

Stabilnost antocijana i tehnike povećanja njihove stabilnosti

Knežević, Valentina

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:980743>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

**STABILNOST ANTOCIJANA I TEHNIKE POVEĆANJA NJIHOVE
STABILNOSTI**

ZAVRŠNI RAD

VALENTINA KNEŽEVIĆ

Matični broj: 118

Split, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ
PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

**STABILNOST ANTOCIJANA I TEHNIKE POVEĆANJA NJIHOVE
STABILNOSTI**

ZAVRŠNI RAD

VALENTINA KNEŽEVIĆ

Matični broj: 118

Split, rujan 2023.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY

STABILITY OF ANTHOCYANINS AND RECOVERY

BACHELOR THESIS

VALENTINA KNEŽEVIĆ

Parent number: 118

Split, September 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko- tehnološki fakultet
Studij Prehrambene tehnologije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Mentor: prof. dr. sc. Tea Bilušić

STABILNOST ANTOCIJANA I TEHNIKE POVEĆANJA NJIHOVE STABILNOSTI Valentina Knežević, 118

Sažetak:

Antocijani su u vodi topljivi pigmenti koji spadaju u fenole, vrlo su važni za rast i razvoj biljaka. Upotrebljavaju se kao prirodni pigmenti u raznim industrijama, a osim toga nedavna istraživanja provedena na antocijanima pokazala su kako imaju vrlo važnu ulogu kod prevencije pojedinih bolesti jer djeluju protuupalno i antioksidacijski. Zbog toga se u posljednje vrijeme javila potreba za povećanom upotrebom antocijana. Budući da su antocijani vrlo nestabilni, to otežava njihovu ekstrakciju i čuvanje. Njihova stabilnost ovisi o mnogim faktorima poput: pH, temperature, svjetla, kopigmentacije, kisika, enzima, askorbinske kiseline, i dr. Rad sadrži informacije temeljene na nizu provedenih eksperimentalnih radova kojima se utvrdilo kakva je stabilnost antocijana pri povišenim temperaturama, različitim pH vrijednostima i svjetlu što omogućava određivanje optimalnih uvjeta za razvoj budućih proizvoda koji sadrže antocijane u cilju očuvanja njihove biološke aktivnosti te prevencije procesa degradacije. Navedene su i tehnike stabilizacije antocijana koji omogućavaju obradu i čuvanje proizvoda s visokim udjelom antocijana pri višim temperaturama i većim pH vrijednostima.

Ključne riječi: antocijani, stabilnost, termička degradacija, stabilizacijske tehnike

Rad sadrži: 26 stranica, 9 slika, 4 tablice, 46 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu završnog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Zvonimir Marijanović, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Mario Buzuk, član
3. prof. dr. sc. Tea Bilušić, mentor

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu., Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology
Study Food technology

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Supervisor: Tea Bilušić, Full professor

STABILITY OF ANTHOCYANINS AND RECOVERY

Valentina Knežević, 118

Abstract:

Anthocyanins are water-soluble pigments that belong to the group of phenols, and are very important for the mechanisms of many plants. They are used as natural pigments in various industries. In addition, and recent research on anthocyanins has shown that they play an important role in the prevention of certain diseases, as they have anti-inflammatory and antioxidative effects. As a result, there has been an increasing demand for the use of anthocyanins. Because anthocyanins are very unstable, they are more difficult to extract and store. Their stability depends on many factors such as: pH, temperature, light, copigmentation, oxygen, enzymes, ascorbic acid and others. The thesis contains information based on a large number of experiments that confirm the stability of the anthocyanins at higher temperatures, different pH values and under the influence of light. This makes it possible to determine optimal conditions for the development of future products containing anthocyanins where degradation processes are prevented. The techniques for stabilising the anthocyanins, allowing the processing of the products containing them at higher temperatures and higher pH values, are also indicated.

Keywords: anthocyanins, stability, thermal degradation, stabilization techniques

Thesis contains: 26 pages, 9 figures, 4 tables, 46 references

Original in: Croatian

Defence committee for evaluation and defense of bachelor thesis:

- | | |
|---|--------------|
| 1. Zvonimir Marijanović, associate prof., | chair person |
| 2. Mario Buzuk, associate prof., | member |
| 3. Tea Bilušić, full professor, | supervisor |

Defence date:

Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

*Završni rad izrađen je u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju
Kemijско-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Tee Bilušić u
razdoblju od veljače do rujna 2023. godine.*

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog završnog rada uključivao je pretragu znanstvenih radova o biološkom značaju i prehrambenim izvorima antocijana, faktorima koji uvjetuju njihovu nestabilnost u namirnici pri čuvanju i obradi te tehnikama koje se koriste u svrhu očuvanja i povećanja njihove stabilnosti.

SAŽETAK

Antocijani su u vodi topljivi pigmenti koji spadaju u fenole, vrlo su važni za rast i razvoj biljaka. Upotrebljavaju se kao prirodni pigmenti u raznim industrijama, a osim toga, nedavna istraživanja provedena na antocijanima pokazala su kako imaju vrlo važnu ulogu kod prevencije pojedinih bolesti jer djeluju protuupalno i antioksidacijski. Zbog toga se u posljednje vrijeme javila potreba za povećanom upotrebom antocijana. Budući da su antocijani vrlo nestabilni, to otežava njihovu ekstrakciju i čuvanje. Njihova stabilnost ovisi o mnogim faktorima poput: pH, temperature, svjetla, kopigmentacije, kisika, enzima, askorbinske kiseline i dr. Rad sadrži informacije temeljene na nizu provedenih eksperimentalnih radova kojima se utvrdilo kakva je stabilnost antocijana pri povišenim temperaturama, različitim pH vrijednostima i svjetlu što omogućava određivanje optimalnih uvjeta za razvoj budućih proizvoda koji sadrže antocijane u cilju očuvanja njihove biološke aktivnosti te prevencije procesa degradacije. Navedene su i tehnike stabilizacije antocijana koje omogućavaju obradu i čuvanje proizvoda s visokim udjelom antocijana pri višim temperaturama i većim pH vrijednostima.

Ključne riječi: antocijani, stabilnost, termička degradacija, stabilizacijske tehnike

ABSTRACT

Anthocyanins are water-soluble pigments that belong to the group of phenols, and are very important for the mechanisms of many plants. They are used as natural pigments in various industries. In addition, recent research on anthocyanins has shown that they play an important role in the prevention of certain diseases since they have anti-inflammatory and antioxidative effects. As a result, there has been an increasing demand for the use of anthocyanins. Because anthocyanins are very unstable they are more difficult to extract and store. Their stability depends on many factors such as: pH, temperature, light, copigmentation, oxygen, enzymes, ascorbic acid and others. The thesis contains a large number of experiments that confirm the stability of the anthocyanin at higher temperatures, different pH values and under the influence of light. This makes it possible to determine optimal conditions for the development of the future products containing the anthocyanins where degradation processes are prevented. The techniques for stabilising the anthocyanins, allowing the processing of the products containing them at higher temperatures and higher pH values, are stated as indicated.

Key words: anthocyanins, stability, thermal degradation, stabilization techniques

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. ANTOCIJANI	3
2.1. Struktura i podjela antocijana.....	3
2.2. Prehrambeni izvori antocijana.....	6
3. BIOLOŠKI ZNAČAJ ANTOCIJANA	8
4. UTJECAJ TEMPERATURE NA STABILNOST ANTOCIJANA	10
5. UTJECAJ KISELOSTI MEDIJA NA STABILNOST ANTOCIJANA	14
6. UTJECAJ SVJETLA NA PRISUTNOST ANTOCIJANA	17
7. TEHNIKE ZA POVEĆANJE STABILNOSTI ANTOCIJANA	18
8. ZAKLJUČAK.....	23
9. POPIS KRATICA I SIMBOLA.....	24
10. LITERATURA.....	25

1. UVOD

Antocijani su biljni pigmenti topljivi u vodi koji pripadaju grupi flavonoida. Najviše su zastupljeni u voću, a nalaze se još u povrću, cvijeću te raznim dijelovima biljaka poput korijenja i lišća. Prepoznatljivi su po crvenoj, plavoj ili ljubičastoj boji. U prirodi su prisutni u obliku glikozida. Od brojnih vrsta antocijana, njih 6 su identificirani u hrani, a to su: cijanidin, pelargonidin, delphinidin, peonidin, petunidin i malvidin.¹

Antocijani su biološki aktivne komponente i djeluju kao antioksidansi, protuupalno, antimikrobno, kao inhibitori virusa i dr. Budući da se učinkovitost antocijana često povezuje sa zaštitom stanica od oksidativnog stresa, smatra se kako na taj način mogu zaštititi i neurone, živčane stanice, a time i spriječiti nastanak oboljenja od neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove, Huntingtonove i Parkinsonove bolesti.² Mnoga provedena *in vitro* istraživanja, na životinjskim ili ljudskim stanicama, potvrdila su potencijal antocijana da poboljšavaju ljudsko zdravlje i sprječavaju nastanak raznih bolesti. Pored neurodegenerativnih bolesti, sprječavaju nastanak karcinoma ili usporavaju napredovanje karcinoma u organizmu, i sprječavaju nastanak raznih kardiovaskularnih bolesti.²

Upotrebu antocijana otežava njihova velika nestabilnost što ovisi o nizu faktora, prvenstveno pH, svjetlosti i temperaturi. Stabilni su samo pri nižim pH vrijednostima što ograničava upotrebu antocijana kao prirodnih pigmenta samo u kiselom mediju. U protivnom dolazi do promjene boje. U kiselom mediju boja pigmenta je crvena, a u bazičnom se mijenja u plavu. U bazičnom području su antocijani veoma nestabilni i često degradiraju do tamno smeđih oksidiranih produkata degradacije.³ Pod utjecajem visokih temperatura dolazi do procesa degradacije i mijenjanja strukture antocijana. Zbog njihova velikog potencijala velik je broj istraživanja koja se provode u svrhu otkrivanja raznih metoda koje će olakšati njihovu izolaciju i izdvajanje iz biljnih sastojaka, a pritom sačuvati njihova svojstva.

