

Parametri kvalitete ribe nakon obrade netoplinском plazmom

Čaće, Alan

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:670472>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2016

Alan Čače

654/PI

**PARAMETRI KVALITETE RIBE
NAKON OBRADÉ
NETOPLINSKOM PLAZMOM**

Rad je izrađen u Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv.prof. dr.sc. Anet Režek Jambrak,. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Višnje Stulić, mag. ing. i Tibora Janči, mag. ing.

Srdačno zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak na nesebičnoj pomoći oko razumijevanja tematike pisanja rada, diskusijama te savjetima i podršci.

Puno zahvaljujem Višnji Stulić, mag. ing. na pruženoj pomoći pri izvedbi eksperimentalnog dijela i savjetima oko pisanja ovog rada.

Također, mnogo se zahvaljujem Tiboru Janči, mag. ing na pruženoj pomoći u provedbi eksperimenata, korisnim informacijama u pisanju rada i svojem posvećenom vremenu

Posebno bih se zahvalio svojim roditeljima i sestri i noni koji su mi omogućili studiranje, poticali me i podržavali kroz sve godine studiranja i radovali se mojim uspjesima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procesno-prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

PARAMETRI KVALITETE RIBE NAKON OBRADJE NETOPLINSKOM PLAZMOM

Alan Čače, 654/PI

Sažetak:

Obrada plazmom je relativno novo područje istraživanja u prehrambenoj industriji. Glavni cilj ovog rada je utvrditi da li dolazi do redukcije broja mikroorganizama i lipidne oksidacije nakon tretmana plazmom, ribe Sparus aurata. Varijabilni ulazni parametri su protok plina argona (1, 1,5 i 2 L/min) i vrijeme tretiranja (5, 10 i 15 minuta). Za planiranje eksperimenta korišten je centralno kompozitni plan (CCD), te je provedeno i optimiranje procesa. Nakon tretmana došlo je do redukcije broja mikroorganizama (0,3-0,96 log CFU), najveće redukcije kod tretmana 5 minuta i protoka plina od 1,5 L/min. Kod analize oksidacije masti, došlo je do povećanja TBA vrijednosti osim kod tretmana pri 5 minuta i protoka 1 L/min. Najveći pad sposobnosti vezanja vode od 16% zabilježen je kod tretmana od 10 minuta i 1,5 L/min. Kod većine uzoraka L i h vrijednost se smanjila nakon tretmana, a s druge strane, došlo je do povećanja a, b i dC vrijednosti. Najveće promjene u teksturi su zabilježene kod tretmana od 10 min i 1 L/min od 46% za tvrdoću, 13% za elastičnost i 31% za rad u odnosu na netretirani uzorak.

Ključne riječi: (*Sparus aurata*, netoplinška plazma-jet, mikrobiološka ispravnost, parametri kvalitete)

Rad sadrži: 55 stranica, 13 slika, 28 tablica, 52 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv.prof.dr.sc., Anet Režek Jambrak

Pomoć pri izradi: Višnja Stulić, mag. ing.

Tibor Janči, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Zoran Herceg
2. Izv.prof.dr.sc. Anet Režek Jambrak
3. Izv.prof.dr.sc. Sanja Vidaček
4. Prof.dr.sc. Helga Medić (zamjena)

Datum obrane: 19. srpanj, 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Food Process Engineering

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

PARAMETERS OF FISH QUALITY PROCESSED WITH NON THERMAL PLASMA

Alan Čače, 654/PI

Abstract:

Plasma processing is a relatively new field of research in food processing. The main goal of this thesis is to determine if reduction of microorganisms and lipid oxidation occurs after plasma treatment of fish Sparus aurata. The changing input parameters were flow rate of the feeding Argon gas (1, 1,5 and 2 L/min) and duration of treatment (5, 10 and 15 minutes). Planning the experiment was done by using the central composite design (CCD), after which process optimisation was carried out. After the treatment, reduction of microorganisms was achieved (0,3-0,96 log CFU),, in the biggest extent for the treatment: 5 minutes and 1,5 L/min of gas flow. When analysing lipid oxidation, TBA value increased except for 5 minutes and 1 L/min treatment. For the water binding capacity the biggest drop of 16% was observed for 10 minutes and 1,5 L/min treatment. For most samples L and h value decreased after treatment, but on the other hand there has been an increase in a, b and dC value. Changes in textural properties, in relation to untreated sample, were most significant in the treatment 10 minutes and 1 L/min, 46% for hardness, 13% for elasticity and 31% for work.

Keywords: (Sparus aurata, non thermal plasma-jet, mikrobiological safeness, quality parameters)

Thesis contains: 55 pages, 13 figures, 28 tables, 52 references, 1 supplement

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Anet, Režek Jambrak, PhD

Technical support and assistance: Višnja, Stulić, M.Sc.
Tibor Janči. M.Sc.

Reviewers:

1. PhD. Zoran Herceg, Full professor
2. PhD. Anet Režek Jambrak, Associate professor
3. PhD. Sanja Vidaček, Associate professor
4. PhD. Helga Medić, Full professor (substitute)

Thesis defended: 19 July 2016

Sadržaj

1.	UVOD.....	1
2.	TEORIJSKI DIO	2
2.1.	ORADA (<i>Sparus aurata</i>)	2
2.2.	PARAMETRI KVALITETE RIBE	3
2.2.1.	Mikrobiološki testovi	5
2.2.2.	Oksidacijske promjene i metode	6
2.2.3.	Sposobnost vezanja vode (SVV).....	8
2.2.4.	Boja	9
2.2.5.	Tekstura	11
2.3.	VRSTE PLAZME	12
2.3.1.	Općenito o plazmi	12
2.3.2.	Jet plazma.....	14
2.4.	DIZAJN EKSPERIMENTA	15
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1.	PRIPREMA I PROVEDBA EKSPERIMENTA.....	17
3.2.	PLANIRANJE I OPTIMIRANJE EKSPERIMENTA.....	17
3.3.	MATERIJALI I METODE ZA PROVEDBU MIKROBIOLOŠKIH TESTOVA	20
3.4.	ANALIZA BOJE.....	21
3.5.	ANALIZA TEKSTURE.....	23
3.6.	ODREĐIVANJE OKSIDACIJE MASTI.....	23
3.7.	SPOSOBNOST VEZANJA VODE (SVV).....	25
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	27
5.	ZAKLJUČCI	50
6.	LITERATURA	51
7.	PRILOZI	

1. UVOD

Riba je uvijek imala važan status u prehrani ljudi. Poželjna je ne samo zbog svojih gastronomskih svojstava, već i zbog toga što je to hrana visoke nutritivne vrijednosti. Meso ribe ima visoko probavljive proteine i odgovarajući omjer aminokiselina sa poželjnim udjelom esencijalnih masnih kiselina. Kemijski sastav ribe može značajno varirati ovisno od vrste ribe, prehrane, dobi, spolu, migraciji, okolišnim uvjetima i godišnjem dobu. Osim proteina i visokog udjela nezasićenih masnih kiselina, i do 60-84% od ukupnih masti, riba je bogata mineralnim tvarima i vitaminima A, D, E i B-kompleksa. Kvaliteta riba je, prije svega ekonomska kategorija. Vrste su kategorizirane po kvaliteti kroz senzorska svojstva, odnosno mirisu i izgledu očiju, škrge, kože, sluzi, konzistenciji i boji mesa, te načinu obrade (evisceracija, itd). Nakon smrti ribe, metabolizam prelazi iz aerobnog u anaerobni, te se smanjuju zalihe i zaustavlja se proizvodnja energije. Promjene koje se javljaju tijekom autolize su vrlo različite, ali najvažnije se odnose na rezerve energije, proteina, lipida i nukleotida. Složeni kemijski i biokemijski procesi procesi javljaju se nakon smrti ribe i utječu na njene karakteristike. Kod razvoja novog proizvoda koji ima jedinstvene karakteristike subjekti u poslovanju s hranom moraju osigurati da je proizvod siguran za konzumaciju. U tom smislu, potrebno je napraviti ispitivanja radi definiranja roka trajnosti za moguće patogene i nametnike koji bi se mogli razviti u uvjetima povišene temperature, a_w vrijednosti, te skladištenja takvog proizvoda. Osim mikrobiološke sigurnosti hrane potrebno je utvrditi neke kemijske parametre poput koncentracije amonijaka, etanola, biogenih amina, trimetilamina (TMA-N), dimetilamin (DMA), ukupni hlapivi dušik (TVB-N) i vrijednosti tiobarbiturne kiseline (TBA), ovisno o vrsti ribe i rizika kojeg predstavlja. Također tekstura, miris i boja proizvoda su veoma važni potrošaču, a i izravni su pokazatelji svježine te donekle i zdravstvene ispravnosti ribe. Zato je kod prerade ribe od iznimne važnosti zadržati vrijednosti tih parametara sličnim ulazima. Kod uporabe nove tehnologije potrebno je mnogo ispitivanja kako bi se došlo do zadovoljavajućih rezultata. Često se treba prilagođavati više ulaznih parametara paralelno i koristiti statistička analiza podataka kako bi se omogućila optimizacija processa obrade. U ovom radu će se opisati uporaba netoplinke tehnologije, ne toplinske plazme u atmosferi argona, kojom će se vršiti obrada ribe *Sparus aurata*. Također će se opisati utjecaj takve metode na redukciju mikroorganizama te utjecaj na sposobnost vezanja vode, oksidaciju masti, teksturu i boju, uz optimizaciju ulaznih parametara poput protoka plina i vremena tretiranja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ORADA (*Sparus aurata*)

Sistematizacija riba često se razlikuje zbog velikog broja i međusobne sličnosti no ipak se u glavnim crtama sve podudaraju i ribe uglavnom uvijek ostaju unutar uobičajenih 400-tinjak porodica. Osnovna podjela riba je na hrskavičnjače i koštunjače. Prave koštunjače obuhvaćaju više od 90% današnjih vrsta riba u koje spada i orada (Vidaček, 2013). Orada prikazana na slici 1. pripada redu Grgečki u porodicu luskavki (*Sparidae*). Osim pod tim imenom, nije jedini hrvatski naziv za ribu *Sparus aurata*, može se naći pod tridesetak drugih imena u različitim krajevima hrvatskog priobalja od kojih su češće upotrebljavana: orada, komarča, podlanica, dinigla, lovrata, ovrata, zlatulja, zlatva, sekulica, štrigavica, a engleski naziv joj je sea bream ili gilthead. Od drugih zemalja u Mediteranu gdje se uzgaja najznačajnije je u Italiji, Francuskoj, Maroku, Turskoj, Grčkoj, Izraelu.



Slika 1. Orada (*Sparus aurata*)

Odrasla orada ima prosječnu dužinu od 35 cm i teži oko 10 kg. Nakon 2 godine i dužine veće od 30 cm iz funkcionalne muške prelazi u žensku jedinku (Arabaci i sur., 2010). Ističe se velikom glavom s razvijenim čeljustima, gornja vilica je malo isturena nad donjom. Karakterizira ju čvrsta građa, tijelo vretenastog oblika. Gornji dio tijela je modrozelenkastosive, a postrance je sivosrebrnaste boje, s uzdužnim smeđim ili smeđezelenkastim prugama. Donji dio tijela je bijele do srebrnastobijele boje. Na gornjem

dijelu škržnog otvora nalazi se zlatna do narančasta mrlja, a gornji kut škržnih otvora obuhvaćen je ljubičastocrnom mrljom. U gastronomiji je veoma cijenjena visoko kvalitetna, delikatna i skupa riba zbog ukusnog mesa, među najboljim od bijelih riba. Intenzivnije uzgajanje u akvakulturi započelo je 1980-ih primarno u Mediteranu. Produkcija Orada je dosegla 140 000 tona po izvješću iz 2010. godine (FAO, 2016). U Hrvatskoj, orada se uzgaja u Cromarisu, prije u Cenmaru, koji je 2015. godine postao jedan od 10 najvećih svjetskih proizvođača orade (Rak-Šajn, 2015). Uzgoj riba, kako u svijetu, tako i u Hrvatskoj, predstavlja segment koji može omogućiti redovitu, kontroliranu i održivu opskrbu tržišta proizvodima ribarstva. U Republici Hrvatskoj potrošnja proizvoda ribarstva u prehrani ljudi je niska i iznosi oko 8-10 kg/stanovniku godišnje dok druge mediteranske zemlje imaju puno veću potrošnju ribe, Italija i Grčka oko 25, a Španjolska čak oko 40 kg/stanovniku godišnje (Christensen, 2011) tako da se većina uzgojene ribe i izvozi. Uz brancina (*Dicentrarchus labrax*) spada u dvije ekonomski najvažnije kultivirane ribe uzgajane na području Mediterana (Smart, 2001). Poznato je da tokom skladištenja kvaliteta opada neovisno od metode konzerviranja, kod riba brže ako u probavnom sustavu sadrži različite bakterije i probavne enzime koji uzrokuju brzo autolitičko kvarenje post-mortem. Evisceracija znači uklanjanje škrge i organa abdomena što izlaže ribu zraku i mogućim oksidacijskim reakcijama. Ovisno o tipu ribe, koliko masnog tkiva ima, odlučuje se je li bolje skladištiti ju cijelu ili evisceriranu. Dužina trajnosti ribe oko 15 dana postiže se poledjivanjem pri 0 do 4°C najviše zbog redukcije mikroorganizama kvarenja (Cakli, 2007), dok bi se još veća trajnost mogla postići kod pothlađivanja tj. čuvanja na temperaturi -4 do -1°C.

2.2. PARAMETRI KVALITETE RIBE

Senzorska analiza je znanstvena disciplina koja se koristi kako bi se evaluirale, izmjerile, analizirale i interpretirale karakteristične reakcije namirnica percipirane kroz osjetila vida, njuha, mirisa, okusa, dodira i sluha (FAO, 1991). Od organoleptičkih metoda za ocjenu kvalitete ribe najviše se koristi EU shema sa kategorijama: E za ribu ekstra koja nije za ljudsku uporabu i N-nedopušteno. Druga novija metoda QIM (Metoda indeksa kvalitete) prikazana je u tablici 1. koju je razvio istraživački tim sa Tasmanije (Bremner, 1985). Razvija se za svaku vrstu posebno u sirovom i za neke u smrznutom stanju. QIM se bazira na signifikantnosti parametara kvalitete svježine ribe za više parametara sa bodovnim sustavom od 0 do 4 demerit bodova (Jonsdottir, 1992). Bodovi se zbrajaju u konačnu senzorsku ocjenu tzv. indeks kvalitete, porastom bodova opada svježina tj. kvaliteta ribe. Osim prethodno

opisanih senzorskih i organoleptičkih testova za ocjenu svježine ribe, provode se i kemijski i mikrobiološki testovi. Od kemijskih testova kvalitete ispituje se koncentracija amonijaka, (TMA-N), (DMA), (TVB-N), TBA (udio malonilaldehida), nukleotidnih katabolita, etanola, aktiviteta vode (a_w) te na biotoksine histamin (post-mortem) i ciguateru (pre-mortem) te parazite. Od fizikalnih metoda upotrebljava se test električnih svojstva (impedancija), pH, Eh (Eh - redukcijski potencijal), analiza boje i teksture. Od mikrobioloških testova provodi se brojanje ukupnog broja m.o., bakterije kvarenja te test na patogene bakterije.

Tablica 1. Shema ocijene indeksa kvalitete (demerit bodovi) i nedostataka (prema Larsen i sur. 1992)

Parametri kvalitete	Parametri	Bodovi (led/morska voda)
Opće karakteristike	Površinski izgled(koža)	0 Svijetla, iridescentna 1 Svijetla 2 Mutna
	Krv na škržnom poklopcu	0 Nema 1 Malo, 10-30% 2 Srednje, 30-50% 3 Mnogo, 50-100%
	Ukočenost tijela	0 Ukočeno, u <i>rigor mortis</i> 1 Elastično 2 Kruto 3 Mekano
	Abdomen	0 Krut 1 Mekan 2 Oštećen, rastrgan
	Miris	0 Svjež, po morskoj travi/metalan 1 Neutralan 2 Pomalo užegao/kiselkast 3 Kiseo/užegao/po amonijaku
Oči	Prozirnost (rožnica)	0 Prozirno/čiste 1 Mutne
	Oblik	0 Normalne 1 Ravne 2 Konkavne/utonule
Škrge	Boja	0 Karakteristična, crvena 1 Blijeda, bezbojna
	Miris	0 Svjež, po morskoj travi/metalan 1 Neutralan 2 Slatkast/pomalo užegao 3 Kiselkast smrad/ustajao, užegao
Zbroj bodova		(minimum 0 i maksimum 20)

