

## PROFESSIONAL PAPER

**Stabilnost prirodnih prehrambenih bojila***Stability of natural food colorants*Suzana Rimac Brnčić<sup>\*1</sup>, Marija Badanjak Sabolović<sup>1</sup>, Marija Vaško<sup>1</sup>, Mladen Brnčić<sup>1</sup>, Nada Knežević<sup>2</sup>*Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb, Hrvatska**Podravka d.d., Ante Starčevića 32, 48000 Koprivnica, Hrvatska**\*Corresponding author: srimac@pbf.hr***Sažetak**

Prehrambeni trendovi usmjereni prema prirodnim proizvodima potiču interes industrijskih proizvođača za korištenjem prirodnih pigmenata pri proizvodnji prehrambenih proizvoda. Međutim, zbog njihove manje stabilnosti, koja ovisi o uvjetima procesa tijekom prerade i skladištenja, uvođenje tih spojeva kao sastojaka hrane predstavlja veliki izazov. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj povišene temperature i vremena zagrijavanja te pH vrijednosti na stabilnost prirodnih prehrambenih bojila ljubičaste, narančaste i plave boje (prirodni karoten P10, spirulina plava P 50, crna/ljubičasta mrkva P 36). Promjene boje i apsorpcijski spektri mjereni su pri temperaturi od 50°C i 70°C nakon 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 i 180 minuta pri pH 5 i 7. Rezultati pokazuju da stabilnost ispitivanih prirodnih prehrambenih bojila ovisi o temperaturi, trajanju zagrijavanja i pH vrijednosti medija. Gotovo sva ispitivana prirodna prehrambena bojila su pokazala veću stabilnost pri nižim temperaturama i nižim pH vrijednostima.

**Ključne riječi:** prirodna bojila, pH vrijednost, zagrijavanje, stabilnost

**Abstract**

The food trend towards natural products stimulated the interest of industry producers of food products for use of natural pigments in foodstuffs. However, due to its reduced stability depending on the process conditions during processing and storage, the introduction of these compounds in food is a great challenge. The aim of this study was to investigate the influence of elevated temperature and heating time as well as pH value on the stability of natural food colorants (natural carotene P10, spirulina blue P 50, black/purple carrot P 36). The color changes and absorption spectra were measured at temperatures of 50 and 70°C after 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 and 180 minutes at pH value 5 and 7. Obtained results showed that the stability of the tested natural food colorants depends on the temperature, the heating time and pH value of media. Almost all investigated natural food colorants showed higher stability at lower temperatures and lower pH values.

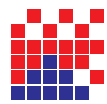
**Key words:** natural colorants, pH value, heating, stability

**Uvod**

Sve su veći zahtjevi potrošača za proizvodnjom prehrambenih proizvoda koji će u što većoj mjeri zadržati svoja izvorna svojstva. U zadnje vrijeme, njihova pozornost je posebno usmjerena prema prehrambenim aditivima; bojilima. Potražnja za prirodnim prehrambenim bojilima raste svakodnevno i to iz više razloga: pozitivni učinci na promicanje zdravlja; prirodna boja kao prioritet potrošača; povećana sklonost potrošača za organskom hranom; raznolikost boje i okusa hrane. Prirodna boja prehrambenog proizvoda je u većini slučajeva nestabilna i podložna degradaciji do koje može doći pri proizvodnji, preradi, pripremi, obradi, pakiranju, prijevozu ili skladištenju djelovanjem različitih kemijskih ili fizikalnih čimbenika. Takve promjene su nepoželjne i utječu na kvalitetu proizvoda, a samim time i na percepciju potrošača. Prehrambena bojila dodaju se kako bi se održala izvorna boja prehrambenog proizvoda, ali i kako bi se postigla veća vizualna privlačnost hrane, dala boja hrani koja je inače bezbojna, zadržao izvoran izgled hrane nakon skladištenja i obrade,

osigurala ujednačenost boje te izbjegle sezonske varijacije u tonu boje.

U cilju provjere i procjene potencijalne toksičnosti i procjene rizika od konzumacije prehrambenih bojila doneseni su zakonski propisi koji osiguravaju proizvodnju namirnica uz korištenje bojila sigurnih za zdravlje potrošača. Svako područje svijeta (kao na primjer: Ujedinjeno Kraljevstvo, Kanada, EU) ima svoje definicije i propise o uporabi prehrambenih aditiva (U.K. Food standards Authority, 2008; Canadian Food Inspection Agency, 2003; Regulation (EC) No 1333/2008). U kategoriju bojila osim sintetiziranih, ubrajaju se i prirodni sastojci hrane i prirodni izvori koji se obično ne uzimaju kao hrana. Pripravci dobiveni iz hrane i drugih sirovina iz prirodnih izvora dobivaju se fizičkom i/ili kemijskom ekstrakcijom sa selektivnim izlučivanjem pigmenata za bojenje koji je dominantan u odnosu na sastojke hrane ili aromatske sastojke (N.N. 39/2013). Prirodna bojila se izoliraju iz prirodnih izvora kao što su voće i povrće dok se sintetska bojila dobivaju laboratorijskom sintezom, a kemijskom strukturom su identična onima izoliranim iz prirodnih izvora. Prirodna prehrambena



bojila međusobno se veoma razlikuju po svojim kemijskim i fizikalnim osobinama te ne pokazuju sva istu stabilnost s obzirom na uvjete kojima su izloženi tijekom procesa proizvodnje i skladištenja hrane. Ona pokazuju različit stupanj oksidacije, topljivosti, osjetljivosti na temperaturu, svjetlo te pH. Prirodna bojila pokazuju slabiji intenzitet u odnosu na sintetska te se moraju koristiti u većim koncentracijama. Bojila proizvedena iz sirovina biljnog porijekla često su kemijski veoma nestabilna te imaju izraženu varijabilnost u nijansi boje, a osim toga mogu dati nepoželjnu aromu i miris prehrambenim proizvodima (Grujić i sur., 2009). Prilikom senzorske procjene nekog proizvoda kao bitan pokazatelj kvalitete smatra se ujednačenost boje, a koja može varirati zbog prirodnih promjena u intenzitetu boje polazne sirovine. Boje proizvedene iz prirodnih sirovina uključuju različite vrste organskih i neorganskih sastojaka, a mogu biti biljnog, životinjskog, mikrobnog ili mineralnog porijekla. Postoje četiri glavne skupine prirodnih bojila, a to su: klorofili, karotenoidi, antocijani i betaini.

