

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 508**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/40** (2006.01)

**C12N 11/00** (2006.01)

**B01J 2/08** (2006.01)

**C12M 1/00** (2006.01)

**C12N 11/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.05.2013 PCT/KR2013/004166**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13172601**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2013 E 13790475 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 2851420**

54 Título: **Aparato para preparar perlas de enzimas inmovilizadas y método para preparar perlas de enzimas inmovilizadas usándolo**

30 Prioridad:

**17.05.2012 KR 20120052385**

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

**28.07.2017**

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)  
500 Namdaemunno 5-ga Jung-gu  
Seoul 100-749, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, SOON CHUL;  
KIM, SEONG BO;  
LIM, JAE YOUN;  
AN, KWANG JIN y  
KIM, JIN HA**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 627 508 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

Aparato para preparar perlas de enzimas inmovilizadas y método para preparar perlas de enzimas inmovilizadas usándolo

5

### Campo técnico

La presente invención se refiere a un aparato para preparar perlas de enzimas inmovilizadas usadas para preparación de tagatosa, y un método para preparar perlas de enzimas inmovilizadas usándolo.

10

Más en concreto, la presente invención se refiere a un aparato para preparar perlas de enzimas inmovilizadas, que incluye una boquilla que tiene un diámetro interior de 0,1 mm a 1 mm y un extremo cilíndrico inferior e incluyendo una salida de líquido del tipo de corte (cortada perpendicularmente a un eje vertical de la boquilla) formada en su extremo inferior, y un método para preparar perlas de enzimas inmovilizadas usándolo.

15

### Antecedentes de la invención

La tagatosa, un isómero de galactosa, es un edulcorante bajo en calorías que se produce de forma natural. Aunque la tagatosa exhibe un dulzor similar al azúcar, es decir, aproximadamente 92% del dulzor del azúcar, la tagatosa se considera un sucedáneo del azúcar dado que la tagatosa sólo tiene aproximadamente 38% de las calorías del azúcar y aproximadamente 4% del índice glicémico (IG) del azúcar.

20

Además, la tagatosa ha sido aprobada como generalmente reconocida como segura (GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y por ello está permitido su uso como un edulcorante para alimentos, bebidas, alimentos saludables, aditivos de dietas y análogos, y es conocido que casi no tiene efectos colaterales cuando es ingerida por humanos y por ello se piensa que será ampliamente utilizada.

25

Los métodos para producir tagatosa incluyen un método químico en el que se usa un catalizador químico para isomerizar galactosa, y un método biológico en el que la galactosa es isomerizada usando una isomerasa. Aunque el método químico tiene ventajas en términos de eficiencia económica y rendimiento, existen los problemas de que el método químico requiere procesos químicos a temperatura alta y presión alta, tiene procesos complicados, y produce residuo industrial. Por lo tanto, hay una creciente necesidad de un método biológico.

30

En la técnica relacionada relativa a una técnica para la producción en serie de tagatosa usando una isomerasa, la Patente coreana número 10-0872694 describe un método para la producción en serie de tagatosa usando una arabinosa isomerasa, y la Patente coreana número 10-0464061 describe un método en el que una isomerasa es inmovilizada sobre un vehículo apropiado, seguido de la introducción de galactosa, produciendo por ello isomerización a tagatosa. US 4639423 A describe un aparato para la producción de perlas de enzimas inmovilizadas goteando una solución conteniendo las enzimas a una solución de cloruro cálcico. Sin embargo, dado que el método biológico es más sensible a condiciones de reacción que el método químico, el método biológico origina una gran diferencia en eficiencia de proceso, rendimiento final, y análogos cuando se ajustan las condiciones de reacción. Además, al usar una isomerasa inmovilizada sobre un vehículo, las propiedades del vehículo preparado y el grado de inmovilización varían según los aparatos usados en la inmovilización y los métodos de inmovilización, haciendo por ello difícil determinar la eficiencia del proceso, el rendimiento de la producción y análogos, e impidiendo un uso activo del método biológico.

35

40

45

Por lo tanto, se necesita un aparato para preparar perlas de enzimas inmovilizadas optimizado para la producción estable en serie de tagatosa a través de un método biológico, y un método para inmovilizar efectivamente una isomerasa o células microbianas capaces de producir la isomerasa sobre un vehículo.

