

Primjena 3D tiskanja u proizvodnji funkcionalnih proizvoda na bazi maginje (Arbutus unedo L.)

Brdar, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:159:468235>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-22**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022

Dora Brdar

**PRIMJENA 3D TISKANJA U
PROIZVODNJI FUNKCIONALNIH
PROIZVODA NA BAZI MAGINJE
(*Arbutus unedo* L.)**

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



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

ZAHVALA

Na početku želim se posebno zahvaliti svojim roditeljima i bratu na neizmjerneoj ljubavi, podršci, pažnji i razumijevanju bez kojih ne bih danas bila ovdje.

Iskreno sam zahvalna ljubavi svog života, mom Karleku, na svakom prošetanom kilometru, svakom zajedničkom učenju, svakom pogledanom filmu uz čips, svakoj minuti razgovora, svakoj obrisanoj suzi, svakom osmijehu i svakom zagrljaju koji mi je dao snage da hrabro koračam putem ostvarenja svojih želja i ciljeva, hvala ti što si uvijek tu!

Hvala mojoj Ivi što smo zajedno zatvorile ovo veliko poglavlje i zajedno pobjeđivale.

Zahvalna sam doc. dr. sc. Predragu Putniku što me prepoznao i pružio mi priliku da se još više približim području kojim se želim cijeli život baviti.

Hvala mag. ing. Anici što sam se u laboratorij vraćala rado i sa uzbuđenjem, i što sam u izradi diplomskog rada uživala.

Draga mentorice, od srca Vam hvala što ste uložili puno truda i vremena u ovaj proces izrade mog diplomskog rada na koji sam neopisivno ponosna! Neizmjerne sam Vam zahvalna što ste me pratili i bili mi podrška na cijelom ovom akademskom putu. Hvala Vam na svim pruženim prilikama i razgovorima punim savjeta i utješnih riječi koje su me motivirale da budem bolja u svemu čime se bavim.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

PRIMJENA 3D TISKANJA U PROIZVODNJI FUNKCIONALNIH PROIZVODA NA BAZI MAGINJE (*Arbutus unedo* L.)

Dora Brdar, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058211489

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj aditivne tehnologije 3D tiskanja na aktivitet vode (a_w), pH vrijednost, masene udjele bioaktivnih spojeva, pigmenata i antioksidacijskog kapaciteta (DPPH i FRAP) u 3D tiskanim proizvodima na bazi maginje (*Arbutus unedo* L.). Analiziran je utjecaj dva različita programa 3D ispisa, kao i vrsta (kukuruzni vs. pšenični) te udio dodanog škrobnog nosača (4, 6 i 8 %). Vrsta škrobnog nosača statistički je značajno utjecala na a_w , pH, ukupne fenolne spojeve, hidroksicimetne kiseline, flavonole, monomerne antocijane, kondenzirane tanine, ukupne karotenoide te na antioksidacijsku aktivnost 3D ispisanih uzoraka. Niži udio škrobnog nosača (4 vs. 6 i 8 %) povoljno utječe na stabilnost analiziranih bioaktivnih spojeva, pigmenata te antioksidacijski kapacitet (DPPH). Tip programa 3D ispisa statistički je značajno utjecao na maseni udio flavonola, klorofila a i b, ukupnih karotenoida te na antioksidacijsku aktivnost (FRAP) 3D ispisanih uzoraka. Tehnologija 3D ispisa može se smatrati obećavajućom u sektoru razvoja inovativnih i funkcionalnih proizvoda na bazi maginje.

Ključne riječi: 3D tiskanje, funkcionalni proizvod, maginja (*Arbutus unedo* L.), bioaktivni spojevi, antioksidacijski kapacitet

Rad sadrži: 66 stranica, 13 slika, 6 tablica, 98 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 29. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

APPLICATION OF 3D PRINTING IN THE PRODUCTION OF FUNCTIONAL PRODUCTS BASED ON STRAWBERRY TREE FRUIT (*Arbutus unedo* L.)

Dora Brdar, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058211489

Abstract: The aim of this study was to investigate the influence of additive 3D printing technology on water activity (a_w), pH, mass fraction of bioactive compounds, pigments, and antioxidant capacity (DPPH and FRAP) in strawberry tree fruit (*Arbutus unedo* L.) based 3D printed products. The influence of two different 3D printing programs as well as the type (corn vs. wheat) and the percentage of added starch carrier (4, 6 and 8%) were analyzed. The type of starch carrier had a statistically significant effect on a_w , pH, total phenolic compounds, hydroxycinnamic acids, flavonols, monomeric anthocyanins, condensed tannins, total carotenoids, and on the antioxidant activity of the 3D-printed samples. The lower percentage of starch carrier (4 vs. 6 and 8%) has a positive effect on the stability of the analyzed bioactive compounds, pigments and antioxidant capacity (DPPH). The type of 3D printing program had a statistically significant effect on the mass fraction of flavonols, chlorophyll a and b, total carotenoids and on the antioxidant activity (FRAP) of the 3D printed samples. 3D printing technology can be considered as promising in the field of development of innovative and functional strawberry tree fruit-based products.

Keywords: 3D printing, functional product, strawberry tree fruit (*Arbutus unedo* L.), bioactive compounds, antioxidant capacity

Thesis contains: 66 pages, 13 figures, 6 tables, 98 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Danijela Bursać Kovačević, PhD, Associate Professor

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

Reviewers:

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

Thesis defended: September 29th, 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. MAGINJA	2
2.1.1. Kemijski sastav maginje	3
2.1.2. Bioaktivni spojevi maginje	6
2.1.3. Zdravstveni značaj maginje	6
2.2. 3D TISKANJE HRANE	9
2.2.1. Potencijal voćnih sirovina u 3D tiskanju hrane	10
2.2.2. Odabir voćnih sirovina za 3D tiskanje	11
2.2.3. Obrada voćnih sirovina prije 3D tiskanja	12
2.2.4. Zdravstvena ispravnost 3D tiskanih proizvoda	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJAL	16
3.2. METODE RADA	17
3.2.1. Priprema smjese za 3D ispis	17
3.2.2. Izvedba 3D ispisa	18
3.2.3. Određivanje pH vrijednosti	21
3.2.4. Određivanje aktiviteta vode	21
3.2.5. Postupak ekstrakcije	22
3.2.5.1. Ekstrakcija polifenolnih spojeva	22
3.2.5.2. Ekstrakcija karotenoida	24
3.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje bioaktivnih spojeva	26
3.2.6.1. Određivanje ukupnih fenola	26
3.2.6.2. Određivanje ukupnih flavonoida	28
3.2.6.3. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola	30
3.2.6.4. Određivanje monomernih antocijana	32
3.2.6.5. Određivanje polimernih proantocijanidina	34
3.2.6.6. Određivanje ukupnih karotenoida	36
3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta	38
3.2.7.1. DPPH metoda	38
3.2.7.2. FRAP metoda	40
3.3 OBRADA PODATAKA	42
4. REZULTATI I RASPRAVA	43

4.1. USPOREDBA KONTROLNIH I 3D TISKANIH PROIZVODA OBZIROM NA pH i a_w VRIJEDNOSTI.....	43
4.2. USPOREDBA KONTROLNIH I 3D TISKANIH PROIZVODA OBZIROM NA SADRŽAJ BIOAKTIVNIH SPOJEVA	44
4.3. USPOREDBA KONTROLNIH I 3D TISKANIH PROIZVODA OBZIROM NA SADRŽAJ PIGMENATA I ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST.....	46
4.4. UTJECAJ VRSTE I UDJELA ŠKROBA TE PROGRAMA 3D ISPISA NA AKTIVITET VODE (a_w) I pH VRIJEDNOSTI U 3D TISKANIM PROIZVODIMA.....	47
4.5. UTJECAJ VRSTE I UDJELA ŠKROBA TE PROGRAMA 3D ISPISA NA UDIO BIOAKTIVNIH SPOJEVA.....	48
4.6. UTJECAJ VRSTE I UDJELA ŠKROBA TE PROGRAMA 3D ISPISA NA UDIO PIGMENATA U 3D TISKANIM PROIZVODIMA	49
4.7. UTJECAJ VRSTE I UDJELA ŠKROBA TE PROGRAMA 3D ISPISA NA ANTIOKSIDACIJSKE KAPACITETE.....	52
5. ZAKLJUČCI	55
6. LITERATURA	56

1. UVOD

Inovacije prehrambene industrije usmjerene su prema korištenju mnogima nepoznatih sirovina koje doprinose zanimljivosti proizvoda i zanimanju potrošača. Maginja ima veliki potencijal za razvoj prehrambenih proizvoda dosad potrošačima nepoznatog okusa, boje i mirisa s visokim bioaktivnim potencijalom i zdravstvenim značajem. Ovaj zanimljivi plod dolazi od samonikle voćne vrste obične planike (*Arbutus unedo* L.) s područja eumediteranske zone Sredozemlja i zapadne Europe. Prepoznatljive je crvene boje izvana i narančaste iznutra, izgleda bobice te karakterističnog slatkog okusa. Maginja je nutritivno bogat izvor bioaktivnih spojeva te ima visok potencijal za stvaranje inovativnih, funkcionalnih prehrambenih proizvoda i dodataka prehrani koji bi uvelike mogli doprinijeti zdravlju potrošača zbog visokog stupnja antioksidacijskog kapaciteta. Dosadašnja istraživanja ukazuju na biološke učinke bioaktivnih spojeva maginje poput antibakterijskog, protuupalnog, antialergijskog, hepatoprotektivnog, antitrombotičkog, antivirusnog, antimikrobnog, antikarcinogenog i vazodilacijskog djelovanja.

Inovacije u prehrambenoj industriji mogu, osim inkorporacije nesvakidašnjih sirovina, biti i rezultat korištenja tehnoloških noviteta. 3D tiskanje hrane je aditivna digitalno kontrolirana tehnologija za izradu trodimenzionalnih oblika personalizirane hrane s preciznom kontrolom kalorijske vrijednosti i sastava gotovog proizvoda. Procjenjuje se veliki uspon primjene aditivne tehnologije 3D tiskanja hrane u razvoju novih receptura, okusa, tekstura, mirisa i oblika gotovih proizvoda koji se ne mogu postići tradicionalnim proizvodnim procesima (Zoran i Coelho, 2011). Stoga je cilj ovog rada bio ispitati mogućnost primjene maginje u razvoju funkcionalnih 3D tiskanih proizvoda. U tu svrhu, ispitani su različiti programi 3D tiskanja te vrste i udjeli hidrokolooidnih nosača, a u gotovim proizvodima ispitani su maseni udjeli pigmenata i bioaktivnih spojeva te antioksidacijskih kapaciteta. Osim navedenog, određen je aktivitet vode i pH vrijednost 3D ispisanih proizvoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MAGINJA

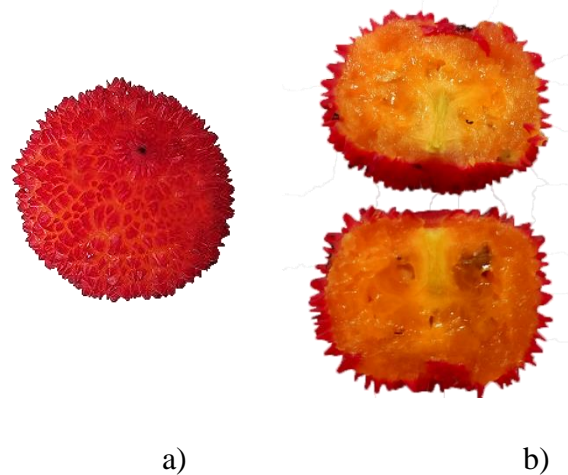
Obična planika (*Arbutus unedo* L.) je samonikla voćna vrsta koja raste na umjereno toplom području eumediteranske zone Sredozemlja i zapadne Europe (slika 1) (Caudullo i sur., 2017). Obična planika se sustavno uzgaja kao zimzeleni grm ili manje drvo u mediteranskim zemljama s razvijenim voćarstvom, zahvaljujući svojim jestivim i nutritivno bogatim plodovima koji se nazivaju maginjom. Nedovoljno je raspoloživih podataka o uzgoju i površinama nasada obične planike te o prirodi maginje. Znanstvenici su proveli istraživanje gospodarskog potencijala obične planike u Španjolskoj (Molina i sur., 2011). Procijenili su da je godišnji prirod maginje od 1500 – 6500 kg po hektaru hipotetske intenzivne plantaže obične planike. Bliske vrijednosti priroda šljive i trešnje (2779 kg/ha – 3905 kg/ha) zabilježene su iste godine u Španjolskoj. Procijenjene vrijednosti priroda maginje ukazuju na njen ekonomski potencijal u uvjetima plantažnog uzgoja i održivog prikupljanja plodova. U Republici Hrvatskoj obična planika neizostavni je dio makije i mediteranskih šuma duž cijele obale Jadrana, od Istarske te sve do Dubrovačko-neretvanske županije kao i na otocima. Uzgoj i mogućnosti iskorištenja maginje u Republici Hrvatskoj nisu dosegle puni potencijal jer je obična planika podcijenjena i mnogima nepoznata voćna vrsta (Skendrović Babojelić i sur., 2020).



Slika 1. Rasprostranjenost obične planike (prema Caudullo i sur., 2017)

Obična planika (*Arbutus unedo* L.) pripada porodici *Ericaceae* (vrjesovke) i redu *Ericales* (vrjesolike). Latinski naziv *unedo* proizlazi iz latinske fraze *unum edo* (u prijevodu znači jedan jedem) pošto se konzumacija maginje u povijesti preporučala u manjim količinama. Morfološka

svojstva obične planike ukazuju na stablo ili grm razgranatog korjenova sustava sa površinskim rastom. Krošnja obične planike je simetrična i okruglasta, a izgled kore ovisi o starosti jedinke te vremenskim prilikama. Listovi su eliptično duguljasti s nepravilno nazubljenim rubom dok je cvijet zvonolikog oblika bijele boje sa zelenim ili ružičastim nijansama. Stablo obične planike obilježava prisutnost cvjetova i plodova različitog stupnja zrelosti u isto vrijeme. Jestivi plod obične planike naziva se maginja te ga karakterizira izgled bobice promjera 1,5-2,5 cm (slika 2). Boja plodova maginje ovisi o fazi zrelosti te kreće od zelene, slijedi ju žuta, narančasta te na posljetku zreli plodovi imaju prepoznatljivu tamno crvenu boju. Vanjska površina maginje sastoji se od papila piramidalnog oblika što površinu čini hrapavom. Unutrašnjost maginje je žute boje te sadrži sjemenke čiji broj ovisi o veličini ploda (od 22 do 40 sjemenki u jednom plodu). Maginji je potrebno 12 mjeseci da sazrije te iz tog razloga ne dozrijevaju svi plodovi istovremeno. Plodonošenje maginje je od listopada do siječnja. Zrela maginja slatkog je okusa te se smatra dijelom mediteranske prehrane (Tardio i sur., 2016), a često se prerađuje u džemove, pekmeze i jaka alkoholna pića (Tardio i sur., 2005). Provedena su brojna istraživanja kemijskog sastava maginje koja upućuju na njeno bogatstvo bioaktivnim spojevima.



Slika 2. Plod obične planike – maginja: a) vanjska površina; b) uzdužni presjek i unutrašnjost
(Vlastita fotografija)

2.1.1. Kemijski sastav maginje

Plodove tradicionalnih i samoniklih voćnih vrsta karakterizira visoka razina kemijske varijabilnosti ovisno o genetskoj različitosti i okolišnim uvjetima rasta. Nutritivna svojstva ploda rezultat su raznovrsnosti i udjela pojedinih komponenata kemijskog sastava. Pomoću

određivanja ukupnog udjela suhe tvari može se olakšano odrediti kvaliteta voćnog ploda namijenjenog tehnološkoj upotrebi i preradi, te su vrste s plodovima višeg udjela suhe tvari poželjnije. Prosječni udio vode u maginji iznosi od 46 % do 56 % (Skendrović Babojelić i sur., 2020). Udio ukupne topljive tvari maginje varira između 16,87-19,4 % (Zitouni i sur., 2020a; Serce i sur., 2010). Analizom maginje uočena je prisutnost različitih ugljikohidrata: monosaharida (fruktoze i glukoze), disaharida (saharoza) i polisaharida (celuloze i škroba) (Özcan i Haciseferoğullari, 2007). Udio ukupnih ugljikohidrata iznosi oko 50 % suhe tvari maginje, što uvelike pridonosi energetske vrijednosti i nutritivnom potencijalu ovih plodova. Udio ukupnih ugljikohidrata varira između 12,68 i 30,06 g/100 g svježeg uzorka maginje (Boussalah i sur., 2018; Gundogdu i sur., 2018). Količina pojedinih ugljikohidrata ovisi o stupnju zrelosti plodova, u nezrelim maginjama prevladava saharoza, dok je u zrelima plodovima fruktoza najzastupljeniji ugljikohidrat (Alarcão-E-Silva i sur., 2001). Mogući razlog odsustva saharoze u zrelim plodovima je hidroliza u monosaharide u procesu zrenja (Vidrih i sur., 2013). Udio fruktoze oscilira između 5,52 i 11,63 g/100 g svježeg uzorka zrele maginje, zabilježen udio glukoze iznosi između 2,9 i 6,10 g/100 g maginje te je udio saharoze u zrelim plodovima od 0,17 do 0,94 g/100 g, ovisno o datumu berbe i lokaciji rasta voćne vrste (Boussalah i sur., 2018; Gundogdu i sur., 2018; Miguel i sur., 2014; Serce i sur., 2010). Sva provedena istraživanja zrelih plodova ističu fruktozu kao prevladavajući šećer kojeg slijedi glukoza (Vidrih i sur., 2013; Ruiz-Rodríguez i sur., 2011; Barros i sur., 2010; Ayaz i sur., 2000). Iz navedenog razloga (i činjenice da je fruktoza slađa od glukoze), maginja je slatkog okusa te osjetljiva na alkoholno vrenje u prisutnosti kvasaca.

