

Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka, ultrazvuka i pulsirajućeg električnog polja na sastojke i svojstva mlijeka

Irena Jeličić, Katarina Lisak, Rajka Božanić*

Laboratorij za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda,
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo,
Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu,
Pierottijeva 6, Zagreb, Hrvatska

Prispjelo - Received: 27.12.2011.
Prihvaćeno - Accepted: 15.02.2012.

Sažetak

Visoki hidrostatski tlak, ultrazvuk i pulsirajuće električno polje pripadaju novim metodama procesiranja hrane čija primjena, najčešće u kombinaciji s toplinom ili međusobnoj kombinaciji, omogućava postizanje odgovarajuće mikrobiološke kvalitete uz minimalne gubitke prirodnih svojstava namirnica. Primjena sve tri metode je intenzivno proučavana na mlijeku kao mediju te je objavljen veliki broj radova sa obećavajućim rezultatima vezanim uz inaktivaciju mikroorganizama. Međutim, mnoštvo provedenih istraživanja rezultiralo je spoznajama koje se odnose na promjene u mineralnom sastavu mlijeka, denaturaciju proteina sirutke, promjene na ostalim sastojcima poput mliječne masti te promjene u mehanizmima grušanja mlijeka. Cilj ovoga rada je pružiti pregled o promjenama koje visoki hidrostatski tlak, ultrazvuk i pulsirajuće električno polje izazivaju na pojedinim sastojcima mlijeka te kako iste mogu doprinijeti poboljšanjima pojedinih procesa u mljekarskoj industriji.

Ključne riječi: visoki hidrostatski tlak, ultrazvuk, pulsirajuće električno polje, mlijeko, svojstva

Uvod

U današnje vrijeme potrošači su sve bolje osviješteni i educirani o važnosti pravilne prehrane te njezinoj ulozi u prevenciji poremećaja uzrokovanih stresom i ubrzanim načinom života. Stoga među najvažnije kriterije pri odabiru namirnica spadaju zasigurno visoka nutritivna vrijednost i očuvana organoleptička svojstva, ali i ekološki aspekt proizvodnje, pri čemu konvencionalne metode konzerviranja hrane ne mogu u potpunosti zadovoljiti iste, pa se u zadnjih nekoliko godina intenzivno razvija koncept minimalnog procesiranja hrane. Ovaj koncept podrazumijeva primjenu minimalno invazivnih ili neinvazivnih metoda obrade hrane poput visokog hidrostatskog tlaka, mikrovalova, ultrazvuka, pulsirajućeg električnog polja i ultraljubičastog zračenja, a u svrhu postizanja sigurnosti hrane i konzerviranja namirnica uz maksimalno očuvanje njihovih prirod-

nih svojstava. Osim toga, nove metode procesiranja hrane odlikuju se manjom potrošnjom energije, kraćim trajanjem tehnološkog postupka te manje štetnim utjecajem na okoliš. Pri tome su najintenzivnije istraživane primjena visokog hidrostatskog tlaka, ultrazvuka i pulsirajućeg električnog polja pojedinačno, kao i u kombinaciji jedna s drugom. Mnoge od tih studija rađene su na mlijeku koje je vrlo pogodan medij za provođenje ispitivanja obzirom na vrstu i dizajn opreme koja se trenutno koristi. Osim toga, tijekom konvencionalne toplinske obrade mlijeka dolazi do određenih nepoželjnih promjena poput inaktivacije određenih nativnih enzima, denaturacije proteina sirutke i pojave aroma po kuhanom mlijeku te gubitka termolabilnih vitamina poput vitamina C. Svrha ovog rada je pružiti pregled promjena koje se događaju na pojedinim sastojcima mlijeka uslijed primjene određenih novih metoda procesiranja hrane.

*Dopisni autor/Corresponding author: Tel/Phone: +385 (0)1 4605 024; E-mail: irjelicic@pbf.com

Visoki hidrostatski tlak

Visoki hidrostatski tlak je metoda procesiranja hrane s visokim potencijalom da se zadovolje svi zahtjevi koje trenutno nameću trendovi razvoja u prehrambenoj industriji. Naime, obrada visokim hidrostatskim tlakom s jedne strane pruža mogućnosti proizvodnje namirnica sa maksimalno očuvanim prirodnim svojstvima, a s druge strane tako obrađene namirnice odlikuju se produljenim rokom trajnosti u odnosu na iste proizvedene konvencionalnim metodama obrade, pa je i dobit veća (McClements i sur., 2001).

Visoki hidrostatski tlak je metoda koja podrazumijeva obradu namirnica tlakovima između 50 i 1000 MPa u trajanju od nekoliko sekunda do nekoliko minuta. Svrha njegove primjene je djelomična ili potpuna zamjena toplinske obrade poput procesa pasterizacije i sterilizacije. Industrijska oprema razvijena u svrhu primjene visokog hidrostatskog tlaka u obradi namirnica primjenjuje se za diskontinuirane procese. Danas postoji preko 156 različitih industrijskih postrojenja maksimalnog kapaciteta otprilike 690 L u kojima je instalirana primjena visokog hidrostatskog tlaka u svrhu proizvodnje oko ukupno 300.000 tona pasteriziranih proizvoda (Jeličić i sur., 2010; Knorr i sur., 2011).

Visoki hidrostatski tlak jedna je od rijetkih novih metoda procesiranja koja se već i komercijalno primjenjuje u prehrambenoj industriji, pri čemu joj začeci sežu u Japan, a nakon toga intenzivno se počela koristiti u SAD-u i Europi (Norton i Sun, 2008). Primjeri prehrambenih proizvoda u čijoj je preradi korišten visoki tlak su sok od naranče UltiFruit®, proizvođača Pernod Ricard Company iz Francuske, pire avokada (Guacamole) proizvođača Avomex Company iz Teksasa u SAD-u, te narezana kuhana šunka španjolskog proizvođača Espuna (Yaldagard i sur., 2008).

Primjena visokog hidrostatskog tlaka u mljekarskoj industriji istraživana je najviše u svrhu inaktivacije mikroorganizama i nativnih enzima, produljenja trajnosti kozjeg sira, smanjenja trajanja faze zrenja sireva, te za prevenciju prekomjernog zakiseljavanja jogurta (Devlieghere i sur., 2004; Fandino-Lopez, 2006).

Mikrobiocidni učinak visokog tlaka zasniva se na oštećenju staničnih stijenki i membrana, te unutarstaničnom djelovanju poput inhibicije sinteze

proteina, uništenja ribosoma, inaktiviranja staničnih enzima ili promjena na razini genetskih mehanizama (Huppertz i sur., 2006).

Iako je mlijeko bila prva namirnica na kojoj se počela istraživati primjena visokog hidrostatskog tlaka, na tržištu još uvijek ne postoje mliječni proizvodi u čijoj je proizvodnji ta metoda primijenjena. Jedan od glavnih razloga za to jest utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na promjenu sastojaka i svojstava mlijeka (Jeličić i sur., 2010).

Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na proteine i mineralne tvari mlijeka

Jedna od glavnih promjena koje izaziva primjena visokog hidrostatskog tlaka jesu promjene u veličini micela kazeina. Tretiranje mlijeka tlakovima između 100 i 200 MPa ne izaziva promjene u strukturi i veličini kazeinskih micela, međutim tretiranje tlakovima od 250-310 MPa u trajanju iznad 15 minuta dovodi do povećanja micela kazeina, što je najvjerojatnije posljedica udruživanja pojedinih submicela i frakcija kazeina nakon prethodnog razbijanja istih na manje dijelove. Do razbijanja kazeinske micelle vjerojatno dolazi uslijed otapanja micelnog kalcijevog fosfata, te zbog kidanja hidrofobnih veza i narušavanja elektrostatskih interakcija među submicelama (Kessler, 2002; Huppertz i sur., 2006; Harte i sur., 2007). S obzirom na taj pretpostavljeni mehanizam, dolazi i do povećanja razine nemicelnog kazeina u mlijeku što je pri temperaturama skladištenja mlijeka (0-5 °C) ireverzibilna promjena, dok je duljim čuvanjem pri 20 °C reverzibilna.

Uslijed promjena koje nastaju na micelama kazeina, dolazi i do promjene u mineralnom sastavu mlijeka. Naime, disocijacijom micela oslobađa se i otapa kalcijev fosfat zbog čega se povećava razina iona kalcija i fosfata u mliječnom serumu što rezultira snižavanjem pH vrijednosti mlijeka. Ova pojava je također ireverzibilna pri temperaturama do 5 °C, dok je duljim čuvanjem pri 20 °C reverzibilna (Huppertz i sur., 2006).

Tretmani visokim hidrostatskim tlakom uzrokuju i promjene na proteinima sirutke. Tako se primjerice oko 90 % β -laktoglobulina prisutnog u mlijeku denaturira djelovanjem tlaka jakosti 400 MPa. β -laktoglobulin u denaturiranom obliku zatim se preko slobodnih sulfhidrilnih skupina veže na micelle kazeina. S druge strane, α -laktalbumin se poka-

zao puno otpornijim na djelovanje tlaka te je njegova denaturacija zabilježena tek primjenom tlakova oko 600 MPa (Krešić, 2005; Jeličić i sur., 2010; Marjanović i sur., 2011).

Rodiles-Lopez i sur. (2008) pratili su promjene funkcionalnih svojstava α -laktalbumina primjenom kombinacije tlakova od 200, 400 i 600 MPa i umjerenih temperatura (25, 40 i 55 °C) pri čemu su također mijenjali pH modelne otopine u rasponu od 3,0 do 9,0. Pokazalo se kako je tretman pri 600 MPa i temperaturi 55 °C u trajanju 10 minuta te kod pH 7 pozitivno utjecao na topljivost, stabilnost pjene i emulzirajuća svojstva α -laktalbumina. Osim toga, primijećeno je kako su emulzirajuća svojstva i sposobnost stvaranja pjene znatno poboljšana primjenom visokih vrijednosti tlaka kod svih pH vrijednosti, što je suprotno učinku kojeg visoki tlak ima na β -laktoglobulin. Pretpostavlja se da sva navedena poboljšanja funkcionalnih svojstava α -laktalbumina proizlaze iz povećanja topljivosti do koje dolazi djelovanjem visokog hidrostatskog tlaka.

Huppertz i sur. (2004b) zaključili su kako su β -laktoglobulin i α -laktalbumin u sirutki kao mediju otporniji na denaturaciju induciranu djelovanjem visokog hidrostatskog tlaka nego ako se nalaze u mlijeku. Razlog tomu je vjerojatno odsutnost kazeinskih micela i koloidnog kalcijevog fosfata u sirutki, koji u mlijeku potiču denaturaciju navedenih frakcija proteina sirutke.

Međutim, pokazalo se kako promjene na strukturi proteina sirutke izazvane djelovanjem visokog tlaka, ukoliko se smatraju nepoželjnim, mogu biti gotovo u potpunosti izbjegnute dodavanjem sredstva za blokiranje sulfhidrilnih skupina u mlijeko kao što je primjerice N-etilimid (Fandino-Lopez, 2006; Bouaouina i sur., 2006).

Padierenos i sur. (2009) ispitivali su utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na neka funkcionalna svojstva koncentrata proteina sirutke koji se dodaje u proizvodnji tučenog vrhnja sa smanjenim udjelom mliječne masti. Svježa sirutka je koncentrirana primjenom membranskog procesa ultrafiltracije do udjela suhe tvari 8,23 %, te potom pasterizirana nakon čega je slijedio tretman visokim tlakom jačine 300 MPa u trajanju 15 min. Tako dobivenom koncentratu ispitivani su viskoznost, sposobnost pjenjenja i maksimalno pjenjenje te je od strane 57 panelista provedeno senzorsko ocjenjivanje. Optimalno vrije-

me tučenja za ispitivane recepture je bilo 3 minute. Osim toga, vrhnje koje je sadržavalo koncentrat proteina sirutke tretiran visokim hidrostatskim tlakom pokazalo je veću stabilnost i bolja senzorska svojstva. Stoga je ova skupina autora zaključila kako tretman visokim tlakom može povećati primjenu koncentrata proteina sirutke u proizvodnji tučenog vrhnja sa smanjenim udjelom masti.

Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na mliječnu mast

U raznim istraživanjima pokazalo se kako primjena visokog hidrostatskog tlaka ne izaziva značajne promjene u veličini globula mliječne masti (Huppertz i sur., 2006), iako su Garcia-Amezquita i sur. (2009) tretmanom mlijeka tlakovima od 400 i 500 MPa u trajanju 0-20 min. postigli povećanja promjera masnih globula vjerojatno uslijed njihovog međusobnog povezivanja. Isto tako, može doći do vezanja denturiranih proteina sirutke na membrane masnih globula pa se i na taj način povećava njihova veličina. Nadalje, primjenom tlakova od 100-250 MPa mliječna mast postaje kremastija u odnosu na netretirano mlijeko ili mlijeko tretirano tlakovima od 400-600 MPa. Ta se pojava povezuje s promjenama nastalim na imunoglobulinu M (IgM) i lipoproteinima koji sudjeluju u mehanizmima udruživanja mliječnih globula u veće nakupine, što može utjecati na skraćivanje vremena potrebnog za zrenje kiselog vrhnja (Huppertz i sur., 2006; Kessler, 2002).

Osim toga, visoki hidrostatski tlak može uzrokovati promjene u mehanizmu kristalizacije mliječne masti pa tako u vrhnju obrađenom visokim hidrostatskim tlakom dolazi do kristalizacije masti pri višim temperaturama nego u vrhnju obrađenom pri atmosferskom tlaku. Razlog tomu vjerojatno je povišenje temperature faznog prijelaza iz čvrstog u tekuće stanje koje se dešava pod utjecajem visokog tlaka (Huppertz i sur., 2006).

Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na ostale sastojke i svojstva mlijeka

Pokazalo se da su enzimi mlijeka većinom otporni na djelovanje tlaka umjerenih jakosti (do 400 MPa) pa i tu činjenicu treba istaknuti (Huppertz i sur., 2006). Međutim, Moatsou i sur. (2008) postigli su vrlo dobru inaktivaciju proteolitičkih enzima plazmina i katepsina D primjenom tlakova 200, 450 i 600 MPa u kombinaciji s temperaturama od

20, 40 i 55 °C. Pri tom se najotpornijim na djelovanje tlaka pokazao katehpsin D i njegova inaktivacija je postignuta tek primjenom viših vrijednosti tlakova (450 i 600 MPa) pri 55 °C. S druge strane, plazmin je bio značajno inaktiviran već pri sobnim temperaturama. Prema zaključcima autora (Moatsous i sur., 2008) postignuta inaktivacija te prijelaz plazminogenih aktivatora iz kazeina u mliječni serum vjerojatno će pozitivno utjecati na prinos sira, poželjne proteolitičke procese tijekom zrenja sira i očuvanje kvalitete UHT-steriliziranog mlijeka.

Obzirom da visoki hidrostatski tlak utječe na različite sastojke mlijeka, te promjene uzrokuju daljnje promjene kao što su promjene u trajanju enzimatskog grušanja, stupnju geliranja, čvrstoći nastalog gela, te sposobnosti nastalog gela da zadrži vodu (Fandino-Lopez, 2006., Huppertz i sur., 2006., Anema, 2010). Tako u proizvodnji sira može doći do ubrzanog ili usporenog nastanka gruša ovisno o intenzitetu pojedinih promjena na proteinima. Pokazalo se da tretmani vrijednostima tlaka od 100 do 300 MPa uzrokuju smanjenje vremena potrebnog za grušanje mlijeka pomoću odgovarajućih enzimatskih pripravaka, dok tlakovi iznad 400 MPa ne utječu na trajanje grušanja. Isto tako, trajanje enzimatskog grušanja se skraćuje ukoliko se mlijeku prije tretmana tlakovima vrijednosti od 250 MPa dodaju N-etilimid ili kalijev jodat (tvar koja oksidira sulfhidrilne skupine) odnosno ukoliko se uklone proteini sirutke (Huppertz i sur., 2006). Podešavanje pH vrijednosti mlijeka prije tretmana visokim tlakom također može uzrokovati promjene u trajanju enzimatskog grušanja što se povezuje sa utjecajem pH na denaturaciju proteina sirutke (Arias i sur., 2000). Čvrstoća tako nastalog sirnog gruša veća je ukoliko je mlijeko tretirano tlakovima od 100 do 600 MPa, pri čemu se maksimalno povećanje čvrstoće postiže djelovanjem tlakova od 250 do 400 MPa.

Općenito su prihvaćena dva mehanizma zbog kojih dolazi do promjena u enzimatskom sirenju mlijeka i to:

- denaturacija β -laktoglobulina i njegovo vezanje na micelle kazeina mogu utjecati na enzimatsku hidrolizu κ -kazeina što može spriječiti povezivanje submicela u sekundarnoj fazi grušanja;
- razgradnja kazeinskih micela uslijed djelovanja visokog tlaka može povećati površinu na kojoj dolazi do međusobnih interakcija čime se poboljšava udruživanje parakazeinskih micela.

U konačnici promjene u grušanju mlijeka ovise o razmjerima u kojima dolazi do pojave svakog od navedenih mehanizama (Huppertz i sur., 2006). Denaturacija β -laktoglobulina uzrokovana djelovanjem visokog tlaka i njegovo vezivanje na micelle kazeina rezultira povećanjem udjela β -laktoglobulina u grušu odnosno u siru proizvedenom iz mlijeka obrađenog visokim tlakom. Time dolazi do povećanja prinosa sira, što se postiže primjenom tlakova jakosti 300 MPa. S druge strane, povećanje udjela β -laktoglobulina u grušu sira može rezultirati smanjenom sinerezom odnosno smanjenim izdvajanjem sirutke što se u pravilu smatra nepoželjnom pojavom, jer se time povećava udio vode u grušu odnosno siru (Huppertz i sur., 2004a). Obrada mlijeka za sirenje tlakom jakosti 400 MPa u trajanju 10-15 minuta pokazala se optimalnim režimom, obzirom da omogućuje povećanje prinosa sira za oko 10 % bez većeg negativnog utjecaja na udio vode u grušu i bez značajnog gubitka proteina izdvajanjem sirutke. S druge strane, ovaj režim povoljno je utjecao na skraćivanje vremena enzimatske koagulacije mlijeka te na rast i razmnožavanje sirarskih starter kultura (Huppertz i sur., 2004c).

Nadalje, Messens i sur. (1998) ispitivali su primjenu visokog hidrostatskog tlaka jačine 100 do 400 MPa u svrhu ubrzanja soljenja sira tipa Gouda. Tretmani su trajali od 30 minuta do 4 sata, a pokazalo se da je brzina apsorpcije soli rasla proporcionalno povišenju tlaka. Međutim, tretman tlakom od 300 MPa u trajanju 50 minuta uzrokovao je razbijanje mreže para-kazeinskih micela te otpuštanje značajnijih količina peptida i proteina, poglavito β -kazeina, u sirutku.

Visoki hidrostatski tlak pokazao se vrlo dobrom potencijalnom metodom obrade u proizvodnji sireva obzirom da omogućava kontrolu mikrobiološke kvalitete, ali i skraćuje trajanje zrenja utjecajem na aktivnost određenih enzima (Trujillo i sur., 2000).

Obrada mlijeka visokim hidrostatskim tlakom rezultira određenim pozitivnim učincima i u proizvodnji jogurta kao što su primjerice povećanje brzine i intenziteta kiseljenja mlijeka, mlijeko koagulira pri višim pH vrijednostima, nastaje gel veće čvrstoće te se sinereza javlja u manjoj mjeri, jer je u samom jogurtu povećan udio proteina sirutke (Fandino-Lopez, 2006., Huppertz i sur., 2006).

Dakle, visoki hidrostatski tlak pokazao se ne samo obećavajućom metodom što se tiče učinka konzerviranja, već i u smislu poboljšanja pojedinih

procesa u mljekarskoj industriji. Međutim, potrebno je još dalje istraživati njegov utjecaj na neke sastojke poput laktoze, o čemu trenutno ne postoji puno podataka.

Ultrazvuk

Ultrazvuk se odnosi na zvučne valove frekvencije iznad 20 kHz koji nastaju uslijed mehaničkih vibracija, a karakteriziraju ga amplituda (A), frekvencija (f), valna duljina (λ) i koeficijent atenuacije (α). Prilikom prolaska tih valova kroz tekućinu dolazi do naizmjenične kompresije i ekspanzije medija zbog promjene tlakova (Butz i Tauscher, 2002; Bron-dum i sur., 1998; McClements i sur., 1995).

Pri tom se ovisno o namjeni razlikuju ultrazvuk niskog i visokog intenziteta. Ultrazvuk niskog intenziteta odnosi se na intenzitete manje od 1 W/cm^2 i frekvencije više od 100 kHz, a primjenjuje se za različite analitičke metode te primjerice za kontrolu pakiranja prehrambenih proizvoda. Ultrazvuk visokog intenziteta odnosi se na intenzitete više od 1 W/cm^2 i frekvencije između 18 i 100 kHz, a primjenjuje se u svrhu inaktivacije i redukcije broja mikroorganizama (Knorr i sur., 2004).

