



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ НОВИ САД



Милан Вукић

Утицај хладне атмосферске плазме на технолошки
квалитет и безбедност пшеничног брашна

-докторска дисертација-

Нови Сад, 2020. година

Захваљујем се свима који су својим усмеравањима, саветима, конструктивним критикама и моралном подршком омогућили да овај рад буде написан.

Конципирање и вођење дела истраживања у оквиру ове докторске дисертације, који се односи на одређивање утицаја третмана хладне атмосферске плазме на безбедност пшеничног брашна, кроз редукцију *Alternaria* токсина, активно је коменторисала др Елизабет Јанић Хајнал, научни сарадник Научног института за прехранбене технологије у Новом Саду.

Радови објављени из истраживања:

Vukić, M., Puač, N., Škoro N., Šoronja-Simović, D., Petrović, Z. (2018). Treatment of flour by surface DBD source in air. In 24th Europhysics Conference on Atomic and Molecular Physics of Ionized Gases (ESCAMPIG XXIV), Glasgow, Scotland, UK, July 17-21, 2018.

Vukić, M., Dapčević Hadnadjev, T., Hadnadjev, M., Šoronja Simović, D, Janić Hajnal, E., Mastilović, J. (2018). Atmospheric pressure cold plasma: an innovative technology to improve the rheological quality of wheat flour. Book of abstracts of the 4th International Congress "Food Technology, Quality and Safety", October 23-25, 2018, Novi Sad, Serbia, p.61 ISBN 978-86-7994-054-4

Janić Hajnal, E., Vukić, M., Pezo, L., Orčić, D., Puač, N., Škoro, N., ... & Šoronja Simović, D. (2019). Effect of Atmospheric Cold Plasma Treatments on Reduction of *Alternaria* Toxins Content in Wheat Flour. *Toxins*, 11(12), 704.

Vukić, M., Hajnal, E. J., Mastilović, J., Vujadinović, D., Ivanović, M., & Šoronja-Simović, D. (2020). Application of solvent retention capacity tests for prediction of rheological parameters of wheat flour mill streams. *HEMIJSKA INDUSTRIJA*, 74(1), 37-49.

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ НОВИ САД, УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

Редни број:

РБР

Идентификациони број:

ИБР

Тип документације: Монографска публикација

ТД

Тип записа: Текстуални штампани материјал

ТЗ

Врста рада: Докторска дисертација

ВР

Име и презиме аутора: Милан Вукић

АУ

Ментор: Др Драгана Шороња-Симовић, ванредни професор

МН

Наслов рада: Утицај хладне атмосферске плазме на технолошки квалитет и безбедност пшеничног брашна

НР

Језик публикације: Српски, ћирилица

ЈП

Језик извода: Српски

ЈИ

Земља публикавања: Србија

ЗП

Уже географско подручје: Војводина

УГП

Година: 2020

ГО

Издавач:	Ауторски репринт
ИЗ	
Место и адреса:	Булевар цара Лазара 1, 21000 Нови Сад, Србија
МА	
Физички опис рада:	6 поглавља / 164 страница / 25 табела / 48 слика / 373 литературних навода
ФО	
Научна област:	Технолошко инжењерство
НО	
Научна дисциплина:	Прехрамбено инжењерство
НД	
Предметна одредница, кључне речи:	Хладна атмосферска плазма, способност задржавања раствора, <i>Alternaria</i> токсини, Квалитет и безбедност брашна
ПО	
УДК	
Чува се:	У библиотеци Технолошког факултета Нови Сад
ЧУ	Булевар цара Лазара 1, 21000 Нови Сад, Србија
Важна напомена:	Нема
ВН	
Извод:	
ИЗ	

Основни задатак ове докторске дисертације је био да се испита утицај третмана хладном атмосферском плазмом на квалитет и безбедност пшеничног брашна.

Прва фаза истраживања спроведених у овој докторској дисертацији била је усмерена на поређење SRC методе (Solvent Retention Capacity) са емпиријским методама на узорцима пасажних брашна. Метода је показала изузетно добру моћ описивања врло различитих својстава пасажних брашна. Поређењем параметара SRC методе са реолошким показатељима квалитета уочена је подела SRC параметара у две групе. Прву групу чинили су параметари способност задржавања раствора млечне киселине и индекс перформанси глутена (SRC_L и GPI) осетљиви на снагу теста, а другу групу параметри способност задржавања раствора натријум карбоната, односно, шећера те способност задржавања воде (SRC_{So}, SRC_{Su} и SRC_w) осетљиви на хидратациона својства брашна. Обрадом резултата кроз мултиваријантну анализу, одређене су корелације, односно, односи између параметара SRC методе и реолошких параметара. На бази параметара SRC методе развијени су модели применом методе парцијалне регресије најмањих квадрата (PLSR) са високим вредностима коефицијента детерминације, $R^2 = 0,93$ за фаринографску моћ упијања воде (FWA) и $R^2 = 0,92$ за енергију те вишеструких

одговора $R^2 = 0,89$.

Друга фаза истраживања у оквиру дисертације била је усмерена на сагледавање утицаја различитих услова третмана хладном атмосферском плазмом (време, растојање, степен искоришћености заклона) на показатеље квалитета брашна кроз примену SRC методе, садржаја слободних сулфхидрилних група, ултраљубичасте и инфрацрвене спектроскопије, реолошких анализа на реометру и глутопику, те вредности глутен индекса и саджај влажног глутена. Електрична карактеризација извора плазме указала је да је укупна површина електроде хомогено прекривена плазмом при RMS вредности напона и јачине струје од 2400 V и 0,1 A. Коришћењем OES мерења (Optical Emission Spectroscopy) потврђено је постојање реактивних врста хладне плазме. Оптичке емисије су забележене у секундарној позитивној траци N_2 , првој позитивној траци N_2 , линије OH (A-X) опсега побуђених OH радикала као и линије из прве негативне траке молекулског јона азота. Мерења су указала и на низак интензитет побуђених стања атомског кисеоника. Сви посматрани показатељи квалитета су се мењали са условима третмана хладном атмосферском плазмом. Дуже време третмана пшеничног брашна довело је до повећање модула еластичности G' , SRCs_u и SRC_w параметра. Вредности влажног глутена и глутен индекса (WG и GI) варираше у уском интервалу, док су вредности садржај слободних сулфхидрилних група SRCLa и GPI параметара опадале. Како је SRC методе исказала добру способност да прати промене на брашну узроковане третманом хладном атмосферском на бази параметара SRC методе уз примену методологије одзивне површине спроведен је поступак моделовања и оптимизације третмана. Развијени модели свих SRC параметара су указали на значајне услове третмана и одликовали су се високим вредностима R^2 SRCLa (0,92), SRCs_u (0,84), SRCs_o (0,75), SRC_w (0,91) и GPI (0,92). Анализа секундарних структура указала је да третман доводи до увећања удела α -хеликс секундарне структуре те до смањења удела β равни као и β -окрет + β равни.

У трећој фази докторске дисертације, посматран је утицај два правца оптимизације третмана хладне атмосферске плазме на показатеље квалитета три групе производа (пшенични хлеб, мешани хлеб од целог зрна и хлеб са мекињама). Циљ првог правца је био минимизација SRCLa и максимизација SRCs_u параметара а другог максимизација SRCLa и SRCs_u параметара. Утицај третмана хладном атмосферском плазмом, оба правца оптимизације, на показатеље квалитета све три групе производа посматран је кроз анализу физичких и сензорских параметара квалитета хлеба. Одређивањем физичких показатеља квалитета утврђено је да третман брашна хладном атмосферском плазмом доводи до промена пецивних својстава пшеничног брашна. Третмани су утицали на текстуру као и боју узорака хлеба. Краће време третмана имало повољнији ефекат на ток колоидних процеса током замеса, те и запремину готових производа. Сензорска анализа показала је да супституција 10% брашна третираним при овом третману позитивно утиче на запремину, изглед средине, укус и мирис свих врста хлеба. Резултати указују да је у зависности и од услова третмана, начина примене (количине), али и од квалитета брашна које се супституише третираним брашном, пожељно спровођење оптимизације третмана у складу са наменом брашна.

У четвртој фази спроведено је испитивања могућег утицаја третмана хладном атмосферском плазмом на безбедност брашна, односно, производе од брашна. Испитивана је могућност редукције *Alternaria* токсина у матриксу пшеничног брашна и утицај услова третмана (време и растојање). Испитивања су била фокусирана на три *Alternaria* токсина: алтернариол (АОН), алтернариол монометил етар (АМЕ) и тентоксин (TEN). Одређени су степени редукције три *Alternaria* токсина, у „спајкованим“ узорцима пшеничног брашна у зависности од услова третмана. Потом је извршено моделовање третмана применом методологије одзивних површина и одређен значај услова третмана на степен редукције испитиваних *Alternaria* токсина. Оптимизација је извршена прорачуном стандардне оцене, те је спроведено тестирање оптималног третмана на природно контаминираним узорцима млинских производа од пшенице. Резултати су показали да је могуће постићи значајан степен разградње свих испитиваних

Alternaria токсина при релативно кратким временима (180 s) третмана како у „спајкованим“ тако и у природно контаминираним узорцима. Најбољи резултати редуције *Alternaria* токсина добијени су третманом узорка постављеним на растојању од 6 cm од извора хладне атмосферске плазме, са трајањем третмана од 180 s, при чему је остварен степен редуције од 60,6% за АОН, 73,8% за АМЕ и 54,5% за ТЕН. Степен редуције испитиваних *Alternaria* токсина у природно контаминираним узорцима зависио је и од почетних концентрација *Alternaria* токсина.

Сва истраживања проведена у изради ове докторске дисертације указују да се третман пшеничног брашна хладном атмосферском плазмом може користити за модификацију технолошког квалитета, али и унапређење безбедности пшеничног брашна те је потребно наставити истраживања у овим правцима.

Датум прихватања теме од 31.01.2019.
стране Сената:

ДП

Датум одбране:

ДО

Чланови комисије:

КО

Председник: Др Александар Фиштеш, редовни професор, Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду

Ментор: Др Драгана Шороња-Симовић, ванредни професор, Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду

Члан: Др Елизабет Јанић Хајнал, научни сарадник, Научни институт за прехранбене технологије у Новом Саду, Универзитет у Новом Саду

Члан: Др Сунчица Коцић-Танацков, доцент, Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду

Члан: Др Никола Шкоро, виши научни сарадник; Институт за физику, Универзитет у Београду

KEY WORD DOCUMENTATION

FACULTY OF TECHNOLOGY NOVI SAD, UNIVERSITY OF NOVI SAD

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type: Monograph documentation

DT

Type of record: Textual printed material

TR

Contents code: PhD thesis

CC

Author: Milan Vukić

AU

Mentor: PhD Dragana Šoronja-Simović, associate professor

MN

Title: Effects of cold atmospheric plasma on the technological quality and safety of wheat flour

TI

Language of text: Serbian

LT

Language of abstract: English

LA

Country of publication: Serbia

CP

Locality of publication: Vojvodina

LP

Publication year: 2020

PY

Publisher: Author's reprint

PU

Publication place: Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia

PP

Physical description: 6 chapters / 164 pages / 25 tables / 48 figures / 373 references

PD

Scientific field: Technological engineering

SF

Scientific discipline: Food engineering

SD

Subject, Key words: Cold atmospheric plasma, Solvent retention capacity, *Alternaria* toxins, Quality and safety of wheat flour

SKW

UC

Holding data: Library of Faculty of Technology Novi Sad

HD Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia

Note: None

N

Abstract:

AB

The main aim of this doctoral dissertation was to examine the impact of cold atmospheric plasma treatment on the quality and safety of wheat flour.

The first phase of research conducted in this doctoral dissertation was aimed at comparing the SRC method with empirical rheological methods on samples of wheat flour mill streams. The method showed good power to describe very different properties of wheat flour mill streams. By comparing the parameters of the Solvent Retention Capacity method (SRC) with empirical rheological parameters, the division of SRC parameters into two groups is noticed. The first group of SRC, lactic acid and glutenin performance index (SRCLa and GPI) is sensitive to the dough strengths, and the second group, SRC of sodium carbonate, sucrose and water (SRCSO, SRCSu and SRCw) is sensitive

to flour hydration potential. Through multivariate analysis, the relationships between the parameters of the SRC method and the rheological parameters were determined. Based on the experimental data of the SRC parameters, models were developed with partial least squares regression (PLSR) to predict the most important rheological parameters. PLSR models with high values of coefficient of determination, $R^2 = 0.93$ for farinographic water absorption (FWA) and $R^2 = 0.92$ for energy and model with multiple responses $R^2 = 0.89$ were developed.

In the second phase of the research, the influence of different conditions of cold atmospheric plasma treatment (time, distance, degree of cover utilization) on flour quality indicators determined by the SRC method, as well as the content of free sulfhydryl groups, wet gluten, gluten index, rheological properties and ultraviolet and infrared spectra were analyzed. The electrical characterization of the plasma source indicates that the electrodes are homogeneously covered with plasma at the RMS voltage of 2400 V and current of 0.1 A. Optical emission spectroscopy shows the most intense emission lines are in the N_2 second positive system band, as expected for the atmospheric air plasma. Relatively lower intensities of peaks associated with atomic oxygen (triplet at 777 nm) are due to the involvement of O in the creation of O_3 , and quenching by N_2 and O_2 molecules. All observed parameters changed with the conditions of cold atmospheric plasma treatment. The prolonged treatment time of wheat flour leads to an increase in the modulus of elasticity G' , SRC_{Su} and SRC_w parameter. The values of the wet gluten (WG) and gluten index (GI) parameters vary in a narrow interval and the content of free sulfhydryl groups and SRCL and GPI parameters show a decreasing trend. As the SRC method showed a good ability to monitor changes in flour caused by atmospheric cold plasma treatment. Based on the parameters of the SRC method, with the application of the response surface methodology, the procedure of modeling and optimization of the treatment was performed. Developed models of all SRC parameters indicated significant treatment conditions and were characterized by high values of R^2 SRCL (0.92), SRC_{Su} (0.84), SRC_{So} (0.75), SRC_w (0.91) and GPI (0, 92) respectively. Analysis of secondary structures indicated that the treatment leads to an increase in the proportion of α -helix secondary structure and to a decrease in the proportion of β -plane as well as β -turn + β -sheet.

In the third phase, the influence of two directions of optimization of cold atmospheric plasma treatment on the quality indicators of three groups of products (wheat bread, whole grain bread and bread with bran) was observed. The aim of the first optimization was to minimize SRCL and maximize SRC_{Su} parameters and of the second to maximize both SRCL_a and SRC_{Su} parameters. The influence of cold atmospheric plasma treatment, of both directions of optimization, on the quality indicators of all three groups of products, was analyzed through the analysis of volume, physical and sensory properties of bread. Results indicate that the treatment of flour with cold atmospheric plasma leads to changes in all baking properties of wheat flour. Treatments affect texture parameters as well as color parameters. Shorter treatment time had a more favorable effect on the course of colloidal processes during mixing and the volume of finished products. Sensory analysis showed that the substitution of 10% flour with flour treated with Shorter treatment time has a positive effect on the volume, appearance of the crumb, taste and smell of bread. The results indicate that the optimization of flour treatment should be carried out according to the appropriate purpose, quantity as well as the quality of the flour which is substituted by the treated flour.

In the fourth phase, investigations of the impact of cold atmospheric plasma treatment on the safety of flour were conducted. The possibility of reduction of *Alternaria* toxins in the wheat flour matrix and

the influence of treatment conditions (time and distance) were investigated. The examinations were focused on three *Alternaria* toxins: alternariol (AOH), alternariol monomethyl ether (AME), and tentoxin (TEN). The extent of reduction of three *Alternaria* toxins were determined in "spiked" samples of wheat flour depending on the treatment conditions. The modeling of the treatment was performed by applying the response surfaces methodology and the significance of the treatment conditions on the extent of the reduction rate of the *Alternaria* toxins were determined. The optimization was performed by calculating the standard scores and testing of the optimal treatment was performed on naturally contaminated samples of wheat mill products. The results showed that it is possible to achieve a significant degree of reduction of all tested *Alternaria* toxins with relatively short treatment times (180 s) in both "spiked" and naturally contaminated samples. The best results of the reduction of all three *Alternaria* toxins were obtained for treatment with a sample placed at a distance of 6 mm, with a treatment time of 180 s. Under these treatments, a reduction of 60.6%, 73.8% and 54.5%, for AOH, AME and TEN, respectively, was achieved. Results also showed that the extent of the reduction of *Alternaria* toxins in naturally contaminated samples also depended on the initial *Alternaria* toxins concentrations.

All research indicates that the treatment of wheat flour with cold atmospheric plasma can be successfully used to modify the technological quality but also to improve the safety of wheat flour and it is justified to continue further research.

Accepted on Scientific Board on: 31.01.2019.

AS

Defended:

DE

Thesis Defend Board:

DB

President: PhD **Aleksandar Fišteš**, full professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad

Mentor: PhD **Dragana Šoronja-Simović**, associate professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad

Member: PhD **Elizabet Janić Hajnal**, research associate, Institute of Food Technology, Novi Sad, University of Novi Sad

Member: PhD **Sunčica Kocić Tanackov**, assistant professor,, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad

Member: PhD **Nikola Škoro**, senior research associate, Institute of Physics, University of Belgrade

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	3
2.1. Пшенично брашно.....	3
2.1.1. Технолошки квалитет пшеничног брашна.....	5
2.2. Полимери пшеничног брашна	6
2.2.1. Скроб	7
2.2.2. Нескробни полисахариди – прехранбена влакна	8
2.2.3. Протеини	9
2.3. Глутенски протеини.....	10
2.3.1. Глијадини	12
2.3.2. Глутенини.....	14
2.4. Развој глутена	16
2.4.1. Значај слободних сулфхидрилних група у развоју глутена	17
2.4.2. Вискоеластична својства глутена	19
2.5. Испитивање технолошког квалитета брашна	23
2.5.1. Процена реолошких својстава теста	24
2.5.1.1. Емпиријска реолошка мерења.....	25
2.5.1.2. Фундаментална реолошка мерења.....	26
2.5.2. Испитивање ретенционе способности брашна - SRC метода	28
2.5.3. Процена пецивних својства брашна	30
2.6. Побољшивачи технолошког квалитета пшеничног брашна.....	31
2.6.1. Аскорбинска киселина	33
2.6.2. Глукоза оксидаза	33
2.7. Примена хладне атмосферске плазме у прехранбеној технологији	34
2.7.1. Плазма	35
2.7.1.1. Извори хладне плазме на атмосферском притиску	37
2.7.1.2. Површинска и копланарна диелектрична баријерна пражњења.....	38
2.7.2. Утицаји од практичног значаја у плазма пољопривреди.....	39
2.7.2.1. Паковање хране	40
2.7.2.2. Промене морфологије третираних површина.....	40
2.7.2.3. Модификације структуре и особина прехранбених производа	40
2.7.2.4. Модификација структуре и својстава протеина	41
2.7.2.5. Разградња микотоксина	43
2.7.3. Регулаторни и безбедносни аспекти технологије.....	45

2.7.4. Поверење потрошача	45
2.8. Микотоксилошка безбедност пшеничног брашна	46
2.8.1. Микотоскини рода <i>Alternaria</i>	48
2.8.2. Технике редукције <i>Alternaria</i> токсина у процесима прераде пшенице	49
3. ЦИЉ РАДА.....	52
4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ.....	53
4.1. Материјали	53
4.2. Конструкција извора хладне атмосферске плазме	55
4.3. Методе.....	58
4.3.1. Основне хемијске анализе брашна	58
4.3.2. Одређивање садржаја слободних сулфхидрилних група	58
4.3.3. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом	58
4.3.4. Ултразубичаста спектроскопија	59
4.3.5. Садржај влажног глутена и глутен индекс	59
4.3.6. Испитивање реолошких својстава теста	59
4.3.6.1. Емпиријске реолошке методе.....	59
4.3.6.2. Фундаменталне реолошке методе.....	60
4.3.7. Метода способности задржавања раствора.....	60
4.3.8. Лабораторијско пробно печење	61
4.3.9. Одређивање квалитета хлеба.....	61
4.3.9.1. Одређивање запремине хлеба.....	62
4.3.9.2. Одређивање текстуре средине хлеба	62
4.3.9.3. Одређивање боје хлеба	62
4.3.9.4. Одређивање сензорских својстава хлеба.....	62
4.3.10. Карактеризација извора хладне атмосферске плазме	63
4.3.10.1. Оптичка емисиона спектроскопија.....	63
4.3.10.2. Електрична карактеризација извора хладне атмосферске плазме	63
4.3.11. Одређивање концентрација <i>Alternaria</i> токсина	63
4.3.11.1. Припрема узорка	63
4.3.11.2. Проширење и валидација LC-MS/MS методе.....	63
4.3.11.3. Валидација методе.....	65
4.3.11.4. Одређивање <i>Alternaria</i> токсина.....	67
4.3.12. Статистичка обрада добијених експерименталних података.....	68
5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	72
5.1. Корелација параметра SRC методе и емпиријских реолошких метода	72
5.1.1. Моделовање реолошких параметара на основу параметара SRC методе	80
5.2. Испитивање утицаја хладне атмосферске плазме на пшенично брашно.....	84
5.2.1. Карактеризација извора хладне плазме.....	84

5.2.2. Утицај третмана плазмом на пшенично брашно	87
5.2.3. Утицај третмана на конформацијске промене протеина – FTIR анализа	92
5.2.4. Ултразубичаста спектроскопија	98
5.2.5. Оптимизација третмана плазмом на основу SRC методе.....	99
5.3. Утицај оптималних третмана на пецивна својства пшеничног брашна	108
5.3.1. Физички параметри квалитета хлеба	108
5.3.2. Сензорски квалитет хлеба.....	117
5.4. Испитивање могућности примене третмана хладном атмосферском плазмом на редукцију <i>Alternaria</i> токсина у пшеничном брашну	122
5.4.1. Моделовање утицаја третмана на редукцију <i>Alternaria</i> токсина.....	127
5.4.2. Евалуација стандардне оцене третмана	132
5.4.2.1. Експериментална верификација математичког модела	133
5.4.3. Испитивање оптималног третмана на природно контаминираним узорцима....	133
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	137
Литература	141

1. УВОД

Квалитет пшеничног брашна у великој мери одређују условима спољне средине али генетски фактори пшенице. Међутим, актуелна су и истраживања везана за примену нових третмана који имају утицај на побољшање квалитета и безбедности брашна. Испитивање нових поступака који оксидативним ефектом побољшавају својства теста и квалитет готових производа у фокусу су научне јавности. Такође, у последње време све интензивније се истражују могућности употребе нових третмана на редукацију микотоксина у циљу унапређење безбедности хране.

Релативно скоро, нетермичка атмосферска плазма, односно хладна атмосферска плазма је уврштена у постојећу листу нетермичких метода третирања хране (Vleugels и остали, 2005; Lee и остали, 2006; Critzer и остали, 2007; Niemira i Sites 2008; Selcuk и остали, 2008).

Истраживања која се баве проучавањем утицаја хладне атмосферске плазме на технолошка својства брашна као и на безбедност брашна су посебно ретка. Пшенично брашно је са једне стране врло погодно за примену третмана хладне атмосферске плазме с обзиром да третман вероватно може пружити могућност модификације технолошких особина пшеничног брашна. С друге стране, пшенично брашно се због заступљености у изради читавог низа производа, може се посматрати као сировина високог ризика због контаминације пшенице различитим микотоксинима. Досадашња испитивања деловања хладне атмосферске плазме на побољшање безбедности хране су углавном била усмерена на антибактеријско дејство третмана, док су се испитивања ефеката плазме на разградњу микотоксина и квалитет производа оскудна. Да би се потпуно сагледао утицај третмана и одредиле могућности примене хладне атмосферске плазме, неопходно је спровести идентификацију реактивних врста плазме и одређивање могућег утицаја на својства брашна. С обзиром да особине брашна значајно утичу на својства теста, као и на квалитет готовог производа, разумевања утицаја третмана хладном атмосферском плазмом на брашно посебно истиче потребу за одабиром поуздане методе, која би коришћењем малих количина узорка могла идентификовати промене до којих доводи третман хладном атмосферском плазмом. Један од новијих приступа испитивања својстава брашна је полимерни приступ. У средишту овог приступа је посматрање полимерних компоненти пшеничног брашна, насупрот устаљеним реолошким или биохемијским приступима. Испитивања способности

задржавања раствора (енгл. Solvent Retention Capacity, SRC) се заснива на одређивању способности бубрења полимера брашна у растворима који су специфични према одговарајућим полимерима брашна. Сваки полимер брашна је повезан са одговарајућим дијагностичким раствором; SRC натријум карбоната (SRCSo) са оштећеним скробом; SRC сахарозе (SRCsu) са арабоксиланима; SRC млечне киселине (SRCLa) са својствима глутена, односно, глутенина, док се SRC воде (SRCw) користи као показатељ укупне способности задржавања воде свих полимерних састојака. SRC методом се брзо и ефикасно могу добити подаци о квалитативним својствима полимера, као и ефекти одређених третмана на својстава брашна и тиме предвидети понашања теста и квалитета готових производа.

Према свему наведеном, постоји оправдана потреба за спровођење истраживања у циљу идентификације утицаја хладне атмосферске плазме на особине пшеничног брашна. С друге стране, исте или сличне третмане треба размотрити у циљу редукције микотоксина присутних у пшеничном брашну као начин да се унапреди безбедност свих производа од пшеничног брашна. Сагледавање веза између утицаја хладне атмосферске плазме на брашно и редукције микотоксина представљало би добру основу за дефинисање могућности и услова третмана хладном атмосферском плазмом при производњи пшеничног брашна и пекарских производа, а у циљу креирања квалитетних и безбедних производа.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Пшенично брашно

Данас се пшеница сматра примарном житарицом за производњу хлеба и других производа од брашна због својих врхунских пецивних својстава у односу на друге житарице, као што су јечам и раж (Dewettinck и остали, 2008). Пшенично брашно се добија сложеним технолошким поступком млевења пшенице, које у низу операција треба истовремено да омогући одговарајући степен уситњавања, али и раздвајања основних анатомских делова пшеничног зрна, односно издвајање честица ендосперма из зрна у што чистијем облику (Fišteš, 2009). Због наведеног захтева, основни концепт млинарства је заснован на вишефазном постепеном уситњавању и просијавању млива као неизменичних поступка. Млевење пшенице обухвата припрему зрнасте масе у циљу истицања разлика структурно-механичких особина анатомских делова зрна и постепено уситњавање на одређеном броју пролазишта при оптималним процесним параметрима. Овакав селективни карактер је неопходан да би се при уситњавању ендосперма спречило истовремено уситњавање омотача, алеуронског слоја и клице (Tanović, 1980; Tanović, 1986). Стандардни технолошки поступак добијања брашна заснива се на неизменичном уситњавању на млинским ваљцима и просејавању млива на планском сити, на већем броју пролазишта (пасажа) млевења.

Пасаже млевења, представљају комбинацију од најмање једног пара ваљака и једног одељења планског сита. Пасажа или пролазиште млевења може бити сачињено и од више пари ваљака и више одељена планског сита, али само под условом да обрађују једнородан материјал. Селективним приступом уситњавању и раздвајању млива у процесу млевења, а с обзиром на хемијски састав анатомских делова пшеничног зрна, финални, међупроизводи и споредни производи млевења са одликују различитим уделом хемијских састојака. Хемијских састав по пасажним брашнима користи се као основа за погонску контролу технолошког поступка млевења пшенице (Fišteš, 2009). Као квалитативни показатељ ефикасности уситњавања највише се користи вредност саджаја пепела у пасажним брашнима. Поред садржаја пепела пасажна брашна се међусобно разликују и количини, саставу или својствима и других структурних компоненти: протеина (Nelson и McDonald, 1977), пентозана (Ciacco и D'Appolonia,

1982), масти и маснокиселинском саставу (Prabhasankar и Haridas Rao, 1999; Prabhasankar и остали, 2000a; Prabhasankar и остали, 2000b) и типу ензимске активности (Rani и остали, 2001).

Са аспекта производње пшеничног брашна, најзначајнији анатомски део пшеничног зрна је ендосперм. Ендосперм се састоји од два дела: спољашњег-алеуронског и унутрашњег, језгра ендосперма. Одговарајуће раздвајање анатомских делова уз уситнавање у поступку млевења пшенице се постиже крупљењем, раздвајањем чистог ендосперма и честица ендосперма са приљубљеним деловима омотача (окојци) на чистилицама гриза те спровођењем фазе млевења гриза и осевака у две етапе, растварање гриза и млевење гриза и осевака.

Процес крупљена обухвата обично четири до пет пасажа крупљења (Мерко 1985). Основни циљ фазе крупљења је добијање 65-70% честица ендосперма у облику гриза и осевака одговарајуће крупноће ради ефикаснијег даљег просејавања на планским ситима и даљег чишћења на чистилицама гриза. Прва три пролазишта крупљења су најбитнија јер она одређују квалитет и принос пасажних брашна која ће се добити при уситнавања гриза и осевака, а задатак задњих пролазишта из фазе крупљења је да обезбеде што веће укланање заосталих честица ендосперма од мекињастог материјала (Мерко 1979).

Након крупљења и одговарајућег просејавања, мливо се разврстава на крупни и ситни прелаз крупљевине; крупни средњи и ситни гриз; осевке и брашно. Крупљевина се води на одговарајућа пролазишта крупљења, а гриз се усмерава на обогаћивање на чистилицама гриза а потом уситњава. Осевци се најпре усмеравају на сита за разврставање, а потом на пролазишта млевења осевака, док се брашно као жељени производ се издваја и процеса (Тановић, 1986). Чист гриз се према крупноћи усмерава на одговарајуће пролазиште у фази млевења гриза и осевака. Основни циљ фазе растварања гриза је редукција крупноће гриза уз остваривање релативно мањег приноса брашна без уситнавања спољашних слојева зрна. Млевење средњег и ситног гриза и осевака представља завршну фазу технолошког поступка млевења пшенице са циљом да се оствари што већи принос брашна одговарајућег квалитета. У савременом млинарству, пролазишта млевења окојака су у циљу рационализације поступка млевења пшенице напуштена. У сваком млинском погону а ради праћења поступка млевења, успостављају се техничке могућности за прецизно извођење поступка прикупљања пасажних брашна. Наведене могућности су од непроцењивог значаја за многа питања која се намећу у млинарској производњи. У погледу технике вршења пасажне анализе истиче се захтев да се прикупљање узорака изведе у најкраћем временском периоду чиме би се осигурао узорак из стабилне и непромењене мељаве. Подаци који се могу добити из пасажне анализе пружају увид и могућу расподелу пасажних брашна у типизирана брашна или израду наменских брашна (Sakhare и Inamda, 2014).

У зависности од квалитета пшенице и начина млевења, односно процента измељавања, могу се добити брашна различитог хемијског састава и квалитета (типска и наменска). Просечан хемијски састав пшеничног брашна чини: скроб 70-75%, протеина 8-16%, несварљивих полисахарида или прехранбених влакана 2-3%, липида 2% и пепела 0,5-1% са уделом воде 12-14% (Goesaert и остали, 2005). Поред наведених састојака, брашно садржи и друге компоненте као што су витамини (В1, В2, Е, провитамин А, никотинску киселину) и ензиме (протеазе, липазе, оксидазе и друге) (Petronijević, 2000). Према Правилнику о квалитету жита, млинских и пекарских производа и тестенина (Службени гласник, 2018) у односу на проценат измељавања разликујемо екстра бело брашно Т-400 и бело Т-500, полубело брашно Т-700 и Т-850, црно брашно Т-1100 и интегрално (грахам) брашно. Бело брашно се добија из централних делова зрна (ендосперма), а зависно од гранулације разликујемо глатко и оштро. Брашна са већим уделом пепела имају већи типизацијски број и тамнију боју. Из средишњег дела зрна, ендосперма, добија се бело брашно а према крупноћи честица дели се на глатко и оштро брашно. Интегрално брашно се добија из целог зрна, садржи све делове зрна и нутритивно је најквалитетније. Поред типских постоје и наменска пшенична брашна, која су због својих специфичних карактеристика најповољнија за израду одређених врста производа.

2.1.1. Технолошки квалитет пшеничног брашна

Квалитет пшеничног брашна има пресудан утицај на својства теста и на квалитет готовог пекарског производа. Скуп показатеља квалитета брашна који дефинишу његову намену представљају технолошки квалитет брашна (Ђакović, 1980). Најзначајнији параметри који одређују технолошки квалитет пшеничног брашна су: количина протеина (пре свега глутена), физичка својства глутена, способност брашна да образује шећере, боја брашна, расподела величина честица брашна, садржај пепела и степен киселости. У зависности од наведених параметра пшенично брашно се може употребити за производњу квалитеног хлеба, пецива, тестенине или финих пекарских производа.

Физичке особине теста су одређене технолошким квалитетом брашна. Једна од најбитнијих карактеристика брашна је „снага“ брашна. Према снази, брашна се деле на јака и слаба брашна. Јака брашна одликује већа моћ упијања воде а формирано тесто има пожељну растегљивост и еластичност те се од таквих теста могу израђивати пекарски производи велике запремине са фином структуром средине (Лукић, 2018). Са друге стране слабим брашном се сматра брашно мале моћи упијања воде. Тесто од слабог брашна већ у току мешања, а нарочито током ферментације погоршава своје физичке особине, постаје меко, нееластично и лепљиво (Auernman, 1979). Поменути својства утичу на лошији квалитет пекарских производа те су производи збијени и

неодговарајуће структуре средине. Генерално, јачина брашна највише зависи од количине и квалитета протеина, односно глутена. Зависно од физичких својстава постоје четири основна типа глутена: растегљив-еластичан, растегљив-нееластичан, нерастегљив-еластичан и нерастегљив-нееластичан. У пракси, нерастегљив глутен се назива „кратак“ а растегљив “дуг“ Међутим, поред протеина на снагу брашна могу утицати и количина и особине скроба, степен оштећености скробних гранула, пентозани, прости и сложени липиди као и ензими.

Последњих година се већа важност придаје липидима пшеничног брашна, којих у пшеничном зрну има око 2% (Goesaert и остали, 2005). Скробни липиди имају способност образовања комплекса између спиралних молекула амилозе и липида. Највећу способност грађења поменутих комплекса имају засићени моноглицериди, знатно мању диглицерида и незнатну триглицериди. Захваљујући образовању комплекса амилоза-моноглицериди битно се успорава старење хлеба. Нескробни слободни липиди су распоређени у свим анатомским деловима зрна и по количини су доминантнији са 2/3 до 3/4 тоталних липида. Наведени липиди ступају у хемијске реакције са глутеном (Morrison, 1988). Гликолипиди учествују у хидрофобним и водоничним везама са глутенином, а фосфолипиди хидрофилним са глијадином што учвршћује и јача глутенску структуру. Липиди у брашну имају позитиван утицај на формирање теста, његову обрадивост, стабилност гасних ћелија и запремину хлеба. Тачније, позитиван утицај на запремину имају гликолипиди, односно, слободни поларни липиди док слободне масне киселине у неполарним липидима имају негативан утицај (MacRitchie, 1983; Graybosch и остали, 1993; Pareyt и остали, 2011).

Оцена о технолошком квалитету брашна доноси се на основу комплексне анализе свих хемијских параметара квалитета, као и физичких и пецивних својстава брашна. Међутим, чињеница је да се са технолошког становишта од свих конситуената брашна највише пажње посвећује испитивању полимера брашна.

2.2. Полимери пшеничног брашна

Полимери пшеничног брашна, скроб, протеини и нескробни полисахариди, имају важну улогу у формирање и понашању теста у даљим фазама технолошког процеса. Квалитетни пекарски производи добијају се од теста које има добру стабилност, мали степен омекшања и које добро задржава гасове настале током ферментације. Од садржаја и структуре полимера зависе и њихова физичка својства, пре свега способност везивања воде, а самим тим и ток развоја пшеничног теста током замеса. На основу наведеног евидентно је да полимери брашна битно одређују и реолошка и пецивна својства брашна, што их често доводи у фокус фундаменталних, али и технолошких научних истраживања. На основу добијених сазнања о утицају полимера на

технолошки квалитет брашна са сигурношће се може предвидети понашање теста током замеса, ферментације, обраде и печења, а самим тим и квалитет производа.

2.2.1. Скроб

Скроб је најраспрострањенији полисахарид који у биљкама служи за складиштење енергије (Parker и Ring, 2001). У пшеничном зрну, односно његовом ендосперму, скроб је са 70-75% квантитативно најприсутнија компонента (Lineback и Rasper, 1988; Goesaert и остали, 2005). Скробна зрна су изграђена од полимера амилозе и амилопектина, који се разликују по структури иако су оба изграђена од молекула α -D-глукозе повезаних гликозидном везом. Амилоза је условно линеарне структуре, са свега неколико бочних грана (Blazek, 2008), молекулске масе од 10^5 - 10^6 , док се степен полимеризације креће од 100-10.000 остатака глукозе повезаних α -1 \rightarrow 4 везама (Lineback и Rasper, 1988). Амилопектин је полимер разгранате структуре коју чини један главни и бројни бочни ланци. У главном ланцу су молекули α -D-глукозе повезани α -1 \rightarrow 4 везама, а на сваких 20-25 глукосидних остатака повезивањем две глукозе α -1 \rightarrow 6 везом појављује се бочни ланац. Међу природним полимерима, амилопектин представља један од највећих полимера молекулске масе веће од 10^7 - 10^9 , степена полимеризације до 2 милиона. Однос амилозе и амилопектина у пшеничном скробу је 25-28%, односно 72-75% (Van Der Borght и остали, 2005).

У пшеници, скроб је присутан у облику интрацелуларних гранула, различите величине. За разлику од већине биљних скрובהа, пшенични скроб показује бимодалну расподелу величина гранула. Према средњем пречнику, разликују се две величине скробних зрна: крупне грануле средњег пречника око 20 μ m и ситне грануле средњег пречника око 5 μ m.

Управо величина и расподела величина гранула су од изузетног значаја за вишеструку и још увек потпуно неразјашњену улогу скроба у свим фазама производње пекарских производа. Што су скробна зрна мања, већа је њихова специфична површина за везивања воде током замеса. На конзистенцију пшеничног теста такође утиче и присуство оштећених скробних гранула у брашну. Удео оштећених скробних гранула зависи од неповољних услова при млевењу. До механичког оштећења скробних гранула долази током уситњавања, услед дејства сила деформације у млевном простору, а карактеристике сорте пшенице, пре свега тврдоћа ендосперма, утиче на степен оштећености (Van Der Borght и остали, 2005). Повећан удео оштећених гранула повећава апсорпцију воде и подложнији је разградњи под дејством α -амилаза (Stauffer, 1999a). У пшеничном тесту, скроб са хидратисаним глутеном формира макромолекулску мрежу у којој има улогу пуниоца. Синергистички ефекат скроба и глутена доприноси вискоеластичним реолошким својствима теста. Релативни доприноси појединачних полимерних компоненти и њихових међусобних интеракција нису у потпуности утврђени (Song и Zheng, 2007). Захваљујући желатинизацији скроб

учествује у формирању флексибилне и еластичне структуре средине хлеба. Ћелијски зидови средине хлеба, на микроскопском нивоу, нису хомогени већ представљају двокомпонентни систем, састављен од делимично набубрелих гранула скроба, међусобно повезаних комплексном смешом агрегираних молекула и гаса унутар ћелијских зидова (Scanlon и Zghal, 2001). Промене које се дешавају на скробу се доводе у везу и са процесом старења хлеба. Услед ретроградације скороба, која подразумева повезивање молекула скроба водоничним везама у уређену кристалну структуру долази до очвршћавања структуре хлеба (Karim и остали, 2000).

2.2.2. Нескробни полисахариди – прехранбена влакна

Поред скроба, најзаступљенијег сварљивог полисахарида, у брашну су присутни и нескробни несварљиви полисахариди. Литературни подаци указују да је Hipsley 1953. године за несварљиве полисахариде (целулоза, хемицелулоза, арабиноксилани, β -глюкан, арабиногалактани) увео појам прехранбена влакна и њиме обухватио несварљиве градивне састојке ћелијског зида (Guiga и остали 2016). Прехранбена влакна припадају групи структурних полисахарида који се од амилозе и амилопектина разликују и/или по хемијском саставу мономерног молекула или по природи њиховог повезивања (Henry, 1985). Mares и Stone (1973) су утврдили да се до 75% масе суве материје ћелијског зида ендосперма пшенице састоји од прехранбених влакана, од чега 85% чине арабиноксилани који представљају главну фракцију пентозана. Количина арабинооксилана у пшеници је око 2%, док их у ражи има три пута више. На основу растворљивости у води деле се на растворљиве и нерастворљиве, при чему је у пшеничном брашну однос растворљивих и нерастворљивих арабиноксилана 1:3. Арабиноксилани имају изражена хидратациона својства, везују од 15-25% воде више од своје масе, и граде вискозне растворе. Додатак растворљивих арабиноксилана повећава моћ упијања воде брашна што смањује потребну енергију мешања, повећава отпор на истезање и смањује растегљивост теста. У току фазе ферментације растворљиви арабиноксилани стабилизују ћелије гаса и повећавају способност задржавања гасова у структури теста (Goesaert и остали, 2005). Позитиван утицај растворљивих арабиноксилана на особине теста током ферментације манифестује се већом запремином и побољшаном текстуром хлеба (Gan и остали 1995). Нерастворљиви арабиноксилани везују већу количину воде приликом формирања структуре теста што смањује количину доступне воде за хидратацију глутенских протеина и развој глутена. Поред тога, нерастворљиви арабиноксилани побољшавају коалесценцију ћелија гаса и смањују задржавање гаса, што резултује смањењем запремине хлеба (Courtin и Delcour, 2002). Сматра се да арабиноксилани имају јак утицај на дистрибуцију воде у тесту, успоравају процес ретроградације скроба и старења хлеба (Biliaderis и остали 1995).

2.2.3. Протеини

Прва изолација глутена извршена је пре више од 250 година (Vesicari, 1745). Минимално толико траје и научно истраживање протеина пшеничног брашна. Озборн је 1908. године први класификовао пшеничне протеине на основу функције и растворљивости на: албумине (растворљиви у води), глобулине (растворљиви у раствору соли), глијадине (растворљиви у 70-90% алкохолу) и глутенине (растворљиви у разблаженим киселинама или базама), табела 1. У другој половини прошлог века на основу растворљивости Озборнове групе глутенина у разблаженој сирћетној киселини добијена је и пета група протеина коју чини нерастворљива фракција (Chen и Bushuk, 1970). На основу биолошке улоге протеини пшенице се могу поделити на структурно/метаболичке и складишне/резервне (Shewry, 2003).

Табела 1. Класификација протеина према Озборновој подели (Goesaert и остали, 2005).

Фракција	Растворљивост	Састав	Биолошка улога	Функција
<i>Албумин</i>	Вода	Већином мономери	Метаболички и структурни протеини	Заштита од патогена
<i>Глобулин</i>	Растов соли	Већином мономери	Метаболички и структурни протеини	Резерва хране
<i>Глијадин</i>	Алкохол	Протеини глутена, углавном мономери глијадина и нискомолекуларни полимери глутенина	Проламински резервни протеини	Тесто Вискозитет/Пластичност
<i>Глутенин</i>	Разблажена сирћетна киселина	Протеини глутена (углавном HMW полимери)	Проламински резервни протеини	Тесто Еластичност/Снага теста
<i>Остатак</i>	Неодвојиви део у води или разблаженим пуферима али издвојиви применом Уреа +DTT+SDS, сонификацијом и сл.	Протеини глутена (HMW полимери и полимерни неглутенски протеини - тритицини)	Проламински (глутен) и глобулински (тритицин) резервни протеини	

Према још једном систему класификације проламини се дела на три групе: богати сумпором, сиромашне сумпором и подјединице глутенина велике молекуларне масе (HMW-GS). У проламине богате сумпором убрајају се β - γ -глијадини, у проламине сиромашне сумпором убрајају се ω -глијадини и глутенини ниских молекулских маса (D-LMW-GS) (Shewry и Halford, 2002). Удео мономерних албумина и глобулина у протеинима пшеничног брашна је у интервалу 15-20% (Pence и остали, 1954; Singh и Skerritt, 2001). Молекулска маса (MW), ове две фракције протеина је углавном мања од

25 kDa , мада један дио ових протеина има MW од 60 до 70 kDa (Veraverbeke и Delcour, 2002).

У одређивању квалитета пшеничног брашна, албумини и глобулини су недовољно испитани, али се ипак зна да имају споредну улогу у односу на глијадин и глутенин. Према истраживањима Tomić и остали (2015) албуминска фракција молекулске масе од 15-30 kDa испољава утицај на неке реолошке карактеристике теста, као што су везивање воде, једнооксијални и биоксијални отпор на растезање, као и на протеолитичку активност. Сматра се да албумини и глобулини имају бољи нутритивни карактер од других протеина пшенице, односно, имају бољи аминокиселински састав. Такође, према Romeranz-у, нутритивно, албумини и глобулини имају веома добро избалансиран аминокиселински састав, релативно велики садржај лизина, триптофана и метионина (Romeranz, 1988).

Поред веома заступљене Осборнове поделе пшеничних протеина у научној јавности је присутна и подела протеина на неглутенске и глутенске протеине (Veraverbeke и Delcour, 2002). Будући да глутенски протеини имају далеко значајнији утицај на квалитет пшеничног брашна од албумина и глобулина посветиће им се већа пажња у наредном поглављу.

2.3. Глутенски протеини

Јединствене карактеристике пшеничног брашна се заснивају на својству протеина пшенице да формирају глутен. Глутенски протеини чине 80-85% од укупног садржаја протеина пшенице и главни су резервни протеини пшенице. Локализовани су у ендосперму зрелог пшеничног зрна где формирају матрикс око скробних гранула. Захваљујући вискоеластичним својствима глутена могуће је од пшеничног брашна као основне сировине добити разноврсне пекарске производе: хлеб, пециво, тестенину, нудле, различите врсте кекса и колача (Day и остали, 2006), а са друге стране, пшенични глутен, као производ индустрије скроба, се користи и као додатак у различитим прехранбеним производима (Delcour и остали, 2012).

На основу растворљивости, глутенски протеини се могу поделити на глијадине и глутенине (Wieser, 2007). Њихов однос у пшеничном зрну је варијабилан и условљен је факторима спољне средине и генотипом пшенице (Shewry и остали, 2000; Рећа и остали, 2002; Goesaert и остали, 2005). Због високог садржаја аминокиселина пролина и глутамина у структури глијадина и глутенина често се за глутенске протеине користи и термин проламини.

На слици 1 шематски је представљен приказ слободних протеина глијадина и глутенина као и њихово умрежавање у глутенској мрежи.



Слика 1. Шематски приказ глутенских протеина у слободном облику и умрежених у глутену Weipert (2006).

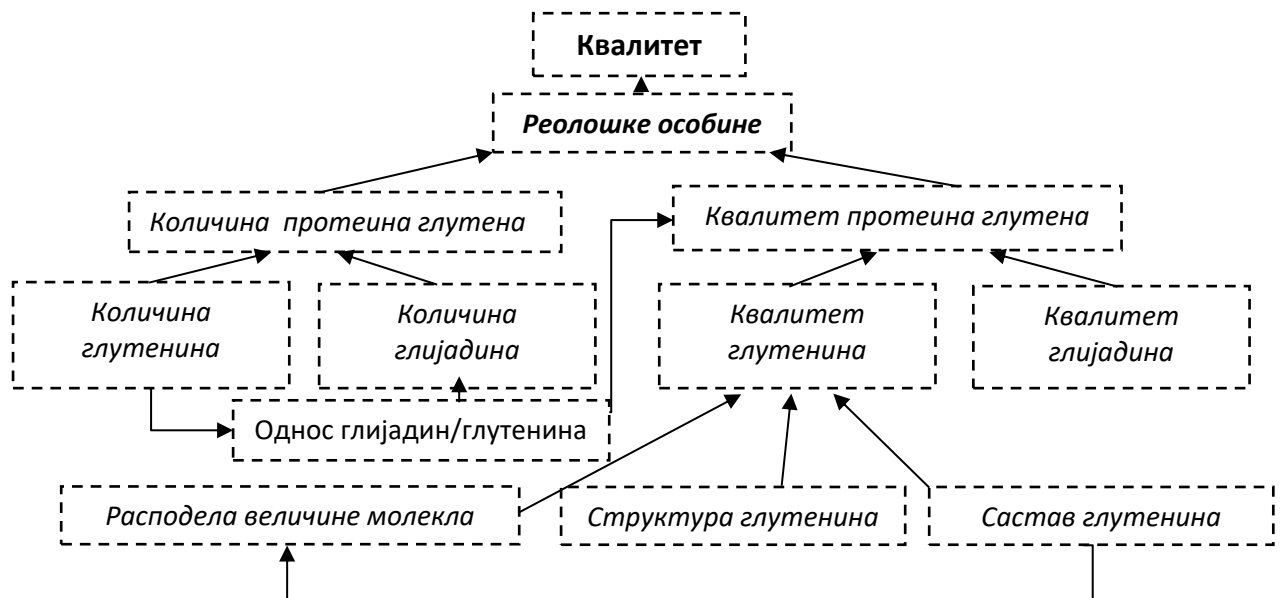
Глутен се састоји од 80-85% протеина и око 5% липида, остатак чине скроб и други угљени хидрати (Wieser, 2007). Стотине протеинских компоненати глутена су у облику мономера или повезаних интер- и интраланчаним дисулфидним везама (оксидована форма цистеина) или олигомера (Wrigley и Vietz, 1988). Удео цистеина у саставу протеина глутена је око 2%, међутим, оксидовани облик цистеина је врло битан за технолошки квалитет као и квалитет финалних пекарских производа (Wieser, 2003). Слаба растворљивост глутена у води се најчешће доводи у везу са ниским садржајем, мање од 10% укупног броја аминокиселинских остатака лизина, аргинина, глутаминске и аспарагинске киселине, (табела 2). Хидрофобни аминокиселински остаци у глутену (око 30%) хидрофобним интеракцијама у значајној мери омогућавају формирање протеинских агрегата, као и везивање липида и других неполарних супстанци.

Табела 2. Класификација и особине протеина пшеничног глутена (D'Ovidio и Masci, 2004).

Група	Структура	Удео	Молекулска маса	Аминокиселински састав (mol %)
<i>НМВ</i> подјединице <i>глутенина</i>	Полимери	6-10	65-90 kDa	30-35 Gln
				10-16 Pro
				15-20 Gly
				0,5-1,5 Cys
				0.7-1,4 Lys
<i>ЛМВ</i> подјединице <i>глутенина</i>	Полимери	70-80	30-45 kDa	30-40 Gln
				15-20 Pro
				2-3 Cys
				<1 Lys
<i>α</i> -Глијадини	Мономери	70-80	30-45 kDa	30-40 Gln
<i>β</i> - Глијадини	Мономери			15-20 Pro
<i>γ</i> - Глијадини	Мономери			2-3 Cys
<i>ω</i> -Глијадини	Мономери	10-20	40-75 kDa	<1 Lys
				40-50 Gln
				20-30 Pro
				0 Cys
				0-0,5 Lys

Када се у брашно дода вода долази до следећих интензивних процеса: упијање воде, хидратација и размицање полипептидних ланаца. Последица ових процеса је бубрење макромолекулских агрегата протеина и појава пластично–еластичних особина, које протеини не поседују у нехидратисаном стању. Агрегати протеинских

макромолекула, из одвојених честица брашна се приликом замеса доводе у контакт и међусобно умрежавају. Набурили конгломерат пшеничних протеина који се назива глутен својим посебним физичко–колоидним особинама одређује реолошке особине, и квалитет готових производа, односно технолошки квалитет брашна. Од особина формираног глутена зависи понашање теста приликом обраде, кохезивност и стабилност теста, способност задржавања гасова насталих током ферментације, а што битно утиче на запремину, порозност и друге сензорске особине хлеба (Gap и остали, 1995). Један од првих радова у којем се указује на зависност количине протеина и запремине векне објавио је Finney (1948). У каснијем раду исти аутор истиче да осим количине и квалитет (састав) протеина има врло значајан утицај на квалитет пекарских производа (Finney, 1984). Зависност реолошких особина теста и способност задржавања гаса у зависности од количине и квалитета глутенских протеина шематски је приказао Veraverbeke и Delcour (2002), слика 2.



Слика 2. Фактори који утичу на реологију теста (Veraverbeke и Delcour, 2002).

Пожељни оптимални квантитативни однос између вискозних глијадина и растегљивих глутенина је оно што чини добар текстурални квалитет квасних и бесквасних пекарских производа. Повезивање својстава глијадина и глутенина са пецивним квалитетом пшенице је од основне важности (Shomer и остали, 1998).

2.3.1. Глијадини

У саставу протеина пшеничног брашна глијадини чине 30-40%. Глијадини су хетерогена смеша мономерних протеина који се састоје из једног полипептидног ланца, а чија је молекулска маса у границама 30-80 kDa. Између ланаца глијадинских појединица долази до стварања унутрашњих веза преко цистеинских дисулфидних мостова и формирања глобуларне структуре глијадина (Shewry, 2003). Глијадини се

међусобно повезују водоничним везама и хидрофобним интеракцијама (Veraverbeke и Delcour 2002). Класификација глијаина у четири групе α , β , γ и ω изведена је се на основу електрофоретској покретљивости при ниској вредности рН у киселом полиакриламидном гелу (Shewry, 1986). Weiser (2007) је извршио још једну поделу глијаина на четири различите групе $\omega 5$ -, $\omega 1,2$ -, α/β - и γ - глијаине. Основ поменуте поделе је аминокиселински састав и молекулска маса. Удео глутамин и пролина у α/β и γ -глијаинима је нижи у односу на ω -глијаине. Са друге стране у својој структури α/β -глијаини имају шест, а γ -глијаини осам остатака цистеина, који формирају три, односно четири дисулфидне везе, док ω -глијаини не поседују цистеински остатак и немају способност грађења ковалентних веза (MacRitchie, 1987; Wieser, 2007). Са друге стране, не постоје слободни цистеински остаци, све S-S везе су интрамолекуларне. Па се глијаинске подјединице међусобно умрежавају или повезују са глутенинима посредством хидрофобних интеракција и водоничних веза (Veraverbeke и Delcour, 2002). Bernardin и Kasarda (1973) наводе да су α/β - и γ -глијаина подјединице мање (30-45 kDa), а ω -глијаини веће молекулске масе (46-74 kDa). Иако истраживања о ефектима глијаина на квалитета теста нису бројна, познато је да хидратисани глијаини имају мању еластичност и мању кохезивност од глутенина (Paune и остали, 1987). Schropp и Wieser (1996) су утврдили да се додатком глијаинске фракције пшеничном брашну битно смањује екстензографски максималан отпор, а повећава растељивост теста, што је и очекивано имајући у виду њихову вискозну природу.

Када је у питању квалитете хлеба поједина истраживања указују да глијаини генерално утичу на запремину хлеба (Hoseney и остали, 1969; Weegels и остали, 1994). Међутим, улога глијаинских подјединица у технолошком квалитету брашна још увек није потпуно разјашњена (Fido и остали, 1997). Uthayakumaran и остали (2001) су установили да γ -глијаини смањују време мешања теста и максимални отпор при растезању, а ω -глијаини највише утичу на смањење запремине векне. Утицај глијаина на запремину хлеба је у корелацији са молекулском масом, док су утицај на време мешања, максимални отпор на растезање и растељивост у корелацији са њиховом хидрофобношћу. Gil-Humanes и остали (2012) су утврдили да је садржај γ -глијаина у позитивној корелацији са развојем теста што повећава снагу теста, али и да γ -глијаини нису најзначајнији показатељи квалитета теста јер се њихов утицај мења са саставом осталих глијаина. Према Torbica (2007), многи истраживачи и данас умањују утицај глијаина зрна на технолошки квалитет, мада се на основу неких резултата такви саставови могу сматрати неоправданим. Новија истраживања Johansson и остали (2013) су указала да велики део глијаина учествује у формирању полимера глутена у оптимуму мешања. Мали проценат α/β - и γ -глијаина ипак учествује у уанкрасном (инермолекуларном) дисулфидном повезивању у матриксу глутена, док сумпором сиромашни ω -глијаини морају бити или заробљени у полимеру или повезани водоничним или другим нековалентним везама. Претпоставља се да глијаини

спречавају формирање водоничних веза између суседних протеинских ланаца и тиме доводе до смањења еластичности, односно, повећања вискозности вискоеластичног пшеничног теста.

2.3.2. Глутенини

Полимерни протеини пшеничног глутена који се растварају у разблаженој сирћетној киселини се називају глутенини (Field и остали, 1983). Познато је да су глутенини највећи полимери откривени у природи (Shewry и Halford, 2002). Молекулска маса полимера глутенина може прећи и 20 милиона, што их поред највећих чини и најсложенијим природним полимерима (Wrigley, 1996; Wieser, 2007). По аминокиселинском саставу глутенини су врло слични глијадинима (Goesaert и остали, 2005). Особине теста су јако зависне од расподеле молекулских маса глутенина и они најзначајније утичу на еластичност теста (MacRitchie, 1992; Wieser, 2007). Протеини глутенина се на основу електрофоретске покретљивости деле на две глутенинске подјединице: глутенини велике молекулске масе 80-130 kDa (HMW-GS) и глутенини мале молекулске масе 30-50 kDa (LMW-GS). Групи А одговара подгрупа HMW-GS, док се групе В, С и D односе на LMW-GS подгрупе (Wrigley, 1996; Gianibelli и остали, 2001; Shewry, 2002; Wang и остали, 2006). До пре 20 година се мало знало о структури глутенинских протеина, али данас се комбиновањем молекуларних и биофизичких изучавања добија детаљнија слика. Упркос релативном малом уделу, до 10% укупних протеина пшеничног брашна, верује се да HMW-GS имају пресудан утицај на квалитет брашна, односно теста (Shewry и остали, 1992). Глутенинске подјединице HMW-GS могу се класификовати на два типа: х-тип (мања електрофоретска покретљивост) и у-тип (већа електрофоретску покретљивост). Протеински ланац HMW-GS подјединица глутенина, састоји се од три различита дела. Централни део се састоји од аминокиселинских секвенци које се понављају, а бочних делови од непонављајућих аминокиселинских секвенци који се завршавају са N- и C-крајевима. Непонављајући N-терминални крај садржи 80-105 аминокиселинских остатака, понављајући централни део 480-700 остатка и C-терминални крај 42 остатка (Shewry и остали, 1992). Аминокиселинске секвенце HMW-GS подјединица глутенина, имају од четири до седам цистеинских остатака на N-крају и C-крају што им омогућава интермолекуларно повезивање.

LMW-GS подјединице чине око једне трећине укупног садржаја протеина зрна, 19-25% глутена и приближно 60% укупних глутенина. Упркос њиховој заступљености, у научним истраживањима им се поклања знатно мање пажње него HMW-GS. Ово је последица углавном проблема који су се јављали при идентификацији LMW-GS протеина на једнодимензионалним SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis) геловима. Преклапање трака LMW-GS и глијадина при електрофорези, већим делом је отклоњено развијањем једноставне двостепене SDS-

PAGE методе. Као и HMW-GS и LMW-GS су међусобно повезани ковалентним дисулфидним везама између ланаца протеина или делова пептидног ланца једног протеина (Veraverbeke и Delcour, 2002). На основу електрофоретске мобилности глутенини се такође додатно класификују у четири подгрупе (A, B, C и D) Групе глутенина B и C чине око 60% LMW-GS протеина са молекулским масама 42-51 kDa, односно 30-40 kDa, док LMW-GS, групе D имају молекулску масу 58 kDa (Janković, 2016).

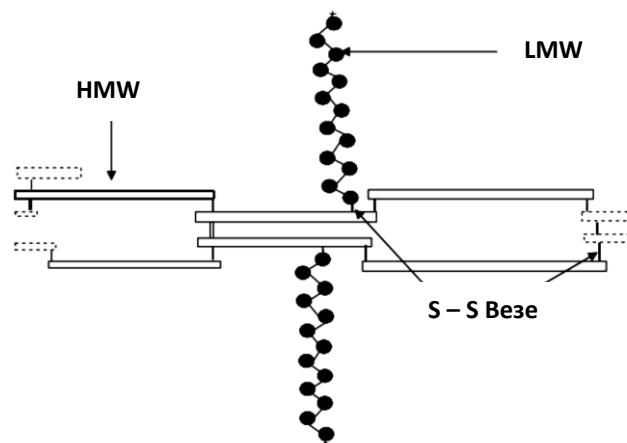
У току протекле деценије унапређења у области микрозамеса и протеинског инжењеринга имала су непроцењив значај у разјашњавању структуре и функционалне повезаности глијадина и глутенина у глутену. Испитивањем утицаја глутенских протеина на особине теста утврђено је да дуголанчани протеини као што су HMW-GS и LMW-GS повећавају снагу и стабилност теста, док полипептиди који садрже један цистеин могу имати супротан ефекат на поменуте параметре квалитета теста, слика 3, (Gianibelli и остали, 2001). Dachkevitch и Autran (1989) су изнели тврђење о високој позитивној корелацији између количине SDS неекстрактибилних протеина и алвеографских параметара: рада деформације, тј. снаге глутена (W - Dough strength) и релативне чврстоће теста (P-Tenacity). Глутенинска протеинска фракција, нарочито HMW-GS и према другим истраживачима има највећи утицај на параметре алвеографа (W и P/L), (Payne, 1987; Shewry и остали, 2000). На слици 3 представљена је класификација протеина глутена.

Протеини глутена						
Фракције	Глијадини				Глутенини	
Подфракција	ω 5-Глијадини	ω 1,2-Глијадини	α/β -Глијадини	γ -Глијадини	LMW-GS	HMW-GS
Удео (%)	3-6	4-7	28-33	23-31	19-25	7-13
Молекулска маса (kDa)	49-55	39-44	29-35	31-35	32-39	67-88
Цистеин (mol%)	-		2.0-3.0		<0.5 -3.0	0.5-1.5
Функција у тесту	Вискозност, растељивост				Еластичност, снага	

Слика 3. Шема класификација протеина глутена према Wieser (2007) и Shewry и Halford (2002).

Истраживања Dachkevitch и Autran (1989), а потом Weegels и осталих (1996) указала су на већу корелацију између садржаја полимерних глутенина и физичких

својстава теста и запремине хлеба. Садржај полимерних протеина у тесту и утицај на поменуте показатеље доводи се у везу са деполимеризацијом и реполимеризацијом глутенина за време замеса и одмарања теста (Weegels и остали, 1996). Међутим, да би се предвидео квалитет пшенице и квалитет брашна није довољно само утврдити присуство и/или одсуство одређених HMW глутенинских субјединица, већ је потребно одредити и апсолутне количине и њихове релативне уделе (MacRitchie и остали, 1991). Такође, LMW глутенини који формирају велике агрегате имају позитиван утицај на јачину теста (Melas и остали, 1994), али је њихов ефекат мањи у поређењу са HMW глутенинима (Wieser и Kieffer, 2001). Резултати истраживања Andrews и Skerritt (1996) су међутим указали да су LMW глутенини једино у високој корелацији са реастегљивошћу теста, док су сва остала својства теста у слабој корелацији са глутенинима мале молекулске масе. Доступна истраживања воде закључку да је специфичан начин дисулфидног умрежавања између LMW и HMW глутенина у глутену важнији фактор за особине пецивости од количине овог протеина (MacRitchie, 1992). На слици 4 шематски је представљено умрежавање LMW и HMW глутенина. Микроскопским истраживањима је утврђено да HMW-GS формирају линеарне ланце и мрежу, а LMW-GS формирају групе.