Prosječna izmjerena pH vrijednost plodova je 3,43 što pogoduje rastu kvasaca, uzročnika alkoholnog vrenja (Boussalah i sur., 2018). Maginja je, osim šećerima, bogata i mineralima, dijetalnim vlaknima, vitaminima (posebno vitaminom C), aminokiselinama kao i mnogim drugim bioaktivnim spojevima (Miguel i sur., 2014). Najzastupljeniji mineral u maginji je kalij (14,99 g/kg), slijedi ga kalcij (4,959 g/kg), fosfor (3,669 g/kg), magnezij (1,316 g/kg) te natrij (0,701 g/kg), pronađeni su i Cd, Cu, Li, Mn, Ni, Pb te Sr, ali u vrlo malim količinama (Özcan i Haciseferoğullari, 2007). Osim prema udjelu ugljikohidrata, maginja prednjači pred jagodastim voćem (jagodom, malinom, borovnicom i kupinom) i u pogledu dijetalnih vlakana (Jurica i Brčić Karačonji, 2016). Pregledom literature, utvrđeno je da je sadržaj ukupnih dijetalnih vlakna u maginji približno između 7,04 i 22,20 g/100 g analiziranog svježeg zrelog uzorka ploda planike (Sagbas i sur., 2020; Colak 2019; Boussalah i sur., 2018;

Rodriguez-Delgado i sur., 2001). Temeljem navedenih vrijednosti, maginju se može okarakterizirati impresivnim izvorom vlakna za potrošača u populaciji s prehranom kojoj nedostaje vlakna. Znanstvenici su dokazali da konzumacijom 100 g maginje potrošač može zadovoljiti 30-44 % dnevne preporuke za unosom vlakna te se prema Europskim propisima maginja može nazvati sirovinom koja obiluje „vrijednim vlaknima“ (European Parliament and Council, 2011; Trumbo i sur., 2002).

Znanstvenici su također utvrdili da pet do šest zrelih bobica maginje mogu ispuniti preporučenu dnevnu dozu vitamina C (107,63-402,41 mg askorbinske kiseline/100 g svježe maginje) (Šic Žlabur i sur., 2020; Jurica i Brčić Karačonji, 2016). Obzirom da brzina fotosinteze uvjetuje količinu nastale glukoze, prekursora u sintezi vitamina C, znanstvenici su zaključili da će maginje iz područja sa više sunčanih dana imati veći sadržaj vitamina C (Zlabur i sur., 2020; Smirnoff, 1996). Maginja je bogatiji izvor vitamina C u usporedbi s višnjom, borovnicom, malinom, kupinom i jagodom (Sagbas i sur., 2020). U maginji je pronađen i vitamin E čija se količina smanjuje sazrijevanjem, sa 1369 mg/kg u nezrelim plodovima do 557 mg/kg u zrelim plodovima (Oliveira i sur., 2011).

Sadržaj proteina u maginji varira između 22,6 i 35,5 g/kg svježeg uzorka (Boussalah i sur., 2018; González i sur., 2011; Özcan i Haciseferoğullari, 2007). U maginji su determinirane i organske kiseline među kojima prednjači fumarna (1,49 mg/g), slijedi ju mliječna (0,49 mg/g), jabučna (0,84 mg/g), suberinska (0,23 mg/g) i limunska kiselina (0,01 mg/g) (Ayaz i sur., 2000). Budući da parametri okoliša i genetski faktori pojedinog analiziranog uzorka maginje utječu na sadržaj organskih kiselina, drugi timovi znanstvenika zabilježili su jabučnu i limunsku kiselinu kao dominantne u plodovima planike (Zitouni i sur., 2020a; Gundogdu i sur., 2018; Vidrih i sur., 2013).

Znanstvenici su u uzorku maginje detektirali i kvantificirali 26 pojedinačnih masnih kiselina s visokim udjelom nezasićenih masnih kiselina (82,4-89,1 %) od kojih je najzastupljenija linolenska kiselina (30,5-45,1 %), linolna (21,50-26,89 %) i oleinska (17,48-29,92 %), Palmitinska kiselina (7,22-11,4 %) je dominantna među zasićenim masnim kiselinama te ju slijedi stearinska kiselina (2,99-3,89 %) (Boussalah i sur., 2018; Oliveira i sur., 2011; Barros i sur., 2010). Istraživanjima su znanstvenici potvrdili i povoljan omjer omega-3 i omega-4 masnih kiselina u analiziranim uzorcima maginje (Boussalah i sur., 2018).

2.1.2. Bioaktivni spojevi maginje

Fenolni spojevi prirodno nastaju u voćnim plodovima kao odgovor na stresne uvjete okoliša te pridonose bioaktivnom potencijalu (Kennedy i sur., 2011; Dai i sur., 2011), a čine sekundarne biljne metabolite s dvije ili više hidroksilne skupine direktno vezane na benzenski ili aromatski prsten. Pregledom istraživanja prikazanim na tablici 1 može se uočiti da je količina ukupnih fenola maginje u rasponu od 387,5 do 1656 mg GAE/100 g analiziranog svježeg uzorka. Okolišni uvjeti poput temperature zraka i količine oborina rezultiraju tako širokim rasponom količine ukupnih fenola. Uočeno je da uzorci sa područja visokih temperatura zraka i nedostatka oborina sadrže više ukupnih fenola nastalih kao obrambenih mehanizam ploda na uvjete okoliša (Šic Žlabur i sur., 2020). Zanimljivo je istaknuti da je maginja bogatiji izvor fenolnih spojeva u usporedbi sa trnulom i kupinom (Barros i sur., 2010; Fortalezas i sur., 2010). Rezultati nekih istraživanja navode da je galna kiselina najzastupljenija fenolna komponenta maginje (1,62-9,27 mg/100 g ubranih u Turskoj (Sagbas i sur., 2020; Gundogdu i sur., 2018). Druga istraživanja ističu galokatehin kao dominantnu fenolnu komponentu maginje (40,52-44,9 mg/100 g suhog uzorka) koju slijede derivati katehinske kiseline (233,57-33,75 mg/100 g suhog uzorka), te galna kiselina (19,73-21,06 mg/100 g suhog uzorka) (Zitouni i sur., 2020a; Zitouni i sur., 2020b). U plodu planike kvantitativno prednjači antocijan cijanidin-3-galaktozid (2,8 mg/100 g svježeg uzorka), slijedi ga cijanidin-3-glukozid (11,4 µg/100 g sušenog uzorka), delfinidin-3-galaktozi i cijanidin-3-arabinozid (Miguel i sur., 2014). Karotenoidi, posebno β – karoteni, također imaju protektivnu ulogu kao foto-protektori plodova (Maoka, 2020; Young, 1991). Svi navedeni bioaktivni spojevi doprinose visokom stupnju antioksidacijske aktivnosti s kojom maginja prednjači pred crvenim i zelenim grožđem, jabukovim sokom, narom i borovnicom (Liu i sur., 2018a; Maragò i sur., 2015; Gil i sur., 2000).

2.1.3. Zdravstveni značaj maginje

Bioaktivni spojevi maginje sa visokim stupnjem antioksidacijske aktivnosti posjeduju značajnu sposobnost usporavanja oksidativnog procesa inhibicijom štetnog djelovanja slobodnih radikala. Posljedica prevencije negativnog djelovanja slobodnih radikala je zaštita organizma od razvoja brojnih kroničnih bolesti poput kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti, dijabetesa te tumorskih oboljenja (Zhang i sur., 2015).

Tablica 1. Pregled istraživanja bioaktivnih tvari svježeg uzorka maginja različitog lokaliteta

Lokalitet uzgoja		Ukupni fenoli (mg GAE/100 g)	Ukupni antocijani (mg/kg)	β – karoten (μ g/100 g)	Antioksidacijska aktivnost (AA) (μ mol TE/g)	Zaključci rada	Referenca
Hrvatska	Rovinj	573,86 – 657,37	ND – 3,08	84,97 – 134,47	ABTS: 2,252 – 2,284	Maginje iz južnijeg dijela Jadranske obale (srednja i južna Dalmacija) pokazuju veće vrijednosti ukupnih fenola, uslijed viših temperatura zraka i manjim količinama oborina, i antocijana u usporedbi sa uzorcima maginje iz Kvarnera i Istarskog područja. Opisani trend porasta vrijednosti od sjevera prema jugu Jadranske obale primijećen je i kod količine β -karotena i antioksidacijskog kapaciteta analiziranih svježih plodova maginje.	Šic Žlabur i sur., 2020
	Lošinj	605,39	4,51	323,87			
	Cres	553,41 – 850,02	ND – 8,41	140,42 – 332,61			
	Krk	666,39	13,74	205,04			
	Zadar	637,99	4,92	157,76			
	Tisno	523,65	11,28	187,42			
	Šibenik	735,04	ND	228,73			
	Šolta	627,78	24,19	50,07			
	Hvar	479,62	5,54	244,94			
	Vis	557,65	5,74	ND			
	Korčula	622,24	ND	270,96			
	Mljet	600,40 – 621,84	1,23	ND			
Pelješac	813,54	7,59	369,23				
Dubrovnik	707,26	7,38	560,89				
Turska	Mediteranska regija	387,5	/	/	FRAP: 26,6	U turskim maginjama iz pokrajine Trabzon određena je najveća vrijednost ukupnih fenola dok maginje iz pokrajina Yalova prednjače po AA.	Serce i sur., 2010
Turska	pokrajina Trabzon	567 – 818	/	/	TEAC: 16,30 – 29,83		Sagbas i sur., 2020
Turska	pokrajina Yalova	/	/	/	TEAC: 17,51 – 30,06		Gundogdu i sur., 2018
Španjolska	Madrid Cáceres	1656	/	520	/	Srednja vrijednost ukupnih fenola analiziranih uzoraka iz Španjolske je vrlo visoka.	Ruiz-Rodriguez i sur., 2011

TE = ekvivalent troloksa ; GAE = ekvivalent galne kiseline; ABTS = 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina); FRAP = redukcija željezo-2,4,6-tris-2-piridil-s-triazina (TPTZ) u fero-tripiridiltriazin.; TEAC = antioksidacijski kapacitet ekvivalenta troloksa; ND = nije detektirano; / = u istraživanju nije analizirano

Fenolni spojevi pružaju širok raspon bioloških učinaka poput antibakterijskog, protuupalnog, antialergijskog, hepatoprotektivnog, antitrombotičkog, antivirusnog, antikarcinogenog i vazodilatacijskog djelovanja upravo zahvaljujući antioksidacijskom potencijalu (Soobrattee i sur., 2005). Galna kiselina i njezini derivati dokazno pokazuju selektivnu citotoksičnost prema tumorskim stanicama (Locatelli i sur., 2009). Znanstvenici izvještavaju o povijesnim zapisima iz razdoblja stare Grčke (Teofrasto, 1988) prema kojima je maginja korištena u tradicionalnoj narodnoj medicini kao antiseptik, diuretik i laksativ (Bnouham i sur., 2007; Ziyyat i sur., 1997). Ziyyat i sur. (2002) ukazuju na tradicionalno korištenje maginje prilikom liječenja kardiovaskularnih bolesti poput arterijske hipertenzije, ateroskleroze i tromboze. Schaffer i sur. (2005) određivali su antioksidacijsku aktivnost etanolnog ekstrakta maginje te dokazali njegov učinak na zaštitu DNA od peroksidnog oštećenja. Tavares i sur. (2010) analizirali su *in vitro* antiproliferativno djelovanje polifenolnog ekstrakta maginje. Dobiveni rezultati pokazuju da je inhibitorna aktivnost MMP-9, metaloproteinaze koje iniciraju širenje tumorskih stanica u okolna tkiva, maginje slična ili veća onoj kod kupine i zelenog čaja, koji su u literaturi prepoznati kao vrlo učinkoviti antiproliferativni agensi. Znanstvenici su također dokazali da ekstrakti maginje inhibiraju rast i smanjuju vitalnost tumorskih stanica (Guimarães i sur., 2014; Fortalezas i sur., 2010). Mosele i sur. (2016) istražili su *in vitro* stabilnosti molekularne strukture bioaktivnih spojeva izoliranih iz maginje tijekom probavnih uvjeta gastrointestinalnog trakta i metabolizma debelog crijeva. Znanstvenici su dokazali da prisutnost pektina u maginji onemogućavala solubilizaciju fenolnih spojeva (s iznimka galne i elaginske kiseline) i vitamina topivih u mastima tijekom želučane probave što ukazuje da ti spojevi mogu dospjeti u debelo crijevo. Fenolni spojevi u debelom crijevu ulaze u kataboličke reakcije ljudske mikrobiote te nastaju urolitini, hidroksifenilvalerolaktoni, hidroksifenilpropionska kiselina, hidroksifeniloctena kiselina i jednostavni fenolni spojevi poput galne kiseline, p-hidroksibenzojeve kiseline, protokatehuinske kiseline i katehola. Plodovi obične planike pokazali su i antimikrobno djelovanje (Kivčak i sur., 2001). Afrin i sur. (2017) proveli su MTT analizu antikancerogenog djelovanja meda od obične planike te dokazali da on inhibira proliferaciju tumorskih stanica te smanjuje održivost tumorskih stanica u organizmu. Istraživanja provedena na listovima i korijenu obične planike također donose rezultate koji upućuju na njihovo antihipersenzitivno, vazorelaksirajuće, antikancerogeno, protuupalno, antiparazitsko i antimikrobno djelovanje te antitrombotičnu aktivnost (Morgado i sur., 2018).

2.2. 3D TISKANJE HRANE

3D tiskanje hrane je inovativan digitalno kontroliran prehrambeni proizvodni proces za izradu trodimenzionalnih oblika hrane aditivnom tehnologijom nanoseći materijal sloj na sloj.

Uređaj za 3D ispis sastoji se od kućišta, mehaničkih brtvi, upravljačkog kruga i motora. Upravljački krug povezuje uređaj za 3D ispis i računalo koje upravlja radom pisača. Uređaj za 3D ispis sadrži mlaznice koje istiskuju željeni materijal na ispisnu površinu prateći unaprijed računalnim softverom određeni oblik (Yang i sur., 2015). Uređaj nudi mogućnost ispisa više različitih materijala iz različitih mlaznica. Optimizacijom veličine otvora mlaznice i veličine željenog 3D oblika dobivaju se gotovi proizvodi koji kvalitetom i preciznošću odgovaraju softverom određenim modelima. Površina na koju se vrši ispis ima mogućnost zagrijavanja te time termičke obrade mlaznicom nanesenog oblika. Gotovi proizvodi su spremni za konzumaciju ili ih je potrebno pakirati kako bi im se, bez provedbe naknadne termičke obrade u cilju produljenja trajanja, sačuvala mikrobiološka ispravnost.

3D ispis nudi tehnološko rješenje proizvodnje personalizirane prehrane sa preciznom kontrolom kalorijske vrijednosti i sastava gotovog proizvoda (Severini i Derossi, 2016). Ova inovativna tehnologija omogućuje dodatak novih sastojaka, mikro i makro nutrijenata, boja i okusa (i potpunu kontrolu njihove količine, vrste i izvora) u smjesu za ispis ukusne nove hrane koja će zadovoljiti specifične potrebe potrošača. 3D ispis istovremeno nudi rješenje funkcionalne, vizualne i teksturalno privlačne prilagodbe gotovog proizvoda različitim zdravstvenim potrebama, stilu života i apetitu potrošača. Prednosti 3D ispisa su i bolja kontrola kvalitete gotovog proizvoda, ekološki prihvatljiva i održiva tehnologija te veća energetska učinkovitost procesa. Također, ova tehnologija donosi slobodu u kreiranju inovativnih oblika, dimenzija, unutarnjih struktura i tekstura ispisane hrane prateći digitalni dizajn (Godoi i sur., 2016; Sun i sur., 2015).

Brojni su znanstvenici, u posljednjih 5 godina, potaknuti visokim potencijalom koji 3D ispis pruža uložili napore u inicijalna ispitivanja usmjerena na implementaciju 3D ispisa u prehrambeni sektor. Provedena su istraživanja na području kemije i tehnologije žitarica (Severini i sur., 2016), čokolade (Mantihal i sur., 2017; Hao i sur., 2010), mliječnih proizvoda (Le Tohic i sur., 2018) te mesa i ribljih proizvoda (Wang i sur., 2018). Istraživanja su dokazala da je 3D ispis hrane djelotvoran tehnološki napredak prehrambenog inženjerstva.

Kod odabira sirovina za 3D ispis važno je uzeti u obzir može li pripremljena smjesa biti istisnuta iz mlaznice. Smjesa mora biti odgovarajuće visokoznosti kako bi imala sposobnost zadržavanja željenog oblika nakon ispisa. U obzir se također uzimaju i temeljne karakteristike sirovina poput otpornosti na zagrijavanje i želatinizaciju. Male varijacije u sastavu smjese za ispis (poput zrelosti voćne sirovine) zahtijevaju ponovnu optimizaciju procesa ispisa. Ukoliko smjesa ima veći udio vode te ne zadržava željeni ispisan oblik, u nju se dodaju hidrokoloidi za postizanje željene konzistencije i zadržavanje zadovoljavajućih ispisanih oblika (Ricci i sur., 2019).

Primjena 3D ispisa prehrambenih proizvoda može se temeljiti na dva aspekta. Proizvodnja inovativnih prehrambenih proizvoda bogatih bioaktivnim tvarima sa potencijalom upotrebe bilo koje sirovine je jedan smjer primjene 3D ispisa. Poboljšanje izgleda i teksture tradicionalnih prehrambenih proizvoda kontrolom sirovina na makro i mikro strukturnoj razini nudi drugu perspektivu primjene 3D ispisa hrane (Yang i sur., 2015). U digitalnoj gastronomiji je također moguća primjena uređaja za 3D tiskanje hrane u budućnosti. Foodini uređaj za 3D ispis, proizvođača Natural Machines, zamišljen je kao kućni i/ili profesionalni uređaj za izradu raznovrsnih 3D oblika ispisujući smjese personalizirane nutritivne vrijednosti i okusa (Natural Machines, 2022). Također, budući da Foodini za svoj operativni sustav koristi Internet te tako podržava digitalizaciju industrije 4.0, predviđa se mogućnost automatskog naručivanja potrebnih sastojaka za izradu obroka.

2.2.1. Potencijal voćnih sirovina u 3D tiskanju hrane

Broj eksperimenata 3D tiskanja smjesa na bazi voća i/ili povrća nije velik te se naglašava važnost razumijevanja područja kemije i tehnologije voća i povrća prije izvođenja samih eksperimenata (Derossi i sur., 2018; Liu i sur., 2018b; Severini i sur., 2018; Yang i sur., 2018).

