



PREGLEDNI RAD/REVIEW

# Primjena ultrazvuka u inovativnim visoko-učinkovitim bioprocima

## Implementation of Ultrasound in Innovative Highly-efficient Bioprocesses

Antonija Trontel<sup>1</sup>, Antonia Penava<sup>2</sup>, Jadranka Sučević<sup>1</sup>, Anita Slavica<sup>1\*</sup>,  
Mladen Brnčić<sup>3</sup>, Suzana Rimac Brnčić<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

<sup>2</sup>Laboratorij za procesno-prehrambeno inženjerstvo

<sup>3</sup>Laboratorij za tehničku termodinamiku

Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb, Hrvatska

### Sažetak

Primjena ultrazvuka jedna je od metoda čija primjena se istražuje u cilju unaprijeđenja učinkovitosti različitih postupaka, npr. filtracije, otplinjavanja, zagrijavanja i ekstruzije, pasterizacije i sterilizacije, smanjenja stupnja polimerizacije, itd., koji se provode u industrijskom mjerilu. Primjena ultrazvuka integrira se u različite inovativne i održive bioprocese tijekom kojih je znatno smanjena: (1) potrošnja vode, drugih otapala i energije, (2) potrošnja fosilnih goriva, (3) količina otpadne vode i (4) drugih tzv. opasnih proizvoda. Ovi bi integrirani (bio)proces mogli naći primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kemijskoj industriji.

Ključne riječi: ultrazvuk, učinkovitost (bio)procesa, sonobioreaktori

### Summary

Ultrasound is one of widely investigated methods to be applied in highly-efficient processes, e.g. filtration, degassing, heating and extrusion, pasterization and sterilization, depolymerization, etc., usually performed on the industrial scale. Application of ultrasound has been integrated in different innovative and sustainable bioprocesses in which: (1) consumption of water, other solvents and energy, (2) consumption of fossil fuels, (3) volume of waste water as well as (4) other hazardous materials has been reduced. Those integrated (bio)processes could be implemented in food, pharmaceutical and chemical industry.

Keywords: ultrasound, (bio)processes efficiency, sonobioreactors

## 1. Primjena ultrazvuka u inovativnim procesima

### 1.1. Filtracija

Filtracija podrazumijeva izdvajanje netopljivih (čvrstih) čestica iz tekućina pomoću filtracijske membrane. Tijekom filtracije dolazi do nakupljanja čestica na membrani, čime se smanjuje učinkovitost filtracije ili se, zbog začepjenja membrane, cijeli proces zaustavlja. Primjenom ultrazvuka može se smanjiti sloj čestica nakupljenih na membrani (kolač) i na taj način povećati učinkovitost ovog postupka, ali i produžiti uporaba membrane (Grossner i sur., 2005). Brzina filtracije ovisi o svojstvima materijala koji se filtrira (veličina čestica, koncentracija, pH vrijednost, ionska jakost), svojstvima membrana (hidrofobnost, naboj, veličina pora) te tlaku i temperaturi. Filtracija potpomognuta ultrazvukom ovisi i o primijenjenoj frekvenciji i intenzitetu ultrazvuka. Niže ultrazvučne frekvencije (28-45 kHz) imaju veći učinak na proces filtracije od viših frekvencija (100 kHz), (Kobayashi i sur., 2003). Naime, pri višim frekvencijama nastaje više kavitacijskih mjehurića koji su manji po veličini i njihovom implozijom se oslobađa manje energije koja ne odvaja čestice od kolača, kao što je to slučaj pri nižim frekvencijama. S povećanjem intenziteta ul-

trazvuka pri istim frekvencijama povećava se sonokemijski utjecaj tj. povećanjem intenziteta povećava se broj kavitacijskih mjehurića te veličina kavitacijske zone kao posljedica povećanja amplitude zvučnog vala. Tako se primjenom ultrazvuka iste frekvencije a različitog intenziteta pospješuje filtracijski proces. Ultrazvučna filtracija se istražuje za primjenu u proizvodnji voćnih sokova (Mason i sur., 1996), obradi sirutke (Muthukumaran i sur., 2005) kao i obradi otpadnih voda iz industrije (Kyllönen i sur., 2006; Smythe i Wakeman, 2000).

### 1.2. Otplinjavanje

Tekućine koje se koriste u industrijskoj proizvodnji obično sadrže otopljeni kisik, ugljikov dioksid i dušik. Otplinjavanje se odvija u uvjetima u kojima se povećava temperatura tekućine i/ili smanjuje tlak iznad tekućine. Iako tijekom primjene ultrazvuka može doći do nepoželjnih povećanja temperature tekućine, ovaj postupak ima prednost pred ostalim metodama, naročito kod otplinjavanja velikih volumena tekućina. Tijekom primjene ultrazvuka dolazi do vibriranja relativno malih mjehurića otopljenog plina koji tada formiraju veći mjehurić, ovaj mjehurić doseže određenu veličinu pri kojoj se počinje

Corresponding author: aslavica@pbf.hr

kretati prema površini i izlazi iz tekućine (Laborde i sur., 1998). Za otplinjavanje se obično koristi ultrazvuk niske frekvencije (20 - 50 kHz). Ova se metoda primjenjuje u cilju smanjenja koncentracije otopljenog ugljikovog dioksida iz gaziranih pića, npr. piva prije punjenja u boce (Chemat i sur., 2011). U usporedbi s mehaničkim otplinjavanjem, tijekom primjene ultrazvuka znatno je smanjen broj oštećenih boca kao i prelijevanje piva (Boistier-Marquis i sur., 1999). Primjenom ultrazvuka može se znatno izmijeniti sastav plinske faze iznad tekućine, prije svega zraka i to u cilju smanjenja udjela ili potpunog uklanjanja kisika. Poznato je da oksidacijski procesi mogu imati izuzetno nepovoljan učinak na kemijski sastav odnosno svojstva tekućine. Primjenom ultrazvuka kao postupka za otplinjavanje može se znatno skratiti vrijeme potrebno za fermentaciju i proizvodnju sakea, piva i vina (Matsuura i sur., 1994). Otplinjavanje razrijeđenih vodenih otopina pomoću ultrazvuka odvija se relativno brzo, dok je kod homogenih i heterogenih sustava visoke viskoznosti, kao što su sirovine, međuproizvodi ili konačni proizvodi različitih bioprocasa, brzina otplinjavanja znatno manja.

