



Ultrases İşleminin Enzim Aktivasyonu Üzerine Etkileri

Seval Dağbağlı  

Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Manisa

Geliş Tarihi (Received): 12.06.2024, Kabul Tarihi (Accepted): 22.07.2024

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): seval.dagbagli@cbu.edu.tr (S. Dağbağlı)

📞 0 236 201 2264 📠 0 236 201 2020

ÖZ

Ultrases (ultrason) işlemi, özellikle gıda, biyoteknoloji ve biyofarmasötik endüstrileri olmak üzere çeşitli alanlarda kullanılan yeşil ve etkili bir termal olmayan işlem tekniği olarak son yıllarda dikkat çekmektedir. Ultrason işleminin bu endüstrilerde önemli uygulamalara sahip enzimatik reaksiyonlarda etkilerinin belirlenmesi önemlidir. Yoğun ultrason koşulları enzim inaktivasyonuna neden olurken ılımlı ultrason koşullarında (yani düşük yoğunluk ve kısa süre) enzim aktivitesinin artırılabilirdiği bildirilmektedir. Ultrason işlemi serbest enzime, substratta ve immobilize enzime uygulanabilir. Ultrasonikasyon işleminin enzim ve substrat yapısı ile enzimatik hidroliz kinetiği ve termodinamik parametreleri üzerine etkileri bulunmaktadır. Bu işlem, moleküllerin yapısını olumlu şekilde değiştirebilir ve böylece enzim aktivitesi ile ürün verimi artırılabilir. Bu derlemede ultrason işleminin serbest enzim, immobilize enzim ve substrata uygulanması sonucu meydana gelen moleküller yapıdaki ve enzim aktivasyonundaki değişiklikler, bu değişikliklerin mekanizmaları ve bu mekanizmaları etkileyen faktörler ile ilgili bilgiler verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ultrason, Enzim aktivasyonu, Serbest enzim, Immobilize enzim

Effect of Ultrasonication on Enzyme Activation

ABSTRACT

Ultrasound has attracted attention in recent years as a green and effective non-thermal processing technique used in various fields, especially in the food, biotechnology and biopharmaceutical industries. It is important to determine the effects of ultrasonication on enzymatic reactions that have important applications in these industries. While intense ultrasonication conditions cause enzyme inactivation, it has been reported that enzyme activity can be increased under mid-ultrasound conditions (i.e. low intensity and short duration). Ultrasound treatment can be applied to free enzyme, substrate and immobilized enzyme. Ultrasonication may have a positive effect on the structure of molecules, increasing enzyme activity and product yield. In this review, information is given about the changes in molecular structure and enzyme activation that occur as a result of the application of ultrasound treatment to free enzyme, immobilized enzyme and substrate, the mechanisms of these changes and the factors that affect these mechanisms.

Keywords: Ultrasound, Enzyme activation, Free enzyme, Immobilized enzyme

GİRİŞ

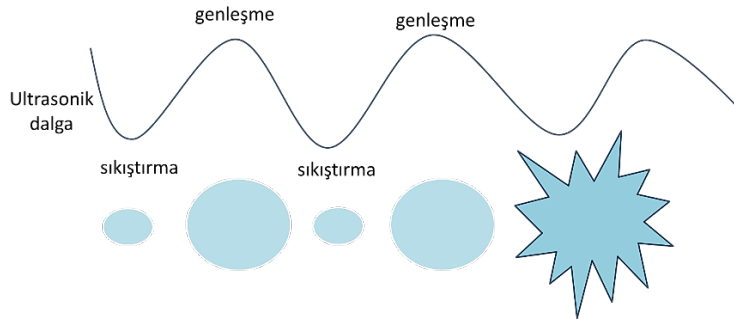
Enzimler, her türlü biyolojik ve kimyasal prosesler için yüksek katalitik aktivite ve seçiciliğe sahip aynı zamanda aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonları hızlandıran makromoleküler biyolojik katalizörlerdir. Enzimler gıda,

yem, ilaç, boya, su arıtma, tekstil, kozmetik, deri, biyoyakıt ve biyokataliz de dahil olmak üzere bir dizi endüstriyel süreçte önemli uygulamalara sahiptir [1, 2, 3]. Enzimatik işlemler, daha yüksek verim, daha az malzeme tüketimi, proses için gereken enerjinin etkili bir şekilde azaltılması ve aynı zamanda toksik yan ürünlerin

oluşumunun azaltılması nedeniyle tercih edilir [4]. Son yıllarda enzim hazırlama maliyetlerinin azaltılmasına ve gıda enzimlerinin uygulamalarının genişletilmesine yönelik artan talep, biyokatalizör geliştirmede enzim aktivasyonunun artırılmasını zorunlu hale getirmektedir. Enzimlerinin aktivitesini arttırmaya yönelik çeşitli işlemler arasında yeşil, termal olmayan bir teknoloji olarak ultrasonun, yalnızca enzim aktivitesini yoğunlaştırmakla kalmayıp aynı zamanda çeşitli gıda matrislerinin farklı yapısına göre enzim özelliklerini uygun hale getirmede de yararlı olduğu kanıtlanmıştır [5].

Ultrason teknolojisi çeşitli kimyasal ve biyokimyasal alanlarda araştırılan, izotermal olmayan ve çevre dostu bir işleme teknolojisidir [6, 7, 8]. İşitilebilir frekans aralığını aşan yani 20 kHz'in üzerindeki ses dalgalarına 'Ultrason' adı verilmektedir [9]. Ultrasonik dalgalar, genleşme ve sıkıştırma fazları oluşturarak, 20 kHz ila 100 MHz frekans aralığında mekanik bir dalga olarak herhangi bir ortamda yayılabilir [10]. Ultrasonik dalga spektrumu güç ultrasonu (20 kHz–1 MHz frekans aralığında) ve tanısal ultrason (1 MHz'den daha yüksek frekans aralığında) olmak üzere iki bölgeye ayrılabilir: Birincisi, son zamanlarda gıda ve biyoproses

endüstrisinde ekstraksiyon, madde modifikasyonu ve reaksiyon hızlandırma gibi çeşitli uygulamalar için yükselen bir teknoloji haline gelirken, ikincisi esas olarak tıbbi ve endüstriyel görüntüleme amaçları için kullanılmaktadır [4, 5, 11]. Ultrason, gaz ortamlarda basınç değişiklikleri ve katı ortamlarda sıvı hareketi üretir [6]. Ultrasonun sıvı sistemler üzerindeki ana etkisi kaviteasyondur [7]. Bu etki, ultrason sürecinde en önemli etki olarak kabul edilir. Kabarcık/balon oluşumu, büyümesi ve patlaması süreci (Şekil 1) olarak bilinen kaviteasyon, dışarıya doğru yayılan şok dalgalarıyla şiddetli basınçlar üretebilir ve bu da çevredeki ortamda ciddi türbülansa neden olabilir. Bu ani değişiklikler, makromoleküllerdeki kimyasal bağları kırabilen ve böylece moleküller üzerinde bir dizi modifikasyon etkisine neden olabilen yüksek kesme gradyanları üretmektedir [4]. Ayrıca kaviteasyon, kütle transferinin artışına ve yüksek enerjili serbest radikallerin oluşmasına neden olmaktadır. Ultrason, güvenli bir işlem olmasından dolayı sıvı gıdaların karıştırılması/ayrılması/ekstraksiyonu, proteinlerin emülsifikasyonu ve işlevsellik modifikasyonu gibi çeşitli süreçlerde kullanılmıştır [7].