Potrošaču prilagođeni obroci, kao rezultat personalizirane prehrane, nude mogućnost prevencije kroničnih bolesti te time i održavanje visoke kvalitete života. Voće i povrće su ključne sirovine uravnotežene ljudske prehrane koje potrošača opskrbljuju vitaminima, antioksidansima, šećerima, mineralima i bioaktivnim spojevima (Ricci i sur., 2019). Klinička istraživanja potvrđuju zdravstvene beneficije prehrane bogate voćem i povrćem. Dokazano je da konzumacija voća i povrća smanjuje rizik od kroničnih i degenerativnih bolesti (Woodside i sur., 2013), poput kardiovaskularne bolesti hipertenzije i rizika od moždanog udara (He i sur.,

2007) te metaboličkih i degenerativnih bolesti (Chen i sur., 2006; Dai i sur., 2006). Količina ugljikohidrata, proteina, lipida, bioaktivnih spojeva, vitamina i minerala tj. komponenti koje doprinose zdravstvenom benefitu, značajno varira ovisno o vrsti voća i povrća (Siriamornpun i sur., 2012). Voda je najzastupljenija komponenta voća i povrća te doseže vrijednosti od čak 90 g na 100 g sirovine poput dinje, lubenice, jagode, krastavaca, rajčice i tikvica do vrijednosti manjih od 80 g na 100 g banane, avokada, graška i krumpira (Ricci i sur., 2019). Sadržaj vode voćne i/ili povrtno sirovine koja se želi upotrijebiti za 3D ispis presudan je čimbenik za prilagodbu viskoznosti smjese za ispis. Viskoznost smjese uvjetuje mogućnost ispisa i zadržavanja željenog 3D ispisanog oblika hrane. Poznavanje sezonskog karaktera i biološke varijacije koja ovisi o okolišnim uvjetima voćne i/ili povrtno sirovine također je temeljni preduvjet za prilagodbu recepture smjese za ispis i dobivanje željenog 3D ispisanog oblika (Ricci i sur., 2019).

Na temelju literaturnih podataka, 3D ispis voća i povrća s ciljem dobivanja inovativnih oblika uključuje sljedeće: odabir vrste voća i povrća ovisno o kemijskom sastavu, biološkoj varijaciji i sezonskom karakteru; definiciju recepture smjese; odabir tehnoloških procesa za pripremu smjesa za ispis; odabir uvjeta ispisa i konačno izbor odgovarajućih tehnoloških rješenja za produljenje rokatrajanja tiskanih oblika (Ricci i sur., 2019)

2.2.2. Odabir voćnih sirovina za 3D tiskanje

Kod odabira voćnih sirovina za 3D tiskanje važno je voditi računa o viskoznosti smjese. Voćna smjesa može stvarati problem kod ekstruzije kroz mlaznice zbog niske ili visoke viskoznosti i sadržaja vlakana koji mogu začepiti mlaznicu, kao i mogućeg odvajanja krute i tekuće faze (Ricci i sur., 2019). Reološka svojstva smjesa moraju odgovarati onima poželjnim za 3D ispis, tj. smjesa bi trebala kontinuirano izlaziti iz mlaznice, ravnomjerno prijanjati na već ispisani sloj, dok bi već ispisani sloj trebao moći zadržati težinu novonanesenog sloja bez urušavanja (Liu i sur., 2018b). Osim reoloških svojstava, kod odabira voćnih sirovina za 3D ispis u obzir se uzimaju i nutritivne i senzorske karakteristike gotovog 3D ispisanog proizvoda. Mogućnost kreiranja nutritivnih karakteristika gotovog proizvoda otvara vrata prilagodbi sadržaja hranjivih tvari za određene skupine potrošača. Capacci i sur. (2012) ističu potrebu za novim strategijama promicanja konzumacije voća što je veliki potencijal za razvoj potrošaču zanimljivih i nutritivno prilagođenih 3D tiskanih voćnih oblika (Ricci i sur., 2019).

Derossi i sur. (2018) osmislili su recepturu obroka na bazi voća prilagođenu za djecu od 3 do 10 godina na temelju pretpostavke da međuobrok mora osigurati 5-10 % ukupne dnevne energetske vrijednosti. Banana je vodeća sirovina obroka iz razloga što je djeci senzorski prihvatljiva te potpomaže viskoznosti smjese, dok ostatak sirovina doprinosi nutritivnom potencijalu i poželjnoj konzistenciji smjese za 3D ispis. Severini i sur. (2018) također temelje svoja istraživanja na želji poboljšanja nutritivnog sadržaja 3D ispisanog oblika pripremom uravnoteženog obroka koji sadrži voće i povrće. Optimizacijom recepture smjese, znanstvenici su kreirali inovativan piramidalan oblik koji će privući pažnju potrošača i rezultirati konzumacijom nutritivno bogatog obroka. Lille i sur. (2018) koristili su tehnologiju 3D ispisa za dizajniranje nove strukture bogate vlaknima i bjelančevinama s malo masti ili šećera. Receptura smjese za uspješni 3D ispis sastojala se od celuloznih nanovlakana, škroba, obranog mlijeka u prahu, poluobranog mlijeka u prahu, raženih mekinja, proteinskog koncentrata zobi i proteinskog koncentrata graha.

Nakon odabira vrste voća i povrća kao i njihovog omjera, slijedi priprema smjese za 3D ispis. Optimizacija recepture smjese mora rezultirati odgovarajućom viskoznošću i mogućnošću ekstruzije smjese iz mlaznice, povezivanjem novoispisanog sloja sa već ispisanim te zadržavanja željenog 3D oblika (Godoi i sur., 2016).

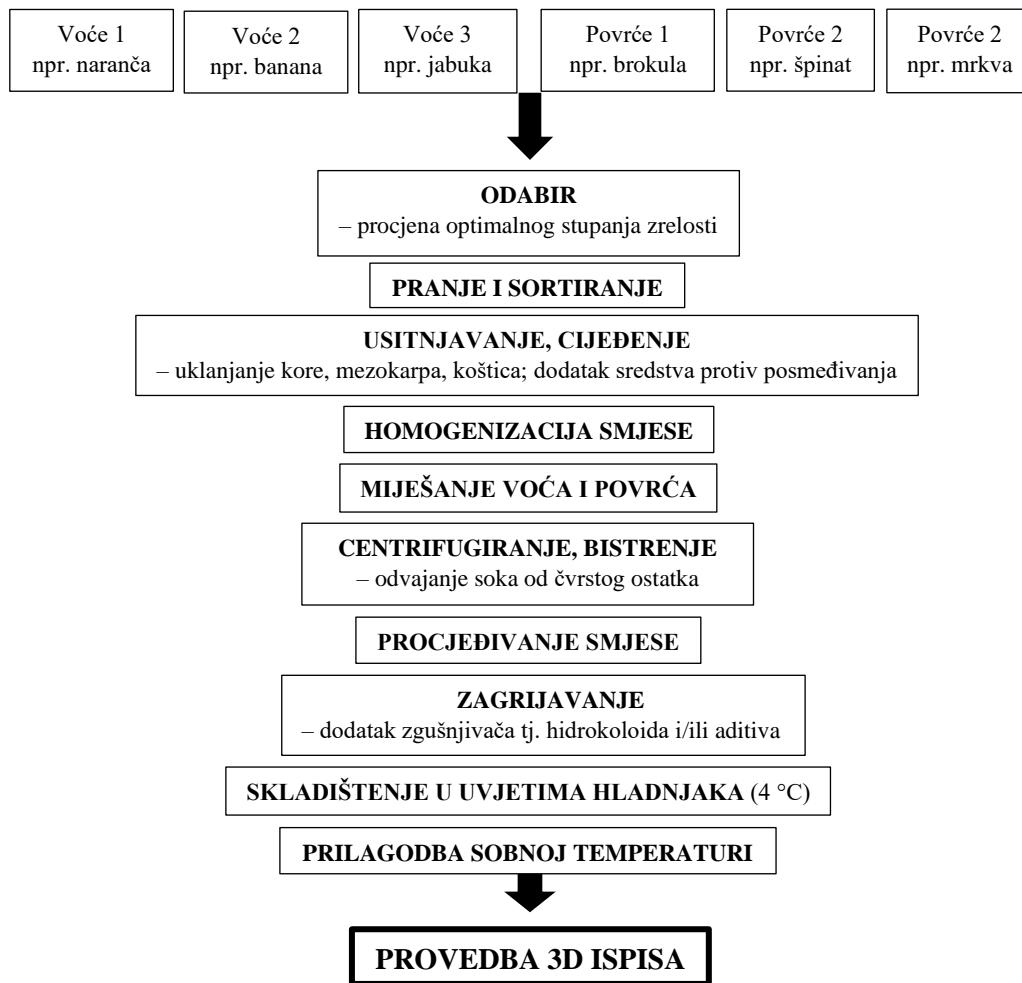
2.2.3. Obrada voćnih sirovina prije 3D tiskanja

Odabrane voćne sirovine potrebno je usitniti s ciljem dobivanja homogene smjese za 3D ispis. Usitnjavanje i homogenizacija smjese ključni su koraci obrade voćne sirovine koji će rezultirati poželjnom veličinom čestica i uspješnosti prolaska smjese kroz otvor mlaznice bez začepeljivanja (Severini i sur., 2018). Slika 3 prikazuje shemu tehnoloških koraka za pripremu voćne smjese za ispis.

Voćnoj smjesi je često potrebna obrada s ciljem povećanja viskoznosti na koju utječu mehanizmi geliranja tj. umreženog povezivanja i toplinska svojstva. Severini i sur. (2018) ovaj su problem riješili koristeći uređaj za dobivanje soka koji odvaja tekuću fazu (sok) od pulpe voća. Odgovarajuću viskoznost smjese za 3D ispis postigli su dodatkom samo određene koncentracije soka u pulpu voća. Povećanje viskoznosti može se postići dodatkom zgušnjivača tj. hidrokoloida (Morell i sur., 2014; Burey i sur., 2008) poput agara, alginata, karagenana, derivata celuloze, gelan gume, ksantan gume, želatine, škroba i pektina. Vancauwenberghe i

sur. (2017) koristili su 11 % (w/w) otopinu pektina za postizanje dovoljne viskoznosti smjese od banane za 3D ispis malih kockica nutritivno prilagođenih za djecu i dokazali važnost pektina za osiguravanje strukturne stabilnosti ispisanih oblika. Potrebna količina pektina određuje se na osnovi reoloških analiza voćnih smjesa prije provedbe ispisa (Derossi i sur., 2018). Cohen i sur. (2009) analizirali su okusne karakteristike mješavina hidrokoloida (ksantan gume i želatine) kako bi uputili inovatore na mogućnosti iskorištavanja hidrokoloida u smjesama različitih okusa. Liu i sur. (2018b) istraživali su utjecaj različitih koncentracije krumpirovog škroba (0 %, 1 %, 2 % i 4 %) u pire krumpiru na printabilnost smjese. Smjese bez dodatka krumpirova škroba nisu omogućavali željenu protočnost iz mlaznice te su se 3D ispisani oblici urušili. Smjesa pire krumpira sa dodatkom od 2 % krumpirovog škroba mogla se ispisati bez poteškoća te su dobiveni kvalitetni i stabilni 3D tiskani oblici sa glatkom površinom. Smjese sa 4 % krumpirova škroba bile su velike viskoznosti te se nisu mogle 3D ispisati. Yang i sur. (2018) proučavali su reološka i mehanička svojstva smjese limunovog soka i pet različitih koncentracija krumpirova škroba (10 g, 12,5 g, 15 g, 17,5 g i 20 g krumpira škroba /100 g smjese). Dodatak 15 g krumpirova škroba u 100 g smjese rezultiralo je ispisom 3D oblika sa vizualno najgladom površinskom teksturom koji je bolje odgovarao dizajniranoj geometriji s vrlo malo nedostataka i bez urušavanja.

Voćnim smjesama za 3D ispis mogu se dodati i sredstva protiv posmeđivanja (npr. limunov sok i askorbinska kiselina) koja će usporiti reakciju oksidacije i zadržati prirodnu boju voćne sirovine (Derossi i sur., 2018). U ovu svrhu mogu se koristiti i druge organske kiseline (octena, mliječna, vinska i jabučna), natrijev klorid, kalcijev klorid, etanol, L-cistein, etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), b-ciklodekstrini i 4-heksilrezorcinol (Ricci i sur., 2019).



Slika 3. Shematski prikaz pripreme smjese za 3D ispis (prema Ricci i sur., 2019)

2.2.4. Zdravstvena ispravnost 3D tiskanih proizvoda

3D ispisani oblici od voća su minimalno obrađeni obroci spremni za konzumaciju. Potrošači preferiraju zdravstveno ispravne proizvode kroz dulji rok trajanja, stoga proizvođači proizvode štite komercijalnim metodama konzerviranja poput pasterizacije. Postavlja se pitanje zdravstvene ispravnosti 3D tiskanih proizvoda tijekom skladištenja i izazov kako ih zaštititi od mogućih uzročnika kvarenja.

Priprema i obrada voćnih sirovina (slika 3) prilikom izrade smjese za 3D ispis moraju osigurati mikrobiološki siguran ispisani 3D oblik. Pranje sirovina u kloriranoj vodi, dezinfekcija uređaja i održavanje niske temperature tijekom mehaničke obrade (usitnjavanja, cijedenja, homogenizacije, miješanja) omogućava dobivanje mikrobiološki sigurne smjese za 3D ispis bogate bioaktivnim tvarima (Derossi i sur., 2018; Severini i sur., 2018). Sam proces

3D ispisa mora također štititi voćnu smjesu od kontaminacije što će rezultirati zdravstveno ispravnim konačnim proizvodom. Svi dijelovi uređaja za 3D ispis koji dolaze u izravan kontakt sa voćnom smjesom, poput mlaznice, moraju se moći očistiti i dezinficirati kako bi se održala sigurnost i kvaliteta voćne smjese i ispisanog 3D oblika.

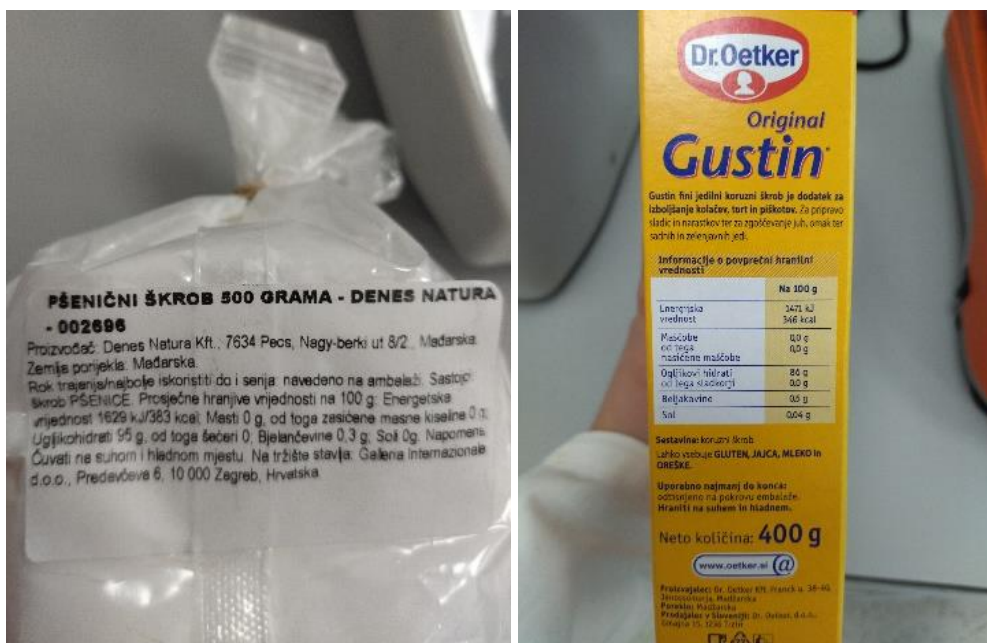
Severini i sur. (2018) analizirali su mikrobiološku sigurnost pakiranih 3D ispisanih voćnih oblika u uvjetima zraka (20 % O₂ i 80 % N₂) te u uvjetima modificirane atmosfere (5 % O₂ i 95 % N₂) tijekom osam dana skladištenja u hladnjaku na 5 °C. Kroz svih osam dana antioksidacijska aktivnost ostala je nepromijenjena iako je zapaženo smanjenje količine ukupnih fenola s 18,8 na 10,5 mg GAE/100 g svježeg uzorka. Koncentracija mezofilnih i psihrofilnih bakterija veća od 4 Log CFU/g uočena je odmah nakon tiskanja u nultom danu skladištenja. Znanstvenici ističu važnost dezinfekcije svakog dijela uređaja koji dolaze u kontakt s hranom kako bi osigurali zdravstvenu ispravnost 3D oblika voćnih sirovina.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Cilj eksperimentalnog rada je bio analizirati pigmente, bioaktivne tvari i antioksidacijski kapacitet uzoraka na bazi maginje dobivenih 3D ispisom. Prije samog 3D ispisa, bilo je potrebno optimizirati programe ispisa, kao i udjele te vrste škrobnih nosača za dobivanje optimalnog oblika i teksture konačnog 3D ispisanog proizvoda. Primjenom odabranih programa i varijacija sastava smjese za 3D ispis, proizvedeni su uzorci u obliku srca. Primjenom ultrazvuka proveden je postupak ekstrakcije čime su dobiveni ekstrakti svih uzoraka za spektrofotometrijsko određivanje bioaktivnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta.

3.1. MATERIJAL

Za pripremu smjese namijenjene za 3D ispis upotrijebljeni su plodovi maginje (*Arbutus unedo* L.). Korištena maginja (slika 2) podrijetlom je iz grada Malog Lošinja koji se nalazi na južnoj strani otoka Lošinja, Primorsko - goranska županija. Maginja je prije upotrebe za eksperiment oprana te osušena staničevinom. Plodovi su upakirani u vrećice od polimernog materijala te skladišteni u zamrzivaču pri $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Neposredno prije 3D ispisa, plodovi su odmrznuti pri sobnoj temperaturi te usitnjeni štapnim mikserom kako bi se dobila homogena kaša sa ujednačenom veličinom čestica ($d \leq 4\text{ mm}$). Tako pripremljena kaša korištena je za proizvodnju svih uzoraka 3D ispisom. Kontrolni uzorak predstavljao je 3D ispisan proizvod načinjen od kaše maginje bez dodataka škrobnih nosača te su mu pri $T=21.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ određeni aktivitet vode a_w (0,90) i pH (3,31). Smjesa za 3D ispis je pored kaše maginje sadržavala škrobne nosače i to pšenični škrob (Denes Natura Kft., Pečuh, Mađarska) i kukuruzni škrob (Gustin, Dr. Oetker, Janossomorja, Mađarska) (slika 4) u udjelima od 4, 6 i 8 %. Svaka varijanta smjese s različitim udjelom i vrstom škrobnog nosača korištena je za 3D ispis dvama različitim programima ispisa (vidi poglavlje 3.2.2., tablica 2).



Slika 4. Korišteni škrobni nosači (Vlastita fotografija)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema smjese za 3D ispis

Kaša maginje dobivena je usitnjavanjem štapnim mikserom unaprijed odmrznutih plodova maginje, koja je potom prenesena u staklenu čašu gdje joj je dodavan pšenični ili kukuruzni škrob u udjelima od 4, 6 i 8 %. Smjesa je zagrijavana na magnetnoj miješalici (LLG-uniSTIRRER 7, Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim, Njemačka) uz konstantno miješenje (slika 5). Zagrijavanje smjese provodilo se do temperature od 80 °C, što odgovara literaturnim podacima o temperaturi želatinizacije pšeničnog i kukuruznog škroba (Jane i sur., 1999). Zagrijavanje se vršilo s namjerom povećanja viskoznosti i dobivanja željene homogene konzistencije smjese pogodne za 3D ispisivanje. Zagrijavanje smjese nužno je kako bi se škrob otopio i želatinizirao čime se ujedno povećava i njegova probavljivost (Ai i Jane, 2015). Dobivena smjesa, prije punjenja u mlaznice uređaja za 3D ispis, ohlađena je na sobnu temperaturu.



