

Fizikalna svojstva trodimenzijski tiskanog snack proizvoda obogaćenog obrađenim pšeničnim posijama

Golubić, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:093117>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-24**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO–BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, travanj 2021.

Petra Golubić

1239/PI

**FIZIKALNA SVOJSTVA
TRODIMENZIJSKI TISKANOG
SNACK PROIZVODA
OBOGAĆENOG OBRAĐENIM
PŠENIČNIM POSIJAMA**

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. Dubravke Novotni te uz pomoć mag. ing. Matee Habuš, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Diplomski rad je izrađen u sklopu istraživačkog projekta '*Razvoj nove generacije snack proizvoda namijenjenih potrošačima s posebnim prehrambenim potrebama primjenom tehnologija 3D tiskanja*' financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost (IP-2020-02-3829).

ZAHVALA

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Dubravki Novotni na pruženoj prilici izrade diplomskog rada, vođenju, strpljenju i svim savjetima koji su mi uvelike olakšali pisanje ovog rada. Također se zahvaljujem mag. ing. Matei Habuš na pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada, na izdvojenom vremenu za moje brojne upite i velikoj podršci.

Zahvaljujem se svojoj obitelji koja je uvijek bila i ostala moja sigurna luka i izvor neizmjerne ljubavi i podrške.

Također velika hvala mojim dragim prijateljima, Marku, cimericama i svim kolegama koji su studentske dane učinili nezaboravnima i ispunjenima veseljem.

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

FIZIKALNA SVOJSTVA TRODIMENZIJSKI TISKANOG SNACK PROIZVODA OBOGAĆENOG OBRADENIM PŠENIČNIM POSIJAMA

Petra Golubić, 1239/PI

Sažetak: *Trodimenzijsko (3D) tiskanje omogućuje proizvodnju hrane personaliziranog oblika i sastava. Svrha ovog rada je bila razviti 3D snack proizvod obogaćen obrađenim pšeničnim posijama te odrediti fizikalna svojstva tog proizvoda. Istražen je utjecaj procesa obrade posija ultrazvukom visokog intenziteta (UZV), mikrovalnim vakuumskim zagrijavanjem i pulsirajućim svjetlom (PS) na aktivnost polifenol oksidaze (PPO) i bioaktivni profil pšeničnih posija. Određena su svojstva boje tiskanih i pečenih oblika, dimenzije pečenih oblika, iskorištenje smjese, preciznost tiska, točnost i ponovljivost oblika u odnosu na različita punjenja iste smjese i u odnosu na različite tretmane posija dodanih u smjesu za tisak. Najveća deaktivacija PPO (75,31 %) i preciznosti tiska dobivena je nakon UZV tretmana posija ($97,17 \pm 2,29$ %), dok je najveća točnost oblika postignuta PS tretmanom posija ($96,93 \pm 3,13$ %). Uočena je vidljiva promjena boje između trenutka tiskanja i 60 minuta nakon tiskanja na tijestu. Tijekom termičke obrade pečenjem dolazi do deformacije svih 3D oblika, promjene boje i gubitka mase.*

Ključne riječi: *pšenične posije, polifenol oksidaza, 3D tisak, ultrazvuk visokog intenziteta, mikrovalno vakuumsko zagrijavanje, pulsirajuće svjetlo*

Rad sadrži: 68 stranica, 23 slike, 8 tablica, 111 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. Dubravka Novotni*

Pomoć pri izradi: *Matea Habuš, mag. ing.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Zoran Herceg
2. Izv. prof. dr. sc. Dubravka Novotni
3. Doc. dr. sc. Filip Dujmić
4. Doc. dr. sc. Sven Karlović (zamjena)

Datum obrane : 30. travnja 2021.

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

PHYSICAL PROPERTIES OF THREE-DIMENSIONAL PRINTED SNACK PRODUCT ENRICHED WITH PRE-PROCESSED WHEAT BRAN

Petra Golubić, 1239/PI

Abstract: *Three-dimensional (3D) printing enables the production of food with a personalized shape and composition. The aim of this work is to develop a 3D snack product enriched with pre-processed wheat bran and to determine the physical properties of this product. The influence of bran processing with high-intensity ultrasound (UZV), microwave vacuum cooking and pulsed light (PS) on the activity of polyphenol oxidase (PPO) and the bioactive profile of wheat bran was investigated. The color properties of the printed and baked forms, the dimensions of the baked forms, the yield of the mixtures, the printing precision and the shape accuracy of the forms in relation to different fillings of the same mixture and in relation to different bran processing were determined. Samples of the used mixtures showed a visible color change between the time of printing and 60 minutes after printing. The biggest inactivation of PPO (75.31%) and highest printing precision (97.17 ± 2.29 %) was obtained after UZV treatment of wheat bran, while the mixture with bran treated with PS resulted in the highest shape accuracy (96.93 ± 3.13 %). A visible change of color was observed between the time of printing and 60 minutes after printing on the dough. During heat treatment by baking, all 3D shapes got deformed, changed color and lost weight.*

Keywords: wheat bran, polyphenol oxidase, 3D printing, high intensity ultrasound, microwave vacuum heating, pulsed light

Thesis contains: 68 pages, 23 figures, 8 tables, 111 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *Dubravka Novotni, PhD. Associate professor*

Technical support and assistance: *Matea Habuš, MSc*

Reviewers:

1. PhD. Zoran Herceg, Full professor
2. PhD. Dubravka Novotni, Associate professor
3. PhD. Filip Dujmić, Assistant professor
4. PhD. Sven Karlović, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: *30th April 2021*

Sadržaj	stranica
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. SNACK PROIZVOD	3
2.1.1. Nutritivno obogaćeni snack proizvodi.....	3
2.1.2. Zobeno brašno	4
2.2. PŠENIČNE POSIJE	5
2.2.1. Nutritivna vrijednost i sastav pšeničnih posija	6
2.3. ENZIMI PŠENIČNIH POSIJA	7
2.3.1. Polifenol oksidaza	7
2.4. ULTRAZVUK.....	8
2.4.1. Mehanizam djelovanja ultrazvuka visokog intenziteta.....	8
2.4.2. Primjena ultrazvuka visokog intenziteta u prehrambenoj industriji	9
2.5. MIKROVALNO ZAGRIJAVANJE	10
2.5.1 Mehanizam djelovanja mikrovalnog zagrijavanja.....	10
2.5.2. Mikrovalno vakuumsko zagrijavanje	11
2.5.3. Primjena mikrovalnog zagrijavanja pri atmosferskom i sniženom tlaku u prehrambenoj industriji.....	11
2.6. PULSIRAJUĆE SVJETLO	12
2.6.1. Mehanizam djelovanja pulsirajućeg svjetla.....	13
2.6.2. Primjena pulsirajućeg svjetla u prehrambenoj industriji	14
2.7. TRODIMENZIJSKI TISAK	15
2.7.1. Način rada 3D pisaa.....	16
2.7.2. Tisak na principu ekstruzije.....	17
2.7.3. Primjena tehnologije 3D tiskanja hrane.....	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. MATERIJAL.....	19
3.2. METODE RADA I UZORCI.....	20
3.2.1. Tretman ultrazvukom visokog intenziteta	21
3.2.2. Tretman mikrovalnim vakuumskim zagrijavanjem.....	22
3.2.3. Tretman pulsirajućim svjetlom.....	23
3.2.4. Liofilizacija	24
3.2.5. Određivanje udjela vode.....	24
3.2.6. Određivanje aktivnosti polifenol oksidaze	25
3.2.7. Ekstrakcija slobodnih spojeva	26
3.2.8. Određivanje sadržaja ukupnih polifenolnih spojeva	27

3.2.9. Određivanje antioksidacijske aktivnosti	29
3.2.9.1. FRAP metoda	29
3.2.9.2. DPPH metoda	31
3.2.10. Postupak pripreme smjese za 3D tisak	33
3.2.11. 3D tiskanje snack proizvoda.....	34
3.2.12. Pečenje 3D tiskanih oblika	35
3.2.13. Određivanje parametara boje snack proizvoda nakon 3D tiskanja i nakon pečenja.....	36
3.2.14. Određivanje preciznosti 3D tiskanja i ponovljivosti oblika	37
3.2.15. Statistička obrada podataka	39
4. REZULTATI I RASPRAVA	40
4.1. Promjena temperature tijekom različitih načina obrade uzoraka	40
4.2. Aktivnost polifenol oksidaze.....	41
4.3. Udio ukupnih polifenolnih spojeva i antioksidacijska aktivnost u uzorcima pšeničnih posija nakon različitih tretmana	43
4.4. Promjena boje snack proizvoda.....	48
4.5. Preciznost tiska i ponovljivost oblika 3D tiskanog snack proizvoda	52
4.6. Iskorištenje smjese i gubitak mase pečenjem.....	56
5. ZAKLJUČCI	58
6. LITERATURA	60

1. UVOD

Potrošači su sve svjesniji važnosti nutritivno vrijednih obroka te općenito pozitivnog utjecaja pravilne prehrane na zdravlje, ali često se događa da zbog ubrzanog načina života ne konzumiraju tri glavna i uravnotežena obroka svakodnevno. Snack proizvod, koji je prvenstveno namijenjen konzumaciji između glavnih obroka, sve češće postaje zamjena za obrok. Upravo zbog toga sve je veći interes potrošača za snack proizvodima koji su obogaćeni raznim nutrijentima važnima za održavanje ljudskog zdravlja. U proizvodnji nutritivno obogaćenih prehrambenih proizvoda sve je popularnije iskorištavanje nusproizvoda u proizvodnji hrane. Nusproizvod određenog procesa proizvodnje u prehrambenoj industriji ponovno se iskorištava jer predstavlja važan izvor mikro- i makronutrijenata i bioaktivnih tvari te zbog globalnog nastojanja da se otpad od hrane svede na minimum. Prilikom konvencionalnih postupaka prerade žitarica nastaje značajna količina nusproizvoda, a jedan od najvažnijih nusproizvoda u procesu mljevenja pšenice u rafinirano pšenično brašno su pšenične posije.

Pšenične posije čine oko 25 % mase samljevane pšenice i obuhvaćaju vanjski dio zrna pšenice koji se sastoji od vanjskog i unutarnjeg perikarpa, sjemene ovojnice, hijalinskog i aleuronskog sloja (Javed i sur., 2012; Prückler i sur., 2014). Pšenične posije sadrže značajnu količinu prehrambenih vlakana, mineralnih tvari, vitamina, polifenola i drugih bioaktivnih spojeva (Prückler i sur., 2014; Hemdane i sur., 2016). Posije su dosad korištene uglavnom za prehranu stoke, ali zahvaljujući spoznajama o visokovrijednom nutritivnom sastavu i pozitivnom učinku konzumacije pšeničnih posija na ljudsko zdravlje, na tržištu raste broj proizvoda u koji su dodane pšenične posije s ciljem nutritivnog obogaćivanja prehrambenog proizvoda. Upotreba pšeničnih posija u prehrambenoj industriji predstavlja izazov zbog značajne aktivnosti enzima polifenol oksidaze koji izaziva nepoželjno posmeđivanje proizvoda. Učinak enzima polifenol oksidaze nastoji se smanjiti raznim tretmanima uz što manji negativni učinak na bioaktivne spojeve posija.

U prehrambenoj industriji sve više se razvija tehnologija trodimenzijskog (3D) tiska koja je također poznata kao aditivna tehnologija. 3D tisak u prehrambenoj industriji potencijalno pruža brojne prednosti kao što su mogućnost personalizirane hrane, širenje izvora prehrambenih sirovina, stvaranje novih tekstura i proizvodnje malih serija te proizvodnja složenih oblika koji se ne mogu proizvesti ručno ili upotrebom kalupa (Sun i sur., 2015b; Liu i sur., 2017; Severini i sur., 2018). U 3D tiskanju hrane trenutno se koriste četiri tehnike tiskanja: tisak na principu

ekstruzije, tisak sa selektivnim sinteriranjem, tiskanje primjenom vezivnog sredstva i tintni tisak (Pérez i sur., 2019). Glavni izazovi 3D tiskanja hrane su: 1) preciznost tiska i ponovljivost oblika 2) produktivnost procesa tiskanja 3) istovremeno tiskanje proizvoda u više različitih boja, okusa i tekstura.

U ovom radu cilj je istražiti različite inovativne tehnologije obrade pšeničnih posija i mogućnost primjene obrađenih posija u smjesi za izradu 3D tiskanog snack proizvoda na principu ekstruzije. Istražit će se utjecaj tretmana ultrazvukom visokog intenziteta, mikrovalnim vakuumskim kuhanjem i pulsirajućim svjetlom na pšenične posije s naglaskom na smanjenje aktivnosti polifenol oksidaze uz očuvanje ukupnih polifenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti posija. Također, ispitat će se promjena svojstava boje 3D tiskanih oblika nakon tiskanja i nakon pečenja, dimenzije nakon pečenja te preciznost tiska i ponovljivost oblika u ovisnosti o broju punjenja iste smjese i u ovisnosti o procesu obrade posija.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. SNACK PROIZVOD

Snack proizvod se definira kao hrana koja se konzumira između glavnih obroka – doručka, ručka i večere (McCarthy, 2001). Zbog ubrzanog načina života, sve manje ljudi jede tri glavna obroka dnevno te ih često zamjenjuju s različitim snack proizvodima tijekom dana. Snack proizvodi se mogu podijeliti u nekoliko skupina : 1) snack proizvodi prve generacije u koje se ubrajaju prirodni proizvodi kao što su orašasti plodovi, krumpirov čips i ispucane kokice, 2) snack proizvodi druge generacije u koje je uključena većina snack proizvoda poput snack proizvoda od jednog sastojka, proizvoda jednostavnog oblika poput čipsa od kukuruza/tortilja čipsa, flips proizvoda i svih direktno ekspanziranih snack proizvoda, 3) treća generacija snack proizvoda koji se još nazivaju poluproizvodi ili peleti, a u njih se ubrajaju snack proizvodi od više sastojaka koji se kuhaju ekstruzijom (Riaz, 2016).

Izbor snack proizvoda na globalnom tržištu danas je složeniji i različitiji nego ikad prije. Diljem svijeta raste potražnja potrošača za specifičnim karakteristikama snack proizvoda kao što su smanjen udio masti, soli i šećera, te veći udio prehrambenih vlakana i bioaktivnih tvari (Crofton i Scannell, 2020).

Većina snack proizvoda može se ubrojiti u skupinu gotove hrane (engl. „ready-to-eat-foods“) koja je sve popularnija među potrošačima zahvaljujući prikladnosti za konzumaciju i pojednostavljenoj pripremi (Brennan i sur., 2013). Uredbom (EZ) br. 2073/2005 gotova hrana definirana je kao hrana koju je proizvođač namijenio izravnoj prehrani ljudi bez potrebe za kuhanjem ili nekom drugom obradom učinkovitom za uklanjanje ili smanjivanje na prihvatljivu razinu mikroorganizama od interesa.

2.1.1. Nutritivno obogaćeni snack proizvodi

Povećanjem interesa potrošača prema zdravijoj i održivoj prehrani te nastojanjem prehrambene industrije da poboljša i proširi portfelj nutritivno obogaćenih i „zdravijih“ prehrambenih proizvoda, proizvođači snack proizvoda su usmjereni k preformuliranju postojećih receptura i da osmisle što više novih i održivih alternativa postojećim snack proizvodima (Crofton i Scannell, 2020). Na slici 1 prikazani su neki od nutritivno obogaćenih snack proizvoda namijenjenih djeci.



Slika 1. Primjer nutritivno obogaćenih snack proizvoda sa svjetskog tržišta namijenjenih djeci (Anonymus 1, 2020)

Istraživanje o snack proizvodima na bazi žitarica (Crofton i sur., 2013) pokazalo je potrebu potrošača za nutritivno obogaćenim („zdravijim“) snack proizvodima smanjene kalorijske vrijednosti, smanjenog udjela masti, soli i šećera, te visokog udjela cjelovitih žitarica, zobi, posija, orašastog voća, sjemenki i bobičastog voća (borovnice, brusnice, goji bobice i drugo). Također se navodi kako takva vrsta snack proizvoda ne bi trebala sadržavati umjetna bojila, arome i zaslađivače. Jedan od najvećih trendova u kategoriji „zdravijih“ snack proizvoda jest istraživanje i razvoj inovativnih snack proizvoda od žitarica s dodatkom specifičnih nutritivnih i funkcionalnih sastojaka poput cjelovitih žitarica, prehrambenih vlakana, antioksidansa i omega-3 masnih kiselina (Dean i sur., 2007; Crofton i sur., 2013).

2.1.2. Zobeno brašno

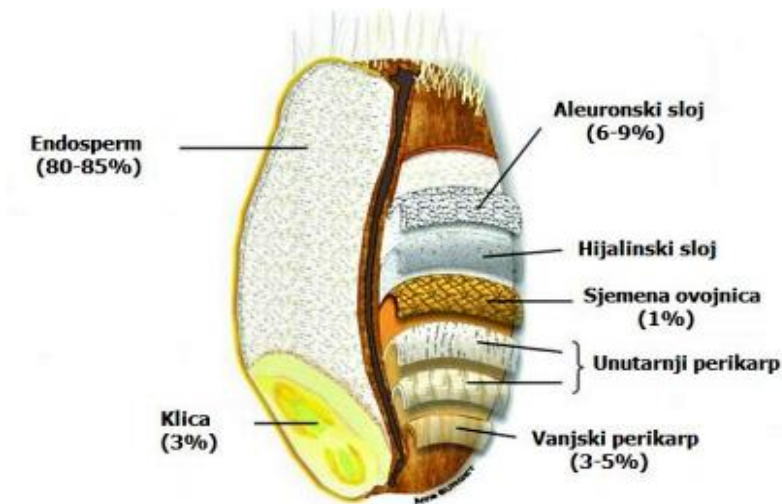
Zob je vrsta žitarica čijem uzgoju najviše pogoduje umjerena klima (Sterna i sur., 2015), a pozornost privlači zbog visokog udjela prehrambenih vlakana i fitokemikalija (Rasane i sur., 2015). Postoji oko 70 različitih vrsti zobi od kojih je najpopularnija *Avena sativa* L., poznata i kao bijela zob (Rasane i sur., 2015). Zob se tradicionalno koristila za prehranu stoke dok se u novije vrijeme sve više primjenjuje u prehrani ljudi zahvaljujući porastu svijesti o njenim korisnim učincima na ljudsko zdravlje (Chauchan i sur., 2018). Samo zrno zobi je u velikoj mjeri neprobavljivo pa se obrađuje na različite načine (usitnjavanje u zobene pahuljice, mljevenje u brašno i slično) kako bi se omogućila što veća probavljivost nutritivno vrijednih spojeva prisutnih u zobi (Decker i sur., 2014).

Zob sadrži visok udio proteina, lipida, mineralnih tvari i prehrambenih vlakana od kojih su posebno značajni β -glukani (Singh i sur., 2013). β -glukan je u vodi topljivo prehrambeno vlakno koje se sastoji od neškrobnih polisaharida, odnosno linearnih polimera glukoze povezanih β -(1-4) i β -(1-3) glikozidnim vezama. Prema Uredbi (EU) br. 1160/2011 dnevni unos najmanje 3 g β -glukana iz zobi dovodi do snižavanja kolesterola u krvi i time se smanjuje rizik od razvoja koronarnih bolesti srca. Također pomaže u regulaciji glukoze u krvi što predstavlja važan čimbenik kod prehrane osoba oboljelih od dijabetesa (Butt i sur., 2008). Prema izvješćima o učinku zobi na ljudsko zdravlje, postoji širok opseg potencijalne primjene zobi u pripremi različitih nutraceutika i funkcionalne hrane te u bezglutenskoj prehrani osoba oboljelih od celijakije (Butt i sur., 2008; Chauhan i sur., 2018).

2.2. PŠENIČNE POSIJE

Pšenične posije, koje se nazivaju i pšeničnim mekinjama, čine vanjski dio zrna pšenice i predstavljaju glavni nusproizvod procesa mljevenja zrna pšenice (Onipe i sur., 2015). Posije se uglavnom koriste kao stočna hrana, no interes za njihovom upotrebom u prehrambenoj industriji raste zahvaljujući vrlo dobrim nutritivnim svojstvima. Procjenjuje se da se godišnje proizvede oko 90 milijuna tona pšeničnih posija namijenjenih ljudskoj prehrani (Onipe i sur., 2015). Broj prehrambenih proizvoda s dodanim pšeničnim posijama je od 2001. do 2011. godine narastao sa 52 na otprilike 800 proizvoda. Uz to, najveći udio prehrambenih proizvoda na tržištu u koje se dodaju pšenične posije čine grupa pekarskih proizvoda i proizvoda od žitarica (Prückler i sur., 2014). Pšenične posije se najčešće dodaju kao izvor prehrambenih vlakana u pekarskim proizvodima, prženoj hrani i žitaricama za doručak (Hossain i sur., 2013).

Na slici 2 je prikazana građa pšeničnog zrna, a 25% njegove mase otpada na pšenične posije. U sastav pšeničnih posija ulaze vanjski i unutarnji perikarp, aleuronski i hijalinski sloj, te sjemena ovojnica (Prückler i sur., 2014). Slojevi vanjskog i unutarnjeg perikarpa su bogati netopljivim vlaknima kao što su celuloza, ksilani i lignini, te fenolnim kiselinama i drugim bioaktivnim tvarima (Sapirstein, 2016). Aleuronski sloj je bogat lignanima i proteinima sa uravnoteženim udjelom aminokiselina, vitaminima i mineralnim tvarima, bioaktivnim tvarima, fitinskom kiselinom, antioksidansima, te pridonosi povećanju funkcionalnosti proizvoda od žitarica s dodanim pšeničnim posijama (Onipe i sur., 2015).



Slika 2. Građa pšeničnog zrna (Brouns i sur., 2012)

2.2.1. Nutritivna vrijednost i sastav pšeničnih posija

Prema Prückler i sur. (2014), pšenične posije sadrže otprilike 12 % vode, 13-18 % proteina, 3,5 % masti i 56 % ugljikohidrata. Pšenične posije predstavljaju bogat izvor prehrambenih vlakana i drugih biološki aktivnih tvari kao što su arabinoksilani, β -glukani, alkilresorcinol, fenolne kiseline, lignani, tokoferoli, karotenoidi i fitosteroli (Prückler i sur., 2014; Belobrajdić i Bird, 2013; Hemdane i sur., 2016). Vrsta i količina bioaktivnih tvari u pšeničnim posijama se razlikuje s obzirom na sortu pšenice te genetičke i okolišne faktore koji utječu na pšenicu tijekom uzgoja (Hossain i sur., 2013).

Iako zasad nije u potpunosti razjašnjeno, klinička i epidemiološka istraživanja pokazuju da je konzumacija hrane bogate cjelovitim žitaricama povezana sa smanjenjem rizika za razvoj bolesti kao što su rak crijeva, dijabetes, pretilost i kardiovaskularne bolesti najvjerojatnije zahvaljujući fitokemikalijama (fenolne kiseline, steroli, alkilresorcinoli, vitamin E, minerali) i vlaknima koja se nalaze u posijama (Andersson i sur., 2014; Prückler i sur., 2014).

Budući da ukupni udio prehrambenih vlakana u pšeničnim posijama iznosi između 36 i 52% (Song i sur. 2013), pšenične posije predstavljaju bogat i ujedno jeftin izvor prehrambenih vlakana (Onipe i sur., 2015). Oko 10 % komercijalno proizvedenih pšeničnih posija koristi se kao izvor netopljivih prehrambenih vlakana u žitaricama za doručak i pekarskim proizvodima (Song i sur., 2013). Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) odobrila je dvije zdravstvene tvrdnje za hranu obogaćenu vlaknima koja sadrži veću količinu vlakana podrijetlom iz pšeničnih posija (mekinja) (minimalno 6 g vlakana na 100 g proizvoda) (Uredba (EU) br.

1924/2006) : „Vlakna pšeničnih mekinja doprinose ubrzanju prolaska crijevnog sadržaja“ i „Vlakna pšeničnih mekinja doprinose povećanju volumena stolice“ (Uredba (EU) br. 432/2012).

Antioksidacijska svojstva pšenice prvenstveno se pripisuju visokom sadržaju fenolnih spojeva, uglavnom alkilresorcinolu i hidroksicimetnim kiselinama, koji su koncentrirani u frakciji pšeničnih posija (Adom i sur., 2005). Fenolni spojevi su najveća i najrazličitija skupina bioaktivnih spojeva u pšeničnim posijama (Anson i sur., 2012) te se pojavljuju u slobodnom ili vezanom obliku (Verma i sur. 2008). Fenolne kiseline, koje su derivati cimetine i benzojeve kiseline, predstavljaju najkompleksniju skupinu fitokemikalija koja prevladava u posijama žitarica (Onipe i sur., 2015). Glavni derivati hidroksicimetine kiseline su ferulinska, sinapinska i *p*-kumarinska kiselina, a prisutni su i derivati benzojeve kiseline kao što su vanilinska i siringinska kiselina (Prückler i sur., 2014).