50

### Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar un aparato para preparar perlas de enzimas inmovilizadas usadas en la preparación de tagatosa, y un método para preparar perlas de enzimas inmovilizadas usándolo.

55

Más en concreto, la presente invención tiene la finalidad de proporcionar un aparato para preparar perlas de enzimas inmovilizadas, que incluye una boquilla que tiene un diámetro interior de 0,1 mm a 1 mm y un extremo cilíndrico inferior e incluyendo una salida de líquido del tipo de corte (cortada perpendicularmente a un eje vertical de la boquilla) formada en el extremo inferior.

60

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para preparar perlas de enzimas inmovilizadas optimizado para la isomerización mediante el ajuste apropiado de su forma y tamaño.

65

### Solución técnica

La presente invención se refiere a un aparato para preparar perlas sobre las que se inmoviliza una enzima y/o

células microbianas capaces de producir la enzima, y un método para preparar perlas de enzimas inmovilizadas usándolo.

5 Según un aspecto de la presente invención, un aparato para preparar perlas de enzimas inmovilizadas incluye: a) un primer depósito al que se inyecta un líquido mezclado conteniendo un material conteniendo enzimas y un excipiente; b) una unidad de boquilla dispuesta en un extremo inferior del primer depósito, e incluyendo una boquilla que tiene un diámetro interior de 0,1 mm a 1 mm y un extremo cilíndrico inferior e incluye una salida de líquido cortada perpendicularmente a un eje vertical de la boquilla en su extremo inferior; y c) un segundo depósito dispuesto debajo de la unidad de boquilla y conteniendo una solución de cloruro cálcico.

10 La distancia entre una superficie de la solución de cloruro cálcico en el segundo depósito y la salida de líquido de la unidad de boquilla puede ser del rango de 0,1 m a 1,5 m.

15 La unidad de boquilla puede incluir al menos dos boquillas.

El primer depósito puede incluir una entrada de líquido mezclado y/o aire.

20 Según otro aspecto de la presente invención, se facilita un método para preparar perlas de enzimas inmovilizadas usando el aparato para preparar perlas de enzimas inmovilizadas según la presente invención.

El líquido mezclado inyectado al primer depósito puede ajustarse a una viscosidad de 3.000 cPs a 7.000 cPs, y puede aplicarse una presión de 0,1 kg/cm<sup>2</sup> a 3 kg/cm<sup>2</sup> a la entrada de aire del primer depósito.

25 Las perlas de enzimas inmovilizadas preparadas por el método pueden tener una forma esférica que tiene un diámetro de 0,5 mm a 3 mm.

### Efectos ventajosos

30 Según la presente invención, dado que el aparato para preparar perlas de enzimas inmovilizadas incluye una boquilla que tiene un diámetro interior de 0,1 mm a 1 mm y un extremo cilíndrico inferior e incluye una salida de líquido del tipo de corte (cortada perpendicularmente a un eje vertical de la boquilla) formada en el extremo inferior, pueden prepararse perlas de enzimas inmovilizadas que tienen una forma esférica uniforme y lisa y poros uniformes.

### Descripción de los dibujos

35 La figura 1 es una vista esquemática en sección longitudinal de un extremo inferior de una boquilla de un aparato para preparar perlas de enzimas inmovilizadas según una realización de la presente invención.

40 La figura 2 es un diagrama esquemático de un aparato para preparar perlas de enzimas inmovilizadas según una realización de la presente invención.

La figura 3 es un diagrama esquemático que representa un proceso y aparato para preparar perlas de enzimas inmovilizadas.

45 La figura 4 es una vista esquemática en sección longitudinal de un extremo inferior de una aguja de inyección de un aparato típico para preparar perlas de enzimas inmovilizadas.

### Mejor modo

50 A continuación se describirán en detalle realizaciones de la presente invención con referencia a los dibujos acompañantes. La descripción de detalles evidentes a los expertos en la técnica se omitirá para mayor claridad.

La presente invención se refiere a un aparato para preparar perlas de enzimas inmovilizadas usadas en preparación de tagatosa y un método para preparar perlas de enzimas inmovilizadas usándolo.