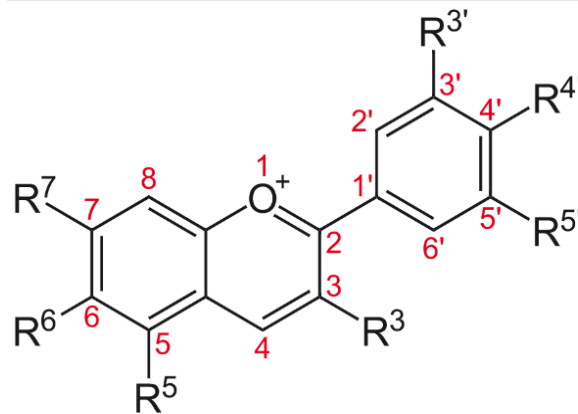
Tehnike inkapsulacije, kopigmentacija, dodatak manoproteina (vanjski sloj stanične stijenke kvasca koji sadrži maninski lanac koji štiti stanicu od utjecaja okoline) i

nanoliposomi, neke su od tehnika koje povećavaju bioraspoloživost antocijana i njihovu stabilnost.

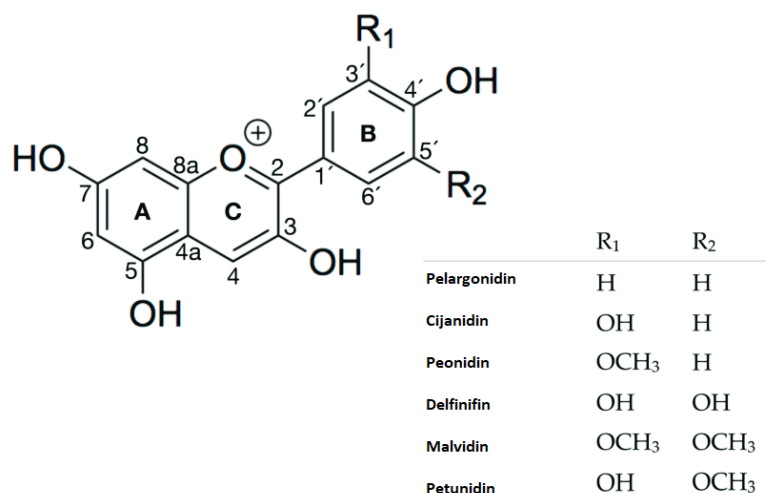
2. ANTOCIJANI

2.1. Struktura i podjela antocijana

Antocijani dijele istu osnovnu strukturu molekule (Slika 1.) koja sadrži dva benzenska prstena između kojih se nalazi heterociklički prsten (flavilium kation). Flavilium kation čini osnovnu strukturu antocijana i odgovoran je za apsorpciju svjetla na valnim duljinama oko 500 nm jer sadrži konjugirane dvostruke veze zbog čega je ovaj pigment vidljiv kao crvena boja. Osnovna struktura se još naziva aglikonskim dijelom (antocijanidinima) od kojih je zasad prirodno prisutnih u hrani šest od ukupno 22, a to su: pelargonidin, cijanidin, peonidin, delphinidin, petunidin i malvidin (Slika 2).¹ Na trećem prstenu jedna skupina može biti supstituirana s atomom H ili s OH, OCH₃ grupom zbog čega i postoji navedenih 6 vrsta antocijanidina u prirodi (Slika 2.)

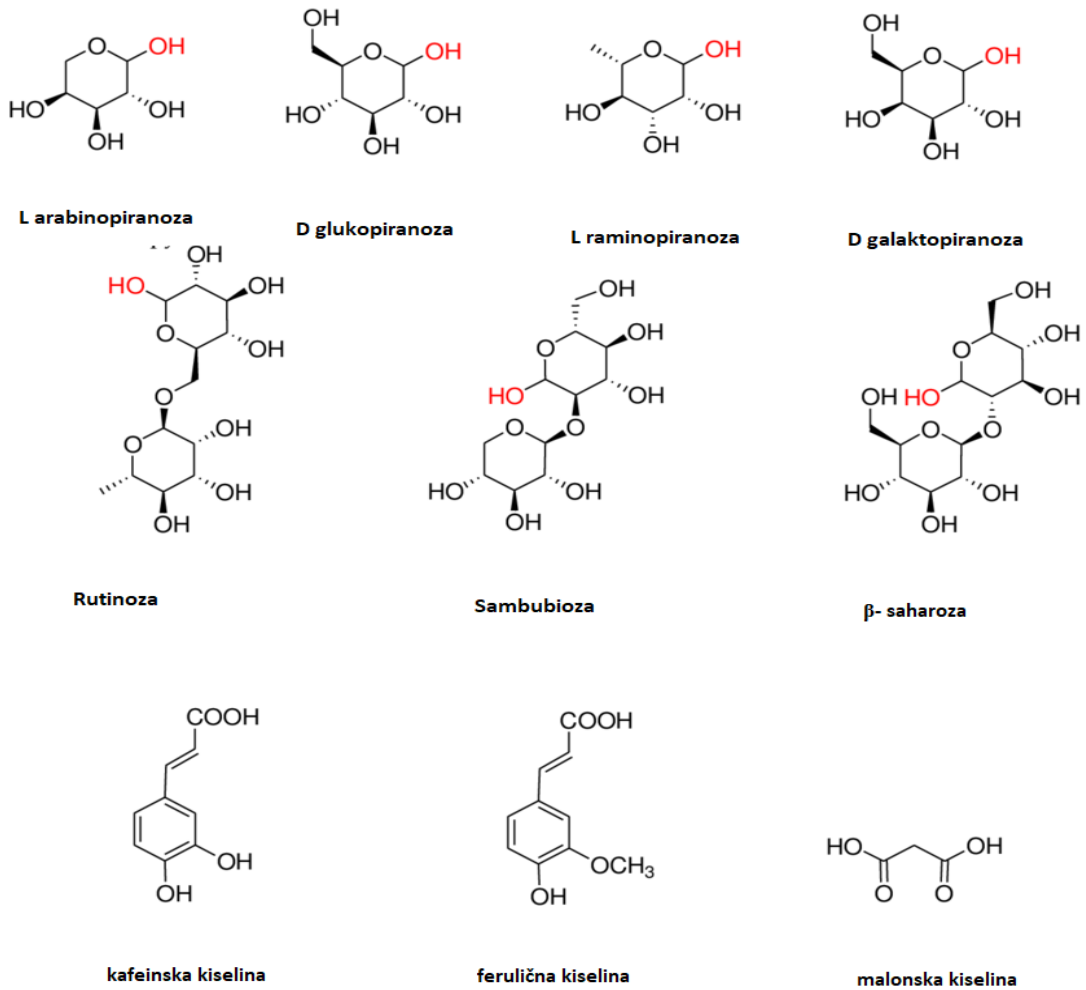


Slika 1. Opća struktura antocijana⁵



Slika 2. Antocijanidini³⁸

Najčešći šećeri koji čine glikozidni dio jesu glukoza, galaktoza, arabinoza, ksiloza i ramnoza. Oni mogu biti vezani na A i C prsten na položaj 3 i 5. Zbog glikozidnog dijela molekule antocijana jesu topljivije u vodi nego antocijanidini. Uslijed odvijanja Friedel-Craftsovih reakcija (reakcija acilacije kiselinama putem elektrofilne aromatske supstitucije) nastaju brojne strukture molekula antocijana. Najčešće kiseline koje sudjeluju u reakcijama mogu biti fenolne ili alifatske kao što su: : octena, oksalna, malonska, kofeinska, ferulična i *p*-kumarinska kiselina (Slika 3).¹ Tada govorimo o aciliranim antocijanima. Povezivanje organskih kiselina na glikozidnu jedinicu antocijanina odvija se putem esterskih veza.