### 1.3. Zagrijavanje i ekstruzija

Izlaganje povišenim temperaturama može dovesti do značajnih razlika u temperaturi postignutoj u rubnim i središnjim dijelovima sirovine/hranjive podloge. Primjenom ultrazvuka poboljšava se prijenos topline kroz cjelokupan volumen hranjive podloge i smanjuje se količina energije potrebne za postizanje određene temperature (Marić i Šantek, 2009; Christi, 1999). Kod primjene ultrazvuka u npr. toplinskoj obradi mesa poboljšava se niz parametara postupka: sirovina se tretira toplinom kroz kraće vrijeme, tretirani uzorci sadrže veću količinu vlage (povećava se kapacitet za vezanje vode) i imaju bolja organoleptička svojstva, dok su gubitci u masi znatno manji nego kod obrade zagrijavanjem (Pohlman i sur., 1997). Tijekom zagrijavanja sirovina/hranjivih podloga dolazi do njihova prihvaćanja za stijenke posuda/reaktora, što otežava čišćenje i pripremu opreme za ponovnu upotrebu. U prehrambenoj se industriji površine posuda u kojima se termički obrađuju sirovine presvlače slojevima silikona ili politetrafluoretilena (PTFE), koji se tijekom upotrebe stanjuju ili potpuno uklanjaju. Zbog toga se postupak presvlačenja površina mora ponavljati. Sirovine prihvaćene na površine posuda mogu se vrlo brzo i učinkovito ukloniti primjenom ultrazvuka (Scotto, 1988).

Tijekom ekstruzije potpomognute ultrazvukom smanjuje se otpor otpuštanju različitih materijala s površina (Chemat i sur., 2011). Na ovaj se način može poboljšati transport ljepljivih i izrazito viskoznih materijala kroz cijevi i tako polučiti izuzetan ekonomski učinak (Mousavi i sur., 2007; Patist i Bates, 2008).

### 1.4. Pasterizacija i sterilizacija

Različite bioprocese kataliziraju enzimi, mikrobnne, biljne i životinjske stanice. Nepoželjni mikroorganizmi najčešće se uklanjaju postupcima pasterizacije (djelomične sterilizacije) i sterilizacije (Marić i Šantek, 2009). Pod pojmom pasterizacija podrazumijeva se postupak kojim se bitno smanjuje koncentracija mikroorganizama prisutnih u materijalu ili opremi koja

se podvrgava ovom postupku. Sterilizacija je postupak uklanjanja ili uništavanja svake životne aktivnosti pomoću topline, obično vodene pare. Zbog uvjeta u kojima se odvijaju opisani postupci, prvenstveno vrijednosti temperature i tlaka, može doći do značajnih promjena u sastavu hranjive podloge ili drugih bioloških materijala koji se steriliziraju. Trajanje sterilizacije može se znatno skratiti ukoliko se tretman toplinom kombinira s primjenom ultrazvuka. Ultrazvuk se primjenjuje u postupcima pasterizacije u mliječnoj industriji. Ultrazvučnom kavitacijom razaraju se stanice nepoželjnih kontaminanata (npr. *Escherichia coli* i *Listeria monocytogenes*), a pri tome ne dolazi promjene u sastavu proteina u pasteriziranom mlijeku (Cameron i sur., 2009). Do razaranja strukture stanica mikroorganizama dolazi zbog smanjenja debljine staničnih membrana, lokalnog zagrijavanja i nastajanja slobodnih radikala. Osim toga, prozvučivanjem se može reducirati aktivnost nekih enzima kao što su npr. pektin-metil-esteraze, polifenol oksidaze, peroksidaze i drugi (Tiwari i sur., 2009).

### 1.5. Smanjenje stupnja polimerizacije

Smanjenje stupnja polimerizacije različitih kompleksnih molekula (depolimerizacija) primjenom ultrazvuka dugo je poznata metoda (Schmid i Rommel, 1939). Depolimerizacija ultrazvukom odvija se uslijed kavitacije i može obuhvaćati dva mehanizma: (a) mehaničku depolimerizaciju, koja se odvija zbog kolapsa kavitacijskog mjehurića, i (b) kemijsku reakciju između polimera i hidroksilnih radikala koji nastaju u ovim uvjetima (Grönroos i sur., 2004). Obično se provodi pri frekvenciji ultrazvučne sonde od 20 kHz. Primjenom ove metode moguće je postići veće brzine depolimerizacijskih reakcija i veći prinos cjelokupnog procesa, ali i kemijsku selektivnost i stereoselektivnost. Provedena su brojna istraživanja o depolimerizaciji polisaharida i to derivata celuloze (Mason i Lorimer, 1988), škrobova (Gallant i sur. 1972; Seguchi i sur. 1994), dekstrana (Lorimer i sur., 1995; Portenlger i Heusinger, 1997), hitozana (Chen Chang i Shyur, 1997), ksantana (Milas i sur., 1986), glukana (Stahmann i sur., 1995), karagenana (Lii i sur., 1999). Dosad je najbolje opisana depolimerizacija škroba potpomognuta ultrazvukom (Zuo et al., 2009; Szent-Gyorgyi, 1933). Ovaj je proces razgradnje škroba do jednostavnijih ugljikohidrata od posebnog interesa u razvoju inovativnih ekološki prihvatljivijih i ekonomski povoljnijih bioprocasa proizvodnje različitih proizvoda (Trontel i sur., 2010; Kardos i Luche, 2001). Ultrazvuk je znatno učinkovitiji od  $\gamma$ -zraka kod depolimerizacije ksiloglukana i hijaluronana (Vodenicarova i sur., 2006). Primjenom ultrazvuka može se smanjiti viskoznost tekućina koje sadrže polimere, a mijenjaju se i reološka svojstva sirovine (Iida i sur., 2008; Seshadri i sur., 2003). Osim pozitivnih učinaka, potrebno je definirati i negativne učinke koje mogu prouzročiti primijenjeni ultrazvuk određene frekvencije i snage, temperatura i trajanje postupka depolimerizacije, kao i drugi uvjeti kojima se uzorak podvrgava tijekom ovog postupka.