2.2.1. Mikrobiološki testovi

Najvažniji od svih parametara kvalitete je zdravstvena ispravnost ribe. Uz porast konzumacije morskih proizvoda povećava se i broj infekcija i intoksikacija te je važno pratiti uvjete obrade od ulova pa do pripreme namirnice. Od značajne je važnosti provjera prisutnosti patogena i drugih organizama opasnih po ljudsko zdravlje. Ispituje se sljedivost hladnog lanca, higijenski uvjeti postrojenja tokom prihvata, prerade i isporuke. S druge strane mikrobiološki test neće dati pouzdanu informaciju o svježini ribe i nutritivnoj vrijednosti, ali može donekle o roku trajnosti. Mišićje ribe je prije smrti sterilno (Vidaček, 2014), ali nakon smrti dolazi do rasta bakterija, a i moguća je kontaminacija tijekom čišćenja, evisceracije i filetiranja od strane radnika ili opreme. Za produljenje trajnosti proizvoda mogu se koristiti toplinske metode obrade, sniženje a_w (dostupnost vode), regulacija koncentracije kisika i pH te dodatkom konzervansa poput nitrita ili hladno dimljenje. Parametar ukupnog broja mikroorganizama ne uključuje patogene i istoznačan je sa ukupnim brojem aeroba TAC (total aerobic count) i standardnim brojem na ploči SPC (standard plate count). PCA (Common plate count agar) se najčešće upotrebljava, a predstavlja ukupan broj bakterija koje su sposobne formirati vidljive kolonije na hranjivoj podlozi pri određenoj temperaturi. Taj podatak često nije najbolji indikator senzorske kvalitete i trajnosti namirnice (Huss *i sur.*, 1974). Ovisno o tome prati li se rast psihrofilnih, psihrotrofnih ili mezofilnih bakterija hranjive se podloge inkubiraju pri redom do 15, 25-30 ili 37°C. Iako postoji više različitih podloga svima je nedostatak dugo vrijeme inkubacije i provedbe eksperimenta. Jedna od brzih metoda evaluacije broja bakterija u namirnici je mikroskopsko promatranje pomoću kontrasta faza gdje je preciznost unutar 1 log. Jedna stanica koja se zamijeti u vidnom polju je aproksimativno $5 \cdot 10^5$ CFU (Colony Forming Units)/ml pri 1000 X povećanju. Epifluorescentna tehnika filtriranja (DEFT) je široko prihvaćena metoda bojenja bakterija sa akridin narančastom bojom i detekcije sa fluorescentnim mikroskopom. Najveća mana metode mikroskopiranja je njena niska osjetljivost (FAO, 1991). Bakterije kvarenja su specifične bakterije poput *Schewanella putrefaciens*, *Pseudomonas* spp., *vibrio* spp., *Photobacterium phosphoreum*, *Alteromonas*, *Enterobacteriaceae* i zakonom su propisane maksimalne dopuštene vrijednosti različitih bakterija kvarenja pri kojima se proizvod i dalje može stavljati na tržište. Broj bakterija kvarenja ovisi u kakvom je okolišu obitavala riba. Najviši udio ima na koži ribe te će post-mortem (temperatura, prisustvo kisika, pH) doći do promijene mikroflore i ovisno o uvjetima skladištenja do rasta jednih i inhibicije drugih vrsta. U aerobnim uvjetima broj psihrofila *Schewanella putrefaciens*, *Pseudomonas* spp. je puno veća nego u anaerobnim uvjetima

skladištenja. *Photobacterium phosphoreum* može rasti u MAP pakiranjima. Specifični mikroorganizmi kvarenja (SMK) proizvode različite metabolite poput trimetilamina, hlapljive sumporne spojeve, aldehide, ketone, estere, amonijak i dr. koje detektiramo kao pokvarenost. Različite peptonske otopine sa željezo citratom su korištene u dokazivanju H₂S koje stvaraju specifične bakterije poput *Schewanella putrefaciens* i bakterije vibrio spp. Nema specifičnog hranjivog medija za dokazivanje *Pseudomonas* spp ili *Photobacterium phosphoreum*. Za *Enterobacteriaceae* se koristi Violet red bile glucose agar (VRBG). Za *Salmonella* spp. koristi se Xylose lysine deoxycholate agar (XLD). Prisutnost patogenih bakterija, a i nekih bakterija kvarenja, najčešće se ispituju pomoću imuno tehnika ili molekularne biologije. Od najznačajnijih patogenih bakterija ističe se *Clostridium botulinum* zbog najjačeg prirodnog toksina i *Listeria monocytogenes* koja tvori problematične biofilmove u industriji. Uz eksperimente može se koristiti i prediktivna mikrobiologija. Ona koristi matematičke modele (uz podatke iz laboratorijskih ispitivanja) i računalni softver za grafičku interpretaciju i opis odgovora mikroorganizama na unutarnje i vanjske čimbenike (Beaufort, 2014). Takvi testovi dobar su početak u procjeni sigurnosti, stabilnosti i roka trajanja namirnice te za reevaluaciju postojećeg proizvoda kod promijene procesnih parametara ili nove formulacije proizvoda (FSAI, 2014).

2.2.2. Oksidacijske promjene i metode

Visoko nezasićene masne kiseline brže oksidiraju od zasićenih, a ribe imaju visoki udio nezasićenih masnih kiselina od kojih omega 3 (Eikozapentaenska m.k. i dokosaheksaenska m.k.) te omega 6 (α -linolenska m.k.) masne kiseline koje su veoma podložne oksidaciji. Autooksidacija je lančana reakcija kemijskog kvarenja ulja koja započinje oksidacijom nezasićene masne kiseline te nastali slobodni radikali katalitički pospješuju daljnju oksidaciju masnih kiselina. U početku je autooksidacija spora, ali u fazi propagacije ide sve brže i brže sve do kad ne dostigne završnu oksidaciju gdje daljnji produkti oksidacije nisu reaktivni. Primarni produkti oksidacije, nastali zbog dugog skladištenja ili povišene temperature, su hidroperoksidi koji se ne mogu detektirati kao užeglost nego kemijskom analizom, pr. spektrofotometrijska analiza peroksidnog broja (PB) gdje se dobije vrijednost u miliekvivalentima peroksida po kg ekstrahirane masti iz ribe. Jodometrijsku metodu određivanja peroksidnog broja opisala je Lea (1952), a spektrofotometrijsku metodu Stine i sur. (1954). Metode određivanja peroksidnog broja su empirijske i usporedba peroksidnog broja različitih uzoraka moguće je samo ako se koristi identična metoda pošto koristeći jednu

metodu može dati potpuno drugačiji rezultat. Peroksidni broj određuje hidroperoksidi i oni se mirisno i okusno ne mogu detektirati te se ne može usporediti sa senzorskom kvalitetom analiziranog uzorka. Druga loša strana je da lipidni peroksidi degradiraju kroz vrijeme i prelaze u sekundarne produkte oksidacije te može biti da je proizvod na početku autooksidacije ili u odmakloj fazi oksidacije sušene ribe (Kanner and Rosenthal, 1992). U kasnijim fazama oksidacije sekundarni produkti oksidacije (aldehidi, ketoni, kratkolančane masne kiseline su pokazatelji završene autooksidacije od kojih su mnogi neugodnog mirisa i izravni pokazatelji oksidacijskog kvarenja. Proizvod poprima karakterističnu notu užeglosti i kiselkastosti po ribi.

Za određivanje sekundarnih produkata oksidacije najrasprostranjenija i prihvaćena je TBA metoda koja ima više varijacija izraženih kao standard dialdehida ili malonaldehida opisanih od Ke i Woyewoda (1979) za lipide ribe i od Vyncke (1975) za ribu. Rezultati TBA testa se najčešće izražavaju u mikromolima i miligramima (u odnosu na količinu analiziranog tkiva) malonaldehida po 1 gramu masti ($\mu\text{mol/g}$). Kontradiktorni su pokušaji korelacije senzorskih analiza i TBA evaluacije. Kako ne bi došlo do užeglog okusa TBA vrijednost bi trebala biti ispod 1-2 μmol MDA-ekvivalenta po g masti (Connell, 1975) ili manje od 10 μmol MDA-ekvivalenta po 1 kg ribe (Ke *i sur.*, 1976).

Osim prije spomenutih metoda koristi se i "headspace" analiza hlapivih spojeva na plinskom kromatografu (GC) koja bolje korelira sa senzorskom analizom, ali za opću uporabu preferiraju se metode PB i TBA test. Headspace ima bolju rezoluciju i osjetljivost te se mogu ispitivati specifični produkti oksidacije i direktan udio malonaldehida.

Od ostalih analitičkih kemijskih metoda postoje Kreiov test (ispitivanje epoksialdehida i acetala), Anisidinski broj-Abr (određivanje svih hlapivih karbonilnih spojeva 2-enali, 2,4-dieni), karbonilni broj (svi spojevi s karbonilnom skupinom), kemijska luminiscencija (određivanje primarnih i sekundarnih produkata oksidacije), oksidacijska vrijednost-OV ($\text{OV}=2*\text{PB}+\text{Abr}$), a od fizikalnih metoda postoje UV spektrofotometrija (ispitivanje konjugiranih diena i triena), IR spektrofotometrija (određivanje primarnih i sekundarnih produkata oksidacije), NMR (hidroperoksidi i alkoholi), fluorescencija (malonaldehid), indeks refrakcije i dielektrična konstanta (1. i 2. produkti oksidacije), kulonometrija i polarografija (hidroperoksidi) (Begić, 2014).

2.2.3. Sposobnost vezanja vode (SVV)

Sposobnost vezanja vode je važan parametar iz razloga što utječe na ekonomičnost i na senzorska svojstva proizvoda. Što je sposobnost proteina da zadrži vodu veća to će biti manji gubitak (gubitak na masi proizvoda) i bolja teksturalna svojstva proizvoda. Neki od faktora koji mogu utjecati na sposobnost vezanja vode su temperatura, pH, rigor mortis, udio proteina lipida i soli. Voda je u mesu ribe prisutna kao slobodna voda u ekstracelularnom prostoru (lako se otpušta), mobilizirana voda koja je zadržana zbog steričkih faktora proteinskih molekula (najpodložnija je promjenama i najvažnija u očuvanju kvalitete) i vezana voda koja je čvrsto vezana za proteine mišića (mali udio koji se ne mijenja i nije podložna smrzavanju). U fazi pre-rigor sposobnost vezanja vode proteina je visoka, ali paralelno s razvojem mrtvačke ukočenosti ona opada, s minimumom kod krajnje pH vrijednosti (kod riba 6.2). Sa sniženjem pH, nastupa denaturacija proteina, što rezultira smanjenom sposobnošću vezanja vode (Vidaček, 2006). Sniženje pH vrijednosti, najviše zbog nakupljanja laktata post-mortem, posljedično dovodi do smanjenja naboja miofilamenata koji se međusobno privlače i pritom istiskuju vodu. Takvo sniženje u ukupnom negativnom naboju rezultira smanjenjem odbijanja između miofibrila i kontrakcijom miofibrilarne strukture. To dovodi do otpuštanja tekućine iz miofibrila i zbijanja stanica te u slučaju da riba ima više udjele glikogena u trenutku izlova, postiže se niži pH koji direktno utječe na teksturu ribe. Trodimenzionalna struktura miofibrilarnih filamenata u mišiću važna je za očuvanje sposobnosti vezanja vode. U trodimenzionalnoj strukturi su miozin i aktin zajedno povezani i formiraju heksagonalni sustav u kojem je miozinski filament okružen sa šest filamenata aktina, dok je svaki aktinski filament okružen sa tri miozinska filamenta. Kod kvalitete fileta ribe je važno da period mrtvačke ukočenosti ne nastupi pri visokoj temperaturi zbog mogućih oštećenja i pucanja tkiva. Filetiranjem se kida osnovna struktura mišića te lakše dolazi do gubitka tekućine. Ako se proizvod podvrgava zamrzavanju, naknadno dolazi do većeg gubitka tekućine i organoleptičkih promjena miofibrilarnih proteina (kod nemasnih, bijelih riba). SVV se uglavnom izražava kao zadržana voda u tkivu od ukupne vode u tkivu što znači da se ukupna količina vode mora ustanoviti zasebno. SVV se uglavnom mjeri po jednoj od slijedećih dviju metoda. Prva metoda je mjerenje težine (filter papira prije i nakon apsorpcije vode) istisnute vode iz mesa stavljenog između filter papire s primjenom utega određene težine kroz zadano vrijeme (uzorak može biti komad fileta ili samljeveni komadići fileta). Druga metoda se bazira na centrifugiranju uzorka kroz određeno vrijeme i pri određenoj brzini. Otpuštena tekućina prolazi kroz sinterirani disk kako se ne bi ponovo resorbirala u tkivo.

2.2.4. Boja

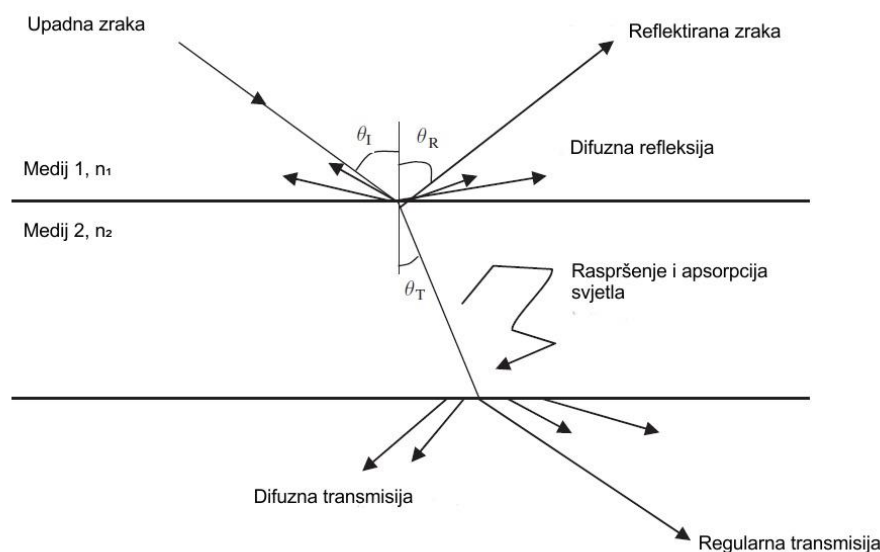
Boja je veoma važan parametar u senzorskoj procjeni kvalitete hrane pošto je prva procjena nekog proizvoda uglavnom osjetom vida. Svježi proizvod uglavnom ima najprivlačniji izgled što se tiče boje, teksture i oblika te se sve više teži pronalasku procesne tehnike koja će očuvati takav izgled i ne narušiti ostale parametre kvalitete. Bez svjetla ili iluminacije boja ne postoji. Boja se može definirati kao senzorski osjet pobude receptora u mrežnici oka elektromagnetskim valovima različite valne duljine (380 nm do 740 nm) koji se prenosi kao impuls u centar za vid gdje se konstruira u boju ili sliku. Postoje tri osnovne boje: crvena (740nm-625nm), žuta (590nm-565nm) i plava (500nm-440nm); tri sekundarne boje: narančasta (625nm-590nm), zelena (565nm-500nm) i ljubičasta (440nm-380nm); i 6 tercijarnih boja (miješanjem primarne i sekundarne boje) koje zajedno čine Ostwaldov krug prikazan na slici 2. Nasuprotne boje su komplementarne što znači da prva boja nema niti jedan dio druge boje.



Slika 2. Ostwaldov krug komplementarnih boja (wikimedia)

Optika je grana fizike koja se bavi proučavanjem svjetlosti i njene interakcije sa materijom. Kada na neki objekt pada svjetlost, ono se može reflektirati, apsorbirati ili proći kroz njega što je prikazano na slici 3. S obzirom na propusnost svjetlosti, materijal se može smatrati transparentan, mat i semitransparentan. Gotovo sva hrana je neprozirna iako neka može biti propusna za svjetlo određene valne duljine. Kolorimetrijske metode su konsenzusom gotovo svih država svijeta prihvaćene kao uniforman standard prema The Commission de International de l'Eclairage (CIE). Osi m tristimulusnog sustava koji koristi reprezentaciju tri

osnovne boje u x, y i z dijagramu-tristimulusna vrijednost gdje je za percepciju bilo koje boje potreban udio tri osnovne boje osmišljene su različite metode kako bi pojednostavile i linearizirale sustav boje kroz prostor. Kao vodeća metoda koristi se teorija protuboja sa L, a i b. Koristi se trodimenzionalni prikaz prostora gdje je L svjetlina (od 0 skroz crna do 100 bijela), a je omjer crvena-zelena (crvena je prema pozitivnim vrijednostima, zelena je kod negativnih vrijednosti a 0 je neutralna) i b omjer plava-žuta (žuta je prema pozitivnim vrijednostima, plava je kod negativnih, a 0 je neutralna). Koriste se dvije varijacije metode, jedna je CIE-ina (L^* , a^* , b^*) i druga od Hunter (L, a, b).



Slika 3. Shematski prikaz interakcije svjetla i materije, θ_I =kut upada zrake θ_R =kut refleksije θ_T =kut transmisije n_1 , n_2 refraktivni faktor medija 1 i 2. (Jha, 2010)

Nije jednostavno kvantificirati mjerenje difuzne refleksije jer efektu pridonose i transmisija uzorka, raspršenje, apsorpcija i refleksija. U klasičnoj optici se za difuznu refleksiju mislilo da je odgovorna za boju. U hrani, koja je u većini slučajeva nehomogena, se pojavljuje refleksija tijela i samo 4-5% upadne zrake je reflektirano dok se ostalo apsorbira i reflektira raspršeno na površinu (Jha, 2010). Boja ima tri karakteristike: nijansa, saturacija i svjetlina boje. Svjetlina boje je subjektivan doživljaj promatrača koja opisuje intenzitet kromatičnosti boje. Saturacija se definira kao količina bijelog svjetla umiješanog sa dominantnom bojom, a nijansa je valna duljina dominantne boje koju percipira promatrač. Kromatičnost je zajednička veličina faktora nijanse i saturacije boje. Spektroskopske analize se baziraju uglavnom na emisiji ili apsorpciji zračenja u području UV-a i VIS-a (emisija, apsorpcija i fluorescencija, vanjski elektroni), IR-a i NIR-a (apsorpcija, vibracione sile) radio frekvencija sa NMR-om i

mikrovalova (orijentacija nukleusa; nesparenog elektrona), x i gama zraka (emisija, apsorpcija, fluorescencija i difrakcija) i gama zraka (emisija).

