

Имобилизация на β -галактозидаза върху модифицирана полипропиленова мембрана

Настя Василева, Владислав Йотов, Цонка Годжевъргова, Нана Котиа

Immobilization of β -galactosidase onto modified polypropylene membrane: Polypropylene membranes were modified with several modifying agents: $K_2Cr_2O_7$; H_2O ; H_2SO_4 ; hydrazine dihydrochloride; hydroxylamine; 1,6-hexamethylenediamine; 1,2-diaminoethane; N,N' -dibenzylethylenediamine-diacetat; 1,2-phenylenediamine and 1,4-phenylenediamine. The characteristics of modified membranes (quantity amino group, quantity carbonyl group and degree of hydrophilicity) were studied. The membranes were used as matrix for covalent immobilization of β -galactosidase. The amount of bound protein, absolute activity and specific activity of the immobilized enzyme were determined. The higher specific activity (1,746 U/mg) showed immobilized β -galactosidase onto membrane modified with 10% 1,6-hexamethylenediamine.

Key words: β -Galactosidase; Immobilization; Modification, Polypropylene membrane

ВЪВЕДЕНИЕ

β -галактозидазата (ЕК 3.2.1.23) е важен индустриален ензим, който катализира хидролизата на лактозата в млякото и суроватката до глюкоза и галактоза [4, 15, 17, 18, 22, 24, 32, 33, 35]. По този начин се предотвратяват редица здравни и екологични проблеми, предизвикани от съдържанието на лактоза в тези продукти. Лактозата е основният въглехидрат, който се съдържа в млякото. Значителна част от хората имат генетичен дефицит на β -галактозидаза и трудно усвояват лактозата в млякото [25]. Това е наложило производството на безлактозно мляко с помоща на ензима β -Гал.

Съдържанието на лактоза в суроватката е около 4-5%. Известно е, че заради все по-големите количества на преработваното мляко в млечната промишленост ежегодно в света се получават милиони килограми отпадъчна суроватка и това поражда все по-големи екологични проблеми [14, 27]. Хидролизирането на лактозата от отпадъчната суроватка с помоща на β -галактозидаза води до получаване на ценни глюкозо-галактозни сиропи използвани в хранителната промишленост. Тези важни индустриални приложения на ензима β -галактозидаза са наложили изучаването на имобилизацията на този ензим.

За имобилизация на ензима β -Гал се използват различни носители и методи [1, 2, 4, 9, 22, 24, 30]. Един от най-перспективните методи за имобилизация е ковалентното свързване на ензима към носителя [4, 7, 12, 18, 22, 23, 32, 33, 36, 37]. Много подходящи носители за имобилизация се явяват полимерните мембрани [8, 10, 11, 20, 21], заради техните предимства: строго определена структура; фиксирана порьозност; възможност за допълнителна модификация; точно определен химичен състав; физична, химична и биологична устойчивост.

Мембраните, получени на основата на полипропилен са подходящи носители за имобилизация на ензими [13, 26, 29]. В полипропиленовите мембрани обаче отсъстват реакционноспособни групи за ковалентно свързване на ензима, поради което възниква необходимостта от предварителното им активиране чрез модифициране с различни химични реагенти [5, 6, 16, 28, 29, 31, 34].

В настоящата работа е проведена модификация на полипропиленова мембрана с различни химични реагенти с цел въвеждане на аминогрупи на повърхността на носителя. Извършена е ковалентна имобилизация на ензима β -Гал, с помощта на глутаров алдехид върху модифицираните мембрани. Определени са основните характеристики на модифицираните мембрани и на мембраните с имобилизиран ензим – количество amino групи, количество карбоксилни групи, степен на хидрофилност, количество свързан белтък, специфична активност. Целта на настоящата работа е да се установи коя от модифицираните полипропиленови мембрани е най-подходящ носител за имобилизация на ензима β -Гал.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали и реагенти

Като носител за провеждане на имобилизацията на β -Гал са използвани мембрани от полипропилен (ПП) с диаметър на порите 0,2 μm (Sterlitech, WA 98032).