2.3. ENZIMI PŠENIČNIH POSIJA

Pšenica sadrži značajnu količinu enzima iz različitih enzimskih razreda od kojih je većina koncentrirana upravo u pšeničnim posijama (Every i sur., 2006). U pšeničnim posijama se nalaze sljedeće skupine enzima : hidrolaze (α -amilaze, β -amilaze, peptidaze, endoksilanaze, ksilozidaze), oksidoreduktaze (lipoksigenaze, peroksidaze, askobat-oksidge, dehidroaskorbat-reduktaze, polifenol oksidge, superoksid dismutaze) i izomeraze (protein-disulfid izomeraze) (Hemdane i sur., 2015). Razina enzima prisutnih u posijama ovisi o različitim parametrima, kao što su način mljevenja, sorta i fiziološki stadij jezgre (Every i sur., 2002; Dornez i sur, 2006.)

2.3.1. Polifenol oksidaza

Polifenol oksidaza (PPO) (1,2-benzendiol-kisik oksidoreduktaza) je generički naziv za grupu enzima koji kataliziraju oksidaciju fenolnih spojeva pri čemu nastaje pigment melanin (Felton i sur., 1992; Čukelj Mustač i sur., 2019) te zbog toga dolazi do nepoželjnog posmeđivanja pšeničnih proizvoda zbog kojeg često dolazi do negativne percepcije takvih proizvoda od strane kupaca (Hemdane i sur., 2015).

Polifenol oksidaza katalizira hidroksilaciju monofenola u *o*-difenole i oksidaciju *o*-difenola u *o*-kvinone koji reagiraju s različitim funkcionalnim grupama kao što su amini, tioli i fenoli pri čemu dolazi do formiranja kompleksnih obojanih spojeva (Niu i sur., 2014). Do posmeđivanja prehrambenih proizvoda dolazi zbog nastanka kompleksnih smeđih pigmenata koji se nazivaju

melanini, a katalitičke reakcije polifenol oksidaze utječu i na okus, teksturu i nutritivnu vrijednost proizvoda (Yoruk i Marshall, 2007).

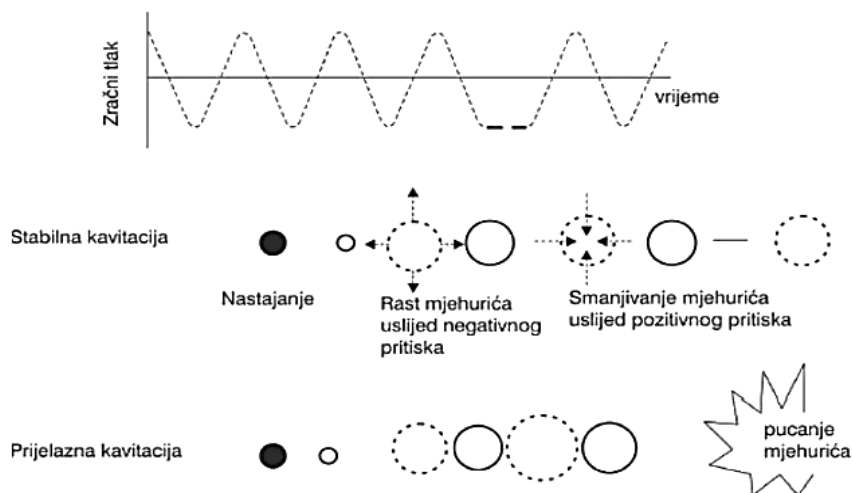
2.4. ULTRAZVUK

Ultrazvučni valovi su zvučni valovi s frekvencijama većim od 16 kHz. U prehrambenoj industriji se primjenjuju ultrazvučni valovi niskog i visokog intenziteta. Ultrazvuk niskog intenziteta karakterizira snaga manja od 1 W/cm^2 i frekvencija 5 - 10 MHz, te se koristi u analitičke svrhe za određivanje sastava, strukture ili viskoznosti hrane, pritom ne izazivajući fizičko oštećenje materijala. S druge strane, ultrazvuk visokog intenziteta karakterizira snaga između 10 do 1000 W cm^{-2} i frekvencija 20 – 100 kHz te zbog velike snage kojom djeluje na materijal izaziva njegova fizička oštećenja kao i određene kemijske reakcije na kojima se zasniva primjena ove tehnike u različitim procesima prerade i konzerviranja hrane (Lelas, 2006; Herceg i sur., 2009).

Ultrazvuk se ubraja u netoplinske metode obrade, a predstavlja inovativnu tehnologiju koja nudi veliku brzinu i učinkovitost procesa, kvalitetniji proizvod zbog zadržavanja njegovih prirodnih karakteristika (tekstura, hranjiva vrijednost, organoleptička svojstva) i produženi rok trajanja (Bhargava i sur., 2021). Proces obrade ultrazvukom prvenstveno ovisi o parametrima koji su povezani s ultrazvučnim uređajem, snazi, frekvenciji, valnoj duljini i amplitudi vala te se proces može optimizirati ovisno o željenom učinku (Pingret i sur., 2013).

2.4.1. Mehanizam djelovanja ultrazvuka visokog intenziteta

Ultrazvučni valovi visokog intenziteta i niske frekvencije okarakterizirani su kao destabilizirajući jer izazivaju značajan učinak na fizikalna, biokemijska i mehanička svojstva prehrambenih proizvoda (Bhargava i sur., 2021). Glavni učinci širenja takvog akustičnog vala kroz medij pripisuju se pojavi prijelazne kavitacije (slika 3) što uključuje stvaranje, rast i raspad (implozija) malih mjehurića u tekućini kao rezultat fluktuacije tlaka jer je svaki element volumena izložen različitom tlaku (Vidić i sur., 2011). Kolaps, odnosno implozija svakog kavitacijskog mjehurića djeluje kao „žarišna točka“ koja generira energiju za povećanje temperature i tlaka (Rastogi, 2011) stvarajući pritom mikropodručja s ekstremno visokom temperaturom ($5000 \text{ }^\circ\text{C}$) i visokim tlakom ($10^4 - 10^5 \text{ kPa}$) (Herceg i sur., 2009).



Slika 3. Prikaz stabilne i prijelazne kavitacije (Kuijpers, 2002)

2.4.2. Primjena ultrazvuka visokog intenziteta u prehrambenoj industriji

Ultrazvuk se primjenjuje za homogenizaciju, miješanje, ekstrakciju, kristalizaciju, fermentaciju, otplinjavanje te inaktivaciju mikroorganizama i enzima (Kiani i sur., 2011). Lelas (2009) navodi da je vjerojatno najraširenija upotreba ultrazvuka u procesima ekstrakcije različitih organskih komponenti iz biljnih sirovina, a primjena metode nalazi se u tome što ultrazvučni valovi oštećuju stanične stjenke biljnih materijala čime se olakšava ulaz otapala u materijal i povećava efikasnost izmjene mase.

Tretman isključivo ultrazvukom ili tretman ultrazvukom u kombinaciji s termičkim metodama obrade pokazao se efikasnim za inaktivaciju industrijski važnih enzima kao što su lipoksigenaza, peroksidaza, polifenol oksidaza i drugi enzimi, a samostalni učinak ultrazvuka na inaktivaciju enzima ovisi o koncentraciji enzima, temperaturi, pH vrijednosti i sastavu medija na koji djeluje (O'Donnell i sur., 2010). Habuš i sur. (2021) su istraživali utjecaj veličine čestica pšeničnog posija i tretmana ultrazvukom visoke frekvencije (vrijeme tretmana i amplituda vala) na aktivnost polifenol oksidaze prisutne u pšeničnim posijama te su dokazali da se kombinacijom optimalne mikronizacije (usitnjavanje čestica) i tretmana ultrazvukom visokog intenziteta uspješno inaktiviralo do 93 % enzima PPO. Utjecaj tretmana ultrazvukom u kombinaciji s antioksidansima - askorbinskom kiselinom ili glutationom na enzimsko posmeđivanje sirovih rezanaca od cjelovitog zrna pšenice uzrokovano aktivnošću enzima PPO pokazao je značajnu učinkovitost u održavanju stabilnosti boje i poboljšanju ukupne kvalitete rezanaca od integralnog pšeničnog brašna (Niu i sur., 2014).

2.5. MIKROVALNO ZAGRIJAVANJE

Dr. Percy Spencer je 1945. godine patentirao mikrovalno zagrijavanje hrane koje se relativno brzo populariziralo u kućanstvima iako je sama tehnologija bila primarno namijenjena vojnim potrebama (Tewari, 2007). Mikrovalno zagrijavanje postalo je popularno u obradi hrane zahvaljujući sposobnosti postizanja visoke brzine zagrijavanja, značajno skraćenom vremenu kuhanja, ujednačenijem zagrijavanju, sigurnosti upotrebe i jednostavnosti rukovanja i održavanja uređaja (Chandrasekaran i sur., 2013).

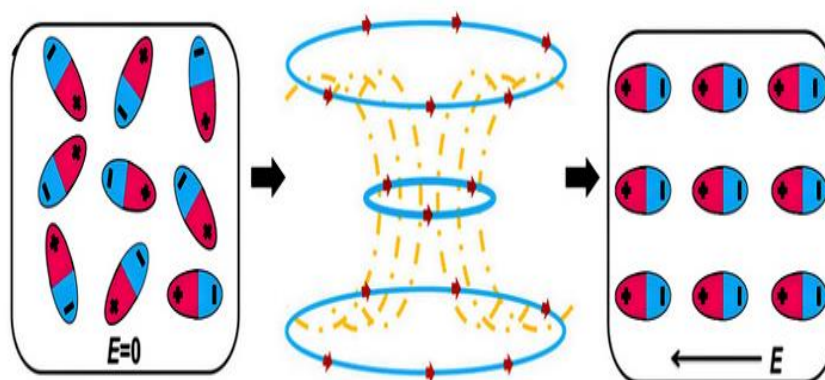
Mikrovalovi su elektromagnetski valovi čija frekvencija iznosi između 300 MHz i 300 GHz; u kućanstvu se koriste mikrovalni uređaji koji uglavnom koriste frekvenciju od 2 450 MHz dok mikrovalni sustavi namijenjeni industrijskoj upotrebi najčešće koriste frekvencije od 915 i 2 450 MHz (Datta i Davidson, 2000.).

2.5.1 Mehanizam djelovanja mikrovalnog zagrijavanja

Mikrovalno zagrijavanje određenog materijala uzrokovano je sposobnošću materijala da apsorbira mikrovalnu energiju i pretvori je u toplinu (Chandrasekaran i sur., 2013). Zagrijavanje mikrovalovima u osnovi uključuje dva mehanizma: dielektrični i ionski mehanizam (Lovrić, 2003).

Prisutnost vlage ili vode u namirnici uzrokuje dielektrično zagrijavanje zbog dipolarnog karaktera molekule vode. Tijekom djelovanja oscilirajućeg električnog polja na molekule vode, ove trajno polarizirane dipolarne molekule pokušavaju se poravnati u smjeru električnog polja (Slika 4). Zahvaljujući visokoj frekvenciji električnog polja, molekule se poravnavaju otprilike milijun puta u sekundi što dovodi do međusobnog trenja molekula i posljedičnog stvaranja topline. Mikrovalno zagrijavanje također se događa zbog oscilacijske migracije iona u namirnici kojom se stvara toplina u prisutnosti visokofrekventnog oscilirajućeg električnog polja (Datta i Davidson, 2000).

Namirnice koje sadrže znatnu količinu vode pogodne su za dielektrično zagrijavanje jer imaju veći koeficijent pretvorbe energije elektromagnetskih valova u toplinu (Lovrić, 2003). Dielektrična svojstva određene namirnice ili hrane na mikrovalnim frekvencijama ovise o kemijskom sastavu, sadržaju vlage, temperaturi i nasipnoj gustoći namirnice te o frekvenciji primijenjenog električnog polja (Tewari, 2007).



Slika 4. Poravnavanje dipolarnih molekula u smjeru djelovanja električnog polja (Zhang i sur., 2015)

2.5.2. Mikrovalno vakuumsko zagrijavanje

Procesi obrade mikrovalovima u prehrambenoj industriji sve češće se kombiniraju s vakuumom jer uspostava podtlaka, odnosno djelomičnog vakuuma pridonosi bržem isparavanju vode pri temperaturama nižima od temperature vrenja, a time i kraći vremenski interval obrade (Song i sur., 2018). Zahvaljujući uklanjanju zraka do postizanja određenog stupnja vakuuma, sprječava se proces oksidacije spojeva prisutnih u tretiranoj namirnici čime se zadržava boja, tekstura i okus namirnice (Chandrasekaran i sur., 2013). Tijekom tretmana mikrovalnim vakuumskim zagrijavanjem, koji se provodi pri nižoj temperaturi u odnosu na mikrovalno zagrijavanje pri atmosferskom tlaku, dolazi do očuvanja antioksidacijskih spojeva (npr. polifenolni spojevi) prisutnih u tretiranoj namirnici (Song i sur., 2018). Također upotrebom mikrovalnog vakuumskog zagrijavanja smanjenje se mogućnost stvaranja zagorjelih mjesta na površini tretiranih proizvoda i poboljšava se energetska učinkovitost procesa (Zhang i sur., 2007).

2.5.3. Primjena mikrovalnog zagrijavanja pri atmosferskom i sniženom tlaku u prehrambenoj industriji

Termička obrada prehrambenih proizvoda tehnologijom mikrovalova stekla je veliku popularnost zahvaljujući sposobnosti brzog i volumetrijskog zagrijavanja, a nekoliko studija je pokazalo da je korištenjem mikrovalnog zagrijavanja u usporedbi s konvencionalnim zagrijavanjem postignut veći ili jednak stupanj očuvanja boje, bioaktivnih spojeva i antioksidativne aktivnosti (Zhou i sur., 2016). Tewari (2007) navodi da su glavne primjene mikrovalnog zagrijavanja u obradi hrane sljedeće: zagrijavanje, (pred)pečenje, temperiranje, blanširanje, pasterezacija i sterilizacija, sušenje i sušenje smrzanjem. Mikrovalno

zagrijavanje se također koristi za inaktivaciju određenih enzima u namirnicama kako bi se smanjio njihov nepoželjni učinak na namirnicu tijekom obrade i skladištenja. U istraživanju utjecaja mikrovalnog zagrijavanja na inaktivaciju enzima polifenol oksidaze, peroksidaze i pektin-metil esteraze u pireu kivija kojeg su proveli Benlloch-Tinoco i sur. (2013), pokazano je da su navedeni enzimi uspješno inaktivirani na željenu razinu te je voćni pire kivija nakon obrade bio stabilan sa poboljšanim antioksidacijskim kapacitetom.

U istraživanju Zhang i sur. (2007) mikrovalno vakuumsko zagrijavanje pokazalo je prednosti mikrovalnog zagrijavanja pred konvencionalnim metodama zagrijavanja (brzo zagrijavanje, visoka učinkovitost), ali i poboljšanu energetska učinkovitost procesa, sprječavanje nastajanja izgorjelih područja na površini i bolju hrskavost slanah krišaka mesa ribe šarana u odnosu na tretman mikrovalnim zagrijavanjem pri atmosferskom tlaku. Renna i sur. (2017) su istraživali učinkovitost kombiniranog „sous vide“ kuhanja i mikrovalnog kuhanja za inaktivaciju patogena iz hrane u cikoriji spremnoj za jelo (engl. „ready-to-eat-food“). „Sous vide“ kuhanje predstavlja metodu kuhanja pod vakuumom pri čemu se sirove namirnice prije toplinskog tretmana umetnu u toplinski stabilne vrećice te se vakuumiraju i zavare (Schellekens, 1996). Renna i sur. (2017) zaključili su da mikrovalna obrada hrane u vakuum pakovanju predstavlja „tehnologiju u nastajanju“ jer omogućuje očuvanje kvalitete namirnice i nutritivno vrijednih spojeva u namirnici uz postizanje željenog antimikrobnog učinka u kraćem vremenu u odnosu na konvencionalno kuhanje.

2.6. PULSIRAJUĆE SVJETLO

Upotreba tehnologije pulsirajućeg bijelog svjetla u svrhu inaktivacije mikroorganizama započinje 1970-tih godina u Japanu, a veći interes za primjenu u prehrambenoj industriji pojavljuje se 1996. godine kada je Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) odobrila korištenje tehnologije pulsirajućeg svjetla za tretiranje hrane i preporučila uvjete primjene (Rimac Brnčić, 2009). Obrada hrane pulsirajućim svjetlom predstavlja jednu od novijih netermalnih tehnologija koja se koristi kao alternativa tradicionalnim toplinskim procesima obrade hrane kako bi tretirana namirnica bila što sigurnija za upotrebu bez značajnog gubitka nutritivne vrijednosti (John i Ramaswamy, 2018). Također, pulsirajuće ultraljubičasto (UV) svjetlo pokazuje brojne prednosti pred upotrebom kontinuiranog UV svjetla zahvaljujući većoj sposobnosti penetracije zračenja, niže potrošnje energije te većoj efikasnosti i brzini inaktivacije mikroorganizama (Oms – Olu i sur., 2010).

Osnovu tehnologije pulsirajućeg svjetla čini upotreba vrlo kratkih bljeskovi svjetla jakog intenziteta, širokog spektra od UV-područja do infracrvenog područja; UV spektar (100-400 nm), spektar vidljivog svjetla (400-700 nm) i spektar infracrvenog zračenja (700-1100 nm) (Rimac Brnčić, 2009; Oms-Oliu i sur., 2010a). Pulsirajuće svjetlo pokazuje antimikrobni učinak prvenstveno zahvaljujući UV dijelu spektra (Manzocco i sur, 2013), a uglavnom se temelji na izazivanju strukturnih promjena u molekuli DNA ciljanih mikroorganizama (John i Ramaswamy, 2018). Za antimikrobnu primjenu koristi se izlaganje kratkim valnim duljinama UV dijela spektra između 100 i 280 nm (tzv. UV-C područje), uključujući dezinfekciju vode, zraka, površina i hrane (Oms-Oliu i sur., 2010a).

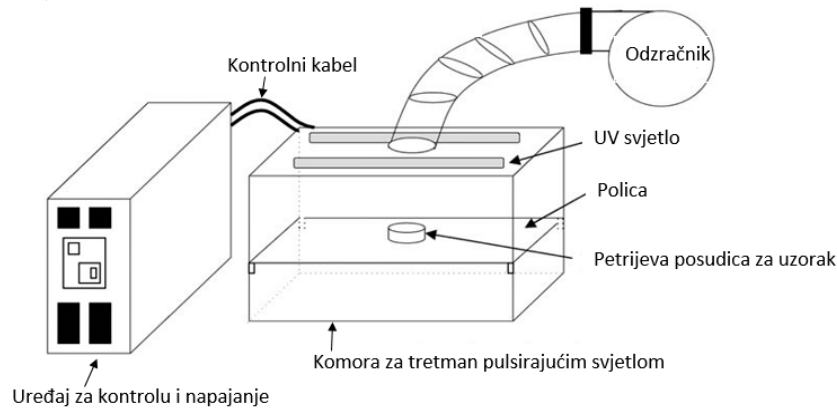
2.6.1. Mehanizam djelovanja pulsirajućeg svjetla

Način djelovanja pulsirajućeg svjetla pripisuje se učinku kratkotrajnih bljeskova jakog intenziteta, pri čemu se proizvod izlaže djelovanju najmanje jednog pulsa gustoće energije od 0,01 do 50 J cm⁻², a frekvencija pulseva iznosi od 1 do 20 bljeskova po sekundi u trajanju od 1 μs do 1 s (Rimac Brnčić, 2009).

Pulsirajuće svjetlo izaziva inaktivaciju mikroorganizama kombinacijom fotokemijskog, fototermičkog, i fotofizikalnog učinka (Keklik i sur., 2012). Fotokemijski učinak odnosi se na djelovanje UV svjetla na DNA, odnosno na apsorpciju zračenja konjugiranih ugljik-ugljik dvostrukih veza u proteinima i nukleinskim kiselinama što dovodi do strukturnih promjena u molekuli DNA (John i Ramaswamy, 2018) dok se fototermički učinak odnosi na djelovanje bljeskova širokog spektra svjetla (UV, vidljivo i infracrveno područje) koji se apsorbiraju u površinskom sloju i izazivanju toplinske površine budući da mikrobnne stanice snažnije apsorbiraju svjetlost od okolnog medija što dovodi do njihovog naglog zagrijavanja na temperaturu dostatnu za njihovu inaktivaciju (Rimac Brnčić, 2009). Fotofizikalni učinak podrazumijeva konstantne smetnje uzrokovane pulsevima visoke energija koje dovode do oštećenja strukture mikrobnne stanice (Keklik i sur., 2012)

Pulsirajuće svjetlo nastaje tako što se elektromagnetska energija akumulira u kondenzatoru uređaja za obradu pulsirajućim svjetlom tijekom djelića sekunde, a zatim se u vrlo kratkom vremenskom periodu (nanosekunde do milisekunde) oslobađa u obliku svjetlosne energije što rezultira pojačavanjem snage uz minimalnu dodatnu potrošnju energije. Na slici 5 nalazi se pojednostavljeni prikaz uređaja za obradu pulsirajućim svjetlom. Oprema koja se koristi za proizvodnju pulsirajućeg svjetla sastoji se od jedne ili više ksenonskih lampi, izvora energije te visokonaponskog priključka koji omogućuje prijenos električne energije. Električna energija

prolazi kroz plinsku komoru lampe što dovodi do emitiranja svjetlosnih pulseva (Oms-Oliu i sur., 2010a).



Slika 5. Prikaz uređaja za obradu pulsirajućim UV svjetlom (Murugesan i sur., 2012)

2.6.2. Primjena pulsirajućeg svjetla u prehrambenoj industriji

Pulsirajuće svjetlo općenito se smatra tehnologijom namijenjenoj površinskoj dekontaminaciji patogena, a efikasnost dekontaminacije uvelike ovisi o sljedećim čimbenicima: fizikalni faktori (broj pulseva, ulazni napon uređaja, udio UV zračenja, udaljenost proizvoda od izvora svjetlosti), biološki faktori (vrsta mikroorganizma-npr. sporogene i vegetativne bakterije) i okolišni faktori (vrsta i debljina uzorka, vrsta ambalaže, kvaliteta površine uzorka) (Levy i sur., 2012 ; Oms – Oliu i sur., 2010).

U prehrambenoj industriji pulsirajuće svjetlo se koristi za inaktivaciju mnogih patogena i mikroorganizma koji uzrokuju kvarenje hrane, uključujući bakterije (sporogene i vegetativne), kvasce, plijesni i viruse (John i Ramaswamy, 2018). Budući da je glavni nedostatak ove tehnologije niska moć penetracije, prvenstveno je namijenjena površinskoj dekontaminaciji čvrste hrane (npr. jaja, voće i povrće), bez ambalaže ili u ambalaži koja propušta UV zračenje (Artiguez i Martínez-de Marañón, 2015). Pulsirajuće svjetlo se koristi i za inaktivaciju enzima prisutnih u hrani, a učinak pulsirajućeg svjetla na enzim polifenol oksidazu ispitan je u istraživanju Manzocco i sur. (2013) na modelnoj otopini enzima polifenol oksidaze i pokazano je da inaktivacija enzima raste s porastom doze tretmana te je potpuna inaktivacija enzima postignuta pri dozama pulsirajućeg svjetla većim od $8,5 \text{ J cm}^{-2}$ što je dovelo do strukturnih promjena unutar proteina uključujući pojave cijepanja i odmatanja proteina te posljedično inaktivacije enzima.

2.7. TRODIMENZIJSKI TISAK

Trodimenzijski (3D) tisak, također poznat kao aditivna proizvodnja, predstavlja tehniku koja omogućuje izradu računalno potpomognutih dizajniranih predmeta na platformi taloženjem sloja po sloj (Zhu i sur., 2019). Prvi 3D printer razvijen je osamdesetih godina prošlog stoljeća, a kao materijal za tiskanje korišteni su fotopolimeri i plastika (Horvath, 2014). Trodimenzijsko tiskanje uspješno se koristi u području medicine, elektroničke, automobilske i zrakoplovne industrije (Mantihal i sur., 2020). He i sur. (2019) navode da su za prvu primjenu 3D tiskane tehnologije u prehrambenoj industriji zaslužni Yang i sur. (2001) koji su na temelju tehnologije ekstruzije proizveli kompleksnu trodimenzijski tiskanu tortu. Nakon toga se tehnologija trodimenzijskog tiska postupno počela razvijati u sektoru prehrambene industrije, a 3D pisači su dizajnirani posebno za proizvodnju hrane (Mantihal i sur., 2020).