2.2.5. Tekstura

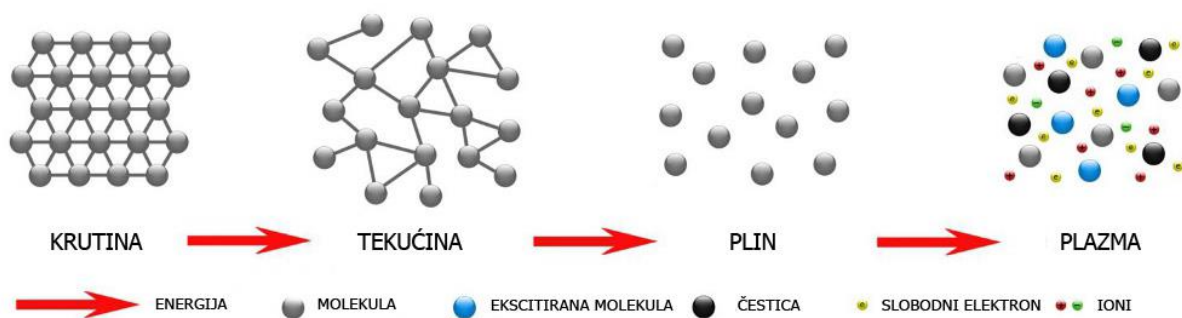
Tekstura je također veoma važan čimbenik u procjeni kvalitete ribe i ostale hrane, općenito ovisi o stanju i udjelu miofibrilarnih proteina i vezivnog tkiva. Mišićna vlakna su bitna kod transverzalnih parametara teksture. Udjel masti u procesiranju riba igra značajnu ulogu na teksturalne promjene. Kod riba s niskim udjelima masti dolazi do promjena na proteinima tijekom zamrzavanja. Produkti oksidacije masnih kiselina se mogu vezati na protein i izazvati veću tvrdoću mišićja. Uz to oštećenja stanične membrane kod bijelih riba može izazvati tvrđu teksturu. Tekstura ribe može biti suha (zbog denaturacije proteina), tvrda (zbog gubitka strukture mišića te zbog reakcija formaldehida sa proteinima) i mekana (zbog enzimske ili bakteriološke proteolize). Teksturalno-reološki parametri kvalitete ribe su tvrdoća, kohezivnost, žvakavost, elastičnost, otpor pri žvakanju. Razne metode su razvijene za analizu teksturalnih promjena, ali mali broj njih dobro korelira sa senzorskim testovima zbog kompliciranih reoloških svojstva mišićnog tkiva. Kod reološkog ispitivanja koriste se sile tlačenja, smicanja i ekstruzije gdje svojstva najviše ovise od omjera miofibrilarnih proteina i vezivnog tkiva. Reklo bi se da senzorska svojstva, uključujući teksturu, najbolje i dalje procjenjuju ljudi, organoleptičkim testovima, istrenirani panelisti. No s druge strane tehnologija napreduje i izrađuju se različiti uređaji koji oponašaju organoleptičke testove i sve bolje im koreliraju. Instrumenti sposobni za mjerenje senzorskih parametara su reometri različitih proizvođača, pr. Bohlin i Instron, mikroskopiranje i analiza slike u procjeni strukturnih promjena na namirnici. Gill i sur. (1979) su razvili metodu, koristeći Instron Model TM sa Kramerovim nožem sa 4 oštrice za smicanje stanica, za procjenu nastalog formaldehida kod otvrđivanja zamrznutog mišićja riba. Metoda je bila u dobroj korelaciji sa analizom panelista. Druga metoda od Johnson i sur. (1980) je za ispitivanje tvrdoće/mekoće mesa riba, uz kompresiju, za mjerenje reverzibilne deformacije (sa klipom), iako interpretacija može varirati. Razvijena je i brza i ne destruktivna metoda za ispitivanje teksture sa prenosivim penetrometrom za mjerenje čvrstoće i otpora kod prodiranja, gdje neke koreliraju i subjektivnim senzorskim ocjenama teksturalne analize. Usporedbu senzorskih testova (čvrstoće i tvrdoće) i instrumentalne analize testirali su mnogi autori gdje su nekima rezultati dobro korelirali za Ksc i test penetracije (sa Allo-Kramer aparaturom) za kuhane i mljevene (bolje nego za filete) uzorke. Ksc metoda, za razliku od Wbc sa jednom

oštricom (i s lošijom korelacijom rezultata), ima više oštrica i zarezuje na različitim mjestima uzorak. Kod usporedbe senzorskog testa tvrdoće i kemijske analize vezivnog tkiva nije se došlo do značajne korelacije. Autori (Tsuchiya i Takahashi, 1950 te drugi autori za meso Pfeiffer, Elsdon i Bailey) su među tim došli do zaključka da je veća korelacija kod fileta ribe nego kod mljevene ribe, jer ne dolazi do promjene kod vezivnog tkiva za razliku od mljevene ribe gdje se potpuno uništi struktura. Također smatraju da je bitnija vrsta međupovezanosti unutar, nego količina vezivnog tkiva (Borderias i sur., 1983).

2.3. VRSTE PLAZME

2.3.1. Općenito o plazmi

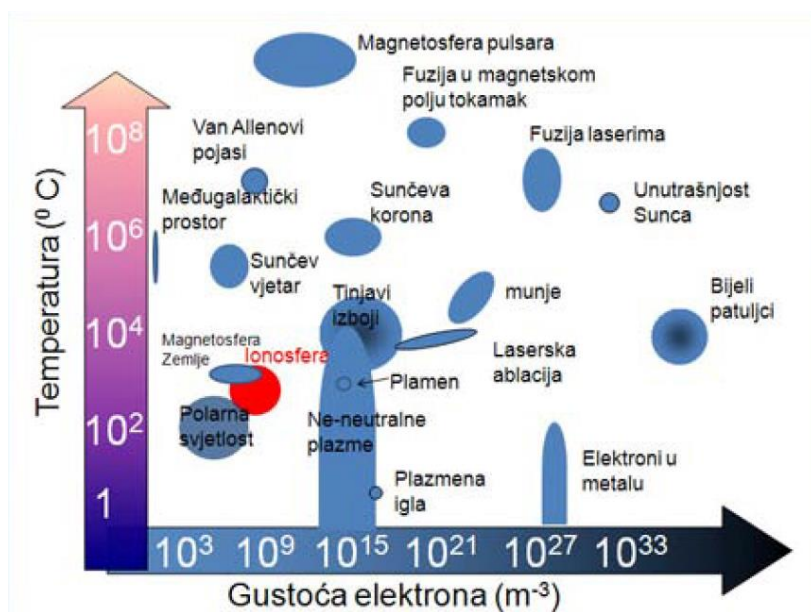
Najjednostavnije rečeno, plazma je četvrto stanje materije sa česticama u ioniziranom stanju (elektroni, ioni i neutralne čestice u pobuđenom ili ne pobuđenom stanju) prikazano na slici 4.



Slika 4. Prikaz agregatnih stanja i porast potrebne energije te tipova čestica u plazmi (AcXys Technologies)

Plazme je moguće opisati pomoću tri osnovna parametra: temperature čestica (mjeri se u eV =11066K), gustoće čestica (br. čestica po m^3) i jačine stacionarnog magnetskog polja (u jedinici Tesla). Obiluje fenomenima koji su prisutni i u drugim oblicima materije. U plazmi se susrećemo sa nelinearnim fenomenima, nestabilnostima i turbulencijama koje izmjenjuju stanje reda i kaosa. Istraživači stalno dolaze do novih saznanja o plazmi u temeljnim i primijenjenim istraživanjima. Veliki potencijal u tehnološkoj primjeni plazme je glavni pokretač takvih istraživanja. Plazmu je prvi opisao Sir William Crooks 1879 nazvavši ju čestica koja zrači. Plazmu je moguće vidjeti u prirodi (munje, aurora borealis, zvijezde, ionosfera, vatra sv. Ilije) ili ju umjetno stvoriti pomoću visoke temperature ili pomoću struje

AC/DC (plazma monitori, fluorescentne lampe, generator ozona, plazma-baklja, induktivno spregnuta plazmena spektrometrija, Teslina zavojnica, zavarivanje). Sve je veća potražnja ready-to-eat minimalno procesiranih proizvoda i s višom nutritivnom vrijednošću što potiče osmišljavanje novih metoda i tehnika procesiranja uključujući korištenje plazme kako bi se dobio proizvod što privlačniji kupcu. Temeljna istraživanja o plazmi su na području ultra hladne plazme, aktivne jednokomponentne plazme, prašinate plazme, laserski proizvedene i plazme visoke gustoće energije, mikroplazme, turbulencije i turbulentni transport u plazmi, magnetska polja u plazmama, plazmeni valovi-strukture i tokovi prikazano na slici 5.



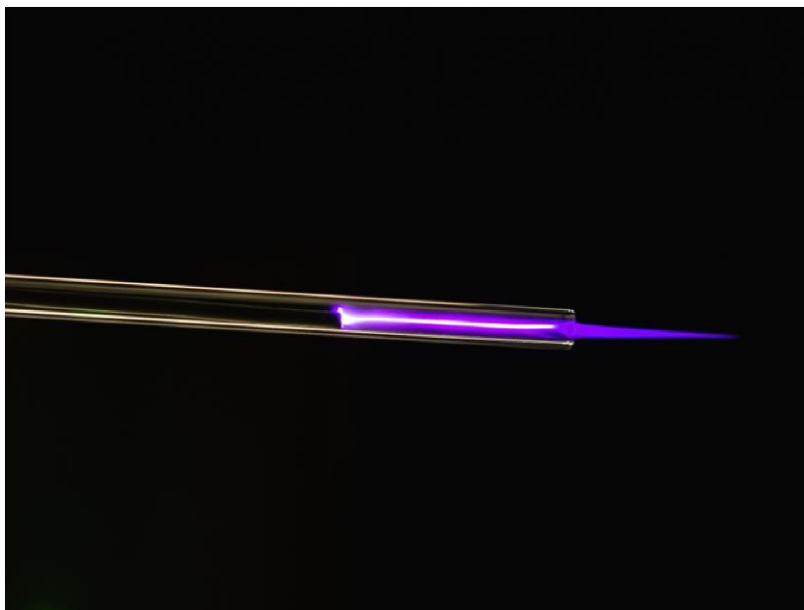
Slika 5. Vrste plazmi s obzirom na temperaturu i gustoću elektrona (Milošević, 2008)

Kada kruto tijelo stavimo u dovoljno vruću okolinu, struktura se razara, pr. led se pretvara u tekućinu, tekućina se pretvara u paru, a molekule plina u pari disociraju na atome i ione. Pritom takve nabijene čestice gibajući se stvaraju električna i magnetska polja koja povratno djeluju na sve te čestice. Plazma nastaje uz pomoć električne energije gdje se energija elektrona prenosi na neutralne čestice u plinu putem sudara. Sudari mogu biti elastični (nema promjene u kinetičkoj energiji) i ne elastični (energija se prenosi na česticu). Kod dovoljno velike energije elektrona u sudaru s neutralnom česticom dolazi do promjene elektronske strukture čestica te do izboja elektrona i pozitivno nabijenih čestica. Što je energija sudara veća to je veća vjerojatnost pobude atoma ili molekule u više energetske stanje, disocijacije atoma molekule, ili ionizacije atoma izbojem elektrona. Ukupni naboj plazme je nula tj. plazma je električki neutralna (ima jednak broj pozitivno i negativno nabijenih čestica) te se brzo i lako vraća u normalno stanje. Takve čestice su nestabilne ili metastabilne i uglavnom

kratkog trajanja do nekoliko nanosekundi nakon čega pobuđeni atomi (više energetska stanje) otpuštaju fotone i vraćaju se u početno neionizirano stanje (niže energetska stanje). Da bi se plazma održala u plinu je stalno potrebno dovoditi energiju. Ovisno o načinu i količini dovedene energije mijenjaju se svojstva plazme izražena kao gustoća elektrona i temperature čestica. Tri su osnovna procesa u atomu: stimulirana apsorpcija, stimulirana emisija i spontana emisija. Stimulirana apsorpcija se odvija ako atom obasjamo svjetlošću fotonima koji energetski odgovaraju nekom od mogućih prijelaza elektrona iz jedne orbitale u drugu. Apsorbirati će se foton, a elektron prelazi u pobuđeno stanje, u orbitalu više energije. Spontana emisija se događa kod pobuđenog atoma, kad elektron iz pobuđene orbitale prijeđe u nižu energetska orbitalu uz emisiju fotona. Za plazmu se već našla tehnološka primjena u medicini kod sterilizacije i kirurgije, pr. Sameer i sur. (2007) su demonstrirali specifično djelovanje DBD (Dielektrično pražnjenje barijere) plazme na agregaciju fibrinogena, bez utjecaja na albumin, koje potiče prirodni mehanizam koagulacije i zarastanja. Također se koristi kod zavarivanja i pročišćavanje vode i zraka, kod spaljivanja otpada, u ispitivanju nastanka fuzije.

2.3.2. Jet plazma

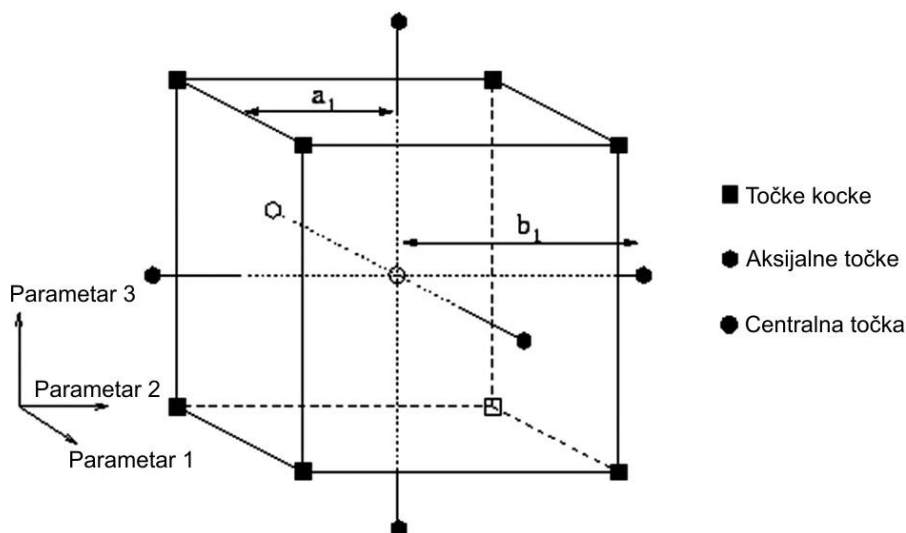
Atmosferska jet plazma pod tlakom (APPJ-Atmospheric Pressure Plasma Jet) je ne termalna induktivno spregnuta plazma koja radi pri radio frekvenciji (Rf) 13,56 MHz ili 27,12 MHz. Sastoji se od dvije elektrode u različitim izvedbama sa međusobnom udaljenosti od par mm i par cm od uzorka. Ovisno o tipu plina i razmaku elektroda uglavnom se koristi paljenje od 100 V do 1 kV što rezultira snagom od 500W. Tipično se koriste plemeniti plinovi helij (He) i argon (Ar), iako se može koristiti i dušik, zrak i smjese plinova, protoka plina do 1L_{st}/min. Pod atmosferskim tlakom uz plemeniti plin uzorak se može tretirati i vakuumskim ultraljubičastim (VUV) zračenjem pri 256nm (Ehlbeck i sur., 2011). Velika prednost APPJ je u maloj dimenziji plazme u kombinaciji sa mogućnošću penetracije u uske pukotine. Još jedna prednost APPJ je u mikrobiološkoj inaktivaciji kod jetkanja polimera i metale i metalnih oksida. S druge strane mana APPJ je u visokoj potrošnji plina, ne ekonomičnoj uporabi protoka višeg od 10 L/min i nepraktičnosti obrade trodimenzionalnih objekata. Produženjem vremena tretiranja povećava se površina dekontaminirane sredine. Na slici 6. prikazana je jet plazma koja nastaje u kapilari na završetku metalne žice.



Slika 6. Jet plazma korištena u medicinske svrhe za dekontaminaciju (Technische Universiteit Eindhoven)

2.4. DIZAJN EKSPERIMENTA

Kada se želi proizvesti neki novi proizvod ili napraviti scale up potrebna su mnoga višestupanjska istraživanja i eksperimentiranja uslijed kojih se troši mnogo vremena i resursa. Zbog kompleksnosti kod izrade novih proizvoda, specifičnih potražnji kupaca, riskantnog i skupog provođenja ispitivanja, razvijeni su i razvijaju se različiti modeli planiranja eksperimenata. Bitni parametri su kvaliteta proizvoda, količina upotrijebljene sirovine, formulacija i u konačnici sama cijena proizvoda. Pritom se koriste različite statističke analize metodologija odzivne površine (RSM-response surface methodology), Centralni kompozitni dizajn (CCD) prikazan na slici 7. i algoritmi poput višekriterijskog adaptivnog oblikovanja planova pokusa (VAOPP). Postavljaju se ulazne varijable (pr. protok, vrijeme tretiranja, temperatura) i izlazni parametri kvalitete (poput boja, CFU/mL, ocjena organoleptičkog ispitivanja, tekstura, arome, udio vitamina i dr.). Mnogi istraživači griješe optimizirajući samo jedan po jedan parametar dok su ostali konstanti čime se troši vrijeme i ne uzima se u obzir interakcija između parametara. Često se dobivaju različiti i krivi podaci koji ne koreliraju s drugim metodama (Režek Jambrak, 2011).



Slika 7. Grafički prikaz CCD-Central composite design gdje je centar izlazni podatak o optimalnim parametrima (Plasun, 1999)

Dva su osnovna tipa pristupa mjerenju i analizi pojava, prvi je nekontrolirani (prati se proces) sa nastankom regresijskog modela, a drugi je kontrolirani poznat po pojmu planiranje pokusa (Montgomery, 1997). Kako bi se donijela prava odluka i lakše došlo do relevantnih zaključaka o nekoj pretpostavci potrebno je prethodno provesti planiranje eksperimenta. Planiranjem pokusa mogu se optimizirati i laboratorijski pokusi i proizvodni procesi u postrojenjima te scale up koji je veliki izazov zbog nelinearnosti dvaju modela. Najbitnije u samom eksperimentiranju je odabir modela sa varijablama kontinuiranog obilježja po kojem bi se eksperiment trebao provesti, a uz to je također bitno biti što vremenski efikasniji i pritom utrošiti manje sredstava. Bitna je i preciznost procjene koja je izražena pomoću standardne devijacije koja se temelji na broju ponavljanja i procijenjenoj varijanci. Prednosti uporabe optimalnih planova (Cajneru 2011) pokusa očituju se kroz tri osnovne stavke a to su:

- 1) Modeli se mogu optimirati kada je prostor pokusa ograničen.
- 2) Moguća je uporaba različitih tipova faktora.
- 3) Ušteda na troškovima eksperimentiranja može se ostvariti uporabom manjeg broja provedenih pokusa.

Korištenjem razvijenih algoritama u početnoj fazi izbjegava se nedostatak podataka i postižu se uštede na vremenu i troškovima provedbe eksperimenata. U današnje vrijeme uz pažnju na ekonomičnost metode sve je veća ekološka osviještenost te se pažnja posvećuje optimiranju procesa i izradi prihvatljivih modela sa što manje traćenja sredstava.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. PRIPREMA I PROVEDBA EKSPERIMENTA

Preliminarnim ispitivanjem, pokazalo se da sa udaljenošću manjom od 2 cm ili protokom plina pri 2,5 L/min dolazi do točkastog spaljivanja uzorka. U ovom radu praćeno je pet parametara kvalitete, nakon i prije tretmana ne-toplinskom plazmom, uzoraka ribe. Kemikalije korištene u ovom radu su analitičke čistoće. Dvadeset i četiri sata prije provedbe tretmana i analize uzorka ribe, za svaki eksperiment po jedna riba, prebačena je u hladnjak radi odmrzavanja. Pomoću preliminarnih mjerenja odabrani su parametri koji će se koristiti za daljnje eksperimente. Utvrđene su gornje i donje granice protoka plina od 1 L/min do 2 L/min i vrijeme tretiranja od 5 minuta pa do 15 minuta. Prethodno spomenute vrijednosti uvrštene su u program za dizajn eksperimenta, Statgraphics, te je program odredio kombinaciju ulaznih parametara za ispitivanja 10 uzoraka prikazanih u tablici 2.