Повърхностната модификация на мембраните се провежда със следните реагенти: $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, H_2SO_4 (ч.з.а., Merck, Германия), 1,2-диаминоетан (1,2-ДАЕ), 1,6-диаминохексан (1,6-ДАХ), хидразин дихидрохлорид (ХДХ), хидроксиламин (ХА), 1,2-фенилендиамин (1,2-ФДА), 1,4-фенилендиамин (1,4-ФДА), N,N'-дибензилетилендиамин-диацетат (N,N'-ДБЕДАДА) (ч.з.а. Fluka, Швейцария).

Имобилизацията на β -Гал (ЕК 3.2.1.23, 151 U/mg, изолирана от *Escherichia coli* (Fluka, Швейцария) се извършва с глутаров алдехид (ГА) (Fluka, Швейцария) върху полипропиленовите мембрани.

2. Химични модификации на полипропиленовите мембрани

Мембраните се потапят за 5 min в 100 cm^3 ацетон и след това се поставят за 10 min при температура 30 $^\circ\text{C}$ в 100 cm^3 разтвор на $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$: H_2O : H_2SO_4 , приготвен в съотношение 1 : 19 : 29,4. След това мембраните престояват в дестилирана вода. Целта на тази обработка е въвеждане на карбоксилни групи върху повърхността на мембраните. За последващо въвеждане на аминок групи върху повърхността на мембраните, последните се обработват с различни химични реагенти:

- 15% и 25% разтвори на ХДХ, за 180 min, при стайна температура;
- мембраните набъбват в 5% разтвор на диметилформамид, за 30 min, при стайна температура и след това се потапят в 10% и 15% разтвори на ХА, за 120 min, при температура 40 $^\circ\text{C}$;
- 10% и 15% разтвори на 1,6-ДАХ, за 60 min, при стайна температура;
- 5%, 10% и 15% разтвори на 1,2-ДАЕ, за 60 min, при температура 40 $^\circ\text{C}$;
- 10% разтвор на N,N'-ДБЕДАДА, за 60 min, при температура 40 $^\circ\text{C}$;
- 5% разтвор на 1,2-ФДА, за 60 min, при температура 40 $^\circ\text{C}$;
- 5% разтвор на 1,4-ФДА, за 60 min, при температура 40 $^\circ\text{C}$.

Модифицираните мембрани се промиват обилно с дестилирана вода.

3. Имобилизация на β -Гал

В чашка се поставя активирана ПП мембрана (20 cm^2) в 10% разтвор на ГА (pH 6,9) за 60 min при температура 4 $^\circ\text{C}$. Мембраната се промива обилно с дестилирана вода, до пълното отстраняване на нереагиращия ГА, с 1M разтвор на NaCl и с 0,1 M натриево-цитратен буфер pH 6,9. След това мембраната се поставя в 20 cm^3 0,1% разтвор на β -Гал (приготвен в натриево-цитратен буфер с pH 6,9), в който престоява 16 h при температура 4 $^\circ\text{C}$. Мембраната с имобилизирания ензим се отмива с дестилирана вода, 1M разтвор на NaCl и 0,1 M натриево-цитратен буфер pH 6,9.

4. Анализи

Количеството на карбоксилните и аминок групите на модифицираните мембрани се определя чрез потенциометрично титруване [39]. Степента на хидрофилност на немодифицираните и модифицираните мембрани се изчислява като тегловна разлика между мократа и суха мембрана [3].

Количеството на свързан белтък върху модифицираните ПП мембрани се определя по метода на Lowry et al. [19].

Абсолютната активност на свободната и имобилизирана β -Гал се определя по метода на Kuby S. A. Et al. [17].

Специфичната активност на имобилизираната β -Гал се определя като отношение между абсолютната активност и количеството свързан белтък върху мембраната.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Като носител за провеждане на имобилизацията на ензима β -Гал са използвани ПП мембрани. Характерно за тези матрици е, че те са хидрофобни и не съдържат

реакционноспособни групи, към които ковалентно да бъде присъединен ензима. Ето защо възниква необходимостта от предварително модифициране на мембраните.

