

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Tea Žeravica

**UTJECAJ ENZIMA NA
REOLOŠKA SVOJSTVA TIJESTA I
KVALITETU 3D TISKA
BEZGLUTENSKOG *SNACK*
PROIZVODA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju žitarica na Zavodu za prehrambeno tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Nikolina Čukelj Mustač te uz pomoć mag. ing. Kristine Radoš.

Istraživanja prikazana u ovom diplomskom radu dio su istraživanja vezana uz projekt Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ IP-2020-02-3289) „Razvoj nove generacije *snack* proizvoda namijenjenih potrošačima s posebnim prehrambenim potrebama primjenom tehnologija 3D tiskanja”, voditeljice prof.dr.sc. Dubravke Novotni

ZAHVALA

Želim se zahvaliti svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Nikolini Čukelj Mustač na pomoći i savjetima tijekom pisanja rada.

Veliko hvala mag. ing. Kristini Radoš na pomoći, strpljenju i razumijevanju tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela i pisanja ovog rada.

Posebno se zahvaljujem mojoj obitelji i svim prijateljima koji su vjerovali u mene kada ja nisam.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

UTJECAJ ENZIMA NA REOLOŠKA SVOJSTVA TIJESTA I KVALITETU 3D TISKA BEZGLUTENSKOG *SNACK* PROIZVODA

Tea Žeravica, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058213478

Sažetak: Enzimi su danas u prehrambenoj industriji prepoznati kao potencijalna zamjena za prehrambene aditive, ali je njihov potencijal nedovoljno istražen u 3D tiskanju hrane. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati utjecaj dodatka enzima lakaze i ksilanaze na reološka svojstva i kvalitetu tiska bezglutenskog tijesta obogaćenog psilijumom te na kvalitetu gotovog 3D *snack* proizvoda. Ispitan je utjecaj tri koncentracije enzima (10, 50 i 100 U/g psilijuma), dva vremena djelovanja enzima lakaza (2 i 16 h) te pH vrijednosti tijesta (5-7) na kvalitetu tiska i reološka svojstva tijesta. Dodatkom 100 jedinica lakaze i 50 jedinica ksilanaze, dobiveni su uzorci najveće kvalitete tiska. Dulje vrijeme enzimskog predtretmana lakazom dalo je viskoznije tijesto što je rezultiralo lošije otisnutim uzorcima. Promjene pH vrijednosti tijesta imale su značajan utjecaj na viskoznost tijesta te se pokazalo da je u slučaju lakaze optimalna vrijednost pH 5, a u slučaju ksilanaze pH vrijednost 6.

Ključne riječi: *3D snack, lakaza, ksilanaza, bezglutensko tijesto, reologija*

Rad sadrži: 46 stranice, 17 slika, 9 tablica, 70 literaturnih navoda

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. Nikolina Čukelj Mustač

Pomoć pri izradi: Kristina Radoš, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Dubravka Novotni (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Nikolina Čukelj Mustač (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Tomislava Vukušić Pavičić (član)
4. doc. dr. sc. Marko Obranović (zamjenski član)

Datum obrane: 28. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

THE INFLUENCE OF ENZYMES ON THE RHEOLOGICAL PROPERTIES OF DOUGH AND THE QUALITY OF 3D PRINTING OF A GLUTEN-FREE SNACK PRODUCT

Tea Žeravica, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058213478

Abstract: In today's food industry enzymes are recognized as a potential substitute for food additives, but they are insufficiently explored in 3D food printing. Therefore, the aim of this work was to examine the influence of laccase and xylanase on the rheology and printing quality of gluten-free dough enriched with psyllium and on the quality of the final 3D snack. The impact of three enzyme concentrations (10, 50 and 100 U/g psyllium), two times of enzyme action (2 and 16 h) and the pH value of the dough (5-7) on the quality of printing and the dough rheology was tested. By adding optimal concentrations of enzymes, 100 units of laccase and 50 units of xylanase, samples with the highest print quality were obtained. A longer time of laccase pretreatment resulted with a more viscous dough and with samples of poorer print quality. Changes in the pH value of the dough had a significant impact on the viscosity of the dough. In the case of laccase the optimal pH value was 5, and in the case of xylanase the optimal pH value was 6.

Keywords: *3D snack, laccase, xylanase, gluten free dough, rheology*

Thesis contains: 46 pages, 17 figures, 9 tables, 70 references

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: Nikolina Čukelj Mustač, PhD, Assistant professor

Technical support and assistance: *Kristina Radoš, mag. ing.*

Reviewers:

1. Dubravka Novotni, PhD, Associate professor (president)
2. Nikolina Čukelj Mustač, PhD, Associate professor (mentor)
3. Tomislava Vukušić Pavičić, PhD, Associate professor (member)
4. Marko Obranović, PhD, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: September 28th, 2023

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. PERSONALIZIRANA PREHRANA	2
2.2. SNACK PROIZVODI.....	4
2.3. 3D TISAK.....	5
2.3.1. Proces 3D tiska.....	5
2.3.2. Primjena 3D tiska u prehrambenoj industriji	5
2.3.3. Vrste tehnologija 3D tiska hrane.....	6
2.4. ENZIMI U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI.....	9
2.4.1. Ksilanaza	10
2.4.2. Lakaza	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI	13
3.2. METODE	13
3.2.1. Enzimski predtretman	13
3.2.2. Priprema tijesta za tisak	14
3.2.3. Određivanje reoloških svojstava tijesta.....	16
3.2.4. 3D tisak <i>snack</i> proizvoda	18
3.2.5. Analiza kvalitete tiska <i>snack</i> proizvoda.....	19
3.2.6. Obrada podataka	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. ODREĐIVANJE OPTIMALNE KONCENTRACIJE ENZIMA	22
4.1.1. Lakaza	22
4.1.1.1. Kvaliteta tiska.....	22
4.1.2. Ksilanaza	25
4.1.2.1. Kvaliteta tiska.....	25
4.2. ODREĐIVANJE UTJECAJA VREMENA TRETMANA LAKAZOM NA REOLOŠKA SVOJSTVA I KVALITETU TISKA	28
4.2.1. Reološka svojstva.....	28
3.2.2. Kvaliteta tiska	29
4.3. ODREĐIVANJE UTJECAJA pH NA REOLOŠKA SVOJSTVA I KVALITETU TISKA	32
4.3.1. Lakaza	32
4.3.2. Ksilanaza	35
5. ZAKLJUČCI.....	38
6. LITERATURA.....	39

1. UVOD

Prehrambena industrija ubrzano se razvija i prilagođava novim trendovima. Svijest i zahtjevi potrošača dovode do potrebe kreiranja inovativnih proizvoda novih tekstura i struktura s dodanom vrijednošću. Takvim zahtjevima teško je udovoljiti primjenom konvencionalnih proizvodnih tehnologija. Upravo je zato 3D tisak privukao značajnu pozornost zbog svog potencijala da promijeni način na koji proizvodimo i konzumiramo hranu. Ova tehnologija omogućuje preciznu kontrolu nanošenja materijala sloj po sloj, omogućujući stvaranje složenih i prilagođenih struktura te receptura. Zbog tih karakteristika pokazala se kao idealna tehnologija u proizvodnji hrane za skupine ljudi s posebnim prehranbenim potrebama. Obzirom da je proizvodnja bezglutenskih proizvoda osobito zahtjevna i u nutritivnom i u tehnološkom smislu, primjena 3D tiska ima veliki potencijal u kreiranju takvih proizvoda.

Za osobe s celijakijom ili necelijakijskom osjetljivošću na gluten, konzumacija proizvoda koji sadrže gluten može dovesti do štetnih učinaka na zdravlje. Kao rezultat toga, došlo je do porasta potražnje za alternativama bez glutena koje mogu ponoviti senzorne attribute i nutritivne kvalitete tradicionalnih snack proizvoda.

Uspješan 3D tisak *snack* proizvoda bez glutena zahtijeva razvoj specijaliziranih formulacija tijesta koja pokazuju odgovarajuća reološka svojstva i karakteristike ispisa. Postizanje optimalne kvalitete tiska i svojstava konačnog proizvoda zahtijeva duboko razumijevanje interakcija između različitih komponenti u smjesi za tijesto, kao i učinaka enzima i aditiva.

Ksilanaza, enzim koji može razgraditi hemicelulozu, djeluje na viskoelastična svojstva tijesta bez glutena te omogućava bolje upijanje vode, a što doprinosi rastezljivosti tijesta. Lakaza, s druge strane, pokazuje potencijal u poboljšanju strukture i teksture proizvoda bez glutena kroz enzimsko umrežavanje biopolimera (Sato i sur., 2015). Nadalje, dodatak psilijuma, topljivog vlakna s izvrsnom sposobnošću zadržavanja vode, ima potencijal za daljnje poboljšanje svojstava tijesta i ukupne kvalitete bezglutenskih *snack* proizvoda (Mariotti i sur., 2009).

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj dodatka enzima lakaze i ksilanaze na reološka svojstva te kvalitetu tiska bezglutenskog tijesta s dodatkom psilijuma kao i utjecaj na kvalitetu gotovog 3D tiskanog *snack* proizvoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PERSONALIZIRANA PREHRANA

Poznato je da prehrana ima veliki utjecaj na naše zdravlje, posebice u prevenciji nekih bolesti, kao što su bolesti krvožilnog sustava i srca, neurodegenerativne bolesti i bolesti mozga, dijabetes tipa 2 te tumora (Ordovas i sur., 2018). Već dugi niz godina raste interes za hranom koja ima pozitivan učinak na ljudsko zdravlje te se povećao interes za personaliziranom prehranom. Personalizirana prehrana koristi specifične informacije za pojedinca, utemeljene na znanstvenim dokazima, u promicanju promjene prehrambenog ponašanja koja može rezultirati mjerljivim zdravstvenim prednostima. Ova personalizacija se može temeljiti na biološkim dokazima o različitim odgovorima na hranu ili hranjive tvari koji ovise o genotipskim ili fenotipskim karakteristikama, i/ili na temelju trenutnog ponašanja, preferencija, prepreka i ciljeva (Ordovas i sur., 2018). Personalizirana prehrana definira se kao pristup koji koristi detalje individualnih karakteristika kako bi se razvio paket prehrambenih savjeta, proizvoda ili usluga (Chaudhary i sur., 2020). Gibney i sur. (2016) objasnili su to kao perspektivu koja "pomaže pojedincima u postizanju trajne promjene ponašanja u prehrani koja je korisna za zdravlje".

Proizvodnja takve personalizirane hrane susreće se s nekoliko izazova. Jedan od primarnih izazova u proizvodnji personalizirane prehrane je odabir odgovarajućih sirovina. Sastav hranjivih tvari ključan je čimbenik kada se žele zadovoljiti individualni prehrambeni zahtjevi. Različiti pojedinci mogu imati jedinstvene prehrambene potrebe, zahtijevajući specifične profile vitamina ili minerala ili određene omjere makronutrijenata. Stoga nabava sirovina s točno određenim sastavom hranjivih tvari postaje složen zadatak. Nadalje, prilagođavanje prehranbenim preferencijama kao što su veganske opcije, opcije bez glutena ili bez alergena dodaje još jedan sloj složenosti. Jedan od izazova je i masovna proizvodnja koja predstavlja problem ne samo zbog dobivanja jedinstvenog prehrambenog sadržaja i jedinstvenih senzorskih svojstava, već i zbog jamstva sigurnosti za odgovarajući rok trajanja održavajući stabilnu hranu tijekom odgovarajućeg vremenskog razdoblja (Ordovas i sur., 2018).

Još neki od izazova koji se nalaze na putu proizvodnje personalizirane prehrane uključuju - (i) ograničenja zbog redukcionističkih pristupa koji se mogu prevladati upotrebom tehnologija vođenih podacima kao što su umjetna inteligencija i strojno učenje; (ii) potrebu za izgradnjom personalizirane računalne infrastrukture prehrane; (iii) potrebu za standardizacijom podataka i ažuriranim programima obuke za korisnike; nedosljednosti i nedostajuće vrijednosti u

elektroničkim zdravstvenim kartonima rezultiraju (iv) nedostatkom i nedosljednošću podataka što naglašava potrebu za razvojem novih metoda za unos podataka (Verma i sur., 2018).

Jedna od tehnologija koja se pokazala obećavajućom u proizvodnji personalizirane hrane je 3D tisak. 3D tisak pruža široku lepezu potpuno personalizirane hrane koja precizno odgovara potrebama, ukusu i načinu prehrane ljudi različite dobi, spola, zanimanja i zdravog stila života prilagođavajući sastav, teksturu, boju ili strukturu preferencijama i potrebama korisnika (Dankar i sur., 2018). 3D tiskom izravno možemo kontrolirati što stavljamo u hranu pa tako možemo dodati prilagođene količine nekih hranjivih tvari kao što su proteini ili šećer te vitamine ili minerale. Osim kontrole sastava omogućuje i potpunu kontrolu nad oblikom i dimenzijama proizvoda što se ne može postići drugim tehnologijama. To se pokazalo korisnim za ljude koji imaju problema s gutanjem odnosno disfagiju (Hemsley i sur., 2015; Pant i sur., 2021).

S obzirom na mogućnost kontrole sastava, 3D tisak pokazao se kao dobro rješenje u proizvodnji bezglutenskih proizvoda. Potražnja za bezglutenskim proizvodima porasla je posljednjih godina jer se probudila svijest o celijakiji te drugim oblicima intolerancije na gluten. U bezglutenskim proizvodima najčešće se koriste brašna heljde, kukuruza i riže (Palabiyik i sur., 2016). S obzirom da u tim brašnima nije prisutan gluten koji će stvoriti mrežu u tijestu, ta tijesta su tekuća zbog čega je rukovanje njima teško, a uz to, rezultiraju proizvodima s lošom nutritivnom vrijednošću (Xu i sur., 2020). Kako bi se taj problem riješio često se koriste hidrokoloide. Hidrokoloide su skupina polisaharida topivih u vodi. U bezglutenskim tijestima hidrokoloide oponašaju neka reološka svojstva glutena čime poboljšavaju strukturu, volumen, teksturu, okus i ukupnu kvalitetu gotovih proizvoda te produljuju rok trajanja (Culetu i sur., 2021). Osim hidrokoloida za poboljšanje kvalitete bezglutenskih tijesta moguće je dodati škrob, enzime, kiselo tijesto te regulatore kiselosti (Palabiyik i sur., 2016). U ovom radu umjesto hidrokoloida korišteni su enzimi lakaza i ksilanaza s obzirom da je malo dostupne literature vezano za njihovo korištenje u bezglutenskim tijestima. Problem bezglutenskih tijesta, osim u proizvodnji, je i u njihovom manjku mikronutrijenata kao što su vitamin B i D te makronutrijenata kao što su vlakna (Matas i sur., 2022). Kako bi se poboljšala nutritivna kvaliteta bezglutenskih proizvoda u tijesto se mogu dodati vlaknaste namirnice (Fratelli i sur., 2018), poput psilijum praha. Psilijum je polisaharid dobiven iz ljuske sjemena biljaka roda *Plantago* (Farahnaky i sur., 2010). Odličan je izvor topivih i netopivih vlakana (Yu i sur., 2001). Nedavno je prepoznat zbog svojih učinaka na sniženje kolesterola i laksativnog djelovanja (Farahnaky i sur., 2010).

2.2. SNACK PROIZVODI

Snack proizvodi mogu se definirati kao brzi obroci odnosno hrana koja se konzumira između obroka (Riaz, 2016). Ubrajaju se u kategoriju hrane spremne za jelo (engl. *Ready-To-Eat-Food*, RTE) tj. hrane koja se može konzumirati bez toplinske obrade ili druge vrste procesiranja (EFSA, 2022).

Ovisno o tehnologiji proizvodnje i sastavu razlikuju se 3 kategorije *snack* proizvoda:

- 1) *Snack* proizvodi prve generacije – prirodni proizvodi poput orašastih plodova, čipsa i kukuruznih kokica
- 2) *Snack* proizvodi druge generacije – proizvodi od jednog sastojka jednostavnoga oblika poput kukuruznoga/tortilja čipsa i direktno ekspanziranih proizvoda
- 3) *Snack* proizvodi treće generacije (polu-proizvodi ili peleti) – proizvodi od više sastojaka dobiveni kuhanjem ekstruzijom pri niskom tlaku i sušenjem do otprilike 10 % vlage (Riaz, 2016)

Zbog svoje praktičnosti i pristupačnosti, potražnja za *snack* proizvodima je u porastu jer se uslijed ubrzanog načina života mijenjaju životne i prehrabene navike potrošača (Riaz, 2016; Brennan i sur., 2013). Uz to, mijenja se i svijest potrošača o sastavu hrane koju konzumiraju. Potrošači traže zdravije *snack* proizvode s malo kalorija, masnoća, soli i šećera, a većim udjelom cjelovitih žitarica, vlakana, posija, zobi, sjemenki, orašastih plodova i bobičastoga voća, te proizvode bez umjetnih bojila, okusa i sladila koji će im dati osjećaj sitosti i imati pozitivan utjecaj na zdravlje (Crofton i sur., 2013). Da bi udovoljili potrebama potrošača proizvođači se okreću novim formulacijama obogaćenima sastojcima koji povećavaju nutritivnu vrijednost proizvoda (Brennan i sur., 2013). Najviše pažnje pridali su istraživanju razvoja inovativnih *snack* proizvoda na bazi žitarica koje koriste raznolik raspon specifičnih prehrabnih i funkcionalnih sastojaka hrane kao što su cjelovite žitarice, vlakna, antioksidansi i omega-3 masne kiseline (Crofton i sur., 2013). Neki od primjera primjene žitarica u proizvodnji *snack* proizvoda su *snack* od pira obogaćen betainom (Kojić i sur., 2022) te dodatak amaranta i kvinoje u *snack* proizvod na bazi kukuruza (Diaz i sur., 2013).