3.2. PLANIRANJE I OPTIMIRANJE EKSPERIMENTA

Koncept planiranja pokusa je baziran na mogućnosti kontrole utjecajnih faktora u istraživanom procesu, te oblikovanje modela po stohastičkom načelu, a radi eliminacije utjecaja nekontroliranih faktora u procesu. Putem RSM metode tražena je odgovarajuća aproksimacijska veza y i nezavisnih varijabli. U slučaju da postoji nelinearnost i da linearna funkcija nije odgovarajuća, za aproksimaciju odziva korišten je polinom višeg stupnja:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad /1/$$

U cilju da se utvrdi statistički utjecaj vremena tretiranja plazmom i protoka plina na izlazne parametre kvalitete ribe za planiranje, dizajn i obranu podataka korišten je računalni program STATGRAPHICS Centurion (StatPoint tehnologija, Inc). Konačni cilj RSM-a je određivanje optimalnih uvjeta procesa i sustava, ili utvrđivanje područja faktora u kojem su radne specifikacije ili ograničenja zadovoljena.

U planiranju eksperimenta korišten je 2 faktorijalni plan (vrijeme tretiranja i protok plina), tzv. centralno kompozitni plan (*central composite design*) koji se sastoji od tri dijela: (a)

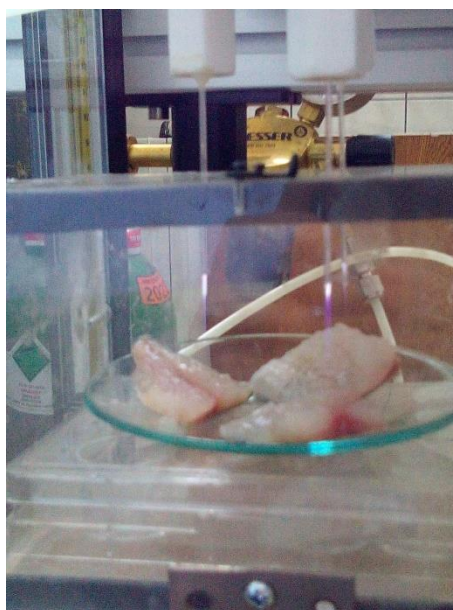
potpunog faktorijskog plana pokusa na dvije razine (+1 i -1); (b) centralne točke gdje razina svakog čimbenika ima srednju vrijednost (0,0,...,0) i (c) osnovnog dijela koji se sastoji od osnih točaka smještene na k jednako razmaknute osi na udaljenosti od centralne točke. Ukupni broj pokusa u takvom kompozitnom planu iznosi , u našem slučaju je $N = 22 + 2 \cdot 2 + 2$, pri čemu je 2 broj ponavljanja srednje točke. Izbor vrijednosti određuje karakteristiku plana, odnosno njegovu ortogonalnost i okretljivost, što ovisi o broju čimbenika i broju ponavljanja istovrsnih uvjeta. U našem slučaju korišten je face centered plan. Ne ulazeći u objašnjavanje tih pojmova može se reći da se ispunjavanjem tih uvjeta postiže nezavisnost informacija koje se mogu izvući iz provedenog plana, a time i pouzdanije zaključivanje (Salopek, 2004). Rezultati su statistički obrađeni te prikazani putem Metoda odzivne površine - RSM (engl. Response Surface Methodology). RSM obuhvaća skup statističkih i matematičkih metoda koje se primjenjuju za razvoj, poboljšanje i optimiranje procesa. Mjerljiva veličina kvalitete proizvoda ili procesa naziva se odziv (Rujnić-Sokele, 2008). Osnovna ideja metode odzivne površine jest dobiti odnos utjecajnih (nezavisnih) faktora na zavisnu varijablu (odziv) kroz odzivnu funkciju (Cajner, 2011). Kao uvjet za uporabu RSM-a trebaju postojati barem dvije nezavisne varijable (x_1, x_2) i jedna zavisna varijabla (y).

Tablica 2. Ulazni parametri, vrijeme tretiranja i protok plina argona, obrade komada fileta ribe

UZORAK	VRIJEME TRETIRANJA	PROTOK PLINA
R1	10min	1,5 L/min
R2	5min	1 L/min
R3	10min	1 L/min
R4	15min	1,5 L/min
R5	5min	2 L/min
R6	15min	2 L/min
R7	10min	2 L/min
R8	15min	1 L/min
R9	10min	1,5 L/min
R10	5min	1,5 L/min

Tretman uzorka proveden je pomoću jet-plazme. Kao izvor plazme koristi se atmosferski mlaz sa jednom elektrodom, End-field mlazni tip (Law i sur., 2012). Kao operativni plin koristi se argon. Sastavljen je od teflonskog kućišta na koji je pričvršćena staklena kapilarna cjevčica dužine 7,5 cm, unutarnjeg promjera 0,1 cm, vanjskog promjera 0,15 cm. Korišten je uređaj sa 3 takve cjevčice postavljenih na najbližu moguću razdaljinu jedne od druge koliko je dopuštala fizika električnog polja stvaranja plazme. Unutar cjevčice je smještena bakrena cjevčica promjera 100 μm koja je pričvršćena na izvor visokog napona preko vakuum čvrste spojnice. Izvor od 6 W daje 2.5 kV pri frekvenciji od 25 kHz-a. Realna struja iznosi 3 mA, a realna snaga plazme iznosi 4 W. Na cjevčicu je također spojen izvor argona čiji se protok regulira rotametrom. Od ulaznih parametara reguliran je protok argona (1 L/min, 1,5 L/min i 2 L/min) i vrijeme samog tretmana (5 min, 10 min i 15 min). Udaljenost izvora plazme od uzorka ribe konstantan je i iznosi ~ 2 cm.

Kao uzorak korištena je riba brancin (*Sparus aurata*) iz akvakulture tvrtke Cromaris. Riba su nakon ulova zajedno zamrznute u blok i po dolasku na fakultet, pojedinačne ribe prepakirane su u zasebnu ambalažu i nastavljeno je njihovo skladištenje pri -18°C . Kod pripreme uzoraka ribe, riba se čistila od ljusaka, kostiju i uklonila se glava s kralježnicom. Od mesnatog dijela očišćene ribe uklonio se potrbušni dio i ostavljen je samo dorzalni filet. Kako bi filet stao u aparaturu za tretiranje plazmom, morao se narezati na 3 dijela, otprilike podjednake mase od 20 g, koji su kod svakog tretmana, ispitivanja boje i teksture bili postavljeni na satno staklo na jednolik način prikazan na slici 8. Jedna strana ribe je korištena za tretman i ispitivanje dok drugi nije bio tretiran i korišten je za usporedbu.



Slika 8. Uzorak ribe podvrgnut plazmi u zatvorenoj posudi pod atmosferom argona

3.3. MATERIJALI I METODE ZA PROVEDBU MIKROBIOLOŠKIH TESTOVA

Kod mikrobioloških testova korištene kemikalije su Biolife[®] proizvođača: VRBG agar, XLD agar, nutrient agar, tehnički agar, peptonski ekstrakt i destilirana voda. Od materijala i pribora korištena je tehnička vaga (Axis[®] BTA 2100D), mikrovalna pečnica (Vivax[®] MWO-8200 SS), autoklav (Sutjeska[®] Fabrika medicinskih uređaja i instrumenata), laminar (Klimaoprema[®] Cleanroom technology), inkubatori (Termo[®] modeli EBT medicinski aparati Badalec&Havočić i BTES-frigomat), brojač kolonija (Labormed[®] LKB 2002), jednokratne PVC petrijeve zdjelice, sterilni štapići za briseve sa futrolom (Copan[®] Sterile R[®]), pinceta, špatulica, štapić po Drigalskom, pipetman od 100-1000 mL (Hirschmann[®]), 10-100 mL i 1000-5000 mL (Labware LLG[®]) sa jednokratnim autoklaviranim nastavcima, autoklavirane staklene epruvete i staklene boce za podloge.

Nakon čišćenja i rezanja ribe, sa uzorka za tretiranje je, pomoću sterilnih štapića, uzet bris. Sa istog uzorka nakon tretiranja plazmom u atmosferi argona uzet je drugi bris. Brisevi su uzeti trljanjem štapića preko cijele površine tri komada ribe te su stavljeni u peptonsku otopinu radi revitalizacije mikroorganizama. Nakon otprilike 30 minuta-sat vremena otopine su spremne za razrjeđivanje. Pripremljene, i opisane u daljnjem tekstu, podloge su korištene za evaluaciju mikrobiološke kontaminacije. Kod nacijepljivanja razrjeđenja za ukupni broj mikroorganizama uzet je po jedan mL uzorka i uz miješanje prelijevan sa 15-20 mL hranjivom podlogom pri 45-55°C. Kod ispitivanja prisutnosti Salmonelle i enterobakterija podloge su već bile napravljene te se 100 µL svakog razrjeđenja premazalo preko zasebne podloge. Podloge sa uzorcima su zatim ostavljene na kratko sušenje u laminaru te su prebačene u inkubator kako za ukupni broj tako i za Salmonellu i enterobakteije. Inkubacija je za ukupni broj mikroorganizama trajala tri dana pri 30°C, a za Salmonellu i enterobakterije jedan dan pri 37°C. Nakon datog perioda provedeno je brojanje kolonija u nekim slučajevima sa, a u nekima bez brojača kolonija, ovisno od gustoće kolonija. Kod izračuna broja jedinki koje formiraju kolonije korištena je slijedeća formula:

$$CFU = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{upotrebljeni volumen uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razr.} \quad /2/$$

Nutrient agar

Za izradu nutrient agara potreban je uz njega još i tehnički agar. Korišteno je 150 mL otopine, što je otprilike idealno za 8 petrijevih zdjelica, da ne dođe do izlivanja zbog vrenja u

mikrovalnoj i kako se ne bi trebalo prebacivati iz jedne u drugu reagens bocu. Za pripremu 150 mL nutrient agara u čistu reagens staklenku od 250 mL izvaže se 1,2 g nutrient agara i 3,0 g tehničkog agara. Proces je puno brži ako se postepeno dodaje 150 mL hladne destilirane vode uz miješanje na ultrazvučnoj kupelji. Potom se stavi u autoklav na 15 minuta nakon čega se hladi na sobnoj temperaturi i stavlja na čuvanje u hladnjaku do same uporabe. Prilikom uporabe najlakše ga je otopiti u mikrovalnoj pećnici kroz nekih minutu i po ili dvije te je približno odmah i na željenoj temperaturi.

Peptonska otopina

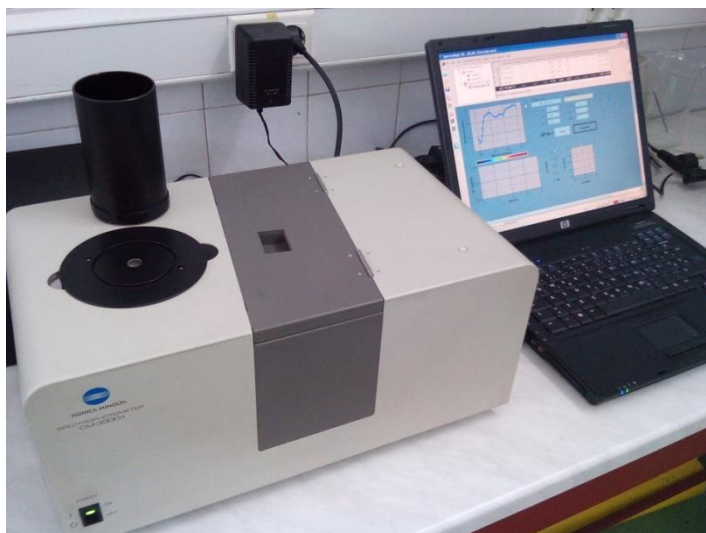
Kod izrade peptonske otopine koristi se 20 g peptonskog bujona na 1000 mL hladne destilirane vode. Miješa se dok većina praha nije otopljena u vodi te se stavlja u autoklav na 15 minuta. Nakon autoklaviranja otopina se hladi do sobne temperature i skladišti u frižideru do uporabe. Prilikom uzimanja otopine iz reagens boce korišteni su sterilni autoklavirani nastavci za pipetmane zbog mogućih kontaminacija, a otopina se koristi kroz duži period.

VRBG agar je selektivni medij za brojanje enterobakterija izoliranih iz namirnica. Pripremljen je na način opisan na samoj ambalaži za 500 mL otopine. Ne autoklavira se. Otopi se 20,75 g u 500 mL hladne destilirane vode. Grije se do vrenja uz stalno miješanje dok se potpuno ne otopi. Hladi se do 45–50°C te se rasporedi jednakomjerno da pokrije površinu petrijevih zdjelica. Nakon kratkog sušenja i aklimatizacije na sobnu temperaturu, kako bi se izbjegla kondenzacija, pohranjuje se u frižider do daljnje uporabe.

XLD agar je selektivni medij za izolaciju Salmonelle i Shigelle. Priprema se na isti način kao VRBG agar također bez autoklaviranja isto za 500 mL otopine. Otopi se 27,5 g u 500 mL hladne destilirane vode. Zagrijava se do vrenja sa čestim miješanjem kako bi se sve otopilo. Potom se hladi na 45–50°C. Jednakomjerno se rasporedi, otprilike 10-15 mL po jednoj, u sterilne petrijeve zdjelice te se suše i aklimatiziraju te pospremaju u frižider do daljnje uporabe.

3.4. ANALIZA BOJE

Analiza boje je provedena za svojstvo "refleksija" na Konica Minolta specrophotometer CM-3500d sa pločom promjera otvora 8 mm prikazanom na slici 9. Uzorci (3 komada fileta sa kožom na gornjoj strani) se stave na otvor i poklope sa duguljastim tuljcem te se pokrene snimanje prilikom čega se ispod ploče aperture 8 mm otvori podnožje i uzorak se nakratko osvijetli te se očita refleksija.



Slika 9. Konica Minolta spektrofotometar CM-3500d sa pločom promjera otvora 8 mm

Parametri boje L^* (svjetlina i tama), a^* (zelenilo ili crvenilo), b^* (plavilo ili žutilo) određivani su uz pomoć Konica Minolta CM 3500-d kolorimetra. Rezultati su prikazani vrijednostima L , a i b , dC i h . Ton boje (C^*) i razlika u tonu boje izračunati su na osnovu slijedećih formula:

$$C^* = \sqrt{a^2 + b^2} \quad /3/$$

$$\Delta C^* = C_{\text{uzorak}} - C_{\text{standard}} \quad /4/$$

Zasićenost boje (ΔH) određivana je na osnovu niže navedene formule:

$$\Delta H = \sqrt{\Delta E^2 - \Delta L^2 + \Delta C^2} \quad /5/$$

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad /6/$$

Ukupna promjena boje izračunata je na osnovu izmjerenih parametara:

Značenje dobivenih vrijednosti ukupne promjene boje:

- + ΔL - uzorka je svjetliji od standarda
- ΔL - uzorak je tamniji od standarda
- + Δa - uzorak je crveniji od standarda
- Δa - uzorak je zeleniji od standarda
- + Δb - uzorak je žutiji od standarda
- Δb - uzorak je plaviji od standarda

3.5. ANALIZA TEKSTURE

Analiza teksture je provedena na Stable Micro Systems TA-HD plus texture Analyser sa nastavkom od 30 kg i promjerom sonde od 6 mm. Uređaj je prikazan na slici 10. Uzorak, uvijek u istom slijedu sa kožom na donjoj strani, se postavi na otvor ispod sonde teksturalnog analizatora. Rezultati veoma variraju i od malih promjena uzorkovanja. Sonda se spušta do uzorka nakon čega započinje penetraciju brzinom penetracije 2 mm/s do 2 cm dubine nakon čega se vraća na početnu udaljenost pritom mjereći tvrdoću, elastičnost i rad.

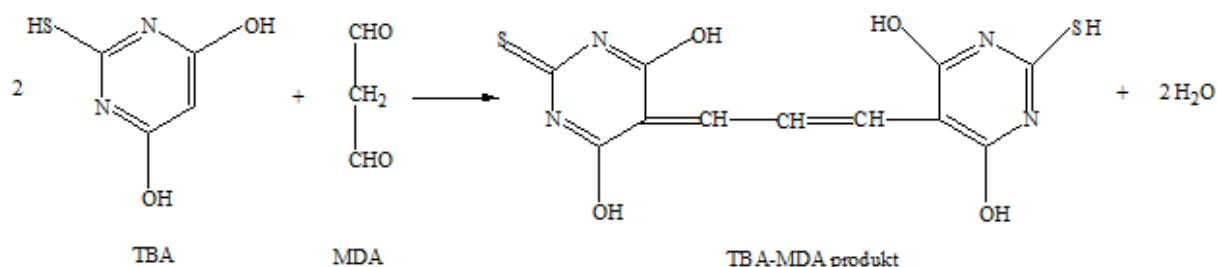


Slika 10. Stable Micro Systems TA-HD plus texture Analyser, nastavak 30 kg i promjer sonde 6 mm

3.6. ODREĐIVANJE OKSIDACIJE MASTI

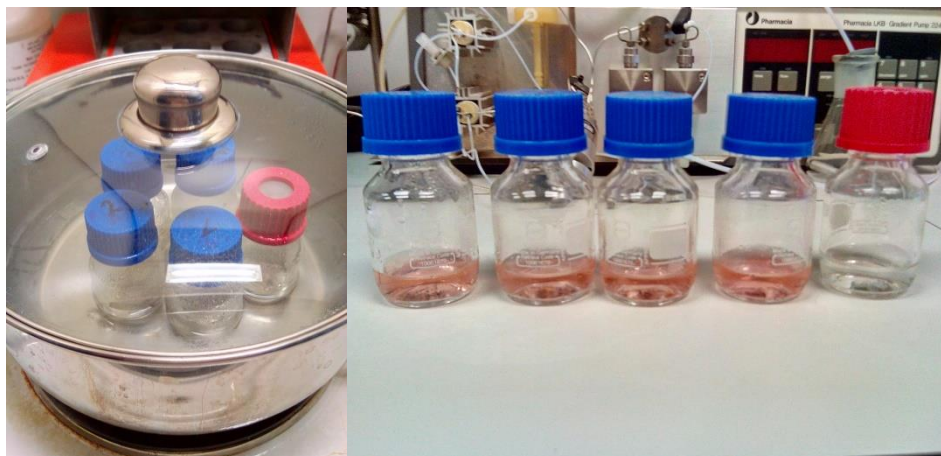
Kod određivanja oksidacije masti od kemikalija su korištene: Trikloroctena kiselina (Carlo Erba), tiobarbiturna kiselina (Acros Organics), propil galat (SIGMA Life Science), 2,2',2'',2'''-(etan-1,2-diildinitrilo) tetraoctena kiselina - EDTA (GRAM-MOL d.o.o.); od materijala i uređaja: štapni mikser sa posudom, homogenizator (IKA® Ultra-Turax T18 basic), falkon epruvete, pinceta, špatulica, filter papir, lijevak, čaše od 100 mL, pipete od 5 mL, staklene reagens bočice, kuhalo, analitička vaga (KERN & Sohn GmbH® ABS 220-4), spektrofotometar (Unicam® Helios β) pri valnoj duljini 538 nm. Korištena je metoda prema Lemon (1975) za određivanja oksidacije masti. Uzorak se usitni prvo u mikseru, a zatim se 10 g uzorka, sa točnošću na 4 decimale, stavi u falkon epruvetu (50 mL) i doda 20 mL 7,5%

TCA (0,5 g EDTA, 0,5 g propil galata i 75 g soli trikloroctene kiseline na 1000 mL destilirane vode). EDTA i propil galat služe kako bi zaustavili daljnju oksidaciju masti. Uzorak sa otopinom TCA se dodatno usitnjava sa homogenizatorom kojih 2 minute sve dok više nema sitnih mrvica. Pusti se 30 minuta da se stalože proteini i odvoje od masne frakcije. Nakon 30 minuta se profiltrira preko filter papira. Potom se uzme 5 mL filtrata i stavi u malu reagens bocu otpornu na temperaturu vrenja pod povišenim tlakom. Doda se još 5 mL 0,02 molarne otopine TBA (3,75 g TBA soli u 200 mL destilirane vode). Kao slijepa proba služi 5 mL destilirane vode i 5 mL otopine TBA. Bočice se zatvore i stave u lonac sa kipućom vodom razine da prelazi nivo u bočicama i s toliko vode da ne ispari kroz 40 minuta kuhanja. Povišenje temperature potiče reakciju između tiobarbiturne kiseline i malonilaldehida prikazano na slici 11.