Slika 5. Zagrijavanje smjese za 3D ispis na magnetskoj miješalici s grijanjem
(Vlastita fotografija)

3.2.2. Izvedba 3D ispisa

Na slici 5 prikazan je Foodini 3D pisac (Natural Machines, Barcelona, Španjolska) koji je korišten za 3D ispis pripremljene smjese. Za izradu dijelova uređaja koji dolaze u izravan kontakt sa hranom korišteni su materijali sigurni za hranu i perivi u perilici za suđe, kako bi se održala visoka higijena pri svakom 3D ispisu. Dijelovi uređaja od polimernih materijala napravljeni su od polikarbonata i polipropilena te nemaju zaostataka bisfenola A (Natural Machines, 2022). Površina na koju se vrši 3D ispis napravljena je od visokokvalitetnog silikona koji se može zagrijavati u pećnici do temperature od 220 °C (Natural Machines, 2022). Foodini u vratima ima nosače za pet mlaznica. Mlaznice za 3D ispis napravljene su od nehrđajućeg čelika (X10 CrNi 18-8), pri čemu je svaka mlaznica volumena 100 mL. Mlaznice mogu biti punjene različitim smjesama te se mogu koristiti naizmjenično za istovremeni ispis kompleksnih sastava i oblika. Oblici se mogu izabrati u „Galeriji oblika“ uz odabir parametara ispisa unutar Software-a uređaja (Natural Machines, 2022).

a)



b)



Slika 6. a) Foodini – uređaj korišten za 3D ispis ; b) Mlaznica Foodini-ja napunjena smjesom kaše maginje i škroba (Vlastita fotografija)

Za ispis su korištene mlaznice veličine otvora 4 mm. Mlaznice su napunjene smjesom kaše maginje i škroba ohlađenom na sobnu temperaturu pazeći da nema zaostataka zraka u mlaznici koji može narušiti izgled željenog oblika 3D ispisa (slika 6). Mlaznice su postavljene na nosač u vratima pisača. Na zaslonu uređaja ili na računalu odabran je željeni oblik i parametri 3D ispisa. Prije početka svakog ispisa, iz mlaznice se u posebnu čašicu pored površine za ispis ekstrudira mala količina smjese s ciljem utvrđivanja protočnosti mlaznice. Za ispis odabran je oblik srca sa tri sloja (slika 7) te su korištena dva različita programa ispisa. Programi ispisa razlikovali su se u brzini pomicanja mlaznice, brzini ekstruzije smjese iz mlaznice, debljini ispisne linije te udaljenosti mlaznice od površine pri ispisu prvog sloja.



Slika 7. Oblik uzoraka dobivenih 3D ispisom (Vlastita fotografija)

Plan pokusa za ispis uzoraka prikazan je u tablici 2. Kontrolni uzorak je predstavljao kašu maginje bez dodatka škrobnih nosača. Dobivenim uzorcima izmjerena je pH vrijednost i aktivitet vode. Ekstrakti pripremljenih uzoraka dobiveni su ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom (vidi poglavlje 3.2.5.1. i 3.2.5.2.) te su im spektrofotometrijski određene bioaktivne tvari i antioksidacijski kapacitet.

Tablica 2. Plan pokusa za 3D ispis maginje

Uzorak	Škrobni nosač	Udio škrobnog nosača	Korišteni program 3D ispisa
1	Kukuruzni škrob	4 %	Program 1
2			Program 2
3		6 %	Program 1
4			Program 2
5		8 %	Program 1
6			Program 2
7	Pšenični škrob	4 %	Program 1
8			Program 2
9		6 %	Program 1
10			Program 2
11		8 %	Program 1
12			Program 2

3.2.3. Određivanje pH vrijednosti

Aparatura i pribor:

- pH-metar (FiveEasy, Mettler-Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Kombinirana pH-elektroda (LE438, Mettler-Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Staklena čaša, volumena 25 mL
- Tehnička vaga Kern (PCB 2500-2, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Pipeta, volumena 5 mL
- Stakleni štapić

Otapala i reagensi:

- Destilirana voda

Priprema uzorka: 5 g uzorka dobivenog 3D ispisom odvaže se u čaši od 25 mL te se doda 5 mL destilirane vode i homogenizira pomoću staklenog štapića.

Postupak određivanja: pH-metar potrebno je prije prvog mjerenja izbaždariti puferima poznatih pH vrijednosti. Uzorku se pH vrijednost određuje uranjanjem elektrode i očitavanjem pH vrijednosti. Očitani rezultati prikazani su kao srednja vrijednost paralelnih mjerenja \pm standardna devijacija.

3.2.4. Određivanje aktiviteta vode

Aparatura i pribor:

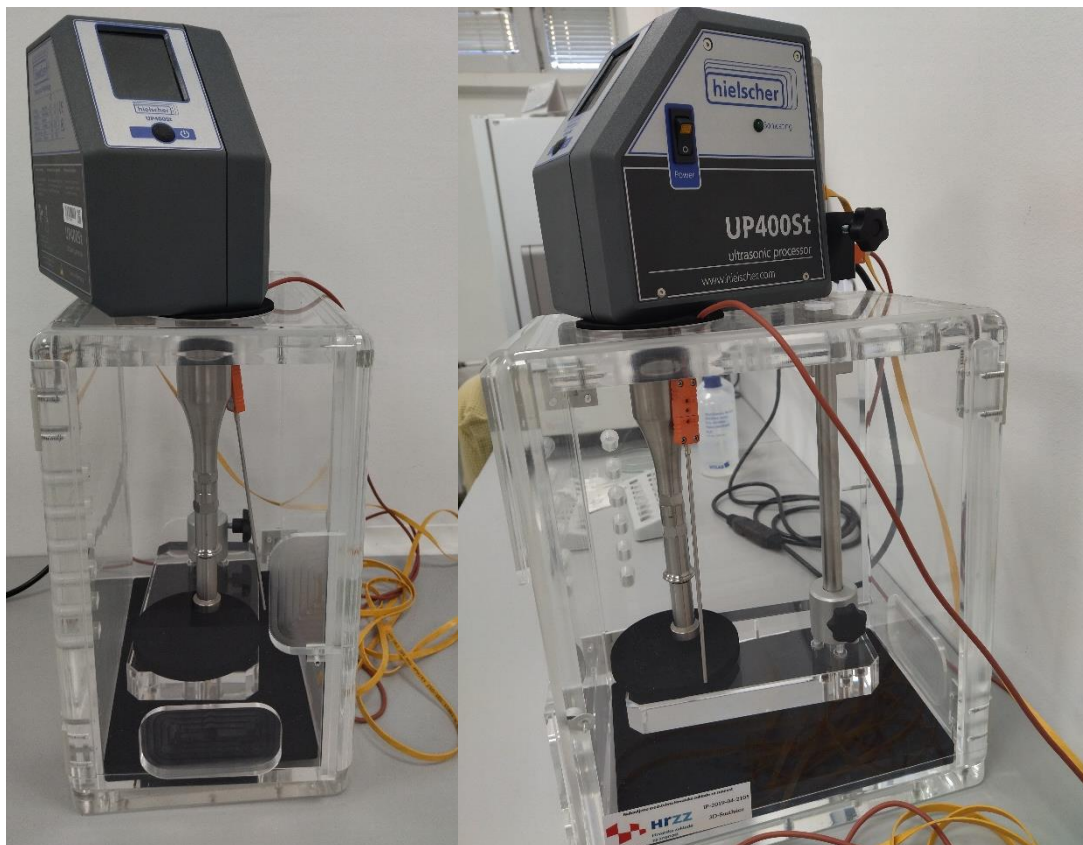
- a_w -metar (AquaLab, P08584, Decagon Devices, Pullman, USA)
- metalna žlica

Postupak određivanja: Uređaj je kalibriran prije korištenja. Metalnom žlicom se uzorak ravnomjerno nanese na dno posudice za mjerenje. Posudica za mjerenje postavlja se pod senzor a_w -metra te se vrijednost aktiviteta vode očitava za zaslону uređaja. Očitani rezultati prikazani su kao srednja vrijednost paralelnih mjerenja \pm standardna devijacija.

3.2.5. Postupak ekstrakcije

3.2.5.1. Ekstrakcija polifenolnih spojeva

Za ekstrakciju 3D ispisanih proizvoda korišten je ultrazvučni procesor (slika 8) uz 1 %-tnu mravlju kiselinu u 80 %-tnom metanolu (v/v) kao ekstrakcijsko otapalo. Ultrazvuk stvara kavitacijske mjehuriće u otapalu za ekstrakciju te implozijom kavitacijskih mjehurića nastaju mikrolokacije visoke temperature i tlaka koje uzrokuju rupturu stanične strukture materijala u ekstrakcijskom otapalu. Usljed ove pojavi dolazi do boljeg kontakta materijala i otapala te poboljšanog prijenosa mase materijala u otapalo što pospješuje ekstrakciju (Putnik i sur., 2017).



Slika 8. Ultrazvučni procesor UP400St, Hielscher Ultrasound Technology (Vlastita fotografija)

Aparatura i pribor:

- Ultrazvučni ekstraktor (UP400St, Hielscher Ultrasound Technology, Njemačka)
- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Staklena čaša, volumena 100 mL
- Odmjerne tikvice, volumena 50 mL, 1 L

- Menzura, volumena 100 mL, 1 L
- Pipeta, volumena 10 mL
- Stakleni lijevak, filter papir
- Plastične falkonice volumena 50 mL
- Stakleni štapić

Otapala i reagensi:

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

Priprema: Za pripremu 80 %-tnog metanola potrebno je u odmjernu tikvicu od 1 L prenijeti 800 mL metanola te ju nadopuniti deioniziranom vodom do oznake. U drugu odmjernu tikvicu od 1 L prenese se 10 mL mravlje kiseline i nadopuni do oznake s prethodno pripremljenim 80 % metanolom.

Postupak ekstrakcije: 10 g uzorka dobivenog 3D ispisom se izvaže u čaši volumena 100 mL pomoću analitičke vage te se nadoda 40 mL ekstrakcijskog otapala (1 %-tna mravlja kiselina u 80 %-tnom metanolu, v/v). Tako pripremljena smjesa ekstrahira se uz slijedeće ekstrakcijske parametre: amplituda 50 %, puls 100 % u trajanju od 5 minuta. Ekstrakti se profiltriraju u odmjerne tikvice volumena 50 mL (slika 9) i nadopune ekstrakcijskim otapalom do oznake te se preliju u plastične falkonice volumena 50 mL i skladište pri -18 °C do provedbe analiza. Dobiveni ekstrakt koristi se u spektrofotometrijskom određivanju ukupnih fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina, flavonola, antocijana i kondenziranih tanina. Ekstrakti se također koriste u analizama anitoksidacijskih aktivnosti primjenom DPPH i FRAP metode.



Slika 9. Filtracija ekstrakata po provedenoj ultrazvučnoj ekstrakciji (Vlastita fotografija)

3.2.5.2. Ekstrakcija karotenoida

Aparatura i pribor:

- Ultrazvučna kupelj (DT 514 H SONOREX DIGITEC 13,5L, 860W, 40 kHz, Bandelin electronic, Njemačka)
- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL, 1L
- Erlenmeyerova tikvica, volumena 50 mL
- Menzura, volumena 100 mL, 1L
- Stakleni lijevak, filter papir
- Plastične falkonice volumena 50 mL
- Stakleni štapić
- Celulozna vata

Otapala:

- Aceton p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Aceton 80 %

Priprema: 80 %-tni aceton se pripremi tako da se u odmjernu tikvicu od 1 L prenese 800 mL acetona i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Postupak ekstrakcije: 3 g uzorka dobivenog 3D ispisom izvaže se u Erlenmeyerovoj tikvici volumena 50 mL pomoću analitičke vage, nadoda se 20 mL ekstrakcijskog otapala (80 %-tni aceton, v/v). Neposredno prije provedbe ekstrakcije, na otvor Erlenmeyerove tikvice umetne se improvizirani čep od celulozne vate. Tako pripremljena smjesa ekstrahira se u ultrazvučnoj kupelji pri temperaturi od 50 °C u trajanju 15 min (slika 10). Po provedenoj ekstrakciji, ekstrakti se profiltriraju u odmjerne tikvice volumena 25 mL i nadopune ekstrakcijskim otapalom do oznake (Bursać Kovačević i sur., 2016).



Slika 10. Ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji (Vlastita fotografija)

3.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje bioaktivnih spojeva

3.2.6.1. Određivanje ukupnih fenola

Određivanje se provodi primjenom spektrofotometrijske metode u alkoholnom ekstraktu uzorka. Metoda se temelji na reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom. Mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 725 nm (Yuan i sur., 2018) dobiva se vrijednost potrebna za izračun ukupnih fenola prema jednadžbi pravca baždarnog dijagrama galne kiseline.

Aparatura i pribor:

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

Otapala i reagensi:

- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens), 5x razrijeđen (Fisher Scientific UK, Loughborough, Velika Britanija)
- Etanol 96 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat anhidrid (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Otopina natrijevog karbonata, 7,5 % (w/v)

Priprema: 75 g anhidrida natrijeva karbonata odvaži se u staklenoj čaši, pomoću destilirane vode kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 1000 mL te destiliranom vodom nadopuni do oznake.

- Standard galne kiseline 97,5 – 102,5 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, Kina)

- Otopina standarda galne kiseline 5 g/L

Priprema: 500 mg galne kiseline odvažuje se u u plastičnoj lađici za vaganje, pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Priprema uzorka: za pripremu ekstrakta vidjeti poglavlje 3.2.5.1.

Postupak određivanja: U epruvetu se otpipetira redom 400 µL adekvatno razrijeđenog ekstrakta, 400 µL F.C. reagensa (koji je prethodno razrijeđen s destiliranom vodom 5x) i 4 mL 7,5 %-tne otopine natrijevog karbonata. Slijepa proba pripremi se na isti način, ali se umjesto ekstrakta koristi ekstrakcijsko otapalo. Reakcijska smjesa u epruvetama se homogenizira kratko upotrebom vortex-a te stoji 20 minuta na sobnoj temperaturi. UV/Vis spektrofotometrom se mjeri apsorbancija reakcijske smjese pri valnoj duljini od 725 nm. Određivanje se provodi u paraleli.

Izrada baždarnog pravca: 500 mg galne kiseline se odvažuje odmjernoj tikvici od 100 mL i otopi u 96 %-tnom etanolu. Odmjerna tikvica se nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od te otopine galne kiseline (5 g/L) pripreme se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 25 mL tako da se koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 10, 25, 50, 100, 150, 250 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 400 µL otopine standarda u staklene epruvete te se redom dodaje 400 µL F.C. reagensa (koji je 5x razrijeđen) i 4 mL 7,5 %-tnog natrijeva karbonata (w/v). Na isti način se pripremi slijepa proba, ali se umjesto otopine standarda uzima destilirana voda. Reakcijske smjese stoje 20 minuta na sobnoj temperaturi, a nakon toga im se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 725 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 725 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (1):

$$y = 0,0078x - 0,0032 \quad R^2 = 0,9983 \quad [1]$$

gdje je:

y- apsorbancija uzorka pri 725 nm

x- koncentracija galne kiseline (mg/L)

3.2.6.2. Određivanje ukupnih flavonoida

Primjenom spektrofotometrijske metode se u metanolnom ekstraktu provodi određivanje ukupnih flavonoida. Spektrofotometrijska se metoda temelji na kolornoj reakciji flavonoida s aluminijevim kloridom i kalijevim acetatom. Nastali intenzitet obojenja mjeri se pri 415 nm (Chang i sur., 2002).

Aparatura i pribor:

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

Otapala i reagensi:

- Etanol 96 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Aluminijev klorid, 98,5 %, anhidrid (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Aluminijev klorid, 10 % (w/v)
Priprema: 10 g aluminijevog klorida se otopi u 10 mL destilirane vode, kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.
- Kalijev acetat, 99 %, anhidrid (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Kalijev acetat, 1 M
Priprema: 9,845 g kalijevo acetata otopi se u 10 mL destilirane vode, kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.
- Standard kvercetin, 95 %, hidrat (Acros Organics, Kina)
- Otopina standarda kvercetina, 200 mg/L

Priprema: 20 mg standarda kvercetina odvaži se u platičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 200 mL i otopi u datom volumenu. Omjerna tikvice se do oznake nadopuni metanolom. Iz alikvotne otopine prirede se redom razrijeđenja od 10, 25, 50, 75, 100 i 150 mg/L.

Priprema uzorka: za pripremu ekstrakta vidjeti poglavlje 3.2.5.1.

Postupak određivanja: Redom se u staklenu epruvetu otpipetira 0,5 mL ekstrakta, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijskog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Slijepa proba pripremi se na isti način, ali se umjesto ekstrakta koristi otapalo za ekstrakciju, dok se umjesto 10%-tnog aluminijskog klorida dodaje se isti volumen destilirane vode. Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega slijedi mjerenje optičke gustoće otopine pri valnoj duljini 415 nm. Mjerenja su provedena u paraleli za svaki uzorak.

Izrada baždarnog pravca: Potrebno je pripremiti otopinu standarda kvercetina koncentracije 200 mg/L. Od te otopine standarda pripreme se razrijeđenja koncentracija 10, 25, 50, 75, 100 i 150 mg/L u odmjernim tikvicama od 25 mL. Za analizu se uzima i alikvotna otopina standarda koncentracije 200 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se redom 0,5 mL otopine standarda, 1,5 mL 96%-tnog etanola, 0,1 mL 10%-tnog aluminijskog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100%-tni metanol te se umjesto 10 %-tnog aluminijskog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa miruje 30 minuta te slijedi mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini 415 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrti se baždarni pravac pri čemu su na apscisi nanese koncentracije kvercetina (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 415 nm. Koncentracija ukupnih flavonoida izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (2):

$$y = 0,0064x - 0,0362 \quad R^2 = 0,9998 \quad [2]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 415 nm,

X – koncentracija kvercetina (mg/L).

3.2.6.3. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola

U metanolnom ekstraktu uzorka dobivenih 3D ispisom provodi se spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 320 nm i 360 nm (Howard i sur., 2003).

