disposición, el gas que contiene ozono pasa a lo largo de la superficie de la harina extendida a lo largo de la longitud del tubo de vidrio del reactor, pero no se filtran a través de la harina.

Muestra de harina de maíz seca:

[0082] La harina de gluten era de la muestra LIMS N.º 338083 (61,2 ppb de aflatoxina en un ensayo anterior). La Tabla 4 enumera los pesos de las muestras de harina expuestas para variar la cantidad de tiempo del gas que contiene ozono.

Experimental:

- 5 **[0083]** Se utilizó aire comprimido para alimentar el generador de ozono OZV-8. El suministro de aire seco fue de ~1 LPM, con 0 psi y utilizando un ajuste de tensión de 10 (máx.). En estas condiciones, los datos del proveedor indican ~20,8 mg/L de ozono (1,25 g/h).

- 10 **[0084]** El gas que contiene ozono fluyó sobre la muestra durante los tiempos indicados en la Tabla 4, con el tubo de reacción rotado cada 15 minutos para mezclar la muestra. Al final de cada tiempo de exposición indicado, el generador de ozono se apagó y el aire se drenó a través del reactor. Una muestra de ~15 g se retiró del recipiente, se midió el resto del peso de la muestra, y luego el flujo del gas que contiene ozono se reanudó. Las muestras retiradas se extrajeron con acetonitrilo y se sometieron a una molienda de bolas antes del análisis por LC-MS de aflatoxinas. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4

LIMS N.º	Tiempo de exposición (horas)	Gramos de harina expuestos	Aflatoxina residual (ppb)	Comentarios
338363	0	157,20	62,4	Control. Ensayo anterior = 61,2 ppb
338364	1	142,11	63,6	
338365	2	125,45	69,6	
338366	3,5	109,54	60,4	

15

[0085] Tal como se muestra en la Tabla 4, incluso cuando se expone harina de gluten de maíz seca a un flujo continuo de gas que contiene ozono durante un periodo prolongado de tiempo no hay ningún efecto discernible en el nivel de aflatoxina de la muestra.

Ejemplo comparativo 5

- 20 **[0086]** *El ozono gaseoso no es eficaz en la reducción de aflatoxinas en harina de gluten seca expuesta en un lecho fluidizado durante >10 horas.*

- 25 **[0087]** Los Ejemplos Comparativos 3 y 4, donde se expuso harina de gluten de maíz seca a ozono en fase gaseosa no fueron eficaces para reducir la aflatoxina de las muestras. Para asegurar que se establecía un contacto suficiente entre el gas ozono y el polvo de gluten, se llevó a cabo un experimento adicional, donde el gluten granulado se expuso continuamente a ozono cuando el polvo se fluidificó en un chorro de aire.

Protocolo:

- 30 **[0088]** Una secadora del lecho fluidizado a escala reducida (Sherwood Scientific) se instaló en una campana extractora química. El generador de ozono a escala reducida (generador de ozono OZV-8) se instaló en el extractor con un suministro de aire comprimido. La línea de suministro de ozono se introdujo en el lecho fluidizado a través de un agujero en la manga de recolección de polvo en la parte superior del recipiente de cristal de la secadora (bien sujeto para evitar el escape de polvo alrededor del agujero de entrada). La secadora se puso en marcha a temperatura ambiente a un ajuste de ~¾ (número determinado 7) que proporcionó un flujo de aire adecuado a través de la base del recipiente de cristal para fluidificar ~400 g de harina de gluten seca.

Muestra de harina seca:

- 35 **[0089]** La harina de gluten era del LIMS N.º 338083 (61,2 ppb de aflatoxinas en un ensayo anterior) Los pesos de la harina expuesta durante varias veces y su número de LIMS (Sistema de Gestión de Información de Laboratorio) se enumeran a continuación en la Tabla 5.

Experimental:

- 40 **[0090]** Se utilizó aire comprimido para alimentar el generador de ozono OZV-8. El suministro de aire seco fue de ~1 LPM, con 0 psi y un ajuste de tensión de 10 (máx.). En estas condiciones, los datos del fabricante indican que se producirán ~20,8 mg/L de ozono (1,25 g/h).

- 45 **[0091]** El gas que contiene ozono fluyó a través de la muestra fluidificada (~400 g) durante los tiempos indicados. Al final del tiempo de exposición indicado, el generador de ozono se apagó y el aire se drenó a través del reactor. Se retiró una muestra de ~15 g del recipiente, y luego el flujo de gas que contiene ozono se reanudó sobre la muestra remanente.

[0092] Los resultados de estos experimentos se resumen a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5

LIMS N.º	Tiempo de exposición (horas)	Gramos de harina expuestos	Aflatoxina residual (ppb)	Comentarios
339034	0	N/A	40,8	Control
339035	2	400,28	49,2	
339038	10,5	293,89	47,6	

- 5 **[0093]** Cantidades aproximadamente fijas de harina de gluten seca fluidificada se expusieron durante periodos de tiempo variables a gas que contiene ozono. A intervalos de ~15 g las muestras se retiraron y se sometieron a la extracción con acetonitrilo y molienda de bolas antes del análisis con LC-MS de la aflatoxina B1. Como puede verse en la Tabla 5, el tratamiento con ozono no fue eficaz en la reducción de la cantidad de aflatoxinas en la harina de maíz.

Ejemplo 1

El ozono en fase líquida es muy eficaz en la reducción de aflatoxinas en una suspensión de gluten contaminada (~15 % en peso de MS).

- 10 **[0094]** Existen varios métodos para la producción de ozono, por ejemplo, descarga eléctrica en O₂ o aire, electrólisis de agua, o métodos térmicos, fotoquímicos o radioquímicos. Pero en este experimento, el ozono se produjo con un generador de oxígeno industrial mediante un proceso de descarga de corona. En la descarga de corona, el O₂ enriquecido de un generador de oxígeno se introdujo en una unidad de generación de ozono que convierte el oxígeno en ozono mediante la utilización de alto voltaje (por ejemplo, véase la Fig. 2).

