

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ULTRASON İŞLEMİNİN LAKTOPEROKSİDAZ VE ALKALEN
FOSFATAZ ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

121491

Yavuz YÜKSEL

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

ERZURUM
2002

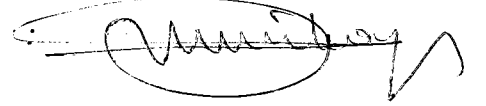
Her hakkı saklıdır

121491

Doç. Dr. M. Fatih ERTUGAY danışmanlığında, Yavuz YÜKSEL tarafından hazırlanan bu çalışma 23/09/2002 tarihinde aşığıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Mükerrrem KAYA

imza



Üye : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVLİOĞLU

imza



Üye : Doç. Dr. M. Fatih ERTUGAY

imza



Yukarıdaki sonucu onaylarım

Doç. Dr. Ümit DEMİR

(imza)



Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ULTRASON İŞLEMİNİN LAKTOPEROKSİDAZ ve ALKALEN FOSFATAZ ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Yavuz YÜKSEL

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. M. Fatih ERTUGAY

Bu çalışmada, soğuk muhafaza yöntemlerinden biri olan ultrason işlemi, süt teknolojisinde önem arz eden laktoperoksidaz ve alkaleen fosfataz enzimlerine uygulanarak aktivitelerindeki değişimler gözlenmiştir. Bu amaçla, ultrason işlemi uygulanmamış kontrole ilaveten 20, 40, 60 ve % 80 olmak üzere dört farklı dalga genişliği, 20 ve 40 °C olmak üzere iki farklı sıcaklık ve 30, 60, 90 ve 120 s sürelerinde dört farklı işlem süresi kullanılarak LPO ve AP enzimleri üzerine kombine etkileri tespit edilmeye çalışılmıştır.

Çalışmada belli miktarda laktoperoksidaz (LPO) enzimi 0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH: 6.0) çözeltisine katılarak ultrasona maruz bırakılmıştır. Bu enzimin, 2,2-azinobis (3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) çözeltisini H_2O_2 eşliğinde yükseltgenmiş forma dönüştürmesi reaksiyonundan faydalanarak spektrofotometrede 412 nm'de absorbanstaki bir dakikalık artış enzim ünitesi olarak kaydedilmiştir.

Alkaleen fosfataz (AP) enzimi ise 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) (pH: 10.45, 35°C) içerisine belli miktarda ilave edilerek ultrasona tabi tutulmuştur. Spektrofotometrede p-nitrofenil fosfat (pNPP) substratının su ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan renkli bileşiğin (p-nitrofenolat) AP eşliğinde 400 nm'de absorbanstaki artış meydana getirdiği gözlenmiştir. Bir dakika içerisinde meydana gelen absorbanstaki artış enzim ünitesi olarak belirlenmiştir.

Ultrason işlemi ile LPO ve AP enzimlerinin aktivitelerinde dalga genişliği, sıcaklık ve işlem zamanına bağlı olarak bir miktar azalma belirlenmiştir. Ayrıca % 80 dalga genişliğinde enzimlerin sıcaklık ve süreye bağlı olarak aktivitelerinin büyük oranda azaldığı ve ultrasonun diğer işlemlerle (ısı, ultraviyole, basınç... vd.) kombine kullanılması halinde daha etkili olabileceği de tespit edilmiştir.

2002 , 40 sayfa

Anahtar kelimeler: Ultrason, laktoperoksidaz, alkaleen fosfataz

ABSTRACT

Master Thesis

EFFECT OF ULTRASOUND ON LACTOPEROXIDASE AND ALKALINE PHOSPHATASE ENZYMES

Yavuz YÜKSEL

Ataturk University
Institute of Pure and Applied Sciences
Department of Food Science and Technology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. M. Fatih ERTUGAY

In this study, ultrasound process, a kind of cold preservation methods, was applied to lactoperoxidase (LPO) and alkaline phosphatase (AP) enzymes which have an significant function in milk technology and the changes in their activities were determined. For this purpose, 4 different amplitudes (20, 40, 60 and % 80) addition to untreatment (control), 2 different temperatures (20 and 40 °C) and 4 different exposure times (30, 60, 90 and 120 s) were applied to these enzymes and the effects of these factors were tried to determine on LPO and AP enzymes.

In the study, a certain amount of LPO enzyme was added in 0.1 M Na₂HPO₄·7H₂O solution (pH: 6.0) and than this solution was exposed to ultrasound treatment. An increase in a minute at 412 nm absorbance in spectrophotometer was recorded as enzyme unit by means of ovidation reaction of 2,2-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) with together H₂O₂.

AP enzyme was also subjected to ultrasound after added in certain amount to 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP) (pH: 10.45, 35°C). It was observed that colourful solution (p-nitrophenolate), occurred by reaction of p-nitrophenyl phosphate (nNPP) substrat with water in spectrophotometer, has absorbance increase to occure by accomplishment with AP enzyme. Absorbance increase in a minute was determined as an enzyme unit.

A decrease was determined in activities of LPO and AP enzymes by ultrasound process depend on level of amplitude, temperature and exposure time. Furthermore, we observed that activities of these enzymes decreased dramatically depending on temperature and exposure time in % 80 amplitude. Finally, we can say that the usage of ultrasound process with other treatments (temperature, ultraviolet, high pressure... etc.) would be more effective.

2002 , 40 pages

Keywords: Ultrasound, lactoperoxidase, alkaline phosphatase

TEŞEKKÜR

Sunmuş olduğum yüksek lisans tezi Atatürk Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiş olup Atatürk Üniversitesi Gıda Mühendisliği ve Kimya Mühendisliği Bölümlerinde yapılmıştır.

Çalışmalarında her türlü desteği sağlayan değerli hocam Sayın Doç. Dr. M. Fatih ERTUGAY'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezin hazırlanmasında gerekli yardımı ve ilgiyi esirgemeyen Ziraat Fakültesi dekanı Sayın Prof. Dr. Mükerrer KAYA, çalışmalarımı yürütebilmem için laboratuvar imkanı sağlayan Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Fevzi KELEŞ, Biyokimya ve Kimya Mühendisliği bölümlerinde deneylerimi yapmam için imkanlar sağlayan hocalarım Bayburt MYO müdürü Prof. Dr. Yaşar Nuri ŞAHİN, Pasinler MYO müdürü Prof. Dr. Hanifi SARAÇ, tecrübelerinden faydalandığım Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU ve Prof. Dr. Songül ÇAKMAKÇI, çalışmalarımı yürütebilmem için sağladığı kolaylıklardan dolayı Hınıs MYO müdürümüz Sayın Yrd. Doç. Dr. Recep AYDIN, tezin sayfa düzenini hazırlamamda tecrübesinden faydalandığım Araş. Gör. Selami YARBAŞI, bilgisinden yararlandığım meslektaşım Öğr. Gör. Tamer TURGUT, bölümümüzde ve diğer bölümlerde benden yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. İrfan AKSU, Yrd. Doç. Dr. Mustafa ŞENGÜL, Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ, Yrd. Doç. Dr. Taner TEKİN, Arş. Gör. Murat KARAOĞLU, Arş. Gör. Memiş ÖZDEMİR, Arş. Gör. Tuba İNGEÇ ve diğer tüm bölüm hocalarıma teşekkür ederim.

Yavuz YÜKSEL

Temmuz 2002

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	9
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	19
3.1. Materyal.....	19
3.2. Metot.....	19
3.2.1. Ultrason İşlemi.....	19
3.2.2. Laktoperoksidaz Aktivitesi Tayini.....	19
3.2.3. Alkalen Fosfataz Aktivitesi Tayini.....	20
3.3. Denemenin Düzenlenmesi.....	21
3.4. İstatistiki Analizler	22
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	23
4.1. Denemede Kullanılan Laktoperoksidaz ve Alkalen Fosfataz Enzimine Ait Analiz Sonuçları.....	23
5. SONUÇ.....	34
KAYNAKLAR.....	35

SİMGELER DİZİNİ

ABTS	2,2-azinobis(3-etilbenztiazolin-6-sülfonik asit)
AMP	2-amino-2-metil-1-propanol
AP	Alkalen fosfataz
EU	Enzim Ünitesi
LPO	Laktoperoksidaz
MS	Manosonikasyon
MTS	Manotermosonikasyon
PNPP	p-nitrofenol fosfat
T	Sıcaklık(°C)
kHz	Kilohertz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. AP enzimi aktivitesi üzerine dalga genişliği x sıcaklık interaksiyonunun etkisi.....	28
Şekil 4.2. LPO enzimi aktivitesi üzerine dalga genişliği x sıcaklık interaksiyonunun etkisi.....	30
Şekil 4.3. LPO enzimi aktivitesi üzerine dalga genişliği x süre interaksiyonunun etkisi.....	31
Şekil 4.4. AP enzimi aktivitesi üzerine dalga genişliği x süre interaksiyonunun etkisi.....	32



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Ultrason Teknolojisinin Süt Ürünlerinde Başlıca Uygulamaları.....	7
Çizelge 4.1. Farklı dalga genişliği, sıcaklık ve sürelerde ultrason uygulanmış LPO ve AP enzimlerinin aktiviteleri (EU).....	23
Çizelge 4.2. Farklı dalga genişliği, farklı sıcaklık ve farklı sürelerde ultrason işlemi uygulanmış LPO enzim aktivitesine ait varyans analiz sonuçları.....	24
Çizelge 4.3. Farklı dalga genişliği, farklı sıcaklık ve farklı sürelerde ultrason işlemi uygulanmış AP enzim aktivitesine ait varyans analiz sonuçları.....	25
Çizelge 4.4. Farklı dalga genişliğinde LPO ve AP enzimleri aktiviteleri değerlerine ait ortalamalarının Duncan Çoklu Karşılaştırma Test sonuçları.....	25
Çizelge 4.5. Farklı sıcaklıklarda ultrason işlemi uygulanmış LPO ve AP enzimleri aktiviteleri değerlerine ait ortalamalarının Duncan Çoklu Karşılaştırma Test sonuçları.....	27
Çizelge 4.6. Farklı sürelerde ultrason işlemi uygulanmış LPO ve AP enzimleri aktiviteleri değerlerine ait ortalamalarının Duncan Çoklu Karşılaştırma Test sonuçları.....	28

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun 6.5 milyara ulaştığı günümüzde bir kısım insanların açlıktan ölmesi, diğer taraftan gıdaların uzun süreli olarak muhafaza edilmediği için yararlanmaksızın yok edilmesi kullanılan gıdaların uzun süreli muhafaza edilmesinin önemini daha da artırmıştır. Uzun süreli olarak muhafaza edilen gıdalar, gıda üretiminin olmadığı bölgelere uygun şekilde transfer edilmesi durumunda açlıktan kaynaklanan ölümlerin bir derece önlenmesi mümkün olacaktır.

Gıdaların dayanıklılığını artırmak için, olumsuz mikrobiyal ve enzimatik aktivitenin belirli oranlarda önlenmesi gereklidir. Isıl işlem, renk, lezzet, besin değeri gibi bazı gıda özelliklerinde olumsuz etki oluşturabileceği için mikroorganizma ve enzim inaktivasyonunda ısıl olmayan bazı teknolojik işlemlere ilgi artmaktadır (Mertens ve Knorr 1992; Gould 1995; Barbosa-Canovas et al. 1997). Gıdaların besinsel ve duyuşsal özelliklerindeki tüketici isteklerini karşılayabilmek için çok sayıda geleneksel olmayan muhafaza metotları geliştirilmektedir (Alzamora et al. 2000). Süt ürünlerinin kalite ve muhafaza özelliklerini artırmak için son zamanlarda gündemde olan teknolojilerden biri de ultrason uygulamalarıdır.

Ultrason katı, sıvı ve gazlardan geçebilen, frekansı 20 kHz'den daha fazla olan insan kulağı tarafından algılanamayan ses dalgaları olarak tanımlanabilir. Diğer bir tanıma göre de, saniyede 20 000 veya daha fazla ses dalgası tarafından enerji üretilmesi işlemidir. Ultrason uygulamalarında düşük ve yüksek şiddetli ultrason olmak üzere 2 farklı tipte ses dalgası kullanılmaktadır (Villamiel et al. 1999).

Gıda endüstrisinde MHz genişliğinde düşük enerji, yüksek frekanslı ultrason ve kHz genişliğinde düşük frekans kullanımı diğer alanlarda olduğu gibi yıllardan beri gelişme ve araştırma konusu olmuştur. Düşük şiddetli (enerjili) ultrason, düşük güç seviyesi ($\leq 1 \text{ W/cm}^2$) ve yüksek frekansı ile (0.1-20 MHz) tanımlanır. Gıda uygulamaları için 0.1-20 MHz arasındaki yüksek frekanslar ve düşük enerji seviyeleri (100 mW) kullanılmaktadır (Gunesakaran ve Ay 1996; McClements 1997; Villamiel et al. 1999).

