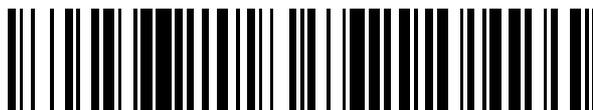


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 366**

51 Int. Cl.:

C12N 1/38	(2006.01)
A23K 10/20	(2006.01)
A23K 20/147	(2006.01)
A23K 50/40	(2006.01)
A23K 50/80	(2006.01)
A23J 1/04	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2014 PCT/FR2014/051118**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014 WO14184492**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2014 E 14729953 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 3008166**

54 Título: **Liofilizado de gusano marino y sus usos**

30 Prioridad:

16.05.2013 FR 1354399

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

04.05.2018

73 Titular/es:

**HEMARINA (100.0%)
Aeropole Centre
29600 Morlaix, FR**

72 Inventor/es:

ZAL, FRANCK

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 666 366 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

Liofilizado de gusano marino y sus usos

- 5 **[0001]** El objeto de la presente invención es un liofilizado o un polvo que comprende i) al menos una globina, un protómero de globina o una hemoglobina extracelular de Anélidos, y ii) al menos un material biológico de Anélidos diferente de dicha globina, de dicho protómero y de dicha hemoglobina.
- [0002]** El crecimiento de los microorganismos a escala industrial es una preocupación principal de las
10 tecnologías que explotan estos microorganismos. De hecho, con el fin de producir alimentos (yogures, cervezas, vinos), pero también medicamentos (penicilina...) o biocarburantes (etanol, biogás), se utilizan numerosos microorganismos de naturaleza y propiedades diferentes. El cultivo en biorreactor necesita una selección de la (de las) cepa(s) de microorganismo(s) pertinente(s), del sustrato, pero también de las condiciones de cultivo.
- 15 **[0003]** La hemina se utiliza a menudo como aditivo de cultivo en biorreactor. Este producto es una protoporfirina IX o un análogo químico o natural, que contiene hierro y está complejada con cloro. Proviene de mamíferos, en particular de bovinos o porcinos, o bien se sintetiza mediante procedimientos químicos y en particular se utiliza en biorreactor de fermentaciones industriales. Sin embargo, este producto es muy difícil de solubilizar y de
20 estabilizar, por lo que no se adapta a un cultivo en biorreactor. Además, este producto puede ser peligroso, en particular por la presencia de virus, de bacterias, de levaduras o de priones, potencialmente transmisibles o patógenos para el hombre y no está de ninguna manera adaptado a la producción de productos *kosher* y/o halal mediante microorganismos.
- [0004]** Existe por lo tanto una necesidad de un producto compatible con el cultivo en biorreactor, que no sea
25 derivado de mamífero y que esté exento de patógenos.
- [0005]** Duwat Patrick et al. "Respiration capacity of the fermenting Bacterium Lactococcus lactis and its positive effects on growth and survival", Journal of bacteriology, American society for Microbiology, US, Vol. 183, no. 15, 1 agosto de 2001 (2001-08-01), páginas 4509-4516; y
30
- [0006]** Brooijmans Rob et al. "Heme and menaquinone induced electron Transport in lactic acid bacteria", microbial cell factories, biomed central, GB, Vol. 8, no. 1, 29 mayo de 2009 (2009-05-29), página 28, se refieren al uso de hemina o de hemo para mejorar la viabilidad de las bacterias lácticas. El documento WO 2010/128159 A1 se refiere a una hemoglobina aislada de gusanos que pertenecen a la familia de los Nereididae y a su uso en un medio
35 de cultivo celular, en soluciones de conservación y como transportador artificial del oxígeno para la transfusión.
- [0007]** La parte solicitante ha descubierto de forma sorprendente que el uso de un liofilizado o de un polvo, obtenido a partir de anélidos enteros, o de coproductos de Anélidos (es decir, productos de gusanos restantes obtenidos tras la extracción de la hemoglobina de Anélidos), o incluso de hemoglobina de Anélidos liofilizada,
40 permite obtener un buen rendimiento de fermentación, en concreto láctica, al tiempo que aporta hierro. Esta molécula no precipita en el medio de cultivo del biorreactor, y permite por tanto mantener una buena homogeneidad.
- [0008]** Este liofilizado presenta además propiedades nutricionales interesantes, que lo hacen compatible con su integración en productos alimenticios, en concreto animales.
45
- [0009]** La parte solicitante ha descubierto que el uso de Anélidos enteros o de coproductos de Anélidos, triturados y liofilizados, permite obtener un buen rendimiento de fermentación, en concreto láctica, al tiempo que aportan hierro. Estos Anélidos enteros o estos coproductos de Anélidos, triturados y liofilizados, constituyen además una fuente de alimentación animal interesante.
50
- [0010]** La invención se refiere por tanto al uso de un liofilizado o un polvo que comprende i) al menos una globina, un protómero de globina o una hemoglobina extracelular de Anélidos y ii) al menos un material biológico de Anélidos diferente de dicha globina, de dicho protómero y de dicha hemoglobina.
- 55 **[0011]** Preferentemente, el liofilizado o el polvo se obtiene a partir de Anélidos enteros o de coproductos de Anélidos, previamente triturados. Dicho liofilizado está destinado a ser utilizado como perfeccionador de la fermentación láctica.
- [0012]** Como se ha indicado anteriormente, por «coproducto de Anélidos», se entiende la fracción de gusano