Slika 3. Šećeri i kiseline koji sudjeluju u reakcijama adicije na antocijanine²¹

2.2. Prehrambeni izvori antocijana

Antocijane pronalazimo u raznim vrstama cvijeća i biljkama koje su crvene, plave ili ljubičaste boje. Crveno cvijeće koje je jestivo i sadrži antocijane jesu crveni hibiskus (*Hibiskus rosa-sinensis*), crvena ruža (*lat. Rosa*) i crvena djetelina (*Trifolium pratense*), i ono se tradicionalno koristilo kao bojila i kao hrana.³ Pigmenti iz bobičastog voća: borovnice (*Vaccinium myrtillus*), brusnice (*Vaccinium subg. Oxycoccus*), crne aronije (*Aronia melanocarpa*, Slika 4.), crvenog ribiza (*Ribes rubrum*, Slika 5.) itd. su snažni antioksidansi, a crna mrkva (*Daucus carota Linn.*), crveni kupus (*Brassica oleracea var. Capitata f. rubra*) i ljubičasti krumpir smatraju se potencijalnom funkcionalnom hranom koja blagotvorno djeluje na organizam i sprječava nastanak raznih kroničnih bolesti.



Slika 4. *Aronia melanocarpa*⁸



Slika 5. *Ribes rubrum*, crveni ribiz⁹

Od 6 u prirodi pronađenih antocijanidina, najzastupljeniji je cijanidin kojeg pronalazimo u bobičastom voću i crvenom povrću jer dolazi u obliku crveno-ljubičastog pigmenta. Nakon cijanidina, pronađeno je najviše pelargonidina, delfinifina i petunidina. Pelargonidin se u obliku crvenog pigmenta u nijansama nalazi u cvijeću i narančama, a voću daje crvenu boju. Delfinidin je crvenkasto-plavi pigment u biljkama, zbog kojeg pojedino cvijeće ima plavu boju. Petunidin je topljiv u vodi, tamno crvene ili ljubičaste boje i najviše ga se nalazi u crnom ribizu i ljubičastom cvijeću. Peonidina i malvidina ima najmanje. Peonidin se pojavljuje u magenta boji u bobičastom voću, grožđu i crvenom vinu, a malvidin se pojavljuje u ljubičastoj boji i prevladavajući je pigment u crvenim vinima.³ U voću su dominantni cijanidin, pelargonidin i delfinidin. Crveno i plavo voće i povrće jesu glavni izvori antocijana, no njihova koncentracija može varirati ovisno o sorti, načinu uzgoja, klimatskim uvjetima, periodu berbe, načinu skladištenja, svjetlu i temperaturi.⁴

Tablica 1. Prosječna količina antocijana u pojedinom voću i povrću⁵

Izvor antocijana	Količina (mg/ g s.t.)
jabuka	0-60
borovnica	300-698
crni ribiz	130-476
crne masline	42-228
kupina	82,5-325,9
crna riža	10-493
aronija	410-1480
višnja	2-450
brusnica	67-140
patlidžan	8-85
grejp	5,9
nektarine	2,4
breskva	4,2
crveni ribiz	22
malina	20-687
crveni kupus	322
crveno grožđe (crveno vino)	30-750 (16,4-35)

3. BIOLOŠKI ZNAČAJ ANTOCIJANA

Zbog niza pozitivnih učinaka koje antocijani imaju na zdravlje, posljednjih godina se sve više preporučuje povećan unos namirnica koje ih sadržavaju. Može se pronaći niz činjenica otkrivenih provedbom raznih istraživanja poput činjenice da Francuzi, jedni od vodećih konzumenata crvenog vina u Europi značajno manje boluju od raznih kardiovaskularnih bolesti u odnosu na ostatak Europe.² Najvažnije svojstvo je antioksidativno svojstvo antocijana jer mogu reagirati sa kisikovim radikalima i tako spriječiti oštećenja stanica uslijed oksidativnog stresa.⁶ Zbog povećane nestabilnosti antocijana otežano je dobivanje njihovih čistih spojeva pa zato njihov fiziološki utjecaj (bilo kakav pozitivan utjecaj na ljudski organizam i funkcije ljudskog organizma) na ljude nije dokazan.⁷

In vivo istraživanja provedena su na miševima koji imaju nedostatak apolipoproteina zbog kojeg su oboljeli od ateroskleroze i hiperkolesterolemije. Na ovim modelima proučavao se potencijalan pozitivan učinak antocijana kod sprječavanja nastanka takvih oboljenja. Pokazalo se da cijanidin-3-*O*-glukozid može potaknuti reakciju fosforilacije sinteze dušikovog oksida i na taj način očuvati dostupnost dušikovog oksida čime se sprječava nakupljanje LDL-a u endotelu.¹⁰ Nedavna istraživanja pokazala su kako antocijani imaju protuupalnu aktivnost jer inhibiraju ciklooksigenazu 2 (COX-2) koja je uključena u mnoge upalne procese. Ciklooksigenaza-2 u stanicama makrofaga inhibira djelovanje mitogen aktiviranih protein kinaza. Monocitni kemotaktantni protein 1 (MCP-1) posreduje u aktivaciji leukocita (makrofaga) na mjestima infekcije ili upale i uzrokuje aterogenezu.¹¹ Antocijani štite organizam od djelovanja TNF- α (faktor tumorske nekroze- alfa, engl. *tumor necrosis factor-alpha*) koji inducira MCP-1 u endotelnim stanicama kod ljudi. Osim toga, cijanidin i delfinidin mogu spriječiti povišenje razine VEGF-a (faktor rasta vaskularnog endotela, engl. *vascular endothelial growth factor*) koji ukazuje na pojavu potencijalne tumorske mase. Faktor je aktiviran faktorom rasta podrijetlom iz trombocita (PDGF-AB, engl. *platelet-derived growth factor*) u glatkim mišićnim stanicama, a cijanidin i delfinidin sprječavaju povišenje razine VEGF-a na način da sprječavaju aktivaciju p38-mitogen-protein kinaze (p38 MPAK, engl. *p38-mitogen activated protein kinases*) i c-Jun N-terminalne kinaze (engl. *c-Jun N-terminal kinases*)¹². Dakle, antocijani i ekstrakti antocijana smanjuju biološku aktivnost pojedinih upalnih citokina *in vitro* kako bi

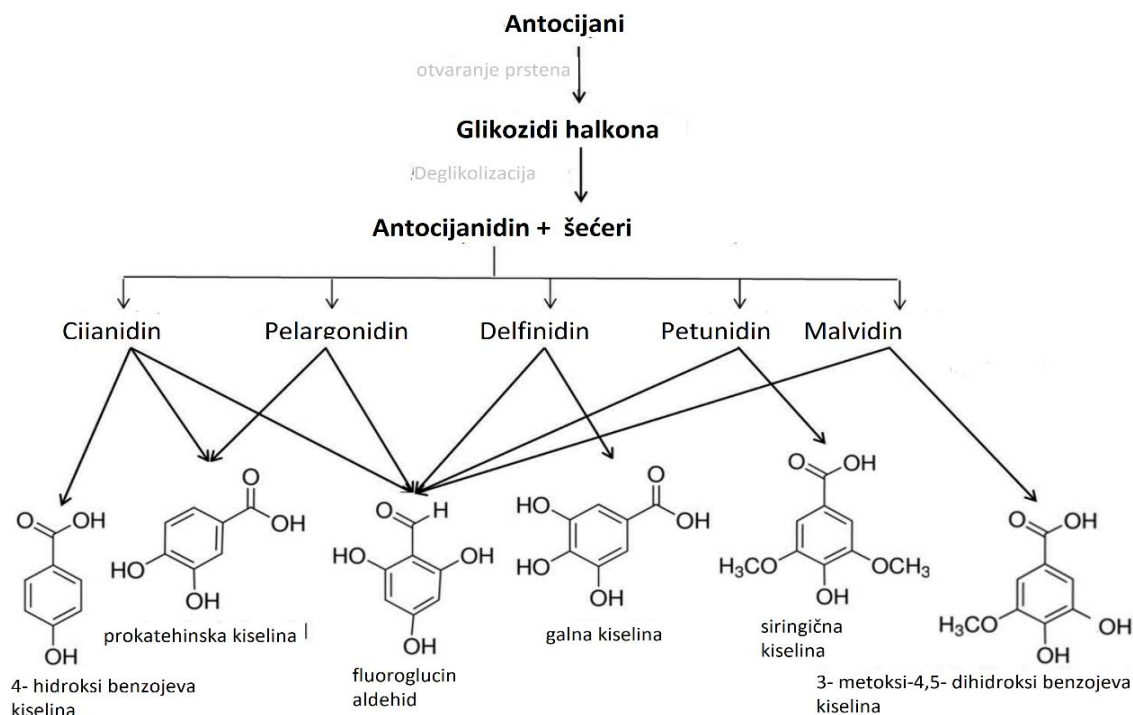
inhibirali djelovanje COX-2. Osim što imaju ulogu hvatača radikala Wang i sur. pokazali su kako su antocijani uključeni u protuupalne procese tako što izazivaju aktivaciju X-receptora α jetre u THP-1 makrofazima. Aktivacija ovih staničnih receptora značajno sprječava djelovanje upalnih gena *in vitro*. Redovna konzumacija antocijana može povećati razinu glutationa koji unutar organizma prirodno sakuplja slobodne radikale, smanjiti razinu kolesterola i na taj način spriječiti upalne procese¹³.

