

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 822 957**

51 Int. Cl.:

C12N 1/04 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 11/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2016 PCT/CA2016/050129**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2016 WO16127260**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2016 E 16748521 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2020 EP 3256581**

54 Título: **Matriz seca mejorada para incorporar bacterias Escherichia coli viables, método para fabricarla y uso de la misma**

30 Prioridad:

11.02.2015 US 201562114829 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.05.2021

73 Titular/es:

**ELANCO CANADA LIMITED (100.0%)
37 McCarville Street
Charlottetown, PA C1E 2A7, CA**

72 Inventor/es:

NADEAU, ERIC

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 822 957 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

Matriz seca mejorada para incorporar bacterias *Escherichia coli* viables, método para fabricarla y uso de la misma

Esta solicitud se refiere, de manera general, al campo de las matrices secas mejoradas para incorporar bacterias *E. coli* viables, al método para producir las mismas y al uso de las mismas.

5 Antecedentes

Las esporas bacterianas son formas de vida latente que pueden existir en un estado desecado y deshidratado indefinidamente. Para los seres humanos, las esporas bacterianas están disponibles ya sea como profilácticos sin prescripción para trastornos gastrointestinales leves, como la diarrea, o como suplementos nutricionales o alimentos naturales. En la industria agrícola, las esporas bacterianas están recibiendo una atención creciente como alternativas potenciales a los antibióticos como impulsores de crecimiento. (Hong et al., *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29: 813-835). Las bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) son, sin embargo, no formadoras de esporas y, como tales, son menos resistentes a las condiciones de desecación y/o deshidratación que las bacterias formadoras de esporas. En muchas aplicaciones, es necesario, sin embargo, conservar y almacenar bacterias *E. coli* en una forma que permita una viabilidad suficiente y/o una bioactividad bacteriana suficiente para un propósito dado.

15 A este respecto, se han sugerido previamente diversas condiciones prácticas de conservación y almacenamiento para bacterias.

Con frecuencia, se usa el secado con congelación (también denominado liofilización) para la conservación y el almacenamiento de bacterias, debido a la exposición a bajas temperaturas durante el secado (Rhodes, *Exploitation of microorganisms*, ed. Jones, DG, 1993, pp. 411-439, Londres, Chapman and Hill). Sin embargo, este proceso presenta como características no deseables una viabilidad significativamente reducida y ser un proceso largo y de alto consumo energético. Se han propuesto agentes protectores, pero la protección conferida por un aditivo dado durante la liofilización varía con las especies de microorganismos (Font de Valdez et al., *Cryobiology*, 1983, 20: 560-566).

También se han usado para la conservación y almacenamiento de bacterias procesos de secado por aire así como con desecación. Si bien el secado por vacío es un proceso similar a la liofilización, tiene lugar a 0 – 40 °C durante un período que va de 30 minutos a unas pocas horas. Las ventajas de este proceso son que el producto no se congela, de forma que el consumo de energía y el impacto económico relacionado se reducen. Desde el punto de vista del producto, se evita el daño por congelación. Sin embargo, la desecación a temperaturas bajas o ambiente es lenta, necesita precauciones extra para evitar la contaminación y a menudo proporciona rendimientos en cuanto a viabilidad no satisfactorios (Lievense et al., *Adv. Biochem Eng Biotechnol.*, 1994, 51: 71-89).

El encapsulado de bacterias en matrices de polisacárido que forman hidrocoloides, tales como perlas de alginato de calcio (Ca-alginato), se ha usado para la conservación y el almacenamiento de bacterias en una amplia y creciente gama de aplicaciones diferentes (Islam et al., *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 20: 1367-1377). Para mantener a las bacterias en un estado metabólica y fisiológicamente idóneo, y así obtener el beneficio deseado, se ha sugerido añadir a tales matrices una formulación conservante adecuada. Las formulaciones conservantes contienen típicamente ingredientes activos en un vehículo adecuado y aditivos que ayudan a la estabilización y protección de las células microbianas durante el almacenamiento y el transporte a la zona objetivo.

Se ha descrito el manitol como un componente de formulación conservante eficaz para bacterias encapsuladas con alginato de Ca durante la liofilización ya que proporciona una alta viabilidad bacteriana hasta 10 semanas a temperatura ambiente y actividad de agua (a_w) menor de 0,2 (Efuvwevwere et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 51: 100-104). Se ha descrito también una mezcla sinérgica de trehalosa y un alcohol azúcar como componente de una formulación conservante eficaz para bacterias encapsuladas con alginato de Ca secadas al aire, en la cual se usa trehalosa en lugar de sacarosa por su temperatura de transición vítrea significativamente mayor, es decir, 110 °C frente a solo 65 °C, respectivamente (documento de la patente de Estados Unidos US 8.097.245). También se ha descrito una mezcla sinérgica de sales de ácido carboxílico y proteínas hidrolizadas como componente de una formulación conservante eficaz para bacterias encapsuladas con alginato de Ca liofilizadas (patente de Estados Unidos, US 2013/0.296.165). En ambos casos, la mezcla sinérgica proporciona una estructura vítrea mejorada sin necesidad de espumar o llevar a ebullición bajo vacío para facilitar un secado eficaz. Además, se ha descrito el recubrimiento de perlas de alginato de Ca que contienen bacterias *E. coli* recombinantes con quitosano para neutralizar para neutralizar la carga superficial externa de las perlas (Wynant et al., *Biocatalysis and Biotransformation*, 2009, 27 (5-6): 348-359).

50 Sin embargo, el desarrollo de formulaciones novedosas es una tarea desafiante y no todas las formulaciones son eficaces para una bacteria dada (Young et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, 5 sept, 95(1): 76-83).

En vista de lo anterior, es necesario proporcionar condiciones de almacenamiento y conservación mejoradas para las bacterias *E. coli*.

Compendio

El alcance de la presente invención se define mediante las reivindicaciones y cualquier información que no esté dentro de las reivindicaciones se proporciona solamente para información.

La presente descripción se refiere, en líneas generales, a bacterias viables de *Escherichia coli* (*E. coli*) incorporadas en una matriz, donde dicha matriz tiene una actividad de agua $a_w \leq 0,3$ y donde dicha matriz comprende un primer polisacárido que es un polisacárido formador de hidrocoloides, un segundo polisacárido distinto del primer polisacárido y un disacárido que incluye sacarosa, trehalosa o una combinación de ambas.

La presente descripción se refiere también, en líneas generales, a una composición para formar una matriz, que comprende un primer polisacárido que es un polisacárido formador de hidrocoloides, un segundo polisacárido distinto del primer polisacárido y un disacárido que incluye sacarosa, trehalosa o una combinación de ambas y bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*).

La presente descripción se refiere también, en líneas generales, a un método para proporcionar un material en partículas que comprende bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) viables.

La presente descripción se refiere también, en líneas generales, a una matriz que comprende bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) viables, donde dicha matriz tiene una actividad de agua $a_w \leq 0,3$ y donde dicha matriz comprende un primer polisacárido que es un polisacárido formador de hidrocoloides, un segundo polisacárido distinto del primer polisacárido y un disacárido que incluye sacarosa, trehalosa o una combinación de ambas.

Todas las características de los aspectos que se describen en esta descripción y no son mutuamente excluyentes se pueden combinar entre sí. Se pueden utilizar elementos de un aspecto en otros aspectos sin mención adicional. Otros aspectos y características de la presente descripción resultarán claros para las personas expertas en la técnica tras la revisión de la siguiente descripción de aspectos específicos junto con las figuras que acompañan el texto.

Breve descripción de los dibujos

A continuación, se proporciona una descripción detallada de aspectos específicos haciendo referencia a los dibujos que lo acompañan, en los cuales:

La figura 1 muestra un diagrama de flujo, no restrictivo, para preparar un cultivo de bacterias, de acuerdo con un aspecto de la presente descripción.

La figura 2 muestra un diagrama de flujo, no restrictivo, para secar perlas con bacterias *E.coli* incorporadas, de acuerdo con un aspecto de la presente descripción.

La figura 3 muestra un gráfico de barras, no restrictivo, que ilustra el efecto de disoluciones de conservación S1, S2, S3 y S4 sobre la viabilidad de las bacterias tras secado al aire, de acuerdo con un aspecto de la presente descripción.

La figura 4 muestra un gráfico de barras, no restrictivo, que ilustra el efecto de disoluciones de conservación S1, S5, S6 y S7 sobre la viabilidad de las bacterias tras secado al aire, de acuerdo con un aspecto de la presente descripción.

La figura 5 muestra un gráfico de barras, no restrictivo, que ilustra el efecto de disoluciones de conservación S1, S0, S8 y S9 sobre la viabilidad de las bacterias tras secado al aire, de acuerdo con un aspecto de la presente descripción.

La figura 6 muestra un gráfico de barras, no restrictivo, que ilustra el efecto de disoluciones de conservación S1, S10, S11 y S12 sobre la viabilidad de las bacterias tras secado al aire, de acuerdo con un aspecto de la presente descripción.

La figura 7 muestra un gráfico de barras, no restrictivo, que ilustra el efecto de disoluciones de conservación S1, S13, S14 y S15 sobre la viabilidad de las bacterias tras secado al aire, de acuerdo con un aspecto de la presente descripción.

La figura 8 muestra un gráfico de barras, no restrictivo, que ilustra el efecto de disoluciones de conservación S1, S16, S17 y S18 sobre la viabilidad de las bacterias tras secado al aire, de acuerdo con un aspecto de la presente descripción.

La figura 9 muestra un gráfico de barras, no restrictivo, que ilustra el efecto de disoluciones de conservación S1 y S19 sobre la viabilidad de las bacterias tras secado al aire, de acuerdo con un aspecto de la presente descripción.

La figura 10 presenta los datos brutos relacionados con las figuras 3 a 9.

En los dibujos, las realizaciones se ilustran a título de ejemplo. Debe entenderse, de manera expresa, que la descripción y los dibujos tienen como objetivo solamente ilustrar ciertas realizaciones y servir de ayuda para la comprensión del texto. El alcance de las reivindicaciones no debería limitarse por las realizaciones expuestas en la presente descripción, sino que debería darse la interpretación más amplia coherente con la descripción en su conjunto.

Descripción detallada de realizaciones

A continuación, se describirán ejemplos específicos para ilustrar la forma en que se pueden poner en práctica los principios de la presente descripción.

Las bacterias *E. coli* aquí descritas son bacterias viables, en otras palabras, si bien se puede considerar que las bacterias incorporadas en una matriz seca están en un estado no activo, se puede hacer que estas bacterias vuelvan a un estado activo cuando se expone la matriz a la humedad.

Las bacterias *E. coli* aquí descritas comprenden cualquier cepa de *E. coli* recombinante o silvestre, o cualquier mezcla de las mismas. En una realización, la cepa de *E. coli* es no patógena. En una realización, la cepa no patógena de *E. coli* es la cepa depositada en el International Depository Authority de Canadá (IDAC) el 21 de enero de 2005 con el número de registro IDAC 210105-01, o la cepa depositada en el International Depository Authority de Canadá (IDAC) el 20 de junio de 2013 con el número de registro 200613-01, o una combinación de ambas.

La matriz aquí descrita comprende un polisacárido que forma hidrocoloides. Varios polisacáridos son adecuados para usarse, como se describe en este documento, solos o combinados.

El almidón con alto contenido de amilosa es un polisacárido capaz de formar un gel firme tras hidratar los gránulos de almidón en agua hirviendo, dispersar los gránulos con ayuda de un mezclador con gran capacidad de cizallamiento y luego enfriar la disolución hasta aproximadamente 0–10 °C. La firmeza y resistencia del gel depende de la concentración de almidón en la disolución, con una concentración practicable máxima de 10 % en porcentaje peso/volumen. La matriz de gel de almidón cortada en rebanadas es capaz también de retener las bacterias vivas en la mezcla de conservación y, puesto que la mayor parte de ella no es digerible por los jugos gástricos o intestinales, las bacterias están protegidas de la destrucción gástrica mientras están dentro de la matriz de almidón. El mecanismo de liberación controlada está proporcionado por el hecho de que el almidón con alto contenido en amilosa es digerible por la microflora del intestino, momento en el cual las bacterias vivas entregadas se liberan en su forma intacta.