restante tras la extracción de la hemoglobina de dicho Anélido.

[0013] El liofilizado o el polvo divulgado en la presente invención comprende por tanto por un lado i) al menos una globina, un protómero de globina o una hemoglobina extracelular de Anélidos.

5

[0014] La hemoglobina extracelular de Anélidos está presente en las tres clases de Anélidos: los Poliquetos, los Oliquetos y los Aquetos. Se habla de hemoglobina extracelular porque de forma natural no está contenida en una célula y, por tanto, puede circular libremente en el sistema sanguíneo sin modificación química para estabilizarla o volverla funcional.

10

[0015] La hemoglobina extracelular de Anélidos es un biopolímero gigante con un peso molecular comprendido entre 2000 y 4000 kDa, constituido por 200 cadenas polipeptídicas comprendidas entre 4 y 12 tipos diferentes que se agrupan generalmente en dos categorías.

15 **[0016]** La primera categoría, que cuenta de 144 a 192 elementos, agrupa las cadenas polipeptídicas llamadas «funcionales» que presentan un sitio activo de tipo hemo y son capaces de enlazarse reversiblemente al oxígeno; son cadenas de tipo globina cuyas masas están comprendidas entre 15 y 18 kDa y son muy similares a las cadenas de tipo α y β de vertebrado.

20 **[0017]** La segunda categoría, que cuenta de 36 a 42 elementos, agrupa las cadenas polipeptídicas llamadas de «estructura» o «linkers» que poseen pocos o ningún sitio activo pero que permiten el ensamblaje de subunidades llamadas doceavas o protómeros.

[0018] Cada molécula de hemoglobina está constituida por dos hexágonos superpuestos que se han denominado bicapa hexagonal (hexagonal bilayer) y cada hexágono está formado a su vez por el ensamblaje de seis subunidades (o «doceavas» o «protómeros») en forma de gota de agua. La molécula nativa está formada por doce de esas subunidades (dodecámero o protómero). Cada subunidad tiene una masa molecular comprendida entre 200 y 250 kDa y constituye la unidad funcional de la molécula nativa.

30 **[0019]** Según la invención, el liofilizado puede comprender igualmente al menos un protómero de globina de la hemoglobina extracelular de Anélidos. Dicho protómero constituye la unidad funcional de la hemoglobina nativa, como se ha indicado anteriormente.

[0020] Por último, el liofilizado puede comprender igualmente al menos una cadena de globina de la hemoglobina extracelular de Anélidos. Dicha cadena de globina puede elegirse en concreto entre las cadenas de globina de tipo Ax y/o Bx de hemoglobina extracelular de Anélidos.

[0021] La hemoglobina extracelular de Anélidos, sus protómeros de globina y/o sus globinas pueden ser nativos o recombinantes.