Слика 4. Шематски приказ дисулфидног повезивања LMW и HMW глутенина (Wieser, 2007).

Током формирања глутена LMW-GS се везују на линеарне HMW-GS ланце и на тај начин попуњавају међупростор између ланаца HMW-GS (Lindsay и Skerrit, 1999). Претпоставка је да се дисулфидне везе између HMW-GS и LMW-GS лакше раскидају него дисулфидне везе појединачних глутенинских подјединица (Ewart, 1990).

2.4. Развој глутена

Пшенично тесто је комплексни систем који садржи конSTITUTE бршна, воду и друге додатне састојке који имају улогу у побољшању технолошког квалитета брашна а тиме и пекарских производа. Са колоидног аспекта тесто је полидисперзни систем у коме су у протеинској фази (глутенски матрикс) дисперговани скроб и друге нерастворљиве компоненте брашна. Током замеса, прве фазе технолошког процеса

производње хлеба, честице брашна интензивно хидратују, развија се глутенска структура и на крају формира вискоеластично хомогено тесто. Током замеса и обраде теста долази до значајних хемијских промена на протеинима брашна, које се манифестују стварањем нових, односно, раскидањем постојећих хемијских веза што неминовно доводи и до промена физичких својстава теста (Pomeranz, 1988). У пшеничном тесту током његовог развоја стварају се јонске, водоничне, хидрофобне и ковалентне везе. Стварању јонских веза доприноси додаток натријум-хлорида, који се раствара у води и јонизује. Настали јони учествују у грађењу јонских веза са супротно наелектисаним активним групама у протеинима. Захваљујући натријум-хлориду долази до конформационих промена и јачања глутена (Pomeranz, 1988). Током формирања теста, због деловања механичке силе, долази до раскидања водоничних веза, али и успостављању нових водоничних веза између полипептидних ланаца који се оријентишу у правцу деловања силе (Belton и остали, 1995; Shewry и остали, 2002). Слободни поларни липиди везују се за глијадин хидрофилним, а за глутенин хидрофобним везама и на тај начин доприносе пластичности, али и еластичности пшеничног теста (Pomeranz, 1988). Несумњиво су за процес формирања глутенске мреже теста најбитније дисулфидне везе.

Осим глутенских протеина у развоју тродимензионалне глутенске структуре важну улогу имају и други полимери брашна. Скробне грануле се уклапају у структуру глутена и формирају агрегате (Rakita, 2017). Слободни поларни гликолипиди се везују хидрофилним везама за глијадин, а хидрофобним везама за глутенинске протеине. Истовремено везивање липида за глијадине и глутенине доприноси формирању комплекса глијадин-гликолипид-глутенин за који се претпоставља да има важну улогу у задржавању гаса током ферментације теста.

2.4.1. Значај слободних сулфидрилних група у развоју глутена

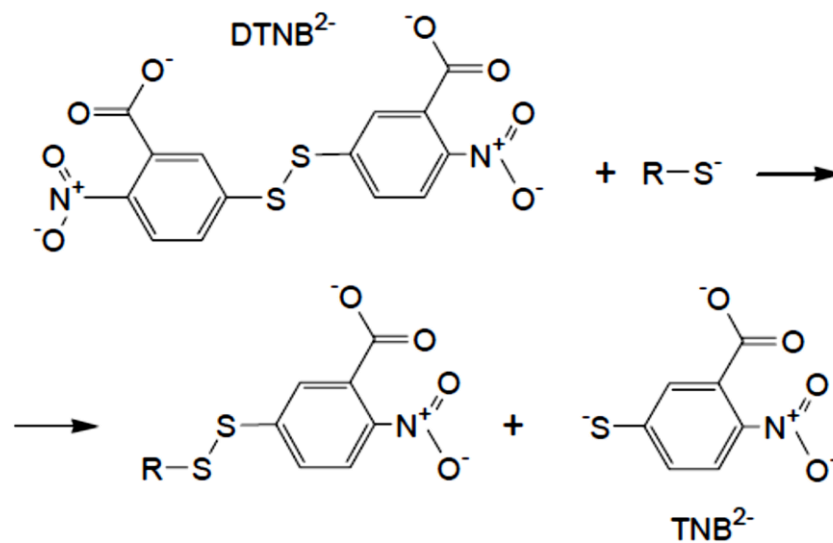
Физичко-хемијске особине пшеничних протеина, односно глутена те технолошке карактеристике теста условљене су дисулфидним унакрсним повезивањем током замеса теста. Аминокиселина која улази у састав глутенских протеина и садржи сумпор назива се цистеин. Атом сумпора цистеина може бити повезан или са атомом водоника (сулфидрилне групе) или са другим атомом сумпора (дисулфидне везе). Присуство слободних сулфидрилних група, односно формирање ковалентних дисулфидних веза током замеса има пресудан утицај на развој глутена и његове реолошке особине (Shewry и Tatham, 1997; Lavelli и остали, 1996). Глутенинске подјединице формирају интра- и интермолекуларне дисулфидне везе, док је за глијадине карактеристично интермолекуларно формирање дисулфидних веза, што је и основни разлог њихове мање молекулске масе (Perez и остали, 2005). Само интра- и интермолекуларне дисулфидне везе глутенина омогућавају асоцијацију глутенинских макрополимера и одређују структуру глутена (Perez и остали, 2005). Број присутних расположивих

сулфхидрилних група, односно број насталих интер- и интрамолекуларних дисулфидних веза условљен је примарном структуром протеина. Највећи значај свакако имају аминокиселине цистеин (CysSh) и цистин (CySSCy) које чине 2,8% од укупне количине албумина и глобулина, 1,3% од количине глутенина и 2,2% од глијадина (Krull и Wall, 1969).

Током замеса теста, цистеински и цистински остаци који чине 2-3% укупних аминокиселинских остатака глутена, подлежу сулфхидрил-дисулфидним реакцијама размене, које резултирају екстензивном полимеризацијом протеина глутена. Од синтезе сулфхидрил-дисулфид реакција размене, развој вискоеластичног теста у великој мери зависи. Ово доказује чињеница да додатком цистеина, као редукционог средства у тесто, значајно опада вискоеластичност. Са друге стране, додатком оксидационих средстава се повећава еластичност теста. Улога сулфхидрил-дисулфид размене у развоју вискоеластичних теста је мало разјашњена, али је генерално прихваћено да дисулфидне везе стабилизују конформацију протеина (Томић, 2015). Сам механизам стабилизације структуре није у потпуности познат (Најта и Schofield, 2004; Булај, 2005). Хемијске промене које се дешавају током замеса и подразумевају раскидање и поновно успостављање дисулфидних веза. Динамичка равнотежа која се успоставља при овим променама резултира или вискозношћу теста, (смањена конзистенција и повећана лепљивост теста) узрокована повећањем садржаја слободних сулфхидрилних група или с друге стране, смањењем садржаја слободних сулфхидрилних група већим степеном умрежености глутена. Мањи садржај сулфхидрилних група у тесту у односу на пшенично брашно указују да се током замеса повећава размена SH/S-S реакција. Међутим, смањење садржаја слободних сулфхидрилних група у пшеничном тесту не мора нужно бити последица стварања нових дисулфидних веза већ може настати и услед деполимеризације глутенина током већих непрезања, односно предугог мешања теста. Gomez и остали (2011) су указали да варијације у садржају сулфхидрилних група код превише дугог замеса могу настати и због ослобађања нискомолекуларних подјединицама глутенина из глутенинског полимера. Описана динамичка равнотежа слободних сулфхидрилних група и дисулфидних веза је врло значајна за снагу теста и управљање особинама теста. Потенцијална могућност да се поменуте реакције квалитативно и квантитативно доведу у везу са пецивним особинама пшеничног брашна привукла је пажњу многих истраживача. Међутим, још увек не постоји јасан и општеприхваћен став о корелацији сулфхидрилног статуса брашна са појединим реолошким особинама парметрима квалитета готових производа (Најта и Schofield, 2004).

Резултати експерименталног одређивања садржаја слободних сулфхидрилних група се не могу посматрати као апсолутне, већ само као релативне вредности јер садржај слободних сулфхидрилних група и дисулфидних веза зависи од спољних али и унутрашњих фактора: природа протеина, присуства или одсуства средства за

денатурацију, температуре, pH вредности, врсте и концентрације коришћеног SH реагенса и времена реакције. Промене у аналитичким условима, односно коришћеним методама или различитој реактивности слободних сулфхидрилних група могу да доведу до неусаглашених резултата за брашна (Hofmann и Ham, 1978). Упркос новијим методама за одређивање садржаја сулфхидрилних група још увек је најзаступљенија метода са Елмановим реагентом (5, 5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) или DTNB. Предности ове методе су висока специфичност реагенса према сулфхидрилним групама; релативно кратко време реакције са сулфхидрилним групама и аналитички лако изводљива (спектрофотометријска метода). На слици 5 приказана је редукција Елмановог реагенса.



Слика 5. Редукција Елмановог реагенса (Sedlak и Lindsay, 1968).

Одређивање се засниава у реакцији Елмановог реагенса и слободних сулфхидрилних група, при чему се ослобађа еквивалент интензивног хромогеног анјона 5-тио-2-нитробензоева киселина (TNB), карактеристичне жуте боје са максимумом апсорпције на 412 nm (Andrews и остали 1995).

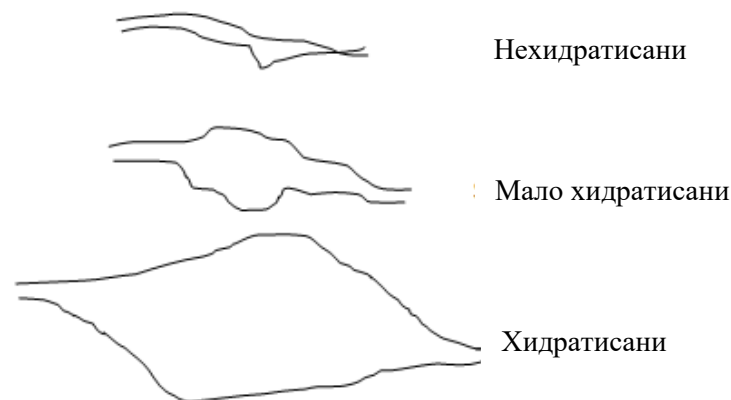
2.4.2. Вискоеластична својства глутена

Утицај макрополимера глутенина на вискоеластична својства глутена је константно у фокусу научне јавности, иако њихова величина, комплексност и мала растворљивост значајно ограничавају детаљнија истраживања. Познато је да сам однос полимерних (глутенина) и мономерних (глутенина) подјединица глутенских протеина, као и однос појединих фракција глијадина и глутенина битно одређује удео еластичног, односно вискозног понашања у вискоеластичним својствима глутена, а самим тим и равнотежу између јачине и еластичности теста.

У пшеничном тесту, високомолекулске подјединице глутенина (HMW) су одговорне за еластичност глутена, због њиховог значаја у формирању полимера

глутенина (Shewry и остали, 1992), док подјединице глутенина LMW утичу на растељивост. Глијадини побољшавају вискозна својства и растељивост пшеничног теста јер имају улогу пластификатора (Wieser, 2007). Скроб као најзаступљенија компонента пшеничног брашна, а уз њега и нескробни полисахариди, испољавају већи утицај на вискозна својства (Freitas и остали, 2003).

Поједини типови мономерних и полимерних глутенских протеина без сумње испољавају утицај на реолошка својства глутена, али се претпоставља да се сви ти утицаји заснивају на модификовању главног ефекта који испољава HMW-GS подјединица (Dobraszczyk и Morgenstern, 2003). Изражен утицај вискомолекулске подјединице глутенина доводи се у везу са његовом карактеристичном конформацијом. Применом инфрацрвене спектофотометрије, на модел системима са HMW-GS подјединицама, уочене су две конформације, односно два типа секундарне структуре β -раван и β -окрет (Belton и остали, 1995). Однос између наведених структура у протеинима зависи од степена хидратације током замеса. Belton (1999, 2005) је покушао да објасни равнотежу између поменутих конформација моделом петље („loop“) и ланца („train“), слика 6 (Belton, 1999; Belton, 2005). Региони са секундарном структуром β -раван називају се петље, а региони у којима доминира β -окрет структура називају се ланац (Belton 1999). Када је степен хидратације низак (<35%) највећи број протеин-протеин интеракција се остварује интерланчаним повезивањем остатака глутамина у β -окрет структури (Belton и остали, 1995; Shewry и остали 2002). Са повећањем степена хидратације настају промене у конформацији и структура β -раван достиже свој максимум. Даљом хидратацијом долази све израженијих промена у секундарној структури што на крају значајно смањује међусобне интеракција у структури β -раван, а подстиче формирање структура β -окрет.



Слика 6. Утицај хидратац ије на конформацију HMW-GS подјединица, модификовано из Belton (2003).

При одређеном садржају воде, постоји равнотежно стање између две описане конформације. Ако се тај однос поремети, тенденција система ће бити да обнови равнотежно стање и минимизује слободну енергију система. Механизам који омогућава еластичност пшеничног теста се сада може објаснити под претпоставком да

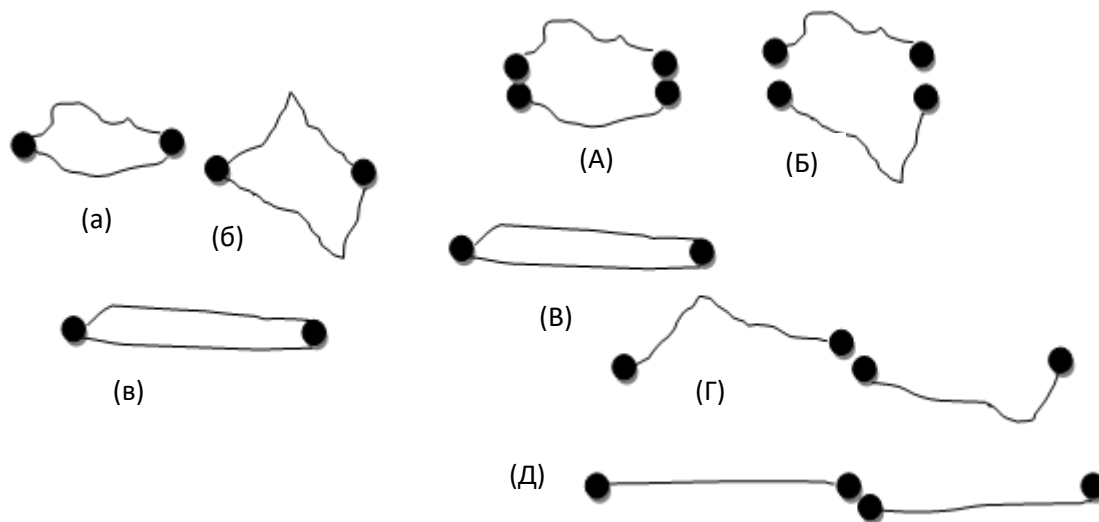
дисулфидни мостови повезују протеине у мрежи. При деловању механичке силе долази до промена у структури β -окрет, као најмобилнијој конформацији. Ако је механичка сила мала, еластична деформација ће бити мала јер су у овој конформацији присутне слабе полимер/полимер интеракције. Ако се интензитет механичке силе повећа, долази до приближавања протеинских ланаца и стварања типа секундарне структуре сличних β -раван. Еластична сила настаје као резултат тежње молекула да остваре равнотежно стање између структура петље и ланца. Ако се деловање механичке силе настави, може да дође до пуцања у структурама ланца и кидања дисулфидних мостова унутар ланца протеина. Како се на описани систем делује силама деформације, систем ће се померати из стања минималне слободне енергије у више енергетско стање. Ако је учесталост деформација, односна промена у конформацији велика, систем ће теже успоставити равнотежно стање и складиштиће све више енергије. У једном тренутку енергија саопштена пшеничном тесту може бити толика да дође до кидања ковалентних веза. Након тога, пшенично тесто ће имати израженије вискозне особине и пружаће минималан отпор при истезању. Описани модел објашњава еластичност глутена као и повећање и смањење отпора теста на растезање током мешања.

Генерално се може закључити да обе глутенске фракције доприносе реолошким својствима теста које омогућавају употребу пшеничног брашна у технологији хлеба, пецива, тестенине и нудли. Међутим, на основу наведених сазнања, јасно је да је улога глијадина и глутенина различита. Захваљујући хидратацији глијадина тесто добија својства вискозности и растегљивости, док еластични и кохезивни глутенини одређују јачину и еластичност теста. Будући да су у глутенској мрежи пшеничног теста присутне различите подјединице и глијадина и глутенина и да свака од њих има своја функционална својства, када се говори о технолошком квалитету брашна (реолошка и пецивна својства) важан је и однос глутенина и глијадина. На основу литературних података промене односа глутенских протеина имају највећи утицај на растегљивост теста (MacRitchie, 1987; Singh и остали, 1990; Wieser и остали 1994; Uthayakumaran и остали, 2001). Оптимална вискоеластична својства теста, а тиме и добар квалитет производа, може се добити само уколико пшенично брашно садржи одговарајући однос глијадина и глутенина (Weiser, 2007).

Како би се боље предвидело понашање пшеничног теста, односно разумела његова вискоеластична својства, морају се узети у обзир два важна фактора: напон који се саопштава пшеничном тесту и његово време трајања. У случају великих напона који узрокују раскидање међумолекулских веза, нарушава се умреженост теста и доминирају вискозна својства теста. Током замеса теста, долази до низа трансформација и формирања полимерне структуре глутена. Полимерне компоненте брашна хидратишу, у протеинима глутена раскидају се постојеће ковалентне и нековалентне везе, јер је тесто при мешању и гњечењу изложено напону смицања, односно силама које су паралелне и делују у супротном смеру. Током обраде теста

глютен је изложен напону растезања у једном или два правца, а напрезања која настају зависе од дужине трајања и интензитета силе.

Belton (2003) је дао шематски приказ ефеката напрезања на полимере глютенске мреже (слика 7). На слици 7 (лево) дат је илустративни приказ утицаја интензитета силе на понашање молекула повезаних са две еластичне опруге (утицај ентропије на молекуле се занемарује). У реалним реолошким системима ове опруге су хемијске везе. (слика 7, случај (а)). Уколико је сила истезања сувише мала систем неће испољити својство еластичности (случај (б)), док ће сила већег интензитета узроковати еластичну деформацију (случај (в)). На истој слици (десно) приказан је ефекат напрезања, зависно од дужине трајања напона, на полимерни умрежени систем у два карактеристична случаја: еластични молекули повезани еластичним везама (А) и нееластичним везама (Б). Након истезања и постизања равнотежног стања ефекти напрезања ће бити другачији (случај В и Г), док ће наставак истезања узроковати стање приказано (Г).

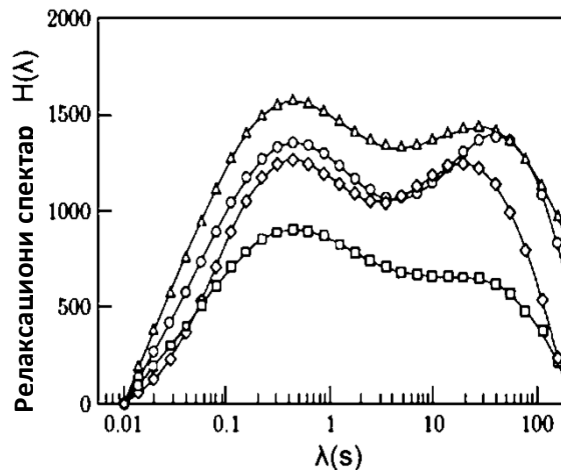


Слика 7. Ефекти равнотеже између умрежених и неумрежених полимера при деловању силе истезања. Belton (2003).

Из свега се може закључити да стабилност вискоеластичног система зависи од примењеног напона (интензитет замеса) и његовог трајања (време замеса). У зависности од наведених фактора, тесто се може понашати као више умрежен систем, (чврсто тело) или као мање умрежен систем (флуид). Било каква одступања у смислу технолошког квалитета брашна, недовољног интензитета замеса (премало унете енергије), превише дуго време мешања (деполимеризација протеина) могу утицати на формирање мење умреженог лепљивог теста услед доминције вискозних особина над еластичним.

Dobraszczyk и Morgenstern, (2003) указују на повезаност јачине глютенске мреже са временом релаксације теста после механичког деловања. Поменути аутори сматрају да краћа релаксација одговара протеинима глутена мање молекулске масе, а дуже време релаксације је повезано са молекулима велике молекулске масе. Пшенична теста

добијена од јаког брашна имају веће релаксационе модуле и захтевају дуже време релаксације него пшенична теста од слабијег брашна. Описано понашање потврђује да пшенична теста са већим степеном умрежености глутенских ланаца имају јачу структуру. Релаксациони спектар пшеничног теста од брашна различите јачине испољава карактеристичну бимодалну расподелу, односно присуство два карактеристична пика, при чему је први последица присуства полимера малих молекулских маса, док је други карактеристичан за полимере велике молекуларне масе (слика 8).



Слика 8. Шематски приказ релаксационог спектра пшеничног теста брашна различите јачине (Rao и остали, 2000).

Код пшеничног теста први пик указује на глутенинске полимере малих молекулских маса које карактерише бржи опоравак након примењеног напона, односно краће време релаксације док други пик карактерише глутенинске полимере великих молекулских маса који захтевају дуже време релаксације (Rao и остали, 2000; Dobraszczyk и Morgenstern, 2003).

2.5. Испитивање технолошког квалитета брашна

Сагледавајући значај технолошког квалитета брашна намењеног производњи пекарских производа интензивно се трагало на проналажењу адекватних метода за његово одређивање. Највећи број метода се односи на дефинисање количине и квалитета глутена (ретенциона способност, еластичност, растегљивост), односно реолошких својстава теста. Поред наведених метода примењује се и метода пробног печења у лабораторијским или индустријским условима. Неке реолошке методе које се користе за процену технолошког квалитета брашна су у оквиру међународних ИСС, ААСС и ISO стандарда, или Правилника о методама физичких и хемијских анализа за контролу квалитета жита, млинских и пекарских производа, тестенина и брзо смрзнутих теста (1988). Међутим, методе спровођења пробних печења од пшеничног брашна се значајно разликују по начину израде теста, рецептури, условима обраде и

печења, као и начина оцењивања квалитета добијених узорак хлеба. Поменута неусаглашеност у начину извођења, или одређене специфичности поступака који се спроводе у различитим лабораторијама или земљама отежавају поређење добијених резултата.

2.5.1. Процена реолошких својстава теста

Под појмом реолошка својства пшеничног брашна мисли се на физичке особине теста изложеног напону смицања или напону истезања током мешања и обраде. Реолошке особине теста су углавном повезане са глутенским компонентама теста, међутим и скроб као најзаступљенији састојак теста утиче на особине теста (Mirsaeedghazi и остали, 2008).

Пшенично тесто треба посматрати као полимерни полидисперзни систем. Чврсту фазу теста чини глутен и грануле скроба, односно формирана глутенска мрежа, течну фазу чини део воде коју нису везали полимери брашна и супстанце растворљиве у води (глобулини, албумини и арабиноксилани), а гасну фазу чине мехурићи ваздуха који су заробљени у току мешања или мехурићи гаса насталим током ферментације (Auerman, 1979). Према својим реолошким особинама, тесто спада у један од најсложенијих реолошких система. Пшенично тесто испољава комплексно реолошко понашање припада групи вискоеластичних систем које карактерише и псеудопластично и тиксотропно протицање (Weipert, 1990; Weipert, 2006; Song и Zheng, 2007; Mirsaeedghazi и остали, 2008).

Испитивањем реолошких особина пшеничног теста индиректно се одређује технолошки квалитет пшеничног брашна, повезаност особина пшеничног теста са сортом пшенице, климатским условима, поступцима прераде, додатим састојцима, процесним параметрима. Реолошким мерењима симулирају се реални услови при производњи пекарских производа, чиме се постиже имитирање понашања теста током свих фаза обраде и самим тим предвиђа квалитет готовог производа (Dobraszczyk и Morgenster, 2003). Реолошка методе које се користе за испитивање реолошких својстава теста, односно технолошког квалитета брашна, деле се на:

- **Емпиријске (дескриптивне) методе**, - омогућавају процену понашања теста током обраде теста, али не могу да пруже увид у фундаменталне математичке зависности мерених величина.
- **Фундаменталне (основне) методе**, - омогућавају да се математички дефинишу фундаментални параметри реолошког понашања теста.

До краја осамдесетих година прошлог века процена технолошког квалитета брашна, са аспекта реолошких својстава, вршила се искључиво применом емпиријских метода,

при којим је тесто изложено великим деформацијама. Данас резултате емпиријских тестова у научним истраживањима допуњују резултати фундаменталних тестова који се изводе при малим деформацијама. Анализом и једних и других параметара стиче се потпунија слика о квалитету брашна или променама реолошких својстава које се дешавају током процеса прераде брашна у производе.

2.5.1.1. Емпиријска реолошка мерења

Основни принцип емпиријских реолошких мерења заснива се на симулирању одређених услова који се дешавају током технолошког поступка. Емпиријска реолошка мерења су брза, лака за извођење, јефтина и тиме се и објашњава њихова широка прихваћеност и у лабораторијским и у индустријским условима. На основу знања стечених током примене емпиријских реолошких метода у протеклих 70 година добијају се бројне информације о квалитету пшеничног теста (конзистенција, вискозност, тврдоћа, отпор, моћ упијања воде, растегљивост) (Andersson, 1994).

Најбитнији представници групе реолошких емпиријских уређаја који прате промене у тесту током мешања и гњечења су фаринограф и миксограф (Spies, 1990). За праћење понашања теста, услед промена које настају при истовременом механичком (мешење) и топлотном (загревање) деловању на протеине и скроб користи се миксолаб (Gil-Humanes и остали, 2012). Недавно је развијен нови уређај глутопик за испитивање способности формирања и јачине глутена. Принцип рада глутопик уређаја се заснива на мешању суспензије брашно – вода при великим брзинама мешања (1900-3000 обр/min). Током мерења, интензивне силе мешања омогућавају развој глутенске мреже која доводи до пораста вискозитета суспензије (Kaur Chandі и Seetharaman, 2012; Melnyk и остали, 2012). Глутопик метода је до сада показала низ предности у односу на друге емпиријске методе за испитивање квалитета брашна, као што су, брзо време спровођења анализе те мала количина потребног узорка али практична примена и литературни подаци још увек нису на задовољавајућем нивоу. После фазе замеса, у фазама обликовања и ферментације пшенично тесто се излаже силама истезања.

Другу групу емпиријских реолошких уређаја представљају уређаји код којих се при мерењу симулирају релани услови током обраде теста, односно прате промене на тесту које је изложено напону растезања. Најбитнији представници ове групе реолошких уређаја су шопинов алвеограф и брабендеров екстензограф. Принцип рада екстензографа се заснива на истезању теста константном брзином у једном правцу и мерењу растегљивости теста и отпора који тесто пружа напону растезања. Насупрот екстензографском униаксијалном истезању, при алвеографском мерењу тесто се истеже једнаким интензитетом у два правца (Dobraszczyk и Morgenstern, 2003). Недостаци који карактеришу униаксијалне тестове истезања се применом биаксијалног истезања могу свести на минимум, али је неопходно истаћи да су напрезања која настају при биаксијалном истезању теста услед експанзије угљен-диоксида током ферментације

већа у односу на експерименталне услове. У последње време развијена је и нова метода, Киферова метода, за одређивање особина приликом истезања теста ил глутена (Pigozi и остали, 2008).

За праћење понашање теста у току ферментације користи се и уређај реоферментометар (Ktenioudaki и остали 2011), који поред способности развоја и задржавања угљен-диоксида индиректно указује на квалитет глутенских протеина (Dарчевић - Наднађев и остали, 2011).

За испитивање желатинизације скроба па тиме и посредно одређивање ензимске амилолитичке активности користе се амилограф и број падања по Хагбергу. Ове методе прате промене у вискозитету суспензије брашно-вода у току загревања. Поред ових уређаја, за одређивање промена скробне суспензије користи се и рапид-виско анализатор (енгл. Rapid visco analyser (RVA)). Као и у случају глутотопик анализе, ову анализу у односу на традиционалну амилографску анализу одликују предности краћег времена анализе и мање количине узорка.

Главни недостатак свих наведених емпиријских реолошких метода је немогућност прецизног дефинисања напона којима је тесто изложено током експеримента. Други недостатак се односи на чињеницу да су напони при симулраним условима већи 10-100 пута при тестовима истезања, односно мањи при замесу у фаринографској месилици у односу на напоне у реалним индустријским условима (Bloksma, 1990). Упркос непроцењивом значају у дефинисању технолошког квалитета брашна као недостаци емпиријских реолошких метода наводе се: деструктивна природа мерења, велика количина узорка за анализу, резултати зависе од величине/облика узорка и нису изражени у SI јединицама што онемогућава изражавање параметара као што су напон, деформација, модули (Dobraszczyk и Morgenstern, 2003).

2.5.1.2. Фундаментална реолошка мерења

Предност фундаменталних реолошких мерења у односу на емпиријска су независност резултата мерења од величине и облика узорка, као и од примењене методе. Фундаментални реолошки параметри се изражавају у јединицама SI система и могу се статистички обрађивати и моделовати. Фундаментална реолошка мерења такође имају и одређене недостатке као што су: скупа инструментација, неопходност обученог особља за извођење анализе, дуго време спровођења и примењене деформације су мале и не одговарају реалним условима (Dobraszczyk и Morgenstern, 2003). Такође, фундаментални тестови су нефлексибилни јер и минимална одступања у смислу дужег одмарања теста утичу на тачност мерења (Charun и остали, 1997). Ове појаве захтевају да се експерименти прецизно планирају и да се прати тачно утврђена процедура. Поновљивост резултата није идеална, а узроци одступања се тешко одређују. Уређај за фундаментална реолошка мерења који има велику примену је реометар.

Принцип рада реометра заснива се на примени одређене брзине смицања, напона смицања или деформације и праћењу понашања теста који се налази између две паралелне плоче, конуса и плоче, циркуларном зазору између два коаксијална цилиндра и других геометрија. Данашњи реометри конструисани су тако да могу да раде у више различитих режима, односно да контролишу вредност примењене брзине смицања, напона смицања или саопштене деформације, па је на једном уређају могуће извођење већег броја тестова. Приликом проучавања пшеничног теста, као реалног вискоеластичног система најчешће се користи следећи фундаментални реолошки тестови: динамичка осцилаторна мерења (енгл. "dynamic oscillatory test"), криве пузања и опоравка (енгл. "creep and recovery") и тестови релаксације напона (енгл. "stress relaxation") (Dobraszczyk и Morgenstern, 2003; Zaidel и остали, 2010).

Динамичка осцилаторна мерења су један од најкоришћених фундаменталних тестова. Пшеничном тесту се саопштава синусноиди осцилаторни напон или деформације у времену. Приликом саопштавања синусноидне деформације, пшенично тесто се понаша као вискоеластични материјал. Параметри који дефинишу вискоеластична својства теста су модул еластичности (G') и модул вискозности (G''), као делови комплексног вискоеластичног модула G^* који представља укупан отпор пшеничног теста при примењеном напону (Zaidel и остали, 2010).

Еластични модул G' , модул чувања или индикатор еластичног понашања, је мерило енергије задржане у тесту током смицања која се може ослободити накнадно. Вискозни модул G'' -модул губитка-, је мерило расуте или изгубљене енергије (топлота). Стога се G' користи као индикатор еластичних особина, а G'' као индикатор вискозних особина. Модули G' и G'' су независни од интензитета деформација у линеарном опсегу и то је први корак у карактерисању пшеничног теста у овој врсти испитивања. Параметар који дефинише допринос еластичне и вискозне компоненте вискоеластичним својствима теста је $\tan \delta$ (формула 1).

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (1)$$

Тесто има веће вредности оба модула у односу на чист глутен чиме се потврђује да и скроб има значајан допринос реолошким особинама теста (Uthayakumaran и остали, 2002). Такође, теста са већим садржајем протеина испољавају и веће вредности модула и ниже вредности $\tan \delta$ у поређењу са тестом од брашна са мањим садржајем протеина (Khatkar и остали, 1995; Toufeili и остали, 1999).

Вискоеластична својства теста се могу дефинисати помоћу теста пузавости, који се се изводи тако што се узорак у фази пузања излаже константном напону смицања и прате промене деформације током времена. У наредној фази, фази опоравка, узорак се ослобађа деловања напона ($\tau = 0$), опадају вредности деформације услед опоравка

система а узорак покушава да заузме првобитан положај (Rakita, 2017). Коначни суд о технолошком квалитету брашна се ипак тешко може дати само на основу реолошких метода те је за потпуно сагледавање квалитета неопходно спровођење лабораторијских тестова пробног печења и анализирање квалитета готових производа.

2.5.2. Испитивање ретенционе способности брашна - SRC метода

Полимери брашна (скроб, протеини и пентозани) су одговорни за везивање воде током замеса, при чему највећи капацитет везивања воде имају у води растворљиви пентозани. На основу релативно нове методе одређивање способности задржавања раствора, SRC метода (енгл. Solvent Retention Capacity), може да се предвиди појединачни утицај три функционална полимера на понашање теста током замеса, обраде и печења. Поменута метода се занима на специфичним својствима полимера која се доводе у везу са одређеним карактеристикама теста: оштећен скроб са лепљивошћу теста, глутен са еластичношћу, пентозани са вискозношћу.

Прва истраживања вазана за корелацију ретенционе способности брашна и квалитет хлеба везују се за средину XX века (Finney и Yamazaki 1946). Нешто касније је уведена метода мерења и алкалне способности задржавања воде (AWRC) која је корелирала са пречником брашно-кондиторских производа типа кекса (Yamazaki 1953). У међувремену AWRC метода је постала стандардна метода, AACС метод 56-10.02 (AACС, 2010) и користи се за одређивање способности апсорпције воде брашна. Самостално примењена, AWRC метода није довољно примењива за предвиђање карактеристика брашна за различите врсте пекарских производа. У ову сврху, SRC метода развијена је касније (Slade и Levine 1994; Haynes и остали 2009). Gaines (2000) наводи да је 1999. године, након спроведене студије Техничког комитета за меке пшенице Америчког удружења хемичара житарица (American Association of Cereal Chemists, AACС) SRC метода је постала званична метода (56-11.02). Основни принцип ове методе се заснива на чињеници да се мали молекули растварају у вишку растварача, док полимери солватишу и бубре. Степен бубрења умрежених полимера се може мерити на основу промена у дужини, маси или запремини полимера. У циљу нумеричке процене степена интеракција између полимерних компоненти, предложен је Хилдебрандов параметар растворљивости полимера (δ), (Grulke 1989). Степен бубрења полимера је у термодинамичком смислу одговара степену растворљивости малих молекула. SRC метода, развијена на бази ове теорије, представља нови начин да се истраже и процене доприноси главних полимерних компоненти брашна, (глутенски протеини, оштећен скроб и пентозани/арабиноксилани) (Slade и Levine 1994). Реолошка испитивања теста се заснивају на посматрању кинетике развоја теста (услед пластификаторског дејства водених раствора на полимере брашна) при ограниченим количинама раствора те се из реолошких метода добијају информације о брзини развоја мреже. С друге стране применом SRC методе на основу бубрења полимерних молекула

у петоструком сувишку дијагностичких раствора добијају се способности задржавања раствора које пружају информације о степену развоја мреже. На основу избора одговарајућег раствора могуће је предвидети функционални допринос бубрењу сваке врсте полимера присутних у брашну (Sears и Darby 1982). Способност задржавања раствора се заснива на класичном термодинамичком одређивању параметра растворљивости полимера. Метода циљано избегава кинетичке ефекте и не може се комбиновати са реолошким методама (Dang и Bason 2006).

У SRC методи користе се четири раствора, односно вода и три водена раствора: 5% раствор млечне киселине (SRCLa), 5% Na_2CO_3 раствор (SRCSо) и 50% раствор сахарозе (SRCSu). Наведени дијагностички раствори се дозирају у пет пута већој количини у односу на брашно (25.0 g раствора на 5.0 g брашна) како би се избегли кинетички ефекти приликом солватације и бубрења. Сваки од ова три дијагностичка раствора је специфичан за одређени полимер, према свом Хилдебрандовом параметру растворљивости полимера (δ). Разблажени водени раствор млечене киселине за глутенине, разблажени водени раствор Na_2CO_3 за амилопектин оштећеног скроба и концентровани водени раствор сахарозе за пентозане. Вода је универзални растварач и према свом Хилдебрандовом параметру растворљивости полимера није оптимални растварач ни за један функционални полимер брашна. Ипак, мора се узети у обзир да сви SRC раствори садрже најмање 50% воде, што значи да испитивањем било ког присутног полимера долази до бубрења у свим растворима услед присуства воде. Ипак, до највећег повећања ће доћи у оном воденом раствору који је термодинамички најподударнији са полимерним молекулама чији је удео у садржају увећан.

Применом SRC методе одређују се четири карактеристична параметра SRCw, SRCLa (глутенин/глутен), SRCSо (оштећен скроб) и SRCSu (пентозани/арабиноксилани). Вредност параметра SRCw (SRC воде) представља укупну способност задржавања воде свих полимерних компоненте брашна (глутен, оштећен скроб и пентозани) (Slade и Levine 1994). Ранија истраживања су указала да на добијене вредности SRCLa параметра поред глутенина утичу и друге полимерне компоненте брашна (оштећен скроб и арабиноксилани) (Barrera и остали 2007; Duyvejonck и остали 2011a; 2011b). Због поменутог утицаја рачуна се и коригована вредност SRCLa која представља количник експериментално добијене SRCLa вредности са збиром SRCSо и SRCSu вредности (Kweon и остали, 2009a). Овако коригована вредност уобичајније се назива индекс перформанси глутенина (енгл. glutenin performance index, GPI). Важно је напоменути да је рН вредност SRCLa раствора око 2,0 што се доводи у вези са киселом средином рН < 4,0 коју стварају млечно-киселе бактерије. Раствор Na_2CO_3 је базан (рН \approx 12,0), јер у овим условима оштећени скроб лако солватише и има већи степен бубрења што омогућава разликовање оштећеног или прежелатинизираниог скроба од неоштећеног, нативног скроба (AACC метод 56-11.02). Раствор сахарозе је неутралан, што доприноси већем бубрењу арабиноксилана.

Прва истраживања везана за примену SRC методе спроведена су у САД на меким пшеницама намењеним за производњу кекса. Међутим, све је више истраживања која се односе на хлебне сорте пшенице, што отвара могућност дефинисања оптималних SRC вредности вредности и за потребе пекарства у Европи. На основу испитивања деветнаест узорака пшеница у Европи, Duuvejonck и остали (2012) приметили су велике варијације у добијеним SRCLa вредностима (106.4 - 147.1 g/100 g), а нешто бољи резултати добијени су за за SRCСу (90.2 - 102.1 g/100 g), SRCSo (74.2 - 88.1 g/100 g) и SRCw (56.3 - 66.3 g/100 g). Према критеријуму, постављеном од стране Pike и MacRitchie (2004), сва брашна код којих је SRCLa изнад 100 g/100 g имају добар квалитет за израду хлеба.

Општа предност примене SRC методе у дефинисању квалитета брашна, и индиректно квалитета пекарских производа је лака изводљивост у смислу времена потребног за анализу и услова које треба обезбедити током одређивања. Због једноставности извођења саме методе и варијације добијених резултата (SRC вредности) између различитих лабораторија или аналитичара су много мање у поређењу са реолошким испитивањима или методама пробног печења (Gaines 2000). Поновљивост метода је такође добра што потврђују вредности стандардне девијације за десет поновљених мерења: SRCw \pm 0,5%; SRCSo \pm 0,5%; SRCLa \pm 1,0% i SRCСу \pm 1,0%. Поред свега наведеног, у неким случајевима, није неопходно спровођење комплетног SRC профила брашна, него се може одредити само циљана SRC вредност испитиваног полимерног састојка брашна. Иако већина до данас објављених радова разматра само аспект примене SRC методе у процесу оплемењивања пшенице и развоја нових сорти, имајући у виду основне принципе ове методе, не постоје препреке њене примене ни у испитивању других узорака пшеничног брашна (Lindgren и Simsek, 2016). Vukić и остали (2020) објавили су испитивања пасажних брашна применом SRC методе и моделовање односа између емпиријских реолошких параметара и параметара SRC методе применом PLSR приступа. Резултати овог истраживања део су ове докторске дисертације (5.1. Корелација параметра SRC методе и емпиријских реолошких метода).

2.5.3. Процена пецивних својства брашна

Хемијски фактори квалитета и реолошка својстава брашна могу да укажу да ли брашно поседује технолошки квалитет, односно да ли је погодно за производњу хлеба. Међутим, за коначну оцену технолошког квалитета брашна неопходно је испитати његова пецивна својства. Појам пецивост изражава свеобухватно понашање пшеничног брашна током његове прераде у готове производе. Способност образовања теста одговарајућих физичких особина, као и способност брашна да развија гасове у тесту су најзначајнији фактори који дефинишу пецивне карактеристике брашна, и тиме утичу на квалитет теста и пекарских производа (Finney, 1948; Shewry и Halford, 2002; Kuktaite,

2004). Брашна која дају веће приносе теста, а самим тим и већи принос хлеба уз одговарајуће сензорске карактеристике, поседују добра својства пецивости.

Пробно печење је најпоузданија метода за процену технолошког квалитета брашна. Једино је пробним печењем могуће директно одредити показатеље пецивних особина, односно, физичке (запремина) и сензорске особине хлеба (Pestorić и остали, 2008). На основу добијених резултата утврђују се квалитативна својства типског брашна, дефинишу оптимални услови производње, али и сагледавају потребе за евентуалним модификацијама устаљених процесних параметара у индустрији. Методом лабораториског пробног печења симулира се технолошки поступак производње хлеба у строго дефинисаним и контролисаним условима. Значај одређивања пецивних својстава брашна у дефинисању технолошког квалитета брашна базира се на чињеници да се управо током фазе печења одвија низ физичких, хемијских и биолошких промена (испаривање воде, формирање порозне структуре, увећање запремине, денатурација протеина, формирање коре, формирање боје, текстуре, ароме и других) (Mondal и Datta, 2008).

Најважнији показатељ пецивних својстава брашна је запремина хлеба. Брашна која имају велику способност везивања и задржавања воде дају и већи принос теста, принос хлеба и принос запремине. Поменута хидратациона својства брашна првенствено зависе од количине и квалитета глутена, али у других полимера брашна (скроб, пентозани). Гранулациони састав брашна, степен ошећења скроба као и ензимска активност брашна такође могу имати позитиван утицај на моћ упијања воде и на мали степен омекшања теста. На запремину хлеба утиче количина створеног и задржаног гаса током ферментације, што зависи од количине слободних шећера и декстрина у брашну и амилолитичке активности,

Са аспекта прихватљивости од стране потрошача поред запремине, битни су и сензорски параметри квалитета, првенствено арома и квалитет структуре хлеба (Heinić, 2006). Најважнија ароматична једињена која доприносе формирању карактеристичне ароме хлеба настају у процесима Мајардове реакције и карамелизације током печења, (Kirchhoff и Schieberle, 2001). Значајан допринос одређивању пецивних својстава пшеничног брашна може бити и инструментално одређивање текстуралних особине хлеба.

2.6. Побољшивачи технолошког квалитета пшеничног брашна

Током производње хлеба често се користе побољшивачи, оксидациона средства или комбиновани побољшивачи, који повећавају јачину и еластичност теста,

побољшавају обрадивост и способност нарастања теста током печења, што на крају резултује већом запремином хлеба (Stauffer 1999b; Junqueira и остали, 2007). Позитиван ефекат оксиданаса на квалитет теста и хлеба објашњава се оксидацијом слободне сулфихидрине групе глутенских протеина. Функције ових побољшивача су комплексне, дешавају се на нивоу молекула и најчешће се за опис њиховог ефекта користи израз „умрежавање протеина“. Смањење броја слободних – SH група деловањем различитих оксиданаса, у процесу умрежавања протеина, је експериментално доказано (Sokol и остали, 1960; Hird и Yates, 1961; Bloksma, 1963; Tsen и Hlynka, 1963; Bloksma, 1972). Најчешће коришћени оксиданси у светској пекарској индустрији су аскорбинска киселина, калијум бромат, калијум јодат, калцијум пероксид и азодикарбон амид (ADA). Коришћење неких синтетичких оксиданаса, као што су калијум бромат и ADA, је забрањено у многим земљама Европе (Ye и остали, 2011). Врло је важно користити оксидациона средства као додатке у оптималној количини. Тесто са превише додатог оксиданаса је суво, а квалитет хлеба нарушен - збијена средина, присутне пукотине, мала запремина. У случају недовољне количине оксиданса тесто је слабо, растегљиво и лепљиво, а хлеб неправилног облика, неразвијене средине и мале запремине (Tebben и остали, 2018).

Кисеоник је основни оксиданс у технологији пекарства, свој утицај на брашно испољава од фазе складиштења брашна до последње фазе израде теста. Интензитет оксидативних промена узрокованих присутним кисеоником зависи од начина израде теста., односно спровођења појединих фаза. Оксидативно дејство кисеоника се повећава ако се користи пнеуматски транспорт или топао ваздух током транспорта брашна из складишта до погона пекаре. Током замеса долази до интензивне аерације теста, која је врло изражена при брзоходном или интензивном замесу, односно условљена временом мешања. Мехурићи ваздуха остају заробљени у формираној глутенској мрежи и утичу на оксидативне промене у тесту. Експериментално је потврђено да су реолошке особине теста мешног у атмосфери азота лошије од теста мешеног у атмосфери ваздуха, а и нарочито у односу на тесто код кога је примењен замес у атмосфери кисеоника. Неки аутори су предлагали да се и у индустријским условима мешање теста спроводи у условима атмосфере обогаћене кисеоником, јер позитиван утицај на глутенску структуру као и код других оксиданаса зависи од количине присутног кисеоника. Замес теста у атмосфери кисеоника доводи до повећања отпора и смањења растегљивости теста као и повећања запремине током накнадне ферментације теста у пећи. Такође је могуће да је кисеоник кључни фактор за одређене хемијских и ензимске реакције у тесту (Xu, 2001). Поред свега наведеног присуство довољне количине кисеоника у тесту важно је и због потенцијалне оксидације аскорбинске киселине у дехидроаскорбинску киселину (Li и остали, 2000), која утиче на јачање глутенске структуре теста.

2.6.1. Аскорбинска киселина

Далеко најзначајније оксидационо средство у пекарству је аскорбинска киселина (L–аскорбинска киселина), чија је употреба као природног додатака оправдана у свим земљама широм света. Аскорбинска киселина је редукционо средство (антиоксиданс), међутим, на самом почетку замеса додата аскорбинска киселина (Asc) се оксидује у дехидроаскорбинску киселину (DHAsc) која делује као оксиданс у тесту (Faccio и остали, 2012; Tebben и остали, 2018). До оксидације аскорбинске киселине може да дође и уз присуство јона гвожђа или бакра. Количина аскорбинске киселине, у пекарству мора да буде у складу са технолошким квалитетом брашна, сировинским саставом теста (присутством других додатака), процесним параметрима и врстом пекарског производа (Šimurina и остали, 2006; Horvat и остали, 2009). Најчешће је количина аскорбинске у границама 20 – 150 ppm, најчешће 100 ppm када је у питању хлебно тесто (Every и остали, 2008). Dodatak веће количине аскорбинске киселине може значајно да повећа отпор теста, а смањи растегљивост и на тај начин поремети оптималн однос отпора и растегљивости. Аскорбинска киселина има већи ефекат најачање протеинске мреже теста од брашна лошег квалитета него теста које је добијено од брашна нешто бољег квалитета (Aamodt и остали, 2003). Током интензивног замеса, без ферментације у маси, примећено је да употреба аскорбинске киселине смањује количину енергије коју треба предати у току замеса. При интензивном замесу познатом као "Chorleywood Bread Process" сваком килограму теста треба предати 40 kJ енергије у току максимално 5 минута (Chamberlain и остали, 1965).

2.6.2. Глукоза оксидаза

Глукоза оксидаза, ензим пшеничног брашна, који у присуству атмосферског кисеоника оксидује глукозу у глукуронску киселину и трансформише воду у водоник-пероксид. Поменути ензим је неспецифично оксидационо средство које може деловати на сулфидрилне групе у глутену, глутатиону или на конверзију аскорбинске киселине у дехидроаскорбинску. Независно од механизма деловања коначни ефекат глукоза оксидазе у тесту се манифестује јачањем глутенске структуре (Popper и Schäfer, 2006; Steffolani и остали, 2010).

Једини лимитирајући фактор за оксидациони ефекат глукоза оксидазе је недовољно присуство кисеоника. При оптималној количини, у границама од 100 – 500 ppm на брашно, глукоза оксидаза доводи до повећања модула еластичности и вискозности пшеничног и пиринчаног брашна и смањује чврстоћу теста. Vonet и остали (2006) тврде да утицај глукоза оксидазе зависи од њене количине, али и квалитета брашна. У присуству кисеоника глукоза оксидаза катализује реакцију оксидације β -D–глукозе до α -D–глюконлактона и водоник пероксида (Steffolani и остали, 2010). Због наведене чињенице, да се ослобађа водоник пероксид, глукоза оксидаза се у пекарству може

користити као средство са оксидационим дејством, самостално или у комбинацији са аскорбинском киселином. Настали водоник пероксид оксидише –SH групе протеина и ствара дисулфидне везе (Vemulapalli и остали, 1998) које доприносе јачању глутена и побољшању квалитета теста. Водоник пероксид није селективно оксидационо средство па са једне стране оксидује –SH групе у цистеинским остатацима полипептидних ланаца, а са друге стране оксидује ферулну киселину на арабиноксиланима (Stauffer, 2007). Према Светској здравственој организацији (World Health Organization, WHO) нема доказа да пероксида имају карциногено дејство на људе (WHO, 2005). Водоник пероксид, када се налази у тесту је такође активан оксиданс. Водоник пероксид се у тесту може унети или створити деловањем квасца или ензима. Квасци користе око половине произведеног водоник пероксида, док друга половина делује оксидативно у тесту и утиче на реологију теста (Liao и остали, 1998). Истраживања су показала да присуство водоник пероксида у тесту доводи до полимеризације глутенских протеина, стварања већих полимера молекулске масе и до 53 kDa. (Toyosaki, 2007). Према резултатима Takasaki и остали (2005) додатак водоник пероксида, а нарочито комбиновани додатак водоник пероксида и пероксидаза значајно повећава број формираних дитиозинских веза. Генерално гледано крајњи ефекти пероксида манифестују се смањењем осетљивости теста на истезање.

2.7. Примена хладне атмосферске плазме у прехранбеној технологији

Енглески израз “disruptive technology” се односи на технологију која има нижу цену уз боље перформансе од постојећих те својом применом ремети тренутно стање и чини га дугорочно неодрживим (Utterback и Асее, 2005). Увођење у индустријску примену такве иновативне технологије, као алтернативе постојећим технологијама, праћено је бројним ризицима нарочито у индустријама са малим профитом као што је прехранбена индустрија. Са друге стране, неоспорна је потреба за иновативним технологијама и приступима и у производњи хране и у њеној преради. За успешно увођење нове технологије у прехранбеној индустрији потребно је да је технологија довољно развијена да може да знатно промени тренутно стање, али и да задовољава неколико нетехнолошких аспеката (специфичност саме прехранбене индустрије и став потрошача. Према томе, два основна покретачка фактора за увођење иновативних технологија у прехранбеној индустрији су развијеност дате технологије и потрошачи.

Потенцијална примена технологије плазме у оквиру прехранбене индустрије базира се на ефектима плазме у микробиолошкој деконтаминацији, контроли штеточина, елиминацији токсина, третирању амбалажних материјала и саме хране.

Истраживања су се до сада углавном концентрисала на примену плазме на свеже пољопривредне производе и њихову продужену трајност постигнуту деконтаминацију микроорганизама и стерилизацију амбалажних материјала. Успешни позитивни примери заинтересовали су научну јавност, па се број истраживања о примени технологије плазме у прехранбеном инжењерству знатно повећао у последњих пар година (Misra и остали, 2011; Niemira и остали, 2012; Pankaj и остали, 2014a; Misra и остали, 2016; Thirumdas и остали, 2016; Bourke и остали, 2017). Према закључцима Misra и остали (2016), развој технологије хладне атмосферске плазма се може повезати са неколико основних покретача развоја.

Покретачи развоја технологије хладне атмосферске плазма у прехранбеној индустрији су:

- (1) могуће продужење одрживости производа – мање отпада од хране;
- (2) максимално очување квалитета хране у одређеном временском периоду – мањи губици у производњи и складиштењу хране;
- (3) мала потрошња енергије – задовољење принципа енергетске одрживости;
- (4) мали трошкови употребе и одржавања технологије – технолошки једноставан систем са минималним одржавањем;
- (5) побољшана хемијска и биолошка безбедност хране – смањење остатака пестицида и осталих хемијских контаминената (нпр. микотоксина), односно, разарање ћелија како бактерија тако и филаментозних гљива тј. плесни;
- (6) заснованост на принципима зелене технологије и еколошкој одрживости – једине потребне сировине су ваздух и електрична енергија.

Највећи изазови за усвајање плазма технологије у прехранбеној индустрији су:

- (1) доказивање ефективности процеса;
- (2) дизајн и развој технологије за индустријске капацитете;
- (3) ефективна контрола и валидација процеса третмана;
- (4) регулаторно одобрење; и
- (5) прихватљивост потрошача.

2.7.1. Плазма

Године 1879. енглески физичар Williams Crookes је идентификовао четврто стање материје, поред чврстог, течног и гасовитог стања. То четврто стање материје је данас познато као плазма. Израз "плазма" је у употребу увео Irvin Langmuir 1928. године (Langmuir, 1928). Најуобичајенији начин реализације стања плазме је путем електричног прањњења. Плазма је сачињена пре свега од јона, слободних електрона као и атома и молекула у њиховим основним и ексцитованим стањима са укупним неутралним електричним набојем, као и фотона. Плазма је квази електрично неутрална,

јер је укупан број негативно наелектрисаних честица једнак укупном броју позитивно наелектрисаних честица. Електрони се најчешће називају „лаке“ честице или врсте за разлику од осталих чинилаца плазме који се називају „тешким“ честицама или врстама. Поред настанка наелектрисаних честица (електрони и јони), које стварају резултујуће електрично поље, производи судара електрона са атомима или молекулима гаса укључују и слободне радикале, побуђене атоме и молекуле, фотоне и друге реактивне врсте.

Основна подела плазме од значаја за технолошку примену је подела на термалну и нетермалну (хладну) плазму. У термалној плазми у скоро свим случајевима остварује се локално термодинамичко равнотежно стање између енергија електрона и других тешких честица. Зато се овакви типови плазме често називају и равнотежном плазмом. Уколико се енергије честица опишу температурама, где су T_e = температура електрона и T_h = температура тежих честица, те температуре су приближно једнаке $T_e \approx T_h$ у термалним плазмама. Температуре центра плазме са лакоћом прелазе 10 000 К и гас је изузетно јонизован. Термодинамичка равнотежа огледа се и кроз хемијско равнотежно стање система па концентрација честица зависи само од температуре. С друге стране, нетермалне или хладне плазме се одликују температурама електрона које су много више од температуре тежих честица, $T_e \gg T_h$. Због тога у овим системима није могуће остварити термодинамичко равнотежно стање између енергија електрона и тежих честица па су овакве плазме по својој суштини неравнотежне плазме. Као последица неравнотежног стања, доминантни су судари тешких честица са електронима, услед којих не долази до загревања тежих честица и сама плазма остаје на собној температури.

Хладне неравнотежне плазме могу се реализовати на ниским притисцима и атмосферском притиску. Плазме на ниским притисцима се одликују много већим средњим слободним путем између електрона и тежих честица па су судари честица много ређа појава. При наведеним условима, могу се остварити хомогене плазме велике запремине (и до неколико десетина m^3). Код плазме на атмосферском притиску средњи слободни пут електрона и тежих честица је изузетно кратак, односно доминирају судари честица у плазми. Због тога је ограничена запремина у којој може доћи до ефикасног преноса енергије са електрона на тешке честице па је реактивност хладне неравнотежне плазме на атмосферском притиску увек ограничена на мали део простора. У хладној неравнотежној плазми електрони са високим енергијама у сударима са тешким честицама доводе до низа хемијских реакција и веома комплексне хемије у плазми у којој се производе различите реактивне врсте. Широка примена овог типа плазме управо произилази из ефикасне производње потребних хемијских врста у плазми без знатног загревања околног гаса. На пример, неравнотежне плазме на атмосферском притиску су способне да проузрокују значајне биолошке ефекте (Kong и

остали, 2009; Fridman и остали, 2008). Табела 3 приказује типичне параметре нетермичког микропражњења плазме на растојању од 1 mm при атмосферском притиску.

Табела 3. Типични параметри нетермичког микропражњења плазме на растојању од 1 mm, при атмосферском притиску (Kogelschatz, 2000).

Животни век	1-20 ns	Пречник филамента	50-100 μm
Максимална јачина струје	0,1 A	Густина струје	0,1-1 kAcm^{-2}
Густина електрона	$10^{14}\text{-}10^{15} \text{ cm}^{-3}$	Енергија електрона	1-10 eV
Укупно пренесено наелектрисање	0,1-1 nC	Редуковано електрично поље	$E/n = (1-2)(E/n)_{\text{Paschen}}$
Укупна расута енергија	5 μJ	Температура гаса	300 K

Са друге стране, сложеност механизма који регулишу реализацију плазме, додатно компликује хемију плазме и схватање њеног деловања. Као пример се може навести хладна плазма ваздуха која се састоји од преко 75 различитих активних врста и преко 500 различитих реакција које се одвијају на нано, микро, мили и секундним временским скалама (Misra и остали, 2016).

2.7.1.1. Извори хладне плазме на атмосферском притиску

Плазме у атмосферским условима могу настати на различите начине: у електричним пражњењима, термичким деловањем, ласерском јонизацијом (бомбардовањем квантима електромагнетног зрачења). Хладне плазме на атмосферском притиску се стварају у електричним пражњењима. У принципу пражњење може бити реализовано у ваздуху или смеси ваздуха са било којим гасом, али се као додатни (радни) гас најчешће користе инертни гасови, зависно од ефекта примене или конструкције уређаја. Неке од често коришћених смеша радних гасова су: ваздух/ O_2 , ваздух/ $\text{Ar}/(\text{O}_2)$, ваздух/ $\text{He}/(\text{O}_2)$, ваздух/ $\text{He}/\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ и други (Guo и остали, 2015). Инертни гасови попут аргона и хелијума се користе због одлике формирања дугоживећих побуђених стања атома (метастабилних стања). Они омогућавају ефикаснију јонизацију и предају енергије електричног поља плазми као и смањену предају термалне енергије тешким честицама што минимизује загревање околног гаса. Нетермална плазма добијена у ваздуху, тј. од смјеше гасова азота, кисеоника и угљен диоксида, има хемијски састав у коме доминирају јони (O_2^- , O^- , N^+ , N_2^+ , O^+ , NO^+ , CO^{2+}), слободни радикали (NO , OH , O , CO) и високо реактивне врсте (H_2O_2 , HNO_2 , HNO_3 , O_3). Уколико је присутна водена пара у довољним концентрацијама, настају и H_3O^+ , H^+ , OH^- јони и јонски кластери H_2O (Kogelschatz, 2007). Како би дошло до стварања нетермалне

плазме на атмосферским притисцима, неопходно је прозвести довољну количину наелектрисаних честица (електрона и јона) у гасу применом високонапонског сигнала на електродама плазма извора. Како је гас на собној температури добар изолатор, потребно је створити довољно јако електрично поље које ће омогућити континуирану мултипликацију наелектрисаних честица и формирање плазме. Тренутак када дође до формирања електричног пражњења назива се електрични пробој у гасу. Уколико се након електричног пробоја одржава довољно јако електрично поље електрично пражњење односно плазма наставља да постоји у одређеној запремини на атмосферском притиску. Електрични напајачи који се користе као генератори плазме на атмосферском притиску могу давати импулсне или континуалне сигнале константног напона (DC), неизменично промелјиве сигнале у широком опсегу фреквенција (AC, радиофреквентни (RF) сигнали и микроталаси (MW)) (Conrads и Schmidt, 2000). У зависности од генератора плазме који се користе, електроде у извору плазме могу и не морају бити у директном контакту са радним гасом. Начин на који се плазма генерише има директан утицај на реактивне врсте које ће бити присутне и њихове концентрације у плазми. Са становишта прехрамбене индустрије најпрактичнији методи за стварање плазме су они који не захтијевају промену параметара атмосферске средине, односно функционишу при атмосферском притиску, уз евентуално додавање неког додатног гаса.

2.7.1.2. Површинска и копланарна диелектрична баријерна пражњења

Један од типова дизајна плазма извора за који се верује да има велики комерцијални потенцијал је извор пражњења преко диелектрика или диелектричног баријерног пражњења (Dielectric Barrier Discharge - DBD) код кога се диелектрик налази у простору између електрода где би се формирало пражњење. Један подтип DBD плазма извора са различитим могућим применама је површинско пражњење кроз изолатор или површинско диелектрично баријерно пражњење (Surface Dielectric Barrier Discharge - SDBD). У случају SDBD типа извора плазме сучељене површине обе електроде су прекривене изолатором а плазма се ствара на слободним површинама електрода (Brandenburg, 2017). Издваја се неколико уређаја различитих конструкција које су прилагођене применама, на пример као што је уређај развијен на Универзитету у Ливерпулу, намењен за деконтаминацију хране и посуђа за храну (Walsh, 2017). Дизајн уређаја се заснива на металној, мрежастој електроди хексагоналне структуре која се налази на кварцној изолаторској површини и металној електроди на супротној страни кварца. Наведени уређај је у могућности да генерише хладну плазму у ваздуху на површини од 80×80 mm. Затворен простор који покрива зону третмана, односно, кућиште, подржава задржавање насталих реактивних врста са дужим временом распада. Вауер и остали (2017) су описали дизајн уређаја те микробицидну ефективност филмова за паковање. Код копланарног типа DBD извора, обе електроде се налазе у

изолационом материјалу и до пражњења долази изнад слоја изолатора који је изложен радном гасу (Brandenburg, 2017). Овај дизајн је веома занимљив за примену у прехранбеној индустрији јер су обе електроде диелектриком заштићене од спољашњег деловања или нису у контакту са водом или храном.