La pectina es otro polisacárido adecuado que funciona de forma muy similar al almidón con alto contenido de amilosa. La pectina tiene una ventaja adicional, ya que la resistencia de la matriz del gel de pectina se puede aumentar además mediante la adición de cationes divalentes tales como Ca^{2+} que forman puentes entre los grupos carboxilo de los polímeros de azúcares.

El alginato es otro polisacárido adecuado que puede formar una matriz de gel firme reticulándose con cationes divalentes. El alginato se puede endurecer para formar una matriz de gel firme reticulando internamente los polisacáridos de alginato con un dicatión, por ejemplo, Ca^{2+} , por ejemplo, extruyendo el alginato en forma de hilos delgados, cuerdas o perlas sustancialmente esféricas en un baño de Ca^{2+} . El alginato se endurece tras la interacción con Ca^{2+} . Un método alternativo de preparación de la matriz es atomizar mediante pulverización la mezcla en un baño que contiene Ca^{2+} .

En una realización, el polisacárido formador de hidrocoloides está presente en la matriz en un porcentaje en peso del total de materia seca de 0,1 % a 20 %. En una realización, el polisacárido formador de hidrocoloides está presente en la matriz en un porcentaje en peso del total de materia seca de 0,1 % a 19 %, o de 0,1 % a 18 %, o de 0,1 % a 17 %, o de 0,1 % a 16 %, o de 0,1 % a 15 %, o de 0,1 % a 14 %, o de 0,1 % a 13 %, o de 0,1 % a 12 %, o de 1 % a 12 %, incluyendo cualquier valor comprendido entre ellos.

La matriz aquí descrita comprende además un disacárido y un polisacárido. La presente descripción describe varias concentraciones y proporciones adecuadas para inclusión en la matriz. En una realización, una proporción adecuada disacárido / polisacárido en % en peso / % en peso es menor de 10 o más preferiblemente, menor de 5. En una realización, la proporción disacárido / polisacárido en % en peso / % en peso es de aproximadamente 1.

En una realización, el disacárido está presente en la matriz en un porcentaje en peso respecto del total de materia seca de 0,1 % a 90 %, o de 0,1 % a 75 %, o de 0,1 % a 50 %, o de 0,1 % a 35 % o de 0,1 % a 20 %, o de 0,1 % a 15 %, o de 0,1 % a 10 %, incluyendo cualquier valor comprendido entre ellos.

En una realización no restrictiva, el disacárido incluye sacarosa.

En otra realización no restrictiva, el disacárido incluye trehalosa.

En una realización no restrictiva, el polisacárido incluye maltodextrina.

En otra realización no restrictiva, el polisacárido incluye dextrano.

En otra realización no restrictiva, el dextrano tiene un peso molecular entre 20 y 70 kDa.

En una realización, la matriz incluye además una sal de ácido L-glutámico. En una realización no restrictiva, la sal es una sal sódica de ácido L-glutámico.

La matriz descrita aquí tiene una actividad de agua (a_w) que cumple la relación: $0,04 \leq a_w \leq 0,3$, por ejemplo, $0,04 \leq a_w \leq 2,5$, $0,04 \leq a_w \leq 2,0$, $0,04 \leq a_w \leq 1,5$, y similares. La "actividad de agua" o " a_w ", en el contexto de la presente descripción, se refiere a la disponibilidad de agua y representa el estado de energía del agua en un sistema. La

actividad de agua se puede medir según los materiales y procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando un equipo medidor de actividad de agua Aqualab Water Activity Meter 4TE (Decagon Devices, Inc, Estados Unidos de América).

- 5 También se proporciona una composición para formar una matriz, que comprende un primer polisacárido formador de hidrocoloides, un segundo polisacárido que es distinto del primer polisacárido y un disacárido que incluye sacarosa, trehalosa o una combinación suya y bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*).

- 10 También se proporciona un método para proporcionar un material en partículas que comprende bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) viables, método que comprende proporcionar partículas que comprenden un primer polisacárido formador de hidrocoloides, un segundo polisacárido que es distinto del primer polisacárido y un disacárido que incluye sacarosa, trehalosa o una combinación suya y bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) y secar dichas partículas hasta que tengan una actividad de agua (a_w) $\leq 0,3$.

En una realización no restrictiva, las bacterias *E. coli* viables experimentan un factor reductor de a_w en las partículas de al menos 0,4, o al menos 0,5, o al menos 0,6, o al menos 0,7.

Ejemplos

- 15 En cada uno de los ejemplos siguientes, se probaron tres disoluciones de conservación junto con la disolución de conservación S1. Los ensayos se realizaron por triplicado y se calculó la desviación estándar de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n}}$$

donde n es el número de muestras y $\bar{x}$ es la media de la población de muestras.

- 20 En cada uno de los ejemplos siguientes, la viabilidad bacteriana se evaluó midiendo el número de unidades formadoras de colonias (UFC) según los protocolos conocidos en la técnica.

Las disoluciones de conservación usadas en los ejemplos siguientes se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

Disolución de conservación	Polisacárido	Disacárido	Sal del ácido L-glutámico	Proporción polisacárido / disacárido / sal de ácido orgánico
S0	x ¹	x	x	N/A ²
S1	Dextrano 40	Sacarosa	Si	5:7:1
S2	Dextrano 40 (5 % peso)	x	x	N/A
S3	x	Sacarosa (7 % peso)	x	N/A
S4	Dextrano 40	Trehalosa	Si	5:7:1
S5	Dextrano 20	Sacarosa	Si	5:7:1
S6	Dextrano 70	Sacarosa	Si	5:7:1
S7	Maltodextrina	Sacarosa	Si	5:7:1
S8	Dextrano 40	Sacarosa	Si	10:1:1
S9	Dextrano 40	Sacarosa	Si	1:10:1
S10	Dextrano 40 (fabricante diferente)	Sacarosa	Si	5:7:1
S11	x	Sacarosa	Si	7:1

S12	Dextrano 70	Trehalosa	Si	5:7:1
S13	Dextrano 40	Sacarosa	x	5:7
S14	Dextrano 40	Sacarosa	Si	5:3:1
S15	Dextrano 40	Sacarosa	SI	5:5:1
S16	Maltodextrina	Trehalosa	Si	5:7:1
S17	Maltodextrina	Trehalosa	Si	10:1:1
S18	Maltodextrina	Trehalosa	Si	1:10:1
S19	Dextrano 40	Maltosa	Si	5:7:1

¹x quiere decir que está ausente

² N/A significa que no es aplicable en ese caso

1. Ejemplo 1

a. Cultivo de *E. coli*

5 En referencia a la figura 1, se cultivó una cepa de *E. coli* en una primera etapa 100 en agar de soja tríptica (TSA, por sus siglas en inglés) de origen no animal. Seis (6) colonias aisladas se usaron luego para cultivar la cepa de *E. coli* en una segunda etapa 200 durante 2 horas a 37 °C y con agitación de 200 rpm en 30 ml de caldo de cultivo de soja tríptica (TSB por sus siglas en inglés) de origen no animal (para 1 litro de TSB: 20 g de peptona de soja A3 SC (Organotechnie), 2,5 g de dextrosa anhidra USP (J.T. Baker), 5 g de cloruro de sodio USP (J.T. Baker) y 2,5 g de fosfato de potasio dibásico USP (Fisher Chemical)). El cultivo 1 resultante se diluyó en un factor de 10 en TSB y se usó después para cultivar la cepa de *E. coli* en una tercera etapa 300 durante 2 horas y a una temperatura de 37 °C con agitación de 200 rpm en 100 ml de TSB de origen no animal. El cultivo resultante 2 se diluyó en un factor de 10 en TSB y se usó a continuación para cultivar la cepa de *E. coli* en una cuarta etapa 400 durante 5 horas a 37 °C y agitación de 200 rpm en 1 litro de TSB de origen no animal. El cultivo resultante 3 se usó luego para incorporar las bacterias *E. coli* en la matriz. Son posibles variaciones y perfeccionamientos del protocolo de cultivos aquí descrito y resultarán claros para las personas expertas en esta técnica, a la luz de las enseñanzas presentes. Por ejemplo, las bacterias no patógenas *E. coli* se pueden cultivar en condiciones anaeróbicas según los protocolos conocidos en la técnica (Son and Taylor, *Curr. Protoc. Microbiol.*, 2012, 27:5.A.4.1 – 5A.4.9). Para preparar las perlas de los ejemplos posteriores, se puede seleccionar la cepa no patógena de *E. coli* depositada en el International Depository Authority de Canadá (IDAC) el 21 de enero de 2005 con el número de registro IDAC 210105-01.

b. Preparación de la matriz

Se mezcló peptona Bacto™ (1,5 g BD, Mississauga, Canadá) con 1,5 litros de agua caliente para obtener una mezcla. A la mezcla se añadió lentamente alginato (30 g Grinsted®, DuPont™ Danisco®, Mississauga, Canadá), mientras se mezclaba con agitación de una barra magnética a 360 rpm. Se obtuvo la solubilización completa del alginato en aproximadamente 3 horas para obtener una disolución al 2 % de alginato (masa/volumen). La disolución, incluyendo la barra magnética se introdujo a continuación en un autoclave, en condiciones estándar. Son posibles variaciones y perfeccionamientos del protocolo de preparación aquí descrito y resultarán claros para las personas expertas en esta técnica, a la luz de las enseñanzas presentes.

c. Incorporación de *E. coli* en la matriz

30 Se añadieron a la disolución de la matriz pasada por el autoclave las siguientes sustancias, en orden y agitando con la barra magnética, para obtener una pasta: 1 litro de TSB de origen no animal y, con referencia a la figura 1, 0,5 litros del cultivo 3 resultante de *E. coli* en 1 litro de TSB de origen no animal. La pasta se extruyó en un baño de polimerización (300 mM CaCl₂, 0,1 % peso/volumen de triptona Bacto™, 0,1 % peso/volumen de peptona Bacto™ y 0,05 % g peso /volumen de extracto de levadura Bacto™ en agua) para formar perlas, utilizando un sistema de jeringa con salida 9 adaptado de evaporadores Thermo Scientific™ Reacti-Vap™. El baño se removió suavemente mientras se inyectaba la pasta. Se dejó que las perlas de la matriz se reticularan durante 30 minutos y luego se recogieron las perlas endurecidas resultantes. Son posibles variaciones y perfeccionamientos del protocolo de incorporación aquí descrito y resultarán claros para las personas expertas en esta técnica, a la luz de las enseñanzas presentes.

d. Secado y prueba de las bacterias *E. coli* introducidas.

40 Para cada disolución de conservación introducida se realizó el proceso de secado y ensayo al menos por triplicado. En referencia a la figura 2, en una primera etapa 500, se colocaron las perlas con las bacterias *E. coli* incorporadas a la matriz en una disolución de conservación S1, una disolución de conservación S2, una disolución de conservación

S3 o una disolución de conservación S4, con agitación suave durante aproximadamente 20 minutos. En cada caso, se realizó una determinación 550 del valor total de las UFC después del remojo en la disolución de conservación. En una segunda etapa 600, las perlas se colocaron en una bandeja de secado en un secador de aire a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas, para obtener perlas semi-secas. En cada caso, se realizó una medida 650 de la actividad de agua a_w de las perlas semi-secas, utilizando un equipo Aqualab Water Activity Meter 4TE (Decagon Devices, Inc., Estados Unidos de América). En una tercera etapa 700, las perlas semi-secas se colocaron a continuación en un desecador durante aproximadamente 64 horas, en el que se sopló aire seco y filtrado. De acuerdo con un aspecto de la presente descripción, el proceso de secado 800 incluye al menos dos etapas: una etapa 600 que incluye colocar las perlas en un secador de aire durante 24 horas a temperatura ambiente y obtener perlas semi-secas y una etapa 700 que incluye colocar las perlas semi-secas en un desecador durante 64 horas para obtener perlas secas. En cada caso se realiza una determinación 750 del valor total de las UFC y una medida 760 de la actividad de agua a_w de las perlas secas. Se obtuvieron perlas secas que tenían un valor de actividad de agua a_w menor o igual de 0,3.

En cada caso, y en referencia a la figura 2, se calculó la disminución relativa de la actividad de agua a_w según la expresión.

$$\text{Reducción relativa de } a_w = (650 - 760) / 650$$

En cada caso, y en referencia a la figura 2, la pérdida de viabilidad se calculó según la siguiente expresión:

$$\text{Pérdida UFC} = \log_{10} (550) - \log_{10} (750)$$

En cada caso, se calculó una pérdida de viabilidad promedio y una pérdida de viabilidad promedio normalizada respecto de los resultados obtenidos con la disolución de conservación S1.