### 1.6. Regulacija razine pjene

Pjena nastaje raspršivanjem mjehurića plina u tekućoj ili čvrstoj fazi. Pri tome je udaljenost između dva mjehurića u formiranoj pjeni izuzetno mala. Nastajanje pjene česta je po-



java tijekom različitih industrijskih procesa, naročito aerobnih mikrobnih procesa koji se odvijaju u hranjivim podlogama kompleksnog sastava. Negativne posljedice nastajanja pjene su upitna sterilnost hranjive podloge odnosno asepticnost cjelokupnog bioprocesa, smanjenje korisnog volumena bioreaktora i produktivnosti bioprocesa, povećanje gubitaka i rizika po zagađenje okoliša (Marić i Šantek, 2009). U tradicionalnim procesima proizvodnje razina pjene se regulira mehaničkim putem, mijenjanjem temperature tijekom bioprocesa ili dodatkom različitih kemikalija (Morey i sur., 1999). Učinkovitost ovih metoda ili njihovih kombinacija nije zadovoljavajuća i zbog toga se istražuje primjena ultrazvuka. Primjena ove metode od izuzetnog je značaja za procese koji se provode u industrijskom mjerilu, naročito u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Ukoliko se smanji nastajanje pjene u određenom sustavu, smanjuje se i potreba za intenzivnom aeracijom kao i rizik od kontaminacije nepoželjnim mikroorganizmima (Chemat i sur., 2011). Razvijen je novi sustav za regulaciju razine pjene pomoću ultrazvuka koji se primjenjuje kod punjenja gaziranih pića u boce i limenke (De-Sarabia i sur., 2006). Valja istaknuti i neke probleme koji se javljaju kod primjene ultrazvuka kao što su npr. buka i količina utrošene energije.

### 1.7. Homogenizacija

Homogenizacija je pojam pod kojim se podrazumijeva jedan ili više fizikalnih i/ili kemijskih postupaka kojima se podvrgava uzorak, koji je dio ili čini plinsku, tekuću ili čvrstu fazu ili smjesu različitih tvari, a koji se primjenjuju u cilju povećavanja jednoličnosti (homogenosti) sastava ili strukture faze ili smjese (De Castro i Capote, 2007a).

Ukoliko se ovaj postupak provodi uz prozvučivanje, potrebno je utrošiti znatno manje energije nego kod konvencionalnih metoda. Jedan od razloga za primjenu ultrazvuka u svrhu homogenizacije je pospješivanje miješanja i mućkanja tekućih uzoraka pri čemu ne dolazi do značajnih promjena kemijskih karakteristika uzorka koji se tretira ultrazvukom. Ultrazvuk visokog intenziteta uzrokuje snažno smicanje i formiranje gradijenta tlaka u tekućoj fazi, pri čemu djeluje kavitacijski efekt koji dovodi do poremećaja u strukturi tekućine. Kod npr. mlijeka kavitacijski efekt ima za posljedicu razbijanje globula mliječne masti, što vodi ka smanjenju promjera i povećanju broja globula (De Castro i Capote, 2007b). Učinkovitost ultrazvučne homogenizacije ovisi o intenzitetu, trajanju i frekvenciji ultrazvučnih valova. Emulzije se mogu formirati primjenom ultrazvučnih valova širokog raspona frekvencije čije vrijednosti dosežu 5 MHz, dok se učinkovitost homogenizacije smanjuje s povećanjem frekvencije. Zbog toga se kod većine komercijalno primijenjenih postupaka koriste ultrazvučni valovi frekvencija između 20 i 50 kHz. Vrlo je važno reakciju homogenizacije provoditi pravilnim odabirom frekvencije, intenziteta i promjera sonde ultrazvučnog postava. Na veličinu kapljica proizvedenih ultrazvučnom homogenizacijom, odnosno na njihovo smanjivanje, može se utjecati povećanjem intenziteta ultrazvuka ili produljenjem vremena kroz koje se tekućina tretira (Bosiljkov i sur., 2011).

Primjenom ultrazvuka formiraju se stabilne emulzije s jednolikom raspodjelom čestica čiji je promjer manji od 1  $\mu$ m

(Chendke i Fogler, 1975). Osim pri homogenizaciji mlijeka, ova visoko-účinkovita metoda nalazi primjenu u proizvodnji voćnih sokova, majoneze, umaka i drugih proizvoda prehrambene industrije (Wu i sur., 2000).

### 1.8. Kristalizacija, smrzavanje i odmrzavanje

Postupci kristalizacije i smrzavanja podrazumijevaju formiranje nukleusa i daljnje napredovanje kristalizacije tj. smrzavanja (Sanz i sur., 1997). Primjenom ultrazvuka moguće je unaprijediti brzinu formiranja nukleusa i brzinu rasta kristala u zasićenim otopinama ili otopinama koje se hlade. Pretpostavlja se da u ovom slučaju kavitacijski mjehurići predstavljaju nukleuse za rast kristala, a razbijanjem već poraslih kristala ultrazvukom znatno se povećava broj nukleusa.

Nekontrolirano formiranje kristala u zasićenim otopinama odvija se zbog relativno malih promjena vrijednosti temperature i/ili tlaka. Ovakvi postupci kristalizacije mogu dovesti do ozbiljnih problema koji se mogu riješiti ukoliko se tijekom procesa kontrolira brzina formiranja nukleusa, brzina rasta i veličina kristala te obrastanje površine (de Castro i Priego-Capote, 2007b; McCausland i sur., 2001). Kristalizacija uz primjenu ultrazvuka uglavnom se primjenjuje u proizvodnji finih kemikalija te u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji (Mortazavi i Tabatabaie, 2008; Rucroft i sur., 2005).

Neujednačeno formiranje kristala vode i razaranje strukture materijala koji se smrzavaju imaju za rezultat smanjenje ukupne kvalitete smrzavanjem očuvanog uzorka. Zbog toga se istražuje primjena inovativnih metoda, npr. smrzavanje uranjanjem, tzv. kriogeno smrzavanje, smrzavanje pri visokim tlakovima i druge, kao i kombinacije pobrojanih metoda (Norton i sur., 2009). Primjenom ultrazvuka značajno se skraćuje vrijeme potrebno za smrzavanje različitih materijala. Osim toga, prisutan je veći broj nukleusa, pa se formira veći broj manjih kristala vode. Zbog toga se reduciraju oštećenja stanica tj. tkiva koji se žele očuvati na ovaj način (Sun i Li, 2003). Nadalje, hlađenje se ubrzava zbog boljeg prijenosa topline (Li i Sun, 2002), kako je već prije opisano kod učinka ultrazvuka na procese zagrijavanja. Zvučnom kavitacijom skraćuje se vrijeme od početka kristalizacije do završetka formiranja leda (Roberts, 1993). Osim u prehrambenoj industriji, ova je visoko-účinkovita metoda prikladana za primjenu i u farmaceutskoj industriji u cilju očuvanja visokovrijednih sastojaka različitih lijekova i pripravaka (Song i sur., 2009). Tijekom smrzavanja i kristalizacije koje se provode uz primjenu ultrazvuka ne dolazi do formiranja kristala na opremi te se i zbog toga pospješuje prijenos topline.