Prilikom odabira i pripreme materijala za tiskanje važno je obratiti pozornost na dva kriterija koja ovise o reološkim svojstvima materijala, a to su lakoća tiska i sposobnost zadržavanja željene strukture nakon tiskanja (npr. tijekom pečenja) (Zhu i sur., 2019).

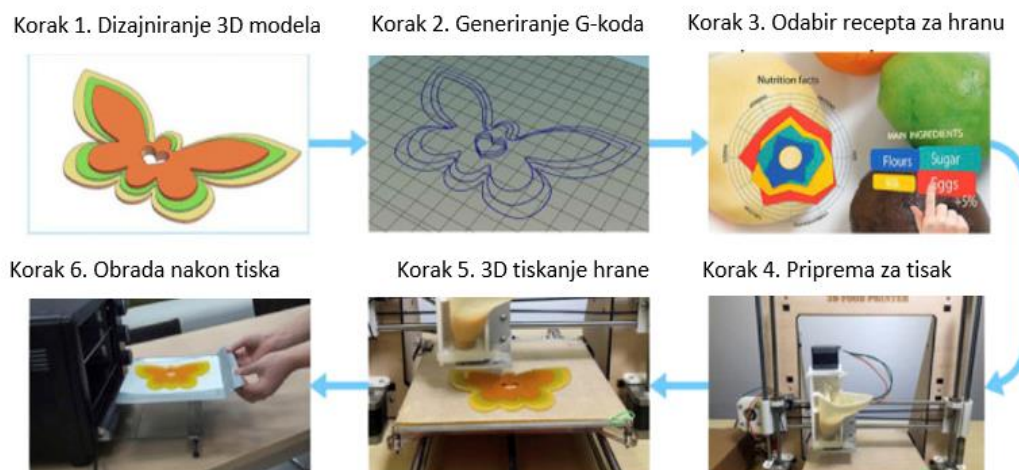
Postoje brojne prednosti korištenja tehnologije 3D tiska u prehrambenoj industriji (Liu i sur., 2017). Koristeći tehnologiju 3D printanja hrane, svakodnevnim ljudima je omogućeno proizvesti vrlo kompleksne oblike prehrambenih proizvoda na temelju unaprijed pripremljenih datoteka od strane stručnjaka, a koje nije moguće proizvesti ručnim radom i korištenjem različitih kalupa (Sun i sur., 2015b). Tehnologija 3D tiska hrane je atraktivna zbog potencijala za stvaranje novih tekstura i proizvodnje manjih serija što omogućuje prilagođavanje hrane posebnim prehrambenim potrebama (Severini i sur., 2018), odnosno personalizaciju prehrane pojedine osobe prema njenom fizičkom i nutritivnom statusu (Sun i sur., 2015b). Ovom tehnologijom moguće je proširiti izvor dostupnih prehrambenih sirovina na način da se koriste netradicionalni prehrambeni materijali kao što su insekti, biljni materijali bogati vlaknima i nusproizvodi biljnog i životinjskog podrijetla (Severini i Derossi, 2016; Liu i sur., 2017).

Komercijalizaciji tehnologije 3D tiska hrane na putu stoje određeni nedostaci kao što su zabrinutost za opću sigurnost tako pripremljene hrane zbog mogućnosti nakupljanja hrane u sitnim prostorima unutar 3D pisača (uske mlaznice i ekstruder) te potencijalnog razvoja patogenih bakterija. Također, većina 3D pisača sadrži plastične dijelove koji s vremenom tijekom postupka printanja hrane mogu otpuštati čestice koje dovode do štetnih utjecaja na zdravlje. Osim zabrinutosti za opću sigurnost tako proizvedene hrane, kao nedostatak se često navodi vrijeme potrebno za proizvodnju 3D tiskane hrane koje obuhvaća pripremu materijala i

razvoj recepture za smjesu čija svojstva moraju zadovoljiti sve kriterije potrebne za uspješno tiskanje, vrijeme potrebno za printanje i vrijeme za obradu 3D oblika nakon tiska (npr. pečenje, sušenje i slično) (Sun i sur., 2018).

2.7.1. Način rada 3D pisača

Osnovni princip trodimenzijskog tiskanja hrane jest generiranje 3D modela po izboru pomoću trodimenzijskog CAD sustava, a zatim se tako generirana datoteka modela (.stl) prenosi u „slicing“ softver koji služi za tzv. rezanje oblika u slojeve prije samog postupka ispisa (Mantihal i sur., 2020). Prema slici 6 potom slijedi odabir recepture, priprema 3D pisača, tiskanje željenog oblika i potencijalna naknadna obrada oblika (npr. sušenje, pečenje) (Sun i sur., 2018). Primjena tehnologije trodimenzijskog tiskanja u prehrambenoj industriji predstavlja izazov zbog velikih razlika u fizikalno-kemijskim svojstvima među korištenim materijalima (Sun i sur., 2018).



Slika 6. Dijagram procesa 3D tiskanja hrane na principu ekstruzije (Sun i sur., 2018)

U prehrambenoj industriji trenutno se primjenjuju četiri tehnike 3D tiska hrane: selektivno sinteriranje, tisak na principu ekstruzije, tisak primjenom tekućeg vezivnog sredstva i tintni tisak (Liu i sur., 2017; He i sur., 2019). Selektivno sinteriranje koristi se za proizvodnju složenih struktura pomoću šećera ili prahova bogatih šećerom (Sun i sur., 2015a). Tisak na principu ekstruzije obično se koristi za ekstruziju vruće rastopljene čokolade i mekih materijala kao što su tijesto, pire krumpir i mesni pire (Yang i sur., 2015). Tisak pomoću vezivnog sredstva temelji se na ravnomjernom raspoređivanju svakog sloja praha po proizvodnoj platformi i zatim se tekućim vezivnim sprejevima povezuju dva uzastopna sloja praha (Sachs i sur., 1990), a ovim postupkom se najčešće proizvodi širok spektar raznobojnih i ukusnih jestivih predmeta

(Liu i sur., 2017). Tintni tisak obično obrađuje materijale niske viskoznosti i stoga se uglavnom koristi u području površinskog ispunjavanja ili za ukrašavanje površine različitim slikama (Pallottino i sur., 2016).

2.7.2. Tisak na principu ekstruzije

Za izradu 3D tiskanih prehrambenih proizvoda najčešće se koristi tisak na principu ekstruzije (He i sur., 2019). U ovom diplomskom radu koristio se 3D pisac za hranu koji radi na principu ekstruzije. Tijekom postupka tiskanja hrane na principu ekstruzije, rastopljeni materijal ili pastozna smjesa se kontinuirano gura kroz sapnicu pod tlakom i taloži na ciljanu ploču prateći određeni uzorak koji je prethodno zadan računalnim programom (Lille i sur., 2018; Liu i sur., 2019). Iako je ova tehnika primjenjiva za tiskanje širokog spektra mekih materijala, tisak složenih i osjetljivih trodimenzijskih oblika je relativno ograničen zbog mogućnosti izobličenja, iskrivljavanja i općenito narušavanja 3D oblika te je stoga vrlo bitno u potpunosti razumjeti svojstva materijala i tehnologije kako bi se željene 3D strukture mogle uspješno graditi (Liu i sur., 2017).

Za izradu atraktivnog 3D tiskanog proizvoda presudni su preciznost i točnost tiska za što su odgovorni sljedeći tehnološki faktori: mehanizam ekstruzije, svojstva materijala, parametri tiskanja i procesi obrade nakon tiska (Liu i sur., 2018).

U trodimenzijskom tiskanju hrane razlikuju se tri mehanizma ekstruzije: ekstruzija pomoću puža, ekstruzija komprimiranim zrakom i ekstruzija pomoću šprice (Liu i sur., 2017).

Ekstruzija pomoću puža vrši se tako da se materijal ubacuje u spremnik sa širokim otvorom na vrhu, a tijekom postupka tiskanja puž, koji se pokreće djelovanjem motora, kontinuirano odvodi materijal kroz užu cijev do mlaznice za ekstrudiranje kroz koju materijal prolazi (Sun i sur., 2018), a ovakav mehanizam ekstruzije nije pogodan za materijale s velikom viskoznošću i mehaničkom čvrstoćom (Liu i sur., 2017). Za ekstruziju komprimiranim zrakom obavezna je pneumatska pumpa kojom se potiskuje materijal kroz mlaznicu, a navedeni mehanizam ekstruzije namijenjen je printanju tekućih i materijala niske viskoznosti (Sun i sur., 2018). Ekstruzija pomoću šprice provodi se tako da se u špicu umetne materijal za printanje te se motorom pokreće sam proces ekstruzije (Sun i sur., 2018). Ovaj mehanizam ekstruzije pogodan je za tiskanje materijala s visokom viskoznošću i velikom mehaničkom snagom te se koristi za izradu kompleksnih 3D tiskanih struktura (Liu i sur., 2017).

2.7.3. Primjena tehnologije 3D tiskanja hrane

S porastom životnog standarda, sve je veća potražnja ljudi za zdravom prehranom i funkcionalnom hranom pa čak i za personaliziranom prehranom zbog sve veće raširenosti osjetljivosti i intolerancije prema određenim namirnicama (He i sur., 2019). Trodimenzijsko tiskanje hrane može biti prilagođeno fizikalnom i nutritivnom statusu pojedinca što znači da se u smjesu koja je namijenjena za tiskanje mogu dodati različiti sastojci kao što su proteini, masti, prehrambena vlakna, vitamini i minerali te se na taj način pojedincu omogućuje balansirana prehrana koja zadovoljava njegove potrebe (Sun i sur., 2018; He i sur., 2019). Također je moguće tiskanje hranu koja je puno nježnije i mekše teksture te je takva hrana namijenjena starijim osobama i osobama koje imaju problema s gutanjem hrane (Kouzani, 2017). Poznato je da su djeca izbirljiva što se tiče hrane i događa se da odbijaju jesti neke namirnice koje su nutritivno vrijedne kao npr. voće i povrće jer ih vizualno ne privlače. Upotrebom 3D pisaca za hranu mogu se napraviti oblici različitog dizajna i različitih boja što može potaknuti djecu da kroz zabavu jedu više nutritivno vrijednih proizvoda te tako u organizam unose potrebne nutrijente za rast i razvoj. Koristeći tehnologiju 3D tiskanja hrane, Derossi i sur. (2018) su razvili snack proizvod na bazi voća koji osigurava 5-10 % preporučene dnevne doze energijskog unosa i nutrijente kao što su vitamin D, željezo, kalcij i brojne druge namijenjene djeci u dobi između 3 i 10 godina. Američka vojska je pokazala veliko zanimanje za primjenu 3D tiskane hrane u prehrani vojnika zbog proizvodnje hrane na zahtjev na bojnopolju, personalizacije obroka i produljenog roka trajanja materijala za pripremu 3D tiskane hrane jer se takav materijal može skladištiti u obliku sirovina, a ne u obliku gotovog proizvoda (Liu i sur., 2017). 3D tisak će se u budućnosti primijenjivati u prehrambenoj industriji kao brzi alat za izradu prototipa za planiranje, dizajniranje i testiranje novih sastojaka i/ili struktura hrane (Lille i sur., 2018).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

Kao sirovine za priremu smjesa u ovom radu korištene su pšenične posije iz industrijskog mlina Farina tvrtke Granolio d.d. (Hrvatska) koje su pomoću laboratorijskog mlina usitnjene na veličinu čestica 180 μm , proteini graška u prahu iz ekološkog uzgoja Piura koje na hrvatsko tržište stavlja Biovega d.o.o., zobeno brašno iz ekološkog uzgoja Garden koje na hrvatsko tržište stavlja Garden d.o.o., suncokretovo ulje tvrtke Zvijezda d.o.o (Hrvatska), kuhinjska sol sitna iz tvrtke Solana d.d. (Bosna i Hercegovina), natrijev hidrogenkarbonat tvrtke Gram-mol d.o.o. (Hrvatska) i deionizirana voda. Nutritivne vrijednosti navedenih sirovina prikazane su u tablicama 1-3.

Tablica 1. Nutritivna vrijednost pšeničnih posija u 100 g

Masti	3,8 g
Ugljikohidrati	22,5 g
Bjelančevine	15,6 g
Vlakna	31,7 g
Mineralne tvari	3,2 g

Tablica 2. Nutritivna vrijednost proteina graška u prahu u 100 g

Energija	381 kcal/1614 kJ
Masti	4,5 g
- od kojih zasićene	1,5 g
Ugljikohidrati	1,1 g
- od toga šećeri	0,0 g
Bjelančevine	83,7 g
Soli	1,3 g

Tablica 3. Nutritivna vrijednost zobenog brašna u 100 g

Energija	371 kcal/1569 kJ
Masti	5,6 g
- od kojih zasićene	1,2 g
Ugljikohidrati	69,6 g
- od toga šećeri	0,6 g
Bjelančevine	9,5 g
Vlakna	2,15 g
Soli	> 0,01 g

3.2. METODE RADA I UZORCI

Pri obradi pšeničnih posija s ciljem što veće inaktivacije enzima PPO te očuvanja polifenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti korišteni su tretmani ultrazvukom visokog intenziteta, mikrovalnim vakuum zagrijavanjem i pulsirajućim svjetlom. Uvjeti tretmana su određeni na temelju prethodnih istraživanja različitih autora.

Budući da je prema Zhang i Shao (2015) enzim PPO stabilan na temperaturi do 40 °C i da prema Doğan i sur. (2002) zagrijavanje na temperaturu veću od 40 °C pokazuje smanjenje aktivnosti PPO, temperatura od 45 °C je odabrana kao najniža temperatura obrade pšeničnih posija kojom bi se mogla postići određena inaktivacija PPO uz što veće očuvanje toplinski nestabilnih fenolnih spojeva. Iako temperatura inaktivacije PPO ovisi o izvoru enzima, odnosno o namirnici koja se obrađuje, uzima se kao pravilo da se PPO gotovo u potpunosti inaktivira pri temperaturama između 70 i 90 °C (Yadav i sur., 2010).

Tretman mikrovalnim vakuumskim zagrijavanjem izveden je prema primjeru istraživanja Renna i sur. (2017) koji su zaključili da mikrovalna obrada namirnice zavarene u vakuum pakovanju doprinosi očuvanju senzorskih i nutritivnih svojstava tretirane namirnice tako što se onemogućuje oksidacija zbog odsutnosti zraka u pakovanju i što se smanjuje toplinska degradacija nutritivno vrijednih spojeva. Vodena suspenzija pšeničnih posija u Petrijevoj zdjelici vakuumirana je neposredno prije obrade mikrovalnim zagrijavanjem kako bi se uklonio zrak iz okoline i time postigla jednaka ili bolja inaktivacija PPO uz što veće očuvanje sadržaja ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti u odnosu na druge tretmane koji su se provodili pri većim temperaturama. Tijekom tretmana pšeničnih posija mikrovalnim

vakuumskim zagrijavanjem bilo je moguće postići maksimalnu temperaturu od 70 °C jer je na većim temperaturama došlo do pucanja vrećice u kojoj se nalazila Petrijeva zdjelica sa suspenzijom uzorka. Mikrovalnim vakuumskim zagrijavanjem se, uz postizanje temperature od 70 °C, uzorak tretirao i do postizanja temperature od 45 °C.

Habuš i sur. (2021) optimirali su vrijednosti amplitude ultrazvuka visokog intenziteta, veličinu čestica posija i vrijeme tretmana kako bi se postigla što veća inaktivacija PPO uz očuvanje fenolnih spojeva te kao najveću vrijednost postignute temperature navode 94 °C. Vodeći se tim istraživanjem, prilikom tretmana ultrazvukom visokog intenziteta pšenične posije su se tretirale do postizanja temperature od otprilike 95 °C. Vodena suspenzija pšeničnih posija također je tretirana pulsirajućim svjetlom do temperature od 45, 70 i 90 °C kako bi se rezultati mogli uspoređivati sa tretmanima mikrovalnim vakuumskim zagrijavanjem i ultrazvukom visokog intenziteta prilikom kojih su također postignute spomenute temperature.

Oznake korištene kod praćenja promjene temperature, aktivnosti PPO, udjela ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta (DPPH i FRAP), označavaju korištene tretmane i uvjete tih tretmana: UZV – ultrazvuk visokog intenziteta, MV45 - mikrovalno vakuumsko zagrijavanje na temperaturu uzorka od 45 °C, MV70 – mikrovalno vakuumsko zagrijavanje na 70 °C, PS45 – pulsirajuće svjetlo na 45 °C, PS70 – pulsirajuće svjetlo na 70 °C i PS90 – pulsirajuće svjetlo na 90 °C. Također, smjese su nazvane prema tretmanu pšeničnih posija koje se nalaze u pojedinoj smjesi: smjesa UZV sadrži posije tretirane ultrazvukom visokog intenziteta, smjesa MV sadrži pšenične posije koje su tretirane mikrovalnim vakuumskim zagrijavanjem na temperaturi od 70 °C, a smjesa PS sadrži posije tretirane pulsirajućim svjetlom na temperaturi od 90 °C. Svakom od triju smjesa, šprica pisaača se punila u dva navrata te se zbog toga definira 1. i 2. punjenje svake smjese koje je, na primjeru smjese UZV, označeno kao UZV1 (1. punjenje) i UZV2 (2. punjenje).

3.2.1. Tretman ultrazvukom visokog intenziteta

Aparatura i pribor:

- 1) Laboratorijska vaga
- 2) Ultrazvučni procesor dr. Hielscher GmbH, Ultraschallprozessor UP 400s (Njemačka)
- 3) Staklena čaša od 50 mL
- 4) Menzura

- 5) Stakleni štapić
- 6) Plastične posude (urinarke)
- 7) pH metar
- 8) Infracrveni termometar

Postupak rada:

Vodena suspenzija pšeničnih posija (3 g posija u 21 mL vode) tretira se ultrazvukom visokog intenziteta pomoću uređaja (UP 400s, Hielscher GmbH, Njemačka) sondom promjera 22 mm. Snaga ultrazvuka iznosila je 400 W, a frekvencija 24 kHz uz amplitudu 100 %. Uzorak se postavlja na postolje u izoliranoj komori te se u njega uranjaju ultrazvučna i temperaturna sonda. Tretman se provodio 2 minute i 27 sekundi do postizanja temperature od 95 °C, odnosno 2 minute i 30 sekundi do postizanja temperature od 96 °C. Uzorcima su prije i nakon tretmana izmjerene temperatura i pH vrijednost.

3.2.2. Tretman mikrovalnim vakuumskim zagrijavanjem

Aparatura i pribor:

- 1) Tehnička vaga (Kern & Sohn GmbH, D-72336, Balingen, Njemačka)
- 2) Mikrovalna pećnica (Tristar Magnetron 220-240V-50Hz 700W, model br. MW-2895K, Nizozemska)
- 3) Petrijeve zdjelice
- 4) Pipeta od 10 mL
- 5) Metalna žlica
- 6) Plastične posude (urinarke)
- 7) Infracrveni termometar
- 8) Vrećice za vakuumiranje (Status d.o.o. Metlika, 280x360 mm, LOT No. 01/2013, Slovenija)
- 9) Uređaj za vakuumiranje i varenje (UNIVAC S.r.l. div Lavezzini, model Medium, Italija)
- 10) Uređaj za varenje (Status d.o.o. Metlika, Model SV 750, Slovenija)
- 11) Škare

Postupak rada:

U Petrijevu zdjelicu se odvagne 3 g pšeničnih posija te se doda 8 mL destilirane vode. Pripremljena suspenzija pšeničnih posija dobro se promiješa i ravnomjerno rasporedi po Petrijevoj zdjelici. Petrijeva zdjelica sa uzorkom umetne se u vrećicu za vakumiranje i tako pripremljeni uzorak se vakuumira 15 sekundi i nakon toga vari 5 sekundi.

Uzorak u vakuumiranoj vrećici stavi se na sredinu postolja unutar mikrovalne pećnice (Tristar Magnetron, model br. MW-2895K, Nizozemska) koja je prethodno podešena na snagu od 350 W. Tretmani mikrovalnim vakuumskim zračenjem trajali su 10 i 20 sekundi kako bi se postigle temperature od 45, odnosno 70 °C. Uzorcima su prije i nakon tretmana izmjerene vrijednosti temperature i pH.

3.2.3. Tretman pulsirajućim svjetlom

Aparatura i pribor:

- 1) Tehnička vaga (Kern & Sohn GmbH, D-72336, Balingen, Njemačka)
- 2) Uređaj za tretiranje pulsirajućim svjetlom (Xenon Cooperation, Model Z-1000 Pulsed light system, USA)
- 3) Petrijeve zdjelice
- 4) Pipeta od 10 mL
- 5) Metalna žlica
- 6) Plastične posude (urinarke)
- 7) Infracrveni termometar

Postupak rada:

Pripremljena vodena suspenzija pšeničnog posija (1,5 g pšeničnih posija i 4 mL destilirane vode) dobro se promiješa i ravnomjerno u tankom sloju rasporedi po sredini Petrijeve zdjelice. Petrijeva zdjelica sa uzorkom se postavlja na sredinu 5. police u uređaju za tretiranje pulsirajućim svjetlom i započinje tretman prema zadanim parametrima.

Cilj je bio postići sljedeće temperature uzoraka : 45, 70 i 90 °C te se prema tome određivalo optimalno trajanje tretmana za postizanje pojedine temperature. Za postizanje temperature od 45 °C potrebno je provoditi tretman pulsirajućim svjetlom 20 sekundi. U jednoj sekundi uređaj

proizvede tri svjetlosna pulsa. Za postizanje temperature od 70 °C potrebno je 120 sekundi, dok je za temperaturu uzorka od 90 °C potrebno 200 sekundi. Uzorcima su neposredno prije tretmana i nakon tretmana izmjerene vrijednosti temperature.

3.2.4. Liofilizacija

Aparatura i pribor:

- 1) Plastične posude (urinarke)
- 2) Liofilizator (Christ Alpha 1-4 LSC plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka)

Postupak rada :

Nakon tretmana ultrazvukom visokog intenziteta, mikrovalnim vakuumskim zračenjem i pulsirajućim svjetlom, uzorci su prenijeti u plastične posudice (urinarke) u debljini sloja od 1-2 cm te su smrznuti na - 80 °C do početka liofilizacije.

Proces liofilizacije traje 24 sata, odnosno dok temperatura uzorka ne postigne sobnu temperaturu. Osušeni uzorci su homogenizirani pomoću metalne žlice te su korišteni za ekstrakciju ukupnih fenolnih spojeva, određivanje aktivnosti polifenol oksidaze i udjela vode.

3.2.5. Određivanje udjela vode

Količina vode u pšeničnim posijama određuje se metodom AACC 44-19.01. Podatak količine vode u uzorcima je iskorišten za izračun dobivenih rezultata na masu suhe tvari pšeničnih posija.

Aparatura i pribor:

- 1) Metalna zdjelica s poklopcem
- 2) Sušionik (ST-01/02, Instrumentaria)
- 3) Eksikator sa silicagelom i indikatorom zasićenosti
- 4) Laboratorijska žlica
- 5) Analitička vaga (Kern & Sohn GmbH, ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)

Postupak rada:

U prethodno osušenu i izvaganu metalnu zdjelicu s poklopcem izvaže se $2 \pm 0,0005$ g uzorka. Za određivanje količine vode u uzorcima pšeničnih posija otvorena zdjelica s uzorkom i poklopcem se stavi u sušionik koji je zagrijan na $135\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 120 minuta. Nakon sušenja zdjelica s uzorkom se izvadi iz sušionika, pokrije poklopcem te se stavi na hlađenje u eksikator. Nakon hlađenja, zdjelica s uzorkom se izvaže. Za svaki uzorak rade se dvije paralele, a kao rezultat uzima se srednja vrijednost. Količina vode u uzorku prikazuje se u postocima, a računa se prema sljedećoj formuli:

$$Udio\ vode\ (\%) = \frac{(m_0 - m_1) * 100}{m_0} \quad [1]$$

gdje su :

m_0 = masa uzorka (g)

m_1 = masa uzorka nakon sušenja (g)

Dobiveni podaci o količini vode u uzorku koriste se za izračun udjela količine suhe tvari uzorka, koja se iskazuje u postocima, a računa se prema sljedećoj formuli:

$$Suha\ tvar\ (\%) = 100\% - udio\ vode\ (\%) \quad [2]$$

3.2.6. Određivanje aktivnosti polifenol oksidaze

Reagensi :

- 1) L-DOPA (L-dihidroksifenilalanin), 10 mM (Acros Organics, New Jersey, SAD)
- 2) Tween-20 (Polioksietilensorbitanmonolaurat) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- 3) MOPS (3-(N-morfolino) propansulfonskakiselina), 50 mM, pH=6,5 (Acros Organics, New Jersey, SAD)

Aparatura i pribor :

- 1) Analitička vaga (Kern &Sohn GmbH, ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)
- 2) Mikrocentrifuga (Thermo Fisher Scientific, MicroCL 21, Waltham, SAD)
- 3) Spektrofotometar (PERKIN ELMER Lambda UV/Vis/NIR, Waltham, Massachusetts, SAD)
- 4) pH metar s termometrom (Testo 206, Testo SE & Co. KGaA, Lenzkirch, Njemačka)
- 5) Vorteks tresilica (Vortex 4 basic, IKA, Njemačka)

- 6) Odmjerna tikvica 100 mL
- 7) Eppendorf epruvete
- 8) Mikrokivete za spektrofotometrijsko mjerenje

Postupak rada :

Aktivnost polifenol oksidaze određena je prema AACC 22-85.01 metodi. U Eppendorf epruvete odvagane se 50 mg uzorka te se dodaje po 1,5 mL L-DOPA reagensa. U epruvetu za slijepu probu ne dodaje se uzorak, već samo 1,5 mL L-DOPA otopine. Epruvete su stavljene na vorteks tresilicu u horizontalnom položaju 55 minuta, a nakon toga su centrifugirane u mikrocentrifugi na maksimalnoj brzini od 14000 o min^{-1} tijekom 5 minuta. Nakon centrifugiranja se 1 mL supernatanta otpipetira u mikrokivete te se aktivnost enzima određuje spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 475 nm.