Sjeverna Amerika je vodeće tržište prehrambenih bojila. Istraživanja predviđaju da će tržište prehrambenih bojila (sintetskih i prirodnih) dosegnuti 2,3 milijarde dolara do 2019. godine s godišnjom stopom rasta od 4,6% (Markets and Markets, 2014). Globalno, prirodna prehrambena bojila u 2014. čine 54,9 % ukupnog tržišta bojila, a očekuje se da će do 2020. godine činiti čak 60 % tržišta (Future Market Insights, 2015). Karotenoidi čine 31,8 % udjela na tržištu u 2014. godini u vrijednosti od 363,2 milijuna \$ (Future Market Insights, 2015). Očekuje se da će izgubiti neznatan udio na tržištu, ali isto tako zadržati svoj dominantan položaj u narednom razdoblju. Antocijani su drugi najveći segment u smislu prihoda te se predviđa da će zadržati svoju dominaciju u narednom razdoblju zahvaljujući razvoju novih proizvoda korištenjem antocijana za dobivanje crveno/ljubičasto/ružičaste i plave nijanse za različitu hranu i pića niskih pH vrijednosti (Future Market Insights, 2015). Ljubičasta mrkva, slatki krumpir i ljubičasti kupus najviše se preferiraju kao sirovina za proizvodnju boja baziranih na antocijanima. Predviđa se da će primjena ekstrakta Spiruline također rasti tijekom razdoblja od 2015-2020. (Future Market Insights, 2015). Prirodna prehrambena bojila najčešće se koriste pri proizvodnji konditorskih i pekarskih proizvoda, pića, mliječnih i ostalih proizvoda. Kategorija ostalih proizvoda predstavlja 316,0 milijuna \$ od ukupne boje na tržištu, odnosno 27,6 % u 2014. (Future Market Insights, 2015). Ona uključuje smrznutu hranu, začine, umake, funkcionalnu hranu te hranu za kućne ljubimce. Pića su druga najveća kategorija koja zauzima 21,5% ukupnog udjela na tržištu ili 230,9 milijuna dolara u smislu prihoda u 2013. godini (Future Market Insights, 2015). Geografski je tržište segmentirano u sedam područja: APEJ (Azija i Pacifik isključujući Japan), MENA (Bliski istok i sjeverna Afrika), Japan, Južna Amerika, Sjeverna Amerika, istočna Europa i zapadna Europa. Zapadna Europa, Sjeverna Amerika i APEJ zajedno čine 76 % udjela na tržištu u 2014. godini (Future Market Insights, 2015). Trenutno je zapadna Europa najveće tržište u smislu veličine i očekuje se da će dominirati u narednom razdoblju. Međutim, APEJ će izaći kao najatraktivnije tržište u smislu apsolutnog prirasta neposredno iza Sjeverne Amerike budući da investitori više preferiraju APEJ u odnosu na Sjevernu Ameriku zbog lakoće poslovanja, u smislu regulative i troškova radne snage (Future Market Insights, 2015). Potražnja potrošača za prirodnim

proizvodima i označavanjem transparentno proizvedene hrane dovesti će do povećane potražnje za prirodnim kategorijama prehrambenih bojila. Nadalje, razvoj tehnika mikrokapsuliranja i inovacija pakiranja predstavljaju poticaj za veću prisutnost prirodnih prehrambenih bojila na tržištu. Vodeća tržišta prirodnim prehrambenim bojilima u EU predstavljaju Velika Britanija, Njemačka, Francuska, Italija i Španjolska (Rimbai i sur., 2011), ali u svijetu je rastuće tržište u azijskim zemljama poput Kine, Indije i Južne Koreje. Neki od lidera na svjetskom tržištu jesu Sensient Technologies Corporation i Kalsec Inc., DDW, The Color House, Naturex S.A., ADM (Wild flavors Inc.), Chr. Hansen A/S, ROHA Dyechem Pvt. Ltd., GNT International B.V., DIC Corporation i LycoRed Ltd (Future Market Insights, 2015).

Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj povišenih temperatura (50 i 70°C) te dviju pH vrijednosti (pH 5 i pH 7) na stabilnost prirodnih prehrambenih bojila ljubičaste, narančaste i plave boje u trajanju od 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 i 180 min.

## Materijali i metode

Ispitivani materijal su uzorci prirodnih prehrambenih bojila ljubičaste, narančaste i plave boje u praškastom obliku:

1. Black / purple carrot P 3 - Prirodno prehrambena bojilo ljubičaste boje, proizvođač DDW, Sjedinjene Američke Države
2. Natural carotene P 10 - Prirodno prehrambena bojilo narančaste boje, proizvođač DDW, Sjedinjene Američke Države
3. Spirulina blue P 50 - Prirodno prehrambena bojilo plave boje, proizvođač DDW, Sjedinjene Američke Države

Do provođenja analiza boje su čuvane u izvornom pakiranju na suhom i hladnom mjestu, a zatim su pripremljene njihove otopine u acetatnom puferu (pH 5) i fosfatnom puferu (pH 7).

### *Priprema otopina prirodnih prehrambenih bojila*

Početne otopine prirodnih prehrambenih bojila pripremljene su otapanjem 500 mg praha bojila u 30 ml pufera (pH 5 i pH 7) nakon čega su kvantitativno prenešeni u odmjerne tikvice od 50 ml te nadopunjeni puferom do oznake. Od početne otopine bojila naprave se razrjeđenja tako da apsorbancija pri maksimalnoj valnoj duljini za svaki uzorak iznosi  $0,700 \pm 0,005$ .

### *Određivanje stabilnosti boje prirodnih prehrambenih bojila*

Stabilnost boje u pripremljenim i razrijeđenim otopinama prirodnih prehrambenih bojila određena je tijekom zagrijavanja pri 50°C i 70°C u vodenoj kupelji prema metodi koju su opisali Fernandez-Lopez i sur. (2013). U određenim vremenskim intervalima mjerena je promjena apsorbancije pri rasponu valnih duljina od 400 do 720 nm (vidljivi dio spektra) te promjena parametara boje  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ . Mjerenje boje otopina prirodnih prehrambenih bojila provedeno je na kolorimetru (CM-3500d, Konica Minolta, Japan). Dobiveni podaci obrađeni su pomoću SpectraMagic NX softwera po CIELAB sistemu boja. Boja je prikazana vrijednostima  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  pri čemu:

L\* vrijednost- određuje svjetloću uzorka

a\* vrijednost- određuje udio crvene odnosno zelene komponente

b\* vrijednost- određuje udio žute odnosno plave komponente.