Učinkovitost smrzavanja uvelike ovisi i o postupku odmrzavanja materijala (Rouillé i sur., 2002). Postupci odmrzavanja su obično spori i upravo ova karakteristika ih čini ekonomski zahtjevnim. Odmrzavanje se može ubrzati dovođenjem topline npr. zagrijavanjem mikrovalovima, ali se ova toplina uglavnom zadržava na površini. Korištenje energije zvuka u cilju odmrzavanja istražuje se i razvija zadnjih 50-tak godina, jer se i primjenom ove metode ne rješavaju problemi kao što su: slabo prodiranje energije u unutrašnjost uzoraka, lokalno zagrijavanje i visoka potrošnja energije (Brody i Antenevich, 1959).

### 1.9. Sušenje

Sušenje je proces koji podrazumijeva dehidraciju različitih materijala i to uglavnom njihovim izlaganjem struji toplog zraka. Ovi su tradicionalni procesi neekonomični, naročito ukoliko se želi ukloniti vlaga iz unutrašnjosti uzorka, što zahtijeva relativno duge postupke. Osim trajanja ovog procesa, primjena relativno visokih temperatura može značajno promijeniti poželjna svojstva sušenog uzorka. Primjenjuju se i druge metode, npr. liofilizacija, kojima se smanjuje udio vode u uzorku, a kojima se izbjegavaju opisani učinci. I liofilizacija je ekonomski zahtjevna metoda. Primjenom energije ultrazvuka moguće je pospješiti proces dehidracije i izbjeći negativne posljedice sušenja tradicionalnim metodama (Cohen i Yang, 1995). Naime, prozvučivanjem se pospješuje difuzija otapala (vode) i prijenos topline na granici čvrsta faza - tekuća faza (Gallego Juarez, 1998). Pomoću ove metode uspješno se provodi sušenje mlijeka, povrća i drugih proizvoda prehrambene industrije. Razvija se primjena ultrazvuka u reaktoru s lebdećim (fluidiziranim) slojem za sušenje različitih materijala (Garcia-Perez i sur., 2009). Dok se vrući zrak uvodi i prolazi pokraj ili kroz tanke listiće materijala koji lebdi, reaktor cilindričnog oblika prozvučuje se ultrazvukom frekvencije od oko 20 kHz. Tijekom osmotski potpomognute dehidracije koriste se niže temperature pri kojima se postiže veća brzina gubitka vode (Simal i sur., 1998; Mulet i sur., 2003). U ovim je slučajevima kvaliteta sušenih uzoraka veća, jer su tijekom kraćih postupaka primijenjene niže temperature sušenja. Ultrazvuk se može primijeniti i u cilju pripreme različitih uzoraka za sušenje (Brnčić i sur., 2010). Ovakvim načinom pripreme uzoraka skraćuje se vrijeme potrebno za sušenje i pospješuje rehidracija uzorka.

### 1.10. Rezanje

Rezanje različitih sirovina, međuproizvoda i proizvoda pomoću opreme koja koristi energiju ultrazvuka znatno smanjuje količinu proizvedenog otpadnog materijala i utrošene energije kao i cijenu održavanja opreme (Schneider i sur., 2008). Ovi procesi podrazumijevaju upotrebu noževa različitih oblika koji su povezani s izvorom ultrazvuka (Rawson, 1988). Na ovaj se način mogu rezati materijali različite konzistencije, npr. smrznuti i odmrznuti uzorci (Brown i sur., 2005). Ova se metoda najčešće koristi za rezanje heterogenih uzoraka, nekih proizvoda mljekarske industrije (npr. sir) ili drugih proizvoda prehrambene industrije (npr. peciva, kolači, pekarski proizvodi) koji mogu imati i ljepljivu konzistenciju (Arnold i sur., 2009). Daljnje prednosti rezanja pomoću ultrazvuka je smanjena mogućnost kontaminacije nepoželjnim mikroorganizmima i bolja standardizacija mase i oblika tj. ujednačenost dimenzija cjelina dobivenih rezanjem.

## 2. Utjecaj ultrazvuka na bioprocese koji se odvijaju u sonobioreaktorima

Primjena ultrazvuka u različitim bioprocесima istražuje se u cilju povećanja njihove produktivnosti (Christi i Moo-Young, 1996). Klasična konstrukcija bioreaktora prilagođava se dodatkom sonde, ploče, kupelji, komore ili drugih načina

uvođenja ultrazvuka određene frekvencije i snage koji se dozira u odgovarajućem volumenu hranjive podloge i tako nastaju sonobioreaktori (Christi i Moo-Young, 2002). Jednostavnije ultrazvučne sonde, obično izrađene od titana, uranjaju se u hranjive podloge u manjim laboratorijskim bioreaktorima i proizvode ultrazvuk koji se širi na udaljenosti od samo 70 do 100 mm (Christi, 2003). Kod bioreaktora većeg volumena potrebno je osigurati ultrazvučnu kupelj ili pumpom prepumpavati hranjivu podlogu iz bioreaktora u komoru s ultrazvukom. Kod cijevnih bioreaktora i „air-lift“ bioreaktora dodaje se nekoliko sondi ili ploča uzduž bioreaktora. Učinak primijenjenog ultrazvuka ovisit će o količini energije koja se predaje biokatalizatoru i hranjivoj podlozi u bioreaktoru. Pri tome valja voditi računa o viskoznosti hranjive podloge. Već relativno male količine ultrazvuka doziranog u bioreaktor mogu polučiti povoljne učinke. Međutim, pri prijenosu većih količina ultrazvučne energije u suspenziju dolazi do prekomjernog zagrijavanja hranjive podloge. Zbog toga je kod određenih bioprocеса koji se odvijaju u sonobioreaktorima potrebno provoditi hlađenje, što je glavni nedostatak primjene ultrazvuka u biotehnoškoj proizvodnji.

