

# Primjena 3D tiskanja u proizvodnji funkcionalnih proizvoda na bazi jagode (*Fragaria x ananassa* Duch.)

---

Žigolić, Adrijana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

*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:159:713796>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-30**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, siječanj 2023

Adrijana Žigolić

**PRIMJENA 3D TISKANJA U  
PROIZVODNJI FUNKCIONALNIH  
PROIZVODA NA BAZI JAGODE  
(*Fragaria x ananassa* Duch.)**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević, te uz pomoć Anice Bebek Markovinović, mag. ing. i doc. dr. sc. Predraga Putnika.



Ovo istraživanje provedeno je u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta „Tehnologija preprekama i 3D printanje za ekološki prihvatljivu proizvodnju funkcionalnih voćnih sokova (3D-SustJuice)“ (IP-2019-04-2105), voditeljice izv. prof. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević.

## ZAHVALA

*Na samom početku, htjela bih se zahvaliti svojim roditeljima koji su žrtvovali mnogo i bez kojih nikada nebih bila gdje sam sada.*

*Veliko hvala najboljim sekama i šogijima, posebno Aniti i Denisu, koji su uvijek bili tu za mene i uz čiju sam podršku postigla ono što mi je na početku studiranja bilo nezamislivo.*

*Hvala što ste vjerovali u mene kada ja nisam!*

*Posebnu zahvalnost iskazujem svom Kikiju, koji je bio tu za mene kroz lijepe i teške trenutke studiranja, uvijek bio podrška i motivacija da budem bolja.*

*Hvala mojim curkama, Nikolini, Martini, Mihaeli i Vikici, koje su kroz sve godine studiranja bile rame za plakanje, podrška i prije svega prijateljice.*

*Hvala mag. ing. Anici Bebek Markovinović i doc. dr. sc. Predragu Putniku na velikoj pomoći, savjetima i utrošenom vremenu.*

*Draga mentorice, neizmjereno Vam se zahvaljujem na stručnom vodstvu, strpljenju, dostupnosti i uloženom vremenu za izradu ovoga rada. Vaša strast prema struci bila je inspiracija i motivacija. Od srca hvala!*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za kemiju i tehnologiju voća i povrća

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Diplomski sveučilišni studij:** Prehrambeno inženjerstvo

PRIMJENA 3D TISKANJA U PROIZVODNJI FUNKCIONALNIH PROIZVODA NA BAZI  
JAGODE (*Fragaria x ananassa* Duch.)

*Adrijana Žigolić*, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058210481

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost primjene 3D ispisa u proizvodnji funkcionalnog proizvoda na bazi jagode (*Fragaria x ananassa* Duch.). Istraživanje je provedeno ispitujući utjecaj dva različita programa ispisa temeljenih na ekstruziji, uz primjenu dva različita škrobna hidrokoloida (kukuruzni vs. pšenični) u različitim udjelima (10, 15 i 20 %, w/w) na stabilnost bioaktivnih spojeva (ukupni fenoli, hidroksicimetne kiseline, flavonoli, ukupni flavonoidi, antocijani i kondenzirani tanini) i antioksidacijski kapacitet (DPPH i FRAP). Također, određeni su i pH vrijednost te aktivitet vode u svim ispitivanim uzorcima. Vrsta škroba imala je statistički značajan utjecaj na pH i aw vrijednosti, sve određivane bioaktivne spojeve i antioksidacijski kapacitet analiziranih 3D proizvoda. Udio škroba i tip programa ispisa također značajno utječu na većinu određivanih spojeva, a za očuvanje bioaktivnog profila i antioksidacijskog kapaciteta 3D tiskanog proizvoda najboljim se pokazao udio škroba od 15% i uporaba programa 2 za ispis. 3D ispis može se smatrati tehnologijom visokog potencijala za razvoj inovativnih i individualnih funkcionalnih proizvoda.

**Ključne riječi:** 3D tiskanje, funkcionalni proizvod, jagoda (*Fragaria x ananassa* Duch.), bioaktivni spojevi, antioksidacijski kapacitet

**Rad sadrži:** 56 stranica, 13 slika, 4 tablica, 84 literaturnih navoda, 0 priloga

**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. Danijela Bursać Kovačević

**Pomoć pri izradi:** Anica Bebek Markovinović, mag. ing. i doc. dr. sc. Predrag Putnik

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Tomislav Bosiljkov (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević (mentor)
3. doc. dr. sc. Predrag Putnik, Sveučilište Sjever (član)
4. doc. dr. sc. Tamara Jurina (zamjenski član)

**Datum obrane:** 7. veljače 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Engineering  
Laboratory for Chemistry and Technology of Fruits and Vegetables

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Graduate university study programme:** Food Engineering

### APPLICATION OF 3D PRINTING IN THE PRODUCTION OF FUNCTIONAL PRODUCTS BASED ON STRAWBERRY (*Fragaria x ananassa* Duch.)

*Adrijana Žigolić*, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058210481

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the possibility of using 3D printing (3DP) in the production of functional product based on strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) . The influence of two different extrusion-based printing programs with the application of two different starch hydrocolloids (corn vs. wheat) in different proportions (10 %, 15 % and 20 %, w/w) on the stability of bioactive compounds (total phenols, hydroxymetallic acids, flavonols, total flavonoids, monomeric antocians, condensed tannins) and antioxidant capacity (DPPH and FRAP) was investigated. In addition, pH and water activity ( $a_w$ ) were determined for all samples tested. The type of starch had statistically significant effect on pH and  $a_w$  values, all determined bioactive compounds, and antioxidant capacity of the 3DP products tested. The starch content and the type of printing program also had a significant effect on the majority of the components studied. For the preservation of the bioactive profile and antioxidant capacity of the 3DP product, a starch content of 15 % and printing program 2 were found to be the most suitable. 3D printing can be considered as a technology with high potential for the development of innovative and customized functional products.

**Keywords:** 3D printing, functional product, strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch.), bioactive compounds, antioxidant capacity

**Thesis contains:** 56 pages, 13 figures, 4 tables, 84 references, 00 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Danijela Bursać Kovačević, PhD, Associate Professor

**Technical support and assistance:** Anica Bebek Markovinović, mag. ing.; PhD Predrag Putnik  
Assistant professor

#### Reviewers:

1. Tomislav Bosiljkov, PhD, Associate professor (president)
2. Danijela Bursać Kovačević, PhD, Associate professor (mentor)
3. Predrag Putnik, PhD, Assistant professor, University North (member)
4. Tamara Jurina, PhD, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** February 7<sup>th</sup>, 2023



## Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. 3D TISKANJE HRANE.....	2
2.2. METODE 3D TISKANJA HRANE.....	4
2.2.1. Tiskanje na bazi ekstruzije .....	4
2.2.2. Tiskanje selektivnim laserskim sinteriranjem .....	5
2.2.3. Tiskanje primjenom vezivnog sredstva.....	5
2.2.4. Tintni ispis.....	6
2.3. MATERIJALI ZA 3D TISKANJE HRANE.....	7
2.4. PERSPEKTIVA PRIMJENE 3D TISKANJA HRANE .....	8
2.4.1. Razvoj personalizirane 3D tiskane hrane .....	8
2.4.2. Pomoć pri liječenju poremećaja gutanja .....	9
2.4.3. Kreiranje nutritivno bogate 3D tiskane hrane za djecu .....	10
2.4.4. Razvoj 3D tiskane hrane s probioticima u liječenju poremećaja probave .....	10
2.4.5. Nutraceutski i funkcionalni 3D tiskani proizvodi .....	11
2.4.6. Dizajn 3D tiskanih proizvoda s dodanim proteinima različitog porijekla .....	12
2.4.7. Primjena 3D tiskane hrane u liječenju i kontroli alergija ili intolerancije na hranu .....	13
2.4.8. Primjena 3D tiskane hrane kao nosača za različite lijekove .....	13
2.4.9. Primjena 3D tiskane hrane u svemirskim misijama .....	14
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>16</b>
3.1. MATERIJALI .....	16
3.2. METODE RADA .....	17
3.2.1. Priprema smjese za 3D ispis .....	17
3.2.2. Izvedba 3D ispisa .....	17
3.2.3. Određivanje aktiviteta vode ( $a_w$ ) .....	19
3.2.4. Određivanje pH vrijednosti .....	19
3.2.5. Priprema ekstrakta.....	19
3.2.6. Određivanje bioaktivnih spojeva.....	21
3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta.....	31
3.2.8. Statistička obrada podataka.....	35
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>36</b>
4.1. USPOREDBA KONTROLNIH I 3D TISKANIH PROIZVODA PREMA pH i $a_w$ VRIJEDNOSTI .....	36
4.2. USPOREDBA KONTROLNIH I 3D TISKANIH PROIZVODA PREMA SADRŽAJU	

BIOAKTIVNIH SPOJEVA .....	37
4.3. USPOREDBA KONTROLNIH I 3D TISKANIH PROIZVODA PREMA ANTIOKSIDACIJSKOM KAPACITETU .....	39
4.4. UTJECAJ VRSTE ŠKROBA, UDJELA ŠKROBA TE PROGRAMA 3D ISPISA NA AKTIVITET VODE $a_w$ I pH VRIJEDNOSTI U 3D TISKANIM PROIZVODIMA ....	40
4.5. UTJECAJ VRSTE ŠKROBA, UDJELA ŠKROBA TE PROGRAMA ISPISA NA UDIO BIOAKTIVNIH SPOJEVA .....	41
4.6. UTJECAJ VRSTE ŠKROBA, UDJELA ŠKROBA TE PROGRAMA ISPISA NA ANTIOKSIDACIJSKE KAPACITETE .....	44
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>46</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>47</b>

# 1. UVOD

Tehnologija trodimenzionalnog (3D) ispisa hrane posljednjih je godina u centru pažnje mnogih inovativnih istraživanja prehrambenog sektora. Ova tehnologija omogućuje računalno kontroliranu izradu trodimenzionalnih oblika hrane različitog sastava, koja se iz mnoštva novih tehnologija ističe zbog višestrukih prednosti, kao što su prilagođeni dizajn hrane, personalizirana prehrana, pojednostavljenje lanca opskrbe i proširenje dostupnih prehrambenih materijala. U vidu prehrambenog sektora, tehnologija 3D ispisa ima široku primjenu, od izrade hrane za starije osobe i djecu, proizvodnje funkcionalne hrane i konditorskih proizvoda pa sve do uporabe u svemirskim misijama.

Poseban interes za primjenu ove tehnologije ogleda se u proizvodnji funkcionalne hrane. S ciljem povećanog dnevnog unosa voća i povrća, ova tehnologija ima perspektivu u proizvodnji proizvoda na bazi različitih kombinacija ovih vrsta, no pored reoloških i senzorskih obilježja, naglasak se stavlja i na nutritivni i biokativni aspekt. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati mogućnost primjene 3D ispisa u razvoju funkcionalnih proizvoda na bazi jagode. Istraživanje je provedeno ispitujući utjecaj dva različita programa ispisa temeljenih na ekstruziji, uz primjenu dva različita škrobna hidrokoloidea (kukuruzni vs. pšenični) u različitim udjelima (10, 15 i 20 %, w/w) na stabilnost bioaktivnih spojeva (ukupni fenoli, hidroksicimetne kiseline, flavonoli, ukupni flavonoidi, antocijani i kondenzirani tanini) i antioksidacijski kapacitet (DPPH i FRAP). Također, određeni su i pH vrijednost te aktivitet vode u svim ispitivanim uzorcima.

## 2. TEORIJSKI DIO

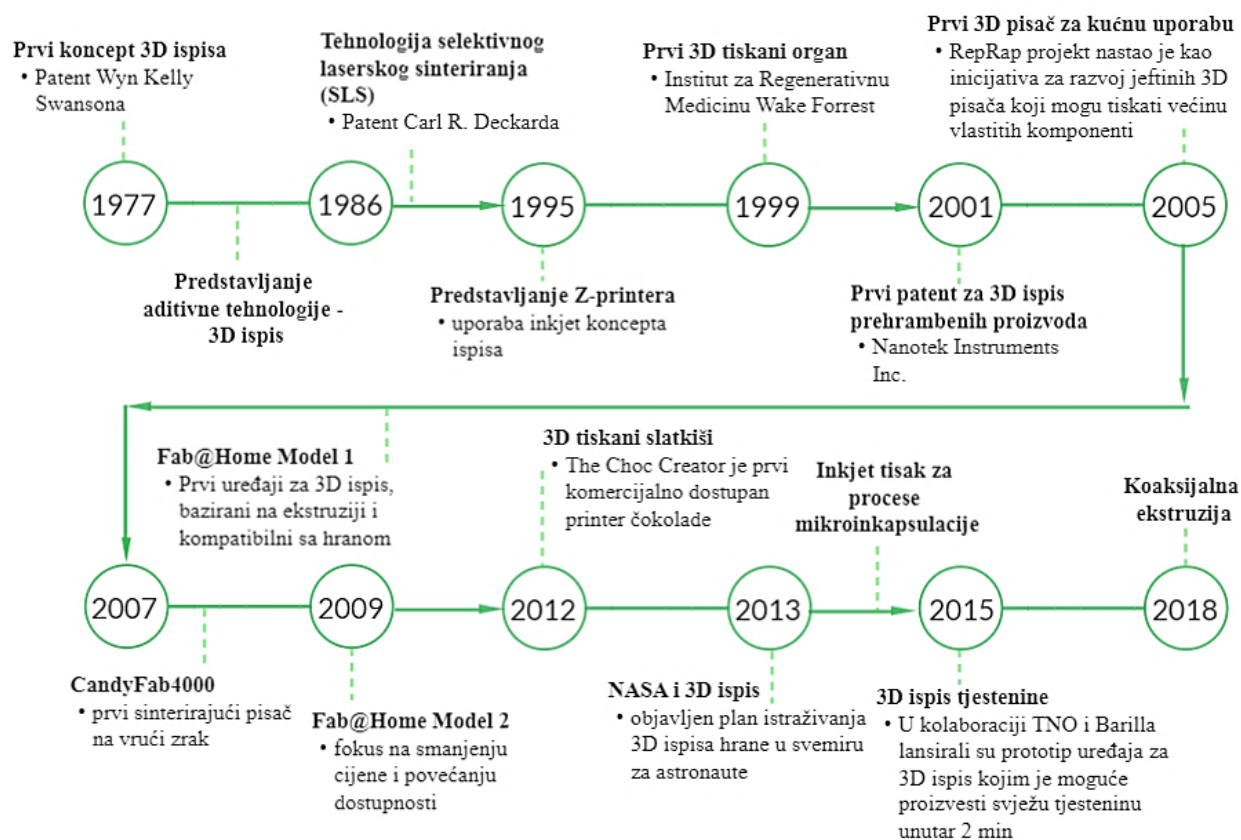
### 2.1. 3D TISKANJE HRANE

Tehnologija trodimenzionalnog ispisa (engl. *three-dimensional printing, 3DP*), prvi put predstavljena 1986. godine, definirana je kao proces dodavanja slojeva materijala s ciljem izrade digitalno dizajniranog 3D objekta. Način dodavanja materijala je sloj-po-sloj, pa se stoga ova tehnologija još naziva i „aditivna proizvodnja“ (Feng i sur., 2019). Ova tehnologija omogućuje izradu kompleksnih 3D modela bez nepotrebnih gubitaka materijala (Escalante-Aburto i sur., 2021) te bez uporabe kalupa, matrica, učvršćivača i rezača uobičajenih u tradicionalnoj proizvodnji (Pitayachaval i sur., 2018).

Koncept 3D ispisa moguće je pratiti još od 1977. godine, a prvi je patent za izradu prehrambenog proizvoda uslijedio 2001. godine (Escalante-Aburto i sur., 2021). Ipak, tehnologiju 3D ispisa je prehrambenom sektoru službeno predstavio tim znanstvenika sa Sveučilišta Cornell 2007. godine s prvim „jeftinim“ pisačem (Fab@Home Model 1) baziranom na tehnologiji ekstruzije. Iako je Model 1 bio sličan tradicionalnom *SSF* pisaču (engl. *Solid freeform fabrication, SFF*) za slobodno oblikovanu proizvodnju, mogao je koristiti značajno veći spektar materijala (Malone i Lipson, 2007). Dvije godine kasnije Projekt Fab@Home objavio je Model 2 snižene cijene i veće dostupnosti (Lipton i sur., 2009). Posljednjih se godina 3D ispis hrane nalazi na fronti istraživanja i razvoja, a povijesni razvoj ove tehnologije prikazan je na slici 1.

Proces 3D tiskanja hrane moguće je podijeliti u tri faze. Prva faza uključuje prethodnu preradu i/ili obradu hrane, tj. prevođenje u oblik povoljan za ispis. S obzirom da se sastojci tiskaju u obliku praha, tekućine, tijesta ili paste, nužno je provesti predradnje poput mljevenja (brašno), kuhanja (krumpir ili škrobni materijali) ili miješanja (meso) (Escalante-Aburto i sur., 2021) te dodatka aditiva (npr. hidrokoloida) za postizanje formulacije smjese optimalnih reoloških svojstava (Manstan i McSweeney, 2020). Druga faza, za koju je danas dostupno nekoliko tehnika, je sam 3D ispis hrane. Najčešća metoda ispisa jest postupak ekstrudiranja, tj. istiskivanje pripremljenog materijala iz glave za ispis (ekstrudera) na podlogu sloj po sloj s ciljem formiranja programiranog 3D oblika. Regulacijom temperature materijala za ispis i udaljenosti glave pisača od podloge omogućena je kontrola konzistencije, stupanj umrežavanja i toplinske obrade proizvoda (Escalante-Aburto i sur., 2021; Sun i sur., 2015). Treću fazu čine

postupci kojima proizvod postaje spreman za konzumaciju ili su nužni za postizanje konačne željene teksture. Uobičajeni primjeri su zamrzavanje, pečenje i prženje (Manstan i McSweeney, 2020).