Slika 11. Reakcija tiobarbiturne kiseline sa malondialdehidom (Matijašević-Oštrić i Turkulov, 1980).

Nakon točno 40 minuta bočice se prebace u posudu sa istom razinom hladne destilirane vode kako bi se zaustavila daljnja reakcija (reakcija ovisna o temperaturi). Bočice su prikazane na slici 12. na samom početku reakcije i nakon razvitka boje poslije 40 minuta kuhanja. Potom se bočice ostave neko vrijeme da im temperatura padne na sobnu temperaturu te se pomoću spektrofotometra mjeri apsorbancija pri 538 nm. Pritom se koriste staklene kivete.



Slika 12. Staklene bočice s uzorkom i otopinom TBA, uz slijepu probu (crveni čep), u kuhalu i nakon 40 minuta kuhanja i razvitka boje

3.7. SPOSOBNOST VEZANJA VODE (SVV)

Kod određivanja sposobnosti zadržavanja vode korišteni su slijedeći uređaji i materijali: štapni mikser sa posudom, staklene petrijeve zdjelice, falkon epruvete, pinceta, špatulica, filter papir, utezi od 200 g, aluminijska posudica sa kvarcnim pijeskom, sušnica, analitička vaga. Metoda određivanja vode je prema AOAC 950.46 iz 1984. godine te je veoma jednostavna i također dobro korelira sa kompleksnijim metodama te se i standardno koristi u laboratoriju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta za određivanje vode u ribi i mesu. Uzorak se prvo usitni u mikseru te se odvoji od kože (jednostavnije ako su oštrice tupe). Izvaže se otprilike 2 g na 4 decimale sa analitičkom vagom te se stavi na, jednaki način prethodno izvagani, filter papir. Filter papir se presavije i stavi između ravnih ploha petrijeve zdjelice i opteretiti sa utegom od 200 g što je prikazano na slici 13. Nakon 15 minuta se ukloni opterećenje i u što kraćem vremenu i ostatak ribe te se filter papir izvaže pomoću analitičke vage. Razlika između suhog i filter papira sa apsorbiranom vodom koristi se za izračun sposobnosti vezanja vode. Uz taj podatak potreban je i podatak sastava ribe tj. udio vode. Udio vode se prethodno izračuna iz razlike prije i nakon sušenja usitnjenog uzorka 1h pri 105°C prema formuli 10 (masa vode) ili 11 (postotak ispuštene vode):

$$(m_3 - m_1) / m_2 \quad /7/$$

m_1 - masa posudice sa uzorkom nakon sušenja

m_2 - masa uzorka

m_3 - masa posudice sa uzorkom prije sušenja

Tu se koristi otprilike 3 g usitnjenog uzorka izvaganog na 4 decimale, aluminijska posudica sa kvarcnim pijeskom i staklenim štapićem.

$$w(H_2O) = (m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) \times 100 \quad /8/$$

m_0 - masa Al-posude sa kvarcnim pijeskom i poklopcem (g)

m_1 – masa Al-posude sa pijeskom i neosušenim uzorkom i poklopcem (g)

m_2 – masa Al-posude sa osušenim uzorkom i poklopcem (g)



Slika 13. Metoda određivanja sposobnosti vezanja vode kod usitnjenog uzorka ribe pod opterećenjem

4. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati za statističku obradu podataka dani su u tablicama 3-6. Rezultati analize varijance za izlazne parametre obrade ribe ne toplinskom plazmom (ukupni broj mikroorganizama, log CFU, enterobakterije, L, a, b, dC, h, sposobnost vezanja vode, TBA vrijednost, tvrdoća, elastičnost, rad) prikazani su u tablicama 7-19. U tablici 20. prikazani su statistički parametri regresije i analize. U tablici 21. prikazani su polinomi optimizacije (drugog reda) kojima su opisana provedena tretiranja ribe ne toplinskom plazmom te optimalni faktori tretmana plazmom i optimalne vrijednosti analiziranih parametara. 3D grafovi odzivne površine u prostoru, nakon obrade plazmom, zajedno s konturnim dijagramima izlaznih parametara prema dobivenim polinomima drugog reda prikazani su u tablicama 22-28.

Tablica 3. Rezultati mikrobioloških ispitivanja netretiranog i tretiranog uzorka ribe (R1-NT – R10-NT i R1-R10)

Uzorak	Vrijeme tretiranja (min)	Protok plina (L/min)	Ukupni broj bakterija (CFU/mL)	Log CFU	Salmonella (CFU/mL)	Enterobakterije (CFU/mL)
R1-NT			110		0	0
R2-NT			30		0	0
R3-NT			240		0	0
R4-NT			160		0	0
R5-NT			70		0	0
R6-NT			230		0	0
R7-NT			270		0	0
R8-NT			960		0	4
R9-NT			900		0	0
R10-NT			370		0	0
R1	10	1,5	2100	-1,28083	0	1
R2	5	1	30	0	0	0
R3	10	1	240	0	0	0
R4	15	1,5	80	0,30103	0	0
R5	5	2	20	0,54407	0	0
R6	15	2	90	0,40749	0	0
R7	10	2	50	0,73239	0	0
R8	15	1	410	0,36949	0	0
R9	10	1,5	670	0,12817	0	0
R10	5	1,5	40	0,96614	0	0

Tablica 4. Rezultati analize boje netretiranog i tretiranog uzorka ribe (R1-NT – R10-NT i R1-R10)

Uzorak	Vrijeme tretiranja (min)	Protok plina (L/min)	L	a	b	dC	h
R1-NT			46,95000	-3,31667	0,15000	3,58333	176,74667
R2-NT			42,41667	-1,74333	3,51000	5,77333	143,62333
R3-NT			47,39000	-3,25000	1,58000	3,74667	152,97667
R4-NT			46,97000	-3,36333	1,48667	4,39333	161,09000
R5-NT			45,26333	-0,15667	5,95667	7,29000	106,90667
R6-NT			51,34000	-3,66667	1,07667	3,86667	163,27333
R7-NT			47,53000	-2,30667	1,33667	4,26000	159,56667
R8-NT			51,02333	-3,81000	2,89333	5,31667	149,44333
R9-NT			48,65667	-3,36667	2,30667	5,25000	155,35333
R10-NT			45,78000	-2,52000	2,66000	4,49000	139,31000
R1	10	1,5	46,53333	-2,08667	1,54000	3,76333	140,92333
R2	5	1	38,89333	-1,56000	3,22667	4,95000	139,43333
R3	10	1	50,99667	-2,96333	2,56333	4,82333	145,79333
R4	15	1,5	45,19667	-3,14333	1,07333	4,70333	170,92333
R5	5	2	45,15333	-0,90000	3,40667	5,14667	126,33000
R6	15	2	49,52667	-2,32333	4,16333	5,80333	133,84667
R7	10	2	44,55000	-0,91333	2,83000	4,77333	131,86000
R8	15	1	48,20000	-2,74333	3,54667	6,10667	149,38667
R9	10	1,5	48,34000	-3,01667	3,78667	5,96000	143,18667
R10	5	1,5	45,45667	-2,03333	3,05333	4,44667	129,88000

Tablica 5. Rezultati određivanja sposobnosti vezanja vode i oksidacije masti netretiranog i tretiranog uzorka ribe (R1-NT – R10-NT i R1-R10)

Uzorak	Vrijeme tretiranja (min)	Protok plina (L/min)	Sposobnost vezanja vode (% vode)	TBA vrijednost ($\mu\text{mol MDA}$)
R1-NT			19,61	0,0039
R2-NT			17,64	0,0057
R3-NT			18,10	0,0018
R4-NT			17,16	0,0075
R5-NT			19,96	0,0065
R6-NT			13,39	0,0056
R7-NT			14,85	0,0107
R8-NT			17,04	0,0106
R9-NT			15,32	0,0034
R10-NT			15,48	0,0069
R1	10	1,5	16,51	0,0068
R2	5	1	14,98	0,0033
R3	10	1	17,37	0,0025
R4	15	1,5	15,53	0,0087
R5	5	2	18,97	0,0108
R6	15	2	14,01	0,0098
R7	10	2	15,35	0,0131
R8	15	1	16,92	0,0106
R9	10	1,5	15,50	0,0050
R10	5	1,5	13,87	0,0098

Tablica 6. Rezultati analize teksture netretiranog i tretiranog uzorka ribe (R1-NT – R10-NT i R1-R10)

Uzorak	Vrijeme tretiranja (min)	Protok plina (L/min)	Tvrdoća (N)	Elastičnost (mm)	Rad (mJ)
R1-NT			29,9650	17,88433	11421,4160
R2-NT			17,65867	16,5880	7896,45967
R3-NT			30,78633	17,58567	8471,47067
R4-NT			24,86867	15,71033	5644,07033
R5-NT			17,14233	12,79067	4524,58267
R6-NT			28,05367	18,69967	7657,91367
R7-NT			26,49967	15,99367	6375,75667
R8-NT			18,61133	16,24333	5638,2660
R9-NT			23,82133	16,3270	7407,45433
R10-NT			11,07867	18,24033	5059,56633
R1	10	1,5	20,87567	19,92533	8309,77567
R2	5	1	14,99933	16,69467	6771,50467
R3	10	1	16,66733	15,37133	5873,97267
R4	15	1,5	28,93933	16,41333	7889,31467
R5	5	2	14,00133	14,90	6078,52033
R6	15	2	21,05333	17,85333	6551,07567
R7	10	2	22,53433	16,6380	8027,14967
R8	15	1	8,310	17,6510	4415,83233
R9	10	1,5	14,0310	15,460	6602,97467
R10	5	1,5	11,48933	18,86767	5967,32200

Tablica 7. Analiza varijance tretiranih uzoraka (R1-R10) (protok plina i vrijeme tretiranja plazmom) za izlaznu vrijednost ukupni broj mikroorganizama (CFU/mL)

IZVOR	SUMA KVADRATA	STUPNJEVI SLOBODE	SREDNJE ODSTUPANJE	F-Veličina	P-Vrijednost
A-PROTOK PLINA (L/min)	23593	1	23593	0,05	0,8397
B-VRIJEME TRETIRANJA	554557	1	554557	1,09	0,3544
AA	763811	1	763811	1,51	0,2868
AB	24025	1	24025	0,05	0,8382
BB	553719	1	553719	1,09	0,3548
UKUPNA POGREŠKA	2,03E+06	4	506489		
UKUPNA KOREKCIJA	3,71E+06	9			

Tablica 8. Analiza varijance tretiranih uzoraka (R1-R10) (protok plina i vrijeme tretiranja plazmom) za izlaznu vrijednost log CFU

IZVOR	SUMA KVADRATA	STUPNJEVI SLOBODE	SREDNJE ODSTUPANJE	F-Veličina	P-Vrijednost
A-PROTOK PLINA (L/min)	0,05535	1	0,05535	0,23	0,6591
B-VRIJEME TRETIRANJA	0,367051	1	0,367051	1,5	0,2878
AA	1,08706	1	1,08706	4,44	0,1027
BB	0,05819	1	0,05819	0,24	0,6512
UZORAK	0,365057	1	0,365057	1,49	0,2889
UKUPNA POGREŠKA	0,978271	4	0,244568		
UKUPNA KOREKCIJA	3,85698	9			

Tablica 9. Analiza varijance tretiranih uzoraka (R1-R10) (protok plina i vrijeme tretiranja plazmom) za izlaznu vrijednost enterobakterije (CFU/mL)

IZVOR	SUMA KVADRATA	STUPNJEVI SLOBODE	SREDNJE ODSTUPANJE	F-Veličina	P-Vrijednost
A-PROTOK PLINA (L/min)	0	1	0	0	1
B-VRIJEME TRETIRANJA	0,107142	1	0,107142	0,67	0,4601
AA	0,107143	1	0,107143	0,67	0,4601
AB	0	1	0	0	1
BB	0,107143	1	0,107143	0,67	0,4601
UKUPNA POGREŠKA	0,642857	4	0,160714		
UKUPNA KOREKCIJA	0,9	9			

Tablica 10. Analiza varijance tretiranih uzoraka (R1-R10) (protok plina i vrijeme tretiranja plazmom) za izlaznu vrijednost L

IZVOR	SUMA KVADRATA	STUPNJEVI SLOBODE	SREDNJE ODSTUPANJE	F-Veličina	P-Vrijednost
A-PROTOK PLINA (L/min)	5,897	1	5,897	0,44	0,5427
B-VRIJEME TRETIRANJA	0,104636	1	0,104636	0,01	0,9337
AA	11,663	1	11,663	0,87	0,4029
AB	6,08444	1	6,08444	0,46	0,5367
BB	0,103835	1	0,103835	0,01	0,9340
UKUPNA POGREŠKA	53,4155	4	13,3539		
UKUPNA KOREKCIJA	101,458	9			

Tablica 11. Analiza varijance tretiranih uzoraka (R1-R10) (protok plina i vrijeme tretiranja plazmom) za izlaznu vrijednost a

IZVOR	SUMA KVADRATA	STUPNJEVI SLOBODE	SREDNJE ODSTUPANJE	F-Veličina	P-Vrijednost
A-PROTOK PLINA (L/min)	0,0170526	1	0,0170526	0,06	0,8240
B-VRIJEME TRETIRANJA	1,04398	1	1,04398	3,45	0,1367
AA	0,000648148	1	0,000648148	0,00	0,9653
AB	0,0144	1	0,0144	0,05	0,8380
BB	1,03704	1	1,03704	3,43	0,1377
UKUPNA POGREŠKA	1,20992	4	0,30248		
UKUPNA KOREKCIJA	6,23563	9			

Tablica 12. Analiza varijance tretiranih uzoraka (R1-R10) (protok plina i vrijeme tretiranja plazmom) za izlaznu vrijednost b

IZVOR	SUMA KVADRATA	STUPNJEVI SLOBODE	SREDNJE ODSTUPANJE	F-Veličina	P-Vrijednost
A-PROTOK PLINA (L/min)	0,04655	1	0,04655	0,03	0,8678
B-VRIJEME TRETIRANJA	1,82769	1	1,82769	1,24	0,3284
AA	0,146947	1	0,146947	0,10	0,7683
AB	0,0476694	1	0,0476694	0,03	0,8662
BB	1,82458	1	1,82458	1,23	0,3288
UKUPNA POGREŠKA	5,91075	4	1,47769		
UKUPNA KOREKCIJA	8,48825	9			

Tablica 13. Analiza varijance tretiranih uzoraka (R1-R10) (protok plina i vrijeme tretiranja plazmom) za izlaznu vrijednost dC

IZVOR	SUMA KVADRATA	STUPNJEVI SLOBODE	SREDNJE ODSTUPANJE	F-Veličina	P-Vrijednost
A-PROTOK PLINA (L/min)	0,0595832	1	0,0595832	0,08	0,7957
B-VRIJEME TRETIRANJA	0,588636	1	0,588636	0,76	0,4336
AA	0,181691	1	0,181691	0,23	0,6543
AB	0,0625	1	0,0625	0,08	0,7910
BB	0,588902	1	0,588902	0,76	0,4335
UKUPNA POGREŠKA	3,11357	4	0,778392		
UKUPNA KOREKCIJA	4,79907	9			

Tablica 14. Analiza varijance tretiranih uzoraka (R1-R10) (protok plina i vrijeme tretiranja plazmom) za izlaznu vrijednost h

IZVOR	SUMA KVADRATA	STUPNJEVI SLOBODE	SREDNJE ODSTUPANJE	F-Veličina	P-Vrijednost
A-PROTOK PLINA (L/min)	1,10587	1	1,10587	0,01	0,9220
B-VRIJEME TRETIRANJA	186,054	1	186,054	1,83	0,2476
AA	16,7054	1	16,7054	0,16	0,7060
AB	1,48434	1	1,48434	0,01	0,9097
BB	184,794	1	184,794	1,82	0,2490
UKUPNA POGREŠKA	406,834	4	101,708		
UKUPNA KOREKCIJA	1469,29	9			

Tablica 15. Analiza varijance tretiranih uzoraka (R1-R10) (protok plina i vrijeme tretiranja plazmom) za izlaznu vrijednost SVV (% vode)

IZVOR	SUMA KVADRATA	STUPNJEVI SLOBODE	SREDNJE ODSTUPANJE	F-Veličina	P-Vrijednost
A-PROTOK PLINA (L/min)	11,9588	1	11,9588	8,36	0,0445
B-VRIJEME TRETIRANJA	4,95455	1	4,95455	3,46	0,1362
AA	2,18252	1	2,18252	1,53	0,2843
AB	11,9025	1	11,9025	8,32	0,0448
BB	4,95914	1	4,95914	3,47	0,1360
UKUPNA POGREŠKA	5,71963	4	1,42991		
UKUPNA KOREKCIJA	25,3792	9			