Los resultados se muestran en la figura 3. La disolución de conservación S4 presentó una pérdida de viabilidad promedio normalizada de 0,32, manteniendo una actividad de agua de $0,142 \pm 0,004$.

En las tablas 2 y 3 se presenta una recopilación de los resultados del ejemplo 1. Estos resultados muestran que los elementos de la disolución de conservación S4 proporcionan un efecto significativo sobre la viabilidad de las bacterias *E. coli* introducidas en la matriz seca y en su resistencia al proceso de secado 700.

Tabla 2

Muestra	Etapa 550		Etapa 750	
	UFC promedio	UFC promedio	Pérdida de UFC promedio ($\log_{10}$)	Pérdida de UFC normalizada ($\log_{10}$)
S1	$3 \times 10^{11} \pm 9 \times 10^{10}$	$1,4 \times 10^{11} \pm 4,3 \times 10^9$	$0,32 \pm 0,14$	1
S2	$2,3 \times 10^{11} \pm 5,5 \times 10^{10}$	$5,4 \times 10^9 \pm 2,7 \times 10^9$	$1,66 \pm 0,3$	5,18
S3	$2,6 \times 10^{11} \pm 4,9 \times 10^{10}$	$7,4 \times 10^{10} \pm 4,3 \times 10^{10}$	$0,61 \pm 0,32$	1,90
S4	$3,1 \times 10^{11} \pm 7 \times 10^{10}$	$2,5 \times 10^{11} \pm 9,7 \times 10^{10}$	$0,11 \pm 0,08$	0,34

Tabla 3

Muestra	Etapa 650	Etapa 760	
	a _w promedio	a _w promedio	Reducción relativa de a _w
S1	0,473 ± 0,020	0,165 ± 0,010	0,65
S2	0,278 ± 0,021	0,054 ± 0,009	0,81
S3	0,423 ± 0,022	0,150 ± 0,026	0,64
S4	0,488 ± 0,022	0,142 ± 0,004	0,71

e. Incorporación de bacterias *E. coli* incorporadas y secas en un alimento (granulado o "peletización")

Se conocen en la técnica los protocolos para incorporar la matriz seca en un alimento, por ejemplo, en forma de aditivo alimentario. Un ejemplo ilustrativo de hacer tal cosa puede ser, por ejemplo, incorporando de 500 g a 1000 g de perlas de matriz seca en una tonelada de alimento. Si se desea, el alimento puede incluir también un producto de levadura inactivada, en cantidades adecuadas. Por ejemplo, las perlas de matriz seca que comprenden las bacterias *E. coli* incorporadas se mezclan en un depósito de homogeneización con todos los demás ingredientes. Preferiblemente, la mezcla se mezcla continuamente durante el proceso de granulado. El material mezclado se bombea después a un extrusor. Se aplica vapor entonces sobre el material mezclado que va a entrar en el extrusor (es decir, por lo tanto, la temperatura de la mezcla aumenta en esta etapa). Se aplica entonces una presión adecuada a la mezcla durante su paso por el extrusor (la presión y la temperatura aumentan, el punto en el que se alcanza la temperatura más alta es aproximadamente 75 °C). Los gránulos formados se expulsan del extrusor a un depósito de enfriamiento (caídas rápidas de temperatura de 30-40 °C, seguidas por otro enfriamiento hasta temperatura ambiente). El alimento granulado que incluye el aditivo alimentario (matriz que comprende las *E. coli* incorporadas) se puede almacenar después, por ejemplo, en bolsas o depósitos. Son posibles variaciones y perfeccionamientos del protocolo de granulado aquí descrito y resultarán claros para las personas expertas en esta técnica, a la luz de las enseñanzas presentes.

2. Ejemplo 2.

Para cada disolución de conservación, el proceso de secado y de ensayo se realizó al menos por triplicado. En referencia a la figura 2, en una primera etapa 500, se colocaron las perlas preparadas como en el ejemplo 1 en una disolución de conservación S1, una disolución de conservación S5, una disolución de conservación S6 o una disolución de conservación S7, con agitación suave durante aproximadamente 20 minutos. En cada caso, se realizó una determinación 550 del valor total de las UFC después del remojo en la disolución de conservación. En una segunda etapa 600, las perlas se colocaron en una bandeja de secado en un secador de aire a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas, para obtener perlas semi-secas. En cada caso, se realizó una medida 650 de la actividad de agua a_w de las perlas semi-secas, utilizando un equipo Aqualab Water Activity Meter 4TE (Decagon Devices, Inc., Estados Unidos de América). En una tercera etapa 700, las perlas semi-secas se colocaron a continuación en un desecador durante aproximadamente 64 horas, en el que se sopló aire seco y filtrado. De acuerdo con un aspecto de la presente descripción, el proceso de secado 800 incluye al menos dos etapas: una etapa 600 que incluye colocar las perlas en un secador de aire durante 24 horas a temperatura ambiente y obtener perlas semi-secas y una etapa 700 que incluye colocar las perlas semi-secas en un desecador durante 64 horas para obtener perlas secas. En cada caso se realizó una determinación del valor total de las UFC 750 y una medida 760 de la actividad de agua a_w de las perlas secas. Se obtuvieron perlas secas que tenían un valor de actividad de agua a_w menor o igual de 0,3.

En cada caso, y en referencia a la figura 2, se calculó la disminución relativa de la actividad de agua a_w según la expresión.

$$\text{Reducción relativa de } a_w = (650 - 760) / 650$$

En cada caso, y en referencia a la figura 2, la pérdida de viabilidad se calculó según la siguiente expresión:

$$\text{Pérdida UFC} = \log_{10} (550) - \log_{10} (750)$$

En cada caso, se calculó una pérdida de viabilidad promedio y una pérdida de viabilidad promedio normalizada respecto de los resultados obtenidos con la disolución de conservación S1.

Los resultados se muestran en la figura 4. La disolución de conservación S7 presentó una pérdida de viabilidad promedio normalizada de 0,38, manteniendo una actividad de agua de $0,298 \pm 0,013$.

En las tablas 4 y 5 se presenta una recopilación de los resultados del ejemplo 2. Estos resultados muestran que los elementos de la disolución de conservación S7 proporcionan un efecto significativo sobre la viabilidad de las bacterias *E. coli* introducidas en la matriz seca y en su resistencia al proceso de secado 700.

Tabla 4

Muestra	Etapa 550		Etapa 750	
	UFC promedio	UFC promedio	Pérdida de UFC promedio ($\log_{10}$)	Pérdida de UFC normalizada ($\log_{10}$)
S1	$3,3 \times 10^{11} \pm 9,2 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^{11} \pm 2,7 \times 10^{10}$	$0,26 \pm 0,07$	1
S5	$3,5 \times 10^{11} \pm 7,7 \times 10^{10}$	$2,6 \times 10^{11} \pm 6 \times 10^{10}$	$0,13 \pm 0,17$	0,5
S6	$3,1 \times 10^{11} \pm 5,8 \times 10^{10}$	$2,8 \times 10^{11} \pm 1,7 \times 10^{11}$	$0,10 \pm 0,29$	0,38
S7	$3,4 \times 10^{11} \pm 3,7 \times 10^{10}$	$2,7 \times 10^{11} \pm 1 \times 10^{10}$	$0,10 \pm 0,06$	0,38

Tabla 5

Muestra	Etapa 650		Etapa 760	
	a_w promedio	a_w promedio	Reducción relativa de a_w	
S1	$0,535 \pm 0,020$	$0,230 \pm 0,012$	0,57	
S5	$0,530 \pm 0,049$	$0,249 \pm 0,009$	0,53	
S6	$0,586 \pm 0,143$	$0,260 \pm 0,013$	0,56	
S7	$0,541 \pm 0,045$	$0,298 \pm 0,013$	0,45	

3. Ejemplo 3.

- 5 Para cada disolución de conservación, el proceso de secado y de ensayo se realizó al menos por triplicado. En referencia a la figura 2, en una primera etapa 500, se colocaron las perlas preparadas como en el ejemplo 1 en una disolución de conservación S1, una disolución de conservación S0, una disolución de conservación S8 o una disolución de conservación S9, con agitación suave durante aproximadamente 20 minutos. En cada caso, se realizó una determinación 550 del valor total de las UFC después del remojo en la disolución de conservación. En una segunda etapa 600, las perlas se colocaron en una bandeja de secado en un secador de aire a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas, para obtener perlas semi-secas. En cada caso, se realizó una medida 650 de la actividad de agua a_w de las perlas semi-secas, utilizando un equipo Aqualab Water Activity Meter 4TE (Decagon Devices, Inc., Estados Unidos de América). En una tercera etapa 700, las perlas semi-secas se colocaron a continuación en un desecador durante aproximadamente 64 horas, en el que se sopló aire seco y filtrado. De acuerdo con un aspecto de la presente descripción, el proceso de secado 800 incluye al menos dos etapas: una etapa 600 que incluye colocar las perlas en un secador de aire durante 24 horas a temperatura ambiente y obtener perlas semi-secas y una etapa 700 que incluye colocar las perlas semi-secas en un desecador durante 64 horas para obtener perlas secas. En cada caso se realizó una determinación del valor total de las UFC 750 y una medida 760 de la actividad de agua a_w de las perlas secas. Se obtuvieron perlas secas que tenían un valor de actividad de agua a_w menor o igual de 0,3.
- 10
- 15
- 20 En cada caso, y en referencia a la figura 2, se calculó la disminución relativa de la actividad de agua a_w según la expresión.

$$\text{Reducción relativa de } a_w = (650 - 760) / 650$$

En cada caso, y en referencia a la figura 2, la pérdida de viabilidad se calculó según la siguiente expresión:

$$\text{Pérdida UFC} = \log_{10} (550) - \log_{10} (750)$$

- 25 En cada caso, se calculó una pérdida de viabilidad promedio y una pérdida de viabilidad promedio normalizada respecto de los resultados obtenidos con la disolución de conservación S1.

Los resultados se muestran en la figura 5.

En las tablas 6 y 7 se presenta una recopilación de los resultados del ejemplo 3.

Tabla 6

Muestra	Etapa 550		Etapa 750	
	UFC promedio	UFC promedio	Pérdida de UFC promedio ($\log_{10}$)	Pérdida de UFC normalizada ($\log_{10}$)
S1	$2,2 \times 10^{11} \pm 2,9 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^{11} \pm 9,3 \times 10^9$	$0,11 \pm 0,05$	1
S0	$1,9 \times 10^{11} \pm 2 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^6$	$5,28 \pm 0,53$	47,7
S8	$2,8 \times 10^{11} \pm 4,6 \times 10^{10}$	$5,9 \times 10^{10} \pm 2,3 \times 10^{10}$	$0,70 \pm 0,15$	6,28
S9	$2,4 \times 10^{11} \pm 5,4 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^{11} \pm 1,5 \times 10^{10}$	$0,18 \pm 0,04$	1,64

Tabla 7

Muestra	Etapa 650	Etapa 760	
	a_w promedio	a_w promedio	Reducción relativa de a_w
S1	$0,453 \pm 0,010$	$0,241 \pm 0,005$	0,47
S0	$0,331 \pm 0,022$	$0,037 \pm 0,002$	0,89
S8	$0,366 \pm 0,010$	$0,062 \pm 0,006$	0,83
S9	$0,451 \pm 0,010$	$0,275 \pm 0,032$	0,39

4. Ejemplo 4.

Para cada disolución de conservación, el proceso de secado y de ensayo se realizó al menos por triplicado. En referencia a la figura 2, en una primera etapa 500, se colocaron las perlas preparadas como en el ejemplo 1 en una disolución de conservación S1, una disolución de conservación S10, una disolución de conservación S11 o una disolución de conservación S12, con agitación suave durante aproximadamente 20 minutos. En cada caso, se realizó una determinación 550 del valor total de las UFC después del remojo en la disolución de conservación. En una segunda etapa 600, las perlas se colocaron en una bandeja de secado en un secador de aire a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas, para obtener perlas semi-secas. En cada caso, se realizó una medida 650 de la actividad de agua a_w de las perlas semi-secas, utilizando un equipo Aqualab Water Activity Meter 4TE (Decagon Devices, Inc., Estados Unidos de América). En una tercera etapa 700, las perlas semi-secas se colocaron a continuación en un desecador durante aproximadamente 64 horas, en el que se sopló aire seco y filtrado. De acuerdo con un aspecto de la presente descripción, el proceso de secado 800 incluye al menos dos etapas: una etapa 600 que incluye colocar las perlas en un secador de aire durante 24 horas a temperatura ambiente y obtener perlas semi-secas y una etapa 700 que incluye colocar las perlas semi-secas en un desecador durante 64 horas para obtener perlas secas. En cada caso se realizó una determinación del valor total de las UFC 750 y una medida 760 de la actividad de agua a_w de las perlas secas. Se obtuvieron perlas secas que tenían un valor de actividad de agua a_w menor o igual de 0,3.