U literaturi je dostupno relativno malo rezultata koji definiraju utjecaj primijenjenog ultrazvuka na aktivnost suspendiranih stanica različitih mikroorganizama ili na aktivnost drugih vrsta biokatalizatora tijekom ovako unaprijeđenih bioprocеса. Korištenjem različitih metoda, kao što su protočna citometrija, obilježavanje makromolekula fluorescentnim markerima (Slavica i sur., 2005) i dr., moguće je definirati utjecaj primijenjenog ultrazvuka na koncentraciju i aktivnost nekih enzima unutar stanice, propusnost i cjelovitost citoplazmatske membrane kao i procijeniti ukupnu metaboličku aktivnost biokatalizatora. Scherba i sur. (1991) utvrdili su negativan učinak ultrazvuka na lipoproteinski dvosloj citoplazmatske membrane kod Gram-pozitivnih (*Lactobacillus rhamnosus*) i Gram-negativnih bakterija (*Escherichia coli*). U uvjetima u kojima se usljed primjene ultrazvuka suspenzija zagrijava do maksimalno 20°C, kod Gram-negativnih bakterija dolazi do oštećenja lipopolisaharidnog sloja vanjske membrane, što ih čini osjetljivijima prema djelovanju nekih antibiotika i bakteriocina (Kalchayanand i sur., 2004). Primjenom ultrazvuka (300 W m<sup>-3</sup>, 25 kHz) povećana je razgradnja supstrata i proizvodnja etanola s pomoću stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Schläfer i sur., 2000). Kontinuiranom primjenom ultrazvuka od 300 W m<sup>-3</sup> i 43 kHz kod fermentacija s pomoću različitih sojeva kvasca *S. cerevisiae* postignuto je kraće trajanje ovih bioprocеса tj. povećana je produktivnost ovih bioprocеса i to za više od 50% (Matsuura i sur., 1994). Osim toga, primjenom ultrazvuka tijekom fermentacije pospješuje se otplinjavanje ugljikovog dioksida iz fermentacijske komine, smanjuje se koncentracija otopljenog ugljikovog dioksida i njegov inhibitorski učinak. Utvrđeno je da ultrazvuk stimulira i sintezu sterola (Chu i sur., 2000). Primjenom ultrazvuka djelomično je narušena struktura stanica bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus delbrueckii* iz čije je okoline izolirana unutarstanična β-galaktosidaza (Sakakibara i sur., 1994). Izlaganje stanica *Anabaena flos-aquae* ultrazvuku frekvencije od 20 kHz i snage



od 50 W kroz period od pet minuta rezultiralo je povećanjem udjela proteina u ovim stanicama kao i povećanjem brzine rasta ove cijanobakterije (Francko i sur., 1994). Tretman ultrazvukom nije utjecao na brzinu potrošnje glukoze i proizvodnju protutijela hibridoma stanicama. Ultrazvukom je moguće povećati i proizvodnju nekih sekundarnih metabolita (Wu i Lin, 2002; Lin i Wu, 2002). Općenito, cjelovite stanice-biokatalizatori smatraju se manje osjetljivijim prema ultrazvuku od izoliranih i pročišćenih enzima koji se primjenjuju kao biokatalizatori u različitim proizvodnim bioprocima. Dosad su opisani pozitivni i negativni učinci primijenjenog ultrazvuka na enzimski katalizirane reakcije i nizove reakcija (Sinistera, 1992). Opisana je i stabilnost enzima celobiasa i endogluukanaza prema ultrazvuku primijenjenom u laboratorijskim bioreaktorima s miješalom u kojima su se odvijale ove enzimske katalizirane konverzije polimernih supstrata (Wood i sur., 1997). Definirani učinci primjene ultrazvuka na različite vrste biokatalizatora ukazuju na potencijal primjene ove metode u razvoju visoko-účinkovitih bioprocisa.

Ultrazvuk je uspješno primijenjen i u indukciji transformacije tj. prijenosa DNA u stanice mikroorganizama (Song i sur., 2007), biljne (Joersbo i Brunstedt, 1992) i životinjske stanice (Miura i sur., 2002). Konjugacija i elektroporacija dvije su metode koje se vrlo često koriste za prijenos genetičkog materijala u stanicu bakterije (Mueller i sur., 2010). Konjugacija podrazumijeva fizičku interakciju dviju stanica (stanica-pilus-stanica) dok se elektroporacija odvija primjenom visokog napona u suspenziji određene ionske jakosti. Opisani uvjeti ograničavaju široku primjenu ovih metoda u transformaciji stanica i nameću primjenu ultrazvuka kao metode za prijenos DNA i RNA u stanice u kompleksnim hranjivim podlogama i uvjetima sličnim onima u njihovim prirodnim staništima.

Osim medicinske dijagnostike, čišćenja nepoželjnih slojeva sa različitih površina i podvodnih istraživanja (Mason i Lorimer, 1988), ultrazvuk se primjenjuje i u obradi različitih sirovina koje se koriste u biotehnoškoj proizvodnji (Mason, 1996; Benedito i sur., 2002; Schläfer i sur., 2002).

### 2.1. Punidbeni (šaržni) dubinski (submerzni) uzgoj

Jednostavan primjer nestacionarnog procesa ograničenog u prostoru i vremenu je punidbeni (šaržni) dubinski uzgoj mikroorganizama. Dubinski (submerznih) bioprocisi obično se provode s pomoću suspenzija mikrobnih stanica u klasičnim bioreaktorima. Osim mikrobnih stanica (čvrsta faza) i hranjive podloge (tekuća faza), kod aerobnih procesa potrebno je uvesti kisik tj. zrak (plinska faza). Opisani se bioprocisi odvijaju u višefaznom sustavu u kojemu su limitirani prijenos supstrata i produkata (Christi, 1999; Marić i Šantek, 2010). Otpori prijenosu supstrata i produkata obuhvaćaju: otpor uz međufazne granične površine, otpor međufaznih graničnih površina, otpor laminarnih slojeva tekućine i otpor unutar svake faze. Primjenom ultrazvuka može se smanjiti debljina laminarnog sloja tekućine uz površinu stanice i debljina laminarnog sloja tekućine između međufazne granične površine plinska faza - tekuća faza i mase tekućine u kojoj je strujanje turbulentno, i na taj način poboljšati prijenos mase. Primjenom ultrazvuka određene frekvencije i snage tijekom submerznih bioprocisa

pospješuje se i prijenos mase unutar stanice. Ultrazvuk djeluje i na pokretanje organela unutar stanice kao i na cirkulaciju unutar vakuola kod biljnih stanica (Nyborg, 1982). Ultrazvuk visoke frekvencije (> 1 MHz) može se koristiti i za izdvajanje sekundarnih metabolita iz vakuola biljnih stanica (Kilby i Hunter, 1991).

### 2.2. Kontinuirani dubinski uzgoj

Nakon punidbenog, može se započeti s kontinuiranim dubinskim uzgojem mikroorganizama. Ovaj postupak podrazumijeva stalan protok hranjive podloge kroz bioreaktor. Produženo vrijeme zadržavanja suspenzija stanica (ili drugih vrsta biokatalizatora) u reaktorima u kojima se biokonverzije supstrata provode kontinuiranim postupkom dovodi do povećanja koncentracije biomase i može rezultirati povećanom produktivnošću bioprocisa. Osim primjene različitih nosača biomase i separatora, ovaj se učinak može postići primjenom ultrazvuka. Primjenom ultrazvučne agregacije CHO stanica povećana je produktivnost bioprocisa za 70 puta (Gorenflo i sur., 2002). Dodatna prednost primjene ultrazvuka u zadržavanju biokatalizatora tijekom kontinuiranih bioprocisa je zadržavanje aktivnih stanica i ispiranje stanica koje ne pokazuju aktivnost, a koje se međusobno razlikuju po svojoj veličini i gustoći (Chisti, 2003). Slično tomu, podešavanjem frekvencije i snage ultrazvuka moguće je izdvojiti stanice kvasca *S. cerevisiae* suspendirane u vodenoj suspenziji od stanica ovog kvasca suspendiranih u 12%-tnoj (vol/vol) otopini etanola (Radel i sur., 2000).