15 1.1. Ecuaciones y conversiones de ozono

[0095] Véase: <http://www.ozonesolutions.com/info/ozone-conversions-equations>

[0096] Propiedades físicas en condiciones estándar:

Presión: 1 013,25 MB; Temperatura: 273,3 K

	<i>Densidad</i>	<i>Peso molecular</i>
Ozono	2,14 kg/m ³	48
Oxígeno	1,43 kg/m ³	32
Aire	1,29 kg/m ³	1 000 kg/m ³

20 **Concentración de ozono en aire y oxígeno en peso**

[0097]

100 g O₃/m³ = ~6,99 % O₃
 1 % O₃ = ~ 14,3 g O₃/m³
 1 % O₃ = 6 520 ppm Ozono

25 **Concentración de ozono en agua**

[0098] 1 mg/l = 1 ppm O₃ = 1 g O₃/m³ agua

Concentración de ozono en aire por volumen

[0099]

- 30 1 g O₃/m³ = 467 ppm O₃
 1 ppm O₃ = 2,14 mg O₃/m³
 100 pphm (partes por cien millones) = 1 ppm (partes por millón)

Ajustar la conversión del índice de flujo

[0100]

$$(\text{flujo ajustado}) = (\text{flujo medido}) \cdot \sqrt{\frac{(\text{presión del oxígeno}) + 14,7}{14,7}}$$

35 **Determinar la dosis de ozono en el agua**

[0101]

Índice de flujo del agua (X) dosis de ozono = producción de ozono requerida

Determinar la salida de un generador de ozono

[0102]

Índice de flujo (LPM) x concentración de ozono (g/m³) = producción de ozono (mg/h)

5 **2. EXPERIMENTAL**

2.1. Materiales y métodos

[0103]

- Generador de oxígeno (suministro de oxígeno industrial), generador de ozono TG-40 de Ozone Solutions
- Recipiente de reacción - tubos de PVC resistentes al ozono
- 10 ○ Índice de flujo de oxígeno 0,5 L/min (LPM); presión ~10 psi; Concentración de Ozono en gas oxígeno: 110 g/m³; resultado del O₃ producido = 0,5 L/min x 110 g/m³ x (1 m³/1 000 L) = 0,055 g/min = **3,3 g/h**

15 [0104] El generador de ozono TG-40 genera O₃ mediante una descarga de corona. En este proceso, se utiliza una chispa eléctrica para romper el enlace molecular del oxígeno, encontrado en la naturaleza en forma de O₂, en la forma atómica O del oxígeno. Estos átomos O se unen a otras moléculas de O₂ para formar O₃. La concentración y la producción de ozono adecuada para la aplicación necesaria puede determinarse y conseguirse utilizando el gráfico de rendimiento TG-40 que se muestra a continuación (Tabla 6; Generador de ozono de 40 gramos/hora <http://www.ozonesolutions.com/products/Industrial-Ozone-Generators/TG-40>) Tal como se señala a continuación en la Tabla 6, según aumenta el flujo, la concentración de ozono (% en peso) disminuye, en cambio, según disminuye el flujo, la concentración de O₃ aumenta. Véanse también las Figuras 3 y 4.

Producción de ozono estimada para TG-40.

[0105]

- 20 g/h de ozono - 4 LPM de oxígeno
- 30 g/h de ozono - 6 LPM de oxígeno
- 25 40 g/h de ozono - 10 LPM de oxígeno

Generador de ozono TG-40

[0106]

Tabla 6

Flujo de oxígeno en LPM	Concentración de ozono g/Nm ³	Concentración de ozono, % en peso	Producción de ozono en g/h	Presión del ozono PSI
2,00	119,5	7,50	12,87	10
3,00	114,3	7,37	18,97	10
4,00	110,1	7,05	24,20	10
5,00	104,4	6,66	28,57	10
6,00	97,3	6,15	31,66	10
7,00	90,7	5,68	34,11	10
8,00	86,2	5,33	36,59	10
9,00	79,0	4,98	38,46	10
10,00	74,3	4,68	40,15	10
11,00	68,6	4,49	42,38	10
12,00	64,6	4,24	43,66	10
13,00	61,0	4,02	44,84	10
14,00	57,0	3,80	45,65	10
15,00	3,5	3,65	46,98	10
16,00	53,1	3,47	47,64	10
17,00	51,1	3,33	48,57	10

18,00	48,7	3,18	49,11	10
19,00	46,9	3,07	50,05	10
20,00	45,6	2,99	51,31	10

2.2. Muestras de gluten de maíz

[0107] Se obtuvieron muestras de suspensión de gluten de maíz contaminadas (LIMS 335552 y 335553) con un 15 % en peso de materia seca (MS) de la planta de Tate & Lyle, en Decatur. Las muestras (1 L cada una) se enriquecieron con Aflatoxina B1 para conseguir una concentración final de 50 ppb en la suspensión líquida (LIMS 335185) antes del tratamiento con ozono.

2.3. Tratamiento de la muestra con ozono

[0108] Las muestras de suspensión enriquecidas con AFB1 se transfirieron a un tubo de PVC resistente al ozono con una capacidad de 2 L. El extremo superior del tubo se conectó a una unidad de destrucción de ozono. La muestra de suspensión enriquecida se trató durante 15, 30, 60 y 120 min a temperatura ambiente (27 °C) con 3,3 g/h de ozono fluyendo desde la parte inferior del tubo. El gas ozono se produjo a partir del modelo de generador de ozono TG-40 utilizando un generador de oxígeno a gran escala industrial tal como se describió anteriormente. Se introdujeron antiespumantes (sólidos o en solución) en el tubo de reacción a intervalos regulares para evitar que la suspensión de gluten produjera demasiada espuma. Las Tablas 7 y 8 resumen las condiciones aplicadas a los materiales.

