

## Prednosti i nedostaci primjene ultrazvuka visoke snage u mljekarskoj industriji

Anet Režek Jambrak<sup>1\*</sup>, Vesna Lelas<sup>1</sup>, Zoran Herceg<sup>1</sup>,  
Marija Badanjak<sup>1</sup>, Verica Batur<sup>2</sup>, Mislav Muža<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb

<sup>2</sup>Prehrambeno-tehnološka škola, Gjуре Prejca 2, Zagreb

Prispjelo - Received: 15.07.2009.

Prihvaćeno - Accepted: 05.11.2009.

### Sažetak

Konzerviranje hrane termičkom sterilizacijom još uvijek je najčešći oblik konzerviranja. Međutim, osim poželjnog učinka na mikroorganizme, povišena temperatura istovremeno izaziva značajne promjene na nutritivnim i organoleptičkim značajkama hrane. Gubitak kvalitete proizvoda može biti povezan s deformacijom strukture i teksture, modifikacijom makromolekula i stvaranjem novih tvari iz reakcija kataliziranih toplinom. Ultrazvuk je pritom jedna od novih metoda koja može uvelike pomoći različitim procesima u prehrambenoj industriji. Nove primjene ultrazvuka visoke snage (HPU) uključuju uništavanje mikroorganizama, pomoć kod membranskih procesa, poboljšavanje teksture mliječnih proizvoda, poboljšavanje funkcionalnih i tehnoloških značajki proteina itd. Ultrazvuk se već uspješno primjenjuje u postupcima emulgiranja i homogenizacije mlijeka, ali je pritom nužno voditi računa o mogućim negativnim promjenama, kao što su oksidacija masti, uništavanje enzima te denaturacija proteina. Pravilna primjena ultrazvuka zahtijeva primjenu odgovarajuće snage, amplitude zvučnog vala i frekvencije ultrazvuka, ali i optimalno vrijeme tretiranja kod nižih temperatura kako bi se izbjegle nepoželjne promjene tretiranog materijala.

*Ključne riječi:* ultrazvuk visoke snage (HPU), mljekarska industrija, kavitacija, oksidacija, kvaliteta

### Uvod

Ultrazvuk se kao nedestruktivna metoda (NDT- non destructive testing) u mliječnoj industriji vrlo uspješno koristi za mjerenje razine tekućina u tankovima, detekciju kontaminanata kao što su dijelovi metala ili stakla u proizvodima; za mjerenje protoka u cijevima i debljine cijevi. Koristi se i za određivanje sastava hrane, za mjerenje raspodjele veličina čestica u disperznim sustavima, za određivanje debljina slojeva čokolade ili masti, te tekućih naljeva itd. Ultrazvukom visoke snage moguće je uzrokovati fizikalne promjene na biološkom materijalu i omogućiti ubrzanje pojedinih kemijskih reakcija. Posljedica je inaktivacija mikroorganizama i enzima, olakšano

emulgiranje i homogenizacija, bolja ekstrakcija, bolji učinci sušenja i sl.

Ultrazvuk visoke snage (HPU- high power ultrasound) ima intenzitet viši od  $1 \text{ W cm}^{-2}$  (uobičajeno u rasponu od 10 do  $1000 \text{ W cm}^{-2}$ ) i frekvencije između 18 i 100 kHz (McClements, 1995.; Povey i Mason, 1998.; Villamiel i de Jong, 2000.b).

Ultrazvuk veće snage i niskih frekvencija (od 20 do 100 kHz) smatra se "snažnim ultrazvukom", jer uzrokuje kavitaciju pa nalazi primjenu u prehrambenoj industriji. Primjenjuje se kod odzračivanja tekuće hrane, za induciranje reakcija oksidacije/redukcije, za ekstrakciju enzima i proteina, za inaktivaciju enzima i za indukciju nukleacije kod kristalizacije (Ro-

\*Dopisni autor/Corresponding author: Tel./Phone: +385 1 4605 035; E-mail: arezek@pbf.hr

berts, 1993.; Thakur i Nelson, 1997.; Villamiel i de Jong, 2000a, Li i Sun, 2002.).

Kombinacija ultrazvuka s toplinom i tlakom (manotermosonifikacija) pokazala se učinkovitom u inaktivaciji enzima otpornih na toplinu (Vercet i sur., 1997.). Nadalje, pokazalo se da ultrazvuk visoke snage pospješuje prijenos topline (Lima i Sastry, 1990.; Sastry i sur., 1989.). Ultrazvuk se može uspješno koristiti i kod emulgiranja, sterilizacije, ekstrakcije, odzračivanja, filtriranja, sušenja i pojačavanja oksidacije (Mason, 1998.). Ultrazvuk visokog intenziteta generiran periodičnim mehaničkim gibanjima sonde prenosi ultrazvučnu energiju u tekući medij i uzrokuje vrlo velike promjene u tlaku, koje dovode do stvaranja malih, a vrlo brzo rastućih mjehurića (Mason, 1998.). Mjehurić se širi tijekom negativnog tlaka te implodira tijekom pozitivnog tlaka stvarajući visoke temperature, tlakove i sile na vrhu sonde (Suslick, 1988.). Ultrazvuk visokog intenziteta pospješuje ekstrakciju proteina povećavajući njihovu topljivost (Moulton i Wang, 1982.), ali vodi i do smanjenja molekularne mase proteina. Uspješno je primijenjen i u izolaciji škroba iz riže (Wang i Wang, 2004.).

Utvrđeno je da kavitacija uzrokovana promjenama tlaka (stvorenim ultrazvučnim valovima) ima baktericidni učinak koji se zasniva na stanjivanju staničnih membrana, ograničenom zagrijavanju i stvaranju slobodnih radikala (Butz i Tauscher, 2002.; Fellows, 2000.).

### Osnovne značajke i djelovanje ultrazvuka visoke snage

S obzirom na frekvenciju, zvučni valovi mogu se podijeliti u više područja koja određuju njihovu potencijalnu primjenu (slika 1).

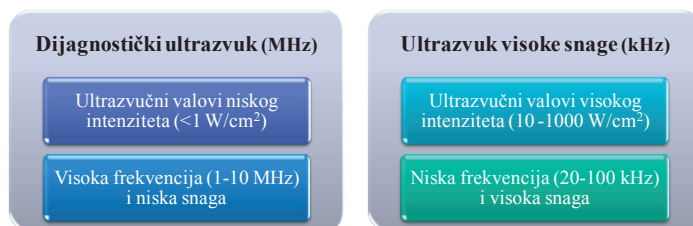
Upotreba ultrazvuka u prehrambenoj industriji predmet je istraživanja i razvoja nekoliko desetaka

godina, a upotrijebljeni rasponi zvuka mogu se općenito podijeliti na dijagnostički ultrazvuk (raspona frekvencije u MHz-ima) i ultrazvuk visoke snage (raspona frekvencija u kHz-ima). Ultrazvučni valovi niskog intenziteta frekvencije 1-10 MHz te vrlo male razine snage (intenzitet manji od 1 W/cm<sup>2</sup>) ne uzrokuju fizikalna i kemijska oštećenja materijala kroz koji val prolazi, pa se mogu koristiti u analitičke svrhe za određivanje sastava, strukture ili viskoznosti hrane.

Ultrazvučni valovi visokog intenziteta frekvencije 20-100 kHz te visoke razine snage (u rasponu intenziteta 10-1000 W/cm<sup>2</sup>) mogu uzrokovati fizikalne promjene na tretiranom materijalu kao i određene kemijske reakcije, ubrzavanje kemijskih reakcija, povećanje brzine difuzije, dispergiranje agregata, ali i uništenje enzima i mikroorganizama.

Prolaskom ultrazvučnog vala kroz medij stvaraju se longitudinalni valovi koji uzrokuju stvaranje alternativne kompresije i razrjeđenja dijelova medija (Povey i Mason, 1998.). U ovisnosti o primijenjenoj frekvenciji i amplitudi zvučnog vala, može se promatrati velik broj fizikalnih, kemijskih i biokemijskih učinaka. Kod obrade hrane važna je činjenica da se tretiranjem ultrazvukom razvija toplina, zbog nastanka kavitacije (implozije mjehurića plina) koja uzrokuje brzu promjenu temperature do 5500 K (5227 °C) i tlaka do 50 MPa (Leighton, 1998.).

Temperatura i tlak generirani su tijekom vrlo kratkih razdoblja na mjestu gdje se dogodila kavitacija (Suslick, 1988.). Količina energije koja se oslobađa zbog kavitacije ovisi o kinetici rasta i raspada mjehurića. Ova energija trebala bi se povećati s porastom napetosti površine na međufazi mjehurića, a smanjiti s tlakom pare tekućine. U namirnicama s velikim udjelom vode postoji visoka površinska napetost, tako da ona može biti vrlo prikladan medij za stvaranje kavitacije.