#### Postupak određivanja:

Razrijeđene otopine prirodnih prehrambenih bojila termostatirane su u vodenoj kupelji pri 50 °C i 70°C. Nakon određenih vremenskih intervala (15, 30, 45, 60, 90, 120 i 180 min) izuzeti su uzorci koji su odmah ohlađeni u ledenoj kupelji na 20 °C. Zatim su uzorcima pomoću kolorimetra mjerene promjene u apsorbanciji pri valnim duljinama od 400-720 nm te parametri boje L\*, a\*, b\*.

#### Račun:

Promjene parametara boje otopina boja prirodnih prehrambenih bojila nakon određenog vremena zagrijavanja u odnosu na kontrolni uzorak odnosno standard (uzorci bojila prije zagrijavanja) izračunate su pomoću slijedećih formula:

$$\Delta L = L_{\text{uzorak}} - L_{\text{standard}} \quad [1]$$

pri čemu:

+ΔL znači da je uzorak svijetliji od standarda

-ΔL znači da je uzorak tamniji od standarda

$$\Delta a = a_{\text{uzorak}} - a_{\text{standard}} \quad [2]$$

pri čemu:

+Δa znači da je uzorak crveniji od standarda

-Δa znači da je uzorak zeleniji od standarda

$$\Delta b = b_{\text{uzorak}} - b_{\text{standard}} \quad [3]$$

pri čemu:

+Δb znači da je uzorak žući od standarda

-Δb znači da je uzorak plaviji od standarda

Ukupna promjena boje u odnosu na kontrolni uzorak računa se prema tzv. Euklidovoj udaljenosti između boja izražene kao L, a i b:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad [4]$$

Parametar ΔE pokazuje koliko neki proizvod odstupa od referentne boje.

**Tablica 1.** Značenje izmjerene vrijednosti parametra ΔE u odnosu na standard (Xiao, 2008.)

**Table 1.** The meaning of the measured value of the parameter ΔE compared to the standard (Xiao, 2008.)

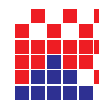
ΔE	Značenje Meaning
0 - 0,5	Razlike u tragovima Trace difference
0,5 - 1,5	Mala razlika Small difference
1,5 - 3,0	Primjetna razlika Visible difference
3,0 - 6,0	Značajna razlika Significant difference
6,0 - 12,0	Velika razlika Large difference
> 12,0	Vrlo velika razlika Very large difference

## Rezultati i rasprava

Ovisno o vrsti hrane i proizvodnom procesu koji se provodi može doći do djelomične odnosno potpune razgradnje nositelja boje prehrambenog proizvoda. Većina promjene boje i/ili degradacije javlja se tijekom toplinske obrade, pri čemu do većih gubitaka dolazi pri višim procesnim temperaturama (Crino i sur., 2012). U praksi, kako bi se smanjio gubitak intenziteta boje nakon izlaganja visokim temperaturama uglavnom se dodaje veća koncentracija bojila.

U ovom radu određena je stabilnost prirodnih prehrambenih bojila u ovisnosti o povišenoj temperaturi i različitim pH vrijednostima kroz vremenski interval od 180 min. Korištena su tri prirodna prehrambena bojila: Black carrot (ljubičasta boja-antocijani), Natural carotene (narančasta boja - karotenoidi) te Spirulina (plava boja- fikocijani). Nakon pripreme otopina standarda odnosno početnih otopina prirodnih prehrambenih bojila napravljena su razrijeđenja tako da apsorbancija pri valnoj duljini sa vršnom vrijednosti intenziteta ( $\lambda_{\text{max}}$ ) iznosi  $0,700 \pm 0,005$ .

Antocijani su prirodni, u vodi topljivi biljni pigmenti. Nositelji su crvene, plave ili ljubičaste boje ovisno o pH u kojem se nalaze, a zbog toga imaju potencijalnu primjenu u bojenju različitih prehrambenih proizvoda. Trenutno su za upotrebu u hrani kao bojila dostupni koncentracije i ekstrakti crvenog kupusa, crne/ljubičaste mrkve, rotkve, borovnice i bazge (Ahmadiani, 2012). Na stabilnost antocijana kao prirodnih prehrambenih bojila utječu prisustvo svjetlosti, kisika, enzima, povišena temperatura i pH vrijednost (Loypimai i sur., 2016). Rezultati određivanja boje prirodnog prehrambenog bojila ljubičaste boje (antocijani crne mrkve BLACK / PURPLE CARROT P3) pokazuju da ono ima bolju stabilnost pri nižoj pH vrijednosti (pH 5) i pri nižoj temperaturi (50°C). Antocijani ovisno o pH vrijednosti daju različito obojenje. U kiselom pH području nose pozitivan naboj odnosno flavium kation te daju crveno obojenje. Pomicanjem prema neutralnom pH, bezbojna karbinol-pseudo baza i halkan oblici postaju izraženiji (Ahmadiani, 2012). Plava i ljubičasta boja pojavljuju se pomi-