Tablica 16. Analiza varijance tretiranih uzoraka (R1-R10) (protok plina i vrijeme tretiranja plazmom) za izlaznu vrijednost TBA ($\mu\text{mol MDA}$)

IZVOR	SUMA KVADRATA	STUPNJEVI SLOBODE	SREDNJE ODSTUPANJE	F-Veličina	P-Vrijednost
A-PROTOK PLINA (L/min)	0,0000170989	1	0,0000170989	2,37	0,1982
B-VRIJEME TRETIRANJA	5,14256E-7	1	5,14256E-7	0,07	0,8025
AA	0,00000848679	1	0,00000848679	1,18	0,3387
AB	0,0000172225	1	0,0000172225	2,39	0,1969
BB	4,87619E-7	1	4,87619E-7	0,07	0,8075
UKUPNA POGREŠKA	0,0000288049	4	0,00000720122		
UKUPNA KOREKCIJA	0,000110344	9			

Tablica 17. Analiza varijance tretiranih uzoraka (R1-R10) (protok plina i vrijeme tretiranja plazmom) za izlaznu vrijednost tvrdoća (N)

IZVOR	SUMA KVADRATA	STUPNJEVI SLOBODE	SREDNJE ODSTUPANJE	F-Veličina	P-Vrijednost
A-PROTOK PLINA (L/min)	47,9037	1	47,9037	1,22	0,3317
B-VRIJEME TRETIRANJA	12,1341	1	12,1341	0,31	0,6082
AA	6,58149	1	6,58149	0,17	0,7035
AB	47,2061	1	47,2061	1,20	0,3348
BB	12,2681	1	12,2681	0,31	0,6063
UKUPNA POGREŠKA	157,333	4	39,3333		
UKUPNA KOREKCIJA	331,589	9			

Tablica 18. Analiza varijance tretiranih uzoraka (R1-R10) (protok plina i vrijeme tretiranja plazmom) za izlaznu vrijednost elastičnost (mm)

IZVOR	SUMA KVADRATA	STUPNJEVI SLOBODE	SREDNJE ODSTUPANJE	F-Veličina	P-Vrijednost
A-PROTOK PLINA (L/min)	1,00525	1	1,00525	0,22	0,6633
B-VRIJEME TRETIRANJA	3,46366	1	3,46366	0,76	0,4328
AA	0,407086	1	0,407086	0,09	0,7801
AB	0,997002	1	0,997002	0,22	0,6645
BB	3,46237	1	3,46237	0,76	0,4329
UKUPNA POGREŠKA	18,2546	4	4,56365		
UKUPNA KOREKCIJA	23,1953	9			

Tablica 19. Analiza varijance tretiranih uzoraka (R1-R10) (protok plina i vrijeme tretiranja plazmom) za izlaznu vrijednost rad (mJ)

IZVOR	SUMA KVADRATA	STUPNJEVI SLOBODE	SREDNJE ODSTUPANJE	F-Veličina	P-Vrijednost
A-PROTOK PLINA (L/min)	1,99993E6	1	1,99993E6	1,60	0,2745
B-VRIJEME TRETIRANJA	1,38643E6	1	1,38643E6	1,11	0,3516
AA	1,4771E6	1	1,4771E6	1,18	0,3381
AB	1,99972E6	1	1,99972E6	1,60	0,2746
BB	1,39567E6	1	1,39567E6	1,12	0,3502
UKUPNA POGREŠKA	4,99878E6	4	1,2497E6		
UKUPNA KOREKCIJA	1,26004E7	9			

Tablica 20. Statistički parametri regresije i analize za tretirane uzorke (R1–R10)

PARAMETRI	UZORAK			
	R ²	R ² (prilagođeno za stupnjeve slobode)	Standardna greška procjene	Apsolutna srednja vrijednost greške
Ukupni broj bakterija	45,4392	0	711,680	368,857
log CFU	74,6364	42,9319	0,495	0,25561
Salmonella				
Enterobakterije	28,5714	0	0,401	0,18571
L	47,3522	0	3,654	2,01933
a	80,5967	56,3425	0,550	0,307222
b	30,3655	0	1,216	0,64554
dC	35,1214	0	0,882	0,389381
h	72,3108	37,6994	10,085	5,44197
TBA	73,8954	41,2646	0,003	0,00143
SVV	77,4633	49,2924	1,196	0,58638
Tvrdoća	52,5517	0	6,272	3,431
Elastičnost	21,3002	0	2,136	1,17194
Rad	60,3284	10,7389	1117,9	647,957

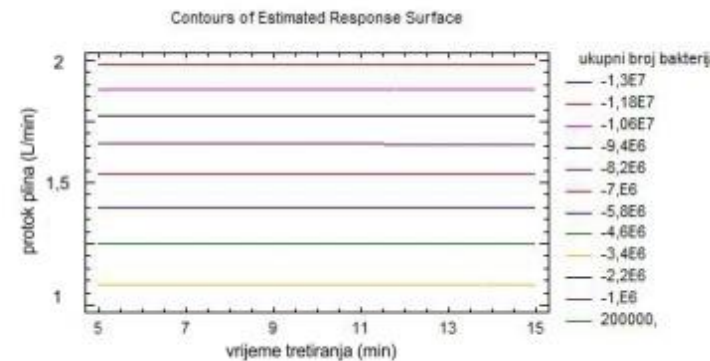
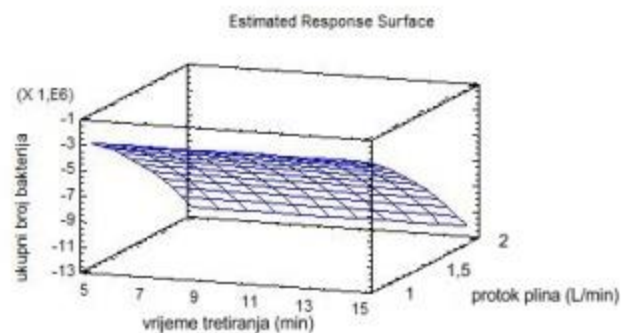
Tablica 21. Polinomi, optimalne vrijednosti i optimalni faktori za tretirane uzorake ribe (R1-R10) netoplinskom plazmom

PARAMETRI	POLINOM	OPTIMIRANE VRIJEDNOSTI PARAMETARA			
		MINIMUM	MAKSIMUM	OPTIMALNI FAKTOR (vrijeme tretiranja i protok plina)	Optimalna vrijednost
Ukupni broj bakterija CFU/mL	$-6032,62 + 520,548 \cdot \text{vrijeme tretiranja} + 5982,38 \cdot \text{protok plina} - 22,8857 \cdot \text{vrijeme tretiranja}^2 - 31,0 \cdot \text{vrijeme tretiranja} \cdot \text{protok plina} - 1948,57 \cdot \text{protok plina}^2$	5	15	5 min	-141,548
		1	2	2 L/min	
log CFU	$-4,19784 + 0,688077 \cdot \text{vrijeme tretiranja} + 4,72366 \cdot \text{protok plina} - 0,0273023 \cdot \text{vrijeme tretiranja}^2 - 0,048245 \cdot \text{vrijeme tretiranja} \cdot \text{protok plina} - 1,58217 \cdot \text{protok plina}^2$	5	15	11,4351 min	2,85054
		1	2	1,31849	
Enterobakterije CFU/mL	$-2,42857 + 0,171429 \cdot \text{vrijeme tretiranja} + 2,57143 \cdot \text{protok plina} - 0,00857143 \cdot \text{vrijeme tretiranja}^2 + 0,0 \cdot \text{vrijeme tretiranja} \cdot \text{protok plina} - 0,857143 \cdot \text{protok plina}^2$	5	15	5 min	-0,0714286
		1	2	1 L/min	
L	$28,0119 + 2,9759 \cdot \text{vrijeme tretiranja} + 2,7819 \cdot \text{protok plina} - 0,0894286 \cdot \text{vrijeme tretiranja}^2 - 0,493333 \cdot \text{vrijeme tretiranja} \cdot \text{protok plina} + 0,84381 \cdot \text{protok plina}^2$				
a	$2,80222 - 0,101222 \cdot \text{vrijeme tretiranja} - 6,71667 \cdot \text{protok plina} + 0,000666667 \cdot \text{vrijeme tretiranja}^2 - 0,024 \cdot \text{vrijeme tretiranja} \cdot \text{protok plina} + 2,66667 \cdot \text{protok plina}^2$				
b	$11,6247 - 0,296373 \cdot \text{vrijeme tretiranja} - 10,6937 \cdot \text{protok plina} + 0,0100381 \cdot \text{vrijeme tretiranja}^2 + 0,0436667 \cdot \text{vrijeme tretiranja} \cdot \text{protok plina} + 3,53714 \cdot \text{protok plina}^2$				

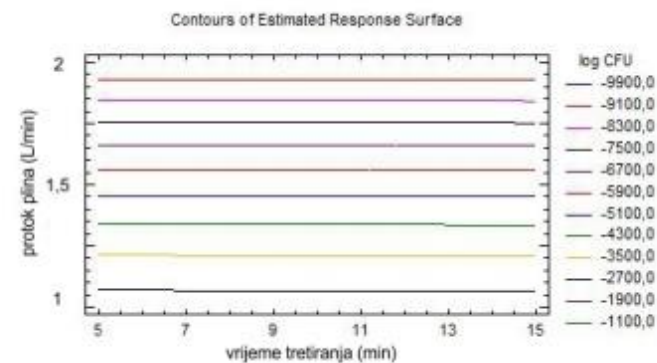
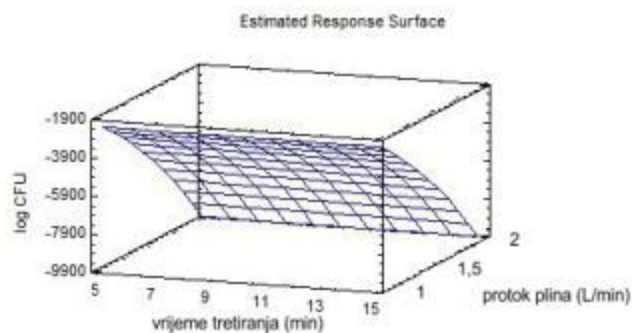
dC	$8,85476 - 0,0792381 \cdot \text{vrijeme tretiranja} - 5,58079 \cdot \text{protok plina} + 0,0111619 \cdot \text{vrijeme tretiranja}^2 - 0,05 \cdot \text{vrijeme tretiranja} \cdot \text{protok plina} + 2,00952 \cdot \text{protok plina}^2$				
h	$73,6287 + 0,175373 \cdot \text{vrijeme tretiranja} + 95,0359 \cdot \text{protok plina} + 0,107029 \cdot \text{vrijeme tretiranja}^2 - 0,243667 \cdot \text{vrijeme tretiranja} \cdot \text{protok plina} - 35,5971 \cdot \text{protok plina}^2$				
TBA ($\mu\text{mol MDA}$)	$-0,00446905 - 0,000107381 \cdot \text{vrijeme tretiranja} + 0,00858095 \cdot \text{protok plina} + 0,0000762857 \cdot \text{vrijeme tretiranja}^2 - 0,00083 \cdot \text{vrijeme tretiranja} \cdot \text{protok plina} + 0,00182857 \cdot \text{protok plina}^2$	5	15	5 min	0,0130774
		1	2	2 L/min	
SVV (% vode)	$15,789 + 1,71238 \cdot \text{vrijeme tretiranja} - 10,9076 \cdot \text{protok plina} - 0,0386857 \cdot \text{vrijeme tretiranja}^2 - 0,69 \cdot \text{vrijeme tretiranja} \cdot \text{protok plina} + 5,83143 \cdot \text{protok plina}^2$	5	15	5 min	17,9943
		1	2	2 L/min	
Tvrdoća (N)	$-1,81284 - 0,123863 \cdot \text{vrijeme tretiranja} + 19,6452 \cdot \text{protok plina} - 0,067179 \cdot \text{vrijeme tretiranja}^2 + 1,37413 \cdot \text{vrijeme tretiranja} \cdot \text{protok plina} - 9,1719 \cdot \text{protok plina}^2$	5	15	5,00168 min	15
		1	2	1,52275 L/min	
Elastičnost (mm)	$10,8384 - 0,585191 \cdot \text{vrijeme tretiranja} + 12,5122 \cdot \text{protok plina} + 0,0167076 \cdot \text{vrijeme tretiranja}^2 + 0,1997 \cdot \text{vrijeme tretiranja} \cdot \text{protok plina} - 4,87257 \cdot \text{protok plina}^2$	5	15	15 min	18,1586
		1	2	1,59139 L/min	
Rad (mJ)	$-121,307 + 213,574 \cdot \text{vrijeme tretiranja} + 7651,02 \cdot \text{protok plina} - 31,8256 \cdot \text{vrijeme tretiranja}^2 + 282,823 \cdot \text{vrijeme tretiranja} \cdot \text{protok plina} - 3093,59 \cdot \text{protok plina}^2$	5	15	11,1047 min	7737,24
		1	2	1,74421 L/min	

Tablica 22. 3 D i konturni dijagrami analiziranih uzoraka (R1-R10) za vrijednosti ukupnog broja mikroorganizama (CFU/mL) i log CFU

Ukupni broj bakterija	3D dijagram odzivne površine	Konturni dijagram odzivne površine
-----------------------	------------------------------	------------------------------------

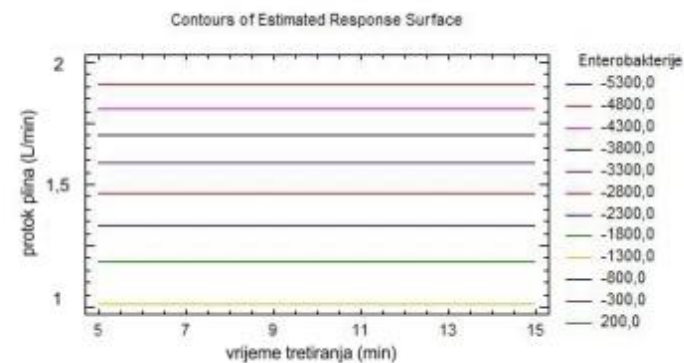
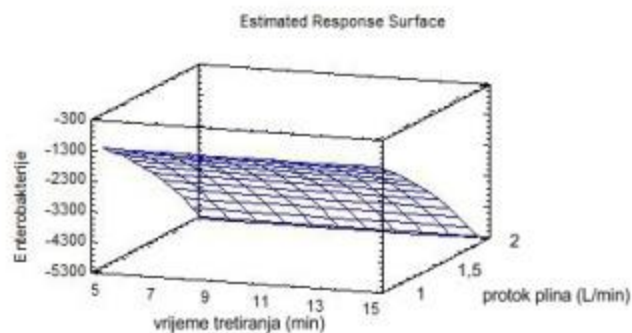


Log CFU

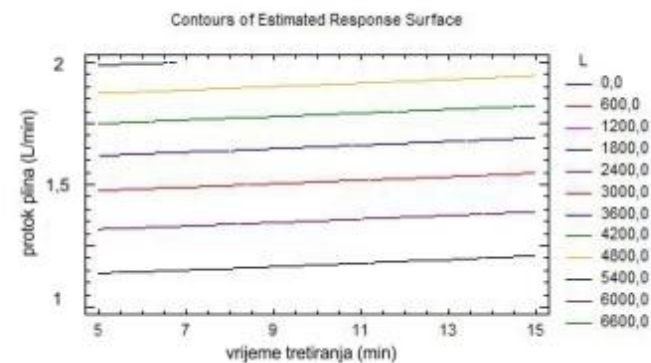
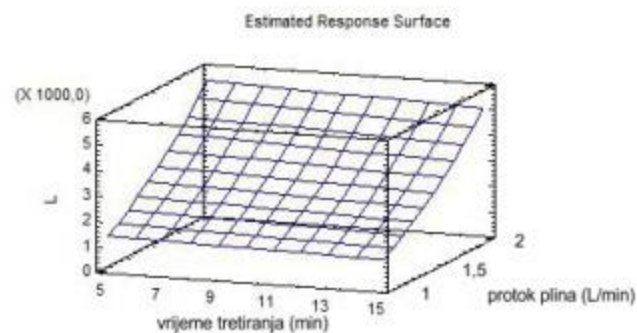


Tablica 23. 3 D i konturni dijagrami analiziranih uzoraka (R1-R10) za enterobakterije (CFU/mL) i za vrijednost L

Entero bakterije	3D dijagram odzivne površine	Konturni dijagram odzivne površine
---------------------	------------------------------	------------------------------------

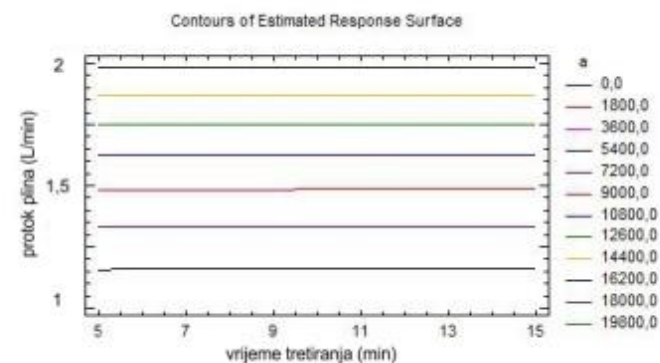
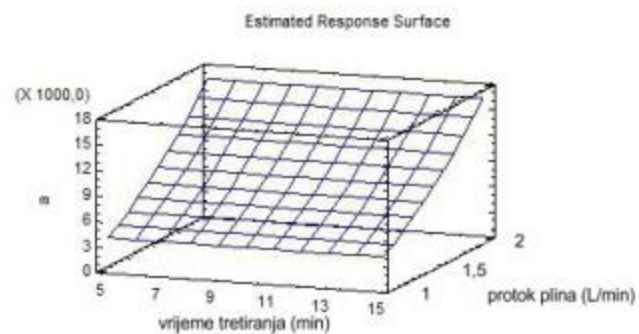