Slika 1: Područja podjele zvuka prema frekvencijama (Mason, 1998.)

Fig. 1: Frequency ranges of sound (Mason, 1998)

### Kavitacija

Širenje akustičnog vala kroz medij uzrokuje različite promjene, od kojih se samo neke mogu objasniti pojedinim mehanizmima. Najznačajniji su učinci ultrazvuka zagrijavanje, kavitacija, strukturni učinci, kompresija i širenje, turbulencija i drugi.

Tijekom prolaska akustičnog vala kroz medij stvaraju se područja promjenjivih kompresija i ekspanzija tlaka (Sala i sur., 1995.), koji uzrokuju pojavu kavitacije i stvaranja mjehurića plina. Tijekom ciklusa ekspanzije nastali mjehurići postižu veću površinu, čime se povećava difuzija plina. Kada osigurana ultrazvučna energija nije dovoljna kako bi se zadržala plinska faza u mjehuriću, on postiže svoju maksimalnu veličinu i pojavljuje se brza kondenzacija. Kondenzirane molekule se sudaraju, stvarajući udarne valove. Lokalizirane "vruće zone" mogu djelovati baktericidno, međutim, vrlo su ograničene i ne utječu na dovoljno veliku površinu, tako da se baktericidni učinak zasniva na promjenama tlaka.

Akustična kavitacija uključuje stvaranje, rast i snažan raspad malih mjehurića ili praznina u tekućini kao rezultat fluktuacije tlaka (Suslick, 1988.). Djelovanje kavitacije može uzrokovati brzo i potpuno odzračivanje; inicirati različite kemijske reakcije stvarajući slobodne kemijske ione (radikale); povećati stupanj stvaranja emulzije; stvarati visoko koncentrirane emulzije ili jednolične disperzije čestica; inaktivirati enzime i mikroorganizme. Kolaps mjehurića rezultira stvaranjem intenzivnih valova koji mogu značajno promijeniti fizikalno-kemijska svojstva materijala. Kada se ultrazvuk koristi u kombinaciji s konvencionalnim grijanjem, učinak tretmana ultrazvukom pojačava se (npr. homogenizacija mlijeka).

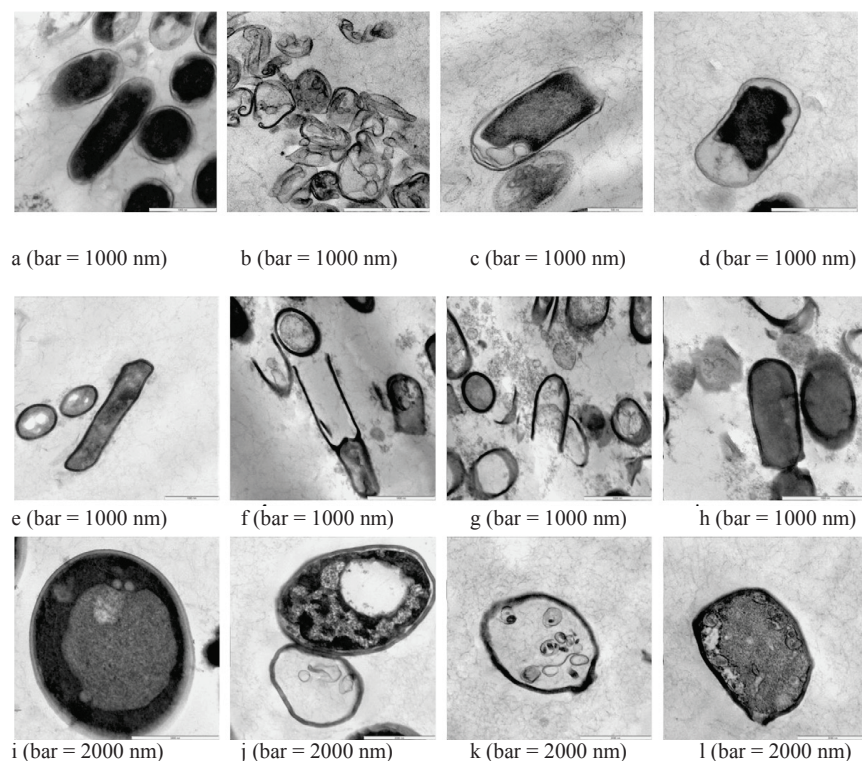
### Prednosti primjene ultrazvuka visoke snage u mljekarskoj industriji

#### *Inaktivacija mikroorganizama*

Moguće primjene ultrazvuka visoke snage u mljekarskoj industriji predmet su brojnih znanstvenih istraživanja. Ova tehnika (intenziteta 10-1000  $Wcm^{-2}$ ) može se primijeniti kao samostalni tretman, u kombinaciji s blagim zagrijavanjem (termosonifikacija, TS), ili u kombinaciji s povišenom temperaturom i tlakom (manotermosonifikacija, MTS) (Mason i sur., 2005.). Objavljeno je nekoliko preglednih radova s opisom primjene ultrazvuka u prehrambe-

noj industriji, uključujući njegov antimikrobni učinak (Knorr i sur., 2004.; Mason, 1999.; Mason i sur., 1996.; Piyasena i sur., 2003.; Zenker, 2004.).

Utvrđeno je da samostalno korištenje ultrazvuka nema značajnijeg utjecaja na inaktivaciju mikroorganizama. Međutim, u kombinaciji sa zagrijavanjem i povišenjem tlaka zapažen je značajan učinak na inaktivaciju enzima i mikroorganizama (Herceg i sur., 2009.). Utvrđeno je da primjenom ultrazvuka kod frekvencija između 18 i 100 kHz dolazi do inaktivacije dijela enzima i mikroorganizama (Lopez i sur., 1994.; Sala i sur., 1995.; Vercet i sur., 2002.; Villamiel i de Jong, 2000.a,b). Prvi rad u ovom području objavili su Ordonez i sur. (1984.) koristeći ultrazvuk od 20 kHz i 160 W u kombinaciji s temperaturama u rasponu od 5 do 62 °C. Kombinacija povišene temperature i ultrazvuka bila je učinkovitija s obzirom na vrijeme tretiranja i potrošenu energiju, u usporedbi s bilo kojim individualnim tretmanom. McClements (1995.) je ustvrdio da je inaktivacija mikroorganizama učinkovitija ako se ultrazvuk koristi u kombinaciji s drugim metodama dekontaminacije kao što su grijanje, ekstremni pH ili klorifikacija. Procese sonifikacije, manosonifikacije, termosonifikacije i manotermosonifikacije koristili su mnogi istraživači (Manas i sur., 2000.; Miles i sur., 1995.; Raso i sur., 1998.; Ordonez i sur., 1984.). Scherba i sur. (1991.) proučavali su učinke ultrazvuka kod 24 kHz na različite bakterije, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, gljivu *Trichophyton mentagrophytes* i viruse (feline herpesvirus tip 1 i feline calicivirus). Na sve bakterije ultrazvuk djeluje baktericidno i to se povećava s vremenom i intenzitetom. Lopez-Malo i sur. (2001.) pokazali su da termosonifikacija može učinkovito inaktivirati i *Penicillium digitatum*. Toplinski i termosonifikacijski tretmani ocjenjivani su kako bi se odredio optimalan pH, aktivitet vode ( $a_w$ ), temperatura i amplituda ultrazvuka. Kod  $a_w$  od 0,99, povećana amplituda ultrazvuka i smanjen pH rezultirali su smanjenjem D-vrijednosti. Kada je pH bio konstantan, veći  $a_w$  rezultirao je manjom D-vrijednošću. Pagan i sur. (1999.) pokazali su da ultrazvučno tretiranje (20 kHz) pri sobnoj temperaturi nema značajnijeg utjecaja na inaktivaciju vrlo opasne patogene bakterije *Listeria monocytogenes* ( $D=4,3$  min), no, u kombinaciji s povišenim tlakom (200 kPa, 400 kPa) vrijeme decimalne redukcije se smanjilo ( $D=1,5$  min,  $D=1$  min). Također, utjecaj



Slika 2: Mikrografske slike stanica *Escherichia coli* dobivene transmisijom elektronskim mikroskopom [(a) netretirane i (b-d) ultrazvučno tretirane], *Lactobacillus acidophilus* [(e) netretirane i (f-h) ultrazvučno tretirane], i *Saccharomyces cerevisiae* [(i) netretirane i (j-l) ultrazvučno tretirane] (Cameron i sur. 2008.)