55 Más en concreto, la presente invención se refiere a un aparato para preparar perlas de enzimas inmovilizadas, que incluye una boquilla que tiene un diámetro interior de 0,1 mm a 1 mm y un extremo cilíndrico inferior e incluyendo una salida de líquido del tipo de corte (cortada perpendicularmente a un eje vertical de la boquilla) formada en el extremo inferior, y un método para preparar perlas de enzimas inmovilizadas usándolo.

60 Según una realización de la presente invención, un aparato para preparar perlas de enzimas inmovilizadas incluye: a) un primer depósito al que se inyecta un líquido mezclado conteniendo un material conteniendo enzimas y un excipiente; b) una unidad de boquilla dispuesta en un extremo inferior del primer depósito e incluyendo una boquilla, que tiene un diámetro interior de 0,1 mm a 1 mm y un extremo cilíndrico inferior e incluye una salida de líquido cortada perpendicularmente a un eje vertical de la boquilla en el extremo inferior; y c) un segundo depósito dispuesto debajo de la unidad de boquilla y conteniendo una solución de cloruro cálcico.

65

El primer depósito puede incluir un depósito que puede recibir el líquido mezclado conteniendo el material conteniendo enzimas y el excipiente, y una entrada a través de la que el líquido mezclado y/o aire pueden ser inyectados al depósito.

5 El líquido mezclado inyectado al primer depósito contiene el material conteniendo enzimas y el excipiente.

El material conteniendo enzimas se refiere a una isomerasa en sí, o un material conteniendo células microbianas o células microbianas muertas capaces de producir la isomerasa, y la isomerasa se refiere a una isomerización enzimática de galactosa a tagatosa y puede ser una arabinosa isomerasa.

10 En una realización, las células microbianas capaces de producir la arabinosa isomerasa pueden incluir cepas recombinantes del género *Corynebacterium*.

15 Las cepas recombinantes del género *Corynebacterium* pueden ser recombinantes incluyendo un gen que codifica la arabinosa isomerasa derivada de *Thermotoga neapolitan* que es un hipertermófilo.

Para detalles relacionados con las cepas recombinantes del género *Corynebacterium* consúltese la Patente coreana número 10-0872694.

20 En algunas realizaciones, el excipiente es preferiblemente un alginato, más preferiblemente una solución de alginato en la que un alginato está disuelto en una solución de dióxido de silicio.

Según la realización de la invención, la unidad de boquilla está dispuesta en el extremo inferior del primer depósito.

25 La unidad de boquilla puede incluir al menos una boquilla.

En alguna realización, la boquilla de la unidad de boquilla tiene un extremo cilíndrico inferior que tiene un diámetro interior de 0,1 mm a 1 mm, preferiblemente de 0,2 mm a 0,5 mm, más preferiblemente de 0,3 mm a 0,4 mm, y puede incluir la salida de líquido del tipo de corte formada en el extremo inferior.

30 La salida de líquido quiere decir una salida a través de la que se descarga el líquido mezclado inyectado al primer depósito, y la salida de líquido del tipo de corte quiere decir que la salida de líquido se forma cortando el extremo inferior de la boquilla en la dirección perpendicular al eje vertical de la boquilla (véase la figura 1 que es una vista en sección longitudinal del extremo inferior de la boquilla).

35 Un aparato típico para preparar perlas inmovilizadas incluye una aguja de inyección (véase la figura 4) y se usa para preparar perlas tipo pellet, originando por ello un problema de deterioro de eficiencia de isomerización. Más específicamente, cuando la isomerización se lleva a cabo usando las perlas tipo pellet, una matriz líquido tiene un factor de carga móvil no uniforme debido a poros no uniformes cuando se añade, haciendo por ello deterioro de la eficiencia de isomerización.

40 En contraposición, cuando se usa la boquilla según la presente invención, que incluye la salida de líquido del tipo de corte en su extremo inferior y tiene un diámetro interior de 0,1 mm a 1 mm, se preparan perlas esféricas uniformes y lisas y así proporcionan poros uniformes, por lo que la matriz líquido también puede tener un factor de carga móvil uniforme, evitando por ello el uso desproporcionado de una enzima debido a la diferencia de los poros en una torre de llenado (una instalación usada en la isomerización llenando la instalación con las perlas de enzimas inmovilizadas, seguido de inyección de la matriz líquido).

45 Según la presente invención, el segundo depósito incluye un depósito que puede recibir la solución de cloruro cálcico, y una entrada a la que el líquido mezclado descargado de la unidad de boquilla cae y es inyectado.