[0109] Las muestras retiradas tras 0, 15, 30, 60 y 120 min se trataron de la manera descrita para los ejemplos comparativos a fin de evaluar el nivel de aflatoxina residual.

Tabla 7

LPM (L/min)	Concentración de O ₃ en gas O ₂	G/hr
0,5	110,00	3,3

Tabla 8

LIMS	Tiempo (min) de exposición al O ₃	Dosis inicial aplicada de O ₃	Dosis inicial en (~ppm)	Dosis (g)
335185	Control	0	0	0
335528	15	3,3 g/hr	750	0,825
335529	30	3,3 g/hr	1500	1,650
335530	60	3,3 g/hr	3000	3,300
335531	120	3,3 g/hr	6000	6,600

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

[0110] La suspensión de gluten de maíz se lavó con 110 g/m³ de gas ozono para 1 L de suspensión de gluten. El gas ozono que se escapa del sistema se monitorizó y midió (durante 15 min a 2 horas) y se descubrió que era de (0,1 g/m³), <1 % (lo que significaba que casi el 99 % de la dosis aplicada de gas O₃ está siendo consumida por la muestra). No hay ningún modo de medir el O₃ residual en la muestra de la suspensión debido a su color amarillo y contenido sólido (a diferencia del tratamiento con agua donde pueden utilizarse kits colorimétricos para medir el ozono residual). Tal como se ha señalado anteriormente, la solubilidad del ozono en agua es muy baja a altas temperaturas. Cuanto más alta sea la temperatura, más ozono se escapa de la solución. Por tanto, las bajas temperaturas son ideales para las reacciones del O₃. La formación de espuma puede ser un problema importante y se descubrió que los antiespumantes secos (es decir, sólidos) no funcionaban muy bien, pero que los antiespumantes líquidos solucionaban este problema hasta cierto punto. Cabe señalar que las dosis de O₃ aplicadas eran relativamente altas ya que se requiere 1-2 ppm de ozono residual para destruir las bacterias (véase el Ejemplo 4).

3.1. Efecto del gas ozono en la suspensión de gluten de maíz enriquecido con Aflatoxina B1 (AFB1)

[0111] Los datos presentados a continuación en la Tabla 9 muestran la cantidad de AFB1 detectada por la LC-MS en muestras enriquecidas tras la exposición al ozono en la fase líquida. Durante la ozonólisis, la Aflatoxina B1 (AFB1) se degradó de 277 ppb (control - gluten de maíz seco) a 125 ppb y 21 ppb respectivamente tras 15 y 30 minutos de exposición. No había ninguna cantidad detectable de AFB1 presente en las muestras tratadas durante 60 y 120 minutos. Se observó una reducción del 55 % en la AFB1 tras 15 min de tratamiento, mientras que menos del 7 % de la AFB1 residual estaba presente tras 30 minutos de exposición de la suspensión de

gluten de maíz al ozono. También se señaló que la suspensión cambió de color de amarillo brillante a incolora durante la exposición. Estos resultados se resumen a continuación en la Tabla 9.

Cuantificación por LC-MS de Aflatoxina B1 en muestras tratadas con ozono

[0112]

5

Tabla 9

Tiempo de exposición del O ₃ (min)	Dosis de O ₃ ~ ppm	AFB1 ppb, MS	AFB1 ppb, en la suspensión	% de reducción de AFB1	Observación
Control	0		24,4	0 %	amarillo brillante
Control enriquecido 0	0	277	42	0 %	amarillo brillante
15	750	125	19	54,9 %	amarillo
30	1500	21,2	3	92,4 %	pequeño cambio del amarillo
60	3000	<1	<1	100 %	amarillo pálido
120	6000	<1	<1	100 %	incoloro

Conclusiones

[0113] Este ejemplo demuestra claramente que la ozonólisis de la suspensión de gluten de maíz es muy eficaz en destruir aflatoxinas a una concentración de O₃ de 3,3 g/h.

10 Ejemplo 2

[0114] El ozono en fase líquida es muy eficaz en la reducción de aflatoxinas en una suspensión de gluten contaminada (~15 % en peso de MS), con oxígeno concentrado utilizado como suministro para el generador de ozono.

Objetivos:

15 [0115]

1. Confirmar que se obtiene una reducción significativa de aflatoxinas en una suspensión de gluten de maíz cuando se trata con ozono.
2. Determinar los efectos del tiempo de exposición a un flujo más o menos fijo de ozono en los niveles de aflatoxinas en la suspensión de gluten.

20 Protocolo:

[0116] Este ejemplo se llevó a cabo a escala de laboratorio utilizando un Concentrador de Oxígeno de Alta Concentración AS-12 en conjunto con un Generador de Ozono TG-40 de Ozone Solutions Inc. El flujo inicial del concentrador de oxígeno se ajustó lo más bajo posible, hasta aproximadamente 0,5 LPM = 1 SCF/h. La presión era de -10 psi. El generador de ozono se estableció al máximo voltaje: es decir, 10. El antiespumante utilizado era un antiespumante líquido (emulsión antiespumante FG-10 de Dow Corning (LIMS 28353)).

25

[0117] La suspensión de gluten de maíz (LIMS 31426) era de la planta de Decatur y se almacenó a 4 °C. La suspensión seca tenía 20 ppb de aflatoxinas.

30

[0118] Se incubaron 8 muestras de 1 L a 80 °F (26,7 °C) al baño maría hasta equilibrar la temperatura y después se transfirieron a un tubo de reacción y se sometieron a ozonólisis. Se añadió antiespumante al tubo según se requiriese durante la reacción.