Fig. 2: Transmission electron micrographs of *Escherichia coli* [untreated (a) and ultrasonicated (b-d)], *Lactobacillus acidophilus* [untreated (e) and ultrasonicated (f-h)] and *Saccharomyces cerevisiae* [untreated (i) and ultrasonicated (j-l)] cells (Cameron et al., 2008)

ultrazvučnog tretiranja poboljšana je na temperatura-  
ma višim od 50 °C.

Bermudez-Aguirre i sur. (2009.) usporedili su vrijeme potrebno za redukciju bakterije *Listeria innocua* ATTC 51742 u sirovom mlijeku na dva načina - ultrazvučnim tretiranjem različitog intenziteta pri temperaturi 63 °C (24 kHz, 400 W) i konvencionalnom šaržnom pasterizacijom (63 °C ± 0,5 °C, 30 minuta).

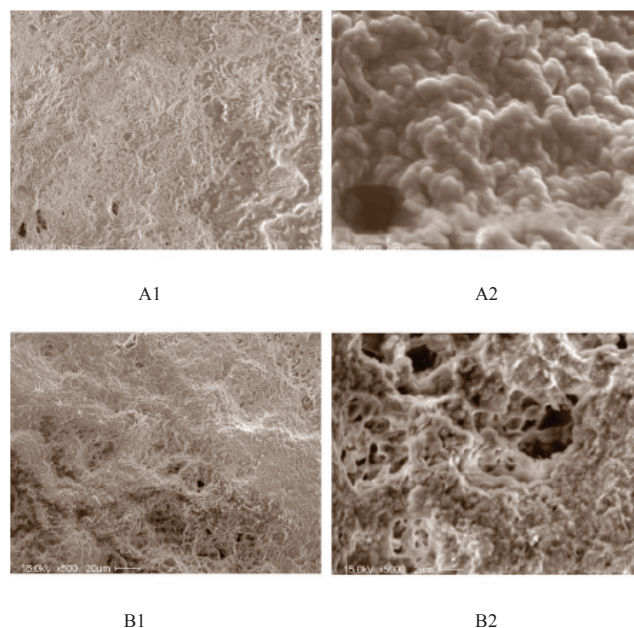
Pokazalo se da tretmani termosonifikacije (3 log decimalne redukcije) u usporedbi s konvencionalnim tretmanom (1,89 log decimalne redukcije) poboljšavaju brzinu inaktivacije mikroorganizama u prvih 10 minuta.

Mehanizam inaktivacije mikroorganizama nije još u potpunosti razjašnjen, iako ga neki autori objašnjavaju mehaničkim šokom koji se javlja kao po-

sljedica kavitacije (Abee i Wouters, 1999.; Butz i Tauscher, 2002.; Grahame, 1996.). Vjerojatno je mjesto oštećenja unutarnja citoplazmatska membrana, budući da nisu zapažene razlike u inaktivaciji između gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija (slika 2) (Scherba i sur., 1991.).

#### Utjecaj ultrazvuka na teksturu gotovog proizvoda

Tekstura gotovih proizvoda vrlo je važna za senzorsku prihvatljivost kod potrošača. U mliječnoj je industriji vrlo bitan proizvod jogurt. Okus jogurta u ustima rezultat je proteinske mreže koja nastaje povezivanjem kazeina. Te nakupine vežu serum i masne globule (Kalab i sur., 1983.). Iz slike 3 vidljive su mikrografske slike teksture jogurta dobivene od konvencionalno tretiranog mlijeka (90 °C/10 min), te od mlijeka koje je bilo termosonificirano (kombina-



Slika 3: Mikrografske slike jogurta dobivene elektronskim mikroskopom od konvencionalno zagrijavanog mlijeka (A) i mlijeka koje je termosonificirano-tretirano ultrazvukom u kombinaciji sa zagrijavanjem (B) (1,5 % mlječne masti) (Riener i sur., 2009.) (Povećanje: A1, B1 je 500 x; A2, B2 je 5000 x)  
 Fig. 3: Electron micrographs of yoghurts from conventionally (A) heated and (B) thermosonicated milk (1.5 % fat) (Riener et al., 2009) (Magnification: A1, B1 x 500; A2, B2 x 5000)

cija ultrazvuka sa zagrijavanjem) pri frekvenciji od 24 kHz i 72 °C. Iz studije je utvrđeno da jogurt koji je pripremljen od termosonificiranog mlijeka ima bolju teksturu, jer je došlo do smanjivanja veličina čestica proteina te bolje homogenizacije mlijeka (Riener i sur., 2009.).

Potencijalna primjena ultrazvuka kako bi se dalje pozitivno utjecalo na teksturalne i fizikalno-kemijske značajke jogurta predočene su u dvije studije. Wu i suradnici (2001.) pokazali su da u usporedbi s jogurtom pripremljenim s netretiranim mlijekom, jogurt pripremljen s mlijekom koje je tretirano ultrazvukom ima značajno veći kapacitet vezanja vode, viskoznost i pokazuje znatno manju sinerezu. Vercet i suradnici (2002.) pokazali su da su jogurti pripremljeni s mlijekom koje je bilo podvrgnuto tretmanu blage termosonifikacije (MTS) imali čvršću teksturu, koja je bila statistički različita od konzistencije jogurta pripremljenog konvencionalnim postupkom.

#### Homogenizacija

Ultrazvuk visoke snage (HPU) koristi se u mljekarstvu za čišćenje opreme i homogeni-

zaciju mlijeka (Villamiel i sur., 1999.). Primjena ultrazvuka omogućuje skraćivanje vremena trajanja procesa pasterizacije, homogenizacije, emulgiranja i radnih temperatura, održavajući isti učinak kao i procesi koji se provode tradicionalnim metodama (Mason, 1999.; Mason i sur., 1996.). Učinci ultrazvuka u homogenizaciji mlijeka pripisuju se pojavi kavitacije (Suslick i sur., 1999.). Glavna pokretačka snaga je mehaničke prirode koja također dovodi i do stvaranja mikrostrujanja unutar tretirane tekućine, dinamičkog miješanja, stvaranja naprezanja unutar tekućine itd. Djelovanjem zvučnog vala dolazi do ubrzanog miješanja slojeva tekućina i razaranja masnih globula u tretiranom mlijeku, što omogućuje ravnomjernu i brzu homogenizaciju. Vrlo je važno reakciju homogenizacije provoditi pravilnim odabirom promjera sonde ultrazvučnog postava, frekvencijom i snagom tretiranja. Pri tome je bitno održavati niske radne temperature kako bi se onemogućile nepoželjne reakcije između kojih je oksidacija masti i stvaranje slobodnih radikala, koje se zbivaju zbog raspada molekula vode (Henglein, 1993.; Makino i sur., 1983.; Riesz i Kondo, 1992.).

Primjena niskih snaga ultrazvuka nema značajan utjecaj na homogenizaciju mlijeka. Homogenizacija mlijeka sa snagom ultrazvuka od 40 W kroz 10 minuta pokazala je sličan učinak kao i konvencionalno tretiranje. Za homogenizaciju mlijeka potrebno je primijeniti ultrazvuk visoke snage (oko 100 W), kako bi se postiglo učinkovito smanjenje masnih globula (do  $1 \mu\text{m}$ ) (Schmidt i sur., 1984.).

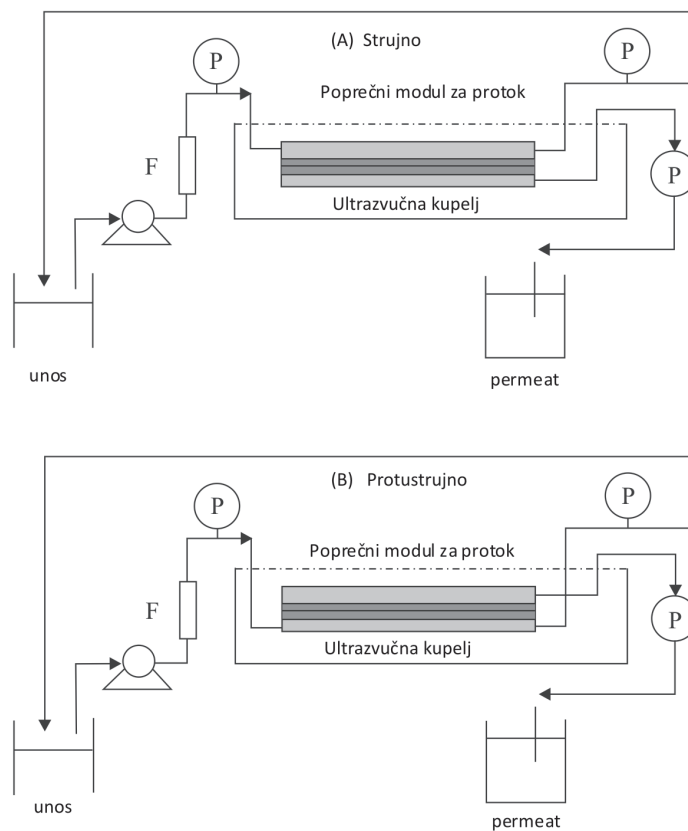
### Membranski procesi

Membranski procesi koji se koriste u mljekarskoj industriji su mikrofiltracija, ultrafiltracija, nanofiltracija i reverzna osmoza. Glavnina primjene je za koncentriranje mlijeka i sirutke. Ultrafiltracija sirutke je jedna od najperspektivnijih tehnologija koja se koristi za koncentriranje i izdvajanje nativnih proteina sirutke. Često se u proizvodnji izolata proteina sirutke koristi mikrofiltracija, tzv. Flow Micro Filtration (FMF) postupak. To je postupak filtriranja sirutke kroz keramičke membrane (filtre) bez upo-

trebe kemijskih reagenasa poput klorovodične kiseline ili natrijevog hidroksida, koji se često koriste za reguliranje pH-vrijednosti sirutke.