**Slika 1.** Povijesni razvoj tehnologije trodimenzionalnog ispisa hrane (prema Escalante-Aburto i sur., 2021)

3D ispis je perspektivna metoda proizvodnje hrane koja pruža mnoge mogućnosti poput izrade hrane personaliziranog sastava (npr. zadovoljavanje prehrambenih potreba pojedinca, obogaćivanje obroka ciljanim hranjivim tvarima, i dr.), visoke kompleksnosti teksture i prilagođenog dizajna oblika. Digitalizacija procesa je omogućila praćenje proizvoda tijekom procesa ispisa te dala mogućnost unosa željenih modifikacija u dizajnu. Tehnikom 3D ispisa smanjenje se količina otpada i emisija ugljičnog dioksida te trošak energije, pripreme i prijevoza, a otvoreno je mnogo prostora za inovacije (Dick i sur., 2019; Jiang i sur., 2019; Portanguen i sur., 2019; Skartsaris i Piatti, 2019; Sun i sur., 2015; Wan i sur., 2015).

Iako su mogućnosti tehnologije 3D ispisa hrane velike, još uvijek postoje mnogi izazovi koje je potrebno savladati kao što su ispis kompleksno dizajnirane hrane s više sastojaka, dijelova ili tekstura (npr. hamburgeri) koji zahtijevaju posebnu i sofisticiranu obradu, te uporaba različitih sastojaka hrane s visokim razlikama u fizikalno-kemijskim svojstvima (Skartsaris i Piatti, 2019).

## 2.2. METODE 3D TISKANJA HRANE

Postoje različite tehnike 3D ispisa koje se mogu primijeniti u preradi hrane, a svaka od njih ima određeni opseg primjene. Odgovarajuća tehnika 3D ispisa odabire se prema karakteristikama prehrambenih materijala kako bi se dobio tiskani proizvod odgovarajuće preciznosti i kvalitete. U sljedećim poglavljima opisane su četiri tehnike 3D ispisa koje imaju primjenu u prehrambenoj industriji.

### 2.2.1. Tiskanje na bazi ekstruzije

3D ispis temeljen na ekstruziji je jednostavan proces koji je, u usporedbi s drugim tehnikama, u širokoj upotrebi. Glavna komponenta uređaja utemeljenog na ovoj tehnici je mlaznica s klipom (Slika 2). U procesu ispisa materijal za ispis kontinuirano se istiskuje iz pokretne mlaznice i potom dodaje na prethodno tiskane slojeve.

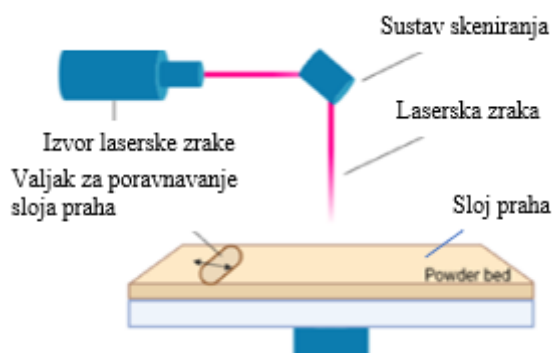


**Slika 2.** Shematski prikaz tiskanja na bazi ekstruzije (prema Varvara i sur., 2021)

U proizvodnji atraktivnog proizvoda ključni su preciznost i točnost 3D ispisa, a oni ovise o nekoliko čimbenika: mehanizmu istiskivanja, svojstvima materijala (reološka svojstva, želiranje, taljenje i temperatura staklastog prijelaza), parametrima ekstruzije (npr. visina i promjer mlaznice, brzina ekstruzije) i naknadnoj obradi (Liu i sur., 2017).

### 2.2.2. Tiskanje selektivnim laserskim sinteriranjem

Tehnologija selektivnog laserskog sinteriranja (Slika 3) primjenjuje snagu lasera za selektivno stapanje čestica praha sloj po sloj u konačnu 3D strukturu. Laser skenira poprečne presjeke svakoga sloja i selektivno spaja prah. Nakon skeniranja svakog poprečnog presjeka, valjkom se nanosi novi sloj praha te se postupak ponavlja do dobivanja željenog oblika. Sinterirani prah čini proizvod, a ostatak praha djeluje kao potporna struktura koja se po završetku ispisa uklanja i koristi za sljedeće tiskanje (Jiang i sur., 2021; Liu i sur., 2017).

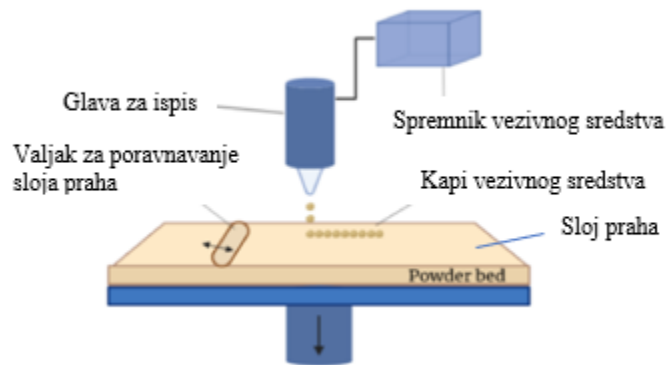


**Slika 3.** Shematski prikaz procesa selektivnog laserskog sinteriranja (prema Varvara i sur., 2021)

Ova tehnologija omogućuje proizvodnju 3D struktura visoke razlučivosti i kompleksnosti, no ograničena je na uporabu isključivo praškastih materijala poput šećera te granula masti ili škroba. Fizikalno-kemijska svojstva materijala (npr. veličina čestica, gustoća, sipkost, vlažnost, kompresibilnost, itd.) imaju velik utjecaj na debljinu sloja, a tako i na kvalitetu ispisa (Godoi i sur., 2016). Sloj praškastog materijala mora biti tanak i jednolik, što je ključno za mehaničku čvrstoću i preciznost objekta koji se tiska. Također, prah bi trebao biti sipak, bez tendencije stvaranja aglomerata ili prijanjanja uz kontaktne površine (Diaz i sur., 2014). Kao i u svakoj tehnologiji 3D ispisa, osim svojstva materijala, bitni su i čimbenici obrade poput vrste lasera, te snage i promjera laserske točke (Gu i sur., 2012).

### 2.2.3. Tiskanje primjenom vezivnog sredstva

Tehnologija ispisa primjenom vezivnog sredstva (Slika 4), za razliku od tehnologije selektivnog sinteriranja, za povezivanje slojeva koristi tekuće vezivno sredstvo. Vezivno sredstvo se izbacuje prema programiranoj putanji tako da ono povezuje slojeve praha koji u konačnici tvore željeni oblik. Nepovezani prah i u ovom slučaju djeluje kao potporna struktura koja se po završetku uklanja (Jiang i sur., 2021; Liu i sur., 2017).



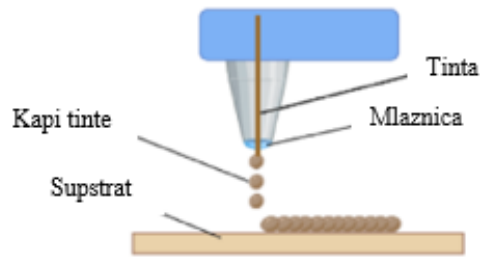
**Slika 4.** Shematski prikaz procesa tiskanja primjenom vezivnog sredstva (prema Varvara i sur., 2021)

U ovom postupku bitna su svojstva praškastog materijala i sredstva koji se koriste za povezivanje slojeva. Vezivno sredstvo mora biti odgovarajuće gustoće, viskoznosti, koncentracije, površinske napetosti te dobrih svojstva injektiranja iz mlaznice kako bi se izbjeglo nepoželjno raspršivanje i rasipanje (Liu i sur., 2017). Najčešće se koriste sredstva na bazi vode ili alkohola (otopine šećera, ksantana i dr.) (Holland i sur., 2018), a mogu biti obojena ili aromatizirana (Varvara i sur., 2021) što omogućuje konačne proizvode u širokoj paleti boja i okusa. Također, kao i kod tehnologije laserskog sinteriranja, fizikalno-kemijska svojstva praškastog materijala bitna su za nanošenje tankih slojeva koji su ključni za izradu preciznih objekata.

#### 2.2.4. Tintni ispis

Tintni ispis (Slika 5) primjenjuje se za površinsko popunjavanje i ukrašavanje prehrambenih proizvoda, kao što su torte, kolači ili pizze. Princip tintnog ispisa je propuštanje kapljica prehrambenog materijala koji se tiska (tzv. tinte) kroz toplinsku ili piezoelektričnu glavu (Kruth i sur., 2007). Postoje dvije vrste tintnog ispisa: kontinuirani mlazni tisak i „kapanje na zahtjev“. U kontinuiranom mlaznom pisaču tinta se kontinuirano izbacuje kroz piezoelektrični kristal koji vibrira pri konstantnoj frekvenciji, dok se kod „kapanja na zahtjev“ tinta izbacuje u obliku kapljica pod pritiskom ventila. Općenito, „kapanje na zahtjev“ je sporija metoda od kontinuiranog ispisa, no razlučivost i preciznost tiskanih slika su značajno veće (Hoath, 2016).





**Slika 5.** Shematski prikaz procesa tintnog ispisa (prema Varvara i sur., 2021)

Za tintni ispis koriste se materijali niske viskoznosti koji nemaju dovoljnu mehaničku čvrstoću da zadrži 3D strukturu, te se stoga koriste za ispis dvodimenzionalnih slika. Sa stajališta preciznosti i točnosti ispisa, ključna je kompatibilnost između tinte i površine supstrata, viskoznost, reološka svojstva i temperatura tinte te brzina ispisa (Liu i sur., 2017).

### 2.3. MATERIJALI ZA 3D TISKANJE HRANE

Materijali za tiskanje 3D proizvoda mogu se klasificirati prema lakoći ispisa, glavnim komponentama povezanim s prehranom i zdravljem kao što su proteini, škrob, vlakna, funkcionalni spojevi (npr. vitamini i antioksidansi) te prema podrijetlu materijala, kao što su tinte na bazi mlijeka, mesa, voća i povrća.

„Prirodno ekstrudibilni materijali” su oni s reološkim i mehaničkim svojstvima koji se mogu izravno ekstrudirati bez dodavanja aditiva kao što su npr. gume (Voon i sur., 2019). Najpopularniji takvi materijali za ispis su čokolada i pire krumpir. Visok sadržaj masti u čokoladi te škroba u krumpiru takvim smjesama omogućuju dobru sposobnost integracije bioaktivnih spojeva i drugih funkcionalnih sastojaka koji poboljšavaju kvalitetu ispisa (Escalante-Aburto i sur., 2021). Uz navedene materijale, sir (Le Tohic i sur., 2018) je također namirnica koja se lako tiska, dok tijesto (Liu i sur., 2019) i šećerna pasta (Kim i sur., 2017) predstavljaju nešto veći izazov.

Tradicionalna hrana kojoj nedostaju karakteristike potrebne za direktan ispis (npr. voće i povrće, riža, meso i dr.) zahtjeva dodatak aditiva kojima se reguliraju reološka i mehanička svojstva, ali i nutritivna vrijednost. Nutritivnu vrijednost čokolade moguće je povećati dodatkom vitamina C, praha od brusnice (Hao i sur., 2019) ili praha biljnih sterola (Mantihal i sur., 2019).

Severini i sur. (2018) su formulirali materijal za ispis od voća i povrća (mješavina mrkve, kivija, brokule, avokada i krušaka) s ribljim kolagenom kao koagulantom, dok su Kouzani i sur. (2017) za ispis koristili smjesu konzervirane tune, cikle i muškatne tikve. Proces tiskanja nije promijenio sadržaj fenola, senzorske i antioksidacijske karakteristike. Što se tiče 3D ispisa mesa, Lipton i sur. (2010) su ispisali proizvod kompleksne strukture purećeg mesa i celera s dodatkom transglutaminaze kao vezivnog sredstva, dok su Hertafeld i sur. (2019) koristili pastu od škampa ili mljevene piletine u kombinaciji s drugim sastojcima, poput bjelanjka. Nakon ispisa, proizvodi su sporo kuhani ili prženi, a dobiven je mesni proizvod s dobrom sposobnošću zadržavanja oblika (Escalante-Aburto i sur., 2021).

Primjenu u 3D ispisu hrane imaju i alternativni sastojci koji mogu zamijeniti tradicionalnu hranu. Funkcionalne sastojke, poput proteina i vlakana, moguće je izolirati iz kukaca (Severini i Derossi, 2016), algi, morskih algi ili gljiva (Sun i sur., 2015). Alternativni sastojci se u obliku paste ili praha mogu miješati s tradicionalnim sastojcima i koristiti za kreiranje individualnih obroka (Escalante-Aburto i sur., 2021).

Tehnologijom 3D ispisa povećava se prihvatljivost uporabe netradicionalne hrane, poput insekata (bogatih proteinima), morskih algi (bogatih dijetalnim vlaknima), voća i povrća (bogatih vlaknima i bioaktivnim spojevima) ili mesa, koji zbog promjene oblika i sastava postaju privlačniji potrošačima (Escalante-Aburto i sur., 2021).

## **2.4. PERSPEKTIVA PRIMJENE 3D TISKANJA HRANE**

Praktična primjena 3D tiskane hrane je upravo u proizvodnji hrane prilagođene individualnim zdravstveno-prehrambenim potrebama potrošača. Posljednjih godina došlo je do velikih promjena u personaliziranoj medicini, kontroli prehrane i terapijskim pristupima, ali i u tehnološkom razvoju povezanim s održivim prehrambenim inženjerstvom te preradom i obradom hrane (Tomašević i sur., 2021).

### **2.4.1. Razvoj personalizirane 3D tiskane hrane**

3D ispis hrane može se koristiti za razvoj personalizirane hrane osoba s posebnim prehrambenim potrebama. To znači da sastojci koji se koriste u sastavu smjese za ispis imaju poseban doprinos i prilagođeni su potrebama pojedinca. Na primjer, osoba s kroničnom bolesti bubrega treba prehranu s niskim udjelom kalija, pa se prilikom kreiranja obroka uvrštavaju

sastojci koji odgovaraju tom profilu (Varvara i sur., 2021). Ipak, proizvodnja personalizirane hrane zahtjeva detaljan uvid u potrošačke i nutricionističke studije. Potrošačke studije treba provesti s fokusom na individualne prilagodbe kako bi se ispitale trenutne mogućnosti 3D ispisa hrane i prihvatljivost takve hrane kod potrošača.

Sun i suradnici su 2018. objavili specifičnu analizu inovacija formulacija i naprednih profila prehrane te analizu tehnika ispisa temeljenih na ekstruziji, digitaliziranom dizajnu i kontroli prehrane. To će omogućiti digitalno upravljanje 3D pisacima za proizvodnju individualnih obroka sa željenim nutritivnim i senzorskim karakteristikama. Vizija digitalne gastronomije jest korisnicima omogućiti da putem računala kontroliraju teksturu, strukturu, miris, okusa i vizualni doživljaj svakog obroka.

#### 2.4.2. Pomoć pri liječenju poremećaja gutanja

Bolesti prehrane, poput probavnih problema, intolerancija i alergija, uzrokovane nepridržavanjem dijetetskih i farmaceutskih mjera, često dovode do nepotrebne hospitalizacije. Personalizirana 3D tiskana hrana ima potencijal da zadovolji prehrambene preporuke, a time smanji komplikacije i hospitalizacije.

Također, 3D tiskana hrana ima visok potencijal primjene kod osoba s poremećajem gutanja, kao što je disfagija (*lat. dysphagia*). Hranu je moguće dizajnirati tako da se zadovoljava posebne prehrambene potrebe pojedinca, a da pritom bude senzorski prihvatljiva i sigurna za konzumaciju. Prilikom kreiranja obroka prema individualnim potrebama pojedinca, potrebno je u obzir uzeti dob i zdravstveno stanje potrošača, potencijalne alergije, intolerancije, itd. (Hemsley i sur., 2019). Za pacijente s disfagijom naglasak je na konzistenciji i teksturi 3D tiskane hrane jer neodgovarajuća tekstura može uzrokovati gušenje i smrt (Hemsley i sur., 2015). U tom kontekstu, Pant i sur. (2021) proučavali su poboljšavanje materijala za ispis 3D tiskane hrane za osobe oboljele od disfagije. Glavna ideja je bila upotreba svježeg povrća i ugljikohidrata za ispis hrane zadovoljavajuće teksture i vizulanih senzorskih obilježja, očuvanog okusa i nutritivnog sastava. Takvu hranu je moguće distribuirati ili pripremati u bolnicama, staračkim domovima ili centrima za dnevnu skrb starijih osoba ili pacijenata sa srodnim bolestima. Kako bi se proizvela hrana koja zadovoljava standarde Međunarodne inicijative za standardizaciju prehrane za disfagiju (engl. *International Dysphagia Diet Standardisation Initiative, IDDSI*), grašak, mrkva i kineski kupus su pasirani i miješani s različitim hidrokolidima (ksanan guma,

$\kappa$ -karagenan i guma rogača korišteni u su različitim kombinacijama i udjelima od 0,3 % do 1 %). Istraživanje obuhvaća ispitivanje reoloških i teksturnih svojstava te sinerezu vode i mikrostrukturu tinte, a dobiveni rezultati mogu biti korisni u izradi budućih modela za ispis 3D tiskane hrane (Pant i sur., 2021).