canjem pH vrijednosti od neutralne prema lužnatoj. U tablici 2. može se uočiti kako je pri pH 5 i temperaturi zagrijavanja od 50°C već nakon 15 min primjetna razlika u boji u odnosu na standard te se  $\Delta E$  kreće u rasponu od 1,59 - 3,03 kroz 180 minuta zagrijavanja. Kroz cijeli vremenski interval pri temperaturi 50°C uzorak je svjetliji od standarda na što ukazuju pozitivne vrijednosti parametra  $\Delta L$ . Tijekom prvih 90 min izraženija je crvena komponenta boje, nakon čega se povećava intenzitet zelene komponente boje. Parametar  $a^*$  može se koristiti kao indikator razgradnje antocijana (Yang i sur., 2008). Pozitivne vrijednosti parametra  $\Delta b$  ukazuju da je uzorak kroz svih 180 minuta žući u odnosu na standard. Ako se usporede rezultati za prirodna prehrambena bojila ljubičaste boje pri pH 5, ali pri višoj temperaturi (70°C), može se uočiti kako je ukupna promjena boje veća ( $\Delta E$  2,53 - 9,64). Prema Xiao (2008) takva promjena boje je značajna i velika u odnosu na standard, odnosno početnu otopinu bojila. Vrijednosti parametara  $\Delta L$  pokazuju da je uzorak je svjetliji od standarda što je u skladu s literaturnim podacima koji potvrđuju da se učinak toplinske obrade očituje u višoj vrijednosti parametra  $L$  (Gimenez i sur., 2015). Povišenjem temperature smanjio se udio crvene komponente boje već nakon 15 min. Prirodno prehrambena bojila ljubičaste boje pri pH 7 i pri 50°C pokazuje veliku razliku u ukupnoj promjeni boje u odnosu na standard ( $\Delta E$  iznosi 7,15). Kroz cijeli vremenski interval pri 50°C uzorak je tamniji od standarda (negativne vrijednosti parametra  $\Delta L$ ) te crveniji od standarda, za razliku od rezultata pri pH 5. Nakon 45 min zagrijavanja uzorak postaje žući. Ovaj uzorak pri pH 7 i temperaturi 70°C pokazuje najveću ukupnu promjenu boje  $\Delta E$  iznosi čak 23,27 nakon 180 min zagrijavanja. Tijekom prvih 60 min pri 70°C uzorak je tamniji od standarda nakon čega postaje svjetliji. Pozitivne vrijednosti parametara  $\Delta a$  i  $\Delta b$  ukazuju da je uzorak kroz cijeli vremenski interval crveniji odnosno žući od standarda. Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da

su promjene izraženije nakon povišenja temperature u odnosu na povišenje pH vrijednosti. Tijekom skladištenja antocijani pokazuju dobru stabilnost koja se pripisuje prisutnosti aciliranih grupa. Acilirane skupine pokazuju veću stabilnost s obzirom na pH i visoke temperature u odnosu na ne-acilirane (Crino i sur., 2012). Također, u optimalnim uvjetima (hlađenjem tijekom nekoliko sati) može doći do rekonverzije boje pigmenta antocijana čime se objašnjava njihova stabilnost tijekom skladištenja. Međutim, temperature skladištenja proizvoda obojanih prirodnim bojilima ljubičaste boje ne bi smjele biti preniske. Prema Ozen i suradnicima (2011) brzina razgradnje antocijana tijekom skladištenja pri 12°C veća je nego pri temperaturama od 20 i 30°C. Upravo zbog toga prehrambeni proizvodi obojeni antocijanima iz crne mrkve nisu prikladni za skladištenje pri temperaturi od 12°C ili nižoj.

Karotenoidi su biljni pigmenti netopljivi u vodi i staničnom soku, a topljivi u kloriranim ugljikovodicima i biljnim uljima. Nositelji su žute, narančaste i crvene boje. Izraz „karotenoidi“ je generički naziv za skupinu ugljikovodika koja uključuje karotene (neoksigenerani oblik) i ksantofile (oksidirani oblici) (EFSA, 2012). Danas je poznato više od 700 strukturno različitih karotenoida (Arimboor i sur., 2015). Glavni lanac karotenoidnih molekula sastoji se od osam izoprenskih jedinica.  $\beta$ -karoten pigment je narančasto-žute boje, topljiv u ulju, a njegov dobar izvor je mrkva. Međutim većina  $\beta$ -karotena za komercijalnu upotrebu dobiva se iz algi (Rimbai i sur., 2011). Smjese karotena dobivaju se ekstrakcijom s otapalom iz jestivih biljaka ili iz prirodnih sojeva algi (EFSA, 2012). Trenutno su mrkva (*Daucus carota*), palmino ulje (*Elaeis guineensis*) i alga *Dunaliella Salina* glavni izvori smjese karotena. Glavnu ulogu u bojanju karotenima ima  $\beta$ -karoten.  $\alpha$ -,  $\gamma$ -karoten te drugi pigmenti mogu biti prisutni, a osim njih smjesa može sadržavati ulja, masti te voskove koji su prirodno prisutni u izvornom materijalu.

**Tablica 2.** Ukupna promjena boje prirodnih prehrambenih bojila ovisno o temperaturi, pH vrijednosti i vremenu zagrijavanja

**Table 2.** Total color difference of natural food colorants depending on temperature, pH value and heating time

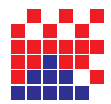
	$\Delta E$											
	Prirodno prehrambena bojila ljubičaste boje BLACK / PURPLE CARROT P3 Natural purple food colorant BLACK / PURPLE CARROT P3				Prirodno prehrambena bojila narančaste boje NATURAL CAROTENE P10 Natural orange food colorant NATURAL CAROTENE P10				Prirodno prehrambena bojila plave boje SPIRULINA BLUE P50 Natural blue food colorant SPIRULINA BLUE P50			
	Temperatura 50°C Temperature 50°C		Temperatura 70°C Temperature 70°C		Temperatura 50°C Temperature 50°C		Temperatura 70°C Temperature 70°C		Temperatura 50°C Temperature 50°C		Temperatura 70°C Temperature 70°C	
Vrijeme zagrijavanja (min) Heating time (min)	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7
15	1,59	4,32	2,53	8,27	1,85	2,06	2,08	2,55	1,91	3,92	24,78	30,1
30	1,56	4,68	3,58	8,79	2,03	2,3	2,34	4,41	2,16	4,18	28,01	31,6
45	1,86	4,87	4,39	9,73	2,07	2,45	2,47	5,63	2,21	4,62	29,8	32,9
60	2,09	4,6	5,08	12,2	1,97	2,77	2,68	7,94	2,42	4,92	30,72	34,5
90	2,32	5,4	6,63	15,15	1,28	3,18	3,28	10,7	2,84	5,44	33,14	35,46
120	2,57	6,45	7,54	18,6	1,23	2,93	3,58	13,16	3,17	6	34,01	36,3
180	3,03	7,15	9,64	23,27	1,39	4,35	3,99	16,75	3,84	7,7	34,22	37