Glavni je problem s membranskim filterima što tijekom vremena dolazi do začepjenja površine membrana proteinima sirutke, a time membrana postaje manje učinkovita. To iziskuje stalno čišćenje membrana, što u velikoj mjeri utječe na učinkovitost procesa. U toj fazi postoji mogućnost primjene ultrazvuka visoke snage tijekom filtracije sirutke kao alternativne metode koja je sigurna za okoliš, a omogućuje isplativiju proizvodnju (Saxena i sur., 2009.).

Tenga i sur. (2006.) proučavali su utjecaj ultrazvuka na strujanje i odvajanje tekuće faze kod ultrafiltracije s binarnom proteinskom smjesom BSA (bovine serum albumin)-lizozim, pri čemu su koristili PES (polietersulfon) membrane (30 kDa MWCO-molecular weight cut off). Zaključili su da ultrazvuk (25 kHz and 240 W) povećava protok ultrafiltracije u strujnom i protustrujnom načinu rada (135 % i 120



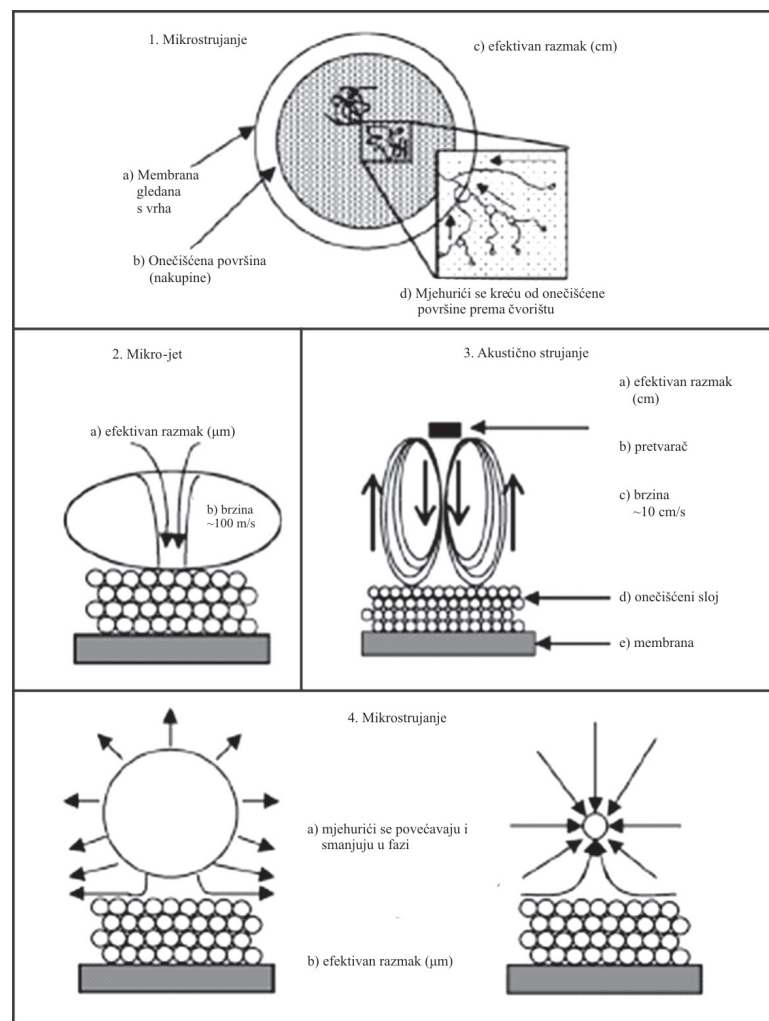
Slika 4: Eksperimentalni postav cross-flow ultrafiltracije u uzlaznom i silaznom strujanju (Saxena i sur., 2009.)

Fig. 4: Experimental set-up of cross-flow UF in the downward and upward modes (Saxena i sur., 2009)

%) i da povećava odbacivanje lizozima (slika 4). Primijećeno je da učinak ultrazvuka kod membranskih filtracija ovisi o više čimbenika, kao što su orijentacija i pozicija ultrazvučnog vala, ultrazvučna frekvencija i snaga, kut emitiranja ultrazvučnog vala, materijal membrane, kućište membrane, tlak kod kojeg se provodi tretman te materijal koji zastaje na membrani. Vjeruje se da povećanje strujanja, bolja separacija i sprječavanje zadržavanja materijala na membrani je u stvari učinak vibracije membrane uzrokovane ultrazvukom, ultrazvučne kavitacije, akustično strujanja

i ultrazvučno zagrijavanje (Saxena i sur., 2009).

Primjena ultrazvuka kod membranskih procesa prvenstveno ima uporište zbog pojave kavitacije. Djelovanjem ultrazvuka koji bi se nalazio vezan za cijevi kroz koje prolazi tekući materijal moglo bi se utjecati na medij. Mehaničke vibracije koje nastaju djelovanjem ultrazvuka visoke snage isto tako imaju pomoć u prevenciji začepljenja filtera membrana, na taj način što prilikom filtriranja omogućuju stvaranje poroznijega filterskog kolača koji se prilikom ispiranja može izbaciti iz sustava. Djelovanjem kavitacije



Slika 5: Mehanizam za odjeljivanje nakupina na membrani pomoću ultrazvučnog čišćenja (Saxena i sur., 2009.)

Fig. 5: Possible mechanisms for particle removal/detachment observed with ultrasonic cleaning (Saxena i sur., 2009)

(1. Microstreamers: a) membrane from the top, b) fouled surface, c) effective range (cm), d) bubbles travel along fouled surface towards node; 2. Micro-jet: a) effective range ( $\mu\text{m}$ ), b) velocity  $\sim 100$  m/s; 3. Acoustic streaming: a) effective range (cm), b) transducer, c) velocity  $\sim 10$  cm/s, d) fouling layer, e) membrane; 4. Microstreaming: a) bubbles increases and decreases in size, b) effective range ( $\mu\text{m}$ )

stvaraju se pore na filterskom kolaču, čime se omogućava olakšano odvajanje nakupina na membrani (slika 5). Učinci ultrazvuka rezultat su više istovremenih zbivanja u svrhu poboljšanja filtracija i čišćenja membrana. Primjena zvučnih valova stvara miješanje slojeva tekućine što dovodi do stvaranja finih sitnih čestica iz nakupina na porama filtera, što smanjuje začepljenje pora i krutost nastalog kolača. Osim toga sonifikacija održava čestice suspendiranima te se na taj način očuvaju kanalići za ispiranje; dok apsorpcija akustične energije rezultira stvaranjem turbulentnog strujanja u tekućini.