35

[0119] Tras la reacción durante varios periodos de tiempo (tal como se indica a continuación en la Figura 5), se tomaron muestras (~100 mL) de las muestras de 1 L de suspensión tratadas con ozono y las muestras se secaron durante toda la noche a 60 °C en un horno de aire forzado. Una parte de las muestras secas se procesó para un análisis de la aflatoxina por LC-MS tal como se ha descrito anteriormente y los resultados se resumen en la Figura 5.

40

[0120] Este experimento confirma la destrucción de aflatoxinas en una suspensión de gluten en un tratamiento con ozono en fase líquida, incluso cuando se lleva a cabo a una temperatura en la que la vida media del ozono se reduce de forma considerable (es decir, 13,5 minutos). Hay una correlación razonable entre la dosis de ozono proporcionada y la disminución de aflatoxinas en la suspensión de harina de gluten de maíz, tal como se muestra en la Figura 6. Tal como se muestra en la Figura 6, el nivel de reducción del 50 % de aflatoxinas ocurre a una dosis de ~1,8 g, que es algo mayor que la que se ha visto en el Ejemplo 1. Se postula que esta diferencia se debe al distinto equipo utilizado entre el Ejemplo 1 y el ejemplo actual.

Ejemplo 3

[0121] El ozono en fase líquida es muy eficaz en la reducción de aflatoxinas en una suspensión de gluten contaminada (~15 % en peso de MS), incluso cuando el aire comprimido se utiliza como suministro para el generador de ozono.

5 Objetivos:

[0122]

1. Confirmar resultados experimentales anteriores, que muestran que las dosis de ozono causan una reducción proporcional en los niveles de aflatoxinas en la suspensión de gluten de maíz.
2. Comparar las dosis de ozono requeridas para reducir la aflatoxina con el efecto en el contenido microbiano total.

Protocolo:

[0123]

1. Se obtuvo suspensión de gluten de maíz fresca (1 415,32 g) de la planta de Decatur y se distribuyó al laboratorio el mismo día. La muestra se almacenó durante toda la noche a 4 °C.
2. La suspensión se enriqueció con aflatoxina para producir una suspensión de gluten de maíz que contiene 50 ppb de aflatoxina B1, tal como se hizo en el Ejemplo 1.

Cálculos:

[0124]

1 mg por 5 mL de solución madre = 0,2 mg/mL.

20 0,35 mL de solución madre en 1 400 mL de suspensión = 0,00005 mg/mL = 0,0500 µg/mL = 50,00 ng/mL = ppb

3. Se añadieron 7 mL de una emulsión de antiespumante líquido al tubo de reacción (FG-10 de Dow-Corning, LIMS 28353).

4. La suspensión enriquecida se situó en el tubo de reacción y empezó el flujo de aire (~1 LPM). Se añadieron 3 mL adicionales de antiespumantes (total 10 mL).

25 5. Antes del muestreo, el generador de ozono (pero no el flujo de aire) se apagó. El ozono se dejó de detectar en la cabeza del tubo de reacción de ~1 a 2 minutos después de que se apagase el generador. El flujo de aire se mantuvo durante el muestreo. Aproximadamente 100 mL de suspensión se drenó del tubo de reacción y se volvió a añadir de nuevo a la parte superior de la columna para limpiar la línea de salida antes de tomar una muestra. Después, se retiraron aproximadamente 100 mL de la suspensión enriquecida como una muestra para el análisis de aflatoxinas. En cada tiempo de muestreo, el volumen en el tubo de reacción fue reducido por el volumen de la muestra (~100 mL). Las muestras para el análisis de aflatoxinas se almacenaron a 4 °C antes de secarlos a 60 °C durante toda la noche. Se retiraron ~10 mL de suspensión tratada para un recuento total en placa (TPC, por sus siglas en inglés) de microbios: tubo centrífugo estéril de 50 mL, almacenado a 4 °C.

6. Condiciones de generación de ozono (valores estimados del proveedor).

Ajuste del voltaje para la generación de ozono	10	(Máx. 100 %)
Flujo de aire	1	LPM
Presión	3	psi
Suministro de ozono estimado	1,25	g/h

35

7. Una vez que el generador de ozono se haya conectado, se detectó ozono en la cabeza de la columna del reactor tras ~1-2 minutos.

[0125] Los resultados se resumen en la Figura 7, que combina los resultados del Ejemplo 1 (suministro de oxígeno concentrado al generador de ozono) y Ejemplo 3 (suministro de aire comprimido al generador de ozono). En los dos ejemplos, la tasa de reducción de aflatoxinas en las muestras de suspensión de gluten de maíz era muy similar en relación con las dosis de ozono (g/L). Por tanto, el uso del aire como la materia prima para la producción de ozono no afecta al resultado y el Ejemplo 3 confirma que el ozono en fase líquida es muy eficaz y elimina de manera reproducible las aflatoxinas de la suspensión de gluten de maíz.

Ejemplo 4

45 **[0126]** La contaminación por aflatoxinas de la suspensión de gluten de maíz es más sensible a la degradación por ozono que las bacterias vivas de las muestras.

Objetivos:

[0127] Medir las sensibilidades relativas al ataque por ozono en la solución de suspensión de gluten de las aflatoxinas y las bacterias vivas.

Protocolo:

[0128] Se evaluaron las bacterias vivas de las muestras de suspensión de gluten tratadas con ozono de los Ejemplos 1 y 3 por su habilidad para formar colonias en placas de agar ("recuento total en placa", TPC) y los resultados se muestran en las Figuras 8 y 9.

[0129] La Figura 8 compara la tasa de degradación (Log %) de la aflatoxina frente a la pérdida de viabilidad (Log %) de los microbios de la suspensión de gluten tratada con ozono (muestras del Ejemplo 1), mientras que la Figura 9 compara la tasa de degradación (Log %) de las aflatoxinas frente a la pérdida de viabilidad (Log %) de microbios en la suspensión de gluten tratada con ozono (muestras del Ejemplo 3). Nótese las diferencias en las escalas horizontales: el Ejemplo 1 incluye muestras tratadas a dosis considerablemente mayores que en el Ejemplo 3.