En cada caso, y en referencia a la figura 2, se calculó la disminución relativa de la actividad de agua a_w según la expresión.

$$\text{Reducción relativa de } a_w = (650 - 760) / 650$$

En cada caso, y en referencia a la figura 2, la pérdida de viabilidad se calculó según la siguiente expresión:

$$\text{Pérdida UFC} = \log_{10} (550) - \log_{10} (750)$$

En cada caso, se calculó una pérdida de viabilidad promedio y una pérdida de viabilidad promedio normalizada respecto de los resultados obtenidos con la disolución de conservación S1.

Los resultados se muestran en la figura 6. La disolución de conservación S7 presentó una pérdida de viabilidad promedio normalizada de 0,58.

En las tablas 8 y 9 se presenta una recopilación de los resultados del ejemplo 4.

Tabla 8

Muestra	Etapa 550	Etapa 750		
	UFC promedio	UFC promedio	Pérdida de UFC promedio ($\log_{10}$)	Pérdida de UFC normalizada ($\log_{10}$)
S1	$3,7 \times 10^{11} \pm 5,2 \times 10^{10}$	$2,8 \times 10^{11} \pm 4,46 \times 10^{10}$	$0,12 \pm 0,01$	1
S10	$4 \times 10^{11} \pm 1 \times 10^{11}$	$3,3 \times 10^{11} \pm 3,11 \times 10^{10}$	$0,07 \pm 0,12$	0,58
S11	$3,3 \times 10^{11} \pm 3,9 \times 10^{10}$	$1,9 \times 10^{11} \pm 1,77 \times 10^{10}$	$0,24 \pm 0,03$	1,91
S12	$4 \times 10^{11} \pm 2,9 \times 10^{10}$	$5,3 \times 10^{11} \pm 9,27 \times 10^{10}$	$-0,12 \pm 0,08$	-0,94

Tabla 9

Muestra	Etapa 650	Etapa 760	
	a_w promedio	a_w promedio	Reducción relativa de a_w
S1	$0,475 \pm 0,023$	$0,123 \pm 0,007$	0,74
S10	$0,490 \pm 0,026$	$0,135 \pm 0,007$	0,72
S11	$0,419 \pm 0,016$	$0,201 \pm 0,038$	0,52
S12	$0,494 \pm 0,026$	$0,165 \pm 0,006$	0,66

5. Ejemplo 5.

Para cada disolución de conservación, el proceso de secado y de ensayo se realizó al menos por triplicado. En referencia a la figura 2, en una primera etapa 500, se colocaron las perlas preparadas como en el ejemplo 1 en una disolución de conservación S1, una disolución de conservación S13, una disolución de conservación S14 o una disolución de conservación S15, con agitación suave durante aproximadamente 20 minutos. En cada caso, se realizó una determinación 550 del valor total de las UFC después del remojo en la disolución de conservación. En una segunda etapa 600, las perlas se colocaron en una bandeja de secado en un secador de aire a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas, para obtener perlas semi-secas. En cada caso, se realizó una medida 650 de la actividad de agua a_w de las perlas semi-secas, utilizando un equipo Aqualab Water Activity Meter 4TE (Decagon Devices, Inc., Estados Unidos de América). En una tercera etapa 700, las perlas semi-secas se colocaron a continuación en un desecador durante aproximadamente 64 horas, en el que se sopló aire seco y filtrado. De acuerdo con un aspecto de la presente descripción, el proceso de secado 800 incluye al menos dos etapas: una etapa 600 que incluye colocar las perlas en un secador de aire durante 24 horas a temperatura ambiente y obtener perlas semi-secas y una etapa 700 que incluye colocar las perlas semi-secas en un desecador durante 64 horas para obtener perlas secas. En cada caso se realizó una determinación del valor total de las UFC 750 y una medida 760 de la actividad de agua a_w de las perlas secas. Se obtuvieron perlas secas que tenían un valor de actividad de agua a_w menor o igual de 0,3.

En cada caso, y en referencia a la figura 2, se calculó la disminución relativa de la actividad de agua a_w según la expresión.

$$\text{Reducción relativa de } a_w = (650 - 760) / 650$$

En cada caso, y en referencia a la figura 2, la pérdida de viabilidad se calculó según la siguiente expresión:

$$\text{Pérdida UFC} = \log_{10} (550) - \log_{10} (750)$$

En cada caso, se calculó una pérdida de viabilidad promedio y una pérdida de viabilidad promedio normalizada respecto de los resultados obtenidos con la disolución de conservación S1.

Los resultados se muestran en la figura 7. La disolución de conservación S7 presentó una pérdida de viabilidad promedio normalizada de 0,35.

En las tablas 10 y 11 se presenta una recopilación de los resultados del ejemplo 5.

Tabla 10

Muestra	Etapa 550	Etapa 750		
	UFC promedio	UFC promedio	Pérdida de UFC promedio ($\log_{10}$)	Pérdida de UFC normalizada ($\log_{10}$)
S1	$4,1 \times 10^{11} \pm 3,8 \times 10^{10}$	$2,7 \times 10^{11} \pm 3,44 \times 10^{10}$	$0,18 \pm 0,10$	1
S13	$3,8 \times 10^{11} \pm 4,2 \times 10^{10}$	$2,6 \times 10^{11} \pm 2,7 \times 10^{10}$	$0,15 \pm 0,02$	0,85
S14	$3,8 \times 10^{11} \pm 6,1 \times 10^{10}$	$2,2 \times 10^{11} \pm 3,55 \times 10^{10}$	$0,24 \pm 0,08$	1,35
S15	$4,4 \times 10^{11} \pm 1,5 \times 10^{10}$	$3,8 \times 10^{11} \pm 6,37 \times 10^{10}$	$0,06 \pm 0,07$	0,35

Tabla 11

Muestra	Etapa 650	Etapa 760	
	a_w promedio	a_w promedio	Reducción relativa de a_w
S1	$0,501 \pm 0,041$	$0,177 \pm 0,008$	0,65
S13	$0,562 \pm 0,101$	$0,247 \pm 0,012$	0,56
S14	$0,465 \pm 0,031$	$0,133 \pm 0,013$	0,71
S15	$0,502 \pm 0,037$	$0,198 \pm 0,016$	0,60

6. Ejemplo 6.

Para cada disolución de conservación, el proceso de secado y de ensayo se realizó al menos por triplicado. En referencia a la figura 2, en una primera etapa 500, se colocaron las perlas preparadas como en el ejemplo 1 en una disolución de conservación S1, una disolución de conservación S16, una disolución de conservación S17 o una disolución de conservación S18, con agitación suave durante aproximadamente 20 minutos. En cada caso, se realizó una determinación 550 del valor total de las UFC después del remojo en la disolución de conservación. En una segunda etapa 600, las perlas se colocaron en una bandeja de secado en un secador de aire a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas, para obtener perlas semi-secas. En cada caso, se realizó una medida 650 de la actividad de agua a_w de las perlas semi-secas, utilizando un equipo Aqualab Water Activity Meter 4TE (Decagon Devices, Inc., Estados Unidos de América). En una tercera etapa 700, las perlas semi-secas se colocaron a continuación en un desecador durante aproximadamente 64 horas, en el que se sopló aire seco y filtrado. De acuerdo con un aspecto de la presente descripción, el proceso de secado 800 incluye al menos dos etapas: una etapa 600 que incluye colocar las perlas en un secador de aire durante 24 horas a temperatura ambiente y obtener perlas semi-secas y una etapa 700 que incluye colocar las perlas semi-secas en un desecador durante 64 horas para obtener perlas secas. En cada caso se realizó una determinación del valor total de las UFC 750 y una medida 760 de la actividad de agua a_w de las perlas secas. Se obtuvieron perlas secas que tenían un valor de actividad de agua a_w menor o igual de 0,3.

En cada caso, y en referencia a la figura 2, se calculó la disminución relativa de la actividad de agua a_w según la expresión.

$$\text{Reducción relativa de } a_w = (650 - 760) / 650$$

En cada caso, y en referencia a la figura 2, la pérdida de viabilidad se calculó según la siguiente expresión:

$$\text{Pérdida UFC} = \log_{10} (550) - \log_{10} (750)$$

En cada caso, se calculó una pérdida de viabilidad promedio y una pérdida de viabilidad promedio normalizada respecto de los resultados obtenidos con la disolución de conservación S1.

Los resultados se muestran en la figura 8.

En las tablas 12 y 13 se presenta una recopilación de los resultados del ejemplo 6.

Tabla 12

Muestra	Etapa 550	Etapa 750		
	UFC promedio	UFC promedio	Pérdida de UFC promedio ($\log_{10}$)	Pérdida de UFC normalizada ($\log_{10}$)
S1	$3,3 \times 10^{11} \pm 3,4 \times 10^{10}$	$3,1 \times 10^{11} \pm 4,92 \times 10^{10}$	$0,03 \pm 0,07$	1
S16	$3,6 \times 10^{11} \pm 4,1 \times 10^{10}$	$4,4 \times 10^{11} \pm 9,91 \times 10^{10}$	$-0,07 \pm 0,11$	-2,68
S17	$3,2 \times 10^{11} \pm 4,5 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^{11} \pm 5,05 \times 10^{10}$	$0,15 \pm 0,05$	5,57
S18	$2,7 \times 10^{11} \pm 3,9 \times 10^{10}$	$4,2 \times 10^{11} \pm 4,76 \times 10^{10}$	$-0,19 \pm 0,06$	-6,98

Tabla 13

Muestra	Etapa 650	Etapa 760	
	a_w promedio	a_w promedio	Reducción relativa de a_w
S1	$0,734 \pm 0,164$	$0,155 \pm 0,003$	0,79
S16	$0,575 \pm 0,862$	$0,136 \pm 0,015$	0,76
S17	$0,742 \pm 0,167$	$0,039 \pm 0,004$	0,95
S18	$0,536 \pm 0,003$	$0,176 \pm 0,029$	0,67

7. Ejemplo 7.

Para cada disolución de conservación, el proceso de secado y de ensayo se realizó al menos por triplicado. En referencia a la figura 2, en una primera etapa 500, se colocaron las perlas preparadas como en el ejemplo 1 en una disolución de conservación S1 o una disolución de conservación S19, con agitación suave durante aproximadamente 20 minutos. En cada caso, se realizó una determinación 550 del valor total de las UFC después del remojo en la disolución de conservación. En una segunda etapa 600, las perlas se colocaron en una bandeja de secado en un secador de aire a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas, para obtener perlas semi-secas. En cada caso, se realizó una medida 650 de la actividad de agua a_w de las perlas semi-secas, utilizando un equipo Aqualab Water Activity Meter 4TE (Decagon Devices, Inc., Estados Unidos de América). En una tercera etapa 700, las perlas semi-secas se colocaron a continuación en un desecador durante aproximadamente 64 horas, en el que se sopló aire seco y filtrado. De acuerdo con un aspecto de la presente descripción, el proceso de secado 800 incluye al menos dos etapas: una etapa 600 que incluye colocar las perlas en un secador de aire durante 24 horas a temperatura ambiente y obtener perlas semi-secas y una etapa 700 que incluye colocar las perlas semi-secas en un desecador durante 64 horas para obtener perlas secas. En cada caso se realizó una determinación del valor total de las UFC 750 y una medida 760 de la actividad de agua a_w de las perlas secas. Se obtuvieron perlas secas que tenían un valor de actividad de agua a_w menor o igual de 0,3.

En cada caso, y en referencia a la figura 2, se calculó la disminución relativa de la actividad de agua a_w según la expresión.

$$\text{Reducción relativa de } a_w = (650 - 760) / 650$$

En cada caso, y en referencia a la figura 2, la pérdida de viabilidad se calculó según la siguiente expresión:

$$\text{Pérdida UFC} = \log_{10} (550) - \log_{10} (750)$$

En cada caso, se calculó una pérdida de viabilidad promedio y una pérdida de viabilidad promedio normalizada respecto de los resultados obtenidos con la disolución de conservación S1.