50 En algunas realizaciones, la distancia entre una superficie de la solución de cloruro cálcico en el segundo depósito y la salida de líquido de la unidad de boquilla es preferiblemente del rango de 0,1 m a 1,5 m, más preferiblemente de 0,5 m a 0,8 m.

55 Dentro de este rango, dado que la distancia de caída del líquido mezclado del primer depósito desde la unidad de boquilla puede ajustarse apropiadamente, el líquido mezclado se puede formar en perlas esféricas mientras cae y puede evitarse que adquiera la forma de perlas elípticas debido a la colisión con la superficie de la solución de cloruro cálcico en caso de que el líquido mezclado caiga de una posición excesivamente alta.

60 El aparato para preparar perlas de enzimas inmovilizadas según la realización de la invención se describirá con más detalle con referencia a la figura 2.

65 En la figura 2, el aparato para preparar perlas de enzimas inmovilizadas según la realización de la presente invención incluye el primer depósito (a), el segundo depósito (b), y la unidad de boquilla (c).

El primer depósito (a) incluye una entrada de líquido mezclado y/o aire dispuesta en su extremo superior. El primer depósito (a) puede incluir una o más entradas, que pueden ser usadas juntas o por separado.

5 La unidad de boquilla (c) está dispuesta en el extremo inferior del primer depósito (a) y puede incluir al menos una boquilla montada en ella.

10 Dado que la boquilla está provista en su extremo superior (d) de una entrada de líquido mezclado, el líquido mezclado es inyectado (1) a la boquilla a través de la entrada de líquido mezclado mientras se inyecta aire (2) al primer depósito (a). Dado que la boquilla tiene el extremo cilíndrico inferior (e) e incluye la salida de líquido del tipo de corte formada en su extremo inferior, las perlas inmovilizadas descargadas a través de la salida de líquido pueden formarse en forma esférica lisa y uniforme mientras caen (4).

15 Las perlas inmovilizadas descargadas de la salida de líquido del extremo inferior de la boquilla caen (5) sobre la solución de cloruro cálcico contenido en el segundo depósito (b), y la distancia entre el extremo inferior (e) de la boquilla y la superficie de la solución de cloruro cálcico en el segundo depósito (b) puede ser del rango de 0,5 m a 0,8 m.

20 Según una realización de la invención, se facilita un método para preparar perlas de enzimas inmovilizadas usando el aparato para preparar perlas de enzimas inmovilizadas según la presente invención.

25 En la preparación de perlas de enzimas inmovilizadas, el líquido mezclado que se inyecta al primer depósito puede prepararse de la siguiente manera: las células microbianas capaces de producir arabinosa isomerasa son matadas, seguido de centrifugación de un fluido de cultivo de las células microbianas para recuperar las células microbianas muertas. A continuación, se disuelve alginato a una concentración de 1,5% a 2,5% en una solución de dióxido de silicio a 0,4% a 1,0% por agitación a  $90\pm 5^\circ\text{C}$  durante 3 horas o más de tal manera que el alginato pueda disolverse por completo. Después de confirmar la disolución completa del alginato, la solución de alginato se enfría a  $35\pm 5^\circ\text{C}$  pasando agua refrigerante a través de una camisa. Este proceso se lleva a cabo con el fin de aumentar la viscosidad del alginato, evitando al mismo tiempo el daño de una enzima al mezclar células microbianas/enzima.

30 A continuación, se mezclan las células microbianas separadas con la solución de alginato usando un agitador a 30 rpm a 60 rpm. Debido a la alta viscosidad de la solución de alginato, cuando la velocidad rotacional es excesivamente alta a la agitación, tiene lugar un fenómeno por el que se generan burbujas dentro del líquido mezclado y no flotan en el lado superior del líquido, y fluye aire a las perlas durante la preparación de las perlas debido a las burbujas, haciendo que las perlas floten en el lado superior del líquido. Así, la velocidad de agitación se ajusta ventajosamente a 30 rpm a 60 rpm.

35 En la preparación de las perlas de enzimas inmovilizadas, el líquido mezclado inyectado al primer depósito puede tener una viscosidad de 3.000 cPs a 7.000 cPs. Dentro de este rango, pueden prepararse perlas esféricas uniformes y lisas.