40

[0022] Preferentemente, la globina, el protómero o la hemoglobina extracelular de Anélidos se elige entre las hemoglobinas extracelulares de Anélidos Poliquetos, preferentemente entre las hemoglobinas extracelulares de la familia de las *Arenicolidae* y las hemoglobinas extracelulares de la familia de las *Nereididae*. Aún más preferentemente, los Anélidos se eligen entre *Arenicola sp* y *Nereis sp*, y más preferentemente aún entre *Arenicola marina* o *Nereis virens*.

45

[0023] El liofilizado o el polvo divulgado en la presente memoria descriptiva comprende igualmente ii) al menos un material biológico de Anélidos diferente de dicha globina, de dicho protómero y de dicha hemoglobina.

50 **[0024]** Por «material biológico diferente de dicha globina, de dicho protómero y de dicha hemoglobina» se entiende cualquier material biológico (células, tejidos u órganos) que sea diferente de la hemoglobina extracelular, del protómero y de la globina. Este material biológico proviene asimismo de Anélidos, dichos Anélidos pudiendo ser idénticos o diferentes del Anélido del cual se extrae la hemoglobina, la globina o el protómero i). Preferentemente, dicho material biológico ii) es un coproducto de Anélidos.

55

[0025] La presente memoria descriptiva también tiene por objeto un procedimiento de preparación del liofilizado, obtenido a partir de gusanos Anélidos enteros o de coproductos de Anélidos. Este procedimiento comprende pues:

- i) la congelación de Anélidos enteros o de coproductos de Anélidos a una temperatura comprendida entre -20 °C y -100 °C durante un tiempo de al menos 24 h;
- ii) la sublimación del producto congelado obtenido en i) durante al menos 2 h, en vacío;
- iii) el secado final del producto sublimado obtenido en ii), hasta la obtención de un producto seco; y
- 5 iv) el triturado del producto seco obtenido en iii).

[0026] El ciclo de liofilización comprende tres etapas:

- la congelación (etapa i) del procedimiento según la invención):

10

Esta primera fase consiste en congelar la solución de forma que el agua contenida se transforme en hielo.

[0027] Preferiblemente, la congelación de la etapa i) del procedimiento según la invención se efectúa a una temperatura comprendida entre -20 °C y -90 °C durante al menos 24 h, preferiblemente al menos 48 h.

15 Preferiblemente, la congelación se efectúa aproximadamente a -80 °C durante al menos 24 h, preferiblemente al menos 48 h.

- la desecación primaria o sublimación (etapa ii) del procedimiento según la invención):

20 La etapa de sublimación permite el paso del hielo presente en la solución congelada del estado sólido al estado gaseoso, sin etapa intermedia. La solución congelada se deseca tras ponerla en vacío; el hielo se convierte entonces en vapor.

[0028] La sublimación se hace con ayuda de una bomba de vacío de empuje, de una bomba mecánica o de una criobomba.

25

[0029] Preferiblemente, la sublimación de la etapa ii) se realiza durante al menos 4 h.

- la desecación secundaria o secado final (etapa iii) del procedimiento divulgado aquí:

30

Cuando el hielo está totalmente sublimado, la fase de desecación secundaria puede empezar. Permite extraer por desorción las moléculas de agua atrapadas en la superficie de los productos secados.

Al final de la etapa iii), el liofilizado obtenido comprende entre un 1 y un 5 % en peso de agua. El triturado de la etapa iii) puede por ejemplo realizarse con la ayuda de un mortero, de un molino de hélice o de un molino de bolas para obtener un polvo fino.

35

[0030] El polvo divulgado en la presente memoria descriptiva puede obtenerse asimismo mediante cualquier medio que permita la obtención de un polvo seco.

40 El liofilizado o el polvo pueden almacenarse en botellas o en frascos de vidrio o de plástico, preferiblemente de vidrio. El liofilizado o el polvo pueden utilizarse como tales o en solución.

El liofilizado o el polvo según la invención son fáciles de transportar y de almacenar, por lo que puede reconstituirse fácilmente y está listo para ser usado.