[0130] En conclusión, las dosis de ozono que reducen significativamente los niveles de aflatoxina en las suspensiones de gluten de maíz son bajas en comparación con las dosis requeridas para eliminar las bacterias vivas de las muestras. Esto muestra que el método expuesto no requiere dosis excesivas de ozono para tratar aflatoxinas, a diferencia de los niveles que al parecer se necesitan para el tratamiento de granos de maíz secos/harina de maíz utilizando ozono gaseoso. Dicho de otro modo, las dosis de ozono requeridas para eliminar aflatoxinas de líquidos de suspensión de gluten de maíz son sorprendentemente más bajas que las dosis que no son eficaces en la fase gaseosa para reducir la aflatoxina en granos de maíz enteros o en polvos de harina de gluten seca.

Ejemplo 5

[0131] *El ozono en fase líquida es muy eficaz en la reducción de aflatoxinas en una suspensión de gluten contaminada (~15 % en peso de MS), con aire comprimido utilizado como suministro para el generador de ozono.*

Objetivos:

[0132] Confirmar resultados experimentales anteriores, que muestran que las dosis de ozono causan una reducción proporcional en los niveles de aflatoxina en la suspensión de gluten de maíz.

Protocolo:

[0133] La suspensión de gluten de maíz era de la planta de Decantur y se almacenó a 4 °C. Se descubrió que una muestra seca de la suspensión tenía un contenido de 20 ppb de aflatoxinas.

[0134] Se incubaron 4 muestras de 1 L al baño maría a 130 °F (54,4 °C) hasta equilibrar la temperatura. Una primera muestra de 1 L se transfirió después a un tubo de reacción y se añadió antiespumante líquido (FG-10 de Dow-Corning, LIMS 28353). Se inició el flujo de aire (~1 LPM), pero el generador de ozono no se encendió. Se recogió una muestra de la suspensión de gluten en el momento cero. El generador de ozono se encendió después a un flujo de 0,5 LPM (1 SCF/h) durante 5 minutos. Después, el generador se apagó y los contenidos de la columna se recogieron para un análisis de aflatoxinas.

[0135] El tubo de reacción se aclaró y limpió con agua y lejía diluida.

[0136] Un segundo recipiente de 1 L equilibrado hasta 130 °F (54,4 °C) se transfirió al tubo de reacción y se inició el flujo de aire, se añadió el antiespumante y el generador de ozono se encendió a un flujo de 0,5 LPM (1 SCF/h) durante 10 minutos. Los contenidos de la columna se recogieron para su análisis.

[0137] El proceso anterior se repitió dos veces más con periodos de tratamiento con ozono de 17 y 20 minutos.

[0138] Los resultados se resumen de la siguiente manera:

Tiempo, minutos	Aflatoxina, ppb
0	19,2
5	20,0
10	15,2
17	17,6
20	4,8

[0139] Este resultado del Ejemplo 5 confirma que el uso del aire como la materia prima para la producción de ozono no afecta el resultado y confirma que el ozono en fase líquida es muy eficaz y elimina de manera reproducible las aflatoxinas de la suspensión de gluten de maíz.

REIVINDICACIONES

1. Método para reducir aflatoxinas en un gluten de granos o gluten de maíz, comprendiendo el método los siguientes pasos:
 - 5 (a) procesar por molienda húmeda los granos o granos de maíz contaminados con aflatoxinas para producir gluten de granos o gluten de maíz, y preparar una suspensión de gluten de granos o gluten de maíz; y
 - (b) tratar la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz con ozono;

en el que la temperatura de la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz en el paso (b) es de 10 a 60 °C;

 - 10 en el que la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz contiene del 10 al 20 % en peso de materia seca por litro; y
 - en el que la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz se prepara a partir de una fracción de gluten de granos o gluten de maíz procesada por molienda húmeda.
2. Método según la Reivindicación 1, en el que el gluten de granos es un gluten derivado de un grano seleccionado del grupo que consiste en avena, arroz, cebada, trigo, espelta y centeno; o
 - 15 en el que, el método se refiere al gluten de maíz.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el paso (b) se lleva a cabo al inyectar gas ozono a través de la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la suspensión resultante de gluten de granos o de gluten de maíz, tiene menos de 300 partes por mil millones de aflatoxinas, tal como se midió por el contenido de aflatoxina B1 utilizando LC/MS, en el que opcionalmente:
 - 20 la suspensión de gluten de granos o de gluten de maíz resultante tiene menos de 200 partes por mil millones de aflatoxinas, tal como se midió por el contenido de aflatoxina B1 utilizando LC/MS; o
 - 25 la suspensión de gluten de granos o de gluten de maíz resultante tiene menos de 100 partes por mil millones de aflatoxinas, tal como se midió por el contenido de aflatoxina B1 utilizando LC/MS; o
 - la suspensión de gluten de granos o de gluten de maíz resultante, tiene menos de 20 partes por mil millones de aflatoxinas, tal como se midió por el contenido de aflatoxina B1 utilizando LC/MS.
 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz contiene un 15 % en peso de materia seca por litro.
 - 30 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la dosis de ozono total es de hasta 6,6 g de ozono por litro de suspensión de gluten de granos o gluten de maíz, en el que opcionalmente:
 - la dosis de ozono total es de hasta 3,3 g de ozono por litro de suspensión de gluten de granos o gluten de maíz; o
 - 35 la dosis de ozono total es de 1,50 g a 2,80 g de ozono por litro de suspensión de gluten de granos o gluten de maíz; o
 - la dosis de ozono total es de 1,80 g a 2,50 g de ozono por litro de suspensión de gluten de granos o gluten de maíz.
 7. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que durante el paso (b) se añaden agentes antiespumantes secos o líquidos según sea necesario para evitar la formación de espuma durante la adición de gas a la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz, en el que opcionalmente se añaden antiespumantes líquidos durante el paso (b).
 - 40 8. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que la temperatura de la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz en el paso (b) es de 10 a 30 °C, en el que opcionalmente:
 - 45 la temperatura de la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz en el paso (b) es de 20 a 28 °C; o
 - la temperatura de la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz en el paso (b) es de 27 °C.
 9. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz está contaminada con 20 partes por mil millones (ppb) o más de aflatoxinas, en el que opcionalmente:
 - la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz está contaminada con de 30 a 100 ppb de aflatoxina; o
 - 50 la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz está contaminada con de 40 a 50 ppb de aflatoxina.
 10. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el componente de materia seca de la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz está contaminada con de 100 a 500 ppb de aflatoxinas; y/o
 - en el que la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz preparada en el paso (b) contiene menos de 1 ppb de aflatoxinas.