40 En algunas realizaciones, en la preparación de las perlas de enzimas inmovilizadas, cuando el líquido mezclado es descargado a través de la boquilla, se le aplica una presión de  $0,1\text{ kg/cm}^2$  a  $3\text{ kg/cm}^2$ , preferiblemente de  $0,5\text{ kg/cm}^2$  a  $2\text{ kg/cm}^2$ , más preferiblemente de  $0,7\text{ kg/cm}^2$  a  $1,7\text{ kg/cm}^2$  a través de la entrada de aire del primer depósito.

45 Dentro de este rango, el líquido mezclado del material conteniendo enzimas y el excipiente pueden pasarse en una cantidad apropiada a través de la boquilla y así formarse en forma de perlas, y se puede aplicar una fuerza apropiada al líquido mezclado mientras el líquido mezclado pasa a través de la boquilla, por lo que se puede formar perlas sustancialmente esféricas. Dado que la forma de las perlas es más próxima a una esfera, se obtienen las ventajas de que pueden obtenerse perlas sobre las que la enzima está efectivamente inmovilizada, y de que la posterior isomerización puede realizarse eficientemente debido a una mayor área superficial de las perlas.

50 Según la presente invención, en la preparación de las perlas de enzimas inmovilizadas, después de que el líquido mezclado del material conteniendo enzimas y el excipiente caen sobre la solución de cloruro cálcico, puede realizarse inyección de aire adicional a la solución de cloruro cálcico de tal manera que las perlas inmovilizadas puedan conservar una forma esférica.

55 Dado que existe el riesgo de que el líquido mezclado caído sobre la solución de cloruro cálcico sea aplastado a una forma de placa debido a la gravedad y de que las perlas aplanadas en forma de placa tengan baja usabilidad en isomerización debido a su área superficial reducida, puede inyectarse aire a la solución de cloruro cálcico para mantener la forma esférica de las perlas.

60 Un método para preparar tagatosa usando el aparato para preparar perlas de enzimas inmovilizadas según la presente invención se describirá brevemente a continuación.

65 1) Se inoculan microorganismos de arranque como semilla.

- 2) Las células microbianas obtenidas a través del cultivo de semilla se someten a fermentación primaria.
- 5 3) Después de finalizar la fermentación primaria, se realiza fermentación secundaria.
- 4) Después de la terminación de la fermentación secundaria, se realiza fermentación terciaria.
- 5) Después de la terminación de la fermentación terciaria, se realiza fermentación cuaternaria.
- 10 6) Después de la terminación de la fermentación cuaternaria, se introduce un surfactante, seguido de calentamiento para inducir la muerte de las células microbianas.
- 7) Las células microbianas son aisladas mediante centrifugación.
- 15 8) Las células microbianas recuperadas se mezclan con un alginato y dióxido de silicio.
- 9) El líquido mezclado se introduce a un aparato de inmovilización para formar perlas.
- 20 10) Las perlas son estabilizadas por impregnación en una solución de galactosa.
- 11) Las perlas son transferidas a un reactor de lecho fluidizado para llenar de perlas la columna del reactor.
- 12) Se transfiere una solución de galactosa al reactor de lecho fluidizado para realizar conversión a tagatosa.
- 25 En la preparación de tagatosa usando el aparato para preparar perlas de enzimas inmovilizadas según la presente invención, puede prepararse tagatosa a alta concentración t/o alta pureza. Ventajosamente, puede prepararse tagatosa que tiene una pureza de 99% o más en términos de contenido sólido.

30 A continuación, la presente invención se explicará con más detalle con referencia a algunos ejemplos. Sin embargo, se deberá entender que estos ejemplos se ofrecen como ilustración solamente y no han de ser interpretados de ninguna forma como limitación de la presente invención.

### Ejemplo 1

35 Preparación de perlas de enzimas inmovilizadas

(1) Preparación de líquido mezclado de material conteniendo enzimas y excipiente

40 Se mataron células microbianas capaces de producir una arabinosa isomerasa, seguido de centrifugación de un medio de cultivo de las células microbianas para recuperar las células microbianas muertas. A continuación, se disolvió alginato a una concentración de 2% en una solución de dióxido de silicio a 0,7% por agitación a 90°C durante 3 horas o más de tal manera el alginato pudiese disolverse por completo en la solución. Después de confirmar la completa disolución del alginato, la solución de alginato se enfrió a 35°C pasando agua refrigerante a través de una camisa.