$\beta$ -karoten je osjetljiv na autooksidaciju, fotodegradaciju te termodegradaciju što dovodi do njegovog cijepanja i stvaranja razgradnih produkata (Boon i sur., 2010). Glavni uzroci degradacije karotenoida u hrani jesu oksidacijske reakcije koje uključuju kisik, hidroperokside i perokside radikala (Delgado-Vargas i sur., 2000). Za smjesu  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - karotena dobivenih iz prirodnih namirnica nije određena ADI vrijednost te se njihovo korištenje kao prehranbenog bojila smatra prihvatljivim (EFSA, 2012). Rezultati ovog rada pokazuju da je prirodno prehranbeno bojilo narančaste boje (NATURAL CAROTENE P10) najstabilnije pri 50 °C i pH vrijednosti 5 (tablica 2). Ukupna promjena boje ( $\Delta E$ ) pri navedenim uvjetima iznosi 1,39 nakon 180 min zagrijavanja te je to mala razlika u odnosu na standard. Uzorak je svjetliji tijekom cijelog vremenskog intervala zagrijavanja u odnosu na standard. Negativne vrijednosti parametara  $\Delta a$  i  $\Delta b$  pokazuju da je uzorak zeleniji, odnosno plaviji u odnosu na standard. Povišenjem temperature, a pri istoj pH vrijednosti veća je i ukupna promjena boje. Međutim kada se uspoređi sa stabilnošću prirodnog prehranbenog bojila ljubičaste boje pri istim uvjetima, vidljivo je da je prirodno prehranbeno bojilo narančaste boje stabilnije. Povišenje temperature nije u velikoj mjeri utjecalo na promjenu parametara  $\Delta a$  i  $\Delta b$ . Tijekom 120 min zagrijavanja uzorak je svjetliji od standarda, ali nakon 180 min postaje tamniji, što ukazuje na to da dulje zagrijavanje pri višoj temperaturi ima jači utjecaj na svjetlinu uzorka. Ukupna promjena boje ispitivanog uzorka pri 50 °C i pri pH 7 povećala se u odnosu na rezultate dobivene zagrijavanjem pri istoj temperaturi, ali pri pH 5.  $\Delta E$  iznosi 4,35 što je značajna razlika u odnosu na standard. Pozitivne vrijednosti parametra  $\Delta L$  tijekom cijelog vremenskog intervala zagrijavanja pokazuju da je uzorak svjetliji od standarda. Vrijednosti parametara  $\Delta a$  i  $\Delta b$  su negativne što znači da je uzorak zeleniji odnosno plaviji od standarda. Najveću ukupnu promjenu boje odnosno najmanju stabilnost prirodno prehranbeno bojilo narančaste boje pokazuje tijekom zagrijavanja pri 70 °C i pH 7.  $\Delta E$  nakon 180 min iznosi 16,75, a to je vrlo velika razlika u odnosu na standard. Vrijednosti parametara  $\Delta a$  i  $\Delta b$  su u svim uvjetima negativne tj. pri nižim i višim pH vrijednostima odnosno temperaturama što znači da su zelenije i plavije u odnosu na standard.

Spirulina je ekstrakt planktonskih modro-zelenih algi koje rastu u alkalnoj vodi vulkanskih jezera (Estrada Pinero i sur., 2001). Ekstrakt se dobiva iz dvije vrste algi *Arthrospira platensis* i *Arthrospira maxima*. Ekstrakt *Arthrospira platensis* sadrži 61% proteina, 26% plavog pigmenta, 4,5% ugljikohidrata, 6,5% vlage i 2% pepela (Akhilender Naidu i sur., 2009). Koristi se kao bojilo hrane i pića u Japanu (Danesi i sur., 2002). Osim toga utvrđeno je da ima brojne pozitivne učinke na zdravlje kao što su: snižavanje razine kolesterola, jačanje imunološkog sustava i crijevne mikroflore, antioksidacijsko i protuupalno djelovanje (Akhilender Naidu i sur., 2009). Upotreba pigmenta Spiruline kao bojila ima široku primjenu u kozmetičkoj, farmaceutskoj i prehranbenoj industriji (Danesi i sur., 2002). FDA je 2013. odobrila upotrebu ekstrakta Spiruline dobivenog iz cijanobakterije *Arthrospira platensis* kao bojilo u bombonima, gumama za žvakanje i sladoledima (Institute of Food Technologists, 2013, Newsome i sur., 2014). Trenutno se za bojanje prehranbenih proizvoda u plavu boju uglavnom koriste sintetska bojila. Sintetsko plavo bojilo dopušteno je kao dodatak prehrani u EU (EFSA, 2013). Sintetsko plavo bojilo je