От литературата е известно, че особено подходящи за провеждане на ковалентна имобилизация са матрици, които съдържат amino групи [38]. За да се получат такива групи на повърхността на ПП мембрани, последните са обработени както следва:

- модификация с $K_2Cr_2O_7 : H_2O : H_2SO_4$, с цел въвеждане на карбоксилни групи на повърхността на мембраните. В резултат на тази обработка се повишава и хидрофилността на ПП мембрана с около 35% (Таблица 1, Мб 0 и Мб 0');

- последваща обработка на мембраните с разтвори на ХДХ, ХА, 1,6-ДАХ, 1,2-ДАЕ, N,N'-ДБЕДАДА, 1,2-ФДА, 1,4-ФДА с различни концентрации. Чрез тези модификации се цели получените карбоксилни групи да се превърнат в amino групи.

Определени са количеството amino групи, количеството карбоксилни групи и степента на хидрофилност на немодифицираната и модифицираните полипропиленови мембрани, като стойностите им са представени в Таблица 1. Вижда се, че проведените модификации осигуряват образуването на достатъчно свободни amino групи за ковалентна имобилизация на ензима, като полимерът запазва първоначалната си механична здравина и структурна цялост. Освен това се забелязва, че с увеличаване на концентрацията на модифициращия агент количеството на amino групите се увеличава, а на карбоксилните намалява (Мб от 1 до 9). Най-добри резултати по отношение на количество amino групи се получават при модификация на мембраните с 1,2-ДАЕ. Най-високо количество amino групи и съответно най-малко количество карбоксилни групи са установени при модификация на мембраната с 15% разтвор на 1,2-ДАЕ (Мб 9). Непосредствено след нея се нарежда модификацията с 10% разтвор на 1,2-ДАЕ (Мб 8). По-малкото количество на amino групи е отчетено при модификация на мембраните с 15% ХДХ и 10% ХА (Мб1 и Мб3).

Таблица 1

Характеристики на полипропиленовите мембрани

Мембрана №	Модифициращ агент	Количество amino групи, mgеqv/g	Количество карбоксилни групи, mgеqv/g	Степен на хидрофилност, %
0	изходна	-	-	41,98
0'	$K_2Cr_2O_7 : H_2O : H_2SO_4$	-	0,346	76,66
1	15% ХДХ	0,331	0,140	76,07
2	25% ХДХ	0,616	0,0715	71,06
3	10% ХА	0,387	0,103	74,75
4	15% ХА	0,545	0,0387	76,41
5	10% 1,6-ДАХ	0,405	0,0677	75,91
6	15% 1,6-ДАХ	0,613	0,0369	70,43
7	5% 1,2-ДАЕ	0,471	0,243	73,40
8	10% 1,2-ДАЕ	0,828	0,0362	69,40
9	15% 1,2-ДАЕ	0,940	0,0352	69,40
10	10% N,N'-ДБЕДАДА	0,472	0,142	65,87
11	5% 1,2-ФДА	0,550	0,0721	69,23
12	5% 1,4-ФДА	0,471	0,108	64,61

Изследвана е и степента на хидрофилност на немодифицираната и модифицираните ПП мембрани (Таблица 1). Вследствие на въвеждането на карбоксилни групи степента на хидрофилност на мембраната нараства – за изходната мембрана тя е 41,98%, а за модифицираната с $K_2Cr_2O_7 : H_2O : H_2SO_4$ – 76,66%. При последващата обработка на мембраните съдържащи карбоксилни

групи, се наблюдава слабо намаляване на степента на хидрофилност с увеличаване на концентрацията на модифициращия агент. Това е ясно изразено при модификацията с: ХДХ (М61 – 76,07% и М62 – 71,06%); 1,6-ДАХ (М65 – 75,91% и М66 – 70,43%); 1,2-ДАЕ (М67 – 73,40%, М68 – 69,40% и М69 – 69,40%). Този резултат е напълно логичен, тъй като е известно, че карбоксилната група е по-хидрофилна в сравнение с amino групата. Следователно наличието на по-голямо количество карбоксилни групи върху М61, М65 и М67 обуславя по-добра хидрофилност на мембраната. Изключение от това правило се наблюдава само при мембраните модифицирани с ХА (М63 – 74,75% и М64 – 76,41%). Интерес представлява и модификацията с ароматни диамини. Тук се наблюдава чувствително намаляване на степента на хидрофилност на мембраните (М610 – 65,87%, М611 – 69,23% и М612 – 64,61%), тъй като ароматните амини са по-хидрофобни съединения от алифатните амини и свързването им с карбоксилните групи на повърхността на мембраната води до по-голямо намаляване на степента на хидрофилност на тези носители.