45 A continuación, la solución de alginato y las células microbianas separadas se mezclaron usando un agitador a 50 rpm.

(2) Descarga de líquido mezclado

50 Se confirmó que el líquido mezclado tenía una viscosidad de 5.000 cPs, seguido de inyección a un primer depósito. A continuación, el líquido mezcla de alginato/células microbianas se pasó a través de una boquilla que tenía un diámetro interior de 0,3 mm y una forma de corte en su extremo distal suministrando aire a una presión de 1,2 kg/cm<sup>2</sup>, por lo que el líquido mezclado caía en forma esférica con un diámetro de 1,7 mm sobre una solución de cloruro cálcico a 1% contenido en un segundo depósito.

(3) Formación de perlas inmovilizadas

60 Las perlas descargadas de la boquilla caían sobre la solución de cloruro cálcico separada de una salida de líquido de la boquilla una distancia de 0,6 m mientras se suministraba aire sobre la solución de cloruro cálcico (burbujas de aire), y luego se transfirieron a un depósito de enfriamiento, seguido de curado a 2°C durante 24 horas.

Un proceso y aparato para preparar las perlas de enzimas inmovilizadas se muestran en la figura 3.

65

**[Lista de números de referencia]**

[Aparato]

a: Primer depósito

5 b: Segundo depósito

c: Unidad de boquilla

10 d: Extremo superior de boquilla

e: Extremo inferior de boquilla

[Proceso]

15 1: Inyectar líquido mezclado

2: Inyectar aire

20 3: Inyectar líquido mezclado a la entrada de líquido mezclado del extremo superior de la boquilla

4: Descargar y dejar caer las perlas inmovilizadas por la salida de líquido del extremo inferior de la boquilla

5: Dejar caer las perlas inmovilizadas sobre la solución de cloruro cálcico en un segundo depósito.

**REIVINDICACIONES**

1. Un aparato para preparar perlas de enzimas inmovilizadas, incluyendo:
- 5 a) un primer depósito al que se inyecta un líquido mezclado conteniendo un material conteniendo enzimas y un excipiente;
- 10 b) una unidad de boquilla dispuesta en un extremo inferior del primer depósito e incluyendo una boquilla, teniendo la boquilla un diámetro interior de 0,1 mm a 1 mm y un extremo cilíndrico inferior e incluyendo una salida de líquido cortada perpendicularmente a un eje vertical de la boquilla en su extremo inferior; y
- c) un segundo depósito dispuesto debajo de la unidad de boquilla y conteniendo una solución de cloruro cálcico, estando provisto dicho segundo depósito de un medio para inyectar aire a la solución de cloruro cálcico.
- 15 2. El aparato según la reivindicación 1, donde el segundo depósito está dispuesto debajo de la unidad de boquilla de tal manera que la distancia entre la superficie de la solución de cloruro cálcico y la salida de líquido de la unidad de boquilla sea del rango de 0,1 m a 1,5 m.
- 20 3. El aparato según la reivindicación 1, donde la unidad de boquilla incluye al menos dos boquillas.
4. El aparato según la reivindicación 1, donde el primer depósito incluye una entrada de líquido mezclado o aire.
5. Un método para preparar perlas de enzimas inmovilizadas usando el aparato para preparar perlas de enzimas inmovilizadas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, método que incluye un paso de inyectar aire sobre la solución de cloruro cálcico.
- 25 6. El método según la reivindicación 5, donde el líquido mezclado inyectado al primer depósito se ajusta a una viscosidad de 3.000 cPs a 7.000 cPs, y se aplica una presión de 0,1 kg/cm<sup>2</sup> a 3 kg/cm<sup>2</sup> a la entrada de aire del primer depósito.
- 30 7. El método según la reivindicación 5, donde las perlas de enzimas inmovilizadas tienen una forma esférica que tiene un diámetro de 0,5 mm a 3 mm.