45 **[0031]** La presente memoria descriptiva se refiere asimismo a una solución que comprende el liofilizado o el polvo aquí divulgado. Una tal solución puede obtenerse por simple mezcla del liofilizado o del polvo con un diluyente. El liofilizado o el polvo puede de hecho diluirse en el momento oportuno con el diluyente, para restituir el triturado inicial. Preferiblemente, el diluyente es agua ultrapura. Alternativamente, preferentemente, el diluyente es una solución acuosa que comprende cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, así como sodio gluconato y sodio acetato y tiene un pH comprendido entre 6,5 y 7,8, preferentemente igual a $7,1 \pm 0,5$, preferentemente aproximadamente 7,35. Dicha solución tiene preferentemente una osmolaridad comprendida entre 300 y 350, y preferentemente de 302 mOsmol/L.

50

Más preferentemente, el diluyente se elige entre el agua ultrapura y una solución acuosa que comprende 90 mM de NaCl, 23 mM de Na-gluconato, 2,5 mM de CaCl₂, 27 mM de Na-acetato, 1,5 mM de MgCl₂, 5 mM de KCl, y un pH de $7,1 \pm 0,5$, que puede contener entre 0 y 100 mM de antioxidante de tipo ácido ascórbico y/o glutatión reducido.

55

Es posible igualmente diluir el liofilizado o el polvo en una solución de sosa (NaOH), en concreto en una solución de sosa de 0,01 a 1 N. La disolución del polvo o del liofilizado según la invención en una solución de sosa permite, por un lado, aumentar la solubilidad del liofilizado o del polvo, pero también potencialmente despirogeneizarla (es decir, destruir las endotoxinas). El tiempo de disolución depende de la concentración de sosa utilizada. Generalmente va

de 24 horas para las concentraciones bajas en sosa, hasta 1 hora para las concentraciones altas.

[0032] El objeto de la invención es el uso de un liofilizado o de un polvo según la invención o de una solución que lo comprende, o incluso de una hemoglobina de Anélidos liofilizada o en polvo, para mejorar la bioproducción.

5 Por «bioproducción» se entiende la producción de un producto biológico a escala industrial, preferentemente en biorreactor. Por «producto biológico» se entiende en concreto una proteína (es decir secuencia de aminoácidos que comprende al menos 50 aminoácidos. Preferentemente, la proteína es un anticuerpo, una hemoglobina o una enzima), un péptido (es decir secuencia de aminoácidos que comprende de 2 a 49 aminoácidos), una secuencia nucleica o un plásmido. Efectivamente, el liofilizado o el polvo según la invención o la solución que lo comprende, así
10 como la hemoglobina, pueden utilizarse en los biorreactores para aumentar el rendimiento de bioproducción. Además, el liofilizado o el polvo según la invención, o la solución que lo comprende, así como la hemoglobina, pueden añadirse en los medios de cultivo de células, animales o vegetales, por ejemplo, CHO. Permiten en concreto mejorar el crecimiento de dichas células.

La invención tiene también por objeto el uso de un liofilizado o de un polvo según la invención, o de una solución
15 que lo comprende, o incluso de una hemoglobina de Anélidos liofilizada o en polvo, para mejorar el rendimiento de la fermentación láctica. La fermentación láctica se hace por bacterias lácticas, típicamente en un biorreactor. No necesita oxígeno (anaerobia) y consiste en la transformación de la glucosa en ácido láctico. Como se ha demostrado en el ejemplo, el liofilizado según la invención, una vez reconstituido, presenta una buena estabilidad y una buena funcionalidad; comprende en concreto hemoglobina extracelular. Asimismo, se divulga aquí el uso de un liofilizado o
20 de un polvo según la invención, o de una solución que lo comprende, o incluso de una hemoglobina de Anélidos liofilizada o en polvo, como alimento para animales, en concreto para los animales acuáticos y los animales de compañía. Este alimento puede presentarse en forma de cebo, de gránulos, de pasta o de croquetas o de polvo. Conviene particularmente como alimento completo o como aditivo de alimento para peces, o para invertebrados como moluscos, crustáceos, cefalópodos, corales o incluso para los animales de compañía. Los ejemplos siguientes
25 sirven para ilustrar la invención, sin tener sin embargo un carácter limitante.

Ejemplo 1: preparación y dosificación de liofilizados según la invención

Material y Métodos

30

Polvos de gusano

[0033] Los productos probados son polvos de *Arenicola marina* y de *Nereis virens*.