Şekil 1. Ultrasonik dalgalar sonucu oluşan kaviteasyon balonlarının oluşumu ve patlaması
Figure 1. Formation and explosion of cavitation bubbles resulting from ultrasonic waves

Ultrason, uygulanan uygun veya uygunsuz koşullara bağlı olarak enzim aktivasyonu ve inaktivasyonu için de kullanılmıştır. Birçok kimyasal ve fiziksel etki aynı anda meydana geldiğinden, spesifik enzim aktivasyonu veya inaktivasyonu mekanizmasını açıklamak zordur. Ancak enzim aktivitesindeki değişikliklerin, esas olarak amino asit bileşimine ve protein konformasyonuna bağlı olduğu bilinmektedir [7, 12]. Kaviteasyon balonlarının sıkıştırma etkisi ile çökmesi sonucu, lokal basınç (1.000 MPa) ve sıcaklık (5.000°K) artışı meydana gelmektedir. Ayrıca ultrason, kararlı kaviteasyon balonlarının titreşmesini sağlayarak güçlü kayma gerilimine ve bitişik sıvıda mikro akışa neden olan şok dalgaları oluşturmaktadır. Bu ekstrem koşullar altında sonikasyon, polipeptit zincirlerindeki hidrojen bağlarının ve van der Waals etkileşimlerinin bozulmasına neden olabilir ve bu da proteinin ikincil ve üçüncül yapısının değişmesine yol açabilir. Proteinin ikincil ve üçüncül yapısındaki bu tür değişiklikler nedeniyle enzimin biyolojik aktivitesi genellikle kaybolmaktadır. Basınç ve sıcaklıktaki aşırı lokal artış ayrıca homolitik su molekülünün parçalanmasına, hidroksil ve hidrojen serbest radikalleri gibi yüksek enerjili ara ürünlerin oluşmasına neden olmaktadır. Oluşan serbest radikaller enzim stabilitesinde, substrat bağlanmasında veya katalitik

fonksiyonda görev alan bazı aminoasit kalıntılarıyla reaksiyona girerek biyolojik aktivitede değişikliğe neden olabilir [13]. Ancak ultrason, ılımlı sıcaklık koşullarında tüm enzimleri etkisiz hale getirmez [8, 13, 14]. Uygun frekanslarda ve yoğunluk seviyelerinde ultrason işlemlerinin kullanılması, fiziksel ve (biyo-)kimyasal etkiler nedeniyle enzim aktivitesinin artmasına yol açabilir. Bu etkiler, (mikro) karıştırma nedeniyle kütle transferinin artması gibi fiziksel etkiler ile hücre parçalanmasından dolayı substrat miktarının artması dolayısıyla belirli enzimlerin üretiminin indüklenerek hücre dokuları içindeki biyokimyasal reaksiyonların uyarılmasına neden olan biyokimyasal etkilerdir [13]. Ayrıca ultrason büyük enzim moleküllerinin daha küçük parçalara bölünmesine, daha fazla aktif bölgelerin açığa çıkmasına ve böylece enzim aktivitesinin artmasına yol açabilir [8].

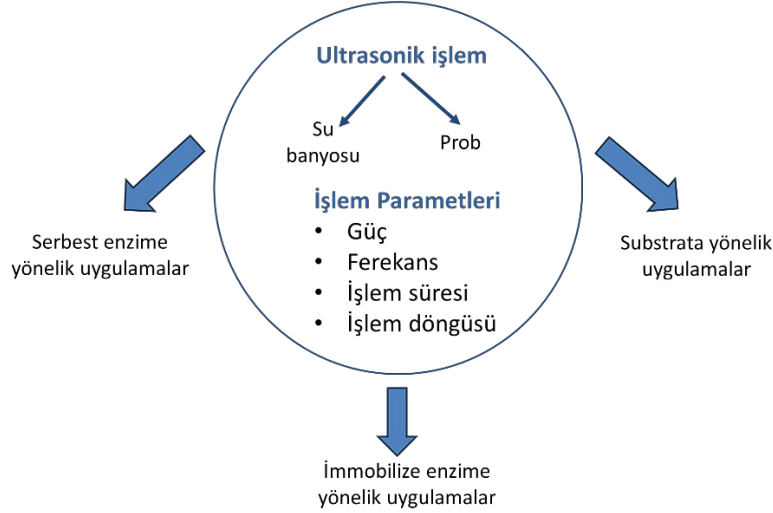
Ultrason işlemlerinde maksimum faydayı elde etmek için çalışma parametreleri (frekans, işlem döngüsü, güç ve işlem süresi) iyi optimize edilmelidir. Burada da açıklandığı gibi kontrolsüz ve uzun süreli sonikasyon, proteini denatüre edecek ve dolayısıyla katalitik aktivitede kayba neden olacak veya aşırı enerji kaybına

yol açacaktır. Dolayısıyla gerçekleştirilen işlem, enzim aktivite kaybı nedeniyle ekonomik olmayacaktır [15].

Ultrason işlemi, ultrasonik su banyosu veya prob kullanılarak gerçekleştirilebilir [4, 11]. Prob sonikatörü, sistemde toplu veya sürekli modda manipüle edilebilen kavitasyon etkisini üretmenin doğrudan bir yolu olarak sıvı bir ortama daldırılacak şekilde tasarlanmıştır. Ultrasonik banyo, reaksiyon sıvısının doğrudan reaktöre veya bir cam kaba yerleştirilebildiği, numuneyle doğrudan veya dolaylı temasla nispeten tekdüze (prob sonikatörüyle karşılaştırıldığında) ve süresiz kavitasyon sağlayan bir temizleme kabıdır [4, 5]. Yapılan

çalışmalarda enzimlerde ultrason işlemi için her iki ultrason tipi kullanılmıştır. Ultrason problemlerinin enzimler üzerindeki etkisi olumlu iken bu problemlerin endüstriyel düzeyde uygulanması (ölçek büyütme) zordur. Ek olarak ultrason problemlerinin yüksek aşınma ve yıpranma özelliği, sınırlı bir hizmet ömrüne neden olur dolayısıyla endüstriyel uygulamalardaki kullanımını kısıtlar [4, 8].

Enzim aktivitesinin artırılması için uygulanan ultrason işlemleri, ön işlem prosedürlerine ve/veya kombine enzime uygulanarak gerçekleştirilebilir. Şekil 2'de ultrason teknolojisi ile enzim aktivasyonunun artırılmasına yönelik uygulanan stratejiler özetlenmiştir.



Şekil 2. Ultrason teknolojisi ile enzim aktivasyonunun artırılmasına yönelik uygulanan stratejiler
Figure 2. Strategies applied to increase enzyme activation with ultrasound technology

Bu derlemede ultrasonikasyon işleminin serbest enzim, immobilize enzim ve substrata uygulanması sonucu meydana gelen molekül yapısındaki değişiklikler, bu değişikliklerin mekanizmaları, bu mekanizmaları etkileyen faktörler ile enzimin aktivasyonuna ilişkin bilgilere yer verilmiştir.

Ultrasonik İşlemlerin Serbest Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Serbest enzimler, sulu bir çözelti veya dondurularak kurutulmuş toz halinde elde edilebilen enzimin geleneksel bir formudur. İmmobilize enzimlerin bulunduğu bazı benzersiz avantajlara rağmen kullanımı kolay olan serbest enzimler, yüksek enzim aktiviteleri ve ucuz maliyetleri göz önüne alındığında bira, süt ve nişasta gibi bazı endüstriyel sektörlerde hala vazgeçilmezdir [4].

Sürdürülebilir biyokütlenin enzimatik hidrolizinin iyileştirilmesi için enzim gereksiniminin ve işlem süresinin azaltılması gereklidir. Ultrasonik işlem, enzim aktivitesini ve stabilitesini etkilemektedir. Ancak bu etkinin nasıl olduğu, uygulanan güç ve frekans gibi sonikasyon parametrelerine bağlıdır. Günümüzde enzimlerin ultrasonla aktivasyonuna ilişkin araştırmaların çoğu serbest enzimler üzerinde gerçekleştirilmiştir (Tablo 1). Bu araştırmalarda, ılımlı ultrasonik koşulları altında gerçekleştirilen enzimatik reaksiyonların enzim aktivitesinde artışa yol açtığı gözlemlenmiştir.

Ultrasonun serbest enzimlerin yapı, kinetik ve termodinamik parametreleri üzerine etkileri bulunmaktadır. Enzimlerin birincil yapısı, peptit bağlarıyla bağlı amino asitlerden oluşmaktadır. Bu polipeptit zincirleri, hidrojen bağı yoluyla α -heliksler, β -yapraklar (akodeon), β -dönüşler ve rastgele sarmallar dahil olmak üzere ikincil yapılar oluşturma eğilimindedir. Bu tür ikincil yapılar, hidrofobik etkileşimler yoluyla üçüncül yapıları oluşturan alt birim haline gelmek üzere üç boyutlu olarak katlanırken dördüncül yapı, van der Waals kuvvetleri ile ilişkili alt birimleri içermektedir. Enzim yapısının değiştirilmesi işlevselliğini, stabilitesini ve kalan aktivitesini de değiştirecektir. Enzimin katalitik yeteneği, aktif merkezine bağlıdır. Ultrason esas olarak enzimlerin aktif merkezini etkileyerek katalitik reaksiyonu etkilemektedir [16, 17]. Enzim çözeltisine ultrason uygulandığında, kavitasyon balonlarının patlamasıyla oluşan kesme kuvvetleri, enzim molekülü içindeki van der Waals kuvvetlerini, hidrojen bağlarını ve hidrofobik etkileşimleri etkileyebilir, bu da ikincil ve üçüncül yapılarda ve dolayısıyla katalitik aktivitelerde değişikliklere neden olabilir. Yoğun ultrason koşulları (aşırı ultrasonik yoğunluk veya uzun işlem süresi gibi) geçici kavitasyon etkilerinin oluşmasına izin verir, burada kavitasyon kabarcıklarının içe doğru çökmesi ve patlaması şok dalgalarına neden olabilir ve ortamda ciddi bir kayma gradyanı yaratabilir. Bu tür şiddetli kayma kuvveti, enzim konformasyonunu ve aktif

bölgeleri oluşturan kimyasal bağları yok edecek kadar güçlü olabilir ve enzim inaktivasyonuna yol açabilir [5]. Ancak son çalışmalar, uygun ultrason işleminin aynı zamanda enzimin aktivitesini de desteklediğini göstermiştir. İlımlı ultrasonik koşulların (yani düşük yoğunluk ve kısa süre) neden olduğu kararlı bir kavıtasyon etkisi, salınımlı rezonans kabarcıklarının çözelti boyunca mikro akımlar oluşturmaya neden olabilir, böylece çözeltide daha hafif kesme gerilimi üretebilir. Bu seviyedeki mekanik etki, enzim yapısını, uzaysal konformasyonunu gevşetecek ve daha fazla aktif bölgelerin açığa çıkmasını sağlayabilir ve böylece enzim aktivitesi iyileştirilebilir [5, 16].

Enzimatik reaksiyon hızı ile reaksiyon hızını etkileyen çeşitli faktörler (enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, pH, sıcaklık, aktivatör, inhibitör vb.) arasındaki ilişkiyi gösteren enzimatik kinetik, Michaelis-Menten denklemi ile gösterilmektedir. Bu denklemin Lineweaver-Burk grafiği ile doğrulanması ile, enzim kinetiğinde önemli iki kinetik parametre olan doymuş substrat konsantrasyonunda elde edilen sınırlayıcı reaksiyon hızını temsil eden maksimum reaksiyon hızı (V_{max}) ve enzimin substrata olan ilgisini gösteren Michaelis-Menten (K_m) sabiti hesaplanmaktadır. Yukarıda bahsedildiği gibi, ultrason, enzimlerin moleküler yapılarını kolaylıkla değiştirerek daha aktif bölgelerin açığa çıkmasına neden olabilir, bu da enzimatik reaksiyon sırasında substratın enzime bağlanmasını kolaylaştırabilir. Bu nedenle ultrason işlemine tabi tutulan enzimlerin K_m 'sinin orijinal enzimle karşılaştırıldığında azaldığı yani enzim ile substrat arasındaki ilişkinin arttığı; ultrason tarafından indüklenen enzim moleküllerindeki fiziksel ve kimyasal değişiklikler nedeniyle de enzimatik reaksiyonların V_{max} değerinin arttığı ifade edilmektedir [5, 17].

Enzimatik termodinamik, maddenin hallerinin dönüşümünü ve enzimatik reaksiyonlarda yer alan enerji değişikliklerini açıklayan bir teoridir. Enzimin termodinamik parametrelerinden biri olan aktivasyon enerjisi (E_a), bir kimyasal reaksiyonun gerçekleşmesi için gereken minimum enerji miktarını temsil eder ve Arrhenius denkleminden hesaplanabilir. Ultrasonun, çeşitli enzimler tarafından katalize edilen enzimatik reaksiyonların E_a 'sını azaltmada etkili olduğu böylece enzim aktivasyonunu arttırdığı ifade edilmektedir. Diğer termodinamik parametreler olan entalpi (ΔH), entropi (ΔS) ve Gibbs serbest enerjisi (ΔG) değişimleri bir enzimin uzaysal konformasyonunun katlanma veya açılma durumuyla ilişkili olduğundan ultrasonun, enzimler üzerindeki modifikasyon etkilerini değerlendirmek için önemli göstergelerdir. ΔH , bir termodinamik sistemin enerjisini temsil eden ve bir reaksiyonun ısı transfer durumunu gösteren önemli bir durum fonksiyonudur. ΔH 0'dan büyük olduğunda reaksiyon endotermiktir, aksi takdirde ekzotermiktir. Enzimatik reaksiyonlarda entalpi, hidrojen bağlarının ve hidrofobik çekirdeklerin oluşumu ve yıkımı gibi enzimlerin konformasyonel yapısıyla yakından ilişkilidir.

Enzimlerin ultrasonik işlem ile aktivasyonu sırasında, ΔH 'deki değişiklik muhtemelen enzim moleküllerindeki hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler ve van der Waals kuvvetleri gibi zayıf bağların sono-mikrojetler ve şok dalgaları tarafından kırılması nedeniyle meydana gelmektedir. Bu tür bir konformasyonel değişim, enzim ve substrat arasındaki bağlanmayı destekleyebilir ve böylece daha yüksek bir reaksiyon verimliliği ortaya çıkabilir. Entropi, reaksiyon sisteminin moleküler rastgeleliğinin bir ölçüsüdür. Enzime ultrason uygulandığında ΔS 'deki değişimler, kavıtasyon nedeniyle oluşan serbest radikaller ile enzimdeki amino asit kalıntılarının oksidasyonu ile ilgilidir, bu nedenle artabilir veya azalabilir. ΔG , sabit sıcaklık ve basınçta çeşitli termodinamik süreçlerin kendiliğinden ilerlemesinin yönünü ve sınırını değerlendirmek için kullanılabilir. Enzimatik bir reaksiyonda, yalnızca ürünlerin toplam serbest enerji miktarı substratlarınkinden düşükse ($\Delta G < 0$) kendiliğinden ilerleyebilir. Ultrasonla aktive edilen enzimle gerçekleşen reaksiyonlarda azalan bir ΔG olabilir, bu da artan enzim aktivitesini ve dolayısıyla enzimatik reaksiyonların kendiliğinden arttığını gösterir [5, 18]. Ultrasonun serbest enzim aktivasyonuna etkisi üzerine yapılan çalışmalar ve bu çalışmalarda elde edilen önemli bulgular, Tablo 1'de özetlenmiştir.