Следећи битан фактор који одређује могућност примене ових плазма извора је могућност задржавања формираних реактивних врста у активној запремини за третман. Корист задржавања формираних реактивних врста је двострука. Први од њих је заштита, људи и других материјала од могућих штетних деловања одређених реактивних врста формираних у плазми (на пример O_3), а други је значајно скраћење самог времена третирања услед веће концентрације и дужег времена контакта реактивних врста са узорком. Велики број приступа је развијен у овом циљу. Неки од њих су употреба плазма реактора у херметички затворених кућиштима, у процесним тунелима или затвореним паковањима. Описан SDBD дизајн је компатибилан и са принципима конструисања континуалне процесне опреме у прехранбеној индустрији, као што су тунелске пећи и сушнице.

2.7.2. Утицаји од практичног значаја у плазма пољопривреди

Научно разумевање феномена плазме и специфичне плазма-хемије представљале су добар основ за развој плазма технологије, која је нашла примену у различитим областима индустрије. Технологија плазме је примењена у производњи полупроводничких уређаја, интегрисаних кола, дисплеја, оптичких уређаја и соларних ћелија, обради и модификација површине различитих материјала и текстилних производа и многим другим (Bogaerts и остали 2002). У последних десет до двадесет година, са развојем нових извора плазме на атмосферском притиску развило се ново поље примене пред којим су постављени велики захтеви и очекивања. То је област примене плазма технологије у производњи и преради хране, такозвана “плазма пољопривреда”. До сада објављена истраживања су дала врло различите, понекад и контрадикторне резултате који захтевају даља детаљнија испитивања. Због разноликости третираних система у великом броју случајева ова неслагања се вероватно могу приписати разликама у спровођењу експеримента у смислу разлика у врсти и особинама третираних узорака. Такође, због специфичности и постојећих разлика у изворима плазме примењеним за третмане, тешко је извршити директно поређење самих плазми. Последице, ово имплицира да је третирање хладном плазмом зависно од врсте производа, те да је потребна оптимизација третмана за сваку врсту производа. Такође, третман хладном плазмом се не може са успехом применити на одређене категорије хране, на пример уља и масти где долази до нежељених реакција оксидације липида. Да би се третман хладном атмосферском плазмом у реалности могао применити на пшенично брашно, мора се размишљати о третирању великих количина брашна. Многи унутрашњи и спољашњи параметри пшеничног брашна као

матрикса, укључујући и саму његову прашкасту форму, могу играти значајну улогу у ефикасности третмана. Код SDBD извора хладна плазма се генерише на површини диелектричне баријере. Ова технологија омогућава да се узорци при атмосферском притиску третирају у ваздуху као радним гасом, што умањује трошкове третмана и захтеваних постројења, а нуди велику предност у облику високе прилагодљивости третмана и повећања капацитета.

2.7.2.1. Паковање хране

Велики број новијих истраживања се заснива на проучавању утицаја хладне плазме на амбалажни материјал или коришћење самог амбалажног материјала као кућишта за третман хладном плазмом. За потпуну процену примене хладне плазме у овим поставкама од суштинске је важности квантификовати све евентуално могуће промене амбалажног материјала. Тако би из безбедоносних разлога било потребно проучити лимите миграције адитива, мономера, олигомера и молекула мале молекуларне масе из амбалажног материјала у храну (након третмана хране у паковању) (Pankaj и остали, 2014c). Досадашња истраживања обећавају јер су промене на самим амбалажним материјалима занемарљивим и миграциона кретања далеко испод лимита прописаних од регулаторних тела (Pankaj и остали, 2014d). Још једна од значајних особина DBD плазми које се реализују унутар паковања хране је чињеница да је техника компатибилна са амбалажним материјалима на бази биополимера (Pankaj и остали, 2014b, e, 2015).

2.7.2.2. Промене морфологије третираних површина

Из истраживања на полимерним и текстилним материјалима је познато да третман хладне плазме доводи до површинског нагризања третиране површине. Слични ефекти су уочени и на кори лимуна након третирања хладном плазмом. У неким DBD плазма третманима дошло је и до оштећења ткива што је резултирало повећаном дифузијом и увећањем у екстракцији уља (Kodama и остали, 2014). Док ово и слична истраживања указују на нове могућности за третмане плазмом, све промене се морају темељно изучити знајући да у току третмана хладном плазмом може доћи и до оксидације уља. Поменута нежељена промена је потврђена на лимуновом уљу третирано плазмом у ваздуху или у гасовима O₂, N₂. Како су ово ипак само резултати истраживања, она свакако показују потенцијал који поседује технологија хладне плазме у прехранбеној индустрији.

2.7.2.3. Модификације структуре и особина прехранбених производа

Приликом примене хладне плазме неопходно је имати у виду могућност модификације структуре и утицаја на одређене особине производа. Могућности хладне плазме да утиче на промене структуре и понашање материјала се могу искористити за модификацију полимера. Међутим, идеја модификације производа плазмом, односно

структурних, функционалних и технолошких особина, је нова у области прехранбене технологије и постоји само мањи бој студија које се баве овом тематиком. Предложени су поступци којима би било могуће утицати на карактеристике хидрофобности или хидрофилности површине производа (Misra и остали, 2014). Аутори наводе пример деловања плазме на површину бисквита, које за последицу има равномернију расподелу уља и до 50% након само неколико секунди третмана. Такође, постоји велико интересовање за проучавање интеракције између плазме и протеинских супстанци у храни, док је улога плазме у инактивацији ензима неоспорно потврђена (Pankaj и остали, 2013; Sugowsky и остали, 2013; Tappi и остали, 2014). Међутим, потребно је истражити и неке друге занимљиве могућности примене у области модификације протеина и утицаја на њихове технолошке особине. У занимљивом истраживању из 2015. године, резултати су указали на увећање способности везивања и воде и масти од стране протеинима грашка након третмана хладном плазмом у ваздуху (Vubler и остали, 2015). Аутори су овакво понашање према налазима флуоросцентне спектроскопије довели у везу са променама на структури протеина.

2.7.2.4. Модификација структуре и својстава протеина

Прехранбени протеини, односно протеини прехранбених производа, су једна од најзначајих компоненти људске исхране због своје нутритивне вредности и технолошког значаја (Cannon, 1945). Уопштено посматрајући, протеини испољавају важне ефекте на физичко-хемијске особине, реолошко понашање, текстуру и сензорске особине производа. У технолошке особине протеина се сврставају способност да формирају или стабилизују мреже налик гелу, филмове, пене, емулзије и соллове (Foegeding и Davis, 2011). Ова разноврсност у технолошким особинама протеина је у вези са њиховом структуром, величином, конформацијом и површинским особинама, као и израженој склоности интеракције са другим састојцима хране -полисахаридима и липиди (Naqе и остали, 2016). Већина ензима протеинске структуре су кључни за одвијање биохемијских реакција (Zaks и Klibanov, 1984). Многи ензими, као што су протеазе, липазе, амлазе и лактазе данас имају велику примену и потенцијал у прехранбеној индустрији. Нутритивни и технолошки атрибути и активност ензима директно су повезани са њиховим аминокиселинским саставом и секвенцом, као и са њиховом структуром (Damodaran, 1994). У нетермалним, односно хладним плазмама до модификација протеина углавном долази под дејством реактивних врста кисеоника (ROS) у комбинацији са синергетичким утицајем реактивних врста азота (RNS) (Tolouie и остали, 2017). Мању улогу играју UV фотони и позитивно и негативни јони (Perni и остали, 2007). Реактивне кисеоничке врсте хладне плазме, ROS – нпр. Супероксид анјон радикал (O_2^-) или хидроксил радикал ($\cdot OH$) имају највећу улогу код бактерицидног дејства (Boudam и остали, 2006; Gaunt и остали, 2006). Ове врсте могу водити до нагризања ћелијских мембрана, затим умрежавања протеина или реакција

оксидације аминокиселина, нарочито бочних ланаца и остатака аминокиселина. Раније истраживања су показала да ROS као што је $\cdot\text{OH}$ могу довести до значајних промена у структури протеина који као крајњу последицу могу имати и цепање протеина на пептиде. Ток процеса оксидације је одређен доступношћу O_2 и O_2^- или његовог протонираног облика HO_2 . (Berlett и Stadtman, 1997). Овај тип реакција може довести до промена приликом формирања дисулфидних веза, као што је показано на примеру аргинина третираног микроталасном плазмом (Motrescu и остали, 2011). Оксидација аминокиселина које садрже сумпор је најизраженија промена протеина током третмана хладном плазмом (Lackmann и остали, 2015).

У истраживањима Такаи и остали (2014) проучавана је реактивност 20 аминокиселина приликом излагања хладној плазми. Након третмана на чак 14 аминокиселина пронађене су разлике при чему је дошло до смањења садржаја метионина, цистеина и ароматичних аминокиселина. На основу добијених резултата је закључено да третман хладном плазмом повећава реактивност аминокиселина које садрже сумпор или ароматични прстен. Метионин има највећу реактивност са плазмом, а следе цистеин, триптофан, фенилаланин и тирозин. Такође, резултати поменутог истраживања указују да третман хладном плазмом доводи и до оксидације остатака метионина те да се те реакције дешавају брже од реакција оксидације цистеинских остатака. Ови резултати су у сагласности са претходним истраживањима (Lackmann и остали, 2015). Током испитивања инактивације GapDH (глицералдехид 3-фосфат дехидрогеназе) указано је на могућност да присутна аминокиселина цистеин буде оксидисана селективно (Lackmann и остали, 2013), односно да позиција аминокиселине у конформацији протеина може у одређеној мери одредити место деловања активних врста плазме. Истраживања исте групе аутора такође указују да излагање неких аминокиселина DBD плазми након оксидације цистеина воде дисоцијацији дисулфидних веза (Lackmann и остали, 2015). Иреверзибилно сулфонување дисулфидно везаног цистеина у глутатиону установљено је након излагање ROS врстама из хладне плазме (Deutsch и остали, 1999). Такође, истраживања показују могућност да под утицајем хладне плазме дође до формирања дисулфидних веза (Ke и остали, 2010; Ke и остали, 2013). Такаи и остали, (2014) сугеришу да се процеси формирања дисулфидних веза и сулфонирање цистеина одвијају паралелно.

Јединствена својства теста и пецивост пшеничног брашна првенствено зависе од структуре и количине протеина глутена (Besker и остали, 2012). Почетна истраживања утицаја хладне плазме на протеине брашна указују да третман DBD хладном плазмом води до промена у молекуларним масама и растворљивости, услед реакција оксидације што узрокује промене у способности везивања воде и способности стварања глутенске мреже (Bahrami и остали, 2016). Након третирања, протеини пшеничног брашна су имали мањи садржај мономера, укључујући и протеинске фракције албумина и глобулина, а повећан садржај фракција веће молекулске масе. Овакве промене доводе

до ојачања глутенске мреже теста. Ово је и потврда претходних истраживања која су указала на промене модула еластичности, вискозности и јачине брашна (Misra и остали, 2015a). Промене у реолошким особинама би могле бити у вези са увећаним бројем дисулфидних веза између глутенских фракција протеина након третирања хладном плазмом. Интензитет поменутих промена зависи од времена третмана и радног напона, односно од карактеристика примењене плазме (Misra и остали, 2015a). Претпоставља се да је прелазак сулфхидрилних (-SH) група у дисулфидне везе (S-S) је основни узрок наведених промене у понашању протеина.

Промене у структури, односно модификацији протеина, се доводе у везу са слободним радикалима и озоном насталим у плазми (Dong и остали, 2017). Утицај хладне плазме на својства протеина брашна грашка (*Pisum sativum*) такође је проучаван. Резултати указују да након третмана до 10 минута, долази до повећања способности везивања воде од 113%, односно способности везивања уља од 116% (Bußler и остали, 2015). У истраживању Segat и остали, (2015) о утицају хладне плазме (од 1 до 60 минута) на протеински изолат сурутке у раствору уочене су промене у индексу хидрофобности након 15 минута третмана. До промена највероватније долази услед оксидације аминокиселина што резултатира повећаним садржајем карбонилних група и површинске хидрофобности протеина. Штавише, губитак слободних -SH група је вероватно настао оксидацијом аминокиселине цистеин што води ка агрегацији протеина. Оваква истраживања су врло значајна за свеобухватније разумевање деловања хладне плазме на фундаменталном нивоу. Таква сазнања ће бити од непроцењиве користи при конструисању нових извора хладне плазме у циљу постизања оптималних услова и повећања ефикасности.

2.7.2.5. Разградња микотоксина

Као нови приступ смањења садржаја присутних микотоксина у храни у ланцу од њиве до трпезе, од скора је интензивирано испитивање хладне амтосферске плазме као нове нетермалне технологије у прехранбеној индустрији. Неке од предности ове технологије су ефикасност са кратким временом третмана, изостанак резидуа, низак негативни или позитиван свеукупан утицај на квалитет третираних прехранбених производа и умањени трошкови када се користи амбијентални ваздух као радни гас (Misra и остали, 2011; Misra и остали, 2015a; Vukić и остали, 2018; Руаџ и остали, 2018). Идеја за примену хладне плазме у третманима микотоксина потиче од недавних истраживања третмана патогених бактерија (Kayes и остали, 2007; Niemira, 2012) као и из студија које се тичу ефеката плазме на хемијска и биолошка једињења које су показале обећавајуће резултате (Misra, 2015b; Sarangapani и остали, 2017; Sarangapani и остали, 2019). Најновији објављени резултати показују да би хладна амтосферска плазма евентуално могла превазићи највеће недостатке класичних техника и осигурати одрживо решење за детоксикацију микотоксина (Siciliano и остали, 2016; ten Bosch и

остали, 2017; Misra и остали, 2019; Hojnik и остали, 2019). Широки спектар високо реактивних врста и ултраљубичасто зрачење из хладне плазме омогућавају разградњу неких од микотоксина. Park и сарадници (2007) бележе разградњу афлатоксина В1, деоксиниваленола и ниваленола са микроталасно индукованом аргонском плазмом у околном ваздуху као радним гасом. У раду Shi и сарадника (2017), третман са хладном атмосферском плазмом од 10 минута доводи до смањења садржаја афлатоксина у узорку кукуруза за 82%. Третирање хладном атмосферском плазмом афлатоксина на лешницима у трајању од 12 минута показала се као веома ефикасна, обезбеђујући 70% редукције присутних укупног афлатоксина (Siciliano et al., 2016). Ten Bosch и сарадници (2017) истраживали су могућност разградње ААЛ токсина, фумонизина В(1), ениатина В, стеригматоцистина, Т-2 токсина и зеараленона хладном атмосферском плазмом. Шест наведених микотоксина је третирано у облику стандардних раствора, док су четири микотоксина (фумонизин В(1), ениатин В, стеригматоцистин и зеараленон) кориштени за испитивање ефекта матрице под истим условима третмана. Резултати су указали да се кинетика разградње стандардних раствора микотоксина може описати експоненцијалном једначином док су у матриксу брзине деградације редуковане за сва четири испитивана микотоксина и могу се описати линеарном једначином. Сва наведена истраживања указују да је са технологијом хладне плазме, могуће извести разградњу микотоксина. Третман са овом техником би био одрживији а захтевао би мање енергије и улагања у односу на класичне технике.

Janić Najnal и остали (2019) објавили су прва сазнања о понашању *Alternaria* токсина (АОН, АМЕ и ТЕН) под утицајем третмана хладне атмосферске плазме у пшеничном брашну. Наведени *Alternaria* токсини су квантификовани применом проширене и валидоване LC-MS/MS методе (4.3.12. – Одређивање концентрације *Alternaria* токсина). Резултати овог истраживања део су ове докторске дисертације (5.4 – Испитивање могућности примене третмана хладном атмосферском плазмом на редукцију *Alternaria* токсина у пшеничном брашну). Како би се створила погодна хемија плазме, која може разарати микотоксине, неопходна је потпуна карактеризација и оптимизација извора хладне атмосферске плазме. Формирање реактивних врста у плазми одвија се према сложеним реакционим механизмима који зависе од великог броја фактора, од који су најзначајнији: предата снага, фреквенција високонапонског сигнала, радни гас и геометрија електрода (Turner, 2016; Maletić и остали, 2017). Због тога би избор најефективнијег извора плазме у великој мери условљен ефикасношћу разградње микотоксина. Хладна атмосферска плазма која се реализује у ваздуху или гасној смеси са ваздухом ствара реактивне јоне и реактивне неутралне врсте кисеоника (енгл. ROS) (кратког или дугог времена постојања) и азота (енгл. RNS) (Pârvulescu и остали, 2012; Graves, 2012; Yonemori и Ono, 2014; Hasan и Walsh, 2016). Озон је за сада идентификован као реактивна врста која директно утиче на разградњу микотоксина

(Olszewski и остали, 2014; Wang и остали, 2016). Међутим, осим самог озона, хладна плазма у ваздуху доводи до формирања ROS и RNS радикала као и ултраљубичастог зрачења, што резултује већом ефикасношћу разградње микотоксина са краћим временима експозиције у плазма третманима у односу на третмане где је коришћен озон. Према томе, очигледно је да и друге реактивне врсте произведене у плазми имају важну улогу у процесу разградње (Misra и остали, 2015b).

2.7.3. Регулаторни и безбедносни аспекти технологије

Из перспективе регулативног уређења прехранбене индустрије, одобрење за употребу плазма технологије, без обзира да ли се ради о директним, индиректним или хибридном третманима, прехранбених производа или амбалажних материјала, захтева да се реализује и анализира велики број експерименталних истраживања. Услед комплексности хемије плазме и великог броја могућих хемијских промена у третираним узорцима, та истраживања ће сигурно бити дуготрајна због чега је потребно одредити приоритете. Главни циљеви истраживања треба да буду усмерена на безбедност, алергеност и токсиколошка испитивања хране третиране хладном плазмом. Процедура добијања безбедносног одобрења за храну Европске Комисије је дефинисана у МЕМО-15 5875. Међутим, у овом тренутку постоји несигурност по питању процедура за одобрење технологије хладне плазме услед непостојања дефинисаних критеријума евалуације евентуалног ризика по јавно здравље као и због непотпуне слике о утицају третмана на нутритивну вредност хране.

2.7.4. Поверење потрошача

Пре имплементације било које иновативне технологије у прехранбену индустрију неопходно је испитати ставове потрошача и одредити ниво њиховог поверења (da Costa и остали, 2000). Ово је пре свега битно због чињенице да потрошачи могу нове технологије посматрати као технологије са повећаним ризиком. У данашње време потрошачи захтевају храну која је минимално прерађена, задовољава њихове нутритивне и сензорске стандарде а са друге стране захтева и минимално припремање. Истраживања показују да је прихватање нових технологија, које могу да омогуће овакве особине хране, засновано на схватању повезаних ризика од стране јасности и кредибилности извора информација (Cullen и остали, 2011). Ипак, истраживања потрошачких ставова константно показују да потрошачи имају мало знања и слабо разумевање многих нових технологија у прехранбеној индустрији. Овакво стање успорава афирмацију тих технологија и њихову примену у пракси. Како ће јавност прихватити нове прехранбене технологије засноване на хладној плазми, данас је тешко предвидети. Одсуство негативних ефеката технологије плазме на околину, који су резултат употребе гасова и високе енергетске ефикасности, би требали бити јасно

наглашени. Пошто је познато је да се рекламним кампањама може утицати на ставове потрошача, научници и технолози су експерти који би информисањем јавности о развоју технологије хладне плазме за прехранбену индустрију могли да прошире идеју о позитивним ефектима и потенцијалу саме технологије.

2.8. Микотоксилошка безбедност пшеничног брашна

Када се пшеница и производи од пшенице посматрају са аспекта биолошке безбедности види се да присуство токсигених гљива и њихових секундарних метаболита, микотоксина представљају највећу биолошку и хемијску опасност (Doolotkeldieva, 2010). Микотоксини су секундарни продукти метаболизма филаментозних гљива и чине групу најчешћих и најпознатијих биохемијских загађивача хране уопште. Међу житима, пшеница заузима треће место по укупно произведеним количинама у свету, а по свом уделу у исхрани људи се налази на првом месту (FAOSTAT, 2019; Drog и остали, 2020). Све наведено указује да присуство микотоксина у производима од пшенице може представљати висок ризик по здравље људи чак и онда када су микотоксини присутни у релативно малим концентрацијама услед релативно великог удела производа на бази пшенице у исхрани људи. Услед климатских промена, а као последица глобалног загревања, учесталост појаве микобиота може бити већа те је већа и опасност од њиховог негативних утицаја на безбедност производа као и негативни утицај на квалитет производа од пшенице. Неке токсигене гљиве су у стању да производе већи број микотоксина као што и неке микотоксине производи већи број гљива, а самим тим веома често пољопривредни производи могу бити контаминирани са више од једног микотоксина (Hussein и Brasel, 2001). Најчешће изоловане токсигене гљиве са зрна пшенице припадају родовима *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* и *Alternaria* (Bhat и остали, 2010). Данас је познато око 650 различитих микотоксина, које се по својој хемијској структури класификују у око 25 различитих група хемијских једињења (Klaffke, 2010). Посматрани са гледишта безбедности хране и постојећег регулаторног оквира у најзначајније микотоксине се убрајају следеће групе микотоксина: афлатоксини (AFs), деоксиниваленол (DON), Т-2 токсин (Т-2), ХТ-2 тоxin (HT-2), зеараленон (ZEN), фумонисини (FBs), охратоксин А (ОТА), ергот алкалоиди (EAs), патулин и цитрин. Ово је очигледно не само због великог броја објављених истраживања и многих међународних и националних извештаја о процени њихове токсичности и процени изложености, већ и због опсежних стандарда и успостављеног законодавства. Прописи о максималној дозвољеној концентрацији ових најзначајнијих микотоксинима у

појединим сировинама и храни успостављени су на светском, европском и националном нивоу већ дужи низ година ради заштите здравља људи од штетних утицаја ових једињења (Eskola и остали, 2018; EUR-Lex 2018; WHO 2018).

Тачан разлог стварања микотоксина од стране гљива није установљен али се зна да је њихово настајање уско повезано са еколошким условима и омогућавања њиховог преживљавања под различитим условима (Magan и Aldred, 2007). Раст гљива и стварање микотоксина, у присуству погодних услова, могу се одиграти у различитим стадијумима развоја биљака, пре жетве на пољу или у фазама складиштења и транспорта након жетве (Bhat и остали, 2010). Секундарни метаболизам гљива, настаје под утицајем генетских механизма као одзив на стимулусе из окружења (Shwab и Keller, 2008). Основни стимулуси за стварање микотоксина су температура и активност воде (a_w), (Sanchis и Magan, 2004). Акутна и хронична изложеност микотоксинима може изазвати различите штетне утицаје на здравље људи и животиња што их чини изузетно релевантним пољопривредним загађивачима хране. Синдроми токсичности који настају као последица уноса микотоксина од стране људи и животиња познати су под називом „микотоксикозе“. Микотоксикозе су познате већ дуже време, али су све до раних шездесетих година двадесетог века биле такозване „занемарене болести“ (Forgacs и Carll, 1962). Ниво штетног дејства микотоксина на људе и животиње пре свега зависи од врсте микотоксина, унете концентрације, периода изложености, здравственог стања те од старосне доби и пола. Многа истраживања указују да микотоксини испољавају неуротоксичке, канцерогене, естрогене, мутагене и имуносупресивне ефекте. Највећи број микотоксина испољава утицај на имуни систем човека и животиње што за последицу може имати увећане подложности другим болестима (Prelusky и остали, 1993). Главни извор контаминације пшенице микотоксинима представљају филаментозне гљиве рода *Fusarium* spp.. У последњих неколико година а услед климатских промена долази до појаве других токсигених гљива, при чему истраживања све више су усмерена на такозване „нове микотоксине“ (енгл. “emerging mycotoxins“). Ови „нови микотоксини“ се дефинишу као микотоксини који се рутински не одређују нити су законски регулисани; међутим, докази о њиховој учесталости брзо се увећавају (Vaclavikova и остали, 2013). Међу овим микотоксинима највећу пажњу истраживача привлаче *Fusarium* микотоксини фузапролиферин, ениатин, беауверицин и монилиформин (Jestoi, 2008) као и токсини рода гљива *Alternaria*. Услед велике учесталости појављивања на пшеници рода гљива *Alternaria*, *Alternaria* токсини привлаче све већу пажњу истраживача (Gruber-Dorninger и остали, 2017). У случају инфекције пшенице, гљива рода *Alternaria* доводи до дисколоризације клице и семена и проузрокује болест звану „тамнокличност“.

2.8.1. Микотоскини рода *Alternaria*

Alternaria је свеприсутни гљивични род који припада највећем колену гљива познатом као *Ascomycota* или мешинарске. Због способности гљива из рода *Alternaria* spp. (око 300 врста) да се развијају у широком температурном интервалу спољашње средине (од 4 °C до 35 °C), па чак и на ниској температури од -3 °C, контаминација пољопривредних култура и производа са гљивама из рода *Alternaria* може се јавити и после жетве, чак и током складиштења у хладњачи или током транспорта. Учесталост и способност овог рода да производе широк спектар секундарних метаболита (више од 70) је значајна и може представљати претњу здрављу људи и животиња (Ostry, 2008; Rose и остали, 2010). Од многобројних секундарних метаболита рода *Alternaria* само неколико од њих је хемијски окарактерисано као микотоксин (алтернариол (АОН), алтернариол монометил етар (АМЕ), тенуазонска киселина (ТеА), тентоксин (ТЕН), алтертоксини (АТХs), *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* токсини, стемфилтоксин III и алтенуен (АЛТ)) са негативним ефектом на здравље људи и животиња (EFSA, 2011; Walravens и остали, 2014). Због чињенице да преовладава као хемијски контаминент у различитим намирницама (жита и производи на бази жита, парадајз и производи на бази парадајза, сунцокрет и сунцокретово уље, воће и поврће и њихови производи, вино и пиво) мутагени, тератогени и евентуално канцерогени ефекти *Alternaria* токсина могући су због кумулативног ефекта (Pinto и Patriarca, 2017). Досадашња истраживања њихове токсичности показују да је ТеА акутно токсичан за мишеве, живину и псе (Рего и остали, 1973). Brugger и остали (2006) указују да АОН и АМЕ исказују генотоксичне и мутагене ефекте инвитро док АОН уништава топоизомеразе (Fehr и остали, 2009). Упркос строгим регулаторним ограничењима и облицима интензивног надзора утврђеним за бројне микотоксине у Европској унији и другде, ни до данас нису утврђене законски обавезујуће границе нити смернице за *Alternaria* токсине у храни или храни за животиње. Додатни разлог за забринутост и отежавајућу околност за спровођење процене њихове безбедности представља могућност одигравања хемијских модификација *Alternaria* токсина током метаболизма биљака или животиња (Hildebrand и остали, 2015) или чак самих гљива (Soukup и остали, 2016). При томе се могу формирати коњугати микотоксина који се називају „маскирани“ или „модификовани“ микотоксини (Rychlik и остали, 2014). Према Европској агенцији за безбедност хране (енгл. *European Food Safety Authority - EFSA*), међу факторима ризика за изложеност преко хране *Alternaria* токсинима су и жита и производи на бази жита (EFSA, 2011; 2016; 2017). Посљедњих година, многе студије су показале да присуство *Alternaria* токсина у пшеници из Европе, Африке, Азије, Аустралије и Сјеверне и Јужне Америке не треба потценити (Scott и остали, 2012; Müller и Korn, 2013; Janić Hajnal и остали, 2015; Covarelli и остали, 2016; Xu, и остали, 2016; Egbontan и остали, 2017), с обзиром на релативно висок удео производа на бази жита у исхрани људи и животиња.

2.8.2. Технике редукције *Alternaria* токсина у процесима прераде пшенице

Упркос вишегодишњим истраживањима и увођењу добре пољопривредне и производне праксе у прехранбени ланац производње и прераде, појава микотоксина и даље остаје глобални проблем. Значајни економски губици повезани су са утицајем микотоксина на здравље људи, добробит животиња, продуктивност, и домаћу и међународну трговину (Wu и Mitchell 2016; Pitt и Miller 2017). Превенција контаминације пшенице гљивама које продукују микотоскине је најефикаснији и најјефтинији приступ смањењу ризика који прате присуство микотоксина храни и храни за животиње. Ипак, овај приступ није увек могућ, нарочито онда када услови околине погодују развоју и расту токсигених филаментозних гљива (Јанић Најнал и остали, 2015). Истраживања са циљем проналажења третмана који би омогућио разградњу *Alternaria* токсина су малобројна. Само неколико студија је спроведено о понашању *Alternaria* токсина применом конвенцијалних технолошких поступака прераде пшенице (Siegel и остали, 2010; Јанић Најнал и остали, 2016a,b; 2019a,b; 2020). Утицај вршидбе пшенице на садржај АОН, АМЕ и ТеА, истраживали су Јанић Најнал и остали (2016a) при чему добијени резултати су указали да се иницијални садржај присутних *Alternaria* токсина у пшеници пре жетве у значајној мери смањује при самој вршидби пшенице услед уклањања плевице где су они концентрисани. Применом поступка чишћења зрнене масе пшенице може се остварити значајно смањење садржаја присутних *Alternaria* токсина до око 50% услед уклањања одвојивих примеса (плева, прашина, лом, болесна и штура зрна) из зрнене масе пшенице (Јанић Најнал и остали, 2016b), при чему степен редукције садржаја присутних *Alternaria* токсина зависи и од њихове почетне концентрације у зрненој маси пре поступка чишћења. Процес млевења пшенице смањује садржај *Alternaria* токсина у пшеничном брашну само услед прерасподеле *Alternaria* токсина у поједине фракције млевења (Јанић Најнал и остали, 2019a), при чему као производи са ниским ризиком у погледу појаве и концентрације *Alternaria* токсина, могу се истаћи бела брашна, док тамне фракције брашна, мекиње и осевци представљају производе високог ризика. Siegel и остали (2010) испитивали су хемијску стабилност АОН, АМЕ и ALT при различитим температурним третманима интегралног пшеничног брашна ком је додата позната концентрација наведених *Alternaria* токсина са и без додатка воде. У случају третмана интегралног брашна са додатком воде (влажно печење) на 200 °C током 45 – 60 минута или на 230 °C током 30 – 45 минута није дошло до деградације наведених *Alternaria* токсина, док значајна деградација од око 90% за ALT, 70% за АОН и око 50% за АМЕ је утврђена након излагања интегралног пшеничног брашна без додатка воде (суво печење) температури од 230 °C у трајању од 60 минута. Нажалост, према ауторима Siegel и остали (2010), наведени услови не могу да се користе као поступак предтретмана брашна за

деконтаминацију, јер долази до промене боје и мириса брашна. Надаље, утврдили су да при наведеним условима термичког третмана стабилност *Alternaria* токсина смањује се следечим редоследом: АМЕ>АОН> АЛТ. Јанић Најнал и остали (2019b) спровели су истраживања о утицај термичке обраде пшеничног теста током производње хлеба на могућност редукције *Alternaria* токсина (АОН, АМЕ и ТеА). Иако је у тесту током ферментације забележено смањење садржаја ТеА за 29,2% и повећање садржаја АМЕ за 13,8%, у односу на њихов садржај у тесту након мешања (0 мин), њихов садржај у хлебу био је на истом нивоу као у сировини. Након завршне ферментације садржај АОН у тесту се смањило за 31,8%, док је у хлебу његов садржај био мањи за 34,8% у односу на садржај АОН у тесту након мешања (0 мин). Резултати прелиминарног истраживања групе аутора Јанић Најнал и остали (2020) о кинетици разградње *Alternaria* токсина током дуготрајне ферментације течног киселог пшеничног теста уз додатак бактерија млечне киселине указују да метаболички процеси квасца и бактерија млечне киселине као и други биохемијски процеси могу имати различите улоге у смањењу садржај *Alternaria* токсина. Максимално смањење садржаја ТеА од 60,3%, АОН од 41,5% и АМЕ од 24,1% остварено је након 48 сати ферментације на 25 °С. Надаље, потенцијал једнопужног екструдера у функцији редукције *Alternaria* токсина у пшеници испитани су од стране Јанић Најнал и остали (2016). Највећа редукција АОН (87,9%), АМЕ (94,5%) и ТеА (65,6%) у пшеничном брашну од целог зрна пшенице постигнут је у случају примене високе влаге полазног материјала (w=24%), велике брзине протока материјала (q=25 kg/h) и средња брзине обртаја пужа (v=390 обртаја/мин.). Наведена истраживања указују да се чишћењем зрнене масе пшенице може значајно смањити садржај АОН, АМЕ и ТеА. Процес млевења води само расподели *Alternaria* токсина у пасаже млевења, примена хидротермичког третмана пшенице доводи до значајног смањења садржаја АОН, АМЕ и ТеА у произведеним екструдатима, дуготрајна ферментација пшеничног теста уз додатак квасаца и бактерија млечне киселине показује потенцијал за редукцију АОН, АМЕ и ТеА, док примена конвенционалног процеса производње хлеба готово не утиче на разградњу испитиваних *Alternaria* токсина.

Према томе, развој техника детоксикације зрна пшенице и производа на бази пшенице контаминираних гљивом рода *Alternaria* питање је од велике важности. На овај начин индустрија би се заштитила од безбедносних и економских губитака услед контаминације. Многе стратегије за развој такве технике, као што су термичка инактивација, зрачење UV или гама зрацима, ултразвучно третирање, хемијска, биолошка и ензимска детоксикација су разматране (Park и остали, 1988; Murata и остали, 2008; Halász и остали, 2009; Aiko и остали, 2016; Wang и остали, 2016; Shanakhat и остали, 2019; Јанић Најнал и остали, 2020). Важно је напоменути да, упркос сталним побољшањима, услед високе хемијске стабилности микотоксина, ове класичне технике исказују недостатке као што су дуго време третмана, показују недовољну

ефикасност у уклањању микотоксина, а неке су и штетне по животну средину. Стога, оне нису енергетски ефикасне а све горе поменуто их чини скупим за имплементацију (Misra и остали., 2019). Наведене технике такође могу изазвати негативне ефекте на сензорске, нутритивне и функционалне особине третиране хране па чак и довести до опасности по здравље (Smith и Girish, 2012; Shanakhat и остали, 2019). Услед горе наведених недостатака, научна јавност као и прехранбена индустрија наставља потрагу за брзим и ефикасним технолошким решењем за детоксикацију микотоксина. Један од обећавајућих иновативних техника за смањење садржаја присутних микотоксина у храни и храни за животиње представља третман са хладном плазмом.

3. ЦИЉ РАДА

На основу досадашњих сазнања о ефектима хладне атмосферске плазме, пре свега на структуру и својства протеина, постављен је циљ дисертације: *утврђивање могућности побољшања технолошког квалитета и безбедности пшеничног брашна применом хладне атмосферске плазме.*

Истраживања у првом делу дисертације била су усмерена на сагледавање корелативних односа између ретенционе способности пшеничног брашна, односно параметара SRC методе и показатеља квалитета брашна одређених стандардним емпиријским методама. Испитивања су спроведена на већем броја пасажних брашна добијених мљевањем у индустријским условима.

У другом делу дисертације развијен је и окарактерисан извор хладне атмосферске плазме у ваздуху типа SDBD, а потом испитан утицај параметара третмана хладном атмосферском плазмом (време, тип третмана, удаљеност узорка од извора) на вредности показатеља квалитета протеинског комплекса пшеничног брашна стандардног квалитета.

Трећи део истраживања је усмерен на испитивање утицаја оптималног третмана хладном атмосферском плазмом на пецивна својства пшеничног брашна. На бази резултата лабораторијског пробног печења са брашном третираним хладном атмосферском плазмом при оптималним условима испитан је потенцијал третмана у побољшању квалитета три врсте хлеба: пшеничног хлеба (основна врста), мешаног хлеба са целим зрном (мешани хлеб) и хлеба са мекињама (специјална врста хлеба).

Четврти део истраживања је усмерен на испитивање ефеката третмана хладном атмосферском плазмом на разградњу *Alternaria* токсина, односно на побољшање безбедности пшеничног брашна.

4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

Експериментални део ове докторске дисертације урађен је у лабораторијама Технолошког факултета Зворник, Универзитет у Источном Сарајеву, лабораторијама Технолошког факултета Нови Сад, и Научног института за прехранбене технологије у Новом Саду, Универзитет у Новом Саду. Карактеризација плазма извора, вршена је у Центру за неравнотежне процесе, Лабораторији за неравнотежне процесе и примену плазме Института за физику, Универзитета у Београду.

4.1. Материјали

У првој фази експерименталног дела коришћена су пшенична пасажна брашна из редовне производње млина „Моларис“ д.о.о. Зворник, Република Српска, БиХ. Поједностављени дијаграм млевења приказан је на слици 9. Млевни ток састоји се од четири пролазишта крупљења (В1-В4), једног пролазишта растварања гриза (D1) и пет пролазишта млевења гриза и осевака (С1-С5). На сваком од четири пролазишта крупљења добија се по једно пасажно брашно (В1 I – В4 I). Додатно, прелаз крупљевине са четвртог крупача усмерава се на вргач мекиња, а пропад са вргача мекиња додатно се просејава на одговарајућем одељењу планског сита при чему се добија још једно пасажно брашно (В5 I). На пролазишту растварања гриза издвајају се два пасажна брашна (D1 I и D1 II), као и на пролазиштима млевења гриза и осевака (С1 I и II – С5 I и II). Додатно, прелаз са последњег пролазишта у фази млевења гриза и осевака додатно се просејава на одељењу планског сита при чему се добијају још два пасажна брашна (С6 I и II). Мекиње су издвојене на чистилици гриза и вргачу мекиња. Због значајно различитих карактеристика у односу на брашно, ове две фракције млива (мекиње) су занемарена те је читав екперимент прве фазе спроведен на поменутих 19 пасажних брашна. У поступку млевења не издваја се клица као засебни споредни производ.

Пшенично брашно Т-400 које је коришћено у другој, трећој и четвртој фази експерименталног рада набављено је из редовне производње млина „Данибиус“ а.д.

Нови Сад, Република Србија. Пшенично брашно Т-400 са 9,6% протеина, пепелом од 0,44% и уделом воде од 14,1% исказало је и следеће реолошке показатеље квалитета:

- Фаринографску моћ упијања воде од 51,8%,
- Развој теста од 1,3 минута,
- Стабилитет теста од 0,3 минута,
- Степен омекшања од 52 ВU и
- Квалитетни број 56.

Према наведеним показатељима квалитета брашна, брашно је спадало у квалитетну класу В-1 а карактеризацијом на екстензографу добијени су и следећи показатељи квалитета:

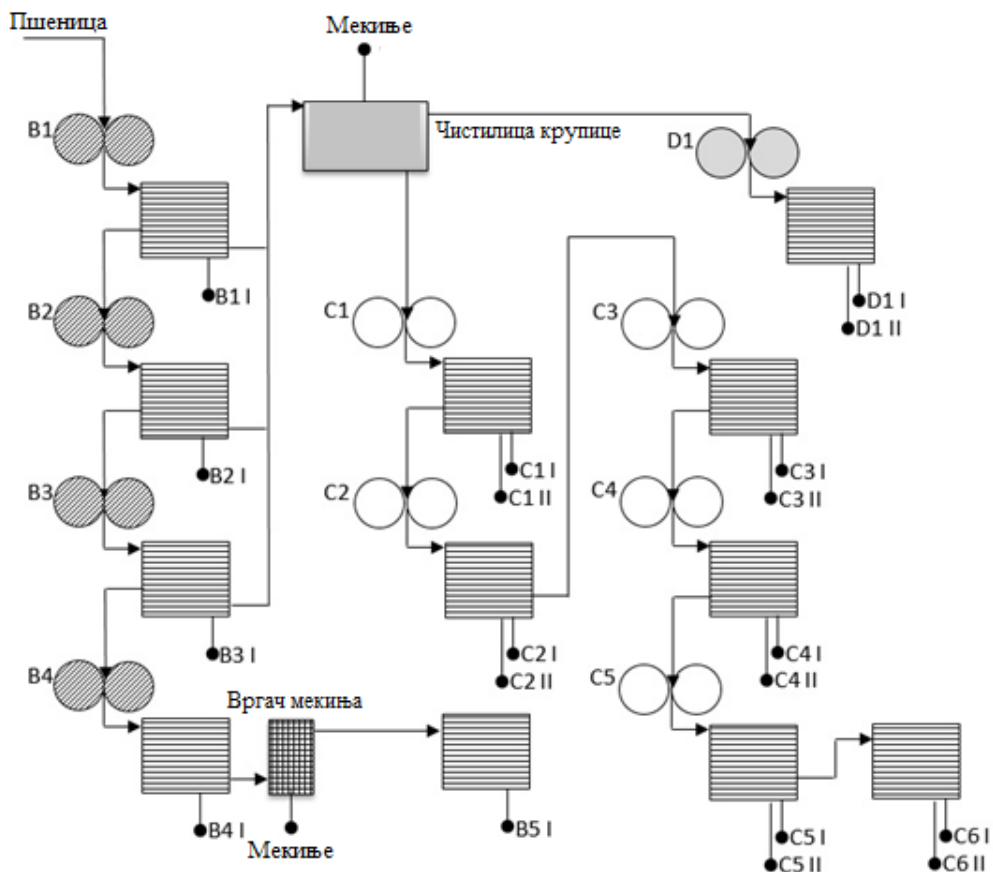
- Енергија од 104 cm²,
- Отпор од 444 ВU,
- Растегљивост од 137 минута и
- Максимални отпор од 607 ВU.

Интегрално брашно, мекиње и млива пшеничног зрна која су коришћени као природно контаминирани узорци са *Alternaria* токсинима обезбеђени су из лабораторије Научног института за прехранбене технологије у Новом Саду. Природно контаминирани узорци сачињавали су узорци мекиња (ознака узорка 11) и узорци интегралног брашна (ознака узорка 1, 2, 3, 4, 5 и 8) набављени на тржишту као и млива пшеничног зрна (ситне мекиње ознака узорка 6 и 10; крупне мекиње 7 и 9) контаминираних *Alternaria* токсинима.

Након третмана хладном плазмом сви узорци брашна за микотоксиколошку анализу су чувани на - 20 °С.

Састав основног теста чиниле су следеће додатне сировине:

- Кухињска со - комерцијални производ, произвођач ДП "Со продукт", Београд
- Пекарски квасац, Врење, Београд.
- Водоводска вода за пиће

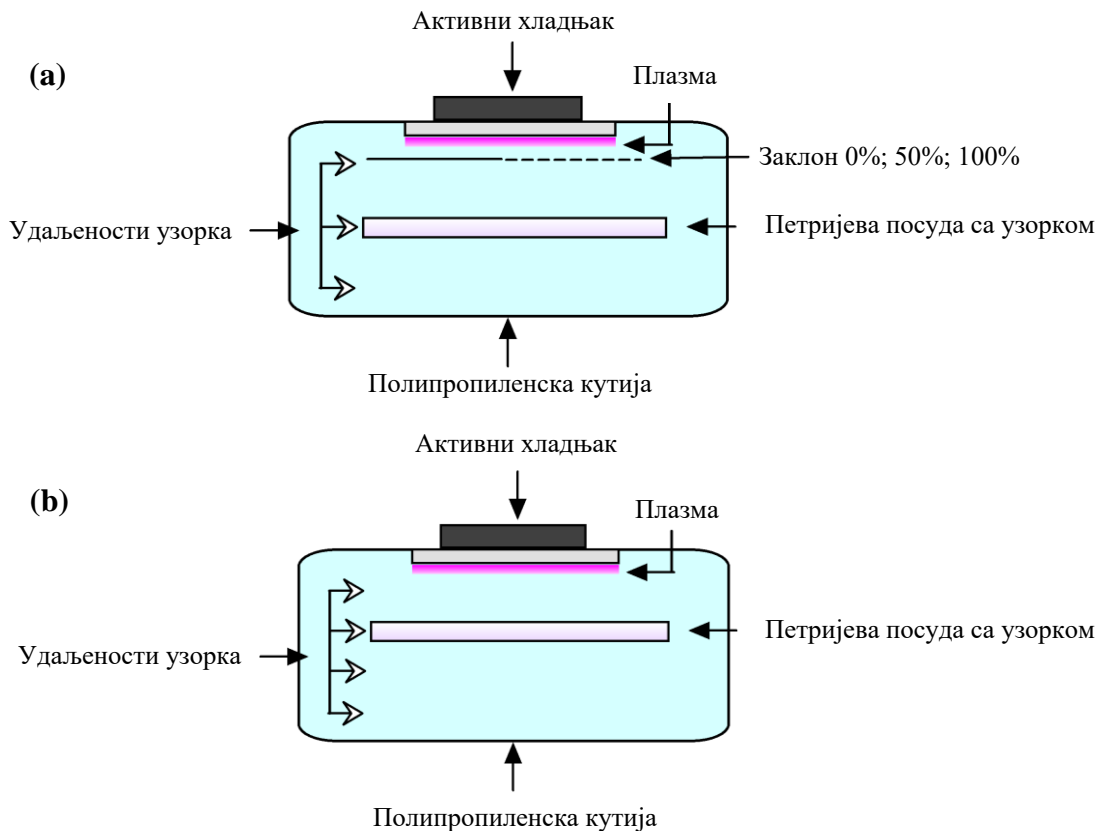


Слика 9. Поједностављен дијаграм млевења пшенице: 1 – 5: пасаже крупљења (B), 6 – 17: пасаже млевења гриза и осевака (C), 18 – 19: пасаже растварања гриза (D).

4.2. Конструкција извора хладне атмосферске плазме

Шематски приказ плазма уређаја приказан је на слици 10. Уређај сачињавају SDBD извор, активни систем хлађења, провидна полипропиленска кутија и држач за Петријеве посуде пречника 100 mm. SDBD извор се састоји од доње сегментиране електроде, горње плочасте електроде између којих се налази керамички диелектрик дебљине 2 mm укупне дужине 70 mm и ширине 40 mm. Доњу электроду чини 9 паралелних трака ширине ~ 1 mm постављених дуж керамичке плоче. Размак између трака је 4 mm, на једном крају су спојене и повезане на извор високог напона. Горња површина диелектричне површине прекривена је термо-проводним слојем и спојена са уземљењем извора високог напона. Преко овог слоја систем је активно хлађен током рада преко ваздушног хладњака постављеном на врху SDBD извора. Електрично коло извора плазме се састоји од SDBD извора, комерцијалног високонапонског трансформатора и варијабилног трансформатора прикљученог на електричну мрежу. Варијабилни трансформатор служи као регулатор напона на улазу у високонапонски

трансформатор, а промена напона се могла вршити у опсегу 0-220 V RMS. Стабилна плазма у ваздуху се формира на SDBD извору за напон од 200 V на варијабилном трансформатору. Шематски приказ плазма уређаја приказан је на слици 10.



Слика 10. Шематски приказ плазма уређаја коришћеног за третмане: **(а)** Поставка за третирање брашна; **(б)** Поставка за третирање микотоксина

Електрични параметри плазме примењени у третманима као и детаљне карактеристике плазма система приликом третмана узорка брашна су приказане у табели 4.

Табела 4. Карактеристике SDBD извора хладне плазме.

Параметар*	Вредност
Напон варијабилног трансформатора/фреквенција	200V /50 Hz
Примењен RMS напон/јачина	2340 V/ 0,094А
Тежина узорка	10 g
Димензије кутије* (Д × Ш × В)	195 mm ×125 mm × 65 mm
Температура гаса	≈ 40 °С

*Д: дужина, Ш: ширина, В: висина.

Упрошћен шематски приказ поставке за третирање пшеничног брашна у циљу одређивања утицаја хладне атмосферске плазме на технолошка својства пшеничног

брашна приказан је на слици 10 (а). Узорци су подвргнути третману у Петријевим посудама према централном композитном плану (енгл. Central Composite Design (CCD)) за спровођење експеримента. За факторе које дефинишу услове третмана, изабрана су три независно промењива параметра: време, раздаљина узорка од површине SDBD извора и степен искоришћења заклона. Као заклон коришћена је диелектрична плоча која је постављена непосредно испод активне запремине плазме. Степени искоришћења заклона су означени процентима и износили су: 0% - мерење без заклона, 50% - мерење са заклоном који прекрива половину активне површине плазма извора и 100% - мерење са заклоном испред целе активне површине формиране плазме. Параметри су посматрани на три нивоа у укупно 17 експерименталних тачки. Промене параметара у третманима приказане су у табели 5.

Табела 5. Кодови и нивои услова третмана по централно композитном плану.

Услови третмана	Кодови нивоа		
	- 1	0	1
x ₁ : Време третирања (s)	30	105	180
x ₂ : Растојање узорка од плазме (mm)	6	28	50
x ₃ : Степен искоришћења заклона (%)	0	50	100

Шематски приказ поставке експеримента за испитивање ефикасности разградње *Alternaria* микотоксина третманом са хладном атмосферском плазмом приказан је на слици 10 (б). За третмане је коришћено 10 g пшеничног брашна „спајковано“ са стандардним растворима АОН, АМЕ и ТЕН у концентрацији од по 100 µg kg⁻¹ у брашну. Спајковани узорци су подвргнути плазма третману у Петријевим посудама у трајању од 30 s, 60 s, 90 s, 120 s, 150 s и 180 s. У овом случају раздаљина узорка од извора хладне плазме су биле: 6 mm, 21 mm, 36 mm и 51 mm.

Приликом свих третмана, након стављања узорка и пре почетка третмана посуда је затворена како би се спречио губитак кроз цурење, реактивних врста плазме. Ваздух у кутији је био амбијентални и имао релативну влажност од (RH) од 45 ± 1% на собној температури. Температура гаса у кутији измерена је инфрацрвеним термометром (Fluke 64 MAX IR Thermometer, Washington, USA) одмах након искључивања плазме и износила је око 40 °C. Различита дужина третмана није знатно утицала на температуру узорка. Након третмана, узорци су уклоњени из кутије, пребачени у затворену врећицу и похрањени у замрзивач на температуру од - 20°C до тренутка анализирања.

4.3. Методе

4.3.1. Основне хемијске анализе брашна

- **Садржај влаге у брашну** одређен је сушењем узорака 90 минута на 130 °C (Kaluderski и Filipović 1998).
- **Садржај пепела у брашна** одређен је жарењем узорака 90 минута на 900 °C (Kaluderski и Filipović 1998).
- **Садржај протеина у брашну** добијен је одређивањем садржаја азота методом по Кјелдалу и употребом фактора 5,7 за прерачунавање садржаја азота у садржај протеина (Kaluderski и Filipović 1998).

4.3.2. Одређивање садржаја слободних сулфхидрилних група

Одређивање садржаја слободних сулфхидрилних група, изведено је према методи описаној у раду Morel и остали, (2002) са мањим модификацијама. За одређивање слободних сулфхидрилних група (SH), одмерено је 0,03 g узорка брашна и растворено са 1,3 mL раствора изопропанола, Tris/HCl пуфера (250 mM, pH 8,5), и 5,5'-дитиобис-2-нитробензојеве киселине (DNTB) (4 g/L, у етанолу) у односу 1/1/0,2 (v/v/v). После центрифугирања на (11800 g), апсорбанција 5,5'-дитиобис-2-нитробензојевог анјона је очитана на 412 nm ($13\ 600\ M^{-1}cm^{-1}$).

4.3.3. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом

У циљу испитивања утицаја третмана хладном атмосферском плазмом на пшенично брашно примењена је метода инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR). FTIR спектри формиран су применом FTIR спектроскопа Cary - 60 (Agilent Technologies, Санта Клара, САД) са атенуираним укупним одразом (Attenuated Total Reflection, ATR - FTIR). Узорци су снимљени при резолуцији од $4\ cm^{-1}$ и у опсегу $4000-500\ cm^{-1}$. Квантитативна процена секундарних структура протеина у брашну спроведена је процедуром Фуријеове деконволуације на основу другог деривата снимљених спектра у регији амид I траке. Пре саме математичке трансформације а у циљу добијања добрих облика максимума одговарајућих секундарних структура извршена је корекција основне линије у интервалу $1700-1600\ cm^{-1}$. Корекција основне линије спектра инфрацрвене апсорпције је такође уклонила могућност нежељеног доприноса из траке амид II. Други корак у анализи је био примена Гаусове функције као функције подешавања максимума појединачних максимума секундарних структура и

израчунавање процентуалних удела специфичног типа секундарне структуре као удела површине специфичног максимума у укупној површини.

4.3.4. Ултраљубичаста спектроскопија

Спектри протеина снимљени су у распону таласних дужина од 200 до 400 nm. Узорци (2 mg/mL протеина) растворени у 0,05M Tris-HCl пуферу (pH 7,5) су центрифугирани на 10.000 g у трајању од 15 минута. Спектри су формираны применом UV-Vis спектрофотометра Cary 630 (Agilent Technologies, Санта Клара, САД) према процедури описаном од (Agyare и остали, 2008).

4.3.5. Садржај влажног глутена и глутен индекс

Одређивање садржаја влажног глутена и глутен индекс је спроведено према методи ICC 155 (ICC standards, 1994), која се заснива на испирању комада теста са 2% раствором соли у циљу уклањања растворљивих протеина и скроба након чега заостаје гумаста маса глутена. Након испирања спроводи се центрифугирање масе глутена при одговарајућим условима, мери се маса глутена заостала на сити (А) и део глутена који је прошао кроз сито (В). Садржај влажног глутена се изражава према формули 2:

$$WG (\%) = (A + B) \times 100 \quad (2)$$

Док се вредност глутен индекса израчунава према формули 3:

$$GI = \frac{A}{A+B} \times 100 \quad (3)$$

4.3.6. Испитивање реолошких својстава теста

4.3.6.1. Емпиријске реолошке методе

Емпиријска реолошка мерења изведена су на фаринографу (Брабендер, Дујзбург; Немачка) са месилицом за 300 g брашна и на екстензографу (Брабендер, Дујзбург; Немачка). Фаринографски показатељи теста током мешања одређени су применом стандардног поступка ICC 115/1 на фаринографу, а физичке особине теста током узастопног одмарања и униаксијалног истезања мерене су на екстензографу применом методе ICC 114/1 (1992).

Способност и кинетика формирања глутенске мреже испитани су применом уређаја глутотик (Брабендер, Дојзбург, Немачка) по поступку Rakita (2017). На основу карактеристичне криве зависности торзије од времена анализе добијени се следећи параметри: време постизања максимума торзије - РМТ (s), које представља време које

протекне од почетка анализе до момента постизања максимума торзије и максимална торзија - МТ (изражена у брабендеровим јединицама, ВЈ), представља висину криве у максимуму.

4.3.6.2. Фундаменталне реолошке методе

Објективни реолошки тестови вршени су применом реометра НААКЕ Mars (Thermo Scientific, Немачка). Узорак глутена добијен према методи ICC 155, одлежавао је 24h у фрижидеру како би се постигла релаксација узорка. Узорак је затим темперирани на собну температуру након чега је подвргнут „frequency sweep“ тесту у линеарном вискоеластичном режиму на температури од 25°C са одмарањем узорка између плоча у трајању од 200 s. Коришћен је мерни прибор назубљена плоча/плоча PP35S пречника 35 mm са размаком између плоча од 1 mm. Мерења су изведена у опсегу фреквенције од 0,1 до 10 Hz при константној вредности напона смицања од 5 Pa, што одговара линеарном вискоеластичном режиму. Добијене вредности модула еластичности G' од фреквенције прилагођене степеним законом, формула 4:

$$G' = K' f^{n'} \quad (4)$$

Где је G' модул еластичности, f је фреквенција а K' је коефицијент који одговара модулу еластичности на 1 Hz и n' је коефицијент који одговара нагибу криве \log – \log зависности G' од фреквенције. Резултати модула еластичности су посматрани на фреквенцији од 1 Hz.

4.3.7. Метода способности задржавања раствора

Метода способности задржавања раствора (Solvent Retention Capacity), SRC метода спроведена је према методи (ААСС АМ 56-11-02, 2000) са одређеним мањим модификацијама описаним од Duyvejonck и остали (2011a) и Bettge и остали (2002). Узорци брашна (1,00 g) су одмерени у пирекс тубе за центрифугирање запремине 15 mL са коничним дном. Поред дејонизоване воде (SRCw) коришћени су и одговарајући раствори дејонизоване воде, сви у количини од 5 mL. Коришћени су 5% раствор натријум карбоната (SRCSo), 50% раствор сахарозе (SRCSu) и 5% раствор млечне киселине (SRCLa). Добијене суспензије брашна су енергично протресене у трајању од 5 s како би се брашно потпуно суспендовало у раствору. Узорци су затим постављени на хоризонтални шејкер и мешани 20 минута на собној температуре при 150 реципрочних покрета у минути како би дошло до потпуне солватације и бубрења полимерних компоненти брашна. Након бубрења, узорци су центрифугирани 15 минута на 1000 g и собној температуре. Супернатант је декантован из туба, тубе са талогом су окренуте врхом ка доле да би се задржани супернатант оцедио. Након 15 минута измерена је

маса добијеног талоба након цеђења. Вредности параметара SRC методе (SRCS_o, SRCS_u, SRCL_a, SRC_w) су израчунате према формули 5 (Хаупес и остали, 2009).

$$SRC (g/100g) = \left(\frac{\text{маса влажног пелета (g)}}{\text{маса брашна (g)}} - 1 \right) * \left(\frac{86}{100 - \text{влага у брашну } \left(\frac{g}{100g} \right)} * 100 \right) \quad (5)$$

Индекс перформанси глутенина (GPI) као коригована вредност параметра SRCL_a, израчунат је према формули 6: (Квеон и остали, 2011).

$$GPI = \frac{SRCL_a}{(SRCS_o + SRCS_u)} \quad (6)$$

Све коришћене хемикалије биле су минимално ACS чистоће (Сигма – Алдрич, Сент Луис, САД)

4.3.8. Лабораторијско пробно печење

Тесто је припремљено од 300 g, 2,5% квасца и 2,0% кухињске соли рачунато на брашно. у фаринографској месилици при стандардној брзини обртаја мешача (63 обр/мин). Количина воде за замес одговарала је количини неопходној за постизање конзистенције теста од 500 ± 50 FJ. Након замеса теста у трајању 5 минута, следило је ферментација у маси (45 минута), затим ручно премесивање и додатно одмарање (15 минута). Тесто је дељено на 3 комада по 150 g и ручно обликовано. Након десетоминутног интермедијарног одмарања тесто је завршно обликовано у векну и стављено у тефлонске калупе (10,4 x 6,4 cm; дно 9,1 x 5,1 cm и висине 8,8 cm). Обликовани тестани комади су завршно ферментисали 55 минута на температури од 30°C и релативној влази 75%. Печење је изведено у етажној лабораторијској пећи на 250°C у трајању од око 15 минута, односно до губитка у маси од 10%. Добијени узорци хлеба су охлађени на собној температури до наредног дана када је одређена запремина и извршена сензорска оцена.

4.3.9. Одређивање квалитета хлеба

У циљу сагледавања утицаја третмана пшеничног брашна плазмом на квалитет хлеба примењене су следеће методе:

- Одређивање запремина хлеба
- Анализа текстуре средине хлеба - ТРА анализа (Texture Profile Analysis)
- Одређивањем боје средине хлеба
- Одређивање сензорских својстава хлеба

4.3.9.1. Одређивање запремине хлеба

Запремине хлеба одређена је волумомером по поступку Kaluđerski и Filipović (1998).

4.3.9.2. Одређивање текстуре средине хлеба

Текстура средине хлеба (чврстоћа, иницијална еластичност, кохезивност и отпор жвакању) одређена је 24 часа после печења коришћењем уређаја Texture Analyzer TA–XT2i (Stable Microsystems, Сари, Уједињено Краљевство) анализом текстуре средине хлеба, методом двоструке компресије (ТРА). Пре извођења анализе дефинисани услови рада: мерна ћелија 5 kg, мерни прибор SMS P/36R, износ компресије 75% од његове оригиналне висине. Мерење је изведено при следећим радним параметрима: брзина кретања мерног дела пре анализе 1 mm/s, а у току и након обављене анализе 5 mm/s, време чекања између првог и другог циклуса компресије 5 s.

4.3.9.3. Одређивање боје хлеба

Боја средине хлеба одређена је хромаметром MINOLTA, Chroma Meter CR–400, (Минолта, Осака, Јапан) са D–65 осветљењем. Пре мерења извршена је калибрација стандардом беле боје. Резултати су изражени према CIE Lab систему боја (CIE, 1976) као: (L*) светлоћа боје (0 - црна; 100 - бела), (a*) удео црвене / зелене боје (a* > 0 означава црвену боју; a* < 0 означава зелену боју) и (b*) удео жуте / плаве боје (b* > 0 означава жуту боју; b* < 0 означава плаву боју). Мерење је вршено 24 часа након печења. На сваком од три добијена хлеба урађено је по пет мерења.

4.3.9.4. Одређивање сензорских својстава хлеба

Оцена сензорских својстава хлеба спроведена је од стране панела обучених оцењивача након 24 часа од печења. Оцењени су најважнији параметри средине хлеба: еластичност и финоћа структура пора по модификованом поступку Kaluđerski и Filipović (1998). Еластичност средине је оцењена описном оценом од „лоша“ до „одлична“, што је одговарало броју бодова од 0,0 до 4,5. Други параметар финоћа структуре пора је такође вреднована од „изразито груба“ до „изразито фина“, односно оценама од 0,0 до 2,5. На основу збира бодова за еластичност средине и финоћу структуре пора добијен је квалитативни параметар вредносни број средине који је био у интервалу од 0,0 до 7,0.

Квалитет узорака пробног печења оцењен је и методом бодовања. Оценама од 1 до 5 вредновани су најзначајнији параметри квалитета који су битни са аспекта прихватљивости производа на тржишту: запремина, спољни изглед, изглед средине, мирис коре и средине, укус коре и средине. Оцене су множене унапред дефинисаним факторима значајности за сваки испитивани параметар у складу са методом Kaluđerski и Filipović (1998).

4.3.10. Карактеризација извора хладне атмосферске плазме

4.3.10.1. Оптичка емисиона спектроскопија

Оптичка емисиона спектроскопија (енгл. optical emission spectroscopy (OES)) хладне атмосферске плазме реализоване у амбијенталном ваздуху снимљена је у полипропиленској кутији плазма уређаја без узорка. Снимањем је покривено подручје ултраљубичастог и видљивог зрачења (270-850 nm). У том циљу, на једном бочном зиду кутије постављен је кварцни прозор који омогућава видљивост активне запремине плазме. За снимање емисије коришћен је спектрометар (Shamrock 750, Уједињено Краљевство) са детектором (Andor DH734 ICCD camera, Уједињено Краљевство) и оптичким влакнима (Thorlabs, САД) пропусним у одговарајућим опсезима (пречник језгра од $\varnothing 200 \mu\text{m}$) и колимирајућим сочивом за UV-VIS опсег спектра.