3.2.7. Ekstrakcija slobodnih spojeva

Reagensi :

- 1) 80 %-tni etanol
- 2) Metanol (J.T. Baker, Nizozemska)

Aparatura i pribor :

- 1) Analitička vaga, (Kern & Sohn GmbH, ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)
- 2) Eppendorf epruvete
- 3) Vorteks tresilica (Vortex 4 basic, IKA, Njemačka)
- 4) Ultrazvučna kupelj (Bandelin Electronic RK 100 H, Sonrex, Njemačka)
- 5) Mikropipeta volumena 100 μL
- 6) Mikrocentrifuga (Thermo Fisher Scientific, MicroCL 21, Waltham, SAD)

Postupak :

U Eppendorf epruvete izvaže se $250 \text{ mg} \pm 0,5 \text{ mg}$ pojedinog uzorka te se dodaje 1 mL 80 %-tnog etanola. Uzorci se homogeniziraju na tresilici u horizontalnom položaju tijekom 10 minuta i zatim se stavljaju u ultrazvučnu kupelj na sobnu temperaturu 10 minuta. Po završetku ekstrakcije Eppendorf epruvete se vade iz kupelji te se stavljaju u mikrocentrifugu 15 minuta

na 8000 o min⁻¹. Supernatant iz mikroeprovete se pipetira u nove Eppendorf epruvete i podvrgne uparavanju pod dušikom uz grijanje na 40 °C. Ekstrakcija se ponovi još dva puta tako da se u zaostali talog iz prethodnog centrifugiranja doda 1 mL 80 %-tnog etanola. Supernatanti istog uzorka se nakon svakog centrifugiranja spajaju i stavljaju na uparavanje pod dušikom. Upareni uzorci spremaju se u zamrzivač na temperaturu od - 20 °C do analize. Za daljnju analizu dodaje se 200 µL metanola u uparene uzorke te se uzorci homogeniziraju na vorteks tresilici.

3.2.8. Određivanje sadržaja ukupnih polifenolnih spojeva

Metoda za određivanje udjela ukupnih polifenolnih spojeva temelji se na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s nekim reducirajućim reagensom (fenolima). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, a reagira s fenoksid ionom prisutnom u uzorku. Tijekom te reakcije dolazi do oksidacije fenoksid-iona, a Folin-Ciocalteu reagens se reducira do plavo obojenih volframovog i molibdenovog oksida (Singleton i sur., 1999a; Singleton i sur., 1999b). Tijekom reakcije koja traje dva sata, svi fenolni spojevi prisutni u uzorku izreagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom. Intenzitet nastalog plavog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 765 nm (Ough i Amerine, 1988), pri tome je intenzitet obojenja direktno proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva u ispitivanom uzorku (Singleton i Rossi, 1965).

Reagensi:

- 1) Folin-Ciocalteu reagens (Sigma-Aldrich, SAD)
- 2) 20 %-tna otopina natrijevog karbonata (Na₂CO₃) (Gram-mol, Hrvatska)

Aparatura i pribor:

- 1) Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 2) Mikropipete volumena 10-100 µL i 100-1000 µL
- 3) Spektrofotometar (PERKIN ELMER Lambda UV/Vis/NIR, Waltham, Massachusetts, SAD)

Postupak rada:

U kivete za spektrofotometrijsko mjerenje otpipetira se 400 µL destilirane vode, 20 µL ekstrakta i 100 µL Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 3 minute dodaje se 300 µL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata (Na₂CO₃) i 1180 µL destilirane vode. Slijepa proba priprema se na isti

način kao i uzorci koji se ispituju, samo što se umjesto 20 μL uzorka dodaje isti volumen metanola. Reakcijska smjesa u kivetama se dobro promiješa te se pripremljeni uzorci ostave 2 sata na sobnoj temperaturi u mraku, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm u odnosu na slijepu probu. Apsorbancija slijepe probe oduzima se od apsorbancije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata udjela ukupnih polifenola u uzorcima. Udio ukupnih polifenolanih spojeva izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje.

Jednadžba baždarne krivulje : $y = 0,7331x - 0,0199$ [3]

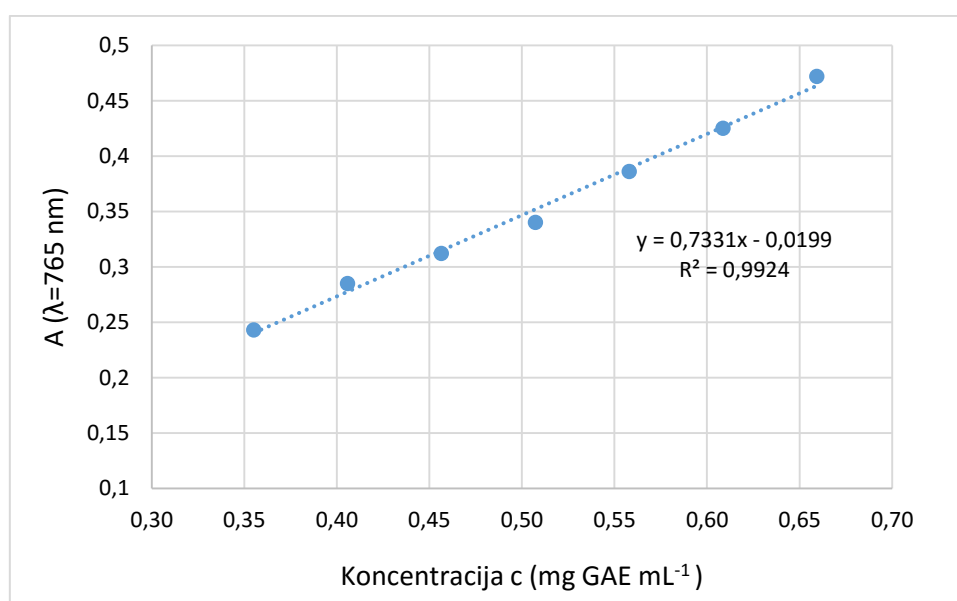
$$R^2 = 0,9924$$

gdje su:

x – koncentracija ukupnih polifenola (mg mL^{-1})

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm

Pomoću jednadžbe baždarne krivulje, koja je konstruirana za standard galne kiseline i koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg L^{-1}), određuje se udio ukupnih polifenola u ispitivanim uzorcima. Određivanje udjela ukupnih polifenolnih spojeva u uzorcima provedeno je u 3 paralele, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama, u mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) g^{-1} suhe tvari uzorka (Yu i sur., 2002). Za izradu baždarnog pravca prikazanog na slici 7 pripremljena je otopina galne kiseline u metanolu u sedam različitih koncentracija.



Slika 7. Baždarna krivulja za ukupne fenolne spojeve

3.2.9. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Određivanje antioksidacijske aktivnosti polifenolnih spojeva u uzorcima provedeno je DPPH (1,1 - difenil - 2 - pikrilhidrazil) i FRAP (eng. Ferric Reducing Antioxidant Power) metodama.

3.2.9.1. FRAP metoda

FRAP metoda se temelji na redukciji žuto obojenog kompleksa Fe (III) - TPTZ u intenzivno plavi kompleks Fe (II) - TPTZ pri niskoj pH vrijednosti. Reakcija se odvija u prisutnosti antioksidansa koji donira elektron. Apsorbancija se mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 593 nm pri kojoj kompleks pokazuje intenzivno obojenje (Benzie i Strain, 1996; Ou i sur., 2002). Intenzitet razvijene boje je proporcionalan redukcijskoj sposobnosti prisutnih antioksidansa.

Reagensi :

- 1) Trolox (6 - hidroksi - 2,5,7,8 tetrametilkroman - 2 - karbonska kiselina) (Sigma-Aldrich, SAD)
- 2) 20 mM otopina $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Hrvatska)
- 3) 10 mM otopina TPTZ (2,4,6-Tris (2 piridil)-s-triazin) (Alfa-Aesar, Njemačka)
- 4) 40 mM otopina klorovodične kiseline (Panreac, Španjolska)
- 5) 300 mM otopina acetatnog pufera

Aparatura i pribor :

- 1) Mikrokivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 2) Mikropipete volumena 10 - 100 μL i 100 - 1000 μL
- 3) Pipete (5 mL i 20 mL)
- 4) Spektrofotometar (PERKIN ELMER Lambda UV/Vis/NIR, Waltham, Massachusetts, SAD)

Postupak rada :

Smjesa koja sadrži 2,5 mL 20 mM $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 2,5 mL TPTZ u 40 mM HCl i 25 mL 300 mM acetatnog pufera naziva se FRAP reagens. FRAP reagens se neposredno prije upotrebe na temperaturu od 37 °C koja se nastoji održati. U mikrokiveti se pomiješa 20 μL uzorka i 1 mL FRAP reagensa, dok se slijepa proba priprema na isti način kao i ostali uzorci, osim što se

umjesto uzorka dodaje jednak volumen metanola. Po završetku četiri minutne reakcije, spektrofotometrijski se izmjeri apsorbanacija pri valnoj duljini od 593 nm. ApSORBANCIJU slijepe probe potrebno je oduzeti od apsorbanacije uzorka i tako dobivena vrijednost koristi se za izračunavanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka.

Jednadžba baždarne krivulje: $y = 19086x - 0,1376$ [4]

$$R^2 = 0,9918$$

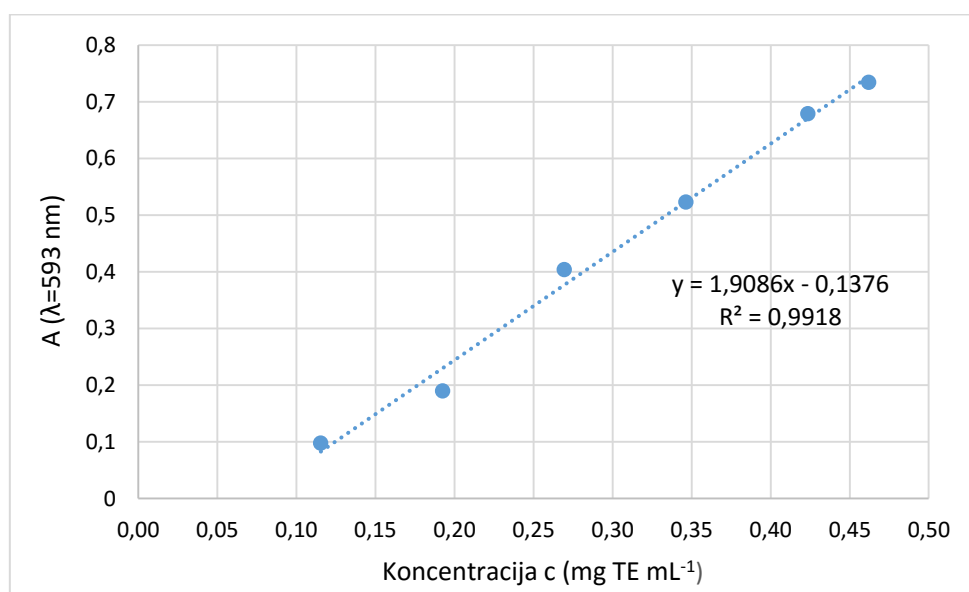
gdje su:

x – koncentracija standarda otopine Trolox-a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

y – izmjerene vrijednosti apsorbanacije pri 593 nm

Iz jednadžbe baždarne krivulje, koja je konstruirana za standard Troloxa i koja prikazuje ovisnost apsorbanacije o koncentraciji standarda (mg mL^{-1}), određuje se antioksidacijska aktivnost u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom provedeno je u tri paralele, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja sa pripadajućim standardnim devijacijama u μmol ekvivalenta Troloxa (TE) g^{-1} suhe tvari uzorka.

Za izradu baždarnog pravca (slika 8) pripremljena je otopina Troloxa (6–hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman- 2-karbonska kiselina) u metanolu u šest različitih koncentracija.



Slika 8. Baždarna krivulja za FRAP

3.2.9.2. DPPH metoda

DPPH metoda koristi se za određivanje antioksidativne aktivnosti spojeva prisutnih u ekstraktu. Metoda se temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u otopini metanola tijekom koje dolazi do kolorimetrijske reakcije, odnosno promjene boje otopine. DPPH radikal posjeduje nespareni elektron te zbog toga pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra pri valnoj duljini od 515 nm. U prisutnosti elektron donora -AH (antioksidans koji uklanja slobodne radikale) dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te se kao posljedica ljubičasta boje otopine promijeni u žutu boju. Promjena se određuje spektrofotometrijski mjerenjem apsorbcije u opadanju (Brand-Williams i sur., 1995).



Reagensi :

- 1) Trolox (6-hidroksi- 2, 5, 7, 8 tetrametilkroman -2- karbonska kiselina) (Sigma-Aldrich, SAD)
- 2) 0,06 mM otopina 2,2-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) (Sigma-Aldrich, SAD)
- 3) Metanol (J.T. Baker, Nizozemska)

Aparatura i pribor :

- 1) Mikropipeta volumena 100 μL
- 2) Analitička vaga (Kern & Sohn GmbH, ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)
- 3) Mikrokivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 4) Spektrofotometar (PERKIN ELMER Lambda UV/Vis/NIR, Waltham, Massachusetts, SAD)

Postupak rada :

Pripremi se 0,06 mM otopina 2,2 - difenil - 2- pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. U mikrokivetu za spektrofotometrijsko mjerenje otpipetira se 20 μL uzorka i doda 950 μL otopine DPPH, dok se mikrokivetu za slijepu probu otpipetira metanol umjesto istog volumena uzorka i uzorci se dobro promiješaju. Reakcija traje 30 minuta u mraku i nakon tog vremena spektrofotometrijski se izmjeri apsorbcija pri 517 nm. Apsorbancija se prvo odredi slijepoj probi koja umjesto uzorka sadrži 20 μL metanola i 950 μL otopine DPPH, a zatim i ostalim uzorcima. Vrijednost ΔA , koja je dobivena izračunom postotka redukcije, prema jednadžbi

baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a preračunava u koncentraciju (mmol Trolox-a).

Jednadžba baždarne krivulje: $y = 250,98x - 2,639$ [7]

$$R^2 = 0,984$$

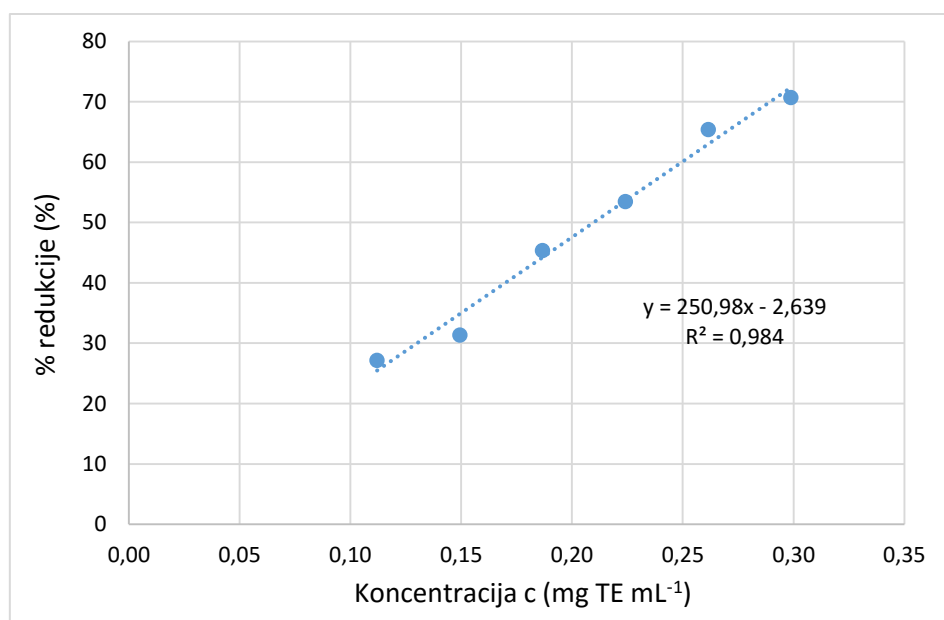
gdje su:

x – koncentracija standarda otopine Trolox-a (mmol L^{-1})

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 517 nm

Pomoću jednadžbe baždarne krivulje, koja je konstruirana za standard Trolox-a i koja prikazuje ovisnost postotka (%) redukcije o koncentraciji standarda (mg mL^{-1}), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom provedeno je u tri paralele, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u μmol ekvivalenta Troloxa (TE) g^{-1} suhe tvari uzorka.

Za izradu baždarnog pravca na slici 9 pripremljena je otopina Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) u metanolu u pet različitih koncentracija.



Slika 9. Baždarna krivulja za DPPH

3.2.10. Postupak pripreme smjese za 3D tisk

Aparatura i pribor :

- 1) Ručni mikser (Gorenje d.o.o, Model M350LBW, Slovenija)
- 2) Plastična posuda
- 3) Tehnička vaga (Kern & Sohn GmbH, D-72336, Balingen, Njemačka)
- 4) Metalna žlica
- 5) Infracrveni termometar
- 6) pH metar
- 7) Staklena menzura od 20 mL
- 8) Pipeta od 10 mL

Postupak rada :

Smjese su pripremljene prema recepturi u tablici 4.

Tablica 4. Receptura za snack proizvod

SASTOJCI	Masa ili volumen
Proteini graška	5 g
Kuhinjska sol (NaCl)	0,1 g
Natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO ₃)	0,15 g
Suncokretovo ulje	3 g
Tretirane pšenične posije	3 g
Voda (deionizirana)	21 mL
Zobeno brašno	15 g

Smjesa za 3D tiskani snack proizvod priprema se prema AACC 10-50.01 metodi uz određene preinake. U plastičnu posudu odvagane se 5 g proteina graška, 0,1 g kuhinjske soli, 0,15 g natrijevog hidrogenkarbonata i 3 g suncokretovog ulja te se sastojci miješaju ručnim mikserom 3 minute sporo. Nakon toga se u zamjes dodaju tretirane pšenične posije i ostatak vode te miješa mikserom 1 minutu sporo i 1 minutu brzo. Na kraju se dodaje 15 g zobenog brašna i ukupan

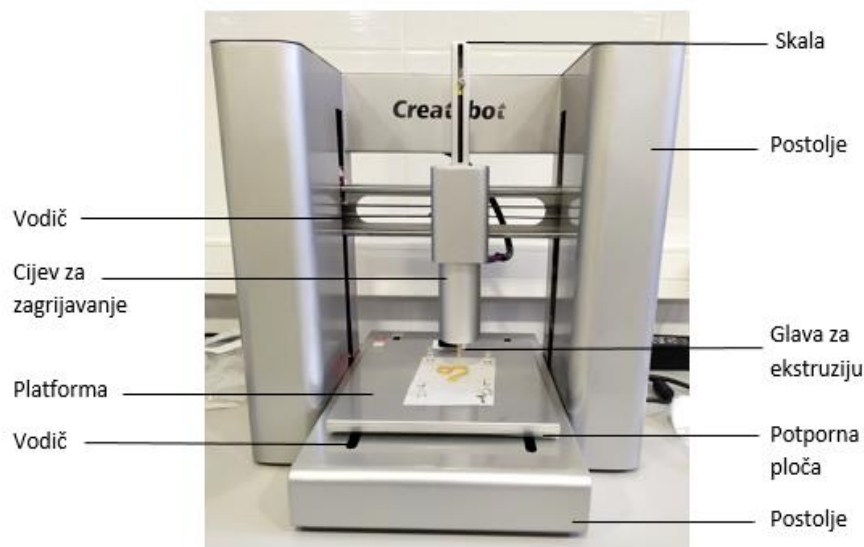
sadržaj plastične posude se miješa mikserom 2 minute sporo. Dobivenoj smjesi se mjeri temperatura i pH vrijednost prije i nakon tiskanja.

3.2.11. 3D tiskanje snack proizvoda

Aparatura i pribor :

- 1) 3D pisač (Createbot 3D Food Printer – Multi-Ingredient Support)
- 2) Infracrveni termometar
- 3) pH metar
- 4) Metalna špatula

Za trodimenzionalno tiskanje snack proizvoda korišten je 3D pisač prikazan na slici 10. Princip rada ovog 3D pisača temelji se na ekstruziji smjese. Neke od specifikacija navedenog uređaja su : brzina ispisa od 15 do 70 mm s⁻¹ veličina ispisa do maksimalno 150 × 150 × 70 mm te mogućnost podešavanja i održavanja temperature na koju se smjesa unutar spremnika zagrijava.



Slika 10. 3D pisač hrane Createbot

Postupak rada :

- 1) Priprema za tisak

Pripremljena smjesa se pomoću metalne špatule prebaci u plastičnu špricu koja se umeće u spremnik, odnosno u cijev za zagrijavanje te se odabire oblik i određuju postavke pisača.

2) Odabir oblika

Prije samog ispisa, u programu 3D pisača odabere se željeni 3D oblik. Odabran je oblik pod nazivom „heart (2)“ koji ima dvadeset slojeva, a ispis jednog oblika traje 6 minuta i 6 sekundi.

3) Postavke printanja

Prije početka tiskanja određuje se udaljenost mlaznice od podloge printera te se provjerava uspješnost ekstrudiranja pripremljene smjese i prohodnost mlaznice. Nakon odabranog željenog oblika, podešava se temperatura unutar spremnika, brzina tiskanja i udaljenost mlaznice od podloge. Odabrani su sljedeći parametri :

- Mlaznica promjera: 2,0 mm
- Udaljenost mlaznice od podloška: 2,0 mm
- Brzina tiskanja: 25 mm s⁻¹
- Temperatura: 20°C
- Trajanje tiskanja: 6 minuta i 6 sekundi
- Broj slojeva odabranog oblika: 20

4) Proces tiskanja

Za početak tiskanja, na ekranu printera odabere se naredba „print“. Budući da je vrijeme tiskanja jednog uzorka približno 6 minuta, iz svake pripremljene smjese tiskano je 10 uzoraka kako bi se lakše provelo mjerenje boje uzoraka svakih 10 minuta tijekom sat vremena. Na kraju svake serije, ostatku smjese koji nije istisnut mjerila se konačna temperatura i pH vrijednost.

3.2.12. Pečenje 3D tiskanih oblika

Aparatura i pribor :

- 1) Pekarski limovi
- 2) Etažna pećnica

Postupak rada:

Uzorci su nakon printanja i mjerenja boje poslagani na pekarski lim i stavljeni u etažnu pećnicu na pečenje. Pećnica je prethodno zagrijana na temperaturi predgrijavanja od 200 °C na gornjem i 160 °C na donjem grijaču. Pečenje se odvijalo pri temperaturi od 160 °C na gornjem grijaču i

140 °C na donjem grijaču tijekom 18 minuta. Uzorci su nakon pečenja ostavljeni na sobnoj temperaturi 30 minuta. Uzorcima koji su ohlađeni na sobnu temperaturu određene su masa i boja te točnost oblika.