Yüksek enerjili ultrason ise yüksek enerji seviyesi ($10-1000 \text{ W/cm}^2$) ve nispeten düşük olan frekansı ile ($\leq 0.1 \text{ MHz}$) tanımlanabilir. Bu tip ultrason dalgaları ile yapılan uygulamalarda, uygulanan materyalde fiziksel ve kimyasal değişimler meydana gelmektedir. Bu nedenle ultrasonun bu tipi, esas olarak cansız olan materyallerde ve özellikle ürün işleme alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüksek enerjili ultrasonun, uygulandığı materyalin yapısını bozma mekanizması üzerine farklı teoriler bulunduğu belirtilmektedir (Blitz 1971; Villamiel et al. 1999).

Yüksek enerjili ultrason dalgaları bir sıvı içinden geçtikleri zaman baloncuk veya oyukçuk (kavitasyon)'lar oluştururlar. Bu baloncukların sönmesiyle materyalin bozulmasından sorumlu tutulan şok dalgaları, yüksek sıcaklık ve basınçla beraber daha etkili şekilde hasara neden olmaktadır. Bununla beraber yine kavitasyon esnasında çok az miktarda da olsa serbest radikallerin de oluşabildiği görüşü ve bu radikallerin özellikle DNA gibi biyolojik materyale saldırmasıyla ek bir hasar meydana getirebileceği vurgulanmaktadır (Scherba et al. 1991; Villamiel et al. 1999, 2000).

Ultrason dalgaları biyolojik yapıları bozmalarıyla bilinmektedir. Geçen yüzyıl boyunca bunun nasıl gerçekleştiği incelenmiştir. Ultrason dalga genişliği, uygun yoğunlukta seçilirse hücre ölümüne neden olmaktadır. Dalgalar bir sıvıdan geçerlerken basınçta artma ve azalmalara neden olmaktadır. Dalga yeterli büyüklükteyse, baloncuklar veya kaviteler oluşur. Buna kavitasyon denir. Kavitasyonun kalıcı veya geçici iki farklı etkisi vardır. Kalıcı kavitasyon küçük baloncuklardan oluşur ve değişen basıncın etkisiyle bu baloncuklar titreşir. Oluşan küçük baloncuklar sıvı içerisinde çözünür ve titreşimler sayesinde çevreye yayılarak hücre yüzeylerine sürtünürler. Daha sonra da hücre zarının yıkımına neden olurlar. Geçici kavitasyon ise, baloncuk büyüklüğünün hızla değişmesiyle olur. Birkaç titreşim döngüsünde baloncuklar farklı yoğunluklarda sönerler. Bu baloncuklar sönerlerken çevrelerinde yüksek basınç ve belirli bir sıcaklık oluşur. Bunların birlikte etkileri sonucunda hücre zarlarının yapısı bozulmaya başlar (Scherba et al. 1991).

Ultrason dalgalarının öldürme potansiyeli, denizaltı savaşlarında radarların kullanımıyla anlaşılmıştır. Denizaltından yayılan ses dalgalarının balıkları öldürdüğü görülmüştür. Bu sayede ultrasonun hücreleri bozma ve inaktif etmede kullanılması düşünülmüştür. 1960'larda yapılan araştırmalar ultrasonun mikrobiyal hücrelerle ilişkisini anlamak için yoğunlaşmıştır. Bu araştırmalarla kavitasyondan kaynaklanan parçalama zararı, ısı ve serbest radikal oluşumu tespit edilmiştir. 1975'deki araştırmalar ultrason işleminin hücre duvarını zayıflattığını ve hücre stoplazmasının dışarı boşalmasını sağladığı gözlenmiştir. 1980'lerde ultrasonun ısı işlemleri ve kimyasal maddelerle birlikte kullanılmaları araştırılmıştır (Earnshaw et al. 1995).

Ultrason işlemi esnasında başlıca aktif etki, bir sıvı içinde hava kabarcıklarının oluşumu ile sonuçlanan mekanik etkidir. Ancak kavitasyon olayı sıcaklık artışı ve moleküler hareket nedenleriyle mekanik enerjinin olduğu bir ısı oluşum prosesidir. Bundan başka enerjinin bir kısmı numunenin ısınması için absorbe edilebilir. Numunenin içerisinde ısınma olurken, ekipman duvar sıcaklığı sıvı sıcaklığından daha düşük olmaktadır. Bu, daha iyi sıcaklık dağılımı ve daha az oluşum bozukluğu ve bu nedenle ürün kalitesinin gelişmesi bakımından geleneksel ısı işlemlerden üstün bazı avantajlar sağlayabilir (Villamiel ve Jong 2000). Diğer taraftan, süt ürünlerinde ultrason uygulamasının tüketicilerin daha az işlem görmüş gıdalara olan ilgilerinden dolayı dikkat çektiği ifade edilmektedir (Villamiel et al. 1999, 2000).

Ultrason işlemi bir sıvıya uygulandığında yararlı olan veya olmayan serbest radikallerin oluşmasını sağlamaktadır. Bu işlem sonunda sudan hidroksil iyonu, hidrojen iyonu ve hidrojen peroksit meydana gelebilmektedir. Ayrıca ultrason, DNA moleküllerinde çeşitli yerlerde kırılmalar meydana getirir. Örneğin; hidroksil radikalleri polimeri bağlayan hidrojen köprülerini etkiler (Suslick 1988; Mason et al. 1994).

Kavitasyon oluşma oranı bazı parametrelerden etkilenmektedir. Örneğin; yüksek sıcaklıkta kavitasyon baloncukları daha çabuk oluşmaktadır. Bunun sebebi buhar basıncının artmasıdır. Baloncuk miktarı sıcaklık arttıkça artmaktadır. Ultrasonun dalga genişliği önemli bir parametredir ve maksimum baloncuk büyüklüğünü belirlemektedir. Düşük dalga genişliğinde baloncuklar büyük oluşmakta ve söndüklerinde yüksek

enerjiler ortaya çıkarmaktadırlar. 2.5 MHz'ın üstündeki frekanslarda kavitasyon oluşmamaktadır. Kavitasyon oluşumunu etkileyen diğer önemli faktörde, sıvı çevrenin viskozitesidir. Yüksek viskoziteli ürünlerde difüzyon kolayca bozulacağından kavitasyon oluşma derecesi düşmektedir. Viskozitenin olumsuz etkisinden etkilenmemek için, yüksek yoğunlukta düşük frekansta dalgalar kullanılması gerekmektedir. Buna alternatif olarak, sıvı ısıtıldığında viskozite azalmakta ve ultrason dalgalarının sıvı içerisine daha kolay girmeleriyle etkinlik artırılabilir (Suslick 1989).

Ultrasonun bakterisidal etkisi genellikle hücre içi kavitasyona atfedilmiştir. Bu etki, ultrason işlemi sırasında, değişen basınçlar tarafından meydana getirilen hava kabarcıklarının bir anda oluşması ve parçalanmasıyla mikromekanik şoklara neden olmasından kaynaklanmaktadır. İşlem sırasında oluşan mikromekanik şoklar, hücrelerde ve bir takım yapısal ve fonksiyonel bileşenlerde yıkımlara neden olmaktadır. Baloncukların oluşmaları ve sönmeleri sırasında oluşan yüksek basınçlar hücreleri etkilemektedir. Ayrıca oluşan sıcaklık da belli ölçüde hücre hasarında rol oynamaktadır. Sıcaklığın oluşumu bir anlıktır ve sadece baloncukun çevresi ısınmaktadır. Dolayısıyla çok az sayıda hücreyi etkilemektedir. Basınçlar ise, hücre zarını etkileyerek hücre duvarının parçalanmasına neden olmaktadır. Eğer ultrason diğer koruma teknikleriyle (ısıl işlem-kimyasal) birlikte kullanılırsa, bakteri hücresi daha fazla zarar görecektir (Scherba et al. 1991; Hoover 2000).

Gıdalardaki ısıl işleme alternatif olarak önerilen teknolojilerden biri de manotermosonikasyon (MTS) yani basınç altında ultrason dalgaları ve sıcaklığın birlikte uygulanmasıdır. MTS uygulamasının önemli ölçüde mikroorganizma ve enzimleri inaktif ettiği bildirilmiştir (Lopez et al. 1994).

Ultrason işlemine tabi tutulan bakteriler sıcaklığa daha duyarlıdır. İki işlem birlikte kullanıldığında etkinin arttığı gözlenmiştir. Sıcaklık ve ultrasonun birlikte kullanımına termosonikasyon denir. Eğer sıcaklık sıvının kaynama noktasını geçerse kavitasyon oluşmamaktadır. Çünkü bu sıcaklıkta yüksek buhar basıncı oluşmaktadır. Bunun için, sıcaklık, basınç ve ultrason işleminin birlikte kullanılması gerekmektedir. Basıncın

termosonikasyonda, kaynama noktasının üzerinde uygulanması böylece mümkün olmaktadır. Bu uygulama genellikle spor oluşturan bakterilerde (*Bacillus cereus*, *Bacillus stearothermophilus* ve *Bacillus coagulans*) kullanılmaktadır. 300 kPa basınç ve 112°C sıcaklıkla beraber ultrason işlemi uygulanırsa inaktivasyon oranı, basınç olmayan işleme göre 10 kat artmaktadır. Basınç ve termosonikasyonun birlikte uygulanmasında, hücreler yoğun titreşim ve kavitasyona maruz kalmaktadırlar. Sonuç olarak sporlarda bulunan bazı kimyasallar ve düşük molekül ağırlığındaki polipeptitler dışarı çıkmaktadırlar (Raso et al. 1994).

Mikroorganizmaları inaktif hale getirmek için gerekli olan ultrasonun enerji tüketiminin geleneksel yöntemlere göre oldukça yüksek olduğu, bu nedenle koruma tekniği olarak yüksek enerjili ultrasonun endüstriyel uygulamalara girmesi durumunda diğer tekniklerle birlikte değişik kombinasyonlarda detaylı araştırmalar yapılması gerektiği anlaşılmaktadır. Ultrason teknolojisi ile sıcaklık artışı olmadan süt içerisinde bulunan mikroorganizma ve enzimler ses dalgaları ile inaktif olmaktadır. Materyalde sıcaklık artışının olmaması, gıda bileşenlerinin olumsuz yönde etkilenmesini engellemektedir. Bu gibi işlemler gıda bileşenlerine daha az zarar verdiği için son zamanlarda tercih edilmeye başlanmıştır (Mertens ve Knorr 1992).

Ultrasonun endüstriyel uygulamaları; tekstür, viskozite ve çoğu katı veya sıvı gıdaların konsantrasyon ölçümünü; yumurta, et, meyve, sebze, süt mamülleri ve diğer ürünlerin kompozisyonunun belirlenmesini, çeşitli uygulamaların kontrolü ve görüntülenmesi için kalınlık, akış seviyesi ve sıcaklık ölçümünü ve gıda ambalajlarının zararsız olarak incelenmesini içermektedir. Ayrıca bir takım araştırmalarda ısı transferinin hızlandırılması, akışkanlardan gaz alınması, hücrelerin yıkımı, mikroorganizmaların ve enzimlerin inaktivasyonu, kurutma, filtrasyon, yüzeylerin temizlenmesi gibi direkt proses uygulamalarında incelenmiştir (Floros ve Liang 1994). Bunun yanında, karıştırma ve parçalama işlemleri, katı ve sıvı yağların emülsifikasyonu, dondurma işleminin hızlandırılması, etlerin ve şarapların olgunlaştırılması, temizleme, homojenizasyon ve sıvıların berraklaştırılmalarında da uygulanmaktadır (Mason et al. 1994; Sala et al. 1995).

Süt ve süt ürünlerinde ultrason teknolojisi tek başına veya diğer yöntemlerle kombine olarak ekipmanların temizliği, bakteri ve enzimlerin inaktivasyonu, sütün homojenizasyonu, peynir yapımında pıhtılaşma ve olgunlaşma gibi proseslerde, enzimlerin ekstraksiyonunda kullanılmaktadır. Ultrasonla muamele edilen süt ürünlerinin besin değerleri üzerine yapılan araştırma sayısı çok azdır. Mikrobiyal kalitesi yüksek, besin değeri azalmamış süt ürünleri üretimi için ultrason ve geleneksel metodların kombinasyonları üzerinde çalışılması gerekmektedir.

Süt ürünlerinin muhafazası, ürün işleme ve geliştirme ile ilgili çalışmaların laboratuvar ölçekli olarak yapılabildiği, ancak homojenizasyon ve temizleme gibi uygulamaların ise pilot ve endüstriyel ölçekli ekipmanlarla yapılabildiği, enerji tüketimi açısından ise ultrason uygulamasının genel olarak daha fazla enerji tüketimine neden olduğu belirtilmektedir. Ultrasonun süt ürünlerindeki bazı uygulamaları Çizelge 1.1'de verilmiştir (Villamiel et al. 1999, 2000).

Bilindiği gibi, süt ve süt ürünleri gıda teknolojisinde büyük öneme sahiptir. Sütlerin teknolojik ve biyolojik açıdan değerlendirilmesinde kriter olarak kullanılan enzimler ise süt kalitesinin belirlenmesinde ve uygulanan ısı işlemlerin kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. Sütün içerisinde düşük konsantrasyonlarda bulunan enzimler, üretim hatalarını ve kaliteyi etkiledikleri için büyük önem taşımaktadırlar. Sütte görülen kusurların çoğu enzimlerden kaynaklanmaktadır (Metin 1996).