#### 2.4.3. Kreiranje nutritivno bogate 3D tiskane hrane za djecu

3D ispis hrane u kućnoj radinosti mogao bi imati velik utjecaj na unaprjeđenje prehrambenih navika u djece. Kreiranjem prirodnih, uravnoteženih i atraktivnih oblika željene teksture i okusa povećao bi se interes za konzumaciju voća, povrća i mahunarki. Ovom tehnologijom mogu se kreirati raznovrsni atraktivni 3D tiskani oblici (npr. dinosauri, gusari, superheroji, vile, svemirski brodovi i dr.) koji bi potencijalno djeci biti zanimljivi (Slika 6) (Rubio i Hurtado, 2019).



**Slika 6.** Primjer 3D tiskane hrane za djecu (Stevenson, 2019)

#### 2.4.4. Razvoj 3D tiskane hrane s probioticima u liječenju poremećaja probave

Sljedeća atraktivna primjena 3D tiskane hrane je u poboljšanju probavljivosti hrane i gastrointestinalnog zdravlja. U ljudskom tijelu živi oko  $10^{14}$  bakterija koje čine mikrobiotu čovjeka. Najviše mikroorganizama ljudske mikrobiote smješteno je upravo u crijevima, te imaju veliki utjecaj na održavanje ljudskoga zdravlja. Crijevna mikrobiota ima ulogu u održavanju homeostaze domaćina, utječe na metaboličke procese, fiziološke funkcije, imunološki sustav, probavu hrane te štiti od patogena, a poremećaj ravnoteže se povezuje s nekim bolestima gastrointestinalnog trakta (Guinane i Cotter, 2013).

U nedavno provedenim istraživanjima ispitana je mogućnost uvođenja probiotika u 3D tiskanu hranu s ciljem poboljšanja probavnih problema povezanih s gastrointestinalnim

poremećajima. Liu i sur. (2020) su ispitivali izvedivost uključivanja *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* BB-12<sup>®</sup> u pire krumpir koji se koristio za tisak 3D proizvoda. Zaključeno je da je proizvodnja 3D tiskane hrane obogaćene korisnim bakterijama moguća, a najbolji rezultat je pokazao održivost iznad 9,773 log CFU/g, što je značajno više od preporučene doze u probiotičkoj hrani (6 log CFU/g).

Zhu i sur. (2020) su dizajnirali višestruki lijek proizveden 3D tiskanjem, a sastoji se od jezgre i omotača. Procijenjena je *in vitro* učinkovitost otpuštanja lijeka, njegov pozitivan učinak na *Bifidobacterium*, te inhibitorni učinci na *E. coli*. Modulacija otpuštanja lijeka (proteoglikana) uspješno je kontrolirana geometrijom membrane koja sadrži prebiotik stahiozu i pomoćne materijale (celulozni acetat i poliakrilna smola II). Stupanj proliferacije *Bifidobacterium bifidum* povećao se do 294,2 %, a inhibitorni učinak na *E. coli* do 37 %.

#### 2.4.5. Nutraceutski i funkcionalni 3D tiskani proizvodi

Najnoviji pristupi u dizajnu 3D tiskane hrane uključuju dodatak funkcionalnih i nutraceutskih sastojaka za proizvodnju hrane s potencijalom poboljšanja zdravlja. Takva se hrana može upotrebljavati za promicanje javnog zdravlja ili smanjenje učestalosti nezaraznih bolesti (Zhao i sur., 2020).

Osobe koje boluju od dijabetesa često konzumiraju zamjenske zaslađivače, poput maltitola i ksilitola. Navedeni sintetski zaslađivači, u kombinaciji s mješavinom funkcionalnih polisaharida, korišteni su za izradu 3D tiskanog proizvoda na bazi čokolade. Formula polisaharida uključuje ekstrakt gljive *Ganoderma*, gojija i liriopu. Navedeni sastojci imaju pozitivno djelovanje na ljudski organizam, uključujući regulaciju imuniteta, antioksidacijsko djelovanje, inhibiciju tumora i svojstva protiv starenja. Dobiveni su nutritivno vrijedni 3D proizvodi na bazi čokolade s dobrim teksturalnim karakteristikama čineći ovaj proizvod dobrom alternativom za dijabetičare (Escalante-Aburto i sur., 2021; Zhao i sur., 2020).

Kim i sur. (2018) su napravili procjenu upotrebe povrća kao izvora bioaktivnih spojeva u materijalima za 3D ispis hrane. Za formulaciju materijala za ispis korištena je smjesa praha brokule, špinata i mrkve u kombinaciji s hidrokolidima, a postavke 3D ispisa i reološka svojstva materijala procijenjeni su zadovoljavajućima. Ipak, za proizvodnju funkcionalnog 3D obroka nužna je i *in vivo* i *in vitro* procjena antioksidacijskog kapaciteta. Severini i sur. (2018) su napravili procjenu antioksidacijskog kapaciteta te odredili sadržaj ukupnih fenola u 3D tiskanim

*smoothie* sokovima proizvedenim od voća i povrća. *Smoothie* je sadržavao mrkvu, krušku, kiwi, listove brokule i avokado, a čvrsta faza se tiskala na 3D pisaču pri različitim procesnim parametrima. Rezultati su pokazali da se nakon 8 dana skladištenja (pri 5 °C) antioksidacijski kapacitet nije promijenio, no došlo je do smanjenja ukupnih fenola od 44,2 %.

Primjenu u 3D tiskanju hrane našao je i prah cvjetova gljive *Cordyceps militaris* koji u smjesi s biljnim uljem i gumama daje dobar materijal za ispis bogat bioaktivnim spojevima. Ova gljiva djeluje na poboljšanje imunološkog sustava te sadrži veliku količinu proteina, kordicepina, superoksid dismutaze i mnoge druge korisne sastojke (Teng i sur., 2019).

#### 2.4.6. Dizajn 3D tiskanih proizvoda s dodanim proteinima različitog porijekla

Primjenu prehrambenih pasta, izrađenih od materijala bogatih proteinima, škrobom i vlaknima, u 3D ispisu snack proizvoda istražili su Lille i sur. (2018). Sastojci korišteni u pripremi paste su modificirani prehrambeni škrob (iz voštanog kukuruza), fino mljevene ražene mekinje, koncentrat proteina zobi i faba, obrano i poluobrano mlijeko u prahu te celulozno nanovlakno. 3D tiskanu hranu moguće je naknadno osušiti u sušioniku (ili u kućnim uvjetima pećnici) kako bi se dobio niskoenergetski i zdravi snack proizvod. Istraživanje Anukiruthika i sur. (2020) također je obuhvatilo 3D tiskane snack proizvode bogate vlaknima i proteinima. Smjesa za tisak sastojala se od smrznutog praha gljiva, pšeničnog brašna i vode u različitim omjerima, a naknadnu obradu čini izlaganje mikrovalovima različite snage i trajanja s ciljem dobivanja što boljih karakteristika okusa i produljenog roka trajanja. Nadalje, u proizvodnji 3D tiskanih zdravih snack proizvoda otvoren je prostor za uporabu mnogih netradicionalnih i alternativnih sastojaka kao što su kompozitno brašno napravljeno od prosa, mung graha iz obitelji Fabaceae i ajowan sjemenki (*Trachyspermum ammi*) (Krishnaraj i sur., 2019).

Sastojci mliječnih proizvoda, poput mliječnih proteina, mliječne masti i laktoze, imaju dobra tehnološka svojstva za primjenu u tehnologiji 3D ispisa hrane (Ross i sur., 2019). Primjena je usmjerena na dizajniranje prilagođene hrane s ciljem rješavanja specifičnih fizioloških stanja, poput intolerancije na laktozu ili alergije na proteine kravljeg mlijeka. Le Tohic i sur. (2018) su kao materijal za 3D ispis koristili komercijalno dostupan topljeni sir koji je prije ispisa topljen, ekstrudiran i solidificiran kako bi se postigla konzistencija smjese povoljna za 3D ispis. Materijal je pokazao dobra svojstva ispisa, tekture i okusa, no kako bi se mogao potrošačima ponuditi kao personalizirana hrana, potrebno je napraviti procjenu biorasploživosti proteina tj. odrediti iskoristivost proteina iz hrane.

Proteini bjelanjka sastojci su visoke nutritivne i funkcionalne vrijednosti što ih čini obećavajućim sastojkom materijala za 3D ispis hrane. Liu i sur. (2020) su formulirali materijal za ispis koji se sastoji od proteina bjelanjaka, kukuruznog škroba, želatine i saharoze te ga optimirali za ispis kompleksnih 3D struktura. Ipak, još bolja svojstva ispisa moguće je postići s proteinima žumanjka u kombinaciji s rižinim brašnom (u omjeru 1:2), koji zbog interakcija škroba i proteina imaju dobra svojstva vezanja i sposobnost ispisa složenih tekstura (Anukiruthika i sur., 2020).

Kao alternativnu hranu, prvenstveno namijenjenu vegetarijancima, španjolski startup NovaMeat proizveo je visoko proteinski odrezak sa senzorskim karakteristikama piletine ili govedine. Proteini su biljnog porijekla, ekstrahirani iz riže, graška te morskih algi (Vialva, 2018).

#### 2.4.7. Primjena 3D tiskane hrane u liječenju i kontroli alergija ili intolerancije na hranu

Rast pojava alergijskih reakcija dogodio se paralelno s „Velikom akceleracijom“, tj. ubrzanim porastom ljudskih aktivnosti na Zemlji te promjenama okoliša i stila života uzrokovanih urbanizacijom (Haahtela i sur., 2021). Prema nedavnim podacima procjenjuje se da između 1,1 i 10,8 % svjetske populacije ima alergiju na hranu, a trend alergija na hranu je u porastu (Fetter, 2022). Diljem svijeta, najčešće alergije i intolerancije su na kazein, laktozu, jaja, gluten, kikiriki, sezam, soju, fruktozu, orašaste plodove, ribu i školjke. Izuzev izbjegavanja alergena i tretiranja nastalih alergijskih reakcija, lijek ne postoji, te se nastoje pronaći alternativna praktična rješenja (Loh i Tang, 2018).

Tvrtka WASP provela je projekt razvoja 3D pisača za pripremu bezglutenske hrane u kuhinji tradicionalnog restorana. DeltaWASP 2040 pisač omogućuje proizvodnju peciva prema željenoj recepturi, a sam pisač zauzima malo prostora, kontrolira udio kalorija u hrani i ne proizvodi otpad tijekom procesa pripreme (Moretti, 2017).

#### 2.4.8. Primjena 3D tiskane hrane kao nosača za različite lijekove

Primjena 3D tiska u farmaciji omogućila je izradu kompleksnih oblika različitih veličina i struktura, varijacija doza te karakteristika otpuštanja koje nije moguće proizvesti tradicionalnim metodama proizvodnje. Prvi 3D tiskani lijek za oralnu konzumaciju odobrila je Uprava za hranu

i lijekove (engl. *Food and Drug Administration, FDA*) 2016. godine. Lijek za epilepsiju omogućavao je trenutnu razgradnju aktivnog sastojka (Zidan, 2017).

Uporaba prirodnih tvari za proizvodnju 3D tiskanih lijekova još je u fazi proučavanja. Ipak, trend korištenja biorazgradivih i biokompatibilnih spojeva kao što su alginat, kitozan, želatina, pektin, natrijev hijaluronat, čokolada i drugi, ima značajnu prednost u odnosu na sintetske materijale (Aguilar-de-Leyva i sur., 2020). Mnoge su studije fokusirane na razvoj 3D tiskanih oblika koji će se koristiti kao farmaceutski nosači, no iako je ugradnja lijekova u hranu revolucionaran koncept koji otvara prostor za niz inovativnih studija, znanstvena literatura je i dalje ograničena.

Karavasili i sur. (2020) su dizajnirali 3D tiskani lijek za oralnu primjenu kod pedijatrijskih pacijenata koji sadržava ibuprofen i paracetamol ukomponiran u čokoladu. Kao bazni materijal za ispis korištena je goraka čokolada, a kao nosač lijeka korištena je mješavina otopljene gorke čokolade s kukuruznim sirupom u omjeru 1:1. Tiskani su upečatljivi i zanimljivi oblici kako bi ih pacijenti bolje prihvatili. Žvakanjem proizvoda u simuliranoj slinovnici pokazalo se povećano otpuštanje oba lijeka. Općenito, uporaba 3D tiska u proizvodnji nosača lijekova omogućila je fleksibilnost u prilagodbi doza za određene populacije i svrhe.

#### 2.4.9. Primjena 3D tiskane hrane u svemirskim misijama

Rane svemirske ekspedicije, uključujući programe Gemini i Mercury, fokus su imale na istraživanje i razvoj kalorične, hranjive i ukusne hrane, prvotno pakirane u tube ili kockice veličine zalogaja, a kasnije u limenke, vrećice ili u obliku prehrambenih pločica (Enfield i sur., 2022). Danas NASA (engl. *National Aeronautics and Space Administration, NASA*) opskrbljuje astronaute Međunarodne svemirske postaje (engl. *International Space Station, ISS*) pojedinačnim pakiranjima hrane, prethodno pripremljenima na Zemlji, koje je potrebno jednostavno ugrijati, a dostupni su i razni liofilizirani prilozi i pića koja je potrebno rehidratirati vodom. Ipak, ograničeni resursi u *ISS-u* onemogućuju hlađenje hrane, pa je rok trajanja takvih proizvoda do 6 mjeseci (NASA, 2019). Osim kratkog roka trajanja, pojedinačna pakiranja obroka zauzimaju puno prostora prije konzumacije, a njihova ambalaža nakon konzumacije postaje otpad.

Zdravlje posade ključno je za uspješnost svake misije, a održavanje prehrane astronauta postaje sve veći izazov sa udaljavanjem od Zemlje, a tako i bilo kakve šanse za misiju s



opskrbbom. Na primjer, misija slanja posade na Mars zahtjeva pripremu hrane za 5 godina (Enfield i sur., 2022). Hrana mora ostati što svježija, sadržavati točne količine potrebnih hranjivih tvari, stvarati što je moguće manje otpada i biti dovoljno ukusna kako bi je posada nastavila jesti.

U tu svrhu NASA je 2013. objavila plan istraživanja „Sustava 3D ispisa hrane za dugotrajne svemirske misije“ kojima bi se omogućio ispis hrane tijekom misija, u svemiru. Dizajnirani uređaj mora uključivati sustav za dugoročno i kratkoročno skladištenje makro- i mikronutrijenata, sustav za miješanje koji omogućuje formuliranje pasta i sustav za doziranje konačnog proizvoda. Najveća prednost 3D ispisa hrane jest proizvodnja bez otpada, što je ključno na misijama velike udaljenosti (Irwin, 2013).

Upravo je iz tog istraživanja 2016. nastao i Startup BeeHex koji se bazira na stvaranju uređaja za 3D ispis hrane koji će omogućiti astronautima raznolike obroke prilikom putovanja na Mars. Prvi uređaj konstruiran u tu svrhu je Chef 3D, uređaj koji kreira pizzu po želji brže i sigurnije od ljudskog kuhara (NASA, 2019).

2019. godine ruski su astronauti prvi puta u povijesti tiskali meso u svemiru. Prehrambeno-tehnološka tvrtka Aleph Farms biopsijom je ekstrahirala kravlje stanice te ih nacijepila na hranjivu podlogu koja imitira okoliš unutrašnjosti tijela krave i omogućuje im uvjete za razmnožavanje. Stanice sa hranjivom podlogom su letjelicom Soyuz MS-15 poslone na ruski segment *ISS*-a, gdje su procesirane na magnetskom pisaču ruske tvrtke 3D Bioprinting Solutions. Konačno, pisač je replicirao stanice kako bi proizveo mišićno tkivo, a uzorci su vraćeni na zemlju kao dokaz koncepta ispisa mesa u mikrogravitaciji (Bendix, 2019)

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio ovog rada proveden je u dva dijela. U prvom dijelu istraživanja provedeno je optimiranje uvjeta 3D ispisa kaše od jagode uporabom različitih programa ispisa te dodatkom različitih udjela i vrsta škrobova. U drugom dijelu istraživanja, primjenom odabranih parametara pripremljeni su uzorci iz čijih su ekstrakata spektrofotometrijski određeni bioaktivni spojevi i antioksidacijski kapacitet.

#### 3.1.MATERIJALI

##### 3.1.1. Voćna sirovina

Kao osnovna sirovina u pripremi smjese za 3D ispis korištena je kaša jagode (*Fragaria x ananassa* Duch.) sorte „Albion“ (Slika 7). Jagode su nabavljene putem tvrtke Jagodar-HB d.o.o (Donja Lomnica, Zagrebačka županija). Nakon dopremanja jagoda u laboratorij, odstranjene su im peteljke te su oprane, posušene staničevinom, zapakirane u plastične vrećice i skladištene pri -18 °C.