4.3.10.2. Електрична карактеризација извора хладне атмосферске плазме

Електрична мерења извршена су у две тачке у колу. Уз помоћ високонапонске сонде (Tektronix, P6015A, САД), струјне сонде (Agilent N2782B) и дигиталног осцилоскопа (Agilent, DSOX3014A, Немачка) снимљени су напонски и струјни сигнали који се из високонапонског трансформатора доводе на напајану электроду извора. Додатно, у колу између варијабилног трансформатора и високонапонског трансформатора повезана су два мултиметра која су коришћена за мерење напона и јачине струје који се доводе на високонапонски трансформатор. На овај начин урађена је електрична карактеризација извора хладне атмосферске плазме. Поред могућности рачунања предате снаге плазми оваква поставка омогућава добру контролу стабилности рада плазма система. Приликом свих третмана посматрани електрични параметри били су константни што осигурава репродукцибилност плазме и стабилност третмана.

4.3.11. Одређивање концентрација *Alternaria* токсина

4.3.11.1. Припрема узорка

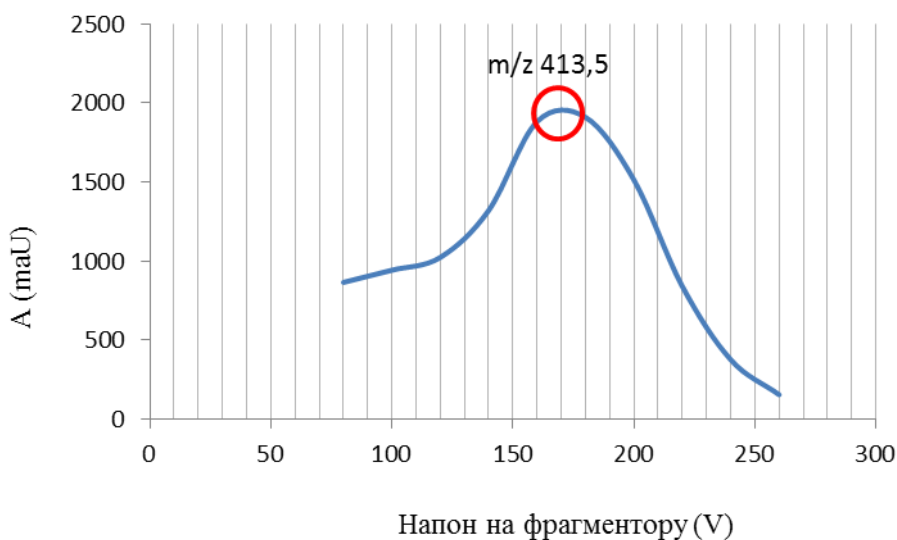
За припрему узорка коришћен је модификовани метод по Siegel и остали (2010), детаљно описан у студијама Јанић Најнал и остали, (2015; 2019а).

4.3.11.2. Проширење и валидација LC-MS/MS методе

Alternaria токсини су одређени применом течне хроматографије са масеном спектроскопијом (LC-MS/MS) према методи Јанић Најнал и остали (2015). Извршена је мања модификација методе према Јанић Најнал и остали (2019с). Модификација се огледала у проширењу односно укључивању TEN (чистоће 99,2%), набављеног од Sigma-Aldrich-а (Зелце, Немачка) у наведену методу. За оптимизацију MS/MS параметара коришћен је стандардни раствор TEN, концентрације од $5000 \mu\text{g kg}^{-1}$. У

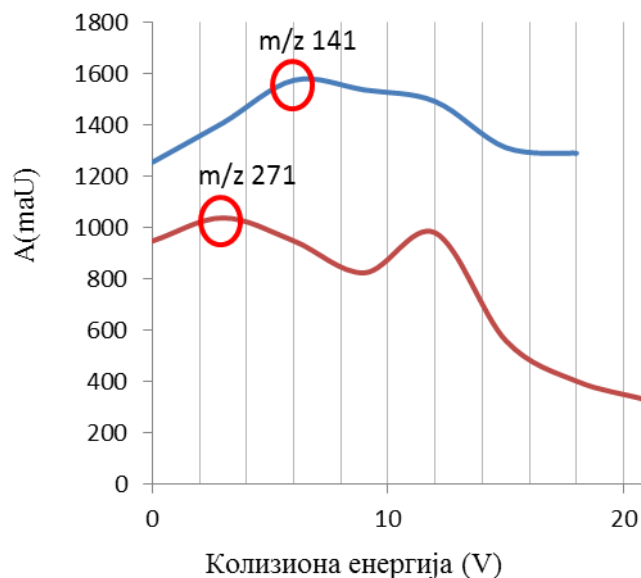
првој фази оптимизације стандард ТЕН је снимљен у „scan“ моду, у m/z опсегу од 120-600 Da, уз негативни поларитет и при напону фрагментора од 135 V, температури гаса за сушење (N_2) од 350 °C, протоку гаса за сушење 10 l/мин, притиску гаса за небулизацију од 45 psi и напону капиларе од 4 kV. ТЕН је еулирани у градијентном режиму почевши са 30% метанола (MeOH), уз линеарно повећање до 70% MeOH у 6. минути, за којим следи линеарно повећање до 100% MeOH у 9. минути. Од 9. до 12. минута удео MeOH био је 100%, а затим се у току 3 минута колона уравнотежава при почетном саставу мобилне фазе. Ретенционо време еулирања ТЕН је било 5,47 минута. Оптимизација, која је за циљ имала обезбеђење максималне осетљивости и поузданости резултата и што ниже границе детекције (LOD) и границе квантификације (LOQ), заснивала се на проналажењу оптималних транзиција јона ТЕН, као и његовог аквизиционих параметара у MRM режиму рада (слика 11), коришћењем *flow-injection* технике при утврђеном односу мобилне фазе за ТЕН (65% MeOH).

Оптимизација напона на фрагментору (слика 11) и колизионе енергије (слика 12) извршена је поступним променама наведених параметара, и праћењем утицаја на интензитет сигнала. Да би се обезбедио најјачи сигнал прекурсор јона m/z 413,5 ТЕН првобитно је оптимизован напон на фрагментор. Анализирани су напони фрагментора од 80 до 260 V. На слици 11. приказане су зависности површине пика јона прекурсора за ТЕН од напона на фрагментору.



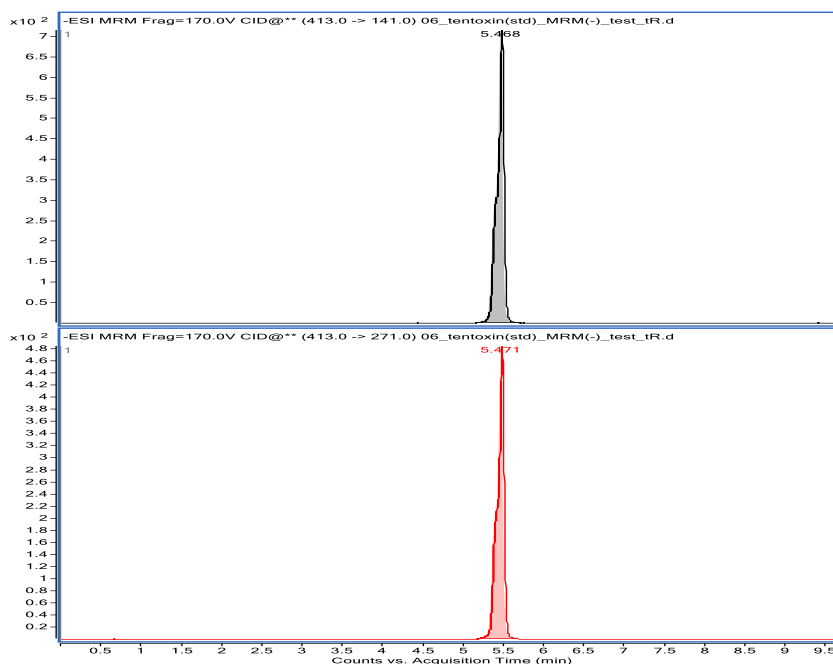
Слика 11. Зависност интензитета сигнала (I) од напона фрагментора за јон прекурсора.

По осам вредности колизионих енергија од 0 до 21 V са корацима од по 3 V испитане су за сваки од одабраних продукт јона при утврђеном оптималном напону фрагментора за ТЕН (Слика 12). Највеће површине пикова указале су на најбоље комбинације напона на фрагментору и колизионих енергија за сваки испитивани јон.



Слика 12. Зависност интензитета сигнала (I) од колизионе енергије за таргет јон TEN.

Оптимални напон на фрагментатору за одабране јоне (m/z 141 и 271) је био 170 V док су оптималне колизионе енергије су биле 6 V и 3 V за фрагменте јона m/z 141 и m/z 271, према редоследу навођења. На слици 13 приказан је MRM хроматограм TEN.



Слика 13. MRM хроматограм при концентрацији TEN од $5 \mu\text{l ml}^{-1}$

4.3.11.3. Валидација методе

Метод је валидован према упутствима датим у директиви 96/23/ЕС која се односи на извођења аналитичких метода и интерпретације резултата (Directive, 2002). Валидација је обављена према ефектима матрикса, линеарности, прецизности, граници детекције (LOD) и граници квантификације (LOQ), према процедури детаљно описаној у ранијој студији Јанић Најнал и остали (2019а). За испитивање утицаја матрикса при

одређивању *Alternaria* токсина у белом пшеничном брашну применом LC-MS/MS методе било је потребно испитати однос између калибрационих кривих чистих стандарда у растварачу (SC) и стандарда који су додати у припремљене узорке након упаравања (MMC). Један од начина провере утицаја матрикса који је коришћен и у овој докторској дисертацији јесте упоређивање нагиба SC и MMC кривих, чији однос (SSE) указује на постојање повећања (>100%) односно смањења сигнала (<100%) под утицајем матрикса. За калибрационе криве у матриксу (енгл. *matrix-matched calibration*, MMC), узорци белог пшеничног брашна без анализата од интереса су обogaћени са радним стандардним растворима у завршном кораку реконституције. Валидациони подаци за одређивање испитиваних *Alternaria* токсина дати су у табели 6. Током валидације поред калибрационе криве чистих стандарда у растварачу (енгл. *solvent calibration curve*, SC), коришћена је и калибрациона крива у матриксу како би се компензовао утицај матрикса, односно, увећање или пригушивање аналитичког сигнала. АОН и ТЕН су исказали увећање сигнала док је у случају АМЕ забележен мањи ефект пригушивања сигнала услед утицаја матрикса. Линеарност је окарактерисана вредностима коефицијената корелације (r^2) изнад 0,9924. Тачност методе процењена је на основу приноса *Alternaria* токсина. За укупан принос методе (R_A) узорци белог брашна без анализата од интереса су „спајковани” са радним стандардним растворима пре припреме узорка за анализу, тј. пре екстракције анализата од интереса обезбеђујући линеарност у истом распону за три анализирана *Alternaria* токсина у три понављања. Укупни принос за методу (R_A) и принос *Alternaria* токсина након припреме узорка тј. након екстракције испитиваних *Alternaria* токсина из узорка (R_E) су израчунати као што је детаљно описано у претходној студији Јанић Најнал и остали (2019а). Из табеле 6. може се видети да су за све анализате од интереса вредности приноса веће од 70%, са изузетком R_A за АМЕ.

Табела 6. Принос *Alternaria* токсина на основу калибрационе криве стандардног раствора (R_A), калибрације криве у матриксу (R_E), утицаја матрикса (SSE) и граница детекције (LOD) и граница квантификације (LOQ) на основу калибрационе криве у матриксу (MMC).

Аналити	Опсег концентрација ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Укупни принос методе R_A (%)*	Принос припреме узорка R_E (%)**	Утицај матрикса SSE (%)***	LOD/LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
АОН	2,5-100	90,4	80,4	112,5	0,75/2,5
АМЕ	2,5-100	68,5	83,0	82,5	0,3/0,9
ТЕН	2,5-100	90,4	74,1	122,0	0,5/1,5

АОН – алтернариол, АМЕ - алтернариол монометил етар, ТЕН – тентоксин, *Рачуноано према (нагиб криве спајкованог узорка/ нагиб калибрационе криве стандардног раствора), **Рачуноано према (нагиб криве спајкованог узорка / нагиб калибрационе криве у матриксу), ***Рачуноано према (нагиб калибрационе криве у матриксу / нагиб калибрационе криве стандардног раствора).

Прецизност методе за бело пшенично брашно, изражена као поновљивост и унутар лабораторијска репродуктивност приказана је у табели 7. Из табеле се види да су вредности RSD у опсегу између 3,4–11,2% и 6,1–11,9%, према редоследу навођења, чиме метода испуњава критеријум да је RSD $\leq 20\%$ и исказује добру прецизност развијене методе.

Табела 7. Прецизност методе при испитивању одабраних *Alternaria* токсина.

Аналити	Опсег концентрација ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Поновљивост (n=6) RSD (%)	Унутар лабораторијска репродуктивност (n=3×6) RSDs (%)
АОН	25	11,2	11,8
	50	7,4	8,8
	100	6,0	7,7
АМЕ	25	11,0	11,5
	50	7,0	7,2
	100	3,1	6,1
ТЕН	25	10,1	11,9
	50	5,3	9,8
	100	3,4	6,2

АОН – алтернариол, АМЕ - алтернариол монометил етар, ТЕН – тентоксин, RSD (%) – релативно стандардно одсупање 6 понављања на три нивоа концентрације при одређивању спајкованих уорака белог пшеничног брашна применом калибрационе криве у матриксу, RSDs (%) - релативно стандардно одсупање 6 понављања на три нивоа концентрације при одређивању спајкованих уорака белог пшеничног брашна применом калибрационе криве у матриксу током три дана, користећи исти инструмент и исте операторе.

4.3.11.4. Одређивање *Alternaria* токсина

Alternaria токсину су одређени на основу калибрационе криве у матриксу (ММС) у циљу превазилажења утицаја матрикса. Калибрационе криве су направљене у распону концентрација од границе детекцију до $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ за АОН, АМЕ и ТЕН, према реду навођења. Испитивање линеарности су показала вредности коефицијента корелације (r^2) изнад 0,9924 у читавом испитиваном калибрационом распону. Добијени резултати су кориговани за вредности (R_E) и исказане су на суву масу узорка. Сви узорци су припремљени и анализирани у три понављања. Степен редукције испитиваних *Alternaria* токсина израчунат је према следећој формули 7:

$$\text{Редукција (\%)} = 100 \times \frac{C_x \times 100}{C_0} \quad (7)$$

Где су, C_x концентрације *Alternaria* токсина (АОН, АМЕ и ТЕН) у пшеничном брашну након третмана хладном атмосферском плазмом; C_0 је почетне концентрације *Alternaria* токсина (АОН, АМЕ и ТЕН) у пшеничном брашну пре третмана хладном атмосферском плазмом.

4.3.12. Статистичка обрада добијених експерименталних података

Статистички значајне разлике између података анализираних су једносмерном анализом варијансе (ANOVA) праћеном Тукејевим тестом при чему је p вредност $< 0,05$ сматрана статистички значајном. Значајне корелације измерених параметара анализираних су применом поступка Пирсонове корелације. Анализа главних компоненти (PCA) коришћена је као ненадгледана истраживачка техника за представљање присутних варијација у скуповима експерименталних података у циљу смањења димензионалности података њиховим пројектовањем на мањи број главних компоненти (PC) (Granato и остали, 2018). Анализа главних компоненти спроведена је у програмком језику R применом пакета „FactoMineR“ и „factoextra“.

У првој фази експеримента, моделовање односа између параметара методе способности задржавања раствора и емпиријских реолошких метода спроведено је методом парцијалне регресија најмањих квадрата (енгл. Partial least squares regression (PLSR)) (Carrascal и остали, 2009). Као надгледани метод, PLSR је посебно конституисан да превазиђе бучне, колинеарне и чак непотпуне варијабле и произведе добра предвиђања у мултиваријантним проблемима са великим p (број променљивих) малим n (ограничен број узорака) (Chung и Keles, 2010). Ова отпорност методе омогућава да се PLSR користи у ситуацијама када је употреба конвенционалних метода регресије посебно ограничена. Применом изабране методе регресије избегава се увећање грешака типа II у околностима које ометају класичну вишеструку регресију. Метод се заснива на пројекцији променљивих предиктора и одговора скупом пројекције на латентне структуре или другачије зване, латентне варијабле и одговарајуће резултате. Метод смањује димензионалност присутну у подацима и проналази модел линеарне регресије, унутар новог мањег простора. За разлику од анализе главних компоненти у којој редукција димензија игнорише променљиву која се предвиђа, циљ примене PLSR методе је максимално објашњење променљиве (параметра) која се предвиђа. PLSR процедура производи линеарни модел, у облику опште једначине приказане формулом 8, где је Y n случајева од m променљивих, матрица одговора, X је n случајева p променљивих матрица предиктора (дизајна), B је $p \times m$ матрица регресионих коефицијената, а E је фактор за буку за модел који има исте димензије као Y . Детаљни математички описи се могу прочитати у (Carrascal и остали, 2009; Martens, 2001).

$$Y=XB+E \quad (8)$$

Моделовање је извршено у програмском језику R са пакетом „pls“ (Wehrens и Mevik, 2007). Пре спровођења моделовања, извршена је min-max нормализација да би се свакој променљивој дала иста важност у току спровођења анализе (Wehrens и Mevik, 2007). За сваки одабрани емпиријски реолошки параметар конструисани су засебни

PLSR модели као и PLSR модел са вишеструким одговорима. Унакрсна валидација је кориштена да би се превазишао проблем прекомерног прилагођавања модела, односно, да би се пружила могућност уопштења модела. Овако је постигнут оптимални баланс између објашњене варијације у одговору и предиктивне способности модела. За одабир оптималног броја латентних варијабли (LV) и за валидацију предиктивне способности конструисаних модела коришћена је метод „изостави један“ унакрсне валидација (енгл. Leave-one-out cross-validation (LOOCV)) (Lachenbruch и Mickey, 1968; Нг, 1997). Примарно добијени модели са свим латентним варијаблама редуковани су на оптимални број латентних варијабли коришћењем функције „best.dims“ R пакета да би се одредило колико је латентних варијабли потребно да се пронађе одговарајући PLSR модел кроз посматрање вредности корена средње квадратне грешке предвиђања (RMSEP). Након што су конструисани модели за предвиђање појединачних одговорима, PLSR моделовање са вишеструким одговорима је такође изведено горе описаном процедуром. Затим, коефицијенти регресије независно промењивих у моделима су стандардизовани а потом нормализовани тако да је њихов апсолутни збир једнак 100% те су груписани према знаку, односно, правцу деловања у моделу. Верификација особина свих развијених модела извршена је употребом коефицијента детерминације (R^2), који се односи на калибрациони збир узорака коришћен за развој модела заједно са (R^2_{pred}) који се односи на детерминацију резултата унакрсне валидације. Додатно, користили смо корен средње квадратне грешке предвиђања (RMSEP) и грешка суме квадрата унакрсно валидираног предвиђања (PRESS) која извештавају о грешци PLS модела. Ови најчешће коришћени параметри су детаљно описани у (Wehrens и Mevik, 2007).

У другој фази екперимента а у циљу уштеде материјала, енергије и времена, оптимизација процеса третирања брашна хладном атмосферском плазмом извршено је моделовање методом одзивне површине (eng. response surface method, RSM). Применом експерименталног дизајна, *central composite design*, са 17 експерименталних тачака. Експериментални дизајн је коришћен за испитивање везе између зависних и независних промењивих, као и за одређивање оптималних услова третмана плазме. Независно промењиве, коришћене приликом оптимизације третмана хладном атмосферском плазмом били су: време, раздаљина узорка од извора хладне плазме и степен искоришћења заклона при чему је свака независно промењива кодирана на три нивоа. Након спроведеног експерименталног прикупљања података зависних промењивих према понуђеној матрици комбинација независно промењивих извршена је апроксимираја одговарајућим моделом који треба да искаже значајност и валидност. Очекивана вредност одзива, односно, облик одзивне површине може се формулисати преко једначине 9:

$$E(y) = f(x_1, x_2) \quad (9)$$

Функција која описује зависне промењиве (зависне параметре) од комбинације независно промењивих (услови третмана) у процесу је функција модела. Када је ова функција полином првог реда, у процесу не постоји интеракција између услова третмана а вредности зависних параметара линеарно зависе од сваког услова третмана појединачно. Много је чешћи случај када се процес, услед своје комплексности, не може задовољавајуће описати са полином првог реда. У оваквом процесу могуће су и ефекти међусобне интеракције услова третмана на зависне параметре процеса. За описивање оваквог процеса неопходно је користити функцију другог реда, односно, квадратни полином (енгл. Second order polynomial - SOP). Општа једначина квадратног полинома се може написати у облику једначине 10:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_{ii}^2 + \sum_{i < j}^k \sum_{j=2}^k \beta_{ij} x_i x_j \quad (10)$$

У изразу одзивног квадратног полинома (Y) фигуришу константа одзивне функције (β_0), коефицијенти линеарних чланова одзивног полинома (β_i), коефицијенти квадратних чланова (β_{ii}), коефицијенти чланова интеракције (β_{ij}), и наравно независно променљиве величине (x_{ij}). Коефицијенти полинома се одређују методом најмањих квадрата а након тога се анализом варијансе издвајају чланови који значајно доприносе посматраним одзивима излазних параметара процеса (Montgomery, 1984). Оптимизација, односно, проналажење одговарајућих комбинације услова третмана при којима се добијају жељене вредности зависних параметара мерених као излаза из процеса спроведена је нумеричком методом оптимизације засноване на прорачуну функције пожељности (енгл. desirability function) (Myers и Montgomery, 2016).

У четвртој фази, примењени експериментални план одговарао је латинском квадрату од 4×6 . Услови третмана су дефинисани кроз две независно промењиве (третман - 4 нивоа и време - 6 нивоа). Прикупљени подаци представљени су табелама описне статистике. Прво су резултати обрађени употребом анализе варијансе, у циљу испитивања утицаја услова третмана на степен редукције *Alternaria* токсина. Затим је спроведено моделовање применом функције другог реда, односно, квадратног полинома. Развијени модел је кориштен за процену главних утицаја услова третмана на зависне промењиве (параметре). Како би се сагледали сва комплексност третмана и извршио одабир оптималног третмана вршено је израчунавање SS, односно евалуација стандардне оцене (енгл. standard score, SS) према наведеним једначинама 11 и 12:

$$\bar{x}_i = 1 - \frac{\max_i x_i - x_i}{\max_i x_i - \min_i x_i}, \quad \forall i \text{ случај критеријума "што више, то боље"}, \text{ или} \quad (11)$$

$$\bar{x}_i = \frac{\max_i x_i - x_i}{\max_i x_i - \min_i x_i}, \quad \forall i, \text{ случај критеријума "што ниже, то боље"} \quad (12).$$

гдје χ_i представља сирове податке из екперименталног мерења одређеног параметра након третмана хладном атмосферском плазмом. Средња вредност збира нормализованих коефицијената из сваког мерење изведено је за сваки узорак како би се добили јединствени бездимензиони бројеви који представљају специфични комбиновани резултат узорка за сва извршена мерења. Тако добијеним вредностима (SS) избегавају се ограничења које настају услед различитих физичких јединица или посматраног распоне вредности параметара. Оваквим приступом такође се олакшавају будућа истраживања на новим узорцима који нису укључени у ову студију и међусобно поређења резултата. Евалуација стандардног резултата спроведена је за пет параметара како би се пронашле вредности услова третмана (време третмана и растојање узорка), при којима се остварују оптималне вредности редукације *Alternaria* токсина. Статистичка обрада свих података спроведена је применом следећих статистичких софтвера, програмског језика отвореног кода са окружењем за статистичку обраду података R-3.3.2 за виндовс (R фондација, Беч, Аустрија) те STATISTICA 13.3 (TIBCO Software, Пало Алто, САД) и Design-Expert 11. (Stat-Ease, Минијаполис, САД).

5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

5.1. Корелација параметра SRC методе и емпиријских реолошких метода

Основни недостатак примене хладне атмосферске плазме у лабораторијским условима је могућност третирања мале количине узорка. Наведена условљеност је повезана са техничким карактеристикама лабораторијских уређаја. Уређаји се израђују као прототипови и да би се умањили технички проблеми приликом саме израде, као што су: високи напони, скупи материјали, прегревање уређаја, прибегава се смањењу њихових димензија. Мале димензије самог уређаја, последично ограничавају количину узорка који се може третирати у једном третману, а самим тим умањује се и могућност праћења ефеката третмана на узорак применом метода које захтевају већу количину узорка за анализу. Испитивање утицаја третмана хладном атмосферском плазмом на промену технолошког квалитета пшеничног брашна управо је захтевало примену брзих, једноставних алтернативних метода које захтевају мању количину узорка а чији би параметри били упоредиви са резултатима емпиријских реолошких мерења, која се деценијама користе за анализу квалитета пшеничног брашна.

Сагледавајући поменути проблематику у првој фази истраживања анализиран је квалитет пшеничног брашна различитих пасажа млевења применом методе способности задржавања раствора (SRC методе) и емпиријских реолошких метода (фаринографска и екстензографска). Иако литературни подаци (Slade и Levine, 1994; Khatkar и остали, 2002; Dobraszczyk и Morgenstern, 2003; Caballero и остали, 2007; Duyvejonck и остали, 2011a; Duyvejonck и остали 2012; Huen и остали, 2018;), указују на актуелност SRC методе у испитивању квалитета брашна, могућност моделовања параметра SRC методе са релевантним реолошким параметрима није детаљније испитивана. Због тога су резултати анализе пасажних брашна статистички обрађени парцијалном регресијом по методи најмањих квадрата и тиме објашњени међусобни односи параметара SRC методе и реолошких метода. Меделовање је извршено у циљу потврде оправданости примене SRC методе за анализу утицаја хладне атмосферске

плазме на технолошки квалитет пшеничног брашна у наредној фази дисертације, а под претпоставком да настале промене у технолошком квалитету брашна не зависи од врсте узорка већ од самог узрока, односно промена које се дешавају на полимерима брашна које посматра SRC метода. Како квалитет моделовања зависи од хетерогености узорака који се испитују, у раду су анализирана пасажна брашна, из индустријског млина за пшеницу која најбоље презентују варијабилности квалитета пшеничног брашна. Наиме, у технолошком поступку млевења добија се низ пасажних брашна веома различитих особина у погледу хемијског састава, технолошких својстава и гранулације. Број пасажних брашна зависи од дијаграма млевења, а различит квалитет пасажних брашна условљен је различитим квалитетним особинама и хемијским саставом појединих слојева ендосперма зрна и несавршеношћу технолошког поступка који не обезбеђује потпуно раздвајање анатомских делова зрна у току млинске прераде (Fišteš и Tanović, 2014). Поједностављен дијаграм млевења пшенице у наведеном индустријском млину по коме су добијена пасажна брашна за анализу приказан је на слици 9. У табели 8. приказани су резултати хемијске анализе пасажних брашна.

Табела 8. Хемијска анализа пасажних брашна из процеса млевења.

Пасаже	Влага (%)	Протеини (%)	Пепео (%)*	Влажни глутен (%)
1	14,1	13,9	0,67	32,7
2	14,4	13,6	0,50	31,9
3	14,3	15,5	0,58	36,8
4	14,0	16,5	0,69	39,2
5	13,0	19,3	1,06	46,7
6	14,3	11,7	0,40	26,9
7	14,2	11,1	0,41	25,4
8	14,0	11,9	0,43	27,3
9	14,1	11,4	0,42	26,1
10	13,9	11,5	0,45	26,3
11	13,9	11,5	0,43	26,4
12	13,7	11,2	0,43	25,7
13	13,5	11,0	0,44	25,0
14	13,2	11,3	0,59	26,0
15	13,3	11,1	0,48	25,2
16	14,2	11,8	0,40	27,0
17	13,1	16,7	0,89	39,8
18	14,3	11,7	0,4	26,8
19	14,4	11,1	0,4	25,3

Пасажна брашна: 1 – 5: пасаже крупљења, 6 – 17: пасаже млевења гриза и осевака, 18 – 19: пасаж растварања гриза. * рачунато на суву материју

Хемијска анализа је показала да се у процесу мљења добијају пасажна брашна са распоредом квалитета који је уобичајан за процес мљења пшенице, са релативно великим распоном вредности протеина, влажног глутена и пепела. Резултати испитивања узорка пасажних брашна емпиријским методама (фаринографска и екстензографска) су приказани у табели 9. Испитиване узорке пшеничног брашна карактерише широк интервал вредности свих реолошких параметара, што потврђује разлике у њиховом технолошком квалитету, односно пецивним својствима.

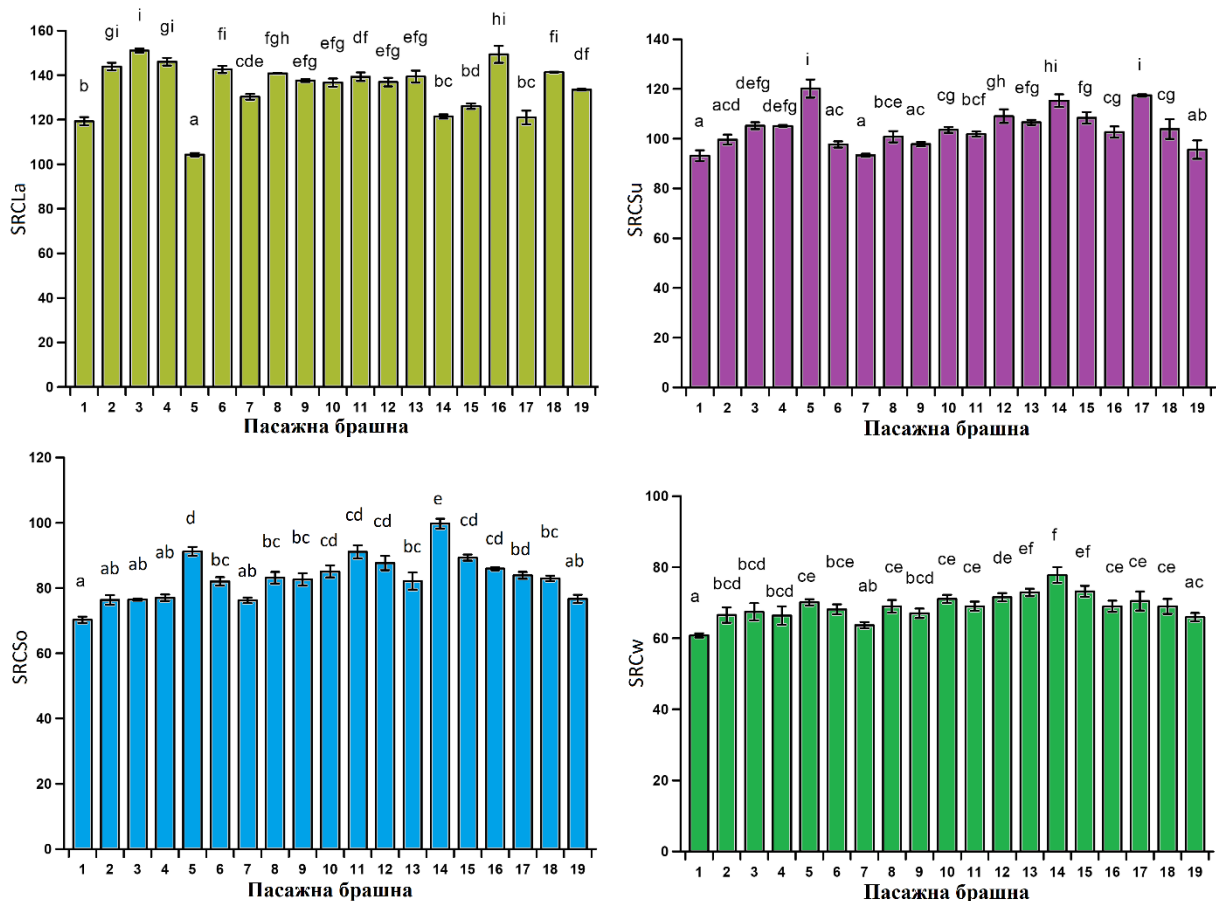
Табела 9. Основна статистика испитаних реолошких параметара.

Параметри	Коефицијент варијације (%)	Минимум	Максимум
FWA (%)	6,1	53,2	65,0
FDT (мин)	58,5	1,7	18,9
FST (мин)	24,5	6,5	19,1
FDS (BU)	51,5	4,0	52
E (cm ²)	21,2	57	153
Ex (мин)	22,6	97	180
R (BU)	27,4	244,0	764
Rmax (BU)	24,1	352,0	898,0

FWA – фаринографска моћ упијања воде, FDT – време израде теста, FST – стабилитет теста, FDS – степен омекшања, E – енергија, Ex – растељивост, R – отпор на 5 cm, Rmax – максимални отпор.

Вредности SRC параметара приказане су на слици 14 и на слици 15 и указују да су велике варијације у вредностима SRC параметара пасажних брашна пронађене у свим испитиваним узорцима. Вредности SRCSo параметра су варирале од 70,28 до 99,77%, SRCСу параметра од 93,15 до 120,17%, SRCLa параметра од 104,3 до 146,01%, SRCw параметра од 60,79 до 77,79%, а вредности GPI параметра су биле у границама од 0,6 до 0,8. Сви параметри SRC методе су били у складу са претходним истраживањима. (Hammed и остали, 2015). Подаци које пружа SRC метода јасно показују на дистрибуцију квалитета у пасажним брашнима а која је у складу са претходнимв искуствима на основу реолошких метода. Параметар SRCLa је у зависности и од количине протеина глутена али и од његове функционалности и карактеристика глутенина (Ее и остали, 2020). Најмању вредност SRCLa параметра је имало брашно петог крупљења док су брашна са другог, трећег и четвртог крупача имала вредности SRCLa параметра међу највећим од свих испитиваних брашна. Познато је да наведена пасажна брашна спадају међу најквалитетнија пасажна брашна те и вредности SRCLa параметра упућују на бољи квалитет. Релативно уједначене вредности SRCLa параметара имала су пасажна брашна из фазе мљења гриза и осевака, али са приметним трендом опадања у редоследу измеђавања све до пасажних брашна растварања гриза која имају вредности SRCLa параметра сличне оним из првих пролазишта мљења гриза.. Будући да вредности SRCSo параметра индиректно указују

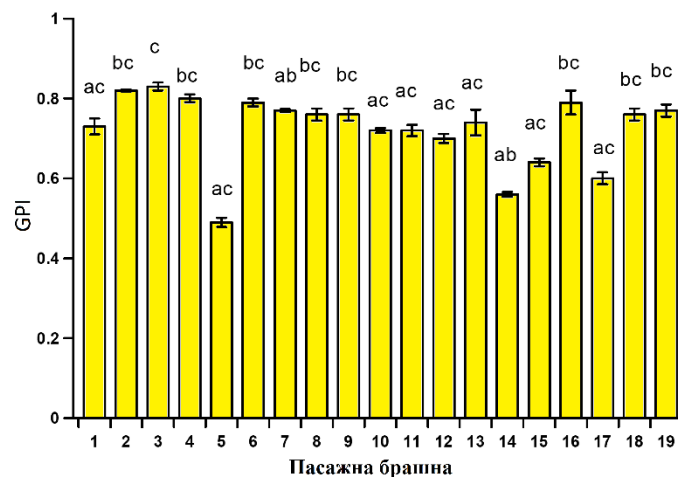
на степен оштећености скроба током млевења (Lindgren и Simsek, 2016) очекивало се да ће код испитиваних узорака у оквиру пасаж (крупљења, млевења гриза и осевака и растварања гриза) бити приметан тренд сукцесивног повећања вредности SRCSo параметра. Добијени резултати нису потврдили правилан тренд промене SRCSo међу испитиваним узорцима пасажних брашна. Вредности SRCSu су као показатељ полимера арабиноксилана у узорку брашна, биле су ниже за пасажна брашна првих пролазишта крупљења и млевења гриза (Lindgren и Simsek, 2016). SRCSu пасажног брашна последњег пролазишта у фази млевења гриза и осевака је била на нивоу добијене вредности за пасажно брашно петог крупљења. У пасажним брашнима са пролазишта растварања гриза дошло је до пада SRCSu вредности (слика 14), што је очекивано с обзиром да ова брашна потичу из централних делова ендосперма и спадају у пасажна брашна најбољег квалитета.



Слика 14. Параметри SRC методе пасажних брашна: 1 – 5: пасаже крупљења, 6 – 17: пасаже млевења гриза и осевака, 18 – 19: пасаже растварања гриза. Стубићи са различитим словима указују на значајне разлике (Тукејев тест: $p < 0,05$).

Добијене вредности SRCw параметра су ниже у поређењу са свим другим SRC параметрима јер вода као растварач нема изражен афинитет ни према једном полимеру брашна. Као и код вредности SRCSu, вредности SRCw биле су ниже у пасажним брашнима насталим у процесу крупљења, повећавају се у пасажним брашнима из фазе

млевења гриза и осевака, а затим поново опадају у пасажним брашнима растварања гриза. Претходним истраживањима је доказано да други полимери брашна, као што су арабиноксилани и оштећени скроб, утичу на вредност SRCLa брашна (Barrera и остали, 2007; Дувејонск и остали, 2011a). Тако, (Квеон и остали, 2009a) предлажу употребу и кориговане вредности SRCLa, изражене као индекс перформанси глутенина (GPI параметар). GPI параметри пасажних брашна приказани су графички на слици 15. Пасажна брашна добијена на другом и трећом крупачу имала су највеће вредности GPI, док је пасажно брашно са последњег петог крупљења имало најниже вредности GPI параметра. Добијени резултати за параметар GPI у складу са трендом промена SRCLa, показује да пасажна брашна првих пролазишта млевења гриза имају вредности GPI параметра сличне вредностима пасажних брашна растварања, као и да квалитет пасажних брашна у редоследу измељевања опада.

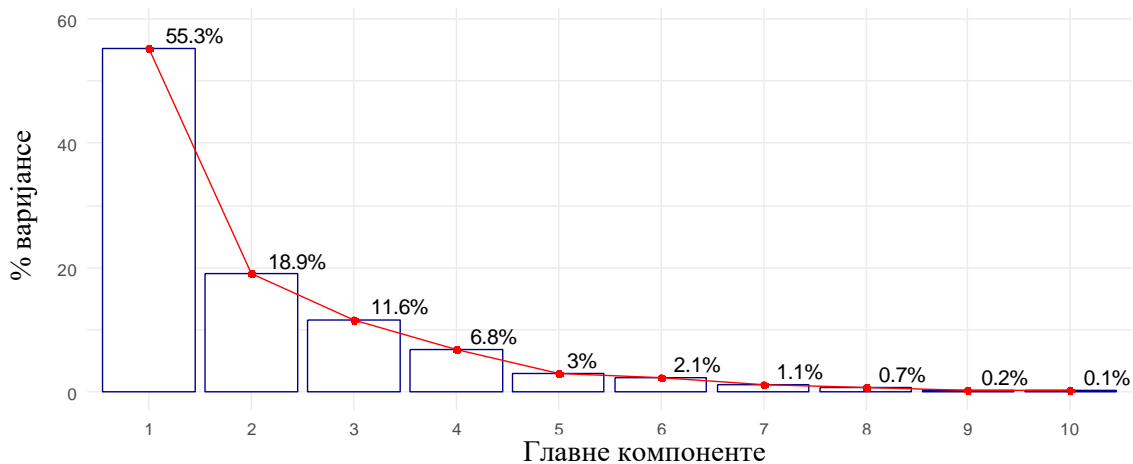


Слика 15. GPI параметри пасажних брашна: 1 – 5: пасаже крупљења, 6 – 17: пасаже млевења гриза и осевака, 18 – 19: пасаже растварања гриза. Стубићи са различитим словима указују на значајне разлике (Тукејев тест: $p < 0,05$).

Добијени резултати су очекивани и усаглашени са дугогодишњим искуством насталим на основу емпиријских реолошких мерења, што указује да се SRC метода има аналитички потенцијал и може се користити за процену својстава појединачних пасажних брашна. Заправо, очекивано су вредности испитиваних параметара квалитета статистички значајно различите ($p < 0,05$) међу пасажним брашнима. На основу дијаграма свих SRC параметрима (слике 14 и 15), уочавају се јасне разлике између пасажног брашна првог и петог крупљења, као и пасажних брашна са последњих пролазишта измељевања ситног гриза и осевака у односу на друга пасажна брашна бољег квалитета.

5.1.1. Анализа главних компоненти (PCA)

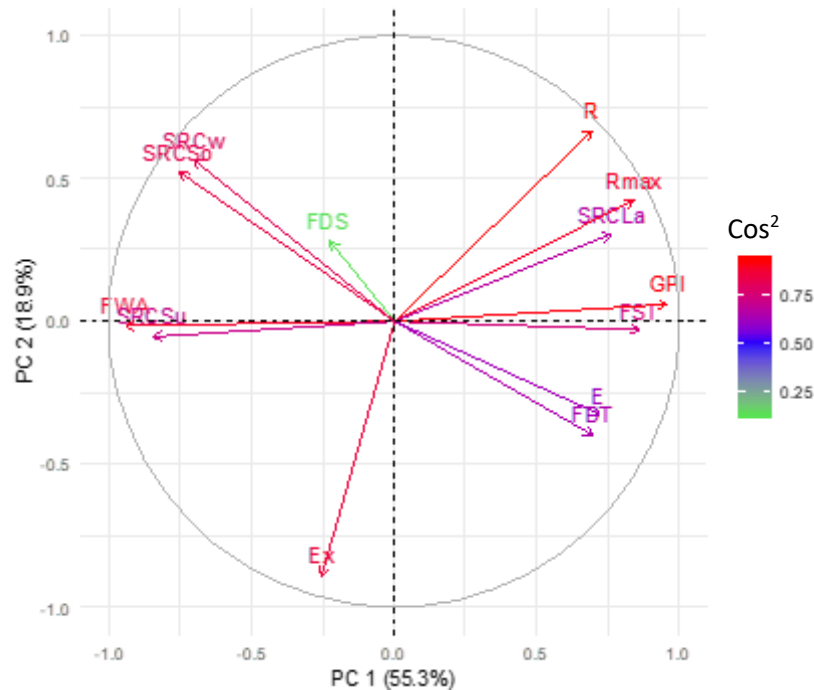
Да би се стекао јединствен увид о корелацији између резултата SRC методе и реолошких мерења, спроведена је мултиваријантна техника главних компоненти (енгл. Principal components analysis, PCA) и израчунати су Пирсонови коефицијенти корелације између посматраних параметара. Важност првих 10 главних компоненти (енгл. Principal components - PCs) представљена је са графиконом главних компоненти (scree plot) на слици 16. Графикон показује да је 74,2% информација (варијансе) пасажних брашна објашњено са прве две главне компоненте. Због мале укупне варијабилности преосталих компоненти, не очекује се да ће њихов утицај бити значајан. На овај начин, скуп сирових података је сведен на нижу димензију у којој ће се посматрати структуре или доминантни типови варијација у вредностима SRC параметара и вредностима емпиријских реолошких параметара.



Слика 16. Дијаграм анализе главне компоненте (PCA)

Прва главна компонента, PC1, објашњава 55.3% присутне варијансе, док друга компонента PC2, објашњава додатних 18.9% варијансе присутне у експерименталним подацима. Да би се истражиле везе између посматраних параметара и разјаснила природа одређене главне компоненте, изворних 13 параметара су пројектоване на дводимензионални круг корелације. Добијени квадратни корелациони коефицијенти за испитиване параметре, називају се квадратни косинуси (\cos^2) (Abdi и Williams, 2010) и омогућавају интерпретацију параметара иза посматраних главних компоненти, слика 14. Корелација између сваког параметра на одговарајућој главној компоненти користи се као координата параметра за пројекцију. Аналогно Пирсоновом коефицијенту r , квадратни косинуси указују на проценат варијансе сваког од 13 изворних посматраних параметара које главне компоненте узимају у обзир и коришћен је за процену квалитета репрезентације параметра. Слика 17 приказује круг корелације прве две главне компоненте. Они параметри који су савршено представљени на прве две главне компоненте, имају \cos^2 приближан или једнак вредности 1 и позиционирани су близу или на самој кружници круга корелација. Како би се поједноставило представљање \cos^2

на слици 17, параметри су обојени према својим вредностима \cos^2 . Квалитет репрезентације параметара црвене боје (R, Rmax, GPI, SRCSo, SRCw, FWA и E_x) је у распону од 0,75 до 1, док су параметри љубичасте боје (SRCLa, E, SRCСу, FDT и FDS) у распону од 0,50 до 0,75. Параметар FDS зелене боје је недовољно објашњен помоћу прве две главне компоненте. PC1 је јако позитивно одређена са GPI, FST, Rmax, SRCLa, E, FDT, R а јако негативно одређена са SRCw, SRCSo, SRCСу и FWA параметрима.



Слика 17. Анализа главних компоненти (PCA) испитиваних параметара, круг корелације.

\cos^2 – квадратни косинус, FDS – степен омекшања, FDT – време развоја теста, FST – стабилност теста, E – енергија, E_x – растељивост, FWA – фаринографска апсорпција воде, Rmax – максимални отпор, R – отпор, GPI – индекс перформанси глутенина, SRCLa – способност задржавања раствора млечне киселине, SRCSo – способност задржавања раствора натријум карбоната, SRCСу – способност задржавања раствора сахарозе, SRCw – способност задржавања воде, PC – главна компонента.

Друга главна компонента PC2, је јако позитивно одређена SRCw, SRCSo, Rmax, SRCLa, R, а негативно са E, E_x и FDT параметрима. На основу слике 17 могу се разликовати две групе у посматраним параметрима: параметри осетљиви на снагу теста (десна страна) и параметри који су осетљиви на способност хидратације брашна (лева страна). Позитивно корелирани параметри, груписани заједно и усмерени у истом правцу на левој страни су FWA и SRCСу, а на десној SRCLa и Rmax параметри. Параметри SRCСу и Rmax су негативно корелирани јер су позициониране у супротним квадрантима. Како се уочава на основу удаљености између параметра и центра графика квалитет репрезентације параметара је задовољавајући. Са слике 17 може се видети да је 12 од 13 параметара далеко од центра круга корелација, што потврђује да су задовољавајуће представљене, једино је за параметар FDS, потребно више од 2 компоненте за задовољавајуће представљање. Упоредо са PCA анализом, извршена је

корелациона анализа параметара SRC методе и фаринографских и екстензографских параметара Пирсонови коефицијенти корелације између поменутих испитиваних параметара приказани су у табели 10.

Табела 10. Коефицијенти корелације параметара SRC методе и конвенционалних реолошких параметара.

Параметри	SRCLa	SRCSu	SRCSo	SRCw	GPI
FWA (%)	-0,57 **	0,93 ***	0,76 ***	0,76 ***	-0,86 ***
FDT (мин)	0,51 *	-0,46 *	-0,65 **	-0,60 **	0,66 **
FST (мин)	0,64 **	-0,68 **	-0,55 *	-0,58 **	0,76 ***
FDS (BU)	0,04	0,26	0,26	0,4	-0,09
E (cm ²)	0,68 **	-0,31	-0,63 **	-0,52 *	0,73 ***
Ex (мин)	-0,29	0,42	-0,2	-0,21	-0,25
R (BU)	0,65 **	-0,58 **	-0,17	-0,13	0,64 **
Rmax (BU)	0,79 ***	-0,61 **	-0,39	-0,32	0,81 ***

FWA – фаринографска моћ упијања воде, FDT – време развоја теста, FST – стабилност теста, FDS – степен омекшања, E – енергија, Ex – растељивост, R – отпор на 5 cm, Rmax – максимални отпор. Корелација значајна на нивоу *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Код испитиваних узорака пасажних брашна уочена је изражена негативна линеарна корелација између параметара GPI и FWA ($r = -0,86$, $p < 0,001$), и такође негативна али слабије изражена између параметара FWA и SRCLa ($r = -0,57$, $p < 0,01$). Негативан линеарни однос између параметара GPI и FWA, као и између FWA и SRCLa произилази из чињенице да FWA параметар доминантно описује способност скроба, квантитативно најзначајнијег полимера пшеничног брашна и арабиноксилана да везује воду, а мањим делом уакзује и на хидратациона својства протеина. Са друге стране, очекивано и у складу са истраживања Ram и остали (2005) FWA параметар је у позитивној линеарној корелацији са SRCSu параметром ($r = 0,93$, $p < 0,001$), као и са параметрима SRCw и SRCSo ($r = 0,76$, $p < 0,001$). Тако с друге стране, позитивна линеарна корелација између параметара GPI и Rmax ($r = 0,81$, $p < 0,001$), GPI и E ($r = 0,73$, $p < 0,001$), GPI и FST ($r = 0,76$, $p < 0,001$), као и између SRCLa и E ($r = 0,68$, $p < 0,01$), се може објаснити значајном условљеношћу свих наведених параметара управо са количином и квалитетом протеина пшеничног брашна. Сличан однос између SRCLa параметра и снаге теста, параметра енергије (E) раније је уочен од стране других аутора (Guttieri и остали, 2001; Lindgren и Simsek, 2016). Посматрајући расподелу параметра SRC методе и реолошких параметара увиђа се подела SRC параметара у две групе, тј. параметре

(SRCLa и GPI) осетљиве на снагу теста и параметре (SRCw, SRCSo и SRCsu) осетљиве на потенцијал апсорпције воде што је у складу са основним принципима SRC методе те потврђује да током анализе пасажних брашна SRC метода се понаша као приликом примене на типизираним брашнима. Параметри SRCw, SRCSo и SRCsu су груписани један близу другог на слици 17, што указује на позитивну корелацију између ова три SRC параметра. Ови резултати су у складу са резултатима ранијих студија које су такође уочиле високу корелацију између поменутих три параметра SRC методе (Gaines, 2000; Xiao и остали, 2006; Colombo и остали, 2008). Разлог је највероватније што сви наведени параметри дају индикацију о капацитету брашна да задржава воду. На слици 17 уочава се да је SRCLa негативно корелисан према осталим SRC параметрима, осим са GPI параметром што је очекивано с обзиром на чињеницу да је параметар GPI директно изведен из SRCLa параметра.

5.1.1. Моделовање реолошких параметара на основу параметара SRC методе

За независне промењиве су изабрани параметри SRC методе (SRCSo, SRCsu, SRCLa, SRCw и GPI) док су за зависне промењиве изабрани параметри фаринографска апсорпција воде (FWA), енергија (E), растегљивост (Ex) и максимум отпорности (Rmax). У PLSR моделовању, димензија матрице података је сведена на мали скуп информативних супер оса, такозваних латентних варијабли те је PLSR метода коришћена за предвиђање емпиријских реолошких параметара на основу експериментално добијених SRC параметара. За све реолошке параметре развијени су регресиони модели методом регресије парцијалних најмањих квадрата, уз примену „изостави један“ унакрсне валидације модела.

У табели 11 приказан је сажетак статистичких података осам PLSR модела за предвиђање сваког емпиријског реолошког параметра одвојено и модела за симултано предвиђање вишеструких одговора (FWA + E + Ex + Rmax). Оптималне перформансе модела за параметре FWA, FST, R и Rmax су добијене коришћењем две латентне варијабле, док су преостали реолошки параметри боље моделовани коришћењем четири или пет латентних варијабли. Квалитет регресионих модела је окарактерисан на основу минималне вредности корена средње квадратне грешке предвиђања (RMSEP) према броју латентних варијабли који су обезбедиле најбољу тачност модела R^2 , способност модела да предвиди нове узорке R^2 предвиђања уз минимизовање грешака суме квадрата унакрсно валидираног предвиђања (PRESS). На основу вредности R^2 предвиђања, уочава се да су PLSR модели добри за 5 реолошких параметра јер су R^2 предвиђања $\geq 0,6$ Међутим, развијени модели за предвиђање параметре FDT, FDS и Rmax, нису задовољавајући (R^2 предвиђања $< 0,6$). Поменути резултати указује на лошу

стабилност, односно немогућност модела да идентификује значајнију повезаност емпиријских реолошких параметара (FDT, FDS и Rmax) са SRC параметрима.

Табела 11. Најзначајнији статистички параметри PLSR модела

Параметри	LV	R^2	R^2 предвиђања	RMSEP	PRESS
FWA (%)	2	0,93	0,89	0,096	0,177
FDT (мин)	2	0,60	0,10	0,312	1,850
FST (мин)	5	0,85	0,60	0,192	0,703
FDS (BU)	5	0,71	0,37	0,198	0,747
E (cm ²)	4	0,92	0,88	0,078	0,116
Ex (мин)	4	0,81	0,70	0,176	0,588
R (BU)	2	0,58	0,39	0,223	0,291
Rmax (BU)	2	0,70	0,55	0,196	0,736
FWA + E + Ex + Rmax	4	0,89	0,85	0,184	0,648

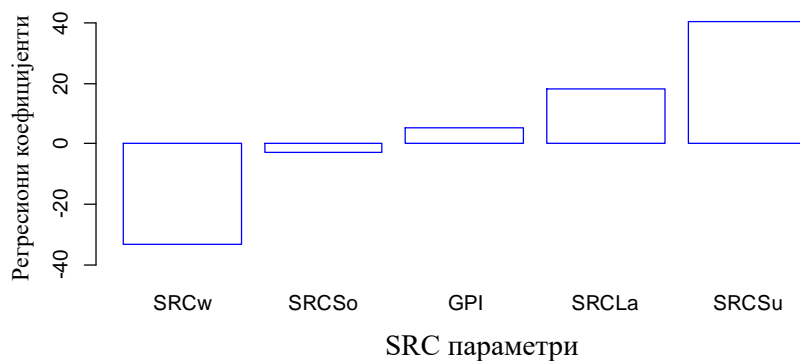
FWA – фаринографска моћ упијања воде, FDT – време развоја теста, FST – стабилност теста, FDS – степен омекшања, E – енергија, Ex – растељивост, R – отпор на 5 cm, Rmax – максимални отпор, FWA + E + Ex + Rmax – модел са вишеструким одговорима, LV – латентне варијабле, R^2 – коефицијент детерминације, R^2 предвиђања – коефицијент предвидљивости, RMSEP – корен средње квадратне грешке предвиђања, PRESS – грешка суме квадрата унакрсно валидираног предвиђања.

За FST и Ex параметре, перформансе развијених модела могу се категоризовати као добре. Сви развијени модели имају међусобно упоредиве RMSEP и PRESS грешке, што се такође може сматрати задовољавајућим. Оптималан број латентних варијабли PLSR модела за параметре FWA и E је 2, односно 4 латенте варијабле. Поменути резултати су у складу са претпоставком да се SRC метода може користити за предвиђање ова два значајна емпиријска реолошка параметра са веома задовољавајућом предиктивном снагом R^2 предвиђања = 0,89 за фаринографску моћ упијања воде (FWA) и R^2 предвиђања = 0,88 за енергију (E).

За развој PLSR модела вишеструких одговора, међу испитиваним параметрима одабрана су четири реолошка параметра која дају најкорисније информације о различитим узорцима. Вредности параметра SRCLa, SRCsu, SRCso, SRCw и GPI, кориштена су као независне промењиве а емпиријски реолошки параметри FWA, E, Ex, и Rmax као зависне промењиве модела. За модел вишеструких одговора добијен је висок коефицијент предвидљивости (R^2 предвиђања = 0,85), стандардизовани регресиони коефицијенти модела су приказани на слици 18. Вредност RMSEP од 0,18 је упоредива са вредностима модела са који моделују појединачне параметре, чиме се показује да увећање сложености модела није довело до значајног повећања грешке и може се сматрати врло добром. Једна од атрактивних карактеристика развијених PLSR модела је та што се односи између независних промењивих (у нашем случају SRC параметара) и зависних промењивих одговарајућег модела (емпиријски реолошки параметари) могу индуковати из стандардизованих регресионих коефицијената

независно промењивих. Стандардизовани коефицијенти представљају средњу промену зависних промењивих са једним помаком стандардне девијације у независно промењивим. На овај начин, стандардизовани регресиони коефицијенти дају смер (једнодимензионални) утицаја независно промењивих у моделу.

На слици 18, коефицијенти регресије су нормализовани како би њихова апсолутна сума износила 100% те су сортирани према знаку који указује на правац њиховог деловања у посматраном моделу. На основу графичког приказа сагледан је допринос сваке појединачне независно промењиве у развијеном регресионим моделом. Очигледно је да независно промењиве SRCw, SRCLa и SRCsu дају значајан допринос предиктивној снази модела са више одговора, док независно промењиве SRCso и GPI имају много мањи допринос предикцији. Објашњење за уочену значајност независно промењивих може се наћи у природи реолошког система пшенично брашно и орјентацији самих полимера које SRC метода мери. Наиме, реолошка својства теста су скоро потпуно одређена квалитетом и квантитетом протеина и способношћу задржавања воде у тесту а независне промењиве SRCw, SRCLa и SRCsu су управо усмерене на полимере који у највишем степену одређују наведене реолошке карактеристике. Најмањи стандардизовани коефицијент је добијен за SRCso параметар, која указује на значај оштећеног скроба у понашању теста током замеса, обраде и печења.

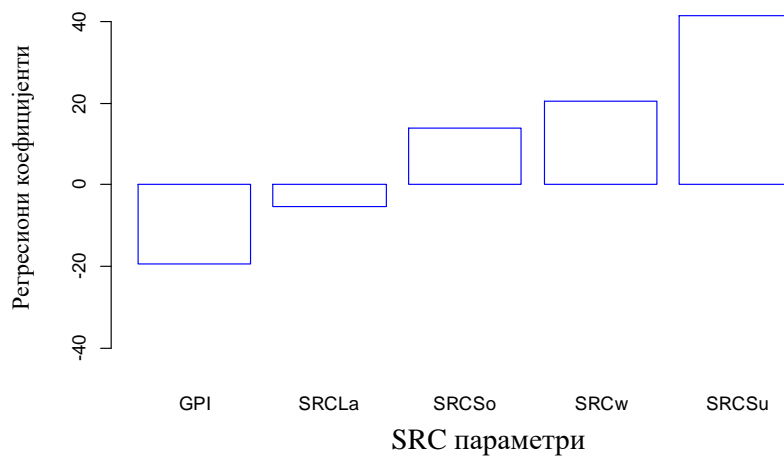


Слика 18. Правац утицаја SRC параметара у PLSR моделу вишеструких параметара.

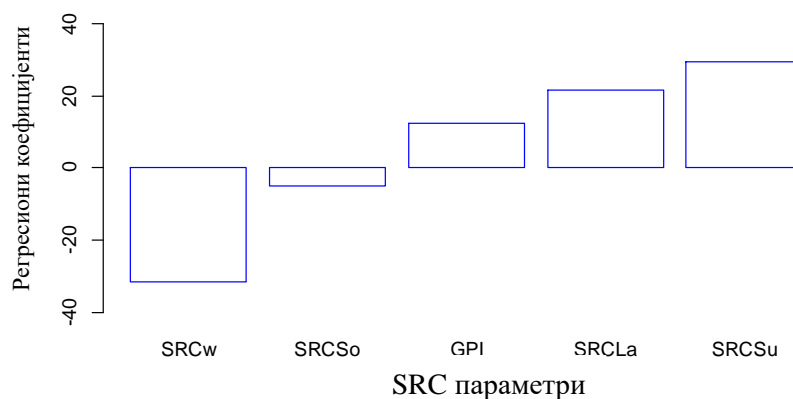
Претпоставља се да већи утицај SRCso параметра у PLSR моделу који пружа вредности вишеструких параметара као зависно промењивих, није потврђен с обзиром на чињеницу да су од реолошких параметра чак три екстензографска (E, Ex и Rmax) која зависе пре свега од квалитета протеина (глутенина), а само један фаринографски (FWA). Оваква повезаност садржаја оштећеног скроба са моделима реолошких параметрима теста је у сагласности и са ранијим истраживањима значаја оштећеног скроба на реолошка својства шеничног брашна (Iuliana и остали, 2010). Значајан допринос независно промењивих SRCw и SRCsu у предикцији реолошких параметра усвојеног модела највероватније је повезан са чињеницом да су оба параметра у великој мери повезана са капацитетом задржавања воде, као једним од најважнијих својстава

пшеничног брашна. Као што је више пута напоменуто параметар SRCw указује на укупну способност задржавања воде узроковану од стране свих полимера у брашну, док са друге стране, параметар SRCSu указује само на значај арабиноксилана (Goesaert и остали, 2005; Kweon и остали, 2011). Различити правци параметара SRCw и SRCSu вероватно се могу објаснити способношћу арабиноксилана да кроз модулацију протеинске структура у одређеној мери модификују реолошке параметре у везу са протеинима (Kweon и остали, 2011). Исти правац деловања параметара GPI и SRCLa вероватно је повезан са чињеницом да су оба параметра условљена квантитетом и квалитетом протеина који имају пресудан утицај на јачину брашна у структуру теста (Guzmán и остали, 2015; Mastilović, и остали, 2018).

На сликама 19 и 20 графички су представљени стандардизовани коефицијенти регресије модела за појединачно предвиђање параметара E и FWA.



Слика 19. Правац утицаја SRC параметара у PLSR моделу FWA параметра.



Слика 20. Правац утицаја SRC параметара у PLSR моделу E параметра.

У случају FWA параметра, позитивна вредност стандардизованог коефицијента регресије независно промењивих SRCSo, SRCw, и SRCSu и са друге стране негативне

вредности стандардизованог коефицијента регресије независно промењивих GPI и SRCLa дефинишу правац доприноса сваког од поменутих параметара моделу у предвиђању фаринографску моћи упијања воде. Очекивано параметар SRCSu има највећи допринос, с обзиром да арабиноксилани од свих полимера пшеничног брашна имају највећи капацитет везивања воде. Такође је прихваћено да растворљиви арабиноксилани могу да ојачају протеинску структуру и испоље одређени утицај на реолошке параметре који се доводе у везу са протеинима (Kweon и остали, 2011). До изразите уочљивости наведена тврдња долази у моделу за E параметар.

Како је установљено, осим очекиваних важности параметара SRCLa и GPI параметара, параметар SRCSu игра значајну улогу у моделовању E параметра. Познато да се и количина протеина разликује у појединачним пасажним брашнима (Wang и остали, 2007), као и чињеница да додатно и структура глутенинских протеина утиче на појаву даљих разлика између пасажних брашна (Wang и остали, 2006; Wang и остали, 2007) те не чуди важност параметара SRCLa и GPI. Испитивања у оквиру овог дела дисертације потврђују значајност параметра SRCSu у свим развијеним PLSR моделима. Највероватнији узрок изражене значајности поменутог параметра би се могао објаснити различитом расподелом анатомских делова (перикарпа алеуронског слоја и ендосперма) зрна пшенице, а самим тим и удела арабиноксилана у испитиваним узорцима пасажних брашна (Delcour и остали, 1999; Kweon и остали, 2011).