Yüksek frekanslı ultrason ($10-100\text{W}/\text{cm}^2$ ve 0.1Mhz) temizleme, bakteri ve enzimlerin inaktivasyonu, galaktozoksidaz ve kimozinin ekstraksiyonu, sütün homojenizasyonu , peynir veriminin artırılması gibi bazı süt uygulamalarında kullanılmaktadır (Villamiel ve Jong 2000).

Çizelge 1.1. Ultrason Teknolojisinin Süt Ürünlerinde Başlıca Uygulamaları

Ürün	Ultrason şiddeti	Uygulama	Kullanım şekli ve beklenen faydalar
Süt	8.4 W/cm ²	Toplam bakteri ve koliform inaktivasyonu	Ultraviyole ışıkla birlikte
	150 W	<i>Staphylococcus aureus</i> ve <i>Bacillus subtilis</i> sporlarının inaktivasyonu	Sıcaklık uygulamasıyla birlikte
	---	<i>S. typhimurium</i> ve peroksidaz inaktivasyonu	Sıcaklık ve yüksek basınçla birlikte
	77.5 W/cm ²	İnsan sütünün homojenizasyonu	Yağ kaybının azaltılması
	---	<i>P. fluorescens</i> 'den kaynaklanan lipaz ve proteazın inaktivasyonu	---
Peynir	20-41 W/cm ²	Kimozin ekstraksiyonu	Enzim aktivitesinde artış
	23 W	Laktik asit bakterilerinden aminopeptidazların ekstraksiyonu	Ekstraksiyon zamanında azalış
	---	Peynir randımanında artış ve yağsız peynir üretimi	Daha iyi peynir kalitesi ve emülsiyon kapasitesinde artış
Diğer	40 W-12 kW	Şişe ve ekipmanların temizlenmesi	Sıcaklık uygulaması ile birlikte
	1.29-1.72 W/cm ²	Laktozun hidrolizi	pH kontrolü eşliğinde

Anne karnındaki yavrunun gelişimine benzer bir şekilde meyve ve sebzelerin iç yapıları ve kaliteleri de yıkıcı olmayan ultrason işlemiyle incelenmektedir (Mizrach et al. 1994; Ay ve Gunasekaran 1994; Mason et al. 1996).

Sütün çok yüksek sıcaklıklarda işlem görüp görmediğini belirlemek amacıyla bir kriter olarak kullanılan peroksidaz enzimi sadece sıcaklık etkisiyle değil, kimyasal maddeler

ve mikroorganizmaların etkisiyle de inaktif olmaktadır. Alkalen fosfataz enziminin ise ısı işlem etkisiyle inaktif olduğu sıcaklık, patojen mikroorganizmaların inaktif olduğu sıcaklıklarla paralellik göstermekte ve bu pastörizasyon normlarında sütün kimyasal bileşiminde önemli bir değişiklik olmamaktadır. Pastörize edilmiş sütlerde alkalen fosfataz enziminin varlığı pastörizasyon işleminin yapılmadığını göstermektedir. Patojen mikroorganizmaların bertaraf edilmesini sağlayan alkalen fosfataz da inaktif hale geldiğinden, bu enzimin aktivite testi ısı işlemin yeterliliği konusunda bilgi vermektedir (Metin 1996).

Ultrason işlemi için kritik faktörler ; ultrason dalgalarının yapısı, mikroorganizmalar ile maruz kalma süresi, mikroorganizmanın tipi, uygulanan gıdanın hacmi, kompozisyonu ve sıcaklığı, gıdanın heterojenliği ve koruyucu doğası (partiküllerin yapısı), koruma metodu olarak ultrasonun tek başına kullanımı ve şiddetidir. Ultrasonun iyi bir sonuç vermesi için ısı, basınç gibi işlemlerle birlikte kullanılması şarttır (Vollmer et al. 1998).

Ultrason işleminin düşük sıcaklık ile birlikte uygulanmasının avantajları vardır (Earnshaw et al. 1995).

- Daha iyi kaliteli ürünler oluşturulur.
- Ürünün tadı ve görünümünde iyileşmeler olmaktadır.
- Düşük enerji ihtiyacından dolayı maliyet azalmaktadır.

Bazen gıdaların koruyucu doğası ve karmaşıklığı bir koruma metodu olarak ultrasonun tek başına kullanımını elverişsiz kılmaktadır. Buna rağmen ultrason teknolojisi zamanımızda ve gelecekte enzimlerin ve mikroorganizmaların inaktivasyonunu içeren gıda endüstrisi uygulamalarında geniş bir alanda kullanılacaktır. Ultrason işlemi ile gıdalarda bulunan mikroorganizmaların inaktivasyonu hakkında fazla bilgi yoktur. Araştırma faaliyetleri, endüstriyel uygulamalar için büyük potansiyele sahip görünen diğer koruma metodları (sıcaklık ve basınç gibi) ile ultrason işleminin kombinasyonu üzerinde yoğunlaşmıştır (Raso et al. 1998).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Son yıllarda ultrason işlemi ve diğer alternatif gıda teknolojileri ile ilgili çalışmalar, tüketicilerin gelişmiş, kaliteli ve güvenli ürünlere olan talepleri nedeniyle artmıştır. Bu yüzden bu teknikle ilgili çok sayıda araştırmalar yapılmıştır (Martinez et al. 1987; Samari 1994; Benedito et al. 1995; Banerjee et al. 1996; Barton et al. 1996; Vercet et al. 1997; Carcel et al. 1998; Gennaro et al. 1999; Mulet et al. 1999; Pagan et al. 1999; Marcotte et al. 2000).

Ultrason uygulamasının, süt pıhtılaştırıcı enzimleri de içeren birçok enzim üzerindeki etkisi, farklı model sistemlerde çalışılmıştır. Raharintsoa et al. (1977), kimozin, pepsin ve birkaç fungal enzimin ultrason (27 kHz) işlemine karşı farklı hassasiyetlere sahip olduklarını bildirmişlerdir. Örneğin; kimozinin pıhtılaştırma aktivitesi ultrasonla muamele edilme süresinin uzamasıyla ve örneğin su ile seyreltilmesiyle azalmaktadır. Aynı araştırmacılar serum proteinler ve tampon çözeltilerin (pH = 6) kimozinin inaktivasyonunu önlediğini bildirmişlerdir. Yine aynı araştırmacıların başka bir araştırmalarında (1978), bu üç enzimin proteolitik aktivitesi, sütün pıhtılaşması ve viskozitesi üzerine ultrason işleminin etkisi çalışılmıştır. Araştırma sonucunda ultrason muamelesiyle enzimlerin proteolitik aktivitesinin genel olarak azaldığı, ultrasonla yağ globüllerinin suya olan ilgileri artırıldığından ultrasonla sütün viskozitesinin azaldığı bulunmuştur. Ultrason işleminin, peynir pıhtısının sertliğini artırdığı, özellikle domuz pepsini ve fungal enzimler kullanıldığında pıhtı oluşum sıklığını fazlaştırdığı tespit edilmiştir.

Lopez et al. (1994), peroksidaz, lipoksigenaz ve polifenol oksidaz enzimlerinin inaktivasyonu üzerine sıcaklığın, ultrason işleminin ve yüksek basıncın etkisini araştırmışlardır. Deneyler, peroksidaz için 37 - 142.6 °C 'de, lipoksigenaz için 37 - 77 °C 'de ve polifenol oksidaz için 37 - 70.7 °C 'de 20 kHz'lik frekans ve 1.5 ve 7.2 kg/cm²'lik statik basınçta gerçekleştirilmiştir. Bütün denemelerde, enzimlerin inaktivasyonu üzerine basınç ve sıcaklığın sinerjik bir etki gösterdiği belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada, ultrasonun, UHT sütlerde proteolitik bozulmaya neden olan ısıya dayanıklı enzimlere karşı önleyici etkisinin olduğu bulunmuştur (Ahvenainen et al. 1991). Enzimlerin inaktivasyonu, ultrason şiddetinin artırılmasıyla hızlanmaktadır. Kombine proseslerde de genel olarak, inaktivasyon oranı basıncın maksimuma çıkarılmasıyla artmaktadır. Bu şekilde kombine edilmiş işlemlerin ısıya dayanıklı enzimler tarafından sütte, meyve sularında ve diğer içeceklerde oluşturulan problemleri çözmede yardımcı olabileceği, ultrason (20 kHz), sıcaklık (140 °C) ve basınç (650 kPa) 'dan oluşan üçlü kombinasyonun sadece sıcaklıktan oluşan (140 °C) kontrol grubundan ekstraselüler lipaz ve proteazın aktivitesini azaltmada daha başarılı olduğu belirtilmektedir (Villamiel et al. 1999).

Diğer taraftan, düşük frekanslı yüksek şiddetli ultrason teknolojisinin kullanılmasıyla, enzimlerin mikroorganizmalardan ekstrakte edilmeleri sırasında, hücre etrafındaki sınır tabaka inceltirilerek, hücre tahrip edilmeksizin enzimler elde edilmekte ve ultrasonun direkt etkisi sonucu enzim aktivitesi artmaktadır (Villamiel et al. 1999). Kimozinin ekstraksiyon etkinliğinin, ultrason işlemiyle artırılabilmesi ultrasonun kullanımıyla (20 kHz, 36 W/cm²) ekstraksiyon zamanında %97'lik bir azalma ve aktivitesinde %53'lük bir artma olduğu belirtilmektedir (Kim ve Zayas 1989).

Süt teknolojisinde önemli fonksiyona sahip bir diğer enzim grubu olan peptidaz enzimlerinin peptidleri parçaladığı ve böylece peynirin olgunlaşması sırasında acılığın azaldığı bilinmektedir. Boquien et al. (1991), *Lactococcus lactis subsp. cremoris*'den amino peptidaz enzimini ekstrakte etmek için ultrasonik bir işlem (5.75 W/ml, 30s) geliştirmişlerdir. Bu araştırmacılar geliştirdikleri işlemin diğer işlemlere göre daha hızlı olduğunu bildirmişlerdir. Düşük frekanslı yüksek şiddetli ultrason uygulamasının, canlı hücreler üzerinde aktiviteyi artırıcı etkisi olduğu bildirilmektedir. Yapılan bir araştırmada, ultrasonun yoğurt üretiminde kullanılmasıyla, yoğurt bakterilerini uyatarak inkübasyon süresini %40 kadar azalttığı ve üretilen yoğurdun konsistens ve tekstürünün daha iyi olduğu belirtilmiştir (Mason et al. 1996).

Sıcaklığa ve manotermosonikasyona (MTS) yaban turpu peroksidazının mukavemetinde çeşitli faktörlerin etkisi, sıcaklık ve ultrason dalgalarının basınç altında eş zamanlı

uygulaması çalışılmıştır. Tamponlama amacıyla katılan sakkaroz ve gliserol ilavesi durumunda peroksidazın ısı ile işlemle daha fazla inaktif olduğu belirlenmiştir. Peroksidazın daha yüksek konsantrasyonlarda MTS'na daha az duyarlı olduğu gözlenmiştir (Lopez ve Burgos 1995).

Yapılan bir araştırmada, sütteki alkalen fosfataz, glutamiltranspeptidaz, laktoperoksidaz, laktoalbumin, laktoglobulin, kazein ve yağ üzerine sürekli akışlı yüksek yoğunluklu ultrasonun etkisi incelenmiştir. Sonuçlar benzer işlem şartlarına sahip geleneksel ısı ile işlem kullanılarak elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmış, ultrason ve sıcaklığa maruz kalan örneklerde enzim ve suda eriyebilir proteinlerde çok yüksek bir denatürasyon elde edilmiştir. Kazeinde, ultrason işlemi sonucunda herhangi bir değişiklik görülmemekle birlikte ultrason etkilerinin bir sonucu olarak yağ damlacığının boyutunda önemli bir azalma (%81.5 'den fazla) olduğu gözlenmiştir (Villamiel ve Jong 2000).

Villamiel et al. (1999), sütü önce ultrason ile muamele etmiş (8.4 W/cm^2 , 1 dakika) ve daha sonra ultraviyole radyasyona tabi tutmuşlar (20 s) ve sonuçta total bakterinin %93, koliform popülasyonunun ise %99.5 oranında tahrip olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacılar, sırasıyla 1 dakikalık ultrasonik muamele ve 20 saniyelik ultraviyole radyasyondan sonra pıhtılaşma süresinin %10-25 uzadığını saptamışlardır. Pıhtılaşma süresinin uzamasının proteinlerin denatürasyonuna bağlanabileceği, ultraviyole radyasyondan önce sütün ultrasonla muamele edilmesiyle, sütün tadında çok hafif pişmiş tat ve aroma meydana geldiği belirtilmiştir. Sonuçta bu kombinasyonun geleneksel işleme metotlarına göre fazla bir avantaj sağlamadığı, çünkü koliform inaktivasyonu tamamen gerçekleştiremediği görülmüştür. Ancak pişmiş süt tat ve aromasının, işlem sırasında süt sıcaklığının yeterince kontrol edilemeyişinden veya ultraviyole radyasyon sırasında oluşan değişimler nedeniyle de meydana gelmiş olabileceği belirtilmektedir.