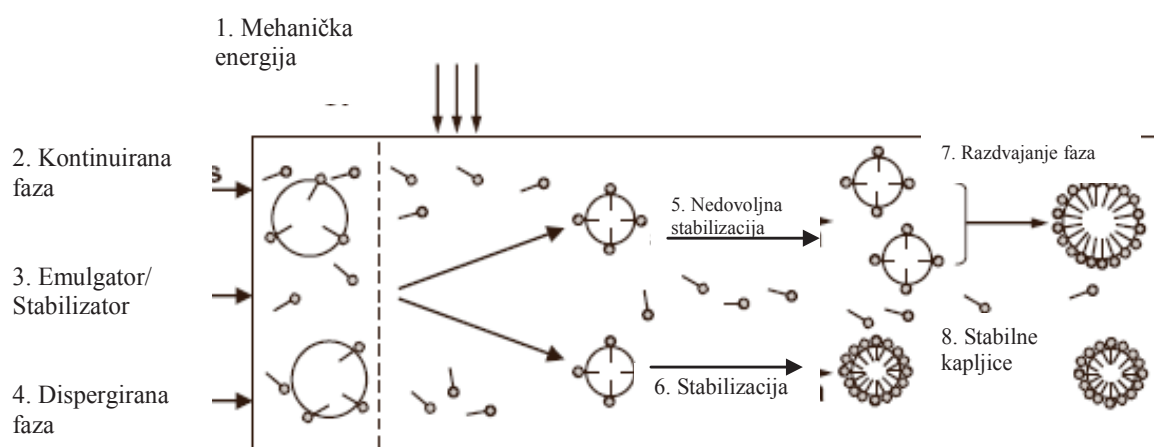
### Emulgiranje

Jedna je od najranijih primjena ultrazvuka visoke snage u procesiranju kod emulgiranja. Emulzije koje su dobivene djelovanjem ultrazvuka obično su stabilnije od onih dobivenih konvencionalno, iako za njihovo dobivanje treba primijeniti malo ili čak ništa emulgatora (Mason i sur., 1996.). Mehanizam stvaranja dobrih emulzija djelovanjem ultrazvuka potječe od kavitacijskih mjehurića koji implodiraju kod površine granične faze između dvaju slojeva koji se ne miješaju te dovode do vrlo učinkovitog miješanja tih dvaju slojeva putem rezultirajućeg vala (slika 6). Relativno mali unos energije može uzrokovati vrlo dobro miješanje i stvaranje stabilnih emulzija (Canselier i sur., 2002.; Freitas i sur., 2006.). To je vrlo dobro komercijalizirano u petrokemijskoj industriji,

industriji polimera, kemijskoj, tekstilnoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Razvijena je i in-line primjena u proizvodnji prehrambenih proizvoda kao što su voćni sokovi, majoneza i kečap od rajčica (Wu i sur., 2001.). Ultrazvučni emulzifikator moguće je bez problema instalirati unutar pogona u in-line proizvodnji.

### Poboljšavanje funkcionalnih svojstava proteina sirutke

U istraživanju djelovanja ultrazvuka različitih frekvencija, snaga i duljine trajanja tretiranja na pojedina funkcionalna svojstva proteina sirutke utvrdilo se pozitivno djelovanje ultrazvuka visoke snage određene frekvencije i duljine trajanja tretiranja na svojstva pjenjenja i emulgiranja proteina sirutke (Režek Jambrak i sur., 2008.; Režek Jambrak, 2008.). Ispitivanja su provedena na materijalima izolata, koncentrata, hidrolizata proteina sirutke i  $\alpha$ -laktalbumina. Korištene su ultrazvučne sonde od 20 i 30 kHz, te ultrazvučne kupelji od 40 i 500 kHz. Vrijeme tretiranja ultrazvukom od 20, 40 i 500 kHz bilo je 15 i 30 minuta, a sondom od 30 kHz 3, 5 i 10 minuta. Ispitan je i utjecaj ultrazvučnog vala na veličinu čestica, molekularnu masu proteina putem gel elektroforeze, te na viskoznost i termofizičke značajke suspenzija.

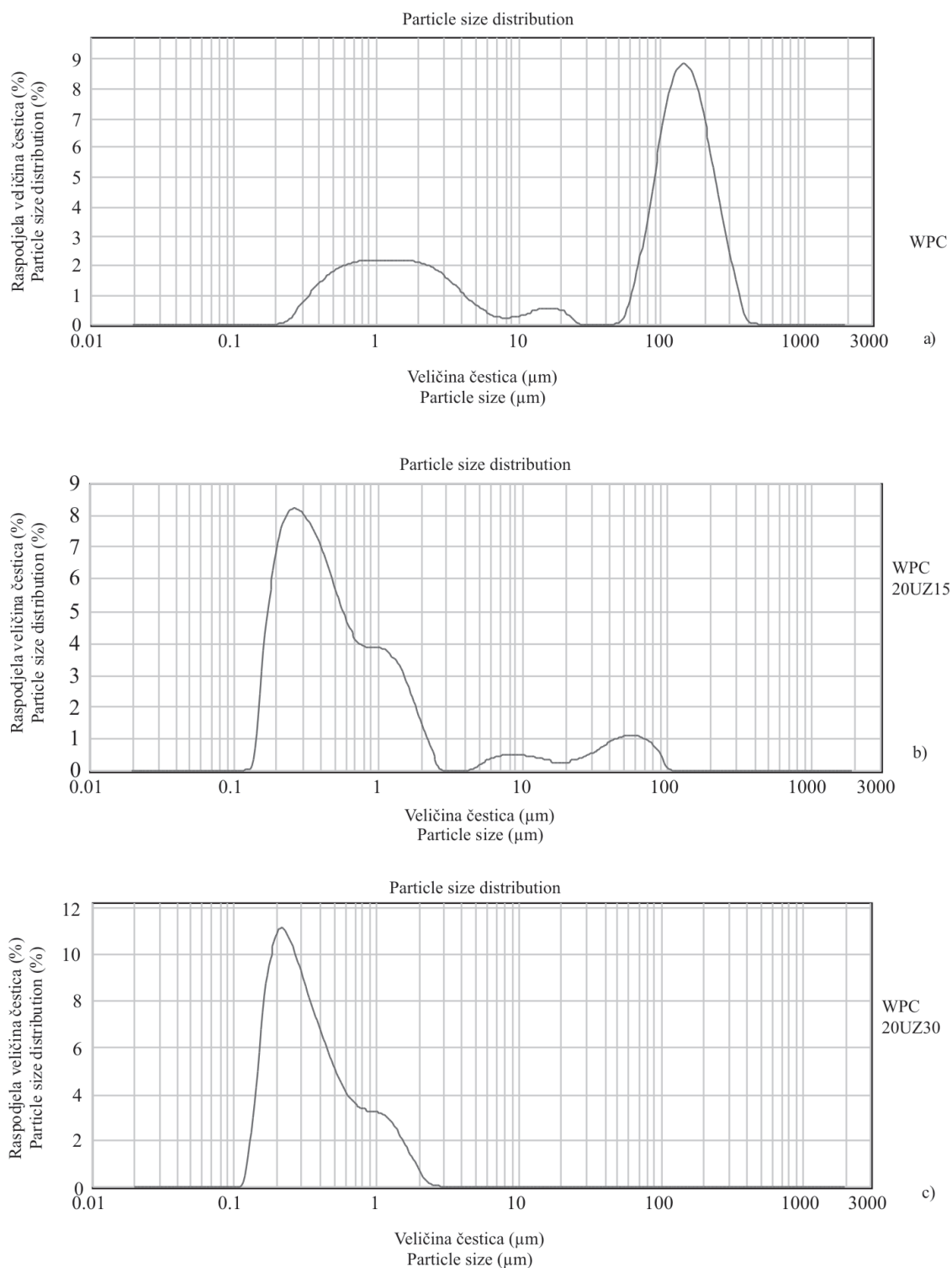


Slika 6: Mehanički proces emulgiranja (Behrend i sur., 2000.)

Fig. 6: Mechanical proces of emulsification (Behrend i sur., 2000)

(1. Mechanical energy, 2. Continuous phase, 3. Emulsifier/Stabilizer, 4. Dispersed phase, 5. Insufficient stabilization, 6. Stabilization, 7. Coalescence, 8. Stable droplets)





Slika 7: Raspodjela veličine čestica koncentrata proteina sirutke (WPC) netretiranih (a) i tretiranih ultrazvukom od 20 kHz (b - tretman 15 min i c - tretman 30 min) (Režek Jambrak, 2008.)

Fig. 7: Particle size distribution of whey protein concentrate (WPC) of untreated (a) and ultrasound treated samples with 20 kHz probe set (b - 15 min treatment and c - 30 min treatment) (Režek Jambrak, 2008.)

Upotreba sonde od 20 kHz pokazala je najznačajniji utjecaj na sva ispitivana fizikalna i funkcionalna svojstva modelnih sustava proteina sirutke, dok tretiranje ultrazvučnom kupelji frekvencije 500 kHz nije pokazalo značajniji utjecaj na ispitivana svojstva. Kod svih ispitivanih proteinskih pripravaka poboljšana su svojstva pjenjenja i emulgiranja, povećani su topljivost i specifične slobodne površine, ali i smanjene

veličine čestica i snižena temperatura odmrzavanja u ovisnosti o upotrijebljenoj frekvenciji, snazi i duljini trajanja tretiranja. Utvrđeno je i značajno smanjenje molekularne mase i frakcioniranja proteina, osim kod hidrolizata proteina sirutke. Također, zaključeno je da se ultrazvučno tretiranje može uspješno primijeniti kako za modifikaciju pojedinih fizikalnih i funkcionalnih svojstava proteina sirutke, tako i za

Tablica 1: Indeks aktiviteta i indeks stabilnosti emulzija pripremljenih netretiranim i tretiranim izolatima proteina sirutke (IP) s ultrazvukom od 30 kHz, te dodacima guara i metil celuloze (Režek Jambrak, 2008.)