2.3. 3D TISAK

3D tisak je tehnologija koja može napraviti trodimenzijski objekt, nanošenjem sloj po sloj materijala prema digitalnom nacrtu. Dizajn objekta izrađuje se programom oblikovanja s pomoću računala (engl. *Computer Aided Design*, CAD). 3D tisak karakterizira nova razina slobode dizajna, moguće je izraditi vrlo složene oblike i unutarnje strukture koje se do sada nisu mogle proizvesti. Michler (2014) smatra kako 3D tisak neće samo preispitati moć strukturiranja u industrijskoj proizvodnji, nego će protresti ekonomski svijet u cijelosti. Ova nova tehnologija se čak smatra potencijalnim pokretačem nove industrijske revolucije (Berman, 2012). Također, jedna od velikih prednosti 3D tiska je to što je održiva tehnologija. Primjenom 3D tiska smanjuje se negativan učinak na okoliš, jer se koristi manje sirovine, a proces zahtjeva manju potrošnju energije. Uz to, smanjuje se i količina proizvedenog otpada s obzirom da je 3D tisak vrlo učinkovit proces koji može spojiti više koraka proizvodnje u jedan, a i hrana koja nije naručena neće se printati (Dankar i sur., 2018).

2.3.1. Proces 3D tiska

Tehnologija 3D tiska koja se najčešće koristi u prehrambenoj industriji je metoda aditivne proizvodnje. Aditivna proizvodnja je proizvodnja koja se bavi izradom predmeta nanošenjem čestica u tankim slojevima jedan na drugi. U usporedbi sa tradicionalnim pisačima, 3D pisači kao tintu koriste razne arhitektonske i strojarske materijale te hranu. 3D tiskom proizvode se dijelovi i modeli hrane ili strojeva. Tehnologija 3D tiska se uglavnom sastoji od tri komponente: računala, softvera i motora samog pisača. Proizvodnja 3D tiskom može se rasporediti u četiri glavna koraka. Prvo se model izrađuje putem CAD-a. Zatim se ta datoteka prevodi u STL (engl. *Standard Triangle Language*) oblik datoteke. Nadalje, M i G kodovi se učitavaju na pisač. M kodovi su zaslužni za osna kretanja, a G kodovi su generirani na programu za oblikovanje pomoću računala koji imaju ulogu u određivanju mjesta tiska i brzine (Baiano, 2020). Postavljaju se određeni parametri tiska na 3D pisaču nakon čega slijedi sam tisak.

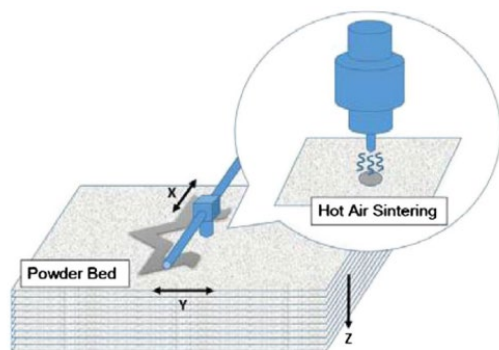
2.3.2. Primjena 3D tiska u prehrambenoj industriji

U proteklih deset godina sve je veća upotreba 3D tiska u proizvodnji određenih prehrambenih proizvoda. Neki od najčešće proučavanih i proizvedenih proizvoda ovom tehnologijom su čokolada (Mantihal i sur., 2017), tijesto (Severini i sur., 2016), sir (Kim i sur., 2017), mješavine voća i povrća (Severini i sur., 2018), hidrogelovi (Yang i sur., 2018) kao i

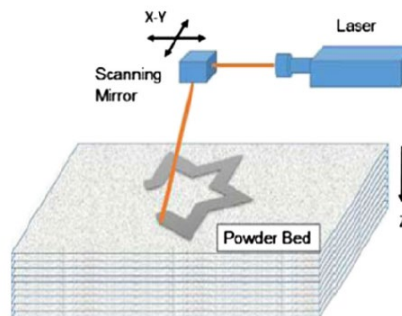
kombinirani praškasti prehrambeni materijali koji su se koristili za proizvodnju uravnoteženog obroka (Diaz i sur., 2016). Međutim, nisu svi materijali pogodni za upotrebu. Materijali trebaju imati određenu sposobnost tečenja kako bi se mogli istisnuti iz mlaznice, ali također moraju biti i stabilne strukture da bi mogli zadržati svoju strukturu nakon ispisa zbog čega je važno je poznavati svojstva želiranja, reološka svojstva kao i svojstva taljenja sastojaka. Osim toga, treba uzeti u obzir i otpornost sastojaka na toplinu, svojstva kuhanja kao i razna druga biokemijska i mikrobiološka svojstva. Provedeni su brojni testovi u kojima se ispitivala podobnost određenih materijala za primjenu u ovoj tehnologiji. Ti testovi uključivali su detekciju viskoznosti, konzistencije i svojstva skrućivanja i na temelju njih pokazano je da su krema, čokolada i škrobna hrana (tijesta) idealni eksperimentalni materijali za korištenje u ove svrhe (Luimstra, 2014). Jedno od rješenja koje bi omogućilo primjenu većine prirodnih prehrambenih materijala, kao što su povrće i meso u 3D tisku je dodavanje hidrokoloida, na primjer ksantan gume i želatine kako bi se postigle željene teksture (Cohen i sur., 2009). Brojna istraživanja pokazala su da je kod hrane koja ne treba naknadnu obradu, kao što su čokolada i sir, potrebno procijeniti kako će određena reološka i mehanička svojstva upotrijebljenih materijala utjecati na mogućnost tiska (Yang i sur., 2018) te kako onda ti određeni parametri tiska utječu na točnost tiska (Hao i sur., 2010). S druge strane, kod hrane koja zahtjeva naknadnu obradu, kao što su tijesto i meso, treba uzeti u obzir kako će toplinska obrada utjecati na 3D konstrukciju, sposobnost 3D strukture da izdrži toplinske operacije bez gubitka 3D dizajna (Lipton i sur., 2010).

2.3.3. Vrste tehnologija 3D tiska hrane

3D tisak je tehnologija kojom se stvara hrana po principu sloj po sloj. Ti slojevi moraju biti dovoljno kruti i čvrsti da mogu izdržati vlastitu težinu i težinu naknadnih slojeva kako ne bi došlo do značajne deformacije ili promjene oblika (Jiang i sur., 2019; Liu i sur., 2018). Razvijene su četiri tehnologije 3D tiska. Kod selektivnog laserskog sinteriranja koristi se laser (Slika 1.) dok se kod sinteriranja vrućim zrakom koristi vrući zrak (Slika 2.) kao izvor sinteriranja za spajanje čestica praha i stvaranja krutog sloja. Sinterirani materijal formira dio proizvoda, dok nesinterirani materijal ostaje na mjestu i ima funkciju podupiranja strukture. Prah koji koristimo se zagrijava točno ispod točke taljenja materijala te se na taj način smanjuje toplinska distorzija i olakšava se spajanje s prethodnim slojem. Ovakav način pokazao se prikladnim samo za materijale s velikim udjelom šećera i masti i s relativno niskom točkom taljenja (Jie Sun i sur., 2015).

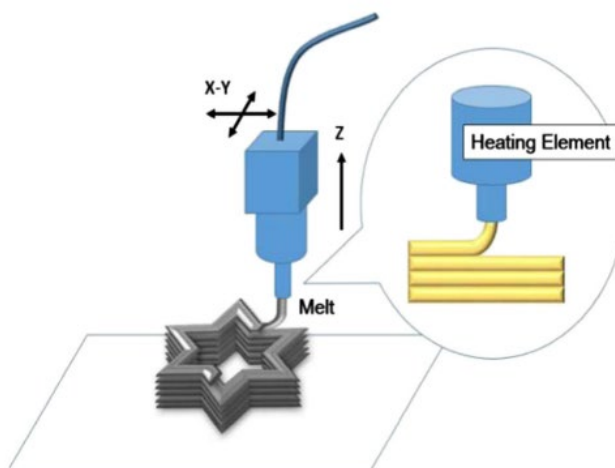


Slika 1. Sinteriranje vrućim zrakom (Jie Sun i sur., 2015)



Slika 2. Selektivno lasersko sinteriranje (Jie Sun i sur., 2015)

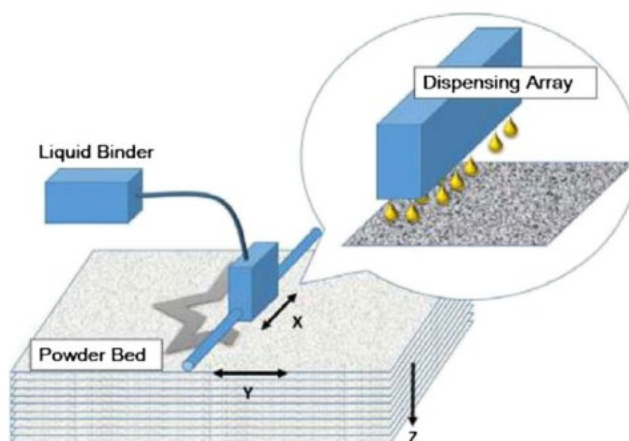
Sljedeća tehnologija je proizvodnja taljenjem i ekstruzijom (Slika 3.) gdje se otopljeni, polučvrsti prehrambeni polimer ekstrudira, skrućuje se gotovo odmah nakon ekstruzije i spaja s prethodnim slojem. Ovaj način proizvodnje koristio se za izradu 3D čokoladnih proizvoda s nekim posebnim zahtjevima (Causar, 2009). Pisače za hranu koji rade na temelju ekstruzije obično karakterizira kompaktna veličina i niski troškovi održavanja, ali su uvelike ograničeni izborom materijala, dugim vremenom izrade i mogućim raslojavanjem ukoliko dođe do fluktuacije temperature (Jie Sun i sur., 2015).



Slika 3. Tehnologija proizvodnje taljenjem i ekstruzijom (Jie Sun i sur., 2015)

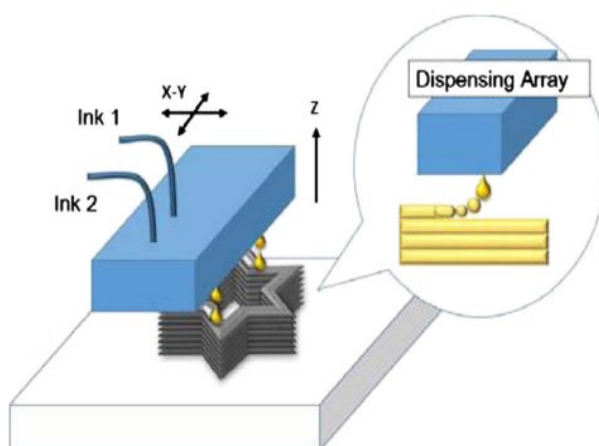
Kod tiska primjenom tekućeg vezivnog sredstva u mlazu svaki sloj praha je ravnomjerno raspoređen po platformi za izradu, a tekuće vezivo se šprica sa funkcijom povezivanja dva

uzastopna sloja praha kao što je prikazano na slici 4 (Sachs i sur., 1992). Prije početka izrade potrebno je raspršiti sloj vodene magle koji će stabilizirati praškasti materijal. Ispuštanje tekućeg veziva u mlazu nudi prednosti poput brze izrade i niske cijene materijala, ali veliki su nedostaci jer ju karakterizira gruba završna obrada i visoka cijena stroja. Također, pogodna je samo za praškaste sirovine (Jie Sun i sur., 2015).



Slika 4. Tisak primjenom tekućeg vezivnog sredstva u mlazu (Jie Sun i sur., 2015)

Kod tintnog tiska koriste se mlaznice s pneumatskim membranama koje doziraju kapljice tinte za hranu na neki materijal koji se miče (Slika 5.). Zbog toga je ovaj način svoju primjenu našao pri izradi kolačića, peciva i kolača (Jie Sun i sur., 2015).



Slika 5. Tintni tisak (Jie Sun i sur., 2015)

2.4. ENZIMI U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI

Enzimi su katalizatori bioloških procesa. Kao svaki drugi katalizator, enzim dovodi reakciju u ravnotežno stanje brže nego što bi se to inače dogodilo (Aehle, 2004).

Enzimi imaju važnu ulogu u proizvodnji hrane, jer kataliziraju razne reakcije koje utječu na boju, okus ili teksturu, a time i na kvalitetu hrane. Neke od ovih reakcija mogu biti poželjne, dok su druge nepoželjne i uzrokuju neželjenu promjenu boje ili neugodan okus u hrani. Svaki enzim ima jedinstvenu strukturu ili konformaciju, što mu omogućuje da se veže za svoj specifični supstrat i katalizira reakciju. Kada je reakcija završena, enzim se oslobađa kako bi ponovno djelovao kao katalizator. Svi enzimi imaju optimalnu temperaturu i pH raspon unutar kojeg će se reakcija odvijati najbrže. Toplina ili promjene u pH denaturiraju enzime, otežavajući ili onemogućavajući im da se pričvrste na odgovarajuće supstrate i tako ih deaktiviraju (Vaclavik, 2014).

Ako je u obradi hrane potrebna enzimska reakcija, važno je osigurati postizanje optimalnog pH i raspona temperature za taj enzim. Izvan optimalnog raspona, reakcija će se odvijati sporije ili uopće neće doći do nje. Iz tog razloga mora se izbjegavati toplinska obrada. Ako to nije moguće, enzim se mora dodati nakon toplinske obrade i nakon hlađenja. S druge strane, ako je djelovanje enzima nepoželjno, enzimi se moraju inaktivirati. To se obično postiže toplinskom obradom, iako se može postići i dodavanjem regulatora kiselosti za promjenu pH vrijednosti. Primjeri poželjnih enzimskih reakcija uključuju zgrušavanje mlijeka pomoću sirila, što je prvi korak u proizvodnji sira. Jedan od primjera neželjenih enzimskih reakcija uključuju enzimsko tamnjenje, koje se događa kada je voće i povrće oštećeno, zbog djelovanja polifenol oksidaze, i uzrokuje neželjenu promjenu boje (Vaclavik, 2014). Habuš i sur. (2021) primjetili su iste promjene tijekom 3D tiska tijesta.

Enzimi imaju jako veliku ulogu u prehrambenoj industriji, jer su je na mnoge načine unaprijedili. Prvo i najvažnije je da se enzimi koriste kao alternativa tradicionalnoj tehnologiji koja se temelji na aditivima (Whitehurst i van Oort, 2010). Enzimi koji se dodaju hrani smatraju se pomoćnim sredstvima za preradu ako nemaju tehnološku funkciju u gotovom proizvodu. To je slučaj ako su potpuno inaktivirani tijekom obrade hrane ili ako zaostala aktivnost enzima ne pokazuje nikakvu tehničku funkciju u konačnom proizvodu. Prema uredbi (EG) br. 1332/2008, pomoćna sredstva za preradu ne moraju biti označena na deklaraciji (Europski parlament i Vijeće Europske unije 2008). Upravo zbog toga enzimi se sve češće koriste kao zamjena za aditive koje je potrebno navesti na deklaraciji u obliku E brojeva što ljudi često negativno

doživljavaju. No, primjenom enzima dobivaju se tzv. "*clean label*" proizvodi za kojima je pokazan velik interes u zadnjih nekoliko godina. Nadalje, budući da su enzimi specifičniji u svom djelovanju nego kemijski reagensi, procesi katalizirani enzimima imaju manje popratnih reakcija i nusproizvoda. Rezultat su kvalitetniji proizvodi i manje zagađenja (Whitehurst i van Oort, 2010). Enzimi mogu katalizirati reakcije pod vrlo blagim uvjetima, omogućujući blage uvjete obrade koji ne uništavaju nutritivna svojstva namirnica.