Farklı mikroorganizmaların ultrason işlemine dayanma güçleri incelenmiştir. Büyük hücreler daha duyarlı olduğu gözlenmiştir. Hücrenin yüzey alanı genişledikçe baloncukların bombardıman etkileri daha geniş alana yayılmış ve hücre zararı daha

fazla olmuştur. Ayrıca Gram(+) hücreler, Gram(-) hücrelerden daha dayanıklı oldukları görülmüştür. Bu dayanıklılığın, Gram(+) bakteri hücresinde bulunan kalın hücre duvarından kaynaklandığı anlaşılmıştır. Ayrıca sporların vejetatif hücrelerden daha dirençli olduğu belirlenmiştir (Sanz et al. 1985; Scherba et al. 1991).

Başka bir araştırmada da, sürekli ultrason işlemi sütteki önemli bakterilerin inaktivasyonunda yüksek frekanslı olarak uygulanmış ve *Pseudomonas fluorescens*'in (Gram negatif) *Streptococcus thermophilus*'tan (Gram pozitif) daha az dirençli olduğu tespit edilmiştir. Süte uygulanan sürekli ultrason işleminin sonuçları süt prosesi için ümit verici bir teknik olarak kendini göstermiştir (Villamiel ve Jong 2000).

Sitrat fosfat tamponunda (pH:7.0) *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 üzerine basınç altında MS'nin inaktivasyon etkisi araştırılmış ve bu işlemin öldürücü etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Manas et al. 2000). Diğer bir araştırmada ise, çikolatalı süt ve %0.1'lik ince film şeklindeki bir pepton solüsyonunda *Salmonella* inaktivasyonu incelenmiştir. Fizikokimyasal özelliklerinden dolayı çikolatada sınırlı kavitasyon etkisi olduğundan *Salmonella* inaktivasyonu, peptonlu suda daha fazla olmuştur. 10 dakikalık bir ultrason uygulamasıyla peptonlu suda 2.5 logaritmik birimlik *Salmonella eastbourne* redüksiyonu gerçekleşmiştir. Ultrason işlemi olmaksızın çikolatalı sütte 2.6 logaritmik birimlik bir azalma ancak 71°C 'de 12 saatlik bir ısı işlemle sağlanabilmektedir. Aynı araştırmacıların yaptıkları başka bir çalışmada ise, peptonlu suda süspanse edilmiş *Salmonella* popülasyonuna 10 dakikalık ultrason işlemi uygulanmış ve 4 logaritmik birimlik azalma meydana gelmiştir. Bununla beraber, çikolatalı sütte 30 dakikalık işlem sonunda *Salmonella*'da 0.8 logaritmik birimlik düşüş olmuştur. Araştırma, çikolatalı sütün ultrason işlemine karşı mikroorganizmaların direncini artırdığını göstermiştir (Lee et al. 1989).

Listeria monocytogenes'in direnci üzerine basınçla birlikte ultrason dalgalarının NaCl varlığında, çözücü madde, sıcaklık işlemi ve pH'nın etkileri değerlendirilmiştir. Ayrıca manosonikasyon/manotermosonikasyon ile *Listeria monocytogenes*'in inaktivasyonu üzerine (sıcaklık, basınç ve dalga genişliği) işlem parametrelerinin etkileri incelenmiştir. Sonuçlar, meydana gelen zararın farklı mekanizmalar içeren manosonikasyon ve

sıcaklık işlemi tarafından oluştuğunu göstermiştir. Manosonikasyon işleminin geri dönüşümsüz reaksiyonlara neden olduğu ve sıcaklık işleminden de nispeten bağımsız olduğu tespit edilmiştir. Bakteri inaktivasyonunda sıcaklığın yerine ultrason dalgalarının yoğunluğunun artırılmasıyla manosonikasyon işleminin daha etkili olacağı belirlenmiştir (Pagan et al. 1999).

Ordenez et al.(1984), *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus durans* bakterileri üzerine ultrason işlemi (20 kHz/160 W'lık) ve sıcaklığın (5-62 °C) etkilerini araştırmışlardır. Bakteri inaktivasyonunda iki işlemin birlikte kullanımı tek başına kullanımlarından daha etkili olmuştur. Ultrason ve sıcaklığın beraber kullanılması termodurik enterokok populasyonunu, tek başına sıcaklık uygulamasına göre yaklaşık 1 logaritmik birim azaltmıştır. Aynı araştırmacıların diğer bir çalışmasında benzer uygulama (termo-ultrasonikasyon), 0.05 M fosfat tamponunda ve UHT süt içerisinde süspanse edilen *Staphylococcus aureus* üzerinde yapılmıştır. Yapılan işlemde ısı uygulamasının yalnız başına uygulanmasına göre, sıcaklık ve ultrason işlemi birlikteyken tampon içerisinde bulunan bakterilerin D değerlerini %63 oranda, UHT sütte ise %43 oranda azaltmıştır.

Garcia et al. (1989), süt ve diğer gıdaların sterilizasyonunda uygulanan sıcaklığın azaltılması için bir alternatif metot olarak ultrason işlemini incelemişlerdir. *Bacillus subtilis*'in iki tip sporu gliserol, su ve kaymaklı süt içerisinde süspanse edilmiştir. Belli bir sıcaklık aralığında ultrason işlemiyle veya ultrason işlemi olmadan ve ayrıca sıcaklık ve ultrasonun birlikte uygulanması (termo-ultrasonikasyon) sonucu desimal ölüm zamanlarındaki azalmalar belirlenmiştir. Kremalı sütte 31°C'deki ultrason işlemi D değerlerini düşük oranda azaltmıştır. Ultrason ve sıcaklık işlemi (90-102 °C) birlikte uygulandığında, tek başına sıcaklık işlemine oranla %40 azalmanın olduğu gözlenmiştir. Ultrason işlemi sıcaklık ile birlikteyken sinerjistik bir etki göstermiştir. Saf su içerisinde her iki tip sporlar için 70-95°C'lerde yalnız başına sıcaklık işlemine göre D değerlerini %72.4-99.9 oranda azaltmıştır. Suyun sıcaklığı 95°C üzerine çıkarıldığında termo-ultrasonikasyonun sinerjistik etkisi azalmıştır. Sütte ve gliserolde yüksek sıcaklıklarda uygulanan termo-ultrasonikasyon işleminin sinerjistik etkisi değişmemiştir. Sıcaklık ve termo-ultrasonikasyondaki z değerleri birbirine çok yakın

bulunmuştur. Termo-ultrasonikasyon işlemi D değerlerini iki tür için gliserolde %63.4-77'ye kadar, sütte %34.6-85,1'e kadar azaltmıştır. Suyun sıcaklığının artışıyla sinerjistik etkideki azalma suda kavitasyon yoğunluğunun giderek azalmasına atfedilmiştir. Sütün sterilizasyonu için termo-ultrasonikasyon uygulaması, kavitasyon üzerindeki etkisinden dolayı pozitif basıncın kullanılmasının yararlı olacağı belirlenmiştir. Aynı araştırmacıların diğer bir çalışmasında termoultrasonun (5 W/ml) *Bacillus subtilis* üzerindeki etkisini saf su, gliserol ve sütte araştırmışlar, özellikle suda, 70-95 °C 'de sporların inaktivasyonunda çok etkili olduğunu bulmuşlardır. D değeri ısıtma işlemine göre % 99.9 oranında azalmıştır. Kavitasyon etkisinin kaynama sıcaklığına yakın derecelerde baloncukların çarpışma hızlarının düşmesi nedeniyle azaldığı belirtilmiştir.

Wrigley ve Llorca (1992), 20, 40 ve 50 °C 'de çalışan su banyosunda yapılan ultrason işlemiyle yağsız sütteki *Salmonella* Typhimurium'un etkili bir şekilde inaktif edildiğini belirtmişlerdir. Ultrason ile işlem görmüş ve görmemiş süt örneklerinin çözünabilir protein konsantrasyonları arasında önemli farklılık bulunmadığı saptanmıştır.

Statik basınç altında ultrason işlemi ile *Bacillus subtilis* sporlarının inaktivasyonu ve kombine edilmiş bir manosonikasyon ısıtma işleminin incelendiği bir çalışmada, manosonikasyon (MS) işlemlerinin bakteri sporları üzerine olan etkisinin işlem sıcaklığı, ultrason dalgalarının genişliği ve statik basınca bağlı olduğu belirlenmiştir. 500 kPa, 117 µm genişliğinde 12 dakikalık bir manosonikasyon işlemi yaklaşık olarak %99 oranında inaktivasyona yol açmıştır. 500 kPa üstündeki basınç artışı, inaktivasyon oranını artırmamış, 90µm'de (20 kHz, 300 kPa, 70 °C, 12 dak.) manosonikasyon işlemi *Bacillus subtilis* spor popülasyonunun %70'ini inaktif etmesine karşın, 150 µm'de bu popülasyonun %99'unu inaktif etmiştir (Raso et al. 1998).

Ultrason işlemi sadece sıcaklık ve basınçla birlikte mikroorganizmaların inaktivasyonunda kullanılmamaktadır. Ayrıca kimyasal uygulamayla beraber de uygulanabilmektedir. Klor gibi kimyasallar, gıda ürünleri ve bunların yapıldığı yüzeylerin temizlenmesinde kullanılmaktadır. Lillard (1993), tarafından yapılan bir araştırmada, kümes hayvanları derisine inoküle edilen *Salmonella*'nın ultrason işlemiyle inaktivasyonu incelenmiştir. Bunun için, klorlu su içerisinde ultrason işlemi

uygulanmış ve bakterinin 2.5-4 logaritmik birim azaldığını tespit etmiştir. Yalnızca klorlu su banyosuna daldırılan kümes hayvanları etlerindeki *Salmonella*'da 1 logaritmik birimden daha az düşüş meydana gelmiş ve sadece ultrason işlemine maruz bırakıldığında ise 1-1.5 logaritmik birimlik azalma olduğu gözlenmiştir.

Salmonella Typhimurium yağsız süt ve beyin-kalp karıştırılmış et suyu içinde geçici olarak bekletilerek, bir ultrasonik su banyosu içerisine yerleştirilmiş ve bazı bakterilerin zamana bağlı olarak 2-3 logaritmik birim azaldığı belirlenmiştir. Ultrason dalgalarıyla inaktivasyon işleminin etkinliğinin arttığı ve indirekt ultrason dalga işleminin bazı gıdalarda *Salmonella* inaktivasyonunda etkili olduğu belirtilmiştir (Wrigley et al. 1992).

Bakterilerin sulu süspansiyonları (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*), fungus (*Trichophyton mentagrophytes*) ve virusler (*Feline herpesvirus* tip 1 ve *Feline calicivirus*) ultrasona (26 kHz) maruz bırakılarak ultrasonun etkisi araştırılmış ve *E. coli* üzerine önemli etkisinin olduğu, *Feline calicivirus* üzerine ise ultrasonun gözle görülebilir bir etkisinin olmadığı tespit edilmiş, fakat ultrason şiddetiyle *Feline herpesvirus* inaktivasyonunda önemli bir azalmanın olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar ultrasonun su içinde bulunabilen hastalık ajanlarını inaktif etmede düşük kHz frekans alanında iyi etkiye sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır (Scherba et al. 1991).

Ordenez et al. (1987), ultrason (20 kHz, 3.75 W/ml) ve sıcaklığın (50.3-56.7°C) kombine edilmiş şeklinin fosfat tamponu ve UHT süt içerisindeki *Staphylococcus aureus*'un canlılığı üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Bu kombinasyon sayesinde D değeri, geleneksel ısıtma işlemine göre fosfat tamponunda %63 ve sütte %43 oranında düşmüştür. Bu farklılığa ultrason işlemiyle bakterilerin öldürülmesinde süütün koruyucu etki yapması neden gösterilmektedir.

Gıdanın yapısında bulunan mikroorganizmalara ve tampon içerisinde süspanse edilen mikroorganizmalara ultrason işlemi uygulanmıştır. Bunun sonucunda bakteri hücrelerinin veya sporlarının inaktivasyonunda gıdanın koruyucu doğasının etkili olduğu belirlenmiştir. Gıdanın heterojen yapısı, partiküller ve gıdadaki diğer bileşenler

koruyucu metot olarak ultrason işleminin kullanımını azaltmaktadır. Bu engellemeler ultrason işleminin gelişme olasılığını azaltmasına rağmen, diğer koruyucu yöntemlerle (sıcaklık ve basınç) birlikte endüstride kullanılabilir (Hoover 2000).

Villamiel et al. (1999)' nın yaptıkları bir araştırmada sütün 60°C 'de ultrasonla homojenize edilmesiyle ortalama yağ globül çapının 1 µm'ye düşürülebileceğinin ileri sürüldüğünü, aynı araştırmacıların diğer bir araştırmasında da ultrasonun sütün homojenizasyonu için kullanılmasıyla peynir randımanının en az %5 arttığını ve bunun işletmenin kârlılığını artıracığı ifade edilmektedir. Yine bu sayede peynir içinde suyun dağılımı daha düzgün olmakta ve peynirin kalitesi artmaktadır. Aynı araştırmacılar ultrason ile yapılan homojenizasyonla yağ globül membranı üzerinde daha fazla kazein ve serum proteini bağlanma bölgeleri olduğunu ileri sürmüşlerdir. Geleneksel yöntemlerle yapılan homojenizasyon işlemiyle ise, yağ globüllerinin hidrofilik membran özelliklerinin daha az stabil olduğunu ve önceki bağlanmaların burada fazla oluşmadığını bildirmiştir. Sütün, ultrason ile homojenizasyonu geleneksel homojenizasyona göre daha fazla enerji tüketmesine rağmen, bu teknik hem peynir verimini artırmakta hem de kaliteyi yükseltmektedir. Geleneksel homojenizasyonla üretilen peynir, yüksek su içeriğine sahip olmakta, konsistens ve elastikiyet ise zayıf kalmaktadır.