Ukoliko je amplituda ultrazvučnog vala dovoljno velika, javlja se kavitacija - fenomen odgovoran za mikrobiocidni učinak ultrazvuka. Ovaj fenomen može se objasniti nizom idućih procesa: uslijed optovanih izmjena tlakova nastaju mjehurići plina čija veličina raste tijekom svakog ciklusa, sve dok ne postignu kritičnu veličinu unutar koje energija ultrazvuka nije dovoljna da bi se zadržala plinovita faza u mjehuriću te oni implodiraju. Svaka implozija mjehurića se ponaša kao lokalizirana "vruća točka" pri čemu se razvijaju vrlo visoke temperature (iznad 5000 °K) i tlakovi (oko 50 MPa) (Sala i sur., 1995; Patist i Bates, 2008; Cameron i sur., 2009).

Takav snažan raspad i pojave koje nosi sa sobom smatraju se odgovornim za uništavanje staničnih stijenki i izazivanje smrti stanica mikroorganizama. Mikrobiocidni učinak ultrazvučne kavitacije uključuje razbijanje nakupina mikroorganizama, izazivanje napuknuća staničnih stijenki, modificiranje unutarstaničnih mehanizama te povećavanje osjetljivosti na djelovanje topline (Fellows, 2000; Cameron i sur., 2009). Osim toga, iznimno visoke temperature i tlakovi nastali implozijom mjehurića mogu izazvati raspad vodene pare na OH^- radikale i H^+ ione

(Suslick, 1989) koji su vrlo vjerojatno odgovorni za inaktivaciju bakterijskih stanica oksidacijom (Shin i sur., 1994), ali i za promjene na sastojcima mlijeka.

Pri tome treba uzeti u obzir kako učinkovitost ultrazvučne kavitacije ovisi o nizu čimbenika poput vrste testnog mikroorganizma, mediju u kojem se isti nalazi, veličini stanica te ulaznoj snazi ultrazvučnog vala (Cameron i sur., 2009).

U mljekarskoj industriji dosad je istraživana primjena ultrazvuka visokog intenziteta u svrhu inaktivacije nepoželjnih mikroorganizama i enzima, za homogenizaciju mlijeka, za poboljšanje fermentacije, za operacije poput rezanja sira za uklanjanje plinova, te za povećavanje antioksidacijskog potencijala (Hercceg i sur., 2009; Cameron i sur., 2009).

Utjecaj ultrazvuka na proteine mlijeka

Veliki broj istraživanja bavi se utjecajem ultrazvuka na promjene u sastavu mlijeka pri čemu se puno pozornosti posvećuje promjenama koje se događaju na proteinima kao jednom od najznačajnijih sastojaka mlijeka namijenjenog za daljnju preradu u proizvode poput sira i jogurta. Villamiel i De Jong (2000) su ispitivali utjecaj kombinacije ultrazvuka i triju različitih temperatura (61, 70 i $75,5 \text{ °C}$) na kazein, proteine sirutke, mliječnu mast i neke enzime mlijeka. Niti jedan od ispitivanih režima nije uzrokovao promjene na strukturi kazeina, dok su proteini sirutke bili puno osjetljiviji i podlegli su procesu denaturacije. Režek-Jambrak i sur. (2008) ispitivali su utjecaj ultrazvuka na neka funkcionalna svojstva modelnih otopina proteina sirutke. Pri tom se pokazalo kako ultrazvuk visokog intenziteta (20 kHz) pozitivno djeluje na svojstva poput topljivosti i sposobnosti stvaranja pjene, dok je ultrazvuk frekvencije 40 kHz pokazao pozitivan učinak na ista svojstva samo u slučaju kraćih tretmana u trajanju 15 minuta. Ultrazvuk niskog intenziteta (500 kHz) nije pokazao nikakav utjecaj na sposobnost ispitivanih otopina proteina sirutke da stvaraju pjenu. Krešić i sur. (2008) su ispitivali utjecaj nekoliko novih metoda procesiranja hrane na reološka i termofizikalna svojstva modelnih otopina proteina sirutke. Također se pokazalo kako tretman ultrazvukom visokog intenziteta (20 kHz) u trajanju 15 minuta značajno povećava topljivost proteina sirutke, te im snižava točku ledišta. Daljnja istraživanja također su potvrdila kako obrada otopina α -laktalbumina ultrazvukom frekvencije 20 kHz

značajno povećava električnu vodljivost i topljivost te smanjuje točku leđišta istih (Režek-Jambrak i sur., 2010).

Nadalje, Cameron i sur. (2009) ispitivali su utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na mikrobiološku kvalitetu i sastojke mlijeka. Pri tom su zaključili kako ultrazvuk ne pokazuje negativan učinak na proteine mlijeka, mliječnu mast i laktozu pa bi se mogao koristiti kao predtretman mlijeka namijenjenog za sirenje te omogućiti veći prinos sira. Međutim, pokazalo se kako ultrazvuk ne inaktivira enzime poput laktoperoksidaze i alkalne fosfataze pa bi ga trebalo primjenjivati u kombinaciji sa blažim toplinskim režimima obrade.

Utjecaj ultrazvuka na mliječnu mast

Jedan od zapravo najznačajnijih učinaka koji se postiže primjenom ultrazvuka je efekt homogenizacije (Knorr i sur., 2004; Patist i Bates, 2008), što bi pri optimiranju procesa u mljekarskoj industriji bilo od velike koristi, budući da se jednom tehnološkom operacijom mogu zamijeniti dosadašnje dvije - homogenizacija i toplinska obrada. Time se znatno smanjuje trajanje procesa pasterizacije, homogenizacije i emulgiranja, kao i snižavanje temperatura pri kojima se ti procesi provode, a da se pri tom postiže isti učinak kao i primjenom tradicionalnih metoda (Mason i sur., 1996; Režek-Jambrak i sur., 2009). U svrhu homogenizacije mlijeka primjenjuje se ultrazvuk visokog intenziteta (oko 100 W), jer se na taj način postiže zadovoljavajuće smanjenje masnih globula (promjer do 1 μm) (Režek-Jambrak i sur., 2009). Villamiel i De Jong (2000) uočili su kako se puno bolji rezultati homogenizacije odnosno adekvatnije smanjenje veličine globula mliječne masti i njihova raspodjela unutar mlijeka postižu ukoliko temperatura tijekom obrade ultrazvukom naraste na otprilike 70 do 75,5 °C. Wu i sur. (2001) također su ispitivali primjenu ultrazvuka u svrhu homogenizacije mlijeka i pri tom postigli vrlo dobre rezultate. Mlijeko su homogenizirali na konvencionalan način primjenom tlaka od 1800 psi (124 bara) pri temperaturi od 60 °C te primjenom ultrazvuka snage 90 W, 225 W odnosno 450 W u trajanju 1, 6 i 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Dobiveni rezultati ukazuju kako je primjenom ultrazvuka jakosti 225 W u trajanju 10 minuta te jakosti 450 W u sva tri testirana tretmana (1, 6 i 10 min) dobiven jednak ili bolji efekt homogenizacije u odnosu na konvencionalan postupak.