Gubitak mase pečenjem je određen mjerenjem mase 3D tiskanog oblika prije i nakon toplinske obrade i izračunat je postotak (%) gubitka mase pečenjem prema formuli:

$$\text{Gubitak mase (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \quad [8]$$

gdje su:

m_1 – masa 3D oblika prije pečenja (g)

m_2 – masa 3D oblika nakon pečenja (g)

3.2.13. Određivanje parametara boje snack proizvoda nakon 3D tiskanja i nakon pečenja

Aparatura i pribor :

1) Kolorimetar (Konica Minolta CM-700d, Japan)

Određivanje parametara boje uzoraka trodimenzionalno tiskanih snack proizvoda provedeno je difuzno reflektirajućom spektrofotometrijom na kolorimetru. Mjerenjem su dobivene L^* , a^* i b^* vrijednosti čiji nelinearni odnosi imitiraju logaritamski odgovora ljudskog oka (CIE, 2004).

L^* vrijednost predstavlja osvjetljenje i pokazuje vrijednosti u rasponu od 1 do 100 dok parametri a^* i b^* predstavljaju dvije kromatske vrijednosti u rasponu od - 120 do 120 (Gökmen i Sügüt, 2007). Parametar a^* iskazuje pozitivne vrijednosti za crvenu te negativne vrijednosti za zelenu boju, dok parametar b^* iskazuje pozitivne vrijednosti za žutu boju, a negativne vrijednosti za plavu boju (Pathare i sur., 2013). ΔE pokazuje ukupnu promjenu boje, odnosno koliko neki proizvod odstupa od referentne boje, a vrijednosti parametra ΔE pokazuju sljedeće : 0 – 0,5 neznatna razlika, 0,5 - 1,5 postoji mala razlika, 1,5 – 3,0 razlika je primjetna, 3,0 – 6,0 značajna razlika, 6 - 12 velika razlika, > 12,0 vrlo velika razlika (Rimac Brnčić i sur., 2016).

Postupak rada

Prije mjerenja provedena je kalibracija kolorimetra pomoću čisto bijelog standarda (100 %-tna refleksija) te crnog valjka (0 % refleksije). Područje mjerenja boje podešeno je na vidljivi dio elektromagnetskog spektra, odnosno na valne duljine između 400 i 700 nm. Kako bi mjerenje bilo što točnije, boja uzoraka mjerila se na točno određenom mjestu sa bočne strane uzorka gdje

je površina bila najveća. Vrijednosti L^* , a^* i b^* određivane su svim isprintanim uzorcima neposredno nakon printanja i svakih sljedećih 10 minuta tijekom jednog sata te nakon pečenja uzoraka s ciljem utvrđivanja razlike u boji ovisno o proteklom vremenu i toplinskoj obradi.

Dobivene vrijednosti L^* , a^* i b^* koriste se za izračunavanje ukupne promjene boje ΔE prema sljedećoj formuli :

$$\Delta E = \sqrt{(L^*_A - L^*_B)^2 + (a^*_A - a^*_B)^2 + (b^*_A - b^*_B)^2} \quad [9]$$

L^*_A - svjetlina boje ispitivanog uzorka nakon vremena t

L^*_B - svjetlina boje ispitivanog uzorka nakon vremena t + 10 min

a^*_A - parametar boje ispitivanog uzorka nakon vremena t

a^*_B - parametar boje ispitivanog uzorka nakon vremena t + 10 min

b^*_A - parametar boje ispitivanog uzorka nakon vremena t

b^*_B - parametar boje ispitivanog uzorka nakon vremena t + 10 min

Promjena boje ΔE nakon tiskanja odnosi se na razliku u boji pojedinog 3D tiskanog oblika neposredno nakon tiskanja (u nultoj minuti) i nakon 60 minuta stajanja pri sobnoj temperaturi. S druge strane, promjena boje ΔE nakon pečenja označava promjenu boje pojedinog 3D oblika između šezdesete minute nakon tiskanja i nakon pečenja i hlađenja na sobnu temperaturu. Budući da je iz jednog punjenja šprice tiskano 10 uzoraka kojima su određivani parametri boje svakih 10 minuta, a za tiskanje jednog uzorka potrebno je 6 minuta i 6 sekundi, uzorci nisu stajali jednako vrijeme na sobnoj temperaturi prije pečenja. Prvi uzorak je stajao gotovo dva sata, dok je deseti po redu uzorak stajao sat vremena pri sobnoj temperaturi prije pečenja što potencijalno ima utjecaj na rezultat ukupne promjene boje nakon pečenja. Kako bi se ovaj utjecaj razlike u vremenu stajanja uzoraka na sobnoj temperaturi prije pečenja minimizirao, ubuduće bi uzorke po završetku mjerenja parametara boje (60 minuta nakon tiskanja) trebalo staviti na smrzavanje kako bi se smanjila aktivnost preostalog enzima PPO i time smanjio utjecaj na promjenu boje između završetka mjerenja i toplinskog tretmana pečenjem.

3.2.14. Određivanje preciznosti 3D tiskanja i točnosti oblika

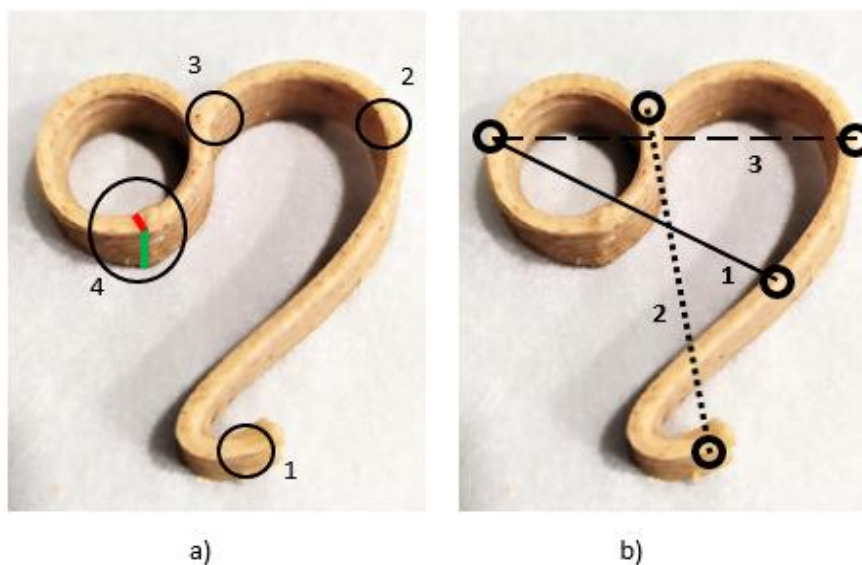
Aparatura i pribor :

1) Tehnička vaga (Kern & Sohn GmbH, D-72336, Balingen, Njemačka)

- 2) Skener (Canon Canoscan LIDE 220)
- 3) Analogno pomično mjerilo
- 4) Računalo i program ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>)

Postupak rada :

Kako bi se odredila kvaliteta tiska, uzorcima se neposredno nakon printanja mjerila masa na tehničkoj vagi. Uzorcima se također mjerila visina, linija debljine s gornje i s donje strane snack proizvoda te promjer s gornje i donje strane snack proizvoda nakon pečenja i hlađenja pomoću analognog pomičnog mjerila na točkama prikazanim na slici 11.

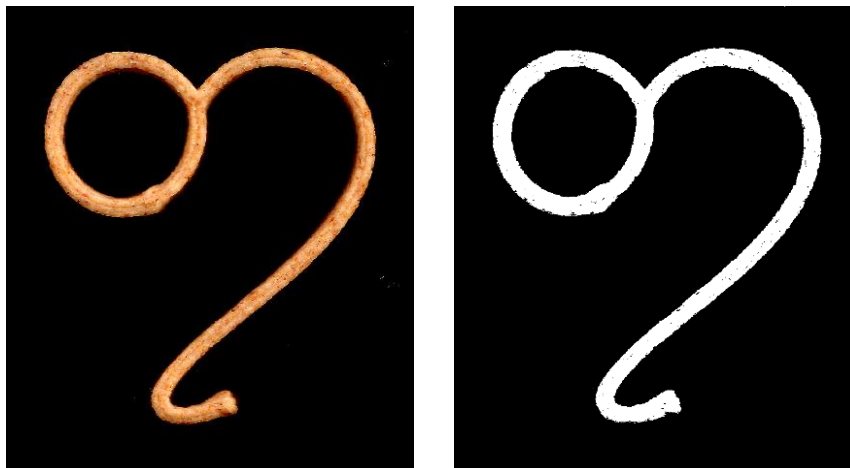


Slika 11. Prikaz točaka 3D tiskanog oblika na kojima su mjereni: a) debljina linije s gornje i donje strane (crvena linija) i visina oblika (zeleno polje) b) promjer s gornje i donje strane na tri različita načina.

Svaki uzorak je skeniran neposredno nakon tiskanja i ponovno nakon pečenja zbog daljnje obrade u računalnom programu ImageJ. Izgled pojedinih tiskanih i osušenih uzoraka se razlikovao od željenog stoga je cilj bio odrediti odstupanje pojedinog isprintanog od željenog oblika. Kako bi se odredilo odstupanje između isprintanog i željenog oblika 3D tiskanih snack proizvoda, provedena je obrada skeniranih fotografija, analiza i usporedba binarnih fotografija oblika u programu ImageJ.

Obrada skena (fotografije) opisana je u knjizi Broeke i sur. (2015), a započinje automatskim i ručnim uklanjanjem smetnji, zatim se podesi dimenzija i rezolucija fotografije te se odredi granična vrijednost za pretvaranje fotografije u boji u fotografiju u sivim tonovima i nakon toga

u binarnu fotografiju. Slika 12 prikazuje sken kojemu su uklonjene smetnje (sjene i mutni dijelovi) i binarnu crno-bijelo sliku tog skena. Binarna slika se najčešće koristi prilikom obrade fotografije jer omogućuje izdvajanje dijelova slike ili piksela od interesa korištenjem samo dvije boje, a to su najčešće crna i bijela boja, iako je moguće koristiti bilo koje dvije boje (Pole, 2016). Za prevođenje sivih fotografiju u binarnu, potrebno je odrediti graničnu vrijednost koji će pikseli biti označeni kao pozadina (1 ili 0, odnosno crno ili bijelo), a koji kao objekt (1 ili 0, odnosno crno ili bijelo). Vrijednosti koje su ispod određene granične vrijednosti svrstavaju se u jednu grupu (bijela boja), a vrijednosti iznad granične svrstavaju se u drugu grupu (crna boja). Objekti na slici su prikazani jednom bojom koju nazivamo prednja boja (engl. „foreground“), a ostali dio slike je prikazan drugom bojom koju nazivamo pozadinska boja (engl. „background“) dok je boja objekta binarno zapisana kao 1, a pozadinska boja kao 0 (Pole, 2016). Kod obrade skenova 3D tiskanih snack proizvoda, oblici su bili prikazani u bijeloj boji (1), a pozadina u crnoj boji (0).



Slika 12. Skenirana fotografija oblika (lijevo) i binarna fotografija skeniranog oblika (desno)

Na temelju odnosa broja bijelih piksela koji karakteriziraju oblik i ukupnog broja piksela fotografije zaključuje se koliko oblik svakog pojedinog snack proizvoda odstupa od željenog oblika i kolika je ponovljivost 3D tiska odnosno točnost oblika.

3.2.15. Statistička obrada podataka

Za statističku analizu i izradu grafičkih prikaza eksperimentalno dobivenih podataka korišten je Microsoft Office Excel 2013. Rezultati provedenih mjerenja izraženi su kao srednja vrijednost sa pripadajućom standardnom devijacijom, dok je za usporedbu uzoraka korištena analiza varijance (ANOVA) s Tukey post-hoc testom. Granica statističke značajnosti za dobivene rezultate postavljena je vrijednost za $p < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitan je utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta, mikrovalnog vakuumskeg zagrijavanja i pulsirajućeg svjetla na aktivnost polifenol oksidaze pšeničnih posija, udio ukupnih polifenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost pšeničnih posija.

Tijekom obrade uzoraka ranije navedenim metodama, došlo je do zagrijavanja uzoraka kao što je prikazano u tablici 5. Tretiranim uzorcima pšeničnih posija određena je aktivnost polifenol oksidaze koja je prikazana na slici 13. U ekstraktima tretiranih uzoraka pšeničnih posija također je određen udio ukupnih polifenola (TPC) što je prikazano na slici 14 te je određena antioksidacijska aktivnost pomoću DPPH (slika 15) i FRAP metode (slika 16). Promjena boje 3D tiskanog snack proizvoda pratila se mjerenjem neposredno nakon tiskanja te nakon 60 minuta i nakon termičke obrade pečenjem. Kako bi se odredila ponovljivost i preciznost tiskanja, svaki 3D tiskani snack proizvod je skeniran nakon tiskanja i nakon pečenja te je u ImageJ programu provedena obrada skeniranih oblika s ciljem utvrđivanja odstupanja od željenog oblika. Također, u svrhu određivanja ponovljivosti i točnosti tiska 3D snack proizvoda, svakom snack proizvodu je pomoću pomičnog mjerila na određenim točkama izmjerena visina, debljina na vrhu i dnu te promjer na vrhu i na dnu. Budući da su snack proizvodi nakon 3D tiskanja podvrgnuti termičkoj obradi, došlo je do gubitka vlage što je prikazano na slici 23.

4.1. Promjena temperature tijekom različitih načina obrade uzoraka

Tijekom obrade uzoraka pšeničnih posija ultrazvukom visokog intenziteta, mikrovalnim vakuumskeg zagrijavanjem i pulsirajućim svjetlom, mijenjao se vremenski interval djelovanja pojedinog tretmana kako bi se postigla željena temperatura uzoraka kako je prikazano u tablici 5.

Tablica 5. Prikaz vremenskih intervala i promjene temperature tijekom različitih tretmana

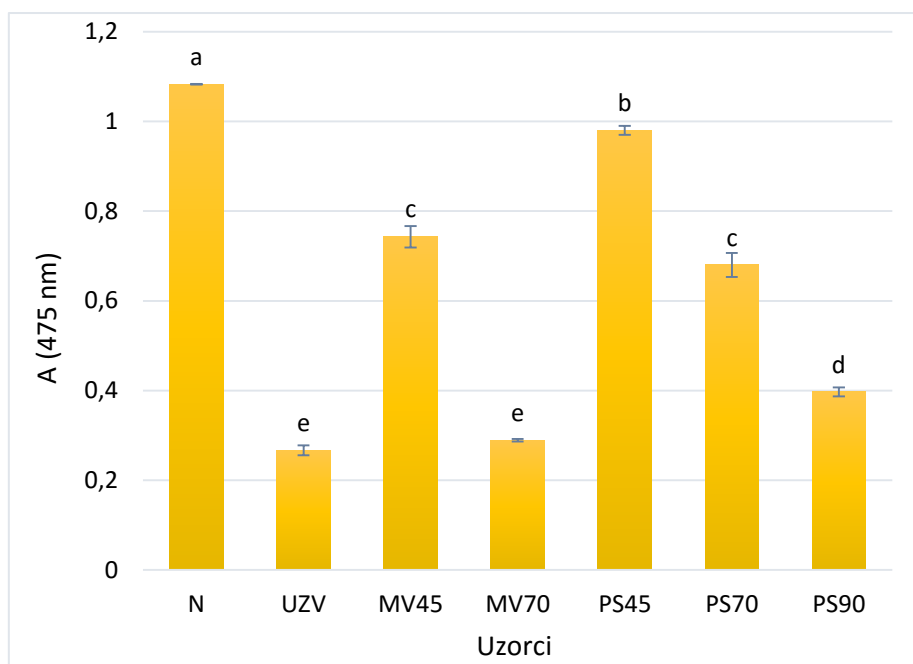
TRETMAN	UZORAK	t (s)	T ₁ (°C)	T ₂ (°C)
Ultrazvuk	UZV	149	21,3 ± 0,0	95,5 ± 0,5
Mikrovalno vakuumskeg zagrijavanje	MV45	10	20,3 ± 0,2	44,8 ± 0,2
Mikrovalno vakuumskeg zagrijavanje	MV70	20	21,1 ± 0,1	71,7 ± 1,2
Pulsirajuće svjetlo	PS45	25	19,0 ± 0,2	45,1 ± 0,5
Pulsirajuće svjetlo	PS70	80	19,8 ± 0,4	71,4 ± 2,4
Pulsirajuće svjetlo	PS90	125	19,2 ± 0,3	91,2 ± 2,6

Rezultati iz tablice 5 pokazuju da je temperatura svih uzoraka na kraju tretmana veća od njihove početne temperature što je i očekivano s obzirom na upotrijebljene metode obrade. Prolaskom ultrazvuka visokog intenziteta kroz tekući medij dolazi do pojave kavitacije pri čemu se stvaraju tzv. „mikropodručja“ s ekstremno visokom temperaturom i tlakom (Herceg, 2009) što pridonosi ukupnom zagrijavanju uzorka podvrgnutog ultrazvučnom tretmanu. Mikrovalno zagrijavanje, koje je pogodno za namirnice koje sadrže znatnu količinu vode, temelji se na dielektričnom i ionskom mehanizmu (Lovrić, 2003) te zbog toga dolazi do zagrijavanje vodene suspenzije pšeničnih posija koje su izložene mikrovalnom zračenju. Zahvaljujući fototermičkom učinku pulsirajućeg svjetla, dolazi do apsorpcije bljeskova svjetla u površinskom sloju (Rimac Brnčić, 2009), a time i do zagrijavanja izloženog površinskog sloja što dovodi do povećanja temperature uzoraka.

Tijekom tretmana se mijenjalo vrijeme obrade kako bi se odredilo optimalno vrijeme obrade za postizanje željenih konačnih temperatura uzoraka od 45, 70 i 90 °C. Prema rezultatima iz tablice 5 vidljivo je da se dužim vremenskim intervalom obrade postiže veća temperatura uzoraka. Za postizanje određene temperature kod različitih tretmana potreban je različiti vremenski interval zbog toga što su tretirani uzroci suspenzije pšeničnih posija bili različitih koncentracija i zbog razlike u mehanizmima zagrijavanja primijenjenih tretmana obrade.

4.2. Aktivnost polifenol oksidaze

Polifenol oksidaza je enzim koji katalizira oksidaciju fenolnih spojeva pri čemu nastaje pigment melanin te dolazi do nepoželjnog posmeđivanja pšeničnih proizvoda. Ultrazvukom visokog intenziteta, mikrovalnim vakuumskim zagrijavanjem i pulsirajućim svjetlom nastojalo se inaktivirati PPO u što većoj mjeri kako bi krajnji 3D tiskani snack proizvod što manje posmeđio i bio poželjan potrošačima. Rezultati aktivnosti PPO nakon pojedinih tretmana određeni su spektrofotometrijski mjerenjem apsorpcije na 475 nm i prikazani su na slici 13.



Slika 13. Aktivnost polifenol oksidaze uzoraka vodenih suspenzija pšeničnih posija tretiranih različitim tretmanima i uvjetima tretmana. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p < 0,05$)

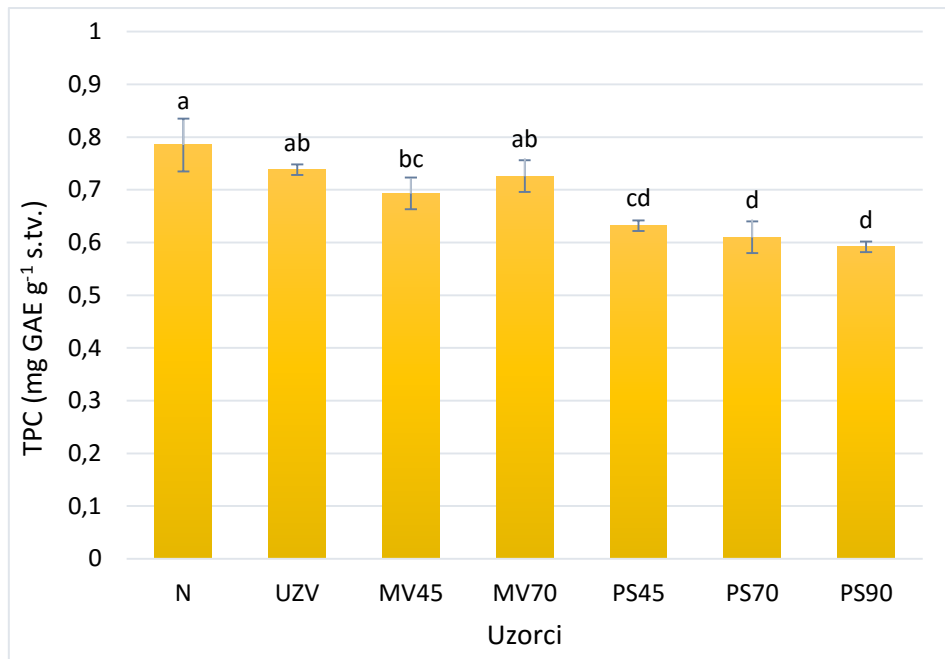
Prema slici 13 vidljivo je da najveću aktivnost PPO pokazuje kontrolni, odnosno nativni uzorak pšeničnih posija koji nije bio tretiran. Najmanju aktivnost PPO pokazao je uzorak tretiran ultrazvukom visokog intenziteta, a od preostalih tretiranih uzoraka najveću aktivnost PPO pokazao je uzorak tretiran pulsirajućim svjetlom do temperature od 45 °C. Svi tretirani uzorci se značajno ($p < 0,05$) razlikuju u odnosu na netretirani (nativni) uzorak te se tretmani međusobno značajno razlikuju ($p < 0,05$) prema apsorbanciji na 475 nm, odnosno prema aktivnosti PPO u odnosu jedan na drugog, osim UZV i MV45 čija međusobna razlika statistički nije značajna ($p > 0,05$). Iz svake grupe tretmana odabran je onaj tretman koji se pokazao najučinkovitijim za inaktivaciju enzima PPO, dakle UZV, MV70 i PS90 te su tim tretmanima obrađene pšenične posije koje su prema recepturi dodavane u smjesu za 3D tiskani snack proizvod.

Inaktivacija PPO djelovanjem ultrazvuka u skladu je sa istraživanjem Niu i sur. (2014) koji su koristili ultrazvuk u kombinaciji s askorbinskom kiselinom kako bi spriječili enzimsko posmeđivanje rezanaca od integralnog brašna uzrokovano katalitičkom aktivnošću PPO. Habuš i sur. (2021) su istraživali utjecaj veličine čestica pšeničnih posija, amplitude i vremenskog intervala tretmana ultrazvukom visokog intenziteta na aktivnost PPO pristune u pšeničnim posijama. Zaključili su da je za najznačajniju redukciju aktivnosti PPO, uz očuvanje

antioksidacijske aktivnosti i udio ukupnih polifenola, potrebno fino usitniti pšenične posije na veličinu čestica od 10 μm te ih podvrgnuti tretmanu ultrazvukom visokog intenziteta amplitude 60-100% u vremenskom intervalu 10-15 minuta. S druge strane, utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na PPO, koja je prirodno prisutna u žitaricama, ovisi o vrsti žitarica jer Čukelj Mustač i sur. (2019) u svom radu navode da tretman ultrazvukom visokog intenziteta dovodi do aktivacije PPO prisutnih u posijama prosa. Rezultati za inaktivaciju PPO mikrovalnim zagrijavanjem u skladu su sa istraživanjem Benlloch-Tinoco i sur. (2013) u kojem su uspješno smanjili aktivnost enzima PPO na željenu razinu u voćnom pireu kivija. U istraživanju utjecaja pulsirajućeg svjetla na svojstva svježe narezanih gljiva (Oms-Oliu i sur., 2010b) zaključeno je da se zbog ubrzanog procesa razgradnje stvara mogućnost kontakta fenolnih spojeva iz gljiva s PPO te time dolazi do povećane aktivnosti PPO i pospješnog procesa posmeđivanja. S druge strane, Ramos-Villarroel i sur. (2011) zaključili su da se kombinacijom pulsirajućeg svjetla i spojeva koji spriječavaju posmeđivanje može spriječiti enzimsko posmeđivanje uzrokovano enzimom PPO. Zbog nedosljednosti dvaju spomenutih istraživanja, Manzocco i sur. (2013) su proveli istraživanje kojim su dokazali da se inaktivacija PPO može postići pulsirajućim svjetlom zahvaljujući izazivanju strukturnih promjena unutar proteina što uvelike ovisi o samoj koncentraciji proteina, odnosno enzima PPO.

4.3. Udio ukupnih polifenolnih spojeva i antioksidacijska aktivnost u uzorcima pšeničnih posija nakon različitih tretmana

Na slici 14 prikazani su udjeli ukupnih polifenolnih spojeva u netretiranim i tretiranim uzorcima pšeničnih posija.