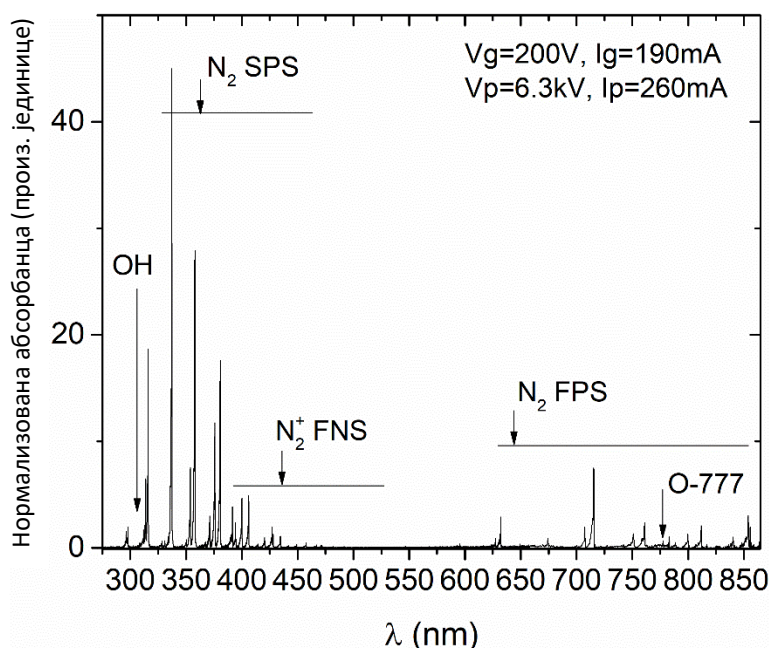
На основу анализе добијених експерименталних резултата и њихове статистичке обраде кроз PCA и PLSR методе, евидентно је да се на основу развијених модела чије су независно промењиве параметри SRC методе у великој мери веродостојно могу предвидети одређене реолошке особине теста. Као поуздани параметри су се издвојили SRCLa и GPI који указују на квалитет протеина, те SRCSu и SRCw док је, значајност параметра SRCSu у предвиђању реолошких особина нешто мања. Добијени резултати још једном потврђују прихваћено становиште да за увид у квалитет брашна није увек потребно одредити све параметре SRC методе већ да је довољно одредити само оне који су усмерени на полимере који одређују показатељ квалитета брашна од интересовања (Duyvejonck и остали, 2012).

5.2. Испитивање утицаја хладне атмосферске плазме на пшенично брашно

5.2.1. Карактеризација извора хладне плазме

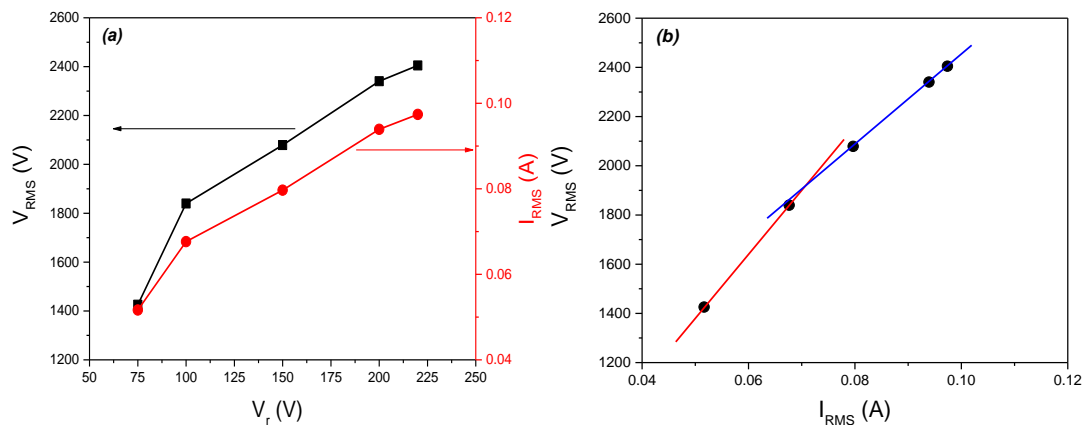
Оптички спектар пражњења плазме забележен је у широком опсегу таласних дужина од 270 nm до 860 nm коришћењем OES технике. Мерења емисије су вршена након неколико секунди од пробоја и укључивања плазме кроз отвор са кварцним

прозорчићем направљеним на пластичној кутији. Просторни угао снимања укључивао је укупну запремину пражњења директно испод плоче електроде као и запремину испод електроде. Спектар пражњења (у произвољним јединицама) снимљен је у одсуству узорака брашна (слика 21) и пружа квалитативну информацију о присуству побуђених врста у плазми. Најинтензивнија емисија је забележена у секундарној позитивној траци N_2 као што је очекивано за атмосферску плазму побуђену у ваздуху. Пред тога, у снимљеном спектру је видљива прва позитивна трака N_2 , као и линије из прве негативне траке молекулског јона азота. Релативно низак интензитет побуђених стања атомског кисеоника (линија на 777 nm) је очекиван услед учествовања атомског кисеоника у процесу стварања озона те због феномена гашења побуђених стања од стране N_2 и O_2 молекула (Walsh и остали, 2010). С обзиром да плазма настаје у амбијенталном ваздуху са одређеним уделом влажности, односно уз присуство водене паре, ОН радикали се стварају углавном кроз директну дисоцијацију молекула воде. Према наведеном, на снимљеном спектру уочавају се линије ОН (А-Х) опсега побуђених ОН радикала ниског интензитета (306-309 nm). Поред детектованих побуђених врста које емитују зрачење у снимљеном UV-VIS делу спектра, постоје и друге реактивне врсте произведене у SDBD плазми које су одговорне за хемијске реакције са узорком и деградацију биохемијских једињења. То су пре свега озон (O_3), водоник пероксид (H_2O_2), као и пероксинитрити и азотни оксиди (Sarangarani и остали, 2017; Shi и остали, 2017; Sarangarani и остали, 2019). Према свему наведеном, применом оптичке емисионе спектроскопије потврђено је присуство одређених реактивних врста у коришћеном SDBD извору хладне атмосферске плазме. Тако је директно потврђено постојање реактивних врста плазме за које се претпоставља да могу испољити утицај на протеине пшеничног брашна и учествовати у редукцији саджаја микотоксина.



Слика 21. Оптички емисиони спектар SDBD у ваздуху под атмосферским притиском.

Поред оптичке урађена је и електрична карактеризација извора плазме. Вредност напона и јачине струје коју обезбеђује високонапонски трансформатор мерене су у тачки близу везе напајане електроде и проводника. Такође, мерен је напон на улазу у висиконапонски трансформатор. Из временски променљивих сигнала струје и напона израчунате су средње квадратне вредности величина (RMS). Зависност RMS вредности напона и јачине струје у зависности од напона на варијабилном трансформатору приказане су на слици 22 (а). Са повећањем напона на варијабилном трансформатору јавља се повећање и напона и јачине струје у високонапонском крају кола. Максималне RMS вредности напона и јачине струје постигнуте у систему су износиле 2400 V и 0,1 A.



Слика 22. (а) Зависност вредности V_{RMS} и I_{RMS} у односу на постављени напон на варијабилном трансформатору V_r ; (б) Струјно-напонска карактеристик SDBD плазма система. Црвена и плава линија су визуелне вођице за лакше праћење промене импедансе.

Струјно-напонска карактеристика (V - I карактеристика) приказана је на слици 22 (б). Одмах након пробоја и појаве плазме, плазма не прекрива читаву површину електроде, већ се са увећањем вредности напона шири до тренутка када једнообразно прекрије читаву површину електроде. Овај феномен се може посматрати и кроз промену импедансе система, која представља нагиб V - I карактеристике на слици 22 (б). Линије на слици представљају визуелне вођице линеарне функције провучене кроз измерене тачке (црвена и плава линија). Оне показују да се на постојећој карактеристици могу издвојити две апроксимације линеарне промене са различитим нагибима, тј. да долази до промене импедансе. За ниже вредности напона и струје импеданса је већа док за веће вредности примењеног напона долази до умањења вредности импедансе што указује на већу површину хомогене плазме. Уопштено посматрано, када се плазма појави долази до промене импедансе комплетног система. Промена импедансе према нижој вредности може се посматрати кроз ефективно коло система представљено као две паралелно повезане сложене импедансе. Једна импеданса настаје услед побуђене хладне атмосферске плазме, које се само може

представити као сложено RLC коло, док је друга импеданса последица система за напајање електрода. Импеданса система електрода највећим делом проистиче из капацитивности система електрода а мањим делом из отпора електричних каблова и спојева. Према томе, код успостављања плазме на великој површини промене укупне импедансе указују на промену површине која је покривена пражњењем. Ово је такође и разлог зашто је као улазни напон варијабилног трансформатора узета вредност од 200 V. На овој вредности, тотална импеданса је константна према I-V карактеристици и не мења се приликом даљег повећања улазног напона. То значи да је укупна површина електроде хомогено прекривена плазмом што је неопходна да би се постигла оптимална ефикасност примене и константност услова обраде. Такође, могуће веће вредности радног напона избегнуте су због могућности настанка варница или прегревања система.

5.2.2. Утицај третмана плазмом на пшенично брашно

Третман пшеничног брашна хладном атмосферском плазмом условљен је са више фактора, односно, параметара који одређују услове третмана. Како би се сагледао значај сваког фактора и њихових интеракцијама у овој фази истраживања коришћена је методологија одзивне површине (Montgomery, 1984). Како би се уз минималан потребан број понављање, омогућило моделовање и оптимизација услова третмана, одабран је централни композитни план (CCD) експеримента. Експеримент је усмерен на сагледавање утицаја три независне променљиве (услова третмана) на три нивоа уз три понављања у централној тачки како би се сагледала и проценила експериментална грешка. У табели 12 приказани су услови третмана пшеничног брашна хладном атмосферском плазмом описани кодовима експерименталног дизајна као и стварним вредностима током третмана. Услови третмана били су: време третмана, удаљеност узорка од хладне плазме и степен искоришћења заклона. Услов третмана, степен искоришћења заклона, уведен је како би се покушали раздвојити ефекте различитих реактивних врста хладне атмосферске плазме. Прецизније, утицај реактивних врста хладне атмосферске плазме кратког животног века од реактивних врста дугог животног века које су једине долазиле у контакт са узорком при вредности степен искоришћења заклона 100%. Циљ ове фазе експеримента је био да се на бази примене централно композитног плана и анализе главних компонената сагледају утицаји различитих услова третмана на испитиване зависне параметре. Како би се сагледала и проценила експериментална грешка спроведена су три понављања у централној тачки. Сви експерименти су спроведени према препорученом насумичном редоследу експеримената како би се избегли или минимизовали утицаји који могу водити ка грешкама приликом мерења.

Табела 12. Дизајн експеримента са кодираним и стварним вредностима услова третмана.

Бр.	Кодови дизајна			Услови третмана		
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁	x ₂	x ₃
1	1	-1	-1	180	50	100
2	0	-1	0	105	50	50
3	1	0	0	180	28	50
4	0	0	0	105	28	50
5	0	1	0	105	6	50
6	-1	0	0	30	28	50
7	1	-1	1	180	50	0
8	-1	-1	1	30	50	0
9	1	1	1	180	6	0
10	0	0	1	105	28	0
11	-1	1	1	30	6	0
12	1	1	-1	180	6	100
13	0	0	0	105	28	50
14	0	0	-1	105	28	100
15	-1	1	-1	30	6	100
16	-1	-1	-1	30	50	100
17	0	0	0	105	28	50

Кодирани промењиве: x₁ – време третирања (s), x₂ – растојање узорка од плазме (mm), x₃ – степен искоришћења заклона (%).

Након извршених третмана по дефинисаном експерименталном плану, одрђене су одговарајуће зависне промењиве, односно, зависни параметри. С обзиром да су количине третираних узорака биле ограничене, а да је у првом делу истраживања потврђена добра корелација параметра SRC методе са релевантним емпиријским реолошким параметрима у овој фази одређивани су параметри SRCLa, SRCSo, SRCСу, SRCw и GPI. Поред параметра SRC методе ефекти третмана на квалитет пшеничног брашна праћени су и применом спектроскопијских метода у ултраљубичастом и инфрацрвеном делу спектру, методе за одређивање садржаја слободних сулфхидрилних група, реометријском анализом на реометру и глутопик уређају те параметара глутен индекса (GI) и садржај влажног глутета (WG). Добијени резултати потврдили су да различити услови третмана хладном атмосферском плазмом доводе до значајних промена вредности готово свих испитиваних параметара (табела 13) у односу на контролни узорак (нетретирано брашно). Контролни узорак је имао следеће вредности параметара SRC методе: SRCLa (120,8), SRCСу (95,4), SRCSo (76,9) и SRCw (67,0), а вредности са садржајем слободних од сулфхидрилних група 0,426 $\mu\text{mol}^{-1}\text{g}$.

Табела 13. Утицај услова третмана на вредности испитиваних показатеља квалитета.

Бр.	SRCLa	SRCSu	SRCSo	SRCw	GPI	TM	PMS	SH	GI	WG	G'
1	119,3	102,5	82,8	71,3	0,64	65	117	0,461	99,12	22,9	3717
2	120,9	105,1	84,6	73,5	0,63	64	137	0,393	99,06	21,4	3454
3	112,9	105,4	84,0	74,0	0,59	70	114	0,400	95,47	24,3	4308
4	116,5	105,6	87,9	73,6	0,60	62	134	0,407	99,10	22,3	3097
5	119,0	101,4	84,8	70,7	0,63	63	123	0,399	99,54	22,0	2839
6	119,9	105,1	83,0	72,7	0,63	64	129	0,496	99,53	21,7	2226
7	113,6	110,2	85,8	76,4	0,57	65	113	0,376	97,89	23,8	3530
8	122,6	104,6	83,7	72,9	0,65	64	123	0,440	99,55	22,7	2286
9	112,8	108,4	89,2	75,4	0,57	64	124	0,264	94,76	21,0	2623
10	118,8	106,4	86,1	74,2	0,61	63	133	0,365	100,00	22,1	3144
11	121,8	103,9	83,9	70,9	0,64	65	147	0,393	99,54	22,2	2055
12	119,4	96,7	82,2	68,1	0,66	63	128	0,360	98,29	23,5	2927
13	115,0	105,8	87,0	74,7	0,59	63	138	0,432	99,54	21,9	3171
14	120,2	100,4	83,6	71,6	0,65	65	123	0,498	100	22,0	2745
15	124,8	97,8	82,0	70,5	0,69	66	120	0,483	98,29	23,5	1927
16	125,3	97,7	82,0	70,8	0,69	63	123	0,523	97,81	22,9	2481
17	113,7	108,3	84,9	74,1	0,58	63	135	0,402	99,55	22,4	3040

SRCLa – способност задржавања раствара млечне киселине, SRCSo – способност задржавања раствара натријум карбоната, SRCSu – способност задржавања раствара сахарозе, SRCw – способност задржавања воде, GPI – индекс перформанси глутена, TM – максимални обртни момент, PMS – време достизња максимума, SH – садржај слободних сулфхидрилних група ($\mu\text{mol}^{-1}\text{g}$), GI – глутен индекс, WG – влажни глутен, G' – модул еластичности.

Већина испитиваних параметара се мењала зависно од услова третмана хладном атмосферском плазмом, што указује да је њихова примена као релевантних показатеља у промене квалитета брашна након третмана хладном атмосферском плазмом оправдана. Експериментални резултати су подвргнути анализи корелација као што је приказано матриксом корелација у табели 14.

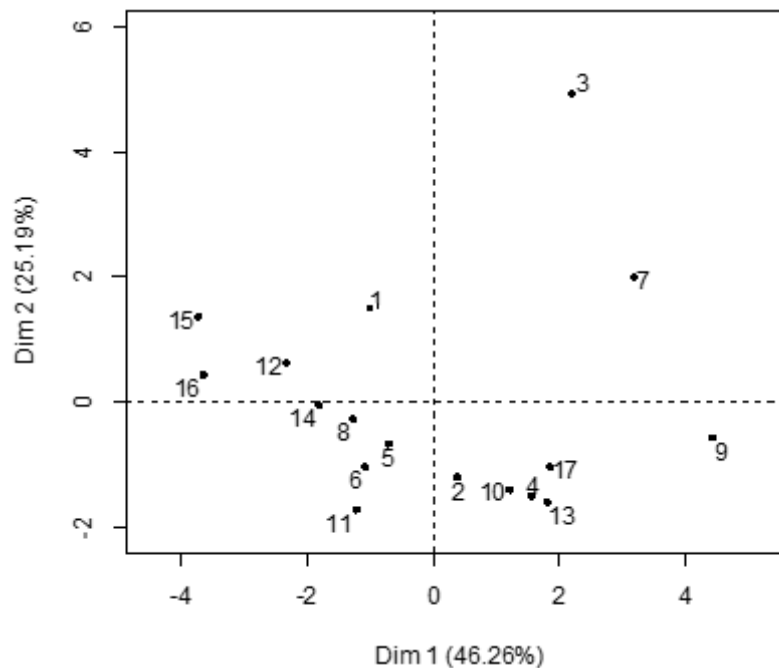
Табела 14. Матрикс Персонових корелација испитиваних показатеља квалитета.

	SRCLa	SRCSu	SRCSo	SRCw	GPI	SH	TM	PMS	GI	WG
SRCLa	—									
SRCSu	-0.735***	—								
SRCSo	-0.696**	0.726***	—							
SRCw	-0.694**	0.922***	0.741***	—						
GPI	0.947***	-0.902***	-0.807***	-0.840***	—					
SH	0.623**	-0.510*	-0.676**	-0.388	0.646***	—				
TM	-0.145	0.019	-0.279	0.077	-0.035	0.071	—			
PMS	0.099	0.124	0.234	-0.037	-0.056	-0.147	-0.493*	—		
GI	0.415	-0.136	-0.239	-0.255	0.289	0.453	-0.495*	0.470	—	
WG	0.003	-0.257	-0.481	-0.196	0.173	0.193	0.553*	-0.576*	-0.252	—
G'	-0.623**	0.362	0.230	0.397	-0.535*	-0.261	0.344	-0.307	-0.264	0.319

Корелације значајне на нивоу: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

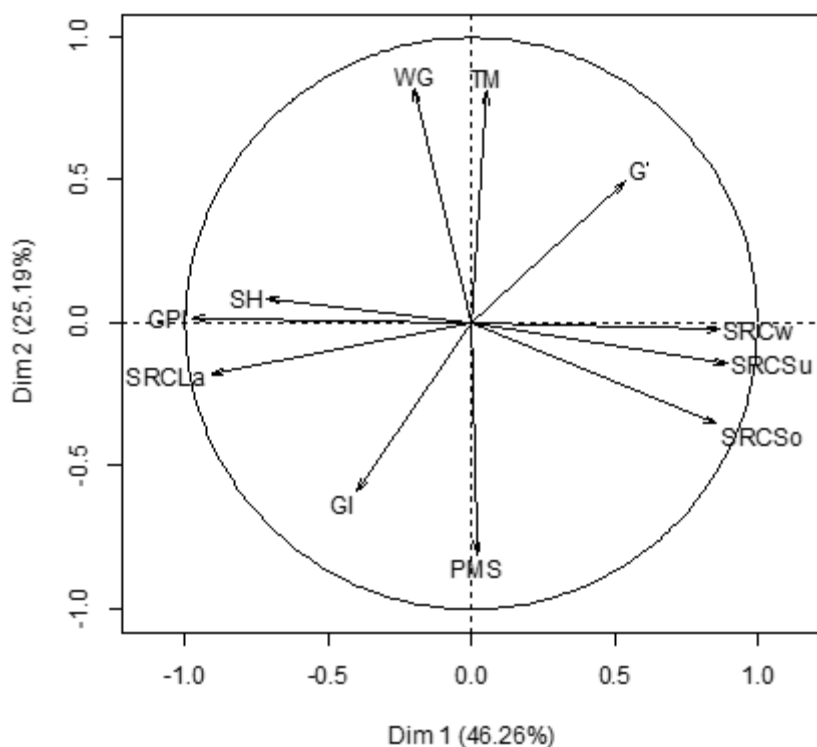
У складу са резултатима претходних истраживања (Xiao и остали, 2006; Hammed и остали, 2015; Lindgren и Simsek, 2016; Portman и остали, 2018; Wessels и остали, 2020) уочене се значајне позитивне или негативне корелације међу параметрима способности задржавања раствора. Такође су уочене значајне корелације између већине параметара SRC методе, осим SRCw, са садржајем сулфхидрилних група. Параметар SRCLa не испољава статистички значајну корелацију са вредностима GI и WG али је у негативној и значајној корелацији са модулом еластичности G'. Посматрајући глутопик параметре, максимални обртни момент (TM) и време достизања максимума (PMS), уочене је само међусобна статистички значајна негативна корелација и значајна негативна корелација GI са параметром TM. У сврху бољег увида и поређења између третираних узорака брашна извршена је и анализа главних компоненти, која је омогућила раздвајање група узорака у факторској равни (слика 23).

Дати узорци описани су коришћењем прве две главне компоненте које описују 71,45% укупне варијансе присутне у подацима што се може сматрати довољним за приказивање целокупног сета експерименталних података. На слици 23. уочљиво је раздвајање узорака према постављеним параметрима примењеног експерименталног дизајна. Тако се јасно уочавају заједно груписани узорци 4 13 и 17, који представљају понављања у централној тачки. На десној страни се издвајају узорци брашна 7 и 9 који су на различитим растојањима од извора хладне атмосферске плазме са степеном искоришћења заклона од 0% третирани током 180 s. Ову групу прати и узорак број 3 такође третиран током 180 s али при растојању од 28 mm и степену искоришћења заклона од 50%.



Слика 23. PCA анализа расподеле узорака након третирања хладном атмосферском плазмом

На левој страни факторске равни издвајају се узорци 15 и 16 који су третирани 30 s са степеном искоришћења заклона од 100% али на различитим растојањима од плазме. Из табеле 13 уочава се да је дуже време третмана пшеничног брашна проузроковало прогресивно повећање модула еластичности G' док вредности параметара WG и GI варирају у уском интервалу а садржај сулфхидрилних група опада. Даље, уочава се да је узорак број 9 имао много мање вредности параметара WG , GI , садржај сулфхидрилних група и модула еластичности G' у односу на узорке третиране током 180 s али при већим растојањима брашна од извора хладне плазме или већем степену искоришћења заклона. Овакви резултате за узорак 9 би се могли објаснити претпоставком да при одговарајућим условима третмана, реактивне врсте плазме другачије од озона испољавају додатни утицај на својства пшеничног брашна. Могуће је да услед разлика у просторно-временским параметрима дифузије долази до одсуства краткотрајних метастабилних реактивних врста (као што су $O_2^{\cdot-}$, OH^+ , N_2^+ , N_2O^+) хладне атмосферске плазме на већим удаљеностима. Наелектрисане честице и врсте хладне плазме кратког животног века при већим удаљеностима узорка од плазме, не утичу на узорак јер подлежу рекомбинацији пре контакта са узорком. Односно, на узорак директно делују само реактивне врсте (као што су O_3 , O_2 , NO_2 , NO и CO) дугог животног века. Узорак 9 је у нашем случају, према параметрима третмана највише изложен утицају реактивне хемији плазме, која укључује велики број реактивних врста и хемијских реакција (Besker и остали 2004). С друге стране, промене су вероватно у вези и са оксидативним деловањем хладне плазме јер су високе концентрације озона саставни део третмана хладном атмосферском плазмом у ваздуху (Misra и остали, 2015a). Ефекти смањења садржаја слободних сулфхидрилних група у пшеничном брашну се не смеју поистоветити са оним који се јављају у пшеничном тесту. Овакво смањење садржаја сулфхидрилних група у релативно сувим честицама пшеничног брашна указује на дисулфидно повезивање протеина глутена. Сличне промене али након термичког третмана пшеничног брашна у садржају слободних сулфхидрилних група приметили су и Van Steertegem и остали (2013). Иако у истраживању Misra и остали (2015a) нису спроведена директна мерења, аутори износе претпоставку да је дејство озона основни узрок смањења садржаја слободних сулфхидрилних група. Ипак, због другачије поставке експеримента у овој студији, који за разлику од поставке експеримента Misra и остали (2015a) осим индиректним третманом, пшенично брашно излаже и директном третману хладне атмосферске плазме, неопходно је спровести даља истраживања којима би се прецизније објасниле наведене промене код узорка 9. На слици 24 приказан је круг корелација, односно позиционирање испитиваних параметара према главним компонентама.



Слика 24. Круг корелација испитиваних параметара.

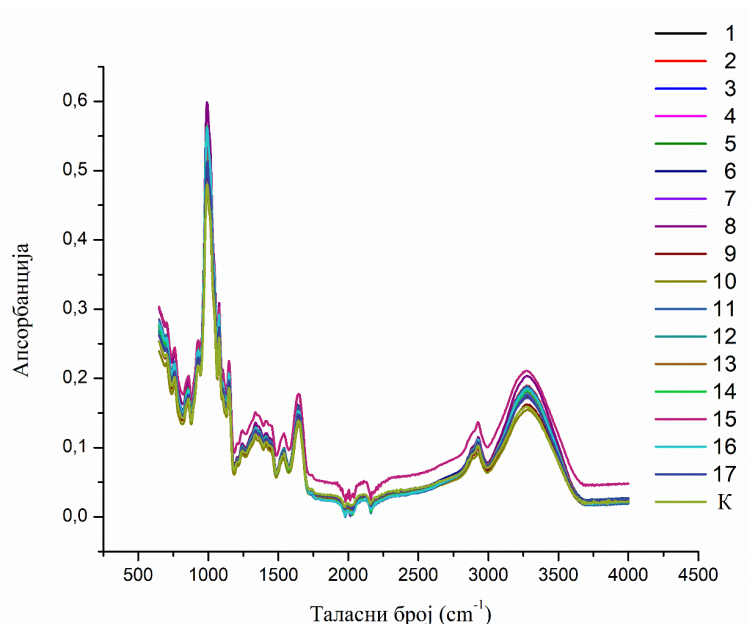
SRCLa – способност задржавања раствара млечне киселине, SRCSo – способност задржавања раствара натријум карбоната, SRCsu – способност задржавања раствара сахарозе, SRCw – способност задржавања воде, GPI – индекс перформанси глутена, TM – максимални обртни момент, PMS – време достизња максимума, SH – садржај слободних сулфхидрилних група ($\mu\text{mol}^{-1}\text{g}$), GI – глутен индекс, WG – влажни глутен, G' – модул еластичности.

Првој главној компоненти PC1 позитивно доприносе параметри SRCsu, SRCso и SRCw. Наведеним параметрима, негативно корелирају параметри SRCLa те GPI као и садржај слободних сулфхидрилних група. Друга компонента PC2 описује позитивну корелацију параметара TM и WG. Параметри PMS и TM не испољавају корелацију са параметрима SRC с обзиром да се налазе ортогонално од њих. У односу на њих, параметри PMS и GI негативно корелишу. Модул еластичности G' је скоро подједнако описан са обе главне компоненте. Висока негативна корелација утврђена је између параметара G' и GI те умерено јака негативна корелација са параметрима SRCLa и GPI. Према наведеном, са слике 24 јасно се види раздвајање параметара према врсти полимера чије карактеристике дефинишу, тако су на десној страни PC1 груписани параметри који се односе на скробну компоненту пшеничног брашна (хидратациона својства) док се на левој страни издвајају параметри који се односе на количину и карактеристике протеина пшеничног брашна, прецизније, протеина глутена.

5.2.3. Утицај третмана на конформацијске промене протеина – FTIR анализа

У овом делу дисертације примењена је инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (енгл. Fourier transform IR spectroscopy, FTIR). FTIR анализа је једна

од најчешћих метода за испитивање конформацијских промена на протеинима (Mangavel и остали, 2001; Nawrocka и остали, 2018). На слици 25 су приказани спектри свих третираних узорака брашна хладном атмосферском плазмом као и контролни узорак.



Слика 25. Инфрацрвени спектри узорака третираних хладном атмосферском плазмом и контролог узорка (К).

FTIR анализа узорака спроведена је у циљу испитивања утицаја третмана хладном атмосферском плазмом на конформацијске промене протеина пшеничног брашна. Анализом су посматране и квантификоване промене у конформацијама протеина на основу добијених спектра након третмана брашна хладном атмосферском плазмом. Типичан инфрацрвени спектар протеина често садржи девет амидних трака са вибрацијским доприносима и протеина и аминокиселинских бочних ланаца (Georget и Belton, 2006; Kong и Yu, 2007). Сви добијени спектри у целини, као и у својим одређеним деловима карактеристични за узорак типа пшеничног брашна. Јасно се издвајају три регије које одговарају одређеним компонентама пшеничног брашна: скроб и остали полисахариди ($1250-800\text{ cm}^{-1}$), протеини, односно регије амид I и амид II ($1700-1500\text{ cm}^{-1}$) и широка трака на око 3300 cm^{-1} која одговара вибрацијама које се дешавају у молекулима воде. Осим наведених карактеристичних максимума види се да долази до преклапања свих појединачних спектра што указује на минималне промене у узорцима након третмана хладном атмосферском плазмом.

У овом истраживању испитиван је утицај хладне атмосферске плазме на апсорпције инфрацрвеног зрачења повезане са C=O истезањем које је карактеристична за амид I траку. Наведена трака представља најистакнутији и најосетљивији вибрациони појас који указује на секундарну структуру протеина (Haris и Severcan, 1999; Mangavel и остали, 2001). Предпоставили смо да третман може утицати на аминокиселине,

примарни ниво структуре протеина, односно утицати у којој просторној конформацији ће се протеини налазити, односно, који облик секундарне структуре ће заузимати. У протеинима пшеничног брашна присутна су два основна облика увијања полипептидног ланца у простору, односно секундарне структуре. Формирањем водоничних веза између имидних и карбонилних група у навоју полипептидног ланца, настаје α -хеликс секундарна структура. Када се два полипептидна ланца или сегменти једног истог полипептидног ланца повежу уздуж водоничним везама настаје β -структура (β раван и β обрт) (Singh и остали, 2016). Поред наведених уређених облика секундарне структуре протеина, у амид I траци јавља се и неуређена структура. Промене у амид I траци често су мале у поређењу са укупном ширином појаса, што резултира једним широким максимумом апсорбције у добијеном спектру уместо низа појединачних максимума за сваку наведену врсту секундарне структуре.

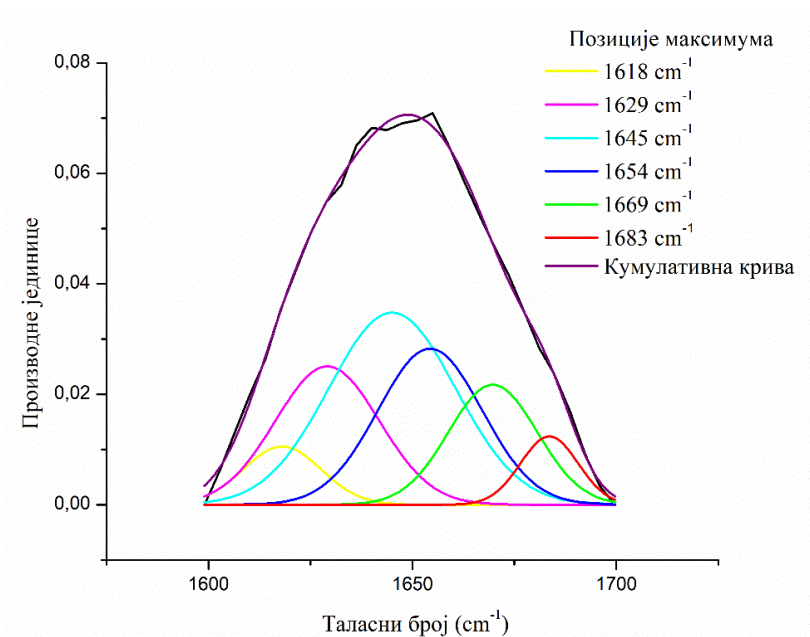
Идентификација максимума апсорбције спектра у подручју амид I траке преко другог деривата оригиналног спектра применом математичке процедуре Фуријеове деконволуације (OriginPro 8.5) показала је да су се јасни максимуми налазили у опсезима карактеристичних максимума појединачних секундарне структуре протеина (табела 15).

Табела 15. Опсеги унутар Амид I регије и претпостављене секундарне структуре.

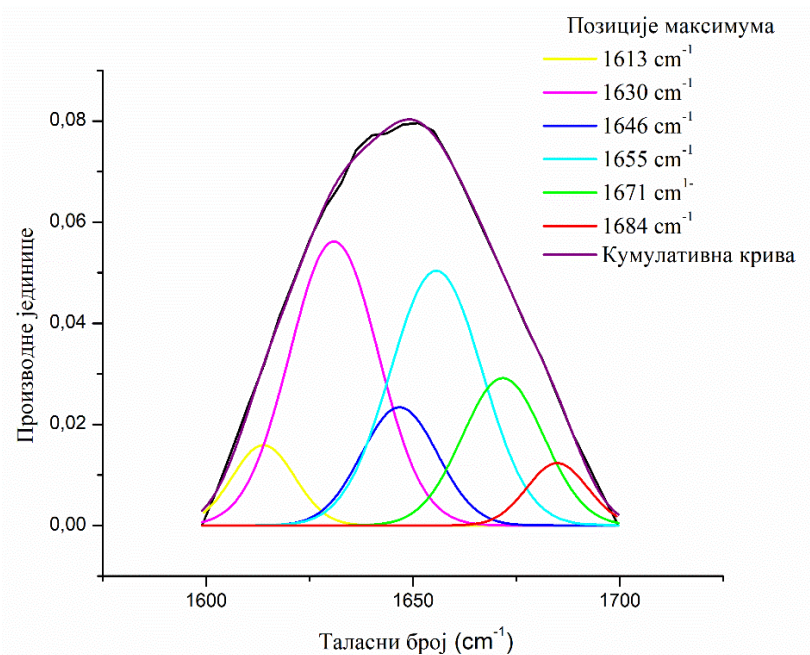
Секундарна структура	Таласни број (cm^{-1})
α -хеликс	1650-1660
β раван	1610-1640
β -окрет + β раван	1660-1690
Насумична завојница	1640-1650

Знак + указује да су површине β раван и β окрет рачунате заједно.

Након математичке трансформације идентификовано је шест карактеристичних максимума чији су интервали били у складу са претходним истраживањима (Wang и остали, 2014; Yang и остали, 2015; Wang и остали, 2016). Максимуми у интервалу $1650 - 1660 \text{ cm}^{-1}$ су одговарали α -хеликс структури, у интервалу $1610 - 1640 \text{ cm}^{-1}$ β равнима, у интервалу $1660 - 1690 \text{ cm}^{-1}$ β -окрет + β равни, максимуми у опсегу $1640-1650 \text{ cm}^{-1}$ су одговарали неуређеној структури. На сликама 26. и 27. приказане су позиције максимума и површине секундарних структура заједно са кумулативном кривом преко оригиналног снимљеног спектра у регији амид I за узорке 9 и контролни. Ова два узорка су изабрани као два изразито дивергентна. Кумулативна крива представља реконструкцију оригиналног спектра као укупни производ свих појединачних карактеристичних максимума за испитивани узорак.



Слика 26. Приказ максимума одговарајућих секундарних структура са кумулативном кривом преко оригиналног спектра у амид I траци за контролни узорак.



Слика 27. Приказ максимума одговарајућих секундарних структура са кумулативном кривом преко оригиналног спектра у амид I траци за узорак 9 (време 180 s на удаљености 6 mm).

Удео сваке појединачне секундарне структуре изражен је као процентуални удео површине специфичног типа секундарне структуре у укупној површини свих присутних типова структуре у подручју амид I траке дељењем површине специфичне секундарне структуре са збиром површина свих секундарних структура у амид I траци. На основу резултата приказаних у табели 16 јасно се види да је дошло до одређених

промена у секундарној структури протеина код свих узорака третираних хладном атмосферском плазмом у односу на контролни узорак. Независно од услова третмана хладном атмосферском плазмом повећао се удео α -хеликс секундарних структура, а смањио удео β равни као и β -окрет + β равни структура.

Табела 16. Утицај третмана хладном атмосферском плазмом на секундарну структуру протеина.

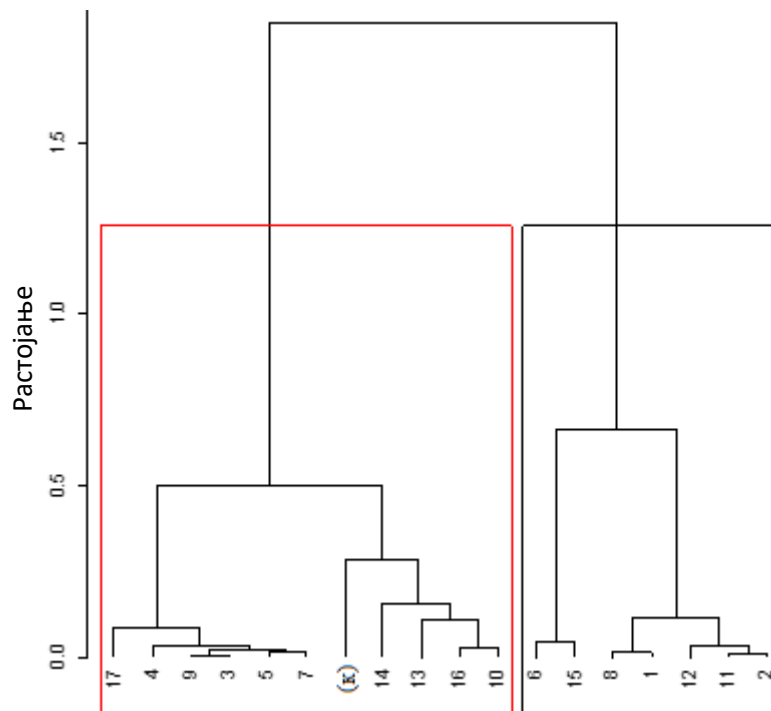
Рб.	α -хеликс (%)	β -раван (%)	β -окрет + β -равни (%)	Неуређена структура (%)
К	28,35	37,81	22,24	11,57
1	31,77	35,82	20,31	12,09
2	31,75	34,66	19,51	14,06
3	32,17	37,69	20,38	9,74
4	30,71	38,26	20,68	10,34
5	31,41	37,22	21,01	10,34
6	35,73	34,51	19,58	10,16
7	31,85	37,89	21,09	9,15
8	31,67	34,91	20,55	12,86
9	31,81	37,21	20,55	10,41
10	31,29	38,37	22,01	8,31
11	32,24	34,60	19,92	14,66
12	32,10	33,32	20,25	14,31
13	32,43	38,95	22,15	6,45
14	31,81	35,72	22,43	10,02
15	34,69	35,59	20,26	9,44
16	30,44	37,89	21,82	9,83
17	31,97	37,55	19,56	10,90

К – контролни узорак. Знак + указује да су површине β раван и β окрет рачунате заједно.

Тумачење осталих експерименталних резултата није једноставно из разлога што су третмани узорака постављени по централном композитном експерименталном дизајну, где су најчешће присутни ефекти интеракције независно променљивих. Како би се потпуно објасниле промене потребно је у обзир узети запажања до којих су дошли аутори у претходним истраживањима, а која су имала једноставнији експериментални дизајн. Misra и остали (2015a) су испитивали утицај индиректног излагања пшеничног брашна хладној атмосферској плазми и установили да третман доводи до смањења удела β -равни као и β -окрет + β -равни и успостављања већег удела α -хеликс секундарних структура што је у сагласности са добијеним резултатима. Да би се објасниле мале разлике у уделу β -равни између узорака такође је потребно сагледати резултате поменутог истраживања. Тако Misra и остали (2015a) уочавају највећи удео структуре β -раван при најинтезивнијем испитиваном третману у трајању од 10 минута

и са примењеном напону од 70 kV након почетног смањења удела β -раван структуре после блажег третмана од 5 минута са примењеном напону од 60 kV.

Слично описаним резултатима Misra и остали (2015a), резултати указују да до смањења удела β -равни долази при благим третманима (30 s) хладном атмосферском плазмом. При интензивнијим третманима (105 s и 180 s) долази до поновног увећања удела наведених структура. До увећања удела β -равни долази под свим интензивнијим условима третмана хладном атмосферском плазмом. У циљу потпунијег сагледавања утицаја третмана на секундарну структуру протеина примењена је кластер анализа. Када се спроведе кластер анализа са почетним ограничењем да се класификација спроведе у два кластера, према добијеним кластерима јасно се уочава подела узорка на основу интезитета примењених третмана хладном атмосферском плазмом. На добијеном дендограму (слика 28), први кластер чине узорци чији се третман може окарактерисати као интензивнији у односу на узорке класификоване у други кластер.



Слика 28. Кластер анализа секундарне структуре протеина. Контролни узорак (К).

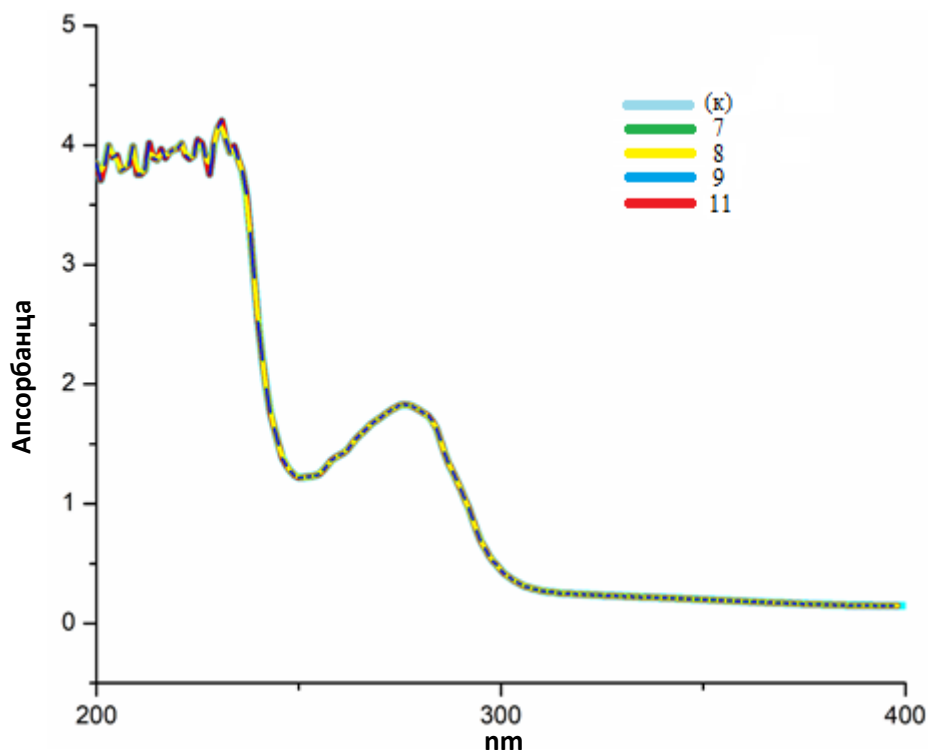
До смањења удела β равни са 37,81% у контролном узорку до 34,51% (узорак б) долази при благим условима (трајање: 30 s, растојање: 28 mm и степен искоришћења заклона; 50%) третмана хладном атмосферском плазмом. При интензивнијим условима третмана долази до поновног повећања удела β равни. У узорку 9 (трајање: 180 s, растојање: 6 mm и степен искоришћења заклона; 0%) удео β равни је 37,21%, што је блиско уделу овог типа структуре код контролног узорка.

Претходна истраживања протеинских конформација су показала да специфичне секундарне структуре, као што су α -хеликс, β раван, и β -окрет указују на физичке

особине протеина глутена. Претходна истраживања су показала да се интеракције између глутенинских субјединица одвијају кроз међумолекулске β равни услед промена у односу β -раван и α -хеликс структура (Porineau и остали, 1994). Секундарне спиралне протеинске структуре које се састоје од узастопних β -окрета се доведе у везу са вискоеластичним особинама пшеничног теста (Wellner и остали, 2005). Промене односа структура β -окрет + β равни и β равни могу узроковати промене у вискоеластичним особинама теста од пшеничног брашна третираног хладном атмосферском плазмом у односу на нетретирано брашно. Повећање удела α -хеликс секундарне структуре указује на већу стабилност молекула протеина (водоничних веза) и указује на могућност бољих хидратационим својствима. Добијени резултати инфрацрвеном спектроскопијом су у складу са резултатима добијеним за параметар SRCw где су узорци два најинтензивнија третмана, у трајању од 180s са степеном искоришћености заклона од 0% имали највећу моћ задржавања воде. Ипак, иста два узорка, 7 (31,85%) и 9 (31,81%) нису имали највећи удео α -хеликс секундарне структуре, те побољшање особине хидратације у неспецифичном раствору воде треба објаснити уоченим значајним увећањем SRCsu параметара. Нижи удео α -хеликс секундарне структуре, који је специфичан за глутенске протеине указују на могуће смањење хидратационог капацитета глутена што је и потврђено нижим вредностима SRCLa параметра. Тумачење садржаја неуређене структуре не указује на специфичну директну последичност у односу на услове третмана те је њено тумачење отежано. Већина третмана брашна доводи до смањења удела неуређених структура, као што су показали резултати у истраживањима (Dop и остали, 2017). С друге стране поједини третмани из примењеног експерименталног плана су довели до увећања удела неуређене структуре. На основу изложених резултата о утицају третмана на секундарну међумолекулске β структуру протеина претпоставља се да су настале структурне промене настале под утицајем ROS и RNS реактивних врста хладне атмосферске плазме. Поменуте промене су у складу са променама која се дешавају у секундарним структурама протеина пшеничног брашна при деловању озона (Safonova и остали, 2011). Евидентно је да правац и интензитет промена зависи од услова третмана, односно, структура може постати мање или више уређена. Дуже време трајања третмана хладном атмосферском плазмом доводи до увећања удела стабилне α -хеликс секундарне структуре протеина чиме се умањује могућност даљих променама структуре.

5.2.4. Ултразубичаста спектроскопија

На слици 29 приказани су преклопљена четири ултразубичаста спектра, узорка 7, 8, 9 и 11 из експерименталних тачки експерименталног плана те контролног узорка (К) који није третиран хладном атмосферском плазмом. Поменути узорци су одабрани јер најбоље презентују разлитости независно промењивих (услова третмана) а у нади да ће показати промене спектралне промене у односу на контролни узорак.



Слика 29. Преклопљена ултраљубичасти спектри узорака 7, 8, 9 и 11.

Спектри су снимљени у ултраљубичастом опсегу од 200 до 400 нанометара а циљ је био посматрање максимума око 276 nm који се приписује остацима ароматских аминокиселина, тј. фенилаланина, тирозина и триптофана. Како би се нагласило преклапање снимљених спектра, узорци су представљени следећим бојама: контролни узорак, светло плавом, узорак број 7 зеленом, узорак број 8 жутом, узорак број 9 плавом те узорак број 11 црвеном бојом. Сви преклопљени спектри су имали карактеристичне максимуме у спектралном региону од 270 до 280 nm међутим на спектрима није било могуће установити ни најмање визуелне разлике односно одступања у спектру повезана са ароматским аминокиселинама.

5.2.5. Оптимизација третмана плазмом на основу SRC методе

У циљу одређивања оптималних услова третмана хладном атмосферском плазмом извршена је регресиона анализа применом методе одзивних површина. Вредности параметра $TM R^2$ није било могуће генерализовати у регресиони модел на основу експерименталних мерења. Линерани модел усвојен је за параметар садржај сулфхидрилних група, док су сви остали параметри описани квадратним (SRCLa и GI) или редукованим квадратним моделелима (SRCsu, SRCso, SRCw, GPI, GI, PMS, WG и G') који су успостављени након брисања независно промењивих са високим p вредностима. На основу резултата анализе варијансе утврђено је да модели засновани на променама WG и PMS, због релативно ниских вредности R^2 WG (0,43) и PMS (0,35) имају лошу способност генерализације утицаја третмана хладне атмосферске плазме на

пшенично брашно. Осим модела развијених на бази параметара SRC методе, модели развијени за GI, модул еластичности (G') и садржај слободних сулфхидрилних група имали су задовољавајуће вредности R^2 по реду навођења 0,87, 0,86 и 0,85. Све наведено показује да услови третмана хладне атмосферске плазме брашна испољавају одређени утицај и да постоје и ефекти међусобне интеракције улазних параметара на излазне параметре процеса а да је SRC метода исказала довољну осетљивост за њихово праћење у поређењу са утемељеним методама као што су GI, модул еластичности (G') и садржај слободних сулфхидрилних група. Немогућност адекватног моделовања утицаја хладне атмосферске плазме на основу глутопик параметара је била изненађујући и тешко је пружити ваљано објашњење без детаљнијих испитивања. Објашњење се вероватно налази у неопходности прецизне регулацији хидратације брашна током спровођења глутопик методе а која је вероватно била измењена и процесом умрежавања протеина у брашну и поступком сушења у одређеним интензивнијим третманима.

У складу са једним од постављених циљева у овој дисертацији, истраживања могућности употребе параметара SRC методе уместо конвенционалних параметара, за детаљну анализу утицаја третмана хладном атмосферском плазмом на брашно изабрани су параметара SRC методе. Осим тога, три од 5 модела на основу SRC методе су исказали највеће вредности R^2 што је овакву одлуку чинило и оправданом. На крају, потребно је и указати да мерења садржаја слободних сулфхидрилних група, GI и G' параметара се заснивају на методологији фундаментално различитој од оне на којој се заснива SRC методе. Ранија истраживања су указала да SRC метода може да сагледава појединачне промене на полимерима брашна што услед интеракција није могуће учинити класичним реолошким методама (Kweon и остали, 2011). Према наведеном, употреба садржаја слободних сулфхидрилних група, GI и G' параметара у развоју модела није била оправдана ни вредностима R^2 и водила би отежавању разумевања утицаја хладне атмосферске плазме на полимере брашна. Како би се проверила присутност мултиколинеарности посматране су вредности фактора инфлације варијансе (енгл. variance inflation factors - VIF). VIF вредности развијених модела су биле у интервалу од 1 до 1,35 чиме је искључен проблем мултиколинеарности у посматраним моделима. Резултати анализе варијансе и статистичке карактеристике модела за предвиђање одзива за третман хладном атмосферском плазмом приказани су у табели 17.

На основу F - теста (Фишеров количник) утврђено је добро слагање развијених модела са експерименталним вредностима параметара SRC методе. Вредности статистичког параметара недостатак модела (енгл. lack of fit), који указује да ли шум у подацима утиче на регресионе коефицијенте код свих посматраних модела су биле статистички незначајне што је неопходан услов валидног регресионог модела.

Табела 17. Статистичке карактеристике и резултати анализе варијансе за моделе на бази SRC методе.

	SRCLa	SRCSu	SRCSo	SRCw	GPI
R^2	0,9216	0,8427	0,7496	0,9149	0,9210
Прилагођени R^2	0,8209	0,7903	0,6661	0,8762	0,8736
R^2 предвиђања	0,6482	0,6705	0,5072	0,7547	0,7811
F-вредност	9,15	16,08	8,98	23,64	19,43
p-вредност	0,0040**	0,0001***	0,0014**	0,0001***	0,0001***
Адекватна прецизност	10,4218	13,3070	7,8202	17,6457	13,2828

Недостатак модела

статистички нису значајани

SRCLa – способност задржавања раствара млечне киселине, SRCSo – способност задржавања раствара натријум карбоната, SRCSu – способност задржавања раствара сахарозе, SRCw – способност задржавања воде, GPI – индекс перформанси глутена. Модел статистички значајан на нивоу *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

Статистичком анализом су одређени и коефицијенти детерминације модела R^2 . Поменути параметар представља однос приказане и укупне варијансе у моделу и значајан је показатељ поношања регресионих модела (Madamba, 2002). Високе вредности R^2 за параметре SRCLa (0,92), SRCSu (0,84), SRCSo (0,75), SRCw (0,91) и GPI (0,92) указују да добијени регресиони модели на адекватан начин представљају експерименталне податке. Често коефицијенти детерминације модела R^2 не приказују веродостојно могућности регресионих модела јер је коефицијент R^2 подложен такозваном преувеличавању услед појаве преувеличавања регресионих коефицијената. Из овог разлог, одређене су и вредности прилагођеног коефицијента детерминације и коефицијента детерминације предвиђања. Вредности прилагођеног R^2 за параметре SRCLa (0,82), SRCSu (0,79), SRCSo (0,66), SRCw (0,87) и GPI (0,87) кроз сагледавање броја чланова сваког модела потврђују да модели пружају реалну слику о утицају хладне атмосферске плазме на брашно.

Релативно високе вредности коефицијента детерминације предвиђања за параметре SRCLa (0,65), SRCSu (0,67), SRCSo (0,50), SRCw (0,75) и GPI (0,78) такође указују да одабрани регресиони модели могу да предвиде вредности поменутих SRC параметара на основу задатих услова третмана. Очекивано су вредности коефицијента детерминације предвиђања ниже од коефицијента детерминације, али разлике између поменутих коефицијената нису велике што указује да модели нису „преподешени“, односно да су реални. Такође, вредности коефицијента детерминације предвиђања и прилагођеног R^2 су усаглашени (разлика $< 0,2$) код свих регресионих модела. На основу вредности статистичког параметра адекватна прецизност (енгл. Adequate precision), које су биле значајно веће од четири, очигледно је да модели поседују одговарајућу

способност дискриминације. Сагледавајући све статистичке параметре валидности, евидентно је да су развијени регресиони модели значајни и способни за описивање утицаја хладне атмосферске плазме на параметре SRC методе.

Значајни услови третмана посматрани су кроз коефицијенте полинома одређених методом најмањих квадрата а анализом варијансе издвајени су чланови који значајно доприносе у посматраним моделима: пресек, коефицијенти линеарних чланова, коефицијенти квадратних чланова и коефицијенти чланова интеракције одзивног полинома. У табели 18. приказани су коефицијенти и статистичка значајност чланова регресионе једначине, а на слици 25 карактеристични 3-D дијаграми одзивне површине за све параметре SRC методе.

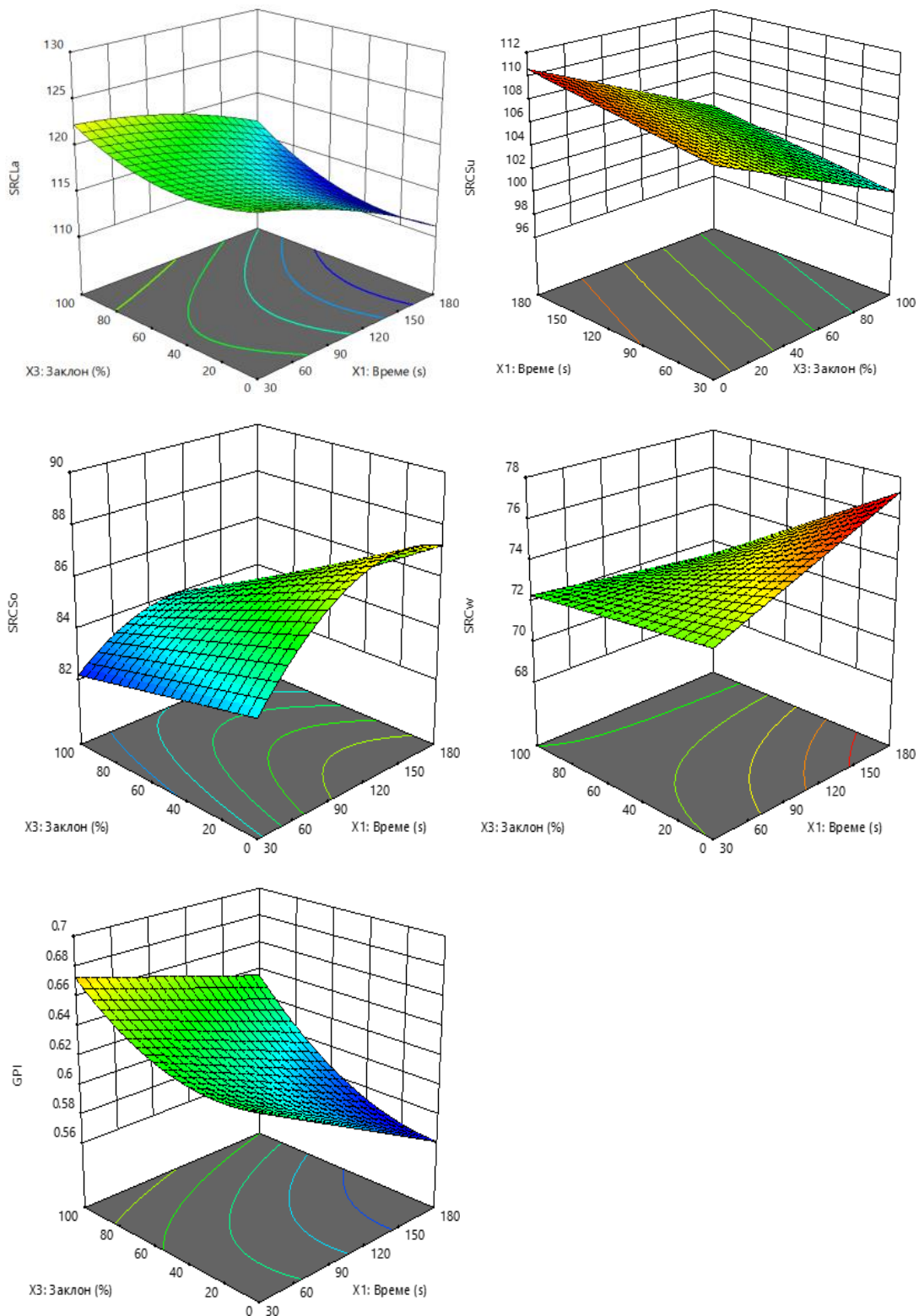
Табела 18. Коефицијенти регресионе једначине за параметре SRC методе.

	SRCLa	SRCSu	SRCSo	SRCw	GPI
Пресек	116,40	105,33	85,61	73,60	0,607
x_1	-3,64**	1,43*	0,94*	0,73*	-0,027**
x_2	0,3853	1,20	-0,31	0,94**	-0,001
x_3	1,94**	-3,85**	-1,60**	-1,74**	0,028**
$x_1 \times x_2$	-0,0784	0,87	-0,33	0,24	-0,002
$x_1 \times x_3$	0,8424	-0,79	-0,80	-1,23**	0,008
$x_2 \times x_3$	-0,1684	0,39	0,51	0,06	-0,004
x_1^2	-0,9607	0,24	-1,71**	0,02	-0,001
x_2^2	2,61*	-2,43**	-0,29	-1,49*	0,020*
x_3^2	2,18	-1,61	-0,14	-0,46	0,017*

SRCLa – способност задржавања раствора млечне киселине, SRCSo – способност задржавања раствора натријум карбоната, SRCSu – способност задржавања раствора сахарозе, SRCw – способност задржавања воде, GPI – индекс перформанси глутена, x_1 – време третирања (s), x_2 – удаљеност узорка (mm), x_3 – степен искоришћења заклона (%). Коефицијенти су статистички значајни на нивоу ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Вредности параметра p појединих чланова развијених регресионих модела коришћене су за процену њихове утицаја на вредност параметара SRC методе и сагледавање појединачних и интеракцијских ефеката између независно променљивих, односно услова третмана хладном атмосферском плазмом. Граница значајности је постављена на 0,05, односно, узимамо да сви чланови чија је вредност p већа од 0,05 не утичу значајно на посматрани параметар SRC методе.

3-D дијаграми одзивних површина развијених модела на бази параметара SRC методе приказани су на слици 30.



Слика 30. 3-D дијаграми одзивних површине за параметре SRC методе.

SRCLa – способност задржавања раствора млечне киселине, SRCSo – способност задржавања раствора натријум карбоната, SRCSu – способност задржавања раствора сахарозе, SRCw – способност задржавања воде, GPI – индекс перформанси глутена. Заклон – степен искоришћења заклона (%), време – трајање третмана (s).

На основу резултата приказаних у табели 18 уочава се да су за све параметре SRC методе линеарни чланови једначине x_1 и x_3 били статистички најзначајнији. За параметре SRCLa и GPI независно променљиве x_1 и x_3 су значајне на нивоу $p < 0,01$, док је за SRCSo, SRCw и SRCsu члан x_1 значајан на ($p < 0,05$), а члан x_3 на нивоу значајности од $p < 0,01$. Члан x_2 био је значајан само код SRCw на нивоу $p < 0,01$. Квадратни члан прве независно променљиве био је значајан за SRCSo ($p < 0,01$), друге независно променљиве за SRCsu ($p < 0,01$), као и SRCLa, SRCw и GPI ($p < 0,05$), док је члан x_3^2 био значајан само за GPI и то на мањем прагу значајности ($p < 0,05$). Интеракција независно променљивих није имала статистички значајан утицај, осим за параметар SRCw за који је потврђено да је члан $x_1 \times x_3$ статистички значајан и то на прагу значајности од 99% ($p < 0,01$).

Дијаграми одзивних површина представљени на слици 30 могу се користити за поређење и тумачење статистички значајних услова третмана хладном атмосферском плазмом на брашно. С дужим третманом, вредности SRCLa параметра постепено опада. Сличан образац опадања вредности параметара SRCLa је уочен и током термичког третмана (Van Steertegem и остали, 2013). Смањење SRCLa параметра указује д третман хладном атмосферском плазмом смањује способност глутенске мреже да бубри. Смањење способности бубрења указује да су глутенски протеини формирали дисулфидне мостове (S-S), односно, полимеризовали те увећали степен умрежености глутенских протеина. Ово је у сагласности са раније приказаним резултатима за саджај слободних сулфхидрилних веза који се такође смањивао при дужем третману. Увећање степена искоришћења заклона, изнад 30%, успорава опадање SRCLa параметра у одређеној мери. Тако при степену искоришћења заклона од 100%, за одговарајуће време, све вредности SRCLa параметра су веће у односу на SRCLa параметре са степеном искоришћења заклона нижим од 70%. Сви наведени резултати указују на то да је до полимеризације дошло услед оксидације слободних сулфхидрилних веза. Поменути ефекат оксидације сулфхидрилних група није идентичан са процесом умрежавања протеина глутена током израде теста током којег долази до хидратације честица брашна и развоја глутенске мреже која онда полимеризује у својој (највише) проширеној запремини. До успоравања процеса са применама већег степена искоришћења заклона долази услед промена у просторно-временским параметрима дифузије када само стабилне реактивних врста плазме као што је озон могу да испоље оксидациони утицај на брашно.

Сличан ефекат времена третмана пшеничног брашна хладном атмосферском плазмом регистрован је и код параметра SRCsu. Вредности SRCsu су се повећавале са продужењем трајања третмана, међутим степен искоришћења заклона је значајно успоравао раст вредности SRCsu параметра. Наведене промене SRCsu параметра укажују на могућност да третман хладном атмосферском плазмом доводи до оксидационог гелирања арабиноксилана те значајно увећавају степен њиховог бубрења.

Сличне промене вредности SRC_{Su} параметра су показане током третирања брашна хлором (Kweon и остали, 2009b).