L

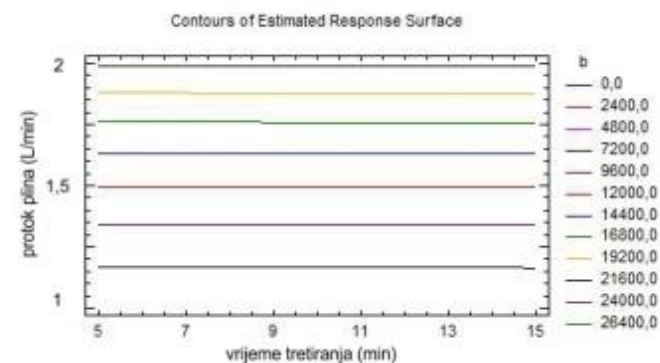
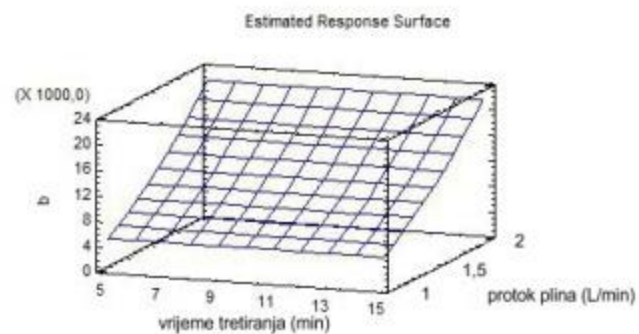


Tablica 24. 3 D i konturni dijagrami analiziranih uzoraka (R1-R10) za optičke vrijednosti *a* i *b*

a	3D dijagram odzivne površine	Konturni dijagram odzivne površine
----------	-------------------------------------	---

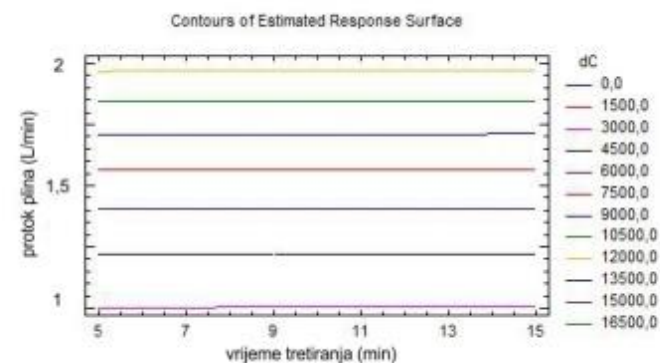
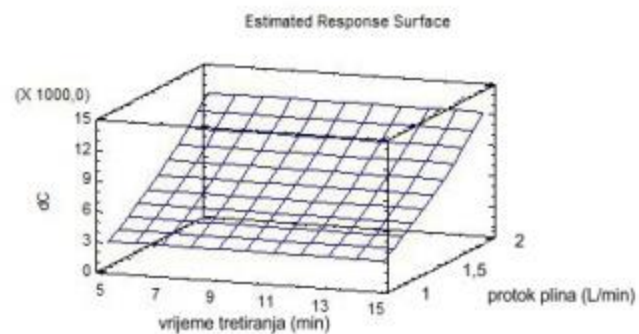


b

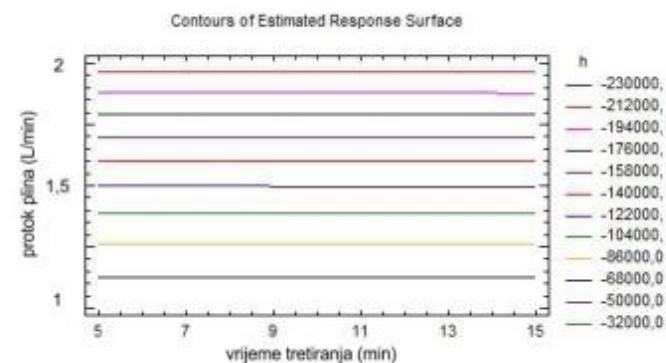
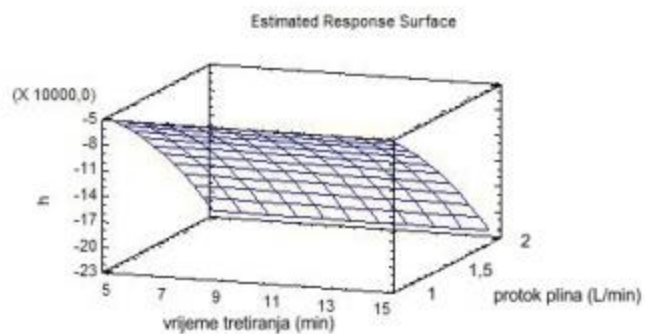


Tablica 25. 3 D i konturni dijagrami analiziranih uzoraka (R1-R10) za optičke vrijednosti dC i h

dC	3D dijagram odzivne površine	Konturni dijagram odzivne površine
------	------------------------------	------------------------------------

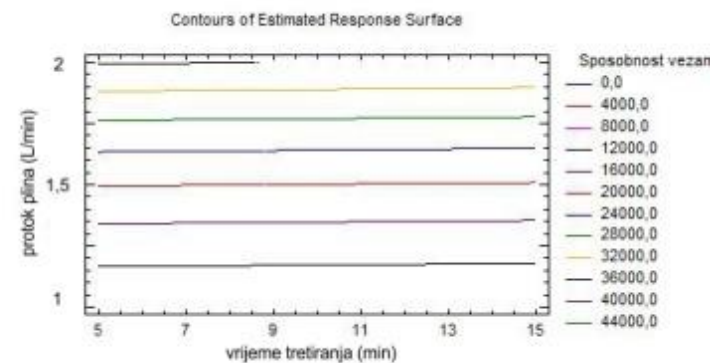
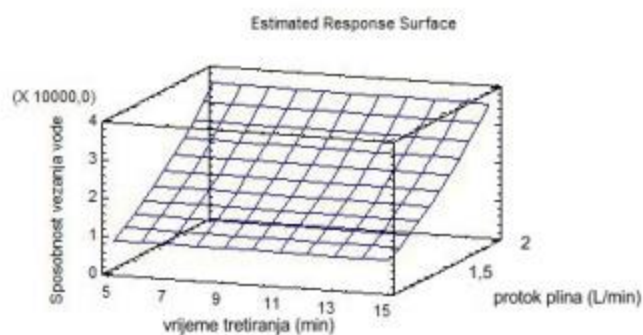


h

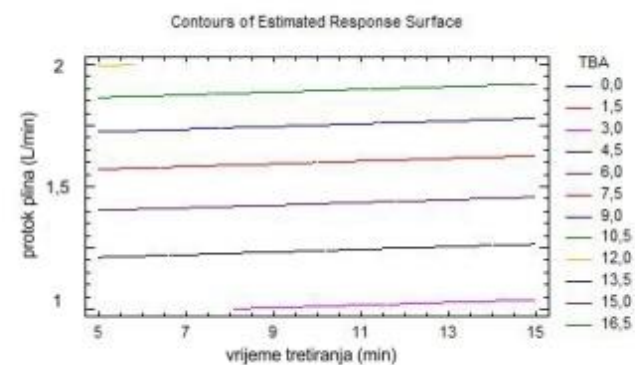
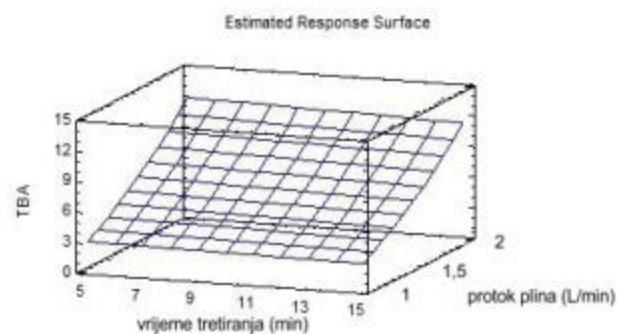


Tablica 26. 3 D i konturni dijagrami analiziranih uzoraka (R1-R10) za vrijednosti sposobnost vezanja vode (% vode) i oksidaciju masti izraženu kroz TBA ($\mu\text{mol MDA}$)

SVV	3D dijagram odzivne površine	Konturni dijagram odzivne površine
-----	------------------------------	------------------------------------

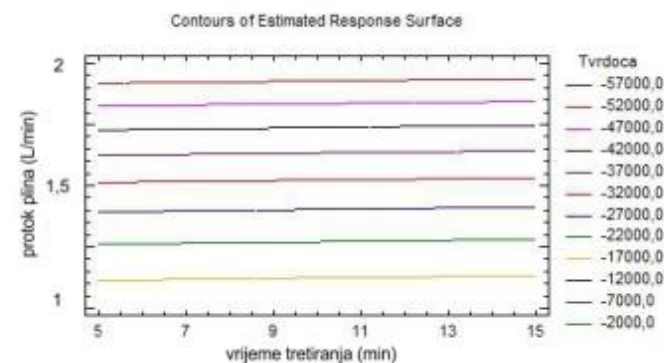
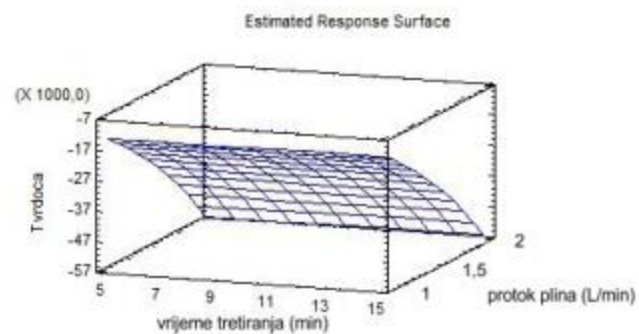


TBA

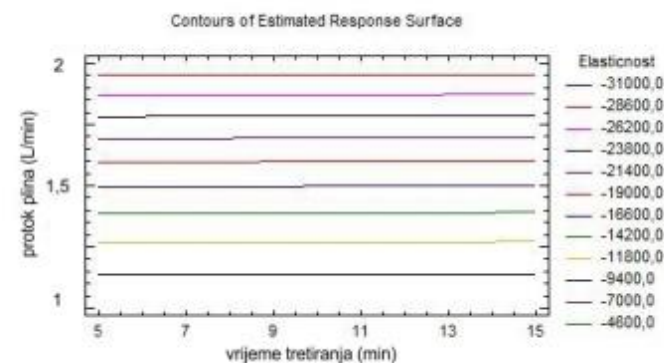
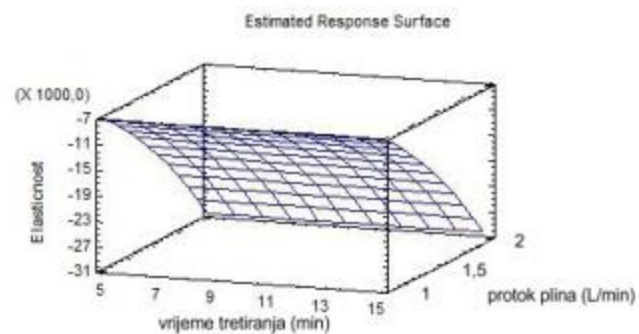


Tablica 27. 3 D i konturni dijagrami analiziranih uzoraka (R1-R10) za teksturalne vrijednosti tvrdoća (N) i elastičnost (mm)

Tvrdoća	3D dijagram odzivne površine	Konturni dijagram odzivne površine
---------	------------------------------	------------------------------------

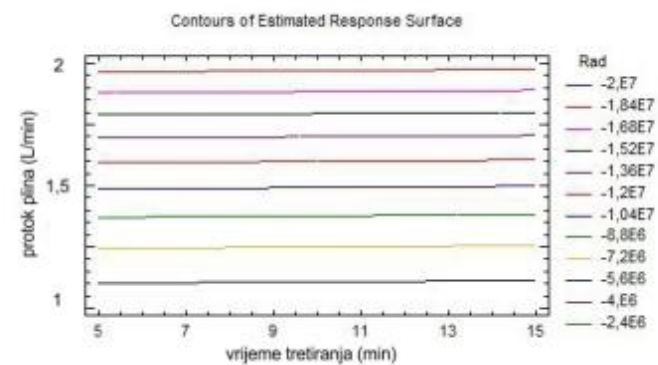
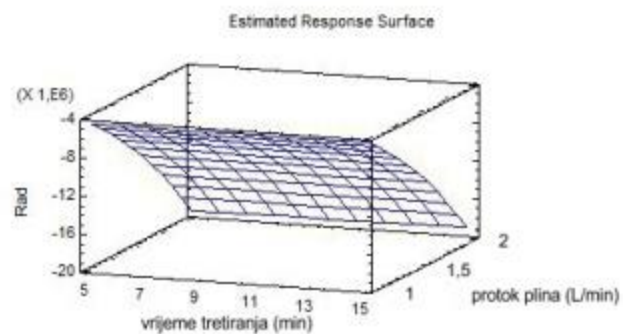


Elastičnost



Tablica 28. 3 D i konturni dijagrami analiziranih uzoraka (R1-R10) za teksturalnu vrijednost rad (mJ)

Rad	3D dijagram odzivne površine	Konturni dijagram odzivne površine
-----	------------------------------	------------------------------------



Iz tablice 3. vidljiva je redukcija broja mikroorganizama nakon tretmana ne toplinskom plazmom najviše kod tretmana 5 minuta i protoka plina od 1,5 L/min R10 (log CFU 0,966). Kod uzorka R2 i R3 pri protoku plina 1 L/min i redom 5 i 10 minuta tretmana nije došlo do redukcije broja mikroorganizama, a kod R1 je došlo do povećanja broja što je posljedica kontaminacije. Niti jedan uzorak nije bio zaražen sa *Salmonellom*, a također nije bilo ni enterobakterija prisutnih, osim kod netretiranog uzorka R8-NT (4) i kod R1 (1).

Iz tablice 4. vidljive su promjene na boji za parametar L gdje je zamijećeno najveće povišenje vrijednosti između netretiranog R3-NT i tretiranog uzorka R3 (3,60667) pri tretmanu 10 minuta i 1 L/min, a najmanje promjene između R5-NT i R5 (-0,11). Pozitivna promjena L vrijednosti ukazuje da je tretirani uzorak R3 svjetliji od standarda R3-NT. Za parametar a je najveće povišenje zamijećeno između R7-NT i R7 (1,39334) pri tretmanu 10 minuta i protoku 2 L/min, a najmanje odstupanje između R4-NT i R4 (0,22). Uzorak R7 je imao pozitivno povećanje parametra a u odnosu na standard R7-NT što ukazuje da je crveniji. Kod parametra b najveće odstupanje je zamijećeno između R6-NT i R6 (3,08666) pri 15 minuta i 2 L/min, a najmanje (-0,28333) između R2-NT i R2. Pozitivno odstupanje od standarda R6-NT, za parametar b , ukazuje da je uzorak R6 žutiji od standarda. Parametar dC se odnosi na ton boje a izračunat je pomoću formule 3. te je izračunato i odstupanje uzorka od standarda (formula 4.). Za parametar dC najveće odstupanje (2,14333) zamijećeno je između R5-NT i R5, a najmanje (-0,18) između R1-NT i R1. Parametar h prikazuje zasićenje boje tj. saturaciju i što je vrijednost niža to je boja svjetlija, a kod većih vrijednosti je zasićenija i tamnija boja. Za parametar h najveće odstupanje je zamijećeno između R1-NT i R1 (-35,82334) pri 10 minuta i 1,5 L/min, a najmanje (-0,05666) između R8-NT i R8.

Kod analize oksidacije masti, kao što je i predviđeno, došlo je do povećanja TBA vrijednosti što se može vidjeti u tablici 5. Najveće povišenje TBA vrijednosti (66%) u odnosu na netretirani uzorak je bilo pri, 5 minuta i 2 L/min, R5 (0,0043). Kod tretmana 5 minuta i protoka 1 L/min, uzorka R8 nije došlo do oksidacije masti. Kako kod broja mikroorganizama tako i kod TBA testa rezultati nisu bili od statističkog značaja što se može vidjeti iz tablice 7-9. i tablice 16. Jim Van Durme i sur. (2014) pokazali su u svojem ispitivanju oksidacije masti, sa čistom Ar plazmom, da se može zanemariti utjecaj fotooksidacija, te da i nakon 20 minuta ne dolazi do stvaranja ROS, u dovoljnoj količini kako bi se inicirala lipidna oksidacija. U drugom radu iste grupe, Jeroen Vandamme i sur. (2015) dolaze do zaključka da i nakon 60 minuta tretmana ne dolazi do znatnog povećanja ROS te oksidaciju pripisuju O_3 , O_2 singletu i atomarnom kisiku.

Attri i sur. su primjetili da tokom tretmana otopine proteina da se pH mijenja i prelazi u kiselo područje, jer peroksinitril radikal prelazi u kiselinu koji je jak oksidans te reagira sa različitim sustavima i sudjeluje u karbonilaciji proteina.

Najveći pad sposobnosti vezanja vode od 16% zabilježen u odnosu na netretirani uzorak R1-NT je bio kod tretmana R1, pri 10 minuta i protoku plina od 1,5 L/min. Najmanje odstupanje u odnosu na netretirani uzorak je bilo (0,18) povišenje kod uzorka R9 pri tretmanu 10 minuta i protoku plina od 1,5 L/min. Attri i sur. (2014) pokazali su u svom istraživanju da Ar plazma uveliko utječe na oksidaciju proteina, te da oksidacija igra veliku ulogu u degradaciji hema i mioglobina. Nakon tretiranja proteina Hb i Mb sa Ar plazmom zabilježili su također veći pad temperature ravnoteže prijelaza između nativnog i denaturiranog proteina (T_m) u odnosu na netretirani uzorak sa 66,37°C na 61,75°C. Opisali su uz druge autore (Xiao, Chesne, Bee, Ye i Coelho), kako pritom dolazi do povećanja veličine čestica, tj. agregacije proteina, karbonilacijom. Takve promjene mogu osim na teksturu i boju, utjecati i na sposobnost vezanja vode zbog stvaranja netopivih agregata proteina i smanjenog prostora između molekula proteina.

Najveće promjene u teksturi su zabilježene kod uzorka R3, pri tretmanu 10 minuta i protoku plina 1 L/min (Tablica 6.). U odnosu na netretirani uzorak R3-NT došlo je do smanjenja tvrdoće u iznosu od 46% (-14,119 N). Došlo je do promjene elastičnosti za 13% u odnosu na netretirani uzorak (2,21434 mm). Također je došlo do smanjenja rada za 31% u odnosu na netretirani uzorak (2597,498 mJ). Najmanja promjena u tvrdoći zamijećena je kod R10 (0,41066 N) u odnosu na netretirani uzorak R10-NT. Najmanja promjena kod elastičnosti je bila kod R2 (0,10667 mm) u odnosu na netretirani uzorak R2-NT. Najmanje odstupanje za rad je bila (-804,47966 mJ) između netretiranog uzorka R9-NT i tretiranog R9.