Epidemiološke studije te *in vivo* i *in vitro* znanstvena istraživanja provedena na nizu modelnih otopina antocijana povezale su njihovu konzumaciju s povoljnim učinkom na zdravlje ljudi. Najčešća ispitivana svojstva biološki aktivnih antocijana jest antioksidativni i antitumorski učinak. Antioksidacijska i antitumorska aktivnost najčešće se međusobno povezuju budući da se smatra kako antioksidansi sprječavaju nastanak tumora. Tako su Xia i sur. istraživanjem ekstrakta pokožice grožđa pokazali kako fenoli koji se nalaze u soku inhibiraju sintezu mutacije DNA u stanicama tumora dojke.¹² Isto tako ekstrakti se mogu primijeniti za kontrolu rasta tumorskih stanica debelog crijeva jer su Kaur i sur. pokazali da ekstrakti pokožice grožđa induciraju humane tumorske stanične linije.¹⁴

4. UTJECAJ TEMPERATURE NA STABILNOST ANTOCIJANA

Antocijani, posebice nakon što se izoliraju iz izvora, su nestabilni i reakcijama degradacije se tijekom zagrijavanja razlažu na različite spojeve ovisno o uvjetima u kojima se odvijaju reakcije i o prisustvu ostalih molekula. Povišenjem temperature se povećava brzina degradacije i dolazi do gubitka svojstava i pigmenta antocijana. Razumijevanje procesa degradacije i utjecaja temperature važno je zbog iskorištavanja maksimalnog potencijala antocijana u vidu njihova biološkog djelovanja.

Kako bi hrana i duže vremena nakon pakiranja ostala sigurna za upotrebu, potrebno je upotrijebiti metode toplinske obrade koje će spriječiti interakcije mikroorganizama koji uzrokuju kvarenje proizvoda i tako produžiti rok trajanja, engl. *shelf life*. Ove metode se odvijaju u rasponu od 50 - 180 °C. Tijekom izlaganja namirnica ovim temperaturama može doći do promjena boje, do smanjenja količine antocijana kao i do smanjenja njihove biološke aktivnosti.¹⁵ Povišenjem temperature smanjuje se stabilnost antocijana, odvijaju se reakcije degradacije i nastaju novi produkti.¹⁵ Turker i sur. su 2004. pokazali kako acilirani antocijani skladišteni na različitim temperaturama pokazuju veću stabilnost od neaciliranih antocijana (antocijanidina) koji onda pri višim temperaturama brže podliježu reakcijama termičke degradacije¹⁶ (Slika 6.)



Slika 6. Mogući mehanizmi termičke degradacije antocijanidina prirodno prisutnih u hrani¹⁸

Drugo istraživanje provedeno je na soku od bobičastog voća gdje je dokazano kako temperatura skladištenja utječe na udio antocijana koji se nalaze u voću. Koncentracija antocijana skladištenjem soka pri sobnoj temperaturi smanjila se za pola za puno kraće vrijeme nego u soku koji se skladištio u hladnjaku. Dakle, za očuvanje antocijana u soku poželjno je izbjegavati njegovo skladištenje na sobnim temperaturama.¹⁹ Kod istraživanja sadržaja antocijana u soku grejpa pokazalo se kako se kod izlaganja na višoj temperaturi količina antocijana smanjila za manje od pola, dok se na nižoj temperaturi izmjerila niža koncentracija antocijana.¹⁹

Procesi koji su se odvijali na višim temperaturama, poput blanširanja i pasterizacije pri 95 °C u vremenu od 3 minute da bi se dobila kaša od borovnice, uzrokovali su gubitak 43% antocijana u usporedbi s izmjerenom koncentracijom u svježem voću prije obrade.²⁰

Polifenol oksidaza enzimski razgrađuje polifenole, pa tako i antocijane, a ovaj enzim se može inaktivirati izlaganjem na povišenoj temperaturi.^{20,21} Tako se kratkotrajno

izlaganje pri povišenim temperaturama pokazalo korisno jer može inhibirati enzime koji loše utječu na antocijane.²¹

Reakcije termičke degradacije antocijana pripadaju reakcijama prvog reda. Uz pomoć kinetike reakcije može se predvidjeti utjecaj obrade hrane u kritičnim uvjetima (npr. pri povišenoj temperaturi) na kvalitetu hrane. Tako možemo predvidjeti moguće mehanizme reakcija kao i koji će produkti u konačnici nastati. Kako je nemoguće izmjeriti samu brzinu kemijske reakcije, količina nastanka produkata mjeri se u funkciji vremena. Proučavajući vrijeme odvijanja termičke degradacije mogu se izračunati sljedeći parametri: red reakcije (n), konstanta brzine reakcije (k), vrijeme poluraspada ($t_{1/2}$) i energija aktivacije (E_a).²²

Poznato je kako su antocijani stabilniji pri niskim pH vrijednostima (pH=1), a proizvodi koji su proizvedeni od voća koje sadrži antocijane, sokovi, imaju veću pH vrijednost (pH >3) pa se tako istraživanja stabilnosti antocijana pri visokim temperaturama provode u slabije kiselim medijima.

Ključan parametar koji se izračunava tijekom reakcije degradacije antocijana jest vrijeme poluraspada ($t_{1/2}$), vrijeme potrebno da se početna koncentracija antocijana smanji za 50%, a izračunava se pomoću sljedećih formula:

$$\ln \frac{C}{C_0} = -kt \quad (22)$$

gdje je C sadržaj antocijana u vremenu t , dok je C_0 početna koncentracija antocijana. Za određivanje gubitka antocijana tijekom prerade koriste se različiti kinetički modeli (Arrhenius, Eyring, Ball).²² Rezultati različitih istraživanja gubitka antocijana (parametri E_a , k i $t_{1/2}$) prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Parametri kemijske reakcije degradacije antocijana provedene pri različitim uvjetima (pH, temperatura) za različite vrste voća i povrća

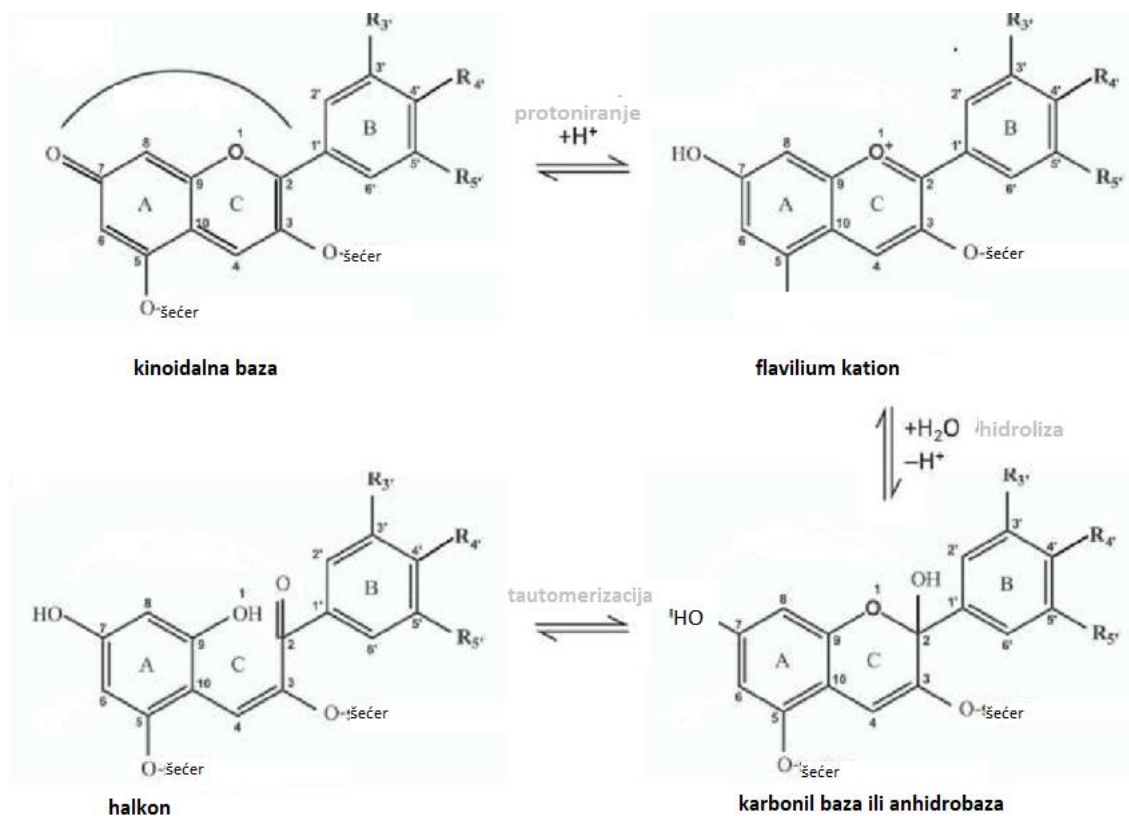
Izvor	pH	T (°C)	vrijeme	Konstanta brzine reakcije (<i>k</i>)	<i>t</i> _{1/2}	<i>E</i> _a (kJ/mol)	Ref .
Acai pulpa (<i>Euterpe precatoria</i>)	n.n.	60 70 80 90	90 min	0,0005 min ⁻¹ 0,0006 min ⁻¹ 0,0007 min ⁻¹ 0,0002 min ⁻¹	23 19 16 7	42,8	21
crni ribizl (<i>Ribes Nigrum L.</i>) sok iz pulpe	3,07	75 80 90	25 h	0,0065 h ⁻¹ 0,0131 h ⁻¹ 0,0352 h ⁻¹	21,9 7,2 1,8	94	22
borovnice (<i>Vaccinium corymbosum</i>) ekstrakt termički obrađene pulpe	3,46	70 80 90	25 h	0,0320 h ⁻¹ 0,0536 h ⁻¹ 0,1167 h ⁻¹	12,7 7,3 1,4	92	23
kupine (<i>Rubus spp.</i>) vodeni kiseli ekstrakt	2	50 75 100	n.n.	2,8 x 10 ⁻³ min ⁻¹ 3,3 x 10 ⁻³ min ⁻¹ 3,8 x 10 ⁻³ min ⁻¹	6,4 4,1 3,0	15	24
grožđe (<i>Vitis vinifera</i>), sok	3,34	70 80 90	90 min 60 min 60 min	1,2 x 10 ⁻³ min ⁻¹ 2,4 x 10 ⁻³ min ⁻¹ 4,2 x 10 ⁻³ min ⁻¹	10,0 3 5,02 4,79	64.89	25
Povrće							
ljubičasti batat (<i>Ipomea batatas L.</i>) u citrusnoj otopini	3	70 80 90	6 h	236x10 ⁻⁴ h ⁻¹ 262x10 ⁻⁴ h ⁻¹ 320x10 ⁻⁴ h ⁻¹	29,4 26,5 21,7	16,46	26
crveni kupus (<i>Brassica oleracea L.</i>) ekstrakt etanola	3,5	80	7 h	1,7x10 ⁻³ min ⁻¹	6,7	n.o.	27
crveni kupus (<i>Brassica oleracea L.</i>) vodeni ekstrakt	Nije naveđeno	60 70 80	30 h	0,0273 h ⁻¹ 0,0394 h ⁻¹ 0,0694 h ⁻¹	25,3 17,6 10,0	n.o.	28