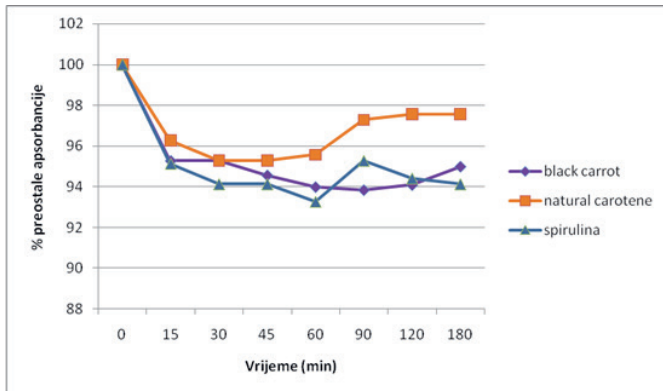
triarilmetan koje u hrani dolazi u obliku kalcijeve ili natrijeve soli u obliku tamno plavog praha ili u obliku granula. Rezultati ispitivanja u ovom radu su pokazala da je prirodno prehranbeno bojilo plave boje (Spirulina BLUE P50) znatno nestabilnije u odnosu na prva dva ispitivana prirodna prehranbena bojila. Pri 50 °C i pH 5 je najmanja ukupna promjena boje (1,91-3,84), ali je već tada značajna razlika u odnosu na standard. Vrijednosti parametra  $\Delta L$  se smanjuju tijekom 180 min zagrijavanja, ali ostaju pozitivne što znači da je uzorak svjetliji s obzirom na standard. Parametri  $\Delta a$  i  $\Delta b$  se povećavaju tijekom zagrijavanja, pozitivni su te je uzorak crveniji odnosno žući u odnosu na standard. Povišenjem temperature na 70 °C, a pri pH 5 dolazi do velikih promjena parametara boje pa je tako ukupna promjena boje porasla čak na  $\Delta E = 34,22$  nakon 180 min, što je vrlo velika razlika u odnosu na standard. Vrijednosti parametara  $\Delta a$  i  $\Delta b$  također su značajno porasle,  $\Delta a$  više od 9 puta u odnosu na zagrijavanje pri 50 °C, a  $\Delta b$  više od 8 puta; pozitivne su, odnosno uzorak je crveniji tj. žući od standarda. Svjetlina uzorka se također povećala, gotovo 20 puta. Zagrijavanjem uzoraka pri temperaturi od 50 °C, a pri pH 7 ukupna promjena boje iznosi 7,7 nakon 180 min zagrijavanja te je to velika razlika u odnosu na standard. Isto tako je veća promjena boje ako se uspoređi sa rezultatima dobivenim zagrijavanjem na istoj temperaturi, a pri nižem pH. Svjetlina uzorka je kroz cijeli interval zagrijavanja gotovo ista, pozitivne su vrijednosti parametara  $\Delta L$ . Vrijednosti parametara  $\Delta a$  i  $\Delta b$  su pozitivne i povećavaju se tijekom zagrijavanja ali ne značajno; uzorci su crveniji odnosno žući od standarda. Najmanju stabilnost Spirulina pokazuje tijekom zagrijavanja pri 70 °C i pri pH 7, odnosno dolazi do najveće ukupne promjene boje kada je  $\Delta E = 37$ . To je vrlo velika razlika u odnosu na standard, a ujedno i najveća ukupna promjena boje usporedbom sva tri ispitivana bojila. Vrijednosti parametara  $\Delta L$ ,  $\Delta a$ ,  $\Delta b$  su pozitivne i značajno porasle u odnosu na rezultate dobivene nakon zagrijavanja pri nižoj temperaturi, a pri istom pH. Iste vrijednosti su porasle u odnosu na zagrijavanje pri 70 °C, a pri pH 5, ali nije velika razlika. Dobiveni rezultati promjene boje prirodnog bojila plave boje nakon zagrijavanja kroz 180 min na temperaturi od 70 °C pri pH 5 te pH 7 su u skladu s literaturnim podacima (Martelli i sur., 2014). Prema Chaiklahan i suradnicima (2012) najveća stabilnost plavog pigmenta spiruline (fikocijanina) je pri pH 5,5-6.0 te pri temperaturi između 50 - 65 °C., a zaštitni potencijal u procesu razgradnje fikocijanina pokazali su glukoza, saharoza te natrijev klorid.

Nakon zagrijavanja prirodnih prehranbenih bojila u vremenskom intervalu od 180 min pri temperaturi od 50 °C te pri pH 5 može se uočiti kako je najveći ostatak apsorbancije (%) zabilježen kod prirodnog bojila narančaste boje kao što je prikazano na slici 1., a iznosi 97,57 %, dok ostatak apsorbancije nakon zagrijavanja u istim uvjetima za prirodno bojilo ljubičaste boje iznosi 95%, a za prirodno bojilo plave boje 94,42 %.



**Slika 1.** Ostatak (%) apsorbancije boje prehrambenih boji-  
la pri  $\lambda_{max}$  kao funkcije vremena nakon zagrijavanja  
pri 50 °C i pH 5

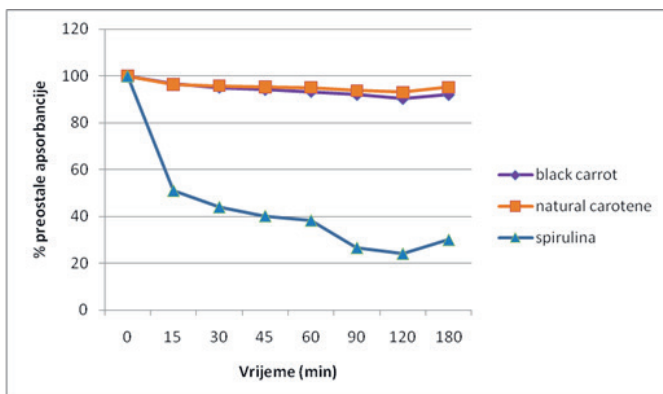
**Figure 1.** Remaining absorbance of natural food colorants at  $\lambda_{max}$  as a function of heating time at 50 °C and pH 5



Na slici 2. prikazan je ostatak apsorbancije prirodnih prehrambenih bojila nakon zagrijavanja pri temperaturi od 70 °C te pri pH 5, iz čega je vidljivo da se prirodno bojilo narančaste boje i pri višoj temperaturi pokazalo kao najstabilnije unatoč porastu temperature, a uz isti pH. Ostatak apsorbancije iznosio je 95,14%, dok je za prirodno bojilo ljubičaste boje iznosio 91,85 %. Najveća promjena uočava se kod prirodnog bojila plave boje gdje je nakon 180 min zagrijavanja ostatak apsorbancije iznosio tek 30% čime se pokazalo kao najmanje stabilno u tim uvjetima što znači da je povišenje temperature imalo najveći utjecaj na promjenu boje, a sličan trend su pokazala i istraživanja Chaiklahan i suradnika (2012).

**Slika 2.** Ostatak (%) apsorbancije boje prehrambenih bojila  
pri  $\lambda_{max}$  kao funkcije vremena nakon zagrijavanja  
pri 70 °C i pH 5

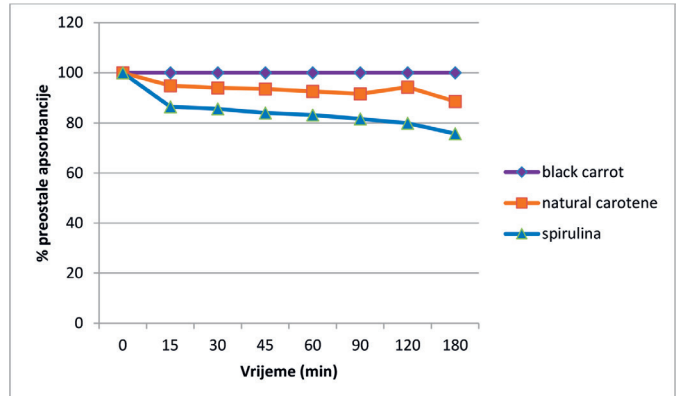
**Figure 2.** Remaining absorbance (%) of natural food colorants at  $\lambda_{max}$  as a function of heating time at 70 °C i pH 5



Pri 50 °C i uz pH 7 najveću stabilnost imalo je prirodno bojilo ljubičaste boje gdje je intenzitet apsorbancije ostao nepromijenjen tijekom 180 min iznad 100% (slika 3). Preostala dva prirodna bojila pokazuju blagi pad vrijednosti ostataka apsorbancije te oni iznose: 88,57% za prirodno bojilo narančaste boje i 75,71% za prirodno bojilo plave boje.