Süt endüstrisinde ekipman temizliği ve sütün homojenizasyonunda yüksek şiddetli ultrason (≤ 0.1 MHz, 10-1000 W/cm²) başarıyla, fazla enerji tüketimi olmaksızın kullanılmaktadır (Villamiel et al. 2000). Stone ve Fryer (1984), soğutulmuş çiğ süt içerisindeki kümelenmiş bakterileri dağıtmak için kesikli bir ultrasonik temizleyici tasarlamışlardır. Bu ultrasonik sistem, geleneksel karıştırma metodu kadar etkili olması yanında, bir defada çok sayıda örneğin bu şekilde temizlenmesini de mümkün kılmıştır. Villamiel et al. (1999), bir araştırmacı tarafından Finlandiya'da Nivala peynir fabrikasında peynir kalıplarının temizlenmesi için bir ultrasonik yıkama makinası geliştirildiğini, diğer bir araştırmacı tarafından aynı amaç için başka bir ultrasonik yıkama makinası önerildiğini aktarmaktadır. Kivela (1996) ise enerji tüketiminin %25 azaltıldığı, peynir kalıplarının hasar görmediği ve gürültü seviyesinin daha düşük olduğu bir ultrasonik temizleyici (12kW, 65-70°C) önermiştir.

Benedito et al. (2000), Mahon peynirinin, olgunlaşma derecesinin, ultrason kullanarak kolaylıkla ve doğru bir şekilde ölçülebileceğini belirtmektedirler. Aynı araştırmacılar Parmesan peynirinin kesim zamanını belirlemede de ultrasonun kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar ayrıca geliştirdikleri metodun geleneksel metotlara göre kolay, hızlı ve peynirde tahribat yapmadığını bildirmişlerdir.

Carcel et al. (1998) süt ürünlerinin yapımında düşük yoğunluklu ultrason uygulamasını araştırmışlardır. Gıdaların reolojik özelliklerin belirlenmesi, ambalajlanmış ürünlerin kontrolü ve fabrikada tortuların tespit edilmesinde bu işlemde faydalanmışlardır. Peynir yapımında sütün koagülasyonunda, ekmek hamuru veya peynirin reolojik özelliklerinin değerlendirilmesinde ultrason çalışılmıştır. Ultrason işlemi ve reolojik ölçümler aralarında iyi korelasyon göstermişlerdir. Ultrasonun alıcı prototipini yüksek sıcaklıkta sürekli akış proseslerinde ince tabakalı tortuların (0.5-6.0 mm kalınlığında) ölçümünde kullanmak için geliştirmişlerdir.

Ultrason işlemi süt ve ürünlerinden başka tahıl ürünlerinde de kullanılmaktadır. Buğday un-su sistemlerinin fiziksel özelliklerini değerlendirmede orijinal bir metot olan, yüksek frekans, düşük güçte ultrason kullanılmış, hamurda farklı hidrasyonlardaki (2-10 MHz aralığında) ultrason dalgalarının yayılma, daralma, vizkoelastik hızları değerlendirilmiş ve serbest suyun varlığına göre %53 su içeriği kritik olarak bulunmuştur (Letang et al. 2001).

Daha yüksek kHz'lerde frekans uygulamasının gıda ürününe nasıl bir etki göstereceği araştırma konusudur. Ayrıca Scherba et al. (1991)'a göre yüksek kHz'lerin sıvı gıdalarda serbest radikallerin oluşumuna ve DNA gibi biyolojik materyalin etkilenmesine yol açabileceğini belirtilmiştir.

Literatür taramasından; ultrasonla ilgili olarak yapılan çalışmaların genellikle mikrobiyolojik ve enzimatik değişimler üzerinde yoğunlaştığı, kimyasal değişimler üzerinde detaylı araştırmaların çok az olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle ultrasonla işlem görmüş süt ürünlerinin güvenilirliği ve besin değerleri üzerinde çalışmalar

yapılması gerekmektedir. Ultrasonun diğer proseslerle (ultraviole, radyasyon, ısı ve yüksek basınç) kombine edilmiş şeklinin çok etkili olduğunun ispat edildiği, ultrasonun tek başına ticari bir proses olmasının zor olacağı, ancak diğer proseslerle kombine edilmiş şeklinin süt endüstrisinde çok daha fazla potansiyele sahip olduğu ifade edilmektedir. Ultrason yardımıyla mikroorganizmalardan enzimler serbest hale geçerken hücrenin canlılığını koruyabildiği belirtilerek bu uygulamanın peynirlerin olgunlaştırılmasında ve yoğurt benzeri fermentasyon ürünlerinde kullanılabileceği, peynir yapımında sütün bu yolla homojenize edilebileceği, enerji tüketiminin yüksek olmasına karşın peynir kalitesi ve veriminin bu sayede yükseltilebileceği anlaşılmıştır.

Bu araştırmada, süt için önem arz eden laktoperoksidaz ve alkalin fosfataz enzimlerinin, ısı işlemlere alternatif olarak, ısı olmayan ultrason işlemi ile inaktif edileceği optimum sıcaklık, süre ve ultrason dalga şiddeti belirlenmesi amaçlanmaktadır. Böylece, ısı işlem görmüş sütlerde meydana gelen bazı olumsuz faktörlerin ortadan kaldırılması düşünülmektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3. 1. Materyal

Araştırmada, materyal olarak saf laktoperoksidaz (Sigma L-2005) ve alkalen fosfataz (Sigma P-5395) enzimi ve analitik derecede saf kimyasal maddeler kullanılmıştır.

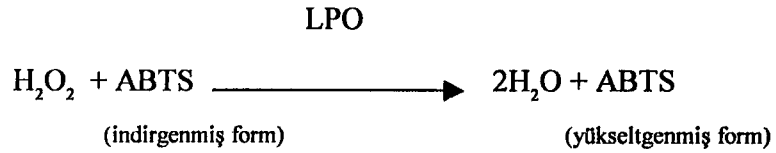
3. 2. Metot

3. 2. 1. Ultrason İşlemi

Alkalen fosfataz ve Laktoperoksidaz enzimlerinin inaktivasyonu için 20 kHz sabit frekansta çalışan ultrason cihazı (Cole-Parmer Instrument Company, USA) kullanılmıştır. Bu cihaz 50 Hz'lik düz elektrik akımını 20 kHz'lik yüksek dalga genişliğini elektriksel güce çevirmektedir. Ultrasonla enzim inaktivasyonu için, kontrole ilaveten 20, 40, 60 ve 80 olmak üzere beş farklı dalga genişliği (amplitude), 30, 60, 90 ve 120s olmak üzere dört farklı işlem zamanı ve 20 ve 40°C olmak üzere iki farklı işlem sıcaklığı kullanılmıştır. Ultrason işleminde kullanılan 20, 40, 60 ve 80 olan dalga genişliği değerleri yaklaşık olarak sırasıyla 90, 180, 270 ve 360 W' a karşılık gelmektedir (Wu et al., 2001).

3. 2. 2. Laktoperoksidaz Enzim Aktivitesi Tayini

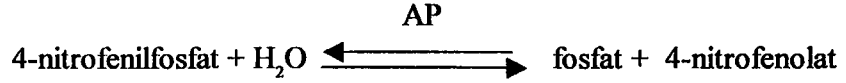
Laktoperoksidaz enziminin aktivite ölçümü, Shindler ve Bardsler (1975) yönteminin bazı modifikasyonları sonucu belirlenen işlemler ile yapılmıştır. Bu yöntem, H_2O_2 tarafından 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) kromojenik substratın yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 412 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır (Kumar ve Bahatla 1995).



Laktoperoksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan 0.1M Na₂HPO₄ tamponu, pH:6.0'ya ayarlanmıştır. Daha sonra bu tampondan 10 ml alınarak, içerisine saf laktoperoksidaz (1mg'ı 97 EU değerinde) enziminden 1mg kadar ilave edilmiştir. İki dakika süreyle homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Geri kalan tampon çözeltisine konsantrasyonu 1mM olacak şekilde ABTS katılarak karıştırılmıştır. Ayrıca saf su içerisinde 3,2 mM konsantrasyonda H₂O₂ çözeltisi hazırlanmıştır. Ultrason işlemi uygulamak için enzim çözeltisinden 0.1 ml alınarak, içerisinde 50 ml 0.1M Na₂HPO₄ pH: 6.0 tamponu bulunan behere konulmuştur. Ultrason cihazının probu bu karışıma batırılarak dalga genişliği, sıcaklık ve süre kombinasyonları kullanılmıştır. Ultrason işlemi uygulanmış örneklerden yaklaşık 10ml'lik temsili numuneler alınmıştır. 3 ml'lik spektrofotometre küvetine 2,8 ml 1mM ABTS ve 3,2 mM H₂O₂ pipetlenmiştir. Temsili numuneden 0.1 ml enzim ilave edilir edilmez kronometre çalıştırılmıştır. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 0.1 ml 0.1M Na₂HPO₄ pH: 6.0 tamponu kullanılmıştır. İlk absorbens değeri ve 1 dakika sonraki absorbens değeri kaydedilmiştir. Aradaki fark alınarak absorbanstaki her 0.001 birimlik değişme 1 EU(enzim ünitesi) olarak değerlendirilmiştir.

3. 2. 3. Alkalen Fosfataz Enzim Aktivitesi Tayini

Alkalen fosfataz (AP) enziminin aktivite ölçümü, McComb et al. (1979)' ın belirttiği metoda göre yapılmıştır. Bu yöntem, p-nitrofenil fosfat (nNPP) substratının su ile reaksiyona girerek AP eşliğinde oluşan renkli bileşiğin (p-nitrofenolat) meydana getirdiği absorbens artışının 400 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır (Chavarri et al. 1998).



Alkalen fosfataz enzim aktivite testinde kullanılmak üzere, 0.9 M 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) tampon çözeltisi kullanılmıştır. AMP 35 °C'de pH 10.45'e ayarlanmıştır. 250 ml AMP içerisinde 15,8 mM konsantrasyonda olacak şekilde nNPP (p-nitrofenil fosfat) çözeltisi hazırlanmıştır. Saf alkalen fosfataz (1mg'ı 3,5 EU değerinde) enziminden 15 mg tartılarak 5 ml AMP'ye katılmıştır. 2 dakika yeterince homojen karışım oluşuncaya kadar karıştırılmıştır. Bu karışımdan 0.1 ml alınarak içerisinde 40ml AMP çözeltisi bulunan behere konulmuştur. Ultrason cihazında belirlenen dalga genişliği (20, 40, 60 ve 80), sıcaklık(20 ve 40°C) ve sürelerde (30, 60, 90 ve 120 s) ses dalgaları uygulanmıştır. Her örnekten yaklaşık 10 ml olmak üzere temsili numune alınmıştır. Alınan bu numunelerden spektrofotometre cihazında kör için, küvete 2,9 ml AMP ve nNPP karışımı, enzim yerine 0.1 ml AMP ilave edilmiştir. Aktivite tayini ölçümünde, küvete 0.1 ml AMP yerine 0.1 ml ultrasona maruz bırakılan alkalen fosfataz enzimi çözeltisinden ilave edildikten sonra kronometre çalıştırılmıştır. AP ilave edilir edilmez 400 nm'de absorbanstaki 1 dakikalık artış enzim ünitesi olarak kaydedilmiştir. Enzim katıldıktan sonraki ilk absorbans değeri ve 1 dakika sonraki okunan absorbans değeri arasındaki fark alınarak, her 0.001 birim 1 EU olarak değerlendirilmiştir.

3. 3. Denemenin Düzenlenmesi

Araştırmada biri kontrol grubu (ultrason işlemi uygulanmamış) olmak üzere 20, 40, 60 ve 80 olmak üzere beş farklı ses dalga seviyesi (amplitude), 20 ve 40°C olmak üzere iki farklı sıcaklık ile 30, 60, 90 ve 120 s olmak üzere dört farklı işlem zamanı faktör olarak seçilmiştir. Araştırma, 5x2x4 faktoriyel düzeninde 2 tekerrürlü olarak Tam Şansa Bağlı Deneme planına göre yürütülmüştür.

3. 4. İstatistiki Analizler

Araştırma sonucu elde edilen bütün değerler, deneme desenine uygun olarak hazırlanan tablolar halinde verilmiştir. Varyans analizi, 2 tekerrürlü Tam Şansa Bağlı Faktöriyel Deneme Planı ile SPSS Paket programında analiz edilmiştir. Denemeden alınan ham değerler varyans analizine tabi tutularak, önemli bulunan ana varyasyon kaynaklarının ortalamaları Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile karşılaştırılmıştır. İstatistik analiz sonuçları, tablolar halinde özetlenmiş, önemli bulunan interaksiyonlar ise şekil üzerinde tartışılmıştır (Yıldız ve Bircan 1994).