## 3. Zaključak

Primjena ultrazvuka u definiranim uvjetima može povećati aktivnost različitih vrsta biokatalizatora i tako značajno unaprijediti produktivnost i ekonomsku učinkovitost određenih bioprocisa. Međutim, potrebna su detaljna istraživanja učinaka koje može imati ultrazvuk određene frekvencije i snage primijenjen tijekom biokonverzije. Provedenim istraživanjima potrebno je odrediti prikladne raspone odgovarajućih parametara ultrazvučnih tretmana, kako homogenih tako i heterogenih sustava, na temelju kojih će se planirati primjena visoko-účinkovitih bioprocisa u sonobioreaktorima.

## 4. Literatura

- Ananta, E., Voigt, D., Zenker, M., Heinz, V., Knorr, D. (2005): Cellular injuries upon exposure of *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* to high-intensity ultrasound, *Journal of applied microbiology*, 99, 271-278.
- Arnold, G., Leiteritz, L., Zahn, S., Rohm, H. (2009): Ultrasonic cutting of cheese: composition affects cutting work reduction and energy demand, *International Dairy Journal*, 19, 314-320.
- Benedito, J., Carcel, J.A., Gonzalez, R., Mulet, A. (2002) Application of low intensity ultrasonics to cheese manufacturing processes, *Ultrasonics* 40, 19-23.
- Boistier-Marquis, E., Lagsir-Oulahal, N., Callard, M. (1999): Applications des ultrasons de puissances en industries alimentaires, *Industries Alimentaires et Agricoles* 116, 23-31.
- Bosiljkov T., Tripalo B., Brnčić M., Ježek D., Karlović S., Jagušt I. (2010) Influence of high intensity ultrasound with dif-



- ferent probe diameter on the degree of homogenization (variance) and physical properties of cow milk, *African Journal of Biotechnology*, 10, (1), 34-41.
- Brnčić, M., Karlović, S., Rimac Brnčić, S., Penava A., Bosiljkov, T., Ježek, D., Tripalo, B. (2010) Textural properties of infra red dried apple slices as affected by high power ultrasound pre-treatment, *African Journal of Biotechnology*, 9, (41), 6907-6915.
- Brody, A.L., Antenevich, J.N. (1959): Ultrasonic defrosting of frozen foods, *Food Technology*, 13, 109-110.
- Brown, T., James, S.J., Purnell, G.L. (2005): Cutting forces in foods: experimental measurements, *Journal of Food Engineering* 70, 165-170.
- Cameron, M., McMaster, L.D., Britz, T.J. (2009): Impact of ultrasound on dairy spoilage microbes and milk components, *Dairy Science & Technology*, 89, 83-98.
- Chemat, F., Zill-e-Huma, Khan, M.K. (2011): Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction, *Ultrasonic Sonochemistry*. doi: 10.1016/j.ulsonch. 2010.11.023.
- Chen, R.-H., Chang, J.-R. and Shyur, J.-S., (1997) Effects of ultrasonic conditions and storage in acidic solutions on changes in molecular weight and polydispersity of treated chitosan. *Carbohydrate Research* 299, 287-294
- Chendke, P.K., Fogler, H.S. (1975): Macrosonics in industry: 4. Chemical processing, *Ultrasonics* 13, 31-37.
- Chisti Y. (1999): Mass transfer. U: Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation (vol. 3), Flickinger, M.C., Drew, S.W. (ured.), John Wiley, New York, str. 1607-1640.
- Chisti, Y. (2003) Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity, *TRENDS in Biotechnology* 12, 89-93.
- Christi, Y., Moo-Young M. (1996): Bioprocess intensification through bioreactor engineering, *Transactions of the Institution of Chemical Engineer*, 74A, 575-583.
- Chisti, Y., Moo-Young, M. (2002): Bioreactors. U: Encyclopedia of Physical Science and Technology (vol. 2), Meyers, R.A., ured., Academic Press, London, str. 247-271.
- Chu, J., Li, B., Zhang, S., Li, Y. (2000) On-line ultrasound stimulates the secretion and production of gentamicin by *Micromonospora echinospora*, *Process Biochemistry*, 35, 569-572.
- Cohen, J.S., Yang, T.C.S. (1995): Progress in food dehydration, *Trends in Food Science & Technology*, 6, 20-25.
- De Castro, L.M.D., Capote, P.F. (2007a) Ultrasound – assisted preparation of liquid samples. *Talanta*, 72, 321-334.
- De Castro, L.M.D., Capote, F. (2007b): Ultrasound-assisted crystallization (sonocrystallization), *Ultrasonic Sonochemistry*. 14, 717-724.
- De-Sarabia, E.R.F., Gallego-Juarez, J.A., Mason, T.J. (2006): Airborne ultrasound for the precipitation of smokes and powders and the destruction of foams, *Ultrasonic Sonochemistry*. 13, 107-116.
- Francko, D.A., Taylor, S.R., Thomas, B.J., McIntosh, D. (1994): Effect of low-dose ultrasonic treatment on physiological variables in *Anabaena flos-aquae* and *Selenastrum capricornutum*, *Biotechnology Letters*, 12, 219-224.
- Gallant, D., Degrois, M., Sterling, C. and Guilbot, A., (1972) Microscopic effects of ultrasound on the structure of potato starch. *Die Stärke* 24, pp. 116-123
- Gallego Juarez, J.A. (1998): Some applications of airborne power ultrasound to food processing. U: *Ultrasound in Food Processing*, Povey, M.J.W., Mason, T.J. (ured.), Blackie, Glasgow, str. 127-143.
- Garcia-Perez, J.V., Carcel, J.A., Riera, E., Mulet, A. (2009): Influence of the applied acoustic energy on the drying of carrots and lemon peel, *Drying Technology*, 27, 281-287.
- Gorenflo, V.M., Smith, L., Dedinsky, B., Persson, B., Piret, J.M. (2002) Scale-up and optimization of an acoustic filter for 200 L/day perfusion of a CHO cell culture, *Biotechnology and Bioengineering*, 80, 438-444.
- Grönroos, A., Pirkonen, P., Ruppert, O. (2004): Ultrasonic depolymerisation of aqueous carboxymethylcellulose, *Ultrasonic Sonochemistry*. 11, 9-12.
- Grossner, M.T., Belovich, J.M., Feke, D.L. (2005): Transport analysis and model for the performance of an ultrasonically enhanced filtration process, *Chemical Engineering Science*, 60, 3233-3238.
- Iida, Y., Tuziuti, T., Yasui, K., Towata, A., Kozuka, T. (2008): Control of viscosity in starch and polysaccharide solutions with ultrasound after gelatinization, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 140-146.
- Joersbo, M., Brunstedt J. (1992): Sonication: a new method for gene transfer to plants, *Plant Physiology*, 85, 230-234.
- Kalchayanand, N., Dunne, P., Sikes, A., Ray, B. (2004): Viability loss and morphology change of foodborne pathogens following exposure to hydrostatic pressures in the presence and absence of bacteriocins, *International Journal of Food Microbiology*. 91, 91-98.
- Kardos, N., Luche, J.-L. (2001): Sonochemistry of carbohydrate compounds *Carbohydrate Research*, 332, 115-131.
- Kilby, N.J., Hunter, C.S. (1991) Repeated harvest of vacuole-located secondary products from in vitro grown plant cells using 1.02 MHz ultrasound, *Applied Microbiology and Biotechnology* 34, 478-480.
- Kyllönen, H., Pirkonen, P., Nyström, M., Nuortila-Jokinen, J., Grönroos, A. (2006): Experimental aspects of ultrasonically enhanced cross-flow membrane filtration of industrial wastewater, *Ultrasonic Sonochemistry*. 13, 295-302.
- Laborde, J.L., Bouyer, C., Caltagirone, J.-P., Gerard, A. (1998): Acoustic bubble cavitation at low frequencies, *Ultrasonics* 36, 589-594.
- Li, B., Sun, D.-W. (2002): Novel methods for rapid freezing and thawing of foods – a review, *Journal of Food Engineering*, 54, 175-182
- Lii, C., Chen, C., Yeh, A., Lai, V.M. (1999) Preliminary study on the degradation kinetics of agarose and carrageenans by ultrasound, *Food Hydrocolloids*, 13, 6, 477-481.
- Lin, L., Wu, J. (2002): Enhancement of shikonin production in single- and two-phase suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* cells using low-energy ultrasound, *Biotechnology and Bioengineering*, 78, 81-88.
- Marić, V., Šantek, B. (2009): Aeracija i miješanje. U: *Biokemijsko inženjerstvo*, Grba, S., Horvat, P., Raspor, P. (ured.), Golden marketing - Tehnička knjiga, Zagreb, str. 243-276.