Los resultados se muestran en la figura 9.

En las tablas 14 y 15 se presenta una recopilación de los resultados del ejemplo 7.

Tabla 14

Muestra	Etapa 550	Etapa 750		
	UFC promedio	UFC promedio	Pérdida de UFC promedio ($\log_{10}$)	Pérdida de UFC normalizada ($\log_{10}$)
S1	$3,5 \times 10^{11} \pm 4,4 \times 10^8$	$3,2 \times 10^{11} \pm 4,13 \times 10^{10}$	$0,03 \pm 0,05$	1
S19	$3,3 \times 10^{11} \pm 2,6 \times 10^{10}$	$2,4 \times 10^{11} \pm 2,06 \times 10^{10}$	$0,13 \pm 0,06$	3,83

Tabla 15

Muestra	Etapa 650	Etapa 760	
	a_w promedio	a_w promedio	Reducción relativa de a_w
S1	$0,660 \pm 0,200$	$0,158 \pm 0,026$	0,76
S19	$0,561 \pm 0,085$	$0,129 \pm 0,010$	0,77

8. Ejemplo 8.

Para cada disolución de conservación, el proceso de secado y de ensayo se realizó al menos por triplicado. Las perlas preparadas como en el ejemplo 1 se colocaron en una disolución de conservación S1, una disolución de conservación S2, una disolución de conservación S3 y una disolución de conservación S4, con agitación suave durante aproximadamente 20 minutos. Las perlas se colocaron después sobre un secador de bandeja en un secador de aire a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas para obtener perlas semi-secas. A continuación, se colocaron las perlas semi-secas en un desecador durante aproximadamente 64 horas, en el cual se sopló aire seco y filtrado. Se obtuvieron perlas secas que tenían un valor de actividad de agua a_w menor o igual de 0,3.

En cada caso, se probó la viabilidad de la cepa durante un período de cuatro (4) semanas en condiciones de almacenamiento de 4°C de temperatura, midiendo las UFC/g de las perlas secas. Los ensayos se realizaron al menos por triplicado y se calculó la desviación estándar.

Los resultados del ejemplo 8 se muestran en la tabla 16, en la que se aprecia que todas las disoluciones de conservación ensayadas proporcionan estabilidad a las cepas de los aditivos alimentarios durante 4 semanas cuando se almacenan a 4 °C.

Tabla 16

Disolución de conservación	Diferencia en UFC/g después de 4 semanas (log)
S1	0,2
S2	0,1
S3	0,1
S4	0

9. Ejemplo 9.

Para cada disolución de conservación, el proceso de secado y de ensayo se realizó al menos por triplicado. Las perlas preparadas como en el ejemplo 1 se colocaron en una disolución de conservación S1, una disolución de conservación S5, una disolución de conservación S6 y una disolución de conservación S7, con agitación suave durante aproximadamente 20 minutos. Las perlas se colocaron después sobre un secador de bandeja en un secador de aire a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas para obtener perlas semi-secas. A continuación, se colocaron las perlas semi-secas en un desecador durante aproximadamente 64 horas, en el cual se sopló aire seco y filtrado. Se obtuvieron perlas secas que tenían un valor de actividad de agua a_w menor o igual de 0,3.

En cada caso, se probó la viabilidad de la cepa durante un período de cuatro (4) semanas en condiciones de almacenamiento de 4 °C de temperatura, midiendo las UFC/g de las perlas secas. Los ensayos se realizaron al menos por triplicado y se calculó la desviación estándar.

Los resultados del ejemplo 9 se muestran en la tabla 17, en la que se aprecia que todas las disoluciones de conservación ensayadas proporcionan estabilidad a las cepas de los aditivos alimentarios durante 4 semanas cuando se almacenan a 4 °C.

Tabla 17

Disolución de conservación	Diferencia en UFC/g después de 4 semanas (log)
S1	0,2

S5	0,1
S6	0
S7	0,1

10. Ejemplo 10.

Para cada disolución de conservación, el proceso de secado y de ensayo se realizó al menos por triplicado. Las perlas preparadas como en el ejemplo 1 se colocaron en una disolución de conservación S1, una disolución de conservación S0, una disolución de conservación S8 y una disolución de conservación S9, con agitación suave durante aproximadamente 20 minutos. Las perlas se colocaron después sobre un secador de bandeja en un secador de aire a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas para obtener perlas semi-secas. A continuación, se colocaron las perlas semi-secas en un desecador durante aproximadamente 64 horas, en el cual se sopló aire seco y filtrado. Se obtuvieron perlas secas que tenían un valor de actividad de agua a_w menor o igual de 0,3.

En cada caso, se probó la viabilidad de la cepa durante un período de cuatro (4) semanas en condiciones de almacenamiento de 4 °C de temperatura, midiendo las UFC/g de las perlas secas. Los ensayos se realizaron al menos por triplicado y se calculó la desviación estándar.

Los resultados del ejemplo 10 se muestran en la tabla 18, en la que se aprecia que todas las disoluciones de conservación ensayadas proporcionan estabilidad a las cepas de los aditivos alimentarios durante 4 semanas cuando se almacenan a 4 °C.

Tabla 18

Disolución de conservación	Diferencia en UFC/g después de 4 semanas (log)
S1	0
S0	2,4
S8	0,1
S9	0

11. Ejemplo 11.

Para cada disolución de conservación, el proceso de secado y de ensayo se realizó al menos por triplicado. Las perlas preparadas como en el ejemplo 1 se colocaron en una disolución de conservación S1, una disolución de conservación S10, una disolución de conservación S11 y una disolución de conservación S12, con agitación suave durante aproximadamente 20 minutos. Las perlas se colocaron después sobre un secador de bandeja en un secador de aire a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas para obtener perlas semi-secas. A continuación, se colocaron las perlas semi-secas en un desecador durante aproximadamente 64 horas, en el cual se sopló aire seco y filtrado. Se obtuvieron perlas secas que tenían un valor de actividad de agua a_w menor o igual de 0,3.

En cada caso, se probó la viabilidad de la cepa durante un período de cuatro (4) semanas en condiciones de almacenamiento de 4 °C de temperatura, midiendo las UFC/g de las perlas secas. Los ensayos se realizaron al menos por triplicado y se calculó la desviación estándar.

Los resultados del ejemplo 11 se muestran en la tabla 19, en la que se aprecia que todas las disoluciones de conservación ensayadas proporcionan estabilidad a las cepas de los aditivos alimentarios durante 4 semanas cuando se almacenan a 4 °C.

Tabla 19

Disolución de conservación	Diferencia en UFC/g después de 4 semanas (log)
S1	0,1
S10	0,1
S11	0,4
S12	0,2

12. Ejemplo 12

Para cada disolución de conservación, el proceso de secado y de ensayo se realizó al menos por triplicado. Las perlas preparadas como en el ejemplo 1 se colocaron en una disolución de conservación S1, una disolución de conservación S13, una disolución de conservación S14 y una disolución de conservación S15, con agitación suave durante aproximadamente 20 minutos. Las perlas se colocaron después sobre un secador de bandeja en un secador de aire a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas para obtener perlas semi-secas. A continuación, se colocaron las perlas semi-secas en un desecador durante aproximadamente 64 horas, en el cual se sopló aire seco y filtrado. Se obtuvieron perlas secas que tenían un valor de actividad de agua a_w menor o igual de 0,3.

En cada caso, se probó la viabilidad de la cepa durante un período de cuatro (4) semanas en condiciones de almacenamiento de 4 °C de temperatura, midiendo las UFC/g de las perlas secas. Los ensayos se realizaron al menos por triplicado y se calculó la desviación estándar.

Los resultados del ejemplo 12 se muestran en la tabla 20, en la que se aprecia que todas las disoluciones de conservación ensayadas proporcionan estabilidad a las cepas de los aditivos alimentarios durante 4 semanas cuando se almacenan a 4 °C.

Tabla 20

Disolución de conservación	Diferencia en UFC/g después de 4 semanas (log)
S1	0
S13	0
S14	0,1
S15	0,1

13. Ejemplo 13.

Para cada disolución de conservación, el proceso de secado y de ensayo se realizó al menos por triplicado. Las perlas preparadas como en el ejemplo 1 se colocaron en una disolución de conservación S1, una disolución de conservación S16, una disolución de conservación S17 y una disolución de conservación S18, con agitación suave durante aproximadamente 20 minutos. Las perlas se colocaron después sobre un secador de bandeja en un secador de aire a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas para obtener perlas semi-secas. A continuación, se colocaron las perlas semi-secas en un desecador durante aproximadamente 64 horas, en el cual se sopló aire seco y filtrado. Se obtuvieron perlas secas que tenían un valor de actividad de agua a_w menor o igual de 0,3.

En cada caso, se probó la viabilidad de la cepa durante un período de cuatro (4) semanas en condiciones de almacenamiento de 4 °C de temperatura, midiendo las UFC/g de las perlas secas. Los ensayos se realizaron al menos por triplicado y se calculó la desviación estándar.

Los resultados del ejemplo 13 se muestran en la tabla 21, en la que se aprecia que todas las disoluciones de conservación ensayadas proporcionan estabilidad a las cepas de los aditivos alimentarios durante 4 semanas cuando se almacenan a 4 °C.

Tabla 21

Disolución de conservación	Diferencia en UFC/g después de 4 semanas (log)
S1	0
S16	0
S17	0
S18	0,1

14. Ejemplo 14.

Para cada disolución de conservación, el proceso de secado y de ensayo se realizó al menos por triplicado. Las perlas preparadas como en el ejemplo 1 se colocaron en una disolución de conservación S1 y una disolución de conservación S19, con agitación suave durante aproximadamente 20 minutos. Las perlas se colocaron después sobre un secador de bandeja en un secador de aire a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas para obtener perlas semi-secas. A continuación, se colocaron las perlas semi-secas en un desecador durante aproximadamente 64 horas,

en el cual se sopló aire seco y filtrado. Se obtuvieron perlas secas que tenían un valor de actividad de agua a_w menor o igual de 0,3.

5 En cada caso, se probó la viabilidad de la cepa durante un período de cuatro (4) semanas en condiciones de almacenamiento de 4 °C de temperatura, midiendo las UFC/g de las perlas secas. Los ensayos se realizaron al menos por triplicado y se calculó la desviación estándar.

Los resultados se muestran en la tabla 22, en la que se aprecia que todas las disoluciones de conservación ensayadas proporcionan estabilidad a las cepas de los aditivos alimentarios durante 4 semanas cuando se almacenan a 4 °C.

Tabla 22

Disolución de conservación	Diferencia en UFC/g después de 4 semanas (log)
S1	0,1
S19	0,1

10 En resumen, el presente inventor ha observado, de manera sorprendente e inesperada, que una matriz que comprende bacterias *E. coli* incorporadas viables tal como se describe en este documento fue capaz de conservar la viabilidad de suficientes UFC de bacterias a lo largo de un período de tiempo dado, por ejemplo, 4 semanas, para un uso comercial de las mismas. Por ejemplo, la matriz se incorporó con éxito en un alimento para animales en forma de gránulos ("pellets") de tal forma que el alimento para animales pudo ser almacenado, transportado y manipulado y, eventualmente, administrado a un animal, conservando suficientes UFC/g viables de alimento animal como para proporcionar los efectos beneficiosos normalmente asociados con las bacterias.

15 Las personas expertas en la técnica entenderán que a lo largo de la presente especificación el término "un/una" usado antes de una palabra abarca realizaciones que contienen uno o más de los ítems a los que el término se refiere. También entenderán las personas expertas en la técnica que, en toda esta especificación, el término "que comprende", que es sinónimo de "que incluye", "que contiene" o "caracterizado por", es inclusivo y abierto y no excluye elementos o etapas de método no enumerados o adicionales.

20 A menos que se definan de otra manera, todos los términos científicos y técnicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por las personas expertas en la técnica a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, prevalecerá el presente documento, incluyendo las definiciones.

25 Tal y como se usan en la presente descripción, los términos "alrededor de", "aproximadamente" o "de manera aproximada" significarán, generalmente, dentro del margen de error aceptado de manera general en la técnica. Por lo tanto, las cantidades numéricas dadas en este documento incluyen generalmente tales márgenes de error de modo que los términos o expresiones alrededor de, "aproximadamente" o "de manera aproximada" se pueden deducir si no están expresamente indicados.