Pekarska industrija koristi enzime već stotinama godina za proizvodnju širokog spektra proizvoda. Čak su i stari Egipćani koristili enzime endogeno prisutne u brašnu, iako nisu bili ni svjesni učinka. Međutim, tek u 20. stoljeću enzimi se počinju koristiti kao poboljšivači brašna. Prva primjena enzima u pekarskim proizvodima bila je dopuna alfa-amilaze dodavanjem slada kako bi se ispravila koncentracija endogene alfa-amilaze u brašnu. Kasnije je slad zamijenjen mikrobnom alfa-amilazom koja ima pogodniju termostabilnost za pečenje (Aehle, 2004). Pekarska industrija koristi enzime iz tri izvora, a to su endogeni enzimi u brašnu, enzimi povezani s metaboličkom aktivnošću dominantnih mikroorganizama i egzogeni enzimi koji su dodani u tijesto. Enzimi se obično dodaju za modifikaciju reologije tijesta u proizvodnji peciva i kekisa, za promjenu mekoće proizvoda pri izradi kolača i za smanjenje stvaranja akrilamida u pekarskim proizvodima. Enzimi se mogu dodavati pojedinačno ili u složenim smjesama, koje mogu djelovati sinergistički u proizvodnji pekarskih proizvoda, a njihove su razine obično vrlo niske (Muzzalupo, 2013). Enzimi koji se najčešće koriste su hidrolaze, proteaze, hemicelulaze i oksidoreduktaze.

U ovom radu ispitivano je djelovanje enzima ksilanaza i lakaza.

2.4.1. Ksilanaza

Hemicelulaze su grupa enzima koji hidroliziraju hemicelulozu. Hemiceluloza je heterogena skupina polisaharida koja se sastoji od ksilana, ksilobioze, arabinoksilana i arabinogalaktana (Muzzalupo, 2013). Enzim ksilanaza ili endo-1,4- β -ksilanhidrolaza spada u hemicelulaze i katalizira hidrolizu ksilana, glavnog sastojka hemiceluloze. Djeluje tako da cijepa beta-1,4-D-ksilozidnu vezu u ksilanima (Aehle, 2004). Najveću aktivnost pokazuju pri hidrolizi polimernog lanca ksilana te brzina reakcije opada kako se lanac skraćuje. Glavni produkti hidrolize su ksilobioza, ksilotrioza i supstituirani oligomeri koji sadrže dva do četiri ksilozilna ostatka (Bajpai, 2009).

Enzim ksilanaza proizvode gljivice, bakterije, kvasci, morske alge, protozoe, puževi,

rakovi, insekti, sjemenke itd. (Bajpai, 2009). Neke bakterije proizvode ksilanazu u ekstremnim uvjetima kao što su visoke temperature ili visoki pH što čini tako dobiven enzim prikladnijim za korištenje u industriji. Početkom 1990-ih raste interes za ksilanazu. Ovaj enzim svoju primjenu našao je u raznim industrijama kao što je industrija celuloze i papira, industrija stočne hrane i prehrambena industrija. Uz to, pokazuje velik potencijal u proizvodnji ksilitola i etanola na najekonomičniji način (Beg i sur., 2001).

Jedna od glavnih primjena ksilanaze u prehrambenoj industriji je u proizvodnji kruha. Pokazalo se da ksilanaza značajno utječe na kvalitetu kruha. Enzimskom hidrolizom neškrobnih polisaharida dovodi do poboljšanja reoloških svojstava tijesta, specifičnog volumena kruha i čvrstoće mrvica (Sharma, 2017). Svojim djelovanjem pretvara u vodi netopljivu hemicelulozu u topljivi oblik koji veže vodu u tijestu, čime se smanjuje čvrstoća tijesta, povećava volumen te stvaraju finije i jednoličnije mrvice (Butt i sur., 2008). Time značajno poboljšava uvjete proizvodnje jer se tijesto ne lijepi za dijelove strojeva (Rouau, 1993). Također, poboljšava i snagu glutenske mreže, no ovdje točan mehanizam djelovanja nije poznat (Sharma, 2017). Ksilanaze razgrađuju arabinoksilane na način da tako modificirani arabinoksilani poboljšavaju elastičnost, stabilnost i razvoj tijesta. Dodatkom ksilanaza tijekom obrade tijesta povećat će se koncentracija arabino ksilooligosaharida u kruhu, što ima povoljne učinke na ljudsko zdravlje (Poutanen, 1997).

2.4.2. Lakaza

Lakaza (p-difenol oksidaza) je jedan od rijetkih enzima koji se proučava još od 19. stoljeća te je prvi put opisana 1883. godine (Yoshida, 1883). To je plava oksidaza koja sadrži bakar i široko je rasprostranjena u vaskularnim biljkama i gljivama (Lontie, 2018). Oksidaze se mogu podijeliti na enzime koji prenose dva elektrona i enzime koji prenose četiri elektrona. Prva skupina reducira dvoatomni kisik u vodikov peroksid, a druga ga reducira u vodu. Lakaza pripada maloj grupi oksidaza koje mogu iskoristiti puni oksidacijski kapacitet dvoatomnog kisika i svesti ga na dvije molekule vode (Lontie, 2018). Kao što je već spomenuto, lakaza je široko rasprostranjena u vaskularnim biljkama i gljivama, ali je također prisutna u bakterijama i nekim insektima (Mayer i Staples, 2002). Lakaza ima širok raspon supstrata. Katalizira oksidaciju bifenola, polifenola, aminofenola, poliamina i aril diamina. Uz to, jedini je enzim koji samostalno razgrađuje lignin (Zhang i sur., 2021) kako bi omogućila pristup drugim ugljikohidratima u biljkama odnosno celulozi i hemicelulozi. Lakaza je zbog svoje sposobnosti

oksidacije velikog broj supstrata privukla pažnju znanstvenika. Svoju primjenu našla je u mnogim industrijama kao što su tekstilna, prehrambena, farmaceutska, kozmetička, industrija biogoriva, bioremedijacija, organska sinteza te u proizvodnji celuloze i papira.

Mnogi supstrati lakaze su važni sastojci raznih namirnica i pića. Modifikacijom tih sastojaka lakazom mogu se dobiti novi funkcionalni proizvodi, može se poboljšati kvaliteta te smanjiti troškovi (Osma i sur., 2010). Zbog toga je našla primjenu u raznim područjima prehrambene industrije, pa se tako koristi kao aditiv za stabilizaciju vina i piva, u preradi voćnih sokova, pekarstvu, bioremedijaciji otpadnih voda iz prehrambene industrije te za geliranje pektina šećerne repe.

Trenutno je velik interes za lakazu u pekarskoj industriji zbog njene sposobnosti umrežavanja biopolimera. Si (1994) je predložio da lakaza dodana u tijesto koje se koristi za proizvodnju pečenih proizvoda može imati oksidirajući učinak na sastojke tijesta i time poboljšati čvrstoću strukture glutena u tijestu i/ili pečenim proizvodima. Korištenje lakaze rezultira povećanim volumenom, poboljšanom strukturom mrvica, većom mekoćom pečenog proizvoda, kao i povećanom čvrstoćom, stabilnosti te doprinosi smanjenju ljepljivosti, čime se poboljšava obradivost tijesta. Učinak na tijesto je posebno dobar kada se koristi brašno loše kvalitete.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Kao radni materijal u ovom istraživanju korištena je smjesa različitih vrsta brašna i ostalih sirovina od kojih je pripremljeno tijesto namijenjeno za 3D tisak *snack* proizvoda.

Brašna:

1. Brašno batata (VG Fryer d.o.o., Hrvatska)
2. Proseno brašno (Bezgluten Sp. z o. o., Poljska)
3. Proteini riže (BIOfan FAN-Commerce d.o.o., Bosna i Hercegovina)

Ostale sirovine:

1. Psilijum u prahu (Biovega d.o.o., Hrvatska)
2. Prašak za pecivo (Podravka d.d., Hrvatska)
3. Suncokretovo ulje (Zvijezda plus d.o.o., Hrvatska)
4. Sol (Solana Pag d.d., Hrvatska)
5. Limunska kiselina (Šafram d.o.o., Hrvatska)
6. Soda bikarbona (Podravka d.d., Hrvatska)
7. Vodovodna voda

Enzimi:

1. Enzim ksilanaza dobiven iz *Bacillus subtilis* (AB Enzymes GmbH, Njemačka)
2. Enzim lakaza dobiven iz *Aspergillus sp.* (Sigma-Aldrich Co., SAD)

3.2. METODE

3.2.1. Enzimski predtretman

Pribor i aparatura:

1. Vodena kupelj
2. Staklena laboratorijska boca s čepom
3. Analitička vaga
4. Žličica
5. Ubodni pH metar testo 206 (Testo SE, Njemačka)

Postupak:

Predtretman ksilanazom proveden je na način da je psilijum prah pomiješan s vodom u omjeru 1:40 te je smjesi dodana odgovarajuća količina enzima. Ksilanaza je dodana direktno u gel psilijuma, jer je psilijum po svom sastavu arabinoksilan, supstrat na koji ksilanaza direktno djeluje (Yu i Perret, 2003). Gel je inkubiran 16 sati na 55°C u vodenoj kupelji uz trešnju (120 rpm) prema uputama proizvođača. Nakon inkubacije gel je dodan u zamjes kako je opisano u potpoglavlju 3.2.2.

Preliminarnim istraživanjima, koja nisu prikazana u ovom diplomskom radu, utvrđeno je da se bolja aktivnost enzima lakaze postiže dodatkom istog direktno u zamjes za tijesto. Predtretman lakazom proveden je na način da je direktno u zamjes dodana odgovarajuća količina enzima, a pripremljeno tijesto je zatim stajalo na sobnoj temperaturi 2, 4 ili 16 sati. Pri odabiru optimalne koncentracije lakaze i ksilanaze ispitivane su koncentracije od 10, 50 i 100 jedinica (U) po gramu dodanog psilijuma što odgovara 0,18, 0,9 i 1,8 jedinica (U) aktivnosti po gramu smjese.

Prilikom ispitivanja utjecaja pH tijesta na aktivnosti enzima kao regulatori kiselosti su korišteni limunska kiselina i soda bikarbona koji su dodani u količini od 1% u gel u slučaju dodatka ksilanaze odnosno u zamjes u slučaju dodatka lakaze. Vrijednosti pH tijesta ispitivane za lakazu bile su 5, 6 i 7 pri koncentraciji od 100 jedinica enzima. Prema preporukama proizvođača za enzim ksilanazu su ispitivane vrijednosti pH tijesta 5 i 6 pri koncentraciji od 50 jedinica enzima.

3.2.2. Priprema tijesta za tisak

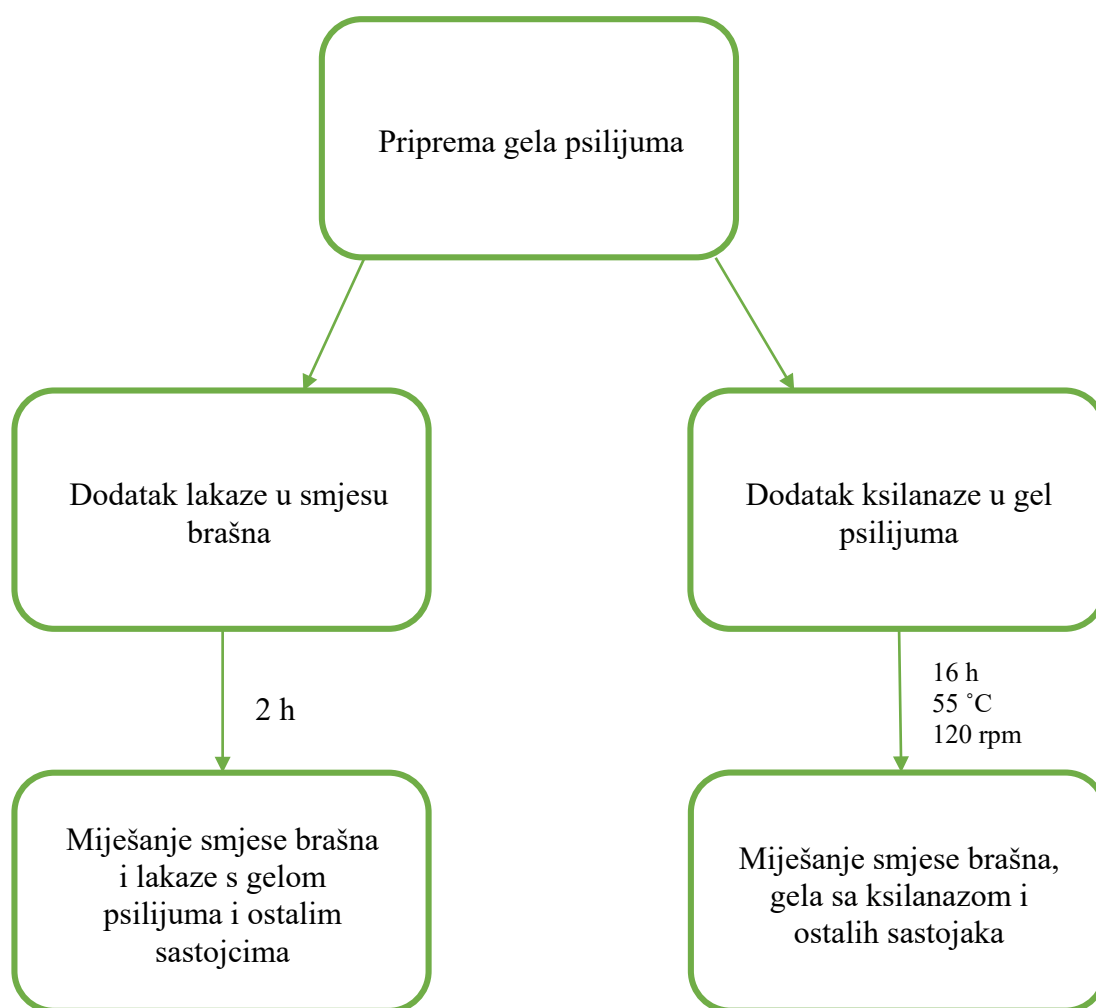
Aparatura i pribor:

1. Turbula (WAB, Willy A. Bachofen Maschinenfabrik Basel, Švicarska)
2. Ručni mikser (Gorenje d.o.o., Slovenija)
3. Digitalna vaga Sartorius BL-150 (Sartorius AG, Njemačka)
4. Čaša (1000 mL)
5. Žlica

Postupak:

Smjesa brašna prosa, proteina riže i brašna batata homogenizirana je u Turbuli kroz 10 minuta, uz brzinu rotacije 130 okretaja u minuti. Tijesto je pripremljeno na način da su praškastoj smjesi brašna dodani sol, prašak za pecivo te regulatori kiselosti i enzim lakaza (ukoliko je

uključen u recepturu), a zatim ulje te psilijum gel (sa/bez enzima) i ostatak vode prema recepturi u Tablici 1. Svi sastojci su pomiješani pomoću ručnog miksera na brzini 1-2 dok se ne dobije homogeno tijesto (oko 3 minute).



Slika 6. Shematski prikaz pripreme tijesta s dodatkom lakaze i ksilanaze

Tablica 1. Receptura tijesta za *snack* proizvode

Sirovine		Masa (g)	Udio (%)
Smjesa brašna*	Proseno brašno	22,25	55,63
	Brašno batata	11,13	27,83
	Rižini proteini	6,68	16,7
Ostali sastojci**	Sol	0,4	1
	Prašak za pecivo	0,8	2
	Suncokretovo ulje	8	20
	Voda	11,2	28
	Psilijum	0,72	0,01

*na ukupnu masu brašna

**postotak ostalih sastojaka izražen je u odnosu na smjesu brašna (100 %)

3.2.3. Određivanje reoloških svojstava tijesta

Aparatura i pribor:

1. Reometar MCR 92 (Anton Paar GmbH, Austrija)
2. Špatula

Postupak:

Za određivanje reoloških svojstava tijesta korišten je oscilacijski reometar MCR 92 (Slika 7). Za sva mjerenja korištena je geometrija paralelne ploče promjera 25 mm (PP25) s razmakom od 1 mm. Prvo je testom amplitude utvrđeno linearno viskoelastično područje (LVER) i smična deformacija s testom frekvencije. Test amplitude se provodio pri konstantnoj frekvenciji od 1 Hz sa smičnom brzinom od 0,01 do 100 s⁻¹. Nakon toga, test frekvencije proveden je u rasponu frekvencija 1–30 Hz pri 30 °C, uz smičnu deformaciju određenu testom amplitude. Prije svakog mjerenja komadić tijesta stavljen je na paralelnu ploču te je pomoću softvera spuštena sonda. Ukoliko izađe višak tijesta on se uklanja špatulom (tzv. trimanje uzorka). Zatim se zatvara hauba kojom se eliminira utjecaj vanjskih faktora i pokreće se mjerenje. Nakon mjerenja, modul pohrane (G'), modul gubitka (G''), faktor gubitka ($\tan \delta = G''/G'$) i kompleksna viskoznost izračunati su pomoću programa Anton Paar RheoCompass.