Međutim, u nekoliko istraživanja pokazalo se kako primjena ultrazvuka može imati negativan učinak na senzorska svojstva mlijeka, što se dovodi u vezu prvenstveno s promjenama na strukturi mliječne masti. Riener i sur. (2009a) pomoću plinske kromatografije i masene spektrometrije uspjeli su identificirati nekoliko hlapljivih spojeva, prvenstveno aldehida i aromatskih ugljikovodika, nastalih u mlijeku prilikom ultrazvučnog tretmana. Pretpostavlja se da ti aldehidi nastaju kao posljedica ultrazvukom prouzročene oksidacije lipida prisutnih u mlijeku, dok aromatski ugljikovodici vjerojatno nastaju cijepanjem bočnih lanaca aminokiselina poput fenilalanina. Tvari arome koje potječu od tih spojeva jesu miris i okus na gumu te metalni miris, čiji se intenzitet znatno smanjuje ukoliko se ultrazvučni tretmani provode pri 100 W.

Stoga je kod korištenja ultrazvuka visokog intenziteta u svrhu homogenizacije potrebno pažljivo odabrati procesne parametre poput promjera sonde ultrazvučnog postava, frekvencije i snage tretiranja. Također je bitno održavati niske procesne temperature kako bi se onemogućile nepoželjne reakcije između kojih je oksidacija masti i stvaranje slobodnih radikala, a koji uzrokuju nepoželjne senzorske promjene mlijeka poput pojave neželjenih primjesa mirisa i okusa po metalu, što uzorke čini nepoželjnima (Režek-Jambrak i sur., 2009).

Utjecaj ultrazvuka na proces fermentacije mlijeka

Mnogi znanstvenici istraživali su utjecaj primjene ultrazvuka na proces fermentacije u mljekarskoj industriji, a postignuti rezultati su vrlo obećavajući. Šener i sur. (2006) ispitivali su utjecaj primjene ultrazvuka kao alternativne metode za poboljšanje procesa hidrolize laktoze. U tu svrhu su mlijeko inokulirali enzimom β -galaktozidazom dobivenim iz soja *Kluyveromyces marxianus* te su ispitivali stupanj hidrolize laktoze pri različitim koncentracijama enzima i ultrazvučnim snagama. Najbolje rezultate dobili su primjenom ultrazvuka ulazne snage 20 W i koncentraciji enzima od 1 mL/L pri čemu je postignut stupanj hidrolize od 90 %, a preostala aktivnost enzima iznosila je 75 %.

Wang i sur. (1996) postigli su puno bolji stupanj hidrolize laktoze pomoću *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ukoliko su na mlijeko neposredno nakon inokulacije djelovali ultrazvukom u odnosu na

netretirano mlijeko. Nguyen i sur. (2009) primjenom ultrazvuka snage 100 W u trajanju 7, 15 i 30 minuta uspjeli su znatno smanjiti vrijeme potrebno za postizanje pH vrijednosti 4,7 pri fermentaciji mlijeka kulturama *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 i *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12. Pretpostavljeni je mehanizam da ultrazvuk uzrokuje bolje otpuštanje intracelularne β -galaktozidaze iz stanica bakterijske kulture, koja pokazuje veću sposobnost razgradnje laktoze van stanica nego unutar njih.

Riener i sur. (2009b) uspoređivali su fizikalno-kemijska svojstva i mikrostrukturu jogurta proizvedenog iz mlijeka obrađenog termosonifikacijom u odnosu na konvencionalno proizvedeni jogurt. Dobiveni rezultati pokazali su kako se mlijeko obrađeno termosonifikacijom zgrušalo pri višim pH vrijednostima tj. fermentacija je skraćena, a proizvedeni jogurt odlikovao se boljom viskoznošću i većom sposobnošću zadržavanja vode u odnosu na tradicionalno proizvedeni jogurt. Također je pomoću elektronskog mikroskopa uočeno kako jogurt proizveden iz termosonificiranog mlijeka ima potpuno drukčiju strukturu gela koja nalikuje strukturi pčelinjeg voska.

Slične rezultate dobili su i Wu i sur. (2001) koji su ispitivali utjecaj ultrazvuka na homogenizaciju mlijeka i trajanje fermentacije u proizvodnji jogurta te na neka fizikalna svojstva jogurta. Jogurt je proizveden na dva različita načina. Prvi način uključivao je uobičajenu toplinsku obradu pri 95 °C i brzo hlađenje na 15 °C, nakon čega je mlijeko homogenizirano primjenom ultrazvuka jačine 90 W, 225 W odnosno 450 W u trajanju 6 minuta. Nakon homogenizacije dodana je jogurtna kultura te je praćen proces fermentacije mjerenjem pH vrijednosti u određenim vremenskim intervalima. Drugi način proizvodnje jogurta uključivao je jednake procesne parametre s tim da je mlijeko nakon toplinske obrade ohlađeno i inokulirano te potom tretirano ultrazvukom u trajanju 8 minuta. Kao kontrolni uzorak proizveden je jogurt na konvencionalan način. Dobiveni rezultati ukazuju kako primjena ultrazvuka ulazne snage 225 W i 450 W u trajanju 8 minuta nakon inokulacije mlijeka jogurtnom kulturom skraćuje postupak fermentacije i do 30 minuta u odnosu na kontrolni uzorak. Oba načina tretmana ultrazvukom pozitivno su djelovala na fizikalna svojstva jogurta odnosno doprinijela su povećanju viskoznosti i sposobnosti zadržavanja tekućine te smanjila sinerezu.

Pulsirajuće električno polje (PEP)

Pulsirajuće električno polje spada među metode najvišeg potencijala u iznalaženju alternativa toplinskoj obradi mlijeka i mliječnih prerađevina, ukoliko se izuzme postupak mikrofiltracije u kombinaciji s umjereno visokom toplinskom obradom. Procesiranje hrane pulsirajućim električnim poljem (PEP) podrazumijeva primjenu vrlo brzih električnih impulsa trajanja do 100 μ s pod visokim naponom (obično 20 do 50 kV/cm). Pri tome se namirnica nalazi smještena u komori između dvije elektrode, najčešće pri sobnoj temperaturi. Tijekom samog procesa dolazi do stvaranja određene topline uzrokovane strujnim impulsima, ali kako je porast temperature minimalan ne može se govoriti o toplinskoj obradi hrane (Bendicho i sur., 2002b; Devlieghere i sur., 2004; Lelas, 2006; Floury i sur., 2006). Mehanizam inaktivacije mikroorganizama pulsirajućim električnim poljem nije u potpunosti poznat, ali najvjerojatnije dolazi do promjena u propusnosti staničnih membrana što rezultira staničnom smrću (Shamsi i sur., 2008).