30 Aunque la presente descripción ha descrito con considerable detalle ciertas realizaciones, son posibles variaciones y perfeccionamientos y resultarán claros a las personas expertas en la técnica a la luz de las presentes enseñanzas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para proporcionar bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) viables incorporadas en una matriz en forma de partículas, que comprende mezclar *E. coli* con alginato, formar partículas, poner en contacto las partículas con una disolución de conservación que comprende maltodextrina o dextrano y que comprende además sacarosa o trehalosa y secarlas para obtener una actividad de agua $\leq 0,3$.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho secado incluye secado al aire.
3. El método de la reivindicación 2, en el que dicho secado comprende secar dichas partículas en un secador de aire.
4. El método de la reivindicación 2, en el que dicho secado comprende secar dichas partículas en un desecador.
- 10 5. El método de la reivindicación 4, en el que dicho secado comprende un primer secado en un secador de aire y un segundo secado en un desecador.
6. El método de la reivindicación 1, en el que dicho secado incluye liofilización.
7. El método de la reivindicación 1, en el que dicha matriz comprende una proporción de sacarosa o trehalosa / maltodextrina o dextrano de menos de 10, donde la relación está en % en peso / % en peso.
- 15 8. El método de la reivindicación 7, en el que la proporción es menor de 5.
9. El método de la reivindicación 7, en el que la proporción es de aproximadamente 1.
10. El método de la reivindicación 1, en el que dicha matriz comprende además una sal de ácido L-glutámico.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que las bacterias *E. coli* son bacterias *E. coli* no patógenas.