Ultrasonik İşlemlerin Substrat Üzerine Etkisi

Substratın yapısını iyileştirmek ve enzim ile hidrolizini arttırmak amacıyla substratlara ultrasonik işlemler uygulanabilir. Enzimatik hidrolizden önce ultrasonik işlemin, substrat moleküllerinin yüzey yapısını değiştirebileceği ifade edilmektedir. Ultrasonik ön işlemin, substratların yüzey morfolojisini değiştirerek enzimlerin substratlara bağlanmasını arttırmak gibi enzimatik reaksiyonların desteklenmesi üzerinde önemli etkileri vardır. Substrat molekülündeki bu değişiklikler, gözenek ve olukların oluşumu ile moleküler yüzeyin pürüzlülüğünde bir artış ve dolayısıyla substrat moleküllerinin spesifik yüzey alanında bir artış ile beraber bazı sıkı moleküler yapıların tahrip edilmesi ve substrat moleküler yapılarının gevşemesi şeklinde gerçekleşebilir. Ultrasonik ön işlem, substratların ikincil yapısını değiştirebilir, polimerizasyon derecesini azaltabilir. Depolimerizasyon sırasında kovalent bir bağın homolitik ve/veya heterolitik kırılması meydana gelebilir ki makromoleküldeki en yaygın mekanizma C-C bağının kırılmasıdır. Ultrasonun neden olduğu kırılmanın, zincirin ortasına yakın bir yerde meydana gelmesi tercih edilir. Böylece molekül boyutundaki azalma kütle transferini artırabilir. Böylece enzimler, aktif substrat grupları ile daha kolay birleşebilir böylelikle enzimatik reaksiyonun etkinliği artabilir. Ultrasonik ön işlem ayrıca diğer maddelere bağlı substratları ayırabilir veya toplanmış substratları dağıtabilir böylece enzimlerle temas alanını genişletebilir ve enzimatik hidrolizi teşvik edebilir [3, 16].

Tablo 1. Ultrasonun serbest enzim aktivasyonuna etkisi
Table 1. Effect of ultrasound on free enzyme activation

Enzim	Araştırma konusu	Ultrason koşulları	Önemli bulgular	Kaynak
α-Amilaz	Ultrasonik banyo ve prob kullanılarak enzime ön işlem uygulanması	Ultrasonik banyo; 120 W, %30 görev döngüsü, 15 dk Ultrasonik prob; 60 W, %30 görev döngüsü ve 5 dk	<ul style="list-style-type: none"> Enzim başlangıç aktivitesi 5.77 U/g (35°C, pH 7) Ultrasonik banyo işleminden sonra aktivite: 7.498 U/g. Prob işleminden sonra aktivite: 6.907 U/g Ultrasonik banyo uygulaması: kontrollü kaviteasyon oluşturması nedeniyle probdan daha etkili olduğu sonucuna ulaşılmış 	[15]
	Lipaz (Eversae® Transform 2.0)	Ultrason destekli transesterifikasyon	Ultrasonik prob; 20 kHz ve maksimum 250 W, %40 genlik ve %5 görev döngüsü	<ul style="list-style-type: none"> Optimize edilmiş koşullar altında, ultrason destekli reaksiyonda; Enzim aktivitesinin %95'i korunmuş Geleneksel yöntemle kıyasla yağ asidi metil esterleri içeriğinde %15 artmış
Pektinaz	Uyvala şartlarında destekli enzimatik ön işlemin biyoaktif özelliklerine etkisi	Ultrason banyo; 25 kHz, 70 W/L, 40°C, 1 saat	<ul style="list-style-type: none"> Oluşan kaviteasyon nedeniyle bitki hücreleri parçalanmış, bu da fenoller, tanenler, uçucu maddelerin ekstraksiyonunu ve fermentasyonunu arttırmış Ultrason enzimin yapısal bütünlüğüne zarar vermeden substratla etkileşimi optimize etmiş Daha yüksek malik asit içeriğine ve daha yüksek düzeyde toplam fenolik bileşik ve antioksidan aktiviteye sahip bir uyvala şarabı 	[25]
α-Amilaz ve glukozamilaz	Enzime ön işlem	40 kHz α-amilaz: 30 W, 5 dk glukozamilaz: 60 W, 3 dk	<ul style="list-style-type: none"> α-amilaz aktivitesi %17.82±0.26, glukozamilaz aktivitesi %38.50±0.40 artmış Optimum sıcaklık aralığı, işlemden sonra genişlemiş İşlemden sonra optimum pH ve pH aralığını değiştirmiş α-amilaz ve glukozamilaz V_{max} değerleri sırasıyla %6.22 ve %25.79 oranında artmış; K_m sırasıyla %5.70 ve %7.52 oranında azalmış Enzimlerin ikincil ve üçüncül yapısını değiştirmiş 	[8]
	Profil endopeptidaz	Soya fasulyesi proteini B3 alt ünitesinin, ultrason destekli enzim ile parçalanması	68 kHz, 60 W/L ve 10 dakika (10 s açık/5 s kapalı)	<ul style="list-style-type: none"> Ultrason destekli enzim, B3 alt ünitesinin bozunma oranı %72 artmış İşlem, enzimdeki hidrofobik amino asitlerin açığa çıkmasına neden olmuş, böylece enzim etkinliği artırılmış, enzim aktif merkezinin B3 alt ünitesine bağlanması kolaylaşmış, böylece enzim aktivitesi ve B3 alt ünitesinin bozunma hızı artmış
Lipaz	Stigmasteril oleatın lipaz katalizli sentezi için ultrason ön işlemi	Ultrasonik prob; 200 W, 1 saatlik ultrason ön işlem süresi, 50°C	<ul style="list-style-type: none"> Ultrason işlemi ile 50 g/L lipaz dozağı ile stigmasterol dönüşümü %91.37'ye ulaşmış 	[27]
α-Amilaz	Hem enzime hem de substrata uygulanan ultrasonik hidroliz üzerine etkisi	Ultrasonik banyo; çift frekanslı sonikasyon: 64.5 W, 25 + 40 kHz	<ul style="list-style-type: none"> Sonikasyona tabi tutulan nişasta (Ca²⁺: 25 Mm) ile yüksek enzim aktivitesi (0.789±0.003 U/g). Nişasta granüllerini gözenekli yapıları dönüştürmüş, dolayısıyla enzim hidroliz için nişasta granüllerine nüfuz etmesini kolaylaşmış 	[19]
	β-Glukozidaz	Serbest enzime ön işlem	Ultrasonik banyo; 50 W, %30 görev döngüsünde, 20 dk	<ul style="list-style-type: none"> Ön işlem görmüş serbest enzimde aktivite değeri 9.7 U/mL, ön işlem uygulanmamış enzime kıyasla (8.86 U/mL) daha yüksek
Selüloz	Zirai atıklardan izole edilen bakteriyel enzim	Ultrasonik banyo; 40 kHz, 39 W, 60dk	<ul style="list-style-type: none"> Enzim aktivitesi 0.095 birimden 0.12 birime yükselmiş 	[29]
Peroksidaz	Enzime ön işlem	Ultrasonik banyo; 40 kHz, 0-100 W	<ul style="list-style-type: none"> Maksimum aktivite 90 W'da elde edilmiş Enzim konformasyonu değişti: sekonder yapıdaki α-heliks ve anti-paralel içeriğin ve sekonder yapıdaki p-tabaka, p-dönüşü ve rasgele bobin içeriğinin artması 	[30]
Lipaz	Keçi kremasının lipaz ile hidrolizi üzerine ultrasonun etkisi	Ultrasonik banyo; 40°C/60 dk	<ul style="list-style-type: none"> Enzim aktivitesi %12 artmış 	[21]
Pepsin ve papain	Peynir altı suyu proteini izolatının düşük saflıktaki enzimlerle hidrolizi	Ultrasonik banyo; pepsin için 400 W, 4 dk ve papain için 300 W, 2 dk	<ul style="list-style-type: none"> Ultrason ön işlemi, süreci 6 saat azaltmış Kısmi enzimatik hidroliz ve ultrason ön işleminden sonra 1000-2000 g.mol⁻¹'de düşük molar kütleli peptit oluşumu gerçekleşmiş 	[31]
β-Glukozidaz	Enzimin ultrasonla aktive edilmesi	Ultrasonik banyo; 50°C, 225 W ve 28 kHz	<ul style="list-style-type: none"> Enzim aktivitesi %34.67 oranında artırılmış 	[32]
İnvertaz	Ultrason enzime ön işlem olarak, substrata ön işlem olarak ve reaksiyona yardımcı olarak	Ultrasonik banyo; 25 kHz, 22 W/L (CAL), 60 dk, 23°C, pH 5.0	<ul style="list-style-type: none"> V_{max} %23 artmış ve K_m sabit kalmış Invertaz katalitik verimliliği sonikasyon altında %27 artmış Sakaroz hidroliz oranı 40°C'de %33'e, 30°C'de ise %30'a artmış Substrata uygulanan ön işlemin sakkaroz hidrolizini desteklememiş 	[33]
Kitinaz	Enzime ön işlem	Ultrasonik prob; 22 kHz, 25 W/mL, 20 dk	<ul style="list-style-type: none"> Aktivite %19.17 artmış V_{max}'ta bir artış ve K_m'de bir azalma 	[34]
Glukozamilaz	Enzime ön işlem	Ultrasonik banyo; 40 kHz, 420 W, 60°C, 10 dk	<ul style="list-style-type: none"> Aktivite %21.07 artmış V_{max} ve K_m değerleri artmış Termodinamik değerleri, E_a, ΔG, ΔH azalmış ancak ΔS'de hafif bir artış 	[35]