n.n.=nije navedeno; n.o.=nije određeno

Prema vrijednostima prikazanim u tablici pri višim temperaturama (80, 90 °C) dobivene su manje vrijednosti *t*_{1/2} i kod voća i kod povrća, što potvrđuje da povišena temperatura ubrzava proces termičke degradacije.

5. UTJECAJ KISELOSTI MEDIJA NA STABILNOST ANTOCIJANA

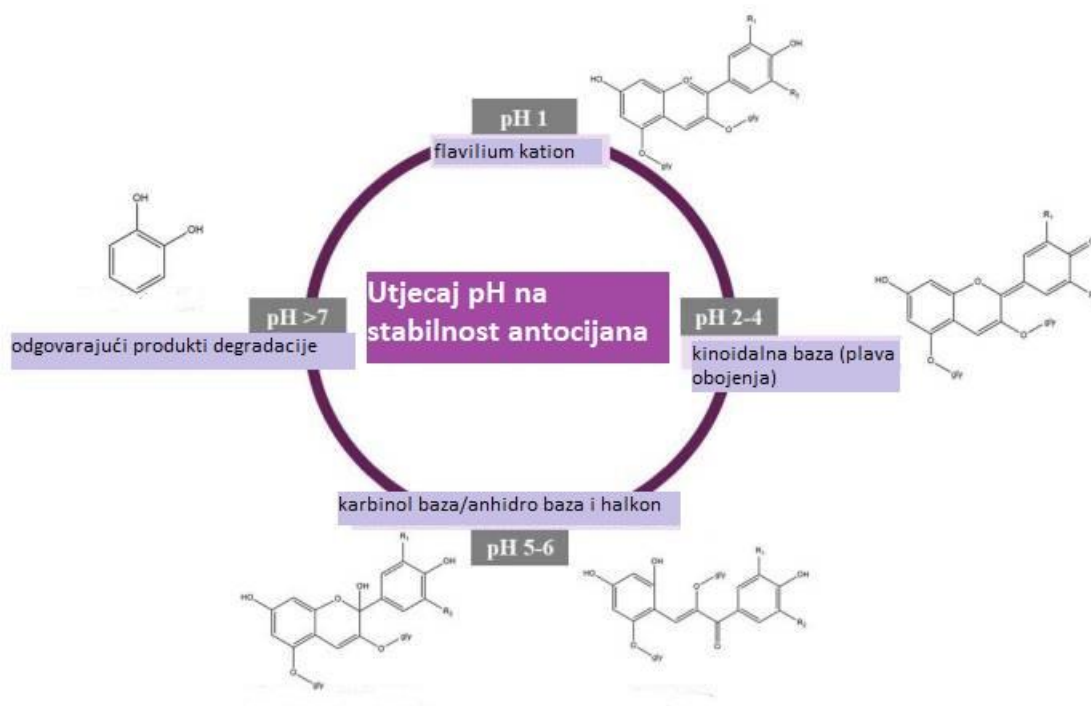
Antocijani podliježu reverzibilnim strukturnim transformacijama u kiselom mediju i reakciji tautomerizacije s halkonom kao konačnim produktom²³ (Slika 7.)



Slika 7. Reverzibilna strukturna transformacija antocijana²¹

Reakcija strukturne transformacije započinje premještanjem protona, odnosno vodikovog kationa čime nastaje obojani flavilium kation. Kation zatim reakcijom hidrolize prelazi u karbinol bazu/anhidro bazu, bezbojan spoj, koji se reakcijom tautomerizacije prevodi u aromatični keton, halkon. Halkon najčešće nastaje u obliku *cis*-halkon izomera (Slika 4.- na drugom atomu otvorenog prstena C, nalaze se dvije iste skupine s iste strane). Takav oblik prevladava kod antocijana kojima nedostaje supstituent na poziciji 3 (monoglikozidi). Reakcija tautomerizacije uvijek je endotermna pa povišenjem temperature najčešće nastaju halkoni.¹

Vrsta nastalih produkata ovisi o pH medija. U kiselom mediju ($\text{pH} < 4$) prevladavaju flavilium kation i kvinoidna baza. Flavilium kation nastaje u većem omjeru pri jako niskom pH (< 1). Pri slabije kiselom pH (4-6) i na sobnoj temperaturi antocijani postoje kao halkoni i karbonil baze/anhidro baze, produkti tautomerizacije.¹ Pri pH iznad 7, antocijani će se degradirati u spojeve ovisno o supstitucijskim skupinama¹ (Slika 8.)



Slika 8. Antocijani pri različitim pH vrijednostima²⁴

Tablica 3. Ovisnost pigmenta i strukture antocijana o pH vrijednosti²²

Ph	Struktura i pigment antocijana
<2	antocijan kation (flavilium kation), crveni pigment
2 – 4,5	kation + leukobaza, crveni pigment + bezbojan oblik
4,5	leukobaza, bezbojno
4,5 – 8	hidrobaza, ljubičasti pigment
8 – 10	anion hidrobaze, plavi pigment
>10	halkon, žuti pigment

Za stabilnost antocijana odgovorni su supstituenti koji se nalaze na prstenu B i dodatna hidroksi ili metoksi grupa koje u neutralnom mediju slabe stabilnost aglikona. U istim uvjetima su stabilniji derivati mono- i di-glikozida jer će šećeri spriječiti degradaciju do fenola i aldehida.^{25,26} Stabilnost antocijana povećava se metilacijom, a smanjuje s brojem hidroksilnih grupa u B prstenu antocijanidina dok acilacija znatno poboljšava stabilnost antocijana.²⁷

6. UTJECAJ SVJETLA NA PRISUTNOST ANTOCIJANA

Biljke su izložene svjetlu te ono stimulira sintezu antocijana.⁷ Iako svjetlost povećava stabilnost antocijana, isto tako ubrzava njihovu degradaciju.²⁸ Fotokemijska degradacija antocijana odvija se kroz mehanizam pretvorbe crvenog flavilium kationa u bezbojan oblik- halkon.²⁹ Svjetlo omogućava vidljivi spektar boja jer su antocijani dobri apsorbensi vidljivog svjetla.³⁰ Istraživanja utjecaja svjetla na stabilnost ekstrakta antocijana iz različitih izvora pokazala su kako kod soka od grožđa koji je bio skladišten na temperaturi od 20 °C u mraku, oko 30% koncentracije antocijana se degradiralo. Identični uzorci postavljeni su na svjetlo pri istoj temperaturi i vremenu gdje se degradiralo skoro polovina pigmenta.³¹ Istraživanjima provedenim s antocijanima iz crvenog kupusa, pokazalo se kako se degradacija antocijana povećala na prirodnom svjetlu kao i na simuliranom sunčevom zračenju.³³ Prietto i sur., 2018. ustanovili su kako su antocijani iz crvenog kupusa izloženi svjetlu stabilniji od izloženih antocijana iz crnog graha zbog prisutnosti aciliranih antocijana u crvenom kupusu.³³ Osim utjecaja na pigmente, svjetlo utječe i na antioksidativno svojstvo antocijana. Svjetlost stimulira proizvodnju slobodnih radikala. Što se ekstrakt antocijana duže izloži utjecaju svjetla, više sadržaja ekstrakta gubi svoja antioksidativna svojstva.³⁵ Bononi i Tateo 2005. provodili su istraživanje s dehidriranim ekstraktom antocijana iz brusnice.³⁵ Provodili su razne procese degradacije kako bi ispitali stabilnost antocijana. Jedan od uzoraka izložili su utjecaju prirodnog svjetla u otvorenoj petrijevoj zdjelici na 30 dana. U uzorku se nakon 30 dana degradirala gotovo cijela početna koncentracija antocijana.³⁵