Промене вредности SRC_{So} параметра су такође зависиле од времена третирања брашна. Дуже време третмана (од 30 до 120 s) је утицало на повећање вредности SRC_{So}. Време третмана дуже од 120 s, није доводило до значјнијих промена испитиваног параметра, односно имало је минималан утицај на својства бубрења скробних гранула. Степен искоришћења заклона је као и код SRC_{La} и SRC_{Su} успоравао деловање реактивних врста плазма кроз блокирање утицаја реактивних врста кратког животног века.

Са слике 30 такође се види да GPI параметар такође подлеже тренду опадања током времена третмана брашна хладном атмосферском плазмом. Опадање је последица значајног пораста SRC_{Su} као и значајног смањења SRC_{La} параметара током времена третмана.

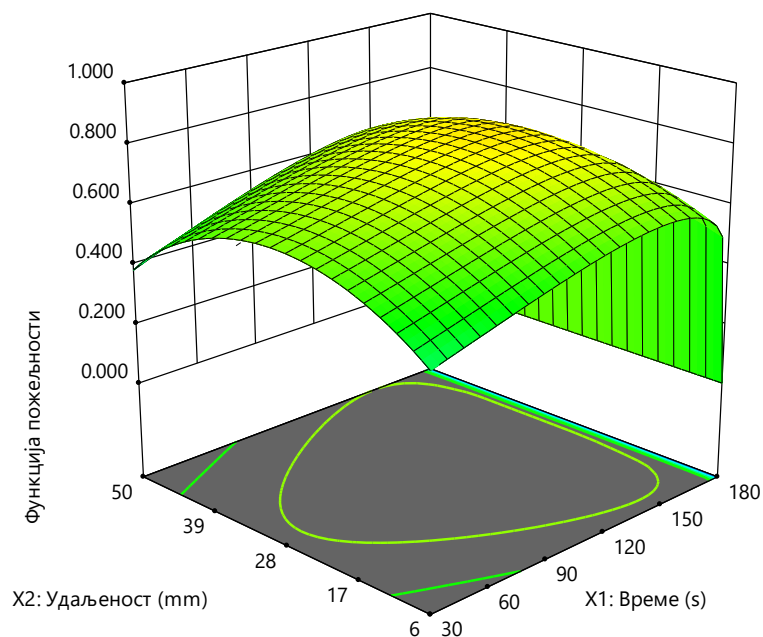
Третман хладном плазмом је доводи до повећања вредности SRC_w параметра и указује на побољшање укупне способности свих полимера да бубре за након третмана. На основу поменутих запажања јасно је да постоје оптимални услови третмана који могу утицати на оптимално развијање мреже глутена, хидратацију протеина и оксидацију арабиноксилана.

У циљу дефинисања оптималних услова третмана извршена је оптимизације одређивањем функције пожељности (Myers и Montgomery, 2016) за зависно променљиве SRC_{La} и SRC_{Su}. Поменути параметри одабрани су на основу досадашњих истраживања и става Duuvejonck и осталих (2012) да за процену квалитета брашна применом SRC методе није увек неопходно одредити све SRC параметре. Резултати истраживања из 2015. године указују да су параметри SRC_{La} и SRC_{Su} поуздани показатељи разлика у квалитету брашна (Hammed и остали, 2015; Lindgren и Simsek, 2016). Са друге стране, изабрани параметри су усмерени на протеине и пентозане (арабиноксилани), полимере који највише доприносе пецивним особинама пшеничног брашна (Kweon и отали, 2011). И коначно, важан разлог избора ових SRC параметара у оптимизацији је и чињеница да су управо протеини и арабоксилани подложни оксидацији. С обзиром да је хладна атмосферска плазма је техника са значајним оксидативним утицајем на третиране материјале (Vukić и остали, 2018; Zhang и остали, 2019).

Постављени су циљеви оптимизације према пожељним опсезима сваког услова третмана и SRC параметра, од „најмање пожељно“ до „најпожељније“. Тако су дефинисани услови третмана који пружају „најпожељније“ вредности SRC параметара а ефективност оптимизације је изражава њиховим комбиновањем у једну функцију пожељности. Сваком услову третмана и SRC параметру додељене су ограничавајуће вредности у поступку оптимизације. За услове време третмана и степен искоришћености заклона, постављене су границе - минимална вредност. Наведени

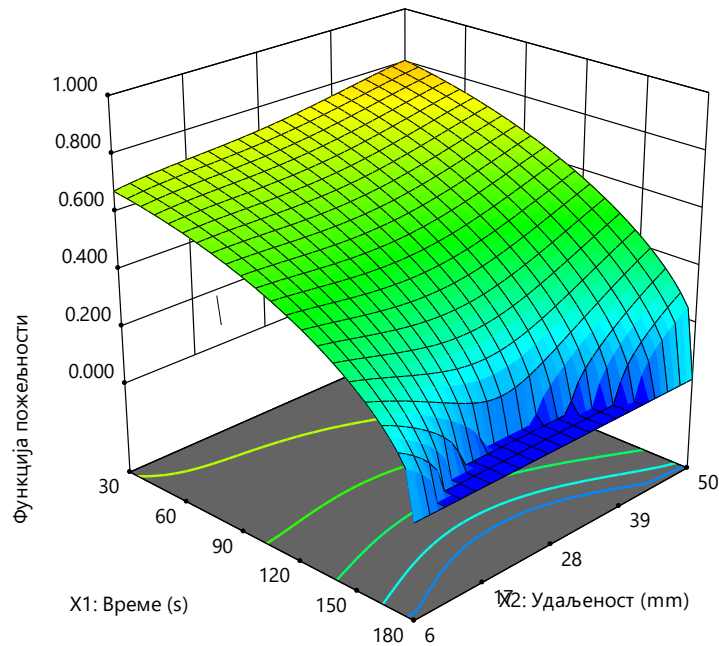
услови постављени су из практичних разлога, краћи третман је економичнији. За трећи услов третмана растојање постављено је циљ „у опсегу“.

Оптимизација SRC параметара извршена је у два правца. Оптимални услови третмана одређени су на основу једнаког критеријума значајности свих SRC параметара и постављених функција пожељности (Khayet и остали, 2008). Први правац оптимизације био је усмерен на добијање минималне вредности параметра SRCLa и максималне вредности за параметар SRCsu. За све остале SRC параметре примењено ограничење „у опсегу“ експерименталних вредности. На слици 31 приказана је одзивна површина, односно зависност укупне жељене функције од времена третмана и растојања узорка за први правац оптимизације – оптимални третман OT*.



Слика 31. Зависност укупне жељене функције у зависности од времена третмана и растојања узорка – оптимални третман (OT*).

Према првом правцу оптимизације (OT*), функција пожељности је износила 0,772, а предвиђене вредности услова третмана су износиле: време 130 s, удаљеност 30 mm и степен искоришћености заклона 0% а претпостављене вредности SRC параметара биле су: SRCLa 114,4; SRCsu 109,8; SRCso 87,6; SRCw 76,2; GPI 0,58. На слици 32 приказана је одзивна површина, односно зависност укупне жељене функције од времена третмана и растојања узорка за први правац оптимизације – оптимални третман OT**.



Слика 32. Зависност укупне жељене функције у зависности од времена третмана и растојања узорка – оптимални третман (ОТ**).

Други правац оптимизације (ОТ**), био је усмерен на добијање максималних вредности SRCLa и SRCСу параметара. За све остале SRC параметре примењено ограничење „у опсегу“ експерименталних вредности. Добијена функција пожељности је имала вредност од 0,810 а предвиђене услова третмана су износиле: време 30 s, удаљеност 50 mm и степен искоришћености заклона 0% а претпостављене вредности SRC параметара биле су: SRCLa 123,4; SRCСу 106,5; SRCСо 83,7; SRCw 72,8; GPI 0,65. Вредности функције пожељности као и предвиђених SRC параметара су биле одговарајуће те је приступљено експерименталној валидацији добијених статистичких резултата. Након третмана пшеничног брашна при условима оптималног третмана ОТ*, експериментално су добијене вредности SRC параметара биле су: SRCLa 112,4, SRCСу 103,1, SRCСо 79,3, SRCw 65,2 и GPI 0,61. При оптималним условима ОТ** добијене су следеће вредности параметара: SRCLa 118,6, SRCСу 108,8, SRCСо 80,3 SRCw 66,6 и GPI 0,62.

Мале разлике између предвиђених и добијених експерименталних вредности SRC параметара при оптималним условима ОТ* и ОТ**, као и релативно високе вредности жељене функције, 0,772 и 0,810 указују да је примењени модел добар, односно да постоје услови третмана брашна хладном атмосферском при којима се може добити одговарајућа ретенциона способност брашна.

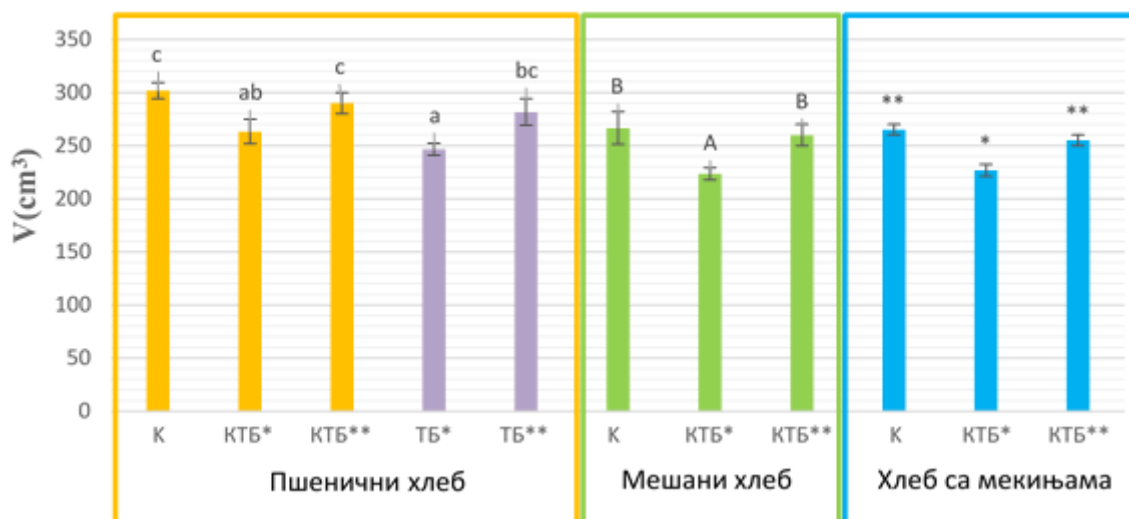
5.3. Утицај оптималних третмана на пецивна својства пшеничног брашна

У циљу испитивања утицаја хладне атмосферске плазме на пецивна својства пшеничног брашна спроведена су лабораторијска пробна печења. Применом одабраних оптималних услова, OT* (min SRCLa и max SRCSu) и OT** (max SRCLa и max SRCSu), извршен је третман пшеничног брашна, а потом су за пробна печења хлеба припремљени одговарајући контролни узорци и узорци са додатком третираног брашна. У експерименталном раду коришћена су три контролна узорка (К): нетретирано брашно Т-400, мешавина 50% нетретираног брашна Т-400 и 50% интегралног брашна и мешавина 90% нетретираног брашна Т-400 и 10% пшеничних мекиња. Поред контролних узорака коришћени су и узорци са третираним брашном: 100% третирано (ТБ) и три узорка код којих је 10% брашна контролних узорака супституисано са 10% третираног брашна (КТБ). Будући да су коришћена два оптимална третмана OT* и OT** након пробног печења добијено је укупно 11 узорака хлеба, од тога су два била од 100% третираног брашна (ТБ*, ТБ**), а преосталих 9 узорака је подељено у три групе према врсти употребљених млинских производа. Сваку групу чинила су три узорка: К, КТБ*, КТБ**. Првом групом обухваћени су узорци пшеничног хлеба (основна врста), другом групом узорци мешаног хлеба са целим зрном (мешани хлеб), а трећу хлеб са мекињама (специјална врста хлеба). Квалитет добијених узорака хлеба одређен је на основу мерења запремине и одређивања најзначајнијих текстурних својстава и параметара сензорског квалитета.

5.3.1. Физички параметри квалитета хлеба

На слици 33 приказане су измерене вредности запремина свих испитиваних узорака хлеба. Уочава се да је примена третираних узорака брашна у свим групама имала утицај на вредности запремине хлеба. Међутим, евидентно је да је други третман OT** имао мањи негативан утицај на квалитет брашна, па и смањење запремине хлеба КТБ** у свим испитиваним групама није било статистички значајно.

Узорак хлеба ТБ* је имао нижу запремину од свих контролних узорака, док је запремина хлеба ТБ** била нижа само од контролног узорка са нетретираним брашном Т-400. Статистичка анализа је потврдила да је разлике у вредностима запремина хлеба од чистог третираног брашна (узорак ТБ**) и контролног узорка прве групе нису статистички значајне ($p < 0,05$). Са друге стране, статистички значајне разлике у вредностима запремине узорака хлеба ТБ* и ТБ** потврђују да је краће време третмана имало повољнији ефекат на ток колоидних процеса током замеса.



Слика 33. Утицај третираног брашна на запремину хлеба.

Контролни узорци (К): I група – брашно Т-400; II група – 50% брашно Т-400:50% интегрално брашно; III група – 90% брашно Т-400:10% мекиње. Узорци са 10% супституисаног контролног узорка: КТБ* – узорци са 10% третираног брашна првим оптималним третманом; КТБ** – узорци са 10% третираног брашна другим оптималним третманом; ТБ* – узорци са 100% третираног брашна првим оптималним третманом; ТБ** – узорци са 100% третираног брашна другим оптималним третманом. Исти стил ознака указује на статистичке значајности у оквиру групе, $p < 0,05$.

Претпоставља се да су услови третмана ОТ* негативно утицали на способност глутенских протеина да колоидно везују воду, односно бубре током замеса, што се касније негативно одразило и на запремину узорка хлеба ТБ*. Пшенично брашно при ОТ* изложено је деловању хладне атмосферске плазме у трајању од 130 s што је, по резултатима приказаним у другом делу дисертације, довело до смањења садржаја слободних сулфхидрилних група. На основу литературних података поменуто смањење се вероватно може довести у везу са полимеризацијом протеина које је праћено стварањем дисулфидних веза. Дисулфидно повезивање је пожељно јер доприноси стабилности конформације и може указати на добар квалитет пшеничног брашна. Међутим, ефекти смањења садржаја слободних сулфхидрилних веза у пшеничном брашну нису идентични ефектима који се дешавају у пшеничном тесту током замеса и при содатку под побољшивача, као што је аксорбинска киселина.

Услед формирања чвршће структуре протеина у самом брашну може се успорити процес хидратације, а тиме и развој глутенске мреже током замеса пшеничног теста. Као што је показано при испитивању утицаја хладне атмосферске плазме на секундарну структуру протеина, третман хладном атмосферском плазмом поспешује полимеризацију протеина, узрокује промене у њиховој конформацији и доводи до повећања молекулских маса протеина (Pareyt и остали 2009). Сличне промене су приметили и Van Steertegem и остали (2013) током испитивања утицаја сувог термичког третмана пшеничног брашна у трајању 5 часова на 80 °C, те су закључили да је услед успорене хидратације третирано брашно имало дужи развој теста. У поменутом

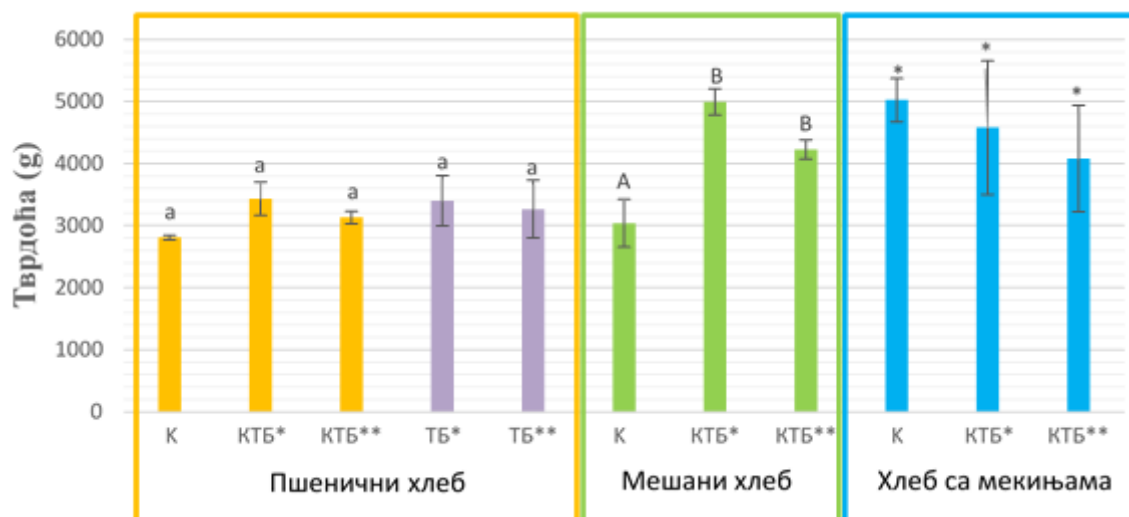
истраживању је такође претпостављено да је суви термички третман утицао на смањење саржаја сулфхидрилних група протеина, што је објашњено стварањем дисулфидних мостова у протеинима пшеничног брашна. Тесто од пшеничног брашна третираног хладном атмосферском плазмом услед успорене хидратације и непотпуне развијености глутенске не може да задржава гасове настале током ферментације, што се манифестује мањом запремином хлеба. Стога је могуће да третман хладном атмосферском плазмом на сличан начин као термички третман брашна доводи до полимеризације. Претпоставља да се при краћем времену третмана OT^{**} од 30 s процес полимеризације протеина у пшеничног брашну одвија значајно мањим интензитетом, и да се, који је имао што има далеко мањи утицај на развој глутенске структуре током замеса теста у односу на третман OT^* . Веће вредности параметра $SRCLa$ код брашна третираног OT^* управо потврђују боља реолошка својства глутена у односу на узорак третиран при OT^{**} што се неминовно морало одразити и на запремину хлеба од поменутих узорака брашна, било да је реч о узорцима хлеба од 100% третираних узорака брашна или да је реч о узорцима КТБ.

Додатак интегралног брашна и мекиња нетретираном брашну Т-400 је утицао на погоршање пецивних својстава одговарајућих контролних узорака, па су и вредности запремине очекивано мање у односу на контролни узорак прве групе (пшенични хлеб). Добијени резултати су у складу са многобројним истраживањима везаним за испитивање утицаја интегралног брашна и пшеничних мекиња (Van Dyck 2014) на запремину хлеба. Ранија истраживања указују да хлеб са 40% интегралног брашна има значајно мању запремину, што се у почетку објашњавало „разблажењем глутена“, односно смањењем количине глутенских протеина, а касније недовољно развијеном и слабом глутенском структуром и утицајем прехранбена влакна у саставу интегралног брашна на развој глутена (Pollard и остали, 2002). Услед изражених хидратационих својстава влакна (целулоза, пентозани, лигнин) смањује се количина доступне воде глутенским протеинима и тиме додатно омета њихово структурирање током замеса теста. Слабо развијен глутен нема оптимална вискоеластична својства да задржава угљен-диоксид током завршне ферментације што на крају резултује смањењем запремине хлеба. Узроци мање запремине контролног узорка у трећој групи такође се могу објаснити високим садржајем прехранбених влакана (око 45%) и мањим уделом протеина у мекињама јер утицај главних компоненти мекиња (липиди, феноли и влакна) је веома комплексан због многобројних интеракција које се дешавају у тесту.

На основу графика приказаног на слици 33, код све три групе узорака уочава се да додатак узорака третираног брашна изазива сличан тренд промене запремине у оквиру група. Супституција контролних узорака третираним брашном по првом третману (OT^*) доводила је до израженог смањења запремине, док је супституција по другом третману (OT^{**}) узроковала много мање изражен ефекат смањења запремине. Вредности запремина свих КТБ^{**} узорака су биле на нивоу или чак мало изнад

вредности контролних узорака у оквиру групе. Статистичком анализом утврђене су статистичке значајне разлике запремине хлеба унутар сваке појединачне група једино за узорке КТБ*. Смањење запремине узорака КТБ* у оквиру прве групе износи 12%, у оквиру друге групе износи 17% и у оквиру треће групе износи 15%.

Након мерења запремине испитиваних узорака хлеба инструментално су одређени параметри текстуре средине. На сликама 34-37 приказан је утицај супституције 10% контролних узорака пшеничним брашном третираним хладном атмосферском плазмом при оптималним условима ОТ* и ОТ** на релевантне параметре текстуре: тврдоћа, иницијална еластичност, кохезивност и отпор жвакању. На основу графичког приказа резултата одређивања тврдоће (слика 34) уочава се да је тврдоћа узорака хлеба ТБ* и ТБ** незнатно већа у односу на контролни узорак од пшеничног брашна, као и контролни узорак еквивалентне смеше белог и интегралног брашна. Међутим, тврдоћа оба узорка хлеба од третираног брашна је значајно мања у односу на контролни узорак, као и узорке КТБ* и КТБ** треће испитиване групе са додатком мекиња.



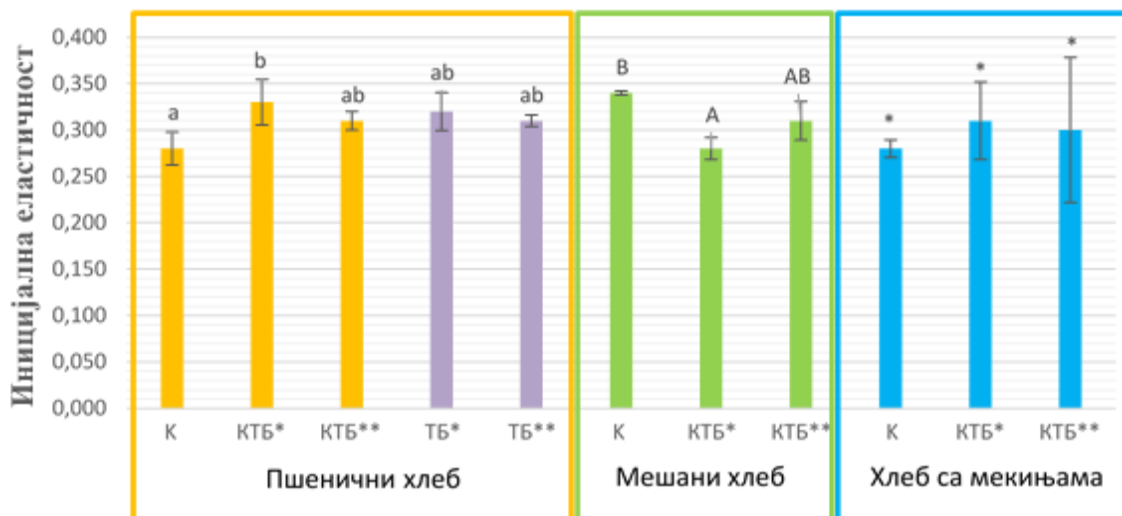
Слика 34. Утицај третираног брашна на тврдоћу средине хлеба

Контролни узорци (К): I група – брашно Т-400; II група – 50% брашно Т-400:50% интегрално брашно; III група – 90% брашно Т-400:10% мекиње. Узорци са 10% супституисаног контролног узорка: КТБ* – узорци са 10% третираног брашна првим оптималним третманом; КТБ** – узорци са 10% третираног брашна другим оптималним третманом; ТБ* – узорци са 100% третираног брашна првим оптималним третманом; ТБ** – узорци са 100% третираног брашна другим оптималним третманом. Исти стил ознака указује на статистичке значајности у оквиру групе, $p < 0,05$.

Супституција контролних узорака третираним узорцима (узорци КТБ* и КТБ**) је, независно од услова третмана (ОТ* и ОТ**), у првој групи узорака довела до благог повећања, а у трећој групи до нешто израженијег смањења тврдоће хлеба. Међутим, ни у првој ни у трећој групи поменуте промене нису статистички значајне. Што се тиче друге групе (мешани хлеб) претпоставља се да су целулозна влакна из интегралног брашна имала знатно већи негативан утицај на секундарну структуру глутенских протеина (Воск и Damodaran, 2013), а тиме и на хидратацију честица брашна у односу

на ефекат брашна третираног хладном атмосферском плазмом. Код узорак КТБ* и КТБ** у трећој групи узорака, упркос присустви влакана у саставу мекиња, ипак дошло до благог смањења тврдоће хлеба. Верује се да би поменути ефекат био другачији да је проценат супституције контролног узорка (мешавина белог брашна и мекиња) био изнад 10%. Такође треба нагласити да у све три групе нема статистички значајних разлика између вредности тврдоће узорака КТБ* и КТБ**, што указује да време трајања третмана хладном плазмом не узрокује промене третираних узорака које се одражавају на тврдоћу средине хлеба.

Промене иницијалне еластичности средине хлеба такође су биле видљиве код узорака добијених од узорака брашна код којих је извршена супституција нетретираних контролних узорака третираним брашном (слика 35). У типу производа пшенични хлеб и мешани хлеб узорци КТБ* су се статистички значајно разликовали од контролних узорака, међутим, у групи узорака хлеб са мекињама, није било статистички значајних промена испитиваног параметра. С друге стране, у групи производа пшенични хлеб и мешани хлеб са целим зрном додаток третираног брашна при ОТ** условима није узроковао статистички значајне промене иницијалне еластичности средине хлеба.

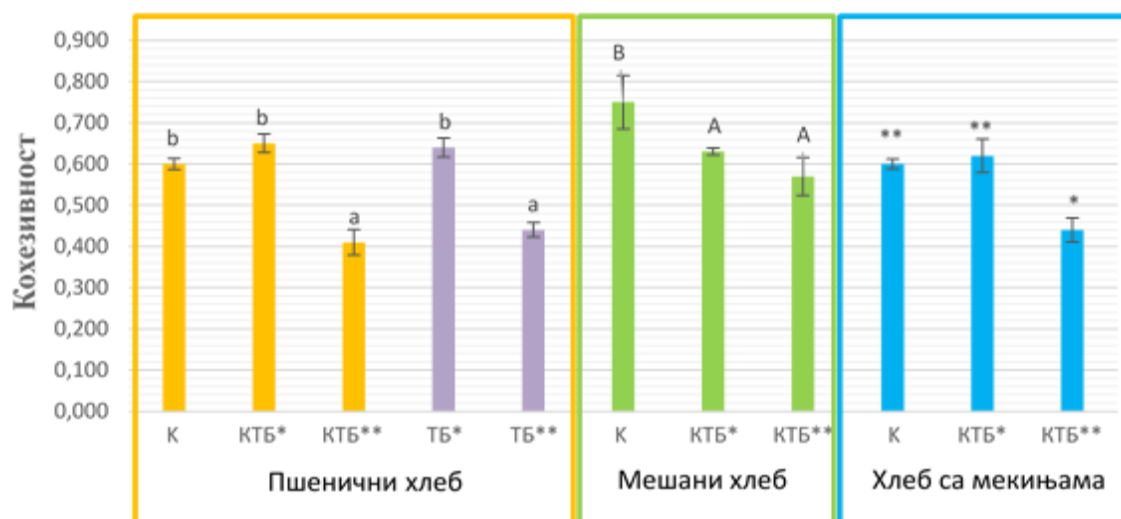


Слика 35. Утицај третираног брашна на иницијалну еластичност средине хлеба.

Контролни узорци (К): I група – брашно Т-400; II група – 50% брашно Т-400:50% интегрално брашно; III група – 90% брашно Т-400:10% мекиње. Узорци са 10% супституисаног контролног узорка: КТБ* – узорци са 10% третираног брашна првим оптималним третманом; КТБ** – узорци са 10% третираног брашна другим оптималним третманом; ТБ* – узорци са 100% третираног брашна првим оптималним третманом; ТБ** – узорци са 100% третираног брашна другим оптималним третманом. Исти стил ознака указује на статистичке значајности у оквиру групе, $p < 0,05$.

На основу приказаних резултата ТРА анализе за кохезивност средине узорака хлеба (слика 36) уочава се да су изабрани оптимални третмани ОТ* и ОТ** имали супротне ефекте на кохезивност узорака хлеба ТБ* и ТБ**. Код узорка ТБ* дошло је до незнатног, статистички незначајног, повећања кохезивности док је кохезивност узорка

ТБ** била статистички значајно мања у односу на контролни узорак (пшенично брашно Т-400).



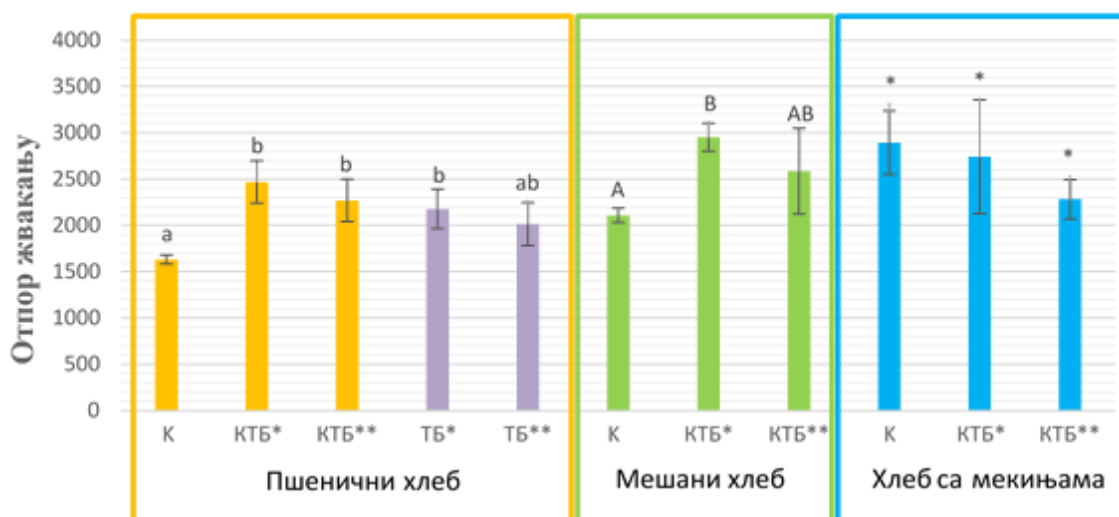
Слика 36. Утицај третираног брашна на кохезивност средине хлеба.

Контролни узорци (К): I група – брашно Т-400; II група – 50% брашно Т-400:50% интегрално брашно; III група – 90% брашно Т – 400:10% мекиње. Узорци са 10% супституисаног контролног узорка: КТБ* – узорци са 10% третираног брашна првим оптималним третманом; КТБ** – узорци са 10% третираног брашна другим оптималним третманом; ТБ* – узорци са 100% третираног брашна првим оптималним третманом; ТБ** – узорци са 100% третираног брашна другим оптималним третманом. Исти стил ознака указује на статистичке значајности у оквиру групе, $p < 0,05$.

Уопштено посматрано, висок степен кохезивности средине је пожељан јер омогућава да хлеб одржи свој облик и запремину што је у вези са перцепцијом квалитета готових производа (Onyango и остали, 2010). Утицај супституције контролног узорка третираним брашном у првој групи узорка зависи од услова примењеног третмана. Додатак пшеничног брашна које је било краће изложено извору хладне атмосферске плазме (третман ОТ*) доводи до незнатног повећања кохезивности хлеба КТБ*, док други третман ОТ** узрокује значајније промене ТБ које узрокују смањење кохезивности узорка КТБ** на статистички значајном нивоу ($p < 0,05$). Идентичан утицај супституције контролног узорка брашна узорцима третираног брашна се увиђа и у групи хлеб са мекињама. У групи узорка мешани хлеб од целог зрна код узорка КТБ* и КТБ** дошло је до статистички значајног смањења кохезивности. На основу приказаних резултата јасно је да додатак третираног брашна, независно од врсте хлеба, има негативан утицај на кохезивност хлеба. Да би се избегла последице мање кохезивности препоручује се употреба калупа током печења који би обезбедили задржавање облика хлеба.

Вредности текстурног параметра отпор жвакању приказане су на слици 37. На основу добијених резултата и графичког приказа може се запазити да је у групама био присутан исти тренд промене који је уочен за тврдоћу хлеба (слика 34). Добијени резултати су усаглашени са резултатима Gomez и остали (2007), који су потврдили

корелацију поменути два текстурна параметра. Отпор жвакању код узорака ТБ* и ТБ** је био нешто већи у односу на контролни узорак од нетретираног пшеничног брашна, али значајно мањи у односу на контролни узорак из групе хлеб са мекињама. Генерално се може запазити да су вредности отпора жвакању код узорака КТБ* и КТБ** друге и треће групе у односу на узорке из групе пшенични хлеб већи. Претпоставља се да су прехранбена влакна, присутна и у интегралном брашну и у мекињама утицала на редистрибуцију воде у тесту, што такође може укључивати и делимичну дехидратацију глутена (Šprogin, 2019). Vock и Damodaran (2013) указују да је последица редистрибуције воде трансформација β -окрета, структурног елемента одговорног за вискоеластична својства глутена, у β -раван. Смањено присуство β -окрета у структури глутена утицало је и на смањење моћи задржавања гаса што је на крају резултирало мањом запремином, већом тврдоћом и већим отпором жвакању.



Слика 37. Утицај третираног брашна на отпор жвакању средине хлеба.

Контролни узорци (К): I група – брашно Т-400; II група – 50% брашно Т-400:50% интегрално брашно; III група – 90% брашно Т-400:10% мекиње. Узорци са 10% супституисаног контролног узорка: КТБ* – узорци са 10% третираног брашна првим оптималним третманом; КТБ** – узорци са 10% третираног брашна другим оптималним третманом; ТБ* – узорци са 100% третираног брашна првим оптималним третманом; ТБ** – узорци са 100% третираног брашна другим оптималним третманом. Исти стил ознака указује на статистичке значајности у оквиру групе, $p < 0,05$.

На основу презентованих резултата евидентно је да интензитет промена текстурних параметара хлеба са додатком третираног пшеничног брашна зависи од услова третмана хладном атмосферском плазмом, али и од врсте хлеба. Утврђене промене у текстури испитиваних узорака хлеба су очекиване с обзиром на претпоставку да третман пшеничног брашна хладном атмосферском плазмом доводи до полимеризације протеина глутена. Резултати друге експерименталне фазе потврдили су смањење садржаја слободних сулфидрилних група у третираним узорцима брашна, што је успорило развој глутенске мреже, односно онемогућило стварање ковалентних дисулфидних веза које стабилизују тродимензионалну глутенску структуру.

Резултати одређивања боје, односно промена релевантних параметра у третирањима брашнима и групама узорака приказана је графички: светлоћа L^* (слика 38), параметар a^* који одређује удео црвене/зелене (слика 39) и параметар b^* који указује на удео жуте/плаве боје (слика 40). Уочава се да је дошло до значајних промена у светлоћи узорака ТБ* и ТБ** у односу на све друге испитиване узорке. Међутим, такође се види да супституција пшеничног брашна третираним пшеничним брашном у првој и другој групи (пшенични хлеб и мешани хлеб) није утицала на статистички значајне разлике у светлоћи испитиваних узорака. Супституција пшеничног брашна са брашном третираним хладном атмосферском плазмом узроковала је статистички значајне промене једино у групи узорака хлеб са мекињама. Такође треба нагласити да услови третмана пшеничног брашна нису имали статистички значајан утицај на разлику у светлоћи узорака КТБ* и КТБ** ни у овој групи.

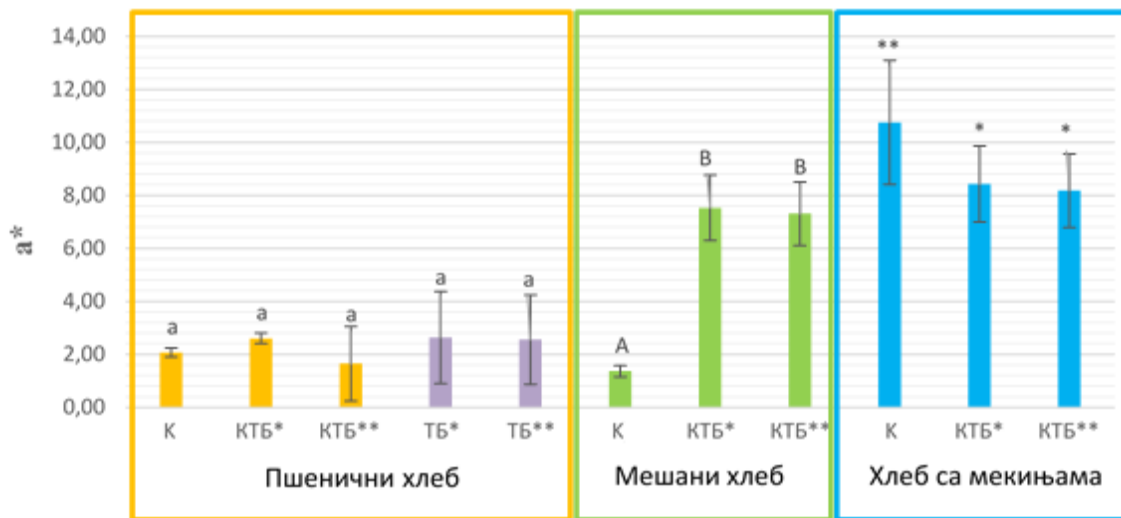


Слика 38. Утицај третираног брашна на светлоћу (L^*) средине хлеба.

Контролни узорци (К): I група – брашно Т-400; II група – 50% брашно Т-400:50% интегрално брашно; III група – 90% брашно Т-400:10% мекиње. Узорци са 10% супституисаног контролног узорка: КТБ* – узорци са 10% третираног брашна првим оптималним третманом; КТБ** – узорци са 10% третираног брашна другим оптималним третманом; ТБ* – узорци са 100% третираног брашна првим оптималним третманом; ТБ** – узорци са 100% третираног брашна другим оптималним третманом. Исти стил ознака указује на статистичке значајности у оквиру групе, $p < 0,05$.

Третмани пшеничног брашна хладном атмосферском плазмом нису утицали на промену удела црвене/зелене боје ТБ, тако да ни између узорака хлеба прве групе К (брашно Т-400), КТБ* и КТБ** нема статистички значајних разлика када су у питању вредности поменутог параметра. Генерално код свих испитиваних узорака доминира удео црвене боје ($a^* > 0$). Супституцијом контролних узорака у другој (мешани хлеб од целог зрна) и трећој групи (хлеб са мекињама) уочен је супротан тренд промене параметра a^* . У другој групи узорака дошло је до статистички значајног повећања, а у трећој групи до смањења удела црвене боје код узорка КТБ* и КТБ**. Разлике између

самих узорака са узорцима третираног брашна (третмани ОТ* и ОТ**) нису статистици значајне (слика 39).

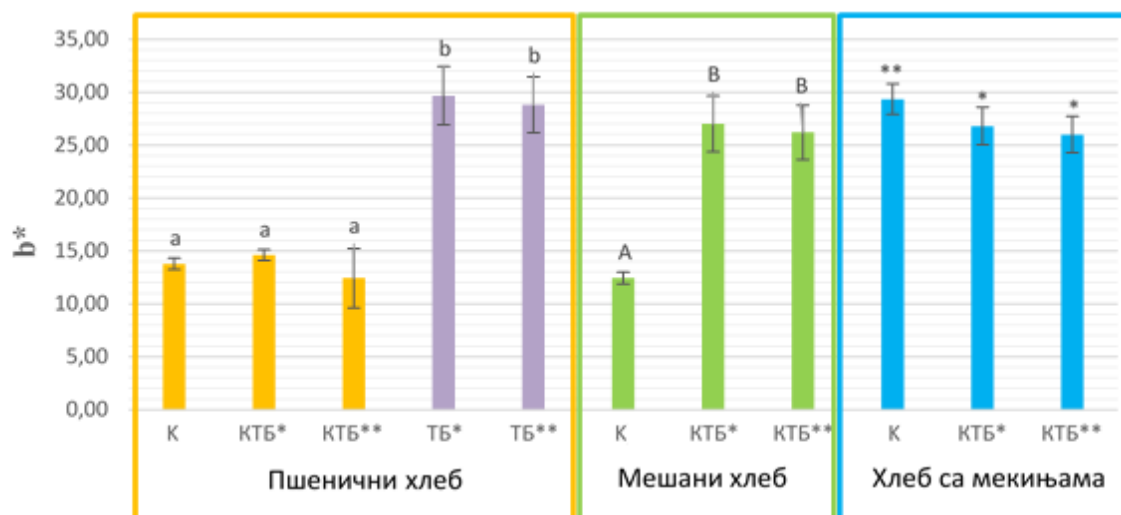


Слика 39. Утицај третираног брашна на удео црвене/зелене (a*) у боји средине хлеба.

Контролни узорци (К): I група – брашно Т-400; II група – 50% брашно Т-400:50% интегрално брашно; III група – 90% брашно Т-400:10% мекиње. Узорци са 10% супституисаног контролног узорка: КТБ* – узорци са 10% третираног брашна првим оптималним третманом; КТБ** – узорци са 10% третираног брашна другим оптималним третманом; ТБ* – узорци са 100% третираног брашна првим оптималним третманом; ТБ** – узорци са 100% третираног брашна другим оптималним третманом. Исти стил ознака указује на статистичке значајности у оквиру групе, $p < 0,05$.

Вредности параметра b^* , који указује на удео жуте/плаве боје, значајно су се мењале применом брашна третираног ОТ* и ОТ**, па је и удео жуте боје максималан и статистички значајно већи код узорака хлеба ТБ* и ТБ** у односу на контролни хлеб од нетретираног пшеничног брашна. Интересантно је да супституцијом брашна у првој групи узорака није дошло до статистички значајног повећања удела жуте боје (слика 40). До статистички значајних промена је дошло у другој и у трећој групи узорака. Промене вредности b^* узокване супституцијом одговарајућих контролних узорака код КТБ* и КТБ** имале су исти тренд као код вредности параметра a^* .

Супституција контролног узорка узорцима третираног пшеничног брашна доводи до статистички значајног увећању вредности b^* у групи производа мешани хлеб од целог зрна и смањења вредности b^* у групи производа хлеб са мекињама. Смањење удела жуте боје код узорка КТБ** у односу на узорак КТБ* у обе групе није статистички значајно. Вредности параметра b^* су веће код свих узорака друге и треће групе у односу на групу производа пшенични хлеб (К, КТБ* и КТБ**).



Слика 40. Утицај третираног брашна на удео жуте/плаве (b*) у боји средине хлеба.

Контролни узорци (К): I група – брашно Т-400; II група – 50% брашно Т-4000:50% интегрално брашно; III група – 90% брашно Т-400:10% мекиње. Узорци са 10% супституисаног контролног узорка: КТБ* – узорци са 10% третираног брашна првим оптималним третманом; КТБ** – узорци са 10% третираног брашна другим оптималним третманом; ТБ* – узорци са 100% третираног брашна првим оптималним третманом; ТБ** – узорци са 100% третираног брашна другим оптималним третманом. Исти стил ознака указује на статистичке значајности у оквиру групе, $p < 0,05$.

На основу изложених запажања очигледно је да третман брашна хладном атмосферском плазмом, значајно мења параметре боје, па се и супституцијом дела брашна код мешаних и специјалних врста хлеба могу постићи видљиве промене у боји средине.

5.3.2. Сензорски квалитет хлеба

Поред потребе за развојем прихватљиве рецептуре хлеба са технолошког становиштва, задовољења нутритивних захтева и прописа који се односе на здравствену безбедност производа, неопходно је водити рачуна и о сензорском квалитету хлеба. Са аспекта прихватљивости хлеба од стране потрошача сензорске особине имају пресудну улогу (Heiniö, 2006). Утицај додатка пшеничног брашна третираног хладном атмосферском плазмом на сензорске особине узорка хлеба одређен је на основу оцене најзначајнијих сензорских параметара хлеба и вредносног броја средине. Резултати сензорске оцене приказани у табели 20, указују да је висина хлеба код узорка од третираног брашна (ТБ* и ТБ**) била нижа у односу на хлеб од нетретираног брашна (контролни узорак прве групе), поре мање фине, док је еластичност била на нивоу узорка прве групе.

Контролни узорци друге и треће групе имали су лошију структуру средине у односу на контролни узорак прве групе што је последица већ поменутих негативних ефеката присутног интегралног брашна и мекиња на реолошке особине теста. Додатак интегралног брашна у сировински састав хлеба утиче на формирањем грубље средине и

формирање пора различите величине, при чему су крупније поре распоређене у слојевима ближим кори хлеба (Van Dusk и остали 2014). Sullivan и остали (2011) објашњавају да је грубља средина последица смањеног задржавања гасова насталих током ферментације услед нарушене глутенске структуре. На основу анализе резултата представљених у табели 20 евидентно је да се додатком третираног брашна побољшао сензорски квалитет хлеба прве и треће групе испитиваних узорака, међутим, код узорака из групе мешани хлеб од целог зрна третирано пшенично брашно, независно од услова третмана, имало је супротан ефекат.

Табела 20. Резултати сензорске анализе хлеба

Узорак	Висина хлеба	Финоћа пора	Еластичност	Вредности број средине (ВБС)
ТБ*	82	1,1	4,2	5,3
ТБ**	85	1,2	4,3	5,7
I група - пшенични хлеб				
К	91	1,8	3,5	5,3
КТБ*	83	1,6	3,5	5,4
КТБ**	90	2,1	3,8	5,9
II група – мешани хлеб са целим зрном				
К	70	1,1	3,5	4,6
КТБ*	75	1,1	3,0	4,1
КТБ**	76	1,0	3,5	4,5
III група – хлеб са мекињама				
К	76	1,1	3,5	4,6
КТБ*	80	1,2	4,0	5,2
КТБ**	80	1,2	4,2	5,4

Контролни узорци (К): I група – брашно Т-400; II група – 50% брашно Т-400:50% интегрално брашно; III група – 90% брашно Т-400:10% мекиње. Узорци са 10% супституисаног контролног узорка: КТБ* – узорци са 10% третираног брашна првим оптималним третманом; КТБ** – узорци са 10% третираног брашна другим оптималним третманом; ТБ* – узорци са 100% третираног брашна првим оптималним третманом; ТБ** – узорци са 100% третираног брашна другим оптималним третманом.

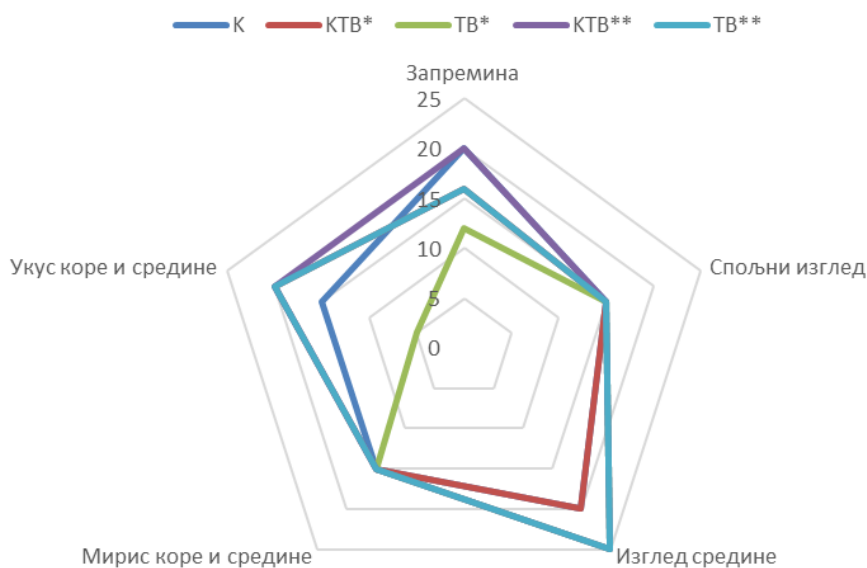
У првој групи узорака упркос негативном ефекту супституције пшеничног брашна третираним узорком (ОТ*) на висину хлеба дошло је до побољшања квалитета средине хлеба. Поменути резултати су усаглашени са анализом текстурних својстава хлеба (тврдоћа и еластичност). Висина узорка КТБ** је била нешто мања у односу на висину контролног узорка, али структура средине је побољшана што је резултирало повећањем вредносног броја средине са 5,3 (контролни) на 5,9. У целини гледано, третман хладном атмосферском плазмом довео је до побољшања вредносног броја средине хлеба.

Супституција 10% пшеничног брашна у групи мешани хлеб од целог зрна имала је значајнији негативан утицај на сензорску оцену финоће пора и еластичности средине, што се одразило и на нижи вредносни број средине. Еластичност средине узорака ове групе је у сагласносама резултатаима добијеним при ТРА анализи (слика 35). Овакви резултати се могу објаснити већ поменутом хипотезом да је у третираном брашну успорено формирање глутенске мреже услед полимеризације протеина и смањења садржаја слободних сулфхидрилних група које имају пресудну улогу у дисулфидном повезивању глутенина током замеса теста. Такође, потребно је напоменути да је раније истраживање показало да третман хладном плазмом доводи до смањења еластичности глутенске мреже (Misra и остали, 2015a). Код узорака друге групе додатни проблем представља и значајан удео интегралног брашна, а самим тим и целулозних влакана (Eiman и остали, 2008). Синергистички ефекат влакана, присутних у интегралном брашну, и третираног брашна на ометање развоја глутена свакако утиче на способност задржавања гасова током ферментације, а самим тим и на запремину и сензорски квалитет средине хлеба.

У групи производа хлеб са мекињама супституција контролног узорка ТБ узроковала је неочекивано побољшање сензорског квалитета хлеба. Иако је финоћа пора задржана на нивоу контролног узорка еластичност средине је значајно побољшана, па су и оцене за еластичност средине, а на крају и за ВБС биле више за 20%. Узорци КТБ* и КТБ** у трећој групи, упркос присуству мекиња у саставу теста имају бољи сензорски квалитет. Претпоставља се да је супституцијом са 10% третираног пшеничног брашна повећан удео глутенских протеина, а смањен удео мекиња у тесту, што је умањило и ефекат целулозних влакана на сензорски квалитет хлеба КТБ* и КТБ**. Вероватно би при већем уделу мекиња у самом контролном узорку треће групе, услед интеракције првенствено влакана, али и липида и фенола из мекиња са глутенским протеинима (Sudha и остали, 2007) дошло до значајнијег нарушавања глутенске структуре (Collar и остали, 2007), а тиме и на погоршање структуре средине и сензорског квалитета хлеба.

У циљу потпунијег сагледавања ефекта третираног брашна на квалитет хлеба анализирани су и резултати добијени методом бодовања. На основу поменуте методе вредновани су најзначајнији параметри хлеба (запремина, спољни изглед, изглед средине, мирис коре и средине и укус коре и средине), а који врло често имају пресудну улогу када су потршачи у питању. На слици 41 приказана је оцена хлеба бодовањем у групи пшенични хлеб. Добијени резултати су у складу са резултатима одређивања текстуралних својстава и квалитета средине хлеба на основу ВБС. Узорци хлеба ТБ* и ТБ** по спољном изгледу и мирису нису одступали од других узорака прве групе (К, КТБ*, КТБ**). Међутим, оцене за запремину и за укус производа оба узорка од третираног брашна су биле ниже. Изражена горчина у укусу хлеба са ТБ указује да његова примена као основног млинског производа у узради хлеба није оправдана. Метода бодовања је такође потврдила да је

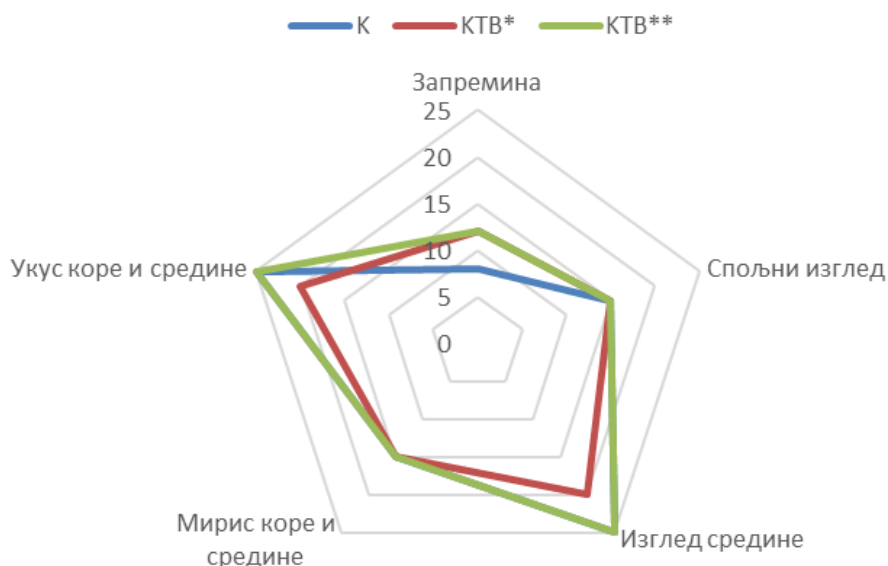
супституција контролног узорка са 10% третираног брашна, нарочито брашна које је третирано при ОТ**, позитивно утицала на запремину хлеба, изглед средине, укус и мирис.



Слика 41. Утицај третмана брашна на квалитет пшеничног хлеба.

Контролни узорци (К): I група – брашно Т-400. Узорци са 10% супституисаног контролног узорка: КТБ* – узорци са 10% третираног брашна првим оптималним третманом; КТБ** – узорци са 10% третираног брашна другим оптималним третманом; ТБ* – узорци са 100% третираног брашна првим оптималним третманом; ТБ** – узорци са 100% третираног брашна другим оптималним третманом.

У групи узорка мешани хлеб са целим зрном укус производа је био својствен и пријатан што је очекивано резултирало и врло високим бројем бодова (слика 42).

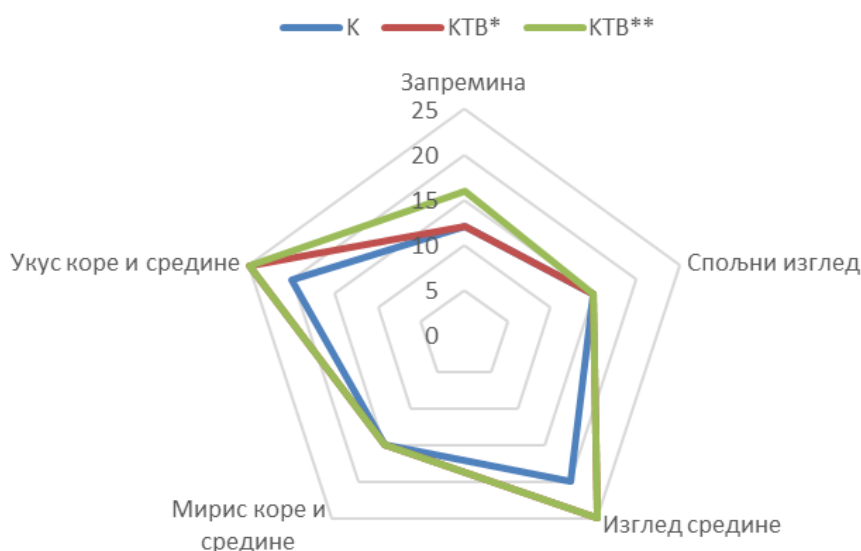


Слика 42. Утицај третмана брашна на квалитет мешаног хлеба са целим зрном.

Контролни узорци (К): II група – 50% брашно Т-400:50% интегрално брашно. Узорци са 10% супституисаног контролног узорка: КТБ* – узорци са 10% третираног брашна првим оптималним третманом; КТБ** – узорци са 10% третираног брашна другим оптималним третманом.

Узорак са 10% пшеничног брашна третираног ОТ** је имао боље оцене за запремину, укус, као и изглед средине, што је такође у складу са претходним резултатима овог поглавља. Укупан број бодова је свакако био мањи у односу на узорке прве испитиване групе (слика 41).

Слични резултати су добијени и у групи узорака хлеб са мекињама. На основу презентованих резултата на слици 43 евидентно је да је супституција узорцима третираног брашна имала позитиван утицај на структуру средине и укус хлеба. Добра еластичност средине је имала пресудан утицај на релативно висок број бодова за структуру средине, а карактеристичан укус мекиња остао је доминантан и заокружен код поменутих узорака. Додатак ТБ није имао значајнији утицај на спољни изглед узорака, што је вероватно резултат печења узорака у калупима. Запремина узорка са 10% третираног брашна при ОТ** је била нешто мања (за 15%), што је резултирало и мањим бројем бодова за овај квалитативни параметар.



Слика 43. Утицај третмана брашна на квалитет хлеба са мекињама.

Контролни узорци (К): III група – 90% брашно Т – 400:10% мекиње. Узорци са 10% супституисаног контролног узорка: КТБ* – узорци са 10% третираног брашна првим оптималним третманом; КТБ** – узорци са 10% третираног брашна другим оптималним третманом.

Све наведено, указује да третман хладном атмосферском плазмом у зависности од услова третмана, начина примене (количине), али првенствено квалитета брашна које се супституише третираним брашном, може имати различит утицај на пецивна својства пшеничног брашна. Самостална примена третираног пшеничног брашна у изради хлеба је неоправдана и са економског и са технолошког аспекта јер су побољшања технолошког квалитета недовољна да би оправдала трошкове третмана. Међутим, оправдана је примена хладне атмосферске плазме у циљу добијања третираног брашна који се може користити као побољшивач за слаба пшенична брашна. У циљу потпунијег сагледавања утицаја хладне атмосферске плазме на пецивна својства брашна потребно је испитати како врста замеса, односно интензитет силе смицања

може утицати на хидратацију и развој глутенске мреже теста од/са додатком третираног пшеничног брашна.

5.4. Испитивање могућности примене третмана хладном атмосферском плазмом на редукцију *Alternaria* токсина у пшеничном брашну

Циљ овог дела дисертације био је да се проуче ефекти SDBD третмана атмосферске хладне плазме на редукцију *Alternaria* токсина, прецизније на редукцију алтернариола (АОН), алтернариол монометил етра (АМЕ) и тентоксина (ТЕН) „спајкованих“ у пшенично брашно. Претходна истраживања показале су да хладна атмосферска плазма може да утиче на смањење садржаја микотоксина у третираним узорцима (ten Bosch и остали, 2017; Нојник и остали, 2017). Међутим, ниједна од ових студија није испитивала *Alternaria* токсине у матриксу пшеничног брашна.

Информација о утицају матрикса је једна од кључних за дубље разумевање процеса деградације микотоксина и основа за развој будућих апликација. Према нашем сазнању, ово је прва студија која истражује горе наведене аспекте. На слици 10 (б) дат је шематски приказ експерименталне поставке за третмане „спајкованих“ узорака пшеничног брашна у Петријевој посуди пречника 100 mm. Резултати добијени анализом *Alternaria* токсина указују на то да долази до значајног смањења садржаја *Alternaria* токсина у третираним узорцима након примене третмана хладне атмосферске плазме. Експериментални резултати су приказани у табели 20. Третмани са већом вредношћу стандардних оцена (eng. *standard score*, SS), указују на већи степен редукције испитиваних *Alternaria* токсина при условима дужег трајања третмана (t) и мањих растојања (d) узорака од извора хладне атмосферске плазме.

До смањења садржаја *Alternaria* токсина долази већ након само 30 секунди третмана, а степен редукције се кретала од 2,4% до 74,8%. Степен редукције зависи од врсте токсина и услова третмана. Највећа смањења за све испитиване *Alternaria* токсине постигнута су при најмањој удаљености узорака од извора хладне плазме, тј. када су постављени на 6 mm од SDBD извора. Од свих испитиваних *Alternaria* токсина, АМЕ је показао највећу нестабилност на третман, односно највећи степен редукције а затим следе ТЕН и АОН. На основу добијених резултата (табела 20), може се претпоставити да заједно са временом и растојањем узорка од плазме и различите хемијске особине испитиваних *Alternaria* токсина играју улогу у одређивању ефективности третмана.

Табела 20. Резултати редукције *Alternaria* токсина у „спајкованим“ узорцима пшеничног брашна у зависности од примењених услова третмана.

Третман	d [mm]	t [s]	АОН (%)	АМЕ (%)	TEN (%)	T (°C)	M (%)	SS
1	6	30	21,5	44,6	30,6	29,0	14,1	0,420
2	21	30	17,0	37,0	14,4	27,0	14,1	0,327
3	36	30	8,9	32,2	13,7	25,7	14,1	0,287
4	51	30	2,4	22,3	3,6	24,0	14,1	0,200
5	6	60	29,1	61,3	37,6	33,2	13,8	0,539
6	21	60	21,8	49,7	22,7	27,9	14,1	0,418
7	36	60	12,3	40,5	16,2	26,9	14,1	0,332
8	51	60	3,0	32,9	15,4	25,9	14,1	0,275
9	6	90	32,9	61,5	38,5	37,4	13,6	0,546
10	21	90	24,2	51,4	23,2	30,0	14	0,430
11	36	90	12,6	41,8	22,7	28,7	14,1	0,350
12	51	90	6,3	35,2	18,5	27,5	14	0,306
13	6	120	33,0	65,0	48,1	41,6	13	0,632
14	21	120	27,5	55,9	40,7	32,0	13,8	0,534
15	36	120	16,4	48,8	39,7	30,5	14,1	0,443
16	51	120	7,7	38,2	20,7	29,1	14	0,319
17	6	150	35,0	69,2	50,2	45,9	12,6	0,675
18	21	150	30,5	56,4	44,1	34,1	13,8	0,544
19	36	150	16,9	49,7	40	32,2	13,9	0,458
20	51	150	9,4	47,4	29,6	30,8	13,9	0,394
21	6	180	60,7	73,8	54,5	50,0	12,3	0,800
22	21	180	47,9	62,7	48,6	36,0	13,5	0,664
23	36	180	41,1	57,3	46,4	34,0	13,5	0,627
24	51	180	28,6	52,7	31,8	32,5	13,9	0,476
Поларитет			+	+	+	-	-	/

d – растојање узорка од плазме (mm), t – време третмана (s), АОН – редукција алтернариола (%), АМЕ – редукција алтернариол монометил етра (%), TEN – редукција тентоксина (%), T – температура узорка брашна након третмана (°C), M – влажност брашна након третмана (%), SS – евалуација стандардне оцене.