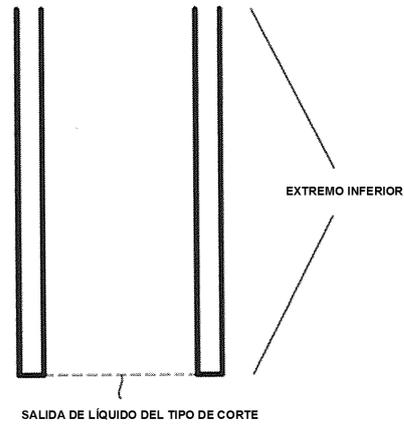


FIG.1

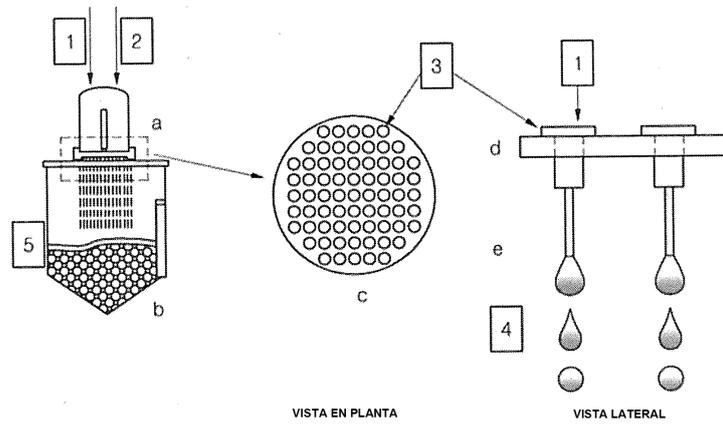


FIG.2

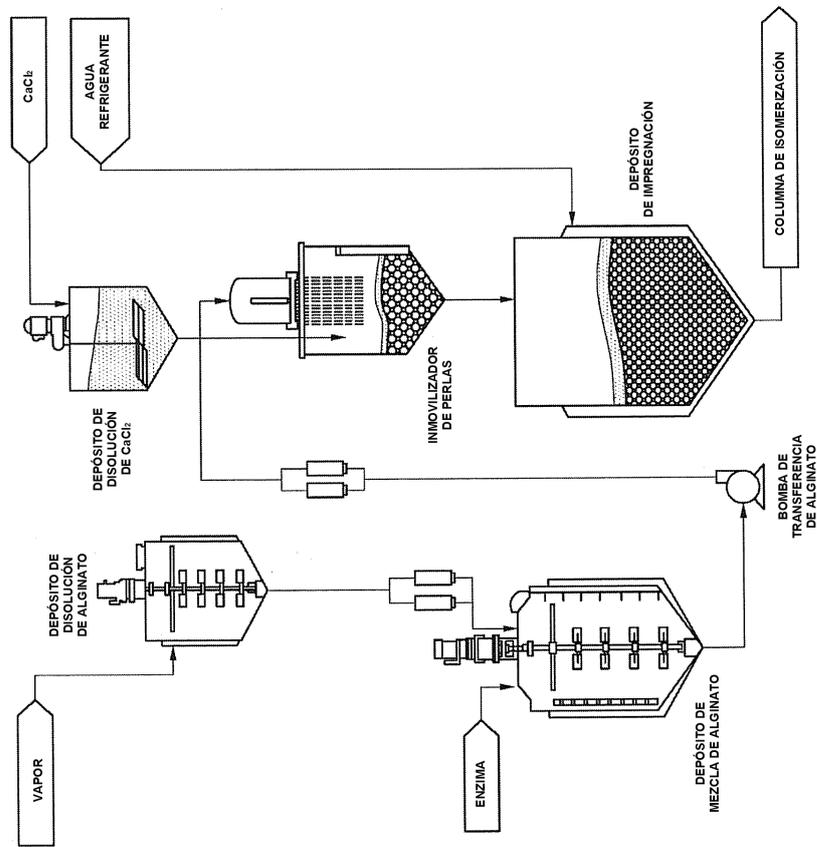
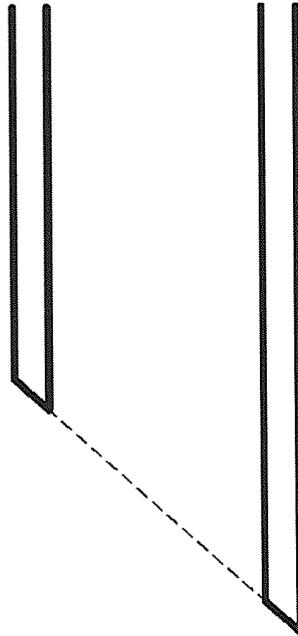


FIG.3



**FIG.4**