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4. 1. Denemede Kullanılan Laktoperoksidaz ve Alkalen Fosfataz Enzimine Ait Analiz Sonuçları

Araştırmada farklı dalga genişliği, sıcaklık ve sürelerde ultrason uygulanmış LPO ve AP enzimlerinin aktiviteleri ortalama enzim ünitesi (EU) olarak çizelge 4.1'de verilmiştir. Aynı çizelgede ultrason işlemi uygulanmamış (kontrol) ortalama EU değerleri de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı dalga genişliği, sıcaklık ve sürelerde ultrason uygulanmış LPO ve AP enzimlerinin aktiviteleri (EU)

Dalga genişliği (%)	İşlem sıcaklığı (°C)	İşlem zamanı (s)	LPO (EU)	AP (EU)
-	-	-	30.50	9.50
20	20	30	26.50	8.50
20	20	60	22.00	7.50
20	20	90	16.50	7.00
20	20	120	13.50	6.50
40	20	30	24.00	7.00
40	20	60	16.50	6.00
40	20	90	14.50	5.00
40	20	120	15.00	5.00
60	20	30	15.50	5.00
60	20	60	13.00	4.25
60	20	90	13.50	4.00
60	20	120	11.50	3.00
80	20	30	10.00	5.00
80	20	60	9.00	5.00
80	20	90	8.00	4.00
80	20	120	9.00	3.50
20	40	30	21.00	7.00
20	40	60	15.50	6.25
20	40	90	14.50	6.00
20	40	120	13.50	5.25

Çizelge 4. 1. (devamı)

40	40	30	18.00	6.50
40	40	60	13.50	5.00
40	40	90	9.50	4.50
40	40	120	8.00	3.00
60	40	30	15.00	6.00
60	40	60	9.00	3.75
60	40	90	7.00	3.00
60	40	120	6.00	2.50
80	40	30	7.50	4.25
80	40	60	5.00	3.75
80	40	90	4.50	3.00
80	40	120	2.00	2.00

-. Ultrason işlemi uygulanmamış kontrol

Farklı dalga genişliği, farklı sıcaklık ve sürelerde ultrason işlemi uygulanmış LPO enzim aktivitesine ait varyans analiz sonuçları çizelge 4.2'de ve AP enzimine ait varyans analiz sonuçları da çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4. 2. Farklı dalga genişliği, farklı sıcaklık ve farklı sürelerde ultrason işlemi uygulanmış LPO enzim aktivitesine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Dalga genişliği (A)	4	1279.425	383.348**
Sıcaklık (B)	1	234.613	70.296**
Süre (C)	3	134.046	40.164**
A x B	4	16.237	4.865**
A x C	12	15.275	4.577**
B x C	3	0.846	0.253
A x B x C	12	5.471	1.639
Hata	40	3.338	
Genel			

(**) P<0.01 seviyesinde önemli

Çizelge 4. 3. Farklı dalga genişliği, farklı sıcaklık ve farklı sürelerde ultrason işlemi uygulanmış AP enzim aktivitesine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Dalga genişliği (A)	4	89.206	303.681 ^{**}
Sıcaklık (B)	1	10.513	35.787 ^{**}
Süre (C)	3	12.725	43.319 ^{**}
A x B	4	1.262	4.298 ^{**}
A x C	12	1.058	3.603 ^{**}
B x C	3	0.337	1.149
A x B x C	12	0.181	0.617
Hata	40	0.294	
Genel			

(^{**}) P<0.01 seviyesinde önemli

Çizelge 4. 2 ve 4. 3 ‘ de görüldüğü gibi, denemede kullanılan LPO ve AP enzimleri üzerine, ana varyasyon kaynaklarından dalga genişliği (A), sıcaklık (B) , süre (C) ve dalga genişliği x sıcaklık (AxB) ile dalga genişliği x süre (AxC) interaksiyonları P < 0.01 seviyesinde önemli bulunmuştur. Farklı dalga genişliğinde LPO ve AP enzim aktiviteleri değerlerine ait ortalamalarının Duncan Çoklu Karşılaştırma Test sonuçları çizelge 4. 4’ de verilmiştir.

Çizelge 4. 4. Farklı dalga genişliğinde LPO ve AP enzim aktiviteleri değerlerine ait ortalamalarının Duncan Çoklu Karşılaştırma Test sonuçları (P<0.01)

Dalga genişliği (%)	AP (EU)	LPO (EU)
Kontrol	9.500a	30.500a
20	6.750b	17.875b
40	5.250c	14.875c
60	3.938d	11.313d
80	3.813d	6.875e

Çizelge 4. 4' de verilen sonuçlara göre, ultrason işlemi uygulanmış enzim aktivite değerleri ile ultrason işlemi uygulanmamış (LPO: 30.5 EU ve AP: 9.5 EU) aktivite değerleri karşılaştırıldığı zaman, hem LPO hem de AP enzimlerine uygulanan dalga genişliği seviyesinin arttıkça, enzim aktivite değerlerinin azaldığı görülmektedir. Başka bir ifadeyle, uygulanan dalga genişliği seviyelerinin artması, enzim inaktivasyonunu artırmaktadır (Villamiel et al. 1999). Her iki enzimde de, uygulanan dalga genişliği seviyeleri arasında, en yüksek değer % 20 seviyesinde (AP: 6.750; LPO: 17.875) elde edilirken, en düşük değer % 80 seviyesinde (AP: 3.813; LPO: 6.875) elde edilmiştir. Yapılan bir araştırmada, kimosin, pepsin ve çeşitli fungal kaynaklı enzimlerin inaktivasyonu için 27 kHz 'lik bir frekans kullanılmış ve her enzimin uygulanan frekansta (27 kHz), farklı oranlarda inaktif olduğu ve dalga genişliği seviyelerinin artışına paralel olarak da enzim inaktivasyonunun arttığı belirlenmiştir (Raharintsoa et al. 1977). Mevcut bu çalışmamızda elde edilen sonuçlar, enzim inaktivasyonu üzerine ultrason işleminin etkilerinin çalışıldığı diğer araştırmalarda elde edilen sonuçlara benzer bulunmuştur.

Ultrason işleminin etki mekanizması, sıvı içerisindeki kavitasyon olayına atfedilmektedir. Başka bir ifadeyle, ultrasonik dalgalar sıvı içerisinde gaz kabarcıkları (kavitasyon) oluşturmakta ve oluşan bu gaz kabarcıklarının sayısına ve hızına bağlı olarak enzimlerin inaktivasyonu artmakta veya azalmaktadır. Oluşan bu gaz kabarcıkları, sıvı ortamda, mikro mekaniksel şoklar meydana getirmekte (Butz ve Tauscher 2001) ve bu mikro mekaniksel şoklardan dolayı enzimler ve diğer hücre bileşenleri inaktif olmaktadır.

Farklı sıcaklıklarda LPO ve AP enzim aktiviteleri değerlerine ait ortalamalarının Duncan Çoklu Karşılaştırma Test sonuçları çizelge 4.5' de verilmiştir. Çizelge 4.5'den de görüldüğü gibi, 40°C'de elde edilen değerler (AP: 5.487; LPO: 14.575), 20°C' de elde edilen değerlere (AP: 6.212; LPO: 18.000) göre daha düşük çıkmıştır.

Çizelge 4. 5. Farklı sıcaklıklarda ultrason işlemi uygulanmış LPO ve AP enzim aktiviteleri değerlerine ait ortalamalarının Duncan Çoklu Karşılaştırma Test sonuçları ($P<0.01$)

Sıcaklık (°C)	AP (EU)	LPO (EU)
20	6.212a	18.000a
40	5.487b	14.575b

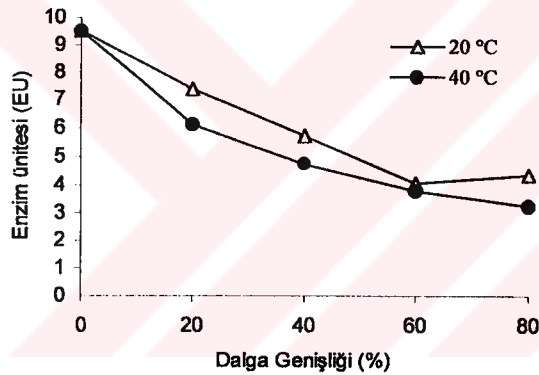
Ultrason işleminin sıcaklıkla birlikte uygulanması sinergist etki oluşturmaktadır (Villamiel et al. 1999). Çizelge 4.5 'den de görüldüğü üzere, yüksek sıcaklıkta (40°C), düşük sıcaklığa göre (20°C) enzim inaktivasyonu daha fazla olmuştur. Etkin bir inaktivasyon elde etmek için ultrason işlemiyle birlikte sıcaklık uygulaması yaygın olarak kullanılmaktadır (Earnshaw et al. 1995; Lopez et al. 1994). Yapılan bir çalışmada, lipaz ve proteaz enzimleri üzerine ultrason ve sıcaklık kombinasyonunun, tek başına uygulanan ısıl işleminden daha etkili bir inaktivasyon sağladığı belirlenmiştir (Vercet et al. 1997). Ultrason işlemi ile birlikte uygulanan sıcaklık derecesi, normal muhafaza metodu olan ısıl işlemdeki sıcaklık derecesinden çok daha düşük olduğu için, yüksek sıcaklıktan kaynaklanan bazı olumsuzluklar da giderilmiş olmaktadır.

Farklı sürelerde LPO ve AP enzim aktiviteleri değerlerine ait ortalamalarının Duncan Çoklu Karşılaştırma Test sonuçları çizelge 4.6' da verilmiştir. Çizelge 4.6'dan görüldüğü gibi, işlem zamanının artmasıyla birlikte enzim inaktivasyonu da buna paralel olarak artmakta ve enzim inaktivasyonu üzerine, enzimlerin ultrasona maruz kalma sürelerinin, sıcaklıktan daha etkili olduğu görülmektedir. Diğer gıda proseslerinde olduğu gibi, burada da, işlem zamanı uzadıkça söz konusu işlemin etkinliği de buna paralel olarak artmaktadır. Bununla birlikte, uzun süreli uygulanan ultrasonik işlemlerden sonra, ultrasona maruz kalan enzimlerin proteolitik aktivitelerinde azalma olduğu belirtilmektedir (Villamiel ve Jong 2000).

Çizelge 4. 6. Farklı sürelerde ultrason işlemi uygulanmış LPO ve AP enzim aktiviteleri değerlerine ait ortalamalarının Duncan Çoklu Karşılaştırma Test sonuçları ($P<0.01$)

Süre (s)	AP (EU)	LPO (EU)
30	6.825a	19.850a
60	6.050b	16.450b
90	5.600c	14.900c
120	4.925d	13.950c

AP enzimi aktivitesi üzerine dalga genişliği x sıcaklık interaksiyonunun etkisi ($P<0.01$) seviyesinde önemli bulunmuş ve şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. AP enzimi aktivitesi üzerine dalga genişliği x sıcaklık interaksiyonunun etkisi

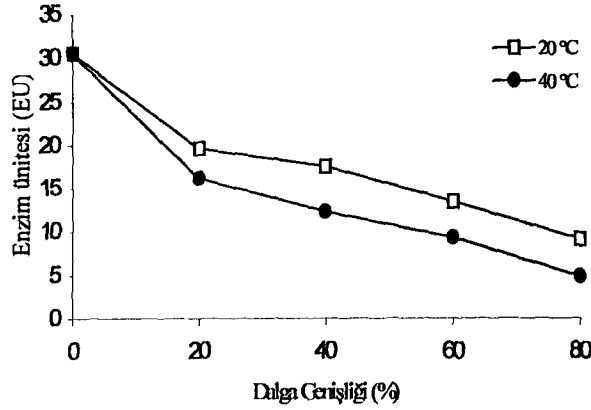
Şekil 4.1 ‘de görüldüğü gibi, dalga genişliği arttıkça enzim aktivite değerleri azalmaktadır. Yüksek sıcaklıkta (40°C) elde edilen enzim aktivite değerleri, düşük sıcaklıktaki (20°C) değerlere oranla genelde daha düşük seviyede seyretmektedir. Daha önceden de açıklandığı gibi, burada sıcaklığın sinergist etkisi söz konusudur. Yani ultrason işleminin sıcaklıkla uygulanması halinde daha etkin bir inaktivasyon işlemi elde edilmektedir. Ultrason işlemine maruz kalan enzimlerin bulunduğu ortam sıcaklığının yüksek olması, meydana gelen kavitasyonun enzim üzerine etkisini artırmakta ve kavitasyon sonucunda oluşan mikromekaniksel şoklara karşı enzimleri daha dayanıksız kılmaktadır.

Villamiel ve Jong (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, alkalen fosfataz, glutamiltanspeptidaz, laktoperoksidaz ve peynir altı suyu proteinleri üzerine ultrason ve ısı işlemin birlikte etkisi araştırılmış ve bu enzimler üzerine uygulanan ultrason ve sıcaklık uygulamasının yüksek oranda inaktivasyon sağladığı tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada, peroksidaz, lipoksigenaz ve polifenoloksidaz enzimleri üzerine, ultrason, ısı işlem ve basıncın birlikte etkisi araştırılmış ve 20 kHz ' lik ultrason işlemiyle birlikte uygulanan sıcaklık ve basıncın enzimlerin inaktivasyonunu daha da artırdığı belirlenmiştir (Lopez et al. 1994).