**Slika 7.** Svježi plodovi jagode sorte „Albion“

Jagode su usitnjene i homogenizirane štapnim mikserom kako bi se pripremila kaša jagode (kontrolni uzorak) kojoj su potom određeni aktivitet vode i pH vrijednost. Aktivitet vode iznosio je 0,95 pri temperaturi 21,6 °C, a pH vrijednost je iznosila 3,56. Ostalim uzorcima je prema planu pokusa (Tablica 1) dodavan škrob. Korišteni su kukuruzni škrob (Gustin, Dr.Oetker, Janossomorja, Mađarska) i pšenični škrob (Denes Natura Kft., Pečuh, Mađarska) u udjelima od 10, 15 i 20 % (w/w). Svaki tip dobivene smjese tiskan je putem dva različita programa 3D ispisa (vidi poglavlje 3.2.1.)

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Priprema smjese za 3D ispis

Priprema kaše od jagode započinje usitnjavanjem, prethodno odmrznutih plodova jagoda, te homogenizacijom pomoću štapnog miksera. Točna odvaga kaše jagode se potom prenosi u staklenu čašu te joj se dodaje škrob u udjelima od 10, 15 i 20 % (w/w). Smjesa kaše jagode i škroba se potom kontinuirano miješa i zagrijava na magnetskoj miješalici do konstantne temperature (oko 70 °C) s ciljem povećanja viskoznosti i dobivanja homogene smjese. Iako su Liu i sur. (2018) u pripremi smjese za 3D ispis s krumpirovim škrobom zagrijavanje u vodenoj kupelji provodili pri 70 °C/30 min, a Zeng i sur. (2021) koristeći rižin škrob pri 95 °C/30 min, u ovom je eksperimentu vrijeme zagrijavanja bilo znatno kraće te je zaustavljeno u trenutku kad je postignuta željena konzistencija kako bi se nutritivni sastav jagode maksimalno očuvao. Po završetku zagrijavanja i želatinizacije škroba, smjesa se hladi na sobnu temperaturu te podvrgava 3D ispisu.

### 3.2.2. Izvedba 3D ispisa

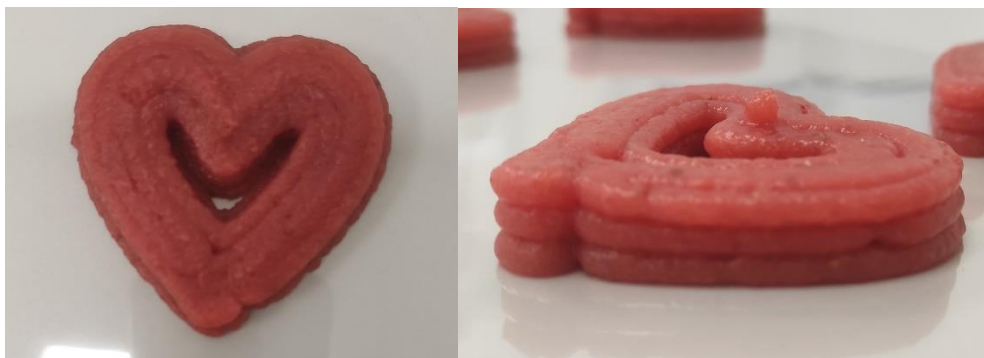
Za 3D ispis smjese korišten je Foodini 3D pisač (Natural Machines, Barcelona, Španjolska) (Slika 8.). Ispis se temelji na postupku ekstrudiranja, a svi dijelovi pisača koji dolaze u dodir sa hranom su napravljeni od materijala sigurnih za hranu. Kapsule za ispis izrađene su od nehrđajućeg čelika (X10 CrNi 18-8), svi plastični dijelovi izrađeni su od polikarbonata i/ili polipropilena bez prisutnosti Bisfenola A, a podloga za ispis izrađena je od silikona sigurnog za hranu (Natural Machines, 2022).



**Slika 8.** Foodini 3D pisač (Natural Machines, 2022)

Uređaj ima mogućnost postavljanja 5 kapsula (punjenih istom ili različitom smjesom) koje se tijekom ispisa automatski izmjenjuju prema zadanom programu ispisa. U ovom radu su

korištene kapsule volumena 100 mL i promjera mlaznice 4 mm, koje se pune smjesom kaše jagode i škroba pri sobnoj temperaturi, te se napunjene kapsule stavljaju u nosač postavljen s unutarnje strane 3D pisača. Odabir željenog oblika i ostalih parametara ispisa postavljeni su putem Foodini Creator Software-a na računalu. Za 3D ispisivanje odabran je oblik srca s tri sloja (Slika 9), a 3D ispis se provodio putem dva različita programa koji se razlikuju u brzini ispisa, debljini ispisne linije, brzini protoka smjese te visini mlaznice prvog sloja. Na svakom početku 3D ispisa, uređaj provodi testno ekstrudiranje smjese kako bi se provjerila prohodnost mlaznice.



**Slika 9.** Odabrani oblik za 3D ispis kaše jagode

Smjesa kaše jagode s dodatkom pšeničnog ili kukuruznog škroba u različitim postotcima ispisuje se na oba programa te su dobiveni uzorci (Tablica 1) iz kojih se mjeri pH vrijednost,  $a_w$  vode te rade ekstrakti za daljnje analize bioaktivnih spojeva i antioksidacijog kapaciteta. Uzorak 1 se odnosio na kontrolni uzorak, u koji se nije dodavao škrob te koji nije podvrgnut postupku 3D-tiskanja.

**Tablica 1.** Plan pokusa 3D ispisa za proizvode od jagoda

Uzorak	Škrob	Udio škroba	Program
1	-	-	-
2	Kukuruzni škrob	10 %	P1
3			P2
4		15 %	P1
5			P2
6			P1
7		20 %	P2
8		Pšenični škrob	10 %
9	P2		
10	15 %		P1
11			P2
12			P1
13	20 %		P2

### 3.2.3. Određivanje aktiviteta vode ( $a_w$ )

Aktivitet vode i temperatura uzoraka određivani su  $a_w$  metrom (AquaLab, P08584, Decagon Devices, Pullman, USA). Uređaj je prije prve upotrebe kalibriran. Kako bi se izvršilo mjerenje, uzorak se nanosi na standardnu čašicu za mjerenje tako da je cijela površina čašice prekrivena uzorkom. Očitani rezultati prikazani su kao srednja vrijednost dva paralelna mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.

### 3.2.4. Određivanje pH vrijednosti

Mjerenje pH vrijednosti određuje se pH-metrom (Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Švicarska), uranjanjem kombinirane elektrode u homogenizirani uzorak i očitavanjem pH vrijednosti.

Priprema uzorka: U čašu od 25 mL odvažuje se 5 g 3D tiskanog uzorka, te se dodaje 5 mL destilirane vode. Prije određivanja pH vrijednosti, uzorak se dobro homogenizira staklenim štapićem.

Postupak određivanja: Prije prvog mjerenja potrebno je pH-metar baždariti s puferima poznate pH vrijednosti. Nakon baždarenja, pH vrijednost se očitava uranjanjem elektrode u uzorak. Očitani rezultati prikazani su kao srednja vrijednost dva paralelna mjerenja  $\pm$  standardna devijacija.

### 3.2.5. Priprema ekstrakta

Ekstrakcija 3D ispisanih uzoraka potpomognuta je ultrazvukom te se provodi primjenom ultrazvučnog procesora (UP400St, Hielscher Ultrasound Technology, Njemačka) (slika 10). Djelovanjem ultrazvuka nastaju kavitacijski mjehurići koji razbijaju staničnu strukturu materijala, omogućivši tako bolje prodiranje otapala u matriks, što posljedično povećava prijenos mase i skraćuje trajanje ekstrakcije (Putnik i sur., 2017). Kao ekstrakcijsko otapalo korištena je vodena otopina metanola (80 %, v/v) s 1%-tnom mravljom kiselinom (v/v).



**Slika 10.** Ultrazvučni ekstraktor (Hielscher, 2022)

Aparatura i pribor:

- Ultrazvučni ekstraktor (UP400St, Hielscher Ultrasound Technology, Njemačka)
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Odmjerne tikvice, volumena 50 mL, 1 L
- Menzura, volumena 50 mL, 1 L
- Pipeta, volumena 10 mL
- Stakleni lijevak, filter papir
- Plastične falkonice volumena 50 mL
- Staklena čaše, volumena 100 mL
- Metalna špatula

Otapala i reagensi:

- Mravlja kiselina 98 % p.a. (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Metanol za HPLC  $\leq 99,9$  % (Honeywell, Riedel-de-Haën <sup>TM</sup>, Francuska)
- 1%-tna mravlja kiselina u 80%-tnom metanolu (v/v)

Priprema: 80 %-tni metanol priprema se u odmjernej tikvici od 1 L tako da se u nju prenese 800 mL metanola te se nadopuni destiliranom vodom do oznake. U drugu se odmjernu tikvicu od 1 L prenese 10 mL mravlje kiseline i nadopuni se do oznake s prethodno pripremljenim 80 %-tnim metanolom.

### Postupak ekstrakcije:

Na analitičkoj vagi u staklenu čašu od 100 mL odvažuje se 10 g 3D ispisanog uzorka (tj. kaša jagode kao kontrolni uzorak) te se nadoda 40 mL ekstrakcijskog otapala. Pripremljena smjesa se ekstrahira pomoću ultrazvučnog procesora, a zadani parametri ekstrakcije su: amplituda 50 %, puls 100 % i ekstrakcijsko vrijeme 5 minuta. Nakon provedene ekstrakcije, ekstrakt se od taloga odvoji u odmjernu tikvicu od 50 mL preko staklenog lijevka i filter papira, a potom se nadopuni do oznake ekstrakcijskim otapalom. Dobiveni ekstrakti se prebace u plastične falkonice volumena 50 mL te se uzorci čuvaju na 4 °C do provedbe ostalih analiza.

### 3.2.6. Određivanje bioaktivnih spojeva

#### *3.2.6.1. Određivanje ukupnih fenola*

Ukupni fenoli se određuju spektrofotometrijskom metodom u alkoholnom ekstraktu uzorka. Metoda se temelji na reakciji obojenja fenola i Folin-Ciocalteu reagensa koja se prati mjerenjem intenziteta obojenja pri 725 nm (Yuan i sur., 2018). Kvantifikacija rezultata analize se provodi iz baždarnog dijagrama putem galne kiseline kao fenolnog standarda.

### Aparatura i pribor:

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)
- Plastična lađica za vaganje, špatula
- Pipete, volumena 5 mL, 10 mL
- Mikropipete Eppendorf, volumena 200 µL i 1000 µL
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 100 mL i 1000 mL
- Staklena čaša volumena 200 mL
- Staklena menzura od 100 mL i 1 L

### Otapala i reagensi:

- Folin-Ciocalteu reagens (Fisher Scientific UK, Loughborough, Velika Britanija)

Priprema: Reagens je prije upotrebe potrebno razrijediti 5 puta sa destiliranom vodom

- Etanol 96 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat anhidrid (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Otopina natrijevog karbonata, 7,5 % (w/v)

Priprema: 75 g anhidrida natrijeva karbonata odvaže se u staklenoj čaši, kvantitativno se uz pomoć destilirane vode prenese u odmjernu tikvicu od 1 L i nadopuni destiliranom vodom do crte.

- Mravlja kiselina 98 % p.a. (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Metanol za HPLC  $\leq 99,9$  % (Honeywell, Riedel-de-Haën <sup>TM</sup>, Francuska)
- 1 %-tna mravlja kiselina u 80 %-tnom metanolu (vidjeti poglavlje 3.2.5.)
- Standard galne kiseline 97,5 - 102,5 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, Kina)
- Otopina standarda galne kiseline (5 g/L):

Priprema: 500 mg galne kiseline odvaže se u plastičnoj lađici i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola. Kada se galna kiselina u potpunosti otopi u etanolu, tikvica se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

Priprema uzorka: Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u poglavlju 3.2.5.

#### Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu se redom otpipetira 4 puta razrijeđen uzorak (100  $\mu$ L ekstrakta i 300  $\mu$ L ekstrakcijskog otapala), 400  $\mu$ L F.C. reagensa i 4 mL 7,5 % otopine natrijeva karbonata. Reakcijska smjesa se kratko homogenizira na vortex uređaju, te se uzorci ostave stajati 20 minuta, nakon čega se na spektrofotometru mjeri apsorbancija pri 725 nm. Određivanje se provodi u dvije paralele, a za slijepu probu se namjesto uzorka ekstrakcijsko otapalo.

#### Izrada baždarnog dijagrama:

Postupak pripreme za izradu baždarnog dijagrama je identičan protokolu za određivanje ukupnih fenolnih spojeva u uzorku, ali se razlikuje u tome što se umjesto 400  $\mu$ L ekstrakta dodaje 400  $\mu$ L galne kiseline poznate koncentracije (10, 25, 50, 100, 150 i 250 mg/L). Galna kiselina poznate koncentracije se priprema iz otopine standarda galne kiseline (5 g/L) pipetiranjem alikvota u odmjerne tikvice od 25 mL i nadopunjavanjem destiliranom vodom do oznake. Na isti način se priprema i slijepa proba, ali umjesto standarda uzima se destilirana voda. Iz



izmjerenih vrijednosti apsorbancije i koncentracije standarda galne kiseline dobije se baždarni dijagram čija jednadžba glasi (1):

$$y = 0,0078x - 0,0032 \quad [1]$$

$$R^2 = 0,9983$$

gdje je:

y - apsorbancija uzorka pri 725 nm

x - koncentracija galne kiseline (mg/L )

### 3.2.6.2. *Određivanje polimernih proantocijanidina*

Polimerni proantocijanidini se određuju temeljem specifične reakcije obojenja spojeva iz skupine flavan-3-ola s vanilinom. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se spektrofotometrijski pri 500 nm (Sun i sur., 1998)

#### Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Germany)
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Germany)
- Staklene kivete
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Mikropipete Eppendorf volumena 100 µL i 1000 µL
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL, 50 mL i 100 mL
- Menzura, volumena 100 mL
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Plastične lađice za vaganje, špatula
- Staklene čaše volumena 50 mL, 100 mL i 250 mL

#### Priprema kemikalija za analizu:

- Metanol za HPLC  $\leq 99,9$  % (Honeywell, Riedel-de-Haën TM, Francuska)
- Vanilin, 99 % (ThermoFisher, Kandel, Njemačka)
- 1 %-tna metanolna otopina vanilina

Priprema: U odmjernoj tikvici od 100 mL se otopi 1 g vanilina i nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom.

- Koncentrirana H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 96 % (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- 25%-tna otopina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Priprema: U odmjernu tikvicu od 50 mL u koju je dodano malo 100 %-tnog metanola (cca 20 mL) prenese se 13,02 mL 96 %-tne H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tikvica se tijekom dodavanja drži u hladnoj vodenoj kupelji, a koncentrirana H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se dodaje u malim obrocima. Po završetku dodatka kiseline, tikvica se do oznake nadopuni 100 %-tnim metanolom.

- Standard katehina (5 g/L)

Priprema: 500 mg standarda katehina odvaže se u plastičnoj lađici i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL pomoću 10 mL 100 %-tnog metanola. Kada se katehin u potpunosti otopi u metanolu, tikvica se metanolom nadopuni do oznake.

Priprema uzorka: Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u poglavlju 3.2.5.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu se redom pipetira 2,5 mL 1 %-tnog vanilina, 2,5 mL 25 %-tne otopine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 1 mL ekstrakta. Reakcijska smjesa se kratko homogenizira na vortex uređaju, a nakon 10 minuta stajanja na sobnoj temperaturi mjeri se apsorbancija pri 500 nm. Slijepa proba se priprema na isti način, ali umjesto ekstrakta se koristi ekstrakcijsko otapalo. Za svaki uzorak provedu su paralelna mjerenja.

Izrada baždarnog dijagrama:

Postupak pripreme za izradu baždarnog dijagrama je identičan protokolu za određivanje polimernih proantocijanidina u uzorku, ali se razlikuje u tome što se umjesto 1 mL ekstrakta dodaje 1 mL otopine katehina poznate koncentracije (10, 30, 60, 90, i 120 mg/L). Otopina katehina poznate koncentracije priprema se iz otopine standarda katehina (5 g/L), pipetiranjem alikvota u odmjerne tikvice od 25 mL i nadopunjavanjem do oznake 100 %-tnim metanolom. Na isti način se priprema i slijepa proba, ali umjesto standarda uzima se metanol. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije i koncentracije katehina dobije se baždarni dijagram čija jednadžba glasi (2):

$$y = 0,0053x - 0,0124 \quad [2]$$

$$R^2 = 0,9985$$

gdje je:

y - apsorbancija uzorka pri 500 nm

x - koncentracija katehina (mg/L)

### 3.2.6.3. *Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavanola*

Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavanola provodi se u metanolnom ekstraktu uzorka u kojem dolazi do kolorne reakcije uzorka i klorovodične kiseline. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se spektrofotometrom pri 320 nm za hidroksicimetne kiseline i 360 nm za flavanole (Howard i sur., 2003). Kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za klorogensku kiselinu, a ukupnih flavanola pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kvercetin.

#### Aparatura i pribor:

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene i kvarcne kivete
- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Mikropipete Eppendorf od 200, 1000 i 5000  $\mu$ L
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 100 mL
- Menzura, volumena 100 mL
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Plastična lađica za vaganje, špatula

#### Otapala i reagensi:

- Koncentrirana klorovodična kiselina 37 % (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Etanol 96 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična otopina (1 g/L HCl u 96%-tnom etanolu)  
Priprema: U odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetira se 0,227 mL 37 %-tne HCl i nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom
- Klorovodična otopina (2 g/L HCl u vodi)  
Priprema: U odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetira se 0,454 mL 37 %-tne HCl i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- Standard kvercetin hidrat 95 % (Acros Organics, Kina)
- Otopina standarda kvercetina (600 mg/L)

Priprema: 60 mg standarda kvercetina odvažuje se u plastičnoj lađici i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL pomoću 30 mL 100 %-tnog metanola. Kada se kvercetin u potpunosti otopi u metanolu, tikvica se metanolom nadopuni do oznake.