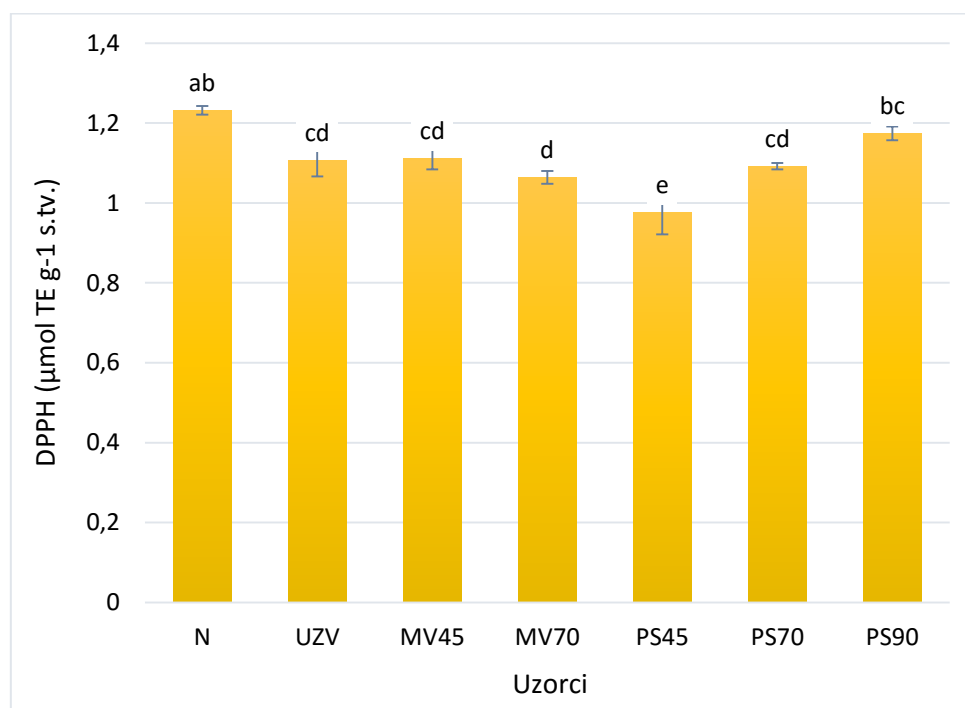


Slika 14. Udio ukupnih polifenola (mg GAE g⁻¹ s. tv.) u nativnim i tretiranim uzorcima pšeničnih posija. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p < 0,05$)

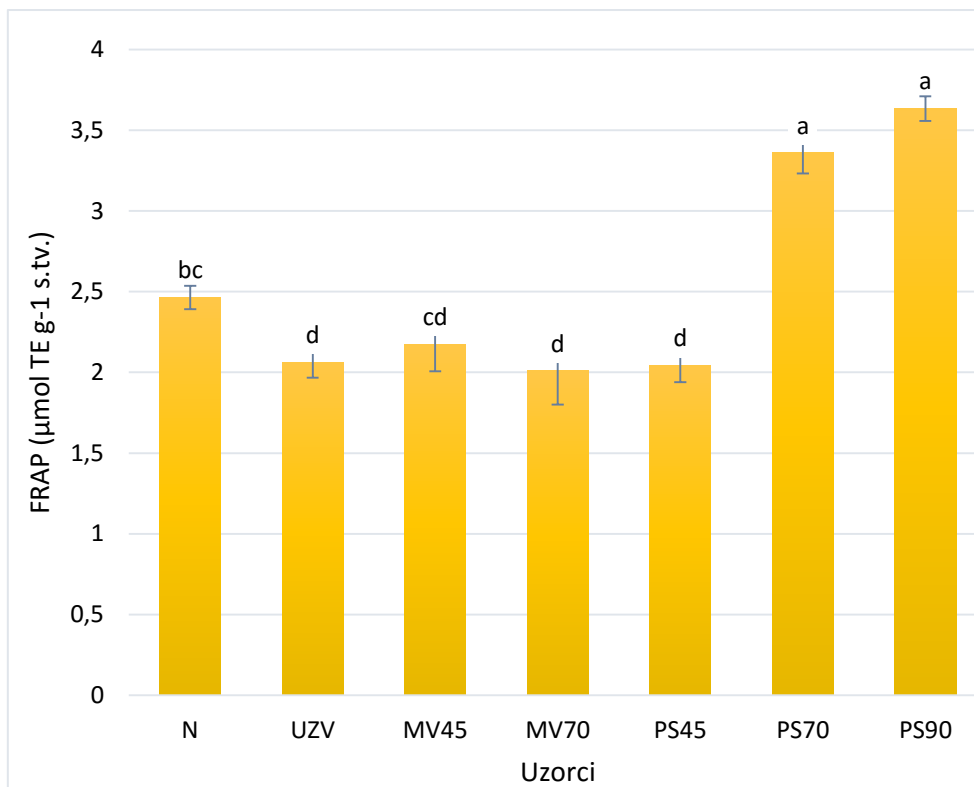
Prema slici 14 udio ukupnih polifenola (TPC) u uzorcima pšeničnih posija nakon tretmana ultrazvukom, mikrovalnim vakuumskim zagrijavanjem i pulsirajućim svjetlom smanjio se u odnosu na kontrolni netretirani uzorak čiji je udio ukupnih polifenola najveći. Razlika u udjelu ukupnih polifenola između netretiranih posija i posija tretiranih ultrazvukom te mikrovalnim vakuumskim zagrijavanjem na temperaturu od 70 °C statistički nije značajna ($p > 0,05$). Preostali tretmani (MV70, PS45, PS70 i PS90) statistički se razlikuju ($p < 0,05$) od netretiranog kontrolnog uzorka prema udjelu ukupnih polifenolnih spojeva. Razlika u udjelu ukupnih polifenola između uzoraka MV45 i PS45 te PS45, PS70 i PS90 nije statistički značajna ($p > 0,05$). Tijekom tretmana ultrazvukom visokog intenziteta dolazi do zagrijavanja uzorka zbog fenomena kavitacije, a time i do djelomične degradacije polifenolnih spojeva u uzroku (Chandrasekara i sur., 2012). U istraživanju Habuš i sur. (2021) tretmanom ultrazvuka visokog intenziteta smanjen je udio ukupnih polifenola na otprilike 8 % vrijednosti udjela ukupnih polifenola nativnih posija što se približno slaže s rezultatima u ovom radu gdje je udio ukupnih polifenola uzorka tretiranog ultrazvukom visokog intenziteta smanjen na 6 % vrijednosti udjela ukupnih fenola netretiranog uzorka. Na slici 14 je vidljivo da kod uzoraka tretiranih pulsirajućim svjetlom također dolazi do smanjenja udjela ukupnih polifenola s povećanjem temperature uzoraka. Murugesan i sur. (2012) proveli su istraživanje utjecaja pulsirajućeg UV svjetla na udio ukupnih polifenolnih spojeva bazge. Rezultati su pokazali da pri određenim uvjetima

tretimana pulsirajućim svjetlom dolazi do povećanja vrijednost TPC u odnosu na netretirani uzorak. Još uvijek nije u potpunosti razjašnjeno dolazi li do povećanja TPC u uzorku bazge isključivo zbog utjecaja pulsirajućeg svjetla ili i zbog utjecaja toplinskog stresa do kojeg dolazi zagrijavanjem tijekom tretmana pulsirajućim svjetlom. Tijekom mikrovalnog vakuumske zagrijavanja također dolazi do povećanja temperature uzoraka, ali prema slici 14 porast temperature uzorka ne može se povezati sa smanjenjem udjela ukupnih polifenola. Do povećanja ili smanjenja razvoja sekundarnih metabolita u uzorku kao što su npr. fenolni spojevi može doći zbog učinka toplinskog stresa do kojeg dolazi zagrijavanjem uzorka (Murugesan i sur., 2012). Od tretiranih uzoraka najveći udio ukupnih polifenola pokazuje uzorak MV70 (0,738 mg GAE g⁻¹ s. tv.) dok najmanji udio pokazuje uzorak PS90 (0,532 mg GAE g⁻¹ s. tv.)

Na slikama 15 i 16 prikazani su rezultati za antioksidacijski kapacitet ekstrakta netretiranih i tretiranih uzoraka pšeničnih posija. Antioksidacijski kapacitet je određen pomoću DPPH i FRAP metode.



Slika 15. Antioksidacijski kapacitet ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$ s. tv.) određen DPPH metodom u nativnom uzorku i tretiranim uzorcima pšeničnih posija. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p < 0,05$).



Slika 16. Antioksidacijska aktivnost ($\mu\text{mol TE g}^{-1} \text{ s. tv.}$) određena FRAP metodom u nativnom uzorku i tretiranim uzorcima pšeničnih posija. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p < 0,05$).

Iz rezultata antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom prikazanih na slici 15, može se vidjeti da je antioksidacijska aktivnost tretiranih uzoraka manja od netretiranog kontrolnog uzorka. Razlika tretiranih uzoraka u odnosu na netretirani uzorak je statistički značajna ($p < 0,05$) za sve tretirane uzorke, osim tretmana PS90 čija razlika u odnosu na netretirani uzorak nije statistički značajna ($p > 0,05$). U odnosu na vrijednost uzorka UZV, statistički značajno se razlikuju rezultati za N i PS45 uzorak. Uspoređujući vrijednost uzorka MV45 sa ostalima na slici 15, uzorci N i PS45 statistički se značajno razlikuju od navedenog uzorka MV45. U odnosu na uzorak MV70, statistički značajno se razlikuju rezultati uzorka N, PS45 i PS90. Osim prethodno navedenih statistički značajnih razlika s uzorkom PS45, uzorak se statistički značajno ($p < 0,05$) razlikuje i od uzorka PS70 i PS90. Od tretiranih uzoraka, najveću vrijednost antioksidacijske aktivnosti pokazuje uzorak PS90 ($1,174 \mu\text{mol TE g}^{-1} \text{ s. tv.}$) dok uzorak PS45 pokazuje najmanju vrijednost antioksidacijske aktivnosti ($0,976 \mu\text{mol TE g}^{-1} \text{ s. tv.}$).

Antioksidacijski kapacitet je, osim DPPH metodom, određen i FRAP metodom. Rezultati FRAP metode su prikazani na slici 16 te je vidljivo da, za razliku od rezultata dobivenih DPPH metodom, najveću vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ima tretirani uzorak PS90 (3,634 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ s. tv.). Vrijednost antioksidacijske aktivnosti netretiranog uzorka N, koja je određena FRAP metodom, je manja i statistički se značajno razlikuje od vrijednosti za uzorke PS70 i PS90, čije se vrijednosti također statistički značajno razlikuju od preostalih uzoraka. Vrijednost N uzorka ne razlikuje se značajno ($p > 0,05$) od uzorka MV45, dok se od preostalih uzoraka razlikuje statistički značajno ($p < 0,05$). Vrijednost antioksidacijskog kapaciteta uzorka MV45 statistički se razlikuje od uzoraka N, PS70 i PS90. Između vrijednosti uzoraka UZV, MV45, MV70 i PS45 ne postoji statistički značajna razlika. Najmanju antioksidacijsku aktivnost pokazao je uzorak MV70 (2,01 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ s. tv.).

Od tretiranih uzoraka, uzorak PS90 pokazuje najveću antioksidacijsku aktivnosti određenu DPPH i FRAP metodom u odnosu na native pšenične posije. U istraživanju utjecaja pulsirajućeg svjetla na plodove smokve, Rodov i sur. (2012) zaključili su da je udio fenolnih spojeva u plodovima koji su tretirani pulsirajućim svjetlom veći od udjela u netretiranim plodovima. Povećan udio fenolnih spojeva u tretiranim plodovima smokve može se objasniti prisutnošću fenilpropanoide čije se formiranje povezuje sa stresom tijekom izlaganja tretmanu pulsirajućim svjetlom. Također, izlaganje UV svjetlosti povećava sintezu nekih vrsta flavonida u različitim biljnim vrstama kao mjeru zaštite protiv štetnog UV-B zračenja (Avalos Llano i sur., 2016). Budući da su fenolni spojevi jedni od nosioca antioksidacijske aktivnosti, nastanak fenilpropanoide tijekom tretmana pulsirajućim svjetlom objašnjava značajnu antioksidativnu aktivnost uzorka PS90. U istraživanju utjecaja mikrovalnog zagrijavanja na džem od ribizla (Curi i sur., 2016) pokazano je da zagrijavanje u mikrovalnoj pećnici male snage ima pozitivan učinak na antioksidacijsku aktivnost džema koja se tretiranjem povećala u odnosu na netretirani uzorak džema. Također, u istraživanju Mahieddine i sur. (2018) gdje je istražen učinak mikrovalnog zagrijavanja na antioksidacijsku aktivnost rajčice, antioksidacijska aktivnost nakon tretmana se povećala u odnosu na netretiranu rajčicu što se pripisuje povećanju dostupnosti određenih spojeva koji pridonose antioksidacijskoj aktivnosti. Tijekom izvođenja eksperimenta korišteno je mikrovalno vakuum zagrijavanje koje prema Song i sur. (2018) pokazuje bolje očuvanje antioksidacijskih spojeva u odnosu na klasično mikrovalno zagrijavanje. Suprotno od navedenih istraživanja, uzorak MV70 pokazuje najmanju vrijednost antioksidacijske aktivnosti prema nativnom uzorku pšeničnih posija.

Prema rezultatima prikazanim na slikama 14,15 i 16 ne postoji pozitivna i značajna korelacija između rezultata dobivenih za TPC, DPPH i FRAP vrijednosti tretiranih uzoraka.

4.4. Promjena boje snack proizvoda

Određivanje boje provedeno je mjerenjem parametara boje L^* , a^* i b^* za 10 tiskanih uzoraka iz svakog punjenja šprice, dakle ukupno 20 tiskanih uzoraka za svaku vrstu smjese. U tablici 6 nalaze se srednje vrijednosti L^* , a^* i b^* parametara boje i srednje vrijednosti ukupne promjene boje ΔE koja se računa na temelju parametara L^* , a^* i b^* . Podaci u tablici su podijeljeni u dvije skupine: a) nakon 3D tiskanja što podrazumijeva vrijednosti parametara boje L^* , a^* i b^* 60 minuta nakon tiska i vrijednost ΔE između parametara boje neposredno nakon tiska (nulta minuta) i 60 minuta nakon ispisa te b) nakon pečenja što podrazumijeva određivanje parametara boje uzoraka nakon pečenja, a vrijednost ΔE se računa iz razlike parametara boje neposredno prije pečenja (šezdeseta minuta od tiska) i nakon pečenja. U tablici 6 prikazani su i međusobno uspoređeni podaci srednjih vrijednosti parametara L^* , a^* , b^* i ΔE za 1. i 2. punjenje jednakih smjesa nakon 3D tiskanja i nakon pečenja.

Tablica 6. Utjecaj punjenja smjese na srednje vrijednosti L^* , a^* , b^* i ΔE ovisno o tretmanu.

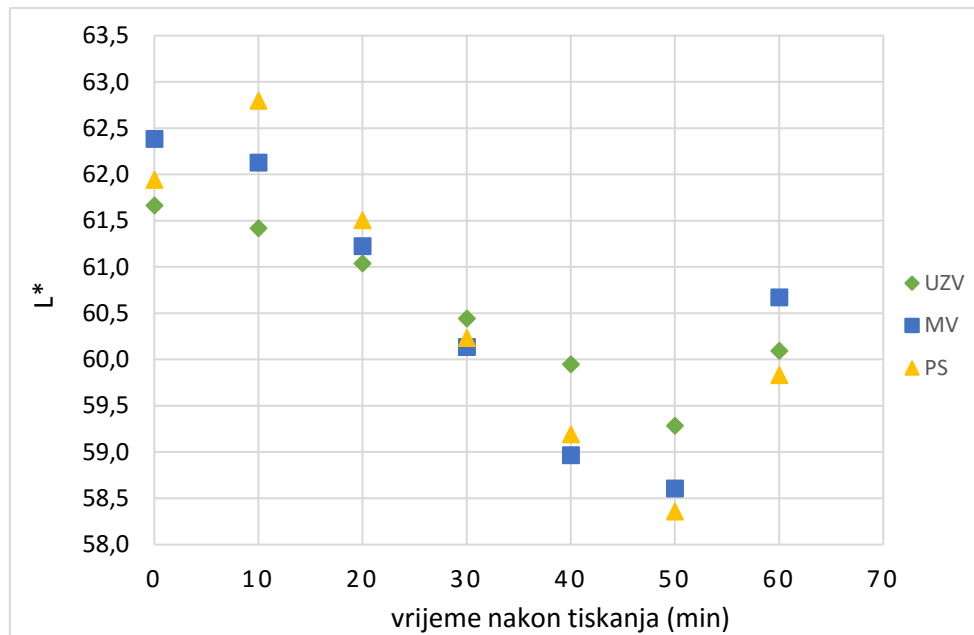
Srednje vrijednosti označene različitim slovima unutar istog reda za pojedinu smjesu se značajno razlikuju ($p < 0,05$)

	TRETMANI :					
	UZV		MV		PS	
	1. punjenje	2. punjenje	1. punjenje	2. punjenje	1. punjenje	2. punjenje
a) NAKON 3D TISKANJA						
L*	60,00 ± 0,63 ^a	60,20 ± 0,87 ^a	60,45 ± 1,49 ^a	60,90 ± 1,22 ^a	60,14 ± 1,10 ^a	59,53 ± 1,25 ^a
a*	4,27 ± 0,12 ^a	4,22 ± 0,26 ^a	4,37 ± 0,68 ^a	4,29 ± 0,19 ^a	4,60 ± 0,23 ^a	4,41 ± 0,28 ^a
b*	16,25 ± 0,45 ^a	16,46 ± 0,58 ^a	16,60 ± 0,88 ^a	15,79 ± 0,76 ^b	16,72 ± 0,26 ^a	15,50 ± 1,05 ^b
ΔE	1,84 ± 0,56 ^a	2,13 ± 0,63 ^a	2,28 ± 0,54 ^a	2,59 ± 0,86 ^a	2,58 ± 0,46 ^a	2,83 ± 0,59 ^a
b) NAKON PEČENJA						
L*	58,06 ± 0,44 ^a	58,11 ± 0,56 ^a	58,82 ± 0,76 ^a	58,14 ± 0,78 ^a	58,50 ± 0,76 ^a	59,09 ± 0,99 ^a
a*	5,47 ± 0,29 ^a	5,60 ± 0,24 ^a	4,88 ± 0,47 ^a	5,10 ± 0,49 ^a	5,37 ± 0,55 ^a	4,92 ± 0,57 ^a
b*	17,74 ± 0,42 ^a	17,91 ± 0,47 ^a	17,21 ± 0,47 ^a	17,65 ± 0,51 ^a	17,82 ± 0,99 ^a	17,90 ± 1,36 ^a
ΔE	2,84 ± 0,56 ^a	3,01 ± 0,57 ^a	2,22 ± 1,09 ^a	3,53 ± 1,18 ^b	2,70 ± 0,91 ^a	2,82 ± 0,97 ^a

U tablici 6 su prikazane srednje vrijednosti parametara koje su određene na 10 tiskanih oblika iz svakog punjenja. Za smjesu UZV ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0,05$) između 1. i 2. punjenja za vrijednosti L^* , a^* , b^* i ΔE nakon 3D tiskanja i nakon pečenja. Statistički značajna razlika između 1. i 2. punjenja smjese MV postoji za parametar b^* nakon 3D tiskanja i parametar ΔE nakon pečenja. Između 1. i 2. punjenja smjese PS postoji statistički značajna razlika između parametra b^* nakon 3D tiskanja.

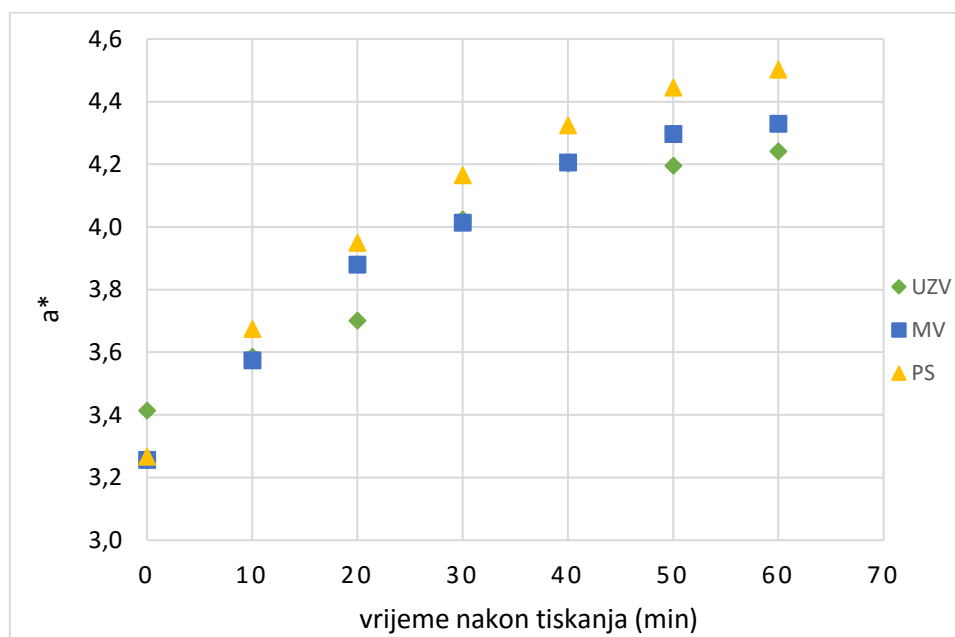
Srednja vrijednost oba punjenja (ukupno 20 uzoraka) pokazala je da ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0,05$) L^* , a^* i b^* vrijednosti između smjesa UZV, MV i PS nakon 3D tiskanja. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) očituje se za ukupnu promjenu boje ΔE nakon tiskanja za uzorke UZV i PS. Najveću ukupnu promjenu boje 60 minuta nakon tiskanja pokazuje PS ($2,71 \pm 0,55$), a najmanju smjesa UZV ($1,99 \pm 0,61$). Iako su tiskani tjesteni komadi stajali različito vrijeme na sobnoj temperaturi, niska vrijednost standardne devijacije ukazuje da su bili ujednačene boje. Nakon pečenja, statistički značajnu razliku za L^* vrijednost pokazali su oblici tiskani iz smjesa PS i UZV, dok za isti parametar razlika između MV i PS te MV i UZV smjese nije statistički značajna. Vrijednost parametra boje a^* nakon pečenja statistički se razlikuje između smjesa UZV i MV te UZV i PS, dok između smjesa MV i PS ne postoji statistički značajna razlika za dati parametar. Razlika između vrijednosti parametara b^* i ΔE svih triju smjesa statistički nije značajna ($p < 0,05$). 3D tiskani snack proizvod je nakon toplinske obrade pečenjem tamniji, žući i crveniji u odnosu na 3D snack proizvod nakon tiskanja, odnosno prije toplinske obrade.

Utjecaj dodavanja različito tretiranih pšeničnih posija u smjese za 3D tiskanje na promjenu parametara boje L^* , a^* i b^* uzoraka nakon tiskanja i tijekom stajanja na sobnoj temperaturi grafički je prikazan na slikama 17, 18 i 19 s ciljem zornijeg prikaza promjene navedenih parametra boje u ovisnosti o vremenu. Vrijednosti parametara boje prikazane na sljedećim slikama odnose se na srednje vrijednosti 20 uzoraka tiskanih iz pojedinih smjesa. L^* , a^* i b^* vrijednosti su izmjerene neposredno nakon tiskanja te svakih sljedećih 10 minuta unutar vremenskog intervala od 60 minuta.



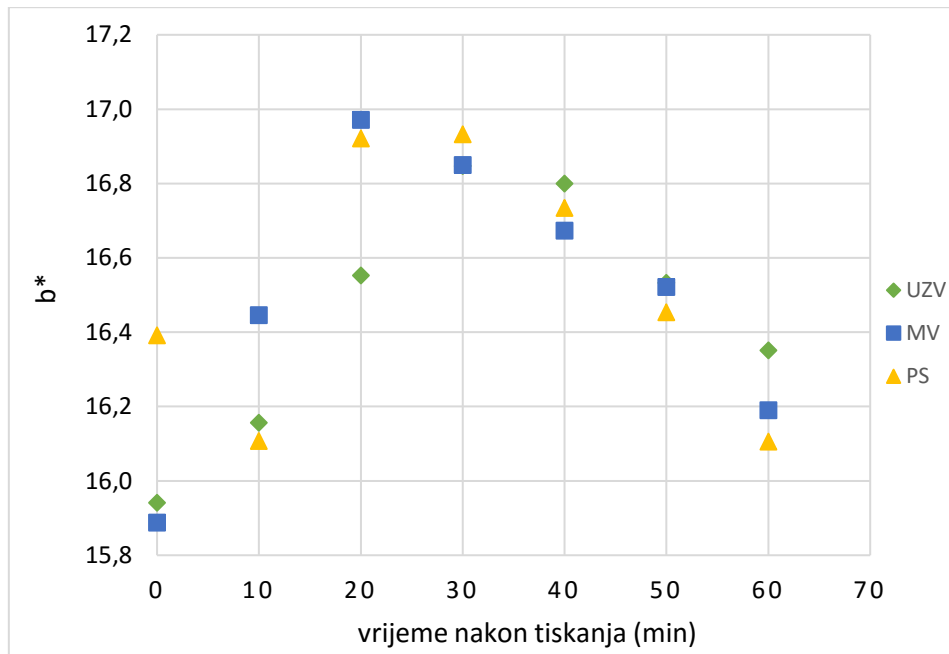
Slika 17. Promjena vrijednosti parametra boje L^* tijekom 60 minuta nakon tiskanja (srednja vrijednost od dva punjenja, $n=20$)

Parametar boje L^* označava svjetlinu, a smanjenje vrijednosti L^* označava tamnjenje 3D tiskanog oblika. Na slici 17 je vidljivo da vrijednost parametra L^* za sve smjese najmanja u pedesetoj minuti. Uzorcima tiskanim iz svih triju smjesa zajednički je porast L^* vrijednosti između pedesete i šezdesete minute od tiskanja što je moguća posljedica isušavanja, odnosno gubitka vlage stajanjem uzoraka na sobnoj temperaturi.