Daha önce de ifade edildiği gibi, ultrason işlemi sırasında, sıvıyı çevreleyen bölgede ve sıvının içerisinde hava kabarcıkları oluşmakta ve bu kabarcıklar sıvı içinde kuvvetli alanlar oluşturmaktadır (Scherba et al 1991). Sıcaklıkla birlikte uygulanan ultrason işleminin çok daha etkili olmasının nedenlerinden biri de, yüksek sıcaklıklarda çok daha hızlı hava kabarcıklarının oluşmasıdır. Ayrıca, yüksek sıcaklıklarda daha fazla sayıda hava kabarcığı oluşmakta ve bunun sonucunda da kavitasyon çok daha etkin bir şekilde gerçekleşmektedir (Alliger 1975).

Sütte bulunan çoğu enzimler, süt işleme teknolojisinde, geleneksel ısı işlemlerle inaktif edilmektedir (Farkye ve Imafidon 1995). Özellikle, sütte bulunan alkalen fosfataz enzimi pastörizasyonla inaktif edilmekte (Kosikowski 1988), bundan dolayı alkalen fosfataz aktivitesi testi 1935' den beri pastörizasyonun etkinliğinin değerlendirilmesinde kriter olarak kullanılmaktadır (IDF 1991). Başka bir ifadeyle, pastörize edilmiş sütlerde alkalen fosfataz enziminin tespiti, yeterli düzeyde pastörizasyon işleminin yapılmadığının göstergesidir (Metin 1996). Bizim çalışmamızda, elde edilen sonuçlara bakıldığında (şekil 4.1) , uygulanan % 80 'lik ultrason dalga genişliği ve sıcaklık uygulaması (20 ve 40°C) alkalen fosfataz enzimini tamamen inaktif etmemiştir. Enzimlerin tamamıyla inaktif edilmesi için çok yüksek dalga genişliklerine ihtiyaç duyulmaktadır (Mason et al. 1996. Ayrıca, %100'lük bir inaktivasyon için sıcaklık, süre ve dalga genişliği gibi faktörlerin seviyelerinin yükseltilmesi gerekmektedir. Bununla birlikte, inaktivasyon oranı, enzimin yapısına, işlem şartlarına ve enzimin bulunduğu ortama göre değişiklik göstermektedir.

LPO enzimi aktivitesi üzerine dalga genişliği x sıcaklık interaksyonunun etkisi ($P<0.01$) seviyesinde önemli bulunmuş ve şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4. 2. LPO enzimi aktivitesi üzerine dalga genişliği x sıcaklık interaksyonunun etkisi

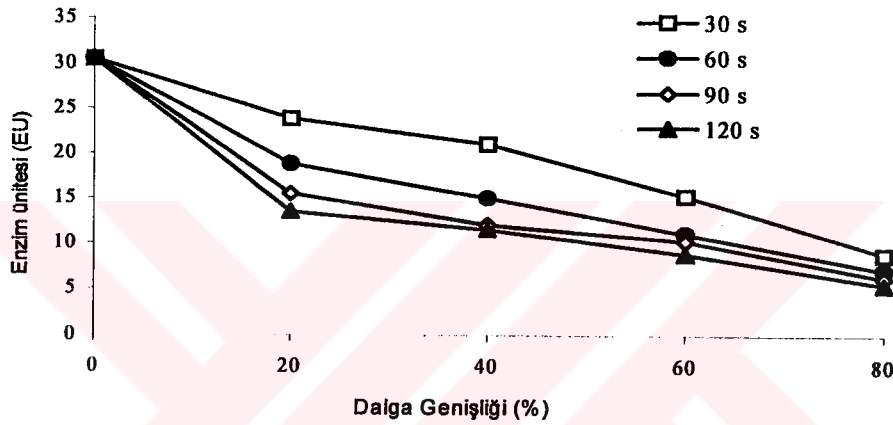
Şekil 4. 2’den görüldüğü gibi, dalga genişliği ve sıcaklığın LPO enzimi aktivitesi üzerine etkisi, AP enzimi üzerine olan etkiye benzerdir. Burada da sıcaklığın inaktivasyon üzerine sinergist etkisi söz konusudur. Sıcaklığın artmasıyla birlikte, uygulanan ultrason işleminin etkinliği de artmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda enzimler ultrasonun meydana getirdiği kavitasyona karşı daha hassas olmakta ve kavitasyonun neden olduğu mekanik etki artmaktadır. Benzer eğilim AP enziminde de elde edilmiştir. 3 saatlik bir ultrason işlemiyle peroksidaz enziminin yaklaşık olarak %90 ‘ı inaktif edilebilmektedir (Mason et al 1996). Daha önce de söylendiği gibi, enzimin tamamının inaktif edilmesi için daha yüksek dalga genişliği gereklidir. Bu çalışmada, en yüksek inaktivasyon % 80 ‘de ve 40°C ‘de elde edilmiştir (şekil 4. 2).

Ultrason dalgalarının enzimler üzerine olan etkileri çok karışıktır ve uygulanan dalga genişliği ve işlem şartlarına bağlı olarak aktivasyon veya inaktivasyon gerçekleşebilir (McClements 1995). Bu nedenle, dalga genişliği ve işlem şartlarının iyi seçilmesi gerekmektedir.

Şekil 4. 1 ve şekil 4. 2’de görüldüğü gibi, her iki sıcaklıkta da (20 ve 40°C) % 80’deki ultrason işleminin diğer dalga genişliklerine göre iki farklı sıcaklıkta da büyük oranda

enzim aktivitesini düşürdüğü belirlenmiştir. % 80 dalga genişliğinde uygulanan ultrason işlemi, LPO enziminin EU değerini 20°C'de, 30.5 EU'den 9.00 EU'ne, 40°C'de de 4.75 EU'ne düşürmüştür. Aynı dalga genişliği, AP için EU değerini, 20°C'de, 9.5 EU'nden 4.375 EU'ne, 40°C'de 3.25 EU'ne düşürmüştür. Bu sonuçlar, enzim inaktivasyonunda dalga genişliği ve sıcaklığın ultrason işleminde oldukça etkili olduğunu göstermektedir.

LPO enzimi aktivitesi üzerine dalga genişliği x süre interaksiyonunun etkisi ($P<0.01$) seviyesinde önemli bulunmuş ve şekil 4. 3'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 3. LPO enzimi aktivitesi üzerine dalga genişliği x süre interaksiyonunun etkisi

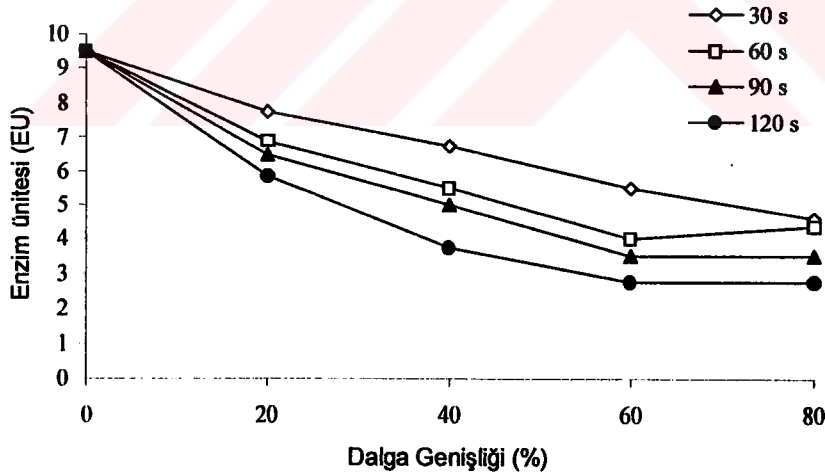
Şekil 4.3'den görüldüğü gibi, LPO aktivitesinde işlem zamanının uzamasıyla birlikte azalma olmuş, yine aynı şekilde % 80 dalga genişliğine sahip ses dalgalarının diğer dalga seviyelerine göre kısa sürelerde enzim aktivitesini düşürdüğü belirlenmiştir. Ayrıca sürelerin artmasıyla enzim aktivitelerindeki azalma da göze çarpmaktadır. Ultrason işlem süresinin 120 s olduğu durumda bütün dalga genişliklerinde etkili bir inaktivasyon sağlandığı belirlenmiştir.

Daha önce de ifade edildiği gibi, herhangi bir gıda işlem prosesinde, gıdanın işleme maruz kalma süresi arttıkça söz konusu işlemin etkinliği de buna paralel olarak artmaktadır. Benzer etki bu çalışmada da gözlenmiştir. Enzimler, ultrason işlemine ne kadar çok maruz kalırsa, sistem içerisinde o kadar çok kavitasyon (boşluk) ve buna

bağlı olarak da fazla sayıda hava kabarcığı oluşmaktadır. Dolayısıyla kavitasyonun fazla olması enzim inaktivasyonunu artırmaktadır.

Enzimlerin inaktivasyonu ile ilgili kavitasyon olayından başka mekanizmaların da etkili olduğu düşünülmektedir (Kashkooli et al. 1980). Ultrason işlemi sırasında, oluşan hava boşluklarının çevresinde meydana gelen sıvı akımı, ya titreşim veya içe doğru patlamayla, ya da protein denatürasyonuna neden olabilen çeşitli kesme kuvvetleriyle sonuçlanmaktadır (Vercet et al. 1997). Enzimlerin inaktif edilmesinde, ultrasonik dalgalar tarafından oluşturulan kesme kuvvetleri yüksek molekül ağırlıklı polimerleri parçalamaktadır (Price 1990). Dolayısıyla, işleme süresinin uzamasıyla birlikte, enzimlerin daha çok kesme kuvvetlerine maruz kalması, inaktivasyon işleminin etkinliğini de artırmaktadır.

AP enzimi aktivitesi üzerine dalga genişliği x süre interaksiyonunun etkisi ($P < 0.01$) seviyesinde önemli bulunmuş ve şekil 4.4’de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. AP enzimi aktivitesi üzerine dalga genişliği x süre interaksiyonunun etkisi

Şekil 4. 4’den görüldüğü gibi, tüm dalga genişliklerinde işlem zamanının artmasıyla AP enzim aktivitesinde de LPO’dakine benzer bir azalma olmuştur. Sürenin enzim inaktivasyonunda sinergist etkisi olduğu şekilden de görülmektedir. Yani işlem

süresinin artışıyla AP enzimi aktivitesinde düşüş olmuştur. En yüksek düşüş yine % 80 dalga genişliğinde görülmüştür. Alkalen fosfataz enziminin inaktif olması, patojen mikroorganizmaların inaktivasyonu ile paralellik gösterdiğinden, enzim inaktivasyonu yanında patojen mikroorganizmaların da inaktif olduğu söylenebilir (Metin 1996). Isıl olmayan ultrason işlemiyle, ortamdaki patojen mikroorganizmaların yok edilmesi veya sayısının önemli oranda azaltılması, normal ısı işlemin getirdiği bazı problemler göz önüne alındığında oldukça önemlidir. Böylece tüketicinin istemediği duyuşsal ve besinsel özelliklerdeki çeşitli olumsuzlukların da önüne geçilmiş olmaktadır.



5. SONUÇ

Yapılan araştırmada LPO ve AP enzimlerinin dalga genişliği, sıcaklık ve süreye bağlı olarak aktivitelerinin azaldığı görölmüştür. Uygulanan ultrason dalga genişliği arttıkça enzim inaktivasyonunda sıcaklık ve süreye bağlı olarak büyük oranda başarı sağlanabilmiştir. Ancak yapılan araştırmada gerek LPO gerekse AP enzimlerinin tam olarak inaktif edildiği gözlemlenmemiştir. Tam bir inaktivasyon sağlanabilmesi için daha yüksek dalga genişliği seviyelerinin uygulanması veya sıcaklık ve işlem zamanı gibi faktörlerin daha etkin seçilmesi gerekmektedir.