Tokom studija na živim stanicama zamjećeno je da kod djelovanja plazme, jedan od glavnih razloga stanične smrti je oštećenje DNA, ali da može doći i do rekuperacije stanice, ako nisu uništeni mehanizmi popravka. Također Attri i sur. (2014) pripisuju zaustavljanje replikacije, modifikacije DNA, proteina i lipida reaktivnim kisikovim česticama (ROS) koje ultimativno vode do stanične smrti. Nadalje, Keider grupa (2013) opisuju kako parametri poput napona, protoka i sastava plina ima različite učinke na vijabilnost stanica zbog promjene i razine ROS i reaktivne dušikove čestice (RNS). U ovom radu nisu praćeni parametri poput napona, sastava plina te temperatura okoline i samog uzorka, ali od ulaznih parametara se pokazalo da protok plina ima veći utjecaj na vijabilnost stanica.

Nakon provedene statističke analize rezultata ispitivanja za većinu parametara, ni protok plina ni vrijeme tretiranja, nije bilo od statističke značajnosti, osim u slučaju sposobnosti vezanja

vode. Iz tablice 15. se može vidjeti da je p-vrijednost za protok plina ispod 0.05 što ukazuje da se razlikuje od 0 (utjecaja) pri 95% intervalu pouzdanosti tj. ima značajan utjecaj na tretirane uzorke ribe (R1-R10). Iz iste tablice se također može vidjeti da značajan utjecaj na tretirane uzorke (R1-R10) ima parametar AB tj. interakcija protoka plina i vremena tretiranja. Kod provjere koeficijenta determinacije - R^2 (Tablica 20.) pratila se mjera odstupanja podataka od regresijske linije. Zamijećena je statistička značajnost kod slijedećih parametara: log CFU, a , h , SVV, TBA vrijednost i rada što govori da za te parametre postoji dobra korelacija među podacima tretiranih uzoraka ribe (R1-R10).

Kod opisivanja eksperimentalnih vrijednosti, da li se podudaraju ili ne kroz 10 točaka (R1-R10), korišten je polinom višeg stupnja (tablica 21.) za prikaz aproksimacije odziva u slučaju nelinearnosti funkcija. Vrijednosti varijabli su izražene u njihovim početnim jedinicama. Nadalje, kod statističkog optimiranja ulaznih i aproksimacije optimalne vrijednosti određenih parametara isključeni su podaci za analizu boje. Optički parametri su subjektivni element i ne može se uniformno zaključiti optimalna vrijednost za L , a , b , dC i h već samo odstupaju li vrijednosti tretiranih od netretiranih uzoraka ribe.

U tablicama 22-28 prikazani su 3D i konturni grafovi za pojedine uzorke (R1-R10) gdje su opisani utjecaji protoka plina i vrijeme tretiranja na izlazne vrijednosti. Grafovi prikazuju područje najvećeg uspona ili najvećeg pada odziva. Odziv je centralno područje eksperimentalnih podataka uz prikaz aproksimacija za malene promjene eksperimentalnih faktora. Ukazuje na dobre polazišne točke za daljnja istraživanja u slučaju želimo li povećati ili smanjiti vrijednost određenog izlaznog parametra. Za mikrobiološka ispitivanja (ukupni broj mikroorganizama, log CFU i broj enterobakterija) iz tablica se može vidjeti pad vrijednosti uslijed povećanja protoka plina dok duljina tretiranja ne izaziva promjene. Kod parametara boje, povećanjem protoka dolazi do povećanja vrijednosti L , a , b , dC i smanjenja za vrijednost h . Na vrijednost L u manjoj mjeri utječe i vrijeme tretiranja, te dolazi do smanjenja L vrijednosti s produljenjem vremena tretmana. Kod sposobnosti vezanja vode i oksidacije masnih kiselina dolazi do povećanja odziva uslijed povećanja protoka plina. Za teksturalne parametre povećanjem protoka plina dolazi do pada odziva svih parametara (tvrdoća, elastičnost i rad).

5. ZAKLJUČCI

1. Netoplinska plazma ima sposobnost dekontaminacije uzoraka i pokazalo se da protok plina puno značajnije na to utječe od samog vremena tretiranja.
2. Preveliki protok plina, uz blizinu uzorka od izvora jet plazme, uzrokuje spaljivanje uzorka u toj točki što posljedično, negativno utječe na sve parametre kvalitete.
3. Do neznatnih promjena u broju decimalne redukcije dolazi i iz razloga što je tretirani uzorak bio gotovo sterilan te je teže postići veći log redukcije nego, pr. kod koncentracije 10^7 CFU/mL gdje su mikroorganizmi izloženiji djelovanju plazme bez mogućnosti zaštite unutar strukture tkiva.
4. Do nekonzistencije rezultata i statističke neznačajnosti je moglo doći, uz pogreške pri mjerenju i zbog variranja ribe do ribe te visine narezivanja uzorka čime je udaljenost od izvora plazme izmjenjena uz mogućnost utjecaja na učinkovitost dekontaminacije.
5. Korištenje plazma jeta za obradu uzoraka je poprilično blaga metoda iako ima svojstvo oksidacije masti kod uzoraka i povećanja broja sekundarnih produkata oksidacije, to nije bilo od značajne signifikantnosti te bi se uz optimizaciju tretmana moglo i smanjiti.

6. LITERATURA

- AOAC (1999) Official method 950.46 moisture in meat; official method 991.36 fat (crude) in meat and meat products; official method 981.10 crude protein in meat; official method 920.153 ash in meat. In P. Cunniff (Ed.), (16th ed). Meat and meat products, vol. II. (str. 1–15) Gaithersburg, MD, USA: Official methods of analysis of the AOAC International (Chapter 39).
- Arabaci, M., Yilmaz, Y., Ceyhun, S. B., Erdogan, O., Dorlay, H. G., Diler, I., Koncagul, S. (2010) A Review on Population Characteristics of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(6), 976–981. <http://doi.org/10.3923/javaa.2010.976.981>
- Attri, P., Kumar, N., Park, J. H., Yadav, D. K., Choi, S., Uhm, H. S., Lee, W. (2015) Influence of reactive species on the modification of biomolecules generated from the soft plasma. *Scientific Reports*, 5, 8221. <http://doi.org/10.1038/srep08221>
- Beaufort, A., Lardeux, A., Lombard, B., Polet, M., Botteldoorn, N., Papageorgiou, G., Skjerdal, T. (2014). *EURL Lm*, 1–47.
- Bee, J. S., Davis, M., Freund, E., Carpenter, J. F., & Randolph, T. W. (2010) Aggregation of a monoclonal antibody induced by adsorption to stainless steel. *Biotechnol Bioeng* **105**, 121–129.
- Bhattacharyya, N., Bandhopadhyay, R. (2010) Nondestructive Evaluation of Food Quality. *Nondestructive Evaluation of Food Quality*, 73–100. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-15796-7>
- Bigić, T. (2014) Utjecaj dodataka mješavine antioksidanasa na oksidacijsku stabilnost repičinog ulja, Diplomski rad, Osijek.
- Borderias, a. J., Lamua, M., & Tejada, M. (2007) Texture analysis of fish fillets and minced fish by both sensory and instrumental methods. *International Journal of Food Science & Technology*, 18(1), 85–95. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb00247.x>
- Borderias, A. J., Lamua, M., Tejada M. (1983) Texture analysis of fish fillets and minced fish by both sensory and instrumental methods. *J. Fd Technol.* 18, 85-95.
- Bremner, H. A. (1985). A convenient easy-to-use system for estimating the quality of chilled seafoods. In D. N. Scott, & G. Summers (Eds.), *Proceedings of the processing conference*, *Fish Processing Bulletin*, 7, 23–25 April (pp. 59–70).

Wellington: DSIRISSN 0112-4633.

- Cajner, H. (2011) Višekriterijsko adaptivno oblikovanje planova pokusa, Doktorski rad, Zagreb.
- Cakli, S., Kilinc, B., Cadun, A., Dincer, T., & Tolasa, S. (2007). Quality differences of whole ungutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. *Food Control*, 18(5), 391–397.
<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.11.005>
- Chesne, S., Rondeau, P., Armenta, S., & Bourdon, E. (2006) Effects of oxidative modifications induced by the glycation of bovine serum albumin on its structure and on cultured adipose cells. *Biochimie* **88**, 1467–1477.
- Christensen, V., Steenbeek, J., & Failler, P. (2011) A combined ecosystem and value chain modeling approach for evaluating societal cost and benefit of fishing. *Ecological Modelling*, 222(3), 857–864.
<http://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2010.09.030>
- Coelho, F. R., Iqbal, A., Linares, E., Silva, D. F., Lima, F. S., Cuccovia, I. M., & Augusto, O. (2014) Oxidation of the Tryptophan 32 Residue of Human Superoxide Dismutase 1 Caused by Its Bicarbonate dependent Peroxidase Activity Triggers the Non-amyloid Aggregation of the Enzyme. *J Biol Chem* **289**, 30690–30701.
- Ehlbeck, J., Schnabel, U., Polak, M., Winter, J., Th Von Woedtke, et al. (2011) Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. *Journal of Physics D Applied Physics*, IOP Publishing, 44 (1), pp.13002.
<10.1088/0022-3727/44/1/013002>.<hal-00585169>
- FAO (1991) Quality and changes in fresh food: Assessment of fish quality, Food and Agriculture Organisation <<http://www.fao.org/docrep/v7180e/v7180e09.htm>>. Pristupljeno 21. veljače 2016.
- FAO (2005-2016) Cultured Aquatic Species Information Programme. *Sparus aurata*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Colloca, F., Cerasi, S. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 8 February 2005. Pristupljeno 6. srpnja 2016. Matijašević
- FSAI (2014) Food Safety Authority of Ireland: Guidance Note No. 18 Validation of Product Shelf-Life, 2. izd. Food Safety Authority of Ireland Dublin. Pristupljeno 10. veljače 2016.

Home Page

<<https://www.tue.nl/en/university/departments/applied-physics/research/plasma->

- physics-and-radiation-technology/elementary-processes-in-gas-discharges/research/research-areas/plasma-for-medicine/>. Pristupljeno 5. srpnja 2016.
- Home Page <<http://www.acxys.com/plasma-technology.html>> Pristupljeno 5. srpnja 2016.
- Home Page
<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/38/BYR_color_wheel.svg>. Pristupljeno 5. srpnja 2016.
- Huss, H. H., Dalsgaard, D., Hansen, L., Ladefoged, H., Pedersen and L. Zittan. 1974. The influence of hygiene in catch handling on the storage life of iced cod and plaice. *Journal of food science technology* 9: 213-221.
- IFST (1993) *Shelf-Life of Foods – Guidelines for its Determination and Prediction*, Institute of Food Science and Technology, London.
- Johnson, E. A., et al. (1980) Evaluation of compressive deformability modulus of fresh and cooked fish flesh. *J. Food Sci.* 45, 1318-20, 1326.
- Jonsdottir, S. (1992). Quality index method and TQM system. In R. Olafsson & A. H. Ingthorsson (Eds.), *Quality issues in the Fish industry. The Research Liaison OYce*, University of Iceland.
- Kalghatgi, S., Fridman, G., Nagaraj, G., Peddinghaus, M., Balasubramanian, M., Brooks, A., & Gutsol, A. (2007) Mechanism of Blood Coagulation by Non-Equilibrium Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Discharge Plasma, 35(c), 1559–1566.
- Kanner J., Rosenthal, I. (1992) *An Assessment of lipid oxidation in Foods – Technical Report*. *Pure Appl Chem.* 64, 1959-1964.
- Ke P. J., Nash, D. M., Ackman, R. G. (1976) Quality preservation in frozen mackerel. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 9, 135-138.
- Ke P. J., Woyewoda, A. D. (1979) Microdetermination of thiobarbituric acid values in marine lipids by a direct spectrophotometric method with a monophasic reaction system. *Anal. Chim. Acta.* 106, 279-284.
- Larsen E, Heldbo J, Jerpersen CM, Nielsen J. 1992. Development of a method for quality assessment of fish for human consumption based on sensory evaluation. In: Huss HH, Jakobsen M, Liston J, editors. *Quality Assurance in the Fish Industry*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV. P 351-358.
- Law, V. J., & Anghel, S. D. (2012) Compact atmospheric pressure plasma self-resonant drive circuits. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 45(7), 075202.

<http://doi.org/10.1088/0022-3727/45/7/075202>

- Lea, C. (1952) Methods for determining peroxide in lipids *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1952 vol: 3 (12) pp: 586-594 10.1002/jsfa.2740031205
- Lemon D. W. (1975) An improved TBA test for rancidity. New Series Circular No. 51. Environment Canada Fisheries and Marine Service. Halifax Laboratory. Canada.
- Milošević, S. (2008) Plazma, svjetlost i spektroskopija. Home Page <<http://www.ifs.hr/people/slobodan-milosevic/>>. Institut za fiziku, Zagreb
- Montgomery D. C., (1997) Design and Analysis of Experiments, 4.izd. John Wiley & Sons inc., New York, Chichester, Weinhein, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Oštrić-Matijašević, B., Turkulov, J. (1980) Tehnologija ulja i masti. I. dio. Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Pfaff, S., & Salopek, B. (2004) Primjena Planiranja Eksperimenata U Oplemenjivanju Mineralnih Sirovina, 16, 97-106, Zagreb.
- R. Plasun (1999) Optimization of VLSI Semiconductor Devices, Doktorska dizertacija. Technische Universitet Wien - Institute for Microelectronics, Beč. <<http://www.iue.tuwien.ac.at/phd/plasun/node32.html> >. Pristupljeno 5. srpnja 2016.
- Rak-Šajn J. (2015) Cromaris u top 10 svjetskih proizvođača orade i brancina, Večernji list 19. svibnja. Pristupljeno 20. veljače 2016.
- Režek-Jambrak, A. (2011) Experimental Design and Optimization of Ultrasound Treatment of Food Products *J Food Process Technol* 2 116.
- Rujnić-sokele, P. M. (2012) Bisfenol A–kemikalija oko koje se lome koplja, 33, 3–4.
- Ryu, Y. H., Kim, Y. H., Lee, J. Y., Shim, G. B., Uhm, H. S., Park, G., & Choi, E. H. (2013) Feeding-gas effects of plasma jets on escherichia coli in physiological solutions. *Plasma Process Polym* **10**, 235–242.
- Smart, G. (2001). Problems of sea bass and sea bream quality in the Mediterranean. In S. C. Kestin & P. D. Warriss (Eds.), *Farmed fish quality* (pp. 120–128). Oxford: Fishing News(Boks)/Blackwell.
- Stine C. M., Harland, H. A., Coulter, S. T., Jennes, R. (1954) A modified peroxide test for detection of lipid oxidation in dairy products. *J. Dairy Sci.* 37, 202-208.
- Van Durme, J., Nikiforov, A., Vandamme, J., Leys, C., & De Winne, A. (2014). Accelerated lipid oxidation using non-thermal plasma technology: Evaluation of volatile compounds. *Food Research International*, **62**, 868–876.
- Vandamme, J., Nikiforov, A., Dujardin, K., Leys, C., De Cooman, L., & Van Durme, J.

- (2015) Critical evaluation of non-thermal plasma as an innovative accelerated lipid oxidation technique in fish oil. *Food Research International*, **72**, 115–125. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.037>
- Vidaček, S. (2006) Bioelektrička impedancijska analiza pri utvrđivanju promjena kvalitete odmrznutog ribljeg mišićja / doktorska disertacija. Zagreb : Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 21.07., 188 str.
- Vidaček, S. (2013) Tehnologija ribe, Interna skripta, Sveučilište Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
- Vidaček, S. (2014) Seafood: Food Safety Management / (Motarjemi, Yasmine; Lelieveld, Huub uredili). San Diego, CA, USA : Academic Press, Elsevier. Str. 189-212.
- Vyncke, W. (1975) Evaluation of direct thiobarbituric acid extraction method for determining oxidative rancidity in mackerel (*Scomber scombrus* L.). *Fette Seifen Anstrichm.* **77**, 239-240.
- Xiao, H., Wang, Y., Xiang, Q., Xiao, C., Yuan, L., Liu, Z., & Liu, X. (2012) Novel physiological properties of ethanol extracts from *Eremurus chinensis* Fedtsch. roots: in vitro antioxidant and anticancer activities. *Food Funct* **3**, 1310–1318.
- Ye, L., Liao, Y., Sun, W., & Zhao, M. (2013) Effect of Protein Oxidation on the Conformational Properties of Peanut Protein Isolate. *Journal of Chemistry*, Article ID 423254.

7. PRILOZI

POPIS I OBJAŠNJENJE KORIŠTENIH KRATICA U RADU:

Abr – Anisidinski broj

AC/DC – Izmjenična struja/Istosmjerna struja

AOAC - Association of Official Agricultural Chemists

APPJ - Atmosferska jet plazma pod tlakom (Atmospheric Pressure Plasma Jet)

a_w – Aktivitet vode

CCD - Centralni kompozitni dizajn

CFU - Colony Forming Units

CIE – Internacionalna komisija o osvjetljenju (The Commision de International de l'Eclairage)

DBD - Dielektrično pražnjenje barijere

DEFT - Epifluorescentna tehnika filtriranja

dF – Stupnjevi slobode (Degrees of freedom)

DMA - Dimetilamin

EDTA - 2,2',2'',2'''-(etan-1,2-diildinitrilo) tetraoctena kiselina

Eh – Redukcijski potencijal

FAO – Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija (Food Administration Agency)

FSAI - The Food Safety Authority of Ireland

GC – Plinska kromatografija (Gas chromatography)

IR – Infracrveno

MAP – Modified atmosphere packaging

MDA – Malonilaldehid

NIR – Blisko infracrveno svjetlo (Near infrared)

NMR – Nuklearna magnetska rezonanca

OV – Oksidacijska vrijednost

PB – Peroksidni broj

PCA - Common plate count agar

QIM – Metoda indeksa kvalitete (Quality Index Method)

R^2 – Koeficijent determinacije

Rf – Radio frekvencija

RNS – Reaktivne dušikove čestice (Reactive Nitrogen Species)
ROS – Reaktivne kisikove čestice (Reactive Oxygen species)
RSM - Metodologija odzivne površine (Response Surface Methodology)
SMK - Specifični mikroorganizmi kvarenja
SPC - Standard plate count
SVV – Sposobnost vezanja vode
TAC - Total aerobic count
TBA – Tiobarbiturna kiselina
TCA – Trikloroctena kiselina
Tm – Temperature prijelaza između nativnog i denaturiranog proteina (Melting Temperature)
TMA-N - Trimetilamin
TVB-N - Ukupni hlapivi dušik
UV – Ultraljubičasto
VAOPP - Višekriterijskog adaptivnog oblikovanja planova pokusa
VIS – Vidljiv spektar svjetlosti (Visible Light)
VRBG - Violet red bile glucose agar
VUV – Vakuum ultraljubičasto
XLD - Xylose lysine deoxycholate agar