- Marić, V., Šantek, B. (2009): Mjerenje i regulacija razine pjene. U: *Biokemijsko inženjerstvo*, Grba, S., Horvat, P., Raspor, P. (ured.), Golden marketing - Tehnička knjiga, Zagreb, str. 155-158.
- Marić, V., Šantek, B. (2009): Sterilizacija hranjivih podloga, zraka i opreme. U: *Biokemijsko inženjerstvo*, Grba, S., Horvat, P., Raspor, P. (ured.), Golden marketing - Tehnička knjiga, Zagreb, str. 213-242.
- Mason, T.J., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P. (1996) The uses of ultrasound in food technology, *Ultrasonics Sonochemistry*, 3, S253-S260.
- Mason, T.J., Lorimer, J.P. (1988): *Sonochemistry: Theory, Applications and Uses of Ultrasound in Chemistry*, Ellis Horwood.
- Mason, T.J., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P. (1996): The uses of ultrasound in food technology, *Ultrasonics Sonochemistry*, 3, S253-S260.
- Matsuura, K., Hirotsune, M., Nunokawa, Y., Satoh, M., Honda, K. (1994): Acceleration of cell growth and ester formation by ultrasonic wave irradiation, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77, 36-40.
- McCausland, L.J., Cains, P.W., Martin, P.D. (2001): Use the power of sonocrystallization for improved properties, *Chemical Engineering Progress*, 97, 56-61.
- Milas, M., Rinaudo, M. and Tinland, B., (1986) Comparative depolymerization of xanthan gum by ultrasonic and enzymic treatments. Rheological and structural properties. *Carbohydrate Polymers* 6, 95-107.
- Miura, S.I., Tachibana, K., Okamoto, T., Saku, K. (2002) In vitro transfer of antisense oligodeoxynucleotides into coronary endothelial cells by ultrasound, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 298, 587-590.
- Morey, M.D., Deshpande, N.S., Barigou, M. (1999): Foam destabilization by mechanical and ultrasonic vibrations, *Journal of Colloid and Interface Science*, 219, 90-98.
- Mortazavi, A., Tabatabaie, F. (2008): Study of ice cream freezing process after treatment with ultrasound, *World Applied Sciences Journal*, 4, 188-190.
- Mousavi, S.A.A.A., Feizi, H., Madoliat, R. (2007): Investigations on the effects of ultrasonic vibrations in the extrusion process, *Journal of Materials Processing Technology*, 187-188, 657-661.
- Mueller, M., Kratzer, R., Schiller, M., Slavica, A., Rechberger, G., Kollroser, M., Nidetzky, B. (2010): The role of Cys108 in *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase examined through chemical oxidation studies and point mutations C108S and C108D, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804, 1483-1491.
- Mulet, A., Carcel, J.A., Sanjuan, N., Bon, J. (2003): New food drying technologies - use of ultrasound, *Food Science and Technology International*, 9, 215-221.
- Muthukumar, S., Kentish, S.E., Ashokkumar, M., Stevens, G.W. (2005): Mechanisms for the ultrasonic enhancement of dairy whey ultrafiltration, *Journal of Membrane Science*, 258, 106-114.
- Norton, T., Delgado, A., Hogan, E., Grace, P., Sun, D.-W. (2009): Simulation of high pressure freezing processes by enthalpy method, *Journal of Food Engineering*, 91, 260-268.
- Nyborg, W.L. (1982) Ultrasonic microstreaming and related phenomena, *British Journal of Cancer*, 45, 156-160.
- Patist, A., Bates, D. (2008): Ultrasonic innovations in the food industry: from the laboratory to commercial production, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 147-154.
- Pohlman, F.W., Dikeman, M.E., Zayas, J.F., Unruh, J.A. (1997): Effects of ultrasound and convection cooking to different end point temperatures on cooking characteristics, shear force and sensory properties, composition and microscopic morphology of beef longissimus and pectoralis muscles, *Journal of Animal Science*, 75, 386-401.
- Radel, S., McLoughlin, A.J., Gherardini, L., Doblhoff-Dier, O., Benes, E. (2000) Viability of yeast cells in well controlled propagating and standing ultrasonic plane waves, *Ultrasonics* 38, 633-637.
- Rawson, F.F. (1988): An introduction to ultrasonic food cutting AQ4, U: *Ultrasound in Food Processing*, Povey, M.J.W., Mason T.J. (ured.), Blackie, Glasgow.
- Roberts, R.T. (1993): High intensity ultrasonics in food processing, *Chemical industry*, 15, 119-121.
- Rouillé, J., Lebail, A., Ramaswamy, H.S., Leclerc, L. (2002): High pressure thawing of fish and shellfish, *Journal of Food Engineering* 53, 83-88.
- Ruecroft, G., Hipkiss, D., Maxted, T.Ny.N., Cains, P.W. (2005): Sonocrystallization: the use of ultrasound for improved industrial crystallization, *Organic process research & development*, 9, 923-932.
- Sakakibara, M., Wang, D., Ikeda, K., Suzuki, K. (1994) Effect of ultrasonic irradiation on production of fermented milk with *Lactobacillus delbrueckii*, *Ultrasonic Sonochemistry*, 1, S107-S110.
- Sanz, P.D., Otero, L., de Elvira, C., Carrasco, J.A. (1997): Freezing processes in highpressure domains, *International Journal of Refrigeration*, 20, 301-307.
- Scherba, G., Weigel, R.M., O'Brien, W.D.J. (1991): Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy, *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2079-2084.
- Schläfer, O., Onyeché, T., Bormann, H., Schröder, C., Sievers, M. (2002): Ultrasound stimulation of microorganisms for enhanced biodegradation, *Ultrasonics* 40, 25-29.
- Schläfer, O., Sievers, M., Klotzbücher, H., Onyeché, T.I. (2000): Improvement of biological activity by low energy ultrasound assisted bioreactors, *Ultrasonics* 38, 711-716.
- Schmid, G., Rommel, O. (1939): Rupture of macromolecules with ultrasound, *Zeitschrift für Physikalische Chemie A*, 185, 97-139
- Schneider, Y., Zahn, S., Rohm, H. (2008): Power requirements of the high frequency generator in ultrasonic cutting of foods, *Journal of Food Engineering*, 86, 61-67.
- Scotto, A. (1988): Device for demoulding industrial food products, Fr. Pat. FR 2 604 063.
- Seshadri, R., Weiss, J., Hulbert, G.J., Mount, J. (2003): Ultrasonic processing influences rheological and optical properties of high-methoxyl pectin dispersions, *Food Hydrocolloids* 17, 191-197.