Aparatura i pribor:

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

Otapala i reagensi:

- Koncentrirana klorovodična kiselina 37 % (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Etanol 96 % (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična otopina 1 g/L HCl u 96 % etanolu (v/v)
Priprema: 0,227 mL 37 %-tne klorovodične kiseline se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni 96 %-tnim etanolom do oznake.
- Klorovodična otopina 2 g/L HCl u vodi (v/v)
Priprema: 0,454 mL 37 %-tne klorovodične kiseline se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te se nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- Standard kvercetin hidrat 95 % (Acros Organics, Kina)
- Otopina standarda kvercetina 600 mg/L

Priprema: Prvo se pripremi otopina standarda kvercetina u koncentraciji 600 mg/L. 60 mg standarda kvercetina odvažuje se u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 30 mL 100%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu. Odmjerna tikvica se do oznake nadopuni metanolom.

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

Priprema: Prvo se pripremi otopina standarda klorogenske kiseline u koncentraciji 600 mg/L. Odvažuje se 60 mg standarda klorogenske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 30 mL 100%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu. Odmjerna tikvica se do oznake nadopuni metanolom.

Priprema uzorka: za pripremu ekstrakta vidjeti poglavlje 3.2.5.1.

Postupak određivanja: U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL ekstrakta, 250 µL 1 g/L HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm koristeći kvarcne kivete, dok se za određivanje ukupnih flavanola apsorbancija mjeri na 360 nm koristeći staklene kivete. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju. Mjerenja su provedena u paraleli za svaki uzorak.

Izrada baždarnog pravca: Kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za klorogensku kiselinu, a za kvantifikaciju ukupnih flavonola koristi se jednadžba baždarnog pravca za kvercetin.

Iz alikvotne otopine standarda klorogenske kiseline 600 mg/L potrebno je prirediti razrjeđenja 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 i 500 mg/L u odmjernim tikvicama od 25 mL. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto standarda uzima 100 %-tni metanol. U staklenoj se epruveti pripremi reakcijska otopina kao za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina, apsorbancija se mjeri na 320 nm.

Koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (3):

$$y = 0,0025x - 0,0038 \quad R^2 = 0,9996 \quad [3]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 320 nm,

X – koncentracija klorogenske kiseline (mg/L).

Iz alikvotne otopine standarda kvercetina 600 mg/L potrebno je prirediti razrjeđenja 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 i 500 mg/L u odmjernim tikvicama od 25 mL. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto standarda uzima 100 %-tni metanol. U epruveti se pripremi reakcijska otopina jednako kao za određivanje ukupnih flavanola, a apsorbancija se mjeri na 360 nm. Koncentracija ukupnih flavanola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (4):

$$y = 0,0026x + 0,0083 \quad R^2 = 0,9995 \quad [4]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 360 nm,

X – koncentracija kvercetina (mg/L).

3.2.6.4. Određivanje monomernih antocijana

Pri promjeni pH vrijednosti monomerni antocijani reverzibilno mijenjaju svoju kemijsku strukturu što rezultira promjenom apsorpcijskog spektra. Snižanjem pH otopine dolazi do povećanja apsorpcije i obrnuto, a koncentracija antocijana proporcionalna je razlici apsorbcija u otopinama kod dvije različite pH vrijednosti pri valnoj dužini maksimalne apsorpcije za pojedine antocijane (AOAC, 1990). Određivanje monomernih antocijana vrši se koristeći metanole ekstrakte uzoraka dobivenih 3D ispisom.

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Germany)
- pH metar Mettler-Toledo FiveEasy F20 (Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Switzerland)
- Staklena čaše, volumena 100 mL i 1000 mL
- Staklene kivete

- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Germany)
- Plastična lađica za vaganje, špatula
- Mikropipete Eppendorf, volumena 1000 µL i 5000 µL
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1000 mL
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)

Otapala i reagensi:

- Klorovodična kiselina 37 % (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Czech Republic)
- Kalij klorid 99,0-100,5 % (ThermoFisher GmbH, Kandel, Germany)
- Kalij kloridni pufer pH 1,0 (kalij klorid 0,025 M)

Priprema: 1,86 g kalijeva klorida (KCl) odvažuje se u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno se prenese u staklenu čašu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom, doda se 960 mL deionizirane vode u čašu i odvaga se otopi. Pripremljenoj otopini izmjeri se pH, i podesi na vrijednost 1,0 ($\pm 0,05$) s klorovodičnom kiselinom (37 % HCl), čiji utrošak približno iznosi 10 mL. Kad je otopina podešena na pH 1,0 prebaci se u odmjernu tikvicu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom, te do oznake nadopuni deioniziranom vodom.

- Natrij acetat anhidrid 99 % (ThermoFisher GmbH, Kandel, Germany)
- Natrij acetatni pufer 4,5 (natrijev acetat, 0.4 M)

Priprema: 54,43 g natrijeva acetata trihidrata ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \times 3\text{H}_2\text{O}$) odvažuje se u staklenoj čaši od 100 mL i kvantitativno se prenese u staklenu čašu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom, doda se 930 mL deionizirane vode i odvaga se otopi. Pripremljenoj otopini izmjeri se pH, i podesi na vrijednost 4,5 ($\pm 0,05$) s klorovodičnom kiselinom (37 % HCl), čiji utrošak približno iznosi 35 mL. Kad je otopina podešena na pH 4,5 prebaci se u odmjernu tikvicu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom, te do oznake nadopuni deioniziranom vodom.

Priprema uzorka: za pripremu ekstrakta vidjeti poglavlje 3.2.5.1.

Postupak određivanja: Reakcija se postavlja u staklenim epruvetama tako da se za mjerenje jednog uzorka pripreme po dvije epruvete i označe se oznakama pufera (za isti uzorak se na jednu epruvetu napiše pH 1, a na drugu pH 4,5). U svaku se epruvetu otpipetira po 1 mL pripremljenog ekstrakta, a potom se u jednu epruvetu nadoda 4 mL pufera pH 1,0 i u drugu 4 mL pufera 4,5 pH. Nakon 20 minuta, pripremljenim reakcijskim otopinama, mjeri se apsorbancija pri 520 nm i 700 nm, uz deioniziranu vodu kao slijepu probu. Ukoliko su pripremljene reakcijske otopine mutne, poželjno je prije spektrofotometrijskog mjerenja provesti centrifugiranje ili filtriranje kako bi se uklonile čestice mutnoće. Mjerenja su provedena u paraleli za svaki uzorak.

Izračunavanje monomernih antocijana: Koncentracija monomernih antocijana u uzorku izračunava se kao ekvivalent cijanidin-3-galaktozida (mg/L) prema formuli (5):

$$\frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l} \quad [5]$$

gdje je:

$$A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}=1,0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}=4,5}$$

MW = molekulska masa (za cijanidin-3-galaktozid $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{ClO}_{10}$ = 480,7 g/mol)

DF = faktor razrjeđenja

10^3 = faktor za preračunavanje g u mg

ϵ = molarni apsorpcijski ekstinkcijski koeficijent (za cijanidin-3-galaktozid 30200 L/molcm u otapalu 1 % HCl / MeOH)

l = debljina kivete (1 cm)

3.2.6.5. Određivanje polimernih proantocijanidina

Princip određivanja temelji se na specifičnosti spojeva iz skupine flavan-3-ola koji pri reakciji s vanilinom rezultiraju obojenim spojevima. Dobiveni obojeni spojevi određuju se mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 500 nm (Sun i sur., 1998).

Aparatura i pribor:

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

Otapala i reagensi:

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

Priprema: 1 g vanilina se u odmjernoj tikvici od 100 ml nadopuni 100 %-tnim metanolom do oznake.

- Koncentrirana H_2SO_4 , 96 % (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- 25 %-tna otopina H_2SO_4

Priprema: 13,02 mL 96 %-tne H_2SO_4 prenese se u odmjernu tikvicu od 50 mL u koju je prethodno dodano malo 100 %-tnog metanola (cca 20 mL). Tikvica se obavezno drži u hladnoj vodenoj kupelji, a konc. H_2SO_4 se dodaje u malim obrocima. Po dodatku cijelog volumena kiseline, tikvica se do oznake nadopuni 100 %-tnim metanolom.

- Standard katehina (5 g/L)

Priprema: 500 mg standarda katehina odvaže se u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu. Odmjerna tikvica se do oznake nadopuni metanolom.

Priprema uzorka: za pripremu ekstrakta vidjeti poglavlje 3.2.5.1.

Postupak određivanja: U staklenu epruvetu otpipetira se redom 2,5 mL 1 %-tnog vanilina, 2,5 mL 25 %-tne otopine H₂SO₄ i 1 mL adekvatno razrijeđenog ekstrakta. Sadržaj epruvete se kratko promiješa na Vortex uređaju, a potom se uzorci ostave stajati 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Mjeri se apsorbancija reakcijske smjese pri valnoj duljini 500 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju. Mjerenja su provedena u paraleli za svaki uzorak.

Izrada baždarnog pravca: Za pripremu baždarnog pravca pripremi se alikvotna otopina standarda katehina koncentracije 5 g/L. Od te otopine prirede se razrjeđenja 10, 30, 60, 90 i 120 mg/L koristeći odmjerne tikvice od 25 mL. Iz svake tikvice otpipetira se 1 mL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje 2,5 mL 1 %-tnog vanilina i 2,5 mL 25 %-tne otopine H₂SO₄. Uzorci ostave stajati 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 500 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100 %-tni metanol. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije katehina, a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 500 nm. Koncentracija polimernih proantocijanidina izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (6):

$$y = 0,0053x - 0,0124 \quad R^2 = 0,9985 \quad [6]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 500 nm,

X – koncentracija katehina (mg/L).

3.2.6.6. Određivanje ukupnih karotenoida

Za određivanje ukupnih karotenoida koriste se ekstrakti uzoraka pripremljeni s vodenom otopinom acetona (80 %, v/v). Određivanje se temelji na apsorbanciji karotenoida na 470 nm. Za precizno određivanje karotenoida potrebno je uzeti u obzir i količinu klorofila b, koji također znatno apsorbira na valnoj duljini od 470 nm (Lichtenthaler i Buschmann, 2001).

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (LLG-uniSpec 2, Spectrophotometer, Meckenheim, Germany)
- Ultrazvučna kupelj DT 514 H SONOREX DIGITEC (13,5L, 860W, 40 kHz) (Bandelin electronic, Berlin, Germany)
- Staklene kivete
- Analitička vaga Kern (ABJ220-4NM, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Germany)
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1000 mL
- Celulozna vata
- Vortex Grant-bio (PV-1, Cambs, Engleska)

Otapala i reagensi:

- Aceton p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 80 %-tni aceton

Priprema: vidjeti poglavlje 3.2.5.2.

Priprema uzorka: za pripremu ekstrakta vidjeti poglavlje 3.2.5.2.

Postupak određivanja: Pripremljenim ekstraktima mjeri se apsorbancija pri 646,8 nm, 663,2 nm i 470 nm uz 80 %-tni aceton kao slijepu probu. Ukoliko su pripremljene reakcijske otopine mutne, poželjno je prije spektrofotometrijskog mjerenja provesti centrifugiranje ili filtriranje kako bi se uklonile čestice mutnoće. Mjerenja su provedena u paraleli za svaki uzorak.

Izračunavanje: Koncentracija karotenoida (c_{x+c}) u ekstrakcijskoj otopini izračunava se ($\mu\text{g/mL}$) prema formuli (7):

$$c_{x+c} = \frac{(1000 \cdot A_{(a)470}) - (\alpha_{(a)470} \cdot c_a) - (\alpha_{(b)470} \cdot c_b)}{\alpha_{(x+c)470}} \quad [7]$$

gdje je:

$A_{(a)470}$ – izmjerena apsorbancija pri 470 nm

$\alpha_{(a)470}$ – specifični apsorpcijski koeficijent za klorofil a pri 470 nm (L/gcm), te za 80 %-tni aceton iznosi 1,82 L/gcm

$\alpha_{(b)470}$ – specifični apsorpcijski koeficijent za klorofil b pri 470 nm (L/gcm), te za 80 %-tni aceton iznosi 85,02 L/gcm

$\alpha_{(x+c)470}$ – specifični apsorpcijski koeficijent za zbroj ksantofila i karotenoida pri 470 nm (L/g cm), te za 80 %-tni aceton iznosi 198 L/gcm

c_a – koncentracija klorofila a ($\mu\text{g/mL}$), te se za 80 %-tni aceton računa prema formuli (8):

$$c_a = 12.25 A_{663,2} - 2.79 A_{646,8} \quad [8]$$

c_b – koncentracija klorofila b ($\mu\text{g/mL}$), te se za 80 %-tni aceton računa prema formuli (9):

$$c_b = 21.50 A_{646,8} - 5.10 A_{663,2} \quad [9]$$

3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

3.2.7.1. DPPH metoda

Metoda se temelji na određivanju antioksidacijskog kapaciteta spojeva uporabom stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala. DPPH radikal je ljubičaste boje i zbog nesporenog elektrona postiže apsorpcijski maksimum pri 517 nm. Promjena ljubičaste boje u žutu posljedica je sparivanja nesporenog elektrona DPPH radikala s vodikom antioksidansa. Na taj način nastaje reducirani oblik DPPH-H. Promjena boje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona (Prior i sur., 2005; Braca i sur., 2001).

Aparatura i pribor:

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

Otapala i reagensi:

- Metanol za HPLC $\leq 99,9\%$ (Honeywell, Riedel-de-Haën TM, Francuska)
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) (Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD)

- Otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) 0,5 mM u 100 % metanolu (v/v)
Priprema: 0,02 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala odvaži se u plastičnoj lađici za vaganje, kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu te nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. DPPH je potrebno čuvati na tamnome u zatvorenoj tikvici.
- Standard Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) (Biosynth s.r.o., Bratislava, Slovačka)
- Otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) 1 mM
Priprema: Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 1 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) tako da se odvaži 0,025 g Troloxa. Odvaga se otopi u 100 %-tnom metanolu i nadopuni metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL.

Priprema uzorka: Za pripremu ekstrakata vidjeti poglavlje 3.2.5.1.

Postupak određivanja: U staklenu epruvetu se otpipetira 1,5 mL ekstrakta i 3 mL 0,5 mM otopine DPPH. Za kontrolu je potrebno otpipetirati 1,5 mL 100 %-tnog metanola i 3 mL 0,5 mM otopine DPPH. Od izmjerene apsorbancije kontrole potrebno je oduzeti apsorbanciju uzorka, ukoliko je potrebno izračunati postotak inhibicije. Kao slijepa proba koristi se 100 %-tni metanol. Epruvete s reakcijskom smjesom stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm. Mjerenja su provedena u paraleli za svaki uzorak.

Izrada baždarnog pravca za Trolox: Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 0,02 M otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina). Od 0,02 M otopine Troloxa pripreme se razrijeđenja u koncentracijama 125, 150, 200, 400 i 600 μ M u odmjernim tikvicama od 25 mL. U epruvetu se odpipetira 1,5 mL odgovarajuće otopine Troloxa i 3 mL 0,5 mM otopine DPPH. Kao slijepa proba koristi se 100 %-tni metanol. Epruvete sa sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm. Baždarni pravac za standard Troloxa s vrijednostima koncentracije Troloxa (μ M) na apscisi i vrijednostima apsorbancije nanesenim na ordinati. Antioksidacijska aktivnost izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (10):

$$y = -0,0037x + 2,3781 \quad R^2 = 0,9902 \quad [10]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 517 nm,

X – koncentracija Troloxa (μM).

3.2.7.2. FRAP metoda

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom temelji se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tris-2-piridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridiltriazin. Plavo obojeni fero-tripiridiltriazin ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Benzie, 1996).

Aparatura i pribor:

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

Otapala i reagensi:

- Metanol za HPLC $\leq 99.9\%$ (Honeywell, Riedel-de-Haën TM, Francuska)
- Standard Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) (Biosynth s.r.o., Bratislava, Slovačka)
- Otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina), 1 mM
Priprema: vidjeti poglavlje 3.2.7.1.
- Klorovodična kiselina, 37 %-tna (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Češka)

- Klorovodična kiselina, 40 mM

Priprema: Otpipetira se 330 μL 37 %-tne klorovodične kiseline i nadopuni destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL.

- TPTZ-a (2,4,6-tris-2-piridil-s-triazin) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

- TPTZ-a (2,4,6-tris-2-piridil-s-triazin), 10 mM

Priprema: Odvažuje se 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuni do oznake s 40 mM klorovodičnom kiselinom.

- Željezo (III)-klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

- Željezo (III)-klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), 20 mM otopina

Priprema: Odvažuje se 0,541 g željezo (III)-klorida heksahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake s destiliranom vodom.

- Glacijalna octena kiselina, $\geq 99,8\%$ (Honeywell, Fluka TM, Seelze, Njemačka)

- Natrijev acetat trihidrat otporan prema kalijevu permanganatu (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6

Priprema: Odvažuje se 3,1 g natrij-acetat trihidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1 L, u koju se potom otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni se destiliranom vodom do oznake.

- FRAP reagens

Priprema: U staklenoj čaši volumena 50 mL pripremi se FRAP reagens na način da se promiješa 25 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.

Prije početka rada sve reagense (uključujući i standarde) potrebno je inkubirati na 37 °C.

Priprema uzorka: Za pripremu ekstrakata vidjeti poglavlje 3.2.5.1.

Postupak određivanja: U staklene epruvete redom se otpipetira 600 μL adekvatno razrijeđenog 4500 μL FRAP reagensa, dobro se promiješa na Vortex uređaju te 10 minuta termostatira na

temperaturi 37 °C. Zatim se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje otapalo u kojem je uzorak ekstrahiran. Mjerenja su provedena u paraleli za svaki uzorak.

Izrada baždarnog pravca za Trolox: Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 1 mM otopina Troloxa i on njega razrijeđenja kako je opisano u poglavlju 3.2.7.1.

U staklene epruvete redom se otpipetira 600 µL otopine standarda i 4500 µL FRAP reagensa, dobro se promiješa te 10 minuta termostatira na temperaturi 37 °C. Zatim se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje 100 %-tni metanol. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije nacrtava se baždarni pravac s vrijednostima koncentracije Troloxa (µM) na apscisi i vrijednostima apsorbancije nanesenim na ordinati. Iz pripadajuće jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijski kapacitet uzoraka određen FRAP metodom (11):

$$y = 0,005x - 0,0081 \quad R^2 = 0,9992 \quad [11]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 593 nm,

X – koncentracija Troloxa (µM).