20

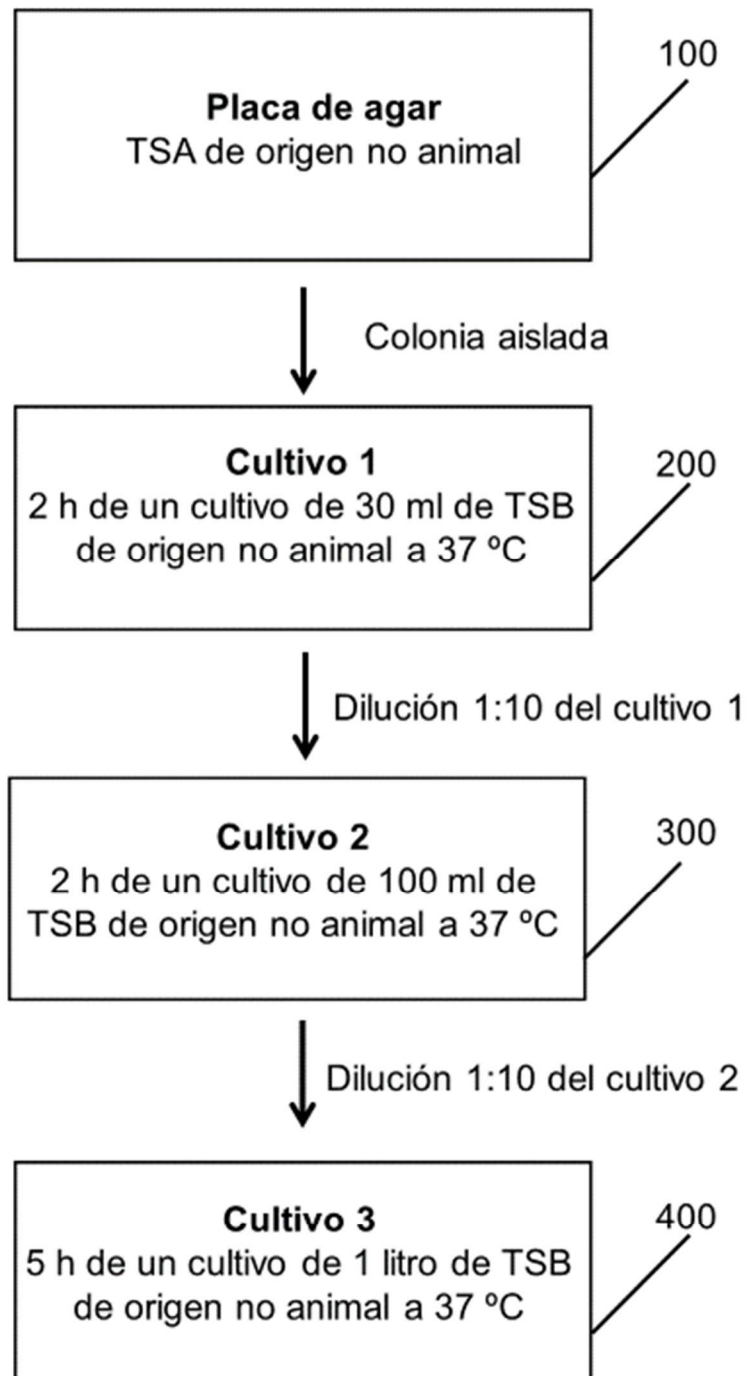


Figura 1

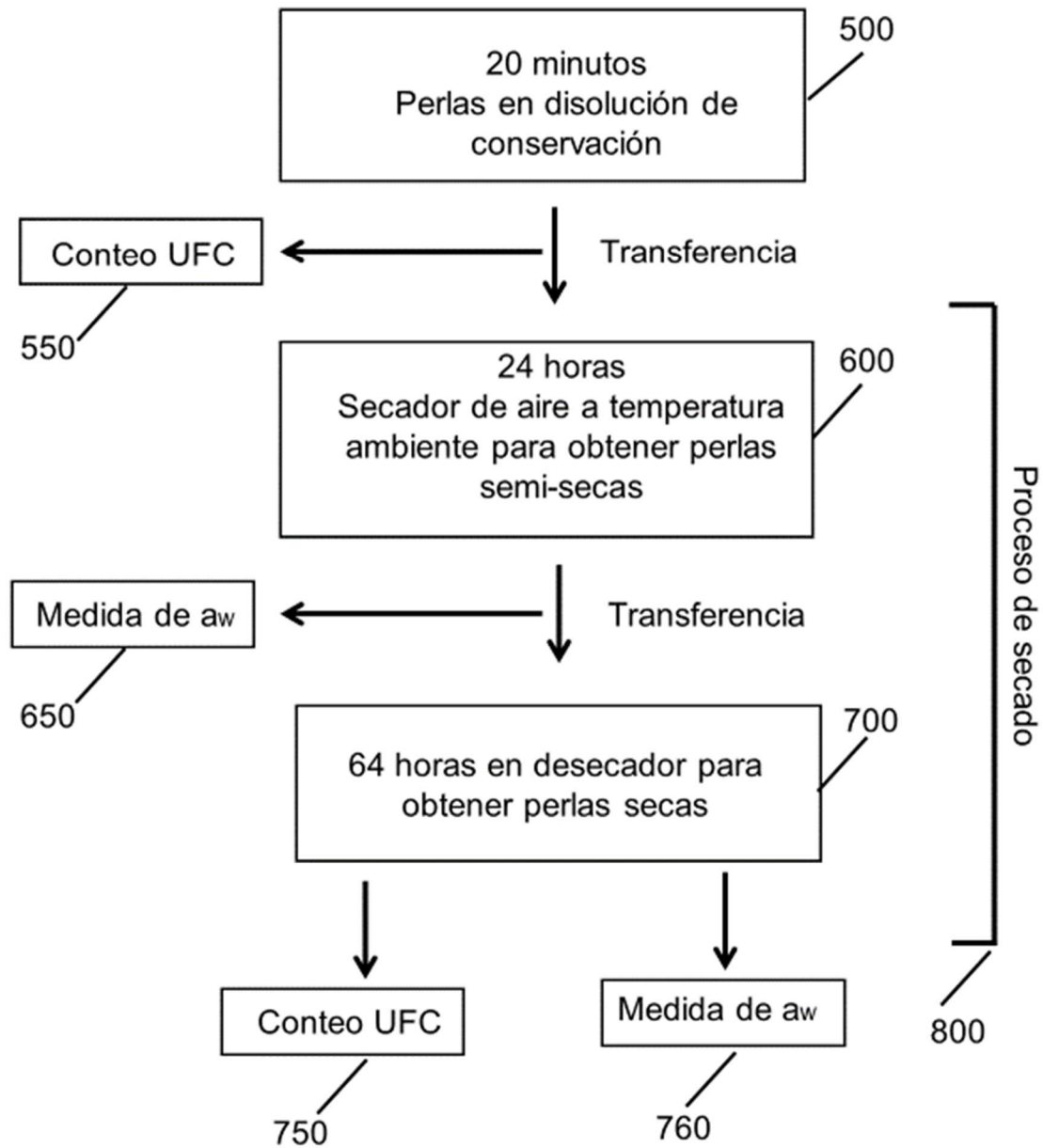


Figura 2

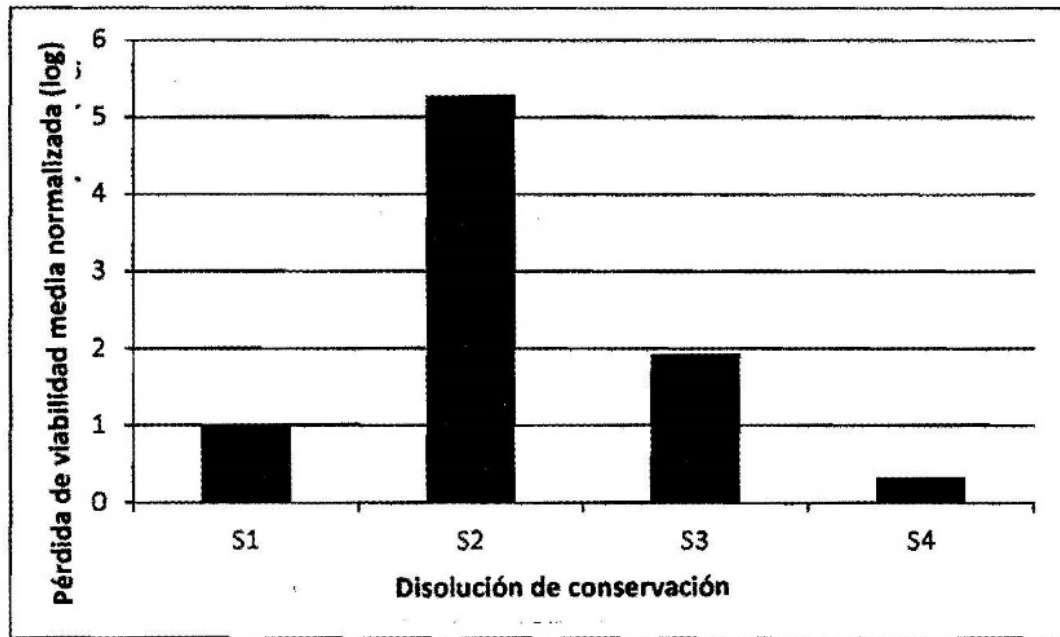


Figura 3

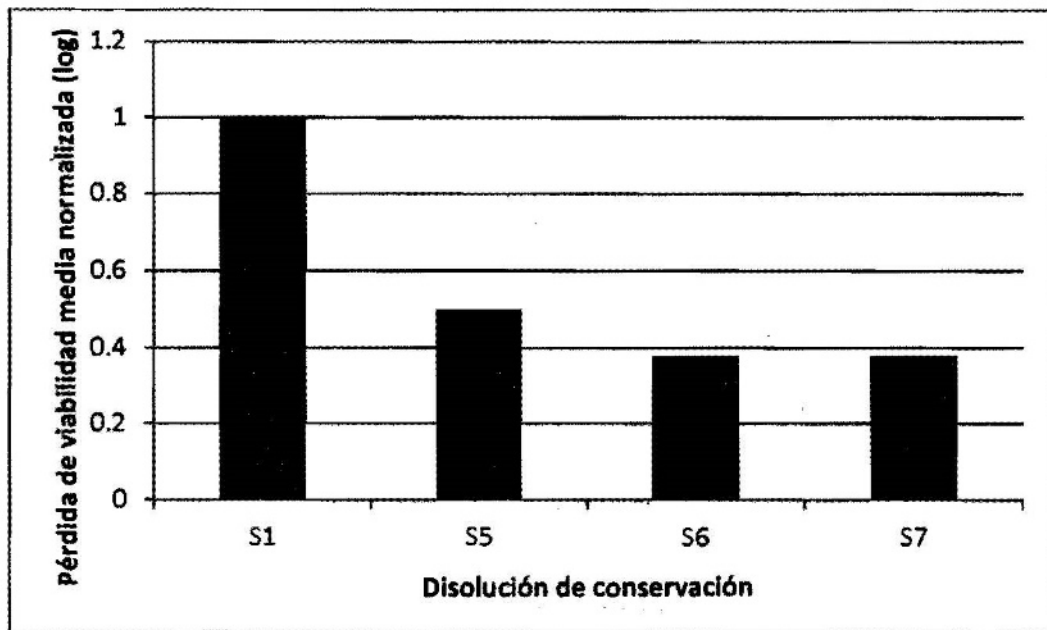


Figura 4

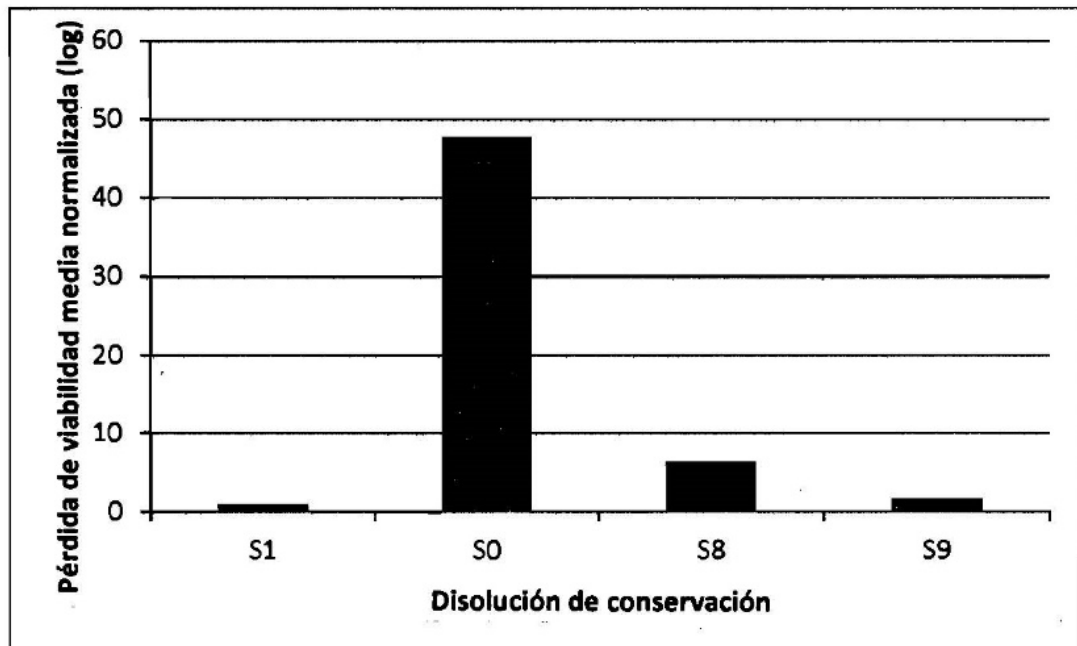


Figura 5

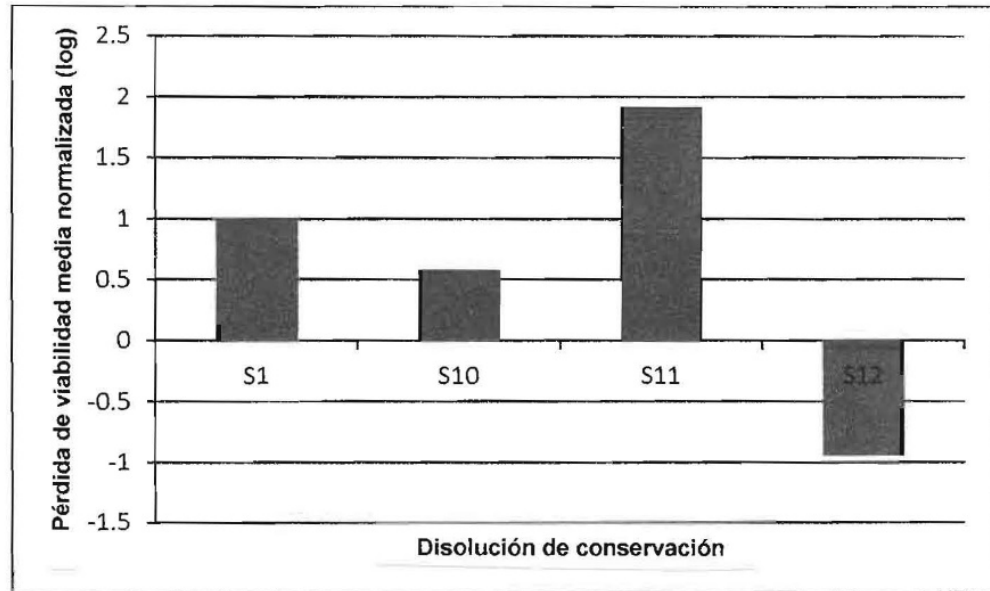


Figura 6

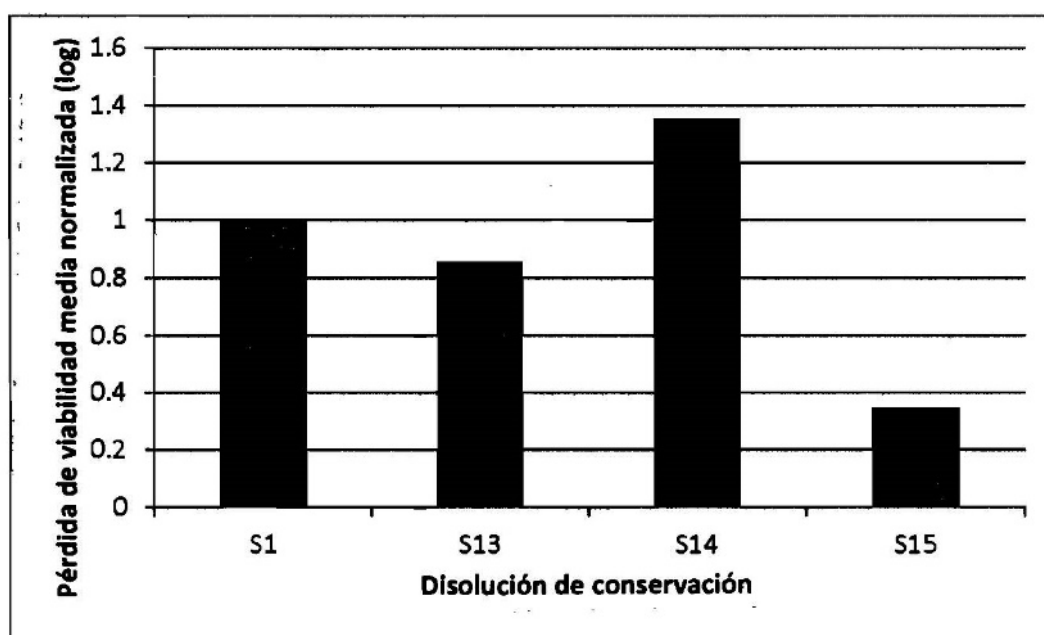


Figura 7

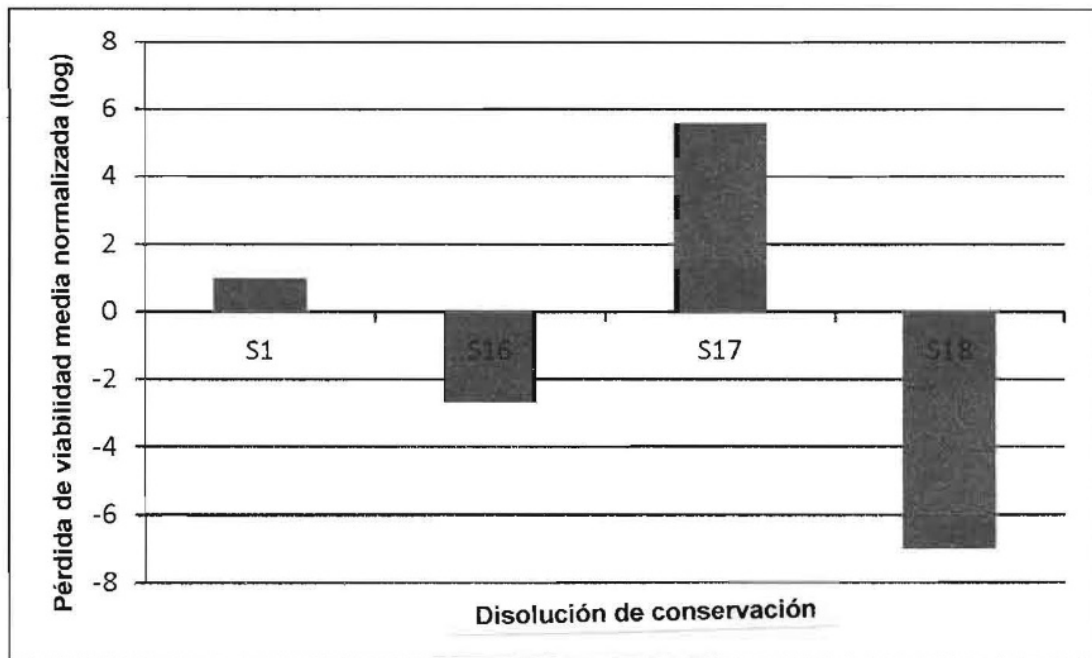


Figura 8

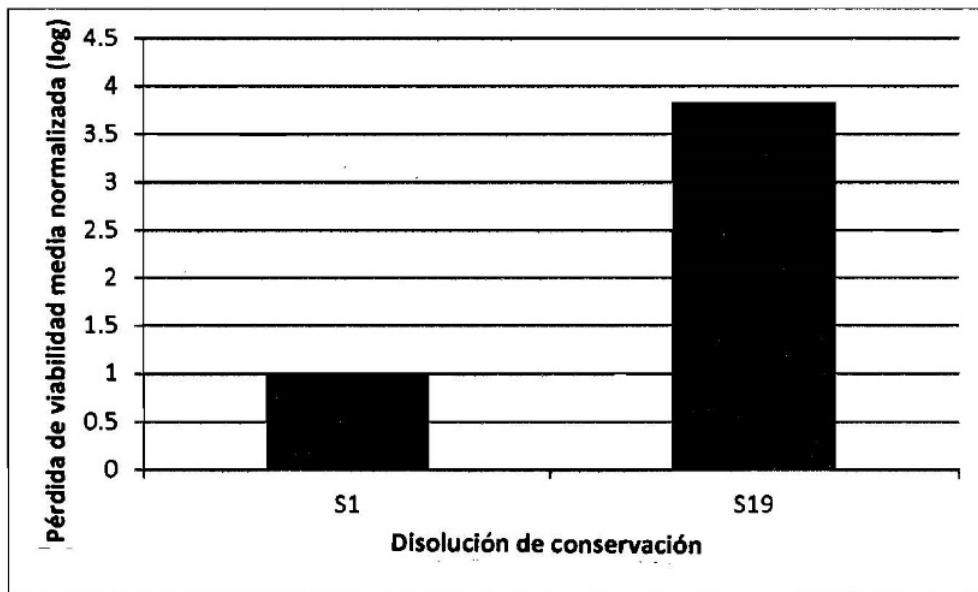


Figura 9

Test	Código de disolución	Muestra	Secado			R ₉₀		Estabilidad por semana (UFC/g)				
			Antes (Total UFC)	Después (Total UFC)	Diferencia (log)	Antes	Después	0	1	2	3	4
1	S1	A	3.1E+11	1.4E+11	-0.36	0.4502	0.1536	3.4E+09	4.5E+09	4.1E+09	4.4E+09	8.6E+09
		B	2.1E+11	1.4E+11	-0.17	0.4831	0.1740	3.8E+09	5.4E+09	4.8E+09	3.2E+09	4.8E+09
		C	3.9E+11	1.4E+11	-0.43	0.4871	0.1671	3.8E+09	5.0E+09	4.3E+09	4.9E+09	5.5E+09
	S2	A	2.3E+11	2.8E+09	-1.92	0.2549	0.0616	1.9E+08	9.9E+07	1.3E+08	1.9E+08	3.5E+08
		B	1.8E+11	8.1E+09	-1.34	0.2836	0.0561	5.4E+08	6.2E+08	4.5E+08	8.2E+08	5.4E+08
		C	2.9E+11	5.3E+09	-1.74	0.2961	0.0434	3.4E+08	1.1E+08	1.5E+08	2.0E+08	4.6E+08
	S3	A	2.3E+11	1.0E+11	-0.34	0.4215	0.1274	4.3E+09	1.8E+09	1.5E+09	4.5E+09	4.4E+09
		B	2.3E+11	2.5E+10	-0.96	0.4011	0.1437	1.1E+09	1.2E+09	1.7E+09	1.5E+09	2.3E+09
		C	3.1E+11	9.1E+10	-0.53	0.4459	0.1791	3.9E+09	5.9E+09	6.1E+09	3.2E+09	6.1E+09
	S4	A	2.9E+11	2.4E+11	-0.08	0.4687	0.1376	6.6E+09	6.3E+09	4.9E+09	5.0E+09	6.3E+09
		B	2.6E+11	1.6E+11	-0.20	0.4848	0.1429	4.6E+09	4.0E+09	5.3E+09	5.6E+09	4.2E+09
		C	3.9E+11	3.5E+11	-0.04	0.5114	0.1463	9.7E+09	5.8E+09	6.6E+09	6.2E+09	6.2E+09
2	S1	A	2.5E+11	1.5E+11	-0.24	0.5219	0.2174	3.7E+09	7.4E+09	5.8E+09	6.6E+09	5.9E+09
		B	4.3E+11	2.0E+11	-0.34	0.5582	0.2299	5.0E+09	5.0E+09	4.8E+09	6.9E+09	7.7E+09
		C	3.0E+11	1.9E+11	-0.20	0.5255	0.2416	4.9E+09	5.1E+09	6.3E+09	4.9E+09	5.9E+09
	S5	A	3.6E+11	2.0E+11	-0.24	0.5016	0.2470	5.4E+09	1.0E+10	8.3E+09	4.7E+09	6.4E+09
		B	4.3E+11	2.6E+11	-0.22	0.5011	0.2413	6.5E+09	5.8E+09	6.5E+09	2.8E+09	8.0E+09
		C	2.8E+11	3.2E+11	0.07	0.5864	0.2592	8.1E+09	7.4E+09	5.6E+09	5.7E+09	9.4E+09
	S6	A	2.8E+11	4.8E+11	0.23	0.7511	0.2747	1.2E+10	9.4E+09	6.2E+09	8.1E+09	8.8E+09
		B	3.8E+11	2.5E+11	-0.19	0.5017	0.2539	6.2E+09	5.6E+09	7.1E+09	5.9E+09	7.5E+09
		C	2.8E+11	1.3E+11	-0.33	0.5065	0.2511	3.3E+09	4.6E+09	7.2E+09	4.7E+09	5.0E+09
	S7	A	3.3E+11	2.8E+11	-0.07	0.5929	0.2840	7.0E+09	1.0E+10	8.5E+09	6.9E+09	1.0E+10
		B	3.8E+11	2.6E+11	-0.16	0.5190	0.3027	6.5E+09	8.1E+09	4.8E+09	4.7E+09	8.6E+09
		C	3.1E+11	2.7E+11	-0.06	0.5104	0.3086	6.6E+09	4.9E+09	4.9E+09	4.4E+09	6.2E+09
3	S1	A	2.0E+11	1.6E+11	-0.10	0.4418	0.2399	4.5E+09	5.6E+09	2.9E+09	4.1E+09	3.2E+09
		B	2.5E+11	1.7E+11	-0.17	0.4611	0.2366	4.9E+09	5.4E+09	4.0E+09	5.3E+09	4.6E+09
		C	2.1E+11	1.8E+11	-0.07	0.4561	0.2468	5.1E+09	5.3E+09	3.1E+09	4.9E+09	4.8E+09
	S0	A	1.8E+11	2.9E+05	-5.79	0.3066	0.0391	3.8E+04	4.4E+05	3.6E+04	4.7E+05	4.7E+05
		B	2.1E+11	1.0E+06	-5.31	0.3343	0.0362	1.4E+05	7.1E+05	9.4E+05	2.8E+06	1.5E+08
		C	1.7E+11	3.2E+06	-4.73	0.3510	0.0356	4.2E+05	8.5E+05	7.2E+05	9.4E+05	3.1E+06
	S8	A	3.2E+11	4.5E+10	-0.85	0.3631	0.0680	1.5E+09	1.9E+09	3.4E+09	3.2E+09	2.5E+09
		B	2.3E+11	4.7E+10	-0.69	0.3585	0.0565	1.5E+09	1.1E+09	1.6E+09	2.2E+09	1.9E+09
		C	3.0E+11	8.6E+10	-0.54	0.3777	0.0614	2.8E+09	1.9E+09	3.0E+09	4.2E+09	3.3E+09
	S9	A	2.3E+11	1.5E+11	-0.17	0.4625	0.2392	4.5E+09	4.5E+09	3.6E+09	3.8E+09	4.0E+09
		B	3.0E+11	1.7E+11	-0.25	0.4433	0.2862	4.8E+09	3.9E+09	3.8E+09	4.4E+09	4.5E+09