Pourmohammadi ve ark. [19], α -amilaz ile patates nişastasının hidrolizinde substrata ultrasonik işlemin etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmada çift frekanslı ultrasonik banyo kullanmışlardır. Ultrasonik uygulamanın nişasta granüllerini daha gözenekli yapılara dönüştürdüğünü, bu durumun enzimin hidroliz için nişasta granüllerine nüfuz etmesini kolaylaştırdığını ifade etmişlerdir. Böylelikle nişastaların ultrasonikasyon yoluyla işlenmesinin nişasta hidrolizinin de iyileştirilebileceği sonucuna varmışlardır.

Roohi ve ark. [20], α -amilaz ile nişastanın hidrolizi öncesinde ultrason destekli modifikasyona tabi tutulan nişastaların reolojik davranışının ve viskozitelerinin belirlenmesi üzerine bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada, gözenekli nişasta elde etmek için sonikasyona tabi tutulan mısır ve patates nişastası için ultrason geometrisinin, gücünün ve frekansının sıvı akışı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Ultrasonik banyoda ön işleme (300 W, 25 + 40 kHz, 10 dakika) tabi tutulan nişastalarda α -amilazın daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Bunun sebebinin sonikasyon işleminin nişasta granüllerinin yüzeylerinde hasara, çatlaklara ve gözenekliliğe neden olması dolayısıyla nişasta granüllerinin yapısal bütünlüğünün bozulması ile enzim hidrolizinin kolaylaştığını ifade etmişlerdir. Yazarlar, α -amilaz tarafından hidrolize duyarlı olan hasarlı nişastanın üretilmesi için ultrasonikasyon işleminin kullanılabilirliğini önermişlerdir.

Soares ve ark. [21], yaptıkları çalışmada keçi kremasının lipaz ile hidrolizinde ultrasonun lipaz, krema ve reaksiyon üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Ultrasonun reaksiyondaki (krema+ lipaz) etkisi incelendiğinde ultrasonik işlem destekli enzimatik reaksiyon, geleneksel prosesle karşılaştırıldığında daha yüksek bir hidroliz oranı (55°C'de %12, 40°C'de %23 ve 25°C'de %28) gösterdiğini belirlemişlerdir. Yazarlar kavitasyon sırasında kabarcık çökmesiyle güçlü türbülansla birlikte yayılan şok dalgaları ve kesme kuvvetleriyle sonuçlanan önemli bir enerji salınımı olduğunu oluşan bu mekanik etkilerin sadece enzim yapısını ve aktivitesini değiştirmediğini aynı zamanda enzim ve substrat arasındaki difüzyonu azaltarak reaksiyon sırasında kütle transferini artırıp reaksiyonun hızlandığını vurgulamışlardır.

Ultrasonik İşlemlerin İmmobilize Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Serbest enzimler yüksek katalitik aktivite üretmelerine ve kullanımlarının daha kolay olmasına rağmen, düşük kararlılıkları ve yeniden kullanılamamaları endüstriyel uygulamalarını kısıtlamaktadır. Bu nedenle, immobilize edilmiş enzimlerin aktivasyonuna ve modifikasyonuna giderek artan bir ilgi duyulmaktadır [1, 17].

Çeşitli matrisler kullanılarak immobilize edilmiş enzimler hazırlamak için çok sayıda yöntem bulunmaktadır. İmmobilizasyon materyalleri doğal polimerler, sentetik polimerler veya inorganik malzemeler olabilir. Enzim immobilizasyon teknikleri fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki yönetime ayrılabilir. Fiziksel immobilizasyon yöntemleri, van der Waals kuvvetleri, hidrofobik