3.3. OBRADA PODATAKA

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

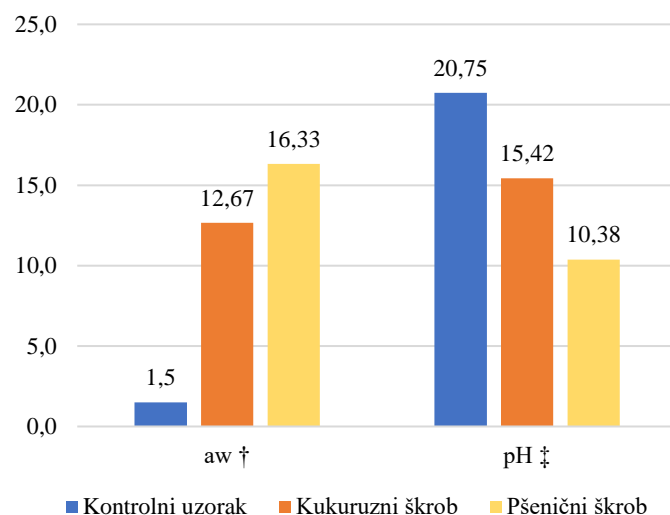
4. REZULTATI I RASPRAVA

Eksperimentalnim radom analizirano je ukupno 13 uzoraka u paralelnim određivanjima. 3D tiskani uzorci međusobno su se razlikovali prema dodanoj vrsti i udjelu škrobnog nosača te odabranom programu 3D ispisa (vidi poglavlje 3.2.2., tablica 2). Zavisne varijable koje su u tijeku istraživanja izmjerene te potom statistički analizirane obuhvaćaju koncentraciju bioaktivnih spojeva i pigmenata, kao i vrijednosti pH, aktiviteta vode (a_w) te antioksidacijskog kapaciteta određenog primjenom dvije metode DPPH i FRAP. Eksperimentalno dobiveni podaci obrađeni su MANOVA analizom i Kruskal Wallis-ovim testom. Rezultati statističke obrade podataka prikazani su na slici 11, slici 12 i slici 13 te tablično u tablici 3, tablici 4, tablici 5 te tablici 6.

4.1. USPOREDBA KONTROLNIH I 3D TISKANIH PROIZVODA OBZIROM NA pH i a_w VRIJEDNOSTI

Za usporedbu rangova prosjeka aktiviteta vode (a_w) i pH u kontrolnim uzorcima (3D tiskani proizvod načinjen od kaše maginje bez dodataka škrobnih nosača) i 3D tiskanim uzorcima uz dodatak različitih tipova škrobnih nosača korišten je Kruskal Wallis-ov test (slika 11).

Vrijednosti a_w statistički se značajno razlikuju među kontrolnim te 3D tiskanim uzorcima. Ovaj je rezultat očekivan ako se uzme u obzir da je u 3D tiskane proizvode prethodno dodan škrobni nosač tj. hidrokoloid za postizanje poželjne viskoznosti i konzistencije smjese za ispis, stoga je očekivano da je došlo do značajnih promjena u a_w . Kontrolni i 3D tiskani uzorci statistički se nisu značajno razlikovali obzirom na pH vrijednost.



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

Slika 11. Rang prosjeka za pH i a_w vrijednosti u kontrolnim uzorcima i 3D tiskanim uzorcima uz dodatak različitih tipova škrobnih nosača

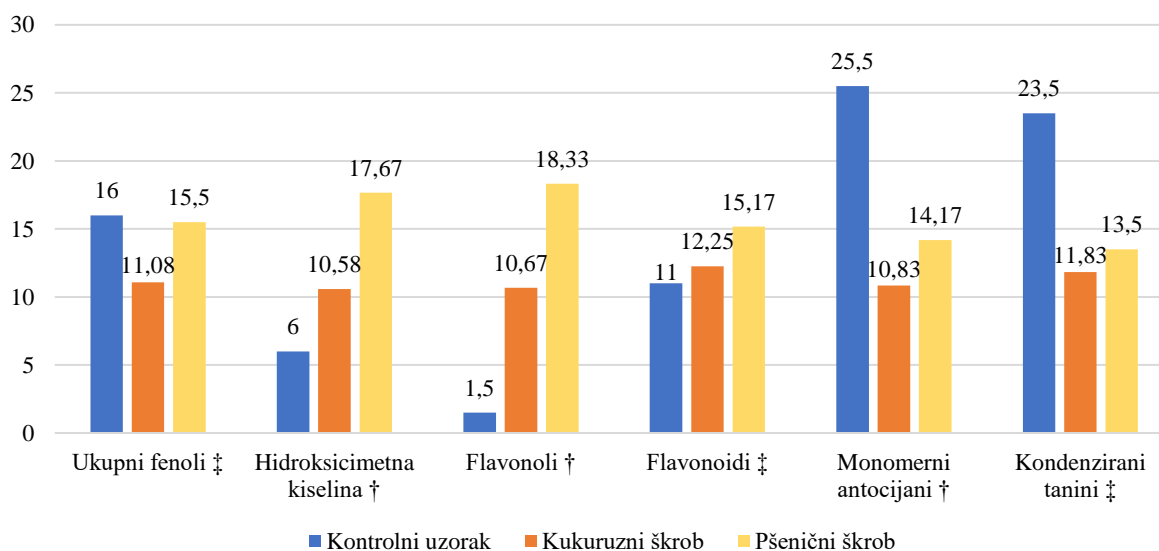
4.2. USPOREDBA KONTROLNIH I 3D TISKANIH PROIZVODA OBZIROM NA SADRŽAJ BIOAKTIVNIH SPOJEVA

Kruskal Wallis-ovim testom uspoređeni su rangovi prosjeka za sadržaj analiziranih bioaktivnih spojeva u kontrolnim i 3D tiskanim uzorcima uz dodatak različitih tipova škrobnih nosača (slika 12). Prema dobivenim rezultatima, evidentno je da nema statistički značajne razlike u rangovima prosjeka između kontrolnih i 3D ispisom dobivenih uzoraka ukoliko se uzorci uspoređuju prema udjelima ukupnih fenola, flavonoida i kondenziranih tanina. Kontrolni i 3D tiskani uzorci statistički su se značajno razlikovali obzirom na sadržaj hidroksicimetnih kiselina, flavonola i monomernih antocijana.

Trenutno u literaturi nema puno podataka o utjecaju 3D ispisa na bioaktivni profil tiskane smjese. Severini i sur. (2018) proveli su istraživanje vezano uz promjenu mikrobioloških, antioksidacijskih i senzorskih svojstava 3D tiskanih uzoraka smjese voća i

povrća tijekom skladištenja kroz 8 dana na 5 °C. Autori su zaključili da 3D ispis nije značajno modificirao ukupan sadržaj fenola, što je u skladu sa rezultatima dobivenim u ovom istraživanju.

Antocijani su kemijski izrazito nestabilni spojevi podložni razgradnji pod utjecajem čimbenika poput pH, temperature, svjetlosti, kisika, enzima, prisustva metalnih iona i mnogih drugih (Wu i sur., 2018). Veliki gubitak antocijana u hrani korelira s reakcijom razgradnje tijekom procesa zagrijavanja hrane (Jiang i sur., 2019). Mogući uzrok statistički značajne razlike sadržaja monomernih antocijana u kontrolnom i 3D tiskanim uzorcima je osjetljivost antocijana na povišenu temperaturu (do 80 °C) kojoj je smjesa za 3D ispis bila izložena uslijed zagrijavanja s ciljem povećanja viskoznosti i dobivanja željene homogene konzistencije. Pretpostavka je u skladu sa istraživanjem Garcia-Viguera i Pilar (2001) koji su izvijestili da je proizvodnja džema od maline rezultirala gubicima antocijana u rasponu od 10 % do 80 % kada je vrijeme termičke obrade pri 90 °C variralo od 10 do 15 min.



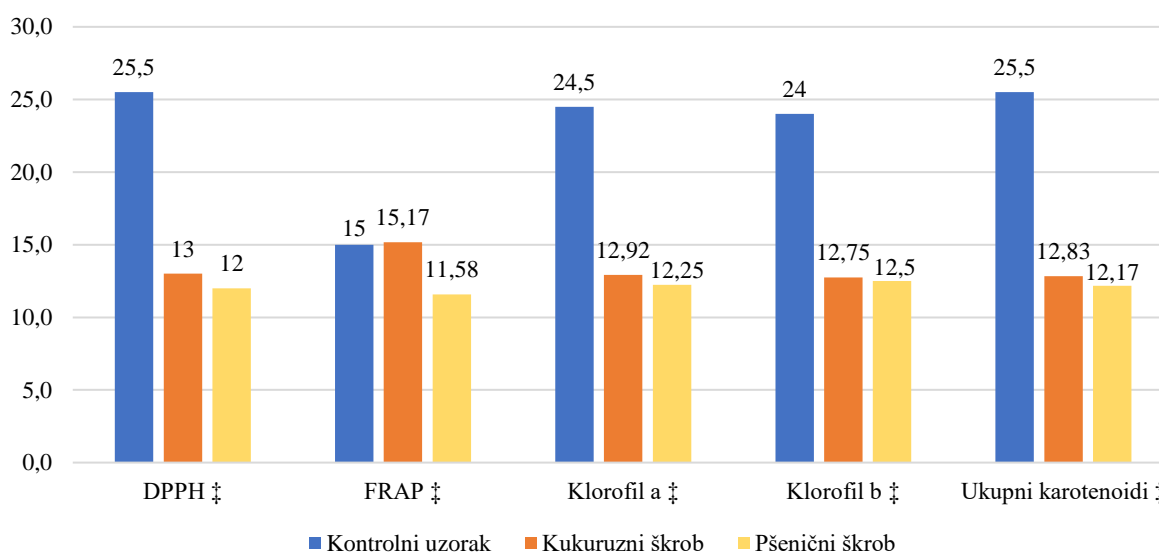
*Rezultati su izraženi kao rang prosjeka izmjerenih vrijednosti. Predstavljene vrijednosti su statistički različite pri $p \leq 0,05$; † značajan faktor u Kruskal Wallis analizi; ‡ nije značajan faktor u Kruskal-Wallisovoj analizi. x os – parametar određivanja; y os – izmjerena vrijednost

Slika 12. Rang prosjeka za sadržaj bioaktivnih spojeva u kontrolnim uzorcima i 3D tiskanim uzorcima uz dodatak različitih tipova škrobnih nosača

4.3. USPOREDBA KONTROLNIH I 3D TISKANIH PROIZVODA OBZIROM NA SADRŽAJ PIGMENATA I ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST

Kruskal Wallis-ovim testom uspoređeni su i rangovi prosjeka za sadržaj analiziranih pigmentata i antioksidacijskog kapaciteta u kontrolnim uzorcima i 3D tiskanim uzorcima uz dodatak različitih tipova škrobnih nosača (slika 13). Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da se kontrolni uzorci statistički nisu značajno razlikovali od 3D ispisanih proizvoda s različitim tipovima škrobova obzirom na ukupne karotenoide, klorofil a, klorofil b te antioksidacijske kapacitete određivane DPPH i FRAP metodom.

Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem Severini i sur. (2018) koji su dokazali da proces 3D ispisa nije značajno utjecao na senzorske karakteristike uzoraka i antioksidacijski kapacitet analiziran DPPH metodom, ispisanih piramidalnih oblika od smjese mrkve, kruške, kivija, brokule i avokada. Autori su poželjnu viskoznost smjese za 3D tiskanje optimirali izdvajanjem dijela tekuće faze (soka) od pulpe te dodatkom ribljeg kolagena u udjelu od 1 %.



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

Slika 13. Rang prosjeka za pigmente i antioksidacijski kapacitet u kontrolnim uzorcima i 3D tiskanim uzorcima uz dodatak različitih tipova škrobnih nosača

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

Prosječni aktivitet vode (a_w) za 3D tiskane proizvode iznosio je 0,93 %. Za razliku od tipa 3DP programa gdje nije utvrđen signifikantan utjecaj, vrsta i udio škrobnog nosača su bili od značajnog utjecaja na a_w u 3D tiskanim proizvodima, pa su tako više a_w vrijednosti određene u 3D tiskanim proizvodima uz dodatak pšeničnog škroba te u nižem udjelu (4 % vs. 6 i 8 %) (tablica 3). Dobiveni rezultati odgovaraju literaturnim podacima prema kojima porast udjela hidrokoloida utječe na smanjenje a_w vrijednosti vezanjem slobodne vode i bubrenjem (Maltini i sur., 2003).

Tablica 3. Rezultati multifaktorske analize o utjecaju vrste i udjela škrobnog nosača te programa 3D ispisa na aktivitet vode (a_w) i pH vrijednost u 3D tiskanim proizvodima

PARAMETAR	n	a_w (%)	pH
Vrsta škrobnog nosača		$p=0,02^\dagger$	$p\leq 0,01^\dagger$
Kukuruzni	12	$0,93\pm 0,00^b$	$3,31\pm 0,00^a$
Pšenični	12	$0,94\pm 0,00^a$	$3,30\pm 0,00^b$
Udio škrobnog nosača		$p\leq 0,01^\dagger$	$p=0,14^\ddagger$
4 %	8	$0,94\pm 0,00^a$	$3,30\pm 0,00^a$
6 %	8	$0,93\pm 0,00^b$	$3,30\pm 0,00^a$
8 %	8	$0,93\pm 0,00^b$	$3,31\pm 0,00^a$
Tip 3DP programa		$p=0,18^\ddagger$	$p=0,08^\ddagger$
Program 1	12	$0,94\pm 0,00^a$	$3,30\pm 0,00^a$
Program 2	12	$0,93\pm 0,00^a$	$3,30\pm 0,00^a$
Prosječna vrijednost	24	$0,93\pm 0,00$	$3,30\pm 0,00$

*Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost paralelnih mjerenja \pm standardna pogreška, Vrijednosti predstavljene različitim slovima statistički su različite pri $p \leq 0,05$; † značajan faktor u multifaktorskoj analizi; ‡ nije značajan faktor u multifaktorskoj analizi.

Prosječna pH vrijednost za 3D tiskane proizvode iznosila je 3,30. Ovdje se kao značajan faktor utjecaja izdvojila jedino vrsta škrobnog nosača pri čemu su nižu pH vrijednost imali 3D

tiskani proizvodi uz dodani pšenični nosač u usporedbi s 3D tiskanim proizvodima koji su proizvedeni uz dodatak kukuruznog škroba (3,30 vs. 3,31) (tablica 3). Sličnu pH vrijednost u uzorcima maginje porijeklom iz Maroka od 3.36 utvrdili su Zitouni i sur. (2020). Također, Šic Žlabur i sur. (2020) za maginju ubranu u Lošinj, kao što su i plodovi maginje iz ovog eksperimenta, utvrdili su pH vrijednost od $3,36 \pm 0,02$ što je u skladu s dobivenim rezultatima u ovom eksperimentu.

4.5. UTJECAJ VRSTE I UDJELA ŠKROBA TE PROGRAMA 3D ISPISA NA UDIO BIOAKTIVNIH SPOJEVA

U tablici 4 prikazan je utjecaj vrste i udjela škrobnih nosača te dvaju odabranih programa 3D ispisa na sadržaj bioaktivnih spojeva u 3D ispisanim uzorcima.

Srednja vrijednost ukupnih fenola u 3D ispisanim uzorcima iznosila je $632,60 \pm 6,12$ mg GAE/100 g analiziranog 3D ispisanog uzorka te su, između analiziranih komponenata ukupnih fenola, najzastupljeniji kondenzirani tanini ($268,11 \pm 1,45$ mg CE/100 g ispisanog uzorka), slijede ih hidroksicimetne kiseline ($44,26 \pm 0,47$ mg CAE/100 g ispisanog uzorka), flavonoli ($18,72 \pm 0,31$ mg QE/100 g ispisanog uzorka), ukupni flavonoidi ($13,69 \pm 0,13$ mg QE/100 g ispisanog uzorka) te na kraju antocijani, s najnižom srednjom vrijednošću ($5,11 \pm 0,02$ mg Cy-3-gal/100 g ispisanog uzorka) (tablica 4). Rezultati udjela ukupnih fenola su u skladu sa pregledom istraživanja bioaktivnih tvari u svježim uzorcima maginje (Šic Žlabur i sur., 2020; Sagbas i sur., 2020; Jurica i sur., 2016).

Vrsta škrobnog nosača značajno je utjecala na udjele svih određivanih bioaktivnih spojeva izuzev udjela flavonoida. Nadalje, iz dobivenih rezultata je vidljivo da su udjeli svih određivanih bioaktivnih spojeva izuzev udjela flavonoida bili značajno veći u 3D tiskanim proizvodima uz dodatak pšeničnog škrobnog nosača.

Udio škrobnog nosača je statistički značajno utjecao na sadržaj ukupnih fenola na način da je kod smjesa sa manjim dodatkom škrobnog nosača zabilježeno više ukupnih fenola ($652,86 \pm 10,59$ mg GAE/100 g) nasprom smjesa za 3D ispis sa većim dodatkom škrobnog nosača ($589,35 \pm 10,59$ mg GAE/100 g). Jednaki trend smanjenja količine analizirang bioaktivnog

spoja s porastom udjela škrobnog nosača u smjesi za 3D ispis prate i flavonoidi, monomerni antocijani i kondenzirani tanini (tablica 4). Moguće objašnjenje za ovaj trend je da do pada koncentracije bioaktivnih spojeva dolazi uslijed povećanog udjela škrobnog nosača te sve manjeg udjela voćne komponente (s 94 % na 92 %) u smjesi za 3D ispis.

Kad se razmotri utjecaj tipa programa, evidentno je da je ovaj izvor varijacije značajno utjecao samo na udio flavonola pri čemu su veće koncentracije u 3D tiskanim uzorcima zabilježene uz tiskanje s programom 1 naspram programa 2 (19,25 vs. 18,19 mg QE/100 g ispisanog uzorka). Obzirom da su se programi ispisa međusobno razlikovali prema brzini pomicanja mlaznice, brzini ekstruzije smjese iz mlaznice, debljini ispisne linije te udaljenosti mlaznice od površine pri ispisu prvog sloja, te da su flavonoli molekularno gledajući najmanje monomerne jedinice među analiziranim bioaktivnim spojevima, moguće je da je uslijed promjene različitih parametara ispisa došlo do brže degradacije ovih senzitivnih molekula te je posljedično njihov udio bio različit u ovisnosti o programima 3D ispisa.

4.6. UTJECAJ VRSTE I UDJELA ŠKROBA TE PROGRAMA 3D ISPISA NA UDIO PIGMENATA U 3D TISKANIM PROIZVODIMA

Rezultati provedene multifaktorske analize o utjecaju vrste i udjela škrobnog nosača te programa 3D ispisa na masene udjele klorofila a, klorofila b te ukupnih karotenoida prikazani su u tablici 5. Prosječni maseni udjeli klorofila u 3D ispisanim uzorcima dobiveni su spektrofotometrijskom analizom i iznose $0,20 \pm 0,01$ mg klorofila a/100 g ispisanog uzorka te $0,35 \pm 0,01$ mg klorofila b/100 g ispisanog uzorka (tablica 5). Maseni udjeli klorofila a i klorofila b u 3D ispisanim uzorcima manji su od vrijednosti koje su odredili Delgado-Pelayo i sur. (2016) analizirajući suhe uzorke zrelih crvenih maginja iz Španjolske. Spektrofotometrijskom analizom pigmenata u 3D ispisanim uzorcima smjesa maginje sa škrobnim nosačima dobiven je prosječni maseni udio ukupnih karotenoida koji iznosi $1,44 \pm 0,00$ mg/100 g ispisanog uzorka (tablica 5).