		C	1.9E+11	1.4E+11	-0.14	0.4472	0.3011	4.0E+09	5.0E+09	4.3E+09	4.8E+09	2.9E+09
4	S1	A	3.1E+11	2.3E+11	-0.14	0.4589	0.1150	5.7E+09	5.8E+09	4.5E+09	5.7E+09	4.9E+09
		B	3.9E+11	3.0E+11	-0.11	0.4655	0.1267	7.6E+09	6.0E+09	4.5E+09	6.6E+09	4.5E+09
		C	4.1E+11	3.1E+11	-0.12	0.5011	0.1272	7.8E+09	6.3E+09	4.7E+09	4.6E+09	6.1E+09
	S10	A	2.9E+11	3.2E+11	0.04	0.4617	0.1279	8.3E+09	6.6E+09	5.6E+09	5.9E+09	6.5E+09
		B	4.9E+11	3.1E+11	-0.20	0.4977	0.1363	7.6E+09	7.5E+09	6.9E+09	5.9E+09	6.2E+09
		C	4.2E+11	3.7E+11	-0.06	0.5117	0.1417	9.0E+09	7.8E+09	8.5E+09	6.6E+09	6.3E+09
	S11	A	2.8E+11	1.8E+11	-0.20	0.4289	0.1567	6.2E+09	3.9E+09	4.1E+09	5.5E+09	3.0E+09
		B	3.3E+11	1.8E+11	-0.27	0.4003	0.2199	6.2E+09	5.0E+09	4.0E+09	3.1E+09	2.6E+09
		C	3.6E+11	2.1E+11	-0.24	0.4287	0.2259	7.6E+09	8.1E+09	5.0E+09	6.3E+09	2.4E+09
	S12	A	3.8E+11	6.1E+11	0.20	0.5165	0.1639	1.6E+10	1.2E+10	1.1E+10	1.1E+10	9.0E+09
		B	4.4E+11	5.5E+11	0.10	0.4994	0.1719	1.5E+10	1.2E+10	1.1E+10	1.3E+10	9.7E+09
		C	3.9E+11	4.3E+11	0.04	0.4652	0.1596	1.1E+10	8.6E+09	1.1E+10	7.9E+09	5.2E+09
5	S1	A	4.5E+11	2.4E+11	-0.28	0.4816	0.1677	5.6E+09	4.5E+09	3.1E+09	5.5E+09	5.0E+09
		B	3.7E+11	3.1E+11	-0.09	0.5490	0.1824	7.3E+09	6.8E+09	7.0E+09	7.0E+09	7.6E+09
		C	4.0E+11	2.7E+11	-0.18	0.4739	0.1821	6.1E+09	5.9E+09	6.4E+09	5.5E+09	5.9E+09
	S13	A	3.7E+11	2.5E+11	-0.17	0.6726	0.2386	6.1E+09	5.6E+09	6.2E+09	6.0E+09	6.7E+09
		B	3.4E+11	2.5E+11	-0.14	0.4740	0.2422	6.1E+09	7.4E+09	5.0E+09	6.8E+09	5.9E+09
		C	4.2E+11	3.0E+11	-0.15	0.5405	0.2602	7.3E+09	6.3E+09	3.7E+09	7.5E+09	6.3E+09
	S14	A	3.1E+11	2.0E+11	-0.19	0.4778	0.1371	6.5E+09	4.9E+09	3.5E+09	5.3E+09	4.7E+09
		B	4.2E+11	2.6E+11	-0.20	0.4295	0.1184	8.4E+09	8.6E+09	6.2E+09	6.6E+09	5.0E+09
		C	4.2E+11	2.0E+11	-0.33	0.4864	0.1434	6.3E+09	8.4E+09	8.2E+09	9.0E+09	6.5E+09
	S15	A	4.2E+11	3.5E+11	-0.08	0.5324	0.1938	9.5E+09	8.5E+09	8.3E+09	1.1E+10	8.3E+09
		B	4.5E+11	3.4E+11	-0.12	0.4612	0.1854	9.5E+09	9.1E+09	8.3E+09	7.9E+09	7.6E+09
		C	4.5E+11	4.6E+11	0.01	0.5118	0.2164	1.2E+10	9.1E+09	8.9E+09	8.4E+09	7.3E+09
6	S1	A	2.9E+11	2.9E+11	0.00	0.7314	0.1529	7.1E+09	6.5E+09	7.3E+09	6.7E+09	6.7E+09
		B	3.5E+11	3.7E+11	0.02	0.8990	0.1590	9.0E+09	8.3E+09	8.9E+09	9.4E+09	8.2E+09
		C	3.5E+11	2.8E+11	-0.11	0.5714	0.1540	6.9E+09	5.3E+09	5.5E+09	6.8E+09	6.2E+09
	S16	A	3.5E+11	3.2E+11	-0.04	0.5313	0.1219	8.1E+09	8.9E+09	1.3E+10	1.2E+10	9.0E+09
		B	4.1E+11	4.9E+11	0.08	0.5198	0.1326	1.2E+10	1.1E+10	1.3E+10	1.7E+10	1.2E+10
		C	3.3E+11	4.9E+11	0.18	0.6745	0.1524	1.3E+10	1.1E+10	9.0E+09	1.3E+10	1.1E+10
	S17	A	3.0E+11	1.9E+11	-0.21	0.5994	0.0372	5.3E+09	6.5E+09	6.8E+09	5.5E+09	7.3E+09
		B	3.8E+11	2.9E+11	-0.12	0.9267	0.0439	8.2E+09	8.5E+09	9.8E+09	8.9E+09	1.1E+10
		C	3.0E+11	2.2E+11	-0.13	0.7010	0.0371	6.5E+09	7.0E+09	5.9E+09	5.8E+09	5.8E+09
	S18	A	2.5E+11	3.7E+11	0.17	0.5388	0.1469	9.6E+09	7.9E+09	1.2E+10	7.8E+09	6.3E+09
		B	3.2E+11	4.4E+11	0.14	0.5327	0.1771	1.1E+10	1.3E+10	8.7E+09	1.1E+10	1.1E+10
		C	2.5E+11	4.6E+11	0.26	0.5359	0.2048	1.2E+10	1.1E+10	9.4E+09	1.1E+10	9.4E+09
7	S1	A	3.5E+11	3.1E+11	-0.05	0.6498	0.1473	8.1E+09	8.0E+09	-	6.9E+09	5.9E+09
		B	3.5E+11	3.7E+11	0.03	0.4659	0.1387	9.7E+09	8.8E+09	-	7.3E+09	-
		C	3.5E+11	2.9E+11	-0.08	0.8656	0.1871	7.6E+09	9.9E+09	-	9.2E+09	7.9E+09
	S19	A	3.0E+11	2.5E+11	-0.08	0.6582	0.1401	6.8E+09	5.7E+09	-	4.3E+09	5.7E+09
		B	3.5E+11	2.6E+11	-0.13	0.5270	0.1194	7.0E+09	7.2E+09	-	5.8E+09	6.0E+09
		C	3.4E+11	2.2E+11	-0.19	0.4994	0.1280	6.0E+09	5.0E+09	-	4.6E+09	4.5E+09

Figura 10