**Slika 3.** Ostatak (%) apsorbancije boje prehrambenih boji-  
la pri  $\lambda_{max}$  kao funkcije vremena nakon zagrijavanja  
pri 50 °C i pH 7

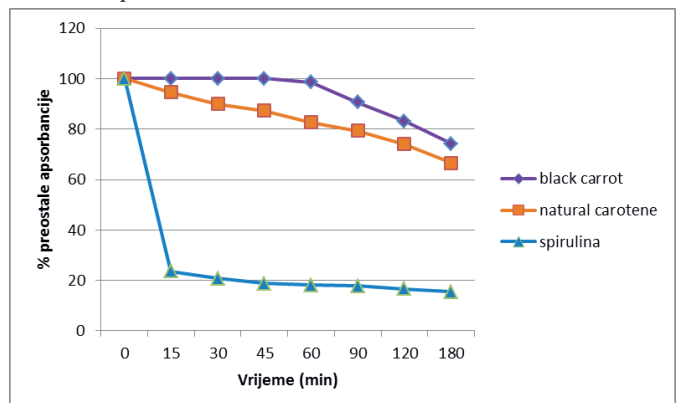
**Figure 3.** Remaining absorbance (%) of natural food colorants at  $\lambda_{max}$  as a function of heating time at 50 °C and pH 7



Najveće promjene za sva ispitivana prirodna bojila uočavaju se zagrijavanjem pri 70 °C i uz pH 7 kao što je prikazano na slici 4. Najveću stabilnost pokazalo je prirodno bojilo ljubičaste boje gdje je ostatak apsorbancije nakon 180 min zagrijavanja iznosio 74,14%. Za isto se može uočiti kako je tijekom 60 min zagrijavanja vrijednost ostatka apsorbancije nepromijenjena, nakon čega je počela padati, ali ipak je zadržala najveću vrijednost u odnosu na preostala dva bojila. Prirodno bojilo narančaste boje pokazalo je manju stabilnost gdje je ostatak apsorbancije nakon zagrijavanja iznosio 66,57%. Najmanje stabilno bojilo i uz najmanji ostatak apsorbancije nakon zagrijavanja kroz 180 min je prirodno bojilo plave boje. Značajan pad vrijednosti uočava se već nakon 15 min zagrijavanja pri čemu iznosi 23,57% te do kraja intervala zagrijavanja pada do 15,42%.

**Slika 4.** Ostatak (%) apsorbancije boje prehrambenih bojila  
kao funkcije vremena nakon zagrijavanja pri 70 °C  
i pH 7

**Figure 4.** Remaining absorbance (%) of natural food colorants at  $\lambda_{max}$  as a function of heating time at 70 °C i pH 7



Uzevši u obzir promjene svih parametara boje za sva ispitivana bojila može se zaključiti da sva tri bojila pokazuju veću stabilnost, odnosno manju degradaciju i promjenu boje pri nižim temperaturama zagrijavanja kao i pri nižoj pH vrijed-

nosti. Isto tako vremenski period zagrijavanja utječe na porast odnosno na pad vrijednosti pojedinih parametara pri čemu do značajnijih promjena dolazi kroz dulji period na višim temperaturama. Kao najmanje stabilno bojilo pokazalo se prirodno prehrambeno bojilo plave boje za koje su zabilježene najveće ukupne promjene boje, zatim slijedi prehrambeno bojilo ljubičaste boje, dok je najstabilnije bojilo narančaste boje uz najmanju ukupnu promjenu boje.

## Zaključci

Stabilnost ispitivanih prirodnih prehrambenih bojila ljubičaste, narančaste i plave boje ovisi o primijenjenoj temperaturi, duljini zagrijavanja i pH vrijednost medija. Najbolja stabilnost boje prirodnog prehrambenog bojila ljubičaste boje (Black carrot) utvrđena je pri temperaturi 50 °C i pH 5. Ostatak apsorbanije nakon 180 min iznosio je 95,00%. Najmanja stabilnost istog bojila utvrđena je pri temperaturi 70 °C i pH 7, a ostatak apsorbanije nakon 180 min iznosio je 74,14%. Najbolja stabilnost boje prirodnog prehrambenog bojila narančaste boje (Natural carotene) utvrđena je pri temperaturi od 50 °C i pH 5, a ostatak apsorbanije nakon 180 min iznosio je 97,57%. Najmanja stabilnost istog bojila utvrđena je pri temperaturi od 70 °C i pri pH 7, a ostatak apsorbanije nakon 180 min iznosio je 66,57 %. Najbolja stabilnost prirodnog prehrambenog bojila plave boje (Spirulina) utvrđena je pri temperaturi od 50 °C i pH 5, a ostatak apsorbanije nakon 180 min iznosio je 94,14%. Najmanja stabilnost istog bojila utvrđena je pri temperaturi 70 °C i pH 7, a ostatak apsorbanije nakon 180 min iznosio je 15,42%. Prirodno prehrambeno bojilo narančaste boje (Natural carotene) pokazuje bolju stabilnost pri nižoj temperaturi (50 °C) i nižoj pH vrijednosti (pH 5). Najmanje stabilno bojilo u ovom istraživanju je prirodno prehrambeno bojilo plave boje (Spirulina). Sva tri ispitivana prirodna prehrambena bojila pokazala su veću stabilnost pri nižim temperaturama zagrijavanja kao i pri nižoj pH vrijednosti.

## Literatura

Akhilender Naidu, K., Sarada, R., Manoj, G., Khan, M. Y., Mahadeva Swamy, M., Viswanatha, S., Narasimha Murthy, K., Ravishankar, G.A., Leela Srinivas, E. (2009) Toxicity Assessment Of Phycocyanin-A Blue Colorant From Blue Green Alga *Spirulina platensis*, *Food Biotechnology*, **19**, 51-66.