Tablica 4. Rezultati multifaktorske analize o utjecaju vrste i udjela škrobnog nosača te programa 3D ispisa na masene udjele bioaktivnih spojeva

PARAMETAR	n	Ukupni fenolni spojevi	Hidroksicimetne kiseline	Flavonoli	Flavonoidi	Monomerni antocijani	Kondenzirani tanini
Vrsta škrobnog nosača		p=0,02 [†]	p≤0,01 [†]	p≤0,01 [†]	p=0,32 [‡]	p≤0,01 [†]	p≤0,01 [†]
Kukuruzni	12	615,48±8,65 ^b	42,86±0,66 ^b	17,86±0,31 ^b	13,55±0,18 ^a	4,96±0,03 ^b	263,91±2,05 ^b
Pšenični	12	649,71±8,65 ^a	45,66±0,66 ^a	19,57±0,31 ^a	13,83±0,18 ^a	5,27±0,03 ^a	272,31±2,05 ^a
Udio škrobnog nosača		p≤0,01 [†]	p=0,33 [‡]	p=0,65 [‡]	p=0,04 [†]	p≤0,01 [†]	p≤0,01 [†]
4 %	8	652,86±10,59 ^a	45,01±0,81 ^a	18,43±0,38 ^a	13,62±0,22 ^{a,b}	5,27±0,04 ^b	281,63±2,51 ^a
6 %	8	655,58±0,59 ^a	44,49±0,81 ^a	18,87±0,38 ^a	14,18±0,22 ^a	5,70±0,04 ^a	276,31±2,51 ^a
8 %	8	589,35±10,59 ^b	43,28±0,81 ^a	18,86±0,38 ^a	13,28±0,22 ^b	4,36±0,04 ^c	246,40±2,51 ^b
Tip 3DP programa		p=0,11 [‡]	p=0,33 [‡]	p=0,03 [†]	p=0,55 [‡]	p=0,99 [‡]	p=0,65 [‡]
Program 1	12	621,95±8,65 ^a	44,73±0,66 ^a	19,25±0,31 ^a	13,77±0,18 ^a	5,11±0,03 ^a	268,78±2,05 ^a
Program 2	12	643,25±8,65 ^a	43,78±0,66 ^a	18,19±0,31 ^b	13,61±0,18 ^a	5,11±0,03 ^a	267,44±2,05 ^a
Prosječna vrijednost	24	632,60±6,12	44,26±0,47	18,72±0,31	13,69±0,13	5,11±0,02	268,11±1,45

*Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost paralelnih mjerenja ± standardna pogreška, Vrijednosti predstavljene različitim slovima statistički su različite pri $p \leq 0,05$; † značajan faktor u multifaktorskoj analizi; ‡ nije značajan faktor u multifaktorskoj analizi, Ukupni fenolni spojevi (mg GAE/100 g ispisanog uzorka); Hidroksicimetne kiseline (mg CAE/100 g ispisanog uzorka); Flavonoli (mg QE/100 g ispisanog uzorka); Flavonoidi (mg QE/100 g ispisanog uzorka); Monomerni antocijani (mg Cyd-3-gal /100 g ispisanog uzorka); Kondenzirani tanini (mg katehina/100 g ispisanog uzorka); GAE – ekvivalent galne kiseline; CAE – ekvivalent klorogenske kiseline; QE – ekvivalent kvercetina; Cyd-3-gal - ekvivalent cijanidin-3-galaktozid

Tablica 5. Rezultati multifaktorske analize o utjecaju vrste i udjela škrobnog nosača te programa 3D ispisa na masene udjele klorofila a, klorofila b te ukupnih karotenoida

PARAMETAR	n	Klorofil a	Klorofil b	Ukupni karotenoidi
Vrsta škrobnog nosača		p=0,83‡	p=0,90‡	p≤0,01†
Kukuruzni	12	0,20±0,01 ^a	0,35±0,01 ^a	1,43±0,00 ^b
Pšenični	12	0,20±0,01 ^a	0,35±0,01 ^a	1,45±0,00 ^a
Udio škrobnog nosača		p≤0,01†	p≤0,01†	p≤0,01†
4 %	8	0,25±0,01 ^a	0,43±0,02 ^a	1,53±0,00 ^a
6 %	8	0,22±0,01 ^a	0,39±0,02 ^a	1,47±0,00 ^b
8 %	8	0,13±0,01 ^b	0,23±0,02 ^b	1,32±0,00 ^c
Tip 3DP programa		p≤0,01†	p≤0,01†	p≤0,01†
Program 1	12	0,22±0,01 ^a	0,39±0,01 ^a	1,48±0,00 ^a
Program 2	12	0,18±0,01 ^b	0,32±0,01 ^b	1,40±0,00 ^b
Prosječna vrijednost	24	0,20±0,01	0,35±0,01	1,44±0,00

*Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost paralelnih mjerenja ± standardna pogreška u mg/100 g ispisanog uzorka, Vrijednosti predstavljene različitim slovima statistički su različite pri p≤0,05 ; † značajan faktor u multifaktorskoj analizi; ‡ nije značajan faktor u multifaktorskoj analizi

Prosječna vrijednost masenog udjela ukupnih karotenoida 3D ispisanih uzoraka veća je od vrijednosti koje su dobili Šic Žlabur i sur. (2020) te Ruiz-Rodriguez i sur. (2011) analizirajući svježe uzorke maginje, što doprinosi nutritivnoj vrijednosti 3D ispisanih proizvoda,

Za razliku od ukupnih karotenoida, udio klorofila a i klorofila b u 3D ispisanim uzorcima statistički se značajno ne razlikuje ovisno o vrsti škrobnih nosača. U 3D ispisanim uzorcima sa dodanim pšeničnim škrobom određene su više vrijednosti ukupnih karotenoida u usporedbi s uzorcima uz dodatak kukuruznog škroba (1,45 vs. 1,3 mg/100 g ispisanog uzorka), Nadalje, viši udjeli škrobnih nosača i tip programa 3D ispisa utječu statistički značajno na masene udjele svih analiziranih pigmenata u 3D ispisanim oblicima. Slično kao i za udjele bioaktivnih spojeva gdje je utvrđeno da niži udjeli škrobnih nosača rezultiraju višim udjelima biaktivnih tvari, isti trend nastavljen i u razmatranju utjecaja udjela škrobnih nosača na udjele pigmenata, stoga bi se u proizvodnji funkcionalnih 3D tiskanih proizvoda svakako prednost

trebala dati nižim udjelima škrobnih nosača. Porastom sadržaja škrobnih nosača (od 4 % do 8 %) u smjesama za 3D ispis dolazi do smanjenja masenog udjela klorofila a (od $0,25 \pm 0,01^a$ do $0,13 \pm 0,01^b$ mg/100 g ispisanog uzorka), klorofila b (od $0,43 \pm 0,02^a$ do $0,23 \pm 0,02^b$ mg/100 g ispisanog uzorka) i ukupnih karotenoida (od $1,53 \pm 0,00^a$ do $1,32 \pm 0,00^c$ mg/100 g ispisanog uzorka). Ovaj je rezultat očekivan ako uzmemo u obzir da smjese sa većim udjelom škrobnog nosača imaju manjnji udio voćne komponente koja je izvor pigmenata. U usporedbi s ujecajem na bioaktivne spojeve, gdje se tip 3DP programa nije pokazao značajnim čimbenikom utjecaja izuzev utjecaja na udio flavonola, u slučaju pigmenata je evidentno da tip programa 1 povoljnije djeluje na stabilnost svih promatranih pigmenata. Program 1 razlikuje se od programa 2 prema većoj debljini ispisne linije i udaljenosti mlaznice od površine pri ispisu prvog sloja te prema manjoj brzini pomicanja mlaznice i brzini ekstruzije smjese iz mlaznice. Maseni udjeli klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida u 3D ispisanim uzorcima, pri čijem je ispisu korišten program 1, veći su od onih ispisanih programom 2. U literaturi trenutno nema puno podataka o utjecaju parametara 3D ispisa na bioaktivni profil tiskane smjese. Severini i sur, (2018) su proučavali odnos brzine pomicanja mlaznice i brzine ekstruzije smjese iz mlaznice s morfološkim i mikrostrukturnim svojstvima, Autori su zaključili da program s većom brzinom pomicanja mlaznice i većom brzinom ekstruzije smjese iz mlaznice ispisuje uzorke boljih morfoloških i mikrostrukturnih svojstva, ali nisu analizirali utjecaj parametara ispisa na bioaktivni profil tiskane smjese.

4.7. UTJECAJ VRSTE I UDJELA ŠKROBA TE PROGRAMA 3D ISPISA NA ANTIOKSIDACIJSKE KAPACITETE

Prosječni antioksidacijski kapacitet dobiven DPPH testom 3D ispisanih uzoraka na bazi maginje iznosi $66,32 \pm 0,03$ mg TE/100 g ispisanog uzorka. Provedena je i analiza antioksidacijskog kapaciteta 3D ispisanih uzoraka FRAP testom te je dobiven rezultat $1,53 \pm 0,02$ g TE/100 g ispisanog uzorka (tablica 6). Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta dobivene FRAP testom u ovom istraživanju niže su od literaturnih podataka za svježju maginju (Serce i sur., 2010).

Kao što je već ranije utvrđeno za udjele bioaktivnih spojeva i pigmenta, i antioksidacijski kapacitet analiziranih 3D ispisanih uzoraka statistički značajno ovisi o vrsti kao i udjelu škrobnog nosača. Interesantno je primjetiti da unatoč tome što su 3D ispisani uzorci na bazi maginje uz dodatak pšeničnog škrobnog nosača uglavnom imali veće udjele bioaktivnih spojeva i pigmenta, rezultati za antioksidacijski kapacitet pokazali su više vrijednosti sa oba testa u uzorcima uz dodatak kukuruznog škrobnog nosača.

U uzorcima s manjim udjelom škrobnog nosača, i posljedično većim udjelom usitnjene maginje u smjesi za ispis, DPPH testom dokazan je veći antioksidacijski kapacitet. Dolazi do pada vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta uz dodatak većeg udjela škrobnog nosača u smjesu za 3D ispis, sa $67,82 \pm 0,06$ mg na $64,97 \pm 0,06$ mg TE/100 g ispisanog uzorka. Ovisnost antioksidacijskog kapaciteta o udjelu škrobnog nosača je očekivana ako uzmemo u obzir vrijednosti iz tablice 5 gdje je prikazan utjecaj udjela škrobnih nosača na sadržaj bioaktivnih spojeva u 3D ispisanim uzorcima. Brojna znanstvena istraživanja dokazala su korelaciju između visokog sadržaja bioaktivnih spojeva i visoke antioksidacijske aktivnosti (Zlabur i sur., 2016; Zayova i sur., 2013), ukazujući da će se promjene u udjelu bioaktivnih spojeva odraziti na promjenu antioksidacijskog kapaciteta uzoraka. Također, i FRAP vrijednost je značajno ovisila o dodanim udjelima škrobnih nosača te su najviše vrijednosti određene u 3D ispisanim uzorcima uz dodatak od 6 %. Moguće je da je uslijed niskih FRAP vrijednosti utvrđenih analizom, postoji i veća mogućnost pogreške promatrajući korelaciju s parametrima 3D ispisa. Thaipong i sur. (2006) uspoređujući ABTS, DPPH, FRAP i ORAC metode analize antioksidacijskog kapaciteta zaključili da je potrebno provoditi barem dva od navedena testa kako bi osigurali višu razinu točnosti rezultata te odredili njihovu korelaciju i slijedivost. Autori također ističu važnost razumijevanja mehanizma svake od pojedinih metoda te odabira najprikladnijih prije provedbe analiza antioksidacijskog kapaciteta (Thaipong i sur., 2006).

Tablica 6. Rezultati multifaktorske analize o utjecaju vrste i udjela škrobnog nosača te programa 3D ispisa na antioksidacijski kapacitet

PARAMETAR	n	DPPH	FRAP
Vrsta škrobnog nosača		p=0,03 [†]	p=0,05 [†]
Kukuruzni	12	66,40±0,05 ^a	1,56±0,02 ^a
Pšenični	12	66,24±0,05 ^b	1,50±0,02 ^b
Udio škrobnog nosača		p≤0,01 [†]	p≤0,01 [†]
4 %	8	67,82±0,06 ^a	1,49±0,03 ^b
6 %	8	66,17±0,06 ^b	1,62±0,03 ^a
8 %	8	64,97±0,06 ^c	1,49±0,03 ^b
Tip 3DP programa		p=0,99 [‡]	p≤0,01 [†]
Program 1	12	66,32±0,05 ^a	1,58±0,02 ^a
Program 2	12	66,32±0,05 ^a	1,48±0,02 ^b
Prosječna vrijednost	24	66,32±0,03	1,53±0,02

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

Ako se promotri utjecaj tipa programa 3D ispisa, vidljivo je da on ne utječe na vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH testom, za razliku od vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP testom. Obzirom su programom 1 određene više vrijednosti udjela flavonola, kao i svih pigmenata, moguće je da se ovim rezultatom dade potvrditi doprinos ovih spojeva antioksidacijskom kapacitetu primjenom FRAP metode. Za detaljnije pojašnjenje svih utvrđenih relacija bilo bi korisno u budućnosti uvrstiti još neku od metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti, obzirom se svaka od metoda odlikuje svojstvenim i specifičnim mehanizmom,

5. ZAKLJUČCI

1. Tehnologija 3D ispisa (3DP) povoljno djeluje na stabilnost analiziranih bioaktivnih spojeva (ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina, flavonola, flavonoida, monomernih antocijana i kondenziranih tanina), pigmenata (klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida) i antioksidacijskog kapaciteta (DPPH i FRAP) u 3D ispisanim proizvodima na bazi maginje pri čemu je utvrđeno da svi procesni parametri (vrsta škrobnog nosača, udio škrobnog nosača te tip 3DP programa) imaju značaj utjecaj na provedbu 3D tiskanja u vidu stabilnosti analiziranih komponenata.
2. Kao jedini značajan faktor utjecaja na pH vrijednost 3D ispisanih uzoraka izdvojila se vrsta škrobnog nosača, pri čemu su se smjese s kukuruznim škrobom istaknule višom pH vrijednošću. Na aktivitet vode (a_w) uzoraka dobivenih 3D ispisom nije statistički značajno utjecao tip programa 3D ispisa za razliku od vrste i udjela škrobnog nosača pri čemu je porastom udjela škrobnog nosača posljedično došlo do sniženja a_w .
3. U razmatranju utjecaja procesnih parametara 3DP tehnologije utvrđeno je da dodatak pšeničnog škroba u usporedbi s kukuruznim, povoljnije djeluje na stabilnost gotovo svih bioaktivnih spojeva i pigmenata, dok su veći antioksidacijski kapaciteti određeni u 3D ispisanim uzorcima uz dodatak kukuruznog škroba.
4. Niži udio škrobnih nosača (4 % vs. 6 i 8 %) uglavnom rezultira s većim udjelima bioaktivnih spojeva, pigmenata i antioksidacijskog kapaciteta (DPPH).
5. Tip 3DP programa značajno ne utječe na stabilnost analiziranih bioaktivnih spojeva, izuzev flavonola, gdje se tip programa 1 izdvojio kao bolji u usporedbi s programom 2. Program 1 je također rezultirao i većom stabilnosti analiziranih pigmenata, ali i antioksidacijskog kapaciteta (FRAP) u 3D ispisanim uzorcima na bazi maginje.
6. Tehnologija 3D ispisa može se smatrati obećavajućom u razvoju inovativnih i funkcionalnih proizvoda na bazi maginje.

6. LITERATURA

Afrin S, Forbes-Hernandez TY, Gasparri M, Bompadre S, Quiles JL, Sanna G, Spano N, Giampieri F, Battino M (2017) Strawberry-tree honey induces growth inhibition of human colon cancer cells and increases ROS generation: A comparison with manuka honey. *Int. J. Mol. Sci.* **18**. <https://doi.org/10.3390/ijms18030613>

Ai Y, Jane JL (2015) Gelatinization and rheological properties of starch. *Starch-starke* **67**, 213-224. <https://doi.org/10.1002/star.201400201>

Alarcão-E-Silva MLCMM, Leitão AEB, Azinheira HG, Leitão, MCA (2001) The Arbutus berry: studies on its color and chemical characteristics at two mature stages. *J. Food Comp. and Anal.* **14**, 27–35. <https://doi.org/10.1006/jfca.2000.0962>

AOAC. Official Methods of Analysis: Changes in Official Methods of Analysis Made at the Annual Meeting. Supplement (Vol 15) Association of Official Analytical Chemists. 1990.