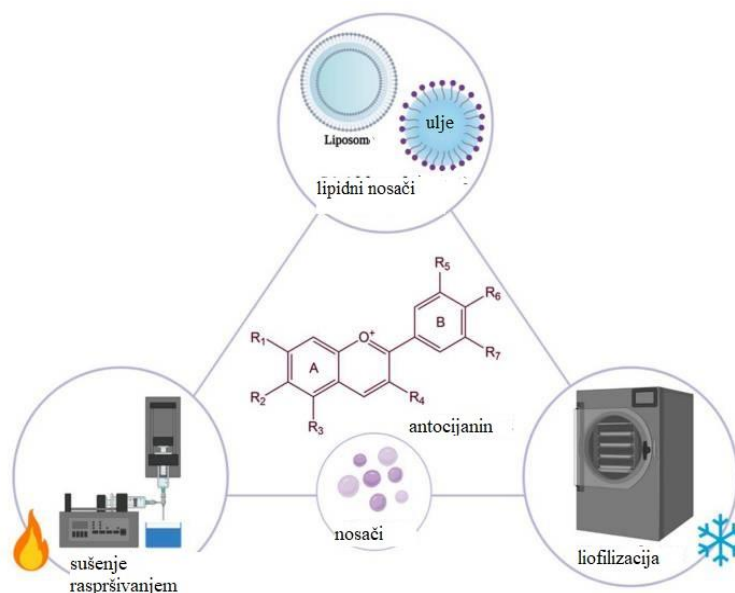
7. TEHNIKE ZA POVEĆANJE STABILNOSTI ANTOCIJANA

Upotreba antocijana u prehrambenoj, farmaceutskoj i drugim industrijama je ograničena s obzirom da su nestabilni, posebice pod utjecajem temperature i pH. Zbog toga se velika važnost pridodaje implementaciji tehnika koje će stabilizirati antocijane pri termičkoj obradi.³⁶

Većina istraživanja usmjerena je prema upotrebi raznih molekula koje se dodaju u prirodne ekstrakte kako bi poboljšali stabilnost antocijana. Na primjer, u koncentrirani sok borovnice (zagrijan na temperaturi od 90 °C) dodaje se 10% glukoze ili trehaloze koje održavaju određenu stabilnost antocijana tijekom skladištenja.³⁷

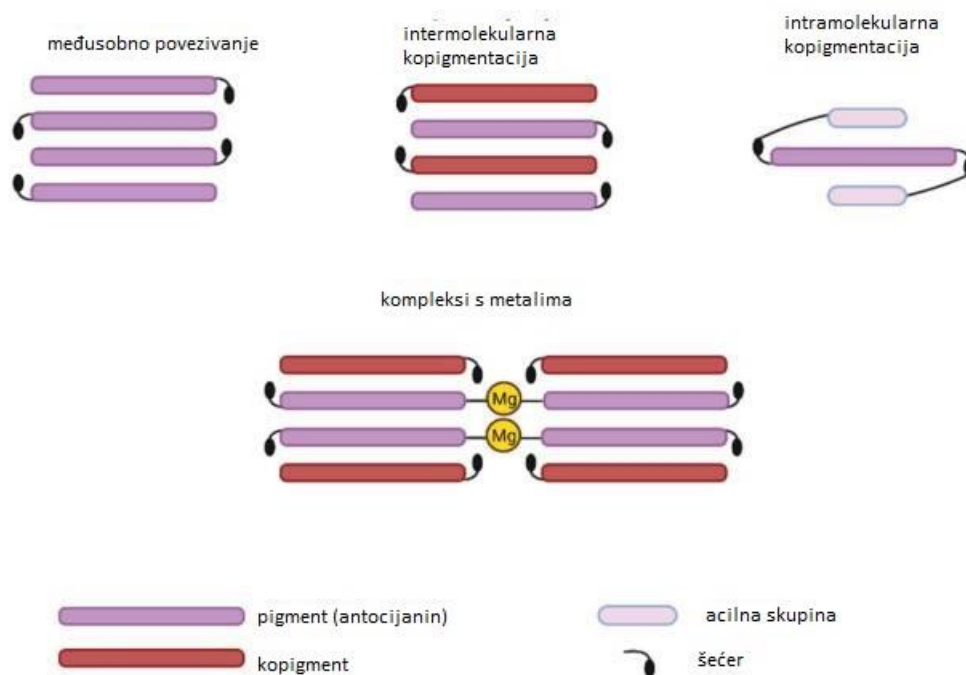
Tehnike inkapsulacije se često primjenjuju kako bi poboljšali boju i stabilnost ekstrahiranih antocijana. Bioaktivna tvar (u ovom slučaju antocijani) u krutom, tekućem ili plinovitom stanju se prekriva polimernim filmom da bi se zaštitila od utjecaja okoline. U tehnike inkapsulacije spadaju sušenje raspršivanjem, liofilizacija, liposomi, emulzije i dr. Upotreba inkapsulacije izvrstan je način očuvanja biološke aktivnosti antocijana i sprječavanja njihove interakcije s ostalim komponentama iz hrane. Osim toga, iste tehnike su se pokazale učinkovitim kod zaštite od utjecaja pH i temperature na stabilnosti antocijana. U vodenoj otopini cijanidin-3-*O*-glukozida pokazala se dobra stabilnost na temperaturi od 60 °C u trajanju od 80 min, u slabo kiselim uvjetima (pH=6,0). U otopinu su bili dodani Fe³⁺ ioni u kombinaciji s anionskim polisaharidima (alginat, karagenan, pektin) koji je inhibirao agregaciju kompleksa.³⁸ Kad se dodala nova količina alginata, stabilnost se smanjila vjerojatno jer Fe²⁺ ioni bolje reagiraju s alginskom kiselom i na taj način remete kompleks antocijan-Fe²⁺. Inkapsulacija plodova jabotikabe (brazilskog grejpa, *Plinia cauliflora*) s kalcijevim alginskom kiselom ili s polietilen-glikolom, uz superkritični CO₂, povećalo je stabilnost ekstrakta antocijana iz plodova jabotikabe prema svjetlosti i temperaturi. Mikro-inkapsulacijom vodenog ekstrakta cvijeta *Hibiscus sabdariffa* L. s izolatom proteina sirutke i/ili polidekstrozom, metodom liofilizacije prah se stabilizirao i pri temperaturama do 210 °C, što su autori Cassol i Norena 2021. dokazali termogravimetrijskom metodom (TGA).³⁹ Također su ispitivali stabilnost različito pripremljenih uzoraka praha pri temperaturama od 40 °C i 60 °C tijekom perioda od 28 dana gdje se očувало najviše antocijana čak 53% u uzorcima koji su bili pripremljeni liofilizacijom samo s polidekstrozom, a bili su čuvani u uvjetima temperature 40 °C i

niske relativne vlažnosti (75%).³⁹ Danas se kao metode inkapsulacije najčešće upotrebljavaju liofilizacija, elektropredenje (proces proizvodnje nanovlakana u elektrostatičkom polju) i sušenje raspršivanjem. (Slika 9.)



Slika 9. Metode inkapsulacije³⁸

Na cvjetovima plavog graška (*Clitoria ternatea* L.) postignuta je termička stabilnost antocijana kada se ekstrakt pomiješao s katehinom u omjeru kopigment/antocijan 100:1 i zagrijao na temperaturi od 90 °C, 60 minuta pri pH 3,5 čime se smanjila konstanta reakcije degradacije.³⁹ **Metoda kopigmentacije** antocijana s drugim pigmentima je metoda koja se najčešće upotrebljava kako bi se antocijani stabilizirali pri interakcijama s ostalim komponentama iz hrane i pri obradi na višim temperaturama. Najčešće se kopigmentiraju s različitim fenolima poput flavonoida, vanilinske, galne, hidroksibenzojeve ili ferulične kiseline, rutina ili katehina.⁴² Kopigmentacija se odvija na način da se hidrofobne acilne grupe povežu kovalentnim vezama na šećer i flavilium kation, čime se smanjuje mogućnost hidrolize antocijana (intermolekularne veze). Interakcija se odvija i unutar molekule (intramolekularne veze) zbog slabih van der Waalsovih sila između antocijana i kopigmenta, zbog čega se odvijaju promjene boje.^{43,44} Intenzitet promjene boje ovisi o kojem kopigmentu se radi, o koncentraciji kopigmenta pa tako i antocijana, pH vrijednosti i temperaturi otapala.