- Klorogenska kiselina, min. 95 %-tna (Alfa aesar, ThermoFisher, Kandel, Njemačka)
- Otopina standarda klorogenske kiseline (600 mg/L)

Priprema: 60 mg standarda klorogenske kiseline odvažuje se u plastičnoj lađici i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL pomoću 30 mL 100 %-tnog metanola. Kada se klorogenska kiselina u potpunosti otopi u metanolu, tikvica se metanolom nadopuni do oznake.

Priprema uzorka: Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u poglavlju 3.2.5.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu se redom pipetira 250 µL ekstrakta, 250 µL 1 g/L HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Prije mjerenja apsorbancije reakcijska smjesa se kratko homogenizira na vortex uređaju. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina mjeri se apsorbancija na 320 nm koristeći kvarcne kivete, dok se za određivanje ukupnih flavanola koriste staklene kivete i mjeri se apsorbancija na 360 nm. Slijepa proba se priprema na isti način, ali umjesto ekstrakta se koristi ekstrakcijsko otapalo. Za svaki uzorak provedu se paralelna mjerenja.

Izrada baždarnog pravca klorogenske kiseline:

Postupak pripreme za izradu baždarnog dijagrama klorogenske je identičan protokolu za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina u uzorku, ali se razlikuje u tome što se umjesto 250 µL ekstrakta dodaje 250 µL otopine klorogenske kiseline poznate koncentracije (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 i 500 mg/L). Otopina klorogenske kiseline poznate koncentracije se priprema iz otopine standarda (600 mg/L), pipetiranjem alikvota u odmjerne tikvice od 25 mL i nadopunjavanjem do oznake 80 %-tnim metanolom. Na isti način se priprema i slijepa proba, ali umjesto standarda uzima se 80 %-tni metanol. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije i koncentracije klorogenske kiseline dobije se baždarni dijagram čija jednadžba glasi (3):

$$y = 0,0025x - 0,0038 \quad [3]$$

$$R^2 = 0,9996$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 320 nm,

x – koncentracija klorogenske kiseline (mg/L).

#### Izrada baždarnog pravca kvercetina:

Postupak pripreme za izradu baždarnog dijagrama kvercetina jednak je postupku izrade baždarnog pravca klorogenske kiseline, ali se razlikuje u tome što se umjesto standarda klorogenske kiseline koristi standard kvercetina (600 mg/L) iz kojega se rade daljnja razrjeđenja, a do oznake se nadopunjava 100 %-tnim metanolom. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali umjesto standarda uzima se 100 %-tni metanol. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije i koncentracije klorogenske kiseline dobije se baždarni dijagram čija jednadžba glasi (4):

$$y = 0,0026x + 0,0083 \quad [4]$$

$$R^2 = 0,9995$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 360 nm,

x – koncentracija kvercetina (mg/L).

#### *3.2.6.4. Određivanje ukupnih flavonoida*

Ukupni flavonoidi se određuju u metanolnom ekstraktu gdje dolazi do kolorne reakcije flavonoida sa aluminijevim kloridom i kalijevim acetatom. Intenzitet obojenja mjeri se spektrofotometrom pri 415 nm (Chang i sur., 2002). Kvantifikacija se provodi iz jednadžbe baždarnog pravca za standard kvercetina.

#### Aparatura i pribor:

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)
- Pipete, volumena 5 mL, 10 mL
- Mikropipete Eppendorf od 200, 1000 i 5000  $\mu$ L
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 100 mL i 200 mL
- Menzura, volumena 100 mL
- Staklene epruvete i stalak za epruvete

- Plastične ladice za vaganje, špatula

Otapala i reagensi:

- Etanol 96 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Metanol za HPLC  $\leq 99,9$  % (Honeywell, Riedel-de-Haën TM, Francuska)
- Aluminijev klorid, 98,5 %, anhidrid (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Aluminijev klorid, 10 % (w/v)

Priprema: 10 g aluminijevog klorida otopi se u 10 mL destilirane vode, kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se potom nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- Kalijev acetat, 99 %, anhidrid (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Kalijev acetat, 1 M

Priprema: 9,845 g kalijevog acetata otopi se u 10 mL destilirane vode, kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se potom nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- Mravlja kiselina 98 % p.a. (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- 1 %-tna mravlja kiselina u 80 %-tnom metanolu (vidjeti poglavlje 3.2.5.)
- Standard kvercetin, 95 %, hidrat (Acros Organics, Kina)
- Otopina standarda kvercetina (200 mg/l)

Priprema: 20 mg standarda kvercetina odvaži se u plastičnoj ladici i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 200 mL uz pomoć 10 mL 100 %-tnog metanola. Kada se kvercetin u potpunosti otopi u metanolu, tikvica se metanolom nadopuni do oznake.

Priprema uzorka: Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u poglavlju 3.2.5.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu redom se pipetira 0,5 mL ekstrakta, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Slijepa proba se priprema na isti način, ali umjesto ekstrakta se uzima ekstrakcijsko otapalo, a umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida se dodaje destilirana voda. Reakcijska smjesa se kratko homogenizira na vortex uređaju, a nakon 30 minuta mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 415 nm. Za svaki uzorak provedena su paralelna mjerenja.

#### Postupak izrade baždarnog dijagrama kvercetina:

Postupak pripreme za izradu baždarnog dijagrama kvercetina identičan je protokolu za određivanje ukupnih flavonoida u uzorku, ali se razlikuje u tome što se umjesto 0,5 mL ekstrakta dodaje 0,5 mL otopine kvercetina poznate koncentracije (10, 25, 50, 75, 100, 150 i 200 mg/L). Otopina kvercetina poznate koncentracije se priprema iz otopine standarda (200 mg/L), pipetiranjem alikvota u odmjerne tikvice od 25 mL i nadopunjavanjem do oznake 100 %-tnim metanolom. Na isti način se priprema i slijepa proba, ali umjesto standarda uzima se 100 %-tni metanol, a umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida destilirana voda.. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije i koncentracije klorogenske kiseline dobije se baždarni dijagram čija jednadžba pravca glasi (5):

$$y = 0,0064x - 0,0362 \quad [5]$$

$$R^2 = 0,9998$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 415 nm,

x – koncentracija kvercetina (mg/L).

#### *3.2.6.5. Određivanje monomernih antocijana*

Monomerni antocijani se određuju na temelju svojstva pigmenata da pri promjeni pH dolazi do promjene njihove kemijske strukture, a posljedično i do promjene maksimuma apsorpcije. Snižanjem pH otopine dolazi do povećanja apsorpcije i obrnuto, a koncentracija antocijana proporcionalna je razlici apsorbancija u otopinama dvije različite pH vrijednosti pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije za pojedine antocijane (AOAC, 1990).

#### Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Germany)
- pH metar Mettler-Toledo FiveEasy F20 (Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Switzerland)
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)
- Staklene čaše, volumena 100 mL i 1000 mL
- Stakleni lijevak, filter papir
- Staklene kivete
- Analitička vaga (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Germany)

- Plastična lađica za vaganje, špatula
- Mikropipete Eppendorf, volumena 1000  $\mu$ L i 5000  $\mu$ L
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Odmjerne tikvica volumena 1000 mL

Otapala i reagensi:

- Mravlja kiselina 98 % p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Czech Republic)
- Metanol za HPLC  $\leq$  99,9 % (Honeywell, Riedel-de-Haën™, France)
- 1%-tna mravlja kiselina u 80 %-tnom metanolu (vidjeti poglavlje 3.2.5.)
- Klorovodična kiselina 37 % (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Czech Republic)
- Kalij klorid 99,0 – 100,5 % (ThermoFisher GmbH, Kandel, Germany)
- Kalij kloridni pufer pH 1 (Kalij klorid 0,025 M):

Priprema: 1,86 g kalijeva klorida odvaže se u plastičnoj lađici i kvantitativno prenese u staklenu čašu volumena 1 L, prethodno dobro ispranu deioniziranom vodom. U čašu se doda 960 mL deionizirane vode kako bi se odvaga otopila. Otopini se izmjeri pH i korigira se na vrijednost 1 ( $\pm$ 0,05) s klorovodičnom kiselinom (37 %). Podešena otopina se prenese u odmjernu tikvicu od 1 L i nadopuni do oznake deioniziranom vodom.

- Natrij acetat anhidrid 99 % (ThermoFisher GmbH, Kandel, Germany)
- Natrij acetatni pufer pH 4,5 (natrij acetat 0,4 M)

Priprema: 54,43 g natrijeva acetata trihidrata odvaže se u čašu od 100 mL te se kvantitativno prenese u čašu volumena 1L, prethodno dobro ispranu deioniziranom vodom. U čašu se doda 930 mL deionizirane vode kako bi se odvaga otopila. Otopini se izmjeri pH i korigira se na vrijednost 4,5 ( $\pm$ 0,05) s klorovodičnom kiselinom (37%). Podešena otopina se prenese u odmjernu tikvicu od 1 L i nadopuni do oznake deioniziranom vodom.

Priprema uzorka: Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u poglavlju 3.2.5.

Postupak određivanja:

Za svaki uzorak reakcije se postavljaju u dvije epruvete ( pri pH=1 i pH=4,5). U svaku se epruvetu otpipetira po 1 mL ekstrakta, potom se u jednu epruvetu doda 4 mL pufera pH=1, a u drugu pH=4,5. Nakon 20 minuta spektrofotometrom se mjere apsorbancije pri 520 i 700 nm, uz deioniziranu vodu kao slijepu probu. Za svaki uzorak provedena su paralelna mjerenja.



### Izračunavanje:

Monomerni antocijani u uzorku se određuju kao ekvivalent pelargonidin-3-glukozida prema formuli (6):

$$\frac{A \times MV \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l} \quad [6]$$

gdje je (7):

$$A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH=1} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH=4,5} \quad [7]$$

MW (molekulska masa pelargonidin-3-glukozida) = 468,8 g/mol

DF - faktor razrjeđenja

$10^3$  – faktor preračunavanja g u mg

$\epsilon$  (molarni apsorpcijski ekstinkcijski koeficijent za pelargonidin-3-glukozida u otapalu 1 %

HCl/MeOH) = 31600 L/mol cm

l – debljina kivete

### 3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

#### 3.2.7.1. DPPH metoda

Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom temelji se na reakciji stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala i fenolnog spoja, pri čemu dolazi do kolorne reakcije čiji apsorpcijski maksimum se postiže u vidljivom dijelu spektra (517 nm). Do reakcije dolazi sparivanjem nesparenog elektrona DPPH radikala s vodikom fenolnog spoja pri čemu nastaje reducirani oblik DPPH-H, a boja se mijenja iz ljubičaste u žutu. Promjena boje je u stehiometrijskom odnosu sa brojem sparenih elektrona (Prior i sur., 2005; Braca i sur., 2001).

### Aparatura i pribor:

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL i 10 mL
- Mikropipete Eppendorf od 200, 1000 i 5000  $\mu$ L

- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 100 mL
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Plastična lađica za vaganje, špatula
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)

Otapala i reagensi:

- Metanol za HPLC  $\leq 99,9\%$  (Honeywell, Riedel-de-Haën<sup>TM</sup>, Francuska)
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) (Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD)
- Otopina DPPH 0,2 mM u 100 %-tnom metanolu (v/v)  
 Priprema: 0,0079 g DPPH radikala odvaže se u plastičnoj lađici za vaganje te se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL uz pomoć 100 %-tnog metanola. Tikvica se nadopuni do oznake sa 100 %-tnom metanolom, a otopina se do uporabe čuva u mraku.
- Otopina DPPH 0,5 mM u 100 %-tnom metanolu (v/v)  
 Priprema: 0,02 g DPPH radikala odvaže se u plastičnoj lađici za vaganje te se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL uz pomoć 100 %-tnog metanola. Tikvica se nadopuni do oznake sa 100 %-tnim metanolom, a otopina se do upotrebe čuva u mraku.
- Standard Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) (Biosynth s.r.o., Bratislava, Slovačka)
- Otopina Troloxa 1 mM  
 Priprema: 0,025 g Troloxa odvaže se u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno se prenese 100 %-tnim metanolom u odmjernu tikvicu od 100 mL. Tikvica se do oznake nadopuni 100 %-tnim metanolom.

Priprema uzorka: Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u poglavlju 3.2.5.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu se otpipetira 1,5 mL ekstrakta i 3 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za kontrolu se pipetira 1,5 mL 100 %-tnog metanola i 3 mL 0,5 mM otopine DPPH. Izmjerena apsorbancija pojedinih uzoraka se oduzima od apsorbancije kontrole. Kao slijepa proba koristi se 100 %-tni metanol. Nakon postavljanja reakcije, epruvete stoje u mraku 20 minuta, a potom im se mjeri apsorbancija pri 517 nm. Za svaki uzorak provedu se paralelna mjerenja.

### Postupak izrade baždarnog dijagrama standarda Troloxa:

Otopine Troloxa poznatih koncentracija pripremaju se iz alikvotne otopine standarda koncentracije 1 mM na način da se pripreme razrjeđenja u koncentracijama 10, 25, 50, 100, 125 i 150  $\mu\text{M}$  u odmjernim tikvicama volumena 25 mL. Postavljanje reakcije identično je kao i u postupku određivanja, samo se umjesto ekstrakta uzima odgovarajuće razrjeđenje standarda Troloxa. Kontrola i slijepa proba identični su kao i u postupku određivanja. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije i koncentracije standarda Troloxa izrađuje se baždarni dijagram čija jednadžba pravca glasi (8):

$$y = -0,0037x + 2,3781 \quad [8]$$

$$R^2 = 0,9994$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 517 nm,

x – koncentracija Troloxa ( $\mu\text{M}$ ).

#### 3.2.7.2. FRAP metoda

FRAP metoda određivanja antioksidacijskog potencijala temelji se na redukcijskoj reakciji žuto obojenog kompleksa TPTZ-a (željezo-2,4,6-tris-2-piridil-s-tirazin) u plavo obojeni kompleks sa apsorpcijskim maksimumom pri 593 nm (Benzie, 1996).

Aparatura i pribor:

- UV/Vis Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Njemačka)
- Staklene kivete
- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Tehnička vaga Kern (PCB 2500-2, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Električna vodena kupelj Grant (JBN5, Cambridge, UK)
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Mikropipete Eppendorf od 200, 1000 i 5000  $\mu\text{L}$
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL, 50 mL, 100 mL i 1 L
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Plastična ladica za vaganje, špatula

- Staklena čaša, volumena 250 mL

Priprema kemikalija za analizu:

- Metanol za HPLC  $\leq 99,9$  % (Honeywell, Riedel-de-Haën <sup>TM</sup>, Francuska)
- Standard Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) (Biosynth s.r.o., Bratislava, Slovačka)
- Otopina Troloxa, 1 mM  
Priprema: 0,025 g Troloxa odvažuje se u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno se prenese 100 %-tnim metanolom u odmjernu tikvicu od 100 mL. Tikvica se do oznake nadopuni 100 %-tnim metanolom.
- Klorovodična kiselina, 37 %-tna (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Klorovodična kiselina, 40 mM  
Priprema: 330  $\mu$ L 37 %-tne klorovodične kiseline otpipetira se u tikvicu od 100 mL koja se zatim nadopuni se do oznake destiliranom vodom.
- TPTZ (2,4,6-tris-2-piridil-s-triazin) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Otopina TPTZ-a, 10 mM  
Priprema: 0,156 g TPTZ-a odvažuje se u plastičnoj lađici i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 50 mL koja se potom nadopuni do oznake 40 mM klorovodičnom kiselinom.
- Željezo (III)-klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Otopina željezo (III) klorida heksahidrata, 20 mM  
Priprema: 0,2705 g željezo (III) klorida heksahidrata odvažuje se u plastičnoj lađici i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 50 mL koja se zatim nadopuni do oznake destiliranom vodom.
- Glacijalna octena kiselina,  $\geq 99,8$  % (Honeywell, Fluka <sup>TM</sup>, Seelze, Njemačka)
- Natrijev acetat trihidrat otporan prema kalijevu permanganatu (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Acetatni pufer (pH 3,6), 0,3 M  
Priprema: 3,1 g natrij acetat trihidrata odvažuje se u plastičnoj lađici i destiliranom vodom se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 1 L u koju se zatim otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline. Tikvica se do oznake nadopuni destiliranom vodom.
- FRAP reagens

Priprema: U staklenu čašu volumena 250 mL pomiješa se 170 mL acetatnog pufera (0,3 M), 17 mL TPTZ reagensa i 17 mL otopina željezo (III) klorida heksahidrata (20 mM).

Priprema uzorka: Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u poglavlju 3.2.5.

Postupak određivanja:

U staklene epruvete redom se otpipetira 600  $\mu$ L ekstrakta razrijeđenog 10 puta i 4,5 mL FRAP reagensa. Reakcijska smjesa se kratko homogenizira na vortex uređaju i 10 minuta termostatira u vodenoj kupelji pri 37 °C. Slijepa proba sadržava sve osim ekstrakta, umjesto kojeg se dodaje ekstrakcijsko otapalo. Nakon 10 minuta očitava se apsorbancija pri 593 nm.