Mlijeko i tekući mliječni proizvodi pripadaju u medije na kojima se najviše istraživala primjena pulsirajućeg električnog polja, obzirom da je oprema za procesiranje dizajnirana tako da pogoduje najviše tekućim namirnicama koje neće izazivati probleme u radu pumpe (Devlieghere i sur., 2004; Bendicho i sur., 2002b). Nedostatak je same metode ponajviše u činjenici kako je industrijska oprema za procesiranje vrlo rijetka, dosta skupa i ima ograničene kapacitete čiji maksimum iznosi svega 1800 L/h (Devlieghere i sur., 2004).

Primjena PEP metode u mljekarskoj industriji se istražuje kako bi se zamijenila prvenstveno obrada visokim temperaturama sterilizacije koja može rezultirati nekim nepoželjnim pojavama poput promjene boje, pojave okusa po kuhanom, karameliziranom mlijeku, te gubitka nutritivne vrijednosti zbog denaturacije proteina, inaktivacije nekih endogenih enzima i sl. (Craven i sur., 2008; Jeličić i sur., 2010).

Utjecaj pulsirajućeg električnog polja na neke sastojke i svojstva mlijeka

Bendicho i sur. (2002a) istraživali su utjecaj PEP metode na mikronutrijente mlijeka odnosno na udio pojedinih vitamina topljivih u vodi (riboflavin, tiamin i askorbinska kiselina) i vitamina topljivih u

mastima (kolekalciferol i tokoferol) u odnosu na učinke koje uvriježeni režimi pasterizacije imaju na iste sastojke. Mlijeko je pri tom tretirano električnim poljem jakosti 18,3 do 27,1 kV/cm propuštanjem pulseva u trajanju 400 μ s. Nisu primijećene nikakve nepoželjne promjene senzorskih svojstava niti smanjenje udjela većine vitamina prisutnih u mlijeku te je jedino zabilježen veći pad udjela askorbinske kiseline primjenom električnog polja jakosti 22,6 kV/cm u trajanju 400 μ s u odnosu na LTLT ili HTST pasterizaciju.

Garcia-Amezquita i sur. (2009) tretirali su mlijeko električnim poljima intenziteta 36 kV/cm i 42 kV/cm propuštanjem 64 μ s pulsa te su pratili promjene koje ti režimi uzrokuju na mliječnoj masti. Pri tom niti jedan režim nije uzrokovao značajne promjene u veličini globula mliječne masti, no došlo je do međusobnog povezivanja manjih globula što je uzrokovalo prividan porast udjela globula većeg promjera. Međutim, u novije vrijeme neka su istraživanja rezultirala spoznajama kako pulsirajuće električno polje ima utjecaj na proteine mlijeka.

Tako su Yu i sur. (2009) kroz mlijeko propuštali 120 pulseva električnog polja intenziteta oko 30 kV/cm u kombinaciji s temperaturama ispod 50 °C te su pratili utjecaj tog režima na proces enzimatskog sirenja mlijeka. Pri tom su uspjeli znatno skratiti vrijeme potrebno za nastanak koagulaciju mlijeka, a proizvedeni gruš se odlikovao boljom čvrstoćom u odnosu na gruš dobiven od pasteriziranog mlijeka. Time se kombinacija umjerenih temperatura i PEP metode pokazala kao jedna dobra alternativa za obradu mlijeka namijenjenog procesu proizvodnje sira.

Fluory i sur. (2006) ispitivali su utjecaj pulsirajućeg električnog polja jakosti 45-55 kV/cm na mikrobiološku kvalitetu i neke sastojke mlijeka. Pri tom su kroz mlijeko propuštali impulse u trajanju 2,1-3,5 μ s uz temperaturu medija od 50 °C. Rezultati istraživanja pokazali su kako tretmani PEP metodom znatno snizili viskoznost mlijeka u odnosu na kontrolni uzorak (sirovo mlijeko) što je vjerojatno posljedica promjena koje su se dogodile na kazeinskim micelama ili, pak, posljedica promjena u mineralnom sastavu mlijeka, obzirom da oba čimbenika uvelike utječu na molekularne interakcije i agregaciju istih. Osim toga, sposobnost grušanja mlijeka znatno se poboljšala nakon tretmana pulsirajućim električnim poljem.

Zhao i Yang (2010) ispitivali su utjecaj pulsirajućeg električnog polja na agregaciju ovalbumina i albumina krvnog seruma (BSA) pojedinačno, te na mješavinu tih dvaju proteina. Pokazalo se kako električna polja jakosti iznad 25 kV/cm uzrokuju agregaciju ovalbumina uslijed povezivanja slobodnih sulfhidrilnih skupina u disulfidne mostove te uslijed međusobnih interakcija nastalih disulfidnih mostova. Međutim, u slučaju albumina krvnog seruma (BSA) nije došlo do agregacije primjenom električnih polja jakosti od 20 do 35 kV/cm što bi se moglo pripisati manjem broju slobodnih sulfhidrilnih skupina potrebnih za njihovu agregaciju. Također je na isti način tretirana i mješavina tih dvaju proteina, a pokazalo se kako do njihovih međusobnih interakcija dolazi tek primjenom električnog polja jakosti iznad 25 kV/cm. Time su dobiveni znanstveni dokazi kako se pulsirajuće električno polje može primijenjivati u svrhu modifikacije proteinskog profila namirnica s ciljem poboljšanja nutritivne vrijednosti i funkcionalnih svojstava istih.

Xiang i sur. (2011) ispitivali su utjecaj tretmana pulsirajućim električnim poljem na strukturu i površinsku hidrofobnost izolata proteina sirutke. Pri tom su 3 %-tni i 5 %-tni izolati tretirani propuštanjem 10, 20 i 30 impulsa u električnom polju jakosti 12, 16 i 21 kV/cm, a dobiveni rezultati ukazuju kako je pri tim uvjetima došlo do promjena u strukturi proteina sirutke te se povećala površinska hidrofobnost istih. Stoga ova skupina autora smatra kako bi metoda pulsirajućeg električnog polja mogla biti primijenjena u obradi tekućih namirnica koje sadrže izolate proteina sirutke u svrhu njihove modifikacije kako bi se dobio proizvod određenih željenih svojstava.

Nadalje, Yu i sur. (2010) tretirali su mlijeko električnim poljem jakosti 30 kV/cm propuštajući 120 impulsa u trajanju po 2 μ s te su iz njega proizvodili sirni gruš. Osim toga, kao kontrolni uzorci proizvedeni su gruševi iz svježeg, toplinski neobrađenog, i pasteriziranog mlijeka. Potom je praćen proces proteolize svih sireva inkubiranjem salamure (mješavina gruša i 0,17 % otopine natrijevog klorida) na 30 °C tijekom 5 dana, a peptidi topljivi u vodi su zatim određeni pomoću HPLC metode. Dobiveni rezultati su pokazali kako je stupanj proteolize izražen kao koncentracija peptida i slobodnih aminokiselina u sirevima proizvedenim iz mlijeka obrađenog PEP metodom intermedijar stupnja proteolize sireva proizvedenih iz pasteriziranog i toplinski neobrađe-

nog mlijeka. Time se pulsirajuće električno polje pokazalo metodom procesiranja velikog potencijala za primjenu u proizvodnji visokokvalitetnih sireva sa maksimalno očuvanom nutritivnom vrijednosti.