Slika 7. Oscilacijski reometar (vlastita fotografija)

Dodatno, proveden je i 3ITT (eng. *three interval thixotropy*) test. Ovaj test daje informaciju o stupnju oporavka tijesta nakon primjene deformacije te se provodi u tri intervala. U prvom intervalu mjerenje se provodi pri niskom smičnom naprezanju i konstantnoj frekvenciji. Ovaj interval koristi se kao referentni jer se tijesto analizira u stanju mirovanja. Cilj drugog intervala je strukturna deformacija tijesta te se tijesto deformira određenim visokim smičnim naprezanjem ili visokom brzinom smicanja. U ovom radu korištena je brzina smicanja od 15 s^{-1} , što odgovara naprezanju tijesta prilikom tiska odabranog oblika u pisaču. Treći interval provodi se u istim uvjetima kao i prvi, pri niskom smičnom naprezanju. Nakon provedenog testa određen je postotak deformacije tijesta prema formuli:

$$\text{Deformacija (\%)} = (G_i - G_0) / G_i * 100 \quad [1]$$

gdje G_i označava početnu G' vrijednost uzorka, a G_0 označava G' vrijednost neposredno nakon smičnog naprezanja (Toker i sur., 2015).

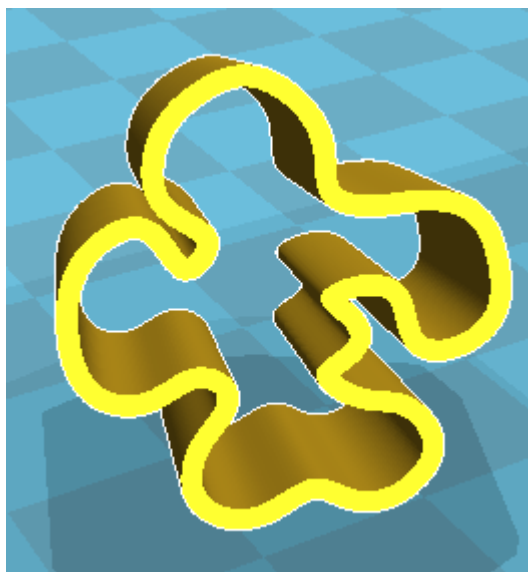
3.2.4. 3D tisak *snack* proizvoda

Aparatura i pribor:

1. 3D pisač (FoodBot D2 Multi Ingredient Dual Head Food 3D Printer, Changxing Shiyin Technology Co., Ltd., Kina)
2. Sušionik (Thermo Fisher Scientific Inc., SAD)
3. Digitalna vaga Sartorius BL-150 (Sartorius AG, Njemačka)
6. Špatula
7. Slastičarska vrećica

Postupak:

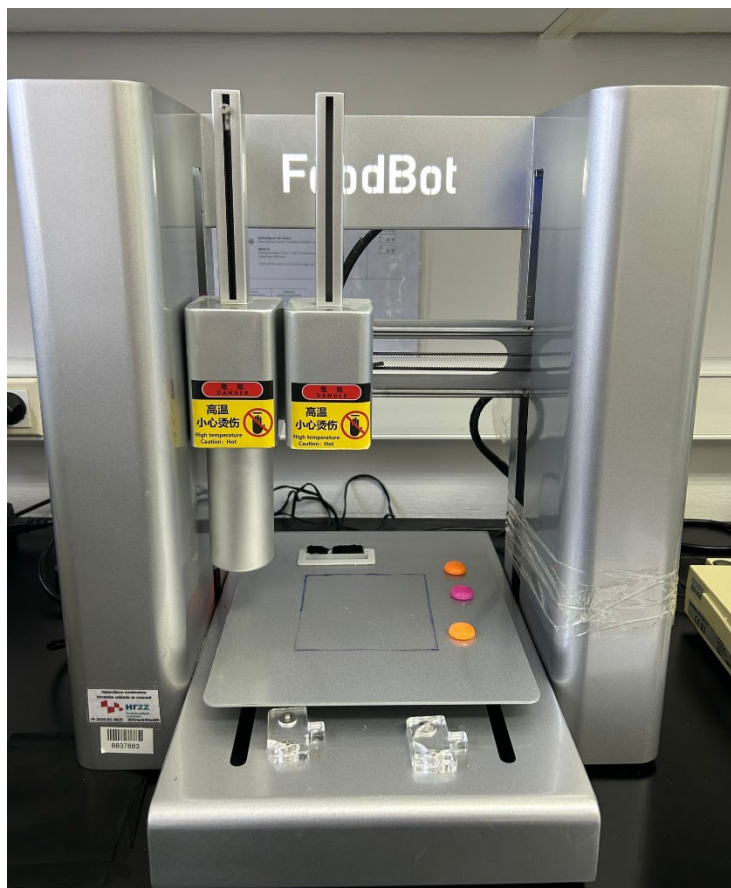
Trodimenzijski oblik *snack* proizvoda dizajniran je u CAD softveru SolidWorks (Dassault Systemes, SAD). G kod koji povezuje stvoreni dizajn sa 3D pisačem stvoren je u Slic3r softveru (Alessandro Ranellucci, Italija). Dizajnirana površina *snack* proizvoda iznosi 88 mm^2 . *Snack* proizvod dizajniran je da sadrži 22 sloja koji ukupno daju visinu od 2,5 cm. CAD model prikazan je na slici 8.



Slika 8. CAD model *snack* proizvoda (vlastita fotografija)

Za 3D tisak koristio se FoodBot D2 Multi Ingredient Dual Head Food 3D Printer (Slika 9). Namijenjen je tisku hrane te radi na principu ekstruzije. Pripremljeno tijesto prvo je prebačeno u slastičarsku vrećicu pomoću koje je punjeno u špricu kako bi se smanjio udio zraka u tijestu. Na napunjenu špricu stavlja se plastična sapnica promjera 0,84 mm. Tako napunjenu špricu sa sapnicom stavljamo u ekstruder 3D pisača. G kod željenog oblika odabire se u

izborniku 3D pisača te se pokreće tiskanje. Tiskanje je provedeno prethodno optimiranim parametrima, brzinom od 15 mm/s na temperaturi od 30 °C. Od svakog tijesta tiskanjem je dobiveno pet *snack* proizvoda kojima je zabilježena masa na digitalnoj vagi. Za tisak jednog *snack* proizvoda bilo je potrebno oko sedam minuta. Neposredno nakon tiska, uzorci su ocjenjeni na temelju vizualnog izgleda i osobnog doživljaja ocjenama od 1 do 5 (1-najlošiji, 5-najbolji) (Radoš i sur., 2022).



Slika 9. 3D pisač (vlastita fotografija)

3.2.5. Sušenje

Završna obrada 3D *snack* proizvoda provedena je u sušioniku 30 minuta pri temperaturi od 130°C. Nakon sušenja ohlađeni su na sobnu temperaturu te im je zabilježena masa na digitalnoj vagi.

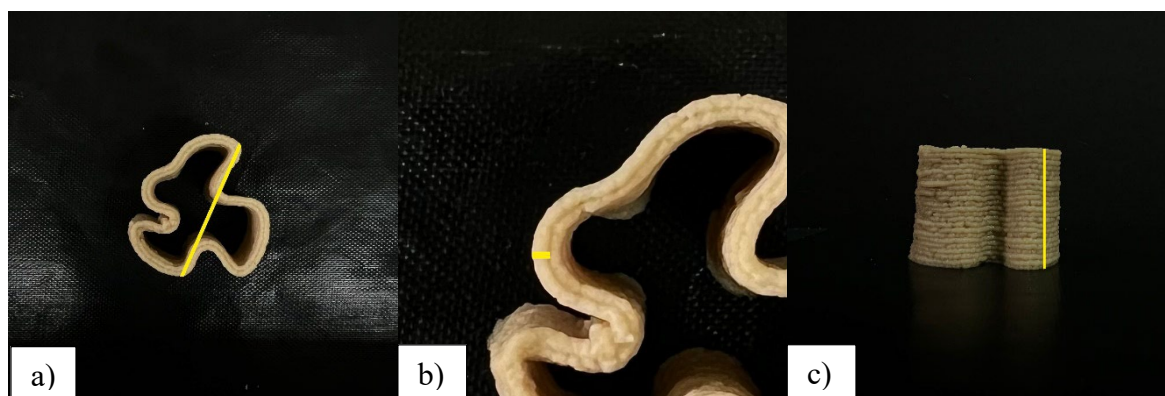
3.2.6. Analiza kvalitete tiska *snack* proizvoda

Aparatura i pribor:

1. Računalni program ImageJ (Java)
2. Microsoft Office Excel 2016

Postupak:

Svaki uzorak je prije i nakon sušenja fotografiran pomoću iPhone 13 Pro mobitela (Apple, SAD) s visine od 13 cm te udaljenosti od 6,5 cm. Također, svaki uzorak je ocjenjen prije i nakon pečenja na temelju vizualnog izgleda. Fotografije su zatim obrađene u programu ImageJ. Pomoću ImageJ programa uzorcima su izmjerene a) širina oblika, b) širina linije tiska te c) visina oblika na način prikazani na slici 10.



Slika 10. Prikaz načina mjerenja dimenzija *snack* proizvoda (vlastita fotografija)

Iz tih podataka izračunata je točnost linije printa, ekspanzija linije, stabilnost linije i odstupanje širine po formulama:

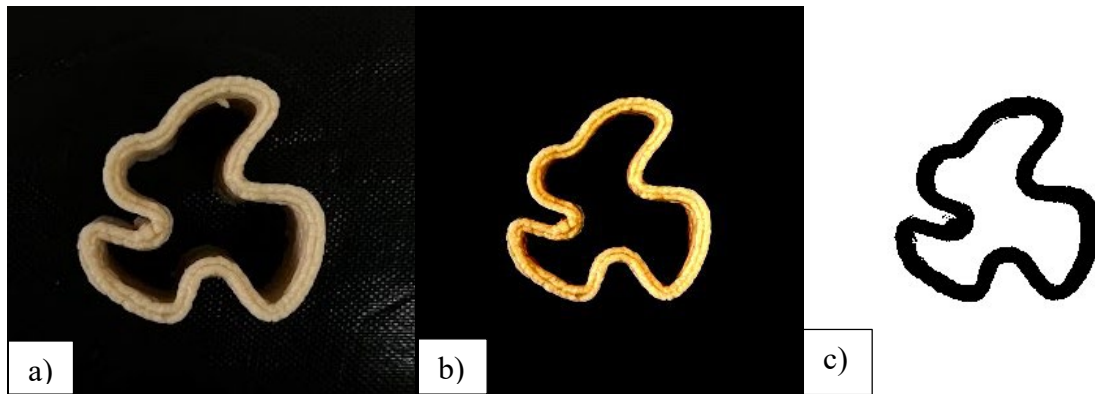
Točnost tiska linije (%): $\text{širina izmjerene linije} / \text{širina dizajnirane linije} * 100$ [2]

Ekspanzija linije (%) = $\text{širina izmjerene linije} / \text{širina sapnice} * 100$ [3]

Stabilnost visine (%) = $\text{izmjerena visina} / \text{dizajnirana visina} * 100$ [4]

Odstupanje širine (%) = $\text{izmjerena širina uzorka} / \text{dizajnirana širina uzorka} * 100$ [5]

Program ImageJ nam također omogućuje dobivanje binarnih fotografija. Prvi korak u obradi fotografije je prilagodba kontrasta te izoštravanje fotografije ukoliko je to potrebno. Zatim slijedi ručno i automatsko uklanjanje smetnji, dakle svega u pozadini što nije *snack*. Fotografija u boji se pretvara u fotografiju u sivim tonovima odnosno 8-bitnu fotografiju. Takvoj fotografiji prilagođava se *threshold* kako bi se dobio bijeli *snack* proizvod na crnoj pozadini. Zadnji korak je prebacivanje fotografije u binarni oblik gdje sada crni pikseli predstavljaju oblik 3D *snacka*, a bijeli pikseli pozadinu (Slika 11).



Slika 11. Obrada fotografija u ImageJ programu: a) fotografija uzorka prije obrade b) nakon prilagodbe kontrasta c) binarna fotografija (vlastita fotografija)

Iz binarnih fotografija možemo očitati zastupljenost crnih i bijelih piksela te tako utvrditi razlike između uzoraka. Parametri koji su analizirani:

$$\text{Preciznost oblika (\%)} = \text{površina izmjerenih crnih piksela/dizajnirana površina*100} \quad [6]$$

$$\text{Deformacija oblika (\%)} = \frac{\text{postotak crnih piksela prije sušenja}-\text{postotak crnih piksela nakon sušenja}}{\text{postotak crnih piksela prije sušenja}}*100 \quad [7]$$

3.2.7. Obrada podataka

Za grafičke prikaze eksperimentalno dobivenih rezultata i statističku analizu korišten je Microsoft Office Excel 2016. Svi rezultati u radu prikazani su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija 5 mjerenja. Kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika između uzoraka korištena je analiza varijance, ANOVA ($p < 0,05$) uz post-hoc Tukey test. Podaci su statistički obrađeni u programu GraphPad Prism 9.5.1 (Insight Partners, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj dodatka enzima lakaze i ksilanaze na kvalitetu tiska te reološka svojstva bezglutenskog tijesta s dodatkom psilijum te na kvalitetu gotovog 3D tiskanog *snack* proizvoda. U prvom koraku istraživanja ispitan je utjecaj različitih koncentracija enzima lakaza i ksilanaza na kvalitetu tiska *snack* proizvoda te su odabrane optimalne koncentracije enzima lakaza i ksilanaza. Obzirom da je broj istraživanja koja koriste enzim lakaza u pripremi prehrambenih proizvoda ograničen, ne postoje preporuke uvjeta za primjenu istog npr. optimalni pH i temperatura. Stoga je u drugom dijelu istraživanja provedeno ispitivanje utjecaja vremena djelovanja enzima lakaze (2 i 16 h) te pH tijesta (5, 6 i 7) na aktivnost enzima pri odabranoj optimalnoj koncentraciji u prvom koraku istraživanja, a što je praćeno kroz reološka svojstva tijesta i mjerenje kvalitete tiska. Literaturni podaci vezani uz primjenu ksilanaza su opsežniji te nije bilo potrebno provesti ispitivanje utjecaja vremena djelovanja enzima već su korištene preporuke proizvođača vezano uz vrijeme i temperaturu tretmana, dok je utjecaj pH tijesta (5 i 6) ispitan.

4.1. ODREĐIVANJE OPTIMALNE KONCENTRACIJE ENZIMA

4.1.1. Lakaza

4.1.1.1. Kvaliteta tiska

Na kvalitetu tiska utječu mehanizam ekstruzije, svojstva materijala npr. reološka svojstva, visina sapnice, promjer sapnice, brzina ekstruzije te procesi obrade nakon tiska (Liu i sur., 2017). Kako bi se odredila kvaliteta tiska praćena je preciznost tiska, stabilnost visine, odstupanje širine i deformacija oblika.