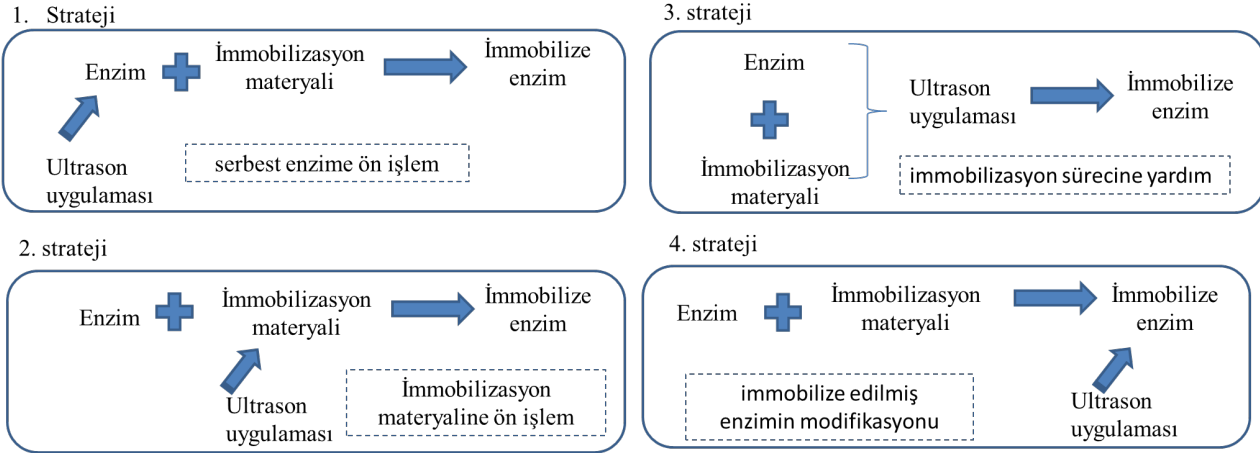
etkileşimler ve hidrojen bağı içeren fiziksel kuvvetler yoluyla gerçekleşir. Kimyasal yöntemler, geri döndürülemez bir süreç yoluyla kovalent veya iyonik bağlar kullanılarak enzimlerin farklı matrislere bağlanmasını içerir [1, 3].

Reaksiyon ortamından kolayca ayrılabilen heterojen bir katalizör olarak immobilize enzimler, reaksiyonun herhangi bir zamanda sonlandırılmasını sağlayarak kirlenmeye içermeyen saf bir ürün elde edilmesini sağlarlar. Ayrıca, endüstriyel bir süreçte birden çok kez kullanılabilirler. Geleneksel serbest enzimlere göre bu avantajlar, immobilize enzimlerin gıda endüstrisinde kullanımını artırmaktadır. İmmobilize enzimlerin katalitik aktivitesinin ve özelliklerinin iyileştirilmesi, daha verimli ve uygun maliyetli bir endüstriyel sürece katkıda bulunacaktır [5]. İmmobilizasyon işleminin verimliliği ve enzimatik aktivitenin sabit tutulması sınırlıdır. Bu nedenle immobilizasyon verimliliğini ve geri kazanımı artırmak için farklı teknikler kullanılmaktadır [3]. Ultrason işlemi, enzimlerin serbest formunu modifiye etmenin yanı sıra son zamanlarda immobilize enzimlerin aktivitesini iyileştirmede de kullanılmıştır. Ultrasonun teknolojisi ile immobilizasyonda enzim aktivasyonunun artırılmasına yönelik farklı stratejiler bulunmaktadır (Şekil 3). Bu stratejilerden biri, immobilizasyon öncesi serbest enzime ultrason işleminin uygulanması sonra işlem görmüş enzimin immobilize edilmesidir ki serbest enzime ultrasonun etkisi yukarıdaki bölümde açıklanmıştır. Bir diğer strateji, immobilizasyon materyaline (taşıyıcı) ultrason ön işlemidir. İmmobilize materyaline ön işlem ile, immobilizasyon sırasında enzim molekülleri ile etkileşimini hızlandırmak için taşıyıcının yapısını değiştirerek immobilize enzimin aktivitesinin iyileştirilmesi amaçlanmaktadır [5, 17, 22]. Ultrasonla indüklenen kesme kuvveti, şok dalgaları ve serbest radikallerin, immobilizasyon materyalinin özelliklerini ve materyal ile enzim arasındaki etkileşimlerini değiştirdiği, sonuç olarak enzimin substratlara olan etkili temas alanını genişlettiği böylece katalitik aktivitenin de dolaylı olarak iyileştirilebileceği ifade edilmektedir [3, 22].

İmmobilizasyondan önce ön işlem aşamasında ultrason kullanmanın yanı sıra, enzim aktivitelerinin daha fazla iyileştirilmesine olanak tanıyan bir başka yaklaşım da enzimlerin immobilizasyonu sırasında ultrason uygulamaktır. Bu tür bir uygulama, işleme sisteminde daha fazla madde/molekül olduğu için bir dizi geniş kapsamlı sonuca yol açabilir ve aynı zamanda kontrol edilmesi daha zor olan karmaşık bir süreçtir [5, 23]. Bu süreçte üç olgu meydana gelebilir. İlk olarak ultrasonun, enzimlerin çözüldüden taşıyıcıların yüzeyine kütle transferini hızlandırması ve enzimlerin taşıyıcı yüzeylere adsorpsiyonunu desteklemesidir. Böylece ultrasonik kavitasyon tarafından oluşturulan bir dizi mekanik etki, kütle transfer özelliklerini azaltır. Sonuç olarak, sistemin kütle transferi artırılmış ve daha homojen bir karışım elde edilerek taşıyıcılar ve enzimlerin kombinasyonu desteklenmiş olur. İkinci olarak ultrasonik kavitasyon, enzimin konfigürasyonunu değiştirebilir ve böylece enzimin aktivitesini doğrudan iyileştirebilir. Üçüncüsü ultrason, taşıyıcıyı değiştirebilir ve enzimlerle temasa daha duyarlı hale getirebilir [3, 22]. Wang ve ark. [23],

yapmış oldukları çalışmada ultrasonun, sodyum aljinatın hidrofobik etkileşimlerini ve arayüz aktivitelerini artırdığını böylece sodyum aljinat ile enzimler arasındaki çapraz bağlanmanın kolaylaştığını ifade etmişlerdir.

Tablo 2’de ultrasonun immobilize enzim aktivasyonuna etkisi üzerine yapılan çalışmalar ve bu çalışmalarda elde edilen önemli bulgular özetlenmiştir.



Şekil 3. Ultrason teknolojisi ile immobilizasyonda enzim aktivasyonunun artırılmasına yönelik uygulanan stratejiler
Figure 3. Strategies applied to increase enzyme activation in immobilization with ultrasound technology

Tablo 2. Ultrasonun immobilize enzim aktivasyonuna etkisi
Table 2. Effect of ultrasound on immobilized enzyme activation