Table 1: Emulsion activity index and emulsion stability index of emulsions prepared with untreated and ultrasound treated whey protein isolates (IP) with 30 kHz ultrasound probe set, and with guar gum or methyl cellulose addition (Režek Jambrak, 2008)

Tretman* Treatments	Indeks aktiviteta emulzije Emulsion activity index IAE (m <sup>2</sup> /g)	Indeks stabilnosti emulzije Emulsion stability index ISE (h)
IP	148,2	70,5
IP30UZ3	94,21	18,84
IP30UZ5	83,89	13,92
IP30UZ10	93,57	20,92
IP30UZ3 + G	130,07	25,59
IP30UZ5 + G	111,01	29,34
IP30UZ10 + G	96,84	32,33
IP30UZ3 + C	120,51	24,10
IP30UZ5 + C	113,63	23,06
IP30UZ10 + C	135,03	29,55

*IP	Izolat proteina sirutke (netretirani) Whey protein isolate (untreated)
IP30UZ3	Izolat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz kroz 3 minute Whey protein isolate treated with 30 kHz ultrasound for 3 minutes
IP30UZ5	Izolat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz kroz 5 minute Whey protein isolate treated with 30 kHz ultrasound for 5 minutes
IP30UZ10	Izolat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz kroz 10 minute Whey protein isolate treated with 30 kHz ultrasound for 10 minutes
IP30UZ3 + G	Izolat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz kroz 3 minute i dodatkom 0,5 % guar gume Whey protein isolate treated with 30 kHz ultrasound for 3 minutes with 0,5 % guar gum addition
IP30UZ5 + G	Izolat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz kroz 5 minuta i dodatkom 0,5 % guar gume Whey protein isolate treated with 30 kHz ultrasound for 5 minutes with 0,5 % guar gum addition
IP30UZ10 + G	Izolat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz kroz 10 minuta i dodatkom 0,5 % guar gume Whey protein isolate treated with 30 kHz ultrasound for 10 minutes with 0,5 % guar gum addition
IP30UZ3 + C	Izolat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz kroz 3 minute i dodatkom 0,5 % metil celuloze Whey protein isolate treated with 30 kHz ultrasound for 3 minutes with 0,5 % methyl cellulose addition
IP30UZ5 + C	Izolat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz kroz 5 minuta i dodatkom 0,5 % metil celuloze Whey protein isolate treated with 30 kHz ultrasound for 5 minutes with 0,5 % methyl cellulose addition
IP30UZ10 + C	Izolat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz kroz 10 minuta i dodatkom 0,5 % metil celuloze Whey protein isolate treated with 30 kHz ultrasound for 10 minutes with 0,5 % methyl cellulose addition

uvodjenje u pojedine tehnološke procese kao zamjena za neke tradicionalne postupke obrade hrane (Krešić i sur., 2008.).

Na temelju dobivenih rezultata utvrđeno je da djelovanjem ultrazvuka od 20 kHz i ultrazvučne kupelji od 40 kHz kod svih uzoraka proteina, osim kod hidrolizata proteina sirutke, dolazi do smanjenja veličina čestica (slika 7), suženja njihove raspodjele, te značajnog povećanja specifične slobodne površine. Djelovanjem ultrazvuka od 20 kHz i ultrazvučne kupelji od 40 kHz utvrđeno je značajno smanjenje molekularne mase i frakcioniranja proteina, osim kod hidrolizata proteina sirutke. Prema dobivenim rezultatima, dulji tretman ne pokazuje veće cijepanje proteinskih lanaca (Režek Jambak, 2008.). Dobiveni rezultati nakon tretmana ultrazvukom od 20 kHz pokazuju povećanje topljivosti kod uzoraka koncentrata proteina sirutke i  $\alpha$ -laktalbumina u usporedbi s netretiranim, ali nisu zabilježene značajne promjene topljivosti kod uzoraka izolata proteina sirutke i hidrolizata proteina sirutke. Upotrebom ultrazvučnih kupelji od 40 i 500 kHz ne dolazi do značajnog utjecaja na topljivost ispitivanih uzoraka.

Nakon tretiranja modelnih sustava ultrazvukom od 20 kHz te ultrazvučnim kupeljima od 40 i 500 kHz, na temelju dobivenih rezultata utvrđeno je da ne dolazi do promjene tipa tečenja. Sve suspenzije i dalje pokazuju newtonski karakter, odnosno karakterizira ih dilatantan tip tečenja ( $n > 1$ ). Isto tako, ne dolazi do statistički značajnog povećanja koeficijenta konzistencije ( $k$ ) modelnih suspenzija.

Negativan primjer primjene ultrazvuka utvrđen je u istraživanju tretiranja ultrazvukom od 30 kHz kod izolata proteina sirutke u kombinaciji s hidrokoloidima. Na temelju dobivenih rezultata utvrđeno je smanjenje indeksa aktiviteta emulzije (IAE) i stabilnosti emulzija kod svih uzoraka (Tablica 1).

### **Nedostaci primjene ultrazvuka visoke snage u mljekarskoj industriji**

#### *Povišenje temperature tretiranog materijala*

Prilikom tretiranja tekuće namirnice ili tekućeg uzorka ultrazvukom visoke snage dolazi do vrlo brzog povišenja temperature tretiranog medija. Povišenje temperature može negativno djelovati na pojedine komponente u namirnici. Najveće promjene koje izravno utječu na nutritivne i senzorske značajke go-

tovog proizvoda zbivaju se na mastima i proteinima. U slučajevima nepravilnog odabira promjera sonde, frekvencije i snage ultrazvuka može doći do neželjenih promjena (Riener i sur., 2009.). Pravilnim planiranjem postupka obrade sa zadanim ciljem te primjenom hlađenja mogu se izbjeći neželjene posljedice povišenja temperature. U slučajevima gdje je primarni cilj inaktivacija mikroorganizama ili inaktivacija enzima, djelovanje ultrazvuka kao samostalnog procesa nije se pokazalo dovoljno učinkovitim. U tim slučajevima potrebno je primijeniti ultrazvuk visoke snage u kombinaciji s povišenjem temperature i tlaka ili njihovim kombinacijama, za koje se pokazalo da imaju sinergistički učinak pri inaktivaciji.

#### *Nastanak nepoželjnih komponenata arome i okusa*

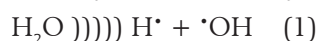
Primjena ultrazvuka u homogenizaciji i emulgiranju mlijeka može se koristiti i kombinirano za smanjenje broja mikroorganizama. Iako su rezultati u tehnološkom smislu vrlo dobri, veliki problemi prilikom nepravilnog tretiranja mlijeka nastaju zbog oksidacije masti, pri čemu se razvijaju nepoželjni mirisi i arome. U studiji Riener i suradnika (2009.) istraživan je utjecaj tretiranja mlijeka ultrazvukom visoke snage na stvaranje određenih hlapljivih komponenti. Tretiranje se povodilo ultrazvučnim postavom frekvencije 24 kHz, snage 400 W sondom promjera 22 mm. Primjenjivala se plinska kromatografija uz SPME ekstrakciju (solid phase microextraction/mikroekstrakcija na čvrstoj fazi) za tretmane 2,5, 5, 10, 15 i 20 minuta. Nastali hlapljivi spojevi bili su benzen, toluen, 1,3-butadien, 5-metil-1,3-ciklopentadien i niz alifatskih 1-alkena, koji su nastali kao produkt pirolize.

U drugoj studiji nakon tretiranja mlijeka ultrazvukom visoke snage dokazano je nastajanje komponenata koje nisu pronađene u netretiranom mlijeku. U netretiranom pasteriziranom mlijeku kvalitativno je određena prisutnost acetona, 2-butanona, kloroforma i dimetilsulfida (Ott i sur., 1999.). Nakon tretiranja mlijeka ultrazvukom visoke snage došlo je do povećanja koncentracija određenih komponenata prisutnih i u netretiranom mlijeku, kao što su 1-heksen, 1-okten, 1-nonen, 5-metil-1,3-cikloheptadien, benzen, toluen, p-ksilen, n-heksanal, i n-heptanal. Njihova koncentracija povećala se unutar prvih pet minuta tretiranja nakon čega se mijenjala vrlo malo. Pokazalo se da primjena ultrazvuka ne utječe i ne

mijenja koncentraciju četiriju komponenata već prisutnih u mlijeku (2-butanon, aceton, dimetilsulfid i kloroform) (Vercet i sur., 2002.; Wu i sur., 2001.).