- Simal, S., Benedito, J., Sanchez, E.S., Rossello, C. (1998): Use of ultrasound to increase mass transport rates during osmotic dehydration, *Journal of Food Engineering* 36, 323-336.
- Sinistera, J.V. (1992): Applications of ultrasound in biotechnology - an overview, *Ultrasonics* 30, 180-185.
- Slavica, A., Dib, I., Nidetzky, B. (2005): Single-site oxidation, cysteine 108 to cysteine sulfinic acid, in D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* and its structural and functional consequences, *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 8061-8068.
- Smythe, M.C., Wakeman, R.J. (2000): The use of acoustic fields as a filtration and dewatering aid, *Ultrasonics* 38, 657-661.
- Song, Y., Hahn, T., Thompson, I.P., Mason, T.J., Preston, G.M., Li, G., Painwnyk, L., Huang W.E. (2007): Ultrasound-mediated DNA transfer for bacteria, *Nucleic Acids Research* 35, 1-9.
- Song, G.S., Hu, S.Q., Li, L., Chen, P., Shen, X. (2009): Structural and physical changes in ultrasound-assisted frozen wet gluten, *Cereal Chemistry*, 86, 333-338.
- Sun, D.-W., Li, B. (2003): Microstructural change of potato tissues frozen by ultrasound-assisted immersion freezing, *Journal of Food Engineering*, 57, 337-345.
- Stahmann, K.-P., Monschau, N., Sahm, H., Koschel, A., Gawronski, M., Conrad, H., Springer, T. and Kopp, F., (1995) Structural properties of native and sonicated cinerean, a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucan produced by *Botrytis cinerea*. *Carbohydrate Research* 266, 115-128
- Szent-Gyorgyi, A. (1933): Chemical and biological effects of ultra-sonic radiation, *Nature* 131, 278.
- Tiwari, B.K., Muthukumarappana, K., O'Donnella, C.P., Cullen, P.J. (2009): Inactivation kinetics of pectin methylesterase and cloud retention in sonicated orange juice, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10, 166-171.
- Trontel, A., Baršić, V., Slavica, A., Šantek, B., Novak, S. (2010): Modelling the effect of different substrates and temperature on the growth and lactic acid production by *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> in batch process, *Food Technology Biotechnology*, 48, 352-361.
- Vodencarova, M., Drimalova, G., Hromadkova, Z., Malovikova, A., Ebringerova A. (2006): Xyloglucan degradation using different radiation sources: a comparative study, *Ultrasonic Sonochemistry*. 13, 157-164.
- Wood, B.E., Aldrich, H.C., Ingram, L.O. (1997) Ultrasound stimulates ethanol production during the simultaneous saccharification and fermentation of mixed waste office paper, *Biotechnology Progress*, 13, 232-237.
- Wu, J., Lin, L. (2002): Elicitor-like effects of low-energy ultrasound on plant (*Panax ginseng*) cells: induction of plant defense response and secondary metabolite production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 51-57.
- Wu, H., Hulbert, G.J., Mount, J.R. (2000): Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter, *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 1, 211-218.
- Zuo, J.Y., Knoerzer, K., Mawson, R., Kentish, S., Ashokkumar, M. (2009): The pasting properties of sonicated waxy rice starch suspensions, *Ultrasonic Sonochemistry* 16, 462-468.

## **Autori/Authors**

**Antonija Trontel, dipl.inž.**

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Pierottijeva 6**

**10000 Zagreb, Hrvatska**

**Antonia Penava, dipl.inž.**

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Pierottijeva 6**

**10000 Zagreb, Hrvatska**

**Jadranka Sučević, dipl.inž.**

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Pierottijeva 6**

**10000 Zagreb, Hrvatska**

**Dr.sc. Anita Slavica, doc.**

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Pierottijeva 6**

**10000 Zagreb, Hrvatska**

**Dr.sc. Mladen Brnčić, doc.**

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Pierottijeva 6**

**10000 Zagreb, Hrvatska**

**Dr.sc. Suzana Rimac Brnčić, doc.**

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Pierottijeva 6**

**10000 Zagreb, Hrvatska**