- 11.** Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el tratamiento de la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz con ozono en el paso (b) dura de 15 minutos a 3 horas, en el que opcionalmente el tratamiento de la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz con ozono en el paso (b) dura de 30 minutos a 2 horas.
- 5 **12.** Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el componente líquido de la suspensión es agua.
- 13.** Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el gluten de granos o gluten de maíz producido al procesarlo por molienda húmeda no se seca antes de preparar la suspensión de gluten de granos o gluten de maíz en el paso (a).

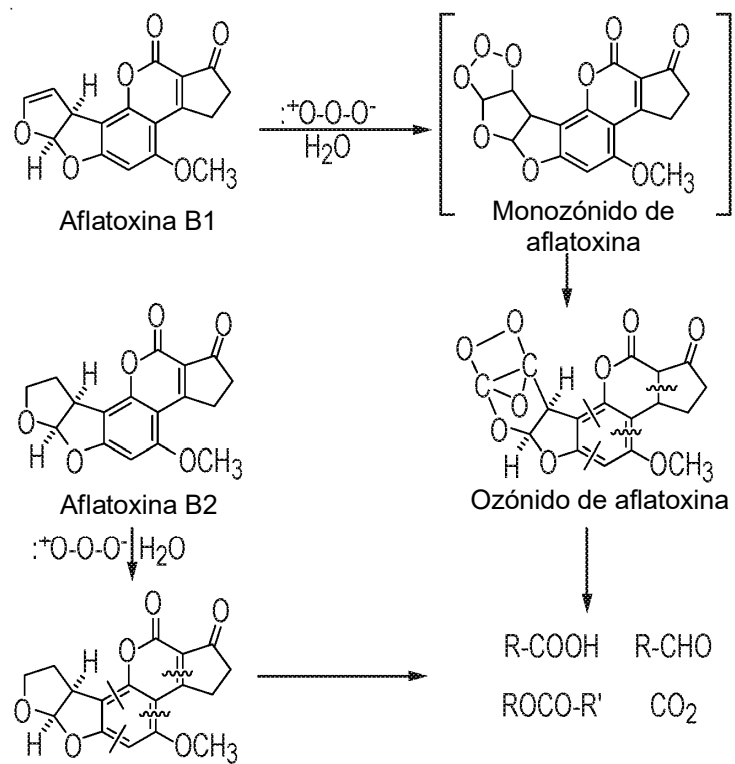


FIG. 1

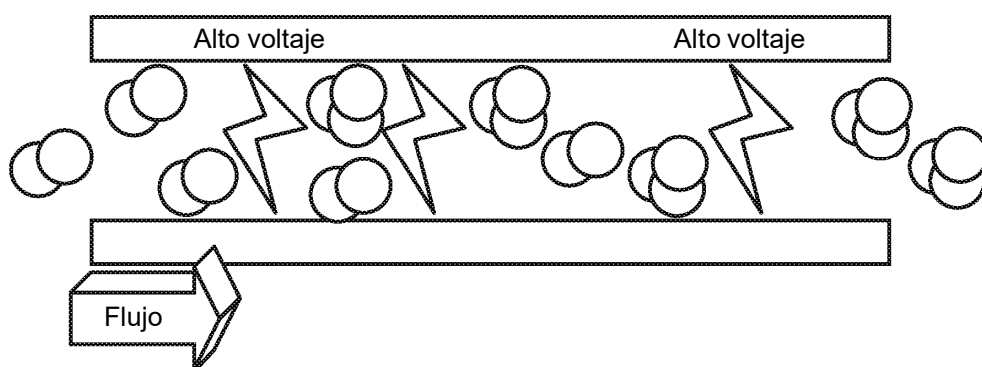


FIG. 2

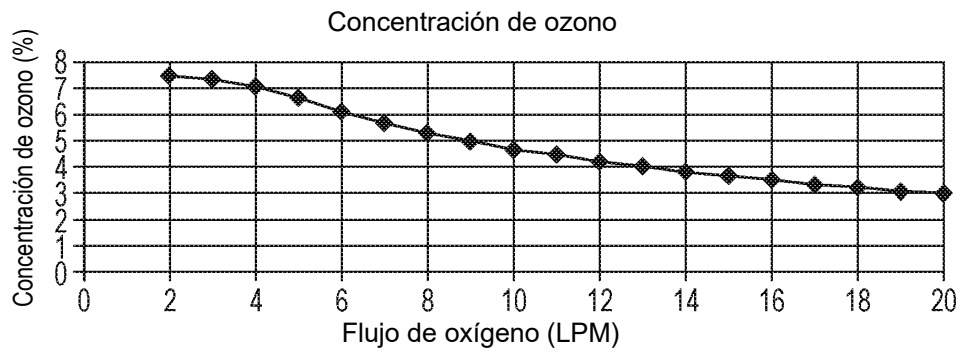
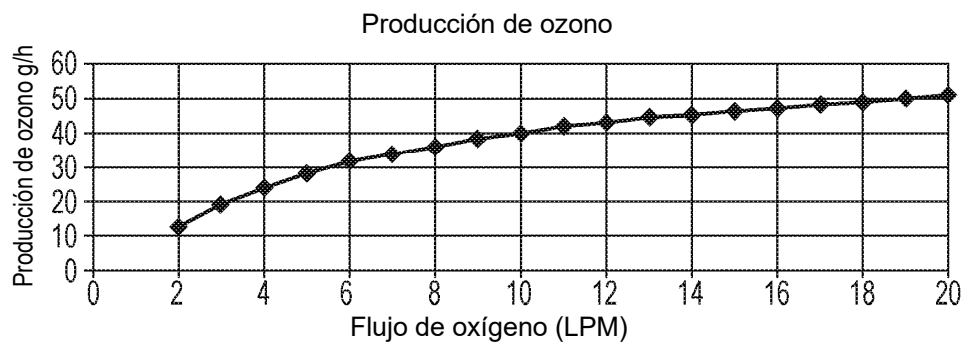