Enzim	Araştırma konusu	Ultrason koşulları	Önemli bulgular	Kaynak
β -Glukosidaz	Enzime US ön işlemi; çapraz bağlama ile immobilizasyon (gluteralehidit ve amonyum sülfat)	ultrasonik banyo; 50 W, %30 görev döngüsünde, 20 dk	• Ön işlemde sonra immobilize edilen enzim ile işlem görmemiş immobilize enzime kıyasla %82'lik bir aktivite geri kazanımı	[28]
Glukoamilaz ve α -amilaz	Immobilize enzimin olduğu ekstraksiyon ortamına US işlemi; MNP'le birlikte immobilize edilmiş enzimler	ultrasonik banyo; 20 kHz, 20 W, 15 dk	• Ultrason ve immobilize enzim ile ekstraksiyon verimi 108.23 mg/g iken ön işlemsiz ekstraksiyon verimi 89.97 mg/g; ekstraksiyon veriminde 1.3-1.5 kat artış	[36]
Peroksidaz	Ultrason kullanılarak Zn-MOF nanoparçısı sentezi	ultrasonik prob; 20 kHz, 200 W, 20 dk, 90°C	• Immobilizasyon verimi, %93.3 • Immobilize enzimin spesifik aktivitesi, serbest enzime göre yaklaşık 3 kat artmış	[37]
Lipaz	Immobilizasyon işlemine destek; Mezopor (çok gözenekli) silika üzerine immobilizasyon	ultrasonik prob; 20 kHz, 100 W, 10 dk	Ultrasonik destekli immobilizasyonda • Lipaz yükleme miktarı (177.3 mg/g ve verim %41.3) ultrasonik olmayan (84.4 mg/g) göre 1.1 kat yüksek • Katalitik verim (6.4 mmol/g saat) 9.1 kat yüksek V_{max}/K_m • Ultrason destekli immobilize enzim, 11.24×10^{-3} • Immobilize enzim, 3.10×10^{-3}	[38]
Pektinaz ve selüloz	Immobilize enzime işlem; Amino-MNP'le birlikte immobilize edilmiş enzimler	ultrasonik banyo; 20 kHz 10 W, 20 dk	• Ekstraksiyon veriminde 1.3 kata kadar bir artış	[39]
Ticari immobilize lipaz, Lipozyme® RMIM	Ultrasonik ön işlemin, domuz yağının lipaz katalizli gliserolizle diasilgliserol (DAG) sentezi üzerindeki etkisi	ultrasonik prob; 5 dakika boyunca 45°C ve güç 250 W	• Ultrasonik ön işlem ile 4 saatlik gliseroliz reaksiyonlarının DAG içeriği, ultrasonik ön işlem olmadan 11 saatlik gliseroliz reaksiyonlarına benzer: ön işlem, gliseroliz reaksiyon süresini önemli ölçüde kısaltmış	[40]
Lizozim	Immobilizasyon işlemine destek; kalsiyum aljinat film üzerine immobilizasyon	ultrasonik prob; 22 kHz, 147,8 W, 25°C, 40 dk	• Maksimum katalitik aktivite (72.34 U) %13.2 oranında artmış	[23]
Lipaz	US destekli manyetik Ta-MOF@Fe ₃ O ₄ nanoparçısı sentezi	ultrasonik prob; 25°C sıcaklık, 15 dakikalık süre ve 120 W	• Immobilize enzim aktivitesi, yüksek substrat konsantrasyonunda kontrole kıyasla artmış • Immobilize enzimin termal stabilitesi daha fazla artmış • Reaksiyon sonunda immobilize enzim aktivitesini %95 korumuş	[22]
Lipaz	Enzime ön işlem; immobilizasyon materyali: MOF	ultrasonik prob; 22 kHz, 11.38 Wcm ⁻² , 25 dk	• Ön işlem sonrasında lipaz aktivitesi 1.6 kata kadar artmış • K_m ve V_{max} değerleri, sonikasyona tabi tutulmuş immobilize lipaz ile sonikasyona tabi tutulmuş serbest lipaz ile hemen hemen aynı • Immobilize enzim art arda 7 kez yeniden kullanım döngüsünden sonra kalan aktivite %54 • 25 günlük depolamada aktivitesini %90'ını korumuş	[18]
Selüloz	Immobilize enzime işlem; MNP'le immobilize edilmiş enzimler	ultrasonik banyo; 6.3 W, 6 dk	Immobilize enzimin aktivitesi 3.6 kata kadar artmış • V_{max} 'sı artmış ve K_m 'i azalmış	[41]

US: Ultrason, MNP: Magnetik nano partikül, MOF: metal-organik çerçeve

US: Ultrasound, MNP: Magnetic nanoparticles, MOF: Metal organic framework

SONUÇ ve ÖNERİLER

Uygun ultrasonik işlem serbest enzime, substrata ve/veya immobilize enzime uygulandığında enzimin aktivitesini iyileştirebilir, enzimatik reaksiyonun hızını ve verimini artırabilir. Enzim aktivasyonunun artışında ultrason tarafından oluşturulan kaviteasyonun önemli bir rolü bulunmaktadır. Kaviteasyon dinamik bir olgudur ve etkileri büyük ölçüde çalışma parametrelerine bağlıdır. Uygun koşullarda gerçekleştirilen ultrason, enzimin ve substratın konformasyonunu değiştirir, bu da enzimin katalitik etkinliğinde bir iyileşmeye yol açabilir. Ultrasonun neden olduğu mekanik etkiler makromoleküller üzerinde kayma kuvvetleri oluşturur, enzimlerin ve substratların kümeleşmelerini zayıflatır ve bağlanmaları kolaylaştırır.

Ultrasonun enzim aktivitesi üzerine umut verici sonuçlarına rağmen, bu teknolojinin ölçeklenebilirliği konusunda bazı zorluklar devam etmektedir. Bu zorlukların üstesinden gelebilmek için yapılacak çalışmalarla ultrasonun, enzimatik reaksiyonlar üzerindeki olumlu etkisinin ve çalışma koşullarının etkisinin incelenmesi sonrasında verimli bir ultrason destekli enzimatik reaksiyonun tasarlanması çok önemlidir. Ayrıca enzimatik reaksiyon verimliliğini artırmak ve ultrason ekipmanının enerji tüketimini azaltmak için ultrason proses parametrelerinin optimize edilmesi gereklidir.

KAYNAKLAR

- [1] Chen, N., Chang, B., Shi, N., Yan, W., Lu, F., Liu, F. (2023). Cross-linked enzyme aggregates immobilization: preparation, characterization, and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 43(3), 369-383.
- [2] Lindsay, M., Hellmeister, J., Augusto, P.E. (2016). The ultrasound technology for modifying enzyme activity. *Scientia Agropecuaria*, 7(2), 145-150.
- [3] Wang, D., Yan, L., Ma, X., Wang, W., Zou, M., Zhong, J., Ding, T., Ye, X., Liu, D. (2018). Ultrasound promotes enzymatic reactions by acting on different targets: Enzymes, substrates and enzymatic reaction systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 453-461.
- [4] Priya, Gogate, P.R. (2021). Ultrasound-Assisted Intensification of activity of free and immobilized enzymes: A Review. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 60, 9650–9668.
- [5] Ma, X., Liu, D., Hou, F. (2023). Sono-activation of food enzymes: From principles to practice. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22, 1184-1225.
- [6] Chavan, P., Sharma, P., Sharma, S.R., Mittal, T.C., Jaiswal, A.K. (2022). Application of high-intensity ultrasound to improve food processing efficiency: A review, *Foods*, 11(1), 122.
- [7] Su, J., Cavaco-Paulo, A. (2021). Effect of ultrasound on protein functionality. *Ultrasonics Sonochemistry*, 76, 105653.
- [8] Wang, Y., Tian, X., Zhang, Z., Tian, M., Zhang, F. (2024). Investigation of the potential mechanisms of α -amylase and glucoamylase through ultrasound intensification. *Food Science & Technology*, 198, 115979.
- [9] Bhargava, N., Mor, R.S., Kumar, K., Sharanagat, V.S. (2021). Advances in application of ultrasound in food processing: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105293.
- [10] Singla, M., Sit, N. (2021). Application of ultrasound in combination with other technologies in food processing: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 73, 105506.
- [11] Zadeike, D., Degutyte, R. (2023). Recent advances in acoustic technology in food processing. *Foods*, 12(18), 3365.
- [12] Nadar, S.S., Rathod, V.K. 2017. Ultrasound assisted intensification of enzyme activity and its properties: a mini-review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(9), 170.
- [13] Mawson, R., Gamage, M., Terefe, N.S, Knoerzer, K. (2010). Ultrasound in Enzyme Activation and Inactivation. In *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*, Edited by H. Feng, G. Barbosa-Canovas, J. Weiss, Springer, New York, 665p.
- [14] Oliveira, H.M., Correia, V.S., Segundo, M.A., Fonseca, A.J.M., Cabrita, A.R.J. (2017). Does ultrasound improve the activity of alpha amylase? A comparative study towards a tailor-made enzymatic hydrolysis of starch. *LWT-Food Science and Technology*, 84, 674-685.
- [15] Mishra, S. K., Yadav, P., Gogate, P.R. (2024). Intensification of α -amylase activity using ultrasound and its application for food waste hydrolysis. *Process Biochemistry*, 143, 73-82.
- [16] Qian, J., Chen, D., Zhang, Y., Gao, X., Xu, L., Guan, G., Wang, F. (2023). Ultrasound-assisted enzymatic protein hydrolysis in food processing: mechanism and parameters. *Foods*, 12(21), 4027.
- [17] Wang, F., Liu, Y., Du, C., Gao, R. (2022). Current strategies for real-time enzyme activation. *Biomolecules*, 12(5), 599.
- [18] Nadar, S.S., Rathod, V.K. (2018). Encapsulation of lipase within metal-organic framework (MOF) with enhanced activity intensified under ultrasound. *Enzyme and Microbial Technology*, 108, 11-20.
- [19] Pourmohammadi, K., Sayadi, M., Abedi, E. (2023). Ultrasound-assisted activation amylase in the presence of calcium ion and effect on liquefaction process of dual frequency ultrasonicated potato starch. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17, 3435-3449.
- [20] Roohi, R., Abedi, E., Hashemi, S.M.B. (2024). Ultrasound-assisted starch hydrolyzing by alpha-amylase: Implementation of computational fluid dynamics, acoustic field determination, and rheology modeling. *Ultrasonics Sonochemistry*, 103, 106785.
- [21] Soares, A.D.S., de Castro Leite Júnior, B.R., Tribst, A.A.L., Augusto P.E.D., Ramos, A.M. (2020). Effect of ultrasound on goat cream hydrolysis by lipase: Evaluation on enzyme, substrate and assisted reaction. *LWT-Food Science and Technology*, 130, 109636.
- [22] Sargazi, G., Afzali, D., Ebrahimi, A.K., Badoei-Dalfard, A., Malekabadi, S., Karami, Z. (2018). Ultrasound assisted reverse micelle efficient