35 **[0034]** Estos polvos se han obtenido por liofilización y triturado.

[0035] Se han probado los siguientes medios:

- MEDIO 1: H2O milliQ

40 - MEDIO 2: Amortiguador de extracción (400 mM NaCl, 2,95 mM KCl, 32 mM MgSO₄ 7H₂O, 11 mM CaCl₂, 50 mM Tris base, 10 mM ácido ascórbico)

- MEDIO 3: 1N NaOH (utilizado para redispersar la Hemina, hemoglobina de origen bovino)

Método

45

[0036] 1 g de polvo se pesó en un tubo de centrifugación de 15 ml. 3 ml de solución se añadieron y se homogeneizaron, manualmente en un primer tiempo después con agitador vórtex. Se tomaron fotografías de esta mezcla. Esta mezcla se centrifugó a continuación a 5000 g durante 10 minutos. Después se tomó una foto del residuo y del sobrenadante. El sobrenadante se recogió y se congeló a -80 °C. Dados los bajos volúmenes
50 recogidos, se repitió el experimento, pero en 3 g de polvo y 9 ml de solución en tubos de centrifugación de 50 ml. Se congelaron partes alícuotas a -80 °C.

[0037] Para las pruebas analíticas, se generó material fresco en mayor cantidad. Se pesaron 3 g de polvo de gusano y después se resuspendieron en 15 ml de la solución de redispersión. Seguidamente se centrifugó el
55 material y el sobrenadante se recogió y se filtró en 0,8 mm y 0,22 mm. La funcionalidad, la pureza y una dosificación se realizaron en las muestras.

Resultados

1. Liofilización

[0038] Con 5 kg de *Arenicola*, se generaron 670 g de polvo es decir un factor de 7,5.

5 [0039] Con 6 kg de *Nereis*, se generaron 921 g de polvo es decir un factor de 6,5.

2. Resultados analíticos

a) Dosificación

10

[0040] Las concentraciones de hemoglobina están comprendidas entre 3 y 8 g/kg de gusanos frescos.

	Arenicola			Nereis		
	Agua	Amortiguador Tris	Amortiguador extracción	Agua	Amortiguador Tris	Amortiguador extracción
[M101] en g/l con una dilución 1/5	8	8	11	4	7	9
[M101] en g/kg de polvo de gusano	38	40	56	22	36	47
[M101] en g/kg de gusano fresco	5	5	8	3	6	7

b) Conductividad

15

[0041] La conductividad de la materia seca se elevó (~130mS/cm).

Ejemplo 2: Pruebas con los liofilizados según la invención

20 Material y Métodos

Polvos de gusano

[0042]

25

HEMARINA A: derivada de *Arenicola marina*

HEMARINA B: derivada de *Nereis virens*

[0043] Los polvos se obtuvieron como en el ejemplo 1.

30

Reparación de las muestras

[0044]

35 i) Cultivo en *flasks*: puesta en solución de los polvos a 200 g/l y después filtración del sobrenadante y adición en los *flasks* (es decir, frascos).

ii) Cultivo en biorreactores: adición directa en los reactores a razón de 1 g/l de polvo antes de autoclave.

Condiciones de cultivo

40

i) Cultivo en *flasks* (100 ml, 0,5 y 1l):

[0045] La cepa utilizada es una cepa de *Lactococcus lactis* SB50.

45 [0046] Las pruebas se realizaron durante la noche (16-18 h) a 30 °C y 180 rpm de agitación.

[0047] La composición del medio de cultivo de la cepa es la siguiente: Glucosa (1 %), Maltosa (0,1 %), Extracto de levadura (2 %) y minerales.

[0048] Las condiciones de cultivo son las siguientes: llenado al 10 % del volumen útil; se utiliza un testigo positivo con adición de hemina (hemoglobina de origen bovino) a 10 ppm final.

[0049] Las muestras HEMARINA (polvos en solución) se añadieron después de la esterilización tras la centrifugación.