Tablica 2. Utjecaj koncentracije enzima lakaze (U = jedinica) na preciznost tiska, stabilnost visine, odstupanje širine i deformaciju oblika pri pH 6

	Kontrolni uzorak	LAC 10U	LAC 50U	LAC 100U
Točnost tiska linije (%)	107 ± 5,95 (a)	117 ± 8,99 (b)	103 ± 9,32 (a)	104,5 ± 11,64 (a)
Stabilnost visine (%)	101,75 ± 3,06 (a)	104,05 ± 5,1 (a)	100,43 ± 1,5 (a)	107,08 ± 6,52 (a)
Odstupanje širine (%)	5,74 ± 2,55 (a)	13,98 ± 13,63 (b)	-5,66 ± 6,12 (c)	4,56 ± 7,17 (a)

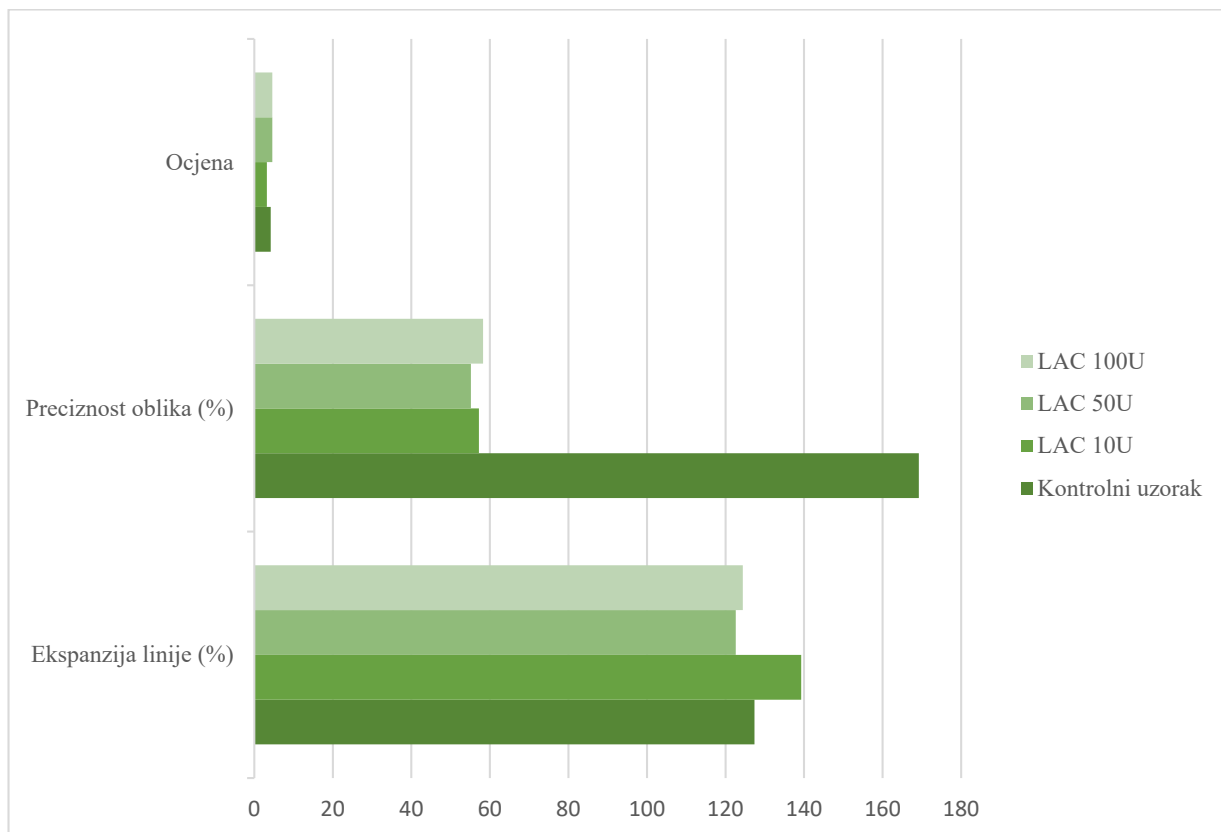
Tablica 2. Utjecaj koncentracije enzima lakaze (U = jedinica) na preciznost tiska, stabilnost visine, odstupanje širine i deformaciju oblika pri pH 6-*nastavak*

Deformacija oblika (%)	26,08 ± 10,16 (a)	25,41 ± 6,71 (a)	27,3 ± 10,92 (a)	16,33 ± 7,85 (b)
-------------------------------	----------------------	------------------	------------------	---------------------

Iz rezultata prikazanih u tablici 2 možemo primijetiti da postoji statistički značajna razlika među uzorcima s različitim koncentracijama lakaze. Vukušić Pavičić i sur. (2021) koristili su tijesta od različitih vrsta brašna s dodatkom različitih ulja i masti te su primijetili značajnu statističku razliku u tisku linije, visini te širini 3D tiskanih keksa. Točnost linije tiska je u svim uzorcima bila viša od dizajnirane zbog čega su vrijednosti točnosti tiska linije više od 100 %. Jedan od razloga zbog kojih je moglo doći do toga je prisutnost zraka u tijestu zbog kojeg ono nije moglo pravilno teći kroz sapnicu. Vrijednost točnosti linije tiska se značajno statistički razlikuje kod uzoraka s 10 jedinica lakaze. Vrijednosti točnosti tiska linije su se, u usporedbi s kontrolnim uzorcima, u uzorcima sa 10 jedinica lakaze povećale, dok se u uzorcima sa 50 i 100 jedinica lakaze smanjila. Najbolju točnost tiska imaju uzorci čija je vrijednost najbliža vrijednosti od 100 %, a to su uzorci sa 50 jedinica lakaze čija je točnost tiska iznosila 103 %.

Visina je u svim uzorcima bila viša od dizajnirane zbog čega su vrijednosti stabilnosti visine više od 100%. Ovdje je opet mogući razlog prisutnost zraka u tijestu zbog kojeg slojevi ne mogu idealno nalijegati jedan na drugog. Stabilnost visine u kontrolnim uzorcima bila je oko 102 %. Dodatkom enzima u uzorcima sa koncentracijom od 10 i 100 jedinica lakaze stabilnosti visine opada, dok se u uzorcima sa 50 jedinica enzima poboljšala i imala je vrijednost najbližu 100 %.

Statistički značajna razlika primijećena je za vrijednosti odstupanja širine među uzorcima. Od kontrolnih uzoraka značajno su se razlikovali uzorci sa 10 i 50 jedinica lakaze. Vrijednost odstupanja širine u kontrolnim uzorcima iznosila je oko 6 %. Dodatkom enzima ta vrijednost se u uzorcima s 10 jedinica lakaze povećala na 14 %, dok je u uzorcima sa 50 jedinica lakaze iznosila oko -6 %. Negativna vrijednost nam govori da su uzorci imali manju širinu od dizajnirane. U uzorcima sa 100 jedinica lakaze odstupanje širine je bilo najmanje, oko 4,5 %.



Slika 12. Grafički prikaz utjecaja koncentracije lakaze (LAC) na kvalitetu tiska pri pH 6

Ekspanzija linije nam daje podatak o tome kolika je širina tiskane linije u odnosu na širinu sapnice i računa se po formuli [3]. Iz rezultata iz slike 12 možemo vidjeti da se ekspanzija linije pri koncentraciji enzima od 10 jedinica lakaze, gdje je ekspanzija linije iznosila $139,29 \pm 28,1$ %, povećala u odnosu na kontrolni uzorak, gdje je iznosila $127,38 \pm 7,09$ %. Pri koncentraciji od 50 i 100 jedinica lakaza se ekspanzija smanjila. Najmanju ekspanziju linije imali su uzorci sa 50 jedinica lakaze ($122,62 \pm 13,86\%$). Huang (2018) primjećuje da se prilikom ekspanzije linije od 130% tiskaju kontinuirane linije koje osiguravaju pravilno prijanjanje slojeva bez ugrožavanja točnosti ispisa.

Preciznost oblika određena je analizom crnih piksela u ImageJ programu uspoređujući svaki uzorak pojedine recepture sa prvim uzorkom jer je on tiskan s najvećom točnošću. U usporedbi s kontrolnim uzorkom možemo vidjeti da se preciznost oblika uzoraka tretiranih enzimom značajno poboljšala. Najbolju preciznost tiska oblika imali su uzorci sa 100 jedinica lakaze, a iznosila je $58,26 \pm 6,63$ %.

Svi uzorci su neposredno nakon tiska ocjenjeni ocjenama od 1 do 5 na temelju vizualnog izgleda i osobnog doživljaja. Najnižu ocjenu dobili su uzorci s 10 jedinica lakaze čija je

prosječna ocjena iznosila 3,2. Nakon njih slijede kontrolni uzorci koji su dobili prosječnu ocjenu od 4,2. Uzorci sa 50 i 100 jedinica lakaze su najbolje ocjenjeni i imali su istu prosječnu ocjenu, a to je 4,6.

Deformacija oblika jedini je parametar kvalitete tiska promatran nakon sušenja. Iz tablice 2 vidimo da nema značajne statističke razlike u deformaciji među uzorcima. Uzorci sa 100 jedinica lakaze jedini su se statistički razlikovali od ostalih uzoraka, te su ujedno imali i najmanju deformaciju oblika koja je iznosila blizu 16 %.

Obzirom na navedene rezultate kao optimalna koncentracija enzima lakaza odabrana je koncentracija od 100 jedinica lakaze po gramu psilijuma jer su ti uzorci imali najmanju deformaciju oblika, najmanje odstupanje od zadane širine te najbolju preciznost tiska.

4.1.2. Ksilanaza

4.1.2.1. Kvaliteta tiska

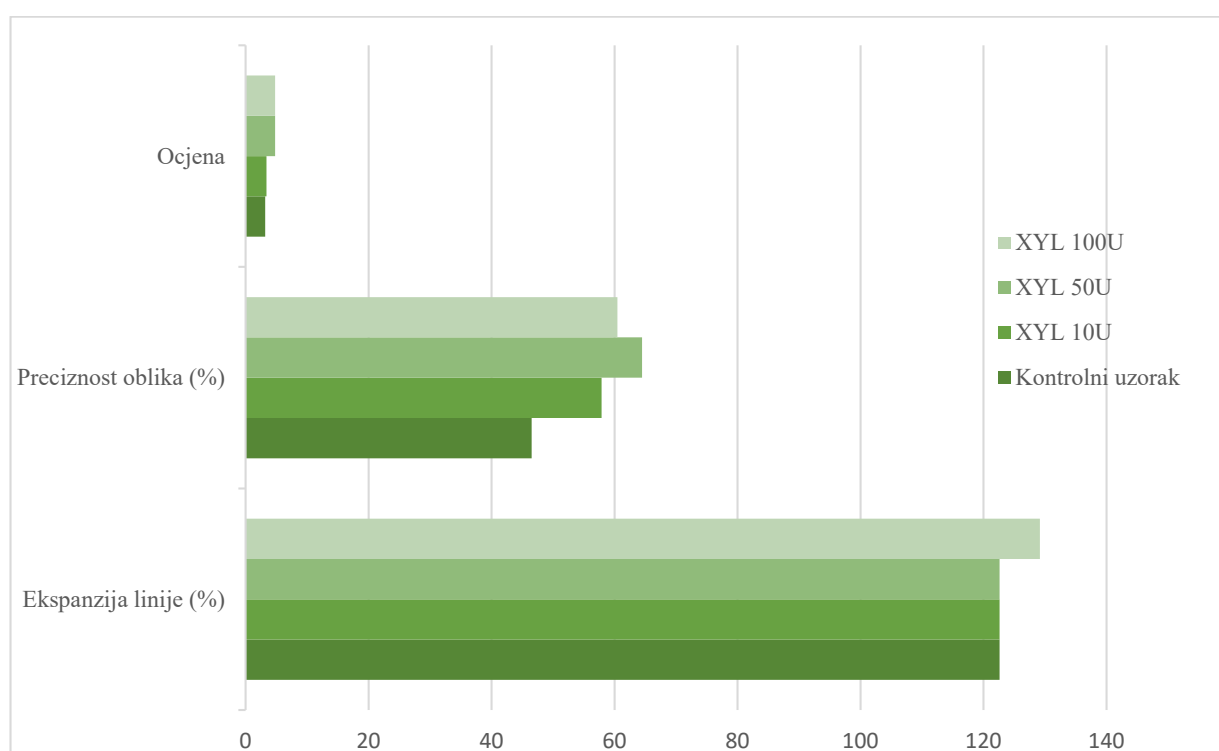
Pri odabiru optimalne koncentracije enzima ksilanaza ispitivane su koncentracije od 10, 50, i 100 jedinica enzima po gramu psilijuma.

Tablica 3. Utjecaj koncentracije enzima ksilanaza na preciznost tiska, stabilnost visine, odstupanje širine i deformaciju oblika pri pH 6

	Kontrolni uzorak	XYL 10U	XYL 50U	XYL 100U
Točnost tiska linije (%)	103 ± 6,13 (a)	103 ± 10,8 (a)	103 ± 11 (a)	108,5 ± 3,12 (a)
Stabilnost visine (%)	100,38 ± 2,51 (a)	96,5 ± 5,49 (a)	106,45 ± 2,83 (a)	100,95 ± 2,83 (a)
Odstupanje širine (%)	-11,12 ± 4,85 (a)	-8,44 ± 5,17 (a)	16,8 ± 14,43 (b)	16,4 ± 13,52 (b)
Deformacija oblika (%)	28,72 ± 5,62 (a)	37,63 ± 12,85 (a)	24,61 ± 7,3 (a)	24,16 ± 4,94 (a)

Iz tablice 3 možemo primjetiti da nema značajne statističke razlike među uzorcima s različitim koncentracijama enzima ksilanaza. Točnost tiska linije bila je veća od dizajnirane. U svim uzorcima vrijednosti točnosti tiska bila je ista, osim u uzorcima sa 100 jedinica ksilanaze gdje je bila viša i iznosila oko 108 %. Vrijednost stabilnost visine je u kontrolnim uzorcima iznosila skoro 100 %. Od uzoraka tretiranih enzimom najbolju stabilnost imali su uzorci sa 100 jedinica ksilanaze, oko 101 %.

Odstupanje od zadane širine se značajno statistički razlikuje između kontrolnih uzoraka i uzoraka sa 10 jedinica ksilanaze te uzoraka sa 50 i 100 jedinica ksilanaze. Najmanje odstupanje od širine pokazali su uzorci sa 100 jedinica ksilanaze, oko 16 %.



Slika 13. Grafički prikaz utjecaja koncentracije enzima ksilanaza (XYL) na kvalitetu tiska pri pH 6

Ekspanzija linije jednaka je za kontrolni uzorak te za uzorke sa 10 i 50 jedinica ksilanaze. Vrijednost ekspanzije linije u tim uzorcima iznosila je $122,62 \pm 12,82$ %. U uzorcima sa 100 jedinica ksilanaze ekspanzija linije je bila viša u usporedbi s kontrolnim uzorkom te je iznosila $129,17 \pm 3,72$ %.

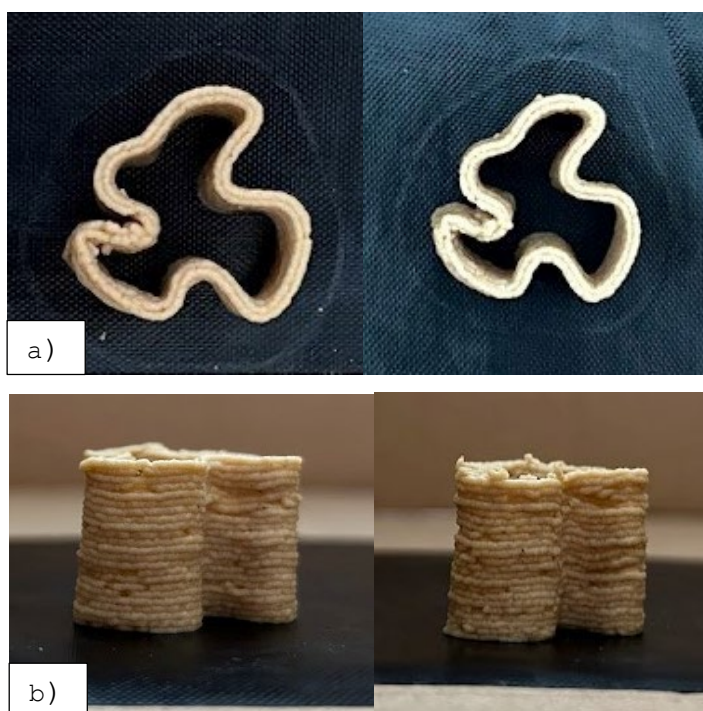
Iz slike 13 možemo vidjeti da je preciznost oblika dodatkom ksilanaze rasla u odnosu na kontrolni uzorak. Najbolju preciznost oblika pokazali su uzorci sa 50 jedinica ksilanaze.

Preciznost oblika u ovim uzorcima iznosila je $64,48 \pm 12,3$ % što je poboljšanje od $38,61$ % u odnosu na kontrolni uzorak, u kojima je vrijednost preciznosti oblika bila $46,52 \pm 2,97$ %.

Uzorci su ocjenjivani neposredno nakon tiska na temelju vizualnog izgleda i osobnog doživljaja. Najnižu prosječnu ocjenu dobili su kontrolni uzorci, a to je 3,2. Sljedeći po ocjenama su uzorci sa 10 jedinica ksilanaze s prosječnom ocjenom 3,4. Najbolji su se pokazali uzorci sa 50 i 100 jedinica ksilanaze po gramu psilijuma te su dobili istu prosječnu ocjenu koja je iznosila 4,8.

Iz tablice 3 vidimo da među uzorcima s različitim koncentracijama enzima nije bilo značajne statističke razlike. Deformacija oblika nakon sušenja u kontrolnim uzorcima iznosila je približno 29 %. Najmanju deformaciju oblika imali su uzorci sa 100 jedinica ksilanaze, a vrijednost deformacije je iznosila oko 24 %. Povezanost između deformacije oblika i koncentracije ksilanaze primjetili su i Habuš i sur. (2022) gdje je uočeno da tijesta s većom koncentracijom ksilanaze rezultiraju 3D tiskanim *snack* proizvodima manje deformacije oblika.

S obzirom da su uzorci s koncentracijama 50 i 100 jedinica ksilanaze bili jako slični, u odabiru optimalne koncentracije enzima presudio je osobni doživljaj. Na slici 14 prikazani su uzorci sa 50 i 100 jedinica ksilanaze.