Проведена е ковалентна имобилизация на ензима β -Гал върху всички видове модифицирани мембрани, с помощта на съшиващ агент - глутаров алдехид. Алдехидните групи на съшиващия агент се свързват с amino групите на модифицираните мембрани и съответно с amino групите на ензима. Определени са количеството свързан белтък върху мембранните матрици, абсолютната и специфичната активност на имобилизираната върху тях β -Гал. Резултатите са представени в Таблица 2. От таблицата се вижда, че най-голямо количество свързан белтък е измерено при мембрана модифицирана с $K_2Cr_2O_7 : H_2O : H_2SO_4$ (0,0420 mg/cm²). Предполага се, че на повърхността на тази мембрана, в резултат на отсъствие на amino групи, се е осъществило свързване на ензима със носителя чрез физична адсорбция. Връзката на ензима с носителя при тази имобилизация е слаба, ензимът лесно се десорбира и с това може да се обясни и по-ниската специфична активност (0,579 U/mg), в сравнение с всички останали, представени в Таблица 2. Освен това е известно, че локалното натрупване на белтък върху мембраната, затруднява дифузията на субстрата до активния център на ензима и това води до намаляване на ензимната активност.

Таблица 2
Характеристики на имобилизираната β -Гал върху модифицираните полипропиленови мембрани

Мембрана №	Модифициращ агент	Количество свързан белтък, mg/cm ²	Абсолютна активност, U	Специфична активност, U/mg
0 ^a	$K_2Cr_2O_7 : H_2O : H_2SO_4$	0,0420	0,0243	0,579
1	15% ХДХ	0,0216	0,0266	1,231
2	25% ХДХ	0,0244	0,0334	1,371
3	10% ХА	0,0230	0,0280	1,217
4	15% ХА	0,0240	0,0361	1,504
5	10% 1,6-ДАХ	0,0232	0,0405	1,746
6	15% 1,6-ДАХ	0,0281	0,0243	0,865
7	5% 1,2-ДАЕ	0,0235	0,0190	0,808
8	10% 1,2-ДАЕ	0,0275	0,0380	1,382
9	15% 1,2-ДАЕ	0,0300	0,0251	0,836
10	10% N,N'-ДБЕДАДА	0,0237	0,0228	0,962
11	5% 1,2-ФДА	0,0255	0,0384	1,505
12	5% 1,4-ФДА	0,0239	0,0232	0,970

При имобилизацията на β -Гал върху всички останали модифицирани мембрани е установена корелация между количество свързан белтък и количеството аминокислотни групи (Таблицы 1 и 2). Най-голямо количество свързан белтък е отчетено при М69 ($0,0300 \text{ mg/cm}^2$) върху която и количеството на аминокислотните групи е най-високо ($0,940 \text{ mgqv/g}$). Голямото количество на свързан белтък обаче води до чувствително намаляване на специфичната активност на имобилизирания ензим. Ето защо при тази модифицирана мембрана е отчетена най-малка стойност на специфичната активност на имобилизирания ензим ($0,836 \text{ U/mg}$).

Резултатите за активност на имобилизираната β -Гал, отразени в Таблица 2, показват, че повечето от модифициращите агенти осигуряват много висока специфична активност на ензима (от $1,217 \text{ U/mg}$ до $1,746 \text{ U/mg}$). Най-висока специфична активност на имобилизирания ензим е отчетена при мембрана, модифицирана с 10% 1,6-ДАХ (М65). При тази мембрана количеството на свързания белтък не е голямо (няма локално натрупване на белтък), поради което дифузията на субстрата до активния център на ензима не е затруднена. Освен това при използването на 1,6-ДАХ като модифициращ агент, поради по-дългата му верига, се осигурява по-голямо отдалечаване на ензима от повърхността на носителя. Активният център на ензима остава открит и това улеснява дифузията на субстрата към него. Много добър резултат по отношение на специфична активност показва и имобилизираната β -Гал върху М611, М64, М68 и М62 ($1,505 \text{ U/mg}$, $1,504 \text{ U/mg}$, $1,382 \text{ U/mg}$, $1,371 \text{ U/mg}$). Следователно, можем да направим извода, че последващата обработка на окислените ПП мембрани с втори реагент води до значително подобряване на специфичната активност (повече от три пъти). Вторият модифициращ агент действа като спейсер и не ограничава придвижването на субстрата до активния център на ензимната молекула. По този начин и влиянието на повърхностния заряд на мембраната върху активността на имобилизираната β -Гал значително намалява.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изследвано е влиянието на различни модифициращи агенти върху характеристиките на ПП мембрани и върху някои от свойствата на β -Гал, имобилизирана върху тях:

1. Установено е, че модифициращите агенти подобряват степента на хидрофилност, като най-висока хидрофилност е получена при М60*, М64 и М61.
2. Установена е корелация между количество аминокислотни групи и количество свързан белтък върху мембраните, като най-голямо количество свързан белтък е отчетено при М69, при която количеството на аминокислотните групи е най-голямо;
3. Определена е около три пъти по-висока специфична активност при мембрани обработени с втори модифициращ агент, който действа като спейсер между ензима и мембраната (М65, М611, М64, М68 и М62), в сравнение с мембрана модифицирана само с $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 : \text{H}_2\text{O} : \text{H}_2\text{SO}_4$ (М60*).
4. Най-добри стойности, по отношение на абсолютна и специфична активност са получени при имобилизирана β -Гал върху модифицирана с 10% 1,6-ДАХ ПП мембрана (съответно $0,0405 \text{ U}$ и $1,746 \text{ U/mg}$).

ЛИТЕРАТУРА

- [1]. Betancor L., H. R. Luckarift, J. H. Seo, O. Brand, J. C. Spain - Three-dimensional immobilization of beta-galactosidase on a silicon surface, *Biotechnology and Bioengineering*, 99, 2, 2008, 261-267.
- [2]. Budriene S., N. Gorochovceva, T. Romaskevicius, L. V. Yugova, A. Miezeliene, G. Dienys, A. Zubriene - β -Galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization, *Central European Journal of Chemistry*, 3, 1, 2005, 95-105.