FIG. 3



El ensayo se llevó a cabo a 72 °F (22,2 °C), el generador estuvo encendido durante más de 1 hora.
Ozone Analyzer API 454

FIG. 4

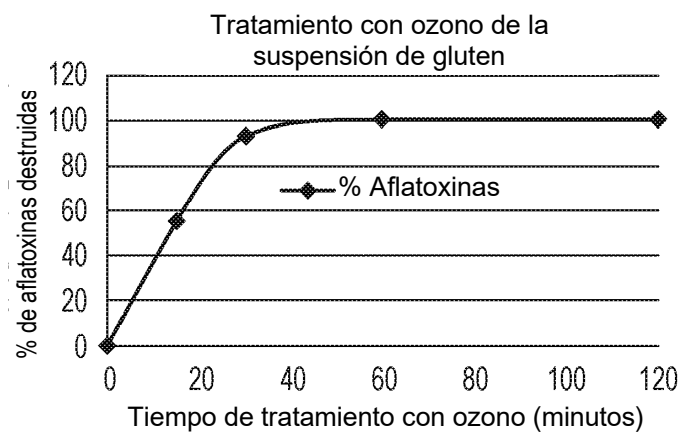


FIG. 5

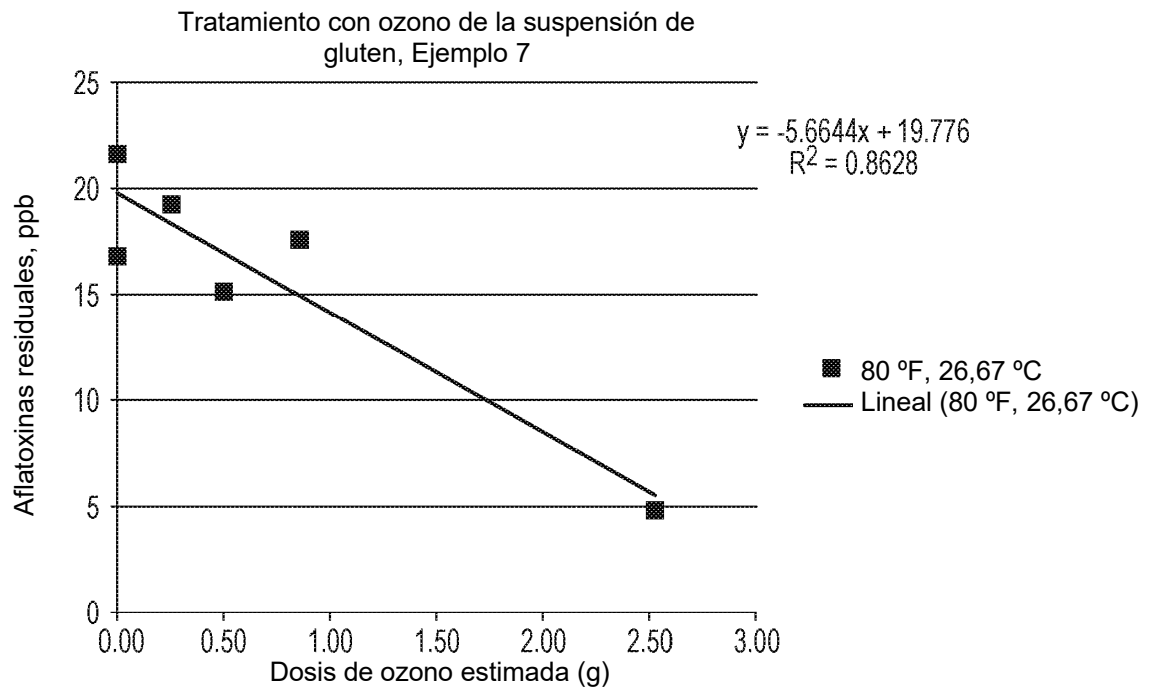


FIG. 6

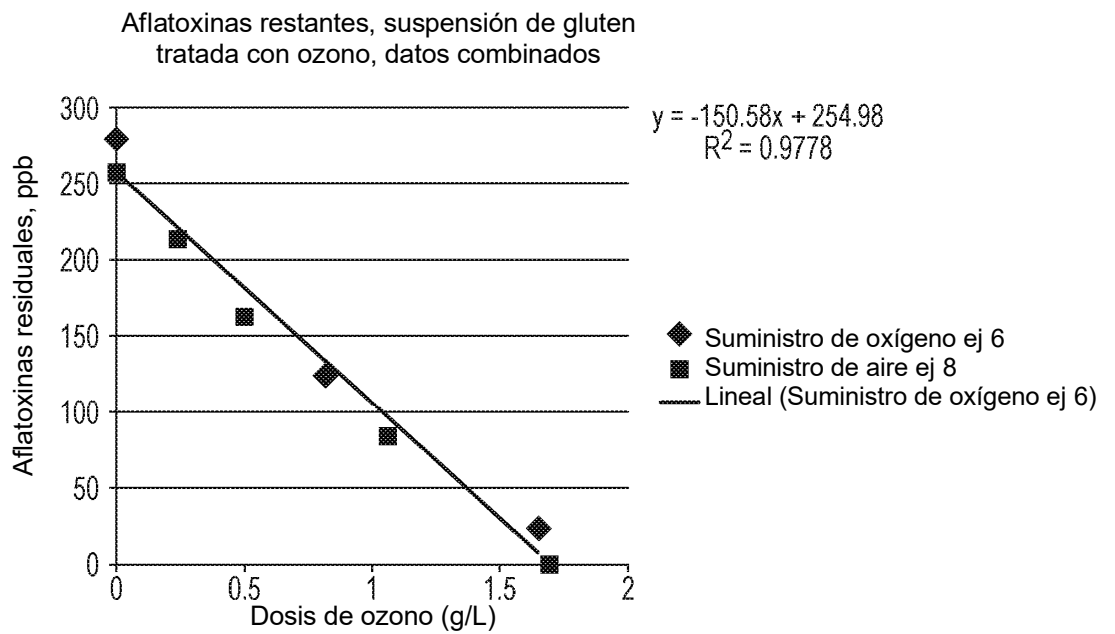


FIG. 7

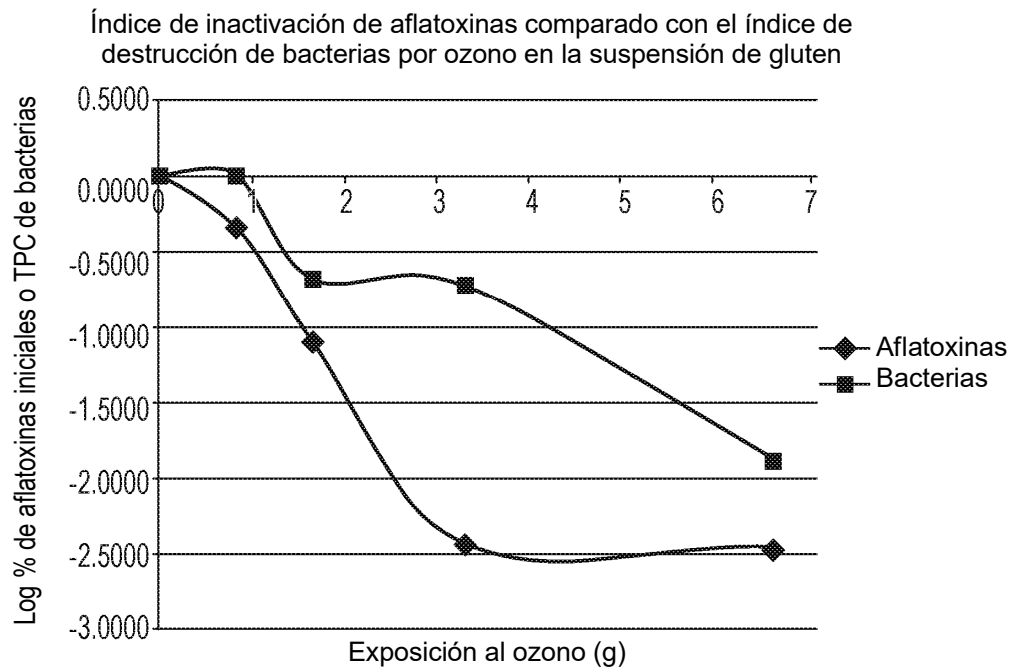


FIG. 8

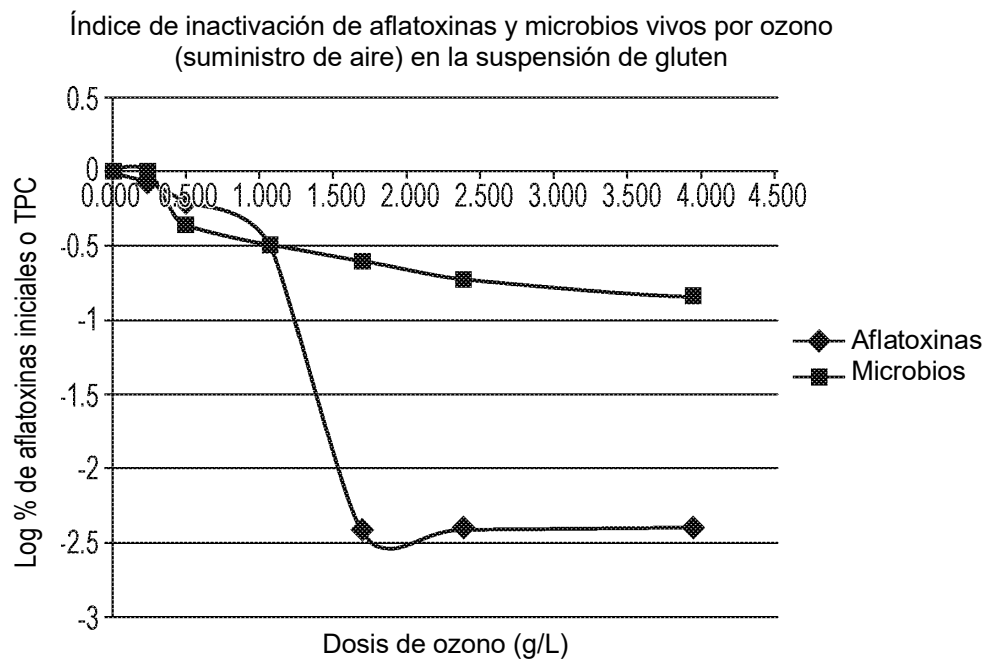


FIG. 9