Slika 14. a) Uzorak sa 50U (lijevo) i 100U (desno) ksilanaze fotografiran odozgora
b)Uzorak sa 50U (lijevo) i 100U (desno) ksilanaze fotografiran bočno

Uzevši u obzir sve navedene rezultate, kao optimalna koncentracija enzima ksilanaza izabrana je koncentracija od 50 jedinica ksilanaze po gramu psilijuma.

4.2. ODREĐIVANJE UTJECAJA VREMENA TRETMANA LAKAZOM NA REOLOŠKA SVOJSTVA I KVALITETU TISKA

4.2.1. Reološka svojstva

Stabilnost oblika tiskanih uzoraka usko je povezana s modulom pohrane (G') tijesta (Zheng i sur., 2021) te materijali s višim G' imaju bolju sposobnost zadržavanja oblika (Costakis i sur., 2016). Iz rezultata prikazanih u tablici 4 vidljivo je da su svi uzorci imali veće vrijednosti G' od modula gubitka (G'') što nam ukazuje na elastičnije ponašanje tijesta, što je neophodno za stabilnost oblika 3D tiskanih proizvoda. Nekoliko istraživanja zabilježilo je da su najbolju stabilnost pokazali *snack* proizvodi tiskani smjesom sa pseudoplastičnim ponašanjem tj. većim vrijednostima G' u odnosu na G'' (Habuš i sur., 2021; Uribe-Wandurraga i sur., 2020). Također, iz tablice 4 vidimo da se G' povećavao s povećanjem vremena djelovanja enzima ili odmaranja tijesta. Dodatak enzima imao je utjecaj na G' te se u slučaju djelovanja enzima u trajanju od 2 sata modul pohrane povećao, dok se u slučaju djelovanja enzima u trajanju od 16 sati smanjio u odnosu na tijesta s istim vremenom djelovanja bez enzima.

Tablica 4. Reološka svojstva tijesta bez i sa dodatkom optimalne koncentracije lakaze

	LAC 0U 2h	LAC 0U 4h	LAC 0U 16h	LAC 100U 2h	LAC 100U 16h
Kompleksna viskoznost (Pas)	1048,00 ± 32,00 (a)	1130,50 ± 30,50 (a)	1092,50 ± 49,50 (a)	1051,50 ± 13,50 (a)	1115,00 ± 4,00 (a)
Faktor gubitka	0,27 ± 0,00 (a)	0,27 ± 0,00 (a)	0,25 ± 0,00 (a)	0,26 ± 0,00 (a)	0,24 ± 0,00 (a)
Modul pohrane G' (Pa)	22260,00 ± 671,70 (a)	24573,00 ± 566,00 (a)	24521,50 ± 1104,50 (a)	23041,00 ± 344,00 (a)	24942,50 ± 101,50 (a)
Modul gubitka G'' (Pa)	6063,40 ± 148,62 (a)	6487,60 ± 143,70 (a)	6201,05 ± 209,05 (a)	6042,30 ± 119,80 (a)	6053,90 ± 37,90 (a)

LAC 100U – optimalna koncentracija lakaze

Faktor gubitka računa se iz omjera G'' i G' ($\tan\delta = G''/G'$) te ukazuje na to pokazuje li materijal elastično ili viskozno ponašanje. Ako je faktor gubitka veći od 1, ispitivani materijal

pokazuje dominantno viskozno ponašanje nalik tekućinama, a ako je manji od 1, materijal pokazuje dominantno elastično ponašanje nalik krutinama (Liu i sur., 2017). Svi uzorci imali su faktor gubitka niži od 1, dakle sva tijesta pokazuju dominantno elastično ponašanje. Prijašnja istraživanja pokazala su da se faktor gubitka bezglutenskih tijesta kreće od 0,33 do 0,68 (Villanueva i sur., 2018). No, niže vrijednosti (0,1-0,4) primjećene su kada je u bezglutensko tijesto dodan sastojak za strukturiranje ili je on naknadno formiran u tijestu. U prijašnjim istraživanjima bezglutenska tijesta pokazala su niže vrijednosti faktora gubitka dodatkom viskoznih prehrambenih vlakana (Ronda i sur., 2013), egzogenih proteina (Ronda i sur., 2014) te β -glukana (Ronda i sur., 2015). Takva tijesta nazivaju se slabim gelovima (Ronda i sur., 2014). Rezultati dobiveni u ovom istraživanju slažu se sa prijašnjima te se niže vrijednosti faktora gubitka mogu objasniti korištenjem gela psilijuma. Faktor gubitka netretiranog tijesta smanjivao se produljenjem vremena djelovanja pa su tako najveću vrijednost faktora gubitka imali uzorci netretirani enzimom i s vremenom djelovanja od 2 sata, dok su najnižu vrijednost imali netretirani uzorci s vremenom djelovanja od 16 sati. Dodatkom enzima vrijednosti faktora gubitka u tijestu s vremenom djelovanja 2 sata su se smanjile. Vrijednosti faktora gubitka tretiranog tijesta s vremenom djelovanja 16 sati su se povisile u odnosu na kontrolni uzorak.

Značajna statistička razlika za reološka svojstva uzoraka nije utvrđena. Kompleksna viskoznost označava otpor viskoznom ili elastičnom tečenju materijala tijekom oscilacijskog gibanja (Habuš i sur., 2021). Kod tijesta tretiranih enzimom kompleksna viskoznost je porasla. Kod uzoraka s vremenom djelovanja 2 sata porasla je sa vrijednosti od 1048 Pas do 1052 Pas. Za uzorke s vremenom djelovanja 16 sati kompleksna viskoznost porasla je sa 1092 Pas na 1115 Pas. Veća kompleksna viskoznost ukazuje na potencijal tijesta za korištenje u razvoju bezglutenskih 3D tiskanih *snack* proizvoda jer se smatra da je visoka kompleksna viskoznost ključna za uspješan 3D ispis (Habuš i sur., 2021).

4.2.2. Kvaliteta tiska

Prvi korak kod određivanja utjecaja vremena djelovanja enzima lakaze, bio je ispitivanje utjecaja vremena od 2, 4 i 16 sati na kontrolnim uzorcima odnosno tijestu koje nije tretirano enzimom. Zatim je utjecaj vremena djelovanja optimalne koncentracije lakaze ispitan u minimalnom i maksimalnom vremenu, 2 i 16 sati.

Tablica 5. Utjecaj vremena djelovanja bez i sa lakazom na preciznost tiska, stabilnost visine, odstupanje širine i deformaciju oblika

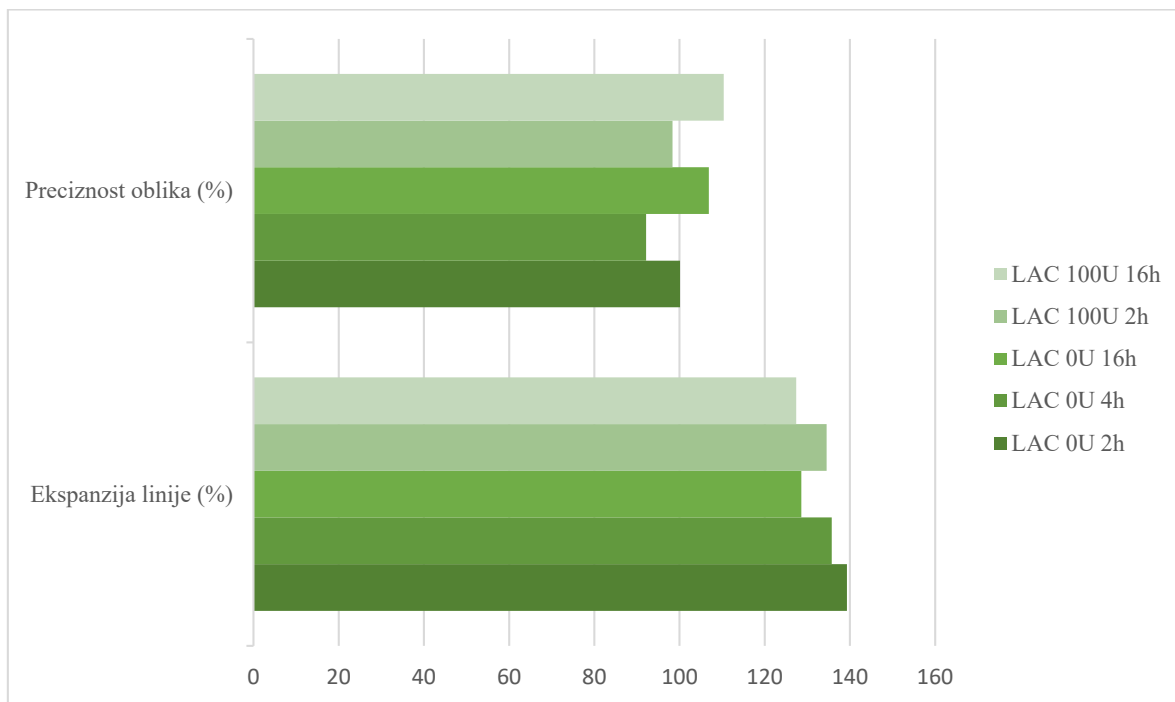
	Kontrolni uzorak 2h	Kontrolni uzorak 4h	Kontrolni uzorak 16h	LAC 100U 2h	LAC 100U 16h
Točnost tiska linije (%)	103± 0 (a)	108 ± 0 (a)	114 ± 0 (a)	101,4± 0,95 (a)	107 ± 0 (a)
Stabilnost visine (%)	96,97 ± 4,57 (a)	95,66 ± 3,06 (ab)	86,92 ± 4,25 (b)	97,81 ± 2,95 (a)	87,31 ± 5,1 (b)
Odstupanje širine (%)	103,12 ± 0,89 (a)	109,28 ± 1,75 (a)	114,70 ± 3,77 (a)	102,66 ± 2,55 (a)	114,49 ± 2,58 (a)
Deformacija oblika (%)	32,02 ± 13,25 (a)	35,41 ± 10,81 (a)	15,73 ± 10,34 (a)	36,01 ± 16,52 (a)	18,51 ± 13,48 (a)

LAC 100U – optimalna koncentracija lakaze

Iz rezultata u tablici 5 možemo primjetiti da nema značajne statističke razlike među uzorcima, ali postoji razlika među uzorcima. Točnost tiska linije se produljenjem enzimskog tretmana povećavala odnosno bila je lošija. Dodatkom optimalne koncentracije lakaze od 100 jedinica točnost tiska linije se poboljšala. Najbolju vrijednost točnosti tiska linije imali su uzorci tretirani enzimom u trajanju od 2 sata, te je iznosila oko 101 %. Netretirano tijesto koje je stajalo 2 sata imalo veću vrijednost točnosti tiska, dakle dodatkom enzima točnost se poboljšala.

Stabilnost visine također je bila niža kod dužih vremena aktivnosti enzima ili stajanja tijesta. Dodatkom enzima stabilnost visine se poboljšala. Ovdje je primijećena jedina statistički značajna razlika među uzorcima. Uzorci koji su odmarali 4 sata imaju sličnosti i sa uzorcima koji su odmarali 2 sata i koji su odmarali 16 sati, dok se uzorci koji su odmarali 2 sata značajno razlikuju od onih koji su odmarali 16 sati. U netretiranom tijestu koje je odmaralo 2 sata stabilnost visine iznosila je 97 %, a dodatkom enzima poboljšala se za malo manje od 1 %. U netretiranom tijestu koje je odležalo 16 sati stabilnost visine se dodatkom enzima također povisila.

Vrijednosti odstupanja od zadane širine također su se povećavala produljenjem stajanja tijesta te produljenjem enzimskog predtretmana. Dodatkom enzima vrijednosti su se smanjile. Najbolje rezultate dalo je tijesto čiji je enzimski pretretman trajao 2 sata, oko 103 %.



Slika 15. Grafički prikaz utjecaja vremena djelovanja lakaze (LAC) na preciznost oblika i ekspanziju linije

Iz slike 15 je vidljivo da se ekspanzija linije, za razliku od drugih parametara, jedina poboljšala produljenjem trajanja tretmana. Dodatkom enzima vrijednosti su se poboljšale, no i dalje su bolje rezultate dala tijesta s duljim enzimskim predtretmanom. Najbolju vrijednost imalo je tijesto s enzimskim predtretmanom od 16 sati, oko $127 \pm 1,42$ %.

Preciznost oblika se djelovanjem enzima 2 sata u uzorcima smanjila sa $100,12 \pm 10$ % na $98,35 \pm 24,05$ %, dok se u uzorcima gdje je enzim djelovao 16 sati porastao sa $106,88 \pm 21,31$ % na $110,37 \pm 16,58$ %. Možemo primjetiti da dodatkom enzima odstupamo od vjernosti oblika te se ta odstupanja povećavaju dužim djelovanjem enzima. S druge strane, Habuš i sur. (2022) nisu primjetili da duljina enzimskog predtretmana utječe na kvalitetu tiska.

Deformacija oblika povećala se dodatkom enzima. Statističkom analizom nisu utvrđene značajne statističke razlike među uzorcima (Tablica 5). U uzorcima kod kojih je vrijeme djelovanja bilo 2 sata deformacija oblika porasla je sa 32 % na 36 % dodatkom enzima, dok je u uzorcima gdje je vrijeme djelovanja bilo 16 sati porasla sa oko 16 %, na 18,5 %.

Ispitivana vremena predtretmana (2, 4 i 16 h) odabrana su jer bi se proizvodnja *snack* proizvoda sa tom duljinom trajanja predtretmana najbolje mogla uklopiti u osmosatnu smjenu nekog pogona. Vrijeme predtretmana od 2 i 4 sata omogućilo bi provođenje samog predtretmana

i tiska više puta u jednoj smjeni, dok bi vrijeme predtretmana od 16 sati odgovaralo ukoliko pogon radi samo u jednoj smjeni na čijem kraju je potrebno pripremiti tijesto za sljedeći radni dan.

Budući da se kontrolni uzorci nisu značajno razlikovali, ispitivanje vremena djelovanja optimalne koncentracije lakaze provedeno je pri minimalnom i maksimalnom vremenu, 2 i 16 sati. Iz dobivenih rezultata kao najbolje vrijeme djelovanja pokazalo se vrijeme od 2 sata jer su ti uzorci imali najbolju stabilnost visine i preciznost oblika. To vrijeme je idealno za uvjete proizvodnje jer se više puta u jednoj smjeni može pripremiti i tiskati tijesto.

4.3. ODREĐIVANJE UTJECAJA pH NA REOLOŠKA SVOJSTVA I KVALITETU TISKA

4.3.1. Lakaza

Optimalni pH enzima lakaze značajno ovisi o supstratu, pa je tako npr. kada su supstrat fenoli optimalni pH lakaze u rasponu od 3 do 7 za gljivične lakaze (Madhavi i Lele, 2009). Vrijednosti pH 5, 6 i 7 su ispitivane zbog gela psilijuma čija su svojstva najbolja pri pH vrijednosti od 4 do 7 (Farahnaky i sur., 2010).

4.3.1.1. Reološka svojstva tijesta

Iz tablice 6 vidljivo je da je pri svim vrijednostima pH G' bio veći od G'' . Uzorci s pH vrijednosti tijesta 7 pokazali su se najsličniji kontrolnom uzorku te se s porastom frekvencije povećavao i G' u ovim uzorcima. Pri pH vrijednosti tijesta 5 i 6 G' je niži u odnosu na kontrolni uzorak. Vrijednosti G'' su se u uzorcima mijenjale kao i vrijednosti G' .

Tablica 6. Reološka svojstva tijesta sa 100U lakaze pri različitim vrijednostima pH

	LAC 100U pH 5	LAC 100U pH 6	LAC 100U pH 7
Kompleksna viskoznost (Pas)	4882,50 ± 17,50 (a)	3320,00 ± 25,00 (b)	4797,50 ± 57,50 (a)
Faktor gubitka	0,27 ± 0,00 (a)	0,27 ± 0,00 (a)	0,24 ± 0,03 (a)
Modul pohrane G' (Pa)	24734,50 ± 1532,50 (a)	19536,50 ± 184,50 (ac)	30206,50 ± 902,50 (ab)
Modul gubitka G'' (Pa)	6775,60 ± 517,40 (a)	5234,20 ± 65,00 (a)	7250,50 ± 994,90 (a)

Vrijednosti faktora gubitka niže su od 1 što nam ukazuje na dominantno elastično ponašanje tijesta. Dobivene vrijednosti kreću se od 0,1 do 0,35 što se slaže sa rezultatima dobivenim u prijašnjim istraživanjima (Ronda i sur., 2013, 2014, 2015), te se tijesto ponaša kao slabi gel.