Slika 10. Interakcije antocijana s kopigmentima (drugim sastojcima hrane)⁵⁴

Nanoliposomi koji se sastoje od kolesterola i lecitina u omjeru 5:8 su pokazali kako dodani antocijanima, posebno cijanidinu-3-*O*-glukozidu i peonidinu-3-*O*-glukozidu mogu očuvati njihovu koncentraciju za čak 85,60% tijekom skladištenja pri temperaturi od 25 °C tijekom perioda od 16 dana.⁴⁵ Ispitivanjem utjecaja pH na nanoliposomne antocijane pokazalo se kako su takvi antocijani stabilniji na nižim pH vrijednostima (pH=3), nego u neutralnim uvjetima (pH=7).

Još jedna od tehnika koja poboljšava stabilnost antocijana otkrila se prilikom miješanja boje antocijana s **manoproteinima** kvasca (10% proteini, 90% ugljikohidrati) na temperaturama sterilizacije i pasterizacije, u neutralnim uvjetima (pH=7). Kompleks koji je nastao ovom reakcijom očuvao je antioksidativna svojstva antocijana kao i njihovu koncentraciju.⁵⁰

Antocijani izolirani iz različitih vrsta voća (grejp, borovnice, brusnice) i povrća (crna mrkva, crveni kupus) pomiješani s komponentama koje sadrže tiolnu skupinu (R-SH) (cistein, glutation, dihidrolipoična kiselina) stabilni su i neće se degradirati na pH =7 i temperaturi od 37 °C.⁴²

Antocijani disperzirani s kopolimerima, poput derivata Maillardove reakcije (izolat proteina sirutke glikoliziran s glukozom) pokazali su kako je cijanidin-3-*O*-glukozid stabilan pri zagrijavanju do temperature od 80 °C u trajanju od 80 minuta, te kako su mu poboljšana antioksidativna svojstva.⁴⁶

Blanširanje i obrada proizvoda koji sadrže antocijane u kontroliranoj atmosferi (snižen udio kisika) također se upotrebljava kao jedna od metoda stabilizacije antocijana pri višim temperaturama. Predobradom ljubičastog batata (*Ipomea batatas* L.) blanširanjem vrućom vodom jednu minutu, ili obradom na pari jednu minutu, pri atmosferskom tlaku prije sušenja na vrućem zraku temperature od 70 °C, pokazalo se kako obrađeni batat sadržava veći udio antocijana od onog koji nije prethodno obrađen.⁴⁷ Blanširanje inhibira aktivnost enzima (peroksidaze, lipoksigenaze) koje su odgovorne za gubitak antocijana.

Tablica 4. Prikaz korisnih metoda koje smanjuju degradaciju antocijana pod utjecajem topline i načini povezivanja⁴⁸

Metode stabilizacije antocijana	Dodatak šećera (saharoza, fruktoza, glukoza, tehaloza)	Povezivanje vodikovim vezama
	Dodatak metalnih iona (bakar, aluminij, željezo, magnezij kalij)	Keliranje metala kvinoidalne baze u blago kiselim ili neutralnim uvjetima; najbolji rezultati se dobiju upotrebom Fe ³⁺ u prisutnosti alginata
	Intramolekulske kopigmentacije s drugim molekulama (flavonoidi, flavoni, katehini, hidroksibenzojeva kiselina, klorogenična kiselina, rutin, taninska kiselina)	Hidrofobne π - π molekularne interakcije, uzrokuju hiperkromne/ batokromne promjene; promjena boje je pojačana u blago alkalnim uvjetima, zagrijavanje smanjuje hiperkromne promjene
	Mikroinkapsulacija (proteini, gume, polidekstroze, inulin, malodekstrin, PEG)	Vodikove veze, hidrofobne/ionske veze, elektrostatske sile s biopolimerima, formiranje kompleksa što usporava hidrolizu antocijana
	Nanokomponente peptida fibroina svile	Povezivanje antocijana i peptida
	Miješanje s manoproteinima kvasca	Hidrofobne veze; kompleks se formira u neutralnim uvjetima
	Disperzija s kopolimerima (produktima Maillardove reakcije)	Elektrostatska povezivanja s glikoliziranim proteinima
	Blanširanje	Inaktivacija enzima koji su odgovorni za degradaciju antocijana (glikozidaze peroksidaze, polifenol oksidaze, lipoksigenaze)
	Uklanjanje kisika tijekom termičke obrade	Prevenција ireverzibilne i oksidativne degradacije antocijana
	Zaštita s antioksidansima koji sadrže tiolnu skupinu (glutation, cistein,...)	Povezivanje -SH skupine sa C4 atomom molekule antocijana, stabilizacija flavilium kationa sa -COOH

8. ZAKLJUČAK

Antocijani su pigmenti koji se nalaze u raznim biljnim vrstama i značajni su za ljudsko zdravlje. Konzumacijom namirnica koje obiluju antocijanima možemo spriječiti razvitak kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti.

Razni industrijski procesi ekstrakcije i procesi obrade hrane zahtijevaju izlaganje antocijana visokim temperaturama. Visoke temperature degradiraju antocijane i narušavaju im strukturu. Pod utjecajem različitih pH vrijednosti antocijani mijenjaju svoju boju, a posebice su nestabilni u bazičnom pH području gdje pigment mijenja boju u žutu.

Razumijevanje ponašanja antocijana u različitim uvjetima (temperatura, pH, svjetlo...) neophodno je kako bi se razvile tehnike koje će povećati njihovu stabilnost i na taj način povećati biodostupnost antocijana. U tu svrhu razvile su se već neke postojeće tehnike poput liposoma, tehnika inkapsulacije i emulzija koje se mogu primijeniti da bi se povećao vijek trajanja antocijana i očuvala njihova biološka svojstva.

9. POPIS KRATICA I SIMBOLA

COX-2 - ciklooksigenaza 2

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

engl. - engleski

H – vodik

LDL - lipoprotein male gustoće

MCP-1 - monocitni kemoatraktantni protein

MPAK - mitogen aktivirana protein kinaza

nm - nanometar

OCH₃ - metoksi skupina

OH - hidroksi skupina

PDGF-AB - trombocitni faktor rasta -AB

TGA - termogravimetrijska analiza

Tnf- α - tumorski faktor nekroze alfa

VEGF- vaskularni endotelni faktor rasta

10. LITERATURA

1. Castañeda-Ovando, A.; de Lourdes Pacheco-Hernández, M.; Páez-Hernández, M.E.; Rodríguez, J.A.; Galán-Vidal, C.A. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* 2009.; 113(4); 859–871.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>

2. Mattioli R., Francioso A., Mosca L., Silva P. Anthocyanins: A comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Molecules.* 2020.; 25(17); 3809

doi: 10.3390/molecules25173809

3. Khoo H.E., Azlan A., Tang S.T., Lim S.M. Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr. Res.* 2017.; 61(1); 1361779

<https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>

4. Wrolstad, RE., Anthocyanin pigments—Bioactivity and coloring properties, *Journal of Food Science*, 2004.;69(5); 419-425

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10709.x>

5. N. Čujić; T. Kundaković; K. Šavikin: Antocijani – Hemijska analiza i Biološka aktivnost, *Lekovite sirovine* 2013., 33(1); 19-37

6. Dangles, O.; Fenger, J.-A. The Chemical Reactivity of Anthocyanins and Its Consequences in Food Science and Nutrition. *Molecules* 2018; 23(8); 1970.

<https://doi.org/10.3390/molecules23081970>

7. Rein MJ: Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Disertacija. Sveučilište Helsinki, *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 2004., 3(1); 3106-3114;

<https://core.ac.uk/download/pdf/14916371.pdf>

8. <https://www.shootgardening.com/plants/ribes-rubrum-junifer> pristupljeno 18.06.2023.

9. <https://retail.degroot-inc.com/product/aronia-berry/> pristupljeno 18.06.2023.

10. Oancea, S.; Linn, Z.M. Anthocyanins: Powerful natural antioxidant pigments with significant biomedical and technological applications. 2018.; 41; 92–106.

<https://doi.org/10.3390/antiox10091337>

11. Sikorski Z. Fennema's Food Chemistry (Fifth Edition)—Edited by Srinivasan Damodaran and Kirk L. Parkin. J. Food Biochem. 2018.; vol.42(2); 12483

doi: <https://doi.org/10.1111/jfbc.12483>

12. Wang, Y., Zhang, Y., Wang, X., Liu, Y., & Xia, M., Supplementation with cyanidin-3-O- β -glucoside protects against hypercholesterolemia-mediated endothelial dysfunction and attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. The Journal of nutrition, 2012., 142(6), 1033-1037.

<https://doi.org/10.3945/jn.112.157701>

13. Xia X., Ling W., Ma J., Xia M., Hou M., Wang Q., Zhu H., Tang Z., An anthocyanin-rich extract from black rice enhances atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E-deficient mice. J. Nutr. 2006; 136(1) 2220–2225.

doi: 10.1093/jn/136.8.2220.

14. M. Xia, W. Ling, H. Zhu, Q. Wang, J. Ma, M. Hou, Z. Tang, L. Li, Q. Ye (2007): Anthocyanin prevents CD40-activated proinflammatory signaling in endothelial cells by regulating cholesterol distribution, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol, vol. 27, 519–524.

doi: 10.1161/01.ATV.0000254672.04573.2d

15. Wang, Y., Zhang, Y., Wang, X., Liu, Y., & Xia, M., Supplementation with cyanidin-3-O- β -glucoside protects against hypercholesterolemia-mediated endothelial dysfunction and attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. The Journal of nutrition, 2012., 142(6), 1033-1037.