- [3]. Chantora V., R. Huang - Separation of liquid mixtures by using polymer membranes, *J. Appl. Polymer Sci.*, 26, 1981, 3223-3243.
- [4]. Chen W., H. Chen, Y. Xia, J. Yang, J. Zhao, F. Tian, H. P. Zhang, H. Zhang – Immobilization of recombinant thermostable β -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* from lactose hydrolysis in milk, *J. Dairy Sci.*, 92, 2, 2009, 491-498.
- [5]. Dai Q-wen, Z-kang Xu, H-tao Deng, Z-mei Liu, J. Wu, P. Seta – Surface modification of microporous polypropylene membranes by graft polymerization of N,N-dimethylaminoethyl methacrylate, *Chinese Journal of Polymer Science*, 22, 4, 2004, 369-377.
- [6]. Diano N., V. Grano, S. Rossi, U. Bencivenga, M. Portaccio, U. Amato, F. Carfora, M. Lepore, F. S. Gaeta, D. G. Mita – Hollow-fiber enzyme reactor operating under non isothermal conditions, *Biotechnol. Prog.*, 20, 2004, 457-466.
- [7]. Eldin M. S. M., A. A. El-Zatahry, M. B. Al-Sabah, M. R. Elaassar – Immobilization of β -galactosidase onto copolymers nano particles of poly (acrylonitrile-co-methylmethacrylate): characterization and application to whey hydrolysis, *Nanotech Conference & Expo 2010*, June 21-25, 2010, Anaheim, CA.
- [8]. Eldin M. S. M., A. De Maio, S. Di Martino, N. Diano, V. Grano, N. Pagliuca, S. Rossi, U. Bencivenga, F. S. Gaeta, D. G. Mita – Isothermal and non-isothermal lactose hydrolysis by means of β -galactosidase immobilized on a single double-grafted Teflon membrane, *Journal of Membrane Science*, 168, 1-2, 2000, 143-158.
- [9]. Ellis J. LC, D. L. Tomasko, F. Dehghani – Novel dense CO₂ technique for β -galactosidase immobilization in polystyrene microchannels, *Biomacromolecules*, 9, 3, 2008, 1027-1034.
- [10]. El-Masry M. M., A. De Maio, S. Di Martino, V. Grano, S. Rossi, N. Pagliuca, Z. H. Abd El-Latifa, A. B. Moustafa, A. D'Uva, F. S. Gaeta, D. G. Mita – Influence of non-isothermal conditions of the activity of enzymes immobilized on nylon-grafted membranes, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 2-3, 2000, 113-126.
- [11]. El-Masry M. M., A. De Maio, S. Di Martino, U. Bencivenga, S. Rossi, B. A. Manzo, N. Pagliuca, P. Canciglia, M. Portaccio, F. S. Gaeta, D. G. Mita – Modulation of immobilized enzyme activity by altering the hydrophobicity of nylon-grafted membranes: Part 2. Non-isothermal conditions, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9, 4-6, 2000, 231-244.
- [12]. Elnashar M. M., M. A. Yassin – Lactose hydrolysis by beta-galactosidase covalently immobilized to thermally stable biopolymers. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 159, 2, 2009, 426-437.
- [13]. Georgieva S., T. Godjevargova, M. Portaccio, M. Lepore, D. G. Mita – Advantages in using non-isothermal bioreactors in bioremediation of water polluted by phenol by means of immobilized laccase from *Rhus vernicifera*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 55, 3-4, 2008, 177-184.
- [14]. Ghaly A. E., M. A. Kamal – Submerged yeast fermentation of acidcheese whey for protein production and pollution potential reduction, *Water Research*, 38, 2004, 631-644.
- [15]. Hronska H., M. Rosenberg, Z. Grosova – Milk lactose hydrolysis by beta-galactosidase immobilized in polyvinylalcohol hydrogel, *New Biotechnology*, 25, 2009, S118.
- [16]. Kou R. Q., Z. K. Xu, H. T. Deng, Z. M. Liu, P. Seta, Y. Xú – Surface modification of microporous polypropylene membranes by plasma-induced graft polymerization of α -allyl glucoside, *Langmuir*, 19, 17, 2003, 6869-6875.
- [17]. Kuby S. A., H. S. Lardy, *Journal of the American Chemical Society*, 75, 1953, 890-896.
- [18]. Li X., Q. Z. K. Zhou, X. D. Chen – Pilot-scale lactose hydrolysis using β – galactosidase immobilized on cotton fabric, *Chemical Engineering and Processing*, 46, 2007, 497-500.