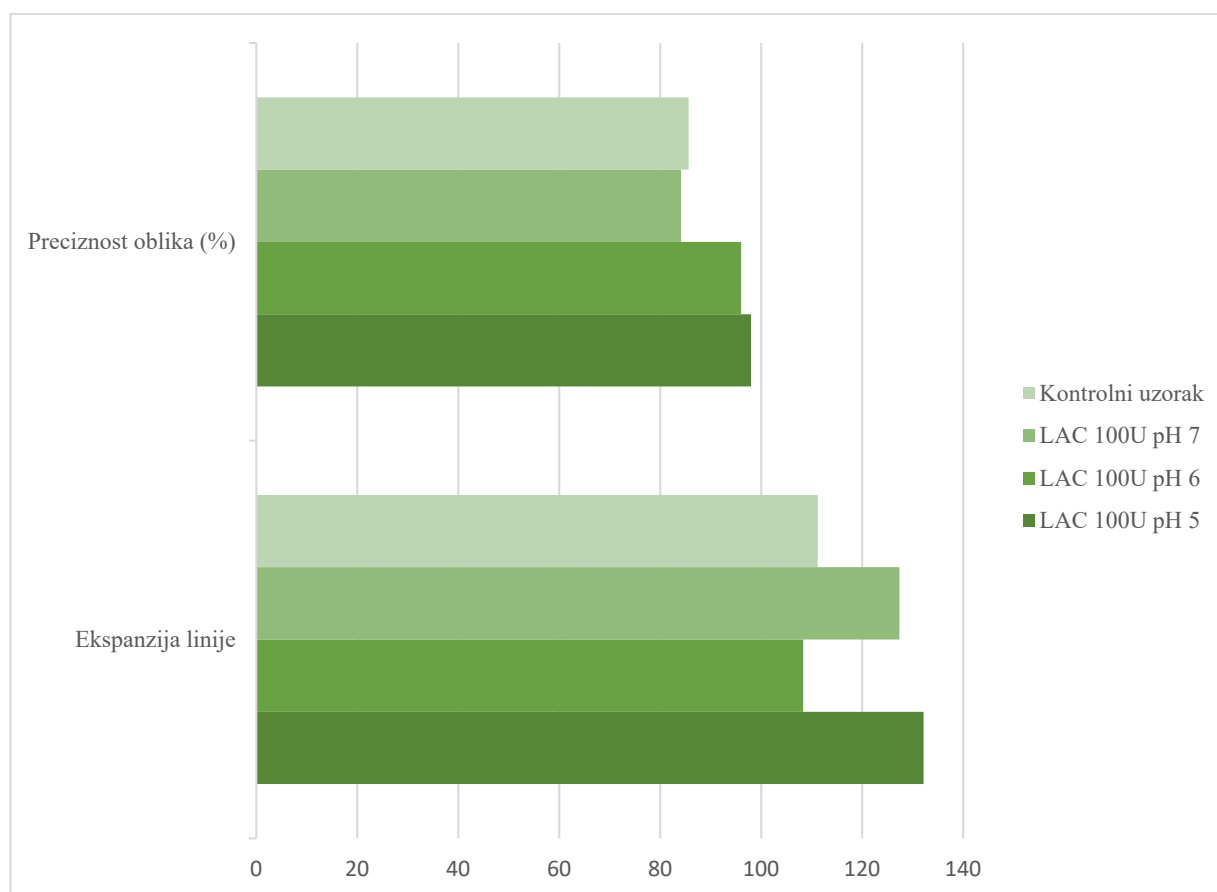
Značajna statistička razlika utvrđena je za kompleksnu viskoznost uzoraka. Pri pH vrijednosti 6, bila je znatno niža od vrijednosti kompleksne viskoznosti uzoraka pri pH vrijednosti 5 i 7. Faktor i modul gubitka ne razlikuju se značajno među uzorcima. Vrijednosti G' uzoraka pri pH vrijednosti tijesta 6 i 7 značajno se ne razlikuju od uzoraka s pH vrijednosti tijesta 5, ali se međusobno razlikuju.

4.3.1.2. *Kvaliteta tiska*

Iz dobivenih rezultata prikazanih u tablici 7 možemo primijetiti da među uzorcima postoji značajna statistička razlika. Po vrijednostima točnosti tiska linije statistički se nisu razlikovali kontrolni uzorak i uzorci pri pH vrijednosti 6, dok se uzorci pri pH vrijednosti 5 i 7 razlikuju od kontrolnog te međusobno. Kao kontrolni uzorak koristilo se tijesto koje je odmaralo 2 sata pri pH vrijednosti 5 bez dodatka enzima. Značajnu statističku razliku u točnosti tiska linije primjetili su i Habuš i sur. (2021). Ispitali su utjecaj različitih vrijednosti pH (5,4; 6,2 i 7) tijesta od ječmenog i zobenog brašna, te su utvrdili da se povišenjem vrijednosti pH povećala točnost tiska. U ovom radu nije primijećen porast točnosti tiska s povišenjem pH vrijednosti. Najbolju preciznost tiska imali su uzorci bez dodatka regulatora kiselosti, odnosno uzorci pri pH vrijednosti 6. Vrijednost točnosti tiska za te uzorke iznosila je 91 %. Stabilnost visine nije se značajno promijenila promjenom pH. Najbolju stabilnost visine imali su uzorci pri pH vrijednosti tijesta 5. Stabilnost visine u tim uzorcima iznosila je gotovo 99 %. Odstupanje širine značajno se povisilo u odnosu na kontrolni uzorak te možemo zaključiti da je za to zaslužan dodatak enzima. Također, iz rezultata u tablici 7 možemo vidjeti da se odstupanje širine povećavalo odnosno sve više odstupalo od zadane širine povišenjem pH vrijednosti. Najmanje odstupanje širine, nakon kontrolnog uzorka, imali su uzorci pri pH vrijednosti 5 i iznosila je oko 114 %.

Tablica 7. Utjecaj pH tijesta na preciznost tiska, stabilnost visine, odstupanje širine i deformacija oblika

	Kontrolni uzorak	LAC 100U pH 5	LAC 100U pH 6	LAC 100U pH 7
Točnost tiska linije (%)	93,4 ± 6,05 (a)	111 ± 0 (b)	91 ± 0 (a)	107 ± 0 (c)
Stabilnost visine (%)	100,23 ± 3,21 (a)	98,92 ± 2,32 (a)	102,28 ± 2,02 (a)	98,83 ± 3,13 (a)
Odstupanje širine (%)	104,201 ± 3,95 (a)	113,82 ± 5,36 (b)	114,25 ± 2,55 (b)	118,38 ± 3,9 (b)
Deformacija oblika (%)	23,21 ± 13,86 (a)	5,16 ± 1,86 (b)	23,98 ± 10,88 (a)	11,56 ± 6,69 (a)



Slika 16. Grafički prikaz utjecaja pH tijesta na kvalitetu tiska tijesta s 100U lakaze

Iz rezultata prikazanih na slici 16 možemo primijetiti da se ekspanzija linije u usporedbi sa kontrolnim uzorkom značajno povećala u tijestima s pH vrijednosti 5 i 7. U uzorcima pri pH vrijednosti tijesta 6 ekspanzija linije se smanjila u usporedbi s kontrolnim uzorkom, te su ujedno ti uzorci imali i najmanju ekspanziju linije, $108,33 \pm 0$ %. Preciznost oblika je u usporedbi s kontrolnim uzorkom porasla u svim uzorcima osim u uzorcima pri pH vrijednost tijesta 7 gdje se snizio sa $85,64 \pm 8,8$ % na $84,13 \pm 6,5$ %. Najveću preciznost oblika imali su uzorci pri pH vrijednosti tijesta 5, točno $98 \pm 12,36$ %.

Deformacija oblika nakon sušenja bila je slična u kontrolnim uzorcima te u uzorcima pri pH vrijednosti 6. U uzorcima pri pH vrijednosti 5 i 7 deformacija je bila znatno niža, a najmanju deformaciju oblika imali su uzorci pri pH vrijednosti 5 i iznosila je oko 5 % (Tablica 7).

4.3.2. Ksilanaza

4.3.2.1. Reološka svojstva

Vrijednosti G' su i ovdje bile veće od vrijednosti G'' što znači da tijesto pokazuje elastično ponašanje. U usporedbi s kontrolnim uzorkom vrijednosti G' su se dodatkom enzima smanjile u uzorcima pri pH vrijednosti 5, dok su se u uzorcima s pH vrijednosti 6 povisile.

Tablica 8. Reološka svojstva tijesta s 50 jedinica ksilanaze pri različitim pH vrijednostima

	Kontrolni uzorak	XYL 50U pH 5	XYL 50U pH 6
Kompleksna viskoznost (Pas)	$5915,00 \pm 15,00$ (a)	$4237,50 \pm 12,50$ (b)	$8362,50 \pm 27,50$ (c)
Modul pohrane G' (Pa)	$32825,50 \pm 229,00$ (a)	$28854,5 \pm 683,50$ (ab)	$37269,50 \pm 1460,50$ (ac)
Modul gubitka G'' (Pa)	$8494,25 \pm 55,00$ (a)	$7449,55 \pm 252,95$ (b)	$9809,05 \pm 252,95$ (c)
Faktor gubitka	$0,26 \pm 0,00$ (a)	$0,26 \pm 0,00$ (a)	$0,26 \pm 0,00$ (a)

Iz tablice 8 vidimo da su vrijednosti faktora gubitka niže od 1, dakle tijesto se dominantno plastično ponaša. U ovom slučaju, dobiveni vrijednosti kreću se od 0,20 do 0,32. Ti rezultati slažu se sa prijašnjim istraživanjima (Ronda i sur., 2013; 2014; 2015) i ovo tijesto također ima karakteristike slabog gela. Faktor gubitka bio je jedna u svim uzorcima.

Značajna statistička razlika primijećena je između uzoraka za vrijednosti kompleksne viskoznosti. U kontrolnim uzorcima vrijednost je iznosila 5915 Pas, a u uzorcima pri pH vrijednosti 5 značajno se snizila, na vrijednost od oko 4240 Pas. Povišenjem pH vrijednosti na 6 kompleksna viskoznost se značajno povisila i u usporedbi sa kontrolnim uzorcima i uzorcima pri pH vrijednosti 5.

4.3.2.2. Kvaliteta tiska

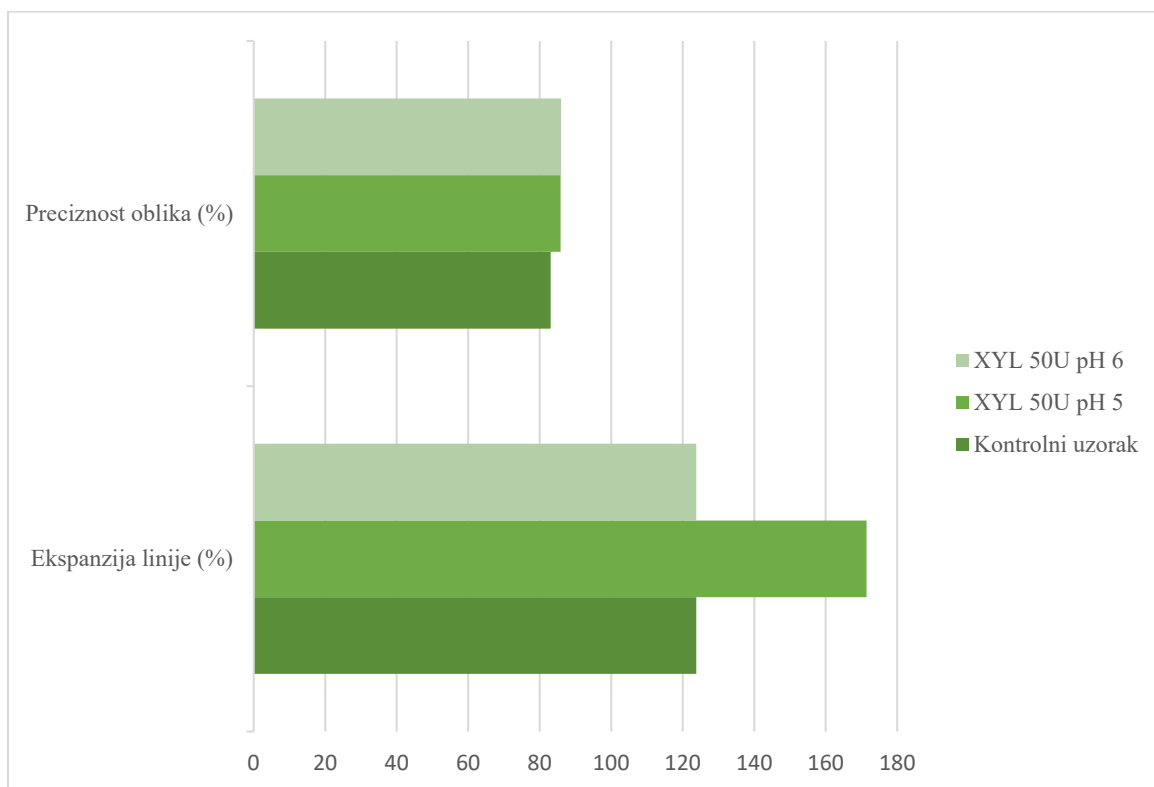
Kao kontrolni uzorak koristilo se tijesto netretirano enzimom pri pH vrijednosti 5.

Tablica 9. Utjecaj pH tijesta s 50U ksilanaze na preciznost tiska, stabilnost visine i odstupanje širine

	Kontrolni uzorak	XYL 50U pH 5	XYL 50U pH 6
Točnost tiska linije (%)	104 ± 0 (a)	144 ± 0 (b)	104 ± 0 (a)
Stabilnost visine (%)	108,44 ± 3,5 (a)	89,56 ± 1,98 (b)	92,85 ± 2,05 (b)
Odstupanje širine (%)	15,1 ± 1,23 (a)	11,29 ± 3,52 (a)	5,93 ± 0,9 (b)
Deformacija oblika (%)	20,49 ± 8,74 (a)	29,25 ± 5,34 (a)	32,8 ± 13,41 (a)

U tablici 9 primijećene su značajne statističke razlike u pojedinim mjerenim parametrima. Točnost tiska linije u kontrolnom uzorku ista je kao u uzorku pri pH vrijednosti 6, 104 %. Točnost tiska uzoraka pri pH vrijednosti 5 značajno se razlikovala i iznosila je 144 %. U slučaju ksilanaza isto nije primijećena povezanost između porasta vrijednosti pH i povećanja točnosti tiska (Habuš i sur., 2021). Stabilnost visine se značajno razlikovala između kontrolnog uzorka i uzoraka pri pH vrijednosti 5 i 6. U kontrolnom uzorku iznosila oko 108 %, dok je u uzorcima pri pH vrijednosti 5 iznosila približno 90 %, a u uzorcima pri pH vrijednosti 6 je iznosila oko 93 %. Dodatkom enzima stabilnost visine je poboljšana.

Dodatkom enzima umanjena su odstupanja od zadane širine, te su najmanju vrijednost odstupanja imali uzorci pri pH tijesta 6, a iznosila je oko 6 %.



Slika 17. Grafički prikaz utjecaja pH tijesta na kvalitetu tiska tijesta s 50U ksilanaze

Ekspanzija linije pri pH vrijednosti 5 značajno odstupa od kontrolnih uzoraka te uzoraka pri pH vrijednosti 6 što se jasno može primijetiti na slici 17. Ekspanzija linije iznosila je jednako za kontrolne uzorke i uzorke pri pH vrijednosti 6, a to je $123,08 \pm 0$ %. Preciznost oblika se dodatkom enzima poboljšala. U kontrolnim uzorcima iznosila je $83,09 \pm 8,63$ %, kod uzoraka pri pH vrijednosti 5 $85,83 \pm 4,87$ %, a kod uzoraka pri pH vrijednosti 6 $85,99 \pm 9,7$ %. Iz dobivenih rezultata vidimo da je pri višoj pH vrijednosti viša i preciznost oblika.

Rezultati za deformaciju oblika prikazani u tablici 9 nisu se značajno statistički razlikovali. Deformacija oblika tijekom sušenja bila je veća ukoliko je bio dodan enzim što se ne slaže s rezultatima dobivenim u Habuš i sur. (2022) gdje je utvrđeno da se dodatkom enzima deformacija smanjuje. U kontrolnim uzorcima iznosila je oko 20 %. U uzorcima pri pH vrijednosti 5 iznosila je oko 30 %, a pri pH 6 33 %. Također, utvrđeno je da se kod viših pH vrijednosti deformacija oblika prilikom sušenja povećavala.