10 i) Cultivo en biorreactores (1 l vol. útil):

[0050] Los ensayos se realizaron durante la noche (15-16 h) a 30 °C. La composición del medio de cultivo de la cepa es idéntica al de los frascos, con una adición de antiespumante al 0,01 %. Las condiciones de cultivo son las siguientes: llenado al 60 % del volumen útil, pO₂ regulado al 20 % u 80 % y pH regulado a 6. Se añade directamente 1g/l de polvo en el medio de cultivo antes de la autoclave.

[0051] Se midió la densidad óptica (DO) a 600 nm de cada cultivo.

Resultados

20

i) Cultivo en flasks:

[0052] Las DO son las siguientes

Referencia	DO a 600 nm
Testigo (<i>Lc lactis</i> solo)	1,52
Testigo positivo (<i>Lc lactis</i> +hemina 10 ppm)	4,5

25

[0053] La concentración activa de cada producto (HEMARINA A y HEMARINA B) es equivalente a la de la hemina, es decir, es de 0,25 ppm aproximadamente.

ii) Cultivo en biorreactores:

30

[0054] Los resultados son los siguientes:

	Testigo	Testigo positivo	HEMARINA A
DO a 600 nm	10,63	10,9	12,07
Peso seco (g/l)	2,8	3,4	4,1
Volumen NH ₄ OH (ml)	18,2	12,3	15,8
Viabilidad (UFC/ml)	1,75E+09	5,03E+09	6,42E+09

[0055] La viabilidad de la cepa mejoró de 3 a 4 veces en presencia de los productos HEMARINA A o HEMARINA B.

[0056] La producción de ácido láctico (correspondiente al volumen de NH₄OH producido) es inferior al testigo pero superior al testigo positivo (hemina).

40 **[0057]** El poder acidificante de los productos HEMARINA A y HEMARINA B es equivalente al del testigo positivo.

[0058] En conclusión, se observa que los productos HEMARINA A y HEMARINA B permiten mejorar la viabilidad de cepas lácticas y tienen muy buen poder acidificante.

45

[0059] Estos productos podrían sustituir a las heminas bovinas y porcinas, que se utilizan extensamente en los ámbitos agroalimentarios pero que presentan riesgos potenciales de contaminación vírica o de tipo prion para el hombre, y que no están adaptadas a la producción de productos *kosher* y/o Halal.

REIVINDICACIONES

1. 5 Uso de un liofilizado o de un polvo que comprende i) al menos una globina, un protómero de globina o una hemoglobina extracelular de Anélidos, y ii) al menos un material biológico de Anélidos diferente de dicha globina, de dicho protómero y de dicha hemoglobina, o de una solución que comprende dicho liofilizado o dicho polvo, o incluso de una hemoglobina de Anélidos liofilizada o en polvo, para mejorar el rendimiento de la fermentación láctica por bacterias lácticas.
2. 10 Uso de un liofilizado o un polvo que comprende i) al menos una globina, un protómero de globina o una hemoglobina extracelular de Anélidos y ii) al menos un material biológico de Anélidos diferente de dicha globina, de dicho protómero y de dicha hemoglobina, o de una solución que comprende dicho liofilizado o dicho polvo, o incluso de una hemoglobina de Anélidos liofilizada o en polvo, para mejorar el rendimiento de bioproducción de proteínas en biorreactor.
- 15 3. Uso según la reivindicación 1 o 2, en el que el Anélido se elige entre los Anélidos Poliquetos, preferentemente entre la familia de los *Arenicolidae* y de los *Nereididae*, más preferentemente entre *Arenicola marina* y *Nereis virens*.
4. 20 Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el liofilizado se obtiene por un procedimiento que comprende:
- i) la congelación de Anélidos enteros o de coproductos de Anélidos a una temperatura comprendida entre -20 °C y -100 °C durante un tiempo de al menos 24 h;
- ii) la sublimación del producto congelado obtenido en i) durante al menos 2 h, en vacío;
- 25 iii) el secado final del producto sublimado obtenido en ii), hasta la obtención de un producto seco; y
- iv) el triturado del producto seco obtenido en iii).
5. 30 Uso según la reivindicación 4, en el que la congelación de la etapa i) se realiza a una temperatura comprendida entre -20 °C y -90 °C durante al menos 24h.
6. h. Uso según la reivindicación 4 o 5, en el que la sublimación de la etapa ii) se realiza durante al menos 4 h.