Slika 18. Promjena vrijednosti parametra boje a^* tijekom 60 minuta nakon tiskanja (srednja vrijednost od dva punjenja, $n=20$)

Parametar boje a^* predstavlja indikator crvenila promatranih 3D tiskanih uzoraka. Na slici 18 je vidljivo da vrijednost parametra a^* za 3D uzorke tiskane iz svih triju smjesa bilježi porast između nulte i šezdesete minute nakon tiska što ukazuje na povećanje izraženosti crvene boje 3D tiskanih uzoraka stajanjem pri sobnoj temperaturi.



Slika 19. Promjena vrijednosti parametra boje b^* tijekom 60 minuta nakon tiskanja (srednja vrijednost od dva punjenja, $n=20$)

Parametar boje b^* predstavlja indikator žutila promatranih 3D tiskanih uzoraka. Na slici 19 je vidljiv trend porasta i smanjenja vrijednosti parametra b^* koji je zajednički iako nešto drukčiji između uzoraka tiskanih iz različitih smjesa tijekom stajanja na sobnoj temperaturi u vremenskom intervalu od 60 minuta. Svim uzorcima tiskanih iz triju različitih smjesa zajednički je rast pa je smanjenje vrijednosti parametra boje b^* , odnosno izraženost žute boje nakon 60 minuta od tiskanja malo slabija u odnosu na svježije otisnute oblike.

Ukupna promjena boje uzoraka svih triju smjesa nakon 3D tiskanja i nakon pečenja nalazi se u intervalu 1,5-3 što prema Rimac Brnčić i sur. (2016) označava primjetnu razliku u boji uzoraka neposredno nakon tiskanja i nakon 60 minuta od tiskanja te razliku u boji između uzoraka 60 minuta nakon tiskanja i uzoraka nakon termičke obrade pečenjem. Do promijene boje 60 minuta nakon tiskanja može doći, jer pšeničnim posijama koje su dodane u smjesu za tisak nije u potpunosti inaktiviran enzim PPO i u smjesu je dodano netretirano zobeno brašno koje također sadrži PPO što može dovesti do posmeđivanja uzoraka. L^* vrijednost koja označava svjetlinu pečenjem se smanjila što ukazuje na to da su uzorci tamniji nakon termičke obrade što se može

pripisati Maillardovim reakcijama kojima tijekom termičke obrade proizvoda nastaju polimeri smeđe boje – melanoidi (Starowitz i Zieliński, 2019). Parametri a^* (indikator crvenila) i b^* (indikator žutila) pokazuju veće vrijednosti nakon pečenja što je poželjno jer se crvena i žuta boja smatraju privlačnima kada se radi o prehrambenim proizvodima (Gregov, 2020.).

4.5. Preciznost tiska, ponovljivost i točnost oblika 3D tiskanog snack proizvoda

Za uspješno 3D tiskanje tjestenih oblika bitna je sposobnost istiskivanja tijesta (ekstruzija) i sposobnost zadržavanja strukture i oblika nakon tiskanja (Yang, 2018). He i sur. (2019) zaključuju da su predhodni tretman smjese i naknadni tretman tiskanih 3D oblika glavni faktori koji utječu na preciznost tiska i stabilnost tiskanog oblika.

Preciznost tiska određena je nakon tiskanja, dok je točnost oblika određena nakon pečenja tako što su se uzorci skenirali i obradili u ImageJ programu, a rezultati su dobiveni analiziranjem bijelih piksela svakog uzorka u odnosu na posljednji, 10. po redu uzorak iz tog punjenja. U tablici 7 prikazani su rezultati za preciznost tiska i točnost oblika u postocima.

Tablica 7. Preciznost tiska i točnost oblika u odnosu na 1. i 2. punjenje šprice istom smjesom. Srednje vrijednosti označene različitim slovima unutar istog reda u stupcu pojedine smjese razlikuju se statistički značajno ($p < 0,05$)

	TRETMANI :					
	UZV		MV		PS	
	1.punjenje	2.punjenje	1.punjenje	2.punjenje	1.punjenje	2.punjenje
PRECIZNOST TISKA (%)	96,85 ± 2,60 ^a	97,48 ± 1,89 ^a	96,95 ± 2,12 ^a	97,28 ± 2,22 ^a	96,00 ± 3,50 ^a	96,37 ± 2,16 ^a
TOČNOST OBLIKA (%)	95,67 ± 3,14 ^a	98,05 ± 1,25 ^b	96,75 ± 2,77 ^a	96,17 ± 3,55 ^a	95,64 ± 3,61 ^a	98,23 ± 1,79 ^a

Za izračun srednje vrijednosti postotka preciznosti tiska i točnosti oblika, u obzir su uzete vrijednosti 1. i 2. punjenja iste smjese što predstavlja 10 tiskanih oblika po punjenju. Prema rezultatima, postotak preciznosti tiska ne razlikuje se statistički značajno ($p > 0,05$) između 1. i 2. punjenja smjesa UZV, MV i PS. Točnost oblika statistički se razlikuje između 1. i 2. punjenja smjese UZV, dok za ostale smjese razlika točnosti oblika između punjenja nije statistički značajna pa je za te uzorke uvrđena i izvrsna ponovljivost oblika.

Za izračun srednje vrijednosti postotka preciznosti tiska i točnosti oblika, u obzir su uzete vrijednosti 1. i 2. punjenja, odnosno ukupno 20 oblika iz iste smjese. Prema rezultatima postotci preciznosti tiska (96,2 - 97,2 %) i točnosti oblika (96,5 – 96,9 %) ne razlikuju se statistički značajno ($p > 0,05$) između različitih smjesa. Najveća preciznost tiska pokazala se pri tiskanju smjese UZV, a najveću točnost oblika pokazuju oblici tiskani iz smjese PS. No, može se zaključiti da način obrade pšeničnih posija koje su dodane u smjesu ne utječe statistički značajno na svojstva smjese, odnosno na preciznost tiska i točnost samih oblika.

Kako bi se dodatno provjerio utjecaj punjenja i vrste tretmana pšeničnih posija na svojstva smjese i posljedično na tiskanje i oblik tiskanih uzoraka, mjereni su sljedeći parametri: masa, visina i debljina gornje i donje linije na 4 različite točke te gornji i donji promjer na 3 različite točke 3D tiskanog snack proizvoda koje su prikazane u potpoglavlju „Određivanje preciznosti 3D tiskanja i točnosti oblika“. U sljedećim tablicama su prikazane srednje vrijednosti mase, visine, debljine gornje i donje linije te gornjeg i donjeg promjera 10 uzoraka svakog punjenja (tablica 8).

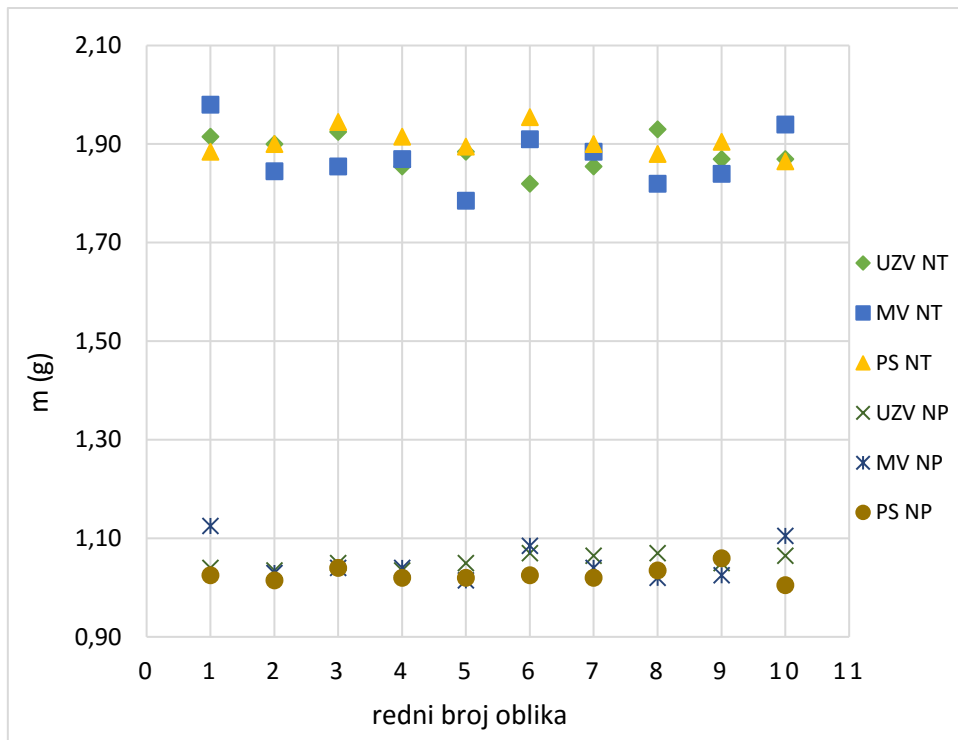
Tablica 8. Utjecaj punjenja na masu, visinu, debljinu gornje i donje linije te gornjeg i donjeg promjera 3D tiskanih oblika iz iste smjese. Srednje vrijednosti označene različitim slovima unutar istog reda u stupcu pojedine smjese razlikuju se statistički značajno ($p < 0,05$)

	TRETMANI :					
	UZV		MV		PS	
	1.punjenje	2.punjenje	1.punjenje	2.punjenje	1.punjenje	2.punjenje
masa (g)	1,89 ± 0,07 ^a	1,89 ± 0,05 ^a	1,93 ± 0,08 ^a	1,88 ± 0,19 ^a	1,96 ± 0,16 ^a	1,91 ± 0,01 ^a
visina (cm)	0,72 ± 0,03 ^a	0,73 ± 0,01 ^a	0,74 ± 0,02 ^a	0,67 ± 0,02 ^a	0,72 ± 0,02 ^a	0,72 ± 0,02 ^a
debljina linije gore (cm)	0,20 ± 0,01 ^a	0,19 ± 0,01 ^a	0,20 ± 0,01 ^a	0,19 ± 0,01 ^a	0,19 ± 0,01 ^a	0,19 ± 0,01 ^a
debljina linije dolje (cm)	0,25 ± 0,04 ^a	0,23 ± 0,02 ^a	0,27 ± 0,05 ^a	0,26 ± 0,01 ^a	0,30 ± 0,06 ^a	0,25 ± 0,01 ^b
promjer gore (cm)	2,69 ± 0,09 ^a	2,84 ± 0,06 ^b	2,81 ± 0,05 ^a	2,86 ± 0,07 ^a	2,92 ± 0,07 ^a	2,82 ± 0,06 ^b
promjer dolje (cm)	2,79 ± 0,13 ^a	2,94 ± 0,06 ^b	2,99 ± 0,12 ^a	3,02 ± 0,14 ^a	3,11 ± 0,14 ^a	2,95 ± 0,07 ^b

Rezultati u tablici 8 pokazuju da se masa, visina i debljina gornje linije 3D tiskanih oblika ne razlikuju statistički značajno u odnosu na broj punjenja korištene smjese. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) vidljiva je za debljinu donje linije između 1. i 2. punjenja smjese PS. Također, statistički značajna razlika postoji između gornjeg i donjeg promjera 1. i 2. punjenja smjese UZV i 1. i 2. punjenja smjese PS. Srednje vrijednosti gornjeg i donjeg promjera oblika tiskanog iz 1. punjenja smjese UZV pokazuju veće vrijednosti od gornjeg i donjeg promjera 2. punjenja iste smjese. Srednje vrijednosti parametara debljine donje linije, gornjeg i donjeg promjera 1. punjenja smjese PS veće su od istih parametara za 2. punjenje iste smjese.

No, ne postoji statistički značajna razlika u srednjoj vrijednosti masa i debljine gornje linije oblika tiskanih iz različitih smjesa ($p > 0,05$). Visina oblika se statistički razlikuje između smjese UZV (0,73 cm) i smjese MV (0,70 cm) ($p < 0,05$). Također, debljina donje linije statistički se razlikuje za oblike tiskane iz smjesa UZV (0,24 cm) i PS (0,28 cm). Vrijednosti gornjeg i donjeg promjera pokazuju statistički značajnu razliku između oblika tiskanih iz smjesa UZV (gornji 2,77 cm; donji 2,87 cm) i MV (gornji 2,84; donji 3,00 cm) te smjesa UZV (2,87 cm; donji 2,87 cm) i PS (gornji 2,87 cm; donji 3,03 cm).

Ponovljivost tiska predstavlja vrlo važan faktor kod određivanje konačne kvalitete tiska, a pokazuje koliko se tiskani oblici razlikuju međusobno (razlika 1. od 2. tiskanog oblika, itd.). Ponovljivost tiska, odnosno međusobne razlike u masi 10 komada 3D tiskanih oblika iz svake smjese nakon tiskanja i nakon pečenja prikazane su na slici 20. Oznake na slici 20 označuju tretman pšeničnih posija i oblik nakon tiskanja (NT) ili oblik nakon pečenja (NP), npr. oznaka UZV NT označuje 3D oblik tiskan iz smjese u koju su dodane pšenične posije obrađene ultrazvukom visokog intenziteta nakon procesa tiskanja. Razlika u masi oblika tiskanih iz različitih smjesa nakon tiskanja i razlika u masi oblika nakon pečenja nije bila statistički značajna zbog čega se može zaključiti da je ponovljivost 3D tiskanja bila izvrsna.



Slika 20. Ponovljivost mase 3D tiskanih oblika ovisno o tretmanu nakon tiskanja (NT) i nakon pečenja (NP)

Lipton i sur. (2010) proučavali su 3D tiskanje na principu ekstruzije mekih materijala kao što su tijesto za kekse i sir. Došli su do zaključka da su se tiskani oblici iz takvih materijala znatno deformirali prilikom konvencionalnih metoda obrade hrane nakon tiskanja. Primjer deformacije 3D tiskanih oblika tijekom pečenja prikazan je na slici 21 u obliku binarne fotografije za oblik tiskan iz smjese MV.



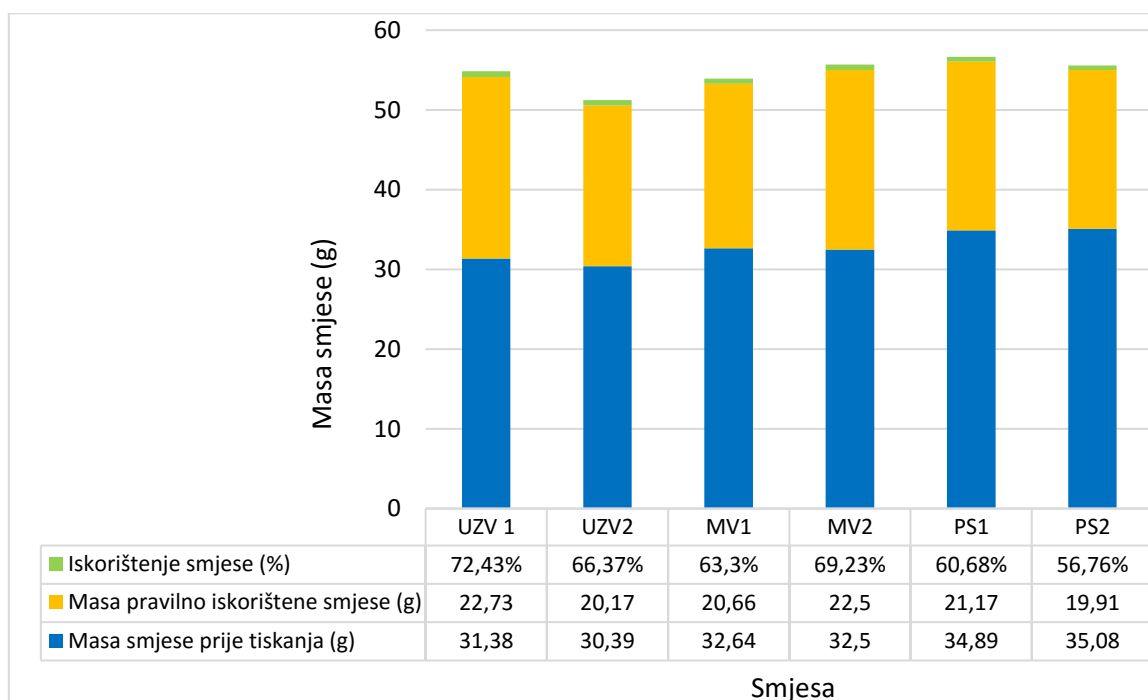
Slika 21. Binarna fotografija 3D tiskanog oblika nakon tiskanja (lijevo) i nakon pečenja (desno)

Kako bi se postigla široka primjena 3D tiskanja mekih smjesa na principu ekstruzije, ona mora biti kompatibilna s tradicionalnim koracima obrade hrane (Lipton i sur., 2015). Uzevši u obzir odstupanja u izmjerenim parametrima oblika iz tablice 8 te promijene u obliku tijekom pečenja sa slike 21, za veću preciznost tiska i točnost oblika, odnosno zadržanje stabilnosti oblika nakon pečenja, potrebna je korekcija recepture ili upotreba određenih aditiva (Lipton i sur., 2010).

4.6. Iskorištenje smjese i gubitak mase pečenjem

Mase svih 3D tiskanih oblika izmjerene su nakon pečenja kako bi se pomoću tih podataka izračunalo iskorištenje pripremljenih smjesa. Nakon 3D tiskanja, određivanja mase i parametara boje, oblici su podvrgnuti termičkoj obradi pečenjem.

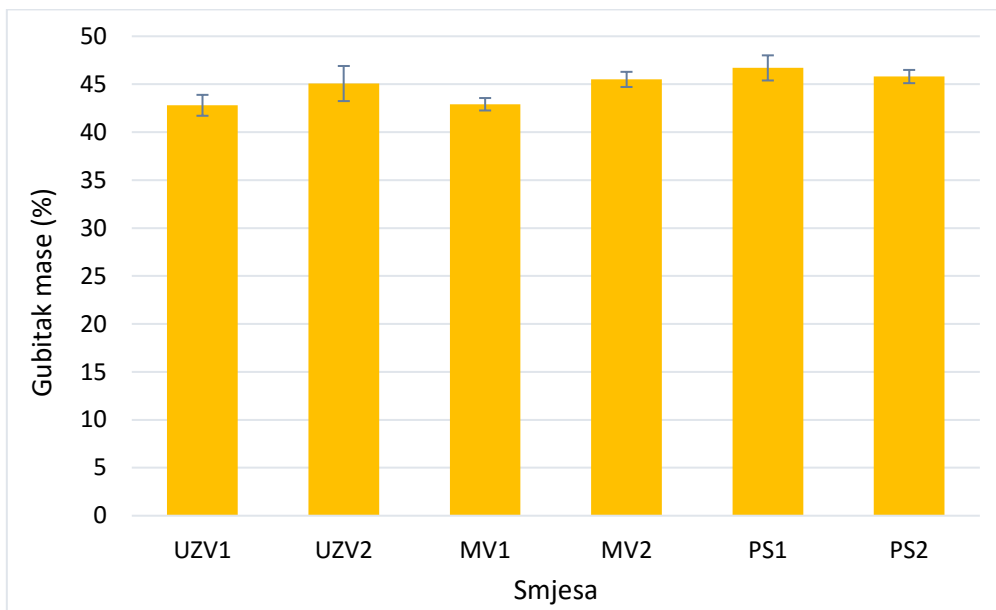
Iskorištenje svake smjese računato je tako da je od početne mase smjese koja je stavljena u špricu oduzeta masa koja je nakon tiskanja zaostala u šprici printera i masa onih oblika koji su odbačeni zbog pogrješke nastale tijekom tiskanja. Dio smjese koji je istisnut, ali odbačen zbog odstupanja od zadanog oblika ili mase, potencijalno bi se mogao ponovno iskoristiti u zamjesu, no u ovom slučaju je tretiran kao gubitak jer nije istraženo kako bi vraćanje i ponovno tiskanje imalo utjecaj na svojstva smjese i 3D tiskanih oblika. Na slici 22 je prikazan postotak iskorištenja smjesa uz prikaz vrijednosti za mase smjesa prije tiskanja i mase smjesa koje su iskorištene pri tiskanju pravilnih 3D oblika.



Slika 22. Prikaz postotka iskorištenja smjese

Prema slici 22 vidljivo je da se vrijednost iskorištenja međusobno razlikuje kod svih smjesa. Najveće iskorištenje ima smjesa UZV1, dok je najmanje iskorištenje smjese. Razlog razlike u iskorištenju od 15,67 % između smjesa UZV1 i PS2 može se pripisati odbacivanju različitog broja tiskanih oblika zbog njihovog odstupanja što je prikazano kao gubitak mase smjese i zbog razlike u početnoj masi smjese kojom se napunila šprica 3D pisača.

Prilikom termičke obrade 3D tiskanih uzoraka dolazi do smanjenje njihove mase zbog gubitka vlage (vode) isparavanjem. Postoci gubitka mase za uzorke iz različitih smjesa prikazani su na slici 23.



Slika 23. Postotak gubitka mase pečenjem 3D tiskanih uzoraka iz različitih smjesa

Prema slici 23, najveći gubitak mase (vode) tijekom pečenja vidljiv je kod 3D tiskanih uzoraka iz smjese PS1 (46,7 %), dok najmanji gubitak mase pokazuju uzorci tiskani iz smjese MV1 (42,8 %). Najmanji gubitak mase u uzorcima iz smjese MV1 može se povezati s time da su pšenične posije koje su dodane u tu smjesu obrađene tretmanom MV70 (mikrovalnim zagrijavanjem na 70 °C) nakon sušenja do konstantne mase imale najveći udio vlage. U smjesu PS1, čiji 3D tiskani uzorci pokazuju najveći gubitak mase, dodane su pšenične posije koje su obrađene tretmanom PS90 i nakon sušenja do konstantne mase je određen manji udio vlage nego kod posija tretiranih UZV i MV70.

5. ZAKLJUČCI

Cilj ovog rada bio je istražiti inovativne tehnologije obrade pšeničnih posija ultrazvukom visokog intenziteta, mikrovalnim vakuumskim zagrijavanjem i pulsirajućim svjetlom te istražiti mogućnost primjene obrađenih posija u smjesi za izradu nutritivno obogaćenog 3D tiskanog snack proizvoda na principu ekstruzije, a na temelju rezultata dobivenih ovim istraživanjem i provedenom raspravom izvode se sljedeći zaključci:

1) Tijekom obrade pšeničnih posija ultrazvukom visokog intenziteta, mikrovalnim vakuumskim zagrijavanjem i pulsirajućim svjetlom došlo je do zagrijavanja svih uzoraka, a promijena temperature tretiranih uzoraka razlikuje se s obzirom na mehanizam i vremenski interval tretmana.

2) Svi tretirani uzorci pšeničnih posija pokazuju manju aktivnost polifenol oksidaze u odnosu na netretirani uzorak. Najveća inaktivacija polifenol oksidaze (75,31 %) postignuta je ultrazvukom visokog intenziteta. Osim UZV, MV70 i PS90 pokazali su se kao najbolji za inaktivaciju enzima polifenol oksidaze među korištenim tretmanima te su pšenične posije obrađene navedenim tretmanima dodane u smjesu za 3D tiskanje.