- [19] Lowry L., N. Rosenbough, H. Farr, J. Chem. 193, 1951, 265.
- [20]. Maio A. De, M. M. El-Masry, M. Portaccio, N. Diano, S. Di Martino, A. Mattei, U. Bencivenga, D. G. Mita – Influence of the spacer length on the activity of enzymes immobilised on nylon/polyGMA membranes: Part 1. Isothermal conditions, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 21, 4-6, 2003, 239-252.
- [21]. Maio A. De, M. M. El-Masry, P. De Luca, V. Grano, S. Rossi, N. Pagliuca, F. S. Gaeta, M. Portaccio, D. G. Mita – Influence of the spacer length on the activity of enzymes immobilised on nylon/polyGMA membranes: Part 2. Non-isothermal conditions, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 21, 4-6, 2003, 253-265.
- [22]. Mariotti M. P., H. Yamanaka, A. R. Araujo, H. C. Trevisan - Hydrolysis of whey lactose by immobilized β -Galactosidase, Brazilian Archives of Biology and Technology, 51, 6, 2008, 1233-1240.
- [23]. Neri D. F. M., V. M. Balcão, M. G. Carneiro-da-Cunha, L. B. Carvalho Jr., J. A. Teixeira - Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic (mPOS-PVA) composite for lactose hydrolysis, Catalysis Communications, 9, 14, 2008, 2334-2339.
- [24]. Ovsejevi K., V. Grazu, F. Batista-Viera – Beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* immobilized on to thiosulfinate/thiolsulfonate supports for lactose hydrolysis in milk and dairy by-products, Biotechnology Techniques, 12, 2, 1998, 143-148.
- [25]. Panesar P. S., R. Panesar, R. S. Singh, J. F. Kennedy, H. Kumar – Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase, J. Chem. Technol. Biotechnol., 81, 2006, 530-543.
- [26]. Piletsky S., E. Piletska, A. Bossi, N. Turner, A. Turner – Surface Functionalization of porous polypropylene membranes with polyaniline for protein immobilization, Biotechnology and Bioengineering, 82, 1, 2003, 86-92.
- [27]. Revillion J. P. D., A. Brandelli, M. A. Z. Ayub – Production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marxianus*, Brazilian Archives of Biology and Technology, 46, 2003, 121-127.
- [28]. Sainbayar A., J. S. Kim, W. J. Jung, Y. S. Lee, C. H. Lee – Application of surface modified polypropylene membranes to an anaerobic membrane bioreactor, Environmental Technology, 22, 9, 2001, 1035-1042.
- [29]. Schroen C. G. P. H., M. C. Wijers, M. A. Cohen Stuart, A. van der Padt, K. van't Riet – Membrane modification to avoid wettability changes due to protein adsorption in an emulsion/membrane bioreactor, J. Membrane Sci., 80, 1993, 265-274.
- [30]. Serio M. Di, C. Maturro, E. De Alteriis, P. Parascandola, R. Tesser, E. Santacesaria – Lactose hydrolysis by immobilized β -galactosidase: the effect of the supports and the kinetics, Catalysis Today, 79-80, 2003, 333-339.
- [31]. Suzhen Z., c. Cheng, L. Yan, M. Yuedong – A comparative study of hydrophilic modification of polypropylene membranes by remote and direct Ar plasma, Plasma science and technology, 11, 5, 2009, 576-581.
- [32]. Szczodrak J. - Hydrolysis of Lactose in Whey Permeate by Immobilized β - galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 10, 2000, 631-637.
- [33]. Szczodrak J. - Hydrolysis of lactose in whey permeate by Immobilized β - galactosidase from *Penicillium notatum*, Acta Biotechnologica, 19, 3, 2004, 235-250.
- [34]. Wang H., Y. Yin, S. Yang, C. Li – Surface modification of polypropylene microporous membrane by grafting acrylic acid using physisorbed initiators method, J. Appl. Polymer Sci., 112, 2009, 3728-3735.
- [35]. Wierzbicki L. E., V. H. Edwards, F. V. Kosikowski – Hydrolysis of lactose in acid whey using β -galactosidase immobilized on porous glass particles: Preparation and characterization of a reusable catalyst for the production of low-lactose dairy products, Biotechnology and Bioengineering, 16, 3, 2004, 397-411.

[36]. Wondolowski M. V., J. H. Woychik – Characterization and immobilization of *E. coli* (ATCC-26) β -galactosidase, *Biotechnology and Bioengineering*, 16, 12, 2004, 1633-1644.

[37]. Zhou Q. Z. K., X. D. Chen – Immobilization of β -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde, *J. Food Engineering*, 48, 1, 2001, 69-74.

[38]. Годжевъргова Ц. – Ензимология, Печатна база Университет „проф. д-р А. Златаров“, Бургас, 2007.

[39]. Димов К., В. Сърмаджиева, П. Павлов - Лабораторен практикум по технология на синтетичните влакна. Техника, София, 1973.

За контакти:

1. доц. д-р инж. Настя Василева Иванова, Филиал – Разград, Русенски университет „Ангел Кънчев“, тел. 084/611012, e-mail: nastiav2001@yahoo.com.

2. ас. Владислав Иванов Йотов, Филиал – Разград, Русенски университет „Ангел Кънчев“, тел. 084/611012, e-mail: vlado.yotov@abv.bg.

3. проф. д-р Цонка Иванова Годжевъргова, Бургаски университет «проф. д-р Асен Златаров», тел. 056/858353, e-mail: godjevargova@yahoo.com.

4. Нана Гивиевна Котия - Phd, Erasmus Mundus ECW for Georgia, Armenia & Azerbaijan. тел. 0887725681, e-mail: nanakotia@yahoo.com.

Докладът е рецензиран.