5. ZAKLJUČCI

1. Kao optimalna koncentracija enzima lakaze odabrana je koncentracija od 100 jedinica enzima po gramu psilijuma jer je ta receptura, bez obzira na istu ocjenu sa koncentracijom sa 50 jedinica enzima po gramu psilijuma, rezultirala *snack* proizvodom sa najmanjom deformacijom oblika (16 %), najmanjim odstupanjem od zadane širine (4,56 %) i najboljom preciznosti oblika (58 %).
2. Kao optimalna koncentracija enzima ksilanaza odabrana je koncentracija od 50 jedinica enzima po gramu psilijuma jer je ta receptura rezultirala *snack* proizvodom najbolje preciznosti oblika (65 %) i najmanjom deformacijom oblika (24 %), te je, bez obzira na istu prosječnu ocjenu, vizualno bila bolja od recepture sa 100 jedinica enzima po gramu psilijuma.
3. Kao optimalno vrijeme djelovanja enzima lakaza odabrano je 2 sata jer se u tom periodu razvije tijesto najbolje kvalitete tiska i reoloških svojstava. Duljim predtretmanom dobiva se viskoznije tijesto s većim deformacijama u pečenju.
4. Najbolja reološka svojstva i kvalitetu tiska su uzorci sa 100 jedinica lakaze pokazali pri pH vrijednosti tijesta 5, dok su uzorci sa 50 jedinica ksilanaze bili najbolji pri pH vrijednosti tijesta 6.
5. Usporedbom kvalitete tiska tijesta u kojem se koristila lakaza i tijesta u kojem se koristila ksilanaza bolji rezultati su postizani korištenjem tijesta s lakazom.

6. LITERATURA

Aehle W (2004) *Enzymes in Industry*, 2. izd., Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, str. 101-111.

Anton Paar (2020) Basics of rheology. <https://wiki.anton-paar.com/en/basics-of-rheology/>
Pristupljeno 28. srpnja 2023.

Baiano A (2020) 3D Printed Foods: A Comprehensive Review on Technologies, Nutritional Value, Safety, Consumer Attitude, Regulatory Framework, and Economic and Sustainability Issues. *Food Rev Int* **38**, 1-31. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1762091>

Bajpai P (2009) Xylanases, U: Schaechter M, Lederberg J (ured.), *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press, San Diego, str. 600-612.

Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS (2001) Microbial xylanases and their industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**, 326-338. <https://doi.org/10.1007/s002530100704>

Berman Barry (2012) 3-D printing: The new industrial revolution. *Bus Horizons* **55** (2), 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.bushor.2011.11.003>

Brennan MA, Derbyshire E, Tiwari BK, Brennan CS (2013) Ready-to-eat snack products: the role of extrusion technology in developing consumer acceptable and nutritious snacks. *Int J Food Sci Tech* **48**, 893–902. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12055>

Butt MS, Tahir-Nadeem M, Ahmad Z, Tauseef Sultan M (2008) Xylanases and Their Applications in Baking Industry. *Food Technol Biotechnol* **46** (1), 22–31. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0734-8>

Causer C (2009) They've got a golden ticket. *IEEE Potentials*, **28** (4), 42–44. <https://doi.org/10.1109/MPOT.2009.933608>

Chaudhary N, Kumar V, Sangwan P, Pant NC, Saxena A, Joshi S, Yadav AN (2021) Personalized Nutrition and -Omics. *Comprehensive Foodomics*, str. 495–507.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22880-1>

Cohen DL, Lipton JI, Cutler M, Coulter D, Vesco A, Lipson H (2009) Hydrocolloid printing a novel platform for customized food production. U: 2009 International Solid Freeform Fabrication Symposium.

Costakis WJ, Rueschhoff LM, Diaz-Cano AI, Youngblood JP, Trice RW (2016) Additive manufacturing of boron carbide via continuous filament direct ink writing of aqueous ceramic suspensions. *J Eur Ceram Soc* **36** (14), 3249–3256. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2016.06.002>

Crofton EC, Markey A, Scannel, AGM (2013) Consumers' expectations and needs towards healthy cereal based snacks: An exploratory study among Irish adults. *Brit Food J* **115**, 1130–1148. <https://doi.org/10.1108/BFJ-08-2011-0213>

Culetu A, Duta DE, Papageorgiou M, Varzakas T (2021) The Role of Hydrocolloids in Gluten-Free Bread and Pasta; Rheology, Characteristics, Staling and Glycemic Index. *Foods* **10** (12), 3121. <https://doi.org/10.3390/foods10123121>

Dankar I, Haddarah A, Omar FEL, Sepulcre F, Pujola M (2018) 3D printing technology: The new era for food customization and elaboration. *Trends food sci tech* **75**, 231–242. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.018>

Diaz JMR, Kirjoranta S, Tenitz S, Penttilä PA, Serimaa R, Lampi AM, i sur. (2013) Use of amaranth, quinoa and kañiwa in extruded corn-based snacks. *J Cereal Sci* **58**, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.04.003>

Diaz JV, Van Bommel KJ C, Noort MWJ, Henket J, Briër P (2016). Method for the production of edible objects using sls and food products. Patent 2016O100621A1.

EFSA (2022) Ready-to-eat-food. EFSA – European Food Safety Authority, <https://www.efsa.europa.eu/en/glossary/ready-eat-food>. Pristupljeno 16. rujna 2023.

Farahnaky A, Askari H, Majzoobi M, Mesbahi G (2010) The impact of concentration, temperature and pH on dynamic rheology of psyllium gels. *J Food Eng* **100** (2), 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.04.012>

Fratelli C, Muniz DG, Santos FG, Capriles VD (2018) Modelling the effects of psyllium and water in gluten-free bread: An approach to improve the bread quality and glycemic response. *J Funct Foods* **42**, 339-345. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.01.015>

Gibney M, Walsh M, Goosens J (2016) Personalized nutrition: paving the way to better population health. U: Eggersdorfer M, Kraemer M, Cordaro JB, Fanzo J, Gibney M (ured.) Good nutrition: perspectives for the 21st century. Karger Publishers, Basel, str. 235-48.

Habuš M, Golubić P, Vukušić Pavičić T, i sur. (2021) Influence of Flour Type, Dough Acidity, Printing Temperature and Bran Pre-processing on Browning and 3D Printing Performance of Snacks. *Food Bioprocess Technol* **14**, 2365–2379 <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02732-w>

Habuš M, Benković M, Iveković D, Vukušić Pavičić T, Čukelj Mustač, Voučko B i sur. (2022) Effect of oil content and enzymatic treatment on dough rheology and physical properties of 3D-printed cereal snack. *J Cereal Sci* **108**, 103559. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2022.103559>

Hao L, Mellor S, Seaman O, Henderson J, Sewell N, Sloan M (2010). Material characterisation and process development for chocolate additive layer manufacturing. *Virtual Phys Prototyp*, **5** (2), 57–64. <https://doi.org/10.1080/17452751003753212>

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 Dis*, **40** (1), 99–103. <https://doi.org/10.3109/13668250.2014.994172>

Huang C (2018) Extrusion-based 3D Printing and Characterization of Edible Materials (doktorski rad), University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Kanada.

Jiang H, Zheng L, Zou Y, Han S, Wang S (2019) 3D food printing: main components selection by considering rheological properties. *Crit rev food sci.* **59** (14), 2335-2347. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1514363>

Jie Sun, Weibiao Zhou, Dejian Huang, Jerry Y. H. Fuh, Geok Soon Hong (2015). An Overview of 3D Printing Technologies for Food Fabrication. *Food Bioprocess Tech* **8** (8),

1605–15. <http://doi:10.1007/s11947-015-1528-6>

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. <http://doi:10.1016/j.jfoodeng.2017.10.023>

Kojić J, Belović M, Krulj J, Pezo L, Teslić N, Kojić P i sur (2022) Textural, Color and Sensory Features of Spelt Wholegrain Snack Enriched with Betaine. *Foods* **11**, 475. <https://doi.org/10.3390/foods11030475>

Lipton J, Arnold D, Nigl F, Lopez N, Cohen D, Norén N, Lipson H (2010) Multimaterial food printing with complex internal structure suitable for conventional postprocessing. U: The annual international solid freeform fabrication symposium, Austin, Texas, str. 819-815.

Liu Z, Zhang M, Bhandari B, Wang Y (2017) 3D printing: Printing precision and application in food sector. *Trends food sci tech.* **69**, 83-94. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00520-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00520-4)

Liu Z, Bhandari B, Prakash S, Mantihal S, Zhang M (2018) Linking rheology and printability of a multicomponent gel system of carrageenan-xanthan-starch in extrusion based additive manufacturing. *Food hydrocolloid* **87**, 413-424. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.026>

Luimstra J (2014) The Future: a 3D Printed "Insects" Meal. <http://3dprinting.com/materials/edibles-food/future-3d-printed-insects-meal/>.

Madhavi V, Lele SS (2009) Laccase: properties and applications. *Bioresources* **4** (4), 1694-1717. <https://doi.org/10.15376/biores.4.4.1694-1717>

Mantihal S, Prakash S, Godoi FC, Bhandari B (2017) Optimization of chocolate 3D printing by correlating thermal and flow properties with 3D structure modeling. *Innov Food Sci Emerg* **44**, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.09.012>

Mariotti M, Lucisano M, Pagani M, Perry KW (2009). The role of corn starch, amaranth flour, pea isolate, and Psyllium flour on the rheological properties and the ultrastructure of gluten-free doughs. *Food Research International* **42**, 963–975. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.04.017>

Matas A, Igual M, Garcia-Segovia P, Martinez-Monzo J (2022) Application of 3D Printing in the Design of Functional Gluten-Free Dough. *Foods* **11** (11), 1555. <https://doi.org/10.3390/foods11111555>

Mayer AM, Staples RC (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* **60**, 551–565. [http://doi:10.1016/s0031-9422\(02\)00171-1](http://doi:10.1016/s0031-9422(02)00171-1)

Michler Inga (2014) 3-D-Druck leitet dritte industrielle Revolution ein. *Welt* <https://www.welt.de/wirtschaft/article128614810/3-D-Druck-leitet-dritte-industrielle-Revolution-ein.html>. Pristupljeno 12. srpnja 2023.

Miguel ASM, Martins-Meyer T, Veríssimo da Costa Figueiredo E, Waruar Paulo Lobo B, Dellamora-Ortiz GM (2013) Enzymes in Bakery: Current and Future Trends. U: Muzzalupo I (ured.) *Food Industry, InTech, Rijeka*, str. 287-323.

Ordovas JM, Ferguson LR, Tai ES, Mathers JC (2018) Personalised nutrition and health. *BMJ* **361**, 1-7. <http://doi:10.1136/bmj.k2173>

Osma JF, Toca-Herrera JL, Rodriguez-Couto S (2010) Uses of Laccases in the Food Industry. *Enzyme Res.* **2010**, 1-8. <http://doi:10.4061/2010/918761>

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 Hydrocolloids* **114**, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106546>

Palabiyik I, Yildiz O, Toker OS, Cavus M, Ceylan MM, Yurt B (2016) Investigating the addition of enzymes in gluten-free flours – the effect on pasting and textural properties. *Food Sci Technol Int* **69**, 633-641. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.019>

Poutanen K (1997) Enzymes: an important tool in the improvement of the quality of cereal foods. *Trends Food Technol* **8**, 300-306. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01063-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01063-7)

Radoš K, Benković M, Čukelj Mustač N, Habuš M, Voučko B, Vukušić Pavičić T i sur. (2022) Powder properties, rheology and 3D printing quality of gluten-free blends. *J Food Eng* **338**, 111251. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2022.111251>

Reinhammar B (2018) Laccase. U: Lontie R (ured.) Copper proteins and copper, 3. izd., enzymes, Taylor & Francis, Boca Raton, str. 1-37.

Riaz MN (2016) Snack Foods: Processing. U: Wrigley C, Corke H, Seetharaman K, Faubion J (ured.) Encyclopedia of Food Grains, 2. izd., Academic Press, Oxford, str. 414-422. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00160-8>

Ronda F, Perez-Quirce S, Angioloni A, Collar C (2013) Impact of viscous dietary fibres on the viscoelastic behaviour of gluten-free formulated rice doughs: A fundamental and empirical rheological approach. *Food Hydrocolloids* **32**, 252-262. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.01.014>

Ronda F, Villanueva M, Collar C (2014) Influence of acidification on dough viscoelasticity of gluten-free rice starch-based dough matrices enriched with exogenous protein. *Food sci technol int* **59**, 12-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.052>

Ronda F, Perez-Quirce, Lazaridou A, Biliaderis CG (2015) Effect of barley and oat β -glucan concentrates on gluten-free rice-based doughs and bread characteristics. *Food Hydrocolloids* **48**, 197-207. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.031>

Rouau X (1993) Investigations into the effects of an enzyme preparation for baking on wheat flour dough pentosans. *J Cereal Sci* **18**, 145–157. <https://doi.org/10.1006/jcrs.1993.1042>

Sachs E, Cima M, Williams P, Brancazio D, Cornie J (1992) Three dimensional printing: rapid tooling and prototypes directly from a CAD model. *Cirp Ann-Manuf Techn*, **114** (4), 481–488. [https://doi.org/10.1016/S0007-8506\(07\)61035-X](https://doi.org/10.1016/S0007-8506(07)61035-X)

Sato ACK, Perrechil FA, Costa AAS, Santana RC, Cunha RL (2015) Cross-linking proteins by laccase: Effects on the droplet size and rheology of emulsions stabilized by sodium caseinate. *Food Res Int* **75**, 244-251. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.010>

Severini C, Derossi A, Azzollini D (2016) Variables affecting the printability of foods: Preliminary tests on cereal-based products. *Innov Food Sci Emerg* **38**, 281–291. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.10.001>

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>

Sharma PK (2017) Xylanases current and future perspectives: a review. *J new biol reports* **6**, 12-22.

Si JQ (1994) Use of laccase in baking industry. Patent PCT/DK94/00232.

Toker OS, Karasu S, Yilmaz MT, Karaman S (2015) Three interval thixotropy test (3ITT) in food applications: A novel technique to determine structural regeneration of mayonnaise under different shear conditions. *Food Res Int* **70**, 125-133. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.02.002>

Uredba (EZ) br. 1332/2008 Europskog parlamenta i vijeća od 16. prosinca 2008. o prehrambenim enzimima i o izmjeni Direktive Vijeća 83/417/EEZ, Uredbe Vijeća (EZ) 1493/1999, Direktive 2000/13/EZ, Direktive Vijeća 2001/112/EZ i Uredbe (EZ) br. 258/97. <https://www.iusinfo.hr/EU-zakonodavstvo/EU721S3C32008R1332> Pristupljeno 27. srpnja 2023.

Uribe-Wandurraga ZN, Zhang L, Noort MWJ, Schutyser MAI, García-Segovia P, MartínezMonzó J (2020) Printability and Physicochemical Properties of Microalgae-Enriched 3DPrinted Snacks. *Food Bioprocess Technol* **13**, 2029–2042. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02544-4>

Vaclavik VA, Christian EW (2014) *Essentials of Food Science*, 4. izd., Springer, New York, str. 524.

Verma M, Hontecillas R, Tubau-Juni N, Abedi V, Bassaganya-Riera J (2018) Challenges in Personalized Nutrition and Health. *Front Nutr.* **5**, 117. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00117>

Villanueva M, Perez-Quirce S, Collar C, Ronda F (2018) Impact of acidification and protein fortification on rheological and thermal properties of wheat, corn, potato and tapioca starch-based gluten-free bread doughs. *Food sci technol int* **96**, 446-454. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.069>

Vukušić Pavičić T, Grgić T, Ivanov M, Novotni D, Herceg Z (2021) Influence of Flour and Fat Type on Dough Rheology and Technological Characteristics of 3D-Printed Cookies. *Foods* **10**, 193. <https://doi.org/10.3390/foods10010193>

Whitehurst RJ, van Oort M (2010) *Enzymes in Food Technology*, 2. izd., Wiley-Blackwell, Chichester, str. 103-143.

Xu J, Zhang W, Li Y (2020) Advanced properties of gluten-free cookies, cakes, and crackers: A review. *Trends Food Sci Tech* **103**, 200–213. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.017>

Yang F, Zhang M, Bhandari B, Liu Y (2018) Investigation on lemon juice gel as food material for 3D printing and optimization of printing parameters. *Food Sci Technol Int*, **87**, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.054>

Yoshida H (1883) Chemistry of lacquer (Urishi) part 1. *J Chem Soc* **43**, 472–486. <http://dx.doi.org/10.1039/ct8834300472>

Yu L, DeVay GE, Lai GH, Simmons CT, Neilsen SR (2001) Enzymatic Modification of Psyllium. US Patent 6248373.


Yu L, Perret J, Parker T, Allen KGD (2003) Enzymatic modification to improve the water-absorbing and gelling properties of psyllium. *Food Chem* **82**, 243-248. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00520-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00520-4)

Zhang JY, Pandya JK, McClements DJ, Lu J, Kinchla AJ (2021) Advancements in 3D food printing: a comprehensive overview of properties and opportunities. *Crit rev food sci.* **62** (17), 4752-4768. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1878103>

Zhang W, Wang W, Wang J, Shen G, Yuan Y, Yan L i sur. (2021) Isolation and Characterization of a Novel Laccase for Lignin Degradation, LacZ1. *Appl Environ Microbiol.* **87** (23). <https://doi.org/10.1128/AEM.01355-21>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Tea Žeravica izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Handwritten signature of Tea Žeravica in black ink.

Vlastoručni potpis