3) Udio ukupnih polifenolnih spojeva tretiranih uzoraka manji je u odnosu na netretirani uzorak pri čemu smanjenje iznosi između 5,88 % (UZV) i 24,6 % (PS90). Antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom najveća je za netretirani uzorak, a odstupanje tretiranih uzoraka u odnosu na netretirani iznosi između 4,73 % (PS90) i 20,82% (PS45). Antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom najveća za uzorak PS90 koji pokazuje 47,45 % veću vrijednost u odnosu na netretirani uzorak, dok najmanju antioksidacijsku aktivnost ima uzorak MV70 koji pokazuje 18,45 % manju vrijednost u odnosu na nativni uzorak.

4) Proces 3D tiskanja je spor i traje 60 minuta za oblikovanje 10 komada snack proizvoda. Ukupna promjena boje (ΔE) 3D tiskanih uzoraka svih triju smjesa nakon 60 minuta je bila vidljiva jer se nalazi u intervalu 1,5 - 3 ovisno o metodi prethodne obrade posija. Najmanja ukupna promjena boje (ΔE) nakon tiskanja vidljiva je kod smjese s ultrazvučno obrađenim posijama ($1,99 \pm 0,61$), a najveća kod smjese s posijama obrađenima pulsirajućim svjetlom ($2,71 \pm 0,55$). Nakon pečenja snack je tamnije, crvenije i žuće boje u odnosu na tijesto.

5) Osim parametara boje, značajan utjecaj metode obrade pšeničnih posija dodanih u smjesu za 3D tiskanje vidljiv je na dimenzijama oblika i to za visinu između smjesa UZV i MV, debljinu

donje linije između smjesa UZV i PS te za gornji i donji promjer između smjesa UZV i MV te UZV i PS.

6) Statistički značajan, ali mali utjecaj broja punjenja vidljiv je kod a) parametra boje b^* nakon tiskanja za smjese MV i PS te ukupna promjena boje (ΔE) nakon pečenja za smjesu MV, b) točnosti i promjera oblika za smjesu UZV i c) između debljine gornje linije te gornjeg i donjeg promjera za smjesu PS.

7) Može se zaključiti kako su snack proizvodi obogaćeni prethodno obrađenim pšeničnim posijama otisnuti s velikom ponovljivošću, preciznošću i točnošću (> 96,2 %), no prilikom pečenja je došlo do deformacije svih oblika zbog smanjenja udjela vlage što je najviše uočljivo u smanjenju promjera oblika nakon pečenja.

Potrebna su daljna istraživanja o metodama prethodne obrade sirovina i brzine 3D tiskanja kako bi se izbjeglo enzimsko tamnjenje tijesta 3D tiskanih proizvoda obogaćenih posijama.

6. LITERATURA

AACC International Method 44 – 19.01, Moisture - Air-Oven Method, Drying at 135°C.

AACC International Method 10 – 50.05, Baking Quality of Cookie Flour.

AACC International Method 22 – 85 .01, Measurement of Polyphenol Oxidase in Wheat Kernels (L-DOPA Substrate).

Adom, K.K., Sorrells, M.E., Liu RH (2005) Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties. *J. Agr. Food Chem.* **53**, 2297-2306.

Andersson, A.A.M., Dimberg, L., Åman, P., Landberg, D. (2014) Recent findings on certain bioactive components in whole grain wheat and rye. *J. Cereal Sci.* **59**, 294– 311.

Anonymus 1 (2020) Is Partnership Sampling the Best Marketing Channel for Healthy Kids' Brands? <<https://flavorsampling.com/is-partnership-sampling-the-best-marketing-channel-for-healthy-kids-brands/>>. Pristupljeno 16.siječnja 2021.

Anson, N. M., Hervey, Y.M., Bast, A., Haenen, G.R.M.M. (2012) Optimizing the bioactive potential of wheat bran by processing, *Food and Function*, **3**(4), 362–375.

Artiguez, M.L., Martínez-de Marañón, I. (2015) Improved process for decontamination of whey by a continuous flow-through pulsed light system. *Food Control.* **47**, 599-605.

Avalos Llano, K.R, Marsellés-Fontanet, A.R., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R. (2016) Impact of pulsed light treatments on antioxidant characteristics and quality attributes of fresh-cut apples. *Innov. Food Sci. & Emerg.* **33**, 206-215.

Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76.

Bhargava, N., Mor, R.S., Kumar, K., Singh Sharanagat, V. (2021) Advances in application of ultrasound in food processing: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*. doi: 10.1016/j.ultsonch.2020.105293

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* **28**, 25 – 30.

Brennan M.A., Derbyshire, E., Tiwari, B.K., Brennan, C.S. (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.

Broeke, J., Pérez, J. M. M., Pascau, J. (2015) Image processing with ImageJ, Packt Publishing Ltd., Livery Place

- Brouns, F., Hemery, Y., Price, R., Anson, N.M. (2012) Wheat aleurone: separation, composition, health aspects, and potential food use. *Crit. Rev. Food Sci*, **52**, 553–558.
- Butt, M. S., Tahir-Nadeem, M., Khan, M. K. I., Shabir, R., Butt, M. S. (2008) Oat: unique among the cereals. *Eur. J. Nutr.* **47**, 68-79.
- Chandrasekara A, Naczek M, Shahidi F (2012) Effect of processing on the antioxidant activity of millet grains. *Food Chem.* **133**(1), 1–9.
- Chandrasekaran, S., Ramanathan, S., Basak, T. (2013) Microwave food processing - A review. *Food Res. Int.* **52**(1), 243-261.
- Chauhan, D., Kumar, K., Kumar, S., Kumar, H. (2018) Effect of Incorporation of Oat Flour on Nutritional and Organoleptic Characteristics of Bread and Noodles. *Curr. Res. Nutr. Food Sci.* **6**(1), 148-156.
- CIE (2004) Technical Report: Colorimetry, 3. izd. CIE - International Commission on Illumination, Vienna, Austria.
- Crofton, E., Scannell, A. (2020) Snack foods from brewing waste: Consumer-led approach to developing sustainable snack options. *Brit. Food J.* **122**(12), 3889-3916.
- Curi, P.N., Salgado, D.L., Mendonca, K., Pio, R., Ferreira, J.L.G., Souza, V.R. (2019) Influence of microwave processing on the bioactive compounds, antioxidant activity and sensory acceptance of blackberry jelly. *Food Sci. Technol.* **39**, 386-391.
- Čukelj Mustač, N., Voučko, B., Novotni, D., Drakula, S., Gudelj, A., Dujmić, F., Čurić, D. (2019) Optimization of High Intensity Ultrasound Treatment of Proso Millet Bran to Improve Physical and Nutritional Quality. *Food Technol. Biotech.* **57**(2), 183-190.
- Datta, A.K., Davidson, P.M. (2000) Microwave and radio frequency processing, *J. Food Science.* **65**, 32-41.
- Dean, M., Shepherd, R., Arvola, A., Vassallo, M., Winkelmann, M., Claupein, E., Lähteenmäki, L., Raats, M. and Saba, A. (2007) Consumer perceptions of healthy cereal products and production methods. *J. Cereal Sci.* **46**, 188-196.
- Decker, E.A., Rose, D.J., Stewart, D. (2014) Processing of oats and the impact of processing operations on nutrition and health benefits. *Brit. J. Nutr.* **112**, 58-64.
- Derossi, A., Caporizzi, R., Azzollini, D., Severini, C. (2018) Application of 3D printing for customized food. A case on the development of a fruit-based snack for children. *J. Food Eng.* **220**, 65–75.

- Doğan, M., Arslan, O., Doğan, S. (2002) Substrate specificity, heat inactivation and inhibition of polyphenol oxidase from different aubergine cultivars. *Int. J. Food Sci. Tech.* **37**(4), 4215-423.
- Dornez, E., Joye, I.J., Gebruers, K., Lenartz, J., Massaux, C., Bodson, B., Delcour, J.A., Courtin, C.M. (2006) Insight into variability of apparent endoxylanase and endoxylanase inhibitor levels in wheat kernels. *J. Sci. Food Agr.* **86**, 1610– 1617.
- Every, D., Simmons, L.D., Ross, M.P. (2006) Distribution of redox enzymes in millstreams and relationships to chemical and baking properties of flour. *Cereal Chem.* **83**, 62– 68.
- Every, D., Simmons, L., Al-Hakkak, J., Hawkins, S., Ross, M. (2002) Amylase, falling number, polysaccharide, protein and ash relationships in wheat millstreams. *Euphytica.* **126**, 135– 142.
- Felton, G.W., Donato, K.K., Broadway, R.M., Duffey, S.S. (1992) Impact of oxidized plant phenolics on the nutritional quality of dietary protein to a noctuid herbivore, *Spodoptera exihua*. *J. Insect Physiol.* **38**(4), 277–285.
- Gökmen, V., Sügüt, I. (2007) Computer-Vision Based Analysis of Colour as a Tool for Food Process Control. U: Focus on Food Engineering Research and Development, (Pletney V. N., ured.), Nova Publishers, str. 17–27.
- Gregov, M. (2020) Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na enzimsku aktivnost i tehnološka svojstva pšeničnih posija. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
- Habuš, M., Novotni, N., Gregov, M., Štiftr, S., Čukelj Mustač, N., Voučko, B., Čurić D. (2021) Influence of particle size reduction and high-intensity ultrasound on polyphenol oxidase, phenolics and technological properties of wheat bran. *J. Food Process. Pres.* **5**, doi: 10.1111/jfpp.15204
- He, C., Zhang, M., Fang, Z. (2019) 3D printing of food: pretreatment and post-treatment of materials, *Crit. Rev. Food Sci.* **60**(14), 1-14.
- Hemdane, S., Jacobs, P.J., Dornez, E., Verspreet, J., Delcour, J.A., Courtin, C.M. (2016) Wheat (*Triticum aestivum* L.) bran in bread making: A critical review. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **15**, 28-42.
- Herceg, Z., Režek Jambrak, A., Rimac Brnčić, S., Krešić, G. (2009) Procesiranje hrane ultrazvukom. U: Procesi konzerviranja hrane: Novi postupci, Tehnička knjiga, Zagreb, str. 53-67.
- Horvath, J. (2014). A brief history of 3D printing. U: Mastering 3D printing, Apress, Berkeley, str. 3-10.

- Hossain, K., Ulven, C., Glover, K. (2013). Interdependence of cultivar and environment on fibre composition in wheat bran. *Aust. J. Crop Sci.* **7**, 525– 531
- John, D., Ramaswamy, H.S. (2018) Pulsed light technology to enhance food safety and quality: A mini-review. *Current Opinion in Food Science.* **23**, 70-79.
- Keklik, N.M., Krishnamurthy, K., Demirci, A.(2012) Microbial Decontamination in the Food Industry. U: Microbial Decontamination in the Food Industry - Novel Methods and Applications (Demirci, A., Ngadi, M.O., ured.), Woodhead Publishing Limited, London, str. 344-369.
- Kiani H., Zhang Z., Delgado A., Sun D.W. (2011) Ultrasound assisted nucleation of some liquid and solid model foods during freezing. *Food Res. Int.* **44**, 2915–2921.
- Kouzani, A. Z., Adams, S., Whyte, D.J., Oliver, R., Hemsley, B., Palmer, S., Balandin, S. (2017) 3D printing of food for people with swallowing difficulties. Proceedings of the International Conference on Design and Technology. DesTech 2016, Dubai, str. 23 –29.
- Kuijpers, W. A., van Eck, D., Kemmere, M. F., Keurentjes, J. T. F. (2002) Cavitation-induced reactions in high-pressure carbon dioxide. *Science.* **298**, 1969-1971.
- Lelas, V. (2006) Nove tehnike procesiranja hrane. *Mljekarstvo* **56**, 325-326.
- Levy, C., Aubert, X., Lacour, B., Carlin, F. (2012) Relevant factors affecting microbial surface decontamination by pulsed light. *Int. J. Food Microbiol.* **152**(3), 168-174.
- Lille, M., Nurmela, A., Nordlund, E., Metsä-Kortelainen, S., Sozer, N. (2018) Applicability of protein and fiber-rich food materials in extrusion-based 3D printing. *J. Food Eng.* **220**, 20-27.
- Lipton, J. I., Cutler, M., Nigl, F., Cohen, D., Lipson, H. (2015) Additive manufacturing for the food industry. *Trends Food Sci. Tech.* **43**, 114-123.
- Lipton, J., Arnold, D., Nigl, F., Lopez, N., Cohen, D., Norén, N., Lipson, H. (2010) Multi-material food printing with complex internal structure suitable for conventional post-processing. Proceedings of the Solid Freeform Fabrication Symposium 9, Austin, str. 809-815.
- Liu, Y., Liang, X., Saeed, A., Lan, W., Qin, W. (2019) Properties of 3D printed dough and optimization of printing parameters. *Innov. Food Sci. Emerg.* **54**, 9-18.
- Liu, Z.B., Zhang, M., Bhandari, B., Wang, Y.C. (2017) 3D printing : Printing precision and application in food sector. *Trends Food Sci. Techn.* **69**, 83-94.
- Liu, Z.B., Bhandari, B., Prakash, S., Zhang, M.(2018) Creation of internal structure of mashed potato construct by 3D printing and its textural properties. *Food Res. Int.* **111**, 534-543.
- Lovrić, T. (2003) Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva, HINUS, Zagreb, str. 274-281.

- Mahieddine, B., Amina, B., Faouzi, S.M., Sana, B., Wided, D. (2018) Effects of microwave heating on the antioxidant activities of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Annals of Agricultural Sciences*. **63**(2), 135-139.
- Mantihal, S., Rovina, K., Boon-Beng, L. (2020) 3D food printing as new way of preparing food: A review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, **22**
doi:10.1016/j.ijgfs.2020.100260
- Manzocco, L., Panozzo, A., Nicoli, M.C. (2013) Inactivation of Polyphenoloxidase by Pulsed Light, *J. Food Sci.* **78**(8), 1183-1187.
- McCarthy, J.A. (2001) The Snack Industry: History, Domestic and Global Status. U: Snack Foods Processing (Lusas, E.W., Rooney, L.,W., ured.), CRC Press, Boca/Raton/London/New York/Washington D.C. str. 29.-35.
- Murugesan, R., Orsat, V., Lefsrud, M. (2012) Effect of Pulsed Ultraviolet Light on the Total Phenol Content of Elderberry (*Sambucus nigra*) Fruit. *Food and Nutrition Sciences*. **3**(6), 774-783.
- Niu, M., Hou, G. G., Li, X., Wang, L., Chen, Z. (2014) Inhibitory effects of ultrasound combined with ascorbic acid or glutathione on enzymatic darkening of whole-wheat raw noodles. *LWT-Food Sci. Technol.* **59**(2) , 901-907.
- Oms-Oliu, G., Aguiló-Aguayo, I., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R. (2010b) Effects of pulsed light treatments on quality and antioxidant properties of fresh-cut mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Postharvest Biology and Technology*. **56**(3), 216-222.
- Oms-Oliu, G., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R. (2010a) Pulsed Light Treatments for Food Preservation: A Review. *Food Bioprocess Tech.* **3**(1), 13-23.
- Onipe, O. O., Jideani, A. I. O., Beswa, D. (2015) Composition and functionality of wheat bran and its application in some cereal food products. *Int. J. Food Sci. Tech.* **50**, 2509–2518.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch - Woodill, M., Flanagan, J. A., Deemer, E. K. (2002) Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *J. Agr. Food Chem.* **50**, 3122 - 3128.
- Ough, C. S., Amerine, M. A. (1988) Methods for analysis of musts and wine, 2. izd., John Wiley and Sons, New York.
- Pallottino, F., Hakola, L., Costa, C., Antonucci, F., Figorilli, S., Seisto, A., & Menesatti, P. (2016) Printing on Food or Food Printing: a Review. *Food Bioprocess Tech.* **9**, 725-733.
- Pathare, P. B., Opara, U. L., Al-Said, F. A. J. (2013) Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food Bioprocess Techn.* **6**(1), 36–60.

- Pérez, B., Nykvist, H., Brøgger, A. F., Larsen, M. B., Falkeborg, M. F. (2019) Impact of macronutrients printability and 3D-printer parameters on 3D-food printing: A review. *Food Chem.* **287**, 249–257
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.S., Chemat, F. (2013) Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control.* **31**(2), 593-606.
- Piyasena, P., Mohareb, E., McKellar, R. C. (2003) Inactivation of microbes using ultrasound: A review. *Int. J. Food Microbiol.* **87**, 207–216.
- Pole, A. (2016) Razvrstavanje objekata u slici metodom usporedbe konture objekata. Diplomski rad, Fakultet elektrotehnike, računarstva i informacijskih tehnologija Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek
- Prückler, M., Siebenhandl-Ehn, S., Apprich, S., Höltinger, S., Haas, C., Schmid, E., Kneifel, W. (2014) Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization. *LWT- Food Sci. Technol.* **56**, 211-221.
- Rasane, P., Jha, A., Sabikhi, L., Kumar, A., Unnikrishnan, V. S. (2015) Nutritional advantages of oats and opportunities for its processing as value added foods - A review. *J. Food Sci. Technol.* **52**(2), 662–675.
- Rastogi, N.K. (2011) Opportunities and Challenges in Application of Ultrasound in Food Processing. *Crit. Rev. Food Sci.* **51**(8), 705-722.
- Renna, M., Gonnella, M., de Candia, S., Serio, F., Baruzzi, F. (2017) Efficacy of Combined Sous Vide-Microwave Cooking for Foodborne Pathogen Inactivation in Ready-to-Eat Chicory Stems. *J Food Sci.* **82**(7), 1664-1671.
- Riaz, M.N. (2016) Snack Foods: Processing. U: Encyclopedia of Food Grains, 2.izd.(Wrigley, C., Corke, H., Seetharaman, K., Faubion, J., ured.), Academic Press, Oxford, str. 414-422.
- Rimac Brnčić, S. (2009) Procesiranje hrane svjetlom jakog intenziteta. U: Procesi konzerviranja hrane: Novi postupci (Herceg, Z., ured.) Tehnička knjiga, Zagreb, str. 102.-107.
- Rimac Brnčić, S., Badanjak Sabolović, M., Vaško, M., Brnčić, M., Knežević, N. (2016) Stability of natural food colorants. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition.* **11**(2), 71-78.
- Rodov, V., Vinokur, Y., Horev, B. (2012). Brief postharvest exposure to pulsed light stimulates coloration and anthocyanin accumulation in fig fruit (*Ficus carica* L.). *Postharvest Biology and Technology.* **68**, 43–46.
- Sachs, E., Cima, M., Cornie, J. (1990) Three - Dimensional Printing: Rapid Tooling and Prototypes Directly from a CAD Model. *CIRP Annals.* **39**, 201–204.

- Sapirstein, H.D. (2016) Bioactive Compounds in Wheat Bran. U: Encyclopedia of Food Grains, 2. izd. (Wrigley, C., Corke, H., Seetharaman, K., Faubion, J., ured.), Kidlington, Oxford, str. 268–276.
- Schellekens, M. (1996) New research issues in sous vide cooking. *Trends Food Sci Technol.* **7**, 256–262.
- Severini, C., Derossi, A. (2016) Could the 3D Printing Technology be a Useful Strategy to Obtain Customized Nutrition? *J. Clin. Gastroenterol.* **50**, 175-178.
- 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.
- Singh, R., De, S., Belkhir, A. (2013) Avena sativa (Oat), a potential nutraceutical and therapeutic agent: An overview. *Crit. Rev. Food Sci Nutr.* **53**(2), 126-144.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamela-Raventós, R. M. (1999a) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol.* **299**, 1179.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamela-Raventós, R. M. (1999b) Flavanoids and other polyphenols. *Method Enzymol.* **299**, 152.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *Sci. Dir.* **16**, 144 – 158.
- Song, C., Wu, T., Li, Z., Li, J., Chen, H. (2018) Analysis of the heat transfer characteristics of blackberries during microwave vacuum heating. *J. Food Eng.* **223**, 70-78.
- Song, X., Zhu, W., Pei, Y., Ai, Z., Chen, J. (2013) Effects of wheat bran with different colors on the qualities of dry noodles. *J. Cereal Sci.* **58**, 400-407.
- Starowitz, M., Zieliński, H. (2019) How Maillard Reaction Influences Sensorial Properties (Color, Flavor and Texture) of Food Products? *Food Rev. Int.* **35**(8), 707-725.
- Sterna, V., Zute, S., Brunava, L. (2015) Oat grain composition and its nutrition benefice. *Agriculture and Agricultural Science Procedia.* **8**, 252-256.
- Sun, J., Peng, Z., Zhou, W., Fuh, J.Y.H, Soon Hong, G., Chiu, A. (2015a) A review on 3D Printing for Customized Food Fabrication. *Procedia Manufacturing.* **1**, 308-319.
- Sun, J., Zhou, W., Huang, D., Fuh, J. Y. H., & Hong, G. S. (2015b) An Overview of 3D Printing Technologies for Food Fabrication. *Food Bioprocess Tech.* **8**, 1605-1615.
- Sun, J., Zhou, W., Yan, L., Huang, D., Lin, L.Y. (2018) Extrusion based food printing for digitalized food design and nutrition control. *J. Food Eng.* **220**, 1–11.

Tewari, G. (2007) Microwave and Radio-Frequency Heating. U: Advances in thermal and non-thermal food preservation, (Tewari, G., Juneja, V.K., ured.), Blackwell Publishing, Ames, str. 91-98.

Uredba Komisije (EU) br. 432/2012 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. svibnja 2012. o utvrđivanju popisa dopuštenih zdravstvenih tvrdnji koje se navode na hrani, osim onih koje se odnose na smanjenje rizika od bolesti te na razvoj i zdravlje djece. Službeni list Europske unije, L136/1.

Uredba Komisije (EU) br. 1160/2011 Europskog parlamenta i Vijeća od 14. studenoga 2011. o odobrenju i odbijanju odobrenja za određene zdravstvene tvrdnje navedene na hrani koje se odnose na smanjenje rizika od bolesti. Službeni list Europske unije, L296/26.

Uredba Komisije (EZ) br. 2073/2005 Europskog parlamenta i Vijeća od 15. studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu. Službeni list Europske unije, L338/1.

Uredba komisije (EU) br. 1924/2006 Europskog parlamenta i Vijeća od 20. prosinca 2006. o prehranbenim i zdravstvenim tvrdnjama koje se navode na hrani. Službeni list Europske unije, L404/9.

Verma, B., Hucl, P., Chibbar, R.N. (2008) Phenolic Content and Antioxidant Properties of Bran in 51 Wheat Cultivars. *Cereal Chem.* **85**(4), 544-549.

Vidić, B., Vukušić, T., Ljubić Herceg, I., Šubarić, D., Ačkar, Đ., Brnčić, M., Rimac Brnčić, S., Režek Jambrak, A., Karlović S., Herceg, Z. (2011) Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na fizikalna i teksturalna svojstva suspenzija škroba pšenice. *Hrvatski časopis za prehranbenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam.* **6**, 134-140. <<https://hrcak.srce.hr/76264>>. Pristupljeno 01.veljače 2021.

Yang, F., Zhang, M., Prakash, S., Liu, Y. (2018) Physical properties of 3D printed baking dough as affected by different compositions. *Innov. Food Sci. Emerg.* **49**, 202-210.

Yang, Fan, Zhang, M., Bhandari, B. (2015) Recent development in 3D food printing. *Crit. Rev. Food Sci.* **57**, 3145-3153.

Yang, J., Wu, L.W., Liu, J. (2001) Rapid prototyping and fabrication method for 3-D food objects. US Patent 6,280,785.

Yoruk, R., Marshall, M.R. (2007) Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *J. Food Biochem.* **27**(5), 361–422.

Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., Qian, M. (2002) Free Radical Scavenging Properties of Wheat Extracts. *J. Agr. Food Chem.* **50**, 1619 – 1624.

Zhang, F., Zhou, T., Liu, Y., Jinsong, L. (2015) Microwave synthesis and actuation of shape memory polycaprolactone foams with high speed. *Scientific Reports.* doi:10.1038/srep11152

Zhang, J., Zhang, M., Shan, L., Fang, Z. (2007) Microwave-vacuum heating parameters for processing savory crisp bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) slices, *J. Food Eng.* **79**(3), 885-891.

Zhang, X., Shao, X. (2015) Characterisation of Polyphenol Oxidase and Peroxidase and the Role in Browning of Loquat Fruit. *Czech J. Food Sci.* **33**(2), 109-117.

Zhou, L., Tey, C.Y., Bingol, G., Bi, J. (2016) Effect of microwave treatment on enzyme inactivation and quality change of defatted avocado puree during storage. *Innov. Food Sci. Emerg.* **37**, 61-67.

Zhu, S., Stieger, M.A., van der Goot, A.J., Schutyser, M.A.I. (2019) Extrusion-based 3D printing of food pastes: Correlating rheological properties with printing behaviour, *Innov. Food Sci. Emerg.* **58**, doi: 10.1016/j.ifset.2019.102214

IZJAVA O IZVORNOSTI

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.

Petra Golubić

Ime i prezime studenta