Postupak izrade baždarnog dijagrama standarda Troloxa:

Otopine Troloxa poznatih koncentracija pripremaju se iz alikvotne otopine standarda koncentracije 1 mM na način da se pripreme razrjeđenja u koncentracijama 10, 25, 50, 100, 125 i 150  $\mu$ M u odmjernim tikvicama volumena 25 mL. Postavljanje reakcije identično je kao i u postupku određivanja, samo se umjesto ekstrakta uzima odgovarajuće razrjeđenje standarda Troloxa. Slijepa proba sadržava sve osim ekstrakta, umjesto kojeg se dodaje 100 %-tni metanol. Reakcijska smjesa termostatira se 10 minuta u vodenoj kupelji pri 37 °C, a potom se mjeri apsorbancija. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije pri 593 nm i koncentracije standarda Troloxa izrađuje se baždarni dijagram čija jednadžba pravca glasi (9):

$$y = 0,005x - 0,0081 \quad [9]$$

$$R^2 = 0,9992$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 593 nm,

x – koncentracija Troloxa ( $\mu$ M).

### 3.2.8. Statistička obrada podataka

Eksperimenti su dizajnirani kao puni faktorski randomizirani eksperimentalni dizajn. Za karakterizaciju uzoraka korištena je deskriptivna statistika. Diskretne varijable testirane su MANOVA analizom, a za neparametrijsku analizu korišten je Kruskal Wallis test. Razina značajnosti za sve testove bila je  $\alpha \leq 0,05$ , a rezultati su analizirani pomoću statističkog programa SPSS-a (v.22).

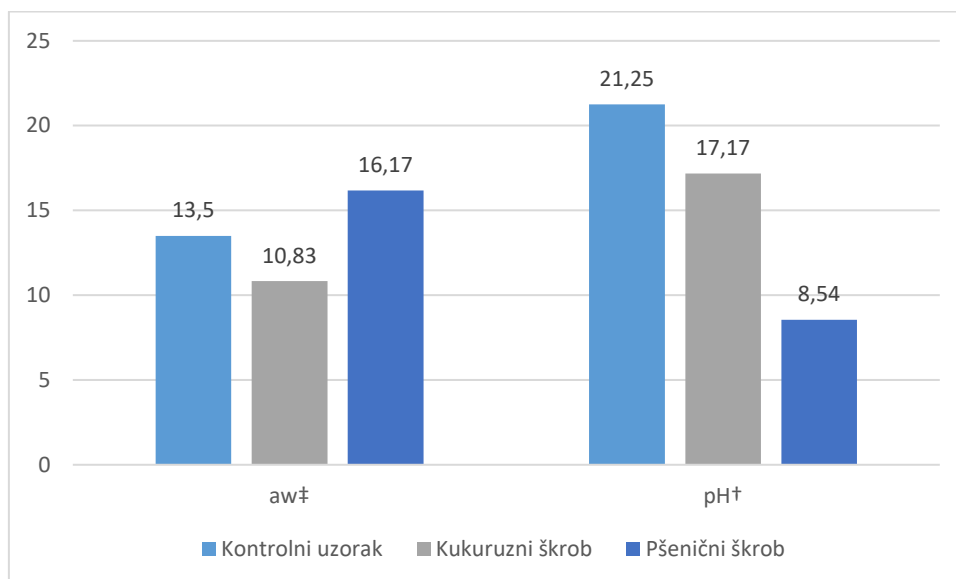
## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

U ovom istraživanju analizirano je ukupno 13 uzoraka koji se međusobno razlikuju prema vrsti i udjelu škroba te programu korištenom za 3D ispis (vidi poglavlje 3.2.2., tablica 1). Zavisne varijable koje su mjerene eksperimentalno, a potom statistički analizirane obuhvaćaju  $a_w$  i pH vrijednosti, bioaktivne spojeve i antioksidacijske kapacitete. Statistička obrada obuhvaća MANOVA analizu i Kruskal Wallis test, a rezultati su prikazani u sljedećim poglavljima.

### **4.1. USPOREDBA KONTROLNIH I 3D TISKANIH PROIZVODA PREMA pH i $a_w$ VRIJEDNOSTI**

Pomoću Kruskal Wallis testa dobiven je prikaz usporedbe rangova prosjeka prema aktivitetu vode ( $a_w$ ) i pH vrijednosti između kontrolnog uzorka (kaša jagode bez dodatka škroba) i 3D tiskanih uzoraka koji sadrže različite tipove škroba (Slika 11).

Škrob je hidrokolid koji se u ovom istraživanju koristi za modifikaciju konzistencije smjese kako bi se omogućio 3D ispis. U interakciji sa vodom stvara vodikove veze i formira trodimenzionalnu mrežu gela, a tijekom zagrijavanja apsorbira vodu i bubri, što rezultira promjenom količine slobodne vode (Liu i sur., 2020). Ipak, u ovom je slučaju se promjena  $a_w$  vrijednosti između kontrolnog uzorka i 3D tiskanih uzoraka nije pokazala značajnom. Između ranga prosjeka pH vrijednosti kontrolnog uzorka i 3D tiskanih uzoraka evidentirana je statistički značajna razlika. Rezultati ukazuju kako je kod oba tipa škroba došlo do smanjenja pH vrijednosti.



\*Rezultati su izraženi kao rang prosjeka izmjerenih vrijednosti. Predstavljene vrijednosti su statistički različite pri  $p \leq 0,05$ ; † značajan faktor u Kruskal Wallis analizi; ‡ nije značajan faktor u Kruskal-Wallisovoj analizi. x os – parametar određivanja; y os – izmjerena vrijednost

**Slika 11.** Rangovi prosjeka za  $a_w$  i pH vrijednosti u kontrolnim uzorcima i 3D tiskanim uzorcima uz dodatak različite vrste škroba

#### 4.2. USPOREDBA KONTROLNIH I 3D TISKANIH PROIZVODA PREMA SADRŽAJU BIOAKTIVNIH SPOJEVA

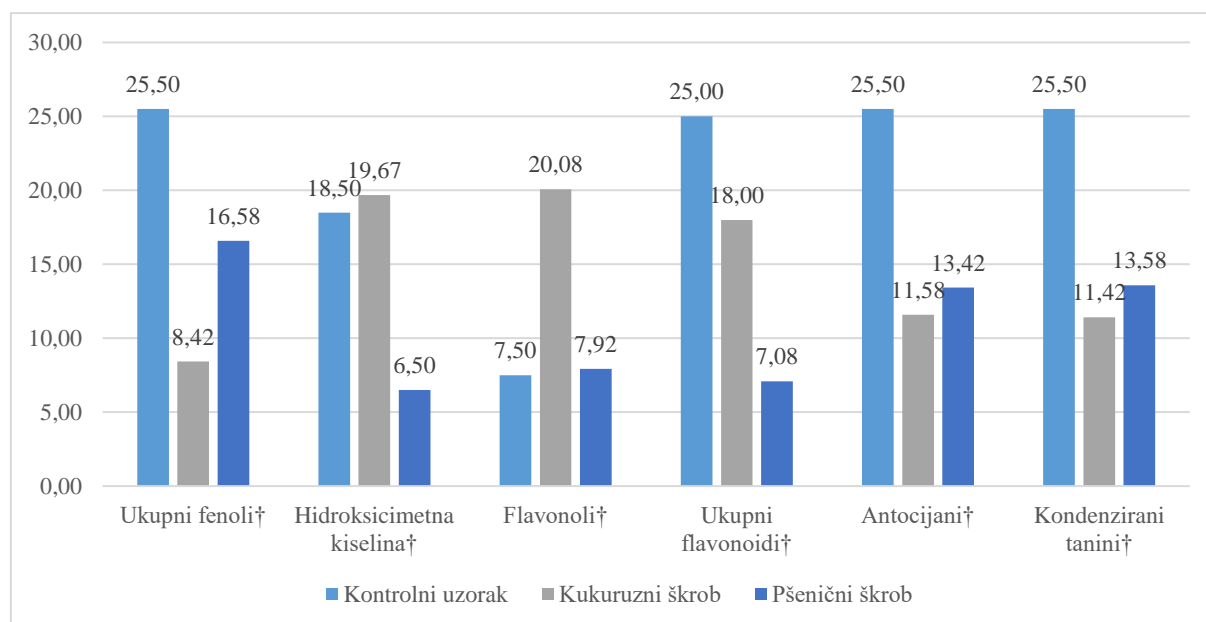
Pomoću Kruskal Wallis testa dobiven je prikaz usporedbe rangova prosjeka prema sadržaju analiziranih bioaktivnih spojeva između kontrolnog uzorka i 3D tiskanih uzoraka koji sadrže različite tipove škroba (Slika 12).

Statistički značajna razlika između kontrolnih i 3D tiskanih uzoraka evidentirana je kod svih određivanih bioaktivnih spojeva. Trenutna znanstvena literatura ne sadrži mnogo podataka o utjecaju 3D ispisa na sadržaj bioaktivnih komponenti 3D tiskanih smjesa. Ipak, dobiveni rezultati u ovom radu poklapaju se sa rezultatima Severini i sur. (2018) koji su tiskali čvrstu fazu smoothija od voća i povrća, te nakon 8 dana skladištenja pri 5 °C zabilježili gubitak ukupnih fenola od 44,2%.

Smanjenje količine bioaktivnih spojeva u 3D tiskanim uzorcima u odnosu na kontrolni uzorak može se povezati sa zagrijavanjem koje je provedeno pri izradi smjese za ispis. Gubitak antocijana je očekivan zbog iznimne nestabilnosti pri povišenim temperaturama, ali i

podložnosti razgradnji pod utjecajem drugih čimbenika poput pH vrijednosti, prisutnosti svjetla, kisika, šećera i kopigmenata (Weber i Larsen, 2017).

Ta je pretpostavka u skladu s istraživanjem Marszałek i sur. (2015) vezano uz promjenu bioaktivnih spojeva u termički obrađenoj kaši od jagode. Zagrijavanje se provodilo pri 90 °C tijekom 15 min, a rezultiralo je smanjenjem ukupnih fenola za 13,8 %, i smanjenjem monomernih antocijana za 43 % u odnosu na kontrolni, termički neobrađeni uzorak. Također, gubitak ukupnih fenola i antocijana evidentiran je i u istraživanju Rababah i sur. (2011) tijekom proizvodnje džema. Džem je proizveden od kaše jagode uz dodatak šećera, vode i pektina, a smjesa je zagrijavana do točke ključanja. Autori su izvijestili da je gubitak ukupnih fenola od 93,2%, a antocijana 96,6% u odnosu na svježju kašu od jagode.



\*Rezultati su izraženi kao rang prosjeka izmjerenih vrijednosti. Predstavljene vrijednosti su statistički različite pri  $p \leq 0,05$  ; † značajan faktor u Kruskal Wallis analizi; ‡ nije značajan faktor u Kruskal-Wallisovoj analizi. x os – parametar određivanja; y os – izmjerena vrijednost

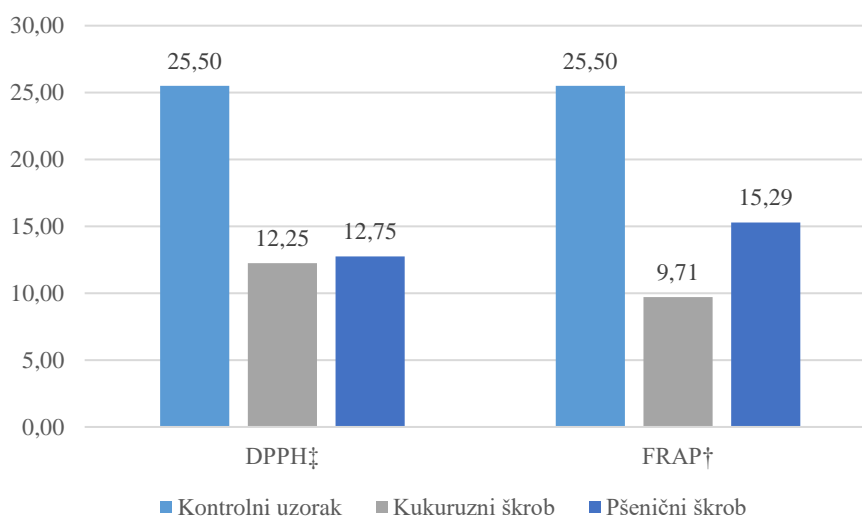
**Slika 12.** Rang prosjeka za sadržaj bioaktivnih spojeva u kontrolnim uzorcima i 3D tiskananim uzorcima uz dodatak različite vrste škroba



### 4.3. USPOREDBA KONTROLNIH I 3D TISKANIH PROIZVODA PREMA ANTIOKSIDACIJSKOM KAPACITETU

Najznačajnija uloga bioaktivnih spojeva je posjedovanje snažne antioksidacijske aktivnosti, tj. sposobnost inhibicije i supresije slobodnih radikala koji ubrzavaju nepoželjne oksidacijske procese u stanicama, povezanih s ubrzanim razvojem karcinoma, kroničnih bolesti i starenja (Šić Žlabur i sur., 2020). Pomoću Kruskal Wallis testa dobiven je prikaz usporedbe rangova prosjeka prema antioksidacijskom kapacitetu između kontrolnog uzorka (kaša jagode bez dodatka škroba) i 3D tiskanih uzoraka koji sadrže različite tipove škroba (Slika 13). Antioksidacijski kapacitet određivan je DPPH i FRAP metodama.

Najveći antioksidacijski kapacitet posjeduju kontrolni uzorci. Smanjenje antioksidacijskog kapaciteta u 3D tiskanim uzorcima može se povezati sa smanjenjem sadržaja bioaktivnih spojeva. Ipak, DPPH metodom nije utvrđena značajna razlika u antioksidacijskom kapacitetu, dok je FRAP metoda dala suprotne rezultate. U literaturi su također mješoviti rezultati, pa tako Severitni i sur. (2018) nisu zabilježili značajnu promjenu u antioksidacijskom kapacitetu 3D tiskanih *smoothija* u odnosu na kontrolni uzorak. Suprotno tome, Rababah i sur. (2011) su zabilježili značajno smanjenje antioksidacijskog kapaciteta od 22,6% u termički obrađenom džemu od jagode.



\*Rezultati su izraženi kao rang prosjeka izmjerenih vrijednosti. Predstavljene vrijednosti su statistički različite pri  $p \leq 0,05$ ; † značajan faktor u Kruskal Wallis analizi; ‡ nije značajan faktor u Kruskal-Wallisovoj analizi. x os – parametar određivanja; y os – izmjerena vrijednost

**Slika 13.** Rang prosjeka za antioksidacijski kapacitet u kontrolnim uzorcima i 3D tiskanim uzorcima uz dodatak različite vrste škroba

#### 4.4. UTJECAJ VRSTE ŠKROBA, UDJELA ŠKROBA TE PROGRAMA 3D ISPISA NA AKTIVITET VODE $a_w$ I pH VRIJEDNOSTI U 3D TISKANIM PROIZVODIMA

U tablici 2. prikazan je utjecaj vrste i udjela škroba, te programa 3D ispisa na aktivitet vode i pH vrijednosti u 3D tiskanim proizvodima. Prosječna vrijednost aktiviteta vode u 3D tiskanim uzorcima iznosi  $0,95 \pm 0,01$  %. Kao značajan faktor koji utječe na  $a_w$  vrijednost ističu se tip i udio škroba korišteni u formulaciji smjese za ispis, dok tip programa 3D ispisa nema statistički značajan utjecaj. Prema dobivenim rezultatima može se uočiti trend povećanja  $a_w$  s povećanjem udjela škroba, što nije u skladu s literaturom, prema kojoj pri višim koncentracijama škroba raste broj vodikovih veza te rezultira jačom mrežom gela i manjom  $a_w$  vrijednosti (Huang i sur., 2017).

Prosječna pH vrijednost 3D tiskanih uzoraka iznosi  $3,53 \pm 0,02$ . Svi promatrani parametri (vrsta i tip škroba te program ispisa) značajno utječu na pH. Više vrijednosti pH evidentirane su kod 3D tiskanog proizvoda sa pšeničnim škrobom u višim udjelima dodanih škrobova (15 i 20 % vs. 10 %) tiskanom Programom 2. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjem Rababah i sur. (2011) koji iznose prosječnu pH vrijednost jagode od  $3,50 \pm 0,00$ . Proizvodnjom džema, koja uključuje dodatak pektina i termičku obradu, evidentirano je smanjenje pH vrijednosti, što u ovom istraživanju odgovara uzorcima sa kukuruznim škrobom u udjelu od 10 %.

**Tablica 2.** Rezultati multifaktorske analize o utjecaju vrste škroba, udjela škroba te programa ispisa na  $a_w$  i pH vrijednosti u 3D tiskanim proizvodima

PARAMETAR	n	$a_w$ (%)	pH
<b>Vrsta škroba</b>		$p \leq 0,01^\dagger$	$p \leq 0,01^\dagger$
Kukuruzni	12	$0,94 \pm 0,00^b$	$3,38 \pm 0,00^b$
Pšenični	12	$0,95 \pm 0,00^a$	$3,50 \pm 0,00^a$
<b>Udio škroba</b>		$p \leq 0,01^\dagger$	$p \leq 0,01^\dagger$
10 %	8	$0,94 \pm 0,00^b$	$3,25 \pm 0,00^b$
15 %	8	$0,96 \pm 0,00^a$	$3,53 \pm 0,00^a$
20 %	8	$0,95 \pm 0,00^a$	$3,53 \pm 0,00^a$
<b>Tip programa 3D ispisa</b>		$p = 0,12^\ddagger$	$p \leq 0,01^\dagger$
Program 1	12	$0,95 \pm 0,00^a$	$3,35 \pm 0,00^b$
Program 2	12	$0,95 \pm 0,00^a$	$3,53 \pm 0,00^a$
<b>Prosječna vrijednost</b>	24	$0,95 \pm 0,01$	$3,53 \pm 0,02$

\*Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost paralelnih mjerenja  $\pm$  standardna pogreška. Vrijednosti

predstavljene različitim slovima statistički su različite pri  $p \leq 0,05$  ; † značajan faktor u multifaktorskoj analizi; ‡ nije značajan faktor u multifaktorskoj analizi.