Како су особине микотоскина у вези са хемијском структуром, овакво понашање је очекивано. Постоје три могућа објашњења за исказане ефекте редукције на садржај *Alternaria* токсина у пшеничном брашну третманом хладне атмосферске плазме. Редукција може бити заснована на термичком, ултраљубичастом зрачењу или на ефекту реактивних врста хладне атмосферске плазме. Развијена као нетермички процес, хладна атмосферска плазма је дизајнирана да потпуно избегне или доведе до занемарљивог загревања узорака. Температура узорака након примене третмана у

експерименту никада није прелазила 50 °C. Овај ниво загревања забележен је само код третмана узорка на најмањем растојању узорка од плазме (6 mm) и са најдужим временом трајања третмана од 180 s. Измерена температура је била знатно нижа од температуре потребне за термичку разградњу *Alternaria* токсина. Како су друга истраживања раније показала АОН и АМЕ имају тачке топљења са разградњом на 350 °C и 267 °C, а подлежу значајној редукцији тек после 20 минута на 80 °C (Watson, 1998). Како нису остварени наведени услови, ни у погледу температуре узорка ни у погледу трајања третмана, не очекује се да термичка редукција *Alternaria* токсина игра значајну улогу је вероватно да термичка редукција има занемарив допринос степену редукције *Alternaria* токсина. Као што се може видети са слике 21, ултраљубичасто зрачење је емитовано услед побуђивања N₂ врста у хладној плазми. Ипак, емисиона снага хладне атмосферске плазме није значајна да би се сматрала ефикасном у процесу редукције микотоксина (Watson, 1998). Према свему наведеном сматра се да деградацију *Alternaria* токсина треба приписати реактивним врстама насталим у хладној плазми. Као што је потврђено мерењем оптичког емисионог спектра и из литературе, у плазми долази до стварања ROS и RON реактивних врста. Будући да се концентрација наведених врста током времена третирања увећава акумулирањем, њихов значајан допринос деградацији *Alternaria* токсина је извештан. Такође, наведено је у складу и са добијеним резултатима који указују да време третмана значајно утиче на ниво редукције *Alternaria* токсина. Резултати и других студија исказују сличне закључке (Misra и остали, 2019). Аутори сматрају да су ROS и RON реактивне врсте примарни узрочници редукције *Alternaria* токсина. Студије других аутора показују да пре свега ROS реактивне врсте имају битну улогу у редукцији микотоксина третманом хладне атмосферске плазме. Оправдање за овакво тумачење значаја ROS реактивних врста може се пронаћи у студији (Shi и остали, 2017). Истраживачи су у наведеној студији проучавали редукцију садржаја афлатоксина у плазми побуђеној у ваздуху као и у атмосфери чистог азота. Из резултата уочињива је много мања ефективност редукције афлатоксина у атмосфери чистог азота. Поврх тога, истражујући механизам деградације, аутори нису успели да пронађу молекул азота у продуктима разградње афлатоксина. Придржавајући се аналогије према наведеном испитивању, вероватно је да су ROS реактивне врсте одговорне и за редукцију *Alternaria* токсина. Једна од основних ROS реактивних врста хладне атмосферске плазме у ваздуху је озон О₃ (Moiseev и остали, 2014). Ефекти озона на редукцију садржаја микотоксина су познати од раније (Zorlugenç и остали, 2008; de Alencar и остали, 2012). Неколико других ROS реактивних врста, атомски кисеоник (O), хидроксилни радикал (OH[•]), водоник пероксид (H₂O₂), прате озон при стварању хладне атмосферске плазме и такође могу испољити утицај на хемијска једињења (Misra и остали, 2015b; Moiseev и остали, 2014; Misra и остали, 2019).

Додатно, испитивано је да ли постоје корелације између свих параметара мерених као излази процеса. Позитивне и врло значајне вредности корелације између АОН, АМЕ, ТЕН и Т параметара су представљене у табели 21. Такође, негативне и врло значајне корелације параметара М и АОН, АМЕ, ТЕН и Т су присутне.

Табела 21. Матрица корелације параметара третмана пшеничног брашна хладном атмосферском плазмом.

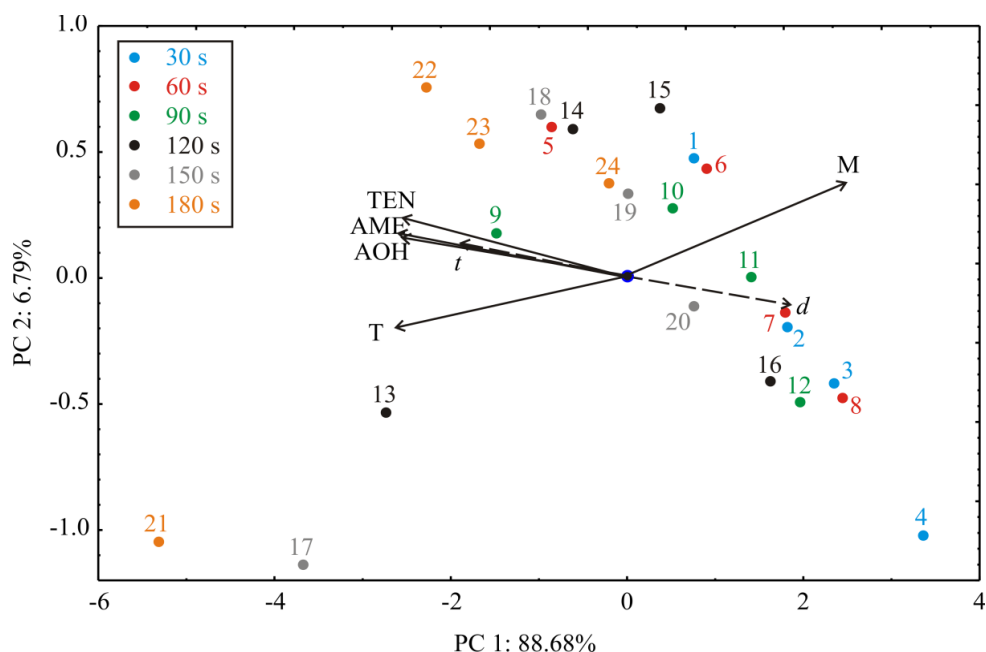
	АМЕ	ТЕН	Т	М
АОН	0,902	0,848	0,844	-0,784
АМЕ		0,933	0,901	-0,792
ТЕН			0,861	-0,751
Т				-0,963

АОН – редуција алтернариола (%), АМЕ – редуција алтернариол монометил етра (%), ТЕН – редуција тентоксина (%), Т – температура узорка након третмана (°C), М – влажност пшеничног брашна након третмана (%). Све корелације су статистички значајне на нивоу $p < 0,01$.

Како је раније наведено, температуре узорака, које су постигнуте током третмана, нису довољно високе како би самостално објасниле уочени степена редуције саджаја *Alternaria* токсина. Објашњење корелација између температуре узорака и степена редуције *Alternaria* токсина може се наћи у добро познатом правилу да корелација између одређених параметара не подразумева нужно и њихову узрочност. Односно, до повећања температуре долази са увећањем степена редуције *Alternaria* токсина али као што је раније показано (табела 20) температуре узорака су биле много мање од температура потребних за одвијање термичког процеса редуције *Alternaria* токсина. Већа температура узорка је остварена при третманима који су излагали узорак на мањим растојањима од извора хладне плазме а који су имали већи степен редуције *Alternaria* токсина. Из наведеног може се претпоставити да растојање узорка од извора плазме, заиста игра значајну улогу у разградњи *Alternaria* токсина а не температура. Ова претпоставка ће бити и потврђена у наставку употребом ANOVA на SOP моделима. До увећања степена редуције испитиваних *Alternaria* токсина са смањењем растојања узорка од плазме вероватно долази услед промена у просторно-временским параметрима дифузије реактивних врста хладне плазме. Услед мањег растојања узорка од плазме, дифузија реактивних врста плазме ка узорку се одвија брже и омогућава одвијање редуције *Alternaria* токсина и на површини и у запремини узорка. Тако за исто време третмана, реактивне врсте улазе дубље у запремину узорка што доводи до већег степена редуције. Односно, могуће је да при већим вредностима растојања плазме од узорка, само ROS реактивне врсте, као што је озон, испољавају редукујући утицај на *Alternaria* токсине. Такође, не треба одбацити ни могућност да при мањим вредностима растојања, и метастабилне реактивне врсте плазме имају могућност да испоље редукујући утицај на *Alternaria* токсине, пре него подлегну рекомбинацији.

Негативна корелација степена редукције и влажности брашна у вези је са објашњеним односом температуре узорка и степена редукције *Alternaria* токсина.

Анализа главних компоненти је такође коришћена за визуализацију описа образаца под којим је могуће разликовање узорака по утицају растојања и времена третмана хладном атмосферском плазмом на редукцију *Alternaria* токсина. Први корак у визуализацији главних трендова услова третмана хладном плазмом у узорцима је биplot резултата PC1 у односу на PC2 (слика 44).



Слика 44. PCA однос параметара на основу корелација компоненти

d – растојање узорка од изора плазме (mm), t – време третмана (s), АОН – редукција алтернариола (%), АМЕ – редукција алтернариол монометил етар (%), TEN – редукција тентоксина (%), Т – температура узорка након третмана (°C), М – влажност брашна након третмана (%).

Тачке приказане у PCA биplot графику, геометријски близу једна другој, указују на сличност узорака. Оријентација вектора који описује параметар у простору фактора указује на растући тренд представљених параметара, док је дужина вектора пропорционална квадрату корелационих вредности између вредности израчунатог параметра и самог параметра. Углови између одговарајућих параметара указују на степен њихових корелација (мали углови одговарају високим корелацијама). Из PCA приказаних података може се видети да прве две главне компоненте у систему пет посматраних параметара објашњавају 95,47% укупне варијансе (88,68 и 6,79%, појединачно) у подацима. Имајући у виду мапу PCA која је извршена на основу података, вредност АОН, доприноси са 19,5% објашњењу укупне варијансе на основу корелација. Остали параметри доприносе појединачно са АМЕ (20,9%), TEN (19,7%) и Т са (21,2%). Ови параметри исказују негативне резултате према првој главној компоненти, док је параметар М, односно, влага узорка са (18,7%) показао позитивну оцену према првој главној компоненти, (слика 44). Позитиван допринос израчунавању

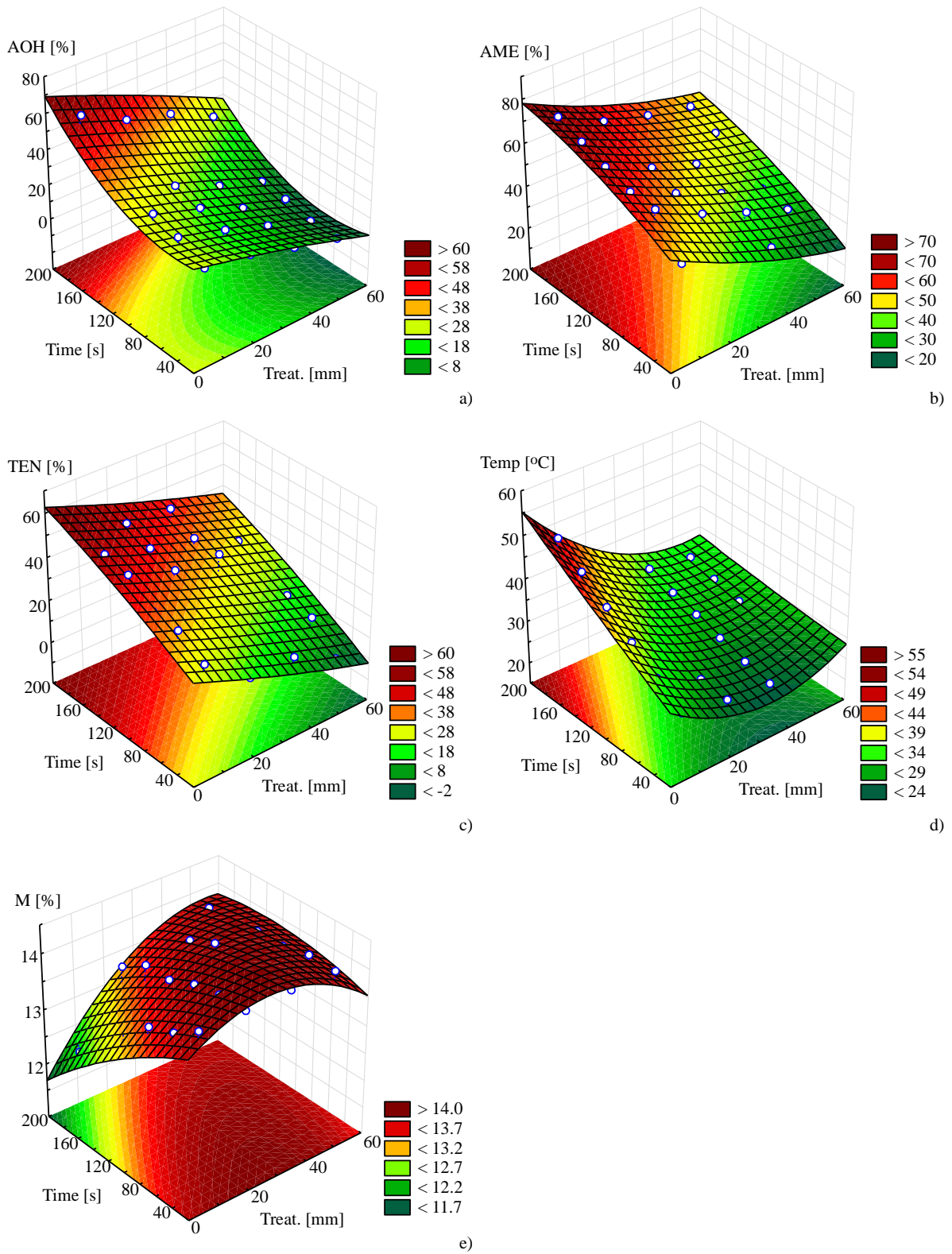
друге главне компоненте уочен је за: АМЕ (10,9%) укупне варијансе на основу корелација, ТЕН (18,7%) и М (48,8%), док негативни резултати израчунавања друге главне компоненте су посматрани за параметар Т (13,3%). Испитивани узорци су очигледно одвојени утицајем времена као и растојања од пражњења плазме и дистрибуција узорака према времену третмана и растојању јасно је видљива. Штавише, расподела узорака за иста времена третмана на основу растојања од плазме је такође јасно видљива. Описани обрасци груписања углавном су узроковани условима третмана (време и растојање), док температура нема значајнији утицај. Ово се може очекивати јер су *Alternaria* токсини стабилни на температурама забележеним током третмана хладном плазмом. РСА анализа је открила да време третмана хладном плазмом има израженији ефекат од растојања узорка од пражњења за раздвајање узорака. Поред тога, узорци третирани током 180 s и 150 s исказују највећи степен дивергенције, узимајући у обзир концентрације *Alternaria* токсина, у поређењу са свим узорцима третираним са краћим временом третмана.

5.4.1. Моделовање утицаја третмана на редукцију *Alternaria* токсина

Моделовање је спроведено применом методе одзивних површина. Модел је кориштен за процену главних утицаја услова третмана на одговоре зависних параметара. Посматрани зависни параметри су били редукција АОН, АМЕ и ТЕН, температура узорка (Т) и влага узорка (М). SOP модел је прилагођен подацима добијеним путем експерименталних мерења (Box и Behnken, 1960; Khuri и Mukhopadhyay, 2010):

$$Y_k = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=2}^3 \beta_{ij} X_i \cdot X_j, k=1-8 \quad (13)$$

гдје су β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} , коефицијенти константне регресије за пресек, линеарни, квадратни и продуктивни однос засебно, Y_k је зависни параметар, док су X_i и X_j услови третмана. Значајни услови третмана су посматрани употребом ANOVA за сваки од параметара. ANOVA је спроведена за добијене SOP моделе, а параметри су тестирану у односу на утицај услова третмана, табела 22. Резултати ANOVA анализе показују да линеарни термини третман и време значајно утичу на формирање SOP модела и прорачун АОН, АМЕ, ТЕН, Т и М. Линеарни члан растојања је такође статистички значајан за све излазне параметре на нивоу $p < 0,05$. Квадратни члан времена испољава утицајан за модел редукције АОН, док је квадратни члан растојања значајан за вредности параметара Т и М у SOP моделу. Члан мешовитог производа растојање \times време је значајан на нивоу $p < 0,05$ за SOP моделе параметара Т и М, односно, удела влаге у узорку и температуре узорка након спроведеног третмана хладном атмосферском плазмом. На слици 45 су приказани 3-D дијаграми главних утицаја услова третмана пшеничног брашна на вредности зависних параметара.



Слика 45. 3-D дијаграми процене главних утицаја услова третмана пшеничног брашна на вредности зависних параметара.

Табела 22. ANOVA израчунавање параметара из процеса третмана пшеничног брашна хладном атмосферском плазмом (приказан је збир квадрата).

Третман	сс	АОН	АМЕ	TEN	Т	М
d	1	2296,355*	1942,272*	1573,696*	370,657*	1,704*
d ²	1	2,385	17,783	1,845	73,150*	0,570*
t	1	1892,277*	1675,572*	2626,082*	391,053*	1,808*
t ²	1	344,607*	21,607	6,396	0,142	0,066
d × t	1	26,331	4,890	2,185	52,807*	0,890*
Грешка	18	356,801	148,727	321,540	41,188	0,451
R ²		0,927	0,961	0,929	0,956	0,918

d – растојање узорка од плазме (mm), t – време третмана (s), АОН – редуција алтернариола (%), АМЕ – редуција алтернариол монометил етар (%), TEN – редуција тентоксина (%), Т – температура узорка након третмана (°C), М – влажност брашна након третмана (%), сс – степени слободе, R² – коефицијент детерминације.*статистички значајно на нивоу $p < 0,05$.

Пошто је у овој студији изведено само квалитативно OES мерење, није могуће једноставно закључити које специфичне реактивне врсте хладне плазме играју главну улогу у редуцији *Alternaria* токсина. Највероватнији сценарио је редуција кроз синергију свих врста ROS, будући да коегзистирају током третмана са могућим утицајем метастабилних реактивних врста плазме при третманима са малим растојањем.

Поред наведеног, степен редуције *Alternaria* токсина може зависити и од релативне влажности ваздуха. Како се у влажном ваздуху постижу веће концентрације OH[•] и H₂O₂. Током третмана са хладном плазмом „спајкованог“ пшеничног брашна са *Alternaria* токсинима, ваздух је био на средњем нивоу zasiћености влаге (40%) која се није знатно мењала током серије третмана. Међутим, влажност брашна из узорака пшеничног брашна испаравала се у околни ваздух и хладну плазму, што је свакако резултирало повећањем процента влажности ваздуха а тиме и концентрација OH[•] и H₂O₂ реактивних врста, табела 20. Стога и на основу добијених резултата очекујемо да редуција *Alternaria* токсина настаје комбинованим ефектима следећих реактивних врста хладне плазме: OH[•], H₂O₂, и O₃. Продужавање времена третмана са хладном плазмом довели су до повећања ефективности разградње свих испитиваних *Alternaria* токсина. Степен редуције *Alternaria* токсина за третман са 6 mm растојања узорака од извора хладне плазме кретала се од 21,5%, 44,6% и 30,6% за изложеност третману од 30s до 60,7%, 73,8% и 54,5% за АОН, АМЕ и TEN, по реду навођења, за изложеност плазми од 180s. Посматрана редуција *Alternaria* токсина може се објаснити ефектом акумулације реактивних врста хладне плазме током дужих времена третмана. Уочава се да је пораст редуције *Alternaria* токсина са временом након 90 s мањи него што би се очекивало из динамике посматране само на основу првих 60 s излагања узорака хладној плазми. Наведену појаву делимично можемо приписати могућности да се након

редукције *Alternaria* токсина у површинском слоју брашна, брзина редукција успорава јављањем потребе за дифузије реактивних врста плазме у запремину узорака. Односно, разградња се успорава услед деловања матрикса брашна, што указује да би оптимални третман требао да се спроводи на релативно танком слоју брашна или на брашну у струји гаса. Ово је специфична особина матрице пшеничног брашна, како су третирани узорци у прашкастом облику, деловање у дубљим слојевима захтева да реактивне врсте пређу дужи пут до преосталих молекула *Alternaria* токсина које се налазе дубље у унутрашњости узорка. Плазма извор SDBD плазму формира на површини електроде без директног контакта са узорцима постављеним испод електроде. Ова геометрија плазма извора свакако утиче на токове реактивних врста од места побуђивања до површине узорака а тиме и на саме ефекте ROS реактивних врста. У свим испитиваним условима третмана, степен редукције *Alternaria* токсина расте са увећањем времена трајања третмана. Као што се види из табеле 21 степен редукције *Alternaria* токсина је већи за све токсине након времена излагања од 180 s и на растојању од 51 mm него што је након времена третирања од 30 s на најмањем растојању од 6 mm од плазме. Даље, степен редукције *Alternaria* токсина може да зависи од њихове хемијске структуре а тек потом од њихових молекулских маса. Тако посматрано, у свим испитиваним третманима АМЕ са молекулском масом од 272,2 Да исказује већи степен редукције у поређењу са АОН који се карактерише вредношћу молекулске масе од 258,2 Да. АОН и АМЕ су деривати дибензо- α -пирона и њихова хемијска структура се разликује само у једној групи (АМЕ има једну метокси групу где АОН има хидрокси групу) при чему третманом са хладном атмосферском плазмом испољавају различит степен редукције. С друге стране, ТЕН је природни циклични тетрапептид са молекулском масом од 414.4 Да при чему је у скоро свим примењеним третманима исказао већи степен разграде у односу на АОН. Овакав резултат је у сагласности и са истраживањима других аутора који су показали да степен редукције микотоксина применом хладне атмосферске плазме није корелирао са молекулском масом појединачних микотоксина (ten Bosch и остали, 2017). Хипотеза коју су изнели други истраживачи сугеришу да су микотоксини са дужим алифатичким ланцима осетљивији на утицај хладне атмосферске плазме у односу на микотоксине са структурама кондензованих прстенова и алифатских ланаца, као и од микотоксима са компактном структуром кондензованих ароматичних прстенова (ten Bosch и остали, 2017). Све наведено указује да разлике у хемијској структури *Alternaria* токсина првенствено утиче на њихову осетљивост према третману хладне атмосферске плазме а самим тим и на степен њихове разградње.

Прецизност SOP модела (енгл. *second order polynomial*, SOP) је посматрана употребом коефицијента детерминације (R^2). За све SOP моделе коефицијент детерминације се може сматрати као адекватан, (табела 23). Веће вредности R^2 приписане су моделима SOP у којима су нелинеарни чланови били мање а линеарни чланови третман и време више изражени. Нумеричка верификација развијених модела

тестирана је помоћу коефицијента детерминације (R^2), редукованог хи-квадрата (χ^2), средње грешке склоности (МВЕ), корена средње квадратне грешке (RMSE) и средње процентне грешке (MPE). Ови најчешће коришћени параметри израчунати су применом следећих израза (Arsenović и остали, 2015):

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (x_{\text{exp},i} - x_{\text{pre},i})^2}{N - n}, \quad RMSE = \left[\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N (x_{\text{pre},i} - x_{\text{exp},i})^2 \right]^{1/2},$$

$$MBE = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N (x_{\text{pre},i} - x_{\text{exp},i}), \quad MPE = \frac{100}{N} \cdot \sum_{i=1}^N \left(\frac{|x_{\text{pre},i} - x_{\text{exp},i}|}{x_{\text{exp},i}} \right) \quad (14)$$

гдје $x_{\text{exp},i}$ означава експерименталне вредности посматраних величина и $x_{\text{pre},i}$ су вредности величина предвиђене рачунањем из модела. N и n су број посматрања и константи, засебно. Квалитет развијених модела је приказан у табели 23. Веће вредности R^2 , а ниже вредности χ^2 , МВЕ, RMSE и MPE показују боље уклапање модела у експерименталне резултате (Arsenović и остали, 2015). Извршена је и резидуална анализа развијених модела. Додатно су посматране вредност скјунес (енгл. *Skewness*) као мера одступање расподеле од нормалне симетрије. Ако се скјунес видљиво разликује од нуле, онда је дистрибуција асиметрична, док су нормалне расподеле савршено симетричне. Мера кутозис (енгл. *Kurtosis*) као мера „врхунца“, односно, оштрину врха криве расподеле дистрибуције. Ако је мера кутозис очигледно различита од нуле, онда је расподела или равна или виша изражена од нормалне док мера кутозис нормалне дистрибуције је једнака нула. Средња вредност, стандардна девијација и варијација резидуалних вредности су такође анализирани и приказани у табели 23.

Табела 23. Статистичке показатељи развијених модела из процеса третмана пшеничног брашна хладном атмосферском плазмом.

	χ^2	RMSE	MBE	MPE	R^2	Skew	Kurt	Сврв	С.Д.	Вар
АОН	18,779	3,856	0,000	19,474	0,927	-0,756	-0,179	0,000	3,939	15,513
АМЕ	7,828	2,489	0,000	4,427	0,961	0,025	-0,072	0,000	2,543	6,466
TEN	16,923	3,660	0,000	11,794	0,929	-0,038	0,681	0,000	3,739	13,980
T	2,168	1,310	0,000	3,427	0,956	-0,579	-0,210	0,000	1,338	1,791
M	0,024	0,137	0,000	0,816	0,918	0,515	-0,177	0,000	0,140	0,020

АОН – редуција алтернариола (%), АМЕ – редуција алтернариол монометил етра (%), TEN – редуција тентоксина (%), Т – температура узорка након третмана (°C), М – влажност брашна након третмана (%), χ^2 - умањени хи-квадрат, RMSE - корен средње квадратне грешке, МВЕ – средња грешка пристрасности, MPE - средња процентна грешка, R^2 – коефицијент детерминације, Skew – скјунес, Kurt – кутозис, Сврв – средње вредности резидуалних вредности, С.Д. – стандардна девијација резидуалних вредности, Вар – варијација резидуалних вредности.

Резидуална анализа је показала да је средња вредност резидуала једнака нули, а стандардна девијација је била између 0,140 и 3,939. Ови резултати су показали добру приближност нормалној дистрибуцију око нуле са вероватноћом од 95% ($2 \times SD$), што значи добру способност генерализације развијеног модела за опсег посматраних експерименталних података.

5.4.2. Евалуација стандардне оцене третмана

Пошто су јединице и распони вредности различитих посматраних физичких и хемијских параметара различите, потребно је да се подаци сваке групе података сведу на тзв. нормализоване стандардне оцене, које представљају бездимензионалне јединице. За сваки посматрани параметар израчунате су вредности стандардне оцене те су кориштене за комплексно поређење посматраних узорака, с обзиром на њихове технолошке и хемијске особине наведених у табели 20. Поступак рангирања између различитих узорака је извршен на темељу односа сирових података и екстремних вредности за сваку примењену анализу (Brlek и остали, 2013), према наведеним једначинама 11 и 12.

Критеријуми „више је боље“ или "мање је боље" коришћени су у складу са знаком у колони „поларитет“ у табели 20. Пошто стандардна оцена представља средњу вредност збира пет нормализованих коефицијената, сваки излазни показатељ/параметар (редукција АОН, АМЕ и ТЕН, Т и М) окарактерисан је једнаком тежином, при израчунавању стандардне оцене. Максимум стандардне оцене представља оптималне услове третмана при којима се остварују оптималне вредности испитиваних параметара. Анализа стандардне оцене редукције *Alternaria* токсина показала је да су најбољи резултати добијени за третманом са узорком постављеним на растојању од 6 mm од извора хладне плазме и са временом трајања третмана од 180 s. Стандардна оцена за дати третман је износио 0,800 и обезбеђује следеће степене редукције за испитиване *Alternaria* токсине: за АОН (60,7%), за АМЕ (73,8%) и за ТЕН (54,5%). Код оптималног третмана температура пшеничног брашна никад није прелазила 50 °C, а влага није опада испод 12,3%. Према резултатима стандардних оцена, приказаних у табели 20, задовољавајући резултати се добијају и за краћа времена третмана на растојању узорка од извора хладне плазме од 6 mm. При временима третмана од 120 и 150 s, стандардне оцена износе 0,632 и 0,675. Недостатак ових третмана је релативно низак степен редукције АОН (33% и 35%). Другачији приступ у оптимизацији може се приметити са просечним растојањем узорка (21 и 36 mm) и времену третмана од 180 s. Стандардне оцене овог приступа износе 0,664 и 0,627 при чему ови третмани доводе до релативно ниских температуре пшеничног брашна, али пружају релативно ниже редукције свих испитиваних *Alternaria* токсина.

5.4.2.1. Експериментална верификација математичког модела

Како би се тестирала тачност развијеног модела, спроведена је експериментална верификација. За спровођене експерименталне верификације изабране су две вредности времена третмана хладном атмосферском плазмом и растојања узорка од извора хладне плазме, које нису коришћене у развоју модела. Ове вредности се налазе у опсегу модела и приказане су у табели 24. Оптимални услови третмана 21 ($d = 6 \text{ mm}$ и $t = 180 \text{ s}$) су такође коришћени у верификацији тачности модела. Концентрације *Alternaria* токсина као и садржај влаге и температура су испитани а под идентичним условима модел је искоришћен за прорачун вредности наведених показатеља. Према добијеним резултатима, уочена су само мања одступања експерименталних вредности у односу на вредности прорачунате моделом што указује да је развијени математички модел валидан и примењив (табела 24).

Табела 24. Верификација развијеног модела на излазне величине процеса током третмана пшеничног брашна хладном атмосферском плазмом.

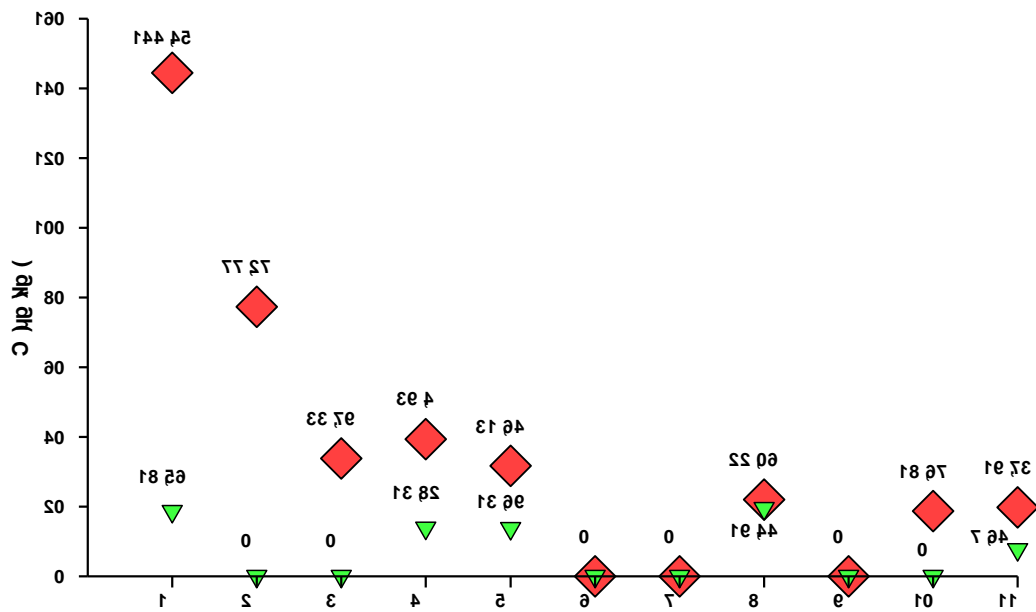
	<i>d</i> (mm)	<i>t</i> (s)	АОН (%)*	АМЕ (%)*	TEN (%)*	T (°C)	M (%)
Модел	40	45	8,370	32,179	12,858	24,809	14,200
Експеримент	40	45	8,498	31,980	12,754	24,767	14,249
Модел	15	165	43,825	65,288	49,448	40,717	13,098
Експеримент	15	165	44,408	64,022	50,256	40,852	13,027
ОТ	6	180	55,708	72,484	56,482	48,106	12,409

d – растојање узорка од плазме, t – време третмана, АОН – редукција алтернариола, АМЕ – редукција алтернариол монометил етра, TEN – редукција тентоксина, T – температура узорка након третмана, M – влажност пшеничног брашна након третмана, ОТ – оптимални третман.

5.4.3. Испитивање оптималног третмана на природно контаминираним узорцима

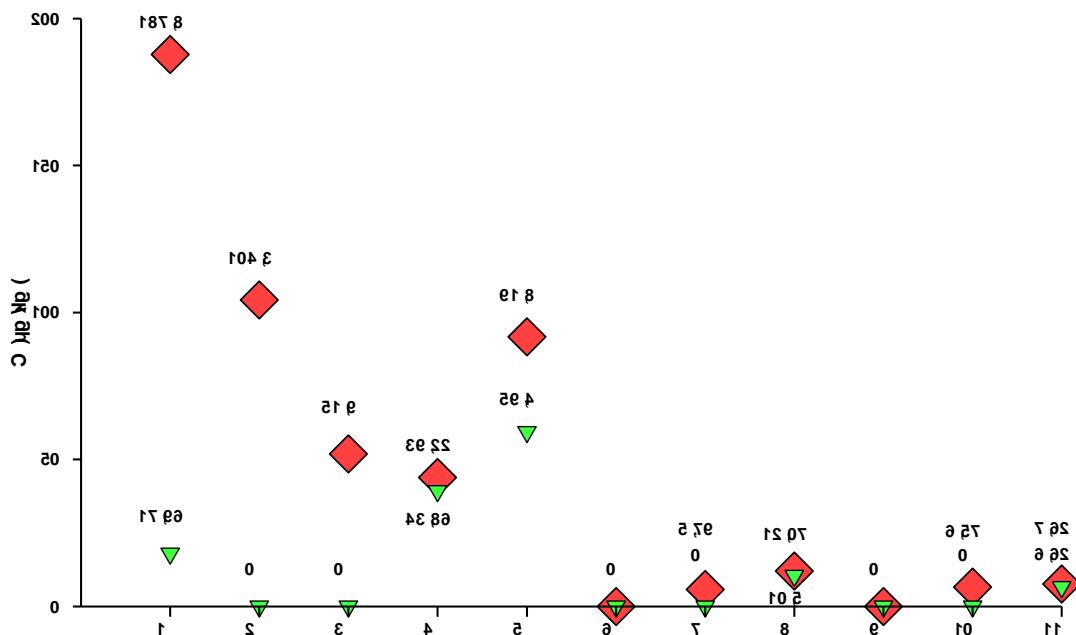
У циљу испитивања утицаја оптималног третмана на редукцију саджаја природно присутних *Alternaria* токсина у производима млевења пшенице, извршено је третирање једанаест реалних узорака. Узорке су чинили узорци мекиња (ознака узорка 11) и интегрално брашно (ознака узорака 1, 2, 3, 4, 5 и 8) набављено на тржишту као и млива пшеничног зрна (ситне мекиње ознака узорака 6 и 10; крупне мекиње 7 и 9) контаминираних *Alternaria* токсинима. Сва реална тестирања су спроведена под идентичним експерименталним условима а према условима третмана 21 (табела 20) који се показао као оптимални за редукцију *Alternaria* токсина у пшеничном брашну у претходном испитивању спроведеном на „спајкованим“ узорцима пшеничног брашна. На сликама од 46 (АОН), 47 (АМЕ) и 48 (TEN) приказане су концентрације *Alternaria*

токсина пре и после спроведених оптималног третмана, при чему као што се може видети одређени узорци нису били контаминирани са сва три *Alternaria* токсина.



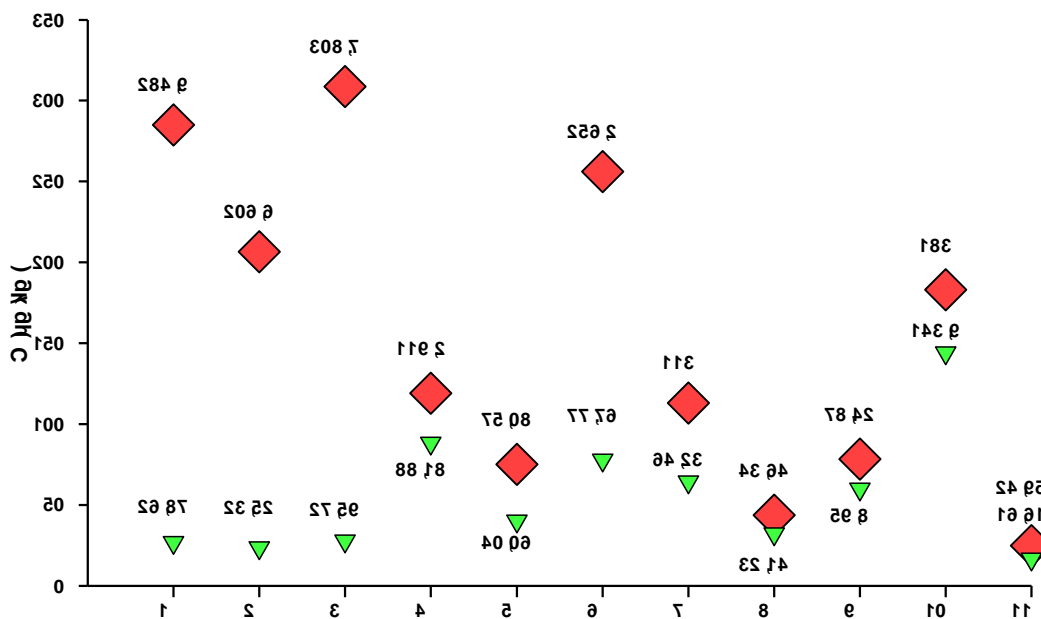
Слика 46. Садржај АОН токсина (црвени квадратићи) и после (зелени троуглови) третирања оптималним третманом хладне атмосферске плазме.

Са слике 46 може се видети да АОН није природно био присутан (концентрацијом од $0 \mu\text{g kg}^{-1}$) у три од једанаест испитиваних реалних узорака (узорци 6,7 и 9). Осим узорка број један, који је имао највећу концентрацију, сви узорци су имали релативно приближне концентрације природно присутног АОН које су се значајно редуковале након спроведеног третмана.



Слика 47. Садржај АМЕ токсина (црвени квадратићи) и после (зелени троуглови) третирања оптималним третманом хладне атмосферске плазме.

Са слике 47. је уочљиво да АМЕ није природно био присутан и свим реалним узорцима. У два од укупно једанаест испитиваних узорака није детектован АМЕ (6 и 9). Након третмана хладном атмосферском плазмом у четири узорка није било могуће установити концентрацију АМЕ токсина, односно, дошло је до нивоa разградње који је био испод границе детекције примењене методе. Као и у случају испитивања разградње АОН и код АМЕ је приметно да је умањење садржаја АМЕ након третмана израженије код оних узорака који су имали већу почетну концентрацију природно присутног АМЕ пре третмана.



Слика 48. Садржај ТЕН токсина пре (црвени квадратићи) и после (зелени троуглови) третирања оптималним третманом хладне атмосферске плазме.

Од испитиваних *Alternaria* токсина ТЕН је био најзаступљени (слика 48) и квантификован је у свим испитиваним реалним узорцима. Поред тога, концентрације ТЕН пре третмана, су се кретале у најширем опсегу у реалним узорцима у односу на концентрације АМЕ и АОН, прецизније од 24,95 до 308,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Значајно је нагласити да је и производ купљен на тржишту у облику мекиња за здраву исхрану био је контаминиран са ТЕН са квантификованом концентрацијом од 24,95 $\mu\text{g kg}^{-1}$. После спровођења третмана хладном атмосферском плазмом у свим узорцима дошло је до значајне редукације садржаја ТЕН. Редукација је била најизраженија у оним узорцима који су пре третмана имали највећи садржај ТЕН, док је код узорака са средњим садржајем ТЕН и редукација била средњег нивоа. У табели 25. приказани су остварени степени редукације на свим реалним узорцима.

Табела 25. Остварени степени редукције *Alternaria* токсина применом оптималног третмана хладном атмосферском плазмом на реалним узорцима.

Узорак	АОН (%)	АМЕ (%)	TEN (%)
1	87,15	90,44	90,6
2	100	100	88,6
3	100	100	91,1
4	64,92	10,58	26,0
5	56,73	35,23	46,6
6	-	-	69,7
7	-	100	43,2
8	11,9	12,9	26,4
9	-	-	23,7
10	100	100	21,4
11	61,3	13,1	33,4

АОН – редукција алтернариола, АМЕ – редукција алтернариол монометил етра, TEN – редукција тентоксина.

Редукција АОН и АМЕ се кретала од 10,58% до 100% у неколико испитиваних контаминираних узорака. С друге стране, степен редукције TEN се кретао у ужем опсегу, од 21,4% па до 91,1%. Примећене разлике у степенима редукције испитиваних *Alternaria* токсина између природно контаминираних узорака на бази пшенице, највероватније су последица како утицаја почетних концентрација природно присутних *Alternaria* токсина, тако и утицаја карактеристике самих узорака производа млевења пшенице, пре свега величине честице млинских производа односно млива. Будућа истраживања требало би да буду управо усмерена ка доказивању ових хипотеза. Ипак, само испитивање је показало да третман развијен на модел систему пшеничног брашна је успешно довео до редукције присутних *Alternaria* токсина у свим испитиваним узорцима. Добијени резултати у овој докторској дисертацији су у сагласности и са истраживањима Wang и остали (2020) који су испитивали утицај почетне концентрације чистих стандарда АОН и АМЕ на њихов степен редукције при третману хладном атмосферском плазмом. Wang и остали (2020) су такође закључили да наведени *Alternaria* токсини подлежу већем степену редукције што су у већој концентрацији подвргнути третману хладне атмосферске плазме. Резултати представљени у овој докторској дисертацији, указују на сличне односе између степена редукције и почетних концентрација *Alternaria* токсина и у реалним узорцима су посебно значајни, како природно присутни *Alternaria* токсини, могу бити и хемијски везани са градивним компонентама носача те њихова редукција може бити отежана присуством хемијских веза у односу на модел систем или чисте стандарде *Alternaria* токсин.

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу спроведених истраживања и дискусије добијених експерименталних резултата може се закључити следеће:

- SRC метода има значајан аналитички потенцијал у дефинисању квалитета пасажних брашна јер потврђује да постоје статистички значајне разлике разлике између првог и петог пасажног брашна, те последњих пасажних брашна редукције у односу на друга пасажна брашна која су бољег квалитета.
- Корелативном анализом утврђено је да се на основу параметара SRC методе веродостојно могу предвидети реолошке особине теста. Као поуздани параметри издвајају се параметри SRCLa и GPI који указују на квалитет протеина, затим SRCsu и SRCw док је значајност параметра SRCSO у предвиђању реолошких особина нешто мања. Параметри SRCLa и GPI су у негативној корелацији са фаринографском моћи упијања воде (FWA). Са друге стране, висока позитивна корелација потврђена је између параметра SRCsu, као и параметара SRCw и SRCSO и FWA. Параметар GPI је у корелацији са фаринографским стабилитетом теста (FST), али и са екстензографским параметрима: максимални отпор теста (Rmax) и енергија (E). SRCLa је такође у позитивној корелацији са максималним отпором и енергијом.
- Мултиваријатна анализа са задовољавајућим степеном тачности потврђује добру способност моделовања реолошких параметара на основу вредности SRC параметара. Развијени PLSR модели омогућавају увид у односе између SRC параметара и емпиријско реолошких параметара. Због брзине, минималне количине узорка за анализу, али пре свега потврђене корелације са реолошким параметрима SRC метода представља алтернативни тест за уобичајене фаринографску и екстензографску емпиријску реолошку методу, које имају значајну улогу у дефинисању технолошког квалитета пшеничног брашна.
- Третман хладном атмосферском плазмом доводи до промена у садржају сулфхидрилних група, односно до промена у степену умрежености протеина глутена, што је потврђено применом и SRC методе. Параметри SRCLa и GPI

опадају указујући на смањену мој бубрења као последицу повећаног степена умрежености што такође доводи и до увећања модула еластичности G' .

- Знатно увећане вредности $SRCSu$ укузују на могућност да третман хладном атмосферском плазмом изазива оксидационо гелирања арабиноксилана чиме се значајно увећава степен њиховог бубрења.
- Моделовање применом методологије одзивне површине указало је на могућност примене свих одабраних експерименталних метода, осим глутопик методе, за праћење утицаја хладне атмосферске плазме на квалитет пшеничног брашна.
- Уочене промене на пшеничним протеинима приписујемо ROS реактивним врстама хладне атмосферске плазме и њиховом интеракцијом, међутим, потребно је урадити и даља испитивања која ће објаснити уочена одступања у вредностима модула еластичности, глутен индекса и садржаја влажног глутена при најинтезивнијем третману: време 180 s, растојање 6 mm и степен искоришћена заклона 0%.
- Применом већег степена искоришћена заклона, услед промена у просторно-временским параметрима дифузије, омогућава само стабилним реактивним врстама плазме да испоље оксидациони утицај на брашно
- На основу спектроскопске анализе, утврђено је да третман хладном атмосферском плазмом доводи до промена у садржају секундарних протеинских структура. Правац промене секундарних протеинских структура зависи од услова третмана третмана хладном атмосферском плазмом. Независно од услова третмана долази до увећања удела α -хеликс секундарних структура, а смањења удела β равни као и β -окрет + β равни структура у односу на контролни узорак са уделима од 28,35%, 37,81% и 22,24% по реду навођења. При интензивнијим условима третмана долази до поновног повећања удела β равни али не до вредности контролног узорка и у узорку 9 износи 37,21% а удели α -хеликс и β -окрет + β равни структура износе 31,81% и 20,55%.
- Процес моделовања третмана хладном атмосферском плазмом указао је на значајност појединачних услова третмана на посматране вредности параметара SRC методе и потребу спровођења поступка оптимизације према одговарајућем циљу третмана. Валидација развијених модела применом функције пожељности је показала да се предвиђања параметара одзива слажу у задовољавајућем степену са добијеним експерименталним подацима валидације, односно, да модели релативно добро описују утицај третмана хладном атмосферском плазмом на SRC параметре.

- Резултати указују да је одабир два третмана, према одговарајућим циљевима третмана, усмерених на протеине и арабоксилане као компоненте брашна подложне оксидацији, омоућио сагледавање утицаја различитог степена оксидације протеина и арабоксилана третираног брашна на квалитет готових производа.
- Резултати испитивања квалитета различитих врста хлеба, пшенични хлеб, мешани хлеб од целог зрна и хлеб са мекињама, потврђују да примена третираног брашна хладном атмосферском плазмом може имати различит утицај на физичке и сензорске параметре квалитета хлеба.
- Супституција пшеничног брашна третираним брашном доводи до смањења запремине хлеба. Интензите промене запремине зависи од услова третмана, али и од врсте хлеба. Третман брашна хладном атмосферском плазмом у трајању од 130 s, растојању узорка 30 mm и 0% искоришћења заклона доводи до статистички значајног смањења запремине за 12,7% пшеничног хлеба, мешаног хлеба са целим зрном и хлеба са мекињама. Други оптимални третман (30 s, 50 mm, 0%) нема статистички значајан утицај на вредности запремине ни на једну испитивану врсту хлеба.
- Промене текстурних параметара хлеба са додатком третираног пшеничног брашна зависи од услова третмана хладном атмосферском плазмом, али и од врсте хлеба (основне, мешане или специјалне). Утврђене промене у текстури испитиваних узорака хлеба су очекиване с обзиром на претпоставку да третман пшеничног брашна хладном атмосферском плазмом доводи до полимеризације протеина глутена што утиче на развој глутена током замеса и физичке особине теста.
- Третмани брашна хладном атмосферском плазмом при оптималним условима, значајно мењају параметре боје, па се и супституцијом дела брашна код мешаних и специјалних врста хлеба могу постићи видљиве промене у боји средине.
- Промене пецивних својстава пшеничног брашна условљене су условима третмана, процентом супституције, али првенствено квалитетом брашна које се супституише третираним брашном. Изради хлеба од чистог третираног пшеничног брашна је неоправдана и са економског и са технолошког аспекта. Трошкови третмана у поменутом случају превазилазе побољшања технолошког квалитета, а евидентно је погоршање сензорских својстава због изражене горчине третираног брашна. Оправдана је примена хладне атмосферске плазме у циљу добијања третираног брашна које се може користити као побољшивач за слаба пшенична брашна или за производњу специјалних врста хлеба.

- Резултати добијени у овом истраживању показују да хладна атмосферска плазма са SDBD побуђењем има велики потенцијал за разградњу испитиваних *Alternaria* токсина. Може се закључити да оба испитивана услова третмана хладном атмосферском плазмом (време и растојање) утичу на степен редукције *Alternaria* токсина у матриксу пшенично брашно.
- Ефекте редукције испитиваних *Alternaria* токсина могу се приписати ROS реактивним врстама хладне атмосферске плазме и њихових међусобним синергијама. Постоје индикације да и RNS реактивне врсте испољавају учинак на разградњу *Alternaria* токсина те су неопходна даља истраживања у овом правцу.
- Полиномски модели другог реда показали су добре могућности предвиђања (коэффициенти детерминације за посматране параметре и кретали су се између 0,927 и 0,961) и на основу њих, развијен је оптимални третман за редукцију испитиваних *Alternaria* токсина.
- За прорачун АОН, АМЕ, ТЕН, Т и М, на нивоу статистичке значајности од $p < 0,05$ линеарни члан растојања је значајан за све излазне параметре, квадратни члан времена испољава утицај за модел редукције АОН, док је квадратни члан растојања значајан за вредности параметара Т и М. Члан мешовитог производа растојање \times време је значајан за Т и М, односно, удела влаге у узорку и температуре узорка након спроведеног третмана,
- На основу евалуација стандардне оцене третмана, одабран је оптимални третман ($d = 6 \text{ mm}$ и $t = 180 \text{ s}$) за редукцију испитиваних *Alternaria* токсина са SS оценом од 0,800 при којем се остварује редукција *Alternaria* токсина од 60,7% (АОН), 73,8% (АМЕ) и 54,5% (ТЕН), уз незнатно повећање температуре пшеничног брашна.
- Одабрани оптимални третман примењен на реалним узорцима односно на природно контаминираним узорцима млинских производа од пшенице је показао ефикасност у разградњи присутних *Alternaria* токсина.
- Степен редукције испитиваних *Alternaria* токсина је зависио од врсте млинских производа од пшенице као и од почетних концентрација присутних *Alternaria* токсина у истим узорцима пре третмана хладном атмосферском плазмом.

Литература

- AACC International. 2010. Approved Methods of Analysis, 11th Ed. Methods 56-10.02, and 56-11.02. AACC International: St. Paul, MN.
- Aamodt, A., Magnus, E. M., & Faergestad, E. M. (2003). Effect of flour quality, ascorbic acid, and DATEM on dough rheological parameters and hearth loaves characteristics. *Journal of food science*, 68(7), 2201-2210.
- Abdi, H., & Williams, L. J. (2010). Principal component analysis. *Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics*, 2(4), 433-459.
- Agyare, K. K., Xiong, Y. L., & Addo, K. (2008). Influence of salt and pH on the solubility and structural characteristics of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate. *Food Chemistry*, 107(3), 1131-1137.
- Aiko, V., Edamana, P., & Mehta, A. (2016). Decomposition and detoxification of aflatoxin B₁ by lactic acid: Degradation of aflatoxin B₁. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(6), 1959–1966.
- Andersson, R., Hämäläinen, M., & Åman, P. (1994). Predictive modelling of the bread-making performance and dough properties of wheat. *Journal of Cereal Science*, 20(2), 129-138.
- Andrews, D. C., Caldwell, R. A., & Quail, K. J. (1995). Sulfhydryl analysis. II. Free sulfhydryl content of heated doughs from two wheat cultivars and effect of potassium bromate. *Cereal chemistry*, 72(3), 330-333.
- Andrews, J. L., & Skerritt, J. H. (1996). Wheat dough extensibility screening using a two-site enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with antibodies to low molecular weight glutenin subunits. *Cereal chemistry*, 73(5), 650-657.
- Arsenović, M., Pezo, L., Stanković, S., & Radojević, Z. (2015). Factor space differentiation of brick clays according to mineral content: Prediction of final brick product quality. *Applied Clay Science*, 115, 108–114.
- Auerman L. J. (1979). Tehnologija pekarske proizvodnje. Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija.
- Bahrami, N., Bayliss, D., Chope, G., Penson, S., Pehinec, T., & Fisk, I. D. (2016). Cold plasma: a new technology to modify wheat flour functionality. *Food chemistry*, 202, 247-253.
- Barrera, G. N., Pérez, G. T., Ribotta, P. D., & León, A. E. (2007). Influence of damaged starch on cookie and bread-making quality. *European Food Research and Technology*, 225(1), 1-7.
- Bauer, A., Ni, Y., Bauer, S., Paulsen, P., Modic, M., Walsh, J. L., & Smulders, F. J. M. (2017). The effects of atmospheric pressure cold plasma treatment on microbiological, physical-chemical and sensory characteristics of vacuum packaged beef loin. *Meat science*, 128, 77-87
- Beccari, JB (1745) De Frumento, in De Bononiensi Scientiarum et Artium atque Academia Commentarii, Tomi Secundi. Bononia, Bologna.

- Becker, D., Wieser, H., Koehler, P., Folck, A., Mühling, K. H., & Zörb, C. (2012). Protein composition and techno-functional properties of transgenic wheat with reduced α -gliadin content obtained by RNA interference. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 85(1), 23.
- Becker, K. H., Kogelschatz, U., Schoenbach, K. H., & Barker, R. J. (Eds.). (2004). *Non-equilibrium air plasmas at atmospheric pressure*. CRC press.
- Belton, P. S. (1999). Mini review: on the elasticity of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*, 29(2), 103-107.
- Belton, P. S. (2003). The molecular basis of dough rheology in Bread making: Improving quality.
- Belton, P. S. (2005). New approaches to study the molecular basis of the mechanical properties of gluten. *Journal of Cereal Science*, 41(2), 203-211.
- Belton, P. S., Colquhoun, I. J., Grant, A., Wellner, N., Field, J. M., Shewry, P. R., & Tatham, A. S. (1995). FTIR and NMR studies on the hydration of a high-Mr subunit of glutenin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 17(2), 74-80.
- Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20313-20316.
- Bernardin, J. E., & Kasarda, D. D. (1973). Hydrated protein fibrils from wheat endosperm. *Cereal Chemistry*.
- Bettge, A. D., Morris, C. F., DeMacon, V. L., & Kidwell, K. K. (2002). Adaptation of AACC method 56-11, solvent retention capacity, for use as an early generation selection tool for cultivar development. *Cereal Chemistry*, 79(5), 670-674.
- Bhat, R., Rai, R. V., Karim, A. A. (2010). Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(1), 57-81.
- Biliaderis, C.G., Izydorczyk, M.S., Rattan, O. (1995). Effect of arabinoxylans on bread-making quality of wheat flours. *Food Chemistry*, 5, 165–171.
- Blazek, J. (2008). Role of amylose in structure-function relationship in starches from australian wheat varieties. PhD-thesis Faculty of Agriculture, Food and Natural Resources, The University of Sydney, Australia.
- Bloksma, A. H. (1963). Oxidation by molecular oxygen of thiol groups in unleavened doughs from normal and defatted wheat flours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 14(8), 529-535.
- Bloksma, A. H. (1972). The relation between the thiol and disulfide contents of dough and its rheological properties. *Cereal Chem.*, 49, 104-118.
- Bloksma, A. H. (1990). Rheology of the breadmaking process. *Cereal Foods World*.
- Bogaerts, A., Neyts, E., Gijbels, R., & van der Mullen, J. (2002). Gas discharge plasmas and their applications. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 57(4), 609-658.
- Bock, J. E., Damodaran, S. (2013). Bran-induced changes in water structure and gluten conformation in model gluten dough studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 31, 146–155.

- Bonet, A., Rosell, C. M., Caballero, P. A., Gómez, M., Pérez-Munuera, I., & Lluch, M. A. (2006). Glucose oxidase effect on dough rheology and bread quality: a study from macroscopic to molecular level. *Food Chemistry*, 99(2), 408-415.
- Boudam, M. K., Moisan, M., Saoudi, B., Popovici, C., Gherardi, N., & Massines, F. (2006). Bacterial spore inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons as obtained with the same gas mixture. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 39(16), 3494.
- Bourke, P., Zuizina, D., Han, L., Cullen, P. J., & Gilmore, B. F. (2017). Microbiological interactions with cold plasma. *Journal of applied microbiology*
- Box, G. E. P., & Behnken, D. W. (1960). Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. *Technometrics*, 2(4), 455-475.
- Brandenburg, R. (2017). Dielectric barrier discharges: progress on plasma sources and on the understanding of regimes and single filaments. *Plasma Sources Science and Technology*, 26(5), 053001
- Brlek, T., Pezo, L., Voća, N., Krička, T., Vukmirović, Đ., Čolović, R., & Bodroža-Solarov, M. (2013). Chemometric approach for assessing the quality of olive cake pellets. *Fuel Processing Technology*, 116, 250-256.
- Brugger, E. M., Wagner, J., Schumacher, D. M., Koch, K., Podlech, J., Metzler, M., & Lehmann, L. (2006). Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Toxicology letters*, 164(3), 221-230.
- Bulaj, G. (2005). Formation of disulfide bonds in proteins and peptides. *Biotechnology advances*, 23(1), 87-92.
- Bußler, S., Steins, V., Ehlbeck, J., & Schlüter, O. (2015). Impact of thermal treatment versus cold atmospheric plasma processing on the techno-functional protein properties from *Pisum sativum* 'Salamanca'. *Journal of Food Engineering*, 167, 166-174.
- Caballero, P. A., Gómez, M., & Rosell, C. M. (2007). Improvement of dough rheology, bread quality and bread shelf-life by enzymes combination. *Journal of food engineering*, 81(1), 42-53.
- Cannon, P. R. (1945). The importance of proteins in resistance to infection. *Journal of the American Medical Association*, 128, 360-362.
- Carrascal, L. M., Galván, I., & Gordo, O. (2009). Partial least squares regression as an alternative to current regression methods used in ecology. *Oikos*, 118(5), 681-690.
- Chamberlain, N., Collins, T. H., and Elton, G. A. H. (1965). The Chorleywood bread process. *Cereal Science today*, 10, 415.
- Charun, E., Dournaux, J.L., Contamine, A.S., Vergnes, B. (1997). Rheological characterization of biscuit doughs. 193-197. Proceedings of 1st International Symposium on Food Rheology and Structure Zurich.
- Chen, C. H., & Bushuk, W. (1970). Nature of proteins in triticale and its parental species: III. A comparison of their electrophoretic patterns. *Canadian Journal of Plant Science*, 50(1), 25-30.
- Chung, D., & Keles, S. (2010). Sparse partial least squares classification for high dimensional data. *Statistical applications in genetics and molecular biology*, 9(1).

- Ciacco, C.F., D'Appolonia, B.L. (1982). Characterization and gelling capacity of water-soluble pentosans isolated from different mill streams, *Cereal Chemistry*, 59, 163-166.
- Collar, C., Bollain, C., Rosell, C.M. (2007). Rheological behaviour of formulated bread doughs during mixing and heating. *Food Science and Technology International*, 13(2), 99.
- Colombo, A., Pérez, G. T., Ribotta, P. D., & León, A. E. (2008). A comparative study of physicochemical tests for quality prediction of Argentine wheat flours used as corrector flours and for cookie production. *Journal of cereal science*, 48(3), 775-780.
- Conrads, H., & Schmidt, M. (2000). Plasma generation and plasma sources. *Plasma Sources Science and Technology*, 9(4), 441.
- Courtin, C. M., & Delcour, J. A. (2002). Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. *Journal of cereal science*, 35(3), 225-243.
- Critzer, F. J., Kelly-Wintenberg, K., South, S. L., & Golden, D. A. (2007). Atmospheric plasma inactivation of foodborne pathogens on fresh produce surfaces. *Journal of food protection*, 70(10), 2290-2296.
- Cullen, P. J., Tiwari, B. K., & Valdramidis, V. (Eds.). (2011). Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods. Academic Press.
- da Costa, M. C., Deliza, R., Rosenthal, A., Hedderley, D., & Frewer, L. (2000). Non conventional technologies and impact on consumer behavior. *Trends in Food Science & Technology*, 11(4-5), 188-193.
- Dachkevitch, T., & Autran, J. C. (1989). Prediction of baking quality of bread wheats in breeding programs by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem*, 66(6), 448-456.
- Damodaran, S. (1994). Structure-function relationship of food proteins. *Protein functionality in food systems*, 1-37.
- Dang, J. M. C., and Bason, M. L. (2006). Assessing solvent retention capacities of flours using the Rapid Visco Analyser. Tech. J. Newport Scientific
- Dapčević Hadnađev, T., Pojić, M., Hadnađev, M., Torbica, A. (2011). The role of empirical rheology in flour quality control. In: I. Akyar (Ed.), *Wide spectra of quality control* (pp. 335–360). Rijeka: InTech, Croatia.
- Day, L., Augustin, M. A., Batey, I. L., & Wrigley, C. W. (2006). Wheat-gluten uses and industry needs. *Trends in Food Science & Technology*, 17(2), 82-90.
- de Alencar, E. R., Faroni, L. R. D., Soares, N. de F. F., da Silva, W. A., & da Silva Carvalho, M. C. (2012). Efficacy of ozone as a fungicidal and detoxifying agent of aflatoxins in peanuts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(4), 899–905.
- Delcour, J. A., Joye, I. J., Pareyt, B., Wilderjans, E., Brijs, K., & Lagrain, B. (2012). Wheat gluten functionality as a quality determinant in cereal-based food products. *Annual review of food science and technology*, 3, 469-492.
- Delcour, J. A., Van Win, H., & Grobet, P. J. (1999). Distribution and structural variation of arabinoxylans in common wheat mill streams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1), 271-275.

- Deutsch, J. C., Santhosh-Kumar, C. R., & Kolhouse, J. F. (1999). Glutathione oxidation in real time by thermospray liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 862(2), 161-168.
- Dewettinck, K., Van Bockstaele, F., Kühne, B., Van de Walle, D., Courtens, T. M., & Gellynck, X. (2008). Nutritional value of bread: Influence of processing, food interaction and consumer perception. *Journal of Cereal Science*, 48(2), 243-257.
- Dick, J. W., JW, D., & JS, Q. (1983). A modified screening test for rapid estimation of gluten strength in early-generation durum wheat breeding lines.
- Directive, I. C. (2002). 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eur Communities*, 221, 8-36.
- Dobraszczyk, B. J., & Morgenstern, M. P. (2003). Rheology and the breadmaking process. *Journal of cereal Science*, 38(3), 229-245.
- Don, C., Lichtendonk, W. J., Plijter, J. J., & Hamer, R. J. (2003). Understanding the link between GMP and dough: from glutenin particles in flour towards developed dough. *Journal of Cereal Science*, 38(2), 157-165.
- Dong, S., Gao, A., Xu, H., & Chen, Y. (2017). Effects of dielectric barrier discharges (DBD) cold plasma treatment on physicochemical and structural properties of zein powders. *Food and Bioprocess Technology*, 10(3), 434-444.
- Doolotkeldieva, T. D. (2010). Microbiological Control of Flour-Manufacture: Dissemination of Mycotoxins Producing Fungi in Cereal Products. *Microbiology Insights*.
- D'Ovidio, R., & Masci, S. (2004). The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*, 39(3), 321-339.
- Dror, Y., Rimon, E., & Vaida, R. (2020). The Wheat in the View of Our Whole-Menu. In *Whole-Wheat Bread for Human Health* (pp. 25-42). Springer, Cham.
- Duyvejonck, A. E., Lagrain, B., Dornez, E., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2012). Suitability of solvent retention capacity tests to assess the cookie and bread making quality of European wheat flours. *LWT-Food Science and Technology*, 47(1), 56-63.
- Duyvejonck, A. E., Lagrain, B., Pareyt, B., Courtin, C. M., & Delcour, J. A. (2011b). Relative contribution of wheat flour constituents to solvent retention capacity profiles of European wheats. *Journal of Cereal Science*, 53(3), 312-318.
- Duyvejonck, A., Lagrain, B., Courtin, C., & Delcour, J. (2011a). Suitability of Solvent Retention Capacity test methodologies for European wheat flours.
- Đaković, Lj. (1980) Pšenično brašno: Fizičko-hemijski osnovi određivanja tehnološkog kvaliteta pšeničnog brašna. Novi sad: Naučna knjiga.
- Ee, K. Y., Eng, M. K., & Lee, M. L. (2020). Physicochemical, thermal and rheological properties of commercial wheat flours and corresponding starches. *Food Science and Technology*, (AHEAD).
- EFA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). (2011). Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food: *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal*, 9(10), 2407.
- EFSA, European Food Safety Authority, Panel on Contaminants in the Food Chain (2017): Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed, *EFSA Journal*.