Umjesto zaključka

Trenutno postoji puno manje znanstvenih spoznaja o utjecaju pulsirajućeg električnog polja na pojedine sastojke mlijeka nego u slučaju istraživanja primjene visokog hidrostatskog tlaka i ultrazvuka. S jedne strane to čini ovu metodu najviše obećavajućom kada se radi o zamjeni toplinske obrade u mljekarskoj industriji, no s druge strane svakako je potrebno posvetiti više pažnje istraživanju utjecaja pulsirajućeg električnog polja na pojedine sastojke mlijeka, kao i na svojstva poput sposobnosti grušanja te senzorskih karakteristika. Osim toga, brojna istraživanja provedena na svakoj od tri opisane metode rezultirala su brojnim korisnim spoznajama koje mogu poslužiti u kreiranju novih tehnoloških operacija u mljekarskoj industriji. Time je otvoren put u razvoj novih načina proizvodnje već postojećih tradicionalnih mliječnih proizvoda, prvenstveno sireva, sa maksimalno očuvanim nutritivnim i funkcionalnim svojstvima, a uz osiguravanje odgovarajuće mikrobiološke kvalitete i skraćivanje trajanja procesa poput koagulacije mlijeka i zrenja sireva.

Effect of high hydrostatic pressure, ultrasound and pulsed electric fields on milk composition and characteristics

Summary

High hydrostatic pressure, ultrasonication and pulsed electric fields (PEF) belong to novel food processing methods which are mostly implemented in combination with moderate temperatures and/or in combination with each other in order to provide adequate microbiological quality with minimal losses of nutritional value. All of three mentioned methods have been intensively investigated for the purpose of inactivation and reduction of foodborne microorganisms present in milk and dairy products. However, a large number of scientific researches have been dedicated to investigation of impact of these methods on changes in constituents like milk

fat, milk proteins and lactose as well as changes in mechanisms like renneting properties and coagulation of milk. The aim of this research was to give an overview of changes in milk constituents induced by high hydrostatic pressure, ultrasonication and pulsed electric field treatments as well as to suggest how these changes could improve conventional processes in the dairy industry.

Key words: high hydrostatic pressure, ultrasound, pulsed electric fields, milk, characteristics

Literatura

1. Anema, S.G. (2010): Effect of pH at pressure treatment on the acid gelation of skim milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11, 265-273.
2. Arias, M., Lopez-Fandino, R., Olano, A. (2000): Influence of pH on the effects of high pressure on milk proteins. *Milchwissenschaft* 55, 191-194.
3. Bendicho, S., Espachs, A., Arantegui, J., Martin, O. (2002a): Effect of high intensity pulsed electric fields and heat treatments on vitamins of milk. *Journal of Dairy Research* 69, 113-123.
4. Bendicho, S., Barbosa-Canovas, G.V., Martiny, O. (2002b): Milk processing by high intensity pulsed electric fields. *Trends in Food Science and Technology* 13, 195-204.
5. Bouaouina, H., Desrumaux, A., Loisel, C., Legrand, J. (2006): Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. *International Dairy Journal* 16, 275-284.
6. Brondum, J., Egebo, M., Agerskov, C., Busk, H. (1998): Online park carcass grading with the autoform ultrasound system. *Journal of Animal Science* 76, 1859-1868.
7. Butz, P., Tauscher, B. (2002): Emerging technologies: chemical aspects. *Food Research International* 35 (2/3), 279-284.
8. Cameron, M., McMaster, L.D., Britz, T.J. (2009): Impact of ultrasound on dairy spoilage microbes and milk components. *Dairy Science & Technology* 1, 83-89.
9. Craven, H.M., Swiergon, Ng, S., Midgely, J., Versteeg, C., Coventry, M.J., Wan, J. (2008): Evaluation of pulsed electric field and minimal heat treatments for inactivation of pseudomonads and enhancement of milk shelf-life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 211-216.
10. Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J. (2004): New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal* 14, 273-285.
11. Fandino-Lopez, R. (2006): High pressure-induced changes in milk proteins and possible applications in dairy technology. *International Dairy Journal* 16, 1119-1131.
12. Fellows, P.J. (2000): *Food Processing Technology - Principles and Practice* (2nd Edition). Woodhead Publishing, Cambridge, Engleska.