#### **4.5. UTJECAJ VRSTE ŠKROBA, UDJELA ŠKROBA TE PROGRAMA ISPISA NA UDIO BIOAKTIVNIH SPOJEVA**

Tablica 3 sadrži podatke o utjecaju vrste i udjela škroba, te programa 3D ispisa na sadržaj bioaktivnih spojeva u 3D tiskanim proizvodima. Prosječan udio ukupnih fenola u 3D tiskanom proizvodu od jagode je  $78,57 \pm 1,08$  mg GAE/100 g tiskanog uzorka što je, kada se u obzir uzme udio voćne komponente, u skladu s rezultatom istraživanja Wang i sur. (2000) koji su zabilježili udio ukupnih fenola  $103 \pm 2,0$  mg GAE/100 g svježe jagode. Kao najzastupljeniji, od svih određivanih fenolnih spojeva, ističu se kondenzirani tanini s prosječnim udjelom od  $44,46 \pm 0,19$  mg katehina/100 g ispisanog uzorka, slijede hidroksicimetne kiseline ( $16,54 \pm 0,18$  mg CAE/100 g ispisanog uzorka), potom monomerni antocijani ( $7,56 \pm 0,02$  mg Pel-3-glc/100 g ispisanog uzorka) i flavonoli ( $5,30 \pm 0,12$  mg QE/100 g ispisanog uzorka). Najmanja je zastupljenost flavonoida, koja iznosi  $4,90 \pm 0,04$  mg QE/100 g ispisanog uzorka.

Općenito, sadržaj većine bioaktivnih spojeva u 3D tiskanim proizvodima od jagode pokazao se nižim, nego u literaturnom pregledu. Pa tako, prema De Souza i sur. (2014) udio antocijana iznosi  $16,03 \pm 0,50$  mg Cyd-3-gal/100 g svježe jagode, a ukupnih flavonoida  $38,17 \pm 2,76$  mg QE/100 g svježe jagode. Marszałek i sur. (2015) odredili su udio flavonola u kaši jagode koji iznosi  $5,67 \pm 0,34$  mg QE/100 g kaše jagode, što je u skladu sa rezultatima dobivenima u ovom istraživanju. Razlozi dobivanja nižih vrijednosti bioaktivnih spojeva u odnosu na literaturu mogu biti raznoliki, od razlika u sortimentu jagoda, preko smanjenja udjela voćne komponente dodatkom većeg udjela škroba, degradacije termički osjetljivih spojeva pod utjecajem topline prilikom spravljanja smjese za ispis ili kao posljedica ultrazvučne ekstrakcije.

Vrsta škroba korištena u izradi smjese za 3D ispis ima značajan utjecaj na sve određivane bioaktivne komponente. Rezultati su pokazali da uzorci s dodatkom pšeničnog škroba sadrže veći udio ukupnih fenola, kondenziranih tanina i monomernih antocijana, dok je dodatak kukuruznog škroba rezultirao proizvodima s višim udjelima hidroksicimetnih kiselina, flavonola i ukupnih flavonoida.

Na sadržaj ukupnih fenola i hidroksicimetnih kiselina, udio škroba nema statistički značaj.

Udio flavonola i kondenziranih tanina bio je najviši u uzorcima s 15 % udjela škroba ( $6,06 \pm 0,20$  mg QE/100 g ispisanog uzorka i  $47.14 \pm 0.33$  mg C/100 g ispisanog uzorka). Udio ukupnih flavonoida i monomernih antocijana smanjivao se s povećanjem udjela dodanog škroba. Trend pada količine bioaktivnih spojeva u uzorcima s većim udjelom škroba može se povezati sa smanjenjem udjela voćne komponente sa 85 na 80 %.

Tip programa korišten za 3D ispis proizvoda imao je značajan utjecaj na udio svih određivanih bioaktivnih spojeva, izuzev hidrokisicimernih kiselina i flavonola. Također, rezultati ukazuju da je uporaba programa 2, u odnosu na program 1, rezultirala većim udjelom bioaktivnih komponenti. Navedena dva programa razlikuju se u brzini ispisa, debljini ispisne linije, brzini protoka smjese te visini mlaznice prvog sloja. Moguće obrazloženje očuvanja bioaktivnih spojeva u proizvodima tiskanih programom 2 jest kraće procesiranje, tj. viša brzina protoka smjese za ispis i veća brzina ispisa. Iako postoji podosta literature koja obrađuje temu procesnih parametara 3D ispisa (temperatura ispisa, brzina pomicanja mlaznice, brzina ekstruzije, promjer i visina mlaznice i dr.) i njihov utjecaj na morfološka i strukturna svojstva (Zhang i sur., 2022), nedostaju podaci utjecaja na bioaktivni profil 3D tiskanih proizvoda.

**Tablica 3.** Rezultati multifaktorske analize o utjecaju vrste škroba, udjela škroba te programa ispisa na sadržaj bioaktivnih spojeva u 3D tiskanim proizvodima

PARAMETAR	n	Ukupni fenoli	Hidroksicimetne kiseline	Flavonoli	Ukupni flavonoidi	Monomerni antocijani	Kondenzirani tanini
<b>Vrsta škroba</b>		$p \leq 0,01^\dagger$	$p \leq 0,01^\dagger$	$p \leq 0,01^\dagger$	$p \leq 0,01^\dagger$	$p = 0,04^\dagger$	$p = 0,01^\dagger$
Kukuruzni	12	$74,47 \pm 1,08^b$	$19,44 \pm 0,25^a$	$6,90 \pm 0,16^a$	$5,30 \pm 0,05^a$	$7,50 \pm 0,03^b$	$43,90 \pm 0,27^b$
Pšenični	12	$82,66 \pm 1,08^a$	$13,64 \pm 0,25^b$	$3,70 \pm 0,16^b$	$4,50 \pm 0,05^b$	$7,61 \pm 0,03^a$	$45,01 \pm 0,27^a$
<b>Udio škroba</b>		$p = 0,54^\ddagger$	$p = 0,09^\ddagger$	$p \leq 0,01^\dagger$	$p = 0,04^\dagger$	$p \leq 0,01^\dagger$	$p \leq 0,01^\dagger$
10 %	8	$77,4 \pm 1,32^a$	$16,00 \pm 0,30^a$	$4,47 \pm 0,20^c$	$4,86 \pm 0,06^{a,b}$	$7,82 \pm 0,04^a$	$45,02 \pm 0,33^b$
15 %	8	$79,48 \pm 1,32^a$	$17,04 \pm 0,30^a$	$6,06 \pm 0,20^a$	$5,04 \pm 0,06^a$	$7,94 \pm 0,04^a$	$47,14 \pm 0,33^a$
20 %	8	$78,83 \pm 1,32^a$	$16,58 \pm 0,30^a$	$5,37 \pm 0,20^b$	$4,80 \pm 0,06^b$	$6,91 \pm 0,04^b$	$41,20 \pm 0,33^c$
<b>Tip programa 3D ispisa</b>		$p = 0,03^\dagger$	$p = 0,08^\ddagger$	$p = 0,09^\ddagger$	$p \leq 0,01^\dagger$	$p \leq 0,01^\dagger$	$p = 0,02^\dagger$
Program 1	12	$76,62 \pm 1,08^b$	$16,21 \pm 0,25^a$	$5,32 \pm 0,16^a$	$4,79 \pm 0,05^b$	$7,43 \pm 0,03^b$	$43,96 \pm 0,27^b$
Program 2	12	$80,51 \pm 1,08^a$	$16,87 \pm 0,25^a$	$5,28 \pm 0,16^a$	$5,01 \pm 0,05^a$	$7,69 \pm 0,03^a$	$44,95 \pm 0,27^a$
<b>Prosječna vrijednost</b>	24	$78,57 \pm 1,08$	$16,54 \pm 0,18$	$5,30 \pm 0,12$	$4,90 \pm 0,04$	$7,56 \pm 0,02$	$44,46 \pm 0,19$

\*Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost paralelnih mjerenja  $\pm$  standardna pogreška. Vrijednosti predstavljene različitim slovima statistički su različite pri  $p \leq 0,05$ ;  $^\dagger$  značajan faktor u multifaktorskoj analizi;  $^\ddagger$  nije značajan faktor u multifaktorskoj analizi, Ukupni fenoli (mg GAE/100 g ispisanog uzorka); Hidroksicimetne kiseline (mg CAE/100 g ispisanog uzorka); Flavonoli (mg QE/100 g ispisanog uzorka); Flavonoidi (mg QE/100 g ispisanog uzorka); Monomerni antocijani (mg Pel-3-glc/100 g ispisanog uzorka); Kondenzirani tanini (mg CE/100 g ispisanog uzorka); GAE – ekvivalent galne kiseline; CAE – ekvivalent klorogenske kiseline; QE – ekvivalent kvercetina; Pel-3-glc - ekvivalent pelargonidin-3-glukozida; CE – ekvivalent katehina.

#### **4.6.UTJECAJ VRSTE ŠKROBA, UDJELA ŠKROBA TE PROGRAMA ISPISA NA ANTIOKSIDACIJSKE KAPACITETE**

Odabir metode analize jedan je od glavnih problema prilikom određivanja antioksidacijskog kapaciteta. Danas postoji široka paleta metoda za mjerenje antioksidacijskog kapaciteta voća i povrća, ali rezultati obično ovise o vrsti proizvoda i korištenoj metodi. Zbog razlika u principu djelovanja i karakteristikama proizvoda, za dobivanje što bolje predodžbe o stvarnom antioksidacijskom kapacitetu preporučuje se korištenje najmanje dvije metode za svaki uzorak (Müller i sur., 2010). Antioksidacijski kapaciteti u ovom istraživanju određeni su DPPH i FRAP metodama, a rezultati provedene multifaktorske analize prikazani su u tablici 4.

Prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određenog u 3D tiskanim proizvodima DPPH metodom iznosi  $486,96 \pm 0,29$  mg TE/100 g tiskanog uzorka, dok je FRAP metodom dobivena vrijednost od  $1,24 \pm 0,01$  g TE/100 g ispisanog uzorka.

Utjecaj vrste škroba korištenog u proizvodnji smjese za ispis pokazao se značajnim kod obje metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta, no rezultati dvije korištene metode kontriraju. Tako su veće vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određivane DPPH metodom zabilježene kod uzoraka s uporabom kukuruznog, a FRAP metodom kod uzoraka s uporabom pšeničnog škroba.

Kao što je utvrđeno u prethodnom poglavlju, udio škroba je značajna stavka koja utječe na sadržaj bioaktivnih spojeva, što se u konačnici odražava i na antioksidacijski kapacitet. Povezanost antioksidacijskog kapaciteta i sadržaja bioaktivnih spojeva dokazana je brojnim istraživanjima (Marszałek i sur., 2015; Rababah i sur., 2010), iz čega se može zaključiti da se gubitkom bioaktivnih komponenata smanjuje i antioksidacijski kapacitet. Očekivano, kod uzoraka s najvišim udjelom škroba (20 %), tj. najmanjim udjelom voćne komponente i najnižom koncentracijom bioaktivnih spojeva uočen je najniži antioksidacijski kapacitet. Pri nižim udjelima škroba rezultati su oprečni, ovisno o metodi određivanja antioksidacijskog kapaciteta. DPPH metodom određeno je da udio škroba od 10 % pogoduje većem antioksidacijskom kapacitetu, dok su FRAP metodom rezultati najbolji pri 15 % škroba.

Odabir programa ispisa također se pokazao kao značajan je faktor koji utječe na antioksidacijski kapacitet proizvoda. Već je utvrđeno da program 2 povoljnije djeluje na

očuvanje bioaktivnih spojeva u odnosu na program 1, a rezultati potvrđuju da antioksidacijski kapacitet prati isti trend.

**Tablica 4.** Rezultati multifaktorske analize o utjecaju vrste škroba, udjela škroba te programa ispisa na antioksidacijski kapacitet u 3D tiskanim proizvodima

<b>PARAMETAR</b>	<b>n</b>	<b>DPPH</b>	<b>FRAP</b>
<b>Vrsta škroba</b>		$p \leq 0,01^\dagger$	$p \leq 0,01^\dagger$
Kukuruzni	12	$487,83 \pm 0,41^a$	$1,19 \pm 0,02^b$
Pšenični	12	$486,08 \pm 0,41^b$	$1,29 \pm 0,02^a$
<b>Udio škroba</b>		$p \leq 0,01^\dagger$	$p \leq 0,01^\dagger$
10 %	8	$515,76 \pm 0,50^a$	$1,24 \pm 0,02^b$
15 %	8	$489,15 \pm 0,50^b$	$1,32 \pm 0,02^a$
20 %	8	$455,97 \pm 0,50^c$	$1,16 \pm 0,02^c$
<b>Tip programa 3D ispisa</b>		$p \leq 0,01^\dagger$	$p = 0,08^\ddagger$
Program 1	12	$485,26 \pm 0,41^b$	$1,22 \pm 0,02^b$
Program 2	12	$488,66 \pm 0,41^a$	$1,27 \pm 0,02^a$
<b>Prosječna vrijednost</b>	24	$486,96 \pm 0,29$	$1,24 \pm 0,01$

\*Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost paralelnih mjerenja  $\pm$  standardna pogreška. Vrijednosti predstavljene različitim slovima statistički su različite pri  $p \leq 0,05$ ;  $^\dagger$  značajan faktor u multifaktorskoj analizi;  $^\ddagger$  nije značajan faktor u multifaktorskoj analizi, DPPH test (mg TE/100 g ispisanog uzorka) i FRAP test (g TE/100 g ispisanog uzorka) antioksidacijskog kapaciteta; TE – Trolox ekvivalent.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Proizvodnja funkcionalnog proizvoda na bazi jagode tehnologijom 3D ispisa rezultirala je povoljnim utjecajem na očuvanje i stabilnost bioaktivnog profila i antioksidacijskog kapaciteta 3D tiskanog proizvoda.
2. Kao faktori koji značajno utječu na vrijednost  $a_w$  3D tiskanih proizvoda izdvajaju se vrsta i udio škroba korišteni u izradi smjese, pri čemu je najviša vrijednost  $a_w$  određena u proizvodima sa pšeničnim škrobom u udjelu od 15 %. Na pH vrijednost značajno utječu svi izvori varijacija (vrsta i udio škroba te tip programa ispisa), pri čemu je najviša pH vrijednost određena u proizvodima sa pšeničnim škrobom u udjelu od 15 % tiskanim programom 2.
3. Vrsta škroba ima značajan utjecaj na stabilnost svih određivanih bioaktivnih spojeva te antioksidacijski kapacitet. Uporaba kukuruznog škroba rezultirala je većim udjelom hidroksicimetnih kiselina, flavonola, ukupnih flavonoida te antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom, dok je proizvod s pšeničnim škrobom imao viši udio ukupnih fenola, antocijana, kondenziranih tanina i antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom.
4. Udio škroba značajno utječe na gotovo sve određivane bioaktivne spojeve i antioksidacijski kapacitet. Za očuvanje bioaktivnog profila 3D tiskanog proizvoda i antioksidacijskog kapaciteta najpovoljniji je udio škroba od 15 %.
5. Tip programa 3D ispisa ima značajan utjecaj na većinu određivanih bioaktivnih spojeva i antioksidacijski kapacitet, pri čemu je uporaba programa 2 rezultirala većom stabilnošću svih analiziranih komponenti u 3D tiskanom proizvodu na bazi jagode.
6. 3D ispis može se smatrati tehnologijom visokog potencijala za razvoj inovativnih i individualnih funkcionalnih proizvoda.



## 6. LITERATURA

Aguilar-de-Leyva Á, Linares V, Casas M, Caraballo I (2020) 3D printed drug delivery systems based on natural products. *Pharmaceutics*, **12**, 620. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070620>

Anukiruthika T, Moses JA, Anandharamakrishnan C (2020) 3D printing of egg yolk and white with rice flour blends. *J. Food Eng.* **265**, 109691. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109691>

AOAC (1990) Official Methods of Analysis, 15. izd., Association of Official Analytical Chemist, Washington DC. *AOAC - Association of Official Analytical Chemists*.

Bendix A (2019) Astronauts just printed meat in space for the first time — and it could change the way we grow food on Earth – INSIDER <https://www.businessinsider.com/meat-grown-in-space-with-3d-printer-2019-10> Pristupljeno 17. listopada 2022.