### *Stvaranje slobodnih radikala*

U ovisnosti o procesu koji se želi provesti, stvaranje slobodnih radikala može biti poželjno ili nepoželjno. Nastali  $\cdot\text{OH}$  slobodni radikali cijepanjem molekula vode (reakcija 1) mogu utjecati na kvalitetu pojedinih komponenata hrane, ali isto tako mogu biti i korisni u poboljšavanju funkcionalnosti pojedinih dodataka hrani (Potterat, 1997.).



U mljekarskoj industriji prilikom željenog tretmana ultrazvukom, osim nepoželjnih tvari arome i okusa koji nastaju pirolizom, dolazi i do stvaranja slobodnih radikala. Slobodni radikali sudjeluju u različitim reakcijama u kojima može doći do kataliziranja nepoželjnih reakcija u kojima se oštećuju proteini, amino-kiseline, masti te može doći i do stvaranja polimera koji bi mogli uzrokovati taloženje i stvaranje neprikladne teksture gotovog proizvoda. S druge strane, u uobičajenim uvjetima, sekvencijalne reakcije koje su katalizirane enzimom lipooksigenaze igraju važnu ulogu u stvaranju poželjnih svježih okusa i aroma u sirevima i fermentiranim proizvodima (German i sur., 1992.; Hsieh, 1994.). Aktivnost antioksidanasa u hrani i biološkim sustavima u velikoj mjeri je pod utjecajem različitih čimbenika kao što je stupanj hidroksilacije (Wanasundara i sur., 1997.).

Vercet i suradnici (1998.) istraživali su stvaranje slobodnih radikala kod različitih tretmana ultrazvukom u kombinaciji s temperaturom i tlakom (manotermosonifikacija). Prema rezultatima studije, povišenje temperature rezultiralo je smanjenjem stupnja nastalih hidroksi radikala. Istraživani su utjecaji temperature između 30 i 140 °C. Amplituda ultrazvuka mijenjana je između dvaju režima kombinacije temperature i tlaka (70 °C/200kPa i 130 °C/500kPa). U oba slučaja, stupanj stvaranja slobodnih radikala povećan je linearno s povećanjem amplitude ultrazvuka. Utjecaj tlaka na stvaranje slobodnih radikala određivan je kod dvaju režima iste amplitude kod 70 i 130 °C. Kod 70 °C povećanje hidrostatskog tlaka rezultiralo je povećanjem stvaranja slobodnih radikala, a povećanjem hidrostatskog tlaka kod 130 °C nije bilo značajnog utjecaja na stvaranje slobodnih radikala.

### **Zaključci**

Istraživanja o primjeni ultrazvuka visoke snage u procesiranju hrane pokazala su njegovu obećavajuću primjenu u prehrambenoj industriji. Prednosti su svakako inaktivacija mikroorganizama i enzima u prehrambenim proizvodima, procesi emulgiranja, homogenizacije, poboljšavanje funkcionalnih, teksturalnih i tehnoloških svojstava pojedinih komponenata i druge. Objašnjena je primjena ultrazvuka visoke snage na nizu primjera kao što je modifikacija škroba, hidrokoloida i proteina. Nažalost, vrlo je malo objavljenih istraživanja koja se bave negativnim djelovanjem ultrazvuka visoke snage na nutritivne i kvalitativne značajke tretiranog materijala. Nedostaci primjene ultrazvuka su nastajanje slobodnih radikala i tvari nepoželjnih mirisa i okusa u mlijeku i mliječnim proizvodima. Posebno je važno istaknuti da tretiranjem mlijeka ultrazvukom dolazi do stvaranja toksičnih produkata kao što su benzen, toluen, aceton, kloroform i dimetilsulfid, koji su nastali kao produkt pirolize.

Potrebno je provesti niz istraživanja kako bi se utvrdilo negativno djelovanje ultrazvučnih tretmana na komponente hrane, poglavito na vitamine, proteine, masti i ugljikohidrate. Također, potrebno je provesti daljnje ispitivanje novih tehnika procesiranja u inaktivaciji mikroorganizama kako bi se smanjio utjecaj toplinskog oštećenja komponenata okusa i arome mliječnih proizvoda nastalih tijekom tretiranja. Cilj je očuvanje organoleptičkih i nutritivnih značajki svježih proizvoda, a potencijalno omogućiti veću trajnost proizvoda u odnosu na konvencionalni tretman.

Potrebno je pravilno postaviti cilj i svrhu tretiranja kako bi se optimalno proveo i planirao proces tretiranja ultrazvukom. Također, ispravno odabrati optimalnu snagu i frekvenciju ultrazvučnog postava, pravilan promjer sonde prema namjeni, te pravilno odabrati amplitudu i vrijeme tretiranja kako bi se osigurao optimalan učinak ultrazvuka kao samostalne metode ili u kombinaciji s povišenom temperaturom i tlakom. Vrlo je važno kontrolirati i temperaturu tretiranog materijala kako bi se izbjegli mogući negativni učinci na nutritivne i senzorske značajke gotovog proizvoda.

## *Advantages and disadvantages of high power ultrasound application in the dairy industry*

### Summary

Preservation of food with thermal sterilisation is usually the most common way nowadays. Besides the positive aim of preservation regarding microorganisms' reduction, elevated temperature in processing simultaneously causes serious changes in nutritive and organoleptical properties of food. Loss of food quality is related to structure and texture deformations, modification of macromolecules and creation of new compounds coming from reactions that are catalised with temperature. One of the new non-thermal processes that can in large scale improve different processes in food industry is ultrasound. In the last five years, new applications of high power ultrasound (HPU) include inactivation of enzymes and microorganisms, assistance in membrane processes, improvement of dairy product texture, improvement of functional properties of proteins etc. High power ultrasound application is used in emulsification and milk homogenization, but in these processes the most important thing is to monitor possible negative effect like oxidation of fats, inactivation of valuable enzymes and denaturation of proteins. Controlled and optimized application of ultrasound demands application of specific ultrasound frequency and optimal treatment time. Treatments should be performed at lower temperatures to avoid negative side effects on treated materials.

**Key words:** power ultrasound (HPU), dairy industry, cavitation, oxidation, quality

### Literatura

1. Abee, T., Wouters, J.A. (1999): Microbial stress response in minimal processing, *International Journal of Food Microbiology* 50, 65-91.
2. Behrend, D., Ax, K., Schubert, H. (2000): Influence of continuous phase viscosity on emulsification by ultrasound, *Ultrasonics Sonochemistry* 7, 77-85.
3. Bermudez-Aguirre, D., Corradini, M.G., Mawson, R., Barbosa-Canovas, G. (2009): Modelling the inactivation of *Listeria innocua* in raw whole milk treated under thermo-sonication, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, 172-178.
4. Butz, P., Tauscher, B. (2002): Emerging technologies: chemical aspects, *Food Research International* 35 (2/3), 279-284.
5. Cameron, M., McMaster, L.D., Britz, T.J. (2008): Electron microscopic analysis of dairy microbes inactivated by ultrasound, *Ultrasonics Sonochemistry* 15 (6), 960-964.
6. Canselier, J.P., Delmas, H., Wilhelm, A.M., Abismail, B. (2002): Ultrasound emulsification - an overview, *Journal of Dispersion Science and Technology* 23, 333-349.
7. Fellows, P. (2000): *Food Processing Technology - Principles and Practice (2 izdanje)*, Woodhead Publishing, Cambridge, UK.
8. Freitas, S., Hielscher, G., Merkle, H.P., Gander, B. (2006): Continuous contact and contamination free ultrasonic emulsification - a useful tool for pharmaceutical development and production, *Ultrasonics Sonochemistry* 13, 76-85.
9. German, B.J., Zhang, H., Berger, R. (1992): Role of lipooxygenases in lipid oxidation in foods, *ACS Symposium Series*, 500 (Lipid Oxid. Food), 74-92.
10. Grahame, G. W. (1996): Methods for preservation and extension of shelf life, *International Journal of Food Microbiology* 33, 51-64.
11. Henglein, A. (1993): Physicochemical properties of small metal particles in solution: "Microelectrode" reactions, chemisorption, composite metal particles, and the atom-to metal transition, *Journal of Physical Chemistry* 97, 5457-5471.
12. 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.
13. Hsieh, R.J.P. (1994): Contribution of lipoxygenase pathway to food flavors. *ACS Symposium Series: Lipids in Food Flavors*, 30-48.
14. Kalab, M., Allan-Wojtas, P., Phipps-Todd, B. (1983): Development of microstructure in set-style yoghurt-A review, *Food Microstructure* 2, 51-66.
15. 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.
16. Krešić, G., Lelas, V., Režek Jambrak, A., Herceg, Z., Rimac Brnčić, S. (2008): Influences of novel food processing technologies on the rheological and thermophysical properties of whey proteins, *Journal of Food Engineering* 87, 64-73.
17. Leighton, T.G. (1998): The principles of cavitation. U: *Ultrasound in Food Processing*. Povey, M. J. W. i Mason, T.J. (ured.), Blackie Academic & Professional: London.
18. Li, B., Sun, D.W. (2002): Effect of power ultrasound on freezing rate during immersion freezing, *Journal of Food Engineering* 55 (3), 277-282.
19. Lima, M., Sastry, S. K. (1990): Influence of fluid rheological properties and particle location on ultrasound-assisted heat transfer between liquid and particles, *Journal of Food Science* 55, 1112-1115.
20. Lopez, P., Sala, F. J., Fuente, J. L., Condon, S., Raso, J., Burgos, J. (1994): Inactivation of peroxidase, lipoxygenase and polyphenol oxidase by manothermosonication, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, 252-256.