13. Flury, J., Grosset, N., Leconte, N., Pasco, M., Madec, M.N., Jeantet, R. (2006): Continuous raw skim milk processing by pulsed electric field at non-lethal temperature: effect on microbial inactivation and functional properties. *Lait* 86, 43-57.
14. Garcia-Amezquita, L.E., Primo-Mora, A.R., Barbosa-Cánovas, G.V., Sepulveda, D.R. (2009): Effect of non-thermal technologies on the native size distribution of fat globules in bovine cheese-making milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, 491-494.
15. Harte, F.M., Gurram, S.R., Luedecke, L.O., Swanson, B.G., Barbosa-Cánovas, G.V. (2007): Effect of high hydrostatic pressure and whey proteins on the disruption of casein micelle isolates. *Journal of Dairy Research* 74, 452-458.
16. Herceg, Z., Brnčić, M., Režek Jambrak, A., Rimac Brnčić, S., Badanjak, M., Sokolić, I. (2009): Mogućnost primjene ultrazvuka visokog intenziteta u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo* 59 (1), 65-69.
17. Huppertz, T., Fox P. F., Kelly, A. L. (2004a): High-pressure treatment of bovine milk: effects on casein micelles and whey proteins. *Journal of Dairy Research* 71, 97-106.
18. Huppertz, T., Fox, P. F., Kelly, A.L. (2004b): High pressure-induced denaturation of a-lactalbumin and b-lactoglobulin in bovine milk and whey: a possible mechanism. *Journal of Dairy Research* 71, 489-495.
19. Huppertz, T., Fox, P.F., Kelly, A.L. (2004c): Effect of high pressure on the yield of cheese curd from bovine milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 5, 1-8.
20. Huppertz, T., Smiddy, M.A., Upadhyay, V.K., Kelly, A.L. (2006): High-pressure-induced changes in bovine milk: a review. *International Journal of Dairy Technology* 59 (2), 58-66.
21. Jeličić, I., Božanić, R., Tratnik, Lj., Lisak, K. (2010): Mogućnost primjene netradicionalnih postupaka procesiranja u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo* 60 (2), 113-126.
22. Kessler, H.G. (2002): *Food and Bio Process Engineering - Dairy Technology*. Verlag A. Kessler, Munich, Germany.
23. Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., Lee, D.U. (2004): Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology* 15, 261-266.
24. Knorr, D., Reineke, K., Mathys, A., Heinz, V., Buckow, R. (2011): High-Pressure induced effects on bacterial spores, vegetative microorganisms, and enzymes. U : Food Engineering Interfaces (ured: Aguilera, J., Barbosa-Cánovas, G.V., Simpson, R., Welti-Chanes, J., Bermudez-Aguirre, D.), str. 325-341, Springer, New York, USA.
25. Krešić, G. (2005): Utjecaj visokog tlaka na funkcionalna svojstva proteina sirutke. Doktorska disertacija, Zagreb.
26. Krešić, G., Lelas, V., Režek-Jambrak, A., Herceg, Z., Rimac-Brnčić, S. (2008): Influence of novel food processing technologies on the rheological and thermophysical properties of whey proteins. *Journal of Food Engineering* 87, 64-73.
27. Lelas, V. (2006): Nove tehnike procesiranja hrane. *Mljekarstvo* 56 (4), 311-330.
28. Marjanović, D., Jovanović, S., Baars, A., Barać, M. (2011): Effects of high hydrostatic pressure on the viscosity of β -lactoglobulin solution. *Mljekarstvo* 61 (2), 135-144.
29. Mason, T.J., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P. (1996): The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry* 3, 253.
30. McClements, D.J. (1995): Advances in applications of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science and Technology* 6, 293-299.
31. McClements, J.M.J., Patterson, M.F., Linton, M. (2001): The effect of growth stage and growth temperature on high hydrostatic pressure inactivation of some psychrotrophic bacteria in milk. *Journal of Food Protection* 64 (4), 514-522.
32. Messens, W., Dewettinck, K., Van Camp, J., Huyghebaert, A. (1998): High pressure brining of Gouda cheese and its effect on the cheese serum. *Lebensmittel-Wissenschaft-und-Technologie* 31, 552-558.
33. Moatsou, G., Bakopanos, C., Katharios, D., Katsaros, G., Kandarakis, I., Taoukis, P., Politis, I. (2008): Effect of high-pressure treatment at various temperatures on indigenous proteolytic enzymes and whey protein denaturation in bovine milk. *Journal of Dairy Research* 75, 262-269.
34. Nguyen, T.M.P., Lee, Y. K., Zhou, W. (2009): Stimulating fermentative activities of bifidobacteria in milk by high intensity ultrasound. *International Dairy Journal* 19, 410-416.
35. Norton, T., Sun, D.W. (2008): Recent Advances in the Use of High Pressure as an Effective Processing Technique in the Food Industry. *Food and Bioprocess Technology* 1, 2-34.
36. Padiernos, C.A., Lim, S.Y., Swanson, B.G., Ross, C.F., Clark, S. (2009): High hydrostatic pressure modification of whey protein concentrate for use in low-fat whipping cream improves foaming properties. *Journal of Dairy Science* 92, 3049-3056.
37. Patist, A., Bates, D. (2008): Ultrasonics innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 147-154.
38. Riener, J., Noci, F., Cronin, D. A., Morgan, D.J., Lyng, J. G. (2009a): Characterisation of volatile compounds generated in milk by high intensity ultrasound. *International Dairy Journal* 19, 269-272.
39. Riener, J., Noci, F., Cronin, D. A., Morgan, D.J., Lyng, J. G. (2009b): The effect of thermosonication of milk on selected physicochemical and microstructural properties of yoghurt gels during fermentation. *Food Chemistry* 114, 905-911.
40. Režek-Jambrak, A., Mason, T.J., Lelas, V., Herceg, Z., Ljubić-Herceg, I. (2008): Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering* 86, 281-287.
41. Režek-Jambrak, A., Lelas, V., Herceg, Z., Badanjak, M., Batur, V., Muža, M. (2009): Prednosti i nedostaci primjene ultrazvuka visoke snage u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo* 59 (4), 267-281.

42. Režek-Jambrak, A., Mason, T.J., Lelas, V., Krešić, G. (2010): Ultrasonic effect on physicochemical and functional properties of α -lactalbumin. *LWT - Food Science and Technology* 43, 254-262.
43. Rodiles-Lopez, J.O., Jaramillo-Flores, M.E., Gutierrez-Lopez, G.F., Hernandez-Arana, A., Fosado-Quiroz, R.E., Barbosa-Canovas, G.V., Hernandez-Sanchez, H. (2008): Effect of high hydrostatic pressure on bovine α -lactalbumin functional properties. *Journal of Food Engineering* 87, 363-370.
44. Sala, F.J., Burgos, J., Condon, S., Lopez, P., Raso, J. (1995): Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. U: Gould, G W. (ur.) *New Methods of Food Preservation*. Blackie Academic & Professional, London.
45. Shamsi, K., Versteeg, C., Sherkat, F., Wan, J. (2008): Alkaline phosphatase and microbial inactivation by pulsed electric field in bovine milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 217-223.
46. Shin, S.Y., Calvisi, E.G., Beaman, T.C., Pankratz, H.S., Gerhardt, P., Marquis, R.E. (1994): Microscopic and thermal characterisation of hydrogen peroxide killing and lysis of spores and protection by transition metal ions, chelators and antioxidants. *Applied Environmental Microbiology* 60, 3192-3197.
47. Şener, N., Apar, D.K., Özbek, B. (2006): A modelling study on milk lactose hydrolysis and β -galactosidase stability under sonication. *Process Biochemistry* 41, 1493-1500.
48. Suslick, K.S. (1989): The chemical effects of ultrasound. *Scientific American* 60, 62-68.
49. Trujillo, A.J., Capellas, M., Bu, M., Royo, C., Gervilla, X., Felipe, X., Sendra, E., Saldo, J., Ferragut, V., Guamis, B. (2000): Application of high pressure treatment for cheese production. *Food Research International* 33, 311-316.
50. Villamiel, M., De Jong, P. (2000): Influence of High-Intensity Ultrasound and Heat Treatment in Continuous Flow on Fat, Proteins, and Native Enzymes of Milk. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48 (2), 472-478.
51. Xiang, B. Y., Ngadi, M.O., Ochoa-Martinez, L. A., Simpson, M.V. (2011): Pulsed Electric Field-Induced Structural Modification of Whey Protein Isolate. *Food Bioprocess Technology* 4, 1341-1348.
52. Yaldagard, M., Mortazavi, S.A., Tabatabaie, F. (2008): The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review of microbiological and quality aspects. *African Journal of Biotechnology* 7 (16), 2739-2767.
53. Yu, L.J., Ngadi, M., Raghavan, G.S.V. (2009): Effect of temperature and pulsed electric field treatment on rennet coagulation properties of milk. *Journal of Food Engineering* 95, 115-118.
54. Yu, L.J., Ngadi, M., Raghavan, G.S.V. (2010): Proteolysis of Cheese Slurry Made from Pulsed Electric Field-Treated Milk. *Food and Bioprocess Technology* First published online 31. March 2010; DOI 10.1007/s11947-010-0341-5.
55. Wang, D., Sakakibara, M., Kondoh, N., Suzuki, K. (1996): Ultrasound-Enhanced Lactose Hydrolysis in Milk Fermentation with *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 65, 86-92.
56. Wu, H., Hulbert, G.J., Mount, J.R. (2001): Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 1, 211-218.
57. Zhao, W., Yang, R. (2010): Pulsed Electric Field Induced Aggregation of Food Proteins: Ovalbumin and Bovine Serum Albumin. *Food and Bioprocess Technology* First published online 12. November 2010; DOI 10.1007/s11947-010-0464-8.