Benzie IF (1996) An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clin Biochem* **29**, 111-116. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(95\)02013-6](https://doi.org/10.1016/0009-9120(95)02013-6)

Braca A, De Tommasi N, Di Bari L, Pizza C, Politi M, Morelli I (2001) Antioxidant principles from *bauhinia tarapotensis*. *J Nat Prod* **64**, 892-895. <https://doi.org/10.1021/np0100845>

Chang CC, Yang MH, Wen HM i Chern JC (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* **10**, 179-182. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>

De Souza VR, Pereira PAP, da Silva TLT, de Oliveira Lima LC, Pio R, Queiroz F (2014) Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food chem* **156**, 362-368. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.125>

Diaz JV, Van BKJC, Noort MWJ, Henket J, Brier P (2014) Method for the production of edible objects using sls and food products. Patent US10092030B2

Dick A, Bhandari B, Prakash S (2019) 3D printing of meat. *Meat Sci* **153**, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.03.005>

Enfield RE, Pandya JK, Lu J, McClements DJ, Kinchla AJ (2022) The future of 3D food printing: Opportunities for space applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1-14. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2077299>

Escalante-Aburto A, Trujillo-de Santiago G, Álvarez MM, Chuck-Hernández C (2021) Advances and prospective applications of 3D food printing for health improvement and personalized nutrition. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **20**, 5722-5741. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12849>

Feng C, Zhang M, Bhandari B (2019) Materials properties of printable edible inks and printing parameters optimization during 3D printing: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **59**, 3074–3081 <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1481823>

Fetter D (2022) Food Allergies Across the Globe – Food Insight <https://foodinsight.org/food-allergies-across-the-globe/> Pristupljeno 27. kolovoza 2022.

Godoi FC, Prakash S, Bhandari BR (2016) 3D printing technologies applied for food design: Status and prospects. *J Food Eng* **179**, 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.01.025>

Gu DD, Meiners W, Wissenbach K, Poprawe R (2012) Laser additive manufacturing of metallic components: Materials, processes and mechanisms. *Int. Mater. Rev.* **57**, 133–164 <https://doi.org/10.1179/1743280411Y.0000000014>

Guinane CM, Cotter PD (2013) Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *The erap Adv Gastroenterol* **6**, 295-308. <https://doi.org/10.1177/1756283X13482996>

Haahtela T, Alenius H, Lehtimäki J, Sinkkonen A, Fyhrquist N, Hyöty H i sur. (2021) Immunological resilience and biodiversity for prevention of allergic diseases and asthma. *Allergy* **76**, 3613-3626. <https://doi.org/10.1111/all.14895>

Hao L, Li Y, Gong P, Xiong W (2019) Material, process and business development for 3D chocolate printing. U: Godoi FC, Bhandari BR, Prakash S, Zhang M (ured.), Fundamentals of

3D food printing and applications, Academic Press, str. 207-255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814564-7.00008-0>

Hemsley B, Balandin S, Sheppard JJ, Georgiou A, Hill S (2015) A call for dysphagia-related safety incident research in people with developmental disabilities. *J Intellect Dev Disabil* **40**, 99–103. <https://doi.org/10.3109/13668250.2014.994172>

Hemsley B, Palmer S, Kouzani A, Adams S, Balandin S (2019) Review informing the design of 3D food printing for people with swallowing disorders: Constructive, conceptual, and empirical problems. Proceedings of the 52nd Hawaii international conference on System Sciences, 5735–5744. <https://doi.org/10.24251/hicss.2019.692>

Hertafeld E, Zhang C, Jin Z, Jakub A, Russell K, Lakehal Y, Andreyeva K, Bangalore SN, Mezquita J, Blutinger J, Lipson H (2019) Multi-material three-dimensional food printing with simultaneous infrared cooking. *3D Print Addit Manuf* **6**, 13–19. <https://doi.org/10.1089/3dp.2018.0042>

Hielcher (2022) <https://www.hielscher.com/up400st-powerful-ultrasonicator.htm> Pristupljeno 18. travnja 2022.

Hoath SD (2016) Fundamentals of Inkjet Printing: The science of inkjet and droplets, 1. izd., Wiley-VCH, Weinheim, Germany. <https://doi.org/10.1002/9783527684724>

Holland S, Foster T, MacNaughtan W, Tuck C (2018) Design and characterisation of food grade powders and inks for microstructure control using 3D printing. *J Food Eng* **220**, 12-19. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.06.008>

Howard LR, Clark JR i Brownmiller C (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *J Sci Food Agri* **83**, 1238-1247. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1532>

Huang J, Tang X, Pu H (2017) Research Progress on the micro-structure, texture property and stability of starch gel. *J Food Sci Biotechnol* **36**, 673–679

Irvin JD (2013) 3D printed food system for long duration space missions - Advanced Food Systems Technology [https://sbir.gsfc.nasa.gov/SBIR/abstracts/12/sbir/phase1/SBIR-12-1-H12.04-9357.html?solicitationId=SBIR\\_12\\_P1](https://sbir.gsfc.nasa.gov/SBIR/abstracts/12/sbir/phase1/SBIR-12-1-H12.04-9357.html?solicitationId=SBIR_12_P1) Pristupljeno 15. listopada 2022.

Jiang H, Zheng L, Zou Y, Tong Z, Han S, Wang S (2019) 3D food printing: Main components selection by considering rheological properties. *Crit Rev Food Sci Nutr* **59**, 2335–2347. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1514363>

Jiang Q, Zhang M, Mujumdar AS (2021) Novel evaluation technology for the demand characteristics of 3D food printing materials: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1-16. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1878099>

Karavasili C, Gkaragkounis A, Moschakis T, Ritzoulis C, Fatouros DG (2020) Pediatric-friendly chocolate-based dosage forms for the oral administration of both hydrophilic and lipophilic drugs fabricated with extrusion-based 3D printing. *Eur J Pharm Sci* **147**, 105291. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105291>

Kim HW, Bae H, Park HJ (2017) Classification of the printability of selected food for 3D printing: Development of an assessment method using hydrocolloids as reference material. *J food Eng* **215**, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.07.017>

Kim HW, Lee JH, Park SM, Lee MH, Lee IW, Doh HS i sur. (2018) Effect of hydrocolloids on rheological properties and printability of vegetable inks for 3D food printing. *J Food Sci* **83(12)**, 2923–2932. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14391>

Kouzani AZ, Adams S, Whyte DJ, Oliver R, Hemsley B, Palmer S, Balandin S (2017) 3D printing of food for people with swallowing difficulties. *KnE Engineering* **2**, 23–29. <https://doi.org/10.18502/keg.v2i2.591>

Krishnaraj P, Anukiruthika T, Choudhary P, Moses JA, Anandharamakrishnan C (2019) 3D extrusion printing and postprocessing of fibre-rich snack from indigenous composite flour. *Food Bioproc Tech* **12**, 1776–1786. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02336-5>

Kruth JP, Levy G, Klocke F, Childs THC (2007) Consolidation phenomena in laser and powder-bed based layered manufacturing. *CIRP Ann Manuf Technol* **56**, 730–759 <https://doi.org/10.1016/j.cirp.2007.10.004>

Le Tohic C, O’Sullivan JJ, Drapala KP, Chartrin V, Chan T, Morrison AP, Kerry JP, Kelly AL (2018) Effect of 3D printing on the structure and textural properties of processed cheese. *J food Eng* **220**, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.02.003>

Lille M, Nurmela A, Nordlund E, Metsä-Kortelainen S, Sozer N (2018) Applicability of protein and fiber-rich food materials in extrusion-based 3D printing. *J Food Eng* **220**, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.04.034>

Lipton J, Arnold D, Nigl F, Lopez N, Cohen D, Norén N, Lipson H (2010) Multi-material food printing with complex internal structure suitable for conventional post-processing. U: 2010 International Solid freeform fabrication symposium, The University of Texas, Austin, str. 809–815 <http://dx.doi.org/10.26153/tsw/15245>

Lipton JI, Cohen D, Heinz M, Lobovsky M, Parad W, Bernstein G i sur. (2009) Fab@Home Model 2: Towards ubiquitous personal fabrication devices. U: 2009 International Solid Freeform Fabrication Symposium, The University of Texas, Austin, str. 70–81. <http://dx.doi.org/10.26153/tsw/15090>

Liu Y, Liang X, Saeed A, Lan W, Qin W (2019) Properties of 3D printed dough and optimization of printing parameters, *Innov Food Sci Emerg Technol* **54**, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.03.008>

Liu Z, Bhandari B, Prakash S, Zhang M (2018) Creation of internal structure of mashed potato construct by 3D printing and its textural properties. *Food Res Int* **111**, 534–543. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.075>

Liu Z, Bhandari B, Zhang M (2020) Incorporation of probiotics (*Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*) into 3D printed mashed potatoes: Effects of variables on the viability. *Food Res Int* **128**, 108795. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108795>

Liu Z, Zhang M, Bhandari B, Yang C (2017) Impact of rheological properties of mashed potatoes on 3D printing. *J Food Eng* **220**, 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.04.017>

Loh W, Tang MLK (2018) The epidemiology of food allergy in the global context. *Int J Environ Res Public Health* **15**, 2043. <https://doi.org/10.3390/ijerph15092043>

Malone E, Lipson H (2007) Fab@Home: the personal desktop fabricator kit. *Rapid Prototyp J* **13**, 245–255. <https://doi.org/10.1108/13552540710776197>

Manstan T, McSweeney MB (2020) Consumers attitudes towards and acceptance of 3D printed foods in comparison with conventional food products. *Int J Food Sci* **55**, 323–331. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14292>

Mantihal S, Prakash S, Godoi FC, Bhandari BR (2019) Effect of additives on thermal, rheological and tribological properties of 3D printed dark chocolate. *Food Res Int* **119**, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.056>

Marszałek K, Mitek M, Skąpska S (2015) Effect of continuous flow microwave and conventional heating on the bioactive compounds, colour, enzymes activity, microbial and sensory quality of strawberry purée. *Food Bioproc Tech* **8**, 1864–1876. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1543-7>

Moretti F (2017) A new gluten free corner project is born from the cooperation between Wasp and Zeroinpiù: 3D printing is used to create a food for people with celiac disease. <https://www.3dwasp.com/en/the-3d-printer-for-the-future-kitchen> Pristupljeno: 27. kolovoza 2022.

Müller L, Gnoyke S, Popken AM, Böhm V (2010) Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Sci Technol* **43**, 992–999. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.02.004>

NASA (2019) Deep-Space Food Science Research Improves 3D-Printing Capabilities -NASA Spinoff [https://spinoff.nasa.gov/Spinoff2019/ip\\_2.html](https://spinoff.nasa.gov/Spinoff2019/ip_2.html) Pristupljeno 14. listopada 2022.

Natural Machines (2022) <https://www.naturalmachines.com> Pristupljeno 18. travnja 2022.

Pant A, Lee AY, Karyappa R, Lee CP, An J, Hashimoto M i sur. (2021) 3D food printing of fresh vegetables using food hydrocolloids for dysphagic patients. *Food Hydrocoll* **114**, 106546. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106546>

Pitayachaval P, Sanklong N, Thongrak A (2018) A review of 3D food printing technology. U: MATEC Web Conf, 6th Asia Conference on Mechanical and Materials Engineering, **213**, 1–5. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201821301012>

Portanguen S, Tournayre P, Sicard J, Astruc T, Mirade PS (2019) Toward the design of functional foods and biobased products by 3D printing: A review. *Trends Food Sci Technol* **86**, 188–198. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.023>

Prior RL, Wu X i Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* **53**, 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>

Putnik P, Bursać Kovačević D, Režek Jambrak A, Barba FJ, Cravotto G, Binello A i sur. (2017) Innovative “Green” and novel strategies for the extraction of bioactive added value compounds from citrus wastes - A Review. *Molecules* **22**, 680. <https://doi.org/10.3390/molecules22050680>

Rababah TM, Al-Mahasneh MA, Kilani I, Yang W, Alhamad MN, Ereifej K i sur. (2011). Effect of jam processing and storage on total phenolics, antioxidant activity, and anthocyanins of different fruits. *J Sci Food Agric* **91**, 1096-1102. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4289>

Ross MM, Kelly AL, Crowley SV (2019) Potential Applications of Dairy Products, Ingredients and Formulations in 3D Printing. U: Godoi F, Bhandari B, Prakash S, Zhang M (ured.) *Fundamentals of 3D Food Printing and Applications*, 1. izd., Academic Press, str. 175-206. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814564-7.00007-9>

Rubio E, Hurtado S (2019) 3D food printing technology at home, domestic application. U: Godoi FC, Bhandari BR, Prakash S, Zhang M (ured.), *Fundamentals of 3D food printing and applications*, 1. izd., Academic Press, str. 289-329. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814564-7.00010-9>

Severini C, Derossi A (2016) Could the 3D printing technology be a useful strategy to obtain customized nutrition? *J Clin Gastroenterol.* **50**, S175–S178 <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000705>

Severini C, Derossi A, Ricci I, Caporizzi R, Fiore A (2018) Printing a blend of fruit and vegetables. New advances on critical variables and shelf life of 3D edible objects. *J Food Eng* **220**, 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.08.025>

Skartsaris I, Piatti C (2019) Altering production patterns in the food industry: 3D food printing. U: Piatti C, Graeff-Hönninger S, Khajehei F (ured.) *Food tech transitions: Reconnecting agri-food, technology and society*, 1 izd., Springer, str. 97–110. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-21059-5>

Stevenson K (2019) Book of the Week: Fundamentals of 3D Food Printing and Applications – Fabbaloo <https://www.fabbaloo.com/2019/01/book-of-the-week-fundamentals-of-3d-food-printing-and-applications> Pristupljeno 21. studeni 2022.

Sun B, Ricardo-da-Silva JM, Spranger I (1998) Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J Agric Food Chem* **46**, 4267-4274. <https://doi.org/10.1021/jf980366j>

Sun J, Peng Z, Zhou W, Fuh JYH, Hong GS, Chiu A (2015) A review on 3D printing for customized food fabrication. *Procedia Manuf* **1**, 308–319. <https://doi.org/10.1016/j.promfg.2015.09.057>

Sun J, Zhou W, Yan L, Huang D, Lin L (2018) Extrusion-based food printing for digitalized food design and nutrition control. *J Food Eng* **220**, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.02.028>

Šic Žlabur J, Skendrović Babojelić M, Galić A, Družić J, Jurković T, Voća S (2020) Bioaktivni spojevi i antioksidacijski potencijal plodova grejpfruta. *Pomologia Croatica: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva*, **24**, 3-14. <https://doi.org/10.33128/pc.24.1-4.1>

Teng X, Zhang M, Bhandri B (2019) 3D printing of Cordyceps flower powder. *J Food Process Eng* **42**, e13179. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13179>

Tomašević I, Putnik P, Valjak F, Pavlić B, Šojić B, Markovinović AB i sur. (2021) 3D printing as novel tool for fruit-based functional food production. *Curr Opin Food Sci* **41**, 138-145. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.03.015>



Varvara RA, Szabo K, Vodnar DC (2021) 3D Food Printing: Principles of Obtaining Digitally-Designed Nourishment. *Nutrients* **13**, 3617. <https://doi.org/10.3390/nu13103617>

Vialva T (2018) NovaMeat 3D prints vegetarian steak from plant-based proteins – 3D Printing Industry <https://3dprintingindustry.com/news/novameat-3d-prints-vegetarian-steak-from-plant-based-proteins-144722/> Pristupljeno: 18. prosinca 2022.

Voon SL, An J, Wong G, Zhang Y, Chua CK (2019) 3D food printing: A categorised review of inks and their development. *Virtual Phys Prototyp* **14**, 203–218. <https://doi.org/10.1080/17452759.2019.1603508>

Wan H, Liu D, Yu X, Sun H, Li Y (2015) A Caco-2 cellbased quantitative antioxidant activity assay for antioxidants. *Food Chem* **175**, 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.128>

Wang SY, Lin HS (2000) Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage, *J Agric Food Chem* **48**, 140-146. <https://doi.org/10.1021/jf9908345>

Weber F, Larsen LR (2017) Influence of fruit juice processing on anthocyanin stability, *Food Res Int* **100**, 354-365. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.033>

Yuan B, Danao MGC, Stratton JE, Weier SA, Weller CL, Lu M (2018) High pressure processing (HPP) of aronia berry purée: Effects on physicochemical properties, microbial counts, bioactive compounds, and antioxidant capacities. *Innovative Food Sci Emerg Technol* **47**, 249-255. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.03.009>

Zeng X, Li T, Zhu J, Chen L, Zheng B (2021) Printability improvement of rice starch gel via catechin and procyanidin in hot extrusion 3D printing. *Food Hydrocoll* **121**, 106997. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106997>

Zhang J, Li Y, Cai Y, Ahmad I, Zhang A, Ding Y i sur. (2022) Hot extrusion 3D printing technologies based on starchy food: A review. *Carbohydr Polym*, 119763. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119763>

Zhao L, Zhang M, Chitrakar B, Adhikari B (2020) Recent advances in functional 3D printing of foods: A review of functions of ingredients and internal structures. *Crit Rev Food Sci Nutr* **61**, 3489-3503. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1799327>

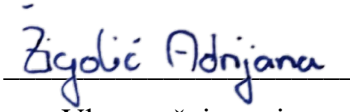
Zhu, LF, Chen X, Ahmad Z, Peng Y, Chang MW (2020) A core–shell multi-drug platform to improve gastrointestinal tract microbial health using 3D printing. *Biofabrication* **12**, 025026. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab782c>

Zidan A (2017) CDER researchers explore the promise and potential of 3D printed pharmaceuticals. FDA - U.S. Food and Drug Administration <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/cder-researchers-explore-promise-and-potential-3d-printed-pharmaceuticals> Pristupljeno: 29. kolovoza 2022.

Zoran A (2019) Cooking with computers: The vision of digital gastronomy [point of view]. *Proc IEEE*, **107(8)**, 1467–1473. <https://doi.org/10.1109/JPROC.2019.2925262>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Adrijana Žigolić, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

  
Vlastoručni potpis