<https://doi.org/10.3945/jn.112.157701>

16. Kaur, S., Tiwari, V., Kumari, A., Chaudhary, E., Sharma, A., Usman A., Garg, A., Protective and defensive role of anthocyanins under plant abiotic and biotic stresses: An emerging application in sustainable agriculture, The Journal of Biotechnology, 2023.; 361; 12-29

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.11.009>

17. Aprodu I., Milea Ş.A., Enachi E., Râpeanu G., Bahrim G., Stănciuc N. Thermal degradation kinetics of anthocyanins extracted from purple maize flour extract and the effect of heating on selected biological functionality. *Foods*. 2020; 9(1); 1593.

doi: 10.3390/foods9111593

18. Laleh G.H., Frydoonfar H., Heidary R., Jameei R., Zare S. The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four berberis species. *Pak. J. Nutr.* 2005; 5(1); 90-92.

doi: 10.3923/pjn.2006.90.92.

19. Turker N., Aksay S., Ekiz H.I. Effect of Storage Temperature on the Stability of Anthocyanins of a fermented black carrot (*Daucus carota* var. L.) beverage: Shalgam. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52(1); 3807–3813.

doi: 10.1021/jf049863s

20. Oancea S., A review of the current knowledge of thermal stability of anthocyanins and approaches to their stabilization to heat, 2021; 10(9); 1337

<https://doi.org/10.3390/antiox10091337>

21. Hellström J., Mattila P., Karjalainen R. Stability of anthocyanins in berry juices stored at different temperatures. *J. Food Compos. Anal.* 2013;31:12–19.

doi: 10.1016/j.jfca.2013.02.010.

22. West M.E., Mauer L.J. Color and chemical stability of a variety of anthocyanins and ascorbic acid in solution and powder forms. *J. Agric. Food Chem.* 2013;61:4169–4179.

doi: 10.1021/jf400608b

23. Patras A., Brunton N., O'Donnell C., Tiwari B. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends Food Sci. Technol.* 2010; 21(1); 3–11a

doi: 10.1016/j.tifs.2009.07.004.

24. Deylami M.Z., Rahman R.A., Tan C.P., Bakar J., Olusegun L. Effect of blanching on enzyme activity, color changes, anthocyanin stability and extractability of mangosteen pericarp: A kinetic study. *J. Food Eng.* 2016; vol. 178; 12–19.

doi: 10.1016/j.jfoodeng.2016.01.001.

25. Brouillard, R.; Delaporte, B. Chemistry of anthocyanin pigment. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. *J. Am. Chem. Soc.* 1977.; 99(26); 8461–8468.

<https://doi.org/10.1021/ja00468a015>

26. Rein MJ: Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. *Disertacija. Sveučilište Helsinki, Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 2004., 3(1); 3106-3114;

<https://core.ac.uk/download/pdf/14916371.pdf>

27. Rodriguez-Amaya D.B. Update on natural food pigments—A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. *Food Res. Int.* 2019;124:200–205.

doi: 10.1016/j.foodres.2018.05.028.

28. Fleschhut J., Kratzer F., Rechkemmer G., Kulling S.E. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur. J. Nutr.* 2006 ; 45:7–18.

doi: 10.1007/s00394-005-0557-8

29. Weber F., Larsen L.R. Influence of fruit juice processing on anthocyanin stability. *Food Res. Int.* 2017;100:354–365.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.033>

30. .Fei P., Zeng F., Zheng S., Chen Q., Hu Y., Cai J. Acylation of blueberry anthocyanins with maleic acid: Improvement of the stability and its application potential in intelligent color indicator packing materials. *Dye. Pigment.* 2020;184;108852.

<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108852>

31. Cavalcanti R.N., Santos D.T., Meireles M.A.A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview. *Food Res. Int.* 2011.; 44(2); 499-509

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.007>

32. Maccarone, E., Maccarone, A., Rapisarda, P., Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice, *Journal of Food Science*, 1985.; 50(4); 901-904

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb12976.x>

33. Remini H., Dahmoune F., Sahraoui Y., Madani K., Kapranov V., Kiselev E. Recent Advances on Stability of Anthocyanins, *Journal of Agronomy*; 13(4): 257-286

doi: 10.22363/2312-797X-2018-13-4-257-286

34. Amogne N.Y., Ayele D.W., Tsigie Y.A. Recent advances in anthocyanin dyes extracted from plants for dye sensitized solar cell. *Mater. Renew. Sustain. Energy.* 2020;9:23.

doi: 10.1007/s40243-020-00183-5

35. Chen S., Zhou, H., Zhang, G., Dong, Q., Wang H., Hu, N., Characterization, antioxidant and neuroprotective effects of anthocyanins from *Nitraria tangutorum* Bobr. fruit, *The Journal of Food Science*, 2021., 3; 353-129435

doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129435

36. Prietto L., Pinto V.Z., El Halal S.L.M., de Moraes M.G., Costa J.A.V., Lim L.T., Dias A.R.G, Zavareze E.D.R., Ultrafine fibers of zein and anthocyanins as natural pH indicator. *J Sci Food Agric.* 2018. ;98(7); 2735-2741.

doi: 10.1002/jsfa.8769.

37. Aramwit P., Bang N., Srichana T. The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits. *Food Res. Int.* 2010;43:1093–1097

doi: 10.1016/j.foodres.2010.01.022

38. Bononi M., Tateo F., Stabilization of cranberry anthocyanins in nutraceutical capsules. *Int J Food Sci Nutr.* 2007. ;58(2): 142-9.

doi: 10.1080/09637480601154061.

39. Cortez, R.; Luna-Vital, D.A.; Margulis, D.; de Mejia, E.G. Natural Pigments: Stabilization Methods of Anthocyanins for Food Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2016.; 16(1); 180–198.

<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12244>

40. Kopjar, M.; Jakšič, K.; Piližota, V. Influence of sugars and chlorogenic acid addition on anthocyanin content, antioxidant activity and color of blackberry juice during storage. *J. Food Process. Preserv.* 2012; 36(6); 545–552.

<https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2011.00631.x>

41. Mollaamin, F.; Monajjemi, M. Thermodynamic and IR Spectral Study of Metal Cations–Anthocyanin Chelation: Mechanism of Formation of Pigments. *Russ. J. Phys. Chem.* 2020.; 94; 1887–1901.

<https://doi.org/10.1134/S0036024420090204>

42. Cassol, L., Norena, C.P.Z., Microencapsulation and accelerated stability testing of bioactive compounds of Hibiscus sabdariffa, *Journal of food measurement and characterization*, 2021.; 15(2); 1599-1610

doi: 10.1007/s11694-020-00757-x

43. Dangles, O.; Fenger, J.-A. The Chemical Reactivity of Anthocyanins and Its Consequences in Food Science and Nutrition. *Molecules* 2018; 23(8); 1970.

<https://doi.org/10.3390/molecules23081970>

44. Charurungsipong, P.; Tangduangdee, C.; Amornraksa, S.; Asavasanti, S.; Lin, J. Improvement of anthocyanin stability in butterfly pea flower extract by co-pigmentation with catechin. In *Proceedings of the 2019 Research, Invention, and Innovation Congress, E3S Web of Conferences 2020.*; vol. 141; 11-13.

<https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014103008>

45. Cortez, R.; Luna-Vital, D.A.; Margulis, D.; de Mejia, E.G. Natural Pigments: Stabilization Methods of Anthocyanins for Food Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2016; 16(1); 180–198.

<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12244>

46. Mateus N., de Freitas V. Anthocyanins as Food Colorants. In: Winefield C., Davies K., Gould K., editors. Anthocyanins. Springer; New York, NY, USA: 2008. pp. 284–304.

doi: 10.1007/978-0-387-77335-3_9

47. Rodriguez-Amaya D.B. Update on natural food pigments—A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. *Food Res. Int.* 2019;124:200–205.

doi: 10.1016/j.foodres.2018.05.028.

48. Chi, J.; Ge, J.; Yue, X.; Liang, J.; Sun, Y.; Gao, X.; Yue, P. Preparation of nanoliposomal carriers to improve the stability of anthocyanins. *LWT Food Sci. Technol.* 2019; 109; 101–107.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.070>

49. Qin, X.; Yuan, D.; Wang, Q.; Hu, Z.; Wu, Y.; Cai, J.; Huang, Q.; Li, S.; Liu, G. Maillard-reacted whey protein isolates enhances thermal stability of anthocyanins over a wide pH range. *J. Agric. Food Chem.* 2018.; 66(36); 9556–9564.

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03125>

50. Albuquerque, B.R.; Oliveira, M.B.P.P.L.; Barros, L.; Ferreira, I.C.F.R. Could fruits be a reliable source of food colorants? Pros and cons of these natural additives. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2021.; 61(5); 805–835.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1746904>

51. Enaru B., Dreţcanu G., Pop T.D., Stănilă A., and Diaconeasa Z., Anthocyanins: Factors Affecting Their Stability and Degradation, 2021.

doi: 10.3390/antiox10121967