Arimboor, R., Natarajan, R. B., Menon, K. R., Chandrasekhar, L. P., Moorkoth, V. (2015) Red pepper (*Capsicum annuum*) carotenoids as a source of natural food colors: analysis and stability-a review, *Journal of Food Science and Technology*, **52**, **3**, 1258–1271.

Boon, C. S., McClements, D. J., Weiss, J., Decker, E. A. (2010) Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **50**, **6**, 515–532.

Canadian Food Inspection Agency. 2003. Guide to Food Labelling and Advertising <<http://www.inspection.gc.ca/english/fssa/labeti/guide/toce.shtml>>. Pristupljeno 25. Srpnja 2015.

Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., & Bunnag, B. (2012) Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives, *Process Biochemistry*, **47**, **4**, 659–664.

Crino, M.A., Heenan, C.N., Nguyen, M.H., Stathopoulos, C.E. (2012) The stability of natural red/pink food colours in ultrahigh-temperature (UHT) products, *J Sci Food Agric*, **93**, 2022–2027.

Danesi, E.D.G., De Rangel-Yagui, C., De Carvalho, J.C.M., Sato, S. (2002) An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*, *Biomass and Bioenergy*, **23**, 261-269.

DDW The Colour House <<http://www.ddwcolor.com>>. Pristupljeno 25. Svibnja 2015.

Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., Paredes-López, O., Francis, F. J. (2000) Natural Pigments : Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **40**

EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) (2012) Scientific Opinion on the re-evaluation of mixed carotenes (E 160a (i)) and beta-carotene (E 160a (ii)) as a food additive, *EFSA Journal*.

EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) (2013) Scientific Opinion on the re-evaluation of Patent Blue V (E 131) as a food additive, *EFSA Journal*.

Estrada Pinero, J.E., Bermejo Besco, P., Villar del Fresno, A.M. (2001) Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protein extract, *Il Farmaco*, **56**, 497-500.

Fernandez-Lopez, J.A., Angosto, J.M., Gimenez, P.J., Leon, G. (2013) Thermal stability of selected natural red extracts used as food colorants, *Plant Foods for Human Nutrition*, **68**, 11-17.

Ferruzzi, G.M., Schwartz, J.S. (2001) Overview of chlorophylls in foods, *Current Protocols Food Analytical Chemistry*, F4.1.1.-F4.1.9.

Future Market Insights (2015) Natural Food Colours Market: Global Industry Analysis and Opportunity Assessment 2014-2020 <http://www.futuremarketinsights.com/reports/details/global-natural-food-colours-market> Pristupljeno 02. svibnja 2016.

Ghidouche, S., Rey, B., Michel, M., Galaffu, N. (2013) A rapid tool for the stability assessment of natural food colours, *Food Chemistry*, **139**, 978-985.

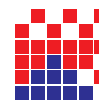
Gimenez, P. J., Fernandez-Lopez, J. A., Angosto, J. M., & Obon, J. M. (2015) Comparative Thermal Degradation Patterns of Natural Yellow Colorants Used in Foods, *Plant Foods for Human Nutrition*, **70**, **4**, 380–387.

Glazer, A. N. (1994) Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used fluorophores, *Journal of Applied Phycology*, **6**, 105-112.

Grujić, R., Odžaković, B., Grujić, S. (2009) Upotreba prehrambenih boja u izradi prehrambenih proizvoda- Koristi i rizici. 1. International Conference of Ecological Safety in Post-Modern Environment, Banja Luka.

Hannuksela, M., Haahtela, T. (1987) Hypersensitivity reactions to food additives, *Allergy*, **42**, 561-575.

IFT-Institute of Food Technologists (2013), < <http://www.ift.org/food-technology/daily-news/2013/august/19/fda-allows-natural-blue-from-spirulina-as-food-coloring>>. Pristupljeno 25. svibnja 2015.



Loypimai, P., Moongngarm, A., Chottanom, P. (2016) Thermal and pH degradation kinetics of anthocyanins in natural food colorant prepared from black rice bran, *Journal of Food Science and Technology*, 53, 1, 461–470.

Markets and Markets (2014) Food Colors Market By Type [Natural (Anthocyanin, Carotenoid, Caramel) & Synthetic (Blue, Green, Red, Yellow)], Application (Beverage, Bakery & Confectionery, Dairy & Frozen product, Meat product) & Geography - Global Trends & Forecast To 2019, <<http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/food-colors-market>>. Pristupljeno 20. svibnja 2015.

Martelli, G., Folli, C., Visai, L., Daglia, M., & Ferrari, D. (2014). Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications, *Process Biochemistry*, 49, 1, 154–159.

McAvoy, S.A. (2014) Global Regulations of Food Colors, *The Manufacturing Confectioner*, 77-86.

Newsome, A.G., Culver, C.A., van Breemen, R.B. (2014) Natures Palette: The search for natural blue colorants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 6498-6511.

Ozen, G., Akbulut, M., Artik, N. (2011) Stability of Black Carrot Anthocyanins in The Turkish Delight (Lokum) During Storage, *Journal of Food Process Engineering*, 34, 1282-1297.

Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and the council of the European Union, 2008 on food additives. In: Official Journal of the European Union, L 354/16. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=C ELEX:32008R1333&from=HR>

Rimbai, H., Sharma, R.R., Srivastav, M. (2011) Biocolorants and its implications in Health and Food Industry- A Review, *International Journal of PharmTech Research*, 3, 2228-2244.

Šarkanj, B., Kipčić, D., Vasić-Rački, Đ., Delaš, F., Galić, K., Katalenić, M., Dimitrov, N., Klapac, T. (2010) Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani, Hrvatska agencija za hranu, Osijek, str. 221.

U.K. Food standards Authority. 2008. Criteria for the use of the use of the terms fresh, pure, natural etc in food labelling. <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/markcritguidance.pdf>

Xiao, D.C. (2008) Food drying Fundamentals. U: Drying technologies in food processing, (Xiao, D.C., Mujumdar, A. S., ured.), Blackwell Publishing, Singapore, str. 1-55.

Yang, Z., Han, Y., Gu, Z., Fan, G., & Chen, Z. (2008) Thermal degradation kinetics of aqueous anthocyanins and visual color of purple corn (*Zea mays* L.) cob, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 3, 341–347.

Zakon o prehrambenim aditivima, aromama, i prehrambenim enzimima (2013). *Narodne novine* 39, Zagreb