21. Lopez-Malo, A., Jimenez-Fernandez, M. i Palou, E. (2001): Penicillium digitatum spores inactivation by combining thermoultrasonication treatments and antimicrobial agents, IFT 2001 Annual Meeting Technical Program Abstracts 151.
22. Makino, K., Mossoba, M.M., Riesz, P. (1983): Chemical effects of ultrasound on aqueous solutions. Formation of hydroxyl radicals and hydrogen atoms, *Journal of Physical Chemistry* 87, 1369-1377.
23. Manas, P., Pagan, R., Raso, J., Sala, F.J. i Condon, S. (2000): Inactivation of Salmonella Typhimurium, and Salmonella Senftenberg by ultrasonic waves under pressure, *Journal of Food Protection* 63 (4), 451-456.
24. Mason, T.J. (1999): Sonochemistry: current uses and future prospects in the chemical and processing industries, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series A-Mathematical Physical and Engineering Sciences* 357, 355-369.
25. Mason, T.J., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P. (1996): The uses of ultrasound in food technology, *Ultrasonics Sonochemistry* 3, 253.
26. Mason, T. J. (1998): Power ultrasound in food processing - the way forward. U: *Ultrasound in Food Processing*, Povey, M. J. W. i Mason, T. J. (Ured.), Blackie Academic & Professional: London.
27. Mason, T.J., Riera, E., Vercet, A., Lopez-Buesa, P. (2005): Application of ultrasound.
28. U: *Emerging technologies for food processing*, D.W. Sun (ured.), Elsevier Academic Press Amsterdam, London 325-351.
29. McClements, D.J. (1995): Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing, *Trends in Food Science & Technology* 6, 293.
30. Miles, C.A., Morley, M.J., Hudson, W.R., Mackey, B.M. (1995): Principles of separating microorganisms from suspensions using ultrasound, *Journal of Applied Bacteriology* 78, 47-54.
31. Moulton, K.J., Wang, L.C. (1982): A pilot-plant study of continuous ultrasonic extraction of soybean protein, *Journal Food Science* 47, 1127.
32. Ordonez, J.A., Sanz, B., Hernandez, P.E., Lopez-Lorenzo, P. (1984): A note on the effect of combined ultrasonic and heat treatments on the survival of thermophilic streptococci, *Journal of Applied Bacteriology* 54, 175-177.
33. Ott, A., Germond, J.E., Baumgartner, M., Chaintreau, A. (1999): Aroma comparisons of traditional and mild yogurts: headspace gas chromatography quantification of volatiles and origin of alpha-diketones, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 2379-2385.
34. Pagan, R., Manas, P., Salvarez, I., Condon, S. (1999): Resistance of *Listeria monocytogenes* to ultrasonic waves under pressure at sublethal (manosonication) and lethal (manothermosonication) temperatures, *Food Microbiology* 16, 139-148.
35. Piyasena, P., Mohareb, E., McKellar, R.C. (2003): Inactivation of microbes using ultrasound: a review, *International Journal of Food Microbiology* 87, 207-216.
36. Potterat, O. (1997): Antioxidants and free radical scavengers of natural origin, *Current Organic Chemistry* 1, 415-440.
37. Povey, M. J. W., Mason, T. J. (1998): *Ultrasound in Food Processing*, Blackie Academic & Professional, London.
38. Raso, J., Pagan, P., Condon, S., Sala, F.J. (1998): Influence of temperature and pressure on the lethality of ultrasound, *Applied and Environmental Microbiology* 64, 465.
39. Režek Jambrok, A. (2008.): Utjecaj ultrazvuka na fizikalna i funkcionalna svojstva proteina sirutke, Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
40. Režek Jambrok, 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 (2), 281-287.
41. Riener, J., Noci, F., Cronin, D.A, Morgan, D.J., Lyng, J.G. (2009): Characterisation of volatile compounds generated in milk by high intensity ultrasound, *International Dairy Journal* 19, 269-272.
42. Riesz, P., Kondo, T. (1992): Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications, *Free Radical Biology and Medicine* 13, 247-270.
43. Roberts, R. T. (1993): High intensity ultrasonics in food processing, *Chemistry and Industry* 15 (4), 119-121.
44. Sala, F.J., Burgos, J., Condon, S., Lopez, P., Raso, J. (1995): Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. U: *New Methods of Food Preservation*. Gould, G.W. (Ured.), Blackie Academic & Professional: London.
45. Sastry, S.K., Shen, G.Q., Blaisdell, J.L. (1989): Effect of ultrasonic vibration on fluid-toparticle convective heat transfer coefficients, *Journal of Food Science* 54, 229.
46. Saxena, A., Tripathi, B.P., Kumar, M., Shahi, V.K. (2009): Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview, *Advances in Colloid and Interface Science* 145, 1-22.
47. Scherba, G., Weigel, R.M., W.D. O'Brien, J. (1991): Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy, *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2079.
48. Schmidt, R.H., Packard, V.S., Morris, H.A. (1984): Effect of processing on whey protein functionality, *Journal of Dairy Science* 67, 2723-2733.
49. Suslick, K. S. (1988): *Ultrasounds: its Chemical, Physical and Biological Effects*. VHC Publishers, New York.
50. Suslick, K.S., Didenko, Y., Fang, M.M., Hyeon, T., Kolbeck, K.J., McNamara III, W.B.,
51. Mdleleni, M.M., Wong, M. (1999): Acoustic cavitation and its chemical consequences, *Philosophical Transactions: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 357, 335-353.
51. Teng, M.Y, Lin, S.H, Juang, R.S. (2006): Effect of ultrasound on the separation of binary protein mixtures by cross-flow ultrafiltration, *Desalination* 200 (1-3), 280.

53. Thakur, B.R., Nelson, P.E. (1997): Inactivation of lipoxygenase in whole soy flour suspension by ultrasonic cavitation, *Die Nahrung* 41, 299.
54. Vercet, A., Lopez, P., Burgos, J. (1997): Inactivation of heat-resistant lipase and protease from *Pseudomonas fluorescens* by manothermosonication, *Journal of Dairy Science* 80, 29.
55. Vercet, A., Lopez, P., Burgos, J. (1998): Free radical formation by manothermosonication, *Ultrasonics* 36, 615-618.
56. Vercet, A., Oria, R., Marquina, P., Crelier, S., Lopez-Buesa, P. (2002): Rheological properties of yoghurt made with milk submitted to manothermosonication, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6165-6171.
57. Villamiel, M., Van Hamersveld, E.H., De Jong, P. (1999): Effect of ultrasound processing on the quality of dairy products, *Milchwissenschaft* 54, 69-73.
58. Villamiel, M., de Jong, P. (2000a): Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* and *Streptococcus thermophilus* in Tryptocase Soy Broth and total bacteria in milk by continuous-flow ultrasonic treatment and conventional heating, *Journal of Food Engineering* 45, 171-179.
59. Villamiel, M., de Jong, P. (2000b): Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins, and native enzymes of milk, *Journal of Agricultural Food Chemistry* 48, 472-478.
60. Wanasundara, P.K.J.P.D., Shahidi, F., Shukla, V.K S. (1997): Endogenous antioxidants from oilseeds and edible oils, *Food Reviews International* 13, 225-292.
61. Wang, L., Wang, Ya-Jane (2004): Rice starch isolation by neutral protease and high-intensity ultrasound, *Journal of Cereal Science* 39 (2), 291-296.
62. 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.
63. Zenker, M. (2004): Ultraschall kombinierte Prozessführung bei der Pasteurisierung und Sterilisierung flüssiger Lebensmittel, Doktorska disertacija, Technischen Universität Berlin, Berlin: Technischen Universität Berlin, 149.