- synthesis of new Ta-MOF@ Fe₃O₄ core/shell nanostructures as a novel candidate for lipase immobilization. *Materials Science and Engineering: C*, 93, 768-775.
- [23] Wang, D., Lv, R.L., Ma, X.B., Zou, M. M., Wang, W.J., Yan, L.F., Ding, T., Ye, X.Q., Liu, D.H. (2018). Lysozyme immobilization on the calcium alginate film under sonication: Development of an antimicrobial film. *Food Hydrocolloids*, 83, 1-8.
- [24] Liow, M.Y., Chan, E., Ng, W.Z., Song, C.P. (2024). Enhancing efficiency of ultrasound-assisted biodiesel production catalyzed by Eversa® Transform 2.0 at low lipase concentration: Enzyme characterization and process optimization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 271(2), 132538.
- [25] Ferreira, A.L.A., da Silva Monteiro Wanderley, B.R., da Silva Haas, I.C., Biluca, F.C., de Oliveira Costa, A.C., Hoff, R.B., Pereira-Coelho, M., dos Santos Madureira, L.A., de Sena Aquino, A.C.M., de Mello Castanho Amboni, R.D., Fritzen-Freire, C.B. (2024). Low-alcohol wine made from uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): Influence of ultrasound-assisted enzymatic pre-treatment on its bioactive properties, *Microchemical Journal*, 198, 110177.
- [26] Zhang, Z., Shan, P., Zhang, Z.H., He, R., Xing, L., Liu, J., He, D., Ma, H., Wang, Z., Gao, X. (2023). Efficient degradation of soybean protein B₃ subunit in soy sauce by ultrasound-assisted prolyl endopeptidase and its primary mechanism. *Food Chemistry*, 429, 136972.
- [27] Zhang, X., Yu, Y., Yu, J., Wang, M., Gao, S., Li, W., Yu, D., Wang, L. (2023b). Ultrasound pretreatment for lipase-catalyzed synthesis of stigmasteryl oleate and evaluation of its physicochemical properties. *LWT-Food Science and Technology*, 183, 114929.
- [28] Priya, Gogate, P.R. (2022). Ultrasound-assisted intensification of β -glucosidase enzyme activity in free and immobilized forms, A review. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 61(5), 2023-2036.
- [29] Atiya, S.A., Gatea, I.H., Abdulla, K.J. (2021). Effect of ultrasonic technology on cellulase enzyme activity produced by local bacterial isolate. *Journal of Physics: Conference Series*, 1963(1), 012051.
- [30] Li, F., Tang, Y. (2021). The activation mechanism of peroxidase by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 71, 105362.
- [31] Lorenzetti, A., Penha, F. M., Petrus, J.C.C., Rezzadori, K. (2020). Low purity enzymes and ultrasound pretreatment applied to partially hydrolyze whey protein. *Food Bioscience*, 38 (December), 100784.
- [32] Fan, X.H., Zhang, X.Y., Zhang, Q.A., Zhao, W.Q., Shi, F.F. (2019). Optimization of ultrasound parameters and its effect on the properties of the activity of beta-glucosidase in apricot kernels. *Ultrasonics Sonochemistry*, 52, 468-476.
- [33] Soares, A.D.S., Augusto, P.E.D., Leite Júnior B.R.D.C., Nogueira, C.A, Vieira, É.N.R., Barros, F.A.R. D., Stringheta, P.C., Ramos, A.M. (2019). Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase: Investigation on substrate, enzyme and kinetics parameters. *LWT-Food Science and Technology*, 107, 164–170.
- [34] Hou, F., Ma, X., Fan, L., Wang, D., Wang, W., Ding, T., Ye, X., Liu, D. (2019). Activation and conformational changes of chitinase induced by ultrasound. *Food Chemistry*, 285, 355-362.
- [35] Meng, H., Li, D., Zhu, C. (2018). The effect of ultrasound on the properties and conformation of glucoamylase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 411-417.
- [36] Patil, S.S., Rathod, V.K. (2022). Combined effect of enzyme co-immobilized magnetic nanoparticles (MNPs) and ultrasound for effective extraction and purification of curcuminoids from *Curcuma longa*. *Industrial Crops and Products*, 177, 114385.
- [37] Farhadi, S., Riahi-Madvar, A., Sargazi, G., Mortazavi, M. (2021). Immobilization of *Lepidium draba* peroxidase on a novel Zn-MOF nanostructure. *International Journal of Biological Macromolecules*, 173, 366-378.
- [38] Sun, T., Dong, Z., Wang, J., Huang, F.H., Zheng, M.M. (2020). Ultrasound-assisted interfacial immobilization of lipase on hollow mesoporous silica spheres in a pickering emulsion system: A hyperactive and sustainable biocatalyst. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(46), 17280–17290.
- [39] Ladole, M.R., Nair, R.R., Bhutada, Y.D., Amritkar, V.D., Pandit, A.B. (2018). Synergistic effect of ultrasonication and co-immobilized enzymes on tomato peels for lycopene extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 48, 453-462.
- [40] Zhao, X., Sun, Q., Qin, Z., Liu, Q., Kong, B. (2018). Ultrasonic pretreatment promotes diacylglycerol production from lard by lipase-catalysed glycerolysis and its physicochemical properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 48, 11-18.
- [41] Ladole, M.R., Mevada, J.S., Pandit, A.B. (2017). Ultrasonic hyperactivation of cellulase immobilized on magnetic nanoparticles. *Bioresource Technology*, 239, 117-126.