- Egbontan, A. O., Afolabi, C. G., Kehinde, I. A., Enikuomehin, O. A., Ezekiel, C. N., Sulyok, M., ... Krska, R. (2017). A mini-survey of moulds and mycotoxins in locally grown and imported wheat grains in Nigeria. *Mycotoxin Research*, 33(1), 59–64.
- Eskola, M., Altieri, A., & Galobart, J. (2018). Overview of the activities of the European Food Safety Authority on mycotoxins in food and feed. *World Mycotoxin Journal*, 11(2), 277-289.
- EUR-Lex. 2018. An official website of European Union law and other public documents of the European Union. Access to European Union law. <https://eur-lex.europa.eu/homepage.html>.
- European Commission - PRESS RELEASES - Press release - Questions and Answers: New Regulation on Novel Food *New Regulation on Novel Food*. (2015). Europa.eu. Retrieved 28 January 2018, from http://europa.eu/rapid/press-release_MEMO-15-5875_en.htm
- European Food Safety Authority, Arcella, D., Eskola, M., & Gómez Ruiz, J. A. (2016). Dietary exposure assessment to Alternaria toxins in the European population. *EFSA Journal*, 14(12).
- Every, D., Motoi, L., Rao, S. P., Shorter, S. C., & Simmons, L. D. (2008). Predicting wheat quality—consequences of the ascorbic acid improver effect. *Journal of cereal science*, 48(2), 339-348.
- Ewart, J. A. D. (1990). Comments on recent hypotheses for glutenin. *Food Chemistry*, 38(3), 159-169.
- Faccio, G., Flander, L., Buchert, J., Saloheimo, M., & Nordlund, E. (2012). Sulfhydryl oxidase enhances the effects of ascorbic acid in wheat dough. *Journal of cereal science*, 55(1), 37-43.
- Fehr, M., Pahlke, G., Fritz, J., Christensen, M. O., Boege, F., Altemöller, M., ... & Marko, D. (2009). Alternariol acts as a topoisomerase poison, preferentially affecting the II α isoform. *Molecular nutrition & food research*, 53(4), 441-451.
- Fido, R. J., Bekes, F., Gras, P. W., & Tatham, A. S. (1997). Effects of α -, β -, γ - and ω -gliadins on the dough mixing properties of wheat flour. *Journal of Cereal Science*, 26(3), 271-277.
- Field, J. M., Shewry, P. R., & Mifflin, B. J. (1983). Solubilisation and characterisation of wheat gluten proteins: correlations between the amount of aggregated proteins and baking quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34(4), 370-377.
- Finney, K. F. (1948). Loaf volume and protein content of hard winter and spring wheat. *Cereal Chem.*, 25, 291-312.
- Finney, K. F. (1984). An optimized, straight-dough, bread-making method after 44 years [Wheat quality]. *Cereal Chemistry*.
- Finney, K. F., & Yamazaki, W. T. (1946). Water retention capacity as an index of the loaf volume potentialities and protein quality of hard red winter wheats. *Cereal Chemistry*, 23, 416-427.
- Fišteš, A. (2009). Prilog proučavanju mogućnosti racionalizacije tehnološkog postupka mlevenja pšenice primenom osmovaljne stolice. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, Srbija.

- Fišteš, A., Tanović, G. (2014). Praktikum iz tehnologije mlinarstva, Tehnoloski fakultet Novi Sad, Novi Sad.
- Foegeding, E. A., & Davis, J. P. (2011). Food protein functionality: a comprehensive approach. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1853-1864.
- Forgacs, J., & Carll, W. T. (1962). Mycotoxicoses. *Adv. Vet. Sci.*, 7.
- Freitas, R. A., Gorin, P. A. J., Neves, J., & Sierakowski, M. R. (2003). A rheological description of mixtures of a galactoxyloglucan with high amylose and waxy corn starches. *Carbohydrate polymers*, 51(1), 25-32.
- Fridman, A. (2008). *Plasma Chemistry*. Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9780511546075
- Gaines, C. S. (2000). Collaborative study of methods for solvent retention capacity profiles (AACC Method 56-11). *Cereal Foods World*, 45(7), 303-306.
- Gan, Z., Ellis, P. R., & Schofield, J. D. (1995). Gas cell stabilisation and gas retention in wheat bread dough. *Journal of Cereal Science*, 21(3), 215-230.
- Gaunt, L. F., Beggs, C. B., & Georghiou, G. E. (2006). Bactericidal action of the reactive species produced by gas-discharge nonthermal plasma at atmospheric pressure: a review. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 34(4), 1257-1269.
- Georget, D. M., & Belton, P. S. (2006). Effects of temperature and water content on the secondary structure of wheat gluten studied by FTIR spectroscopy. *Biomacromolecules*, 7(2), 469-475.
- Gianibelli, M. C., Larroque, O. R., MacRitchie, F., & Wrigley, C. W. (2001). Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits. *Cereal Chemistry*, 78(6), 635-646.
- Gil-Humanes, J., Pistón, F., Rosell, C. M., & Barro, F. (2012). Significant down-regulation of γ -gliadins has minor effect on gluten and starch properties of bread wheat. *Journal of cereal science*, 56(2), 161-170.
- Goesaert, H., Brijs, K., Veraverbeke, W. S., Courtin, C. M., Gebruers, K., & Delcour, J. A. (2005). Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in food science & technology*, 16(1-3), 12-30.
- Gomez, A., Ferrero, C., Calvelo, A., Anon, M. C., & Puppo, M. C. (2011). Effect of mixing time on structural and rheological properties of wheat flour dough for breadmaking. *International journal of food properties*, 14(3), 583-598.
- Gomez, M., Ronda, F., Caballero, P. A., Blanco, C. A., & Rosell, C. M. (2007). Functionality of different hydrocolloids on the quality and shelf-life of yellow layer cakes. *Food hydrocolloids*, 21(2), 167-173.
- Granato, D., Santos, J. S., Escher, G. B., Ferreira, B. L., & Maggio, R. M. (2018). Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. *Trends in Food Science & Technology*, 72, 83-90.
- Graves, D. B. (2012). The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 45(26), 263001.

- Graybosch, R.A., Peterson, C.J., Moore, K.J., Stearns, M., Grant, D.L. (1993). Comparative effects of wheat flour protein, lipid and pentosan composition in relation to baking and milling quality. *Cereal Chemistry*, 70, 95–101.
- Gruber-Dorninger, C., Novak, B., Nagl, V., & Berthiller, F. (2017). Emerging mycotoxins: Beyond traditionally determined food contaminants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(33), 7052-7070.
- Gulke, E. A. 1989. Solubility parameter values. Pages 519-533 in: Polymer Handbook, 3rd Ed. G. Brandrup and E. H. Immergut, eds. Wiley:New York.
- Guo, J., Huang, K., & Wang, J. (2015). Bactericidal effect of various non-thermal plasma agents and the influence of experimental conditions in microbial inactivation: A review. *Food Control*, 50, 482-490.
- Guttieri, M. J., Bowen, D., Gannon, D., O'Brien, K., & Souza, E. (2001). Solvent retention capacities of irrigated soft white spring wheat flours. *Crop science*, 41(4), 1054-1061.
- Guzmán, C., Posadas-Romano, G., Hernández-Espinosa, N., Morales-Dorantes, A., & Peña, R. J. (2015). A new standard water absorption criteria based on solvent retention capacity (SRC) to determine dough mixing properties, viscoelasticity, and bread-making quality. *Journal of cereal science*, 66, 59-65.
- Gyura, J; Šereš. Z., Šoronja-Simović, D., Pajin, B. (2016). Proizvodnja i primena prehrambenih vlakana. Tehnološki fakultet Novi Sad.
- Halász, A., Lásztity, R., Abonyi, T., & Bata, Á. (2009). Decontamination of Mycotoxin-Containing Food and Feed by Biodegradation. *Food Reviews International*, 25(4), 284–298.
- Hammed, A. M., Ozsisli, B., Ohm, J. B., & Simsek, S. (2015). Relationship between solvent retention capacity and protein molecular weight distribution, quality characteristics, and breadmaking functionality of hard red spring wheat flour. *Cereal Chemistry*, 92(5), 466-474.
- Haque, M.A., Bsmrau, G., Timilsena, B.Y.P., Adhikari, B. (2016). Food Proteins, Structure, and Function. *Reference Module in Food Science*. 1-9.
- Haris, P. I., & Severcan, F. (1999). FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 7(1-4), 207-221.
- Hasan, M. I., & Walsh, J. L. (2016). Numerical investigation of the spatiotemporal distribution of chemical species in an atmospheric surface barrier-discharge. *Journal of Applied Physics*, 119(20), 203302.
- Haynes, L. C., Bettge, A. D., & Slade, L. (2009). Soft wheat and flour products methods review: Solvent retention capacity equation correction. *Cereal Foods World*, 54(4), 174-175.
- Hayta, M., & Schofield, J. D. (2004). Heat and additive induced biochemical transitions in gluten from good and poor breadmaking quality wheats. *Journal of Cereal Science*, 40(3), 245-256.
- Heinio, R.-L. (2006). Sensory attributes of bakery products. In Y. H. Hui (Ed.), *Bakery products: science and technology*. Ames: Blackwell Publishing, pp. 285-298.

- Henry, R. J. (1985). A comparison of the non-starch carbohydrates in cereal grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(12), 1243-1253.
- Hildebrand, A. A., Kohn, B. N., Pfeiffer, E., Wefers, D., Metzler, M., & Bunzel, M. (2015). Conjugation of the mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in tobacco suspension cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(19), 4728-4736.
- Hipsley, E. H. (1953). Dietary „fibre“ and pregnancy toxemia. *British Medical Journal*, 2; 420.
- Hird, F. J. R., & Yates, J. R. (1961). The oxidation of protein thiol groups by iodate, bromate and persulphate. *Biochemical Journal*, 80(3), 612.
- Hofmann, K., Ham, R. (1978). Sulfhydryl and Disulfide Groups in Meats. Methods for the Determination of SH and SS Groups. In: *Advances in food research*, Volume 24, CO Chichester, EM Mrak, GF Stewart (Eds.), Academic Press, New York, 3-30.
- Hojnik, N., Cvelbar, U., Tavčar-Kalcher, G., Walsh, J., & Križaj, I. (2017). Mycotoxin Decontamination of Food: Cold Atmospheric Pressure Plasma versus “Classic” Decontamination. *Toxins*, 9(5), 151.
- Hojnik, N., Modic, M., Tavčar-Kalcher, G., Babič, J., Walsh, J. L., & Cvelbar, U. (2019). Mycotoxin Decontamination Efficacy of Atmospheric Pressure Air Plasma. *Toxins*, 11(4), 219.
- Horvat, D., Drezner, G., Magdić, D., Šimić, G., Dvojković, K., & Lukinac, J. (2009). Effect of an oxidizing improver on dough rheological properties and bread crumb structure in winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) with different gluten strength. *Romanian Agricultural Research*, 26, 35-40.
- Hoseney, R. C., Finney, K. F., Pomeranz, Y., & Shogren, M. D. (1969). Functional (breadmaking) and biochemical properties of wheat flour components. V. Role of total extractable lipids. *Cereal Chem*, 46(6), 606-613.
- Huen, J., Börsmann, J., Matullat, I., Böhm, L., Stukenborg, F., Heitmann, M., ... & Arendt, E. K. (2018). Wheat flour quality evaluation from the baker's perspective: comparative assessment of 18 analytical methods. *European Food Research and Technology*, 244(3), 535-545.
- Hussein, H. S., Brasel, J. M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167(2), 101-134.
- ICC. International Association for Cereal Science and Technology, International Association for Cereal Science and Technology, Vienna, Austria. Standard Methods 155, (1994).
- ICC. International Association for Cereal Science and Technology. Standard Methods 114/1, 115/1, (1992).
- Iuliana, B., Georgeta, S., Violeta, I., & Iuliana, A. (2010). Physicochemical and rheological analysis of flour mill streams. *Cereal chemistry*, 87(2), 112-117.
- Janić Hajnal, E., Čolović, R., Pezo, L., Orčić, D., Vukmirović, Đ., Mastilović, J. (2016b). Possibility of *Alternaria* toxins reduction by extrusion processing of whole wheat flour. *Food Chemistry*, 213, 784–790.
- Janić Hajnal, E., Mastilović, J., Bagi, F., Orčić, D., Budakov, D., Kos, J., & Savić, Z. (2019a). Effect of wheat milling process on the distribution of *Alternaria* toxins. *Toxins*, 11(3), 139.

- Janić Hajnal, E., Orčić, D., Torbica, A., Kos, J., Mastilović, J., & Škrinjar, M. (2015). *Alternaria* toxins in wheat from the Autonomous Province of Vojvodina, Serbia: a preliminary survey. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(3), 361-370.
- Janić Hajnal, E., Pezo, L., Orčić, D., Šarić, L., Plavšić, D., Kos, J., & Mastilović, J. (2020). Preliminary Survey of *Alternaria* Toxins Reduction during Fermentation of Whole Wheat Dough. *Microorganisms*, 8(2), 303.
- Janić Hajnal, E., Vukić, M., Pezo, L., Orčić, D., Puač, N., Škoro, N., ... & Šoronja Simović, D. (2019c). Effect of Atmospheric Cold Plasma Treatments on Reduction of *Alternaria* Toxins Content in Wheat Flour. *Toxins*, 11(12), 704.
- Janić-Hajnal, E. P., Kos, J. J., & Orčić, D. Z. (2019b). Stability of *Alternaria* toxins during bread-making process. *Food and Feed Research*, 46(1), 73-81.
- Janić-Hajnal, E., Belović, M., Plavšić, D., Mastilović, J., Bagi, F., Budakov, D., Kos, J. (2016a). Visual, instrumental, mycological and mycotoxicological characterization of wheat inoculated with and protected against *Alternaria* spp. *Hemijska industrija*, 70 (3), 257–264.
- Janković, M. (2016). Proteinski profili pšenice i njihov uticaj na tehnološka svojstva brašna. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Jestoi, M. (2008). Emerging Fusarium-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin—A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(1), 21-49.
- Johansson, E., Ali Hafeez, M., Hussain, A., Rasheed, F., Newson, W. R., Plivelic, T., Hedenqvist, M. S., Gällstedt, M., Kuktaite, R. (2013). Wheat gluten polymer structures: the impact of genotype, environment, and processing on their functionality in various applications. *Cereal Chemistry*, 90(4), 367–376.
- Joint, F. A. O., & WHO Expert Committee on Food Additives. (2005). Steviol glycosides. In 63rd Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland, WHO Technical Report Series (Vol. 928, pp. 34-39).
- Junqueira, R. M., Castro, I. A., Areas, J. A. G., Silva, A. C. C., Scholz, M. B. S., Mendes, S., & Oliveira, K. C. (2007). Application of response surface methodology for the optimization of oxidants in wheat flour. *Food Chemistry*, 101(1), 131-139.
- Kaluđerski, G., & Filipović, N. (1998). Laboratorijsko mlevenje pšenice Metode ispitivanja kvaliteta žita, brašna i gotovih proizvoda (pp. 62–70). *Novi Sad, SRJ Jugoslavija: Tehnološki fakultet u Novom Sadu, SRJ Jugoslavija, Zavod za tehnologiju žita i brašna*.
- Karim, A.A., Norziah, M.H., Seow, C.C. (2000). Methods for the study of starch retrogradation— A review. *Food Chemistry*, 71, 9–36.
- Kaur Chandi, G., Seetharaman, K. (2012). Optimization of gluten peak tester: A statistical approach. *Journal of Food Quality*, 35, 69–75.
- Kayes, M. M., Critzer, F. J., Kelly-Wintenberg, K., Roth, J. R., Montie, T. C., & Golden, D. A. (2007). Inactivation of Foodborne Pathogens Using A One Atmosphere Uniform Glow Discharge Plasma. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4(1), 50–59.
- Ke, Z., Huang, Q., Dang, B., Lu, Y., Yuan, H., Zhang, S., & Yu, Z. (2010). A study of low-energy ion induced radiolysis of thiol-containing amino acid cysteine in the solid and

- aqueous solution states. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 268(17-18), 2729-2734.
- Ke, Z., Yu, Z., & Huang, Q. (2013). Assessment of damage of glutathione by glow discharge plasma at the gas–solution interface through Raman spectroscopy. *Plasma processes and polymers*, 10(2), 181-188.
- Khatkar, B. S., Fido, R. J., Tatham, A. S., & Schofield, J. D. (2002). Functional properties of wheat gliadins. I. Effects on mixing characteristics and bread making quality. *Journal of Cereal Science*, 35(3), 299-306.
- Khatkar, B.S., Bell, A.E., Schofield, J.D. (1995). The dynamic rheological properties of glutens and gluten sub-fractions from wheats of good and poor bread making quality. *Journal of Cereal Science*, 22, 29–44.
- Khayet, M., Cojocar, C., & Zakrzewska-Trznadel, G. (2008). Response surface modelling and optimization in pervaporation. *Journal of Membrane Science*, 321(2), 272-283.
- Khuri, A. I., & Mukhopadhyay, S. (2010). Response surface methodology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2(2), 128–149.
- Kirchhoff, E., and Schieberle, P. (2001): Determination of key aroma compounds in the crumb of a three-stage sourdough rye bread by stable isotope dilution assays and sensory studies. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49: 4304-4311.
- Klaffke, H. (2010). Biotoxine und herstellungsbedingte Kontaminanten. In: *Handbuch für Lebensmittelchemiker* (Frede, W., eds.), pp.449-489, Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Kodama, S., Thawatchaipracha, B., & Sekiguchi, H. (2014). Enhancement of essential oil extraction for steam distillation by DBD surface treatment. *Plasma Processes and Polymers*, 11(2), 126-132.
- Kogelschatz, U. (2007). Applications of microplasmas and microreactor technology. *Contributions to Plasma Physics*, 47(1-2), 80-88.
- Kogelschatz, U., & Eliasson, B. (2000, September). Fundamentals and applications of dielectric barrier discharges. In *HAKONE VII Int. Symp. On High Pressure Low Temperature Plasma Chemistry*, Greifswald.
- Kong, J., & Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 39(8), 549-559.
- Kong, X., Kasapis, S., Bao, J., & Corke, H. (2009). Effect of gamma irradiation on the thermal and rheological properties of grain amaranth starch. *Radiation Physics and Chemistry*, 78(11), 954-960.
- Krull, L. H., & Wall, J. S. (1969). Relationship of amino acid composition and wheat protein properties. *Bakers digest*.
- Ktenioudaki, A., Butler, F., & Gallagher, E. (2011). Dough characteristics of Irish wheat varieties II. Aeration profile and baking quality. *LWT – Food Science and Technology*, 44(3), 602–610.
- Kuktaite, R. (2004): Protein quality in wheat: changes in protein polymer composition during grain development and dough processing. In Crop Science Department. Alnarp: Swedish University of Agricultural Science.

- Kweon, M., Louise, S., & Harry, L. (2009a). Oxidative Gelation of Solvent-Accessible Arabinoxylans is the Predominant Consequence of Extensive Chlorination of Soft Wheat Flour. *Cereal Chemistry*, 86(4), 421-424.
- Kweon, M., Slade, L., & Levine, H. (2011). Solvent retention capacity (SRC) testing of wheat flour: Principles and value in predicting flour functionality in different wheat-based food processes and in wheat breeding—A review. *Cereal Chemistry*, 88(6), 537-552.
- Kweon, M., Slade, L., Levine, H., Martin, R., Andrews, L., & Souza, E. (2009b). Effects of extent of chlorination, extraction rate, and particle size reduction on flour and gluten functionality explored by solvent retention capacity (SRC) and mixograph. *Cereal chemistry*, 86(2), 221-224.
- Lachenbruch, P. A., & Mickey, M. R. (1968). Estimation of error rates in discriminant analysis. *Technometrics*, 10(1), 1-11.
- Lackmann, J. W., Baldus, S., Steinborn, E., Edengeiser, E., Kogelheide, F., Langklotz, S., ... & Bandow, J. E. (2015). A dielectric barrier discharge terminally inactivates RNase A by oxidizing sulfur-containing amino acids and breaking structural disulfide bonds. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 48(49), 494003.
- Lackmann, J. W., Schneider, S., Edengeiser, E., Jarzina, F., Brinckmann, S., Steinborn, E., ... & Bandow, J. E. (2013). Photons and particles emitted from cold atmospheric-pressure plasma inactivate bacteria and biomolecules independently and synergistically. *Journal of The Royal Society Interface*, 10(89), 20130591.
- Langmuir, I. (1928). Oscillations in ionized gases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 14(8), 627-637.
- Lavelli, V., Guerrieri, N., & Cerletti, P. (1996). Controlled reduction study of modifications induced by gradual heating in gluten proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2549-2555.
- Lee, K., Paek, K. H., Ju, W. T., & Lee, Y. (2006). Sterilization of bacteria, yeast, and bacterial endospores by atmospheric-pressure cold plasma using helium and oxygen. *The Journal of Microbiology*, 44(3), 269-275.
- Li, H. P., Wang, L. Y., Li, G., Jin, L. H., Le, P. S., Zhao, H. X., ... & Bao, C. Y. (2011). Manipulation of Lipase Activity by the Helium Radio-Frequency, Atmospheric-Pressure Glow Discharge Plasma Jet. *Plasma Processes and Polymers*, 8(3), 224-229.
- Li, W. L., Tsiami, A. A., & Schofield, J. D. (2000). Redox reactions during dough mixing and dough resting: Effect of reduced and oxidised glutathione and l-ascorbic acid on rheological properties of gluten. *SPECIAL PUBLICATION-ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY*, 261, 239-243.
- Liao, Y., Miller, R. A., & Hoseney, R. C. (1998). Role of hydrogen peroxide produced by baker's yeast on dough rheology. *Cereal chemistry*, 75(5), 612-616.
- Lindgren, A., & Simsek, S. (2016). Evaluation of hard red spring wheat mill stream fractions using solvent retention capacity test. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(2), 131-139.
- Lindsay, M. P., & Skerritt, J. H. (1999). The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: structure–function perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 10(8), 247-253.

- Lineback, D. R., & Rasper, V. F. (1988). Pages 277-372 in: Wheat: Chemistry and Technology. Vol. IY Pomeranz, ed. *Am. Assoc. Cereal Chem.: St. Paul, MN*.
- Lukić, J. (2018). Retencijska sposobnost brašna corti pšenice roda 2017. godine. Diplomski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilište J. J. Strossmayer u Osijeku.
- MacRitchie, F. (1983). Role of lipids in baking. In 'Lipids in Cereal Technology'. *PJ Barnes, (Ed.)*, 165.
- MacRitchie, F. (1987). Evaluation of contributions from wheat protein fractions to dough mixing and breadmaking. *Journal of Cereal Science*, 6(3), 259-268.
- MacRitchie, F. (1992). Physicochemical properties of wheat proteins in relation to functionality. In *Advances in food and nutrition research* (Vol. 36, pp. 1-87). Academic Press.
- MacRitchie, F., Kasarda, D. D., & Kuzmicky, D. D. (1991). Characterization of wheat protein fractions differing in contributions to breadmaking quality.
- Madamba, P. S. (2002). The Response Surface Methodology: An Application to optimize dehydration operations of selected agricultural crops. *LWT-Food Science and Technology*, 35(7), 584-592.
- Magan, N., Aldred, D. (2007). Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1), 131-139.
- Maletić, D., Puač, N., Malović, G., Đorđević, A., & Petrović, Z. L. (2017). The influence of electrode configuration on light emission profiles and electrical characteristics of an atmospheric-pressure plasma jet. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 50(14), 145202.
- Mangavel, C., Barbot, J., Popineau, Y., & Guéguen, J. (2001). Evolution of wheat gliadins conformation during film formation: A Fourier transform infrared study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(2), 867-872.
- Mares, D. J., & Stone, B. A. (1973). Studies on wheat endosperm I. Chemical composition and ultrastructure of the cell walls. *Australian Journal of Biological Sciences*, 26(4), 793-812.
- Martens, H. (2001). Reliable and relevant modelling of real world data: a personal account of the development of PLS regression. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 58(2), 85-95.
- Mastilović, J., Kevrešan, Ž., Vukić, M., Ivanović, M., Radovanović, J., & Džinić, D. (2018). Possibilities for utilization of dietary fiber rich supplement from pepper (*Capsicum annum* L.) processing waste in bakery products. *Journal of Engineering & Processing Management*, 10(1), 28-33.
- Melas, V., Morel, M. H., Autran, J. C., & Feillet, P. I. E. R. R. E. (1994). Simple and rapid method for purifying low molecular weight subunits of glutenin from wheat. *Cereal Chemistry*, 71(3), 234-237.
- Melnyk, J.P., Dreisoerner, J., Marcone, M.F., Seetharaman, K. (2012). Using the Gluten Peak Tester as a tool to measure physical properties of gluten. *Journal of Cereal Science*, 56, 561–567.
- Mirsaeedghazi, H., Emam-Djomeh, Z., Mousavi, S.M.A. (2008). Rheometric measurement of dough rheological characteristics and factors affecting it. *International Journal of Agriculture and Biology*, 10 (1), 112–119.

- Misra, N. N. (2015b). The contribution of non-thermal and advanced oxidation technologies towards dissipation of pesticide residues. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 229–244.
- Misra, N. N., Kaur, S., Tiwari, B. K., Kaur, A., Singh, N., & Cullen, P. J. (2015a). Atmospheric pressure cold plasma (ACP) treatment of wheat flour. *Food Hydrocolloids*, 44, 115–121.
- Misra, N. N., Schlüter, O., & Cullen, P. J. (Eds.). (2016). *Cold plasma in food and agriculture: fundamentals and applications*. Academic Press.
- Misra, N. N., Sullivan, C., Pankaj, S. K., Alvarez-Jubete, L., Cama, R., Jacoby, F., & Cullen, P. J. (2014). Enhancement of oil spreadability of biscuit surface by nonthermal barrier discharge plasma. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 26, 456-461.
- Misra, N. N., Tiwari, B. K., Raghavarao, K. S. M. S., & Cullen, P. J. (2011). Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens. *Food Engineering Reviews*, 3(3-4), 159-170.
- Misra, N. N., Yadav, B., Roopesh, M. S., & Jo, C. (2019). Cold Plasma for Effective Fungal and Mycotoxin Control in Foods: Mechanisms, Inactivation Effects, and Applications: Cold plasma for effective fungal.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(1), 106–120.
- Moiseev, T., Misra, N. N., Patil, S., Cullen, P. J., Bourke, P., Keener, K. M., & Mosnier, J. P. (2014). Post-discharge gas composition of a large-gap DBD in humid air by UV–Vis absorption spectroscopy. *Plasma Sources Science and Technology*, 23(6), 065033.
- Mondal, A., and Datta, A.K. (2008): Bread baking-A review. *Journal of Food Engineering* 86: 465-74.
- Montgomery, D. C. (1984). *Design and Analysis of Experiments*, 2nd ed., John Wiley and Sons Inc., New York, USA.
- Morel, M. H., Redl, A., Guilbert, S. (2002). Mechanism of Heat and Shear Mediated Aggregation of Wheat Gluten Protein upon Mixing. *Biomacromolecules*, 3, 488-497.
- Morrison, W.R. (1988). Lipids in cereal starches: A review. *Journal of Cereal Science*, 8, 1–15.
- Motrescu, I., Ogino, A., Tanaka, S., Fujiwara, T., Kodani, S., Kawagishi, H., ... & Nagatsu, M. (2011). Mechanism of peptide modification by low-temperature microwave plasma. *Soft Matter*, 7(10), 4845-4850.
- Müller, M. E. H., & Korn, U. (2013). Alternaria mycotoxins in wheat – A 10 years survey in the Northeast of Germany. *Food Control*, 34(1), 191–197.
- Murata, H., Mitsumatsu, M., & Shimada, N. (2008). Reduction of feed-contaminating mycotoxins by ultraviolet irradiation: an *in vitro* study. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25(9), 1107–1110.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. John Wiley & Sons.
- Nawrocka, A., Krekora, M., Niewiadomski, Z., & Miś, A. (2018). FTIR studies of gluten matrix dehydration after fibre polysaccharide addition. *Food chemistry*, 252, 198-206.

- Nelson, P.N., McDonald, C.E. (1977). Properties of wheat flour protein in flour from selected mill streams, *Cereal Chemistry*, 54, 1182-1191.
- Ng, A. Y. (1997, July). Preventing " overfitting" of cross-validation data. In *ICML* (Vol. 97, pp. 245-253).
- Niemira, B. A. (2012). Cold Plasma Decontamination of Foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 125–142.
- Niemira, B. A., & Sites, J. (2008). Cold plasma inactivates Salmonella Stanley and Escherichia coli O157: H7 inoculated on golden delicious apples. *Journal of Food Protection*, 71(7), 1357-1365.
- Olszewski, P., Li, J. F., Liu, D. X., & Walsh, J. L. (2014). Optimizing the electrical excitation of an atmospheric pressure plasma advanced oxidation process. *Journal of Hazardous Materials*, 279, 60–66.
- Onyango, C., Mutungi, C., Unbehend, G., & Lindhauer, M. G. (2010). Rheological and baking characteristics of batter and bread prepared from pregelatinised cassava starch and sorghum and modified using microbial transglutaminase. *Journal of Food Engineering*, 97(4), 465-470.
- Ostry, V. (2008). Alternaria mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal*, 1(2), 175-188.
- Pankaj, S. K., Bueno-Ferrer, C., Misra, N. N., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2014a). Zein film: effects of dielectric barrier discharge atmospheric cold plasma. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(18).
- Pankaj, S. K., Bueno-Ferrer, C., Misra, N. N., Milosavljević, V., O'donnell, C. P., Bourke, P., ... & Cullen, P. J. (2014b). Applications of cold plasma technology in food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 35(1), 5-17.
- Pankaj, S. K., Bueno-Ferrer, C., Misra, N. N., Milosavljević, V., O'donnell, C. P., Bourke, P., ... & Cullen, P. J. (2014c). Applications of cold plasma technology in food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 35(1), 5-17.
- Pankaj, S. K., Bueno-Ferrer, C., Misra, N. N., O'Neill, L., Jiménez, A., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2014d). Characterization of polylactic acid films for food packaging as affected by dielectric barrier discharge atmospheric plasma. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 21, 107-113.
- Pankaj, S. K., Bueno-Ferrer, C., Misra, N. N., O'Neill, L., Tiwari, B. K., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2014e). Physicochemical characterization of plasma-treated sodium caseinate film. *Food research international*, 66, 438-444.
- Pankaj, S. K., Bueno-Ferrer, C., Misra, N. N., O'Neill, L., Tiwari, B. K., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2015). Dielectric barrier discharge atmospheric air plasma treatment of high amylose corn starch films. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), 1076-1082.
- Pankaj, S. K., Misra, N. N., & Cullen, P. J. (2013). Kinetics of tomato peroxidase inactivation by atmospheric pressure cold plasma based on dielectric barrier discharge. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 153-157.

- Pareyt, B., Bruneel, C., Brijs, K., Goesaert, H., & Delcour, J. A. (2009). Flour sodium dodecyl sulfate (SDS)-extractable protein level as a cookie flour quality indicator. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(1), 353-360.
- Pareyt, B., Finnie, S.M., Putseys, J.A., Delcour, J.A. (2011). Lipids in bread making: Sources, interactions, and impact on bread quality. *Journal of Cereal Science*, 54, 266–279.
- Park, B. J., Takatori, K., Sugita-Konishi, Y., Kim, I.-H., Lee, M.-H., Han, D.-W., ... Park, J.-C. (2007). Degradation of mycotoxins using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. *Surface and Coatings Technology*, 201(9–11), 5733–5737.
- Park, D. L., Lee, L. S., Price, R. L., & Pohland, A. E. (1988). Review of the decontamination of aflatoxins by ammoniation: current status and regulation. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 71(4), 685–703.
- Parker, R., & Ring, S. G. (2001). Aspects of the physical chemistry of starch. *Journal of Cereal Science*, 34(1), 1-17.
- Pârvulescu, V. I., Magureanu, M., & Lukes, P. (Eds.). (2012). *Plasma chemistry and catalysis in gases and liquids*. John Wiley & Sons.
- Payne, P. I. (1987). Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality. *Annual Review of Plant Physiology*, 38(1), 141-153.
- Peña, R. J. (2002). Wheat for bread and other foods. Bread wheat improvement and production. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 483-542.
- Pence, J. W., Weinstein, N. E., & Mecham, D. K. (1954). The albumin and globulin contents of wheat flour and their relationship to protein quality. *Cereal Chemistry*, 31, 303-311.
- Pérez, G., Bonet, A., & Rosell, C. M. (2005). Relationship between gluten degradation by *Aelia* spp and *Eurygaster* spp and protein structure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(7), 1125-1130.
- Perni, S., Shama, G., Hobman, J. L., Lund, P. A., Kershaw, C. J., Hidalgo-Arroyo, G. A., ... & Kong, M. G. (2007). Probing bactericidal mechanisms induced by cold atmospheric plasmas with *Escherichia coli* mutants. *Applied Physics Letters*, 90(7), 073902.
- Pero, R. W., Posner, H., Blois, M., Harvan, D., & Spalding, J. W. (1973). Toxicity of metabolites produced by the " *Alternaria*". *Environmental Health Perspectives*, 4, 87-94.
- Pestorić, M., Pojić, M., Mastilović, J., Šimurina, O., Tasić, T., Živančev, D., & Šoronja Simović, D. (2008). Sensory evaluation of traditional bread in Vojvodina. *Food Processing Quality and Safety*, 35, 99–112.
- Petronijević, Ž. (2000). Opšta i primenjena enzimologija. *Tehnološki fakultet, Leskovac*.
- Pike, P. R., & MacRitchie, F. (2004). Protein composition and quality of some new hard white winter wheats. *Crop science*, 44(1), 173-176.
- Pinto, E. V. F., & Patriarca, A. (2017). Mycotoxigenic Fungi. In A. Moretti & A. Susca (Eds.), *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols*.
- Pirozi, M. R., Margiotta, B., Lafiandra, D., & MacRitchie, F. (2008). Composition of polymeric proteins and bread-making quality of wheat lines with allelic HMW-GS differing in number of cysteines. *Journal of Cereal Science*, 48(1), 117–122.

- Pitt, J. I., & Miller, J. D. (2017). A concise history of mycotoxin research. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(33), 7021-7033.
- Pomeranz, Y. (1988). Wheat: chemistry and technology. *AACC monograph series (USA)*.
- Popineau, Y., Bonenfant, S., Cornec, M., & Pezolet, M. (1994). A study by infrared spectroscopy of the conformations of gluten proteins differing in their gliadin and glutenin compositions. *Journal of Cereal Science*, 20(1), 15-22.
- Popper L., Schäfer W. (2006). Flour Treatmentb and the Improvement. In L. Popper, W. Schäfer , W. Freund (Eds.) *Future of Flour*. AgriMedia Bergen, Germany.
- Portman, D., Blanchard, C., Maharjan, P., McDonald, L. S., Mawson, J., Naiker, M., & Panozzo, J. F. (2018). Blending studies using wheat and lentil cotyledon flour— Effects on rheology and bread quality. *Cereal Chemistry*, 95(6), 849-860.
- Pose, G., Patriarca, A., Kyanko, V., Pardo, A., & Pinto, V. F. (2010). Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. *International Journal of Food Microbiology*, 142(3), 348-353.
- Prabhasankar, P., Haridas Rao, P. (1999). Lipids in wheat flour streams, *Journal of Cereal Science*, 30, 315-322.
- Prabhasankar, P., Sudha, M.L., Haridas Rao, P. (2000a). Quality characteristics of wheat flour milled streams, *Food Research International*, 33, 381-386.
- Prabhasankar, P., Vijaya Kumar, M., Lokesh, B.R., Haridas Rao, P. (2000b). Distribution of free lipids and their fractions in wheat flour milled streams, *Food Chemistry*, 71, 97-103.
- Prelusky, D. B., Rotter, B. A., Rotter, R. G. (1993). Toxicology of mycotoxins. In: *Mycotoxins in grains, compounds other than aflatoxin*. (Miller, J. D., Trenholm, H. L., eds.) pp. 359-404, Eagan Press, St.Paul, Minnesota, USA.
- Puač, N., Gherardi, M., & Shiratani, M. (2018). Plasma agriculture: A rapidly emerging field. *Plasma Processes and Polymers*, 15(2), 1700174.
- Rakita, S. (2017). Evaluacija kvaliteta pšeničnih sorti sa teritorije Vojvodine procenom reoloških karakteristika testa. Doktorska disertacija, Univerzitet Novi Sad, Tehnološki fakultet Novi Sad,
- Ram, S., Dawar, V., Singh, R. P., & Shoran, J. (2005). Application of solvent retention capacity tests for the prediction of mixing properties of wheat flour. *Journal of Cereal Science*, 42(2), 261-266.
- Rani, K.U., Prasada Rao, U.J.S., Leelavathi, K., Haridas Rao, P. (2001). Distribution of enzymes in wheat flour mill streams, *Journal of Cereal Science*, 34, 233-242.
- Rao, V. K., Mulvaney, S. J., & Dexter, J. E. (2000). Rheological characterisation of long-and short-mixing flours based on stress–relaxation. *Journal of Cereal Science*, 31(2), 159-171.
- Rychlik, M., Humpf, H. U., Marko, D., Dänicke, S., Mally, A., Berthiller, F., ... & Lorenz, N. (2014). Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including “masked” mycotoxins. *Mycotoxin research*, 30(4), 197-205.
- Safonova, O. N., Kholodova, E. A., & Golota, V. I. (2011, May). Ozone usage for adjustment of technological properties of wheat baking flour. In *11th International Congress on Engineering and Food. Athens. Greece* (pp. 1-6).

- Sakhare, S. D., & Inamdar, A. A. (2014). The cumulative ash curve: a best tool to evaluate complete mill performance. *Journal of food science and technology*, 51(4), 795-799.
- Sanchis, V., Magan, N. (2004). Environmental profiles for growth and mycotoxin production. In *Mycotoxins in food: detection and control* (Magan, N., Olsen, M., eds.), pp. 174-189, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, U.K.
- Sarangapani, C., O'Toole, G., Cullen, P. J., & Bourke, P. (2017). Atmospheric cold plasma dissipation efficiency of agrochemicals on blueberries. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 44, 235–241.
- Sarangapani, C., Ziuzina, D., Behan, P., Boehm, D., Gilmore, B. F., Cullen, P. J., & Bourke, P. (2019). Degradation kinetics of cold plasma-treated antibiotics and their antimicrobial activity. *Scientific Reports*, 9(1).
- Scanlon, M. G., & Zghal, M. C. (2001). Bread properties and crumb structure. *Food Research International*, 34(10), 841-864.
- Schropp, P., & Wieser, H. (1996). Effects of high molecular weight subunits of glutenin on the rheological properties of wheat gluten. *Cereal chemistry (USA)*.
- Scott, P. M., Zhao, W., Feng, S., & Lau, B. P.-Y. (2012). Alternaria toxins alternariol and alternariol monomethyl ether in grain foods in Canada. *Mycotoxin Research*, 28(4), 261–266.
- Sears, J. K., & Darby, J. R. (1982). Mechanism of plasticizer action. *The Technology of Plasticizers*, 35-77.
- Sears, J. K., and Darby, J. R. 1982. Solubility parameter and cohesive energy density. Page 105 in: *The Technology of Plasticizers*. J. K. Sears and J. R. Darby, eds. Wiley: New York.
- Sedlak, J., & Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*, 25, 192-205.
- Segat, A., Misra, N. N., Cullen, P. J., & Innocente, N. (2015). Atmospheric pressure cold plasma (ACP) treatment of whey protein isolate model solution. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 29, 247-254.
- Selcuk, M., Oksuz, L., & Basaran, P. (2008). Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment. *Bioresource technology*, 99(11), 5104-5109.
- Shanakhat, H., Sorrentino, A., Raiola, A., Reverberi, M., Salustri, M., Masi, P., & Cavella, S. (2019). Technological properties of durum wheat semolina treated by heating and UV irradiation for reduction of mycotoxin content. *Journal of Food Process Engineering*, 42(3), e13006.
- Shewry, P. R., & Halford, N. G. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of experimental botany*, 53(370), 947-958.
- Shewry, P. R., & Lookhart, G. L. (2003). *Wheat gluten protein analysis*. American Association of Cereal Chemists.
- Shewry, P. R., & Tatham, A. S. (1997). Disulphide bonds in wheat gluten proteins. *Journal of Cereal Science*, 25(3), 207-227.
- Shewry, P. R., Halford, N. G., & Tatham, A. S. (1992). High molecular weight subunits of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science*, 15(2), 105-120.

- Shewry, P. R., Popineau, Y., Lafiandra, D., & Belton, P. (2000). Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EUROWHEAT project. *Trends in Food Science & Technology*, 11(12), 433-441.
- Shewry, P. R., Tatham, A. S., Forde, J., Kreis, M., & Miflin, B. J. (1986). The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment. *Journal of Cereal Science*, 4(2), 97-106.
- Shi, H., Ilejic, K., Stroshine, R. L., Keener, K., & Jensen, J. L. (2017). Reduction of Aflatoxin in Corn by High Voltage Atmospheric Cold Plasma. *Food and Bioprocess Technology*, 10(6), 1042–1052.
- Shomer, I., Lookhart, G. L., Vasiliver, R., & Bean, S. (1998). Ultrastructure of consecutively extracted and flocculated gliadins and glutenins. *Journal of cereal science*, 27(1), 27-36.
- Shwab, E. K., Keller, N. P. (2008). Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycological Research*, 112(2), 225-230.
- Siciliano, I., Spadaro, D., Prella, A., Vallauri, D., Cavallero, M., Garibaldi, A., & Gullino, M. (2016). Use of Cold Atmospheric Plasma to Detoxify Hazelnuts from Aflatoxins. *Toxins*, 8(5), 125.
- Siegel, D., Feist, M., Proske, M., Koch, M., & Nehls, I. (2010). Degradation of the *Alternaria* mycotoxins alternariol, alternariol monomethyl ether, and altenuene upon bread baking. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(17), 9622-9630.
- Singh, J., & Skerritt, J. H. (2001). Chromosomal control of albumins and globulins in wheat grain assessed using different fractionation procedures. *Journal of Cereal Science*, 33(2), 163-181.
- Skerritt, J. H., Hac, L., & Bekes, F. (1999). Depolymerization of the glutenin macropolymer during dough mixing: I. Changes in levels, molecular weight distribution, and overall composition. *Cereal Chemistry*, 76(3), 395-401.
- Slade, L., & Levine, H. (1994). Structure-function relationships of cookie and cracker ingredients. In H. Faridi (Ed.), *The science of cookie and cracker production* (pp. 23e141). New York, NY, USA: Chapman & Hall.
- Službeni glasnik (2018). Pravilnik o kvalitetu žita, mlinskih i pekarskih proizvoda i testenina. *Правилнику о квалитету жита, млинских и пекарских производа и тестенина*, 68/2016, 56/2018.
- Službeni list SFRJ. (1988). Pravilnik o metodama fizičkih i hemijskih analiza za kontrolu kvaliteta žita, mlinskih i pekarskih proizvoda, testenina i brzo smrznutih testa, 74.
- Smith, T. K., & Girish, C. K. (2012). Prevention and control of animal feed contamination by mycotoxins and reduction of their adverse effects in livestock. In *Animal Feed Contamination* (pp. 326–351).
- Sokol, H. A., Mecham, D. K., & Pence, J. W. (1960). Sulfhydryl losses during mixing of doughs: Comparison of flours having various mixing characteristics. *Cereal Chem*, 37, 739-748.
- Song, Y., & Zheng, Q. (2007). Dynamic rheological properties of wheat flour dough and proteins. *Trends in food science & technology*, 18(3), 132-138.
- Soukup, S. T., Kohn, B. N., Pfeiffer, E., Geisen, R., Metzler, M., Bunzel, M., & Kulling, S. E. (2016). Sulfoglucosides as novel modified forms of the mycotoxins alternariol and

- alternariol monomethyl ether. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(46), 8892-8901.
- Spies, R. (1990). Application of rheology in the bread industry. In H. F. Faridi, J.M. (Ed.), *Dough Rheology and Baked Product Texture* (pp. 343–361). New York, USA: Van Nostrand Reinhold.
- St, L., & Wold, S. (1990). Multivariate analysis of variance (MANOVA). *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 9(2), 127-141.
- Stauffer, C. E. (1990a). Oxidants. Functional additives for bakery foods (pp. 1–39). New York: Van Nostrand Reinhold
- Stauffer, C. E. (1999b). Principles of dough formation. In *Technology of breadmaking* (pp. 262-295). Springer, Boston, MA.
- Stauffer, C. E. (2007). Principles of dough formation. In *Technology of breadmaking* (pp. 299-332). Springer, Boston, MA.
- Steffolani, M. E., Ribotta, P. D., Pérez, G. T., & León, A. E. (2010). Effect of glucose oxidase, transglutaminase, and pentosanase on wheat proteins: Relationship with dough properties and bread-making quality. *Journal of Cereal Science*, 51(3), 366-373.
- Sudha, M. L., Baskaran, V.; Leelavathi, K., (2007). Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making. *Food Chemistry*, 104(2): 686-692
- Sullivan, P., O’Flaherty, J., Brunton, N., Arend,t E., Gallagher, G. (2011). The utilisation of barley middlings to add value and health benefits to white breads. *Journal of Food Engineering*, 105, 493–502.
- Surowsky, B., Fischer, A., Schlueter, O., & Knorr, D. (2013). Cold plasma effects on enzyme activity in a model food system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 146-152.
- Šimurina, O., Mastilović, J., Milošević, S., & Filipčev, B. (2006). Tehnološki aspekti delovanja pojedinih aditiva i enzima na kvalitete hleba u zavisnosti od kvaliteta brašna. *Žito hleb*, 33, 61-68.
- Šporin, M. (2019). Izboljšanje prehranske vrednosti in trajnosti kruha z dodatkom grozdnih tropin in oljčne pogače. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.
- Takai, E., Kitamura, T., Kuwabara, J., Ikawa, S., Yoshizawa, S., Shiraki, K., ... & Kitano, K. (2014). Chemical modification of amino acids by atmospheric-pressure cold plasma in aqueous solution. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 47(28), 285403.
- Takasaki, S., Kato, Y., Murata, M., Homma, S., & Kawakishi, S. (2005). Effects of peroxidase and hydrogen peroxide on the dityrosine formation and the mixing characteristics of wheat-flour dough. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69(9), 1686-1692.
- Tanović, G. (1980). Zavisnost efekata krupljenja od međusobnog usklađivanja žlebova valjaka i strukturno-mehaničkih osobina pšenice, Magistarski rad, Novi Sad.
- Tanović, G. (1986). Prilog proučavanju parametara usitnjavanja pri krupljenju domaće pšenice, Doktorska disertacija, Novi Sad.

- Tappi, S., Berardinelli, A., Ragni, L., Dalla Rosa, M., Guarnieri, A., & Rocculi, P. (2014). Atmospheric gas plasma treatment of fresh-cut apples. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 21, 114-122.
- Tebben L., Shen Y., Li Y. (2018). Improvers and functional ingredients in whole wheat bread: A review of their effects on dough properties and bread quality. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 10–24
- ten Bosch, L., Pfohl, K., Avramidis, G., Wieneke, S., Viöl, W., & Karlovsky, P. (2017). Plasma-Based Degradation of Mycotoxins Produced by Fusarium, Aspergillus and Alternaria Species. *Toxins*, 9(3), 97.
- Thirumdas, R., Kadam, D., & Annature, U. S. (2017). Cold plasma: an alternative technology for the starch modification. *Food Biophysics*, 12(1), 129-139.
- Tolouie, H., Mohammadifar, M. A., Ghomi, H., & Hashemi, M. (2017). Cold atmospheric plasma manipulation of proteins in food systems. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1-15.
- Tomić, J., Torbica, A., Popović, L., Strelec, I., Vaštag, Ž., Pojić, M., & Rakita, S. (2015). Albumins characterization in relation to rheological properties and enzymatic activity of wheat flour dough. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17(4), 805-816.
- Torbica, A. (2007). Doktorska disertacija: Karakteristike glutensko-glijadinskog kompleksa zrna kao pokazatelj tehnološkog kvaliteta pšenice. Novi Sad Tehnološki fakulte Novi Sad.
- Toufeili, I., Ismail, B., Shadarevian, S., Baalbaki, R., Khatkar, B.S., Bell, A.E., Schofield, J.D. (1999). The role of gluten proteins in the baking of Arabic bread. *Journal of Cereal Science*, 30, 255–265.
- Toyosaki, T. (2007). Effects of hydroperoxide in lipid peroxidation on dough fermentation. *Food chemistry*, 104(2), 680-685.
- Tsen, C. C., & Hlynka, I. (1963). Flour lipids and oxidation of sulfhydryl groups in dough. *Cereal Chem*, 40(2), 145.
- Turner, M. (2016). Physics of Cold Plasma. In *Cold Plasma in Food and Agriculture* (pp. 17–51).
- Uthayakumaran, S., Newberry, M., Phan-Thien, N., Tanner, R. (2002). Small and large strain rheology of wheat gluten. *Rheologica Acta*, 41, 162–172.
- Uthayakumaran, S., Tömösközi, S., Tatham, A. S., Savage, A. W. J., Gianibelli, M. C., Stoddard, F. L., & Bekes, F. (2001). Effects of gliadin fractions on functional properties of wheat dough depending on molecular size and hydrophobicity. *Cereal Chemistry*, 78(2), 138-141.
- Utterback, J. M., & Acee, H. J. (2005). Disruptive technologies: An expanded view. *International Journal of Innovation Management*, 9(01), 1-17.
- Vaclavikova, M., Malachova, A., Veprikova, Z., Dzuman, Z., Zachariasova, M., & Hajslova, J. (2013). ‘Emerging’ mycotoxins in cereals processing chains: Changes of enniatins during beer and bread making. *Food Chemistry*, 136(2), 750-757.
- Van Der Borght, A., Goesaert, H., Veraverbeke, W. S., & Delcour, J. A. (2005). Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and the factors involved. *Journal of Cereal Science*, 41(3), 221-237.

- Van Dyck, T., Verboven, P., Herremans, E., Defraeye, T., Van Campenhout, L., Wevers, M., Claes, J., Nicolai, B. (2014). Characterisation of structural patterns in bread as evaluated by X-ray computer tomography. *Journal of Food Engineering*, 123, 67–77.
- Van Steertegem, B., Pareyt, B., Slade, L., Levine, H., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2013). Impact of heat treatment on wheat flour Solvent Retention Capacity (SRC) profiles. *Cereal Chemistry*, 90(6), 608-610.
- Vemulapalli, V., Miller, K. A., & Hoseney, R. C. (1998). Glucose oxidase in breadmaking systems. *Cereal Chemistry*, 75(4), 439-442.
- Veraverbeke, W. S., & Delcour, J. A. (2002). Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality. *Critical reviews in food science and nutrition*, 42(3), 179-208.
- Vleugels, M., Shama, G., Deng, X. T., Greenacre, E., Brocklehurst, T., & Kong, M. G. (2005). Atmospheric plasma inactivation of biofilm-forming bacteria for food safety control. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 33(2), 824-828.
- Vukić, M., Hajnal, E. J., Mastilović, J., Vujadinović, D., Ivanović, M., & Šoronja-Simović, D. (2020). Application of solvent retention capacity tests for prediction of rheological parameters of wheat flour mill streams. *Hemijska industrija*, 74(1), 37-49.
- Vukić, M., Vujadinović, D., Ivanović, M., Gojković, V., & Grujić, R. (2018). Color change of orange and carrot juice blend treated by non-thermal atmospheric plasma. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(2), e13525.
- Walravens, J., Mikula, H., Rychlik, M., Asam, S., Ediage, E. N., Di Mavungu, J. D., ... De Saeger, S. (2014). Development and validation of an ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of free and conjugated *Alternaria* toxins in cereal-based foodstuffs. *Journal of Chromatography A*, 1372, 91–101.
- Walsh, J. (2017). IAFP's European Symposium on Food Safety.
- Walsh, J. L., Liu, D. X., Iza, F., Rong, M. Z., & Kong, M. G. (2010). Contrasting characteristics of sub-microsecond pulsed atmospheric air and atmospheric pressure helium–oxygen glow discharges. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 43(3), 032001.
- Wang, L., Shao, H., Luo, X., Wang, R., Li, Y., Li, Y., ... Chen, Z. (2016). Effect of Ozone Treatment on Deoxynivalenol and Wheat Quality. *PLOS ONE*, 11(1), e0147613.
- Wang, X., Wang, S., Yan, Y., Wang, W., Zhang, L., & Zong, W. (2020). The degradation of *Alternaria* mycotoxins by dielectric barrier discharge cold plasma. *Food Control*, 107333.
- Wang, Y. G., Khan, K., Hareland, G., & Nygard, G. (2006). Quantitative glutenin composition from gel electrophoresis of flour mill streams and relationship to breadmaking quality. *Cereal chemistry*, 83(3), 293-299.
- Wang, Y. G., Khan, K., Hareland, G., & Nygard, G. (2007). Distribution of protein composition in bread wheat flour mill streams and relationship to breadmaking quality. *Cereal chemistry*, 84(3), 271-275.
- Wang, Z., Li, Y., Jiang, L., Qi, B., & Zhou, L. (2014). Relationship between secondary structure and surface hydrophobicity of soybean protein isolate subjected to heat treatment. *Journal of Chemistry*, 2014.

- Watson, D. H. (Ed.). (1998). *Natural toxicants in food*. Sheffield: Sheffield Acad. Press [u.a].
- Weegels, P. L., Marseille, J. P., Bosveld, P., & Hamer, R. J. (1994). Large-scale separation of gliadins and their bread-making quality. *Journal of Cereal Science*, 20(3), 253-264.
- Weegels, P. L., Van de Pijpekamp, A. M., Graveland, A., Hamer, R. J., & Schofield, J. D. (1996). Depolymerisation and re-polymerisation of wheat glutenin during dough processing. I. Relationships between glutenin macropolymer content and quality parameters. *Journal of Cereal Science*, 23(2), 103-111.
- Wehrens, R., & Mevik, B. H. (2007). The pls package: principal component and partial least squares regression in R.
- Weipert, D. (1990). The benefits of basic rheometry in studying dough rheology. *Cereal Chemistry*, 67(4), 311-317.
- Weipert, D. (2006): Fundamentals of rheology and spectrometry. In: L. Popper, W. Schafer, W. Freund (Eds.), *Future of flour a compendium of flour improvement*. Clenze: Agrimedia, Germany, pp. 117-146.
- Wellner, N., Mills, E. C., Brownsey, G., Wilson, R. H., Brown, N., Freeman, J., ... & Belton, P. S. (2005). Changes in protein secondary structure during gluten deformation studied by dynamic Fourier transform infrared spectroscopy. *Biomacromolecules*, 6(1), 255-261.
- Wessels, R., Wentzel, B., & Labuschagne, M. T. (2020). Solvent retention capacity and swelling index of glutenin in hard red wheat flour as possible indicators of rheological and baking quality characteristics. *Journal of Cereal Science*, 102983.
- WHO. 2018. FOSCOLLAB Database. Chemical Overview Dashboard – Integrated summary elements from JECFA Evaluations Database, GEMS/Food Contaminants database and the WHO Collaborating Centres Database. https://extranet.who.int/sree/Reports?op=vs_html&path=/WHO_HQ_Reports/G7/PROD/EXT/chemical_overview&userid=G7_ro&password=inetsoft123
- Wieser, H. (2003). The use of redox agents in breadmaking. In *Breadmaking* (pp. 447-469). Woodhead Publishing.
- Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food microbiology*, 24(2), 115-119.
- Wieser, H., & Kieffer, R. (2001). Correlations of the amount of gluten protein types to the technological properties of wheat flours determined on a micro-scale. *Journal of Cereal Science*, 34(1), 19-27.
- Wrigley, C. W. (1996). Giant proteins with flour power. *Nature*, 381(6585), 738.
- Wrigley, C. W., & Bietz, J. A. (1988). *Wheat: chemistry and technology*. USA: American Association of Cereal Chemists, 159-275.
- Wu, F., & Mitchell, N. J. (2016). How climate change and regulations can affect the economics of mycotoxins. *World Mycotoxin Journal*, 9(5), 653-663.
- Xiao, Z. S., Park, S. H., Chung, O. K., Caley, M. S., & Seib, P. A. (2006). Solvent retention capacity values in relation to hard winter wheat and flour properties and straight-dough breadmaking quality. *Cereal chemistry*, 83(5), 465-471.
- Xu, F. (2001). Adsorption of oxygen gas by hydrated wheat flour. *LWT-Food Science and Technology*, 34(2), 66-70.
- Xu, W., Han, X., Li, F., & Zhang, L. (2016). Natural Occurrence of *Alternaria* Toxins in the 2015 Wheat from Anhui Province, China. *Toxins*, 8(11), 308.

- Yamazaki, W. T. (1953). An alkaline water retention capacity test for the evaluation of cookie baking potentialities of soft winter wheat flours. *Cereal Chemistry*, 30(3), 242-246.
- Yang, H., Yang, S., Kong, J., Dong, A., & Yu, S. (2015). Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. *Nature protocols*, 10(3), 382.
- Ye, J., Wang, X., Sang, Y., & Liu, Q. (2011). Assessment of the determination of azodicarbonamide and its decomposition product semicarbazide: Investigation of variation in flour and flour products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 9313–9318.
- Yonemori, S., & Ono, R. (2014). Flux of OH and O radicals onto a surface by an atmospheric-pressure helium plasma jet measured by laser-induced fluorescence. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 47(12), 125401.
- Zaidel, A., Norulfairuz, D., Chin, N. L., & Yusof, Y. A. (2010). A review on rheological properties and measurements of dough and gluten. *Journal of Applied Sciences*, 10(20), 2478-2490.
- Zaks, A., & Klibanov, A. M. (1984). Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. *Science*, 224(4654), 1249-1251.
- Zhang, C., Wang, P., Yang, J., Ren, D., Lu, Z., Zhao, H., & Lu, F. (2019). Oxidative crosslinking of water-extractable wheat arabinoxylans by recombinant lipoxygenase and its effect on bread properties. *LWT*, 103, 1-7.
- Zorlugenç, B., Kiroğlu Zorlugenç, F., Öztekin, S., & Evliya, I. B. (2008). The influence of gaseous ozone and ozonated water on microbial flora and degradation of aflatoxin B1 in dried figs. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3593–3597.
- Мерко, И.Т. (1979). Совершенствование технологических процессов сортового помола пшеницы, Москва, Колос.
- Мерко, И.Т. (1985). Технология мукомольного и крупяного производства, Москва, Агропромиздат.

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Утицај хладне атмосферске плазме на технолошки квалитет и безбедност пшеничног брашна
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду (Србија) б) Технолошки факултет Зворник, Универзитет у Источном Сарајеву в) Научни институт за прехранбене технологије у Новом Саду, Универзитет у Новом Саду д) Центар за неравнотежне процесе, Лабораторија за неравнотежне процесе и примену плазме Института за физику Универзитета у Београду.
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
1. Опис података
<p>1.1 Врста студије</p> <p>Докторска дисертација</p> <p><i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i></p> <p>Подаци су прикупљени у оквиру израде докторске дисертације <i>Утицај хладне атмосферске плазме на технолошки квалитет и безбедност пшеничног брашна.</i></p> <p>1.2 Врсте података</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> а) квантитативни</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> б) квалитативни</p> <p>1.3. Начин прикупљања података</p> <p>а) анкете, упитници, тестови</p> <p>б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи</p> <p>в) генотипови: навести врсту _____</p> <p>г) административни подаци: навести врсту _____</p>

д) узорци ткива: навести врсту _____

ђ) снимци, фотографије: навести врсту _____

е) текст, навести врсту - литература

ж) мапа, навести врсту _____

з) остало: описати - експериментални подаци

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

а) Excel фајл, датотека – .xlsx, .csv

б) SPSS фајл, датотека _____

в) PDF фајл, датотека – .pdf.

г) Текст фајл, датотека – .docx.

д) JPG фајл, датотека – .jpeg, .tif

е) Остало, датотека – фајлови аналитичких инструмената

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли – велики број

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) – велики број

1.3.3. Поновљена мерења

а) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) временски размак између поновљених мера је зависио од мерења

б) варијабле које се више пута мере односе се на електрична мерења, оптички емисиони спектар, ултрацрвени спектар, ултраљубичасти спектар, реолошке особине, хемијске особине, физичке особине, полимерне особине.

в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као понављања инкорпорирана у постојећа мерења.

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, навести тип – централни композитни, факторијални, моделовање, анализе

б) корелационо истраживање, навести тип – регресиона и мултиваријантна анализа прикупљених експерименталних података.

ц) анализа текста, навести тип – преглед литературе

д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да Не

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) Колики је број недостајућих података? _____

б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не

в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података контролисан је поређењем добијених података са литературним подацима, поређењем експерименталних и теоретских података као и спровођењем статистичких тестова.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података у матрицу извршена је поређењем добијених података са литературним подацима, као и спровођењем статистичких тестова.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у _____ репозиторијум.

3.1.2. URL адреса _____

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до 5 година.

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

Подаци ће бити чувани на локалним компјутерским дисковима на Технолошким факултетима у Новом Саду и у Зворнику.

3.2. Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? _____

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да Не

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
 - б) Подаци су анонимизирани
 - ц) Остало, навести шта
-
-

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Подаци ће бити доступни под условом успостављања сарадње на заједничкој обради података и коауторству на објављеним научним радовима.

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

Подаци ће на захтев бити достављени заинтересованим истраживачима у електронској форми.

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство - некомерцијално CC BY-NC-ND 4.0

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Милан Вукић, milan.vukic@tfzv.ues.rs.ba

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Милан Вукић, milan.vukic@tfzv.ues.rs.ba

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Милан Вукић, milan.vukic@tfzv.ues.rs.ba