Yaptığımız utrason denemeleri sırasında, örnek sıcaklığında önemli bir artış olmamıştır. Bu da ultrasonun, ısıl işlemlerin gıdanın duysal ve besinsel özellikleri üzerine olan olumsuz etkilerine karşı alternatif bir yöntem olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla soğuk pastörizasyon veya siterilizasyon olarak da tanımlayabileceğimiz bu işlemin gıda muhafaza proseslerinde bir yöntem olarak kullanılması konusunda sanayicilere ışık tutacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Ahvenainen, R., Wirtanen, G. and Mattila-Sandholm, T., 1991. Ultrasound Imaging – A Non-destructive Method for Monitoring Changes Caused by Microbial Enzymes in Aseptically-Packed Milk and Soft Ice-cream Base Material. *Lebensmittel – Wissenschaft Und-Technologie*, 24 (5), 397-403.
- Alliger, H., 1975. Ultrasonic disruption. *Am. Lab. (Shelton)*, 10, 75.
- Alzamora, S. M., Guerra, S. N. and Lopez-Malo, 2000. Ultrasound as a food preservation method. 2000 IFT Annual Meeting.
- Ay, C. and Gunasekaran S., 1994. Evaluating Milk Coagulation with Ultrasonics. *Food Technol.*, 48(12), 74-78.
- Ay, C. and Gunasekaran S., 1994. Ultrasonic Attenuation Measurements for Estimating Milk Coagulation Time. *Transactions of the ASAE*, 37(3), 857-862.
- Banerjee, R., Chen, H. and Wu, J., 1996. Milk protein-based edible film mechanical strength changes due to ultrasound process. *J. Food Science*, 61(4), 824-828.
- Barbosa-Canovas, G. V., Palou, E., Pothakamury, U. R. and Swanson, B. G., 1997. Application of light pulses in the sterilization of foods and packaging materials. *Nonthermal preservation of foods.*, 139-161.
- Barton, S., Bullock, C. and Weir, D., 1996. The effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(3), 190-194.
- Benedito, J., Bon, J., Sanjuan, N. and Frau, M., 1995. Utilization of ultrasound in the food industry. I. Fundamental concepts. *Alimentacion Equipos y Tecnologia*. 14(9), 79-83.
- Benedito, J., Carcel, J., Clemente, G. and Mulet, A., 2000. Cheese maturity assessment using ultrasonics. *J. Dairy Sci.*, 83, 248-254.
- Blitz, J., 1971. *Ultrasonics: Methods and Application*. Butterworths & Coltd. London, 76-103
- Boquien, C. Y., Nakache, F. and Paraf, A., 1991. Ultrasound treatment for harvesting an amino peptidase from lactic acid bacteria and quantitation of the enzyme linked immunosorbent assays. *Appl. Environ. Microb.*, 57, 2221-2216.

- Butz, P. and Tauscher B., 2001. Emerging technologies: chemical aspects. Food Research International, 6.
- Carcel, J. A., Benedito, J., Bon, J. and Frau, M., 1998. Application of ultrasound in the dairy products and derivatives industry. I. Low intensity ultrasound. Alimentacion Equipos y Tecnologia, 17(6), 135-141.
- Chavarri, F., Santistaban, A., Virto, M. and Renobales M. De., 1998. Alkaline Phosphatase, Acid Phosphatase, Lactoperoxidase and Lipo-protein Lipase Activities in Industrial Ewe's Milk and Cheese. J. Agric. Food Chem., 46, 2926-2932.
- Earnshaw, R. G., Appleyard, J. and Hurst, R. M., 1995. Understanding physical inactivation process: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. International J. Food Microbiology, 28, 197-219.
- Farkye, N. Y. and Imafidon, G. I., 1995. Thermal denaturation of indigenous milk enzymes. International Dairy Federation, 331-348.
- Floros, J.D. and Liang, H., 1994. Acoustically Assisted Diffusion Through Membranes and Biomaterials. Food Technol., 48, 79-84.
- Garcia, M. L., Burgos, J., Sanz, B. and Ordonez, J.A., 1989. Effect of heat and ultrasonic waves on the survival of the two strains of *Bacillus subtilis*. J. Appl. Bacteriol., 67, 619-628.
- Gennaro, L. De., Cavella, S., Romano, R. and Masi, P., 1999. The use of ultrasound in food technology I: Inactivation of peroxidase by thermosonication. J. Food Eng., 39, 401-407.
- Gould, G. W., 1995. New Method of Food Preservation. Blackie Academic and Professional, 159-172.
- Gunasekaran, S. and Ay, C., 1996. Milk coagulation cut time determination using ultrasonics. J. Food Process Engineering, 19(1), 63-74.
- Hoover, G. D., 2000. Ultrasound. J. Food Science Technol., 35(1), 93-95.
- International Dairy Federation, 1991. Alkaline phosphatase test as a measure of correct pasteurization. Int. Dairy Fed. Bull. 262, 33-35.
- Kashkooli, H., Rooney, J. and Roxyby, R., 1980. Effects of ultrasound on catalase and malate dehydrogenase. J. Acoust. Soc. Am. 67, 1798.

- Kim, S. M. and Zayas, J. F., 1989. Processing parameters of chymosin extraction by ultrasound. *J. Food Sci.*, 54, 700-703.
- Kivela, T., 1996. Easier cheese mould cleaning by ultrasound. *Food Sci. Tech. Abs.*, 28(6), 257.
- Kosikowski, F. V., 1988. Enzyme behaviour and utilisation in dairy technology. *J. Dairy Sci.*, 71, 557-573.
- Kumar, R. and Bhatla, K.L., 1995. Purification, Crystallization and Preliminary X-ray Crystallographic Analysis of Lactoperoxidase from Buffalo Milk. *Acta Cryst.*, D51, 1094.
- Lee, B. H., Kermasha, S. and Baker, B. E., 1989. Thermal, ultrasonic and ultraviolet inactivation of *Salmonella* in thin films of aqueous media and chocolate. *Food Microbiol.*, 6, 143-152.
- Letang, C., Piau, M., Verdier, C. and Lefebvre, L., 2001. Characterization of Wheat-Flour-Water Doughs: a New Method Using Ultrasound. *Ultrasonics*, 39, 133-141.
- Lillard, H. S., 1993. Bactericidal effect of chlorine on attached *Salmonellae* with and without sonification. *J. Food Protect.*, 56 (8), 716-717.
- Lopez, P., Sala, J.F., Fuente, J.L., Condon, S., Raso, J. and Burgos, J., 1994. Inactivation of Peroxidase, Lipoxygenase and Polyphenol Oxidase by Manothermosonication. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 252-256.
- Lopez, P. and Burgos, J., 1995. Peroxidase Stability and Reactivation after Heat Treatment and Manothermosonication. *J. Food Science*, 60(3), 451-455.
- Manas, P., Pagan, R. and Raso, J., 2000. Predicting Lethal Effect of Ultrasonic Waves Under Pressure Treatments on *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 by Power Measurements. *J. Food Science*, 65(4), 663-667.
- Marcotte, M., Trigui, M., Tatibouet, J. and Ramaswamy, S., 2000. An Ultrasonic Method for Assessing the Residence Time Distribution of Particulate Foods During Ohmic Heating. *J. Food Sci.*, 65(7), 1180-1186.
- Martinez, F. E., Desai, I. D., Davidson, A. G. F., Nakai, S. and Radcliffe, A., 1987. Ultrasonic homogenization of expressed human milk to prevent fat loss during tube feeding. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 6, 593-597.

- Mason, T., Newman, A., Sukhvinder, P. and Charter, C., 1994. Sound solution. *World Water Environ. Eng.* (April), 16.
- Mason, J.T., Paniwnyk, L. and Lorimer, J.P., 1996. The Uses of Ultrasound in Food Technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3, 253-260.
- McClements, D. J., 1995. Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends Food Sci. Technol.*, 6, 293-299.
- McClements, D. J., 1997. Ultrasonics characterization of food and drinks : principles, methods and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 37, 1-46.
- McComb, R. B., Bowers, G. N. and S . Posen., 1979. In *Alkaline Phosphatase*; Eds., Plenum Press: New York and London, 903-907.
- Mertens, B. and Knorr, D., 1992. Developments of Non-thermal Processes of Food Preservation. *Food Technol.*, 46, 124-133.
- Metin, M., 1996. Süt Teknolojisi. *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları*, 33, 202-204.
- Mizrach, A., Galili, N. and Rosenhouse, G., 1994. Determining Quality of Fresh Products by Ultrasonic Excitation. *Food Technol.*, 48(12), 68-71.
- Mulet, A., Benedito, J., Bon, J. and Sanjuan, N., 1999. Low intensity ultrasonics in food technology. *Food Science and Technology International/Ciencia y Tecnologia de Alimentos Internaciomal*, 5(4), 285-297.
- Ordenez, J. A., Sanz, B., Hernandez, P. E. and Lopez-Lorenzo, P., 1984. A note on the effect of combined ultrasonic heat treatments on the survival of thermotolerant *Streptococci*. *J. Appl. Bacteriol.*, 56, 175-177.
- Ordenez, A. J., Aguilera A. M., Garcia, L. M. and Sanz, B., 1987. Effect of Combined Ultrasonic and Heat Treatment (Thermoultrasonication) on the Survival of a Strain of *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Research*, 54, 61-67.
- Pagan, R., Manas, P., Alvarez, I. and Condon, S., 1999. Resistance of *Listeria monocytogenes* to ultrasonic waves under pressure at sublethal (manosonication) and lethal (manothermosonication) temperatures. *Food Microbiology*, 16 (2), 139-148.
- Price, G. J., 1990. The use of ultrasound for the controlled degradation of polymer solutions. In *Advances in Sonochemistry*, 1, 66-129.

- Raharintsoa, C., Gaulard, M. L. and Alasis, C., 1977. Etude de l'action des ultrasons cavitans sur quelques enzymes coagulans. *Lait*, 57, 631-645.
- Raharintsoa, C., Gaulard, M. L. and Alasis, C., 1978. Effect des ultrasons cavitans sur la coagulation du lait par les enzymes. *Lait*, 58, 559-574.
- Raso, J., Condon, S. and Sala Trepas, F. J., 1994. Mano-thermosonication: a new method of food preservation. In: *Food Preservation by Combined Process*. Final report for FLAIR Concerted Action No. 7 Subgroup B.
- Raso, J., Palop, A., Pagan, R., and Condon, S., 1998. Inactivation of *Bacillus subtilis* Spores by Combining Ultrasonic Waves Under Pressure and Mild Heat Treatment. *J. Applied Microbiology*, 85 (5), 849-854.
- Sala, F. J., Burgos, J., Condon, S., Lopez, P. and Raso, J., 1995. In: G.W. Gould (editor) *New Methods of Food Preservation*, Blackie, Glasgow.
- Samari, S., 1994. Ultrasonic inspection methods for food products. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 27(3), 210-213.
- Sanz, P., Palacios, P., Lopez, P. and Ordonez, J. A., 1985. Effect of ultrasonic waves on the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. In: G. J. Dring, D. J. Ellars and G. W. Gould (editors) *Fundamental and Applied Aspects of Bacterial Spores*, Academic Press, New York, 251-259.
- Scherba, G., Wrigel, R. M. and O'Brien, W. D., Jr., 1991. Quantitative Assessment of the Germicidal Efficacy of Ultrasonic Energy. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (7), 2079-2084.
- Shindler, J.S. and Bardsley, W.G., 1975. Steady-state Kinetics of Lactoperoxidase with ABTS as Chromophen. *Biochemistry and Biophysics Res. Comm.*, 67, 1307.
- Stone, D. L. and Fryer, T. F., 1984. Disruption of bacterial clumps in refrigerated raw milk using an ultrasonic cleaning unit. *NZ J. Dairy Sci. Tech.*, 19, 221-228.
- Suslick, K. S., 1988. Homogenous sonochemistry. In *Ultrasonics: its chemical, physical and biological effects*, VCH Publishers, New York., 123-164.
- Suslick, K. S., 1989. The chemical effects of ultrasound. *Scientific American*, 2, 62-68.
- Vercet, A., Lopez, P. and Burgos, J., 1997. Inactivation of heat-resistant lipase and protease from *Pseudomonas fluorescens* by Mano-thermoultrasonication. *J. Dairy Sci.*, 80, 29-36.

- Villamiel, M., Hamersveld, E. H. van and Jong, P. De., 1999. Effect of ultrasound processing on the quality of dairy products. *Milchwissenschaft*, 54 (2), 69-74.
- Villamiel, M., Verdurmen, R. and Jong, P. De., 2000. Degassing of milk by high-intensity ultrasound. *Milchwissenschaft*, 55 (3), 123-126.
- Villamiel, M. and Jong, P., 2000. Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* and *Streptococcus thermophilus* in Trypticase Soy Broth and Total Bacteria in Milk by Continious-flow Ultrasonic Treatment and Conventional Heating. *J. Food Engineering*, 45, 171-179.
- Villamiel, M. and Jong, P., 2000. Influence of High-Intensity Ultrasound Heat Treatment in Continious Flow on Fat, Proteins and Native Enzymes of Milk. *J. Agric. Food Chem*; 48, 472-478.
- Vollmer, A. C., Everbach, E. C., Halpern, M. and Kwakye, S., 1998. Bacterial stress responses to 1-megahertz pulsed ultrasound in the presence of microbubbles. *Applied Environmental Microbiology*, 64(10), 3927-3931.
- Wrigley, D.M. and Llorca, G. N., 1992. Decrease of *Salmonella typhimurium* in Skim Milk and Egg by Heat and Ultrasonic Wave Treatment. *J. Food Protection*, 55(9), 678-680.
- Wu, H., Hulbert, G. J. and Mount, J. R., 2001. Effects of Ultrasound on Milk Homogenization and Fermantation with Yogurt Starter. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 1, 211-218.
- Yıldız, N. ve Bircan, H., 1994. Araştırma ve Deneme Metodları. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 697, 63-67.

ÖZGEÇMİŞ

Sivas'ta 1977 yılında doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 1994 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden 1998 yılında mezun oldu. 1999 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans'a başladı.

Atatürk Üniversitesi Hınıs Meslek Yüksekokulu'nda Ocak 1999 yılından beri Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktadır.