Ayaz FA, Kucukislamoglu M, Reunanen M (2000) Sugar, non-volatile and phenolic acids composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L. var. *ellipsoidea*) fruits. *J. Food Compos. Anal.* **13**, 171-177. <https://doi.org/10.1006/jfca.1999.0868>

Barros L, Carvalho AM, Morais JS, Ferreira ICFR (2010) Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chem* **120**, 247-254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.016>

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

Bnouham M, Merhfouf FZ, Legssyer A, Mekhfi H, Maallem S, Ziyat A (2007) Antihyperglycemic activity of *Arbutus unedo*, *Ammoides pusilla* and *Thymelaea hirsuta*. *Pharmazie* **62**, 630-632. <https://doi.org/10.1691/ph.2007.8.6587>

Boussalah, N, Boussalah D, Cebadera-Miranda L, Fernández-Ruiz V, Barros L, Ferreira ICFR, Mata MCS, Madani K (2018) Nutrient composition of Algerian strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.). *Fruits* **73**, 283-297. <https://doi.org/10.17660/th2018/73.5.4>

- Braca A, De Tommasi N, Di Bari L, Pizza C, Politi M, Morelli I (2001) Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *J Nat Prod* **64**, 892-895. <https://doi.org/10.1021/np0100845>
- Burey P, Bhandari B, Howes T, Gidley M (2008) Hydrocolloid gel particles: formation, characterization, and application. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **48**, 361-377. <https://doi.org/10.1080/10408390701347801>
- Bursać Kovačević D, Putnik P, Dragović-Uzelac V, Pedisić S, Režek Jambrak A, Herceg Z (2016) Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice. *Food Chem* **190**, 317-323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.099>
- Capacci S, Mazzocchi M, Shankar B, Macias JB, Verbeke W, Perez-Cueto FJA, Koziol-Kozakowska A, Piorecka B, Niedzwiedzka B, D'Addesa D, Saba A, Turrini A, Aschemann-Witzel J, Bech-Larsen T, Strand M, Smillie L, Wills J, Traill WB (2012) Policies to promote healthy eating in Europe: a structured review of policies and their effectiveness. *Nutr Rev* **70**, 188-200. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2011.00442.x>
- Caudullo G, Welk E, San-Miguel-Ayanz J (2017) Chorological maps for the main European woody species. *Data in brief* **12**, 662-666. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.05.007>
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* **10**, 178-182.
- Chen PN, Ch, SC, Chiou HL, Kuo WH, Chiang CL, Hsieh YS (2006) Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. *Cancer Lett* **235**, 248-259. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.04.033>
- Cohen DL, Lipton JI, Cutler M, Coulter D, Vesco A, Lipson H (2009) Hydrocolloid printing: a novel platform for customized food production. U: Solid Freeform Fabrication Symposium, Austin, TX, str. 807-818.
- Colak AM (2019) Morphological and biochemical diversity in fruits of *Arbutus unedo* L. from East Aegean Region in Turkey. *Erwerbs Obstbau* **61**, 379-383. <https://doi.org/10.1007/s10341-019-00450-4>

- Dai Q, Borenstein AR, Wu Y, Jackson JC, Larson EB (2006) Fruit and vegetable juices and Alzheimer's disease: the Kame project. *Am J Med* **119**, 751-759. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.045>
- Dai J, Mumper RJ (2011) Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**, 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Delgado-Pelayo R, Gallardo-Guerrero L, Hornero-Mendez D (2016) *Food Chem* **199**, 165-175. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.135>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.05.015>
- European Parliament and Council (2011) Regulation (EU) No. 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers. Off. J. Europ. Union, 22112011: L304/18-L304/63.
- Fortalezas S, Tavares L, Pimpao R, Tyagi M, Pontes V, Alves PM, McDougall G, Stewart D, Ferreira RB, Santos CN (2010) Antioxidant Properties and Neuroprotective Capacity of Strawberry Tree Fruit (*Arbutus unedo*). *Nutrients* **2**, 214-229. <https://doi.org/10.3390/nu2020214>
- Garcia-Viguera C, Zafrilla P (2001) Changes in anthocyanins during food processing: influence on color. ACS Symposium Series 775 (chemistry and physiology of selected food colorants), *J. Am. Chem. Soc.* 56-65. <https://doi.org/10.1021/bk-2001-0775.ch004>
- Gil M, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Kade A, Kader AA (2000) Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 4581–4589. <https://doi.org/10.1021/jf000404a>
- Godoi FC, Bhesh SP, Bhandari R (2016) Review. 3D printing technologies applied for food design: status and prospects. *J Food Eng* **179**, 44-54. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.01.025>
- González EA, Agrasar AT, Castro LMP, Fernández IO, Guerra, NP (2011). Solid-state fermentation of red raspberry (*Rubus ideaus* L.) and arbutus berry (*Arbutus unedo* L.) and

characterization of their distillates. *Food Res. Intl.* **44**, 1419-1426. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.032>

Guimarães R, Barros L, Calhella RC, Carvalho AM, Queiroz MJRP, Ferreira ICFR (2014) Bioactivity of Different Enriched Phenolic Extracts of Wild Fruits from Northeastern Portugal: A Comparative Study. *Plant Foods Hum. Nutr.* **69**, 37–42. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0394-5>

Gundogdu M, Ercisli S, Canan I, Orman E, Sameeullah M, Naeem M, Ben Ayed R (2018) Diversity in phenolic compounds, biochemical and pomological characteristics of *Arbutus unedo* fruits. *Folia Horticulturae* **30**, 139-146. <https://doi.org/10.2478/fhort-2018-0014>

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

He FJ, Nowson CA, Lucas M, MacGregor GA (2007) Increased consumption of fruit and vegetables is related to a reduced risk of coronary heart disease: meta-analysis of cohort studies. *J Hum Hypertens* **21**, 717-728. <https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1002212>

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

Jane J, Chen YY, Lee LF, McPherson AE, Wong KS, Radosavljevic M, Kasemsuwan T (1999) Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. *Cereal Chem* **76**, 629-637. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1999.76.5.629>

Jurica K, Brčić Karačonji I (2016) Maginja – neotkriveno mediteransko blago. U: Stipičević S (ured.) Znanstveni dalekozor - Zbirka radova za popularizaciju znanosti, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, str. 21-26.

Kennedy DO, Wightman EL (2011) Herbal extracts and phytochemicals: Plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Adv. Nutr.* **2**, 32–50. <https://doi.org/10.3945/an.110.000117>

- Kivcak B, Mert T, Demirci B, Baser KHC (2001) Composition of the essential oil of *Arbutus unedo*. *Chem. Nat. Compd.* **37**, 445–446. <https://doi.org/10.1055/s-2006-959714>
- Le Tohic C, O’Sullivan JJ, Drapala KP, Chartin V, Chan T, Morrison AP, Kerry JP, Kelly AL (2018) Effect of 3D printing on the structure and textural properties of processed cheese. *J Food Eng* **220**, 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.02.003>
- Lichtenthaler HK, Buschmann C (2001) Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* **1**, F4.3.1-F4.3.8 <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>
- Lille M, Nurmela A, Nordlund E, Metsa-Kortelainen S, Sozer N (2018) Applicability of protein and fiber-rich food materials in extrusion-based 3D printing. *J Food Eng* **220**, 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.04.034>
- Liu Q, Tang GY, Zhao CN, Feng, XL, Xu XY, Cao SY, Meng X, Li S, Gan RY, Li HB (2018a) Comparison of Antioxidant Activities of Different Grape Varieties. *Molecules* **23**, 24–32. <https://doi.org/10.3390/molecules23102432>
- Liu ZB, Zhang M, Bhandari B, Yang C (2018b) Impact of rheological properties of mashed potatoes on 3D printing. *J Food Eng* **220**, 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.04.017>
- Locatelli C, Leal PC, Yunes RA, Nunes RJ, Creczynski-Pasa TB (2009) Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death. *Chem Biol Interact* **181**, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.06.019>
- Maltini E, Torreggiani D, Venir E, Bertolo G (2003) Water activity and the preservation of plant foods. *Food Chem* **82**, 79-86. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00581-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00581-2)
- Mantihal S, Prakash S, Godoi FC, Bhandari B (2017) Optimization of chocolate 3D printing by correlating thermal and flow properties with 3D structure modelling. *Innov Food Sci Emerg Technol* **44**, 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.09.012>
- Maoka T (2020) Carotenoids as natural functional pigments. *J. Nat. Med.* **74**, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>

Maragò E, Iacopini P, Camangi F, Scattino C, Ranieri A, Stefani A, Sebastiani L (2015) Phenolic Profile and Antioxidant Activity in Apple Juice and Pomace: Effects of Different Storage Conditions. *Fruits* **70**, 213–223. <https://doi.org/10.1051/fruits/2015015>

Miguel MG, Faleiro ML, Guerreiro AC, Antunes MD (2014) *Arbutus unedo* L.: Chemical and Biological Properties. *Molecules* **19**, 15799-15823. <https://doi.org/10.3390/molecules191015799>

Molina M, Pardo-De-Santayana M, Aceituno L, Morales R, Tardío J (2011) Fruit production of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) in two Spanish forests. *Forestry* **84**, 419-429. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpr031>

Morell P, Fiszman S, Varela P, Hernando I (2014) Hydrocolloids for enhancing satiety: relating oral digestion to rheology, structure and sensory perception. *Food Hydrocoll* **41**, 343-353. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.038>

Morgado S, Morgado M, Placido AI, Roque F, Duarte AP (2018) *Arbutus unedo* L.: From traditional medicine to potential uses in modern pharmacotherapy. *J Ethnopharmacol* **225**, 90-102. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.07.004>

Mosele JI, Macia A, Romero MP, Motilva MJ (2016) Stability and metabolism of *Arbutus unedo* bioactive compounds (phenolics and antioxidants) under in vitro digestion and colonic fermentation. *Food Chem.* **201**, 120-130. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.076>

Natural Machines, <https://www.naturalmachines.com> Pristupljeno 19. travnja 2022.

Oliveira I, Baptista P, Malheiro Casal RSAB, Pereira JA (2011) Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. *Food Res. Int.* **44**, 1401-1407. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.009>

Özcan MM, Haciseferoğullari H (2007) The strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: Chemical composition, physical properties and mineral contents. *J. Food Eng.* **78**, 1022-1028. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.12.014>

Jiang T, Mao Y, Sui LS, Yang N, Li SY, Zhu ZZ, Wang CT, Yin S, He JR, He Y (2019) Degradation of anthocyanins and polymeric color formation during heat treatment of purple sweet potato extract at different pH. *Food Chem.* **274**, 460-470. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.141>

- Prior RL, Wu XL, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agr Food Chem* **53**, 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Putnik P, Kovacevic DB, Jambrak AR, Barba FJ, Cravotto G, Binello A, Lorenzo JM, Shpigelman A (2017) Innovative "Green" and Novel Strategies for the Extraction of Bioactive Added Value Compounds from Citrus Wastes-A Review. *Molecules* **22**, 680. <https://doi.org/10.3390/molecules22050680>
- Ricci I, Derossi A, Severini C (2019) 3D Printed Food From Fruits and Vegetables. U: Godoi FC, Bhandari BR, Prakash S, Zhang M (ured.) Fundamentals of 3D Food Printing and Applications. 117-149. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814564-7.00005-5>
- Rodriguez-Delgado, MA, Malovana S, Perez JP, Borges T, Garcia-Montelongo FJ (2001) Separation of phenolic compounds by high- performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *J. Chromatogr.* **912**, 249-257. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00598-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00598-2)
- Ruiz-Rodríguez BM, Morales P, Fernández-Ruiz V, Sánchez-Mata MC, Cámara M, Díez-Marqués C, Pardo-de-Santayana M, Molina M, Tardío J (2011) Valorization of wild strawberry tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data. *Food Res. Intl.* **44**, 1244–1253. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.015>.
- Sagbas HI, Ilhan G, Zitouni H, Anjum MA, Hanine H, Necas T, Ondrasek I, Ercisli S (2020) Morphological and Biochemical Characterization of Diverse Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) Genotypes from Northern Turkey. *Agronomy-basel* **10** <https://doi.org/10.3390/agronomy10101581>
- Schaffer S, Heinrich M, Leonti M, Nebel S, Peschel W, Pieroni A, Smith F, Rivera D, Obón C, Inocencio C, Verde A, Fajardo J, Llorach R, Müller WE, Eckert GP, Schmitt-Schillig S, Antonopoulou S, Kyriotakis Z, Manios Y, Nomikos T, Kaliora A, Sidossis L, Galli C, Visioli F, Grande S, Bogani P, de Saizieu A, Flühmann B, D’Orazio D, Fowler A, Koj A, Bereta J, Dulak J, Guzdek A, Kapiszewska M (2005) Understanding local Mediterranean diets: A multidisciplinary pharmacological and ethnobotanical approach. *Pharmacol. Res.* **52**, 353–366. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.06.005>

- Serce S, Ozgen M, Torun AA, Ercisli S (2010) Chemical composition, antioxidant activities and total phenolic content of *Arbutus andrachne* L. (Fam. Ericaceae) (the Greek strawberry tree) fruits from Turkey. *J. Food Compos. Anal.* **23**, 619-623. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.12.007>
- Severini C, Derossi A, Azzolini D (2016) Variables affecting the printability of foods: preliminary tests on cereal-based products. *Innov Food Sci Emerg Technol* **38**, 281-291. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.10.001>
- Severini C, Derossi A (2016) Could the 3D printing technology be a useful strategy to obtain customized nutrition? *Clin J Gastroenterol* <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000705>
- Severini C, Derossi A, Ricci I, Caporizzi R, Fiore A (2018) Printing a blend of fruit and vegetables. New advances on critical variables and shelf life of 3D edible objects. *J Food Eng* **220**, 89-100. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.08.025>
- Shortle E, O'Grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci* **98**, 828-834. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.001>
- Siriamornpun S, Kaisoon O, Meeso N (2012) Changes in colour, antioxidant activities and carotenoids (lycopene, beta-carotene, lutein) of marigold flower (*Tagetes erecta* L.) resulting from different drying processes. *J Funct Foods* **4**, 757-766. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.05.002>
- Skendrović Babojelić M, Bogdanović S, Dlačić I, Duralija B, Prgomet Ž, Prgomet I, Šic Žlabur J, Voća S (2020) Obična planika (*Arbutus unedo* L.) - Biološka, kemijska i gospodarska svojstva. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb.
- Smirnoff N (1996) The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann. Bot.* **78**, 661-669. <https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0175>
- Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T (2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat Res* **579**, 200-213. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.023>
- Sun BS, Ricardo-da-Silva JM, Spranger I (1998) Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J Agr Food Chem* **46**, 4267-4274. <https://doi.org/10.1021/jf980366j>

Sun J, Zhou W, Huang D, Fuh JY, Hong GS (2015) An overview of 3D printing technologies for food fabrication. *Food Bioproc Tech* **8**, 1605-1615. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1528-6>

Tardío J, De Cortes Sánchez-Mata M., Morales R, Molina M, García-Herrera P, Morales P, Díez-Marqués C, Fernández-Ruiz V, Cámara M, Pardo-De-Santayana M, Matallana-González MC, Ruiz-Rodríguez BM, Sánchez-Mata D, Torija-Isasa ME, Guil-Guerrero JL, Boussalah N (2016) Ethnobotanical and food composition monographs of selected mediterranean wild edible plants, U: De Cortes Sánchez-Mata M, Tardío J (ured.) *Mediterranean Wild Edible Plants*, Springer, str. 273-470.

Tardío J, Pardo-De-Santayana M, Morales R (2006) Ethnobotanical review of wild edible plants in Spain. *Bot J Linn Soc* **152**, 27-71. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2006.00549.x>

Tavares L, Fortalezas S, Carrilho C, McDougall GJ, Stewart D, Ferreira RB, Santos CN (2010) Antioxidant and antiproliferative properties of strawberry tree tissues. *J Berry Res* **1**, 3-12. <https://doi.org/10.3233/BR-2010-001>

Teofrasto (1988) *Historia de las plantas*. Spanish translation of the original Greek work written by Theophrastus in the 3rd century B.C. Madrid: Editorial Gredos.

Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* **19**, 669-675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>

Trumbo P, Schlicker S, Yates AA, Poos M (2002) Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *J. Amer. Diet. Assoc.* **102**, 1621-1630. [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(02\)90346-9](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(02)90346-9)

Vancauwenberghe V, Katalagianakis L, Wang Z, Meerts M, Hertog M, Verboven P, Moldenaers P, Hendrickx ME, Lammertyn J, Nicolai B (2017) Pectin based food-ink formulations for 3-D printing of customizable porous food simulants. *Innov Food Sci Emerg Technol* **42**, 138-150. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.06.011>

Vidrih R, Hribar J, Prgomet Z, Poklar Ulrih N (2013) The physico-chemical properties of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **5**, 29–33.

- Wang L, Zhang M, Bhandari B, Yang C (2018) Investigation on fish surimi gel as promising food material for 3D printing. *J Food Eng* **220**, 10-108. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.02.029>
- Woodside JV, Young IS, McKinley MC (2013) Fruits and vegetables: measuring intake and encouraging increased consumption. *Proc Nutr Soc* **72**, 236-245. <https://doi.org/10.1017/S0029665112003059>
- Wu HY, Yang KM, Chiang PY (2018) Roselle Anthocyanins: Antioxidant Properties and Stability to Heat and pH. *Molecules* **26** <https://doi.org/10.3390/molecules23061357>
- Yang F, Zhang M, Bhandari B (2015) Recent development in 3D food printing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **57**, 3145-3153. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1094732>
- Yang FL, Zhang M, Bhandari B, Liu YP (2018) Investigation on lemon juice gel as food material for 3D printing and optimization of printing parameters. *Food Sci. Technol.* **87**, 67-76. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.054>
- Young AJ (1991) The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiol. Plant.* **83**, 702–708. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb02490.x>
- Yuan B, Danao MGC, Stratton JE, Weier SA, Weller CL, Lu M (2018) High pressure processing (HPP) of aronia berry purée: Effects on physicochemical properties, microbial counts, bioactive compounds, and antioxidant capacities. *Innov Food Sci Emerg* **47**, 249-255. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.03.009>
- Zayova E, Stancheva I, Geneva M, Petrova M, Dimitrova L (2013) Antioxidant activity of in vitro propagated *Stevia rebaudiana* Bertoni plants of different origins. *Turk. J. Biol.* **37**, 106–113. <https://doi.org/10.3906/biy-1204-64>
- Zhang YJ, Gan RY, Li S, Zhou Y, Li AN, Xu DP, Li HB (2015) Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases. *Molecules* **20**, 21138–21156. <https://doi.org/10.3390/molecules201219753>
- Zlabur JS, Bogdanovic S, Voca S, Babojelic MS (2020) Biological Potential of Fruit and Leaves of Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) from Croatia. *Molecules* **25** <https://doi.org/10.3390/molecules25215102>

- Zlabur JS, Voca S, Dobricevic N, Pliestic S, Galic A, Boricevic A, Boric N (2016) Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from lemon balm and peppermint leaves. *Int. Agrophys.* **30**, 95–104. <https://doi.org/10.1515/intag-2015-0077>
- Zitouni H, Hssaini L, Ouaabou R, Viuda-Martos M, Hernandez F, Ercisli S, Ennahli S, Messaoudi Z, Hanine H (2020a) Exploring Antioxidant Activity, Organic Acid, and Phenolic Composition in Strawberry Tree Fruits (*Arbutus unedo* L.) Growing in Morocco. *Plants-basel* **9** <https://doi.org/10.3390/plants9121677>
- Zitouni H, Hssaini L, Messaoudi Z, Ourradi H, Viuda-Martos M, Hernandez F, Ercisli S, Hanine H (2020b) Phytochemical Components and Bioactivity Assessment among Twelve Strawberry (*Arbutus unedo* L.) Genotypes Growing in Morocco Using Chemometrics. *Foods* **9** <https://doi.org/10.3390/foods9101345>
- Ziyyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhouchni M, Benjelloun W (1997) Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *J. Ethnopharmacol.* **58**, 45–54. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(97\)00077-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00077-9)
- Ziyyat A, Mekhfi H, Bnouham M, Tahri A, Legssyer A, Hoerter J, Fischmeister R (2002) *Arbutus unedo* induces endothelium-dependent relaxation of the isolated rat aorta. *Phytother Res* **16**, 572–575. <https://doi.org/10.1002/ptr.1143>
- Zoran A, Coelho M (2011) Cornucopia: The Concept of Digital Gastronomy. *Leonardo* **44**, 425-431. https://doi.org/10.1162/LEON_a_00243

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis