

UNIVERZITET U BEOGRADU  
Poljoprivredni fakultet

Stefan M. Kolašinac

**KAROTENOIDI, NJIHOV ANTIOKSIDATIVNI  
KAPACITET I BIOLOŠKA AKTIVNOST U  
ODABRANIM SORTAMA PAPRIKE I  
NJIHOVIM TRADICIONALNIM  
PROIZVODIMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF AGRICULTURE

Stefan M. Kolašinac

**CAROTENOIDS, THEIR ANTIOXIDANT  
CAPACITY AND BIOLOGICAL ACTIVITY IN  
SELECTED PAPRIKA VARIETES AND  
THEIR TRADITIONAL PRODUCTS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

Mentor:

Dr Zora Dajić-Stevanović, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet  
Uža naučna oblast: Poljoprivredna botanika

Članovi komisije:

Dr Ilinka Pećinar, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet  
Uža naučna oblast: Poljoprivredna botanika

Dr Dragosav Mutavdžić, viši naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu, Institut za multidisciplinarna istraživanja  
Uža naučna disciplina: Hemometrija

Dr Mirjana Cvetković, naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju  
Uža naučna disciplina: Organska hemija

Dr Đorđe Moravčević, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet  
Uža naučna oblast: Ratarstvo, povrtarstvo, cvećarstvo, krmno i lekovito bilje

Dr Mile Veljović, docent  
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet  
Uža naučna oblast: Nauka o konzervisanju i vrenju

Datum odbrane:

## **Zahvalnica**

*Pre svega, duboku i najveću zahvalnost dugujem prof. Zori Dajić Stevanović, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu i šefu Katedre za agrobotaniku. Prihvativši mentorstvo, dala nam je šansu da sarađujemo, a meni da se bavim ozbiljnim istraživačkim radom i nastavnim poslom. Zahvaljujem joj se i što mi je dala ogromnu slobodu u naučnom radu, pri čemu je podstakla moju radoznalost i omogućila širenje vidika a takođe i skretala pažnju na greške na kojima sam učio. Time mi je utaban put ka kritičkom i logičkom razmišljanju kao i konstruktivnom delovanju, ali i put ka etičnosti i čovečnosti jer bez toga nema ni nauke ni naučnika.*

*Veliku zahvalnost dugujem i svim kolegama sa Katedre za agrobotaniku: dr Marini Mačukanović-Jocić, dr Dragani Rančić, dr Ilinki Pećinari, dr Ivanu Šoštariću, dr Svetlani Ačić, dipl. inž. Radenku Radoševiću i dipl. inž. Maji Terzić. Njihovo prihvatanje mene, kao novog člana njihove Katedre, je nešto što svako može samo da poželi. Hvala vam na tome, zaista! Ovde bih posebno izdvojio pomoći, savete i podršku Ilinke Pećinari.*

*Iskrenu zahvalnost i poštovanje dugujem dr Dragosavu Mutavdžiću iz Instituta za multidisciplinarne studije sa kojim sam saradnju počeo 2017. godine a koji je nesebično delio svoje znanje u uveo me u čudesni svet verovatnoće i statistike.*

*Zahvaljujem se dr Dejanu Gođevcu, dr Mirjani Cvetković i dr Jovani Jeremić sa Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu koji su mi omogućili da se sprovede deo eksperimentalnih analiza.*

*Veliku zahvalnost dugujem grupi za Hemiju i Biohemiju hrane: dr Mirjani Pešić, dr Aleksandru Kostiću, dr Danijelu Milinčiću i dr Slađani Stanojević sa kojima sam provodio dosta vremena i čiji su saveti sigurno doprineli da ova disertacija dobije svoj finalni oblik, ali isto tako su doprineli i formiranju kritičkog mišljenja i produbljivanju naše zajedničke saradnje.*

*Zahvaljujem se dr Miletu Veljoviću koji je svojim tehnološkim veštinama i znanjem omogućio bolje sagledavanje i povezivanja problema privrede sa naukom.*

*Veliki doprinos dao je i dr Dario Danojević iz Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu koji je odgajio i obezbedio biljni materijal na kome je urađena ova doktorska disertacija.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem i dr Vesni Rakić čija predavanja su mi bila prozor ka vibracionim spektroskopskim instrumentalnim metodama analiza.*

*Veliko poštovanje i zahvalnost dugujem i dr Đorđu Moravčeviću čiji su saveti, na samom početku doktorskih akademskih studija, možda bili i presudni da podem ovim putem.*

*Naravno, veliku zahvalnost dugujem svim svojim prijateljima i kolegama koji su mi pružali podršku i direktno ili indirektno imali uticaj ne samo na izradu ove doktorske disertacije već i na formiranje moje naučne kompetentnosti u celini. U to ime zahvaljujem se dr Milanu Jankoviću, dr Nemanji Stanisavljeviću, mast. inž. Tijani Ilić, Tomi, Raši, Dobriju, Matorom, tetki Ljilji, Sunčici, čika Milovanu, Slađi, Goranu, i svima drugima koji su mi bili potpora u proteklim godinama.*

*Veliku zahvalnost dugujem majci Marijani, mojoj Micki, i tu zahvalnost zaista ne umem da opišem rečima.*

*Ogromnu zahvalnost i poštovanje dugujem i mojoj Jeleni koja je uvek bila tu da sasluša, pruži podršku i ljubav, posavetuje i pomogne u laboratoriji.*

*Na kraju, ova disertacija nikada ne bi ugledala svetlost dana da nije bilo velike podrške **Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija** te im se ovim putem neizmerno zahvaljujem na podršci koju su mi pružali stipendiranjem u trajanju od 4 godine i kasnijim uključivanjem u naučno-istraživački rad.*

*Zahvalnost dugujem i **Fondu za nauku Republike Srbije** koji su odobravanjem projekta za finansiranje čiji sam učesnik u velikoj meri doprineli razvoju mojih istraživačkih kapaciteta.*

*Ovu doktorsku disertaciju posvećujem  
Jeleni i Micki*

*Beograd, 2024*

*Autor  
Stefan M. Kolašinac*

## **Karotenoidi, njihov antioksidativni kapacitet i biološka aktivnost u odabranim sortama paprike i njihovim tradicionalnim proizvodima**

### **Rezime**

Cilj ove doktorske disertacije bio je da se okarakterišu karotenoidini profili 4 sorte paprike (Amfora, Una, Kurtovska kapija i Vrtka) kroz različite faze sazrevanja, kao i ajvara proizvedenoig od svih ispitivanih sorti. Najzastupljeniji karotenoidi u plodu paprike (lutein, zeaksantin,  $\beta$ -karoten, kapsantin i  $\beta$ -kriptoksantin) ekstrahovani su uz pomoć aceton-heksana, dok su njihove koncentracije određene metodom tankoslojne hromatografije visokih performansi (HPTLC). Iz dobijenih ekstrakta, određivani su ukupni karotenoidi, polifenoli i flavonoidi kao i antioskidativna aktivnost spektrofotometrijskim metodama. Uzorci svežih plodova analizirani su primenom Ramanove spektroskopije, pri čemu su fomirani hemometrijski modeli za diskriminaciju genotipova i faza sazrevanja u skladu sa rezultatima dobijenim standardnim analitičkim metodama. Rezultati su pokazali pouzdanost od 100% korišćenjem modela SIMCA, dok je u prepoznavanju faze sazrevanja postignuta preciznost od 98% korišćenjem modela PCA-QDA.

Analiza ispitivanih uzoraka HPTLC metodom pokazala je da je količina ispitivanih karotenoida bila najveća u fazi fiziološke zrelosti kod svih ispitivanih sorti. Utvrđeno je da se količina  $\beta$ -karotena u toj fazi kretala od  $0,1680\pm0,0232$  g/100g kod sorte Una do  $0,9912\pm0,1435$  g/100 g kod sorte Kurtovska kapija. Količina kapsantina u fazi pune zrelosti bila je najmanja kod sorte Una ( $0,1142\pm0,0693$  g/100g), dok je najveća količina zabeležena kod sorte Vrtka ( $0,5097\pm0,0397$  g/100g). Analize su pokazale da se količina  $\beta$ -kriptoksantina kretala u opsegu od  $0,0129\pm0,0072$  g/100g kod sorte Una do  $0,0811\pm0,0362$  g/100g kod sorte Vrtka. Lutein i zekasantin su analizirani zajedno zbog sličnosti građe u njihovoј strukturi, čime je bilo onemogućeno njihovo precizno razdvajanje metodama koje su korišćene. Rezultati su pokazali da se količina luteina/zeaksantina u fazi fiziološke zrelosti kretala od  $0,0841\pm0,0467$  g/100g kod sorte Una do  $0,1624\pm0,0172$  g/100g kod sorte Vrka. Analize ispitivanja sadržaja ispitivanih karotenoida u ajvaru pokazale su da postoji tendencija opadanja koncentracije u odnosu na njihovu količinu u svežim plodovima. Najveće promene u količini ukupnih ispitivanih karotenoida (lutein/zeaksantin+ $\beta$ -karoten+ $\beta$ -kriptoksantin+kapsantin) u ajvaru u odnosu na fazu pune zrelosti su zabeležene kod sorte Una (66,98%), a najmanje kod sorte Kurtovska kapija (1,90%).

Ukupni karotenoidi su pokazali trend rasta tokom sazrevanja plodova, dok je količina ukupnih fenola i flavonoida opadala. Rezultati antioksidativnih testova pokazali su povećanje antioksidativnog kapaciteta sa sazrevanjem plodova paprike, što potvrđuje ulogu karotenoida kao jedinjenja sa sposobnošću neutralizacije štetnih kiseoničnih vrsta.

Kvantifikacija ukupnih karotenoida Ramanovom spektroskopijom dala je rezultate koji su bili visoko korelisani sa rezultatima dobijenim HPTLC analizom i metodom ukupnih karotenoida određivanih spektrofotometrijski, što ukazuje na visok potencijal ove metode u kvantifikaciji karotenoida.

Rezultati sposobnosti ekstrakata paprike u finalnoj fazi sazrevanja i ajvara da inhibiraju enzime  $\alpha$ -amilaza i tirozinaza pokazali su da ekstrakti ajvara imaju manju sposobnost inhibicije ispitivanih enzima kod svih ispitivanih sorti. Najmanju IC50 vrednost za enzim  $\alpha$ -amilaza pokazali su ekstrakti sorte Amfora ( $6,21\pm0,05$  mg/ml) a najveća vrednost zabeležena je kod ajvara sorte Vrtka ( $10,42\pm0,03$  mg/ml). Najmanju IC50 vrednost za enzim tirozinaza pokazao je takođe ekstrakt sorte Amfora u finalnoj fazi sazrevanja ( $3,50\pm0,05$  mg/ml) dok je najmanja IC50 vrednost zabeležena kod ajvara sorte Kurtovska kapija ( $5,82\pm0,05$  mg/ml).

Rezultati statičkog *in vitro* modela pokazali su da je biodostupnost karotenoida sorte Una najveća u ajvaru, zatim u fazi 1 i 3, a najmanja biodostupnost je zabeležena u finalnoj fazi sazrevanja (faza 5).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da tradicionalni proizvod (ajvar) predstavlja važan izvor karotenoida koji su sačuvani nakon termičke obrade sa visokom biološkom aktivnošću u odnosu na fazu finalnog sazrevanja paprike. Takođe, biousvojivost karotenoida iz ajvara je značajno veća u poređenju sa rezutatima dobijenih analizom sveže paprike.

Ključne reči: sorte paprike, karotenoidi, kapsantin, Ramanova spektroskopija, HPTLC, hemometrija, antioksidativni kapacitet, biousvojivost

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Poljoprivredna botanika

UDK: 547.979.8:635.649(043.3)

## **Carotenoids, their antioxidant capacity and biological activity in selected paprika varieties and their traditional products**

### **Abstract**

The aim of this doctoral dissertation was to characterize the carotenoid profiles of 4 paprika varieties (Amfora, Una, Kurtovska kapija and Vrtka) through different stages of ripening, as well as ajvar produced from all tested varieties. The most abundant carotenoids in paprika fruit (lutein, zeaxanthin,  $\beta$ -carotene, capsanthin and  $\beta$ -cryptoxanthin) were extracted with the help of acetone-hexane, while their concentrations were determined by high performance thin layer chromatography (HPTLC). From the obtained extracts, total carotenoids, polyphenols and flavonoids as well as antioxidant activity, were determined by spectrophotometric methods. Fresh fruits were analyzed using Raman spectroscopy, where chemometric models were formed for the discrimination of genotypes and ripening stages in accordance with the results obtained by standard analytical methods. The results showed 100% reliability of using the SIMCA model, while in recognizing the ripening stage, a precision of 98% using the PCA-QDA model.

The analysis of the tested samples using the HPTLC method showed that the amount of tested carotenoids is the highest in the physiological maturity stage of all tested varieties. It was determined that the amount of  $\beta$ -carotene in that phase ranged from  $0.1680 \pm 0.0232$  g/100g in the Una variety to  $0.9912 \pm 0.1435$  g/100g in the Kurtovska Kapija variety. The amount of capsanthin in the stage of full maturity was the lowest in the Una variety ( $0.1142 \pm 0.0693$  g/100g), while the highest amount was recorded in the Vrtka variety ( $0.5097 \pm 0.0397$  g/100g). The analyzes showed that the amount of  $\beta$ -cryptoxanthin ranged from  $0.0129 \pm 0.0072$  g/100g in the Una variety to  $0.0811 \pm 0.0362$  g/100g in the Vrtka variety. Lutein and zeaxanthin were analyzed together due to the similarity of their structure, which prevented their precise separation by the methods used. The results showed that the amount of lutein/zeaxanthin in the stage of physiological maturity ranged from  $0.0841 \pm 0.0467$  g/100g in the Una variety to  $0.1624 \pm 0.0172$  g/100g in the Vrtka variety. Analysis of the content of the investigated carotenoids in ajvar showed that there is a tendency for the concentration to decrease in relation to their amount in fresh fruits. The biggest changes in the amount of total analysed carotenoids (lutein/zeaxanthin+ $\beta$ -carotene+ $\beta$ -cryptoxanthin+capsanthin) in ajvar compared to the full maturity stage were recorded in the Una variety (66.98%), and the least in the Kurtovska Kapija variety (1.90%).

Total carotenoids showed an increasing trend during fruit ripening, while the amount of total phenols and flavonoids decreased. The results of antioxidant tests showed an increase in antioxidant capacity with the ripening of paprika fruits, which confirms the role of carotenoids as compounds with the ability to neutralize harmful oxygen species.

The quantification of total carotenoids by Raman spectroscopy provided results that were highly correlated with the results obtained by HPTLC analysis and the method of total carotenoids determined spectrophotometrically, which indicates the high potential of this method in the quantification of carotenoids.

The results of the ability of paprika extracts in the final stage of ripening and ajvar to inhibit the enzyme  $\alpha$ -amylase and tyrosinase showed that the ajvar extracts have a lower ability to inhibit the tested enzymes in all tested varieties. The lowest IC<sub>50</sub> value for the enzyme  $\alpha$ -amylase is shown by extracts of the Amfora variety ( $6.21 \pm 0.05$  mg/ml), and the highest value was recorded in the ajvar of the Vrtka variety ( $10.42 \pm 0.03$  mg/ml). The lowest IC<sub>50</sub> value for the enzyme tyrosinase was also shown by the extract of the Amfora variety in the final stage of ripening ( $3.50 \pm 0.05$  mg/ml), while the lowest IC<sub>50</sub> value was recorded in the ajvar of the Kurtovska Kapija variety ( $5.82 \pm 0.05$  mg/ml).

The results of the static *in vitro* digestion model showed that the bioavailability of carotenoids of the Una variety is the highest in ajvar, then in stages 1 and 3, and the lowest bioavailability was recorded in the final stage of ripening (stage 5).

Based on the obtained results, it can be concluded that the traditional product (ajvar) represents an important source of carotenoids that are preserved after heat treatment with high biological activity in relation to the final ripening stage of the paprika. Also, the bioavailability of carotenoids from ajvar is significantly higher compared to the results obtained from the analysis of fresh paprika.

Keywords: paprika varieties, carotenoids, capsanthin, Raman spectroscopy, HPTLC, chemometry, antioxidant capacity, bioavailability

Scientific field: Biotechnical Sciences

Discipline: Agricultural Botany

UDK: 547.979.8:635.649(043.3)

## **Spisak skraćenica**

A x U – Amfora x Una  
ABA – Abscisinska kiselina  
ABTS<sup>+</sup> - 2,2-azino-bis/3-etil-benotiazolin-6-sulfonska kiselina  
AMF1 – Amfora faza 1  
AMF3 – Amfora faza 3  
AMF5 – Amfora faza 5  
AMFAJV – Amfora ajvar  
DPPH• - 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate  
CUPRAC - Kupri jon redukujuća antioksidativna moć  
FRP - Sposobnost redukcije Fe<sup>3+</sup> jona (Redukujuća moć)  
GAA – Galna kiselina  
GGDP – Geranilgeranil difosfat  
HPLC- High Performance Liquid Chromatography. Tečna hromatografija visokih performansi  
HPTLC-High Performance Thin Layer Chromatography. Tankoslojna hromatografija visokih perfomansi  
KK – Kurtovska kapija  
KK1 – Kurtovska kapija faza 1  
KK2 – Kurtovska kapija faza 2  
KK3 – Kurtovska kapija faza 3  
KK4 – Kurtovska kapija faza 4  
KK5 – Kurtovska kapija faza 5  
KKAJV – Kurtovska kapija ajvar  
LC-MS-Liquid Chromatography Mass Spectrometry. Tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom  
MLR – Multilinear Regression. Višestruka linearna regresija  
NMR- Nuclear Magnetic Resonance. Nuklearna magnetna rezonanca  
Orbitrap MS-Mass Spectrometry. Orbitrap masena spektroskopija  
PCA – Analiza glavnih komponenti  
PCA-LDA – Principal Component Analysis-Linear Discriminant Analysis. Metoda glavnih komponenti- Linearna diskriminaciona analiza  
PLS-DA – Partial Least Square – Discriminant Analysis  
PLSR – Partial Least Square Regression. Regresija metodom delimičnih najmanjih kvadrata.  
QDA – Quadratic Discirminant Analysis. Kvadratna diskriminaciona analiza  
RMSE – Root mean square error  
ROS – Reactive Oxigen Species. Reaktivne vrste kiseonika  
RS – Raman Spectroscopy. Ramanova spektroskopija  
SERS – Surface Enhanced Raman Spectroscopy  
SIMCA – Soft Independent Modeling of Class Analogy. Nezavisno modelovanje slaganjem grupa.  
SM – Suva masa  
SNOM - Scanning Near-field Optical Microscopy  
TEAC - Trolox ekvivalent antioxidativni kapacitet  
TERS - Tip enhanced Raman spectroscopy  
UHPLC (eng. Ultra-High-Performance Liquid Chromatography). Ultra-efikasna tečna hromatografija  
UNA1 – Una faza 1  
UNA3 – Una faza 3

UNA5 – Una faza 5

UNAAJV – Una ajvar

VRT1 – Vrtka faza 1

VRT3 – Vrtka faza 3

VRT5 – Vrtka faza 5

VRTAJV – Vrtka ajvar

## Sadržaj

1.	Uvod.....	1
2.	Pregled literature .....	2
2.1.	Poreklo i istorijat paprike .....	2
2.2.	Sistematski položaj gajenih vrsta roda <i>Capsicum L.</i> .....	3
2.3.	Proizvodnja paprike u svetu i kod nas.....	4
2.4.	Botaničke osobine paprike ( <i>Capsicum annuum L.</i> ) .....	4
2.5.	Proizvodnja paprike.....	7
2.6.	Proizvodi od paprike .....	8
2.7.	Nutritivna vrednost i hemijski sastav ploda paprike .....	8
2.8.	Vrste karotenoida u biljkama .....	10
2.8.1.	Biosinteza karotenoida.....	11
2.8.2.	Biljke bogate karotenoidima .....	12
2.8.3.	Uloga karotenoida u fotosintezi i antioksidativna aktivnost.....	16
2.8.4.	Karotenoidi i adaptacije biljaka na uslove stresa.....	17
2.8.5.	Ostale uloge karotenoida u biljkama.....	17
2.9.	Bioraspoloživost i biološki efekti karotenoida.....	18
2.9.1.	Bioraspoloživost karotenoida.....	18
2.9.2.	Bioaktivnost karotenoida i njihov značaj za zdravlje ljudi.....	19
2.10.	Industrijska primena karotenoida i globalno tržiste .....	20
2.11.	Karotenoidi prisutni u vrstama roda <i>Capsicum L.</i> .....	21
2.12.	Izolacija i karakterizacija karotenoida .....	22
2.13.	Ramanova spektroskopija u analizi karotenoida .....	23
2.14.	Hemometrijska analiza Ramanovih spektara .....	23
3.	Ciljevi i hipoteze istraživanja.....	25
4.	Materijal i metode .....	26
4.3.	Biljni materijal korišćen u eksperimentu .....	26
4.2.	Merenje mase, morfoloških parametara plodova paprike i količine šećera .....	27
4.3.	Ekstrakcija karotenoida .....	28
4.4.	Analiza karotenoida HPTLC metodom.....	29
4.4.1.	Kvalitativno i kvantitativno određivanje karotenoida HPTLC metodom.....	29
4.4.2.	Hemometrijska obrada slika hromatograma .....	29
4.5.	Određivanje bioaktivnih komponenti iz ekstrakata paprike i prozvoda paprike (ajvara) .....	30
4.5.1.	Određivanje ukupnih polifenola .....	30
4.5.2.	Određivanje ukupnih karotenoida.....	30

4.5.3. Određivanje ukupnih flavonoida.....	31
4.6. Određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata paprike i proizvoda od paprike (ajvara) .....	31
4.6.1. Određivanje sposobnosti sakupljanja DPPH• radikala .....	31
4.6.2. Sposobnost redukcije Fe <sup>3+</sup> - FRP .....	32
4.6.3. Određivanje Kupri ion redukujuće antioksidativna moći – CUPRAC .....	32
4.7. Statička <i>in vitro</i> gastrointestinalna digestija karotenoida.....	33
4.8. Bioaktivnost ekstrakata različitih sorti paprika i ajvara .....	34
4.8.1. Inhibicija enzima α-amilaze.....	34
4.8.2. Inhibicija enzima tirozinaze .....	34
4.9. Analiza karotenoida Ramanovom spektroskopijom .....	35
4.9.1. Primena hemometrijskog diskriminacionog modela u cilju prepoznavanja faze zrenja crvene paprike .....	35
4.9.2. Primena rezultata Ramanove spektroskopije u razvijanju hemometrijskog diskriminacionog modela u cilju prepoznavanja genotipova paprike u fazi pune zrelosti ..	36
4.9.3. Primena Ramanove spektroskopije za kvantifikaciju ukupnih karotenoida u fazi pune zrelosti .....	37
4.10. Softverski paketi korišćeni prilikom statističke obrade podataka .....	38
5. Rezultati i diskusija.....	39
5.1. Analiza osnovnih morfoloških parametara ploda paprike u fazi fiziološke zrelosti .	39
5.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza karotenoida ekstrakata paprike i ajvara HPTLC metodom .....	41
5.2.1. Karotenoidni sastav ispitivanih uzoraka na osnovu profila dobijenog ispitivanjem slike HPTLC hromatograma .....	50
5.2.2. Hemometrijska analiza slike hromatograma u cilju prepoznavanja faze zrelosti paprike ..	52
5.2.3. Hemometrijska analiza slike hromatograma u cilju prepoznavanja sorte paprike u finalnoj fazi zrelosti .....	61
5.3. Određivanje sadržaja ukupnih ispitivanih bioaktivnih komponenti.....	65
5.3.1. Ukupni karotenoidi .....	65
5.3.2. Ukupni flavonoidi .....	67
5.3.3. Ukupni polifenoli .....	68
5.4. Antioksidativni kapacitet ekstrakta paprike i ajvara .....	70
5.4.1. DPPH• .....	70
5.4.2. CUPRAC.....	72
5.4.3. FRP .....	73
5.4.4. Bioraspoloživost i biološki efekti karotenoida .....	74
5.4.4.1. Biodostupnost karotenoida iz poda paprike i ajvara sorte Una.....	74

5.4.4.2. Bioaktivnost ekstrakata karotenoida iz različitih sorti paprika i ajvara .....	77
Aktivnost enzima $\alpha$ -amilaze i tirozinaze .....	77
5.5. Analiza karotenoida Ramanovom spektroskopijom .....	82
5.5.1. Hemometrijski modeli u obradi RS spektara u cilju prepoznavanja faze zrenja paprike .....	82
5.5.2. Primena Ramanove spektroskopije u razvijanju hemometrijskog diskriminacionog modela u cilju prepoznavanja sorte paprike u finalnoj (fiziološkoj) fazi zrenja .....	93
5.5.3. Kvantitativna analiza ukupnih karotenoida u plodu paprike primenom Ramanove spektroskopije .....	100
6. Zaključci .....	105
7. Literatura.....	107
8. Prilozi.....	121
9. Biografija autora .....	148
Izjava o autorstvu.....	150
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije.....	151
Izjava o korišćenju .....	152

## 1. Uvod

Paprika (*Capsicum annuum* L.) pripada familiji Solanaceae i predstavlja jednu od najviše gajenih i korišćenih povrtarskih vrsta (Huang i sar., 2014). Rod *Capsicum* se sastoji od 22 divlje i 5 domestikovanih vrsta: *C. annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L. i *C. Pubescens* R. & P.

Plod paprike može varirati u boji, obliku i veličini, između i u okviru vrste. Boja zrelog ploda varira od bele do jarko crvene. Sa aspekta preferencije konzumenata, intenzitet boje, ukus, aroma, kao i stepen ljutine kod određenih vrsta, tj. sorti, navode se kao glavni atributi kvaliteta ploda (Arimboor i sar., 2015). Plodovi paprike različitih sorti, linija i populacija jasno se razlikuju u pogledu hemijskog sastava, uključujući količinu askorbinske kiseline (vitamin C), tokoferola, kao i tipova karotenoida i prisustva različitih flavonoida (Kim i sar., 2011). *C. annuum* i *C. frutescens* (čili paprika) su najviše korišćene vrste paprika u ishrani ljudi u svetu. Plodovi se mogu koristiti u svežem i osušenom stanju, zamrznuti, konzervisani ili prerađeni.

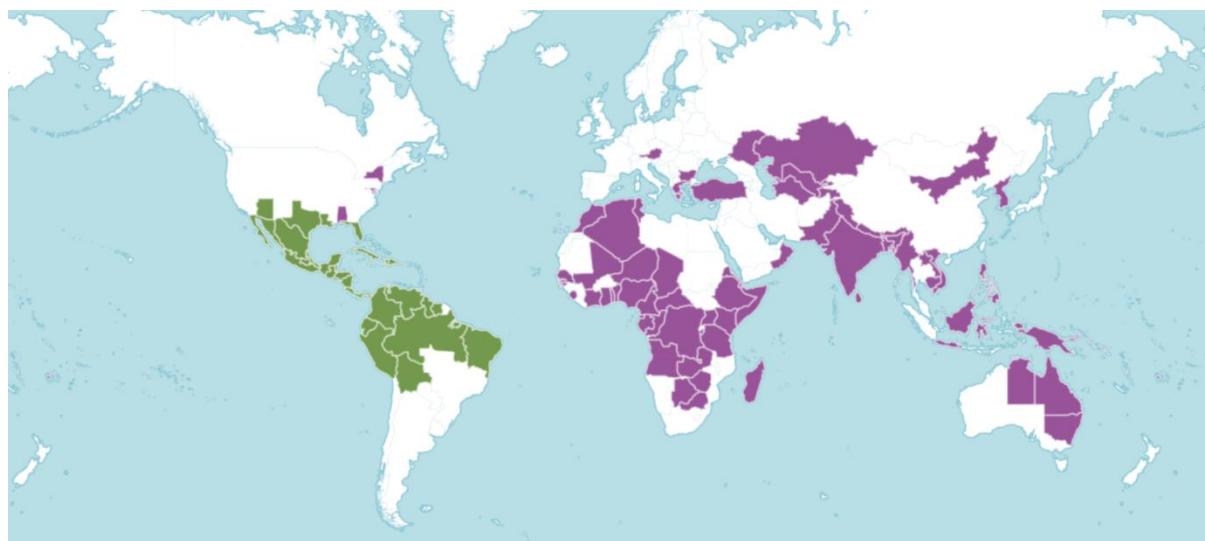
Zreli plodovi različitih sorti paprike su važan izvor karotenoidnih pigmenata zbog njihove visoke koncentracije (Mínguez-Mosquera i Fernández-Díez, 1981). Paprika je široko korišćena u sušenom i mlevenom stanju, ali su određeni tipovi karotenoida u tom proizvodu vrlo nestabilni. Brojne su fiziološke koristi koje daju karotenoidi.  $\beta$ -karoten, zajedno sa  $\alpha$ -karotenom i  $\beta$ -kriptoksaninom predstavlja izvor provitamina A. Studije su pokazale inverznu povezanost između nekih hroničnih oboljenja i unošenja karotenoida kroz ishranu. Istraživanja su pokazala da karotenoidi smanjuju oksidativni stres (Edge i sar., 1997), inhibiraju ćelije tumora (Maoka i sar., 2001) i štite od kardiovaskularnih bolesti (Voutilainen i sar., 2006) i pojave katarakte (Gale i sar., 2003). Metode za analizu karotenoida obuhvataju čitav spektar instrumentalnih metoda kao što su HPLC, HPTLC, LC-MS, UHPLC, NMR, FT-IR, NIR itd.

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je karakterizacija dominantnih karotenoida odabranih sorti i tradicionalnog proizvoda od paprike, ajvara. Tačnije, kvalitativno i kvantitativno određivanje dominantnih karotenoida kao što su  $\beta$ -karoten,  $\beta$ -kriptoksanin, lutein, zeaksantin i kapsantin. Pored navedenog, ispitivana je i antioksidativna aktivnost ekstrakata svežih paprika i tradicionalnog proizvoda primenom različitih testova, kao i biološki efekti ekstrakata na nivou uticaja ekstrakata na aktivnost enzima  $\alpha$ -amilaze i tirozinaze. Metoda statičke *in vitro* gastrointestinalne digesitije primenjena je u cilju određivanja biodostupnosti karotenoida iz različitih karotenoidnih matriksa (sveže paprike i ajvara). Primenom Ramanove spektroskopije i odabranih hemometrijskih metoda, analizirani su i upoređivani rezultati sa onima dobijenim primenom standardne analitičke metode (HPTLC) u cilju adekvatne kvalitativne i kvantitativne determinacije dominantnih karotenoida. Ramanova spektroskopija u kombinaciji sa hemometrijom korišćena je i u cilju klasifikacije ispitivanih sorti paprike kao i za određivanje faze zrelosti plodova paprike.

## 2. Pregled literature

### 2.1. Poreklo i istorijat paprike

Centar porekla paprike je američki kontinent (Centralna i Južna Amerika) dok je u ostale krajeve sveta introdukovana (**Slika 1**). Drevne civilizacije Maja i Asteka su papriku koristile kao hranu, lek pa čak i kao valutu (DeWitt i Paul., 2009). Domestifikacija paprike se verovatno desila na teritoriji današnjeg Meksika pre oko 6.000 godina, te ona predstavlja jednu od prvih kultivisanih vrsta na prostoru američkog kontinenta (Heiser i Smith, 1953; Perry i Flannery, 2007).



**Slika 1.** Centar porekla paprike █ Prostor gde je paprika introdukovana █ Preuzeto od <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:316944-2#distributions>

Kada je Kristofor Kolumbo stigao do Kariba 1492. godine, naišao je na čili paprike, sakupio ih i preneo u Evropu. Odatle se biljka proširila u druge delove sveta, uključujući Afriku, Aziju i ostatak Amerike (Pickersgill, 1997). Peter Martyr je 1493. godine zabeležio da domoroci iz Novog sveta gaje izvesnu biljku koja ima oštijii miris i ukus nego začin sa Kavkaza (biber) (Matire d', 1944). Kasnije je ta biljka nazvana capsicum, a nakon toga je taj naziv prihvaćen i od strane Karla Linea koji je celom rodu dao taj naziv (Heiser i Smith, 1953). Poreklo reči capsicum nije tačno definisano. Smatra se da potiče od latinske reči "capsa" što znači kutija, a najverovatnije jer je oblik ploda podsećao na kutiju (Quattrocchi, 2017).

Slatka paprika takođe potiče iz Centralne i Južne Amerike. Prvi varijeteti slatke paprike su počeli da se stvaraju i razvijaju početkom 20. veka kroz procese oplemenjivanja u Evropi i Sjedinjenim Američkim Državama. Prva komercijalna sorta je Kalifornijsko čudo (eng. California Wonder) stvorena u Kaliforniji 1920. godine (Wahyuni i sar., 2011). Od tada, slatka paprika postaje veoma popularna u različitim nacionalnim kuhinjama širom sveta (Moyer, 2011).

## **2.2. Sistematski položaj gajenih vrsta roda *Capsicum* L.**

Familija Solanaceae obuhvata preko 100 rodova i oko 2900 vrsta. U flori Srbije se nalazi 10 rodova sa 20 vrsta. Rod *Capsicum* je jedan od ekonomski najznačajnijih rodova ove familije.

**Taksonomska klasifikacija gajenih vrsta paprike može se predstaviti na sledeći način:**

Carstvo (Regnum) biljaka (Plante)  
Odeljak (Phylum) semenice (Spermatophyta)  
Pododeljak (Subphylum) skrivenosemenice (Angiospermae)  
Klasa (Cassis) dikotile (Dicotyledoneae)  
Podklasa (Subclassis) Asteridae  
Red (Ordo) Scrophulariales (Solanales)  
Familija (Familia) Solanaceae  
Rod (Genus) *Capsicum*

Rod *Capsicum* L. obuhvata oko 25 divljih i 5 domestifikovanih vrsta i to (Jarret & Dang, 2004):

- *Capsicum annuum* L.
- *Capsicum futescens* L.
- *Capsicum baccatum* L.
- *Capsicum pubescens* R. & P.
- *Capsicum chinense* Jacq.

Najveći privredni značaj i najveće rasprostranjenje svakako ima vrsta *Capsicum annuum* koja sa klasificuje u tri velike grupe (Popović, 2000):

### **1. *Capsicum annuum* L. ssp. *macrocarpum* – krupnoplodne**

Grupa varijeteta GROSSUM – loptasto-ovalnog oblika

var. dolma – babure

var. rotunda – rotunde

var. cordatum – sročlike

Grupa varijeteta LONGUM – konusni, oblika kapije (kanije) i roga

### **2. *C.a. ssp. microcarpum* – sitnoplodne**

Grupa varijeteta SHIPCA – šipke

var. accuminatum – feferone

var. conoides – obične šipke

var. fusiformis – plodovi vretenastog oblika

var. abbreviatum – plodovi sa zaobljenim vrhom

Grupa varijeteta CERASIFORME – trešnjolike

### **3. *C. a. ssp. fasciculatum* – ukrasne**

## **2.3. Proizvodnja paprike u svetu i kod nas**

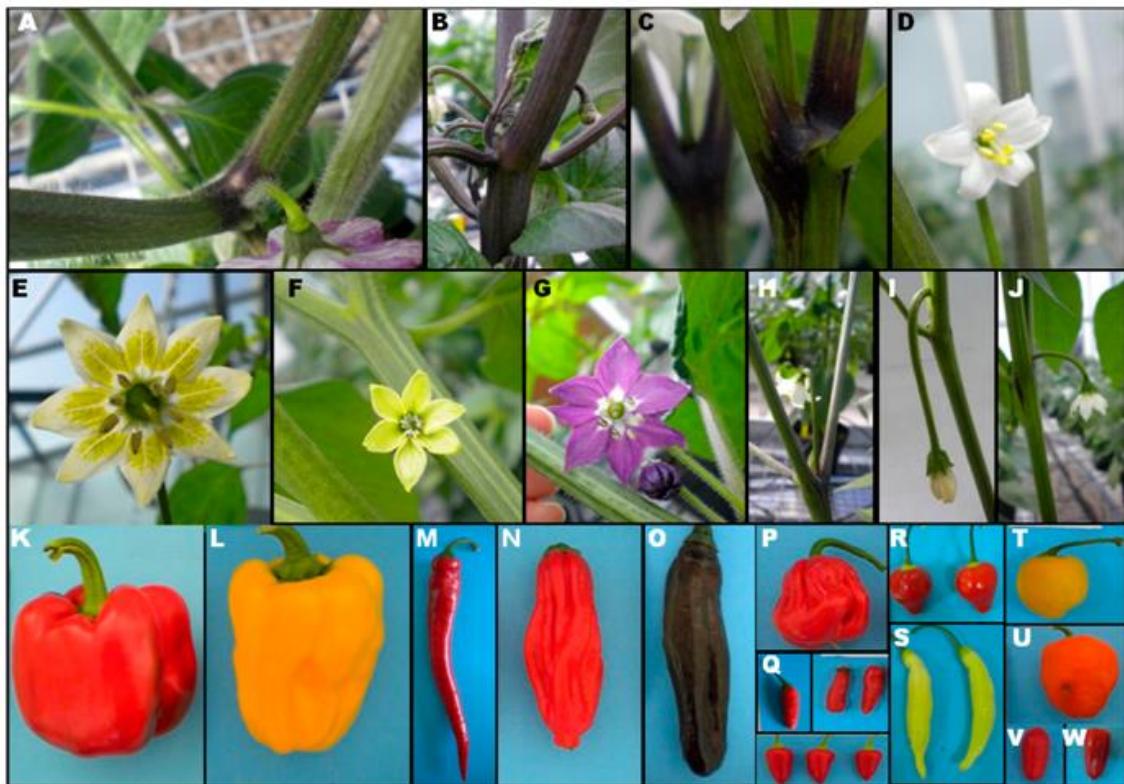
U zavisnosti od opštih i organoleptičkih karakteristika, plod paprike se klasificuje kao slatka paprika i ljuta paprika. Generalno, slatka paprika je karakteristična za severnu hemisferu, dok se ljuta paprika više konzumira u tropskim i suptropskim regionima. Paprika se u svetu gaji na oko 2 miliona hektara a najveća proizvodnja i prinosi su zabeleženi u Kini (oko 16,7 miliona tona), Turskoj (3,1 miliona tona) i Meksiku (oko 2,58 miliona tona). U R. Srbiji, prema FAO, u 2021. godini ukupna proizvodnja paprike iznosila je 135 hiljada tona (**Slika 2**).

**Slika 2.** Prinos paprike u tonama u 2022. godini prema FAO (<https://www.fao.org/food-agriculture-statistics/en/>)

Najčešće gajene sorte slatke paprike u svetu su Kalifornijsko čudo, Seged, Kaloča, Banana Pepper i Alma. Kalifornijsko čudo je jedna od najpopularnijih sorti slatke paprike u svetu koja se karakteriše krupnim plodovima po tipu babure i blagim ukusom. Segedinska i kaločka paprika predstavljaju dve najčešće gajene sorte u Mađarskoj i obuhvataju oko 40% ukupne proizvodnje paprike u toj zemlji. Karakterišu se crvenom bojom i slatkim ukusom i predstavljaju neizostavan deo mađarske kuhinje. Banana paprika se odlikuje plodom u obliku banana. U fazi tehnološke zrelosti je žute boje dok je u punoj zrelosti crvene. Plodovi su mesnati i koriste se kako za svežu upotrebu tako i za pripremu zimnice. Sorta Alma predstavlja nisku sortu koja pripada obliku babura, tankog perikaprpa i smatra se najboljom sortom za pravljenje mlevene paprike (<https://www.skyscrapercity.com/threads/kalocsa-baja-2020.2281740/>).

## **2.4. Botaničke osobine paprike (*Capsicum annuum* L.)**

Paprika predstavlja jednogodišnju zeljastu biljku koju karakteriše uspravan rast, varijabilnost u visini stabla, boji lista kao i boji i obliku ploda . Raznolikost u pogledu vegetativnih i generativnih organa kao i ploda paprike doprinela je širokoj fenotipskoj raznolikosti u okviru roda *Capsicum* (**Slika 3**) (Tripodi i Greco, 2018).



**Slika 3.** Varijabilnost u pogledu morfoloških osobina vegetativnih organa, cvetova i plodova. Pubescencija stabljike kod *C. pubescens* (A); ljubičasta boja stabljike kod *C. chinense* (B); nodalni antocijanin u *C. annuum* (C); cvet *C. chacoense* sa belom krunicom i žutim prašnicima (D); cvet *C. baccatum* sa tipičnim pegama (E); žuta krunica kod *C. frutescens* (F); *C. pubescens* cvet (G); uspravan položaj cveta kod *C. annuum* (H); padajući položaj cveta kod *C. annuum* (I); polupadajući položaj cveta kod *C. annuum* (J); kockasti crveni plodovi slatke paprike *C. annuum* (K); kockasti žuti plodovi slatke paprike *C. annuum* (L); plod u obliku roge začinske paprike *C. annuum* (M); *C. chinense* plodovi (N–P); *C. frutescens* plodovi (K); *C. baccatum* var. *baccatum* plodovi (R); *C. baccatum* var. *pendulum* plodovi(S); žuti plodovi *C. pubescens* (T); narandžasti plodovi *C. pubescens* (U); *C. chacoense* plodovi (V); *C. annuum* var. *glabriusculum* plodovi (V) (Tripodi i Greco, 2018)

## Vegetativni organi paprike

### Koren

Koren je po tipu vretenasat, plitak, razgranat i ima relativno slabu usisnu moć usvajanja vode i mineralnih materija iz zemljišta kao i slabe regenerativne moći. Razvija se u površnskom sloju zemljišta i dužina može varirati od 30 cm (ako se biljke gaje iz rasada) do 100 cm (ako su biljke rasle iz direktnе setve).

### Stablo

Stablo je zeljasto, razgranato, visine do 100 cm, a pojedini hibridi mogu da porastu i do 2 m visine. Boja stabla je zelena, dok nodusi mogu biti obojeni antocijanom ljubičaste boje. Na poprečnom preseku stablo je okruglo ili petouogaono. Stablo gajene paprike je glatko i bez trihoma. Visina biljke zavisi od sorte i agroekoloških uslova gajenja, pa se stoga mogu razlikovati tri tipa paprike:

- Niska – niža od 50cm,
- Srednje visoka - 50 do 70cm,
- Visoka - viša od 70cm

## List

Kotiledoni listovi su uski, lancetasti, glatki, bez dlačica i po obodu celi. Pravi listovi su prosti, celi ili lučno nazubljeni po obodu, asimetrični, od široko ovalnog do ovalno lancetastog oblika. Sitnoplodne sorte imaju manje listove na dužim drškama, a krupnoplodne imaju šire lisne ploče i kraće lisne drške. Veličina lista je u pozitivnoj korelaciji sa krupnoćom ploda. Površina lista je glatka, mada može kod pojedinih sorata biti izražena maljavost. Boja listova je zelena (od svetle do tamne nijanse), ređe ljubičasta.

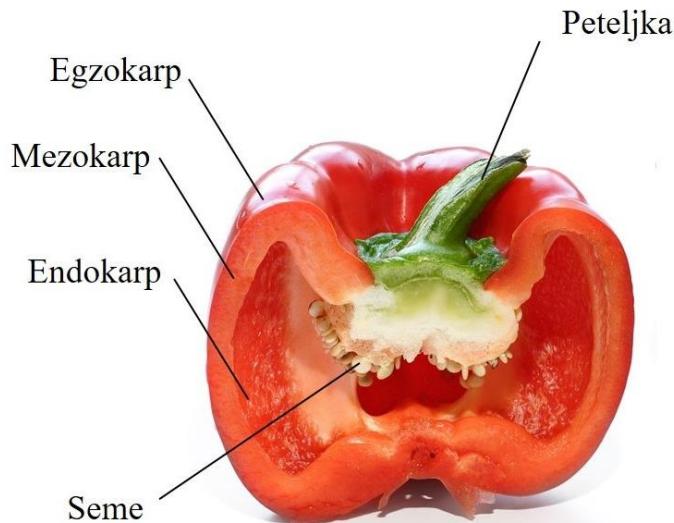
## Reprodukтивni organi paprike

### Cvet

Cvetovi su dvopolni, pojedinačni ili 2 do 3 u grupi na kratkim drškama grade grozdaste cvasti. Cvetovi su dvopolni, imaju 5 do 7 čašičnih listića, 5 do 7 kruničnih, najčešće belih ili ljubičasto obojenih, 5 do 7 ljubičastih prašnika. Plodnik je nadcvetan sa 3 do 5 okaca, nastao strastanjem dva oplodna listića (karpela). Paprika je samooplodna biljka, ali je moguća stranooplodnja i do 50%.

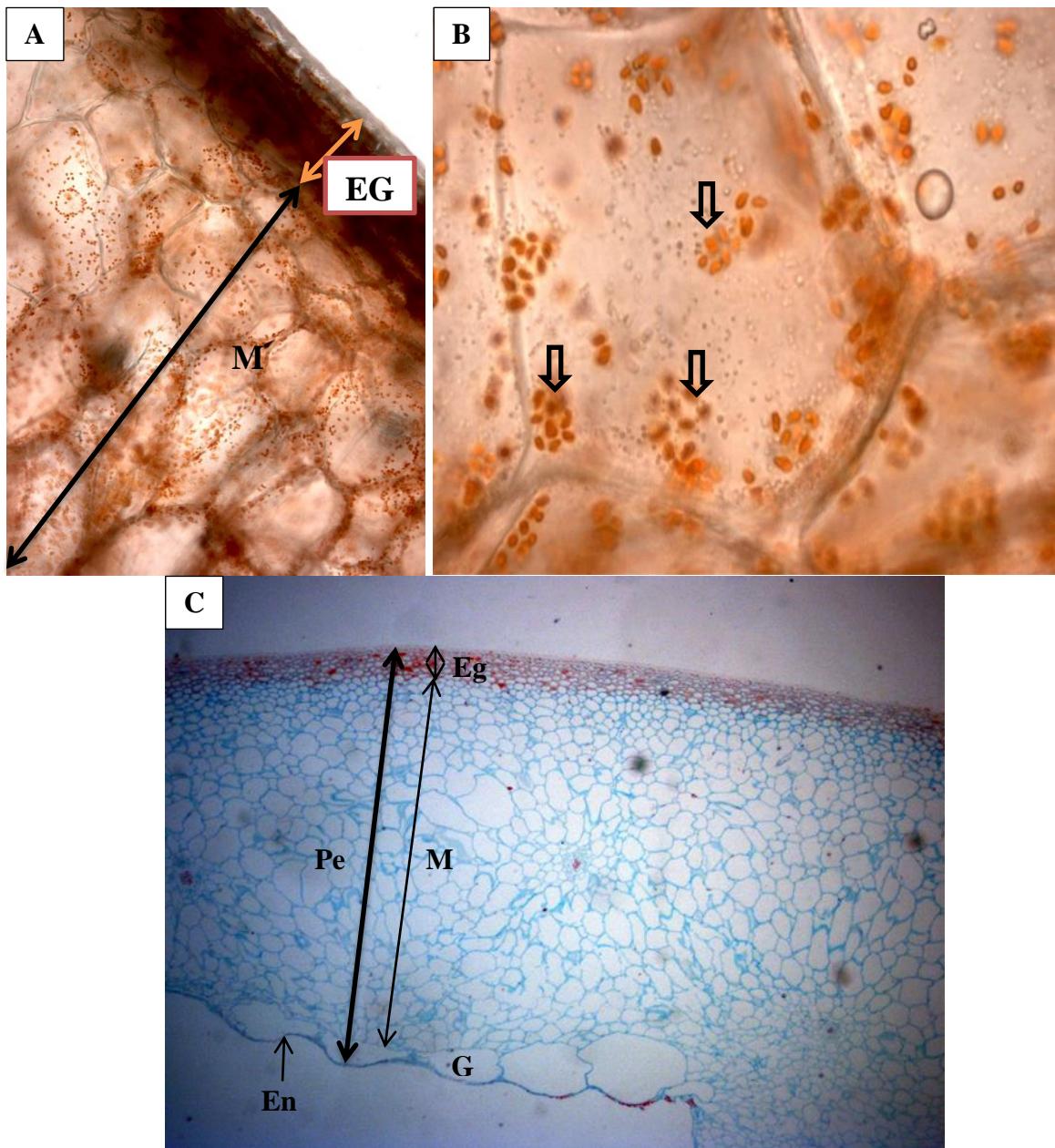
### Plod

Plod je šuplja bobica, sa 3 do 5 semenih komora. Na poprečnom preseku ploda paprika razlikuju se egzokarp, mezokarp i endocarp (**Slika 4**).



**Slika 4.** Presek ploda paprike

Egzokarp je građen od jednoslojnog epidermisa, zabebljalih spoljašnjih tangencijalnih zidova, prekrivenog kutikulom i hipodermalnog kolenhima kao i kod ploda paradajza. Ispod egzokarpa se nalazi veliki broj slojeva parenhimskih ćelija mezokarpa bogatih hromoplastima (**Slika 5A i 5B, pokazani strelicama**), često i kapljicama ulja i jednoslojnog endokarpa koji gradi kesasta ispupčenja u unutrašnjost ploda, poznatija kao gigantske ćelije (**Slika 5C**). Gigantske ćelije dosežu širinu 1 mm i više a razdvojene su jedna od druge grupacijom sitnih parenhimskih ćelija koje su poznate kao mostovi. Ćelije koje ograničavaju gigantske ćelije ka samoj unutrašnosti ploda su sa jako lignifikovanim ćeljskim zidovima a pripadaju epidermalnom tkivu (Weryszko-Chmielewska i Michałojé, 2012) (**Slika 5C**). Provodni snopići su postavljeni u centralnom delu mezokarpa, svi zajedno grade jedan prsten rasprostranjenja provodnih snopića (**Slika 5C**).



**Slika 5.** Poprečni presek ploda paprike. Pe-perikarp, EG-egzokarp, EN-endokarp, M- mezokarp, G- gigantske ćelije

## 2.5. Proizvodnja paprike

U našoj zemlji se paprika uglavnom proizvodi iz rasada, osim industrijske paprike koja se prozvodi prevashodno direktnom setvom semena. Proizvodnja se obavlja na otvorenom polju ili u zaštićenom prostoru.

Kada je u pitanju gajenje paprike na otvorenom polju, za radnu proizvodnju, setva rasada se obavlja početkom februara, rasađuje se krajem aprila ili početkom maja, dok berba počinje u drugoj polovini juna. Sa druge strane, srednje rana setva rasada počinje sredinom marta, rasađivanje je od sredine do kraja maja, a berba počinje od sredine jula. Kasna proizvodnja paprike počinje setvom rasada krajem marta i početkom aprila, rasađivanje je krajem maja i početkom jula, a prva berba počinje krajem avgusta i početkom septembra.

Setva rasada za gajenje u zaštićenom prostoru počinje uglavnom od 10. februara do 01. marta, rasađivanje je od 15. aprila do 10. maja, dok je početak berbe 15. juna. Sa druge strane, setva rasada za gajenje na otvorenom polju počinje od 15.-25. marta, rasađivanje je u periodu od 15.- 25. maja, dok berba počinje 15. jula. Ukoliko se paprika proizvodi direktnom setvom (u slučaju industrijske paprike), optimalan rok setve je sam početak aprila.

## 2.6. Proizvodi od paprike

Paprika je veoma poznata među potrošačima u svetu zbog svoje raznovrsnosti u boji ploda (crvena, žuta, zelena i narandžasta), obliku kao i u fitohemijskom sastavu koji uključuje, pre svega, vlakna (ugljene hidrate), askorbinsku kiselinu, tokoferol, karotenoide i flavonoide (Kim i sar., 2011).

*C. annuum* i *C. frustecens* su najviše korišćene vrste u ishrani ljudi u svetu. Plodovi se mogu koristiti u svežem stanju, a mogu se zamrznuti, konzervirati, sušiti ili kiseliti. Od zrelih crvenih plodova može se kuvati pekmez koji ima intenzivniju aromu od mlevene začinske paprike i koristi se kao začin za jela.

Plod se takođe obraduje određenim tehnološkim procesima i na taj način se dobijaju fermentisani proizvodi kao što su prahovi, sosevi i sredstva za bojenje. Pasta od paprike predstavlja popularni mađarski proizvod koji se koristi kao dodatak prilikom pravljenja sendviča, roštilja i supa. Paprika je takođe dodatak tradicionalnom mađarskom sušenom mesu Salami. Ulje dobijeno iz semena je jestivo i koristi se kao sredstvo za poboljšanje arome i kao začin (<https://www.thehungarianpaprika.hu/en/products/>).

U Španiji je paprika veoma popularna, a najznačajniji tradicionalni proizvod od slatke paprike je španska dimljena slatka paprika, poznata kao „Pimenton de la Vera“. Ovaj proizvod je popularan širom Mediterana, a ukus ove paprike doprinosi autentičnosti tradicionalnim španskim jelima. Dimljena slatka paprika se dobija tako što se sveže paprike dime nekoliko nedelja na hrastovoj vatri ([https://es.wikipedia.org/wiki/Piment%C3%B3n\\_de\\_la\\_Vera](https://es.wikipedia.org/wiki/Piment%C3%B3n_de_la_Vera)).

Čili u obliku praha ili paste je osnovni sastojak karija. Fermentisane slatke paprike ("torshi felfe") se proizvode u zapadnoj Aziji i Africi. Paprike koje su namenjene za prodaju u marketima, kao što su babure, cuban i squash, obično nemaju jak i oštar miris i ukus, te se stoga mogu jesti sirove, ili se od njih spravlja neki kulinarski proizvod. Na području Balkana, tako i u Srbiji, od crvenih paprika prave se proizvodi u kategoriji tzv. zimnice, kao što su marinirana parika, ajvar i ljutenica. U Vojvodini i okolini Leskovca se uglavnom gaje paprike od kojih se spravlja suva i mlevena, tzv. aleva paprika.

## 2.7. Nutritivna vrednost i hemijski sastav ploda paprike

Hemijski sastav i nutritivna vrednost paprike varira i zavisi, pre svega, od vrste i sorte, uslova gajenja, vremenskih uslova kao i faze sazrevanja (boje). Visoka nutritivna i biološka vrednost paprike ogleda se u značajnom sadržaju ugljenih hidrata, belančevina, biljnih vlakana, ulja, organskih kiselina, mineralnih materija, vitamina, pigmenata, i etarskih ulja. Nutritivna vrednost jestivog dela sirove zelene, crvene i žute paprike u 100 g zasnovana na podacima USDA iz 2012. godine je data u **Tabeli 1**.

**Tabela 1.** Nutritivne vrednosti sveže zelene, žute i crvene paprike (*Capsicum annum*) u 100g sveže paprike (USDA, 2012)

Hemijski sastav		Boja paprike		
		Zelena paprika	Crvena paprika	Žuta paprika
Voda (g)	93,89	92,21	92,02	
Energija (kcal)	20,00	31,00	27,00	
Proteini (g)	0,86	0,99	1,00	
Ukupni lipidi (g)	0,17	0,30	0,21	
Pepeo (g)	0,43	0,47	0,45	
Ugljeni-hidrati (g)	4,64	6,03	6,32	
Ukupna dijetna vlakna (g)	1,70	2,10	0,9	
Ukupni šećeri (g) (monosaharidi i oligosaharidi sa do 10 monomernih jedinica)	2,40	4,20	0,0	
Saharoza (g) (disaharid)	0,11	0,00	nd	
Glukoza (g) (monosaharid)	1,16	1,94	nd	
Fruktoza (g) (monosaharid)	1,12	2,26	nd	
Minerali	Ca (kalcijum) (mg)	10,00	7,00	11,00
	Fe (gvožđe) (mg)	0,34	0,43	0,46
	Mg (magnezijum) (mg)	10,00	12,00	12,00
	P (fosfor) (mg)	20,00	26,00	24,00
	K (kalijum) (mg)	175,00	211,00	212,00
	Na (natrijum) (mg)	3,00	4,00	2,00
	Zn (cink) (mg)	0,13	0,25	0,17
	Cu (bakar) (mg)	0,066	0,017	0,107
	Mn (mangan) (mg)	0,122	0,112	0,117
	Se (selen) (µg)	0,00	0,10	0,30
	F (fluor) (µg)	0,30	Nd	nd
Vitamini	Vitamin C (mg)	80,40	127,70	183,50
	Tiamin (mg)	0,057	0,054	0,028
	Riboflavin	0,028	0,085	0,025
	Niacin (mg)	0,480	0,979	0,890
	Pantotenska kiselina (Vitamin B) (mg)	0,099	0,317	0,168
	Vitamin B6 (mg)	0,224	0,291	0,168
	Ukupni folati (mg)	10,00	46,00	26,00
	Ukupni holini (mg)	5,50	5,60	0,00
	β-karoten (µg)	208,00	1624	12,00
	*kapsantin	4,50	479	15,36
	α-karoten (µg)	21,00	20,00	nd
	β-kriptoksansatin (µg)	7,00	490,00	nd
	lutein+zeaksantin (µg)	341,00	51,00	nd
	Vitamin E (α-tokoferol) (mg)	0,37	1,58	0,00
	β-tokoferol	0,00	0,05	0,00
	γ-tokoferol	0,00	0,14	0,00
	δ-tokoferol	0,00	0,01	0,00
	Vitamin K (filohinon) (µg)	7,40	4,90	0,00
Lipidi	Ukupne zasićene masne kiseline (g)	0,058	0,027	0,031
	Palmitinska kiselina 16:0 (g)	0,050	0,025	nd
	Stearinska kiselina 18:0 (g)	0,08	0,02	nd
	Ukupne mononezasićene masne kiseline (g)	0,08	0,003	nd
	Palmitoleinska kiselina 16:1 (g)	0,01	0,00	nd
	Oleinska kiselina 18:1 (g)	0,08	0,02	nd
	Ukupne polinezasićene masne kiseline (g)	0,062	0,070	nd
	Linolna kiselina 18:2 (g)	0,054	0,045	nd

	Linoleinska kiselina 18:3 (g)	0,08	0,025	nd
Steroli	Fitosteroli (mg)	9,00	Nd	nd
Aminokiseline	Triptofan (g)	0,012	0,012	0,013
	Treonin (g)	0,036	0,040	0,037
	Izoleucin (g)	0,024	0,021	0,032
	Leucin (g)	0,036	0,036	0,052
	Lizin (g)	0,039	0,036	0,044
	Metionin (g)	0,007	0,006	0,012
	Cistin (g)	0,012	0,019	0,019
	Fenilalanin (g)	0,092	0,050	0,031
	Valin (g)	0,036	0,031	0,042
	Arginin (g)	0,027	0,036	0,048
	Histidin	0,010	0,017	0,020
	Alanin	0,036	0,026	0,041
	Asparaginska kiselina	0,208	0,284	0,143
	Glutaminska kiselina	0,194	0,211	0,132
	Glicin	0,030	0,028	0,037
	Prolin	0,024	0,024	0,044
	Serin	0,054	0,050	0,040

\*( Kim i sar., 2009)

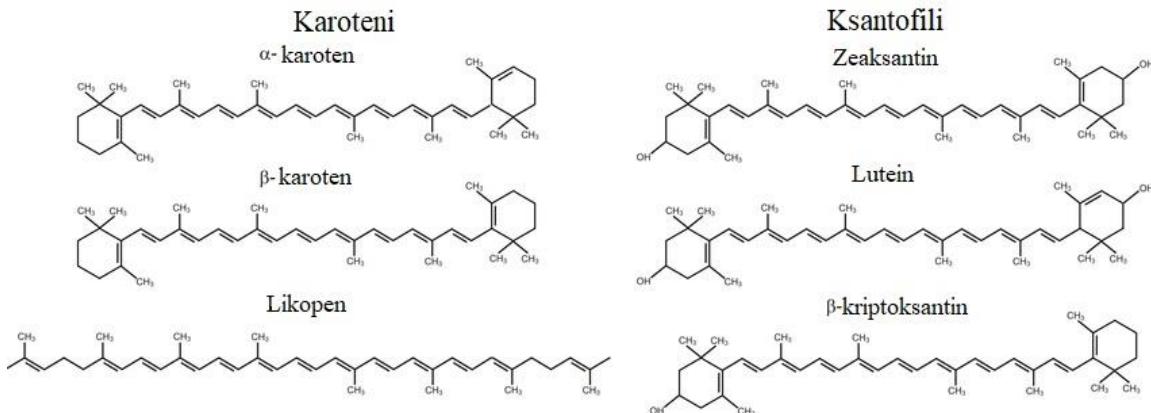
## 2.8. Vrste karotenoida u biljkama

Karotenoidi predstavljaju veliku i značajnu grupu sekundarnih metabolita biljaka koji daju žutu, crvenu i narandžastu boju cvetovima, plodovima, semenu, pojedinim korenovima i listovima. Do sada je identifikovano više od 1000 različitih karotenoida, od čega je oko 500 u potpunosti okarakterisano sa aspekta fizičko-hemijskih karakteristik (von Lintig i sar., 2020). U ishrani ljudi prisutno je uglavnom oko 40 različitih karotenoida (Langi i sar., 2018; von Lintig i sar., 2020).

Karotenoidi u biljkama predstavljaju tetraterpenska jedinjenja sastavljena iz osam C<sub>5</sub> izoprenskih jedinica koje su povezane sistemom „glava-rep“, izuzev centralnog dela gde su povezane sistemom „rep-rep“, što im daje obeležje simetričnosti. Niz konjugovanih dvostrukih veza u kojima su  $\pi$  elektroni delokalizovani, omogućava pojavu hromofore koja apsorbuje svetlost određenih talasnih dužina i, samim tim, omogućava da karotenoidi poseduju relativno širok spektar boja. Pored toga, upravo taj sistem konjugovanih dvostrukih veza čini takve molekule podložnim geometrijskoj izomerizaciji i oksidativnoj degradaciji (Rodríguez-Amaya, 2016).

Molekul karotenoida je u osnovi sačinjen od linearног lanca koji se sastoji od lateralnih (bočnih) metil grupa koje su međusobno odvojene sa po šest ugljenikovih atoma u centru molekula. Veliki broj karotenoida nastaje zahvaljujući strukturnim promenama koje uključuju uvođenje kiseonika u vidu hidroksilne, epoksi, keto ili aldehidne grupe. Pored toga, promene mogu nastati migracijom dvostrukih veza, ciklizacijom, skraćivanjem ili izduživanjem lanca ili kombinacijom navedenih promena. Karotenoidi mogu biti aciklični, ciklični sa jednim prstenom i ciklični sa dva prstena. Prstenovi su uglavnom šestočlani, osim kod kapsantina i kapsorubina gde su petočlani (Rodríguez-Amaya, 2016).

Molekuli karotenoida koji u svojoj strukturi imaju samo atome ugljenika i vodonika nazivaju se hidrokarbonski karotenoidi ili **karoteni** (npr.  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten i likopen). Sa druge strane, karotenoidi koji imaju kiseonik u vidu polarne funkcionalne grupe (hidroksilna, keto, epoksi ili aldehidna grupa) nazivaju se **ksantofili** (npr. lutein i zeaksantin) (Saini i sar., 2015) (**Slika 6**). Karotenoidi u kojima je lanac skraćen uklanjanjem delova molekula sa jednog ili oba kraja molekula nazivaju se **apokarotenoidi** (Felemban i sar., 2019).



Slika 6. Primeri nekih karotena i ksantofila (prema Borrelli i Trono, 2016)

### 2.8.1. Biosinteza karotenoida

Biosintetski put karotenoida u biljkama, odnosno neke njegove sekvence, otkiven je još šezdesetih godina 20. veka. Ova otkrića su bila bazirana na klasičnim biohemijskim procedurama koje su omogućile da se odrede intermedijerni i finalni proizvodi biosinteze.

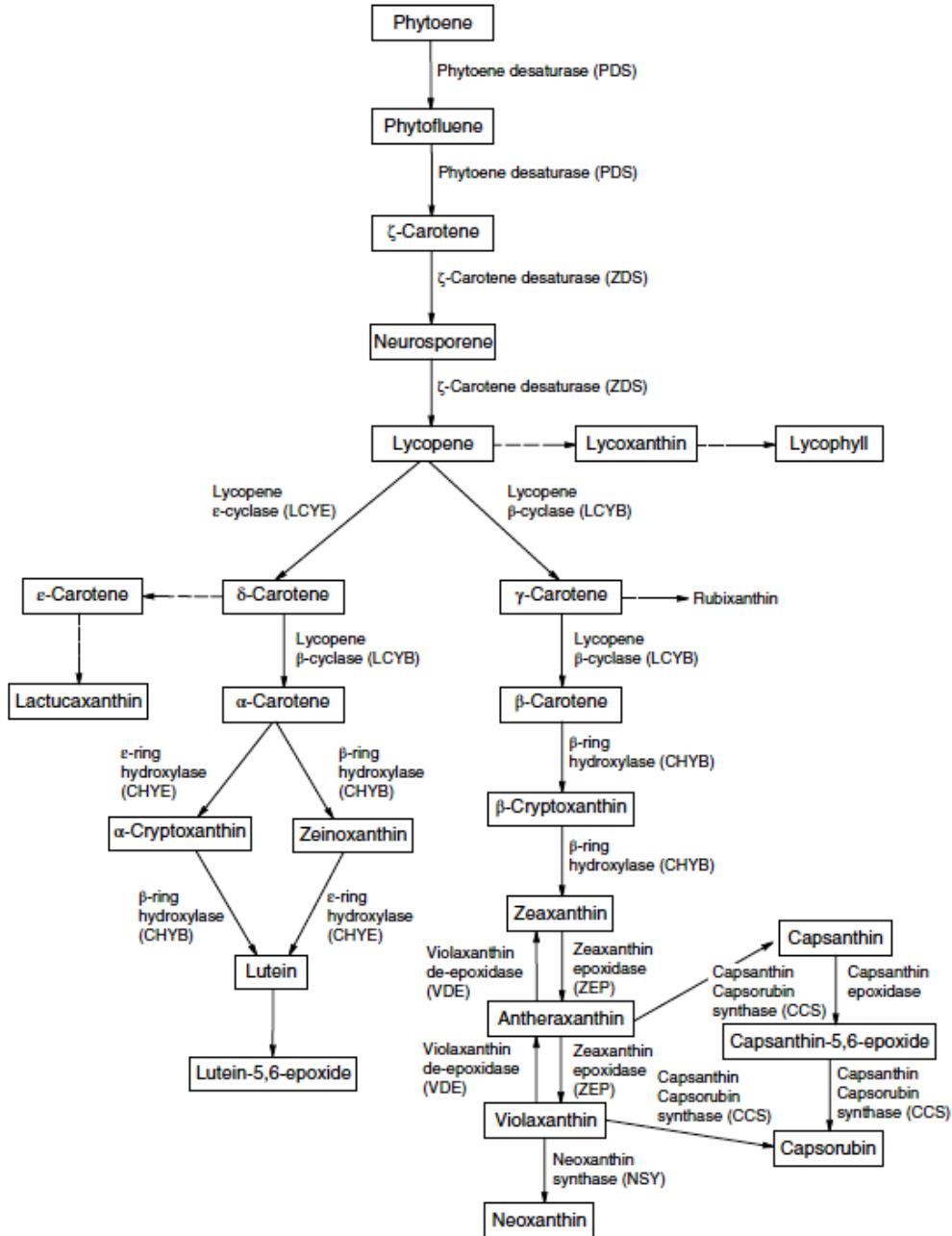
Biosinteza i transformacija karotenoida regulisana je tokom celokupnog života biljaka, što rezultira u značajnim promenama u količini i sastavu karotenoida u različitim vegetativnim i generativnim organima tokom ontogeneze, zavisno od potreba same vrste, kao i uslova spoljašnje sredine (Sankari i sar., 2018).

Pokušaji da se razjasne, odnosno odrede pojedinačni enzimi uključeni u biosintezu i transformaciju karotenoida, dugo su bili bezuspešni. Pre svega zato što su ovi membranski enzimi uglavnom prisutni u malim količinama i osetljivi su na rastvarače koji se koriste za njihovu ekstakciju (Simann, 2001). Devedesetih godina prošlog veka, uspešno kloniranje gena odgovornih za biosintezu karotenoida (od prvih karotenoida u biosintezi, pa do najsloženijih i najdominantnijih), omogućilo je njihovu karakterizaciju i bolje razumevanje karotenogeneze na molekularnom nivou (Cunningham i Gantt, 1998). Karrenoide mogu snitetistati *de novo* fotosintetičke bakterije, neke vrste gljiva, alge i biljke. Životinje ih ne mogu sintetisati i stoga ih moraju unositi direktno, putem ishrane.

Danas je biosinteza karotenoida dobro proučena, uključujući i enzime odgovorne za različite sekvence u biosintetskom putu (Fraser i Bramley, 2004; Bouvier i sar., 2005; Domonkos i sar., 2013). U višim biljkama, karotenoidi se sintetišu u plastidima uz pomoć enzima čija je ekspresija regulisana jedarnom DNK. Biosinteza karotenoida se može podeliti u pet glavnih faza. Najranije faze se sastoje od formiranja izopentil difosfata (IPP) i elongacije lanca do geranilgeranil difosfata (GGDP) i formiranja fitoena. Kasnije etape se sastoje od:

1. Desaturacije fitoena do likopena
2. Ciklizacije neurosporena ili likopena i
3. Formiranje ksantofila.

Rane faze, do GGDP, su zajedničke u biosintezi svih izoprenoidnih jedinjenja. Prvi specifičan korak za karrenoide je kondenzacija dva molekula GGDP do fitoena, prvog C<sub>40</sub> karotenoida u biosintetskom putu (Rodriguez-Amaya, 2016). Kasnije etapa biosinteze podrazumevaju promene fitoena do likopena se koji uz pomoć enzima dalje transformiše do β-karotena, β-criptoksiantina, luteina kapsantina, kapsorubina i dr. (Slika 7).



Slika 7. Etape biosinteze karotenoida počev od fitoena (prema Rodriguez-Amaya, 2016)

### 2.8.2. Biljke bogate karotenoidima

Najveće izvore karotenoida predstavljaju biljke, odnosno voće i povrće, kao što su repa šargarepe, krtola slatkog krompira, plodovi breskve, kajsije, paradajza, pomorandže, tikve, paprike i mnoge druge vrste. Generalno, boja i intenzitet boje ploda može dati informaciju o tipu karotenoida i njegovojoj koncentraciji (Prakash i Sharma, 2014). Žutonarandžasto voće i povrće je bogato  $\beta$ -karotenom i često ksantofilima, dok kriptoksanthin i zeaksantin mogu biti u većoj količini prisutni u narandžastim plodovima (Saini i sar., 2015). Lutein i zeaksantin su prisutni u zelenom i tamno zelenom lisnatom povrću, dok su crveno obojeni paradajz i lubenica bogati likopenom (Del Campo i sar., 2007). Tamno crvena boja paprike u vezi je sa većom količinom kapsantina ( Kim i sar., 2016).

Sadržaj i tip karotenoida svakako su zavisi od genotipa, sorte, faze sazrevanja, gajenja, klimatskih uslova kao i posle žetvene tehnologije i prerade (Saini i sar., 2015). Međutim, najveći uticaj na kompoziciju i dominaciju određenih karotenoida ima genotip, tj. sama biljna vrsta. U **Tabeli 2** su prikazane jestive biljke bogate u karotenoidima, na nivou koncentracije najzastupljenijih karotena, odnosno ksantofila (minimum 1 i maksimum 5 dominantnih karotenoida). Najčešći karotenoidi su:  $\beta$  karoten (kod 33 od 43 prikazane vrste), lutein (kod 16 vrsta) i zeaksantin (kod 14 vrsta). Među manje čestim karotenoidima javljaju se mutoksantin, pikrokrocin, sapoteksantin, neurosporen i mimulaksantin kod

**Tabela 2.** Najdominantniji karotenoidi u biljkama (prema Kolašinac i sar., 2022)

Ime vrste	Familija	Narodni naziv	Dominantni karotenoid (karotenoidi)	Referenca
<i>Aiphanes aculeata</i> Willd.	Arecaceae	Bodljikava palma	Zeaksantin	(Murillo i sar., 2010)
<i>Daucus carota</i> L.	Apiaceae	Mrkva	$\beta$ -karoten $\alpha$ - karoten $\gamma$ - karoten Lutein 15-cis- $\beta$ - karoten	(Heinonen, 1990)
<i>Averrhoa carambola</i> L.	Oxalidaceae	Karambola	Fitofluen $\zeta$ - karoten $\beta$ -kriptoflavin Mutatoksantin	(Gross i sar., 1983)
<i>Brassica rapa</i> L.	Brassicaceae	Repa	$\beta$ - karoten Lutein	(Jung i sar., 2014)
<i>Capsicum annuum</i> L.	Solanaceae	Paprika	Kapsantin $\beta$ - karoten $\beta$ -kriptoksantin Zeaksantin Kapsorubin	(Mohd Hassan i sar., 2019)
<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	Papaja	Likopen $\beta$ - karoten $\beta$ -kriptoksantin	(Schweiggert i sar., 2011)
<i>Citrullus vulgaris</i> Schrad.	Cucurbitaceae	Lubenica	$\beta$ - karoten Neoksantin Likopen Fitofluen Fitoen	(Zhao i sar., 2013)
<i>Citrus paradisi</i> Macfad.	Rutaceae	Grejpfrut	$\beta$ - karoten Likopen $\zeta$ - karoten Fitofluen	(Khan & Mackinney, 1953)
<i>Citrus reticulata</i> Blanco		Mandarina	Violaksantin $\beta$ - karoten $\alpha$ - karoten Lutein	(Xue i sar., 2012a)
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck		Narandža	$\beta$ -kriptoksantin $\alpha$ - karoten $\beta$ - karoten Neoksantin Fitoen	(MacLachlan & Mueller, 2012) (Lux i sar., 2019)
<i>Citrus unshiu</i> (Yu.Tanaka ex Swingle)		Miagava mandarina	$\beta$ -kriptoksantin Zeaksantin	(Ma i sar., 2016)
<i>Coffea arabica</i> L.	Rubiaceae	Kafa Arabika	$\beta$ - karoten $\beta$ -kriptoksantin Zeaksantin	(Simkin i sar., 2008)
<i>Coffea canephora</i> Pierre ex a Froehner		Kafa Robusta	$\beta$ - karoten $\beta$ -kriptoksantin	

<i>Crocus sativus</i> L.	Iridaceae	Šafran	Zeaksantin Krocin Safranal Pikrokrocin $\beta$ - karoten $\beta$ - karoten Zeaksantin Lutein	(Tarantilis i sar., 1998) (Medeiros i sar., 2020) (Kulczyński & Gramza-Michałowska, 2019)
<i>Cucumis melo</i> L.	Cucurbitaceae	Dinja	$\beta$ - karoten	(Medeiros i sar., 2020)
<i>Cucurbita maxima</i> Duchesne		Bundeva	$\beta$ - karoten	(Kulczyński & Gramza-Michałowska, 2019)
<i>Diospyros kaki</i> Thunb.	Ebenaceae	Kaki	Zeaksantin Kriptokapsin Likopen $\beta$ - karoten	(Brossard & Mackinney, 1963)
<i>Elaeis spp.</i> <i>Helianthus annuus</i> L.	Arecaceae Asteraceae	Uljna palma Suncokret	$\beta$ - karoten Lutein	(Ribeiro i sar., 2011) (Ohmiya, 2011)
				Anteraksantin
				Zeaksantin
				Violaksantin
<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.	Convolvulaceae	Batat	Lutein $\beta$ - karoten Zeaksantin $\alpha$ - karoten	(Kammona i sar., 2015)
<i>Lactuca sativa</i> L.	Asteraceae	Zelena salata	Lutein	(Cruz i sar., 2012)
				$\beta$ - karoten
<i>Lamium montanum</i> Pers.	Lamiaceae	Planinska mrtva kopriva	Mimulaksantin	(Buchecker & Eugster, 1980)
<i>Lycium barbarum</i> L.	Solanaceae	Godži	Zeaksantin $\beta$ -kriptokantsin $\beta$ -karteon	(Inbaraj i sar., 2008b)
<i>Lycium chinense</i> Mill.		Godži	$\beta$ - karoten $\alpha$ - karoten Lutein Zeaksantin Likopen	(Bunghez i sar., 2012)
<i>Mammea americana</i> L. <i>Mangifera indica</i> L.	Calophyllaceae Anacardiaceae	Američka mamea Mango	Apo-10'- $\beta$ -karotenol $\beta$ - karoten $\alpha$ - karoten Lutein	(Chacón-Ordóñez i sar., 2017) (Haque i sar., 2015)
<i>Oryza sativa</i> L.	Poaceae	Pirinač	Lutein $\beta$ - karoten	(J. K. Kim i sar., 2010)
<i>Panicum maximum</i> Jacq.		Kruonozrno proso	Zeaksantin Lutein 3-acetat	(Kusaba i sar., 2009)
<i>Passiflora edulis</i> Sims	Passifloraceae	Marakuja	Fitoen Fitofluen $\zeta$ - karoten	(Mercadante i sar., 1998)

<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	Pasulj	Neurosporen β- karoten β- karoten	(Lopez-Herniez i sar., 1993)
<i>Physalis alkekengi</i> L.	Solanaceae	Ljoskavac	Zeaksantin β-criptoktsantin Lutein β- karoten	(Wen i sar., 2017)
<i>Pleioblastus chino</i> (Franchet et Savatier) Makino	Poaceae	Bambus	Lutein 3-acetat	(Kusaba i sar., 2009)
<i>Polygonum</i> <i>hydropiper</i> L.	Polygonaceae	Vodení štavalj	Lutein β- karoten Likopen	(Mihaylova i sar., 2018)
<i>Pouteria sapota</i> (Jacq.) H. E. Moore & Stearn	Chrysophylloideae	Sapote	Sapoteksantin Kriptokapsin Kapsoneoksantin	(Chacón-Ordóñez i sar., 2017)
<i>Prunus domestica</i> L.	Rosaceae	Šljiva	β- karoten	(Vio-Michaelis i sar., 2020)
<i>Prunus armeniaca</i> L.	Rosaceae	Kajsija	β- karoten γ- karoten β-criptoktsantin	(Ruiz i sar., 2005)
<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch	Rosaceae	Breskva	β-criptoktsantin β- karoten	(Dabbou i sar., 2017)
<i>Prunus salicina</i> Lindl.	Rosaceae	Japanska šljiva	β- karoten	(Cuevas i sar., 2015)
<i>Rosa canina</i> L.	Rosaceae	Divlja ruaža	β- karoten Likopen	(Ghazghazi i sar., 2010)
<i>Solanum</i> <i>lycopersicum</i> L.	Solanaceae	Paradajz	Likopen Neoksantin Lutein α- karoten β- karoten	(Perveen i sar., 2015)
<i>Spinacia oleracea</i> L.	Chenopodiaceae	Spanać	β- karoten Lutein Violaksantin Neoksantin	(Bunea i sar., 2008)
<i>Vitis vinifera</i> L.	Vitaceae	Vinova loza	Lutein β- karoten Zeaksantin Violaksantin	
<i>Zea mays</i> L.	Poaceae	Kukuruz	β- karoten α- karoten β-criptoktsantin Lutein Zeaksantin	(Kurilich i Juvik, 1999)

### **2.8.3. Uloga karotenoida u fotosintezi i antioksidativna aktivnost**

Fotosinteza predstavlja najvažniji metabolički proces na Zemlji. Odvija se u biljkama i određenim fotosintetičkim organizmima, kao što su bakterije i alge. Krajnji produkt fotosinteze je hrana (glukoza) i kiseonik koji se koriste od strane organizama koji nemaju sposobnost fotosinteze. Hlorofil igra ključnu ulogu u apsorpciji svetlosti iz plavog i crvenog dela spektra, kao i za započinjanje procesa fotosinteze. U toku tog procesa, dolazi do eksitacije elektrona iz molekula hlorofila koji bivaju prihvaćeni od strane akceptora. Dalji proces se odvija transportom elektrona, odnosno nizom oksido-redukcionih reakcija koji kao rezultat imaju stvaranje NADPH, ATP i kiseonika (kao rezultat fotolize vode). Osim hlorofila, karotenoidi su pigmenti koji takođe imaju ulogu u fotosintezi. Zajedno sa molekulima hlorofila, oni predstavljaju komponente reakcionih centara fotosistema I i II (Fedor i sar., 2019). Tokom fotosinteze, karotenoidi apsorbuju i transportuju energiju svetlosti prema molekulima hlorofila. Naime, hlorofil *a* apsorbuje svetlost na 442 i 662 nm, dok hlorofil *b* apsorbuje na 453 i 642 nm. Karotenoidi, međutim, apsorbuju svetlost na talasnim dužinama na kojima hlorofili nisu u mogućnosti (na 460 i 550 nm) i na taj način povećavaju efikasnost apsorpcije, a samim tim i fotosinteze (Polívka & Frank, 2010). Na ovaj način, karotenoidi služe kao "produžena ruka" fotosintetičkom kompleksu hlorofila. Od ukupno blizu 1000 tipova karotenoida u prirodi, samo oko 50 učestvuje u fotosintetskoj aktivnosti kao sakupljači svetlosti (Polívka & Frank, 2010). Da bi obezbedili dobru pozicioniranost i efikasan transfer sunčeve energije, karotenoidi se na membranama nalaze u vidu kompleksa sa proteinima. U fotosistemu I preovladava  $\beta$ -karoten, dok u fostosistemu II dominira lutein (Demmig-Adams & Adams, 1996).

Pored uloge u fotosintezi, karotenoidi štite fotosisteme od pregrevanja (fotoprotективni efekat) i predstavljaju prekursore za biosintezu abscisinske kiseline (ABA) i strigolaktona (Cazzonelli, 2011; Hirschberg, 2001). Njihova fotoprotективna uloga ogleda se u sposobnosti da zaštite fotosintetički aparat od oštećenja koje može izazvati svetlost visokog intenziteta (Beverley i sar., 2003). Ukoliko hlorofil apsorbuje više energije nego što može da primi, postoji mogućnost od pregrevanja, narušavanja ravnoteže reakcija koje zavise od svetlosti i oštećenja fotosistema, dovodeći do stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. ROS – reactive oxygen species), kao što su singletni kiseonik ( $^1\text{O}_2$ ), superoksid anjon radikali ( $\text{O}_2^-$ ), hidroksil radikali ( $\cdot\text{OH}$ ) i vodonik peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Niyogi, 1999; Shen i sar., 2018). Proteini, lipidi i pigmenti koji se nalaze na membrani tilakoida mogu biti oksidovani posredstvom ROS, što dovodi do destrukcije fotosintetičkog aparata (Polívka & Frank, 2010). Zbog toga su biljke razvile tokom evolucije nekoliko foto-protectivnih strategija. Karotenoidi (posebno  $\beta$ -karoten) su ključni molekuli u tim strategijama (Braslavsky & Holzwarth, 2012). Tokom sunčeve radijacije,  $\beta$ -karoten, koji je vezan za reakcioni centar fotosistema I, transportuje elektron do fotosistema P680+ čime sprečava štetne oksidacione reakcije koje mogu da oštete fotosistem II (Hashimoto i sar., 2016). Istraživanja su pokazala da se količina singletnog oblika kisenika značajno povećava ukoliko se smanji broj molekula  $\beta$ -karotena za dvostruko (Telfer i sar., 1994). Da bi ispoljili foto-protectivni efekat na membranama tilakoida, karotenoidi moraju imati minimum 8 konjugovanih dvostrukih veza. Tokom biosinteze karotenoida i hlorofila i njihovog vezivanja za proteine, ovi kompleksi trebaju biti dobro izbalansirani da bi se ispunili fotosintetički zahtevi (Rodriguez-Amaya, 2016).

Pored  $\beta$ -karotena, zeaksantin je takođe poznat po svojoj fotoprotективnoj ulozi (Kress & Jahns, 2017). De-epoksidacija zeaksantina i violaksantina dovodi do promena u strukturi i osobinama ovih ksantofila, izazivajući strukturne promene na protein-pigmentnim kompleksima u hloroplastima (Choudhury & Behera, 2001).

ROS, posebno singletni kiseonik, koji se stvara tokom ekstra-optimalnih, tj. stresnih uslova, može oskidovati karotenoide, dovodeći do stvaranja različitih produkata - različitih aldehida, ketona, endoperoksida i laktona. Ovi proizvodi (npr. ispraljivi  $\beta$ -ciklocitral) su veoma reaktivne elektrofilne molekulske vrste (lako se redukuju) koje mogu izazvati promene u genskoj eksperesiji i dovesti do odgovora na stresne uslove (Havaux, 2014) putem minimiziranja efekata štetnih ROS molekula.

#### **2.8.4. Karotenoidi i adaptacije biljaka na uslove stresa**

Reakcija biljaka na neoptimalne uslove životne sredine podrazumeva ekspresiju brojnih mehanizama tolerancije, uključujući biosintezu i akumulaciju različitih antioksidativnih jedinjenja, među kojima i karotenoida. Karotenoidi su sposobni da deluju kao molekuli koji "gasite" (eng. quenchers ili scorchers) ROS, odnosno kao molekuli "rasipači" viška sunčeve energije koja može da ošteti membrane (Uarrota i sar., 2018). Istraživanja su pokazala da određeni derivati karotenoida, kao što je hormon ABA i strigolaktoni, zatim i neki isparljivi apokarotenoidi, uglavnom  $\beta$ -ciklocitral i  $\beta$ -jonon, igraju značajnu ulogu u toleranciji stresa kod biljaka (Felemban i sar., 2019).

Producija i sadržaj karotenoida i njihovih produkata u biljkama pod uslovima stresa je veoma kompleksan adaptivni mehanizam i primarno je zavisан od koncentracije rastvorljivih šećera i produkcije vodonik peroksida ( $H_2O_2$ ) koji nastaju u procesu fotosinteze, odnosno fotorespiracije (Fanciullino i sar., 2014).

Povećanje sadržaja karotenoida u uslovima stresa je verovatno povezano sa aktivacijom ksantofil ciklusa koji može biti indukovani usled jake sunčeve insolacije, povećanog saliniteta ili suše (Eismann i sar., 2020). Porast koncentracije karotenoida i luteolin-7-O-glukozida zabeleženi su kod određenih sorti babure koje su izlagane UV-B radijaciji i stresu niske temperature (León-Chan i sar., 2017). Stres soli dovodi do značajnog povećanja sadržaja likopena u paradajzu (Borghesi i sar., 2011). Vodni stres indukuje značajno povećanje sadržaja karotenoida koji je zabeležen kod nekoliko biljnih vrsta, uključujući i maslinu (Doupis i sar., 2013). Smatra se da akumulacija zeaksantina može biti odgovor na različite abiotičke stresne uslove (Inbaraj i sar., 2008a). Povećanje sadržaja zeaksantina i smanjenje violaksantina kod algi je u korelaciji sa visokim intenzitetom svetlosti (Couso i sar., 2012). Međutim, izlaganje biljaka stresu spoljašnje sredine može i smanjiti sadržaj karotenoida. Nedostatak vode izaziva smanjenje koncentracije karotenoida u pojedinim usevima, kao što je pšenica (Hammad & Ali, 2014). Pokazano je, takođe, da stres soli može da izazove smanjenje koncentracije karotenoida u plodovima leblebije (Shankar i sar., 2016) i pasulja (Taïbi i sar., 2016).

Transkripcija gena zaduženih za stvaranje enzima koji su odgovorni za biosintezu karotenoida usled abiotičkog stresa su regulisani održavanjem redoks balansa (Wang i sar., 2018).

#### **2.8.5. Ostale uloge karotenoida u biljkama**

Osim uloge u fotosintezi, fotoprotekciji i odgovoru na uslove stresa, karotenoidi su uključeni i u odgovore na efekte patogena, kao i ostvarivanju simbiotskih odnosa sa drugim organizmima (Hirschberg, 2001). Takođe, ovi pigmenti igraju značajnu ulogu u oplođenju, fotomorfogenezi, razvoju ploda i u različitim signalnim i regulatornim procesima (Cazzonelli, 2011).

Pokazano je da apokarotenoidi služe kao vizuelni ili ispraljivi signalni molekuli koji privlače oprašivače, pospešuju rasejavanje, obezbeđuju alelopatske interakcije i omogućavaju odbranu biljke od različitih izazivača bolesti i štetočina (Bouvier i sar., 2005). Pored toga, karotenoidi deluju kao molekuli koji imaju ulogu i u odvraćanju herbivora od biljaka (Gruber i sar., 2009).

Karotenoidi su lokalizovani u hromoplastima. Mogu se javiti u većim količinama u cvetovima i plodovima nekih biljaka, dajući žutu, narandžastu i crvenu boju radi privlačenja oprašivača ili rasprostiranja plodova i semena putem endozoične zoohorije (Nisar i sar., 2015). S obzirom da su hromoplasti krucijalni u akumulaciji karotenoida sa ulogom atraktanata, regulacija biogeneze hromoplasta je od velike važnosti (Sun i sar., 2018).

Tokom enzimatske oksidacije ksantofila neoksantina dolazi do stvaranja određenih signalnih molekula kao što je abscisinska kiselina (ABA). Abscisinska kiselina je uključena u procese regulacije ranog razvoja embriona, mehanizme otvaranja stoma, klijanje semena i odgovore na toleranciju na stres (Nambara & Marion-Poll, 2005).

Strigolaktoni koji su poznati kao terpenoidni laktoni koji čine klasu fitohormona koji su provobitno predstavljeni kao signalni molekuli u uspostavljanju simbioze biljka-mikroorganizmi, arbuskularne mikorize i klijanja semena (Mostofa i sar., 2018). Strigolaktoni predstavljaju signalne molekule koji regulišu razvoj stabla i grananje (Gomez-Roldan i sar., 2008), i koordinaciju razvoja stabla i korena (Koltai, 2011).

Poznato je da su karotenoidi koji sadrže polarne grupe na dva kraja molekula (ksantofili) lokalizovani na membrani formirajući vodonične veze sa lipofilnim grupama lipida (Gruszecki & Strzałka, 2005). Interakcije između ksantofila i membranskih lipida rezultuje smanjenjem fluidnosti membrane i povećanjem njene termo stabilnosti što doprinosi smanjenju mogućnosti za lipidnu peroksidaciju (Havaux, 2014).

Akumulacija karotenoida u plastidima, uglavnom hromoplastima, je veoma kompleksna i zavisna je od transkripcione i post-transkripcione kontrole biosintentskih puteva, degradacije karotenoida i njihove transformacije, kao i uticaja regulatornih mreža različitih metaboličkih i fizioloških procesa (Sun i sar., 2018).

## 2.9. Bioraspoloživost i biološki efekti karotenoida

### 2.9.1. Bioraspoloživost karotenoida

Prema literaturnim podacima, različita hidrofobna bioaktivna jedinjenja imaju pozitivan efekat na ljudsko zdravlje. Obogaćivanje hrane i pića ovakvim jedinjenjima predstavljaju poseban izazov u novijim istraživanjima, pre svega zbog njihove slabe rastvorljivosti u vodi i hemijske nestabilnosti što doprinosi njihovoj limitiranoj upotrebi (Tan et al., 2022). Biološka dostupnost karotenoida zavisi od tipa proizvoda i količine karotenoida u njima. Pored toga, biološka dostupnost zavisi i od načina obrade nakon berbe, načina skladištenja i načina pipremanja proizvoda od vrsta koje su bogate karotenoidima (Pugliesea i sar., 2013).

Bioraspoloživost karotenoida, kao i bilo kojih drugih nutrijenata, uključuje komponentu biodostupnosti i komponentu bioaktivnosti. Koncept biodostupnosti se definiše kao količina karotenoida koja se oslobađa iz matriksa hrane u gastrointestinalnom traktu i koja se može apsorbovati. Sa druge strane, bioaktivnost se odnosi na tok ulaska hranljivih materija u sistemsku cirkulaciju i njihovog daljeg transporta do ciljanog (target) mesta – tkiva ili organa, gde ispoljavaju svoj maksimalni metabolički ili fiziološki efekat (Dajić Stevanović i sar., 2020). Uopšteno govoreći, karotenoidi su nestabilni molekuli, osetljivi na svetlost, temperaturu i ekstremne pH vrednosti, posebno u prisustvu kiseonika. Niska bioraspoloživost karotenoida rezultira i sniženom bioaktivnošću (Saini i sar., 2020).

Biodostupnost karotenoida uglavnom zavisi od tipa karotenoida, termičke obrade, prisustva lipida i njihove interakcije sa lipofilnim matriksom (Gehse i sar., 2018). Određeni načini obrade sirovina, odnosno namirnica bogatih karotenidima mogu da izazovu njihovu cis-trans izomerizaciju. Na primer, nestabilni *trans* β-karoten u prisustvu svetlosti ili visoke temperature se izomerizuje i oksidiše (Mezzomo & Ferreira, 2016; Saini i sar., 2015). Na efikasnost apsorpcije karotenoida takođe utiče i sam matriks odnosno vrsta hrane (Kaulmann & Bohn, 2014).

Stoga se, primenom savremenih biotehnologija, pribegava različitim načinima mikro i nanokapsulacije karotenoida, izborom odgovarajućih hidrofobno-hidrofilnih organskih nosača i tehnika kapsulacije, zavisno od hemijske grade karotenoida koji se kapsulira (Eun i sar., 2020).

## 2.9.2. Bioaktivnost karotenoida i njihov značaj za zdravlje ljudi

U poslednje vreme izvori karotenoida (voće i povrće) privukli su veliku pažnju zbog povoljnog dejstva na zdravlje ljudi. Unošenje karotenoida povezano je sa poboljšanjem funkcionalisanja imunog sistema i smanjenjem rizika od razvoja degenerativnih hroničnih bolesti (degeneracija žute mrlje oka, dijabetes tipa 2, gojaznost, neurološka i kognitivna oštećenja) i osteoporoze (Khalid i sar., 2019; Rivera-Madrid i sar., 2020). Pored toga, nedostatak karotenoida može dovesti do aberacije rožnjače, uključujući i noćno slepilo (Sommer, 2008).

Na primer, β-karoten ima funkciju provitamina A, dok lutein/zeaksantin formiraju pigment žute mrlje (Eggersdorfer i sar., 2018). Postoje čvrsti dokazi o profilaktičkom efektu karotenoida na kardiovaskularna, kožna i maligna oboljenja, kao i jačanje imunog sistema (Khalid i sar., 2019).

Pacijenti sa Kronovom bolešću i celijkijom imaju nizak nivo karotenoida u krvi i u određenim tkivima (Drai i sar., 2009). U slučaju gastrointestinalnih poremećaja, preporučuje se povećan unos karotenoida (von Lintig i sar., 2020). Prema Svetskom fondu za istraživanje tumora (eng. WCRF - World Cancer Research Fund), redovno unošenje karotenoida može redukovati rizik od dobijanja nekih tipova tumora. Naime, pojava određenih vrsta kancera je povezana sa nedostatkom oksigenovanih karotenoida u ishrani, pa se stoga ksantofili mogu smatrati antitumorskim agensima (Koklesova i sar., 2020). S obzirom da antioksidativni kapacitet karotenoida zavisi od broja dvostrukih veza u polienskom lancu, upravo su zbog te osobine likopen, α-karoten i β-karoten predstavljeni kao jaki antioksidansi i kao molekuli koji imaju sposobnost da smanje rizik od karcinogeneze u različitim ljudskim organima (Rowles & Erdman, 2020).

Kompleksne antitumorske osobine karotenoida povezane su sa fosforilacijom i aktivacijom signalne kinaze, modulacijom ćelijskog puta transkripcionih faktora Nrf2 i NF-κB, apoptoze, progresijom ćelijskog ciklusa, međućelijskom GJIC (eng. gap junction intercellular communication) komunikacijom i angiogenezom (Rodriguez-Concepcion i sar., 2018; Saini i sar., 2020). Treba naglasiti da su karotenoidi poznati i kao agensi koji se koriste u dermatologiji, jer imaju tzv. antiageing (deluju protiv starenja) i fotoprotективni efekat na kožu (Meléndez-Martínez i sar., 2019).

Takođe je pokazano da karotenoidi imaju uticaj na aktivnost različitih humanih enzima, čime se može ostvariti fina regulacija različitih metaboličkih puteva koji se aktiviraju prilikom poremećaja homeostaze, odnosno indukcijom imunskih i drugih odgovora u reakcijama na bolesti i degenerativna stanja.

Tako je na primer, poznato da karotenoidi inhibiraju aktivnost CYP1A1, CYP1A2 CYP3A4 enzima, što može imati pozitivne efekte u slučaju pojave malignih tumora. Takođe, analiziran je uticaj karotenoida na aktivnost enzima  $\alpha$ -amilaze, u vezi sa mogućim efektima ovih biljnih nutrijenata na regulaciju nivoa šećera u krvi i dijabetes. Alfa amilaza je digestivni enzim koji se nalazi u pljuvački i pankreasu. Obavlja hidrolizu 1-4 glukozidne veze polisaharida (skroba), produkujući male šećerne jedinica kao što su disaharid maltoza i glukoza. Varenje skroba počinje u usnoj duplji zahvaljujući enzimu koji se nalazi u pljuvački i nastavlja se do tankog creva pomoću enzima koji se nalazi u pankreasu. Proizvodi reakcije, jedinice glukoze, apsorbuju se u zid creva. Glukoze se zatim isporučuju krvlju do ciljanih ćelija po celom telu. Dakle, inhibicija  $\alpha$ -amilaze je važna za odlaganje razgradnje ugljenih hidrata i adsorpcije glukoze Povećane vrednosti enzima u serumu potencijalno ukazuju na zapaljenje žučne kese, prisustvo mikroamilaze u krvi, dijabetesna ketoacidoza i dr. Dijabetes predstavlja globalni zdravstveni problem zbog toga što može izazvati hronične probleme koje mogu dovesti do smrti (Watcharachaisoponsiri i sar., 2016). Time, inhibicija ovog enzima može prevenirati i u izvesnoj meri ublažiti posledice u slučaju metaboličkog sindroma, gojaznosti i insulinske rezistencije (Jin i Arroo, 2023; Roohbakhsh i sar., 2017; Shalini i sar., 2021; Watcharachaisoponsiri i sar., 2016).

Već je napomenuto da karotenoidi imaju zaštitnu ulogu u odnosu na uticaje sunčevog zračenja na kožu, i da se njihova regularna konzumacija, kao i nanošenje preparata za sunčanje obogaćenih karotenoidima, preporučuje pre i tokom izlaganja suncu. Mehanizmi uključeni u fotoprotективne efekte karotenoida nisu do kraja razjašnjeni. Enzim tirozinaza (hsTYR – humana tirozinaza) je odgovoran za produkciju pigmenta melanina. Predstavlja ključni enzim koji omogućava konverziju l-tirozina do dopamine omogućavajući time sintezu melanina odnosno process melanogeneze (Roulier i sar., 2020). Ovaj enzim se nalazi u metanocitama, odnosno u ćelijama u kojima se sintetiše melanin. Melanin je pigment koji daje boju koži, kosi i očima. Pored toga, nalazi se u mrežnjači oka. Povišene vrednosti ovog enzima rezultuju povećanom sintezom melanina što dovodi do hiperpigmentacije kože, melazme, senilnog lentiga, solarnog lentiga, solarne melanoze itd. Prema tome, inhibicija tirozinaze može imati pozitivne efekte na sprečavanje svih navedenih kožnih oboljenja (Di Petrillo et al., 2016; Kim i sar., 2023; Pillaiyar et al., 2017).

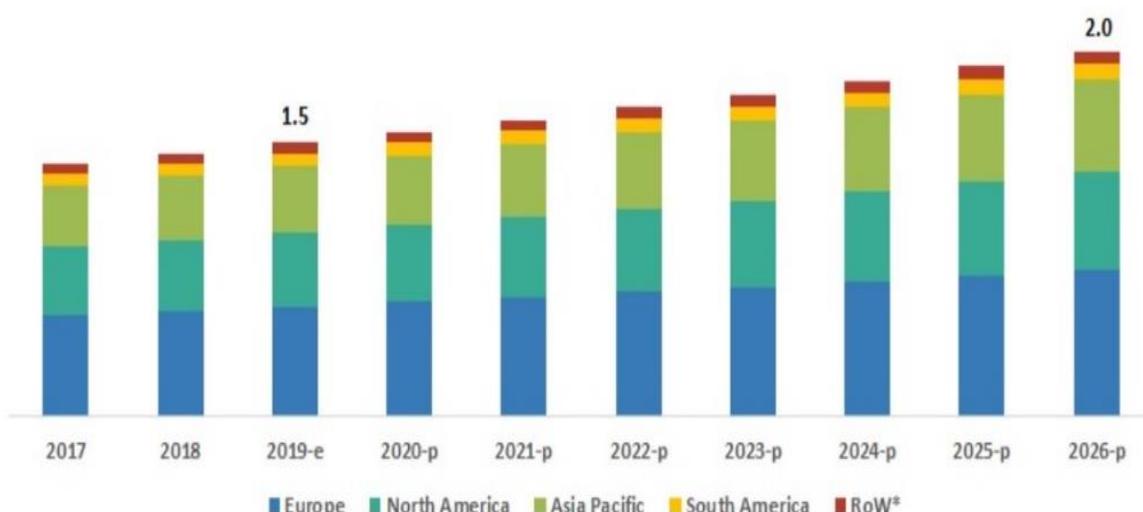
Prema DGE (The German Nutrition Society), dnevni prepoučeni unos karotenoida iznosi 2 mg  $\beta$ -karotena i 1 mg retinola. Sa druge strane NCI (Comprehensive Cancer Information) preporučuje unos 5-6 mg  $\beta$ -karotena. Da bi se ispunila ova potreba, potrebno je da se dnevno unese 100-200 g raznog voća ili povrća kao što su na primer crvena paprika, peršun, spanać, salata, mrkva, paradajz, nektarine ili kajsija (Müller, 1996).

## 2.10. Industrijska primena karotenoida i globalno tržiste

Globalno tržište karotenoida je procenjeno na oko 1,5 milijardi američkih dolara (Saini i sar., 2020). Predviđa se da će tržište prirodnih proizvoda dostići povećanje za preko 4,2 % do 2024., a do 2026. se očekuje porast na oko 2 milijarde dolara (**Slika 8**). Razlog tome je porast potražnje prirodnih boja, a karotenoidi predstavljaju potpuno bezbedna prirodna jedinjenja koja se mogu koristiti za ishranu ljudi, domaćih životinja kao i u kozmetici. Međutim, iako je potražnja za karotenoidima porasla, cena je pala zbog velikih proizvodnih postrojenja u Kini koji proizvode visokokvalitetne proizvode po nižim cenama. Takođe, tržište je zasićeno proizvodima na bazi sintetičkog  $\beta$ -karotena, a nada da će prirodno dobijeni  $\beta$ -karoten iz algi moći da pronađe svoje mesto na tržištu je sve manja (Zakynthinos & Varzakas, 2016).

Najviše zastupljeni karotenoidi na globalnom tržištu su astaksantin,  $\beta$ -karoten, lutein, likopen, kantaksantin, zeaksantin i dr. (Zakynthinos & Varzakas, 2016). Karotenoidi se koriste kao prirodne boje za bojenje prehrabnenih proizvoda kao što su supe, meso, sirevi, hleb i slatkiši. Kroz ishranu pernate živine, kantaksantinom, pojačava se obojenost žumanceta (Vílchez i sar., 2011). Takođe, ishrana kantaksantinom lososa i škampa dovodi do obojenosti mesa ovih organizama. Pored toga, zdravlje i fertilitet domaćih životinja koje se hrane žitaricama se može poboljšati ukoliko se u hranu dodaje  $\beta$ -karoten (Yao i sar., 2022).

Zahvaljujući svom fotoprotективnom efektu, karotenoidi, prevashodno  $\beta$ -karoten, se koriste u preparatima za sunčanje sa zaštitnim faktorom. Pored navedenog, postoji značajno povećanje zahteva tržišta za mikro- i nanokapsuliranim proizvodima, uključujući i one sa inkapsuliranim karotenoidima, a koje se procenjuje na 34, odnosno 12,5 milijardi američkih dolara. Od ove sume, 400-500 miliona američkih dolara se odnosi na karotenoide (<https://www.gminsights.com/industry-analysis/food-encapsulation-market>).



Slika 8. Tržište karotenoida po regionima (u milijardama dolara) (<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/carotenoid-market-158421566.html>)

## 2.11. Karotenoidi prisutni u vrstama roda *Capsicum* L.

Zreli plodovi različitih sorti paprike predstavljaju značajan izvor karotenoida (Mínguez-Mosquera i Fernández-Díez, 1981). Prema istraživanju Hornero-Méndez i sar. (2000) postoji jedinstven obrazac biosinteze ovih jedinjenja vrstama roda *Capsicum* L.: kod pet ispitvanih sorti, koncentracija luteina i neoksantina je opadala tokom sazrevanja sve do njihovog nestanka. Koncentracija  $\beta$ -karotena, anteraksantina i violaksantina se povećala, dok su se ostali pigmenti sintetisali *de novo* (zeaksantin,  $\beta$  kriptoksanthin, kapsantin, kapsorubin, kapsantin-5,6-epoksid i kukurbitaksantin). Do sada je u crvenoj paprići identifikovano više od 50 karotenoida dok se njihova ukupna količina kretala od 0,1-3,2 g/100g suve materije (Arimboor i sar., 2015).

Jedinstveni keto karotenoidi kapsantin, kapsorubin i kriptoksanthin daju karakterističnu crvenu boju zrelom plodu paprike, dok žuto-naranđasta boja ploda potiče od  $\beta$ -karotena, zeaksantina, violaksantina i kriptoksanthina. Mnogi ksantofili u crvenoj paprići se javljaju kao estri sa C12, C14 i C18 masnim kiselinama, dok ekstrakti zelene paprike uključuju uglavnom slobodne karotenoide (Breithaupt i Schwack 2000; Cervantes-Paz i sar. 2014; Giuffrida i sar. 2013).

Karotenoidi kao što su kapsantin i kapsorubin sa κ-prstenom kao krajnjom grupom, se uglavnom označavaju kao tipični za vrste iz roda *Capsicum* (Deli i Molnar, 2002). Kapsantin učestvuje sa 30-70% od ukupnih karotenoida kod većine sorti i hibrida crvene paprike, a odnos kapsantin:kapsorubin se povećava sa fazama sazrevanja (Deli i sar. 1996).

Prema Deli i sar. (2001), u vrsti *Capsicum annuum* var. *lycopersiciforme rubrum* identifikovano je 34 karotenoida. Ukupna količina karotenoida je bila 1,3g/100 g suve materije od kojih je kapsantin obuhvatao 37%, zeaksantin 8%, kukurbitaksantin 7%, kapsorubin 3,2% i β-karoten 9%. Ostatak je sastavljen od karotenoida kao što su: kapsantin 5,6-epoksid, kapsantin 3,6-epoksin, 5,6-diepikarpoksantin, vioalaksantin, anteraksantin, β-criptoksantin, uz nekoliko *cis* izomera i furanoidnih oksida.

Maoka i sar. (2001) su detektovali i 11 apokarotenoida, uključujući 5 novih komponenti izolovanih iz ploda tzv. paradajz paprike. Novi apokarotenoidi su identifikovani kao apo-14'-zeaxantinal, apo-13'-zeaxantinon, apo-12'-kapsorubinal, apo-8'-kapsorubinal, 9'-diapo-10,9'-retrokaroten-9,9'-dion. Ostalih 6 apokarotenoida su identifikovani kao apo-8'-zeaxantinal, apo-10'-zeaxantinal, apo-12'-zeaxantinal, apo-15'-zeaxantinal, apo-11'-zeaxantinal i apo-9'-zeaxantinon. Takođe su izlovali novi karotenoid kapsanton 3,6-epoksid sa strukturom (3S, 5R, 6S, 5'R)-3,6-epoksi-5,6-dihiro-5-hidroksi-β, kappa-karoten-3',6'-dion. Pretpostavlja se da je kapsanton 3,6-epoksid oksidovani metabolit kapsantin 3,6-epoksida u paprici.

Dakle, u slučaju crvene paprike, najviše prisutni su kapsantin, β-karoten, β-criptoksantin i zeaksantin (Deli i sar., 2001).

## 2.12. Izolacija i karakterizacija karotenoida

Prilikom analize karotenoida neophodno je ispratiti sledeće korake: uzorkovanje, ekstrakcija, saponifikacija (opciono), koncentrovanje (evaporacija), hromatografska separacija, identifikacija, kvantifikacija i obrada podataka i interpretacija rezultata.

Proces ekstrakcije treba da omogući prelazak karotenoida iz uzorka (matriks) u rastvarač bez strukturnih promena i promena u njihovoj koncentraciji. S obzirom da su uzorci hrane kompleksni, izbor rastvarača treba da omogući ekstrakciju velikog broja karotenoida koji su prisutni u uzorku. Najčešće korišćeni rastvarači su aceton, metanol, etanol, dihor metan, heksan, bezen, toluen i njihove mešavine. Najčešće mešavine rastvarača su aceton:heksan, aceton:heksan:etanol, heksan:etanol i heksan:etanol:aceton:toluen. Sto se tiče metoda ekstrakcije, najbolje se pokazala kombinacija ultrazvucnog kupatila (10 minuta) i šejkera (30 minuta).

Do sada, najviše korišćene instrumentalne metode u analizi karotenoida su visoko efikasna tečna hromatografija - HPLC (eng. High Performance Liquid Chromatography), tankoslojna hromatografija visokih performansi - HPTLC (eng. High Performance Thin Layer Chromatography), tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom - LC-MS (eng. Liquid Chromatography Mass Spectrometry), ultra-efikasna tečna hromatografija - UHPLC (eng. Ultra-High-Performance Liquid Chromatography), Orbitrap MS (eng. Mass Spectrometry), nuklearna magnetna rezonanca - NMR (eng. Nuclear Magnetic Resonance), itd. (Saini i sar., 2015). Sve navedene metode zahtevaju pripremu uzorka u vidu ekstrakcije čime se gubi početni biljni materijal (Subramanian i sar., 2014).

Uprkos manjoj moći razdvajanja u odnosu na visoko efikasnu tečnu hromatografiju (HPLC) i gasnu hromatografiju (GC), primena elektronskih filtera prilikom obrade slike kod HPTLC hromatograma ili posthromatografska selektivna derivatizacija povećavaju rezoluciju razdvajanja. Međutim, otvoren sistem kod HPTLC metode onemogućava analizu isparljivih i nestabilnih jedinjenja.

Uprkos ovome, HPTLC metoda ima niz prednosti, kao što su:

- jednostavna priprema uzorka,
- detekcija analiza u opsegu od  $0,1 \mu\text{l} - 1 \text{ ml}$
- analiza velikog broja uzoraka za kratko vreme

U novije vreme sve se više koriste nove nedestruktivne (ili manje destruktivne) vibracione spektroskopske metode kao što su FT-IR (eng. Fourier Transform Infrared) spektroskopija i Ramanova spektroskopija.

## 2.13. Ramanova spektroskopija u analizi karotenoida

Ramanova spektroskopija pripada grupi metoda vibracione spektroskopije koja se bazira na interakciji svetlosti određenih talasnih dužina sa materijom (matriksom). Ramanovi spektri i ramanova slika (raman image) mogu biti korišćeni za procenu fizičkih, hemijskih, bioloških (Qin i sar., 2019; Yang & Ying, 2011), kao i senzornih osobina hrane i prehrambenih proizvoda (Xue i sar., 2012b).

Sa druge strane, metoda Ramanove spektroskopije omogućava identifikaciju tipova, sadržaja i distribucije karotenoida u biološkim sistemima, a takođe može da prepozna i izomerizovane forme karotenoida. Ono što najviše preporučuje ramanovu spektroskopiju u analizi uzorka bogatih karotenoidima su:

- Potrebna je mala količina uzorka
- Nije neophodna prethodna priprema uzorka (nedestruktivna metoda)
- Vreme merenja je kratko – u najvećem broju slučajeva merenje traje nekoliko sekundi; kada su u pitanju analiza slike (eng. Image analysis), dužina merenja se produžava na nekoliko sati.
- Tip uzorka može biti u bilo kom obliku (svež, smrznut, čvrst, tečan, suv, itd)

Primena Ramanove spektroskopije u fundamentalnim i primenjenim biološkim disciplinama počela je 80-ih godina 20. veka. Karotenoidi su se pokazali kao molekuli vrlo pogodni za analizu ovom instrumentalnom metodom, jer poseduju takvu hemijsku strukturu da i pri veoma malim koncentracijama može da se dobije vibracioni spektar (Merlin, 1985).

Karotenoidi su obojeni i kao takvi imaju  $\pi-\pi^*$  prelaz koja se javlja u vidljivom regionu. Kada se talasna dužina lasera poklopi sa  $\pi-\pi^*$  (S-S0) elektronskim prelazom dobija se ramanov spektar (Feltl i sar., 2005; Withnall i sar., 2003a). Ramanovom spektroskopijom mogu biti identifikovane funkcionalne grupe molekula karotenoida, a intenzitet traka je u korelaciji sa njihovom relativnom koncentracijom u uzorku. Ramanov spektar karotenoida pokazuje trake u regionu od  $1500-1550 \text{ cm}^{-1}$  i u regionu od  $1150-1170 \text{ cm}^{-1}$  zbog  $\text{C}=\text{C}$  (v1) i C-C vibracija (v2) u polienskom lancu. Sa druge strane, u regionu od  $1000-1005 \text{ cm}^{-1}$  javlja se traka koja potiče od  $\text{C}-\text{CH}_3$  deformacije (v2) (Schulz i sar., 2005).

## 2.14. Hemometrijska analiza Ramanovih spektara

S obzirom da su Ramanovi spektri snimljeni na kompleksnom matriksu, kao što je biljni materijal, primena hemometrijskih alata u obradi spektara je neophodna. Hemometrijska analiza obuhvata dva koraka: prethodnu obradu podataka i modelovanje. U toku prethodne obrade, tj. prve obrade spektara, obavlja se smutovanje (eng. smoothing), zatim, korekcija bazne linije, kao i redukcija broja varijabli određenim metodama za redukciju, kao što je na primer PCA (eng. Principal Component Analysis), NMF (eng. Non-negative matrix factorization), BFE (eng. Backward Feature Elimination) i dr.

Sa druge strane, modelovanje zavisi od cilja istraživanja i obuhvata metode klasifikacije i regresije. Metode klasifikacije se odnose na pronalaženje klastera koji grupišu određene objekte na osnovu njihove sličnosti. Metode regresije svode se na predviđanje kvantitativnog slaganja ispitivanih varijabli (Ryabchikov i sar., 2019).

Tako na primer, među najčešće korišćenim metodama klasifikacije mogu se spomenuti PLS-DA (*eng.* Partial Least Square – Discriminant Analysis), SIMCA (*eng.* Soft Independent Modeling of Class Analogy), SVM (*eng.* Support Vector Machines) itd. Sa druge strane, među najčešće korišćenim regresionim modelima mogu pomenuti MLR (*eng.* Multiple Linear Regression), PLSR (*eng.* Partial Least Square Regression), SVMR (*eng.* Support Vector Machines Regression) i drugi.

PCA-LDA predstavlja model za separaciju (klasifikaciju) ispitivanih grupa (Pomerantsev, 2014). Cilj ovog modela je da se formira (pronađe) idealna projekcija podprostora (*eng.* subspace) i da se u njemu sprovede diskriminacija. Ovaj potprostor se definiše tako da distance između centroida ispitivanih klas budu što veće i da distance između pojedinih objekata u okviru iste klase budu minimalne (Chen & Jiang, 2018). Granice koje se formiraju su linearne ili kvadratne i dele potprostor u regije (Dixon & Brereton, 2009).

PLS-DA je klasifikacioni metod koji je baziran na potrazi za latentnim varijablama koje služe za diskriminaciju dve ili više grupa. Ova metoda maksimizira kovarijansu između nezavisnih varijabli i odgovarajuće zavisne varijable, traženjem linearog potprostora eksplanatornih varijabli. Novi potprostor omogućava predikciju zavisne promenljive na osnovu smanjenog broja faktora (PLS komponenti). Ovi faktori (komponente), koji "razapinju" potprostor na koji su projektovane nezavisne varijable, opisuju ponašanje zavisne varijable (Uarrota i sar., 2014).

SIMCA (*eng.* Soft Independent Modeling of Class Analogy) je dvoklasni model gde se svaka klasa posebno modeluje, nezavisno od ostalih klasa. Glavne prednosti SIMCA su što ne zahteva pretpostavku o normalnosti raspodele, greška prve vrste može biti podešena, može biti primenjena na podacima koja imaju veliki broj varijabli i otporna je na predimenzionalnost podataka. Sa druge strane, najvažnije mane ovog modela su zahteva sprovodenje PCA analize pre samog modelovanja, a rezultati zavise od broja izbaranih glavnih komponenata. Pored toga, osetljiva je na ekstremne vrednosti (*eng.* outliers) i pokazuje loše rezultate kada je test set podataka mali (Pomerantsev, 2014).

### **3. Ciljevi i hipoteze istraživanja**

**Osnovni ciljevi istraživanja ove doktorske disertacije su:**

1. Utvrđivanje sadržaja dominantnih karotenoida u ekstraktima odabranih sorti svežih paprika u različitim fazama sazrevanja i u tradicionalnim proizvodom od paprike (ajvar) HPTLC metodom
2. Utvrđivanje sadržaja ukupnih karotenoida i polifenola u ekstraktima odabranih sorti svežih paprika u različitim fazama sazrevanja i u tradicionalnom proizvodu od paprike (ajvar) spektrofotometrijskom metodom
3. Utvrđivanje antioksidativnog kapaciteta ekstrakata odabranih sorti svežih paprika u različitim fazama sazrevanja i u tradicionalnom proizvodu od paprike (ajvar) spektrofotometrijskom metodom
4. Utvrđivanje efekta ekstrakta karotenoida paprike u fazi pune zrelosti i ajvara na inhibiciju enzima  $\alpha$ -amilaze i tirozinaze
5. Utvrđivanje kapaciteta digestije karotenoida paprike u finalnoj fazi sazrevanja i u ajvaru
6. Razvijanje hemometrijskog diskriminacionog modela na bazi spektara dobijenih Ramanovom spektroskopijom za prepoznavanje faze zrelosti paprike
7. Razvijanje hemometrijskog diskriminacionog modela za određivanje sorte paprike na bazi spektara dobijenih Ramnovom spektroskopijom
8. Kreiranje statističkog modela za kvantifikaciju karotenoida u plodovima i proizvodu paprike na osnovu dobijenih Ramanovih spektara i uz verifikaciju putem primene standardnih analitičkih metoda (HPTLC)

**Hipoteze od kojih se polazi:**

1. Profil karotenoida (sastav i količina) u plodovima i tradicionalnom proizvodu zavisiće od genotipa
2. Sastav i količina karotenoida menjaće se tokom faza razvića ploda paprike
3. Postoji razlika u biodostupnosti karotenoida između paprike u fiziološkoj fazi sazrevanja i ajvara
4. Ramanova spektroskopija se može koristiti za kvalitativnu i kvantitativnu karakterizaciju karotenoida između različitih sorti i tokom faza razvića, uz primenu odgovarajućeg hemometrijskog modela
5. Razlike u biološkoj aktivnosti između različitih genotipova paprike i njihovih proizvoda praćeni na nivou antioksidativnog kapaciteta i aktivnosti enzima u ekstraktima paprike su u vezi sa razlikama koncentracija glavnih karotenoidnih molekula

## 4. Materijal i metode

### 4.3. Biljni materijal korišćen u eksperimentu

Biljni materijal korišćen u ovoj doktorskoj tezi su plodovi crvene paprike. Odabrane su sorte Vrtka, Kurtovska kapija, Una, Amfora kao i jedna linija Amfora x Una. Plodovi su uzorkovani sa oglednih polja Instituta za ratarstvo i povrтарstvo u Novom Sadu, osim sorte Vrtka koja je uzorkovana sa proizvodnog polja u Beloj Palanci (**Slika 9**).

Setva paprike obavljena je 28.3.2019. u redove u plasteniku bez grejanja. Biljke su nikle između 10-16. aprila, dok je rasadišvanje sprovedeno 13.6.2019. godine na međurednom razmaku od 70 cm i 25 cm između biljaka u redu. Prihranjivanje biljaka obavljeno je početkom jula amonijum-nitratom u količini od 200 kg/ha. Početkom avgusta, biljke su zaštićene insekticidom Coragen u koncentraciji 32 ml/80 l vode. Sredinom septembra je obavljena berba plodova.

Uzorci su uzimani u pet sukcesivnih faza razvića koje odgovaraju različitoj boji ploda zelena (faza 1), zeleno-mrka (faza 2), mrko-crvena (faza 3), crvena (faza 4) i tamno crvena (faza 5). Uzorkovano je 10 plodova po fazi (jedna biljka - jedan plod), ukupno 200 plodova paprike.



Kurtovska kapija

Una

Amfora

Amfora x Una

Vrtka

**Slika 9.** Sorte i linije paprike korišćene u istraživanju

Sorta Amfora je srednje rana sorta po tipu kapije registrovana 2001. godine u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, R. Srbija. Dužina ploda je približno 14 cm, masa oko 145 g, dok je debljina perikarpa približno 5 mm. Plod je krupan, u tehnološkoj zrelosti tamno zelen, a u fiziološkoj zrelosti intenzivno crven.

Sorta Una je srednje rana sorta po tipu kapije. Selekcionisana je u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, Srbija. Dužina ploda je 14-18 cm, širina približno 4 cm, masa ploda 80-120 g, a debljina perikarpa približno 5 mm. Boja ploda je žuto-zelena u tehnološkoj zrelosti, a intenzivno crvena u fiziološkoj zrelosti. Plod je pogodan za svežu potrošnju kao i za kišeljenje i pečenje.

Sorta Kurtovska kapija potiče iz Bugarske. Plodovi su dugi 12-16 cm sa debljinom perikarpa 3-4 mm. Boja ploda u tehnološkoj zrelosti je zelena, a u fiziološkoj zrelosti intenzivno crvena. Koristi se sveža i za preradu. Pogodna je za pečenje i zamrzavanje.

Amfora x Una je srednje rana linija po tipu kapije stvorena u Institutu za ratarstvo i povrtarsvo u Novom Sadu, Srbija. Dužina ploda iznosi 14-16 cm, širina ploda je oko 4 cm. Oblik ploda je sličan sorti Una. Boja ploda u tehnološkoj zrelosti je zelena a u fiziološkoj zrelosti intenzivno crvena.

Sorta Vrtka je autohtona sorta sa područja Bele Palanke. Dužina ploda iznosi oko 12-16 cm dok je širina oko 4,5 cm. Debljina perikarpa iznosi približno 3,6 mm. Plod se prilikom sušenja spiralno uvrće te otuda naziv Vrtka. Plodovi se koriste osušeni.

Sveži plodovi (neposredno nakon branja) su oprani, očišćeni od semena, placente i peteljke, samleveni i zamrznuti na temperaturi od -80 °C. Pored toga, zamrznut je i ajvar. Zamrznuti uzorci su podvrgnuti liofilizaciji (model liofilizatora Christ ALPHA 2-4 LD plus) na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu (**Slika 11**).

### Priprema proizvoda od analiziranih sorti paprike

Pored navedenog, kao materijal istraživanja korišćen je i ajvar koji je pravljen od navedenih sorti u fazi pune fiziološke zrelosti u laboratorijskim uslovima Poljoprivrednog fakulteta, po tradicionalnoj recepturi (**Slika 10**).

Za 1 kg ajvara potrebni su sledeći sastojci:

2 kg pečene paprike

100 ulja

20 g soli

20 ml sirčeta 9%

Tradicionalni recept za ajvar: *Paprike oprati, postaviti na pleh i ubaciti u zagrejanu rernu na 220 stepeni i peći 14 minuta. Nakon toga, ostaviti da se ohladi u najlonskoj kesi i zatim oljustiti i izvaditi peteljke, semenke i placentu. Tako očišćenu papriku staviti u odgovarajući sud za kuvanje, dodati sastojke iz recepture i kuvati do odgovarajuće gustine. Skuvani ajvar prebaciti u odgovarajuće staklene posude (tegle) i pasterizovati (Slika 10).*



**Slika 10.** Ajvar proizveden od paprika u punoj fiziološkoj zrelosti

### 4.2. Merenje mase, morfoloških parametara plodova paprike i količine šećera

Na sveže ubranim plodovima paprika u fiziološkoj zrelosti mereni su sledeći parametri: masa ploda (g), dužina ploda (cm), širina ploda (cm), debljina perikarpa (mm) i briks (mera sadržaja šećera izražena u jedinicama °Bx). Masa ploda merena je na vagi (model ACCULAB ATL-224-V), dužina i širina ploda su mereni lenjirom dok je debljina perikarpa merena šublerom (proizvođač INSIZE). Vrednost briksa meren je ručnim digitalnim refraktometrom (model PAL-1, Atago, Japan). Merenja su sprovedena za sorte Kurtovska kapija, Una, Amfora, Vrtka kao i liniju Amfora x Una. Ukupno je mereno 15 plodova po sorti (liniji).

Rezultati su izražavani kao prosečna vrednost  $\pm$  standardna devijacija. Ispitivanje efekata sorte na ispitivane parametre sproveden je jednofaktorskom analizom varijanse (eng. One Way Anova). Naknadno poređenje rezultata sprovedeno je Dankanovim testom na nivou značajnosti 5%.

#### 4.3. Ekstrakcija karotenoida

Ekstrakcija liofilizovanih paprika kao i ajvara, obavljena je na sledeći način: 5 g liofilizovanog uzorka rastvoren je u 3 ml smeše acetona i heksana u odnosu 1:1. Tako pripremljeni rastvor su stavljeni na ultrazvučno kupatilo u trajanju od 15 minuta i nakon toga su centrifugirani 5 min na 13500 obrataja u minuti. Supernatant je korišćen za dalje analize karotenoida (**Slika 12**).



**Slika 11.** Liofilizacija plodova paprike pomoću liofilizatora (Christ ALPHA 2-4 LD plus)



**Slika 12.** Pripremljeni ekstrakti sorte Kurtovska kapija. Faze 1, 2, 3, 4, 5 i ajvar idući sa leva nadesno.

## 4.4. Analiza karotenoida HPTLC metodom

### 4.4.1. Kvalitativno i kvantitativno određivanje karotenoida HPTLC metodom

Za određivanje karotenoidnog sastava ispitivnih ekstrakata paprika i ajvara, primenjena je tehnika horizontalne tankslojne hromatografije (eng. High Performance Thin Layer Chromatography). Analiza je urađena u laboratoriji Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Ekstrakti paprike/ajvara su naneti na ploču silika gela 60 F<sub>254</sub> dimenzija 20 x 10 cm (Merck - Darmstadt, Nemačka) koja je prethodno zasićena metanolom i zagrevana 15 min na temperaturi od 120 °C (CAMAG TLC PLATE HEATER III). Zatim su ekstrakti paprike/ajvara zaprimene 3 µl i smeša standarda ispitivanih karotenoida zapremine 1 µl nanešeni na ploču koristeći polu-automatski TLC CAMAG Linomat 5 (Muttenz, Switzerland). Broj traka koje su nanete na ploču bio je 19 (17 uzoraka i 2 smeše standarda). Front rastvarača iznosio je 70 mm dok je širina nanešene zone bila 7 mm. Početna pozicija nanošenja uzoraka bila je X 10 mm (rastojanje od leve ivice ploče) i Y 8 mm (rastojanje od donje ivice ploče). Hromatografsko razdvajanje sprovedeno je u vertikalnoj kadi dimenzija 20 x 10 cm (CAMAG, Muttenz, Switzerland) primenom smeše rastvarača heksan:aceton (8:2, v/v) zapremine 120 ml u trajanju od 15 min na temperaturi od 22 °C. Detekcija ispitivanih karotenoida obavljena je na talasnoj dužini od 440 nm. Celokupna analiza je kontrolisana softverom WinCAT (version 1.4.3.6336, CAMAG, Muttenz, Switzerland).

Serija standarda karotenoida pripremljena je u smeši u sledećim koncentracijama: 0,085, 0,17, 0,22 i 0,33 mg/ml osim kod β-kriptoksantina gde je raspon koncentracija bio 0,04 do 0,09 mg/ml (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Koncentracija standarda karotenoida korišćenih za formiranje kalibracione krive

Standard	koncentracija (mg/ml)			
β-karoten	0,33	0,22	0,17	0,085
β-kriptoksantin	0,09	0,06	0,04	-
Lutein	0,33	0,22	0,17	0,085
Zeaksantin	0,33	0,22	0,17	0,085
Kapsantin	0,33	0,22	0,17	0,085

Sorta Kurtovska kapija je analizirana u svih 5 faza sazrevanja kao standardna model sorte, dok su sorte Amfora, Una i Vrtka analizirane u prvoj, trećoj i petoj fazi sazrevanja, kao kritičnim fazama razvića ploda. Tradicionalni proizvod, pripremljen u laboratorijskim uslovima od svih ispitivanih sorti analiziran je istim metodama. U cilju poređenja razlika u količini pojedinačnih karotenoida između različitih sorti, korišćena je jednofaktorska analiza varijanse. Kao naknadni test korišćen je Dankanov test.

### 4.4.2. Hemometrijska obrada slika hromatograma

Nakon razvijanja traka, hromatografske ploče su fotografisane (Nikon DIG Z30 LENS KIT W/ 12-28 DX PZ) i fotografije su obrađene u softveru ImageJ (ver.1.43q Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Primenom ovog softvera fotografija je razdvojena na 3 kanala (R-red, G-green i B-blue), ali je za dalje analize korišćen samo B (blue) kanal jer u njemu odziv bio najbolji.

Tako dobijeni hromatogrami analizirani su u cilju formiranja hemometijskog modela za prepoznavanje faze zrenja kao i za prepoznavanje sorte paprike u fazi fiziološke zrelosti.

Za formiranje **modela za prepoznavanje faze zrenja**, korišćena je sorta Kurtovska kapija kao model sorta u 4 faze zrenja (faza 1, faza 2, faza 4 i faza 5). U tu svrhu korišćeno je svih 10 uzoraka po fazi zrenja, a finalna matrica podataka sastojala se od 10 redova i 158 kolona (R<sub>f</sub> vrednost) (10x158). Podaci su redukovani primenom analize glavnih komponenata (PCA) dok je modelovanje sprovedeno primenom LDA (eng. Linear Discriminant Analysis).

Kada je u pitanju formiranje **modela za prepoznavanje sorte paprike**, korišćene su sorte Kurtovska kapija, Amfora, Una i Vrtka u fazi fiziološke zrelosti. Finalna matrica podataka bila je dimenzija 40x158. Podaci su takođe redukovani primenom PCA metode a zatim modelovani primenom LDA.

#### **4.5.Određivanje bioaktivnih komponenti iz ekstrakata paprike i prozvoda paprike (ajvara)**

Određivanje bioaktivnih komponenti obuhvatilo je analizu ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida i ukupnih karotenoida. Analizirani su ekstrakti sorte Kurtovska kapija u svih 5 faza sazrevanja (f 1-5) koja je uzeta kao standardna model sorta, dok su sorte Amfora, Una i Vrtka analizirane u prvoj, trećoj i petoj fazi sazrevanja, kao ključnim fazama u biosintezi određenih karotenoida. Tradicionalni proizvod, ajvar, pripremljen u laboratorijskim uslovima analiziran je kod svih ispitivanih sorti.

##### **4.5.1. Određivanje ukupnih polifenola**

Sadržaj ukupnih fenola je određen spektrofotometrijski, prema metodi po Folin-Ciocalteu (Singleton i Rossi, 1965).

Postupak : 175 µL ekstrakta je pomešano sa 750 µL radnog rastvora Folina (1:9). Nakon 5 minuta, dodato je 575 µL 7.5% rastvora natrijum-karbonata i vode, nakon čega je smeša inkubirana 90 minuta i nakon toga su uzorci centrifugirani. Absorbanca je merena na 765 nm. Kao blank je korišćen uzorak u koji je umesto ekstrakta dodata ista količina rastvarača. Merenja su vršena u triplikatu, a rezultati su izraženi kao prosečna vrednost tri merenja ± stiardna devijacija i izražen kao miligram ekvivalenta galne kiseline po mililitru ekstrakta (mg GAE/ml ekstrakta).

##### **4.5.2. Određivanje ukupnih karotenoida**

Ukupni karotenoidi su određeni spektrofotometrijski prema metodi Sumanta i sar. (2014).

Postupak :

Dobijeni aceton-heksanski ekstrakti paprike i ajvara (supernatant) su direktno očitavani na absorbanci od 450 nm. Količina karotenoida se izračunava prema sledećoj formuli:

$$\mu\text{g/g karotenoida} = \frac{(A \cdot V \cdot 106)}{(E_{1\text{cm}} \cdot 100 \cdot m)}$$

gde je:

A- apsorbanca uzorka na 450 nm

V-ukupna zapremina ekstrakta

E<sub>1cm</sub> - ekstinkcioni koeficijent za korišćeni rastvarač

m - odmerena masa uzorka (u gramima)

#### **4.5.3. Određivanje ukupnih flavonoida**

Sadržaj ukupnih flavonoida određen je spektrofotometrijski prema Kim-u (Kim i sar., 2020).

Postupak: U ependorf posudu odmereno je 125 µL pomešana je sa 625 µL vode i 37.5 µL rastvora 5% natrijum-nitrita, nakon čega je inkubacija traja 6 min. Nakon isteka vremena inkubacije dodato je 75 µL 10% rastvora aliminijum-hlorida i ponovna inkubacija je trajala 5 min. Nakon drugog perioda inkubacije dodato je 250 µL 1M natrijum- hidroksida i dodatnih 138 µL destilovane vode, a zatim je rastvor centrifugiran. Apsorbanca je merena na 510 nm (kao blank je korišćen uzorak koji sadrži 125 µL rastvarača umesto ekstrakata). Merenje je vršena u triplikatu, a rezultati su izraženi kao prosečna vrednost tri merenja ± standardna devijacija i izražen kao miligram ekvivalenta kvercentina po mililitru ekstrakta (mg QE/ml ekstrakta).

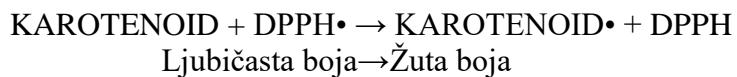
#### **4.6. Određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata paprike i proizvoda od paprike (ajvara)**

Određivanje antioksidativnog kapaciteta ekstrakata paprike i njihovog tradicionalnog proizvoda obuhvatilo je određivanje sposobnosti sakupljanja DPPH• radikala (DPPH), sposobnost redukcije Fe<sup>3+</sup> (FRP) i određivanje Kupri jon redukujuće antioksidativne moći (CUPRAC). Analizirani su ekstrakti sorte Kurtovska kapija u svih 5 faza sazrevanja koja je uzeta kao standardna model sorta, dok su sorte Amfora, Una i Vrtka analizirane u prvoj, trećoj i petoj fazi sazrevanja (već je napomenuto da su te faze uzete kao ključne ili kritične u biosinteti i akumulaciji pojedinih karotenoida).

##### **4.6.1. Određivanje sposobnosti sakupljanja DPPH• radikala**

DPPH• (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) predstavlja stabilni slobodni radikal koji ima nespareni valentni elektron na jednom atomu azotnog mosta (Eklund i sar., 2005). "Hvatanje" DPPHradikala je osnova DPPHtesta (Kordali i sar., 2005). Metoda je prvi put opisana 1958. godine (Blois, 1958) , a kasnije je modifikovana od strane mnogih istraživača. Ovaj test je baziran na teoriji da je donor vodonika antioksidans i meri antioksidativni kapacitet biljnog ekstrakta kao "hvatača" 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala.

Mehanizam reakcije karotenoida sa DPPH• radikalom može se objasniti sledećom reakcijom:



gde je DPPH• radikal koji se redukuje do DPPH• prihvatanjem vodonika koji potiče od molekula karotenoida. Prilikom reakcije između DPPH• radikala i karotenoida boja se menja od ljubičaste do žute (Rodrigez-Amaya, 2016).

Određivanje aktivnosti "hvatanja" radikala bazirana je na radu Gawron-Gzella i sar. (2018).

Postupak rada: 105  $\mu$ L ekstrakta se pomeša sa 840  $\mu$ L 150  $\mu$ M DPPH $^{\bullet}$  rastvora. Smeša je ostavljena da stoji na sobnoj temperaturi u mraku 30 minuta a zatim je absorbance merena na 515 nm. Procenat inhibicije DPPH $^{\bullet}$  radikala izračunata je korišćenjem sledeće formule:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{(A_b - A_s)}{A_b} \cdot 100$$

gde je:

$A_b$  – apsorbanca blanka;

$A_s$  – apsorbanca biljnog ekstrakta

Sposobnost hvatanja slobodnih radikala izražena je kao ekvivalenti  $\mu$ mol Troloxa po g suve mase uzorka ( $\mu$ mol/g suve mase uzorka)

#### 4.6.2. Sposobnost redukcije Fe $^{3+}$ - FRP

Antioksidativna aktivnost ekstrakata određena je i metodom FRP (Nibir i sar., 2017).

Postupak:

U staklenu epruvetu dodato je 0,5 ml ekstrakta pomešanog sa 0,5 ml 0,2 M natrijum fosfatnog pufera (pH 6,6) i 0,5 ml 1% rastvoda kalijum fericijanida. Nakon toga, mešavina je inkubirana u vodenom kupatilu na 50 °C u trajanju od 20 min. Potom je dodato 0,5 ml 10% rastvora trihlor sircetne kiseline i mešavina je centrifugirana (4000 g) u trajanju od 5 min. Zatim je odvojen supernatant u zapremini od 1,5 ml i pomešan 1,5 ml destilovane vode i 0,3 ml 0,1% rastvora feri hlorida. Blank je sadržao sve reagense osim ekstrakta paprike (umesto ekstrakta dodata je voda). Absorbanca je merena na talasnoj dužini od 700 nm. Askorbinska kiselina je korišćena kao standard i dobijeni rezultati su izražavani kao mg askorbinske kiseline po g suve mase.

#### 4.6.3. Određivanje Kupri jon redukujuće antioksidativna moći – CUPRAC

Određivanje sposobnost redukcije Cu $^{2+}$  jona - CUPRAC (eng. Cupric Reducing Antioxidant Capacity) sprovedena je po metodi Uysal i sar. (2017).

Postupak:

U ependorf kivetu je nasuto 0,350 mL originalnog ekstrakta paprike/ajvara (dobijeni supernatant), zatim je dodato 0,350 mL CuCl<sub>2</sub>, 0,350 mL Neokuproina i 0,350 mL amonijum-acetat pufera (pH 7). Uzorci su stajali u mraku 30 min, potom centrifugirani 3 min, i onda je očitana apsorbanca na 450 nm. Merenje je ponovljeno tri puta za svaki uzorak, a rezultat je dobiten kao srednja vrednost tri merenja  $\pm$  standardna devijacija i izražen u miligramima ekvivalenata troloksa po mililitru ekstrakta (mg TE/ml E; mg TE/ml soka, mg TE/ml vina, redom).

Sve metode određivanja antioksidativnog kapaciteta, kao i ukupnih karotenoida, polifenola i flavonoida merene su na instrumentu Shimadzu UV-1800 UV-Vis Spectrophotometer (laboratorija Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu).

#### 4.7. Statička *in vitro* gastrointestinalna digestija karotenoida

Statička *in vitro* digestija je izvršena prema metodi Minekus i sar. (2014). U svrhu ove analize korišćena je sorta Una i ajvar od iste sorte. Odabir sorte Una je učinjen zbog najnižih vrednosti ukupnih karotenoida, posebno u fazama 1 i 3, kao i sporijeg toka akumulacije ključnih karotenoida u plodu,  $\beta$ -karotena,  $\beta$ -kriptoksantina i kapsantina. Liofilizovani uzorci (0,5g) su prethodno rehidratisani sa 4,5, ml destilovane vode i nakon toga podvrgnuti prvoj etapi u varenju hrane, a koja podrazumeva oralnu digestiju. U rehidratisani uzorak je dodato: 3,5 ml pljuvačne tečnosti (PT), 0,5 ml of  $\alpha$ -amilaze (1500 U/ml), 25  $\mu$ l 0,3 M CaCl<sub>2</sub> i 975  $\mu$ l destilovane vode. U ovoj fazi, uzorak je inkubiran 2 min na 37°C. Potom se pristupilo izvođenju gastrične faze digestije (digestija hrane u želudcu), tako što je u uzorak koji je prošao oralnu fazu tretmana dodato: 7,5 ml gastrične tečnosti (GT), 1,6 ml of pepsina (25000 U/ml), 5  $\mu$ l 0,3 M CaCl<sub>2</sub>, pH vrednost je podešena na 3,0 koristeći HCl, a zapremina mešavine je podešena 20 mL sa dH<sub>2</sub>O. Uzorci su potom inkubirani 2 h na 37°C koristeći orbitalni šejker podešen na 300 rot/min. Nakon završene inkubacije uzorka započeta je intestinalna faza digestije (varenje hrane u tankom crevu) dodavanjem: 11 ml intestinalne tečnosti (IT), 5 ml pankreatina (800 U/ml), 2,5 ml žučnih soli (160 mM), 40  $\mu$ l 0,3 M CaCl<sub>2</sub>, pH vrednost je podešena 7,0 sa NaOH, a finalna zapremina smeše je dopunjena do 40 mL sa dH<sub>2</sub>O. Inkubacija uzorka u intestinalnoj fazi je obavljena pod istim uslovima i u istom trajanju kao i u gastričnoj fazi. Nakon završetka kompletne digestije supernatanti koji sadrže biološki dostupnu frakciju su sakupljeni nakon centrifugiranja 20 min na 4500  $\times$  g koristeći centrifugu (5804R, Eppendorf, Hamburg, Germany), prethodno ohlađenu na (4°C). Sakupljeni supernatanti su čuvani na -80 °C do analize. Detaljni sastav pljuvačne, gastrične i intestinalne tečnosti je prikazan u **Tabeli 4**. Za utvrđivanje početnog sadržaja karotenoida (pre digestije) korišćen je aceton heksanski ekstrakt, jer se on pokazao kao najbolje ekstrakciono sredstvo. Sadržaj ukupnih karotenoida pre i posle digestija meren je spektrofotometrijski po već opisanoj metodi u poglavljiju 4.6.2.

**Tabela 4.** Sastav tečnosti korišćenih u *in vitro* digestiji

	PT	GT	IT
	pH 7,0	pH 3,0	pH 7,0
	mmol L <sup>-1</sup>	mmol L <sup>-1</sup>	mmol L <sup>-1</sup>
KCl	15,1	6,9	6,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,7	0,9	0,8
NaHCO <sub>3</sub>	13,6	25	85
NaCl	-	47,2	38,4
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,15	0,1	0,33
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,06	0,5	-
NaOH	-	-	8,4
HCl	1,1	15,6	-
*CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,75	0,075	0,3

PT – veštačka pljuvačna tečnost, GT – veštačka gastrična tečnost, IT- veštačka intestinalna tečnost. PT, GT and IT se pripremaju kao 1,25 $\times$  koncentrovani rastvori. \* Koncentracija CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O u finalnim smešama u toku digestije (dodaje se zasebno).

## **4.8. Bioaktivnost ekstrakata različitih sorti paprika i ajvara**

### **4.8.1. Inhibicija enzima $\alpha$ -amilaze**

Ekstrakcija liofilizovanih paprika kao i ajvara, obavljena je na sledeći način: 1 g liofilizovanog uzorka rastvoren je u 10 ml metanola. Tako pripremljeni rastvor stavljeni su na ultrazvučno kupatilo u trajanju od 15 minuta i nakon toga su centrifugirani 5 minuta na 13500 obrtaja u minuti. Supernatant je korišćen za analize inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze i tirozinaze kao i za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih karotenoida, polifenola i flavonoida po već opisanim metodama (poglavlja 4.6.1., 4.6.2 i 4.6.3).

Ispitivanje sposobnosti metanolnih ekstrakata liofilizovanih plodova paprike (Vrtka, Amfora, Kurtovska kapija i Una) i ajvara da inhibiraju aktivnost enzima  $\alpha$ -amilaze izvršeno je uz pomoć metode po Ahmedu i sar. (2020), uz određene modifikacije. Serija razblaženih uzoraka u fosfatnom puferu pH 6,9 je pomešana sa rastvorom enzima  $\alpha$ -amilaze (type VI-B,  $\geq 10$  units/mg solid; Sigma-Aldrich). Epruvete su stavljenе u vodeno kupatilo i vršena je inkubacija 15 minuta na 37°C. Potom je u epruvete dodato 1% rastvor skroba i inkubacija je nastavljena još 10 minuta na 37°C. Nakon dodatka bojenog reagensa, 3,5-dinitro salicilne kiseline, inkubacija je vršena još 15 minuta, na 100°C. Nakon hlađenja epruveta, reakcionali smeši je dodato 3 ml destilovane vode, a potom je merena apsorbanca na talasnoj dužini od 540 nm uz pomoć UV-VIS spektrofotometra (uniSPEC 2, LLG Labware, Turnov). Rezultat je izražen kao IC<sub>50</sub> vrednost.

Procenat inhibicije je računat prema sledećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{(Ak - Au)}{Ak} \cdot 100$$

gde je:

Ak-predstavlja apsorbancu kontrole

Au-apssorbancu uzorka različitih koncentracija.

### **4.8.2. Inhibicija enzima tirozinaze**

Ispitivanje sposobnosti metanolnih ekstrakata liofilizovanih plodova paprike u finalnoj fazi sazrevanja sorti Vrtka, Amfora, Kurtovska kapija i Una kao i ajvara od istih sorti da inhibiraju aktivnost enzima tirozinaze izvršeno je uz pomoć modifikovane metode po No i sar. (1999). Serija razblaženih uzoraka u fosfatnom puferu pH 6,6 je pomešana sa rastvorom enzima tirozinaze ( $\geq 1000$  units/mg solid; Sigma-Aldrich) i fosfatnim puferom pH 6,6. Reakcionali smeši je inkubirana 10 minuta na 30°C. Po dodatku supstrata, L-tirozina, vršena je inkubacija još 30 minuta na 30°C. Apsorbanca rastvora u mikrotitracijskim pločama je merena na 490 nm, uz pomoć ELISA čitača (BIOTEK, USA, ELx800 Absorbance Microplate Reader). Rezultat je izražen kao IC<sub>50</sub> vrednost.

Procenat inhibicije je računat prema sledećoj formuli:

$$\% \text{ Inhibicije} = \frac{(Ak - Au)}{Ak} \cdot 100$$

gde je:

Ak-predstavlja apsorbancu kontrole

Au-apssorbancu uzorka različitih koncentracija

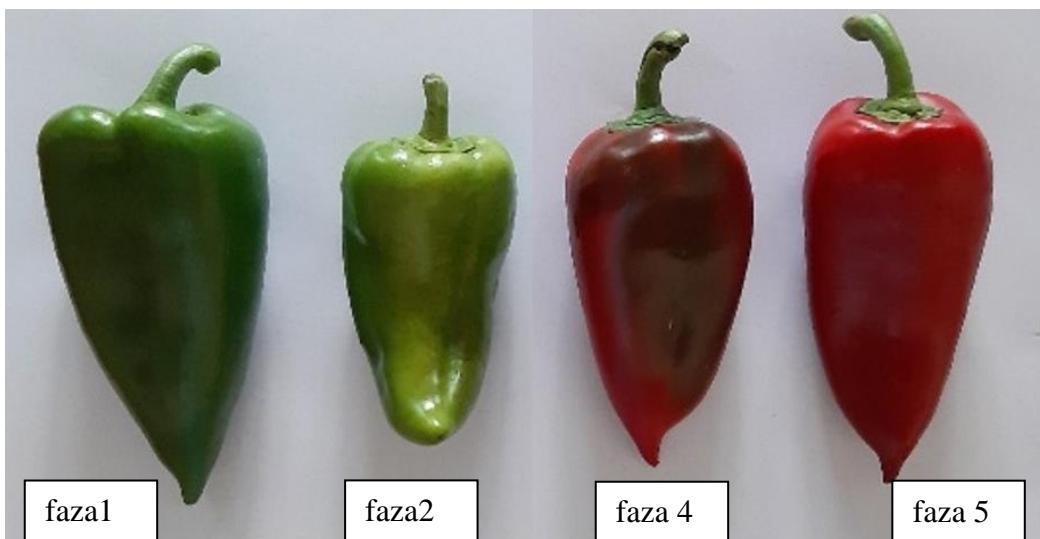
## **4.9. Analiza karotenoida Ramanovom spektroskopijom**

Metoda Ramanove spektroskopije je korišćena za utvrđivanje stepena zrelosti paprike kao i za određivanje sorte paprike u punoj fiziološkoj zrelosti. U tu svrhu korišćen je instrument Horiba Jobin Yvon (Palaiseau, France) sa Olimpus BX 41 mikroskopom (Olympus, Tokyo, Japan), koji koristi LabSpec 6.0 softver. Instrument poseduje lasere talasne dužine 532 i 785 nm. Tokom merenja, korišćen je laser od 532 nm, objektiv 100 LWD. Ramanovo rasejanje je detektovano CCD (charge-coupled-device) detektorom, a rezolucija je bila  $3 \text{ cm}^{-1}$ . Kalibracija instrumenta je obavljena silicijumom koji pokazuje traku na 520, 47  $\text{cm}^{-1}$ .

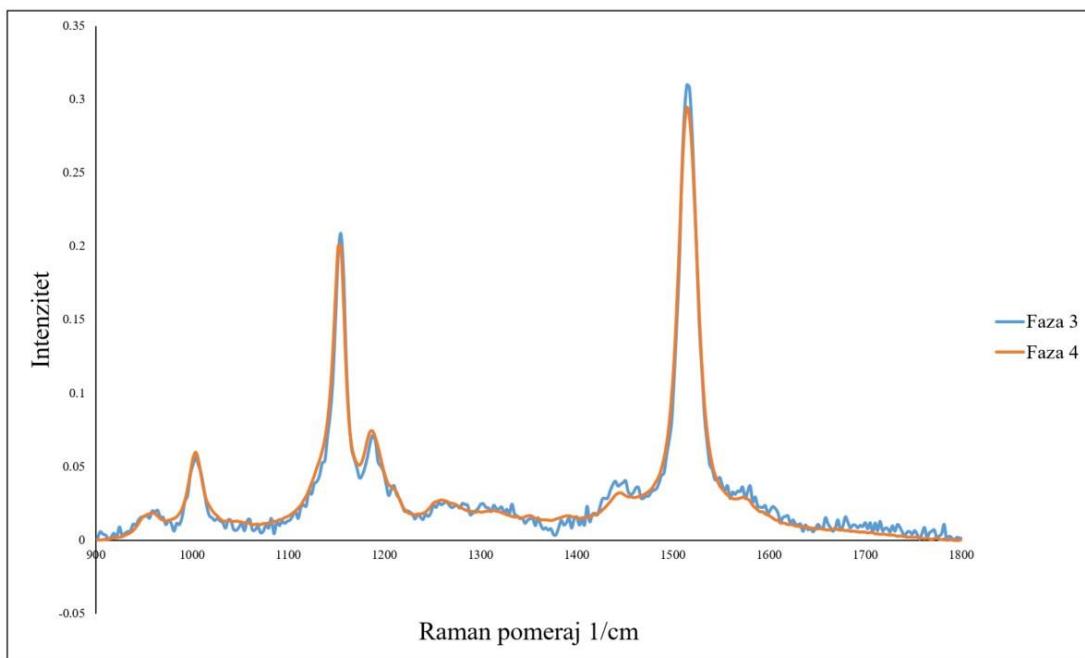
Pored toga, metoda Ramanovih spektara je korišćena i za kvantifikaciju ukupnih. U tu svrhu korišćen je Raman mikrospektroskop tipa Witec Alpha 300R (Germany) opremljen konfokalnim Zeiss mikroskopom (Zeiss, Germany). Instrument poseduje lasere talasne dužine 532 i 785 nm. U ovom istraživanju je korišćen e laser od 532 nm, i objektiv 10x. Ramanovo rasejanje je detektovano CCD (charge-coupled-device) detektorom, a rezolucija je bila  $3 \text{ cm}^{-1}$ . Kalibracija instrumenta je obavljena silicijumom koji pokazuje traku na 520, 47  $\text{cm}^{-1}$ .

### **4.9.1. Primena hemometrijskog diskriminacionog modela u cilju prepoznavanja faze zrenja crvene paprike**

U cilju ispitivanja mogućnosti primene Ramanove spektroskopije u detekciji faze zrenja paprike, kao model sorta odabrana je Kurtovska kapija u četiri faze zrenja i to zelena (faza 1), zeleno-mrka (faza 2), crvena (faza 4) i tamno crvena (faza 5) (**Slika 13**). Razlog zašto su uzete ove 4 faze je zato što su faze 3 i 4 imale skoro identične spektre te ih nije moguće bilo razlikovati (**Slika 14**).



**Slika 13.** Uzorci paprike sorte Kurtovska kapija u različitim fazama sazrevanja plodova (faza 1, faza 2, faza 4 i faza 5)



**Slika 14.** Spektri ploda sorte Kurtovska kapija u fazama sazrevanja f3 i f4

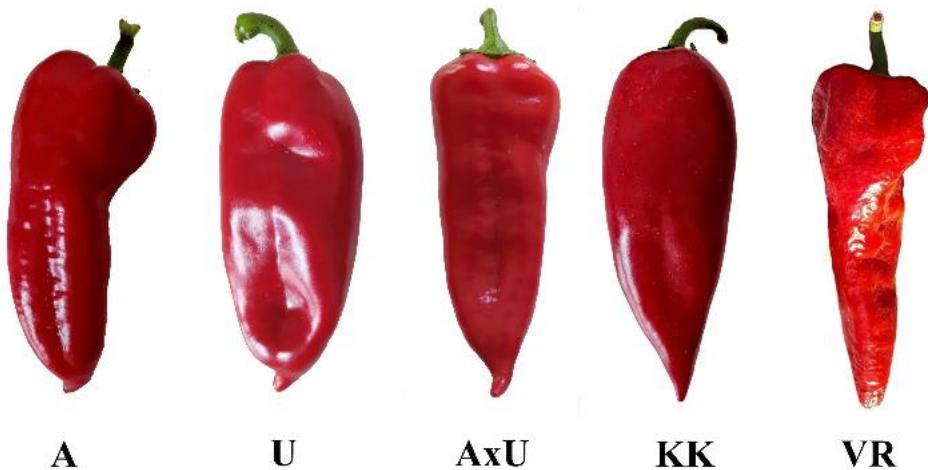
Kada je u pitanju određivanje stepena zrelosti, snimljeno je 40 spektara po fazi (ukupno 160 spektara). Dobijeni spektri su organizovani u matricu koja se sastojala od 160 redova (objekata posmatranja odnosno uzoraka – svaka faza po 40 ponavljanja) i 334 kolone (varijable-talasni brojevi). Zbog kompleksnosti biološkog sistema koji se ispitivao primjenjeni su korekcija bazne linije i normalizacija na jedinični vektor kao metode za prethodnu obradu podataka. Nakon toga, primenjena je metoda analize glavnih komponenti (*eng.* Principal Component Analysis – PCA) da bi se redukovao broj podataka varijabli (talasnih brojeva).

Glavne komponente dobijene PCA analizom predstavljale su input za klasifikacione metode: PCA-LDA, PLS-DA i SIMCA. Da bi se sprovelo modelovanje, podaci su podeljeni u dve grupe: trening set (75% podataka) i test set (25% podataka). Trening set je služio za izgradnju modela dok je test set služi za njegovu validaciju.

Analiza varianse (ANOVA) primenjena je u cilju ispitivanja statistički značajnih razlika u intenzitetu ispitivanih traka u različitim fazama zrenja. Naknadna poređenja sprovedena su korišćnjem Dankanovog testa. U svim testiranjima je korišćen nivo značajnosti od 5%.

#### 4.9.2. Primena rezultata Ramanove spektroskopije u razvijanju hemometrijskog diskriminacionog modela u cilju prepoznavanja genotipova paprike u fazi pune zrelosti

U svrhu ispitivanja mogućnosti primene Ramanove spektroskopije za prepoznavanje genotipa paprike u fiziološkoj fazi pune zrelosti (**Slika 15**) odabранo je 10 plodova od svake sorte a za snimanje spektara isečen je skalpelom komadić dimenzija 2x2 cm na ekvatorijalnoj poziciji ploda. Dodatno je u ovo istraživanje uključena linija dobijena ukrštanjem Amfore i Une (AxU). Uvođenjem linije AxU u ovo istraživanje predstavlja kontrolnu tačku osetljivosti Ramanove spektroskopije u smislu prepoznavanje odgovorajuće sorte (odnosno linije) paprike.



**Slika 15.** Uzorci korišćeni u eksperimentu: A-Amfora; U-Una; AxU-Amfora x Una; KK-Kurtovska kapija; VR-Vrtka (Kolašinac i sar., 2022)

Sirovi spektri su organizovani u matricu sastavljenu od 250 redova (predstavljaju ispitivane uzorce – svaki uzorak po 50 ponavljanja) i 334 kolone (variabile – talasni brojevi). Sirovi spektri su prethodno obrađeni na nekoliko načina kombinacijom različitih matematičkih metoda:

1. korekcija bazne linije + normalizacija jediničnim vektorom;
2. korekcija bazne linije + normalizacija jediničnim vektorom + prvi izvod funkcije Savitzky-Golay metodom;
3. korekcija bazne linije + normalizacija jediničnim vektorom + drugi izvod funkcije Savitzky-Golay metodom;

Nakon obrade, spektri su 'dorađeni' Savitzky-Golay metodom (eng. smoothing) sa 13 tačaka a zatim je sprovedena analiza glavnih komponenti da bi se redukovao broj varijabli. Analiza glavnih komponenti je redukovala dimenzionalnost prostora (smanjila broj varijabli-talasnih brojeva) tako da je kao rezultat dobijen manji broj međusobno nekorelisanih varijabli (princip ortogonalnosti) odnosno glavnih komponenti.

Glavne komponente su predstavljale input za primenu hemometrijskih klasifikacionih metoda PCA-LDA (eng. Principal Component Analysis-Linear Discriminant Analysis), QDA (eng. Quadratic Discriminant Analysis), i PLS-DA (eng. Partial Least Square – Discriminant Analysis).

Da bi se sprovela multivarijaciona klasifikaciona analiza, svi podaci su podeljeni u dva seta: trening set (75% podataka) i test set (25% podataka). Trening set je služio za izgradnju modela za klasifikaciju uzorka paprike dok je test set služio za njihovu validaciju.

#### **4.9.3. Primena Ramanove spektroskopije za kvantifikaciju ukupnih karotenoida u fazi pune zrelosti**

U cilju formiranja modela za kvantifikaciju, kao model molekuli izabran je  $\beta$ -karoten s obzirom da je najzastupljeniji karoten u fazi pune zrelosti (faza 5). Radi formiranja regresinog modela, napravljena je serija standardnih rastvora  $\beta$ -karotena rastvorenih u smeši acetona: heksan (1:1, v/v) sledećih koncentracija: 1320 ppm, 660 ppm, 330 ppm, 150 ppm, 50 ppm, 30 ppm, 20 ppm, 10 ppm, 5 ppm i 2,5 ppm.

Uzorci na kojima je ispitivan model su Kurtovska kapija i Amfora u fazu pune fiziološke zrelosti kao i ajvar od istih sorti. Ove sorte su odabrane kao model sorte i one se najčešće gaje na području naše zemlje u cilju dobijanja kvalitetne sirovine za spravljanje ajvara. Uzorci i serije standarnih rastvora su potom preneti u kvarcne mikrokapilare a zatim su snimani Ramanovi spektri.

Da bi se održala ponovljivost dobijenih spektara, spektri su snimani 3 puta u periodu od 9 dana (svaki treći dan) pod identičnim uslovima (talasna dužina lasera, snaga lasera, dužina eksponacije, temperatura, matrix uzorka). Da ne bi došlo do degradacije standarda i uzorka, ekstrakti paprike su čuvani u na temperaturi od -80 °C (ULT 250, Nordic Lab).

Sirovi spektri organizovani su u matricu koje sa sastojala iz 21 reda (objekata) i 806 kolona (varijabli – talasnih brojeva). Spektri su obrađeni sa ciljem nenarušavanja odnosa dobijenih intenziteta. Nakon toga primjenjen je regresioni model MLR (eng. Multiple Linear Regression).

#### **4.10. Softverski paketi korišćeni prilikom statističke obrade podataka**

Deskriptivna statistika, regresiona analiza kao i ispitivanje postojanja razlika između prosečnih intenziteta odabranih traka Ramanovih spektara (ANOVA) sprovedeni su u softveru SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL)

Statistička analiza Ramanovih spektara koja je uključivala obradu spektara u vidu smutovanja i korekcija bazne linije, zatim redukciju broja podataka (PCA analiza), kao i modelovanje, sprovedena je u softveru Unscrambler (The Unscrambler X version 10.4 (Camo Software, Oslo, Norway).

Konstrukcija svih grafičkih prikaza obavljena je u softveru XLSTAT (version 2014, Addinsoft), dok je grafički prikaz kalibracione krive za kvantifikaciju karotenoida Ramanovom spektroskopijom izvršen uz pomoć softvera Unscrambler.

## 5. Rezultati i diskusija

### 5.1. Analiza osnovnih morfoloških parametara ploda paprike u fazi fiziološke zrelosti

Analiza osnovnih morfoloških parametara paprike u fazi fiziološke zrelosti sprovedena je u cilju ispitivanja razlika između sorti u pogledu ispitivanih parametara, kao i potencijalne veze kako između između samih parametara tako i sa količinom ukupnih karotenoida.

Najveće prosečne vrednosti za masu ploda (145,07 cm), dužinu ploda (14,52 cm), širinu ploda (7,18 cm) i debljinu perikarpa (5,27 cm) zabeležene su kod sorte Amfora dok je kod iste sorte zabeležena najniža vrednost briksa (6,34). Sa druge strane, sorta Vrtka je zabeležila najniže vrednosti za pomenute parametre osim za vrednost briksa koja je bila najviša i iznosila je 9,40 cm (**Tabela 5**). Generalno posmatrano, masa ploda je bila u pozitivnoj korelaciji sa dužinom ploda, širinom ploda i debljinom perikarpa, što je i očekivano s obzirom da sa rastom dužine, širine ploda kao i debljine perikarpa, raste i masa ploda. Sa druge strane, masa ploda je u negativnoj korelaciji sa vrednostima briksa (**Tabela 6**).

Rezultati analize varianse (**Prilog 1**) pokazali su da je efekat sorte statistički značajan ( $p<0,05$ ) a rezultati Dankanovog post hoc testa pokazali su između kojih sorti postoji statistički značajna razlika u morfološkim karakteristikama ploda (**Tabela 5**).

**Tabela 5.** Prosečne vrednosti ispitivanih parametara  $\pm$  standardna devijacija (n=15).

	Masa ploda (g)	Dužina ploda (cm)	Širina ploda (cm)	Debljina perikarpa (mm)	Briks
<b>Amfora</b>	145,07 $\pm$ 21,73e	14,52 $\pm$ 1,64b	7,18 $\pm$ 0,54c	5,27 $\pm$ 0,81c	6,34 $\pm$ 0,51a
<b>Kurtovska kapija</b>	80,13 $\pm$ 8,94c	14,11 $\pm$ 1,10b	5,39 $\pm$ 0,43b	4,21 $\pm$ 0,85a,b	6,92 $\pm$ 0,65b
<b>Amfora x Una</b>	68,01 $\pm$ 13,12b	13,79 $\pm$ 1,45b	4,61 $\pm$ 0,56a	4,21 $\pm$ 0,95a,b	8,75 $\pm$ 0,39c
<b>Vrtka</b>	40,00 $\pm$ 13,32a	11,9 $\pm$ 71,63a	4,57 $\pm$ 0,15a	3,74 $\pm$ 0,19a	9,40 $\pm$ 0,16d
<b>Una</b>	102,33 $\pm$ 16,38d	14,01 $\pm$ 1,29c	5,80 $\pm$ 0,38b	4,38 $\pm$ 0,88b	6,59 $\pm$ 0,15a

Vrednosti označene malim latiničnim slovom u okviru iste kolone su statistički značajno različite

Naknadnim poređenjem sredina zabeleženo je da se sorta Vrtka ima statistički značajno niže vrednosti od svih ostalih sorti u masi ploda, dužini ploda i vrednosti briksa. Kada je u pitanju širina ploda i debljina perikarpa, Vrtka se statistički značajno razlikuje od sorti Amfora i Una (**Tabela 5**).

Sorta Kurtovska kapija pokazuje da se statistički značajno razlikuje od svih ostalih sorti kada su u pitanju parametri: masa ploda, širina ploda i vrednost briksa. Sa druge strane, vrednosti dužine ploda i debljine perikarpa se statistički značajno razlikuju od sorte Vrtka odnosno Amfora i Una (**Tabela 5**).

Sorta Amfora pokazala je statistički značajno odstupanje od svih sorti u vrednostima mase ploda, širine ploda i vrednosti briksa. Debljina perikarpa se statistički značajno razlikovala od sorti Kurtovska kapija, Vrtka i linije Amfora x Una dok se dužina ploda statistički značajno razlikovala samo od sorte Vrtka (**Tabela 5**).

Sorta Una se statistički značajno razlikovala od svih ispitivanih uzoraka u masi ploda, širini ploda i vrednosti briksa. Kada je u pitanju debljina perikarpa vrednosti su se statistički značajno razlikovale od vrednosti zabeleženih kod sorti Kurtovska kapija, Una i linije Amfora x Una. Dužina ploda se statistički značajno razlikovala samo od sorte Vrtka (**Tabela 5**).

Kao što je poznato, briks predstavlja meru zrelosti plodova koja se izražava kao mera rastvorljivih šećera u čelijskom soku i zavisi od količine vlage u plodu, sorte, stepena zrelosti kao i od veličine ploda (Jauregui et al., 1999). Pojedini rezultati su pokazali da sa veličinom ploda raste vrednost briksa. Takođe, Martínez i sar. (2007) su pokazali da paprike različitih sorti u istoj fazi zrelosti a sa različitom masom pokazuju veću vrednost briksa kod plodova koji imaju veću masu. Suprotno ovim istraživanjima, Ibarbia i Lambeth (1971) pokazali su da sa rastom mase ploda paradajza opada vrednost briksa.

Kao što je očekivano, masa ploda je u pozitivnoj korelaciji sa širinom ploda kao i debljinom perikarpa kod svih sorti osim kod sorte Vrtka. Sa druge strane, kod pojedinih sorti, masa ploda je u negativnoj korelaciji sa vrednostima briksa što se može dovesti u vezi sa specifičnostima samih sorti (**Tabela 6**).

**Tabela 6.** Korelace matrice između ispitivanih parametara, po sortama.

Sorta/linija	Ispitivani parametri	Masa ploda (g)	Duzina ploda (cm)	Sirina ploda (cm)	Debljina perikarpa (mm)	Briks (°Brix)
Amfora	masa ploda (g)	1	-	-	-	
	Duzina ploda (cm)	0,09	1	-	-	-
	Sirina ploda (cm)	0,52	0,11	1		
	Debljina perikarpa (mm)	0,73	-0,25	0,35	1	
	Brix	-0,15	-0,41	-0,18	0,12	1
Kurtovska kapija	masa ploda (g)	1				
	Duzina ploda (cm)	0,30	1			
	Sirina ploda (cm)	0,80	0,18	1		
	Debljina perikarpa (mm)	0,59	-0,26	0,50	1	
	Brix	-0,04	0,27	0,052	-0,67	1
Amfora Una	masa ploda (g)	1				
	Duzina ploda (cm)	0,64	1			
	Sirina ploda (cm)	0,80	0,47	1		
	Debljina perikarpa (mm)	0,62	0,43	0,45	1	
	Brix	-0,68	-0,60	-0,38	-0,59	1
Vrtka	masa ploda (g)	1				
	Duzina ploda (cm)	-0,85	1			
	Sirina ploda (cm)	0,36	-0,13	1		
	Debljina perikarpa (mm)	-0,07	0,18	0,34	1	
	Brix	-0,51	0,42	-0,26	-0,25	1
Una	masa ploda (g)	1				
	Duzina ploda (cm)	-0,15	1			
	Sirina ploda (cm)	0,61	-0,13	1		
	Debljina perikarpa (mm)	0,76	-0,03	0,44	1	
	Brix	-0,19	0,22	-0,22	0,04	1

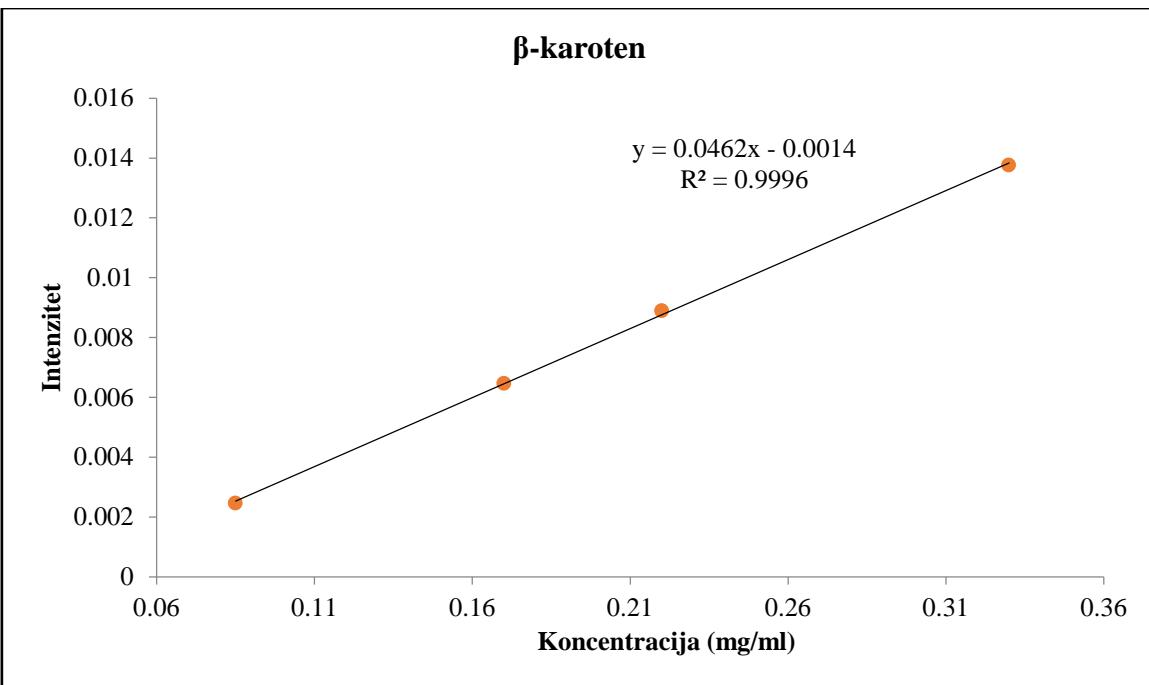
## 5.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza karotenoida ekstrakata paprike i ajvara HPTLC metodom

Kvalitativna i kvantitativna analiza karotenoida plodova paprike sprovedena je korišćenjem tankoslojne hromatografije visokih performansi – HPTLC. Pripremljeni ekstrakti su odvojeni na TLC pločama i uočeno je prisustvo karotenoida u svim ispitivanim sortama paprike kao i u ajvaru. Analizom dobijenih traka odnosno njihovim upoređivanjem sa standardima detektovani su  $\beta$ -karoten, kapsantin,  $\beta$ -kriptoksantin, lutein i zeaksantin. S obzirom da lutein i zeaksantin imaju vrlo sličnu Rf vrednost, njihovi rezultati su ovom prilikom analizirani zajedno (**Slika 16**).

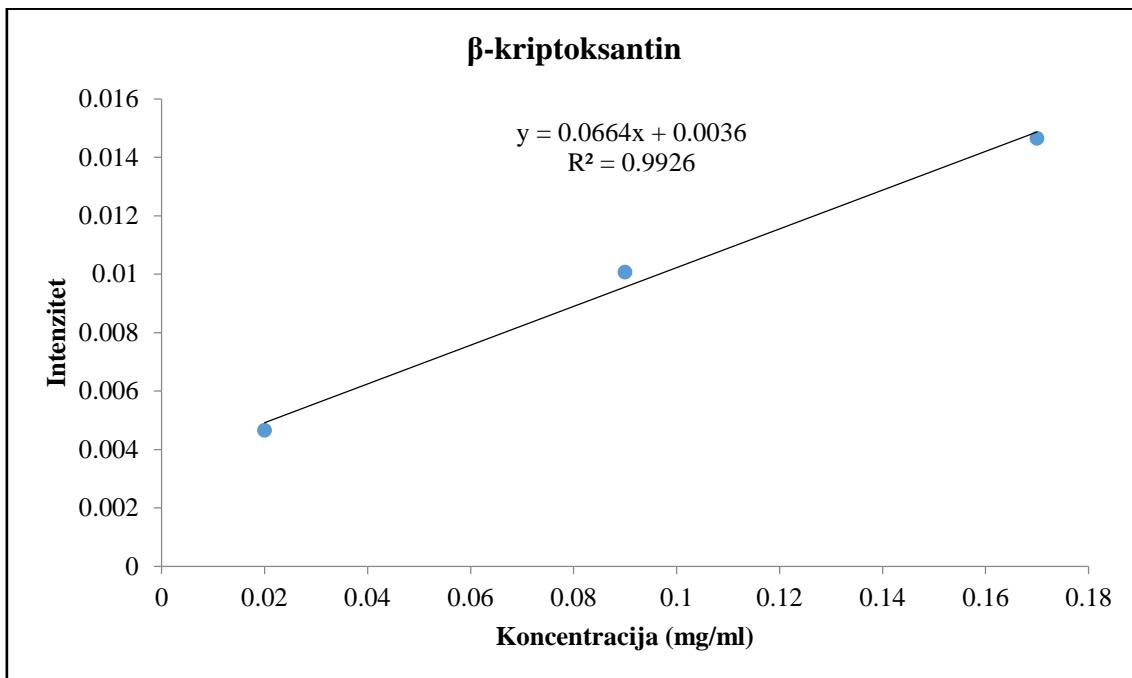
Kvantifikacija navedenih jedinjenja izvršrena je na osnovu kalibracione krive koja je formirana za koncentracije u opsegu od 0,085 do 0,033 mg/ml (**Slike 17-20**). Opseg koncentracija za formiranje standarnih krivih za pojedinačne karotenoida utvđen je prethodnim probama na jednom nasumično odabranom uzorku ekstrakata. Rezultati kvantifikacije prikazani su u Treba napomenuti da je **procentualno opadanje količine ukupnih ispitivanih karotenoida** u tradicionalnom proizvodu (ajvaru) u odnosu na fazu 5 najmanje kod sorte **Kurtovska kapija (1,9 %)**, Vrtka (16,28 %) i Amfora (19,53 %) dok je najveće opadanje zabeleženo kod sorte **Una (66,98 %)**. Ovi rezultati ukazuju na to da ajvar treba spravljati od sorte Kurtovska kapija kako bi se sačuvala značajna količina ovih vrednih bioaktivnih jedinjenja. Ovde takođe treba napomenuti da je procentualno opadanje ukupnih karotenoida u ajvaru u odnosu na fazu 5 u veoma jakoj indirektnoj (negativnoj) korelaciji sa količinom  $\beta$ -karotena u fazi 5 ( $r=0,9536$ ,  $r^2=0,9094$ ) (**Slika 22**). Preciznije, sorte koje su imale veći sadržaj  $\beta$ -karotena u fazi 5 imale su manji pad ukupnih karotenoida u ajvaru. Trake standarda  $\beta$ -karotena,  $\beta$ -kriptoksantina, luteina/zeaksantina i kapsantina imale su sledeće Rf vrednosti (vrednosti retencionog faktora): 0,87, 0,497, 0,111 i 0,054. Kvalitativna analiza sprovedena je poređenjem ispitvanih uzoraka sa Rf vrednostima ispitivanih standarda.



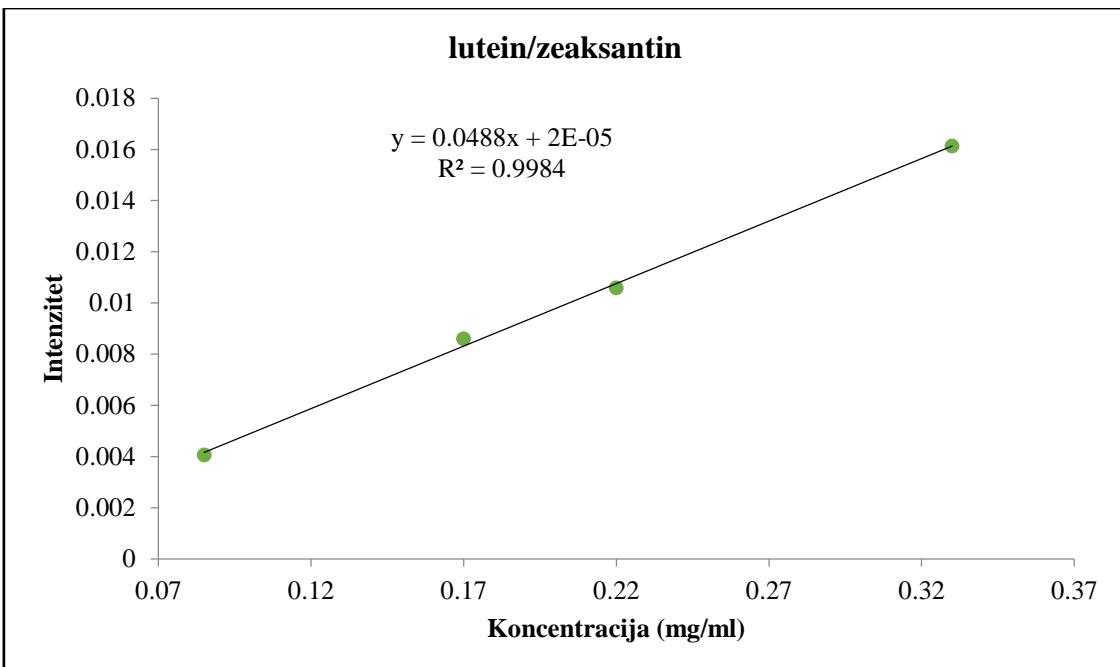
**Slika 16.** Trake standarda  $\beta$ -karotena,  $\beta$ -kriptoksantina, luteina/zeaksantina i kapsantina dobijenih HPTLC metodom



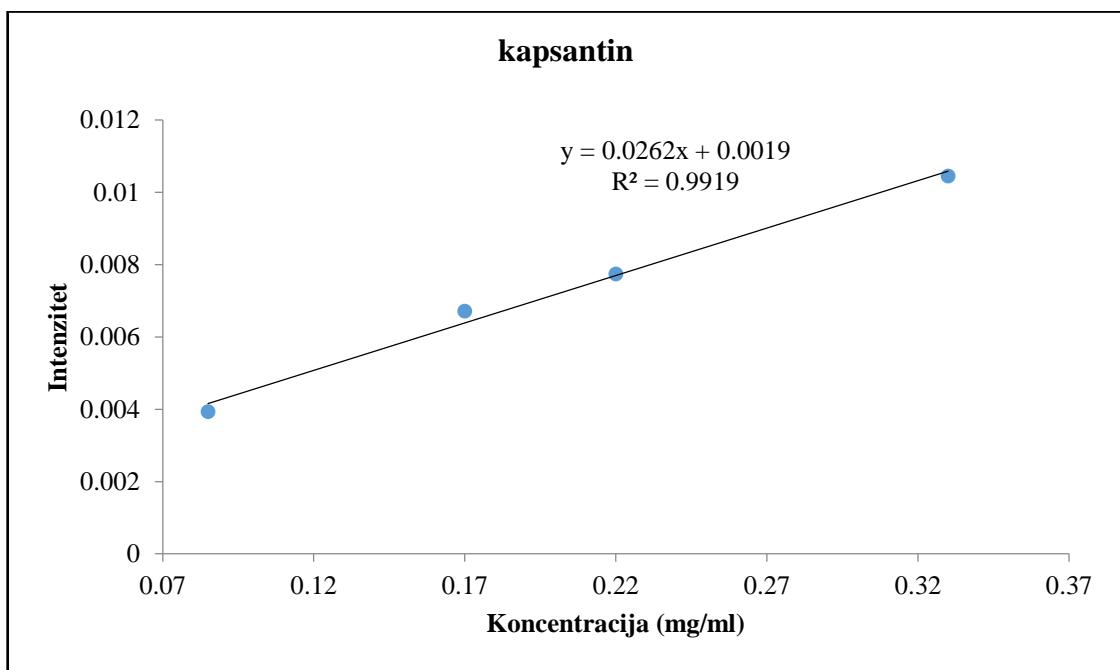
Slika 17. Kalibraciona kriva za određivanje koncentracije  $\beta$ -karotena HPTLC metodom



Slika 18. Kalibraciona kriva za određivanje koncentracije  $\beta$ -criptoksantina HPTLC metodom



**Slika 19.** Kalibraciona kriva za određivanje koncentracije luteina/zeaksantina dobijena primenom HPTLC metode



**Slika 20.** Standardna kriva za određivanje koncentracije kapsantina HPTLC metodom

Rezultati hromatografskog razdvajanja ispitivanih uzoraka prikazani su na **Slikama 19 i 20**. Može se zaključiti da su karotenoidi prisutni u svim ispitivanim uzorcima i u zavisnosti od sorte i faze sazrevanja, trake su manje ili više intenzivne, što ukazuje na povećanje ili smanjenje količine ispitivanih jedinjenja.

**Tabela 7.** Rezultati kvantifikacije karotenoida HPTLC metodom

Sorta	Faza sazrevanja	Ispitivani karotenoidi				Ukupna količina ispitivanih karotenoida (kapsantin+lutein/zeaksantin+β-kriptoksanthin+β-karoten (g/100g, % SM)	Promena količine ukupnih ispitivanih karotenoida kroz faze sazrevanja i u proizvodu u odnosu na početnu fazu – fazu 1 (%)	Promena količine ukupnih ispitivanih karotenoida kroz faze sazrevanja i u proizvodu u odnosu na prethodnu fazu (%)
		Kapsantin (g/100 g SM, % ± SD)	lutein/zeaksantin (g/100 g SM, % ± SD)	β-kriptoksanthin (g/100 g SM, % ± SD)	β-karoten (g/100 g SM, % ± SD)			
Kurtovska kapija	1	0,1312±0,0589 <sup>a</sup>	0,0334±0,0138a	n.d.	0,0900±0,0135a	0,2547	0,00	0,00
	2	0,1333±0,0025 <sup>a</sup>	0,0507±0,00349b	n.d.	0,1274±0,01bc	0,3114	22,26	22,26
	3	0,1275±0,0367 <sup>a,A</sup>	0,0360±0,0181a	n.d.	0,1176±0,0108b	0,2811	10,37	-9,73
	4	0,1375±0,0311 <sup>a</sup>	0,1129±0,0280c	n.d.	0,4728±0,1103d	0,7232	183,94	157,27
	5	0,3570±0,0812 <sup>c,A</sup>	0,1523±0,0372e	0,0522±0,0094a	0,9912±0,14350e	1,5527	509,62	114,70
	ajvar	0,3057±0,0838 <sup>b,A</sup>	0,1362±0,0306d	0,0415±0,0118b	0,98399±0,1259e	1,5232	498,04	-1,90
Amfora	1	n.d.	0,0685±0,0086b	n.d.	0,1011±0,0140b	0,1696	0,00	0,00
	3	0,0708±0,0075 <sup>a,B</sup>	0,0210±0,0057a	n.d.	0,0908±0,0076a	0,1806	6,49	6,49
	5	0,5057±0,0979 <sup>c,B</sup>	0,1541±0,0386d	0,0759±0,0279b	0,5405±0,1390c	1,2761	652,42	606,59
	ajvar	0,3495±0,1271 <sup>b,A</sup>	0,1203±0,0431c	0,0265±0,0142a	0,5305±0,0402 c	1,0269	505,48	-19,53
Una	1	n.d.	0,0152±0,0011a	n.d.	n.d.	0,0152	0,00	0,00
	3	n.d.	0,0162±0,0051b	n.d.	n.d.	0,0162	6,58	6,58
	5	0,1142±0,0693	0,0841±0,0467d	0,0129±0,0072	0,1680±0,0232b	0,3792	2394,74	2240,74
	ajvar	n.d.	0,03313±0,0938c	n.d.	0,0920±0,0080a	0,1252	723,68	-66,98
Vrtka	1	n.d.	0,0282±0,02842	n.d.	n.d.	0,0282	0,00	0,00
	3	0,2621±0,0395 <sup>a,C</sup>	0,0877±0,0257a	n.d.	0,1240±0,0154a	0,4739	1580,50	1580,50
	5	0,5097±0,0397 <sup>c,B</sup>	0,1624±0,0172b	0,0811±0,0362b	0,7221±0,0702c	1,4752	5131,21	211,29
	ajvar	0,45576±0,1784 <sup>b,B</sup>	0,162398±0,0500b	0,071103±0,0314a	0,545811±0,0537b	1,2351	4279,79	-16,28

Faze koje dele mala slova se ne razlikuju statistički značajno u pogledu sadržaja ispitivanih jedinjenja

Faze koje dele ista velika slova se ne razlikuju statistički značajno u pogledu sadržaja ispitivanih jedinjenja

Mala slova su koriscena za označanje statistički značajnih razlika analiziranih jedinjenja između faza sazrevanja u okviru iste sorte. Velika slova su koriscena za označavanje statistički značajnih razlika analiziranih jedinjenja između sorti u istoj fazi sazrevanja

U svim testiranjima je koriscen nivo značajnosti od 5%; n.d. - nije detektovano; SD – standardna devijacija; SM-suva masa.

**Tabela 7** prikazuje količinu pojedinačnih i ukupnih karotenoida (g/100g) u ekstraktima ispitivanih genotipova paprike i njihovom tradicionalnom proizvodu. Prikazani su i nivoi promene količine karotenoida tokom razvića ploda, praćeni u odnosu na početnu , kao i u odnosu na prethodnu fazu sazrevanja, izraženi u procentima.

Rezultati HPTLC analize pokazali su da **kapsantin** uglavnom kod sorti Amfora i Vrtka počinje da se javlja od faze 3, a da mu je maksimalna koncentracija u finalnoj fazi sazrevanja (faza 5). Količina kapsantina kreće se u opsegu od 0,0708 g/100g (kod sorte Amfora u fazi 3) do 0,5097 g/100g (kod sorte Vrtka u fazi 5). Njegova količina opada u ajvaru u svim ispitivanim sortama. Kada je u pitanju **lutein/zeaksantin**, rezultati većinom pokazuju trend rasta i, time najveću koncentraciju pokazanu u finalnoj fazi sazrevanja (faza 5). Količina luteina/zeksantina kreće se u opsegu od 0,0152 g/100g (kod sorte Una u fazi 1) do 1,624 g/100g (kod sorte Vrtka u fazi 5). Količina luteina/zeaksantina opada u ajvaru u svim ispitivanim sortama u odnosu na vrednosti zabeležene u fazi 5. Rezultati ispitivanja količine **β-kriptoksanina** pokazali su da se ovaj karotenoid prvi put detektuje u fazi 5 kod svih ispitivanih genotipova. Količina ovog karotenoida kreće se u opsegu od 0,0129g/100g (kod sorte Una) do 0,0811 (kod sorte Vrtka). Količina β-kriptoksanina u ajvaru opada u odnosu na fazu 5, kod svih ispitivanih genotipova. Količina **β-karotena** raste sa sazrevanjem i najveća količina je u poslednjoj fazi (faza 5). Rezultati pokazuju da se količina ovog karotenoida kreće u opsegu od 0,0900 g/100g (kod sorte Kurtovska kapija u fazi 1) do 0,9912 g/100g (kod sorte Kurtovska kapija u fazi 5). Količina ovog karotenoida u ajvaru kod svih ispitivanih sorti opada u odnosu na vrednosti zabeležene u fazi 5.

Posmatranjem karotenoidnog profila sorte **Kurtovska kapija** zaključuje se da se količina kapsantina u prve četiri faze sazrevanja ne menja statistički značajno dok u fazi fiziološke zrelosti dolazi do njegovog povećanog akumuliranja do količine od 0,3570 g/100g. Količina luteina/zeaksantina se povećava nekoliko puta počev od faze tehnološke zrelosti, faza označena brojem 1 (0,03344 g/100g) do faze fiziološke zrelosti, faza označena brojem 5 (0,1523 g/100g). Količina β-karotena takođe raste više od 10 puta sa sazrevanjem i u fazi fiziološke zrelosti iznosi 0,9912 g/100g dok β-kriptoksanin izostaje u prve četiri faze i prvi put se javlja u fazi 5 u količini od 0,0522 g/100g. Kada je u pitanju ajvar, količina kapsantina, luteina/zeaksantina i β-kriptoksanina je u statistički značajnom padu u odnosu na fazu fiziološke zrelosti (faza 5) dok količina β-karotena nije statistički značajno različita u ajvaru u odnosu na fazu 5 (**Tabela 7** i **Slika 21**).

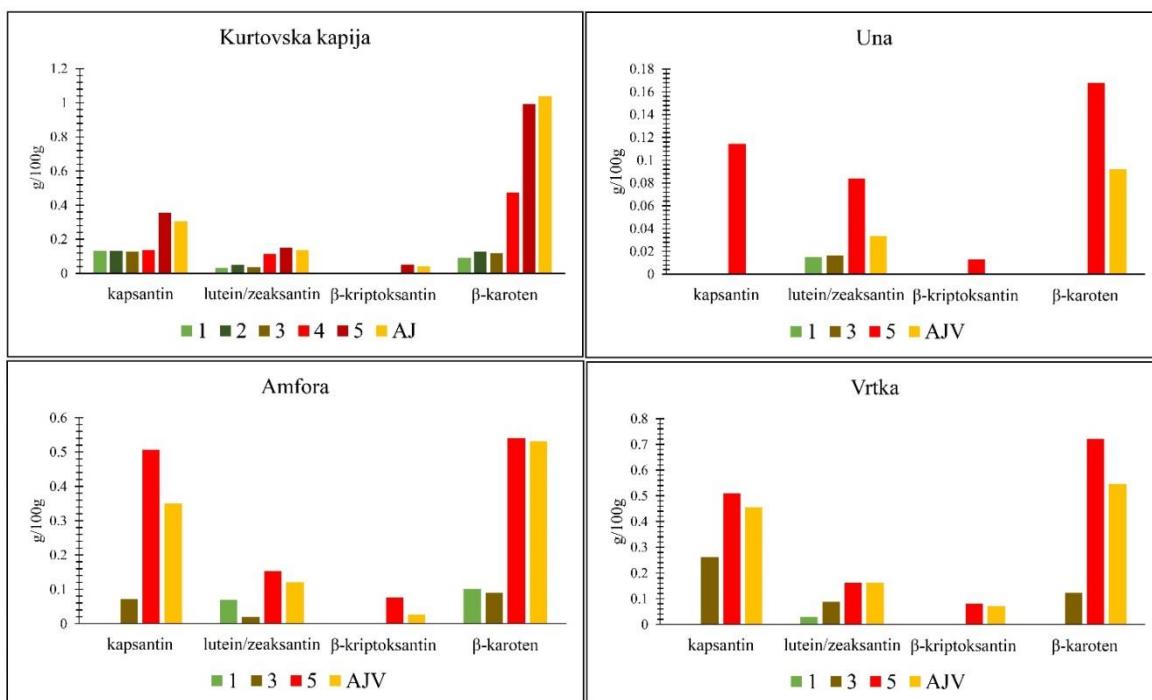
Karotenoidni profil sorte **Amfora** karakteriše potpuno odsustvo kapsantina i β-kriptoksanina u fazi tehnološke zrelosti (faza 1) dok je količina luteina/zeaksantina i β karotena iznosila 0,0685 odnosno 0,1011 g/100g. Poređenjem faze tehnološke i fiziološke zrelosti, može se zaključiti da dolazi do statistički značajnog povećanja količine svih ispitivanih karotenoida. Analiza karotenoida u ekstraktu ajvara pokazala je statistički značajno opadanje svih ispitivanih karotenoida (**Tabela 7** i **Slika 21**) osim β-karotena gde pad nije bio statistički značajan.

Karotenoidni profil sorte **Una** karakteriše odsustvo kapsantina, β kriptoksanina i β karotena sve do faze 5 kada se akumuliraju u značajnim količinama (kapsantin 0,1142 g/100g; lutein/zeaksantin 0,0841 g/100g; β-kriptoksanin 0,0129 g/100g; β karoten 0,1680 g/100g). Međutim nakon termičke obrade (spravljanja ajvara) dolazi do statistički značajnog opadanja količine β-karotena i luteina/zeaksantina dok kapsantin i β-kriptoksanin nisu detektovani (**Tabela 7** i **Slika 21**).

Karotenoidni profil sorte **Vrtka** odlikuje se odusustvom kapsantina, β-kriptoksanina i β- karotena u tehnološkoj fazi sazrevanja (faza 1) dok se lutein/zeaksantin nalaze u količini od 0,0282 g/100g. Tokom sazrevanja količine svih ispitivanih karotenoida rastu dok se tokom prerade njihova količina delimično redukuje (**Tabela 7** i **Slika 21**). Količina kapsantina u fazi 3 iznosi 0,2621 g/100g dok se u fazi 5 statistički značajno povećava i iznosi 0,5097 g/100g.

Sa druge strane, prilikom spravljanja ajvara, količina statistički značajno opada i iznosi 0,4558 g/100g. Količina luteina/zeaksantina kreće se od 0,02820 g/100g u fazi 1 do 0,1624 g/100g u fazi 5 dok u ajvaru njihova količina ne opada statistički značajno i iznosi 0,1623 g/100g. Karotenoid  $\beta$ -criptoksantin je prvi put detektovan u fazi 5 u količini od 0,0811 g/100g dok u ajvaru količina navedenog karotenoida iznosi 0,0711 g/100g. Rezultati kvantifikacije  $\beta$ -karotena pokazali su da se ovaj karotenoid javlja u fazi 3 u količini od 0,1240 g/100g dok se u fazi 5 njegova količina statistički značajno povećava i iznosi 0,7221 g/100g. Količina  $\beta$ -karotena u ajvaru pravljenom od ove sorte paprike opada u odnosu na fazu 5 i iznosi 0,5458 g/100g (**Tabela 7**).

Količina **ukupnih karotenoida** dobijena sabiranjem ispitivanih karotenoida (kapsantin + lutein/zeaksantin +  $\beta$ -criptoksantin +  $\beta$ -karoten) (**Tabela 7**) uglavnom je pratila trend povećanja sa sazrevanjem kod svih genotipova dok je kod ajvara primećeno opadanje. Najveća količina ukupnih ispitivanih karotenoida zabeležena je, očekivano, u fazi punog zrenja (faza 5) kod svih ispitivanih genotipova. Kod sorte Kurtovska kapija, zabeležena je **najveća količina ukupnih karotenoida** (**Slika 43a**) i iznosila je od 0,2547 g/100g i fazi 1 do 1,5527 g/100g u fazi 5. Kada je u pitanju sorta Amfora, količine su se kretale od 0,1696 g/100 g u fazi 1 pa do 1,2761 g/100g. Sorta Vrtka se najvećim procentualnim porastom ukupnih karotenoida u finalnoj fazi sazrevanja (faza 5) u odnosu na početnu fazu sazrevanja (faza 1). Naime, količina ukupnih karotenoida u početnoj fazi sazrevanja u iznosila je 0,1240 g/100g dok je količina u finalnoj fazi sazrevanja (faza 5) porasla za čak više od 5000% i iznosila je 1,4752 g/100g. **Sortu Una karakteriše najmanja količina ukupnih karotenoida** (**Slika 43a**) u početnoj fazi sazrevanja u odnosu na ostale sorte i iznosila je 0,0152 g/100g dok je količina ukupnih karotenoida u finalnoj fazi sazrevanja takođe bila najniža u odnosu na sve ostale ispitvane sorte i iznosila je 0,3792 g/100g. Grafički prikaz rezultata analize karotenoida prikazan je stubičastim dijagramom (**Slika 21**).



**Slika 21.** Grafički prikaz rezultata kvantifikacije odabranih karotenoida HPTLC metodom

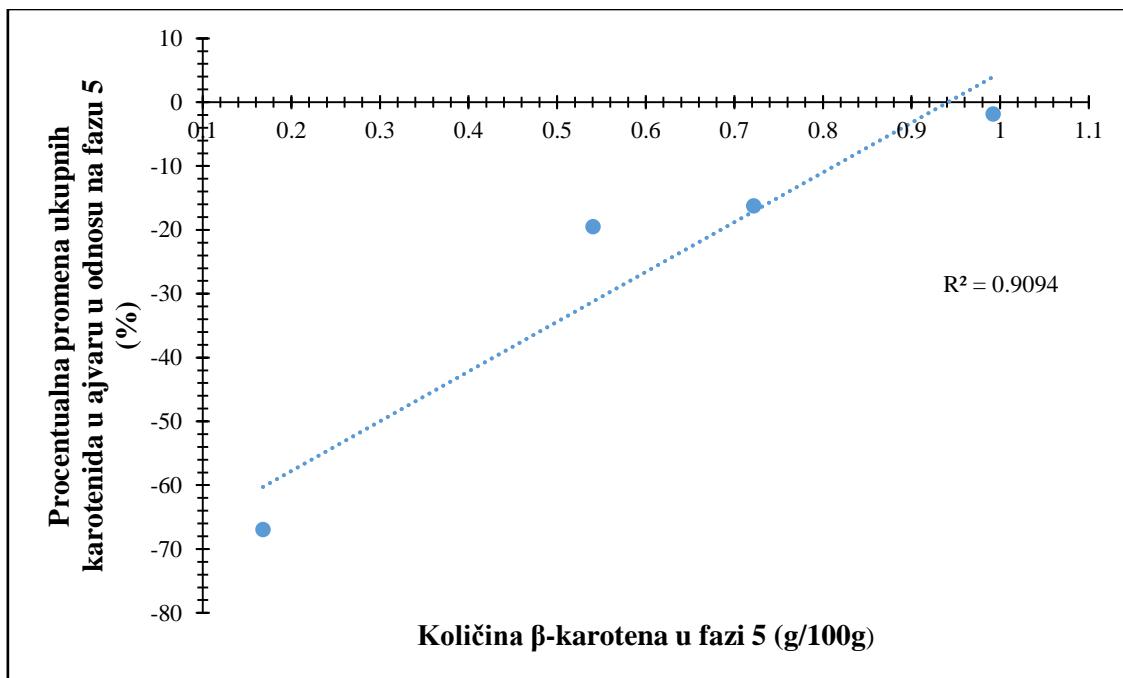
Treba napomenuti da je **procentualno opadanje količine ukupnih ispitivanih karotenoida** u tradicionalnom proizvodu (ajvaru) u odnosu na fazu 5 najmanje kod sorte **Kurtovska kapija (1,9 %)**, Vrtka (16,28 %) i Amfora (19,53 %) dok je najveće opadanje zabeleženo kod sorte **Una (66,98 %)**. Ovi rezultati ukazuju na to da ajvar treba spravljati od sorte Kurtovska kapija kako bi se sačuvala značajna količina ovih vrednih bioaktivnih jedinjenja. Ovde takođe treba napomenuti da je procentualno opadanje ukupnih karotenoida u ajvaru u odnosu na fazu 5 u veoma jakoj indirektnoj (negativnoj) korelaciji sa količinom  $\beta$ -karotena u fazi 5 ( $r=0,9536$ ,  $r^2=0,9094$ ) (**Slika 22**). Preciznije, sorte koje su imale veći sadržaj  $\beta$ -karotena u fazi 5 imale su manji pad ukupnih karotenoida u ajvaru. Poznate su termolabilna svojstva karotenoida (tako i  $\beta$ -karotena) međutim naučni radovi (W. Liu et al., 2018; Y. Liu et al., 2014) potvrđuju da se stabilnost  $\beta$ -karotena pri visokim temepraturama povećava u prisustvu ulja (odnosno nezasićenih masnih kiselina). Naime,  $\beta$ -karoten je lipofilno jedinjenje koje se rastvara u ulju pri čemu se  $\beta$ -karoten verovatno enkapsulira unutar uljane kapljice. Uljana kapljica predstavlja barijeru koja  $\beta$ -karoten fizički odvaja od spoljašnje sredine uključujući i direktni kontakt sa visokom temperaturom. Zapravo, uljana kapljica apsorbuje i distribuira toplotu ravnomerno čime sprečava direktno lokalno delovanje toplote. Pored toga, ovaj način štiti  $\beta$ -karoten i od destruktivnog delovanja kiseonika (Gheonea i sar., 2020; Qiu i sar. 2012).

Sa druge strane, interesantno je zapažanje da je najmanji gubitak karotenoida u procesu termičke obrade ploda paprike (spravljanja ajvara) zapažen kod sorte Kurtovska kapija gde je biosinteza svih pojedinačnih karotenoida počela najranije i koja je imala daleko najveće vrednosti količine  $\beta$ -karotena kao i ukupnih karotenoida. Kod ove sorte gubitak ukupnih karotenoida (posebno  $\beta$ -karotena) bio je minimalan. Sa druge strane, kod sorte Una kasno počinje biosinteza svih karotenoida (detektovani su tek u fazi 3) i pokazuje najmanju količinu  $\beta$ -karotena i ukupnih karotenoida u fazi pune zrelosti ploda. Daleko najveći gubitak ukupnih i pojedinačnih karotenonoida zapažen je upravo kod ove sorte. Moguće je da ukupni sastav karotenoida, posebno u odnosu na  $\beta$ -karoten koji je relativno stabilan, njihova dinamika biosinteze i kapacitet akumulacije, sveukupno utiču na očuvanje karotenoida u toku termičke obrade.

Generalno, stvaranje svih karotenoida počinje od prvog sintetisanog karotenoida u biosintetskom putu, fitoena. Zatim se fitoen nizom reakcija desaturacije (u kojima se po sekvencama uklanjuju po dva atoma vodonika sa susednih pozicija uvodeći dvostrukе veze) transformiše do likopena. Nakon formiranja likopena dešava se ciklizacija do  $\beta$ -karotena i  $\alpha$ -karotena sa jedne strane (formiranje karotena) i uvođenje grupa koje sadrže kiseonik i formiranje ksantofila. Enzim  $\beta$ -ciklaza (LCYB) koji katališe sintezu  $\beta$ -karotena iz likopena izolovan je i iz paprike (Hugueney et al., 1995). Kada je u pitanju formiranje ksantofila, ovaj proces je katalizovan hidrolazama (Rodriguez-Concepción, 2006). Uvođenjem hidoksilne grupe u molekul  $\beta$ -karotena uz pomoć enzima  $\beta$ -ring hidrolaze (CHYB) rezultuje formiranjem  $\beta$ -criptoksantina, a uvođenjem druge hidroksilne grupe nastaje zeksantin. Sa druge strane, epoksidacijom (uvođenjem epoksi grupe)  $\beta$ -karotena,  $\beta$ -criptoksantina, zeaksantina i luteina dovodi do stvaranja širokog spektra različitih karotenoida, između ostalih do violaksantina koji uz pomoć enzima kapsantin-kapsorubin sintetaza dovodi do stvaranja kapsantina i kapsorubina (Domonkos et al., 2013).

Sadržaj i sastav karotenoida u paprići tokom sazrevanja određen je sa dva metabolička puta. Prvi je transformacija postojećih karotenoida, a drugi je sinteza karotenoida *de novo*. Studije Gómez-García i Ochoa-Alejo (2013) pokazale su da hlorofilni pigment kao što je lutein nestaje u poslednjoj fazi sazrevanja s obzirom da lutein ne podleže daljoj transformaciji u biosintetskom putu (eventualno do lutein-5,6-epokside) (Rodriguez-Amaya, 2016). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima Deli i sar. (2001). Sa druge strane, koncentracija intermedijera u sintezi crvenih pigmenata ( $\beta$ -karotena i violaksantina) se povećavaju i dovode

do stvaranja, redom  $\beta$ -kriptoksantina, kapsantina i kapsorubina (Gómez-García i Ochoa-Alejo, 2013). Posmatrajući ovakav sled biosintetskih događaja (transformacija) dolazi se do zaključka da se sinteza i akumulacija sadržaja  $\beta$ -karotena i violaksantina dešava sve dok se dešava sinteza početnih karotenoida u celokupnom biosintetskom putu. Drugim rečima, kada sinteza početnih molekula karotenoida stane, ostatak karotenoida se postepeno transformiše do krajnih produkata karotenogeze. S obzirom da krajni produkti sinteze karotenoida zavise od sorte (odnosno njene genetske predispozicijom) kao i uslova sredine, njihov odnos i količina može varirati. Ono što je zajedničko za većinu ispitivanih sorti u ovom doktoratu je da su najdominantniji karotenoidi u finalnoj fazi sazrevanja upravo  $\beta$ -karoten, kapsantin, lutein, zeaksantin,  $\beta$ -kriptoksantin i kapsantin.



**Slika 22.** Korelacija između procentualne promene ukupnih karotenoida u ajvaru u odnosu na fazu 5 i količine  $\beta$ -karotena u fazi 5

Topuz i Ozdemir (2007), ispitivali su količinu različitih karotenoida u slatkoj paprići kod 5 genotipova (730 F1, 1245 F1 i Amazon F1, Serademre 8, Kusak 295 F1) u fazi fiziološke zrelosti. Rezultati su pokazali da su najdominantniji karotenodi u pomenutoj fazi sazrevanja kapsantin, lutein/zeaksantin,  $\beta$ -karoten i  $\beta$ -kriptoksantin. Njihova količina iznosila je kod kapsantina od 769 do 1270 mg/kg SM, zeaksantina od 212,8 do 462,4 mg/kg SM,  $\beta$ -karotena od 69,5 do 124,5 mg/kg SM, dok je sadžaj  $\beta$ -kriptoksantina iznosio od 113,5 do 165,5 mg/kg SM. Prema istim autorima, količina ukupnih karotenoida kretala se od 809,2 do 1340 mg/kg SM. Ovi rezultati pokazuju da je količina pojedinačnih karotenoida uslovljena genotipom, odnosno da se biosintetski put karotenoida razlikuje među sortama, što je u potpunoj saglasnosti sa rezultatima ove disertacije.

Rezultati Rodríguez-Rodríguez i sar. (2020) takođe pokazuju da su dominatni karotenoidi u fazi fiziološke zrelosti slatke paprike (sorta Lamuyo) upravo kapsantin, lutein/zeaksantin,  $\beta$ -karoten i  $\beta$ -kriptoksantin, a da se pored njih kao dominantan javlja i violaksantin. U ovom radu količina kapsantina iznosila je u proseku 9667  $\mu\text{g}/100\text{g}$  luteina 1202,5  $\mu\text{g}/100\text{g}$ , zeaksantina 583,1  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ,  $\beta$ -karotena 2167  $\mu\text{g}/100\text{g}$  i  $\beta$ -kriptoksantina 524,6  $\mu\text{g}/100\text{g}$  sveže mase što je u saglasnosti sa rezultatima našeg istraživanja kod svih ispitivanih sorti (kada je u pitanju kvalitativni sastav karotenoida).

Deli i sar. (2001) sproveli su sveobuhvatnu analizu karotenoida u slatkoj paprići (sorta Szentesi piros) u 6 faza razvića. Rezultati su pokazali da je u svih 6 faza detektovano 34 različita karotenoida od kojih su najdominantniji bili lutein,  $\beta$ -karoten, kapsantin, zeaksantin i  $\beta$ -kriptoksantin. Lutein je pokazao opadanje tokom sazrevanja i njegova količina iznosila je u relativnim vrednostima 31,55 % u fazi tehnološke zrelosti dok u fazi pune zrelosti nije detektovan. Sa druge strane,  $\beta$ -karoten je pokazao najveću količinu u fazi fiziološke zrelosti (13,65 % od ukupnih karotenoida) i njegova količina je tokom sazrevanja rasla i opadala. Relativni sadržaj kapsantina je pokazala značajan rast tokom sazrevanja te je u fazi tehnološke zrelosti (zelena faza, faza 1) iznosila je 0,24 % dok je u fazi pune zrelosti iznosila 37,02 %. Količina zeaksantina je rasla sve do pretposlednje faze dok je fazi pune zrelosti pokazala blagi pad. Količina ovog karotenoida kretala se od 4,11% (faza tehnološke zrelosti) do 8,16 % (faza pune zrelosti). Slično zeaksantinu, količina  $\beta$ -kriptoksantina rasla je se do pretposlenje faze (gde je iznosila 5,48 %), a nakon toga je blago pala i iznosila je 3,48 %.

Sve ovo nas navodi da količina karotenoida u velikoj meri zavisi od sorte, uslova gajenja, načina ekstrakcije, kao i instrumenta kojim se analizira. Prabakaran i sar. (2017) ispitivali su uticaj različitih rastvarača korišćenih za ekstrakciju karotenoida iz paprike na broj, poziciju i intenzitet traka dobijenih primenom HPTLC metode. Rezultati su pokazali da uticaj rastvarača postoji, a najbolji rezultati dobijeni su primenom hloroforma kao ekstrakcionog sredstava dok su najlošiji rezultati dobijeni primenom etil-acetata i etanola. Pregledom literature, nije ustanovljeno da postoje radovi na temu primene HPTLC metode u analizi karotenoida paprike te nije bilo moguće poređiti sa radovima drugih istraživača.

Konačno, rezultati ovog eksperimentalnog rada pokazali su da ispitivani karotenoidi pokazuju pravilnost u pogledu njihove količine u finalnoj fazi sazrevanja (faza 5) kod svih ispitivanih sorti i da je njihova zastupljenost raspoređena na sledeći način počev od najzastupljenijeg do najmanje zastupljenog:  $\beta$ -karoten, kapsantin, lutein/zeaksantin i  $\beta$ -kriptoksantin. Primećuje se da združena komponenta lutein/zeaksantin raste tokom sazrevanja i da su najveće koncentracije u finalnoj fazi (faza 5). Ovo se može objasniti upravo time da je tokom sazrevanja količina luteina opadala dok je količina zeaksantina rasla, a s obzirom da su ova dva karotenoida posmatrana zajedno, rast sa sazrevanjem bio je očekivan. Što se  $\beta$ -karotena tiče, njegova visoka zastupljenost u finalnoj fazi sazrevanja kod svih sorti može biti objašnjena time da u momentu branja plodova biosinteza prekinuta i da bi potencijalno biosinteza bila nastavljena u pravcu formiranja kapsantina da je plod ostao na biljci što će biti predmet naših budućih istraživanja u smislu potvrđivanja ili odbacivanja ove predpostavke. Drugo objašnjenje je da je to sortna karakteristika.

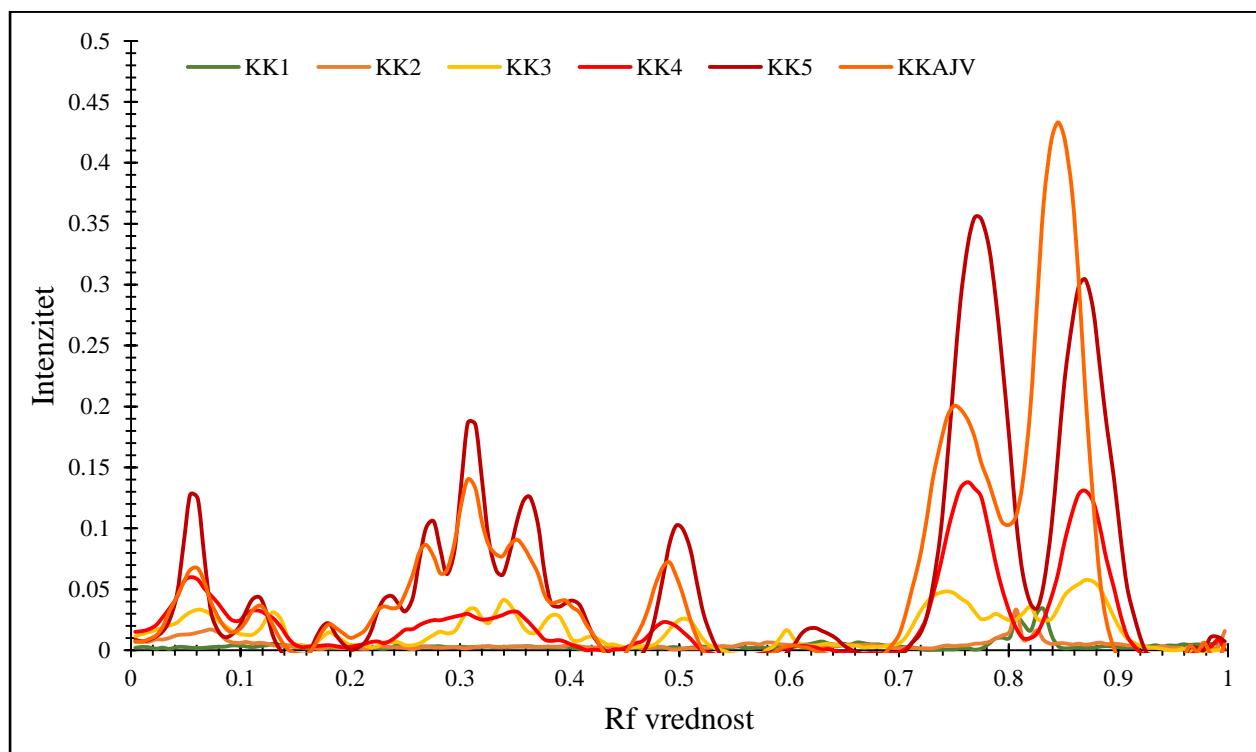
Sa druge strane, svakako da su karotenogeneza i kvalitativni sastav karotenoida, posebno ksantofila, svojstva koje zavise od sorte, a takođe je veoma zavisna od agroekoloških faktora. Prema dostupnoj literaturi, karotenoidi koji su odgovorni za boju ploda paprike u finalnoj fazi zrelosti su kapsantin, kapsorubin i kapsantin 5,6 epoksid (Hornero-Méndez i sar., 2000). U toku sazrevanja plodova paprike, količina luteina opada, kao i  $\beta$ -karotena, dok količina  $\beta$ -kriptoksantina i kapsantina raste. Međutim, biosinteza karotenoida, kao i njihova količina u plodu je pod uticajem velikog broja faktora, kao što su veća ili manja ekspresija gena koji upravljaju karotenogenom, efekti fiziološke i morfološke karakteristike sorte, uslovi gajenja itd. (Hornero-Méndez i sar., 2000). S obzirom na to, u pojedinim sortama se može desiti da količina  $\beta$ -karotena bude dominantnija u odnosu na kapsantin (Morais i sar., 2002). Deli i sar. (2001) navode da karotenoidi sa 9 konjugovanih dvostrukih veza koji se javljaju u sortno crvenoj paprići su lutein,  $\beta$ -karoten, zeaksantin,  $\beta$ -kriptoksantin i kapsantin i njihova količina se menja sa sazrevanjem što se potvrdilo i u ovoj studiji. Prema istom autoru, količina luteina opada, dok zeaksantin raste tokom sazrevanja i u manjoj količini opadne u fazi fiziološke zrelosti.

### 5.2.1. Karotenoidni sastav ispitivanih uzoraka na osnovu profila dobijenog ispitivanjem slike HPTLC hromatograma

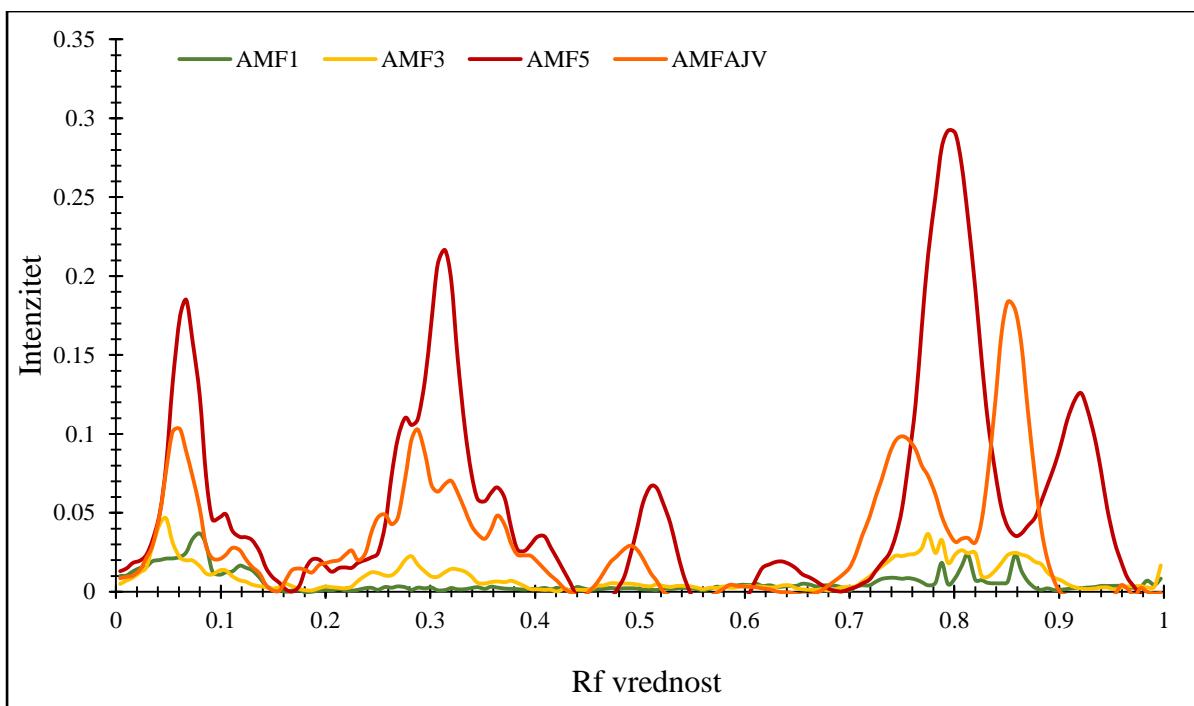
Hromatogram predstavlja bogat izvor informacija o analitima. Na osnovu vizuelnog posmatranja HPTLC hromatograma, mogu se dobiti podaci o sličnosti odnosno razlikama između uzoraka kao i količini kartenoidnih jedinjenja. Slike hromatograma su obrađene primenom programa ImageJ gde su slike HPTLC ploča invertovane i razbijene u 3 kanala: R (red), G (green) i B (blue). Za dalje analize koristio korišćen je samo kanal B (blue) jer je pokazao najbolji odziv. Zatim su tako dobijeni podaci obrađeni korekcijom game, korekcija bazne linije i poravnanjem pikova. Rezultati obrade slika u ImageJ softveru prikazani su u **slikama 23 do 26**.

Razlike u pozicijama i intenzitetima pikova jasno se mogu razlikovati što je prikazano na **Slici 23**. Prema tome, u fazi tehnološke zrelosti sorte Kurtovska kapija (KK1) skoro da izostaju pikovi na hromatogramu dok se u ostalim fazama pojavljuje veći broj intenzivnijih pikova idući od faze 3 do faze 5 što daje informaciju da se količina karotenoida u ispitivanim uzorcima povećava.

Ono što se može primetiti jeste da su pikovi koji potiču od ajvara (kod svih ispitivanih sorti) blago pomereni uлево (eng. shifted) a razlog tome može biti uljani sastav ajvara. Brzina kojom se kreće analit kroz stacionarnu fazu (ploču) zavisi i od uzorka, odnosno kako je već napomenuto, od njegove viskoznosti.

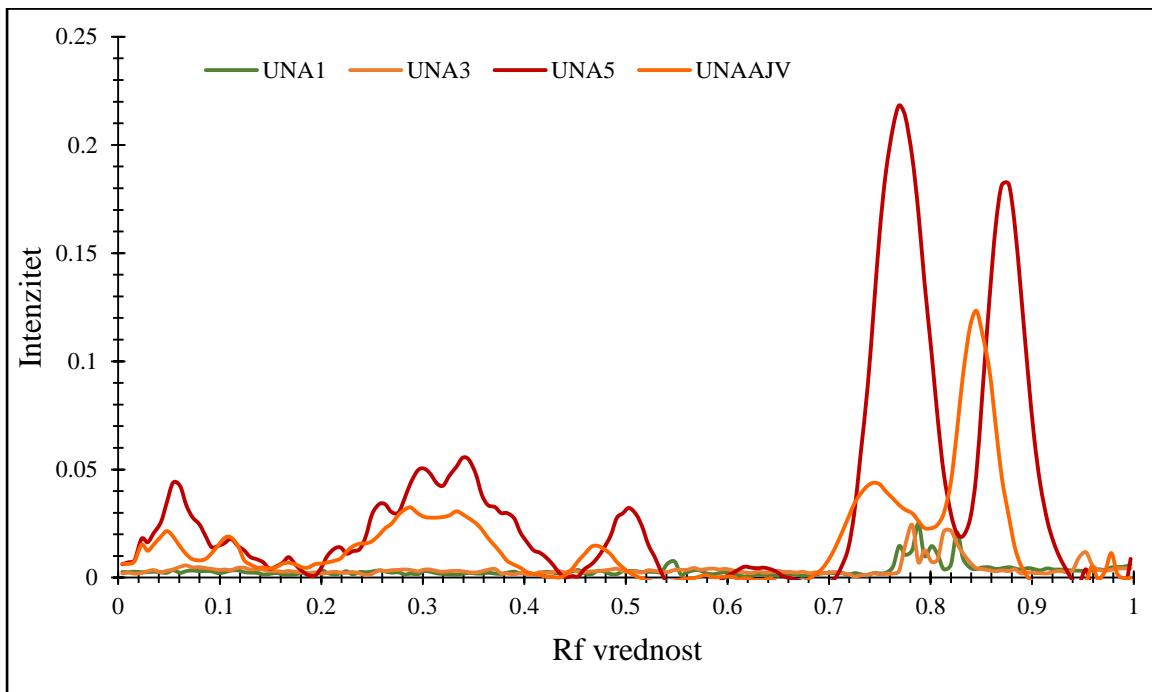


**Slika 23.** Karotenoidni profil sorte Kurtovska kapija kroz faze sazrevanja i ajvara. KK1-Kurtovska kapija faza 1; KK2- Kurtovska kapija faza 2; KK3- Kurtovska kapija faza 3; KK4- Kurtovska kapija faza 4; KK5- Kurtovska kapija faza5.



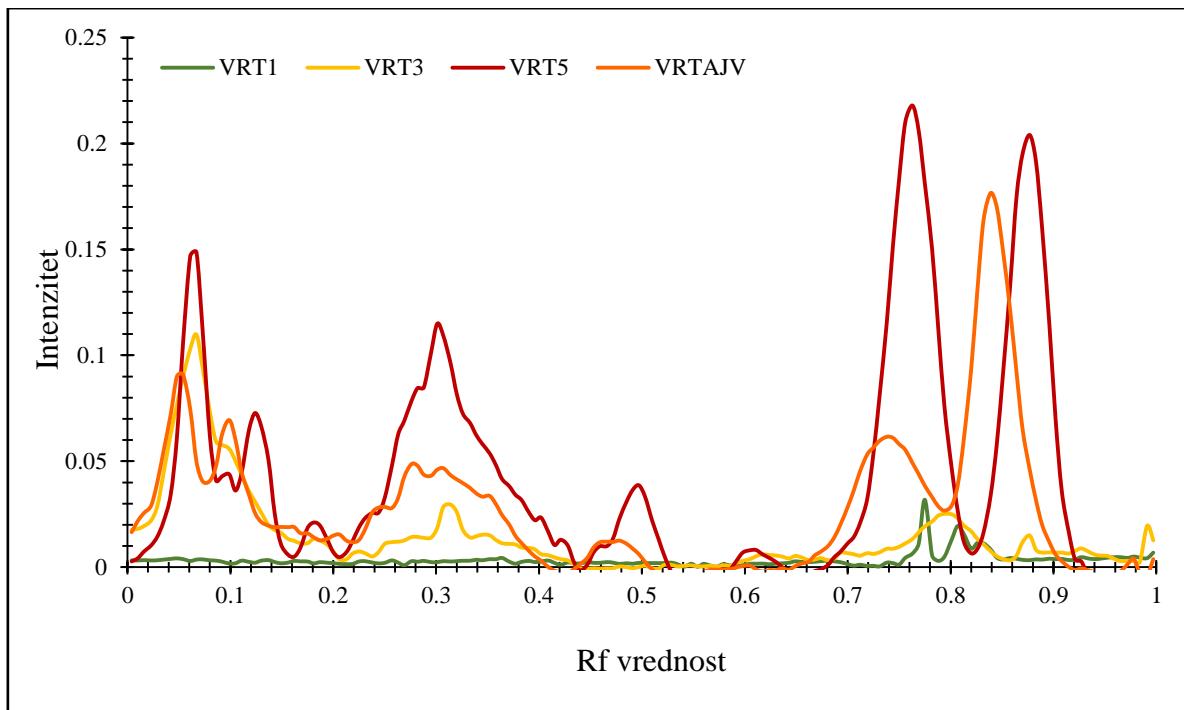
**Slika 24.** Karotenoidni profil sorte Amfora kroz faze sazrevanja i ajvara. AMF1-Amfora faza 1; AMF3-Amfora faza 3; AMF5-Amfora faza 5; AMFAJV-Amfora ajvar

Na osnovu **slike 24** može se primetiti da se faze sazrevanja sorte Amfora razlikuju u broju i intenzitetu pikova. Faza 1 (AMF1) koja predstavlja fazu tehnološke zrelosti paprike pokazuje svega nekoliko pikova sa veoma niskim intenzitetima. Sa druge strane, kako sazrevanje odmiče tako se pojavljuju pikovi na različitim Rf vrednostima što ukazuje na stvaranje novih karotenoida. Kada je u pitanju ajvar, jasno se vidi pojava pomerenja pozicije pikova a razlog za to je objašnjen kod sorte Kurtovska kapija.



**Slika 25.** Una kroz faze sazrevanja i ajvara. UNA1-Una faza 1; UNA3-Una faza 3; UNA5-Una faza 5; UNAAJV-Una ajvar.

Rezulati predstavljeni na **Slici 25** pokazuju razlike u položaju pikova i njihovih intenziteta tokom sazrevanja sorte Una i ajvaru. Može se primeti da se u tehnološkoj fazi zrelosti javlja mali broj pikova i niskog intenziteta. Tokom sazrevanja pojavljuje se veći broj pikova dok intenzitet raste (**Slika 25**).



**Slika 26.** Karotenoidni profil sorte Vrtka tokom sazrevanja i ajvara. VRT1-Vrtka faza 1; VRT3-Vrtka faza 3; VRT5-Vrtka faza 5; VRTAJV-Vrtka ajvar.

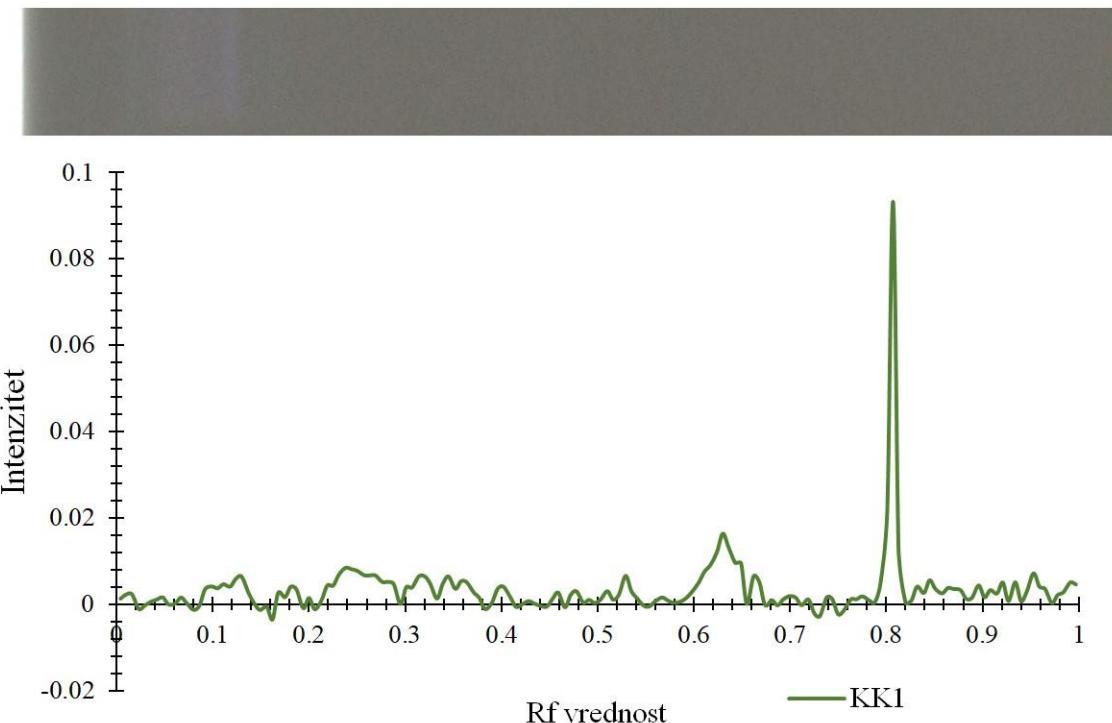
Na osnovu **slike 26** može se primetiti da se faze sazrevanja sorte Vrtka razlikuju u broju i intenzitetu pikova. Faza 1 (VRT1) koja predstavlja fazu tehnološke zrelosti paprike pokazuje svega nekoliko pikova sa veoma niskim intenzitetima. Sa druge strane, kako sazrevanje odmiče tako se pojavljuju pikovi na različitim Rf vrednostima što ukazuje na stvaranje novih karotenoida. Kada je u pitanju ajvar, jasno se vidi pojava pomerenja pozicije pikova a razlog za to je objašnjen kod sorte Kurtovska kapija.

Dobijeni rezultati analize slike su se dalje koristile za multivariatnu analizu u cilju iznalaženja najboljeg hemometrijskog modela za prepoznavanje sorte paprike i faze sazrevanja kod odabrane sorte.

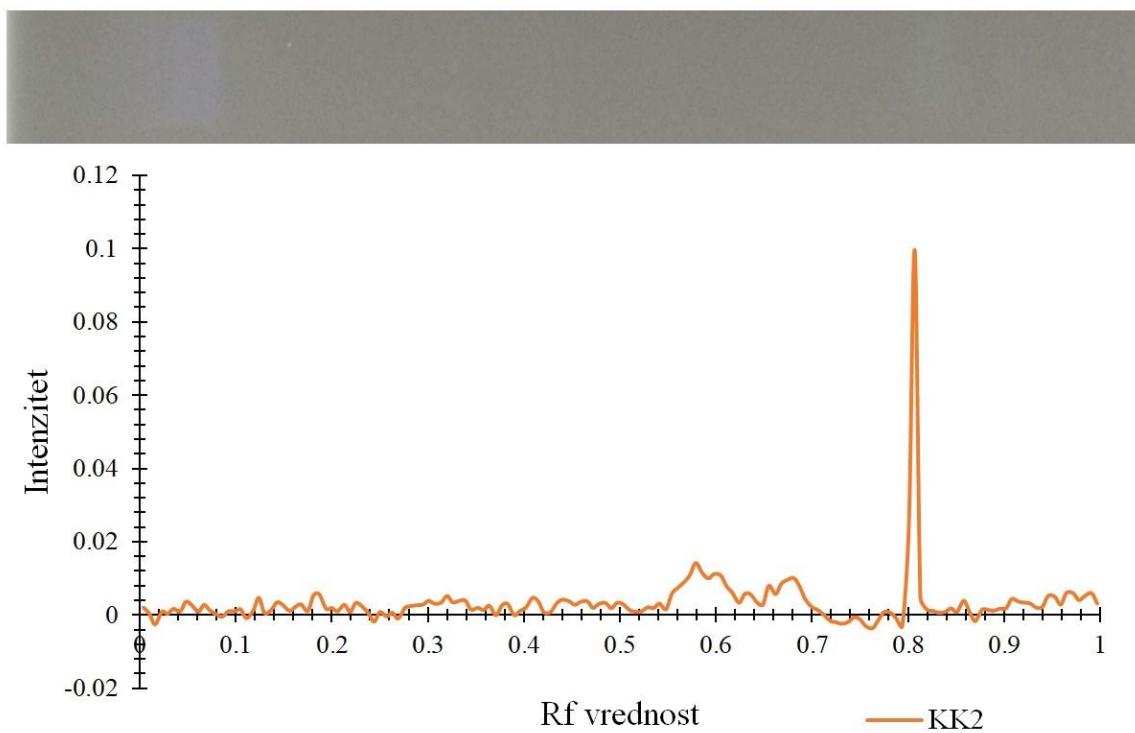
### 5.2.2. Hemometrijska analiza slike hromatograma u cilju prepoznavanja faze zrelosti paprike

U hemometrijskoj analizi slike hromatograma razmatrane su iste faze koje su praćene Ramanovom spektroskopijom (faza 1, faza 2, faza 4 i faza 5). U cilju formiranja hemometrijskog modela za prepoznavanje sorte paprike u finalnoj fazi sazrevanja (faza 5) primenjena je PCA analiza kao metoda prethodne obrade podataka a sa ciljem redukcije broja varijabli (Rf vrednosti). Nakon smanjenja broja varijabli primenjeni su metodi klasifikacije PLS-DA, PCA-LDA i SIMCA. S obzirom na mali broj uzoraka, validacija modela sprovedena je primenom LOOCV (eng. Leave One Out Cross-Validation) metoda validacije. Primenom ovog metoda, svaka observacija (objekat, uzorak) predstavlja validacioni set podataka dok preostala količina objekata ( $n-1$ ) predstavlja trening set podataka. Na ovaj način, validacija modela se obavlja n puta, odnosno za svaki posmatrani objekat (uzorak).

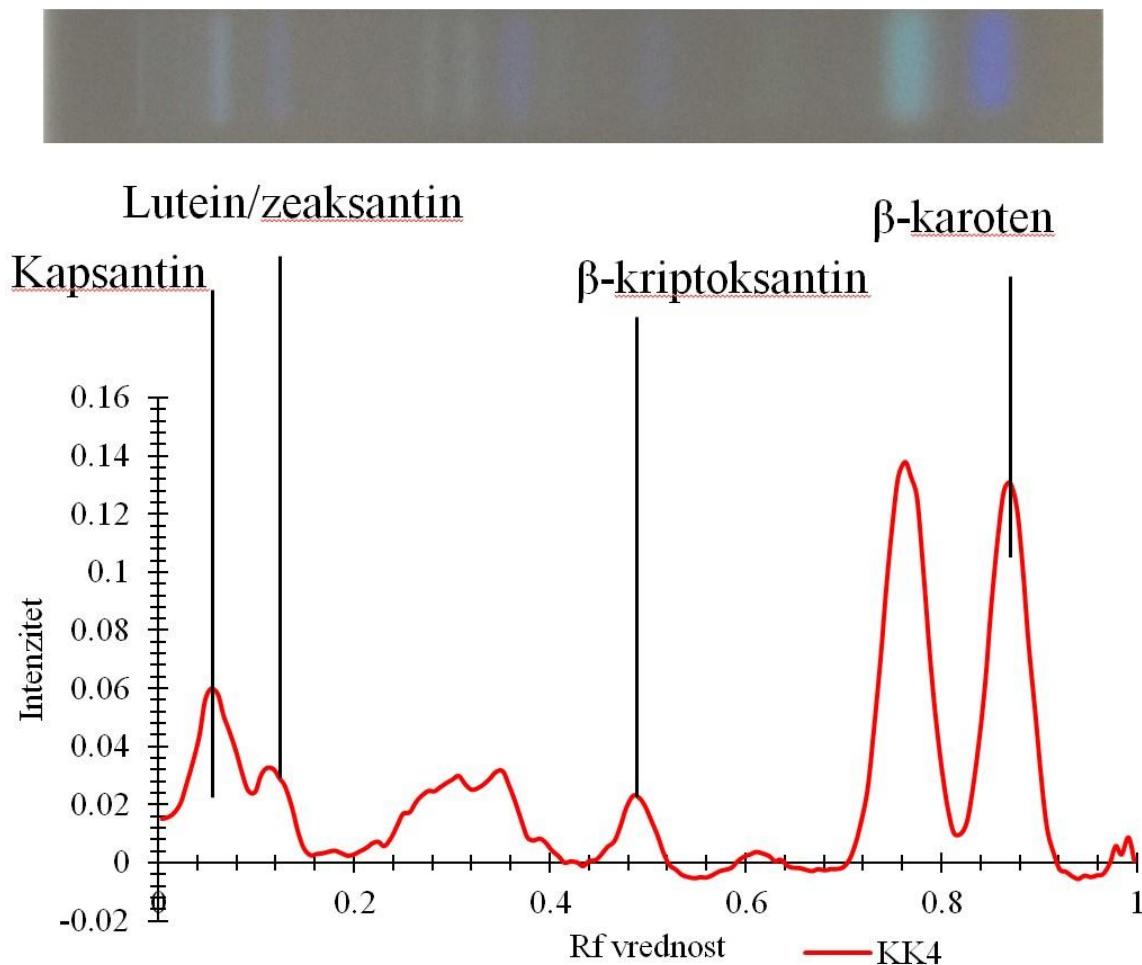
Varijable predstavljaju Rf vrednosti koje počinju od polazne mrlje do fronta rastvarača, dok objekti predstavljaju ispitivane uzorke. Konačna matrica bila je dimenzija (40x148). **Slike 27-30** predstavljaju karotenoidni profil sorte Kurtovska kapija kroz faze sazrevanja dobijen uz pomoć HPTLC analize i ImageJ softvera.



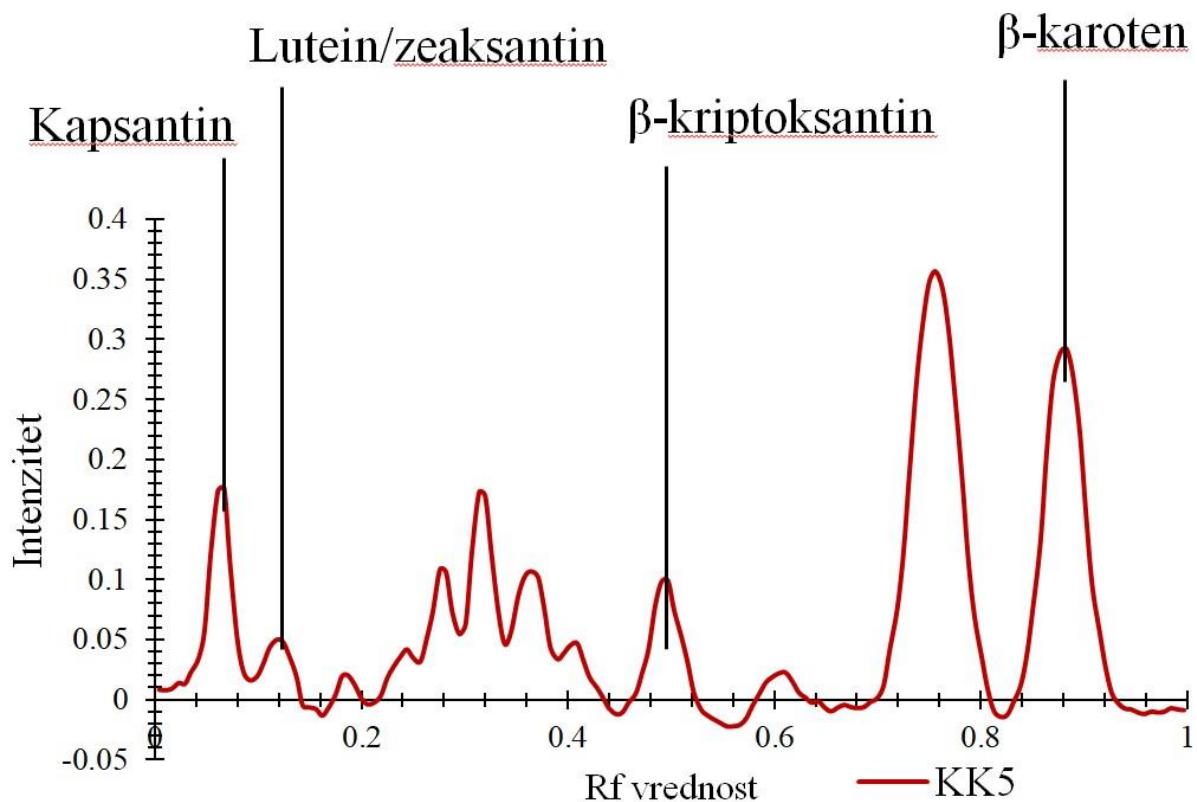
**Slika 27.** Karotenoidni profili sorte Kurtovska kapija u fazi 1 dobijeni HPTLC metodom



**Slika 28.** Karotenoidni profili sorte Kurtovska kapija u fazi 2 dobijeni HPTLC metodom

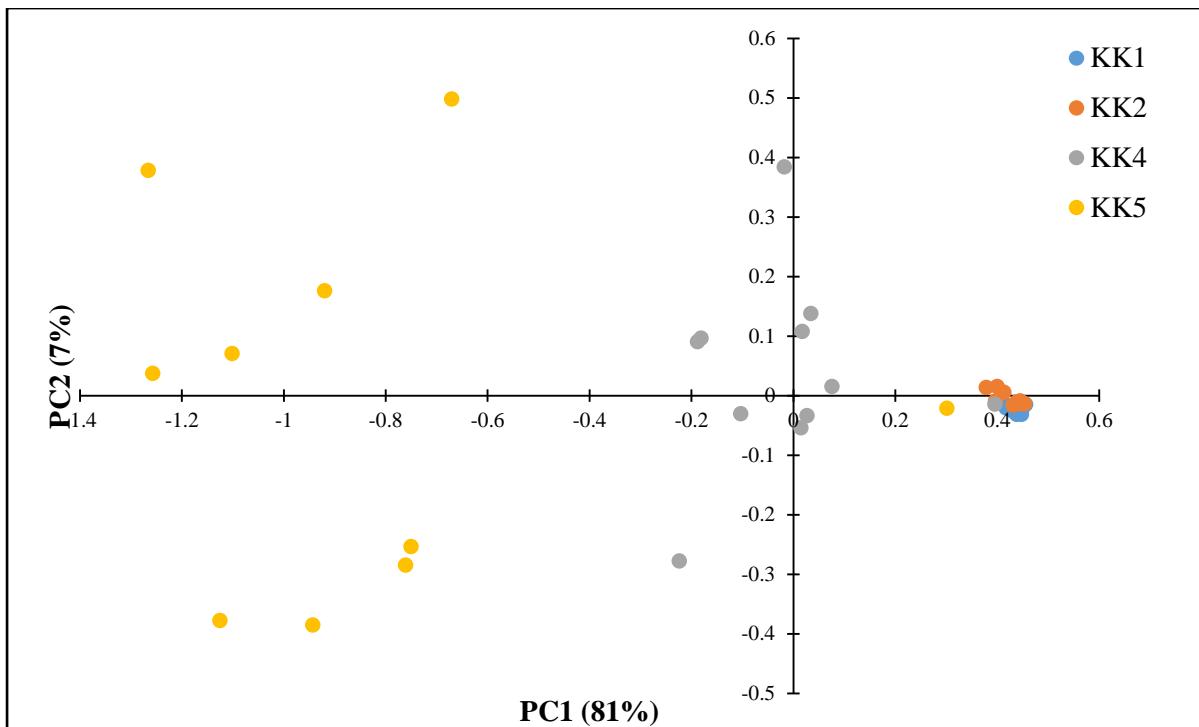


Slika 29. Karotenoidni profili sorte Kurtovska kapija u fazi 4 dobijen HPTLC metodom



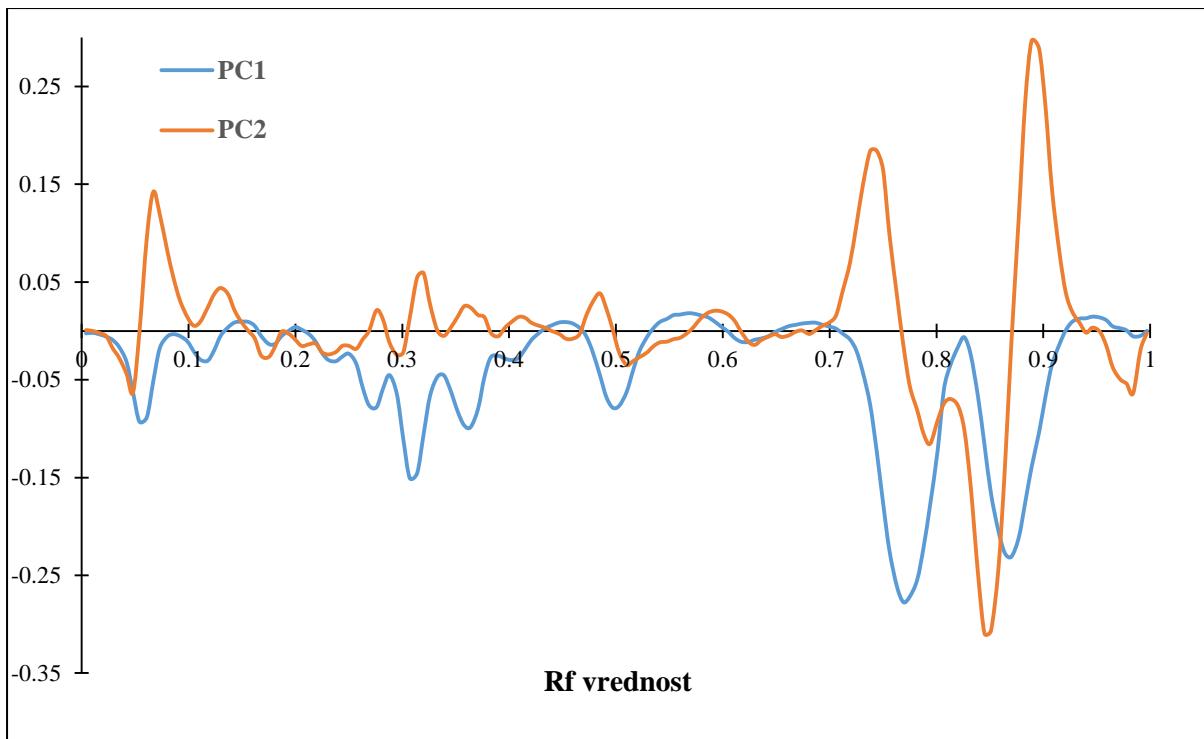
Slika 30. Karotenoidni profili sorte Kurtovska kapija u fazi 5 dobijen HPTLC metodom

Kao rezultat primene metode analize glavnih komponenata (PCA) dobio se manji broj varijabli (međusobno nekorelisanih) odnosno glavnih komponenti. Grafički prikaz PCA analize predstavljen je dijagramom rasipanja (Slika 31) i dijagramom opterećenja (Slika 32). Zadržavanjem prve dve glavne komponente u analizu objašnjeno je 88 % i 7 % ukupnog varijabiliteta podataka. Dijagram rasipanja pokazao je da postoji jasno odvajanje objekata koji pripadaju fazi 5 kao i objekata koji pripadaju fazi 4 od ostalih faza (faze 1 i faze 2). Sa druge strane, uzorci koji pripadaju fazama 1 i 2 nisu se jasno razdvojili.



**Slika 31.** Dijagram rasipanja uzoraka paprike u prostoru definisanom sa prve dve glavne komponente

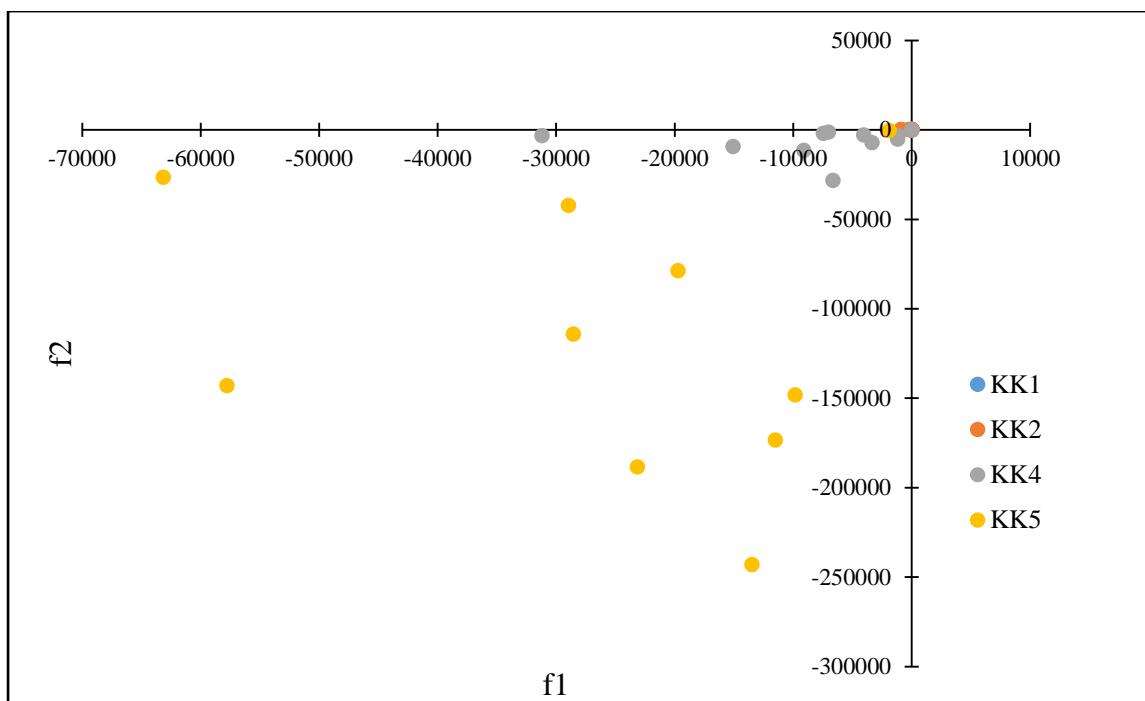
Dijagram opterećenja pokazuje da grupisanju uzoraka koji pripadaju fazi 4 i 5 doprinose varijable sa Rf vrednošću 0,87 (odgovara  $\beta$ -karotenu), 0,497 (odgovara  $\beta$ -kriptoksanthinu), 0,111 (odgovara luteinu/zeaksantinu), 0,054 (odgovara kapsantinu) kao i pik sa Rf vrednošću 0,763 za koje nemamo podatke jer standard čija je Rf vrednost na pomenutoj poziciji nije bio predmet ovog istraživanja. Sa druge strane, uzorci koji pripadaju fazama 1 i 2 grupisani su zajedno i njihovom grupisanju doprinele su varijable koje nisu bile predmet ovog istraživanja (**Slika 32**).



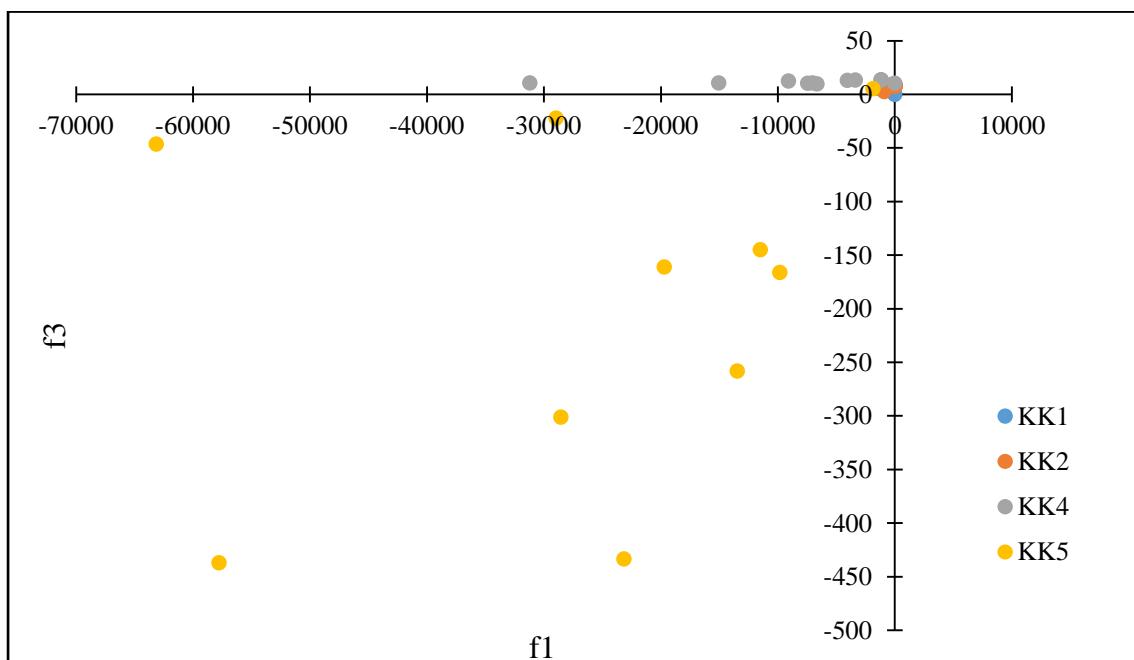
**Slika 32.** Dijagram zavisnosti opterećenja prve dve glavne komponente of Rf vrednosti

Kao što je navedeno, PCA je sprovedena kao prvi korak u konstruisanju nadgledanog klasifikacionog modela i služila je za redukciju broja varijabli. Za sve testirane modele izabrane su četiri glavne komponente koje objašnjavaju 97% ukupnog varijabiliteta.

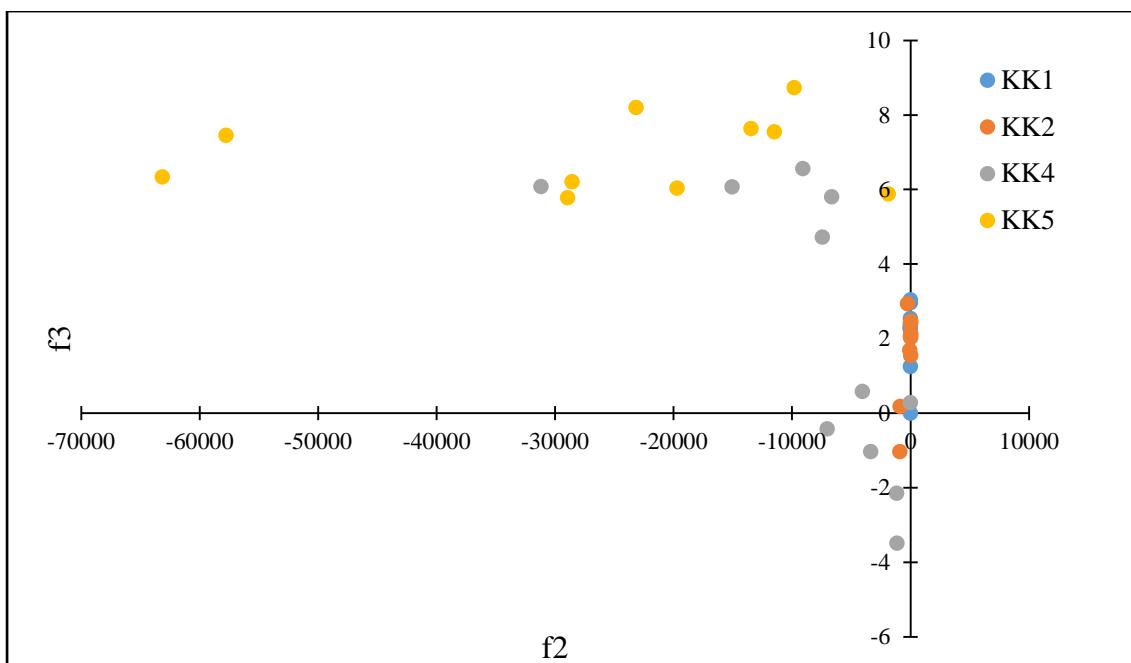
Diskriminacioni modeli primjenjeni na ispitivane uzorke pokazali su različite rezultate. Od svih odabranih modela, najbolju prediktivnu moć pokazao je model PCA-LDA koji je pravilno klasifikovao 90 % uzorka. Iz tog razloga grafički je prikazan samo model PCA-LDA (**Slika 33-37**). Takođe, rezultati klasifikacije su prikazani i u matrici konfuzije (**Tabela 8**). Kao što se može primetiti, faze 1, 4 i 5 su u potpunosti pravilno klasifikovane, dok su kod faze 2, 3 i 6 objekta (uzorka) klasifikovana kao faza 1 (**Tabela 8**).



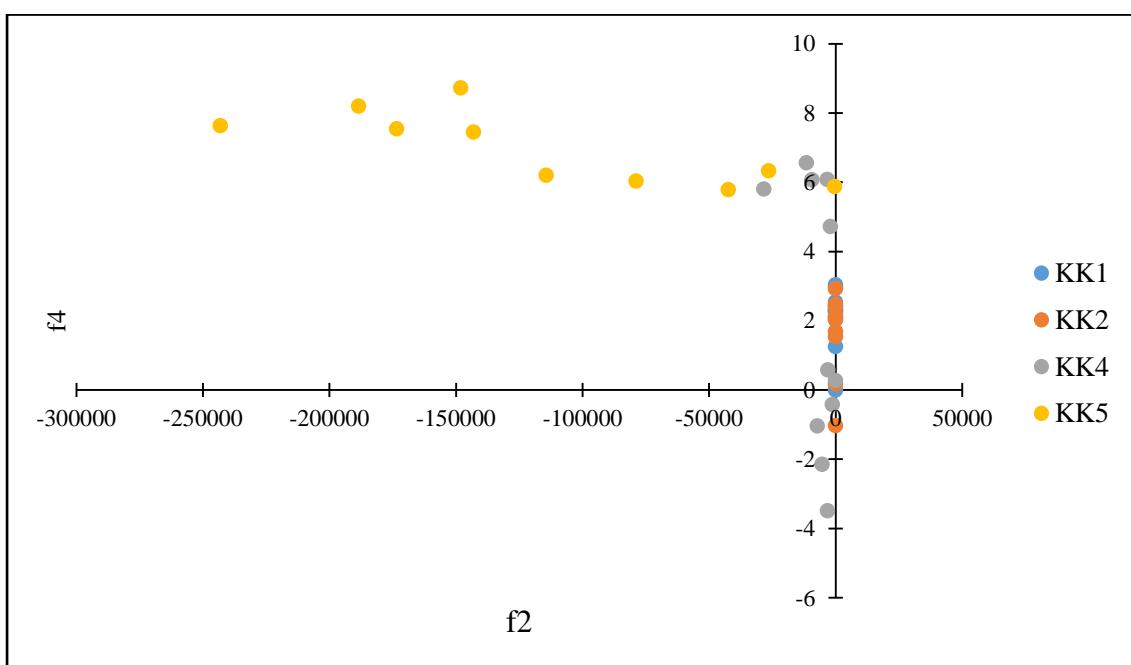
**Slika 33.** PCA-LDA diskriminacioni plot. Diksriminacioni skorovi f1 i f2 određuju pripadnost uzorka odgovarajućoj klasi (grupi)



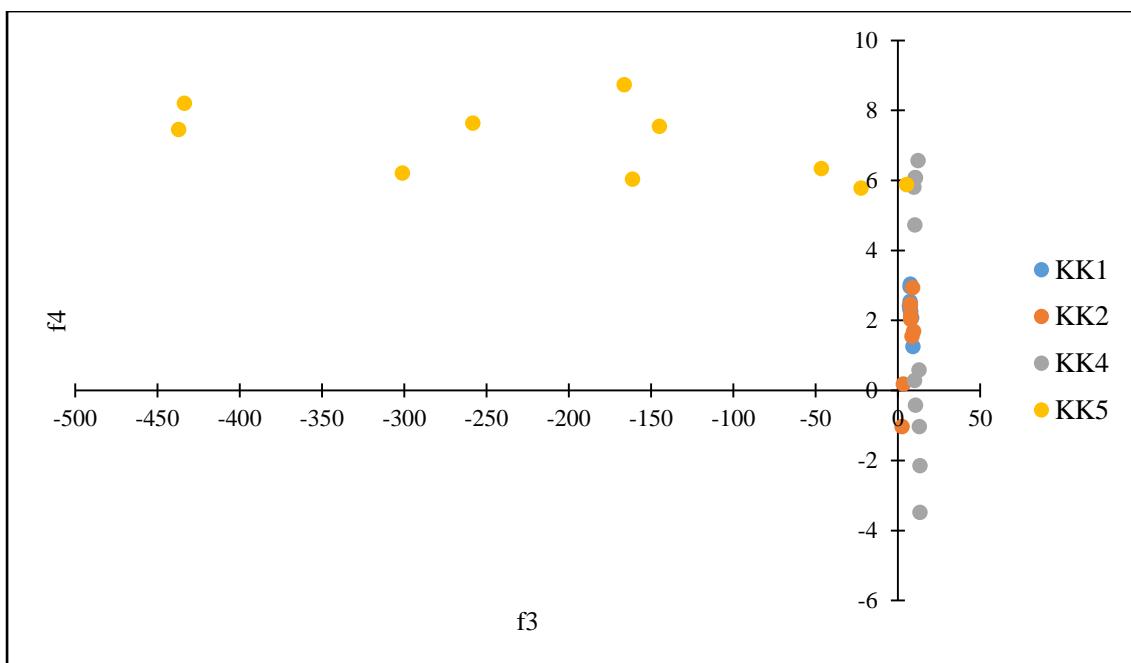
**Slika 34.** PCA-LDA diskriminacioni plot. Diksriminacioni skorovi f1 i f3 određuju pripadnost uzorka odgovarajućoj klasi (grupi)



Slika 35. PCA-LDA diskriminacioni plot. Diksriminacioni skorovi f2 i f3 određuju pripadnost uzoraka odgovarajućoj klasi (grupi)



Slika 36. PCA-LDA diskriminacioni plot. Diksriminacioni skorovi f2 i f4 određuju pripadnost uzoraka odgovarajućoj klasi (grupi)



**Slika 37.** PCA-LDA diskriminacioni plot. Diksriminacioni skorovi f3 i f4 određuju pripadnost uzorka odgovarajućoj klasi (grupi)

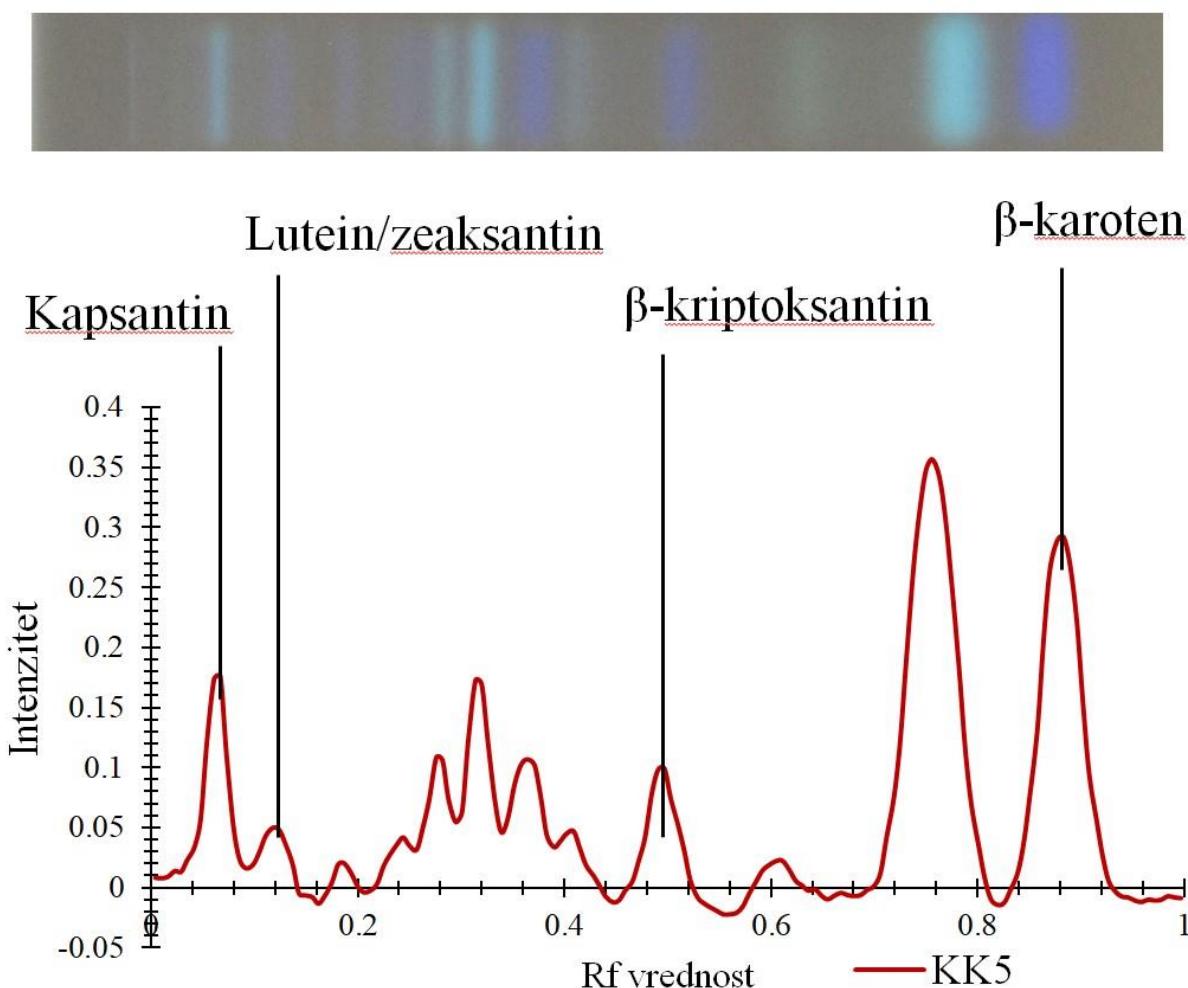
**Tabela 8.** Konfuzionna matrica klasifikacije objekata (uzoraka)

		Očekivano			
		KK1	KK2	KK4	KK5
Predviđeno	KK1	10	4	0	0
	KK2	0	6	0	0
	KK4	0	0	10	0
	KK5	0	0	0	10

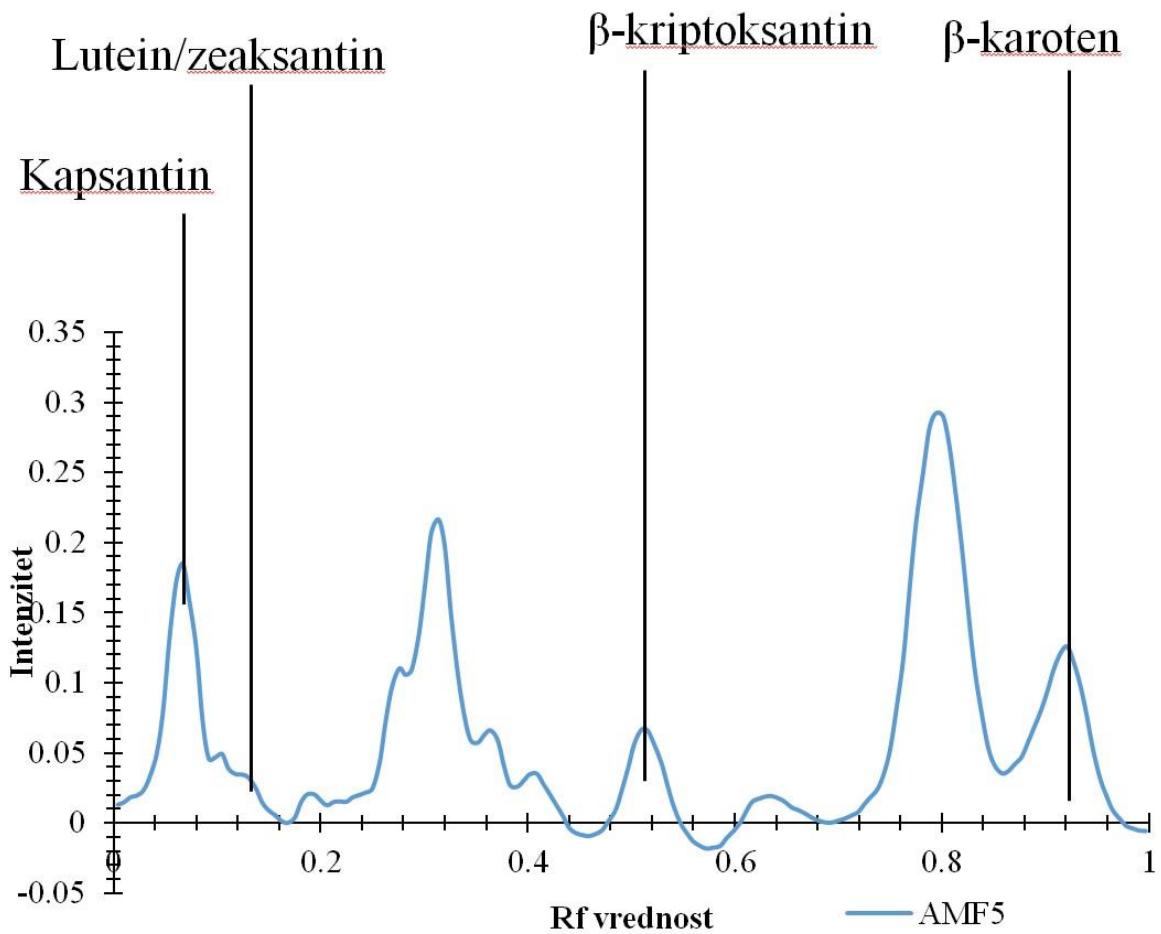
### 5.2.3. Hemometrijska analiza slike hromatograma u cilju prepoznavanja sorte paprike u finalnoj fazi zrelosti

Hemometrijska analiza slike hromatograma je takođe primenjena u cilju determinacije sortnih razlika odnosno kao metoda koja potencijalno može da detektuje male razlike u karotenoidnoj kompoziciji između genotipova. U ovu svrhu uzeti su plodovi paprike različitih sorti (Kurtovska kapija, Amfora, Una i Vrtka) u fazi pune fiziološke zrelosti (faza 5).

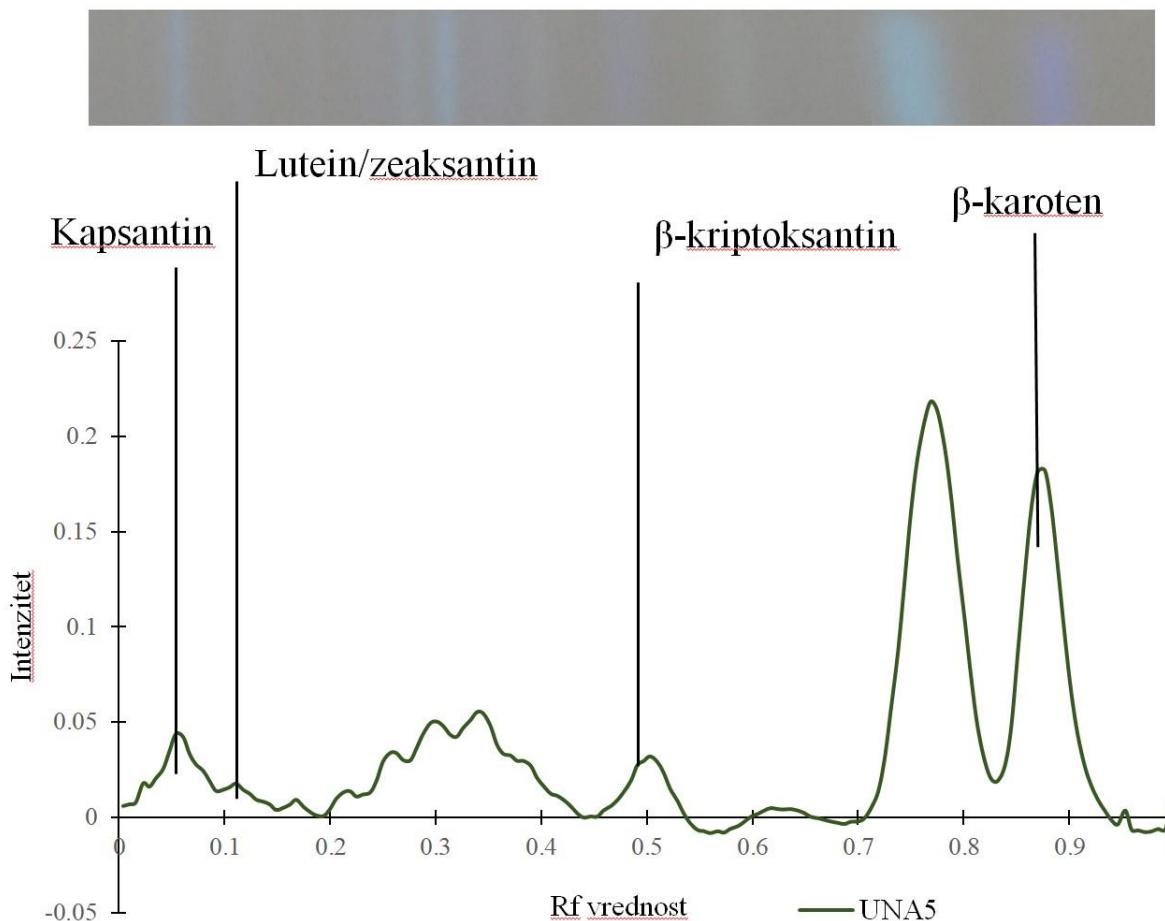
Analizom slike hromatograma uočeni su pikovi na  $R_f$  0,054, 0,111, 0,497 i 0,87 koji su zajednički za sve sorte a odgovaraju ispitivanim karotenoidima odnosno kapsantinu, luteinu/zeaksantinu,  $\beta$ -kriptoksanitnu i  $\beta$ -karotenu. Međutim, pored zajedničkih pikova, javio si i veliki broj drugih pikova koji verovatno odgovaraju karotenoidima koji nisu bili predmet ove doktorske disertacije (**Slike 38-41**). Pored toga, intenzitet pikova se razlikovao između sorti. Stoga, celokupna karotenoidna informacija je korišćena u cilju formiranja diskriminacionog modela koji bi služio za klasifikaciju sorti u fazi pune zrelosti (faza 5).



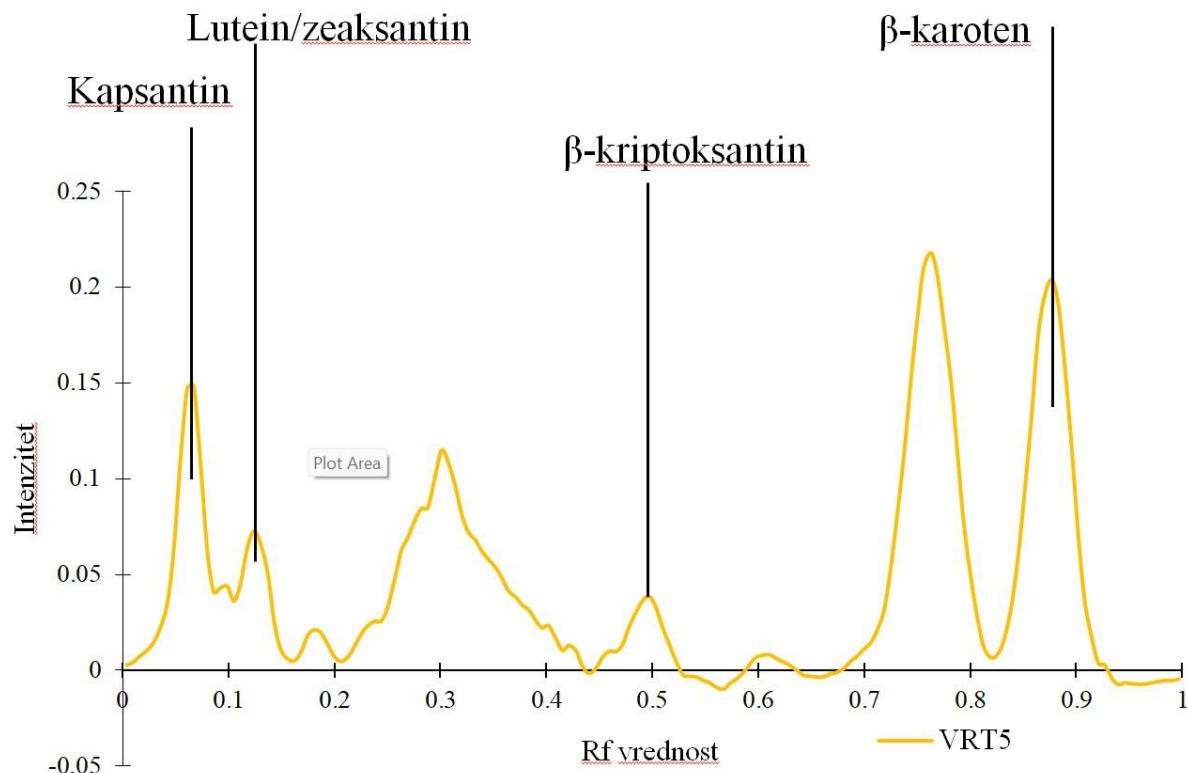
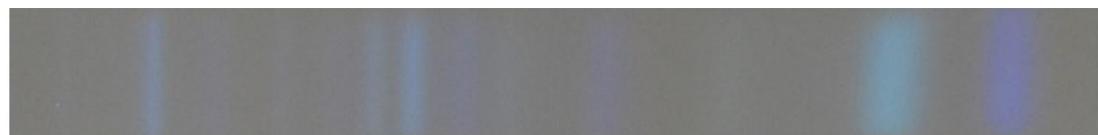
**Slika 38.** Karotenoidni profili sorte Kurtovska kapija u fazi 5 dobijeni HPTLC metodom



**Slika 39.** Karotenoidni profili sorte Amfora u fazi 5 dobijen HPTLC metodom



**Slika 40.** Karotenoidni profili sorte Una u fazi 5 dobijen HPTLC metodom



**Slika 41.** Karotenoidni profili sorte Vrtka u fazi 5 dobijen HPTLC metodom

Kako bi se potvrdile razlike između sorti pomoću informacija dobijenih HPTLC metodom, primenjene su hemometrijske metode diskriminacije. Metode su obuhvatile primenu PCA kao metode za redukciju broja varijabli, a zatim primena SIMCA, PCA-LDA i PLS-DA modela.

Rezultati klasifikacije pokazale su da SIMCA i PLS-DA daje veoma lošu prediktivnu sliku te su ovoj doktorskoj disertaciji prikazani samo rezultati dobijeni PCA-LDA metodom klasifikacije (**Tabela 8a**). Prema konfuzionoj matrici (tabela 8), nijedna sorta nije u potpunosti tačno klasifikovana. Kod sorte Amfora i Kurtovska kapija, tačno je klasifikovano 8 od 10 uzoraka. Sa druge strane, kod sorte Una i Vrtka je tačno klasifikovano 9 od 10 uzoraka. Sveukupno, procenat tačno klasifikovanih uzoraka iznosio je 85%.

**Tabela 8a.** Konfuziona matrica klasifikacije različitih sorti paprike PCA-LDA metodom

		Očekivano			
		AMF5	KK5	UNA5	VRT5
Predviđeno	AMF5	8	0	0	0
	KK5	1	8	0	0
	UNA5	0	1	9	1
	VRT5	1	1	1	9

Poređenjem sa modelima koji su formirani na osnovu informacija dobijenih Ramanovom spektroskopijom, može se zaključiti da je metoda Ramanove spektroskopije dala pouzdanije i preciznije rezultate. Treba napomenuti da se metodom Ramanove spektroskopije dobijaju informacije i o drugim prisutnim analitima osim karotenoida i da su uzorci snimani u svežem stanju. Samim tim, količina informacija kojom se raspolaže korišćenjem Ramanove spektroskopije je veća pa se posledično mogu napraviti fine razlike između sorti paprike.

### 5.3. Određivanje sadržaja ukupnih ispitivanih bioaktivnih komponenti

U plodovima paprike, pored ukupnih i pojedničanih karotenoida, određivan je sadržaj ostalih sekundarnih metabolita, odnosno ukupnih polifenola i flavonoida.

#### 5.3.1. Ukupni karotenoidi

U pogledu ukupnih karotenoida, rezultati su pokazali da kod svih ispitivanih sorti količina raste sa sazrevanjem (**Tabela 9**). Primera radi, kod sorte Vrtka, porast ukupnih karotenoida u poslednjoj fazi u odnosu na početnu fazu sazrevanja iznosio je 4713,23%, kod sorte Una 1332,10%, kod sorte Amfora iznosio 587,83%, dok je kod sorte Kurtovska kapija iznosio 396,13% (**Tabela 9**). Analizirajući sortu Kurtovska kapija, najmanji procenatalni skok ukupnih karotenoida, očekivano, primećen je između faze 2 i faze 3.

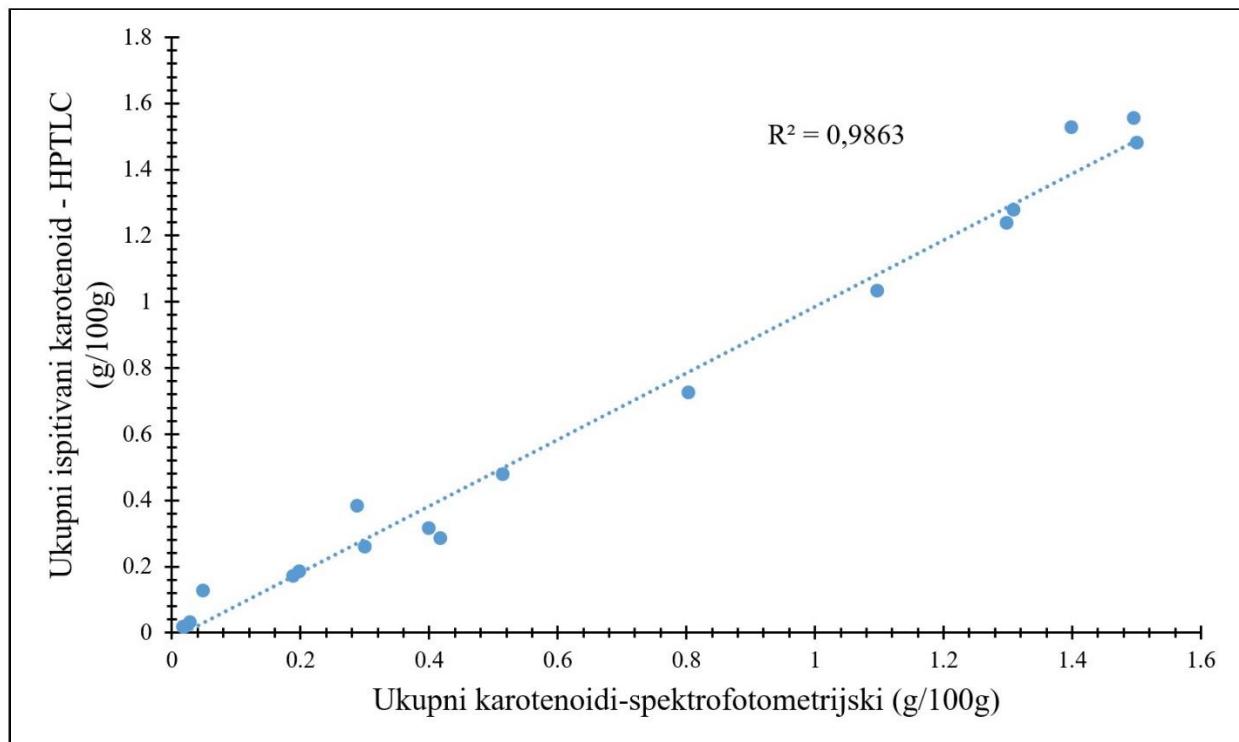
Najveća količina ukupnih karotenoida zabeležena je u fazi pune zrelosti kod svih ispitivanih sorti, a najviše vrednosti primećene su kod sorte Vrtka (1502,21 mg/100g) i Kurtovska kapija (1498,21±60,89 mg/100g). Najmanja količina ukupnih karotenoida zabeležena je početnoj fazi sazrevanja (faza 1) u svim ispitivanim sortama a najniža vrednost uočena je kod sorte Una (20,22 mg/100g) (**Tabela 9 i Slika 43a**). Primenom metode Analize varijanse pokazano je da razlika u količini ukupnih karotenoida između fazi 3 i 5 statistički značajna kod svih ispitivanih genotipova. Takođe, količina ukupnih karotenoida u ajvaru u odnosu na fazu pune zrelosti je statistički značajno manja kod svih ispitivanih uzoraka.

**Tabela 9.** Rezultati analize ukupnih karotenoida u ekstraktima ispitivanih paprika i u ajvaru

Naziv uzorka	Ukupni karotenoidi mg/100 g	Promena ukupnih karotenoida kroz fazе sazrevanja i u proizvodu u odnosu na početnu fazu – fazu 1 (%)	Promena ukupnih karotenoida kroz fazе sazrevanja i u proizvodu u odnosu na prethodnu fazu (%)
Amfora faza 1	190,60±3,23a	0,00	0,00
Amfora faza 3	200,21±10,55a	5,04	5,04
Amfora faza 5	1311,01±15,84b	587,83	554,82
Amfora ajvar	1099,35±15,62c	476,78	-16,14
Kurtovska kapija faza 1	301,98±13,98a	0,00	0,00
Kurtovska kapija faza 2	401,56±10,23b	32,98	32,98
Kurtovska kapija faza 3	419,31±15,96b	38,85	4,42
Kurtovska kapija faza 4	805,45±32,23c	166,72	92,09
Kurtovska kapija faza 5	1498,21±60,89d	396,13	86,01
Kurtovska kapija ajvar	1401,11±59,01e	363,97	-6,48
Una faza 1	20,22±1,63a	0,00	0,00
Una faza 3	22,01±1,21a	8,85	8,85
Una faza 5	289,57±14,58b	1332,10	1215,63
Una ajvar	51,08±2,66c	152,62	-82,36
Vrtka faza 1	31,21±1,28a	0,00	0,00
Vrtka faza 3	515,05±20,21b	1550,27	1550,27
Vrtka faza 5	1502,21±70,74d	4713,23	191,66
Vrtka ajvar	1299,09±60,21c	4062,42	-13,52

Rezultati Deli i sar. (2001) pokazuju sličan trend kao i rezultati prikazani ovom doktorskom disertacijom. Međutim, u radovima Deepa i sar. (2007) količina ukupnih karotenoida u finalnoj fazi zrelosti je maksimalno iznosila oko 130 mg/100 g (sorta Anupan), dok je kod određenih sorti iznosila ispod 11mg/100g (sorta Flamingo). Sve navedeno dovodi do zaključka da je količina karotenoida sortno uslovljena osobina, kao i da se u pogledu ukupnih karotenoida, domaće sorte crvene paprike mogu okarakterisati kao bogate, među kojima se posebno može istaći sorta Kurtovka kapija i autohtonu domaću sortu Vrtka. Zanimljivo je da u pogledu ukupnih karotenoida, očekivano, tradicionalni proizvod sadrži nešto manje količine karotenoida u odnosu na finalnu fazu sazrevanja i u proseku procentualni pad je bio za oko 6,48 % kod sorte Kurtovska kapija, 13,52 % kod sorte Vrtka, 16,14 % kod sorte Amfora i oko 82 % kod sorte Una (**Tabela 9**). Ovaj rezultat je u skladu sa navodima iz literature (Sevindik Bać i sar., 2023) prema kojima se neki karotenoidi kao na primer  $\beta$ -karoten ne degradiraju u velikoj meri prilikom termičke obrade, a takođe, njihova degradacija biva sprečena i prisustvom uljanog matriksa, što je bila situacija u slučaju ajvara. Rezultati dobijeni HPTLC metodom pokazali su sličan trend, odnosno najveći pad ukupnih ispitivanih karotenoida zabeležen je kod sorte Una, a najmanji kod sorte Kurtovska kapija.

Treba napomenuti da je količina ukupnih ispitivanih karotenoida HPTLC metodom u vrlo jakoj pozitivnoj korelaciji ( $r=0,9930$ ,  $r^2=0,9863$ ) sa ukupnim karotenoidima koji su mereni spektrofotometrijski (**Slika 42**). Prema rezultatima Deli i sar. (2001) količina ukupnih karotenoida značajno raste sa sazrevanjem i kreće se od 19,60 mg/100g suve mase u fazi tehnološke zrelosti do 1297,12 mg/100g suve mase u fazi tehnološke zrelosti što je približno rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji.



**Slika 42.** Zavisnost između ukupnih karotenoida merenih spektrofotometrijski i ukupnih ispitivanih karotenoida merenih HPTLC metodom

### 5.3.2. Ukupni flavonoidi

Rezultati analize ukupnih flavonoida u ekstraktima ispitivanih paprika i ajvaru pokazali su trend smanjenja sa sazrevanjem. Najveća količina ukupnih flavonoida zabeležena u fazi 1 (faza tehnološke zrelosti) kod svih sorti i iznosila je kod sorte Vrtka 95,12 mg/g QE, Amfora 75,23 mg/g QE, Una 60,15 mg/g QE i Kurtovska kapija 50,44 mg/g QE. Najmanja količina ukupnih flavonoida u fazi fiziološke zrelosti zabeležena je kod sorte Kurtovska kapija (10,11 mg/g QE) i Una (12,25 mg/g QE) (**Tabela 10 i Slika 43a**).

Najveći procentualni pad količine ukupnih flaovnoida u odnosu na fazu 1 zabeležen je u fazi 5 i ajvaru i iznosio je među 70-80% kod svih sorti. Procentualni pad količine ukupnih flavonoida kod ajvara kod svih sorti u odnosu na fazu 5 iznosio je od 2,18 % kod Kurtovske kapije do 9,94 % kod Amfore (**Tabela 10**).

**Tabela 10.** Rezultati analize ukupnih flavonoida u ekstraktima ispitivanih paprika i u ajvaru

Naziv uzorka	Ukupni flavonoidi mg/g QE	Promena ukupnih flavonoida kroz faze sazrevanja i u proizvodu u odnosu na početnu fazu – fazu 1 (%)	Promena ukupnih flavonoida kroz faze sazrevanja i u proizvodu u odnosu na prethodnu fazu (%)
Amfora faza 1	75,23	0.00	0.00
Amfora faza 3	50,50	-32.87	-32.87
Amfora faza 5	20,12	-73.26	-60.16
Amfora ajvar	18,12	-75.91	-9.94
Kurtovska kapija faza 1	50,44	0.00	0.00
Kurtovska kapija faza 2	35,95	-28.73	-28.73
Kurtovska kapija faza 3	30,48	-39.57	-15.22
Kurtovska kapija faza 4	20,08	-60.19	-34.12
Kurtovska kapija faza 5	10,11	-79.96	-49.65
Kurtovska kapija ajvar	9,89	-80.39	-2.18
Una faza 1	60,15	0.00	0.00
Una faza 3	31,81	-47.12	-47.12
Una faza 5	12,05	-79.97	-62.12
Una ajvar	11,59	-80.73	-3.82
Vrtka faza 1	95,12	0.00	0.00
Vrtka faza 3	63,66	-33.07	-33.07
Vrtka faza 5	30,12	-68.33	-52.69
Vrtka ajvar	28,19	-70.36	-6.41

Literaturni podaci pokazuju da količina ukupnih flavonoida opada tokom sazrevanja dok u nekim slučajevima u prelazim fazama pokazuje povećanje a zatim opet opada sa zrenjem (Kovács et al., 2022).

Treba napomenuti da stabilnost flavonoida zavisi od dužine izlaganja visokim temperaturama, pH sredine u kojima se flavonoidi nalaze, zatim matriksa hrane, prisustva kiseonika, proteina, šećera itd. Sa druge strane, primećuje se da svi ispitivani ajvari pokazuju male promene u ukupnim flavonoidima u odnosu na fazu pune zrelosti. Razlog tome može biti matriks u kome se ajvar nalazi a u kome je jedan od sastojaka sirće čija se pH kreće između 2,4 i 3,4. Ovakva pH sredina omogućava stabilnost flavonoida i sprečava njihovu degradaciju (Zeng et al., 2017). Sa druge strane, naravno, stabilnost flavonoida zavisi i od njihove hemijske strukture. Ovom prilikom nisu rađeni detaljni profili flavonoida te iz tog razloga nije bilo moguće detaljnije razmatrati ovu problematiku.

### 5.3.3. Ukupni polifenoli

Rezultati analize ukupnih polifenola u ekstraktima ispitivanih paprika pokazali su trend pada sa sazrevanjem. Najveća količina ukupnih polifenola u fiziološkoj fazi zrelosti zabeležena je kod sorte Una (12,22 mg/g GAE), zatim Amfora (9,46 mg/g GAE), dok je najmanja količina zabeležena kod sorte Vrtka (7,58 mg/g GAE) (**Slika 43a**).

Zanimljivo je što na prvi pogled, količina polifenola stoji u obrnutoj proporciji u odnosu na karotenoide kada je reč o fazi pune zrelosti crvene paprike, što možda može biti u vezi sa opštim metaboličkim putevima i metaboličkoj i fiziološkoj ravnoteži između glavnih grupa sekundarnih metabolita, kao i njihovoj međusobnoj integraciji u odnosu na adaptivni značaj u odgovarajućim fazama razvića.

Kada je u pitanju ajvar, količina ukupnih polifenola je rasla ili opadala u odnosu na količinu ukupnih polifenola u fazi fiziološke zrelosti (faza 5) kod različitih sorti. Tako na primer, kod sorti Amfora i Vrtka količina ukupnih polifenola je povećana u ajvaru u odnosu na fazu fiziološke zrelosti, dok je kod sorti Kurtovska kapija i Una obrnut slučaj (Tabela 11). U odnosu na početnu fazu sazrevanja (faza 1), procentualno najveći pad ukupnih polifenola primećen je u poslednjoj fazi sazrevanja (faza 5) kod svih ispitivanih genotipova. Najveći pad količine ukupnih polifenola zabeležen je kod sorte Kurtovska kapija (84,63 %), zatim kod sorte Una (81,52 %) i sorte Vrtka (80,57 %), dok je kod sorte Amfora iznosio 76,48 % (**Tabela 11**).

**Tabela 11.** Rezultati analize ukupnih polifenola u ekstraktima ispitivanih paprika i u ajvaru

Naziv uzorka	Ukupni polifenoli	Promena ukupnih polifenola kroz faze sazrevanja i u proizvodu u odnosu na početnu fazu – fazu 1 (%)	Promena ukupnih polifenola kroz faze sazrevanja i u proizvodu u odnosu na prethodnu fazu (%)
	mg/g GAE		
Amfora faza 1	40,22±3,01d	0,00	0,00
Amfora faza 3	15,13±0,76c	-62,38	-62,38
Amfora faza 5	9,46±1,47a	-76,48	-37,48
Amfora ajvar	10,55±1,53b	-73,77	11,52
Kurtovska kapija faza 1	54,21±3,71e	0,00	0,00
Kurtovska kapija faza 2	30,09±2,50d	-44,49	-44,49
Kurtovska kapija faza 3	15,66±1,78c	-71,11	-47,96
Kurtovska kapija faza 4	12,10±1,60b	-77,68	-22,73
Kurtovska kapija faza 5	8,33±0,42a	-84,63	-31,16
Kurtovska kapija ajvar	7,56±1,38a	-86,05	-9,24
Una faza 1	66,12±4,30d	0,00	0,00
Una faza 3	16,07±1,80c	-75,70	-75,70
Una faza 5	12,22±1,11b	-81,52	-23,96
Una ajvar	11,11±0,71a	-83,20	-9,08
Vrtka faza 1	39,02±2,95d	0,00	0,00
Vrtka faza 3	14,23±1,71c	-63,53	-63,53
Vrtka faza 5	7,58±0,451a	-80,57	-46,73
Vrtka ajvar	8,69±0,44b	-77,73	14,64

Literaturni podaci pokazuju da količina ukupnih polifenola može da raste ili da opada sa sazrevanjem. Prema rezultatima Sun i sar. (2007) količina ukupnih polifenola značajno je veća u fazi fiziološke zrelosti u odnosu na paprike u fazi tehnološke zrelosti. Kovács i sar. (2022) ispitivali su količinu ukupnih polifenola u sortama paprike kroz četiri faze sazrevanja. Rezultati ove studije pokazali su da kod većine sorti količina polifenola opada sa sazrevanjem, kao i u ovoj doktorskoj disertaciji. Navedeni rezultati i rezultati dobijeni u ovoj studiji dovode do zaključka da je količina ukupnih polifenola verovatno sortno uslovljena osobina.

Rezultati ukupnih polifenola u ajvaru pokazali su da njihova količina opada ili raste u odnosu na fazu pune zrelosti (fazu 5) u zavisnosti od sorte. Kada su u pitanju sorte Kurtovska kapija i Una, količina ukupnih polifenola opada oko 9% dok kod Sorti Amfora i Vrtka raste za 11,52 odnosno 14,64 %.

Poznato je da termostabilnost polifenola (kao i flavonoida) zavisi od velikog broja faktora kao što pH, prisustva kiseonika, dužine izlaganja topotnom tretmanu, matriksa hrane, itd. (Antony i Farid, 2022). Pored toga, dokazano je da su polifenoli stabilniji u prisustvu flavonoida i da time formiraju kompleksije strukture koje su stabilnije nego u slučaju pojedinačnog prisustva polifenola odnosno flavonoida.

Rezultati ukupnih flavonoida su pokazali da su sorte Amfora i Vrtka bogatije flavonoidima u odnosu na ostala dva ispitivana genotipa te stoga to može biti razlog veće stabilnosti polifenola. Pored toga, naravno da treba uzeti u obzir raznovrstnost i različite hemijske građe polifenolih jedinjenja koji su prisutni u paprici i u finalnom proizvodu a za sta nema literaturnih podataka. Sa druge strane, primećuje se da svi ispitivani ajvari pokazuju male promene u ukupnim polifenolima u odnosu na fazu pune zrelosti. Razlog tome može biti matriks u kome se ajvar nalazi a u kome je jedan od sastojaka sirće čija se pH kreće između 2,4 i 3,4. Ovakva pH sredina omogućava stabilnost polifenola (Zeng et al., 2017).

Generalno, stabilnost polifenola je veoma kompleksno objasniti jer zavisi od velikog broja faktora. Stabilnost polifenola u prisustvu flavonoida ili neke druge polifenolne komponente zavisi i od toga koje je specifično polifenolno ili flavonoidno jedinjenje prisutno, uslova u kojima se matriks nalazi, interkacije između molekula u samom matriksu itd.

## 5.4. Antioksidativni kapacitet ekstrakta paprike i ajvara

### 5.4.1. DPPH<sup>•</sup>

Rezultati DPPH<sup>•</sup> analize su pokazali da sa sazrevanjem paprike dolazi do povećanja inhibicije DPPH<sup>•</sup> radikala u svih ispitivanim sortama. Takođe, trend blagog opadanja inhibicije u ekstraktu ajvara u odnosu na fazu fiziološke zrelosti (faza 5) primećen je kod svih sorti (**Tabela 12**). Najveću sposobnost hvatanja DPPH<sup>•</sup> radikala pokazale su sorte Kurtovska kapija (1,50 µmol ekvivalenta TEAC/g SM) i sorte Vrtka (1,49 µmol ekvivalenta TEAC/g SM), zatim Amfora (1,39 µmol ekvivalenta TEAC/g SM) dok je najmanja vrednost zabeležena kod sorte Una (1,18 µmol ekvivalenta TEAC/g SM) sto je u skladu sa rezultatima dobijenim HPTLC metodom ukupnih karotenoida i spektrofotometrijski (**Slika 43a**).

Zabeleženi rezultati inhibicije DPPH radikala su u korelaciji sa rezultatima ukupnih karotenoida, odnosno sa rastom količine ukupnih karotenoida raste inhibicija DPPH radikala. Takođe, rezultati HPTLC analize su pokazali da su sorte Kurtovska kapija i Vrtka najbogatije ispitivanim karotenoidima. Ovi rezultati navode da su vrednosti inhibicije DPPH radikala uslovljeni količinom karotenoida u ekstraktu.

Sa druge strane, količina ukupnih karotenoida u ajvaru blago opada u odnosu na fazu 5 kod svih ispitivanih sorti dok se sličan rezultat dobio i kod inhibicije DPPH radikala. Inhibicija DPPH radikala opala je kod ajvara u odnosu na fazu 5 u opsegu od 6,78 % do 16,03 % (**Tabela 12**). Kada su u pitanju procentualne promene rezultata inhibicije DPPH radikala u ajvaru u odnosu na fazu pune zrelosti (faza 5), zabeleženo je da je najveći procentualni pad zabeležen kod sorte Vrtka (16,03 %), zatim Kurtovska kapija (10,67 %) i Amfora (10,27 %), dok je najmanji pad zabeležen kod sorte Una (6,78 %).

**Tabela 12.** Rezultati antioksidativnog kapaciteta merenjem hvatanja DPPH<sup>•</sup> radikala izraženi kao µmol ekvivalentni TEAC po g suve mase uzorka

Naziv uzorka	DPPH <sup>•</sup>	Promena inhibicije DPPH radikala kroz faze sazrevanja i u proizvodu u odnosu na početnu fazu – fazu 1 (%)	Promena inhibicije DPPH radikala kroz faze sazrevanja i u proizvodu u odnosu na prethodnu fazu (%)
	µmol/g TEAC		
Amfora faza 1	0,23±0,03a	0,00	0,00
Amfora faza 3	0,61±0,02b	165,22	165,22
Amfora faza 5	1,46±0,19d	534,78	139,34
Amfora ajvar	1,31±0,15c	469,57	-10,27
Kurtovska kapija faza 1	0,21±0,06a	0,00	0,00
Kurtovska kapija faza 2	0,40±0,04b	90,48	90,48
Kurtovska kapija faza 3	0,91±0,07c	333,33	127,50
Kurtovska kapija faza 4	1,04±0,09d	395,24	14,29
Kurtovska kapija faza 5	1,50±0,11f	614,29	44,23
Kurtovska kapija ajvar	1,34±0,15e	538,10	-10,67
Una faza 1	0,30±0,04a	0,00	0,00
Una faza 3	0,89±0,04b	196,67	196,67
Una faza 5	1,18±0,02d	293,33	32,58
Una ajvar	1,10±0,02c	266,67	-6,78
Vrtka faza 1	0,21±0,01a	0,00	0,00
Vrtka faza 3	0,46±0,04b	223,91	223,91
Vrtka faza 5	1,49±0,09d	184,78	-12,08
Vrtka ajvar	1,31±0,07c	139,13	-16,03

Dobijeni rezultati su u skladu sa ranije objavljenim rezultatima istraživanja (El-Ghorab i sar., 2013; Elkholy i sar., 2023; Ghasemnezhad i sar., 2011; Sun i sar., 2007). Sun i sar., (2007) su ispitivali sposobnost inhibicije DPPH<sup>•</sup> radikala tokom sazrevanja paprike i rezultati su pokazali da je inhibicija rasla sa sazrevanjem. Sa druge strane, Ghasemnezhad i sar., (2011) su ispitivali razlike u hvatanju DPPH<sup>•</sup> radikala u dve faze sazrevanja (tehnološkoj i fiziološkoj) i zaključili da je u fiziološkoj fazi sazrevanja veća sposobnost hvatanja ispitivanog radikala. Fitriansyah i sar. (2018) ispitivali su povezanost (korelacije) između količine karotenoida u ekstraktu biljke *Phyllanthus emblica* i inhibicije DPPH radikala i zaključili su da postoji jaka pozitivna korelacija ( $r=0,97$ ). Ovi navodi su u skladu sa našim rezultatima i ukazuju na značaj karotenoida u sposobnosti neutralizacije štetnih kiseoničnih vrsta. **Tabela 13** prikazuje rezultate korelace analize gde se može primetiti da su korelacije između rezultata antioksidativnog DPPH testa i ukupnih karotenoida (spektrofotometrijski i ukupni ispitivani karotenoidi mereni HPTLC metodom) statistički značajne kod svih ispitivanih sorti osim kod sorte Una.

**Tabela 13.** Pirsonov korelacioni koeficijent između vrednosti DPPH analize i ukupnih karotenoida merenih spektrofotometrijski

Ispitivane korelacije	Sorta	Amfora	Kurtovska kapija	Una	Vrtka
Korelacije između rezultata DPPH analize I ukupnih karotenoida merenih spektrofotometrijski	Pirsonov korelacioni koeficijent	<b>0,965*</b>	<b>0,907*</b>	0,589	<b>0,992**</b>
	p vrednost	0,035	0,013	0,411	0,008
Korelacije između rezultata DPPH analize i ukupnih karotenoida dobijenih sabiranjem pojedinačnih karotenoida merenih HPTLC metodom	Pirsonov korelacioni koeficijent	<b>0,963*</b>	<b>0,879*</b>	0,682	<b>0,994**</b>
	p vrednost	0,037	0,021	0,318	0,006

\*korelacija je statistički značajna ( $p<0,05$ )

\*\*korelacija je statistički vrlo značajna ( $p<0,01$ )

#### 5.4.2. CUPRAC

Rezultati CUPRAC testa su takođe pokazali da vrednosti rastu sa sazrevanjem ploda paprika (od tehnološke do fiziološke zrelosti) dok kod ajvara vrednosti antioksidativnog potencijala blago opadaju.

Najveća vrednost u fazi pune zrelosti (faza 5) zabeležena je kod sorte Amfora (faza 5) i iznosio je 0,305 mg GAE/g SM), zatim Kurtovske kapije (0,297 mg GAE/g SM) i Une (0,249 mg GAA/g SM), dok je najniža vrednost zabeležena kod sorte Vrtka (0,225 mg GAA/g SM) (Tabela 7). Najmanje vrednost CUPRAC testa zabeležena je kod sorte Vrtka u fazi tehnološke zrelosti (0,178 mg GAE/g SM) (faza 1) (**Tabela 14 i Slika 43a**).

Rezultati CUPRAC testa su u pozitivnoj korelaciji sa rezultatima DPPH što je i očekivano s obzirom da su oba testa dizajnirana na taj način da mere sposobnost supstanci da deluju kao antioksidansi. Razlika je u mehanizmu (principima) samih metoda, ali cilj metoda je isti. Takođe, poznato je da rezultati ova dva testa pokazuju isti smer odnosno trend (Al-Rimawi et al., 2017).

Poznato je da na vrednost CUPRAC testa utiče veliki broj sekundarnih (specijalnih) metabolita kao što su polifenoli, flavonoidi i karotenoidi (Gülenç, 2022). Rezultati CUPRAC testa pokazuju negativnu korelaciju sa sadržajem polifenola i flavonoida, dok sa karotenoidima ima pozitivnu (direktnu) povezanost. Razlog tome je pre svega to što su ekstrakti daleko bogatiji karotenoidima nego polifenolima i flavonoidima te karotenoidi više doprinose rezultatima CUPRAC testa (**Slika 43a**).

Kada je u pitanju procentualna promena antioksidativnog kapaciteta u fazi 5 u odnosu na početnu fazu zrenja (faza 1), najveći porast zabeležen je kod sorte Amfora (64,43 %), dok je najmanji zabeležen kod sorte Vrtka i iznosio je 26,40 % (**Tabela 14**).

Rezultati procentulnog smanjenja antiosidativnog kapaciteta ekstrakta ajvara u odnosu na fazu pune zrelosti (faza 5) pokazao je da je najmanji pad zabeležen kod sorte Kurtovska kapija sa svega 2,12 % manjim antioksidativnim kapacetetom u odnosu finalnu fazu sazrevanja. Takođe, sorta Vrtka je pokazala nisku vrednosti i ona je iznosila 8,89 %. Najveći pad antiosidativnog kapaciteta prilikom obrade paprike (spravljanja ajvara) zabeležen je kod sorte Amfora (20,38 %) i Una (20,48 %) (**Tabela 14**). Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima procentualne promene ukupnih karotenoida merenih spektrofotometrijski.

Preciznije, sorte Kurtovska kapija i Vrtka su pokazale najmanju procentualnu promenu ukupnih karotenoida prilikom tehnološkog procesa spravljanja finalnog proizvoda.

**Tabela 14.** Rezultati analize antioksidativnog kapaciteta metodom CUPRAC

Naziv uzorka	CUPRAC	Promena CUPRAC aktivnosti kroz faze sazrevanja i u proizvodu u odnosu na početnu fazu – fazu 1 (%)	Promena CUPRAC aktivnosti kroz faze sazrevanja i u proizvodu u odnosu na prethodnu fazu (%)
	mg Galne kiseline/g suve mase uzorka		
Amfora faza 1	0,194±0,03	0,00	0,00
Amfora faza 3	0,205±0,02	5,67	5,67
Amfora faza 5	0,319±0,02	64,43	55,61
Amfora ajvar	0,254±0,02	30,93	-20,38
Kurtovska kapija faza 1	0,205±0,02	0,00	0,00
Kurtovska kapija faza 2	0,209±0,02	1,95	1,95
Kurtovska kapija faza 3	0,200±0,02	-2,44	-4,31
Kurtovska kapija faza 4	0,256±0,02	24,88	28,00
Kurtovska kapija faza 5	0,297±0,02	44,88	16,02
Kurtovska kapija ajvar	0,291±0,02	41,95	-2,02
Una faza 1	0,185±0,02	0,00	0,00
Una faza 3	0,185±0,02	0,00	0,00
Una faza 5	0,249±0,03	34,59	34,59
Una ajvar	0,198±0,02	7,03	-20,48
Vrtka faza 1	0,178±0,02	0,00	0,00
Vrtka faza 3	0,199±0,02	11,80	11,80
Vrtka faza 5	0,225±0,02	26,40	13,07
Vrtka ajvar	0,205±0,02	15,17	-8,89

#### 5.4.3. FRP

Rezultati FRP pokazuje da antioksidativni kapacitet raste sa sazrevanjem paprike u svim sortama dok se kod ajvara značajno ne menja u odnosu na vrednosti u finalnoj fiziološkoj fazi sazrevanja (finalna faza sazrevanja). Najveću vrednosti antioksidativnog kapaciteta imala je sorta Kurtovska kapija (25,66 mgAsA/g SM) i Amfora (24,23 mgAsA/g SM) dok su najniže vrednosti zabeležene kod sorti Una (15,81 mgAsA/g SM) i Vrtka (15,22 mgAsA/g SM) (**Tabela 15 i Slika 43a**).

**Tabela 15.** Rezultati sposobnosti redukcije  $\text{Fe}^{3+}$  jona

Naziv uzorka	mgAsA/g SM	Promena FRP aktivnosti kroz faze sazrevanja i u proizvodu u odnosu na početnu fazu – fazu 1 (%)	Promena FRP aktivnosti kroz faze sazrevanja i u proizvodu u odnosu na prethodnu fazu (%)
Amfora faza 1	12,36±0,59	0,00	0,00
Amfora faza 3	16,54±0,73	33,82	33,82
Amfora faza 5	24,23±1,10	96,04	46,49
Amfora ajvar	23,08±1,15	86,73	-4,75
Kurtovska kapija faza 1	10,37±0,52	0,00	0,00
Kurtovska kapija faza 2	10,23±0,51	-1,35	-1,35
Kurtovska kapija faza 4	13,74±0,72	32,50	34,31
Kurtovska kapija faza 4	16,36±0,75	57,76	319,07
Kurtovska kapija faza 5	25,66±1,30	147,44	56,85
Kurtovska kapija ajvar	25,12±1,26	142,24	-2,10
Una faza 1	9,33±0,47	0,00	0,00
Una faza 3	10,11±0,51	8,36	8,36
Una faza 5	15,81±0,79	69,45	56,38
Una ajvar	16,13±0,75	72,88	2,02
Vrtka faza 1	10,11±0,61	0,00	0,00
Vrtka faza 3	13,16±0,66	11,80	11,80
Vrtka faza 5	15,22±0,77	26,40	13,07
Vrtka ajvar	14,89±0,80	15,17	-8,89

Kada je u pitanju kapacitet redukcije  $\text{Fe}^{3+}$  jona kod ajvara, najmanji procentualni pad u odnosu na finalnu fazu sazrevanja zabeležen je kod sorte Kurtovska kapija (2,1%), zatim kod sorte Amfora (4,75 %) i Vrtka (8,89 %) dok je kod sorte Una zabeležen blagi porast od 2,02 % koji nije bio statistički značajan (**Tabela 15**). Literaturni podaci u većini slučajeva pokazuju sličan trend, ali se sporadično javljaju sorte kod kojih je ovaj trend obrnut (Deepa i sar., 2007; Kovács i sar., 2022).

Svi sprovedeni aktioksidativni testovi pokazali su trend porasta vrednosti sa sazrevanjem plodova. S obzirom da su ovi uzorci bili bogatiji karotenoidima nego ostalim sekundarnim metabolitima, može se zaključiti da biološkoj aktivnosti ekstrakta plodova paprika doprinose uglavnom karotenoidi.

#### 5.4.4. Bioraspoloživost i biološki efekti karotenoida

##### 5.4.4.1. Biodostupnost karotenoida iz poda paprike i ajvara sorte Una

Rezultati sadržaja ukupnih karotenoida u uzorcima liofilisane paprike sorte Una različitim faza zrelosti i u ajvaru, nakon *in vitro* gastrointestinalne digestije, prikazani su u **Tabeli 16**. Sadržaj ukupnih karotenoida nakon digestije je bio 7,52 mg/100g SM u uzorku paprike faze 1; 7,62 mg/100g SM u uzorku paprike faze 3; 16,19 mg/100g SM u uzorku paprike faze 5; i 66,86 mg/100g SM u ajvaru. Kao što se može videti, ukupni karotenoidi u uzorcima plodova tokom sukcesivnih faza razvića, posebno u fazi pune zrelosti su imali značajno manji sadržaj ukupnih karotenoida, u poređenju sa ajvarom.

Kako bi se odredila potencijalna biodostupnost ukupnih karotenoida, izvršeno je poređenje ukupnih karotenoida pre (kontrolni uzorci) i nakon *in vitro* gastrointestinalne digestije. Da bi rezultati za biodostupnost bili verodostojnije prikazani, sadržaj ukupnih karotenoida meren je u polaznim uzorcima koji su ekstrahovani aceton:heksan (1:1, v/v) mešavinom, jer se ovo ekstrakciono sredstvo u predhodnim analizama pokazalo kao optimalno.

**Tabela 16.** Biodostupnost karotenoidnih jedinjenja ekstrakta ploda paprika pre i posle *in vitro* gastrointestinalne digestije (rezultati su prikazani kao mg/100g suve materije)

Uzorak	Pre digestije mg/100g	Nakon digestije mg/100g	Procenat biodostupnosti u odnosu na početni ekstrakt (%)
Una faza 1	20,22	7,52	37,19
Una faza 3	22,01	7,62	34,60
Una faza 5	289,57	16,19	5,59
Una ajvar	51,08	66,82	130,81

Razlike u biodostupnosti ukupnih karotenoida u uzorcima paprika različitih faza zrelosti mogu biti posledica prisustva pojedinih dominantnih karotenoida tokom razvića ploda, kao i njihove osjetljivosti na različite uslove kojima su izloženi tokom gastrointestinalne digestije. Prilikom prolaska hrane bogate karotenoidima kroz gastrointestinalni trakt, ona biva izložena različitim okruženjima i uslovima koji su karakteristični za usnu duplju, jednjak, želudac, tanko crevo i debelo crevo (Li et al., 2020). Svaki od ovih gastrointestinalnih regiona je specifičan po mehaničkim, hemijskim i enzimatskim procesima, uključujući sastav i kompoziciju proteina, soli, različit pH, a posebno tip digestivnih enzima (Tan et al., 2022) (**Slika 43**).

Tokom oralne faze digestije u našem eksperimentu, došlo je do mešanja liofilizata parike sa veštačkom pljuvačnom tečnošću. Nakon toga, u gastričnoj fazi (želudac) došlo je do razlaganja matriksa hrane/nutrijenata i oslobođanja karotenoida. U intestinalnoj fazi (tanko crevo) oslobođeni karotenoidi se mešaju sa simuliranim crevnom tečnošću koja je dizajnirana da imitira uslove u tankom crevu gde dolazi do apsorpcije karotenoida zahvaljujući mikrovilima enterocita, tj. epitelnim ćelijama unutrašnje starne crevnog zida. Rezultati HPTLC analize su pokazali da kod sorte Una, u početnim fazama razvića ploda dominiraju lutein i zeaksantin, dok se β-karoten, kapsanit i β-kriptoksantin javlju tek u fazi pune fiziološke zrelosti (faza 5). Stabilnost karotenoida, kao što je već navedeno, zavisi od temperature, ali i od izloženosti svetlosti i promene pH vrednosti sredine u kojoj se nalaze. Poznato je da su lutein i zeaksantin karotenoidi koji su stabilni pri neutralnoj do slabo kiseloj sredini (pH 6-7) (Xiao & Ahn, 2022), dok im alkalna sredina (pH>7) ne odgovara. Generalno, stabilnost luteina i zeaksantina je nezavisna od vrednosti pH, osim blage degradacije pri visokoj pH vrednosti (većoj od 8) (Davidov-Pardo et al., 2016). Pri visokoj vrednosti pH, dolazi do izomerizacije luteina i zeaksantina što dovodi do smanjenja njihove stabilnosti kao i smanjenja obojenosti, posledično utičući na njihove biološke osobine. Visoke pH vrednosti inače nisu karakterisitčne ni za jedan kompartment gastrointestinalnog trakta, te se efikasnija apsorpcija luteina/zeaksantina mogla očekivati.

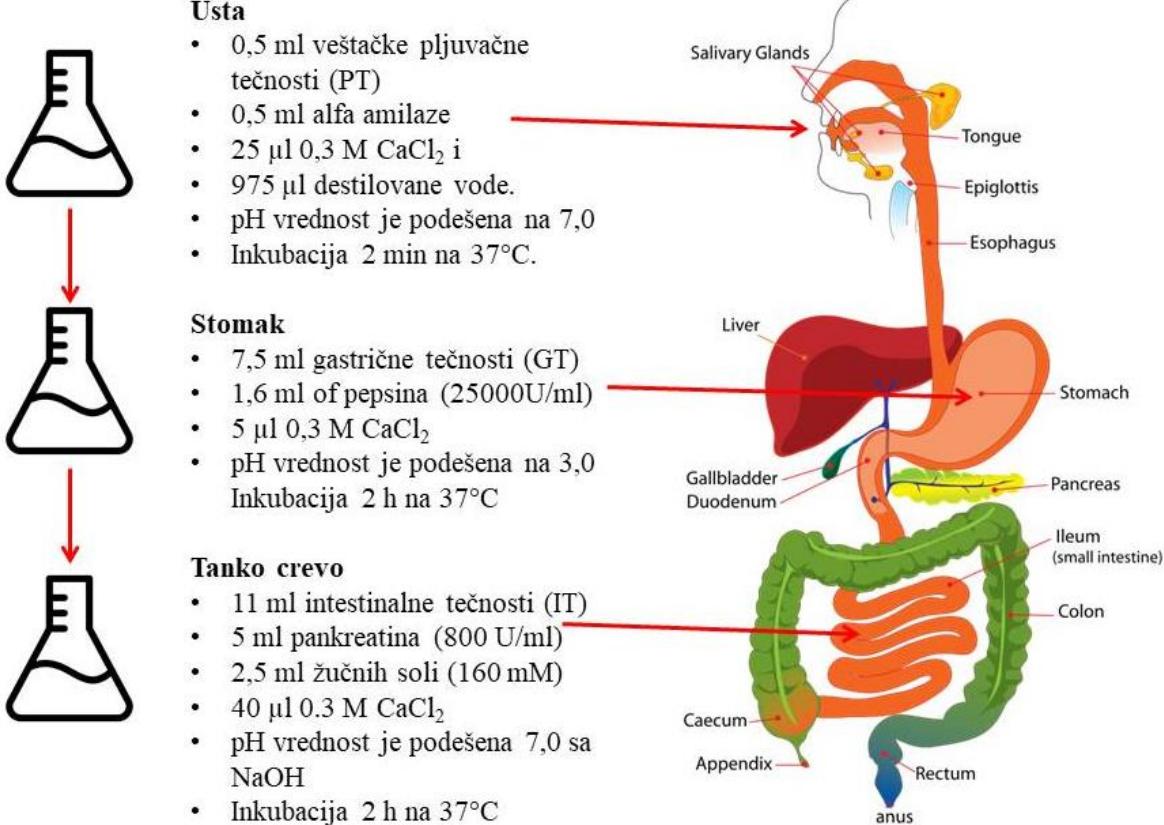
Sa druge strane, β-karoten predstavlja karotenoid koji je, takođe, relativno stabilan pri pH od blago kisele do neutralne (pH~6-7), ali je, pri nižoj vrednosti pH, tj. u kiseloj sredini podložan hemijskoj degradaciji što dovodi do gubitka boje i smanjenja nutritivne vrednosti namirnice u uslovima sniženog pH (Shao et al., 2017; Sheng et al., 2018).

S obzirom da su faze 1 i 3 bogate karotenoidima koji su stabilniji u pogledu promene pH u oralnoj (pH~6-7), gastričnoj (pH~1-5) i intenstinalnoj fazi digestije (pH~6-7) (lutein i zeaksantin), time se može objasniti veći procenat biodostupnosti u odnosu na fazu pune zrelosti (faza 5) koja je bogata manje stabilnim karotenoidima na uticaje promene pH vrednosti, a posebno na uslove kisele sredine ( $\beta$ -karoten i kapsantin) (Slika 43).

Kada je u pitanju ajvar, količina ukupnih karotenoida se povećala nakon digestije u odnosu na liofilizat zrele paprike, tj. materijal iz koga je ajvar i načinjen. Ajvar je proizvod koji je bogat suncokretovim uljem i samim tim, predstavlja uljani matriks. Prilikom digestije, u gastričnoj fazi dolazi do razgradnje ulja posredstvom enzima lipaze gde se kao proizvod dobijaju glicerol i masne kiseline. Glicerol, zajedno sa žučnim solima iz gastrične faze, okružuje molekule karotenoida i na taj način predstavlja zaštitu od dalje degradacije.

Nisku biodostupnost karotenoida i njihovih estara nakon digestije su takođe opisali Gomez-Maqueo et al., (2020) za biljku *Pouteria lucuma*. Međutim, u ovom radu je ispitivana biodostupnost pojedinačnih jedinjenja uz pomoć detaljnije hromatografske analize, što je preporuka za dalja istraživanja na uzorcima paprika i ajvara koji su bili predmet ove doktorske disertacije. Za razliku od paprika gde je primećena smanjena biodostupnost ukupnih karotenoida, u uzorku ajvara je biodostupnost ukupnih karotenoida bila visa, čak za 130,81%, što je bilo malo očekivano. Međutim, ako uzmemo u obzir da ajvar sadrži ulje, može se pretpostaviti da kapljice ulja "inkapsulišu" karotenoide, čime ih štite od degradacije i poboljšavaju njihovu biodostupnost nakon digestije. Pod uticajem lipaza (iz pankreatina), ulja se konvertuju do masnih kiselina i glicerida, koji zajedno sa žučnim solima formiraju mešane micele (Milinčić et al., 2023), koje okružuju karotenoide i povećavaju njihovu biodostupnost. Inače je dobro poznato da se usvajanje, tj. apsorpcija karotenoida u crevnom traktu značajno povećava u prisustvu lipida, odnosno u lipofilnom matriksu (Hedrén i sar., 2002; Hornero-Méndez i Mínguez-Mosquera, 2007; Kirkhus i sar., 2019). Međutim, ovo istraživanje se bazira na rezultatima spektrofotometrijske analize, pa su dodatne analize (primena Ramanove spektroskopije i hromatografskih tehnika) poželjne kako bismo dobili verodostojnije rezultate za biodostupnost pojedinačnih karotenoida.

Takođe, treba napomenuti, da je biodostupnost hidrofobnih bioaktivnih jedinjenja (pa tako i karotenoida) veća u hrani nego u suplementima, upravo zbog matriksa u kome se karotenoidi nalaze (Zheng et al., 2018). Zbog toga se nameće logično rešenje da hranu, posebno onu bogatu mastima treba obogaćivati (inkapsuliranim) karotenoidima. Tako na primer, mleko i jogurt se obogaćuju vitaminima A i D, hleb se obogaćuje vitaminom D. Obogaćivanje namirnica esencijalnim biološkim mikronutrijentima predstavlja važnu strategiju razvijanja funkcionalne hrane radi poboljšanja zdravlja ljudi, posebno u nerazvijenim zemljama i zemljama u razvoju gde je populacija neuhranjena ili je unos odgovarajućih nutrijenata nedovoljan (Rodriguez-Concepcion et al., 2018).



**Slika 43.** Šematski prikaz statičkog in vitro humanog digestionog modela

#### 5.4.4.2. Bioaktivnost ekstrakata karotenoida iz različitih sorti paprika i ajvara

##### Aktivnost enzima $\alpha$ -amilaze i tirozinaze

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da metanolni ekstrakti paprika u fiziološkoj fazi sazrevanja (faza 5) i u ajvaru inhibiraju aktivnost testiranih enzima  $\alpha$ -amilaze i tirozinaze.

Najveću inhibitornu aktivnost enzima  $\alpha$ -amilaze u fazi fiziološke zrelosti (faza 5) pokazala je sorta Amfora ( $IC_{50}=6,21\pm0,05$  mg/ml), zatim Kurtovska kapija ( $IC_{50}=6,36\pm0,06$  mg/ml), pa Una ( $IC_{50}=6,45\pm0,12$  mg/ml) dok je najmanju inhibitornu aktivnost pokazala sorta Vrtka ( $IC_{50}=8,33\pm0,04$  mg/ml). Kada je u pitanju ajvar, najveću inhibitironu aktivnost pokazao je ajvar sorte Amfora ( $IC_{50}=8,04\pm0,04$  mg/ml), zatim ajvar sorte Kurtovska kapija ( $IC_{50}=9,16\pm0,03$  mg/ml), pa ajvar Une ( $IC_{50}=9,56\pm0,13$  mg/ml), dok je najmanju inhibitornu aktivnost pokazao ajvar napravljen od autohtone sorte paprike Vrtka ( $IC_{50}=10,42\pm0,03$  mg/ml) (**Tabela 17 i Slika 43a**).

Inhibicija enzima tirozinaze pokazala je sličan trend. Najveću inhibiciju pokazao je metanolni ekstrakt paprike u fiziološkoj fazi zrelosti (faza 5) sorte Amfora ( $IC_{50}=3,50\pm0,05$  mg/mL), zatim sorte Kurtovska kapija ( $IC_{50}=3,53\pm0,05$  mg/mL), a najmanju sorte Vrtka ( $4,26\pm0,05$  mg/ml) i Una ( $4,27\pm0,05$  mg/ml). Kada je u pitanju ajvar, najveću inhibitornu aktivnost ispoljio je ajvar sorte Amfora ( $IC_{50}=4,98\pm0,05$  mg/ml), zatim ajvar sorte Vrtka ( $IC_{50}=5,26\pm0,05$  mg/ml), a najmanju ajvar sorte Una ( $IC_{50}=5,79\pm0,05$  mg/ml), kao i ajvar Kurtovske kapije ( $IC_{50}=5,82\pm0,05$  mg/ml) (**Tabela 17**).

Ispitivani ekstrakti pokazali su inhibiciju pomenutih enzima, ali značajno manju u odnosu na uzete pozitivne kontrole (komerijalno dostupne lekove). Kao pozitivna kontrola za inhibiciju enzima  $\alpha$ -amilaze korišćena je akarboza, a njena IC<sub>50</sub> vrednost je iznosila  $5,2 \pm 0,16$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Sa druge strane, pozitivna kontrola za inhibiciju enzima tirozinaze bila je kojična kiselina čija je IC<sub>50</sub> vrednost iznosila  $20,00 \pm 0,2$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  (**Tabela 17**).

**Tabela 17.** Uticaj metanolnih ekstrakata ispitivanih paprika i ajavara na inhibiciju enzima  $\alpha$ -amilaza i tirozinaza (IC<sub>50</sub>)

Uzorak	$\alpha$ -amilaza (mg/ml)	tirozinaza (mg/ml)	Procentualno smanjenje inhibicije enzima $\alpha$ amilaze u ajvaru u odnosu na fazu fiziološke zrelosti (faza 5)	Procentualno smanjenje inhibicije enzima tirozinaze u ajvaru u odnosu na fazu fiziološke zrelosti (faza 5)
Amfora	$6,21 \pm 0,05^A$	$3,50 \pm 0,05^A$		
Amfora ajvar	$8,04 \pm 0,04^B$	$4,98 \pm 0,05^B$	22,76	28,57
Kurtovska kapija	$6,36 \pm 0,06^C$	$3,53 \pm 0,05^C$	30,58	60,65
Kurtovska kapija ajvar	$9,16 \pm 0,03^D$	$5,82 \pm 0,05^D$		
Una	$6,45 \pm 0,12^C$	$4,27 \pm 0,05^E$	32,53	73,75
Una ajvar	$9,56 \pm 0,13^E$	$5,79 \pm 0,05^F$		
Vrtka	$8,33 \pm 0,04^F$	$4,26 \pm 0,05^E$	20,06	81,00
Vrtka ajvar	$10,42 \pm 0,03^G$	$5,26 \pm 0,05^G$		
Akarboza	$0,0052 \pm 0,00016$	-	-	-
Kojična kiselina	-	$0,0200 \pm 0,0002$	-	-

Naši rezultati ukazali su da sveža paprika (liofilizat) u fazi pune zrelosti ispoljava veće biološke efekte, odnosno veću inhibiciju oba ispitivana enzima, nego njihov proizvod – ajvar. Ovo se može objasniti kompleksnijim sastavom nutrijenta u svežim plodovima, gde su sačuvana različita termolabilna jedinjenja, koja su se transformisala ili razložila tokom termičke obrade spravljanja ajvara. Poznato je da je crvena slatka paprika u fazi pune zrelosti bogata kvercetinom, mircetinom i luteolinom, kao i karotenoidima (Tundis et al., 2011; Bae et al., 2012). S obzirom da metanolni ekstrakt sadrži veliki broj bioaktivnih komponenti, uključujući pre svega fenole, flavonoide i druge polifenolne komponente, a u određenoj meri i karotenoide, izvršena je analiza povezanosti između inhibitorne aktivnosti ispitivanih enzima i ukupnog sadržaja glavnih grupa sekundarnih metabolita u metanolnim ekstraktima liofilizata sorti paprika u fiziološkoj fazi sazrevanja i u odgovarajućim tradicionalnim proizvodima. Rezultati spektrofotometrijskih analiza sadržaja ukupnih ispitivanih bioaktivnih jedinjenja prikazani su u **Tabeli 18**. Količina ukupnih karotenoida u svežoj paprici (faza 5) kretala se u opsegu  $0,15 \pm 0,01$  mg/g kod sorte Una do  $0,48 \pm 0,02$  mg/g kod sorte Amfora. Kada je u pitanju količina ukupnih karotenoida u ajvaru, najmanja količina zabeležena je takođe kod sorte Una ( $0,09 \pm 0,02$  mg/g), a najveća opet kod sorte Amfora ( $0,81 \pm$  mg/g). Ukupni polifenoli pokazali su isti trend, te je najmanja količina polifenola zabeležena kod sorte Una i iznosila je  $4,54 \pm 0,08$  mg/g i  $4,57 \pm 0,06$  mg/g u ajvaru, dok je najveća količina polifenola utvrđena kod sorte Amfora i iznosila je  $6,84 \pm 0,09$  mg/g u zrelim plodovima i  $6,57 \pm$  mg/g u ajvaru.

Ukupni flavonoidi pokazali su nešto drugačije rezultate: najmanja količina zabeležena je kod sorte Una i iznosila je  $4,46 \pm 0,11$  mg/g dok je kod ajvara najmanja količina zabeležena kod sorta Vrtka i iznosila je  $4,50 \pm 0,12$  mg/g u ajvaru. Najveća količina flavonoida zabeležena kod sorte Kurtovska kapija i iznosila je  $9,15 \pm 0,25$  mg/g i  $8,90 \pm 0,15$  u ajvaru (**Tabela 18**).

**Tabela 18.** Rezultati ukupnih ispitivanih bioaktivnih jedinjanja iz metanolnog ekstrakta paprike i ajvara. Rezultati su predstavljeni kao prosečna vrednost  $\pm$  SD

Faza	Uzorci	UK (mg/g)	UP (mg/g) GAE	UF (mg/g) QE	UK+UP (mg/g)	UK+UF (mg/g)	UF+UP (mg/g)	UK+UP+UF (mg/g)
Faza 5	AMF	$0,48 \pm 0,02$	$6,84 \pm 0,09$	$7,91 \pm 0,08$	$7,32 \pm 0,08$	$8,39 \pm 0,36$	$14,75 \pm 0,08$	$15,23 \pm 0,08$
	KK	$0,24 \pm 0,02$	$6,56 \pm 0,08$	$9,15 \pm 0,25$	$6,80 \pm 0,08$	$9,39 \pm 0,44$	$15,71 \pm 0,08$	$15,95 \pm 0,08$
	UNA	$0,15 \pm 0,01$	$4,54 \pm 0,06$	$4,46 \pm 0,11$	$4,69 \pm 0,08$	$4,61 \pm 0,25$	$9,00 \pm 0,08$	$9,15 \pm 0,08$
	VRT	$0,33 \pm 0,02$	$4,83 \pm 0,08$	$4,65 \pm 0,08$	$5,16 \pm 0,07$	$4,98 \pm 0,32$	$9,48 \pm 0,08$	$9,81 \pm 0,08$
Ajvar	AMF AJV	$0,81 \pm 0,02$	$6,57 \pm 0,08$	$8,03 \pm 0,08$	$7,38 \pm 0,08$	$8,83 \pm 0,20$	$14,60 \pm 0,08$	$15,41 \pm 0,08$
	KK AJV	$0,19 \pm 0,02$	$5,09 \pm 0,08$	$8,90 \pm 0,15$	$5,28 \pm 0,07$	$9,09 \pm 0,15$	$13,99 \pm 0,08$	$14,18 \pm 0,08$
	UNA AJV	$0,09 \pm 0,02$	$4,57 \pm 0,08$	$7,91 \pm 0,08$	$4,66 \pm 0,06$	$8,00 \pm 0,03$	$12,48 \pm 0,08$	$12,57 \pm 0,08$
	VRT AJV	$0,55 \pm 0,02$	$4,60 \pm 0,08$	$4,50 \pm 0,12$	$5,15 \pm 0,08$	$5,04 \pm 0,05$	$9,10 \pm 0,08$	$9,64 \pm 0,08$

UK-ukupni karotenoidi; UP-ukupni polifenoli; UF; ukupni flavonoidi

SD-standardna devijacija

Korelacije između ukupnog sadržaja glavnih grupa bioaktivnih molekula (polifenoli, flavonoidi, karotenoidi) i inhibitorne aktivnosti metanolnih ekstrakata na enzime  $\alpha$ -amilazu i tirozinazu prikazani su u **tabeli 19**. Korelacije između ispitivanih grupa bioaktivnih jedinjenja i IC50 vrednosti za enzim  $\alpha$ -amilazu uglavnom nisu bile statistički značajne, osim slabih korelacija između IC50 vrednosti ekstrakata paprike u fiziološkoj fazi sazrevanja i ukupnih flavonoida ( $r=-0,577$ ), kao i IC50 vrednosti ekstrakta ajvara i ukupnih flavonoida ( $r=-0,580$ ). Sa druge strane, korelacije između IC50 vrednosti i ukupnih polifenola i karotenoida nisu bile statistički značajne (**Tabela 19**).

Kada su u pitanju korelacije između IC50 vrednosti i ukupnih bioaktivnih komponenti metanolnih ekstrakata sveže paprika, one nisu bile statistički značajne. Sa druge strane, rezultati su pokazali statistički značajne korelacije korelacije između IC50 vrednosti i ukupnih bioaktivnih komponenti iz metanolnih ekstrakata ajvara. Naime, ukupni polifenoli i flavonoidi iz metanolnog ekstrakta ajvara pokazuju statistički vrlo značajne negativne korelacije sa IC 50 vrednostima za enzim tirozinazu (za UP  $r=-0,968$  i za UF  $r=-0,941$ ) kao i sa sumom ukupnih bioaktivnih jedinjenja (za UK+UP  $r=-0,953$ , za UK+UF= $-0,949$ , za UF+UP  $r=-0,965$ , za UK+UF+UF= $-0,966$ ) (**Tabela 19**). To znači da sa povećanjem količine ispitivanih bioaktivnih jedinjenja opada IC50 vrednost, odnosno da postoji veza između količine ovih jedinjenja i inhibicije ispitivanog enzima. Veća korelacija između uticaja ekstrakta ajvara na aktivnost enzima tirozinaze može biti posledica niskog sadržaja bioaktivnih molekula ili manje složenog matriksa u smislu sastava i količine bioaktivnih molekula. Za detaljnija tumačenja aktivnosti enzima potrebno je sprovesti opsežnija istraživanja koja bi uključivali veći broj sorti paprike i ajvara.

Studije su pokazale da vitamini, karotenoidi i fenoli iz ploda paprike, salate, mrkve i drugog povrća, pokazuju inhibitornu aktivnost prema  $\alpha$ -amilazi (Gopal et al., 2017; Oboh et al., 2011; Yusuf et al., 2021). Rezultati Watcharachaisoponsiri i sar., 2016) pokazali su da plod crvene paprike ima antidiabetički efekat zahvaljujući različitim mehanizmima inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze što doprinosi nizu zdravstvenih benefita kao što su regulacija telesne mase, poboljšanje insulinske rezistencije, zaštita  $\beta$ -ćelija od apoptoze itd. Međutim, u studiji koja je predmet ove doktorske disertacije nisu dobijeni slični rezultati.

Prema rezultatima (Della Valle et al., 2020), slatka paprika, odnosno njen ekstrakt ima inhibitorno dejstvo prema enzimu tirozinaza, ali sposobnost inhibicije zavisi od načina ekstrakcije koja utiče na količinu antitirozinazne komponente koja će se ekstrahovati, kao što je npr. katehin. Prema istim autorima, načini ekstrakcije se mogu poređati na sledeći način počev od najboljeg: mikrotalasna ekstrakcija>Sokslet>dekokcija u heksanu>dekokcija u metanolu.

**Tabela 19.** Korelace matrice između ispitivanih bioaktivnih molekula i IC50 vrednosti

Uzorak	Bioaktivne komponente	$\alpha$ -amilaza		tirozinaza	
		Pirsonov korelacioni koeficijent	p vrednost	Pirsonov korelacioni koeficijent	p vrednost
Fiziološka faza sazrevanja (faza 5)	<b>UK</b>	0,376	0,229	0,291	0,359
	<b>UP</b>	-0,08	0,805	0,230	0,472
	<b>UF</b>	<b>-0,577*</b>	<b>0,05</b>	-0,017	0,959
	<b>UK+UP</b>	0,04	0,902	0,259	0,416
	<b>UK+UF</b>	-0,537	0,072	0,033	0,918
	<b>UF+UP</b>	-0,487	0,109	0,074	0,818
	<b>UK+UP+UF</b>	-0,432	0,161	0,112	0,73
Ajvar	<b>UK</b>	0,034	0,916	-0,479	0,115
	<b>UP</b>	-0,560	0,058	<b>-0,968**</b>	0,000
	<b>UF</b>	<b>-0,580*</b>	<b>0,048</b>	<b>-0,941**</b>	<b>0,000</b>
	<b>UK+UP</b>	-0,517	0,086	<b>-0,953**</b>	<b>0,000</b>
	<b>UK+UF</b>	-0,565	0,055	<b>-0,949**</b>	<b>0,000</b>
	<b>UF+UP</b>	<b>-0,582*</b>	<b>0,047</b>	<b>-0,965**</b>	<b>0,000</b>
	<b>UK+UP+UF</b>	-0,570	0,053	<b>-0,966**</b>	<b>0,000</b>

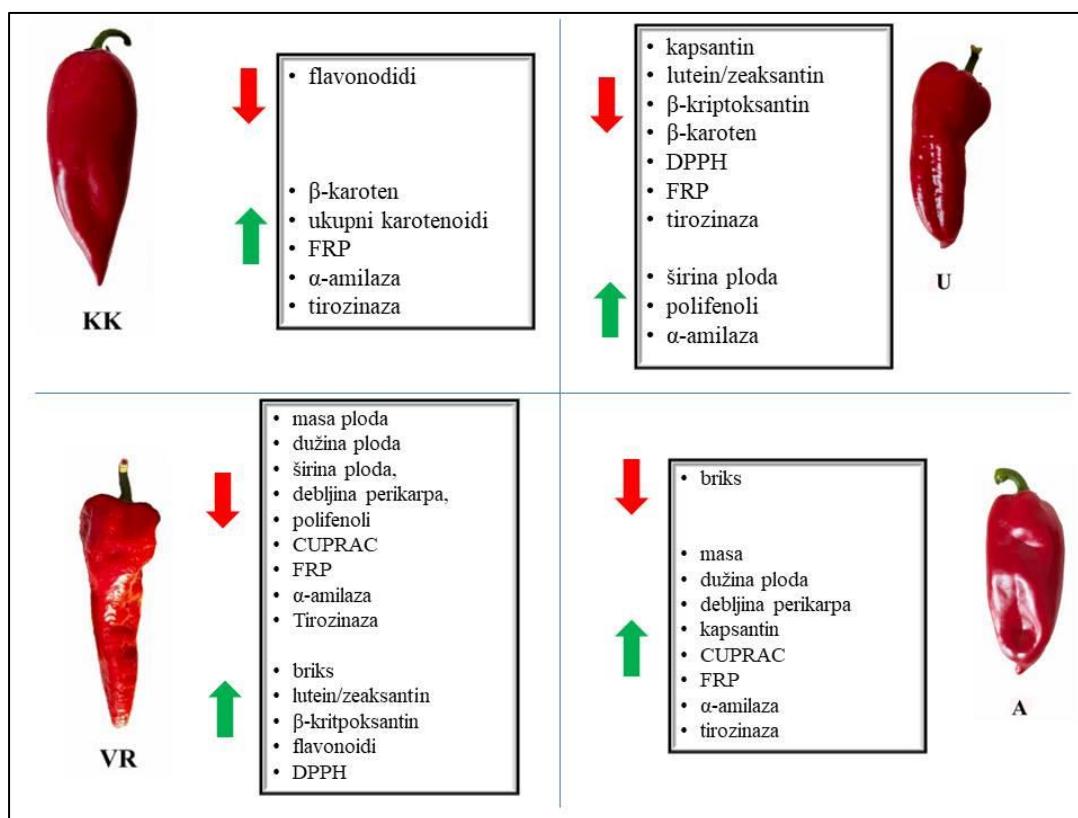
\*statistički značajne korelacije ( $p<0,05$ )

UK-ukupni karotenoidi i ; P-polifenoli; UF-ukupni flavonoidi

Kao što je već navedeno, tirozinaza je ključni enzim koji je uključen u sintezu melanina, pigmenta koji je odgovoran za boju kože, kose i očiju. Inhibicija ovog enzima može biti značajna u slučajevima poemećaja hiperpigmentacije. Pokazano je da sniženje aktivnosti enzima tirozinaze od strane polifenola, flavonoida i karotenoida uključuje nekoliko mehanizama, kao što su kompetitivna inhibicija, nekompetitivna inhibicija, heliranje, regulacije ekspresije gena za sintezu melanina i dr. (Tang i sar., 2018; Yu i sar., 2019).

U slučaju kompetitivne inhibicije, polifenoli i flavonoidi deluju kao kompetitivni inhibitori tako što se vežu direktno za aktivno mesto tirozinaze. Na ovaj način se sprečava da supstrat (uglavnom L-tirozin) veže za eznim i podvrgne katalitičkoj reakciji. Kada je u pitanju nekompetitivna inhibicija, polifenoli i flavonoidi se mogu vezati za mesta na enzimu koja nisu aktivna (alosterna mesta). Ovakva vrsta vezivanja izaziva konformacionu promenu u enzimu, čineći ga manje efikasnim u katalizi reakcije. Polifenoli i flavonoidi takođe mogu da utiču na ekspresiju gena uključenih u sintezu melanina, uključujući i tirozinazu. Smanjenjem ekspresije ovih gena, može se smanjiti stvaranje tiroiznaze i posledično melanina. Karotenoidi imaju inhibitorno dejstvo na enzim tiroizinazu, ali detaljniji mehanizmi delovanja nisu još uvek sasvim proučeni (de Morais i sar., 2018).

Treba napomenuti i efekat sinergističkog inhibitornog delovanja bioaktivnih komponenti na aktivnosti enzima tirozinaza i  $\alpha$ -amilaza (Y. Wang i sar., 2018; Yu i sar., 2019; Oskoueian i sar., 2011; Nanok i Sansenya, 2021; Smit i sar., 2004). To znači da bez obzira na koncentraciju određenih grupa bioaktivnih jedinjenja, njihovim kombinacijama se pojačava biološki efekat, što je pokazano I na nivou korelace analize u našem istraživanju.



**Slika 43a.** Sumarni prikaz rezultata morfoloških parametara, ukupnih bioaktivnih komponenti i biološke aktivnosti

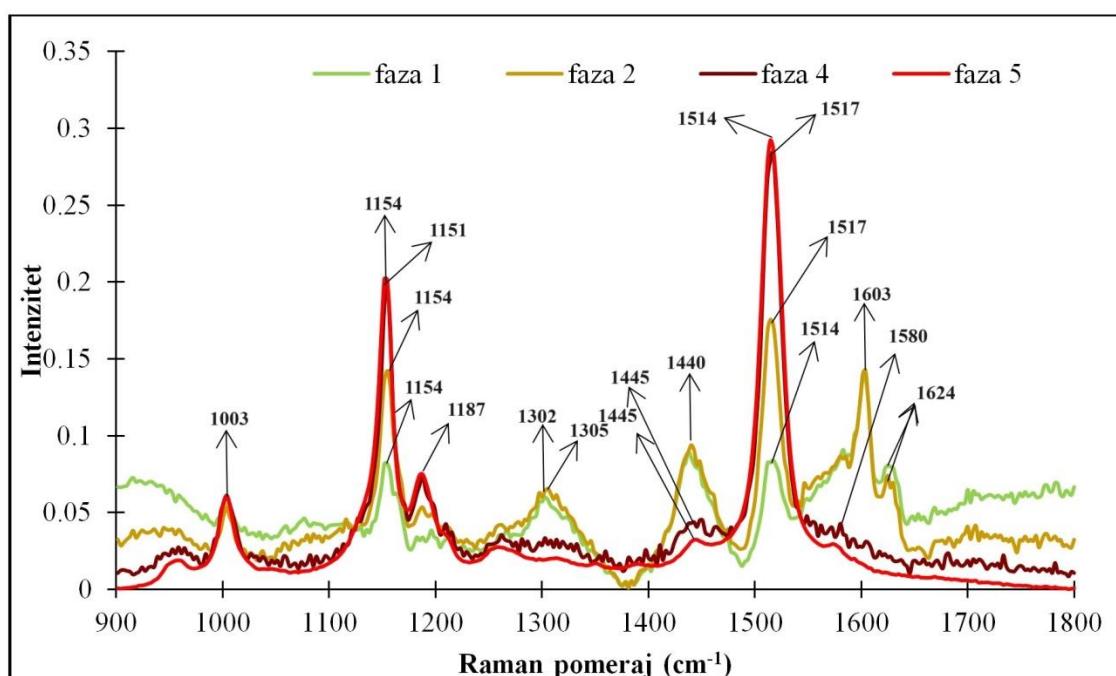
## 5.5. Analiza karotenoida Ramanovom spektroskopijom

Ramanova spektroskopija (RS) je u okviru ove doktorske disertacije primenjena u istraživanjima determinacije i zastupljenosti glavnih karotenoida u plodu različitih sorti crvene paprike, kao i njihovog tradicionalnog proizvoda, ajvara. Takođe, uvođenjem ove vibracione spektroskopske metode proučavana je i transformacija pojedinih karotenoida u toku zrenja ploda paprike.

Ramanova spektroskopija je po prvi put primenjena u nas u oblasti aplikativnih bioloških i biohemijskih istraživanja, i to specijalno sa aspekta kvaliteta hrane i prehrabbenih proizvoda. Koliko nam je poznato, istraživanja sprovedena u ovoj doktorskoj disertaciji koja se odnose na primenu RS kao metode kojom se može validirati sortna specifičnost na nivou nutrijenata u uzorku na modelu karotenoida, zatim promene sastava karotenoida tokom razvića i sazrevanja ploda, kao i konačno, testiranje niza hemometrijskih modela radi razvijanja pouzdanog i automatskog načina njihove kvantifikacije, nisu do sada vršena ni u svetu.

### 5.5.1. Hemometrijski modeli u obradi RS spektara u cilju prepoznavanja faze zrenja paprike

U cilju razvijanja preciznog modela u primeni RS za determinaciju različitih faza razvića ploda koje korespondiraju sa različitim sastavom i dominacijom pojedinih marker karotenoida, uzeti su sveži uzorci paprike u četiri sukcesivne faze razvića. Kao model biljka odabrana je standardna sorta Kurtovska kapija, zbog njene zastupljenosti na tržištu Srbije. Vizuelnom procenom uočeno je postojanje razlika u intenzitetu i položaju traka između različitih faza sazrevanja što ukazuje na razlike u hemijskom sastavu. Promene u intenzitetu traka na istoj poziciji tokom sazrevanja se mogu objasniti promenom u sadržaju određenih dominantnih karotenoida (**Slika 44**).



**Slika 44.** Ramanovi spektri paprika u različitim fazama sazrevanja. Bazna linija je korigovana, spektri su normalizovani i uprosećeni

**Tabela 20.** prikazuje pozicije posmatranih traka kroz faze sazrevanja i opisuje poreklo vibracija kao i potencijalno jedinjenje (tip karotenoida) sa kojim Ramanov signal može biti povezan. Trake na pozicijama na približno 1003, 1151–1154, i 1514–1517 cm<sup>-1</sup> su ključne za određivanje karotenoida (Baranska et al., 2013; Schulz et al., 2005; Trebolazabala et al., 2017b). Traka na poziciji 1514–1517 potiče od C-C istežućih vibracija (Baranska, Małgorzata; Roman i sar., 2013). Sa druge strane, prema Schulz i sar., (2005) karakteristične trake blizu 1510, 1524, 1530, and 1536 cm<sup>-1</sup> mogu biti pripisane karotenoidima sa 11, 9, 8 ili 7 konjugovanih dvostrukih veza, svaki za sebe. Traka na 1517 cm<sup>-1</sup> je karakteristična za zeleno-mrku i crvenu fazu, koja može biti pripisana istežućim vibracijama molekula sa 9 konjugovanih dvostrukih veza. Ramanove trake koje potiču od zelene i mrko crvene faze pokazuju hipsohromatični pomeraj (plavi pomeraj) pojavljujući se na 1514 cm<sup>-1</sup>, što takođe može biti pripisano istežućim vibracijama molekula sa 9 konjugovanih dvostrukih veza. Karotenoidi sa 9 konjugovanih dvostrukih veza u glavnom polienskom lancu koji se mogu naći u crvenoj paprici su lutein, β karoten, zeaksantin, β kriptoksantin i kapsantin (u zavisnosti od faze zrenja) (Deli i sar., 2001). Trake na poziciji 1151–1154 cm<sup>-1</sup> potiču od C-C vibracije glavnog polienskog lanca karotenoida (Baranska i sar., 2013; Trebolazabala i sar., 2017b). Traka 1154 cm<sup>-1</sup> je karakteristična za zelenu, zeleno-mrku i crvenu fazu, dok kod mrko-crvene faze je ova traka pomerena na 1151 cm<sup>-1</sup>. Primećeno je da trake u pomenutim regionima pokazuju povećanje u intenzitetu tokom sazrevanja.

Rezultati predstavljeni u **Tabeli 20** daju detaljan opis traka dobijenih Ramanovom spektroskopijom. Traka na 1003 cm<sup>-1</sup> se pojavljuje u svim fazama sazrevanja. Ova traka se odnosi na ljudljajuću deformaciju u ravni (eng. in plane rocking vibration) CH<sub>3</sub> grupe polienskog lanca karotenoida (Trebolazabala i sar., 2017). Traka na 1187 cm<sup>-1</sup> potiče od C-C istežućih vibracija (eng. stretching vibration) glavnog polienskog lanca (Withnall i sar., 2005). Rezultati pokazuju da ova traka povećava intenzitet tokom sazrevanja ploda što može biti povezano sa akumulajom glavnih karotenoida. Trake na 1603 and 1630 cm<sup>-1</sup> se javljaju zbog C-O-C and C-OH vibracija dok trake na 1583–1585 cm<sup>-1</sup> mogu biti povezane sa C-C istežućom vibracijom (Trebolazabala i sar., 2017). Ove trake mogu biti pripisane benzoevom prstenu (Schulz i Baranska, 2005; Trebolazabala i sar., 2017) koji je glavni konstituent fenolnih jedinjenja kao što su fenolne kiseline i flavonoidi (npr. kvercetin-3-glukozid) koji se javljaju kao značajni mikronutrijenti u crvenoj paprici (Lekala i sar., 2019). Navedene trake pokazuju smanjenje u intenzitetu tokom sazrevanja što je u korelaciji sa biohemiskim putem sinteze fenolnih jedinjenja u paprici (Ghasemnezhad i sar., 2007; Navaro i sar., 2006). Nadalje, trake na 1302–1305 cm<sup>-1</sup> mogu biti označene kao CH<sub>2</sub> uvijajuće vibracije što može biti povezano sa lipidima (Trebolazabala i sar., 2017), karakterističnim za zelenu (faza 1) i zeleno mrku fazu (faza 2), dok u mrko-crvenoj (faza 4) i crvenoj fazi (faza 5) ove trake nisu detektovane. Trake na 1440–1445 cm<sup>-1</sup> javljaju se zbog CH<sub>2</sub> savijajućih (deformacionih) vibracija molekula koji ulaze u sastav kutikularnih voskova (Trebolazabala i sar., 2017) i pokazuju tendenciju smanjenja tokom sazrevanja. Najveći signal/šum odnos zabeležen je između zeleno-mrka i crvene faze sazrevanja. U fazi fiziološke zrelosti, odnos signal/šum se značajno menja verovatno zbog smanjenja i degradacije hlorofila koji izaziva fluorescenciju i time menja odnos signal/šum (Huang i sar., 2009).

**Tabela 20.** Opis najznačajnih Ramanovih traka ploda paprike tokom 4 suksesivne faze sazrevanja

Zelena faza	Zeleno-mrka faza	Mrka-crvena faza	Crvena faza	Tipovi vibracija i njihove karakteristike	Tip jedinjenja
1003	1003	1003	1003	CH <sub>3</sub> ljliljuće vibracije u ravni koje potiču od konjugovanog polienskog lanca karotenoida (Trebolazabala i sar., 2017a)	Karoteni
1154	1154	1151	1154	C=C istežuće vibracije (Baranska, Małgorzata; Roman i sar., 2013)	Karoteni
1187	1187	1187	1187	C-C istežuće (valentne) vibracije polienkog lanca (Withnall i sar., 2003b)	Karoteni
1302	1305	/	/	CH <sub>2</sub> uvijajuće vibracije (Trebolazabala i sar., 2017a)	Lipidi
1440	1440	1445	1445	CH <sub>2</sub> deformacione vibracije (Trebolazabala i sar., 2017a)	Kutikularni vosak
1514	1517	1514	1517	C-C istežuće vibracije (Baranska, Małgorzata; Roman i sar., 2013)	Karoteni
1583	1585	/	/	C-C istežuće vibracije (Trebolazabala i sar., 2017a)	Fenolne komponente
1603	1603	/	/	COC i COH istežuće vibracije (Andreev i sar., 2001)	Fenolne komponente
1624	1624	/	/	COC i COH istežuće vibracije (Andreev i sar., 2001)	Fenolne komponente

Rezultati analize varijanse (ANOVA) (**Tabela 21**) su pokazali da postoji statistički značajna razlika u intenzitetima traka između mrkocrvene i crvene faze u pogledu traka koje potiču od karotenoida što je u skladu sa rezultatima dobijenim HPTLC analizom. Kada je u pitanju poređenje rezultata kvantifikacije, ovde to nije primenjivo jer su uzorci za analizu Ramanom snimani u intektnom stanju dok se za HPTLC sprovela kompletна priprema uzorka kroz ekstrakciju, verovatno zbog sličnog karotenoidnog sastava i malih razlika u koncentraciji u navedenim fazama.

Tokom procesa sazrevanja, sve navedene trake pokazuju povećanje u intenzitetu (**Slika 44**), što korenspondira sa akumulacijom ukupnih karotenoida, što je u skladu sa rezultatima dobijenih HPTLC metodom kao i metodom ukupnih kartotenoida merenih spektrofotometrijski. Dobro je poznato da je kapsantin dominantan karotenoid u crvenoj paprici (Kim i sar., 2016) pokazujući nekoliko puta veću koncentraciju u odnosu na ostale karotenoide, posebno u fazi fiziološke zrelosti (Rodríguez-Rodríguez i sar., 2020).

Povećanje koncentracije kapsantina je rezultat ekspresije kapsantin/kasporubin sintetaze koja se javlja neposredno nakon transformacije hloroplasta u hromoplaste, što ukazuje na funkcionalnu ulogu tog enzima u sazrevanju crvene paprika (Piano i sar., 2019). Prema de Oliveira i sar. (2010) lutein i β-karoten u zelenoj fazi bi trebalo da se pojave na 1515, 1156, i 1002 cm<sup>-1</sup>. Sa druge strane, Schulz i sar. (2005) su pokazali da u crvenoj paprici kapsantin pokazuje traku blizu 1517, 1158, and 1004 cm<sup>-1</sup>. Slični rezultati dobijeni su i u ovoj studiji.

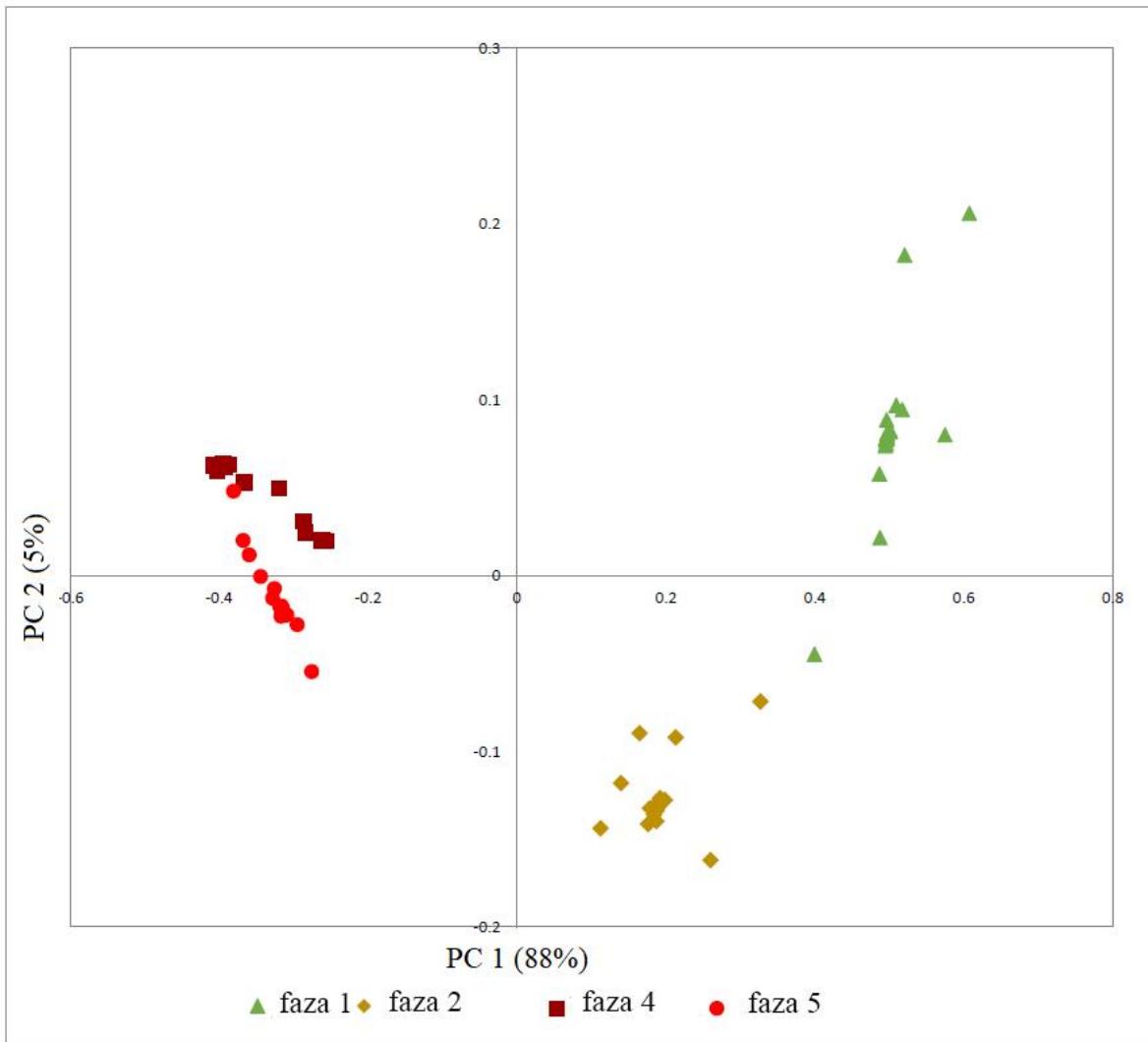
**Tabela 21.** Rezultati analize varijaanse intenziteta karakterističnih Ramanovih traka ispitivanih uzoraka paprika tokom faza sazrevanja ploda. Rezultati su predstavljeni kao prosek prosek  $\pm$  standardna devijacija intenziteta odabranih traka sa korigovanom baznom linijom

Ispitivane trake	Zelena faza (faza 1)	Zeleno-mrka faza (faza 2)	Mrko-crvena faza (faza 3)	Crvena faza (faza 4)
1003	115,91 $\pm$ 1,16a	336,68 $\pm$ 10,10b	226,11 $\pm$ 4,52c	675,46 $\pm$ 20,26d
1151-1154	407,65 $\pm$ 8,15a	517,03 $\pm$ 10,34b	608,60 $\pm$ 12,17c	2302,68 $\pm$ 46,05d
1187	137,71 $\pm$ 1,38a	205,64 $\pm$ 4,11b	234,91 $\pm$ 7,05c	826,94 $\pm$ 24,81d
1302-1305	167,72 $\pm$ 5,03a	357,82 $\pm$ 3,58b	n.d.	n.d.
1440-1445	301,71 $\pm$ 9,05a	520,05 $\pm$ 5,20c	411,09 $\pm$ 12,33b	546,12 $\pm$ 10,92d
1514-1517	474,42 $\pm$ 4,74a	525,11 $\pm$ 10,50b	791,86 $\pm$ 7,92c	3307,89 $\pm$ 66,16d
1583-1585	285,79 $\pm$ 8,57a	555,45 $\pm$ 11,11b	n.d.	n.d.
1603	634,39 $\pm$ 12,69a	845,89 $\pm$ 8,46b	n.d.	n.d.
1630	342,53 $\pm$ 6,85a	488,14 $\pm$ 14,64b	n.d.	n.d.

Prosečne vrednosti sa istim slovom u okviru istog reda nisu statistički značajno različite ( $p < 0.05$ ).

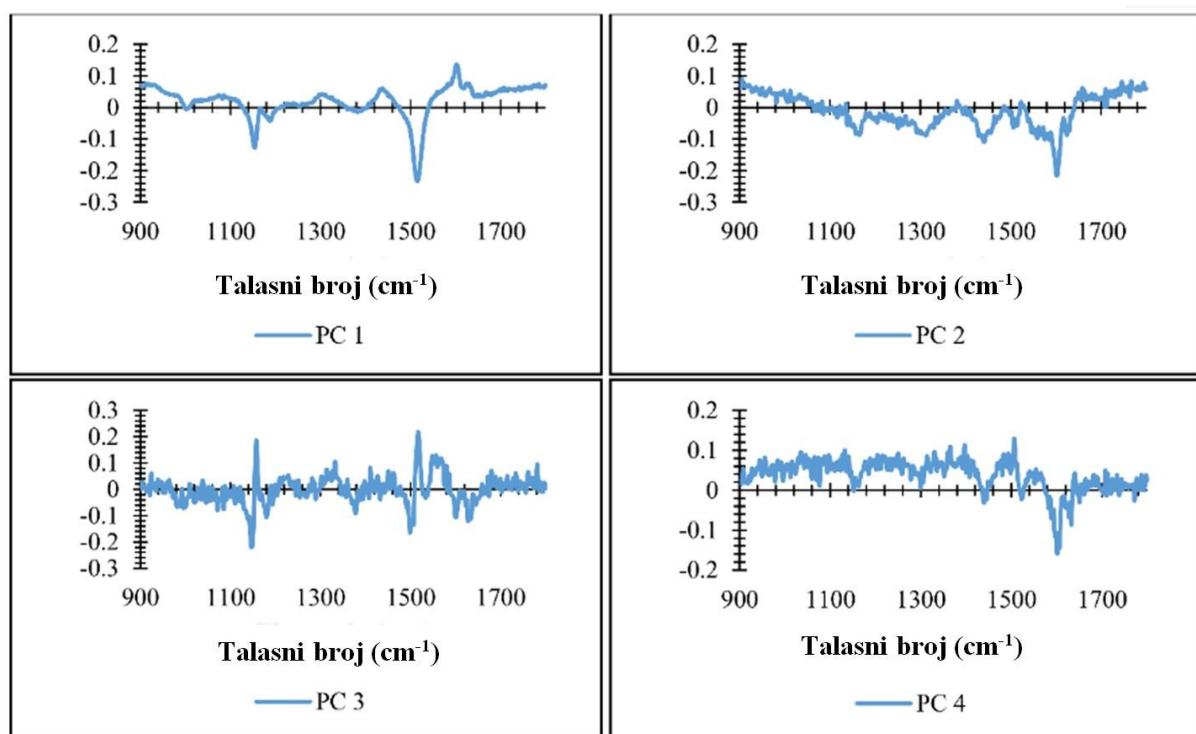
\*n.d. - nije detektovano

Primenom metode analize glavnih komponenata redukovao se broj varijabli (talasnih brojeva) i rezultat je manji broj međusobno nekorelasičnih varijabli (princip ortogonalnosti) odnosno glavnih komponenti (eng. principal components). Grafički prikaz PCA analize predstavlja dijagram rasipanja prve dve glavne komponente (**Slika 45**) i dijagram opterećenja (**Slika 46**). Uključivanjem prve dve glavne komponente u dalju analizu objašnjeno je 88% (PC1), odnosno 5% (PC2) ukupnih varijacija. Dijagram rasipanja jasno je pokazao grupisanje zelene i zeleno-mrke faze (označene kao faze 1 i 2) u odnosu na mrko-crvenu (faza 4) i duboko-crvenu fazu (fiziološka zrelost, ovde označena kao faza 5), koje su formirale poseban klaster (**Slika 45**).



**Slika 45.** Analiza glavnih komponenata – dijagram raspipanja uzoraka paprika u različitim fazama sazrevanja u prostoru prve dve glavne komponente (PC1 i PC2)

Rezultati dijagrama opterećenja pokazali su karakteristične talasne brojeve koji su doprineli razdvajaju grupu (**Slika 45**). Njihovom analizom ustanovljeno je da prva glavna komponenta pokazuje negativne vrednosti opterećenja na  $1187$ ,  $1151$  i  $1514\text{ cm}^{-1}$  i grupiše mrko-crvenu i crvenu fazu zrenja. Pozitivne vrednosti opterećenja prve glavne komponente primećene su na  $1630$ ,  $1603$ ,  $1440$  i  $1302\text{ cm}^{-1}$  što doprinosi grupisanju zelene i zeleno-mrka faze (faza 1 i 2). Sa druge strane, dijagram opterećenja druge glavne komponente pokazao je samo negativne vrednosti na  $1630$ ,  $1603$ ,  $1440$  i  $1165\text{ cm}^{-1}$  što doprinosi odvajjanju zeleno-mrka faze.



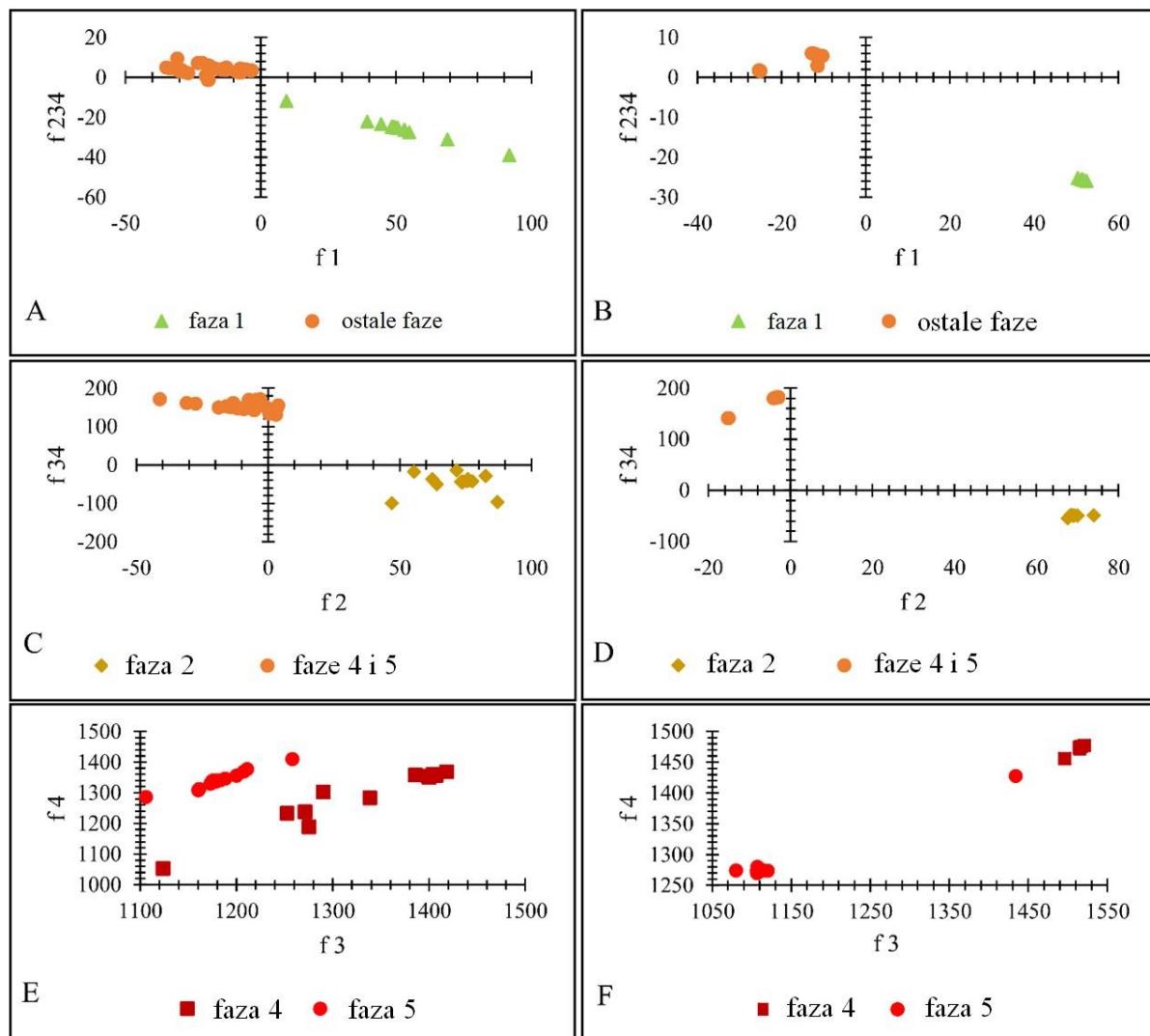
**Slika 46.** Dijagram opterećenja: talasni brojevi u funkciji prve, druge, treće i četvrte glavne komponente

### Multivariaciona klasifikaciona analiza

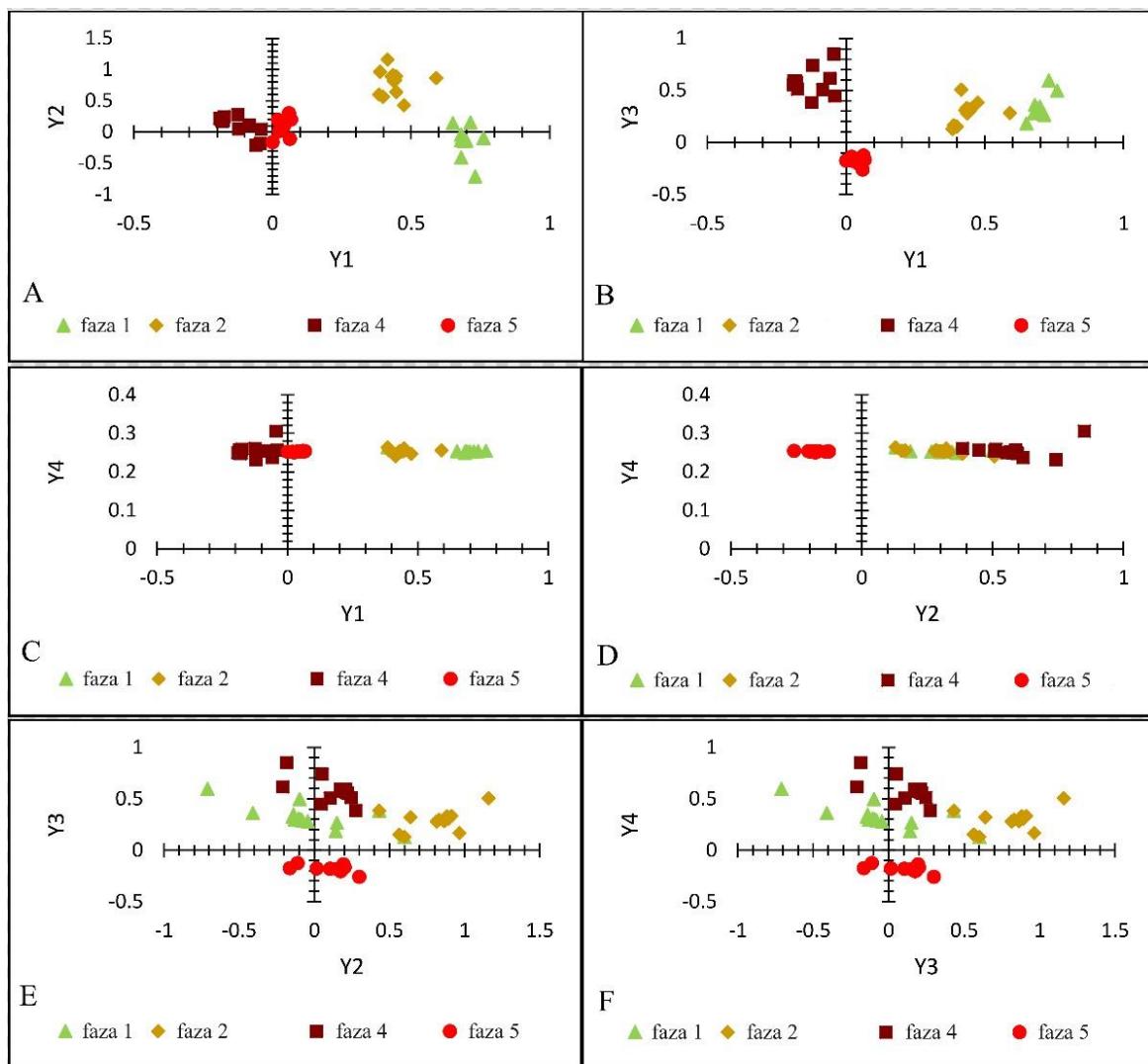
U cilju konstrukcije klasifikacionog modela za prepoznavanje faze zrenja ploda paprika korišćeni su PCA-LDA (eng. Principal Component Analysis – Linear Discriminant Analysis), PLS-DA (eng. Partial Least Square – Discriminant Analysis) i SIMCA (eng. Soft Independent Modeling of Class Analogy) statistički modeli.

Za modelovanje je korišćen spektralni opseg od  $900\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ . Kao što je navedeno, PCA je sprovedena kao prvi korak u konstruisanju nadgledanog klasifikacionog modela i služila je za redukciju broja varijabli. Za sve testirane modele izabrane su četiri glavne komponente koje objašnjavaju 99% ukupnog varijabiliteta. Svi diskriminacioni modeli su pokazali visoku pouzdanost. Trening podaci za PCA-LDA, PLS-DA i SIMCA su imali preciznost između 95 i 100%, 95-100% i 100%, respektivno. Sa druge strane, test podaci su pokazali 90-100, 100 i 100%, preciznost, respektivno. **Tablela 22** predstavlja sumirane rezultate o preciznosti modela dok **Slike 47-50** predstavljaju grafički prikaz diskriminacije.

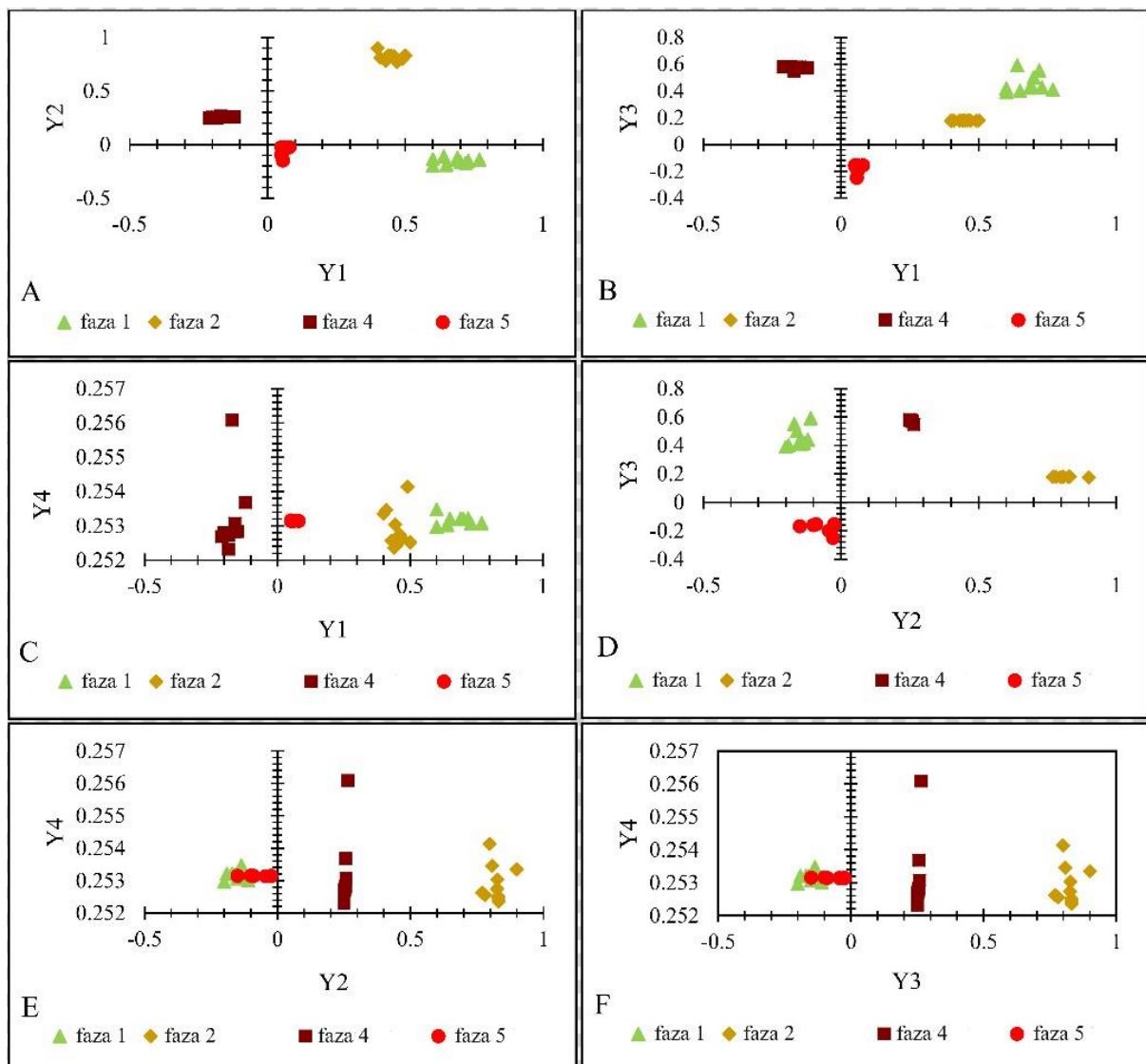
**Slika 47** predstavlja grafički prikaz (diskriminacione plotove) klasifikacione analize korišćenjem PCA-LDA hemometrijskog modela. **Slika 47A** (trening podaci) i **47B** (test podaci) prikazuju razdvajanje zelene faze od ostalih faza. **Slika 47C** (trening podaci) i **47D** (test podaci) prikazuju razdvajanje zeleno-mrka faze od preostalih faza (mrka-crvena i crvena faza). **Slika 47E** (trening podaci) i **47F** (test podaci) predstavljaju diskriminacione plotove koji pokazuju klasifikaciju mrka-crvene i crvene faze.



**Slika 47.** PCA-LDA diskriminacioni plot: A (trening set podataka) i B (test set podataka) pokazuju diskriminaciju između zelene i ostalih ispitivnih faza (faze 2, faze 4 i faze 5); C (trening set podataka) i D (test set podataka) ilustruje diskriminaciju između faze 2 sa jedne strane i faze 4 i 5 sa druge strane; E (trening set podataka) i F (test set podataka) ilustruju diskriminaciju između faze 4 i faze 5. Diskriminacioni skorovi (f1, f2, f3, f4 i f234) određuju pripadnost uzorka odgovorajućoj klasi (grupi).

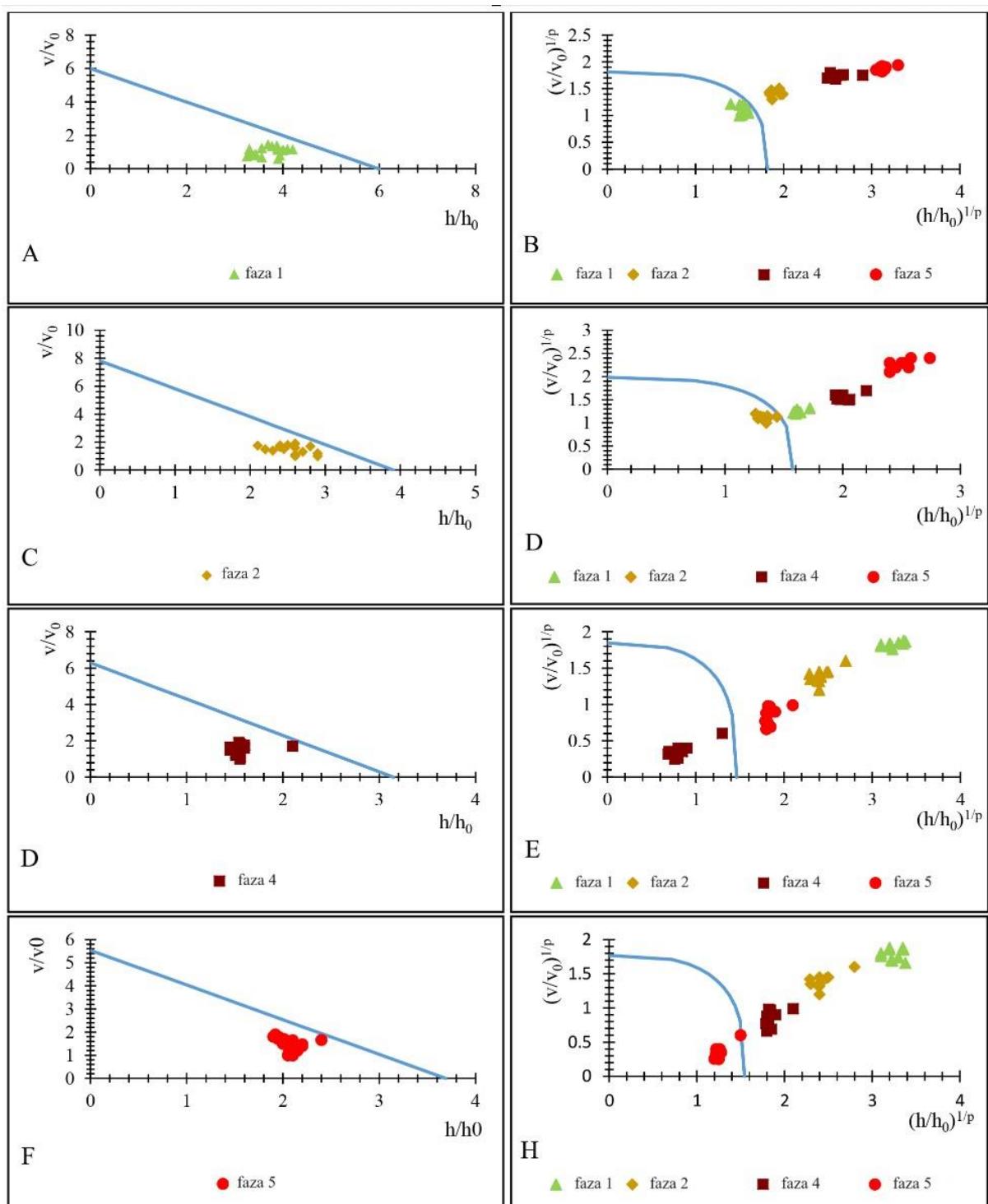


**Slika 48.** PLS-DA diskriminacioni plotovi trening seta podataka. Vrednosti Y1, Y2, Y3 i Y4 predstavljaju predikcioni odgovor.



**Slika 49.** PLS-DA diskriminacioni plotovi test seta podataka. Vrednosti Y1, Y2, Y3 and Y4 predstavljaju predikcioni odgovor.

**Slike 48 i 49** predstavljaju grafički prikaz (diskriminacione plotove) klasifikacione analize korišćenjem PLS-DA hemometrijskog modela. **Slike 48A, 48B, 48C, 48D, 48E i 48F** predstavljaju rezultate klasifikacije paprike u različitim fazama sazrevanja na osnovu trening podataka. **Slike 49A, 49B, 49C, 49D, 49E i 49F** predstavljaju rezultate klasifikacije paprike u različitim fazama sazrevanja na osnovu test podataka.



**Slika 50.** Rezultati klasifikacije dobijeni SIMCA modelom: A (trening set) i B (test set) ilustruju diskriminaciju između faze 1 i ostalih faza sazrevanja; C (trening set) i D (test set) ilustruju diskriminaciju između faze 2 i ostalih faza sazrevanja; E (trening set) i F (test set) ilustruju diskriminaciju između faze 4 i ostalih faza sazrevanja; G (trening set) i H (test set) ilustruju diskriminaciju između faze 5 i ostalih faza sazrevanja.

**Slika 50** predstavlja grafički prikaz diskriminacije korišćenjem modela SIMCA. Slika **50A** (trening podaci) i **50B** (test podaci) predstavljaju diskriminaciju između zelene faze i ostalih faza (mrka-zelene, mrka-crvene i crvene). Slika **50C** (trening podaci) i **50D** (test podaci) ilustruju diskriminaciju između zeleno-mrka faze sa jedne strane i zelene, mrka-crvene i crvene faze sa druge strane. Slike **50E** (trening podaci) i **50F** (test podaci) ilustruju diskriminaciju između mrka-crvene faze i ostalih faza (zelen, zeleno-mrka i crvene).

Slike **50G** i **50H** ilustruju diskriminaciju između crvene i ostalih faza (zelene, zeleno-mrka i mrko-crvene).

Prema navedenim rezultatima, najbolju preciznost pokazao je model SIMCA a razlog tome je svakako korišćenje različitih algoritama u poređenju sa ostalim modelima (Pomerantsev, 2014). Pored toga, SIMCA je jednoklasifikacioni model (razdvaja jednu klasu od ostalih) što dodatno olakšava konstrukciju modela. Takođe, primenjiva je za veliki broj varijabli i "otporna" je na predimenzionalnost. Sa druge strane, za razliku od PCA-LDA i PLS-DA, koji definišu nove pravce u prostoru podataka i time klase diskriminišu direktno, SIMCA je metod koji koristi PCA sa ciljem da obuhvati varijacije unutar svake (Khodabakhshian i sar., 2020).

**Tabela 22.** Klasifikacija trening i test seta podataka korišćenjem PCA-LDA, PLS-DA i SIMCA modela

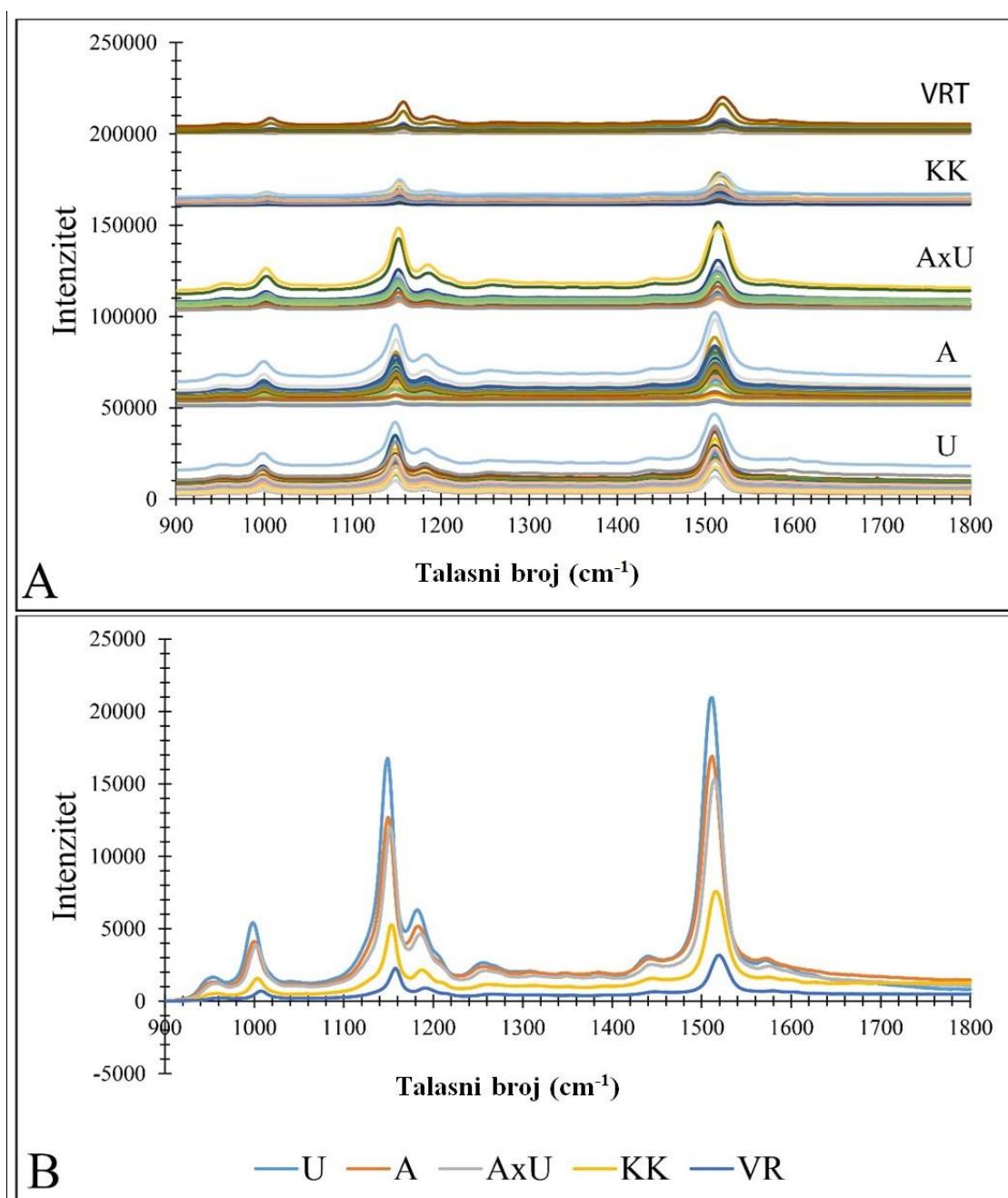
Klasifikacioni metod	Faza sazrevanja	Trening set podataka		Test set podataka		Broj glavnih komponenti
		Broj spektara	Procenat precizne klasifikacije (%)	Broj spektara	Procenat precizne klasifikacije (%)	
PCA-LDA	Faza 1	30	100	10	100	4
	Faza 2	30	100	10	100	4
	Faza 4	30	95	10	100	4
	Faza 5	30	100	10	90	4
PLS-DA	Faza 1	30	100	10	100	4
	Faza 2	30	95	10	100	4
	Faza 4	30	100	10	100	4
	Faza 5	30	95	10	100	4
SIMCA	Faza 1	30	100	10	100	4
	Faza 2	30	100	10	100	4
	Faza 4	30	100	10	100	4
	Faza 5	30	100	10	100	4

Prema dostupnim literarnim podacima, Ramanova spektroskopija u kombinaciji SIMCA klasifikacionim modelom pokazuje zadovoljavajuću preciznost za klasifikaciju skrobnih gelova (84%) (Kizil i Irudayaraj, 2006), uzorke mleka (96-100%) (Wang i sar., 2018) i tvrdi sir, na primer (100%) (Vigni i sar., 2020). Sa druge strane, visoku preciznost klasifikacije uz pomoć Ramanove spektroskopije u kombinaciji sa PLS-DA i PCA-LDA (97%) pokazuju uzorci kao što su jestiva ulja i masti (Yang i sar., 2005). Na kraju, pojedini autori su pokazali da PLS-DA pokazuje bolju klasifikacionu moć od SIMCA u slučaju klasifikacije ploda nara tokom sazrevanja (Khodabakhshian i Abbaspour-Fard, 2020).

Rezultati ovog eksperimenta pokazuju da Ramanova spektroskopija u kombinaciji sa odabranim hemometrijskim modelima može da prepozna fazu zrelosti paprike. Rezultati su pokazali visoku preciznost klasifikacije koja je iznosila više od 95% (**Tabela 22**). Pored toga, dobija se i veliki broj informacija o hemijskom sastavu uzorka (u vidu spektra) kao i njihovim razlikama pa se ti rezultati mogu koristiti kao mera kvaliteta plodova.

### 5.5.2. Primena Ramanove spektroskopije u razvijanju hemometrijskog diskriminacionog modela u cilju prepoznavanja sorte paprike u finalnoj (fiziološkoj) fazi zrenja

Ramanova spektroskopija je takođe primenjena u cilju determinacije sortne specifičnosti, tj. kao metoda koja potencijalno može da detektuje male razlike u hemijskoj kompoziciji između sorata. Stoga su uzeti plodovi paprike različitih genotipova (Amfora, Una, Amfora x Una, Kurtovska kapija, Vrtka) u istoj fazi razvića, fazi pune fiziološke zrelosti (faza 5 -potpuno zreli, crveni plodovi ravnomernih nijansi na čitavom plodu). S obzirom da su ispitivani plodovi različitih sorti bili takoreći identični po boji u finalnoj fazi sazrevanja (faza fiziološke zrelosti) (**Slika 15**), očekivalo se da i spektri budu približno slični (**Slika 51**).

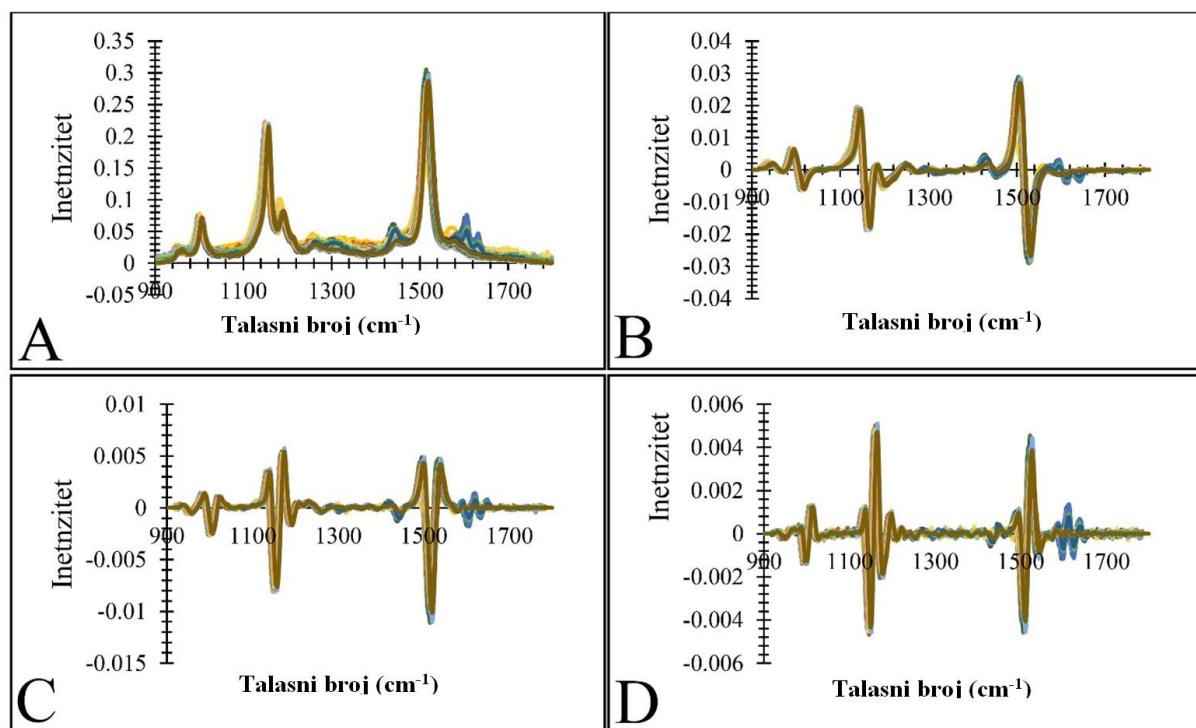


**Slika 51.** Sirovi (A) i uprosečeni (B) Ramanovi spektri različitih sorti paprika u fiziološkoj fazi sazrevanja: U-Una; A-Amfora; AxU-Amrofa x Una; KK-Kurtovska kapija; VR-Vrtka.

Vizuelnom opservacijom Ramanovih spektara ispitivanih sorti paprika, uočava se postojanje malih razčika između uzoraka. Da bi se navedene fine razlike intenzivirale sprovedene su različite kombinacije metoda preprocesiranja spektara:

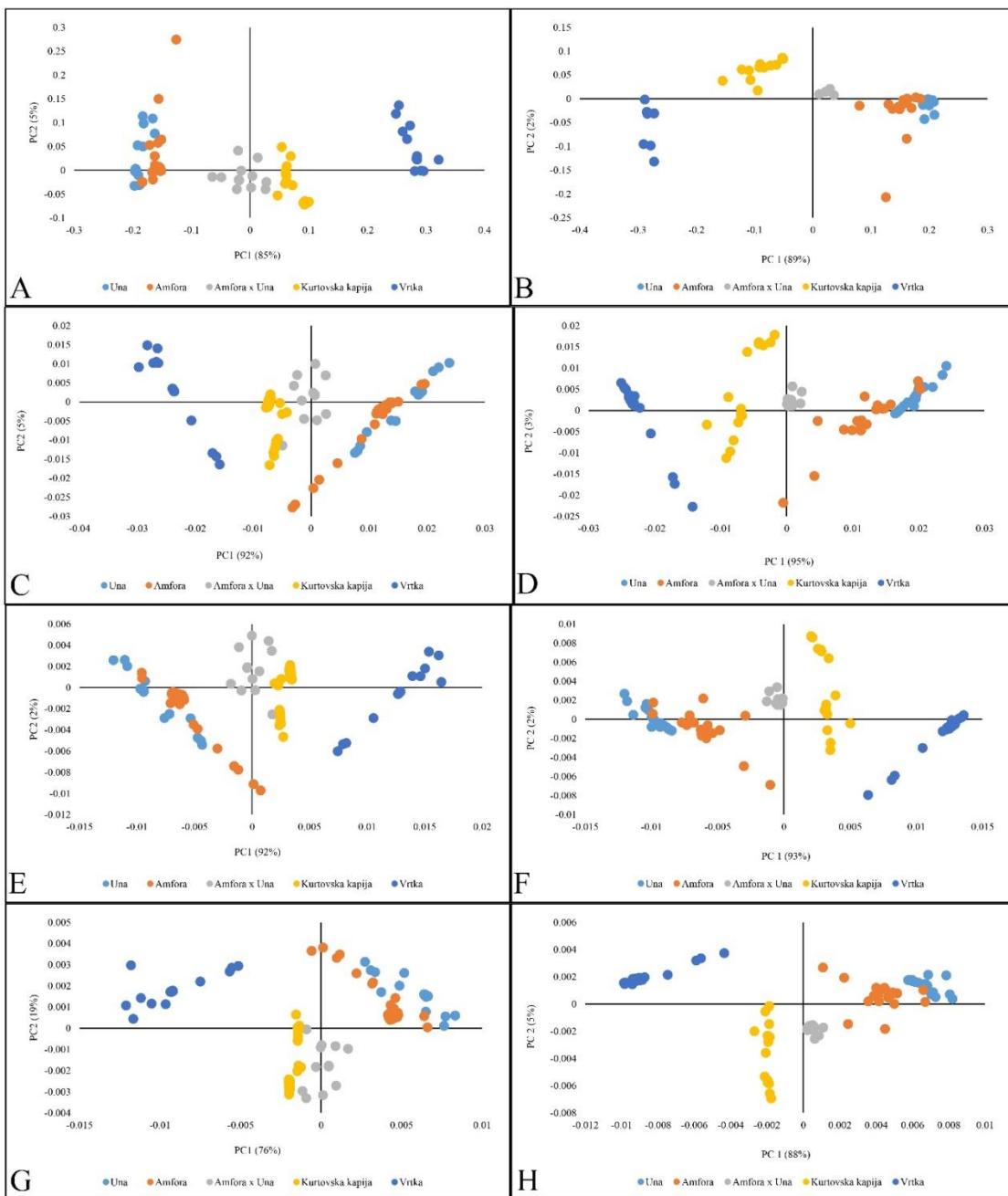
1. korekcija bazne linije + normiranje na jedinični vektor;
2. korekcija bazne linije + normiranje na jednični vektor + prvi izvod funkcije Savitzky-Golay metodom;
3. korekcija bazne linije + normalizacija na jedinični vektor + drugi izvod funkcije Savitzky-Golay metodom;
4. korekcija bazne linije + normalizacija na jedinični vektor + treći izvod funkcije Savitzky-Golay metodom

Rezultati primene navedenih kombinacija prethodne obrade spektara (preprocesiranja) prikazani su na **Slici 52**. Prema tome, spektri prikazani na slikama B, C i D (**Slika 52**) pokazuju promene u intenzitetu i poziciji traka (posebno pri niskim talasnim brojevima) prilikom primene prvog, drugog i trećeg izvoda.



**Slika 52.** Rezultati primene različitih metoda prethodne obrade (preprocesiranja spektara: A) korekcija bazne linije + normalizacija jediničnim vektorom; B) korekcija bazne linije + normalizacija jediničnim vektorom + prvi izvod funkcije Savitzky-Golay metodom; C) korekcija bazne linije + normalizacija jediničnim vektorom + drugi izvod funkcije Savitzky-Golay metodom; D) korekcija bazne linije + normalizacija jediničnim vektorom + treći izvod funkcije Savitzky-Golay metodom

Nakon prethodne obrade (preprocesiranja) spektara, sprovedena je PCA analiza u cilju redukcije broja varijabli. Rezultati PCA analize prikazani su na **Slici 53**.



**Slika 53.** Analiza glavnih komponenata-score plot. A (trening podaci) i B (test podaci) predstavljaju rezultate analize glavnih komponenata kada je kao metod za obradu spektara korišćena kombinacija sledećih metoda: korekcija bazne linije + normalizacija jediničnim vektorom; C (trening podaci) i D (test podaci) predstavljaju rezultate analize glavnih komponenata kada je kao metod za obradu spektara korišćena kombinacija sledećih metoda: korekcija bazne linije + normalizacija jediničnim vektorom + prvi izvod funkcije Savitzky-Golay metodom; E (trening podaci) i F (test podaci) predstavljaju rezultate analize glavnih komponenata kada je kao metod za obradu spektara korišćena kombinacija sledećih metoda: korekcija bazne linije + normalizacija jediničnim vektorom + drugi izvod funkcije Savitzky-Golay metodom; G (trening podaci) i H (test podaci) predstavljaju rezultate analize glavnih komponenata kada je kao metod za obradu spektara korišćena kombinacija sledećih metoda: korekcija bazne linije + normalizacija jediničnim vektorom + treći izvod funkcije Savitzky-Golay metodom.

Rezultati analize glavnih komponenata (**Slika 53**) pokazuju tendenciju grupisanja uzoraka koje pripadaju istoj sorti. Međutim, u zavisnosti od primenjene hemometrijske metode, tendecija je više ili manje izražena.

Literaturni podaci pokazuju da se različite sorte crvene paprike mogu razlikovati u hemijskom sastavu sekundarnih metabolita kao što su polifenoli (Mudrić i sar., 2017), flavonoidi (Tundis i sar., 2011) i karotenoidi (Collera-Zúñiga, García Jiménez, i Meléndez Gordillo, 2005). Detaljnijom analizom spektara uočene su trake jakog intenziteta na talasnim brojevima  $\sim 1511\text{--}1519\text{ cm}^{-1}$ , srednje jakog intenziteta na  $\sim 1149\text{--}1151\text{ cm}^{-1}$  i slabog intenziteta  $\sim 998\text{--}1006\text{ cm}^{-1}$  (**Slika 51B**) koje mogu biti pripisane karotenoidima. I pored toga što su karotenoidi prisutni u relativno maloj količini u perikarpu (oko  $1\text{ mg kg}^{-1}$ ), Ramanove trake koje potiču od ove grupe jedinjenja su vidljive što je u vezi sa rezonantnim efektom ovih metabolita na laseru talasne dužine 532 nm (Baranski i sar., 2005). Smatra se da traka u regionu  $\sim 1511\text{--}1519\text{ cm}^{-1}$  potiče od C=C vibracije u ravni, trake u regionu  $\sim 1149\text{--}1151\text{ cm}^{-1}$  od C-C vibracija u ravni dok traka na  $\sim 1003\text{--}1009\text{ cm}^{-1}$  potiče od CH<sub>3</sub> ljudajuće deformacione vibracije u ravni (de Oliveira i sar., 2009; Schulz i sar., 2005). Navedene trake jasno sugeriraju prisustvo karotenoida kao glavnih sekundarnih (specijalnih) metabolita u velikom broju biljaka, uključujući i plod paprike (Sharma i sar., 2019). Slično rezultatima iz prethodnog poglavlja, dominantne trake se nalazne na pozicijama približno 1517, 1158 and 1004 cm<sup>-1</sup> koje mogu biti pripisane kapsantinu, dominantnom karotenoidu u fiziološkoj fazi zrelosti paprika (Schultz i sar., 2005). Pored traka povezanih sa karotenoidima, primećene su i trake ispod 1000 cm<sup>-1</sup> (približno 952 cm<sup>-1</sup>), 1572–1575, 1440–1442 and  $\sim 1260\text{ cm}^{-1}$ , kao i u regionu između 1600–1625 cm<sup>-1</sup> (**Slika 51B**). S obzirom da su parenhimske ćelije plodova paprika bogate ugljenim hidratima, trake ispod 1000 cm<sup>-1</sup> mogu biti povezane sa istežućim vibracijama glikozidnih veza (Synytsya i sar., 2003). Traka na  $\sim 1445\text{ cm}^{-1}$  (korespondira  $\delta(\text{CH}_2)$  vibracionom modu) i  $\sim 1256\text{ cm}^{-1}$  su verovatno povezane sa prisustvom galakturonske kiseline (Chylińska i sar., 2014) (**Slika 51B**). Traka slabijeg intenziteta na 1575 cm<sup>-1</sup> je povezana sa prisustvom benzoevog prstena koji je glavni konstituent fenolnih komponenti (Trebolazabala i sar., 2017). Traka na  $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$  takođe može biti pripisana fenolnim jedinjenjima (Prats Mateu i sar., 2016). Poznato je da je crvena paprika bogata flavonoid glukozidima i fenolnim kiselinama kao što su kvercetin-3-glikozid (Lekala i sar., 2019).

Kada su u pitanju intenziteti traka povezanih sa polifenolima, treba napomenuti da je intenzitet rastao sa fazama sazrevanja sledećim redom: Vrtka, Kurtovska kapija, Amfora x Una, Amfora, Una. Ovi rezultati su u korelaciji sa rezultatima ukupnih polifenola dobijenih spektrofotometrijski. Sa druge strane, kada su u pitanju trake koje potiču od karotenoida, rezultati su u velikoj meri u skladu sa rezultatima dobijenih HPTLC metodom i metodom ukupnih karotenoida merenih spektrofotometrijski.

## Multivarijaciona klasifikaciona analiza

Kao što je već navedeno, klasifikacija bazirana na pronalaženju jedne komponente (eng. target compound) vrlo često može biti beskorisna zbog činjenice da ne postoji specifična komponenta u jednom uzorku koja bi ga klasifikovala u posebnu grupu. Multivarijaciona klasifikaciona analiza se ne zasniva na pronalaženju jedne specifične komponente (eng. non-targeted analysis) takođe ima svoje nedostatke, a to je u prvom redu potreba za velikim brojem deskriptora koji ponekad mogu biti suvišni i dovesti do degradacije performansi modela. U ovom eksperimentu, analiza je sprovedena na spektralnom regionu u opsegu od 900 do  $1800\text{ cm}^{-1}$ .

S obzirom da su diskriminacioni (klasifikacioni) modeli nepredvidivi zbog nepoznate diskriminacione moći, neophodno je testirati nekoliko modela baziranih na prethodno obradjenim podacima (spektrima) (Devos i sar., 2014). U tu svrhu testirano je tri modela: PCA-LDA, QDA i PLS-DA.

PCA-LDA predstavlja model za separaciju u dve klase (grupe) (Pomerantsev, 2014). Cilj ovog modela je da se formira (pronađe) idealna projekcija tačaka na potprostor (eng. subspace) i da se u njemu sprovede diskriminacija. Potprostor treba tako da se definiše da se distanca centroida između klasa maksimizira i da se sa druge strane minimizira rastojanje između objekata u okviru iste klase (Chen & Jiang, 2018). Granice koje se formiraju su linearne i dele prostor u regione odnosno klase (Dixon & Brereton, 2009).

QDA je multiklasni model koji se koristi za diskriminaciju nekoliko klasa (više od dve) odjednom (simultano). U poređenju sa LDA, QDA formira kvadratne granice koji dele prostor u regione odnosno klase (Dixon & Brereton, 2009).

PLS-DA je klasifikacioni metod koji je baziran na potrazi za latentnim varijablama koje služe za diskriminaciju dve ili više grupa. Diskriminacija se sprovodi prema maksimalnoj kovarijansi određene grupe (Uarrota i sar., 2014).

U svim testiranim modelima, 5 glavnih komponeti je korišćeno, i one objašnjavaju 99% ukupne varijabilnosti.

Pouzdanost PCA-LDA, PLS-DA, PCA-QDA modela u trening podacima bila je 0–100, 19.35–100 i 83.87–100%, respektivno, dok je u test podacima bila 0.00–100.00 0.00–100.00 i 89.47–100.00%. Što se tiče modela PCA-LDA i PLS-DA, metod prethodne obrade podataka nije značajno uticao na preciznost klasifikacije. Sa druge strane PCA-QDA pokazala je najbolju klasifikacionu moć, bez obzira koji je metod prethodne obrade bio korišćen (za grafički prikaz klasifikacija videti **Prilog, Slike P10 do P29**).

Glavni problem sa PLS-DA modelom odnosio se na klasifikaciju sorte Amfora, kao i linije nastale ukrštanjem sorti Amfora i Una (Amfora x Una). Razlog tome može biti slična genetička struktura u kojima dele određeni broj gena koji potencijalno određuju metabolički put biosinteze karotenoida, polifenola, šećera i drugih metabolita.

Sa druge strane, PCA-LDA pokazao je bolje performanse kada je u pitanju klasifikacije ove dve grupe uzoraka, dok PCA-QDA nije imao problema sa klasifikacijom genetički, tj. hemijski bliskih uzoraka. PLS-DA i PCA-LDA modeli se zasnivaju na Mahalanobisovom odstojanju, dok PCA-QDA prepostavlja različite kovarijacione matrice za svaku klasu (grupu) posebno, kreirajući mnogo "strožija" klasifikaciona pravila što može biti razlog za bolje performanse ovog modela. Ovaj način formiranja diskriminacionih pravila je posebno pogodan za spektre bioloških uzoraka u kojima varijabilnost unutar klase predstavlja ključni problem za formiranje stabilnog modela (Dixon i Brereton, 2009).

U slučaju pogrešne klasifikacije, sorte se slučajno dodeljuju nekoj određenoj klasi. Sumarni prikaz rezultata diskriminacije svakog modela u zavisnosti od načina prethodne obrade podataka prikazan je u tabelama 23 i 24.

**Tabela 23.** Rezultati diskriminacije sorti na osnovu trening podataka korišćenjem PCA-LDA, PLS-Da i PCA-QDA klasifikacionih modela

Metod	Sorta	Trening podaci				Prosek
		KBL+N	KBL+N+PIF	KBL+N+DIF	KBL+N+TIF	
		Procenat tačno klasifikovanih uzoraka				
PCA-LDA	U	100,00	100,00	100,00	93,10	93,85
	A	50,94	50,94	90,00	100,00	90,72
	AU	100,00	100,00	0,00	100,00	74,46
	KK	0,00	0,00	0,00	50,00	45,83
	VR	0,00	0,00	0,00	0,00	41,67
PLS-DA	U	54,54	60,00	75,00	72,73	78,23
	A	52,00	51,92	58,70	54,90	58,62
	AU	96,87	62,22	100,00	100,00	91,89
	KK	100,00	82,35	86,11	86,11	91,31
	VR	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
PCA-QDA	U	93,94	85,71	88,57	91,18	92,79
	A	100,00	96,30	100,00	100,00	98,48
	AU	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	KK	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	VR	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

KBL+N – korekcija bazne linija, normalizacija na jednični vektor; KBL+N+PIF – korekcija bazne linije, normalizacija na jednični vektor, prvi izvod funkcije Savitzky-Golay; KBL+N+DIF – korekcija bazne linije, normalizacija na jednični vektor, drugi izvod funkcije Savitzky-Golay; KBL+N+TIF - BC+N+<sup>3<sup>rd</sup></sup> D - korekcija bazne linije, normalizacija na jednični vektor, treći izvod funkcije Savitzky-Golay;

**Tabela 24.** Rezultati diskriminacije na osnovu test podataka korišćenjem PCA-LDA, PLS-DA i PCA-QDA klasifikacionih modela

Metod	Sorta	Test podaci				Prosek
		KBL+N	KBL+N+PIF	KBL+N+DIF	KBL+N+TIF	
		Procenat tačno klasifikovanih uzoraka				
PCA-LDA	U	0,00	100,00	100,00	100,00	76,97
	A	0,00	65,51	76,00	82,61	69,26
	AU	33,33	86,36	100,00	100,00	84,57
	KK	50,00	100,00	100,00	100,00	87,50
	VR	50,00	100,00	100,00	100,00	87,50
PLS-DA	U	0,00	61,29	61,29	59,37	67,36
	A	20,00	100,00	100,00	84,04	63,17
	AU	0,00	70,83	77,27	94,74	74,29
	KK	0,00	87,50	83,33	92,63	72,07
	VR	0,00	100,00	100,00	98,95	77,76
PCA-QDA	U	100,00	90,00	100,00	94,44	96,07
	A	100,00	100,00	90,47	90,00	96,40
	AU	95,00	95,00	100,00	100,00	98,95
	KK	100,00	100,00	100,00	89,47	97,25
	VR	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

KBL+N – korekcija bazne linija, normalizacija na jednični vektor; KBL+N+PIF – korekcija bazne linije, normalizacija na jednični vektor, prvi izvod funkcije Savitzky-Golay;  
 KBL+N+DIF – korekcija bazne linije, normalizacija na jednični vektor, drugi izvod funkcije Savitzky-Golay; KBL+N+TIF - BC+N+<sup>3<sup>rd</sup></sup> D - korekcija bazne linije, normalizacija na jednični vektor, treći izvod funkcije Savitzky-Golay;

Luna i sar. (2019) koristili su PCA-LDA, QDA i PLS-DA u kombinaciji sa različitim metodama obrade Ramanovih spektara za klasifikaciju različitih vrsta kafe. Rezultati su pokazali da svi modeli u kombinaciji sa tzv- "multiplicative scatter correction" pokazuju 100% preciznost klasifikacije, osim QDA (97,8%). Sa druge strane, u slučaju kada se kao metod za obradu spektara koristi tzv. "mean centering", preciznost drastično opada i iznosi 62,7% za PCA-LDA i QDA dok za PLS-DA iznosi 61,3%.

Rezultati primene Ramanove spektroskopije u klasifikaciji (prepoznavanju) faze sazrevanja pokazali paprike su da su najveću moć imali modeli PCA-LDA i PLS-DA koji su imali preciznost od 95-100%.

Primena Ramanove spektroskopije u kombinaciji sa PCA-QDA modelom pokazala je visoku moć klasifikacije koja je u proseku iznosila 98, 89%. Sa druge strane, primena HPTLC metode u kombinaciji sa ImageJ softverom i PCA-LDA modelom takođe je dao zadovoljavajuće visoku preciznost koja je iznosila preko 90 % i za klasifikaciju faze zrenja kao i za diskriminaciju sorti. Treba napomenuti da je su uzorci za analizu Ramanovom spektroskopijom bili u svežem stanju dok je za HPTLC bila neophodna ekstrakcija. Veća preciznost Ramanove spektroskopije u klasifikaciji uzorka može biti povezana sa količinom informacija koje daje sam Ramanov spektar (karotenoidi, polifenoli, lipidi), a koje su bile input za konstrukciju modela. Međutim, ova hipoteza će biti potvrđena kada budu analizirani ekstrakti, odnosno materijal koji je dobijen primenom iste metode.

Generalno, pristup i metodologija su pokazali da korišćenje hemometrijskih metoda i uzimanjem u obzir celokupnog spektra odnosno kompletne hemijske informacije (eng. pattern-based approach) predstavlja alternativu u odnosu na "tradicionalne" načine analize koje se oslanjaju na pronađenju jedne komponente koja će diskriminirati (klasifikovati) ispitivani uzorak (eng. component-based approach). Najbolje rezultate je pokazala metoda QDA u svim kombinacijama prethodne obrade informacija (spektara).

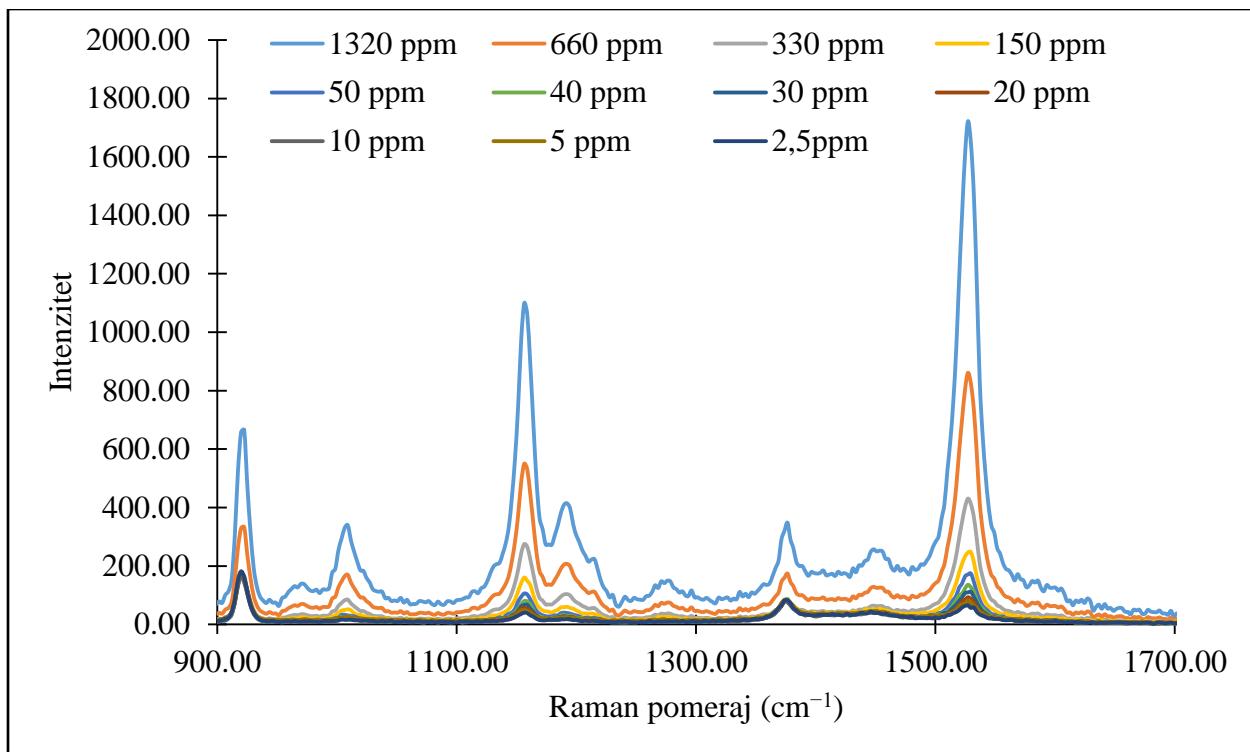
### **5.5.3. Kvantitativna analiza ukupnih karotenoida u plodu paprike primenom Ramanove spektroskopije**

Hemometrijsko modelovanje Ramanovih spektara je primenjeno u cilju pokušaja kvantifikacije ukupnih karotenida gde su korektivni faktori bile vrednosti ukupnih karotenoida određene HPTLC metodom i ukupnih karotenoida spektrofotometrijski. Kao model sorte uzete su Kurtovska kapija i Amfora u fazi pune zrelosti, kao i odgovarajući ajvari. U cilju dobijanja najverodostojnjijih rezultata, Ramanovom spektroskopijom su snimani identični ekstrakti koji su prethodno pripremljeni radi HPTLC analize i analize ukupnih karotenoida.

U svrhu formiranja kvantifikacionog (prediktivnog) modela, korišćen je  $\beta$ -karoten kao standard za izražavanje ukupnih karotenoida. Razlog tome je njegova dominantnost u plodu papriči, kao i zbog mogućnosti poređenja rezultata sa naučnom literaturom gde se kao mera ukupnih karotenoida uglavnom koristio  $\beta$ -karoten (Baranska et al., 2006).

Kvantifikacija navedenog jedinjenja sprovedena je na osnovu kalibracione krive, konstruisane u opsegu koncentracije  $\beta$ -karotena od 2,5 ppm do 1320 ppm (**Slika 53**).

Prethodna obrada spektara obuhvatila je samo korekciju bazne linije i smutovanje, kako se ne bi narušio odnos intenziteta traka, a zatim je formiran Multivarijacioni linearni regresioni model (eng. Mutivariate Linear Regression).

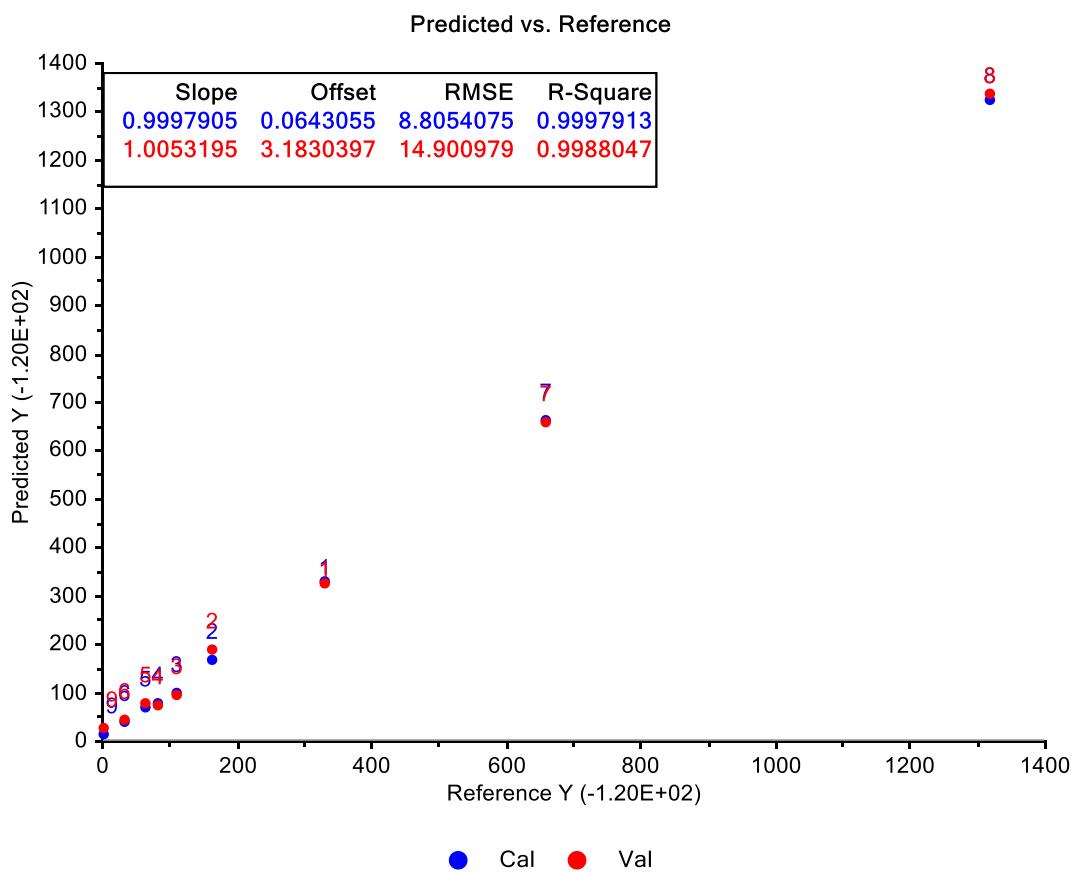


**Slika 53.** Ramanovi spektri standarda  $\beta$ -karotena različitih koncentracija

Rezultati regresione analize prikazani su u **Tabeli 25** i na **Slici 54**. Rezultati kvantifikacije MLR metodom su pokazali veoma visoke regresione koeficijenete determinacije (**Tabela 25**).

**Tabela 25.** Rezultati odabranih regresionih modela

Regresioni model	Podaci	Slope	Offset	RMSE	$R^2$
MLR	Trening podaci	0,9998	0,0643	8,8054	0,9998
	Test podaci	1,0053	3,1830	14,9009	0,9990



**Slika 54.** Zavisnost predviđenih od referentnih vrednosti količine  $\beta$ -karotena za trening I test set podataka

**Tabela 26.** Rezultati kvantifikacije odabralih uzoraka Ramanovom spektroskopijom

Ispitivni uzorci	Ukupni karotenoidi mereni metodom Ramanove spektroskopije i MLR metode (g/100g)	Ukupna količina ispitivanih karotenoida (kapsantin+lutein/zeaksantin+ $\beta$ -kriptoksiantin+ $\beta$ -karoten) merenih HPTLC metodom (g/100g SM)	Ukupni karotenoidi mereni spektrofotometrijski (g/100g SM)
Kurtovska kapija faza 5	1,952	1,5527	1,4982
Kurtovska kapija ajvar	1,899	1,5232	1,4011
Amfora faza 5	1,726	1,2791	1,3110
Amfora ajvar	1,614	1,0269	1,0993

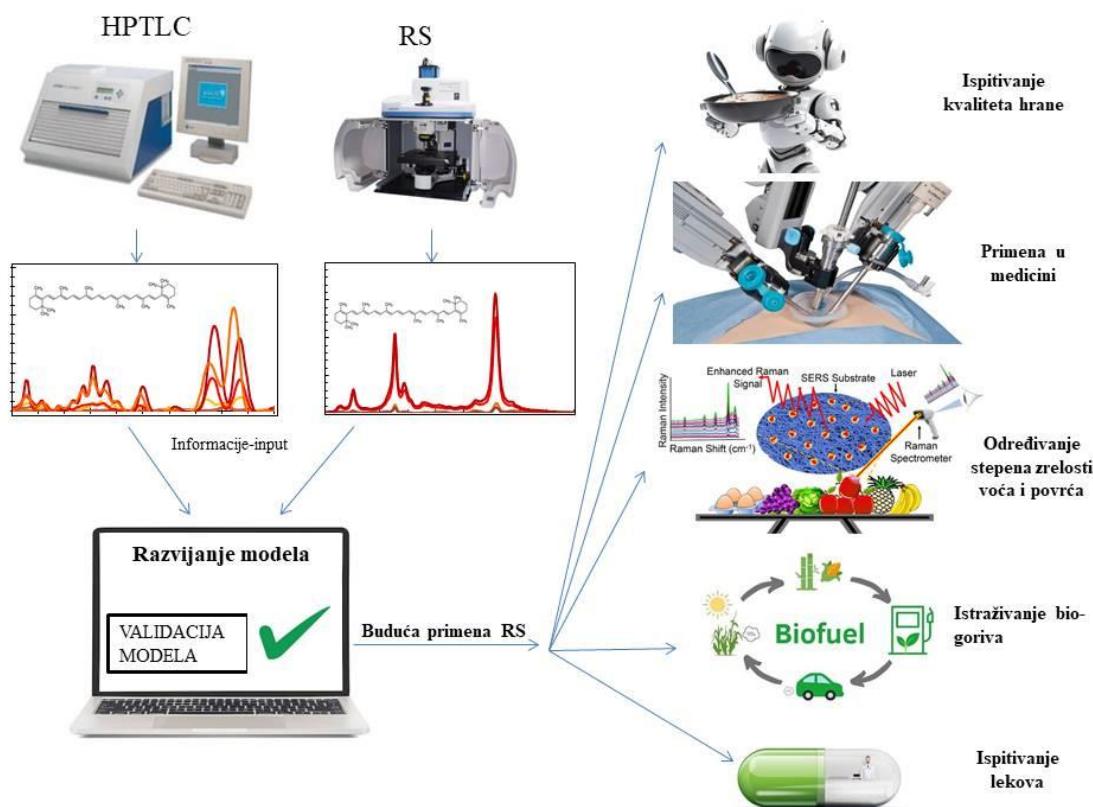
Rezultati kvantifikacije pokazali su određena odstupanja od rezultata dobijenih HPTLC metodom, kao i analizom ukupnih karotenoida, ali su pokazali dobru usklađenost sa vrednostima dobijenim standardnim analitičkim metodama (**Tabela 26 i Slika 54**).

Do sada je publikovan mali broj radova na temu primene Ramanove spektroskopije u kvantifikaciji karotenoida. Jedan od razloga je visoka osetljivost ove vibracione spektrometrijske metode prema velikom broju faktora (atmosferski pritisak, temperatura, snaga lasera, itd.), te time, dolazi i do smanjene ponovljivosti u analizama. Sebben i sar. (2018) i Hara i sar. (2018) ispitivali su primenljivost Ramanove spektroskopije i PLSR (eng. Partial Least Square Regression) u kvantifikaciji karotenoida u slatkom krompiru. Rezultati predstavljeni u spomenutim studijama slični su rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji, u smislu validacije dobijenih rezultata primenom standardnih analitičkih metoda u determinaciji karotenoida.

## Mogućnost primene Ramanove spektroskopije u analizi nutrijenata i biološki aktivnih biljnih metabolita

Značaj ovog istraživanja ogleda su u potencijalu primene Ramanove spektroskopije u diskriminaciji (klasifikaciji) veoma sličnih uzoraka kao što su plodovi različitih genotipova paprika gajenih u istim agroekološkim uslovima i analiziranih u istoj fiziološkoj fazi zrenja. Ramanova spektroskopija u kombinaciji sa multivarijacionim statističkim metodama pokazala je mogućnost primene u određivanju sukcesivnih faza sazrevanja ploda paprike kao i razlikovanje genotipova paprike. Konacno primena ove vibracione spektrometrijska metode dala je dobre rezultate u pogledu kvantifikacije (određivanju količine) model nutrijenata – karotenoida.

Ramanova spektroskopija u kombinaciji sa kompleksnim hemometrijskim modelima ima veliki potencijal u određivanju kvaliteta sirovina biološkog porekla i prehrabnenih proizvoda. Iako su matriks sistemi hrane veoma kompleksni i složeni zbog njihovog hemijskog sastava, ova metoda je dovoljno precizna da može da okarakteriše prisustvo različitih primarnih i sekundarnih metabolita kao što su npr. lipidi, proteini, ugljeni hidrati i vitamini, odnosno flavonoidi, antocijanini, terpenoidi itd. Sve ovo upućuje na veliku verovatnoscu primene RS i odgovarajućih hemometrijskih modela kao brze, nepreparativne efikasne i tačne metode koja će se sve više koristi kako u fundamentalnim tako u primenjenim istraživanjima ali i od strane razlicitih privrednih granama (kao što su npr. poljoprivreda i proizvodnja hrane, farmacija, medicina, materijali) i u zaštiti životne sredine (**Slika 55**).



**Slika 55.** Rezultati primene Ramanove spektroskopije u ovoj doktorskoj disertaciji i buduća polja istraživanja

## 6. Zaključci

Na osnovu svih izloženih i diskutovanih rezultata u okviru ove doktorske disertacije, mogu se formulisati sledeći zaključci:

- Rezultati dobijeni korišćenjem HPTLC metode pokazali su da sorte Kurtovska kapija i autohtona sorte Vrtka poseduju najveću količinu ukupnih ispitivanih karotenoida ( $\beta$ -karoten+ $\beta$ -kriptoksantin+kapsantin+lutein/zeaksantin) i to 1,5527 g/100g SM odnosno 1,4752 g/100g SM. Sorta Una sadrži najmanju količinu ukupnih ispitivanih karotenoida u količini od 0,3792 g/100g SM dok je kod sorte Amfora ta količina iznosila 1,2761 g/100g SM. Sorta Kurtovska kapija sadrži najveću količinu kapsantina ( $0,3570\pm0,0812$  g/100g SM) i  $\beta$ -karotena ( $0,9912\pm0,14350$  g/100g SM), dok je sorta Vrtka bogata u  $\beta$ -kriptoksantinu ( $0,1624\pm0,0172$  g/100g SM) i luteinu/zeaksantinu ( $0,0811\pm0,0362$  g/100g SM).
- Biosinteza karotenoida kod svih sorti, osim kod sorte Una, počinje u ranim fazama rastenja i razvića što dovodi do povećane akumulacije ispitivanih karotenoida, a pre svega  $\beta$ -karotena tokom sazrevanja ploda. Kao rezultat ove kasne akumulacije karotenoida kod sorte Una, količina ispitivanih karotenoida je značajnije manja i osetnije opada u ajvaru u odnosu na fazu pune zrelosti. Sa druge strane, kod sorti Kurtovska kapija, Vrtka i Amfora smanjenje količine karotenoida u ajvaru nije izrazito. Pored toga, uljani matriks doprinosi boljoj stabilnosti karotenoida, posebno  $\beta$ -karotena i kapsantina u ajvaru.
- Rezultati ukupnih karotenoida pokazali su rast ovih bioaktivnih jedinjanja sa sazrevanjem, dok su rezultati ukupnih polifenola i flavonoida pokazali obrnut trend. Količina ukupnih karotenoida u ekstraktima ploda paprika u fazi pune zrelosti kretala se u opsegu od  $289,57\pm14,58$  mg/100 g kod sorte Una do  $1502,21\pm70,74$  mg/100g kod sorte Vrtka. Najveći procentualni pad karotenoida u ajvaru u odnosu na fazu pune zrelosti zabeležen je kod sorte Una (smanjenje za 82,36 %), a najmanji pad je zabeležen kod sorte Kurtovska kapija (smanjenje za 6,48 %).
- Antioksidativni kapacitet ekstrakta ispitivanih genotipova paprike bio je direktno zavisan od količine ukupnih karotenoida, čime je potvrđen njihov biološki smisao kao nutrijenata sa viskim kapacitetom neutralizacije slobodnih kiseoničnih radikala. Rezultati su pokazali da kod ispitivanih sorti, ajvar ima niži inhibitorni kapacitet od odgovarajuće sorte paprike u finalnoj fazi sazrevanja. Rezultati inhibicije DPPH radikala su pokazali porast sa sazrevanjem ploda paprike i pad u ajvaru. Najveću inhibiciju DPPH radikala imaju ekstrakti sorte Kurtovska kapija u finalnoj fazi sazrevanja (faza 5) ( $1,50\pm0,11$   $\mu$ mol/g TEAC), a najnižu ekstrakt sorte Una u početnoj fazi sazrevanja (faza 1) ( $0,30\pm0,04$   $\mu$ mol/g TEAC). Rezultati CUPRAC testa su takođe pokazali da vrednosti rastu sa sazrevanjem ploda paprika (od tehnološke do fiziološke zrelosti) dok kod ajvara vrednosti antioksidativnog potencijala blago opadaju. Rezultati su se kretali u opsegu od 0,305 mg GAE/g SM kod sorte Amfora do  $0,178\pm0,02$  mg GAE/g SM kod sorte Vrta u početnoj fazi sazrevanja (faza 1). Rezultati FRP analize pokazali su isti trend kao kod prethodne dve metode u smislu pada kapaciteta prilikom sazrevanja ploda paprike.
- U uslovima simulirane *in vitro* digestije ekstrakti sorte Una u različitim fazama sazrevanja pokazala su različitu biodostupnost. Najveća biodostupnost zabeležena je u

ajvaru, verovatno zbog njegove „inkapsulacije“ u uljanim kapljicama, tj. formiranja uljanih micela, kao i dodatnim okruživanjem žučnim solima i glicerolom koji su omogućili zaštitu karotenoida od dalje degradacije.

- Rezultati inhibitorne aktivnosti enzima alfa amilaze i tirozinaze pokazali su da ekstrakti svežih paprika pokazuju bolju inhibitornu aktivnost od ekstrakata ajvara u svim ispitivanim sortama, shodno očekivanoj transformaciji i degradaciji glavnih grupa sekundarnih metabolita (polifenola, flavonoida i karotenoida) usled termičke obrade. Prema tome, najveću inhibitornu aktivnost enzima  $\alpha$ -amilaza pokazao je ekstrakt sorte Amfora ( $6,21 \pm 0,05$  mg/ml), dok je najniže rezultate pokazao ekstrakt ajvara sorte Vrtka ( $10,42 \pm 0,03$  mg/mg). Rezultati inhibicije enzima tirozinaza pokazali su ekstrakt ploda paprike sorte Amfora pokazuje najvišu inhibitornu aktivnost ( $3,50 \pm 0,05$  mg/ml), a ekstrakt ajvara sorte Kurtovska kapija najnižu ( $5,82 \pm 0,05$  mg/ml).
- Ramanova spektroskopija pokazala je tipične trake koje potiču od vibracije hemijskih veza koje korespondiraju sa molekulima karotenoida na pozicijama  $\sim 1003$ ,  $\sim 1156$  i  $\sim 1527\text{ cm}^{-1}$ .
- Rezultati dobijeni primenom RS u kombinaciji sa naprednim statističkim pokazali su da se ovom metodom može odrediti i **stepen zrelosti paprika** kao i sortnog porekla paprike. Najbolju klasifikacionu moć za određivanje faze zrenja je pokazao model SIMCA (100%). Sa druge strane, najbolji model za određivanje sorte paprike pokazao se QDA (98,26%). Dobijeni rezultati i metoda se mogu dalje iskoristiti i implementirati za razvoj modela za određivanje stepena zrelosti drugih biljnih vrsta kao i za određivanje njihovog sortnog porekla.
- Ramanova spektroskopija pokazala je potencijal u kvantifikaciji ukupnih karotenoida u ekstraktima paprika ispitivanih sorti kao i u ekstraktu ajvara, primenom modela Multivarijantne linearne regresije.
- Kada je u pitanju kvantifikacija, buduća istraživanja bi trebalo usmeriti ka razdvajanju karotenoida iz smeše i za simultanu kvantifikaciju većeg broja dominantnih karotenoida iz uzorka. Pored toga, potrebno je obezbediti ponovljivost modela njegovim treniranjem/trening seta gde bi on iz novih podataka bio u mogućnosti da kontinuirano poboljšava postojeći model.
- Može se očekivati da će se Ramanova spektroskopija sve više primenjivati u determinaciji i kvantifikaciji važnijih nutrijenata i bioaktivnih biljnih molekula u različitim bioloskim sirovinama, uključujući i veoma kompleksne matriksne sisteme kao što su uzorci hrane i prehrambenih proizvoda. U tom smislu, veliku prednost/aplikaciju imaju precizniji i oseetljiviji Ramanski sistemi i pristupi, kao sto su SERS, TER i SNOM. Buduća istraživanja će takođe biti orijentisana u pravcu primene Ramanove spektroskopije povezane sa dometima veštacke inteligencije i robotike radi *in situ* brzog i efikasnog određivanja kvaliteta i bezbednosti sirovina i hrane u realnom vremenu.

## 7. Literatura

- Ahmed, M. U., Ibrahim, A., Dahiru, N. J., & Mohammed, H. S. (2020). Alpha Amylase Inhibitory Potential and Mode of Inhibition of Oils from *Allium sativum* (Garlic) and *Allium cepa* (Onion). *Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes*, 13, 117955142096310. <https://doi.org/10.1177/1179551420963106>
- Al-Rimawi, F., Abu-Lafi, S., Abbadi, J., Alamarneh, A. A. A., Sawahreh, R. A., & Odeh, I. (2017). Analysis of phenolic and flavonoids of wild ephedra alata plant extracts by lc/pda and lc/ms and their antioxidant activity. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(2), 130–141. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i2.14>
- Antony, A., & Farid, M. (2022). Effect of Temperatures on Polyphenols during Extraction. *Applied Sciences*, 12(4), 2107. <https://doi.org/10.3390/app12042107>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1260-7>
- Baranska, Malgorzata; Roman, M., Cz. Dobrowolski, Jan; Schulz, H., & Baranski, R. (2013). Recent Advances in Raman Analysis of Plants: Alkaloids, Carotenoids, and Polyacetylenes. *Current Analytical Chemistry*, 9(1), 108–127.
- Baranska, M., Roman, M., Cz. Dobrowolski, J., Schulz, H., & Baranski, R. (2013). Recent Advances in Raman Analysis of Plants: Alkaloids, Carotenoids, and Polyacetylenes. *Current Analytical Chemistry*, 9(1), 108–127.
- Baranska, M., Schütze, W., & Schulz, H. (2006). Determination of Lycopene and β-Carotene Content in Tomato Fruits and Related Products: Comparison of FT-Raman, ATR-IR, and NIR Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 78(24), 8456–8461. <https://doi.org/10.1021/ac061220j>
- Beverley, G., Parson, W. W., & Parson, W. W. (2003). *Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis*. Springer Science & Business Media.
- Borghesi, E., González-Miret, M. L., Escudero-Gilete, M. L., Malorgio, F., Heredia, F. J., & Meléndez-Martínez, A. J. (2011). Effects of Salinity Stress on Carotenoids, Anthocyanins, and Color of Diverse Tomato Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11676–11682. <https://doi.org/10.1021/jf2021623>
- Borrelli, G., & Trono, D. (2016). Molecular Approaches to Genetically Improve the Accumulation of Health-Promoting Secondary Metabolites in Staple Crops—A Case Study: The Lipoxygenase-B1 Genes and Regulation of the Carotenoid Content in Pasta Products. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1177. <https://doi.org/10.3390/ijms17071177>
- Bouvier, F., Isner, J., Dogbo, O., & Camara, B. (2005). Oxidative tailoring of carotenoids: a prospect towards novel functions in plants. *Trends in Plant Science*, 10(4), 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.02.007>
- Braslavsky, S. E., & Holzwarth, A. R. (2012). Role of Carotenoids in Photosystem II (PSII) Reaction Centers. *International Journal of Thermophysics*, 33(10–11), 2021–2025. <https://doi.org/10.1007/s10765-012-1274-1>
- Brossard, J., & Mackinney, G. (1963). Fruit Pigments, Carotenoids of *Diospyros Kaki* (Japanese Persimmons). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 11(6), 501–503. <https://doi.org/10.1021/jf60130a019>

- Buchecker, R., & Eugster, C. H. (1980). Mimulaxanthin, Hauptcarotinoid von *Lamium montanum*, und seine absolute Konfiguration; konfigurative Verknüpfung von Deepoxyneoxanthin mit Neoxanthin. *Helvetica Chimica Acta*, 63(8), 2531–2537. <https://doi.org/10.1002/hlca.19800630848>
- Bunea, A., Andjelkovic, M., Socaciu, C., Bobis, O., Neacsu, M., Verhé, R., & Camp, J. Van. (2008). Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Food Chemistry*, 108(2), 649–656. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.056>
- Bunghez, I. R., Avramescu, S. M., Marian, N., Georgeta, R., & Rodica-Mariana, I. (2012). Obtaining of carotenoid extract from *Lycium chinense* and characterization using spectrometrical analysis. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7(2), 523–528.
- Cazzonelli, C. I. (2011). Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Functional Plant Biology*, 38(11), 833. <https://doi.org/10.1071/FP11192>
- Chacón-Ordóñez, T., Schweiggert, R. M., Bosy-Westphal, A., Jiménez, V. M., Carle, R., & Esquivel, P. (2017). Carotenoids and carotenoid esters of orange- and yellow-fleshed mamey sapote (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn) fruit and their post-prandial absorption in humans. *Food Chemistry*, 221, 673–682. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.120>
- Choudhury, N. K., & Behera, R. K. (2001). Photoinhibition of Photosynthesis: Role of Carotenoids in Photoprotection of Chloroplast Constituents. *Photosynthetica*, 39(4), 481–488. <https://doi.org/10.1023/A:1015647708360>
- Couso, I., Vila, M., Vigara, J., Cordero, B. F., Vargas, M. Á., Rodríguez, H., & León, R. (2012). Synthesis of carotenoids and regulation of the carotenoid biosynthesis pathway in response to high light stress in the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Phycology*, 47(3), 223–232. <https://doi.org/10.1080/09670262.2012.692816>
- Cruz, R., Baptista, P., Cunha, S., Pereira, J. A., & Casal, S. (2012). Carotenoids of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Grown on Soil Enriched with Spent Coffee Grounds. *Molecules*, 17(2), 1535–1547. <https://doi.org/10.3390/molecules17021535>
- Cuevas, F. J., Pradas, I., Ruiz-Moreno, M. J., Arroyo, F. T., Perez-Romero, L. F., Montenegro, J. C., & Moreno-Rojas, J. M. (2015). Effect of Organic and Conventional Management on Bio-Functional Quality of Thirteen Plum Cultivars (*Prunus salicina* Lindl.). *PLOS ONE*, 10(8), e0136596. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136596>
- Dabbou, S., Maatallah, S., Castagna, A., Guizani, M., Sghaeir, W., Hajlaoui, H., & Ranieri, A. (2017). Carotenoids, Phenolic Profile, Mineral Content and Antioxidant Properties in Flesh and Peel of *Prunus persica* Fruits during Two Maturation Stages. *Plant Foods for Human Nutrition*, 72(1), 103–110. <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0585-y>
- Dajic Stevanovic, Z., Sieniawska, E., Glowniak, K., Obradovic, N., & Pajic-Lijakovic, I. (2020). Natural Macromolecules as Carriers for Essential Oils: From Extraction to Biomedical Application. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00563>
- Davidov-Pardo, G., Gumus, C. E., & McClements, D. J. (2016). Lutein-enriched emulsion-based delivery systems: Influence of pH and temperature on physical and chemical stability. *Food Chemistry*, 196, 821–827. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.018>
- Deepa, N., Kaur, C., George, B., Singh, B., & Kapoor, H. C. (2007). Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes during maturity. *LWT - Food Science and Technology*, 40(1), 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.016>

- Del Campo, J. A., García-González, M., & Guerrero, M. G. (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(6), 1163–1174. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0844-9>
- Deli, J., Matus, Z., Molnár, P., & Tóth, G. (2001). Separation and identification of carotenoids from different coloured paprika (*Capsicum annuum*) by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *European Food Research and Technology*, 213(4–5), 301–305. <https://doi.org/10.1007/s002170100377>
- Deli, J., Molnár, P., Matus, Z., & Tóth, G. (2001). Carotenoid Composition in the Fruits of Red Paprika (*Capsicum annuum var. lycopersiciforme rubrum*) during Ripening; Biosynthesis of Carotenoids in Red Paprika. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1517–1523. <https://doi.org/10.1021/jf000958d>
- Della Valle, A., Dimmito, M. P., Zengin, G., Pieretti, S., Mollica, A., Locatelli, M., Cichelli, A., Novellino, E., Ak, G., Yerlikaya, S., Baloglu, M. C., Celik Altunoglu, Y., & Stefanucci, A. (2020). Exploring the Nutraceutical Potential of Dried Pepper *Capsicum annuum* L. on Market from Altino in Abruzzo Region. *Antioxidants*, 9(5), 400. <https://doi.org/10.3390/antiox9050400>
- Demmig-Adams, B., & Adams, W. W. (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, 1(1), 21–26. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(96\)80019-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(96)80019-7)
- DeWitt, D., & Paul W., B. (2009). *The complete chile pepper book: A gardener's guide to choosing, growing, preserving, and cooking*. Timber Press.
- Di Petrillo, A., González-Paramás, A. M., Era, B., Medda, R., Pintus, F., Santos-Buelga, C., & Fais, A. (2016). Tyrosinase inhibition and antioxidant properties of *Asphodelus microcarpus* extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 453. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1442-0>
- Doupis, G., Bertaki, M., Psarras, G., Kasapakis, I., & Chartzoulakis, K. (2013). Water relations, physiological behavior and antioxidant defence mechanism of olive plants subjected to different irrigation regimes. *Scientia Horticulturae*, 153, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.02.010>
- Drai, Borel, Faure, Galabert, Le Moël, Laromiguère, & Fayol. (2009). Fasting plasma carotenoids concentrations in Crohn's and pancreatic cancer patients compared to control subjects. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 79(2), 87–94. <https://doi.org/10.1024/0300-9831.79.2.87>
- Eismann, A. I., Perpetuo Reis, R., Ferreira da Silva, A., & Negrão Cavalcanti, D. (2020). Ulva spp. carotenoids: Responses to environmental conditions. *Algal Research*, 48, 101916. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101916>
- El-Ghorab, A. H., Javed, Q., Anjum, F. M., Hamed, S. F., & Shaaban, H. A. (2013). Pakistani Bell Pepper (*Capsicum annuum* L.): Chemical Compositions and its Antioxidant Activity. *International Journal of Food Properties*, 16(1), 18–32. <https://doi.org/10.1080/10942912.2010.513616>
- Elkholy, N. S., Hariri, M. L. M., Mohammed, H. S., & Shafaa, M. W. (2023). Lutein and β-Carotene Characterization in Free and Nanodispersion Forms in Terms of Antioxidant Activity and Cytotoxicity. *Journal of Pharmaceutical Innovation*. <https://doi.org/10.1007/s12247-023-09745-2>
- Eun, J.-B., Maruf, A., Das, P. R., & Nam, S.-H. (2020). A review of encapsulation of carotenoids using spray drying and freeze drying. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*,

- 60(21), 3547–3572. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1698511>
- Fancuillino, A. L., Bidel, L. P. R., & Urban, L. (2014). Carotenoid responses to environmental stimuli: integrating redox and carbon controls into a fruit model. *Plant, Cell & Environment*, 37(2), 273–289. <https://doi.org/10.1111/pce.12153>
- Felemban, A., Braguy, J., Zurbriggen, M. D., & Al-Babili, S. (2019). Apocarotenoids Involved in Plant Development and Stress Response. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01168>
- Felzl, L., Pacakova, V., Stulik, K., & Volka, K. (2005). Reliability of Carotenoid Analyses: A Review. *Current Analytical Chemistry*, 1(1), 93–102. <https://doi.org/10.2174/1573411052948424>
- Fiedor, L., Zbyradowski, M., & Pilch, M. (2019). *Tetrapyrrole pigments of photosynthetic antennae and reaction centers of higher plants: Structures, biophysics, functions, biochemistry, mechanisms of regulation, applications* (pp. 1–33). <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2019.04.001>
- Fitriansyah, S. N., Aulifa, D. L., Febriani, Y., & Sapitri, E. (2018). Correlation of Total Phenolic, Flavonoid and Carotenoid Content of Phyllanthus emblica Extract from Bandung with DPPH Scavenging Activities. *Pharmacognosy Journal*, 10(3), 447–452. <https://doi.org/10.5530/pj.2018.3.73>
- G., A., B., S., H., S., R., F., S., P., & N., H. (2001). Non-destructive NIR-FT-Raman analyses in practice. Part 1. Analyses of plants and historic textiles. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 371(7), 1009–1017. <https://doi.org/10.1007/s00216-001-1109-6>
- Gehse, S., Knorr, F., Patzelt, A., Zastrow, L., Meinke, M. C., Lademann, J., & Darvin, M. E. (2018). Determination of the effect of boiling on the bioavailability of carotenoids in vegetables using resonance Raman spectroscopy. *Laser Physics*, 28(10), 105602. <https://doi.org/10.1088/1555-6611/aad1b4>
- Ghasemnezhad, M., Sherafati, M., & Payvast, G. A. (2011). Variation in phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity of five coloured bell pepper (*Capsicum annum*) fruits at two different harvest times. *Journal of Functional Foods*, 3(1), 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.02.002>
- Ghazghazi, H., Miguel, M. G., Hasnaoui, B., Sebei, H., Ksontini, M., Figueiredo, A. C., Pedro, L. G., & Barroso, J. G. (2010). Phenols, essential oils and carotenoids of *Rosa canina* from Tunisia and their antioxidant activities. *African Journal of Biotechnology*, 9(18), 2709–2716. <https://doi.org/10.5897/AJB2010.000-3092>
- Gheonea (Dima), I., Aprodu, I., Enachi, E., Horincar, G., Bolea, C. A., Bahrim, G. E., Râpeanu, G., & Stănciu, N. (2020). Investigations on thermostability of carotenoids from tomato peels in oils using a kinetic approach. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(1). <https://doi.org/10.1111/jfpp.14303>
- Gómez-García, M., & Ochoa-Alejo, N. (2013). Biochemistry and Molecular Biology of Carotenoid Biosynthesis in Chili Peppers (*Capsicum* spp.). *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 19025–19053. <https://doi.org/10.3390/ijms140919025>
- Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P. B., Puech-Pagès, V., Dun, E. A., Pillot, J.-P., Letisse, F., Matusova, R., Danoun, S., Portais, J.-C., Bouwmeester, H., Bécard, G., Beveridge, C. A., Rameau, C., & Rochange, S. F. (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, 455(7210), 189–194. <https://doi.org/10.1038/nature07271>
- Gopal, S. S., Lakshmi, M. J., Sharavana, G., Sathaiah, G., Sreerama, Y. N., & Baskaran, V. (2017). Lactucaxanthin – a potential anti-diabetic carotenoid from lettuce (*Lactuca sativa*)

- inhibits  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activity in vitro and in diabetic rats. *Food & Function*, 8(3), 1124–1131. <https://doi.org/10.1039/C6FO01655C>
- Gross, J., Ikan, R., & Eckhardt, G. (1983). Carotenoids of the fruit of *Averrhoa carambola*. *Phytochemistry*, 22(6), 1479–1481. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84040-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84040-6)
- Gruber, M. Y., Xu, N., Grenkow, L., Li, X., Onyilagha, J., Soroka, J. J., Westcott, N. D., & Hegedus, D. D. (2009). Responses of the Crucifer Flea Beetle to Brassica Volatiles in an Olfactometer. *Environmental Entomology*, 38(5), 1467–1479. <https://doi.org/10.1603/022.038.0515>
- Gruszecki, W. I., & Strzałka, K. (2005). Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1740(2), 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.bbadi.2004.11.015>
- GÜLENÇ, B. E. (2022). *Comparison of different antioxidant assays for estimation of antioxidant potential of selected fruit juice waste materials* (Issue February).
- Hammad, S. A. R., & Ali, O. A. M. (2014). Physiological and biochemical studies on drought tolerance of wheat plants by application of amino acids and yeast extract. *Annals of Agricultural Sciences*, 59(1), 133–145. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2014.06.018>
- Haque, S., Begum, P., Khutun, M., & Islam, S. N. (2015). Total Carotenoid Content in Some Mango (*Mangifera indica*) Varieties of Bangladesh. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(11), 4875. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(11\).4875-78](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(11).4875-78)
- Hara, R., Ishigaki, M., Kitahama, Y., Ozaki, Y., & Genkawa, T. (2018). Excitation wavelength selection for quantitative analysis of carotenoids in tomatoes using Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 258, 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.089>
- Hashimoto, H., Uragami, C., & Cogdell, R. J. (2016). *Carotenoids and Photosynthesis* (pp. 111–139). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7_4)
- Havaux, M. (2014). Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *The Plant Journal*, 79(4), 597–606. <https://doi.org/10.1111/tpj.12386>
- Hedrén, E., Diaz, V., & Svanberg, U. (2002). Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(5), 425–430. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601329>
- Heinonen, M. I. (1990). Carotenoids and provitamin A activity of carrot (*Daucus carota L.*) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 609–612. <https://doi.org/10.1021/jf00093a005>
- Hirschberg, J. (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(3), 210–218. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00163-1](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00163-1)
- Hornero-Méndez, D., Gómez-Ladrón de Guevara, R., & Mínguez-Mosquera, M. I. (2000). Carotenoid Biosynthesis Changes in Five Red Pepper (*Capsicum annuum L.*) Cultivars during Ripening. Cultivar Selection for Breeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3857–3864. <https://doi.org/10.1021/jf991020r>
- Hornero-Méndez, D., & Mínguez-Mosquera, M. I. (2007). Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(3), 407–412. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.03.014>
- Ibarbia, E. A., & Lambeth, V. N. (1971). Tomato Fruit Size and Quality Interrelationships1 determinations were essentially those previously outlined by. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 96(2), 199–201.
- Inbaraj, B. S., Lu, H., Hung, C. F., Wu, W. B., Lin, C. L., & Chen, B. H. (2008a). Determination

- of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC–DAD–APCI–MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(4–5), 812–818. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.04.001>
- Inbaraj, B. S., Lu, H., Hung, C. F., Wu, W. B., Lin, C. L., & Chen, B. H. (2008b). Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC–DAD–APCI–MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(4–5), 812–818. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.04.001>
- Jarret, R. L., & Dang, P. (2004). Revisiting the waxy locus and the *capsicum annuum* l. complex. *Georgia Journal of Science*, 62(3), 118–132. [https://search.proquest.com/scholarly-journals/revisiting-waxy-locus-capsicum-annuum-l-complex/docview/230534225/se-2?accountid=6802%0Ahttp://snu-primo.hosted.exlibrisgroup.com/openurl/82SNU/SNU\\_SERVICES\\_PAGE??url\\_ver=Z39.8-2004&rft\\_val\\_fmt=info:ofi/fmt:](https://search.proquest.com/scholarly-journals/revisiting-waxy-locus-capsicum-annuum-l-complex/docview/230534225/se-2?accountid=6802%0Ahttp://snu-primo.hosted.exlibrisgroup.com/openurl/82SNU/SNU_SERVICES_PAGE??url_ver=Z39.8-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:)
- Jauregui, J. I., Lumbrieras, M., Chavarri, M. J., & Macua, J. I. (1999). Dry weight and brix degree correlation in different varieties of tomatoes intended for industrial processing. *Acta Horticulturae*, 487, 425–430. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1999.487.69>
- Jin, Y., & Arroo, R. (2023). The protective effects of flavonoids and carotenoids against diabetic complications—A review of in vivo evidence. *Frontiers in Nutrition*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1020950>
- Jung, H.-J., Manoharan, R. K., Park, J.-I., Chung, M.-Y., Lee, J., Lim, Y.-P., Hur, Y., & Nou, I.-S. (2014). Identification of Yellow Pigmentation Genes in *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* Using Br300 Microarray. *International Journal of Genomics*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/204969>
- Kammona, S., Othman, R., Jaswir, I., & Jamal, P. (2015). Characterisation of carotenoid content in diverse local sweet potato (*Ipomoea batatas*) flesh tubers. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(2), 347–351.
- Kaulmann, A., & Bohn, T. (2014). Carotenoids, inflammation, and oxidative stress—implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *Nutrition Research*, 34(11), 907–929. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2014.07.010>
- Khalid, M., Saeed-ur-Rahman, Bilal, M., Iqbal, H. M. N., & Huang, D. (2019). Biosynthesis and biomedical perspectives of carotenoids with special reference to human health-related applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.027>
- Khan, M.-U.-D., & Mackinney, G. (1953). Carotenoids in Grapefruit, *Citrus paradisi*. *Plant Physiology*, 28(3), 550–552. <https://doi.org/10.1104/pp.28.3.550>
- Kim, H.-D., Choi, H., Abekura, F., Park, J.-Y., Yang, W.-S., Yang, S.-H., & Kim, C.-H. (2023). Naturally-Occurring Tyrosinase Inhibitors Classified by Enzyme Kinetics and Copper Chelation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 8226. <https://doi.org/10.3390/ijms24098226>
- Kim, J.-S., An, C. G., Park, J.-S., Lim, Y. P., & Kim, S. (2016). Carotenoid profiling from 27 types of paprika (*Capsicum annuum* L.) with different colors, shapes, and cultivation methods. *Food Chemistry*, 201, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.041>
- Kim, J. K., Lee, S. Y., Chu, S. M., Lim, S. H., Suh, S.-C., Lee, Y.-T., Cho, H. S., & Ha, S.-H. (2010). Variation and Correlation Analysis of Flavonoids and Carotenoids in Korean Pigmented Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(24), 12804–12809. <https://doi.org/10.1021/jf103277g>

- Kim, S., Ha, T. Y., & Hwang, I. K. (2009). Analysis, Bioavailability, and Potential Healthy Effects of Capsanthin, Natural Red Pigment from Capsicum spp. *Food Reviews International*, 25(3), 198–213. <https://doi.org/10.1080/87559120902956141>
- Kirkhus, B., Afseth, N. K., Borge, G. I. A., Grimsby, S., Steppeler, C., Krona, A., & Langton, M. (2019). Increased release of carotenoids and delayed in vitro lipid digestion of high pressure homogenized tomato and pepper emulsions. *Food Chemistry*, 285, 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.124>
- Koklesova, L., Liskova, A., Samec, M., Buhrmann, C., Samuel, S. M., Varghese, E., Ashrafizadeh, M., Najafi, M., Shakibaie, M., Büsselberg, D., Giordano, F. A., Golubnitschaja, O., & Kubatka, P. (2020). Carotenoids in Cancer Apoptosis—The Road from Bench to Bedside and Back. *Cancers*, 12(9), 2425. <https://doi.org/10.3390/cancers12092425>
- Kolašinac, S., Pećinar, I., Danojević, D., & Stevanović, Z. D. (2022). Raman spectroscopy coupled with chemometric modeling approaches for authentication of different paprika varieties at physiological maturity. *LWT*, 162, 113402. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113402>
- Koltai, H. (2011). Strigolactones are regulators of root development. *New Phytologist*, 190(3), 545–549. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03678.x>
- Kovács, Z., Bedő, J., Pápai, B., Tóth-Lencsés, A. K., Csilléry, G., Szőke, A., Bányai-Stefanovits, É., Kiss, E., & Veres, A. (2022). Ripening-Induced Changes in the Nutraceutical Compounds of Differently Coloured Pepper (*Capsicum annuum* L.) Breeding Lines. *Antioxidants*, 11(4), 637. <https://doi.org/10.3390/antiox11040637>
- Kress, E., & Jahns, P. (2017). The Dynamics of Energy Dissipation and Xanthophyll Conversion in *Arabidopsis* Indicate an Indirect Photoprotective Role of Zeaxanthin in Slowly Inducible and Relaxing Components of Non-photochemical Quenching of Excitation Energy. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02094>
- Kulczyński, B., & Gramza-Michałowska, A. (2019). The Profile of Carotenoids and Other Bioactive Molecules in Various Pumpkin Fruits (*Cucurbita maxima* Duchesne) Cultivars. *Molecules*, 24(18), 3212. <https://doi.org/10.3390/molecules24183212>
- Kurilich, A. C., & Juvik, J. A. (1999). Quantification of Carotenoid and Tocopherol Antioxidants in *Zea mays*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(5), 1948–1955. <https://doi.org/10.1021/jf981029d>
- Kusaba, M., Maoka, T., Morita, R., & Takaichi, S. (2009). A Novel Carotenoid Derivative, Lutein 3-Acetate, Accumulates in Senescent Leaves of Rice. *Plant and Cell Physiology*, 50(8), 1573–1577. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp096>
- Langi, P., Kiokias, S., Varzakas, T., & Proestos, C. (2018). *Carotenoids: From Plants to Food and Feed Industries* (pp. 57–71). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8742-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8742-9_3)
- León-Chan, R. G., López-Meyer, M., Osuna-Enciso, T., Sañudo-Barajas, J. A., Heredia, J. B., & León-Félix, J. (2017). Low temperature and ultraviolet-B radiation affect chlorophyll content and induce the accumulation of UV-B-absorbing and antioxidant compounds in bell pepper (*Capsicum annuum*) plants. *Environmental and Experimental Botany*, 139, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.05.006>
- Li, C., Yu, W., Wu, P., & Chen, X. D. (2020). Current in vitro digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology*, 96, 114–126. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.015>
- Liu, W., Wang, J., McClements, D. J., & Zou, L. (2018). Encapsulation of β-carotene-loaded oil

- droplets in caseinate/alginate microparticles: Enhancement of carotenoid stability and bioaccessibility. *Journal of Functional Foods*, 40, 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.046>
- Liu, Y., Hou, Z., Yang, J., & Gao, Y. (2014). Effects of antioxidants on the stability of β-Carotene in O/W emulsions stabilized by Gum Arabic. *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1380-0>
- Lopez-Hernandez, J., Vazquez-Oderiz, L., Vazquez-Blanco, E., Romero-Rodriguez, A., & Simal-Lozano, J. (1993). HPLC determination of major pigments in the bean Phaseolus vulgaris. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(10), 1613–1615. <https://doi.org/10.1021/jf00034a017>
- Lux, P. E., Carle, R., Zacarías, L., Rodrigo, M.-J., Schweiggert, R. M., & Steingass, C. B. (2019). Genuine Carotenoid Profiles in Sweet Orange [ Citrus sinensis (L.) Osbeck cv. Navel] Peel and Pulp at Different Maturity Stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(47), 13164–13175. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06098>
- Ma, G., Zhang, L., Yungyuen, W., Tsukamoto, I., Iijima, N., Oikawa, M., Yamawaki, K., Yahata, M., & Kato, M. (2016). Expression and functional analysis of citrus carotene hydroxylases: unravelling the xanthophyll biosynthesis in citrus fruits. *BMC Plant Biology*, 16(1), 148. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0840-2>
- MacLachlan, D. J., & Mueller, U. (2012). A refined approach to estimate exposure for use in calculating the Maximum Residue Limit of veterinary drugs. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 62(1), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2011.12.006>
- Maoka, T., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., & Akimoto, N. (2001). Isolation of a Series of Apocarotenoids from the Fruits of the Red Paprika *Capsicum annuum* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1601–1606. <https://doi.org/10.1021/jf0013149>
- Martínez, S., Curros, A., Bermúdez, J., Carballo, J., & Franco, I. (2007). The composition of Arnoia peppers (*Capsicum annuum* L.) at different stages of maturity. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 58(2), 150–161. <https://doi.org/10.1080/09637480601154095>
- Medeiros, I., de Oliveira, G. L. R., de Queiroz, J. L. C., de Carvalho Gomes, C., de Carvalho, F. M. C., de Souza Lima, M. C. J., Serquiz, A. C., de Andrade Santos, P. P., da Silva Camillo, C., Maciel, B. L. L., de Araújo Morais, A. H., & Passos, T. S. (2020). Safety and bioactive potential of nanoparticles containing Cantaloupe melon (*Cucumis melo* L.) carotenoids in an experimental model of chronic inflammation. *Biotechnology Reports*, 28, e00567. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00567>
- Meléndez-Martínez, A. J., Stinco, C. M., & Mapelli-Brahm, P. (2019). Skin Carotenoids in Public Health and Nutricosmetics: The Emerging Roles and Applications of the UV Radiation-Absorbing Colourless Carotenoids Phytoene and Phytofluene. *Nutrients*, 11(5), 1093. <https://doi.org/10.3390/nu11051093>
- Mercadante, A. Z., Britton, G., & Rodriguez-Amaya, D. B. (1998). Carotenoids from Yellow Passion Fruit (*Passiflora edulis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4102–4106. <https://doi.org/10.1021/jf9801724>
- Merlin, J. C. (1985). Resonance Raman spectroscopy of carotenoids and carotenoid-containing systems. *Pure and Applied Chemistry*, 57(5), 785–792. <https://doi.org/10.1351/pac198557050785>
- Mezzomo, N., & Ferreira, S. R. S. (2016). Carotenoids Functionality, Sources, and Processing by Supercritical Technology: A Review. *Journal of Chemistry*, 2016, 1–16.

- <https://doi.org/10.1155/2016/3164312>
- Mihaylova, D., Vrancheva, R., Petkova, N., Ognyanov, M., Desseva, I., Ivanov, I., Popova, M., & Popova, A. (2018). Carotenoids, tocopherols, organic acids, carbohydrate and mineral content in different medicinal plant extracts. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 73(11–12), 439–448. <https://doi.org/10.1515/znc-2018-0057>
- Milinčić, D. D., Salević-Jelić, A. S., Kostić, A. Ž., Stanojević, S. P., Nedović, V., & Pešić, M. B. (2023). Food nanoemulsions: how simulated gastrointestinal digestion models, nanoemulsion, and food matrix properties affect bioaccessibility of encapsulated bioactive compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–23. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2195519>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Mohd Hassan, N., Yusof, N. A., Yahaya, A. F., Mohd Rozali, N. N., & Othman, R. (2019). Carotenoids of Capsicum Fruits: Pigment Profile and Health-Promoting Functional Attributes. *Antioxidants*, 8(10), 469. <https://doi.org/10.3390/antiox8100469>
- Morais, D. V. de, Costa, M. A. P. de C., Santa Bárbara, M. F., Silva, F. de L., Moreira, M. M., Delerue-Mato, C., Guimarães Dias, L. A., Estevinho, M. L. M., & Carvalho, C. A. L. de. (2018). Antioxidant, photoprotective and inhibitory activity of tyrosinase in extracts of *Dalbergia ecastaphyllum*. *PLOS ONE*, 13(11), e0207510. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207510>
- Morais, H., Rodrigues, P., Ramos, C., Almeida, V., Forgács, E., Cserháti, T., & Oliveira, J. S. (2002). Note. Effect of Blanching and Frozen Storage on the Stability of β-Carotene and Capsanthin in Red Pepper (*Capsicum annuum*) Fruit. *Food Science and Technology International*, 8(1), 55–59. <https://doi.org/10.1106/1082013022914>
- Mostofa, M. G., Li, W., Nguyen, K. H., Fujita, M., & Tran, L.-S. P. (2018). Strigolactones in plant adaptation to abiotic stresses: An emerging avenue of plant research. *Plant, Cell & Environment*, 41(10), 2227–2243. <https://doi.org/10.1111/pce.13364>
- Müller, H. (1996). Die tägliche Aufnahme von Carotinoiden (Carotine und Xanthophylle) aus Gesamtnahrungsproben und die Carotinoidgehalte ausgewählter Gemüse- und Obstarten. *Zeitschrift Für Ernährungswissenschaft*, 35(1), 45–50. <https://doi.org/10.1007/BF01612027>
- Murillo, E., Meléndez-Martínez, A. J., & Portugal, F. (2010). Screening of vegetables and fruits from Panama for rich sources of lutein and zeaxanthin. *Food Chemistry*, 122(1), 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.034>
- Nambara, E., & Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 165–185. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046>
- Nanok, K., & Sansanya, S. (2021). Combination effects of rice extract and five aromatic compounds against α-glucosidase, α-amylase and tyrosinase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 132(1), 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.02.003>
- Nisar, N., Li, L., Lu, S., Khin, N. C., & Pogson, B. J. (2015). Carotenoid Metabolism in Plants. *Molecular Plant*, 8(1), 68–82. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.007>
- Niyogi, K. K. (1999). Photoprotection revisited: Genetic and Molecular Approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 333–359.

- <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.333>
- No, J. K., Soung, D. Y., Kim, Y. J., Shim, K. H., Jun, Y. S., Rhee, S. H., Yokozawa, T., & Chung, H. Y. (1999). Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sciences*, 65(21), PL241–PL246. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00492-0](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00492-0)
- Oboh, G., Ademiluyi, A. O., & Faloye, Y. M. (2011). Effect of Combination on the Antioxidant and Inhibitory Properties of Tropical Pepper Varieties Against  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase Activities In Vitro. *Journal of Medicinal Food*, 14(10), 1152–1158. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0194>
- Ohmiya, A. (2011). Diversity of Carotenoid Composition in Flower Petals. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 45(2), 163–171. <https://doi.org/10.6090/jarq.45.163>
- Oskoueian, E., Abdullah, N., Hendra, R., & Karimi, E. (2011). Bioactive Compounds, Antioxidant, Xanthine Oxidase Inhibitory, Tyrosinase Inhibitory and Anti-Inflammatory Activities of Selected Agro-Industrial By-products. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12), 8610–8625. <https://doi.org/10.3390/ijms12128610>
- Perveen, R., Suleria, H. A. R., Anjum, F. M., Butt, M. S., Pasha, I., & Ahmad, S. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum*) Carotenoids and Lycopene Chemistry; Metabolism, Absorption, Nutrition, and Allied Health Claims—A Comprehensive Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(7), 919–929. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.657809>
- Pillaiyar, T., Manickam, M., & Namasivayam, V. (2017). Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 403–425. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1256882>
- Polívka, T., & Frank, H. A. (2010). Molecular Factors Controlling Photosynthetic Light Harvesting by Carotenoids. *Accounts of Chemical Research*, 43(8), 1125–1134. <https://doi.org/10.1021/ar100030m>
- Popović (2000). Povrtarstvo. Nolit. Beograd.
- Prakash, D., & Sharma, G. (2014). *Phytochemicals of Nutraceutical Importance*. CAB Books.
- Qin, J., Kim, M. S., Chao, K., Dhakal, S., Cho, B.-K., Lohumi, S., Mo, C., Peng, Y., & Huang, M. (2019). Advances in Raman spectroscopy and imaging techniques for quality and safety inspection of horticultural products. *Postharvest Biology and Technology*, 149, 101–117. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.11.004>
- Qiu, D., Shao, S.-X., Zhao, B., Wu, Y.-C., Shi, L.-F., Zhou, J.-C., & Chen, Z.-R. (2012). Stability of  $\beta$ -carotene in thermal oils. *Journal of Food Biochemistry*, 36(2), 198–206. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2010.00526.x>
- Quattrocchi, U. (2017). *CRC World Dictionary of Plant names*. Routledge. <https://doi.org/10.1201/9781315140599>
- Ribeiro, B. D., Barreto, D. W., & Coelho, M. A. Z. (2011). Technological Aspects of  $\beta$ -Carotene Production. *Food and Bioprocess Technology*, 4(5), 693–701. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0545-3>
- Rivera-Madrid, R., Carballo-Uicab, V. M., Cárdenas-Conejo, Y., Aguilar-Espinosa, M., & Siva, R. (2020). Overview of carotenoids and beneficial effects on human health. In *Carotenoids: Properties, Processing and Applications* (pp. 1–40). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817067-0.00001-4>
- Rodriguez-Amaya, D. (2016). *Food Carotenoids*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2016). Structures and Analysis of Carotenoid Molecules. In *Carotenoids in Nature: Biosynthesis, Regulation and Function* (pp. 71–108). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7_3)

- Rodriguez-Concepcion, M., Avalos, J., Bonet, M. L., Boronat, A., Gomez-Gomez, L., Hornero-Mendez, D., Limon, M. C., Meléndez-Martínez, A. J., Olmedilla-Alonso, B., Palou, A., Ribot, J., Rodrigo, M. J., Zacarias, L., & Zhu, C. (2018). A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Progress in Lipid Research*, 70, 62–93. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.004>
- Rodríguez-Rodríguez, E., Sánchez-Prieto, M., & Olmedilla-Alonso, B. (2020). Assessment of carotenoid concentrations in red peppers (*Capsicum annuum*) under domestic refrigeration for three weeks as determined by HPLC-DAD. *Food Chemistry*: X, 6, 100092. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2020.100092>
- Roohbakhsh, A., Karimi, G., & Iranshahi, M. (2017). Carotenoids in the treatment of diabetes mellitus and its complications: A mechanistic review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 91, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.057>
- Roulier, B., Pérès, B., & Haudecoeur, R. (2020). Advances in the Design of Genuine Human Tyrosinase Inhibitors for Targeting Melanogenesis and Related Pigmentations. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(22), 13428–13443. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00994>
- Rowles, J. L., & Erdman, J. W. (2020). Carotenoids and their role in cancer prevention. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(11), 158613. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158613>
- Ruiz, D., Egea, J., Tomás-Barberán, F. A., & Gil, M. I. (2005). Carotenoids from New Apricot (*Prunus armeniaca* L.) Varieties and Their Relationship with Flesh and Skin Color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6368–6374. <https://doi.org/10.1021/jf0480703>
- Ryabchykov, O., Guo, S., & Bocklitz, T. (2019). Analyzing Raman spectroscopic data. *Physical Sciences Reviews*, 4(2). <https://doi.org/10.1515/psr-2017-0043>
- Saini, R. K., Keum, Y.-S., Daglia, M., & Rengasamy, K. R. (2020). Dietary carotenoids in cancer chemoprevention and chemotherapy: A review of emerging evidence. *Pharmacological Research*, 157, 104830. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104830>
- Saini, R. K., Nile, S. H., & Park, S. W. (2015). Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Research International*, 76, 735–750. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.047>
- Schulz, H., Baranska, M., & Baranski, R. (2005). Potential of NIR-FT-Raman spectroscopy in natural carotenoid analysis. *Biopolymers*, 77(4), 212–221. <https://doi.org/10.1002/bip.20215>
- Schweiggert, R. M., Steingass, C. B., Heller, A., Esquivel, P., & Carle, R. (2011). Characterization of chromoplasts and carotenoids of red- and yellow-fleshed papaya (*Carica papaya* L.). *Planta*, 234(5), 1031–1044. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1457-1>
- Sevindik Baç, H., Yemiş, O., & Özkan, M. (2023). Thermal stabilities of lycopene and β-carotene in tomato pulp and pink grapefruit juice. *Journal of Food Engineering*, 337, 111217. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2022.111217>
- Shalini, T., Jose, S. S., Prasantha, P. S., Balakrishna, N., Viswanath, K., & Reddy, G. B. (2021). Carotenoid status in type 2 diabetes patients with and without retinopathy. *Food & Function*, 12(10), 4402–4410. <https://doi.org/10.1039/DFO03321A>
- Shankar, V., Kumar, D., & Agrawal, V. (2016). Assessment of Antioxidant Enzyme Activity and Mineral Nutrients in Response to NaCl Stress and its Amelioration Through Glutathione in Chickpea. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178(2), 267–284. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1870-1>
- Shao, P., Qiu, Q., Xiao, J., Zhu, Y., & Sun, P. (2017). Chemical Stability and in vitro release properties of β-carotene in emulsions stabilized by *Ulva fasciata* polysaccharide.

- International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 225–231.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.186>
- Shen, Y., Li, J., Gu, R., Yue, L., Wang, H., Zhan, X., & Xing, B. (2018). Carotenoid and superoxide dismutase are the most effective antioxidants participating in ROS scavenging in phenanthrene accumulated wheat leaf. *Chemosphere*, 197, 513–525.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.036>
- Sheng, B., Li, L., Zhang, X., Jiao, W., Zhao, D., Wang, X., Wan, L., Li, B., & Rong, H. (2018). Physicochemical Properties and Chemical Stability of β-Carotene Bilayer Emulsion Coated with Bovine Serum Albumin and Arabic Gum Compared to Monolayer Emulsions. *Molecules*, 23(2), 495. <https://doi.org/10.3390/molecules23020495>
- Simkin, A. J., Moreau, H., Kuntz, M., Pagny, G., Lin, C., Tanksley, S., & McCarthy, J. (2008). An investigation of carotenoid biosynthesis in Coffea canephora and Coffea arabica. *Journal of Plant Physiology*, 165(10), 1087–1106.  
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.06.016>
- Smit, N., Vicanova, J., Cramers, P., Vrolijk, H., & Pavel, S. (2004). The Combined Effects of Extracts Containing Carotenoids and Vitamins E and C on Growth and Pigmentation of Cultured Human Melanocytes. *Skin Pharmacology and Physiology*, 17(5), 238–245.  
<https://doi.org/10.1159/000080217>
- Sommer, A. (2008). Vitamin A Deficiency and Clinical Disease: An Historical Overview. *The Journal of Nutrition*, 138(10), 1835–1839. <https://doi.org/10.1093/jn/138.10.1835>
- Subramanian, B., Tchoukanova, N., Djaoued, Y., Pelletier, C., Ferron, M., & Robichaud, J. (2014). Investigations on the geometrical isomers of astaxanthin: Raman spectroscopy of conjugated polyene chain with electronic and mechanical confinement. *Journal of Raman Spectroscopy*, 45(4), 299–304. <https://doi.org/10.1002/jrs.4459>
- Sun, T., Xu, Z., Wu, C.-T., Janes, M., Prinyawiwatkul, W., & No, H. K. (2007). Antioxidant Activities of Different Colored Sweet Bell Peppers (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Food Science*, 72(2), S98–S102. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00245.x>
- Sun, T., Yuan, H., Cao, H., Yazdani, M., Tadmor, Y., & Li, L. (2018). Carotenoid Metabolism in Plants: The Role of Plastids. *Molecular Plant*, 11(1), 58–74.  
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.09.010>
- Taïbi, K., Taïbi, F., Ait Abderrahim, L., Ennajah, A., Belkhodja, M., & Mulet, J. M. (2016). Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in Phaseolus vulgaris L. *South African Journal of Botany*, 105, 306–312.  
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.03.011>
- Tan, Y., Zhou, H., & McClements, D. J. (2022). Application of static in vitro digestion models for assessing the bioaccessibility of hydrophobic bioactives: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 122, 314–327. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.028>
- Tang, H., Cui, F., Li, H., Huang, Q., & Li, Y. (2018). Understanding the inhibitory mechanism of tea polyphenols against tyrosinase using fluorescence spectroscopy, cyclic voltammetry, oximetry, and molecular simulations. *RSC Advances*, 8(15), 8310–8318.  
<https://doi.org/10.1039/C7RA12749A>
- Tarantilis, P. A., Beljebar, A., Manfait, M., & Polissiou, M. (1998). FT-IR, FT-Raman spectroscopic study of carotenoids from saffron (*Crocus sativus* L.) and some derivatives. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 54(4), 651–657.  
[https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(98\)00024-9](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(98)00024-9)
- Telfer, A., Dhami, S., Bishop, S. M., Phillips, D., & Barber, J. (1994). .beta.-Carotene Quenches

- Singlet Oxygen Formed by Isolated Photosystem II Reaction Centers. *Biochemistry*, 33(48), 14469–14474. <https://doi.org/10.1021/bi00252a013>
- Trebolazabala, J., Maguregui, M., Morillas, H., de Diego, A., & Madariaga, J. M. (2017a). Portable Raman spectroscopy for an in-situ monitoring the ripening of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 180, 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.03.024>
- Trebolazabala, J., Maguregui, M., Morillas, H., de Diego, A., & Madariaga, J. M. (2017b). Portable Raman spectroscopy for an in-situ monitoring the ripening of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 180, 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.03.024>
- Tripodi, P., & Greco, B. (2018). Large Scale Phenotyping Provides Insight into the Diversity of Vegetative and Reproductive Organs in a Wide Collection of Wild and Domesticated Peppers (*Capsicum* spp.). *Plants*, 7(4), 103. <https://doi.org/10.3390/plants7040103>
- Uarrota, V. G., Stefen, D. L. V., Leolato, L. S., Gindri, D. M., & Nerling, D. (2018). Revisiting Carotenoids and Their Role in Plant Stress Responses: From Biosynthesis to Plant Signaling Mechanisms During Stress. In *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants* (pp. 207–232). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75088-0\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75088-0_10)
- Vílchez, C., Forján, E., Cuaresma, M., Bédmar, F., Garbayo, I., & Vega, J. M. (2011). Marine Carotenoids: Biological Functions and Commercial Applications. *Marine Drugs*, 9(3), 319–333. <https://doi.org/10.3390/md9030319>
- Vio-Michaelis, S., Feucht, W., Gómez, M., Hadersdorfer, J., Treutter, D., & Schwab, W. (2020). Histochemical Analysis of Anthocyanins, Carotenoids, and Flavan-3-ols/Proanthocyanidins in *Prunus domestica* L. Fruits during Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(10), 2880–2890. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01954>
- von Lintig, J., Moon, J., Lee, J., & Ramkumar, S. (2020). Carotenoid metabolism at the intestinal barrier. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(11), 158580. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.158580>
- Wang, Y., Hao, M.-M., Sun, Y., Wang, L.-F., Wang, H., Zhang, Y.-J., Li, H.-Y., Zhuang, P.-W., & Yang, Z. (2018). Synergistic Promotion on Tyrosinase Inhibition by Antioxidants. *Molecules*, 23(1), 106. <https://doi.org/10.3390/molecules23010106>
- Wang, Z., Xu, W., Kang, J., Li, M., Huang, J., Ke, Q., Kim, H. S., Xu, B., & Kwak, S.-S. (2018). Overexpression of alfalfa Orange gene in tobacco enhances carotenoid accumulation and tolerance to multiple abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 130, 613–622. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.08.017>
- Watcharachaisoponsiri, T., Sornchan, P., Charoenkiatkul, S., & Suttisansanee, U. (2016). The  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity from different chili pepper extracts. *International Food Research Journal*, 23(4), 1439–1445.
- Wen, X., Hempel, J., Schweiggert, R. M., Ni, Y., & Carle, R. (2017). Carotenoids and Carotenoid Esters of Red and Yellow Physalis (*Physalis alkekengi* L. and *P. pubescens* L.) Fruits and Calyces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(30), 6140–6151. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02514>
- Weryszko-Chmielewska, E., & Michałojć, Z. (2012). Anatomical traits of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) fruit. *Acta Agrobotanica*, 64(4), 181–188. <https://doi.org/10.5586/aa.2011.059>
- Withnall, R., Chowdhry, B. Z., Silver, J., Edwards, H. G. M., & de Oliveira, L. F. C. (2003a). Raman spectra of carotenoids in natural products. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular*

- and Biomolecular Spectroscopy*, 59(10), 2207–2212. [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(03\)00064-7](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(03)00064-7)
- Withnall, R., Chowdhry, B. Z., Silver, J., Edwards, H. G. M., & de Oliveira, L. F. C. (2003b). Raman spectra of carotenoids in natural products. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 59(10), 2207–2212. [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(03\)00064-7](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(03)00064-7)
- Xiao, S., & Ahn, D. U. (2022). Enhanced lutein stability under UV-Light and high temperature by loading it into alginate-chitosan complex. *LWT*, 164, 113663. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113663>
- Xue, F., Li, C., & Pan, S. (2012a). Subacute toxicity assessment of carotenoids extracted from citrus peel (Nanfengmiju, *Citrus reticulata* Blanco) in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 62(1), 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2011.12.003>
- Xue, F., Li, C., & Pan, S. (2012b). Subacute toxicity assessment of carotenoids extracted from citrus peel (Nanfengmiju, *Citrus reticulata* Blanco) in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 62(1), 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2011.12.003>
- Yang, D., & Ying, Y. (2011). Applications of Raman Spectroscopy in Agricultural Products and Food Analysis: A Review. *Applied Spectroscopy Reviews*, 46(7), 539–560. <https://doi.org/10.1080/05704928.2011.593216>
- Yao, R., Fu, W., Du, M., Chen, Z.-X., Lei, A.-P., & Wang, J.-X. (2022). Carotenoids Biosynthesis, Accumulation, and Applications of a Model Microalga *Euglenagracilis*. *Marine Drugs*, 20(8), 496. <https://doi.org/10.3390/md20080496>
- Yu, Q., Fan, L., & Duan, Z. (2019). Five individual polyphenols as tyrosinase inhibitors: Inhibitory activity, synergistic effect, action mechanism, and molecular docking. *Food Chemistry*, 297, 124910. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.184>
- Yusuf, E., Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Nowicka, P. (2021). Nutritional, Phytochemical Characteristics and In Vitro Effect on  $\alpha$ -Amylase,  $\alpha$ -Glucosidase, Lipase, and Cholinesterase Activities of 12 Coloured Carrot Varieties. *Foods*, 10(4), 808. <https://doi.org/10.3390/foods10040808>
- Zakynthinos, G., & Varzakas, T. (2016). Carotenoids: From Plants to Food Industry. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 4(1), 38–51. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.4.Special-Issue1.04>
- Zeng, L., Ma, M., Li, C., & Luo, L. (2017). Stability of tea polyphenols solution with different pH at different temperatures. *International Journal of Food Properties*, 20(1), 1–18. <https://doi.org/10.1080/10942912.2014.983605>
- Zhao, W., Lv, P., & Gu, H. (2013). Studies on carotenoids in watermelon flesh. *Agricultural Sciences*, 04(07), 13–20. <https://doi.org/10.4236/as.2013.47A003>
- Zheng, B., Peng, S., Zhang, X., & McClements, D. J. (2018). Impact of Delivery System Type on Curcumin Bioaccessibility: Comparison of Curcumin-Loaded Nanoemulsions with Commercial Curcumin Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(41), 10816–10826. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03174>

## 8. Prilozi

### PRILOG 1

**Tabela T1.** Jednofaktorska analiza varijanse. Ispitivanje efekta sorte (linije) na ispitivane parametre.

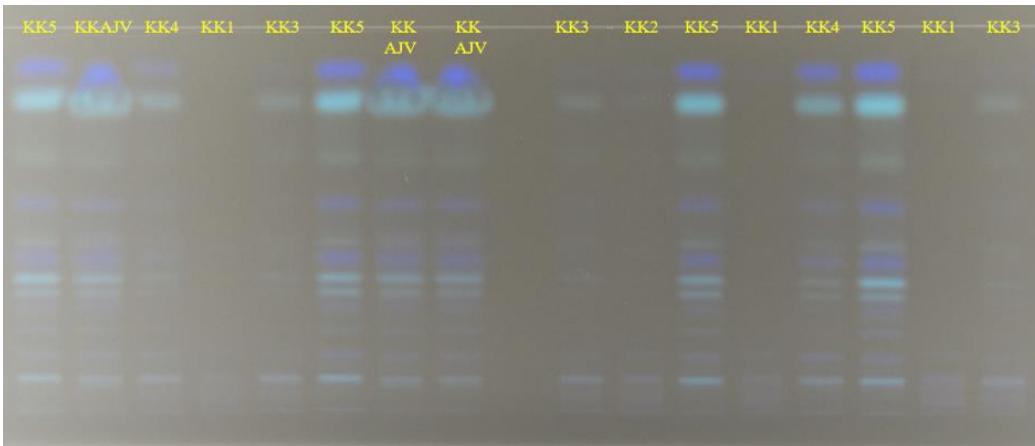
Izvori variranja		Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	F količnik	p vrednost
<b>Masa ploda (g)</b>	Između grupe	93351,506	4	23337,877	99,699	0,000
	Unutar grupe	16385,817	70	234,083		
	Ukupno	109737,323	74			
<b>Dužina ploda (cm)</b>	Između grupe	87,271	4	21,818	10,550	0,000
	Unutar grupe	144,756	70	2,068		
	Ukupno	232,027	74			
<b>Širina ploda (cm)</b>	Između grupe	67,237	4	16,809	87,047	0,000
	Unutar grupe	13,517	70	0,193		
	Ukupno	80,754	74			
<b>Debljina perikarpa (mm)</b>	Između grupe	18,885	4	4,721	7,604	0,000
	Unutar grupe	43,463	70	0,621		
	Ukupno	62,347	74			
<b>Brix</b>	Između grupe	114,475	4	28,619	161,888	0,000
	Unutar grupe	12,375	70	0,177		
	Ukupno	126,850	74			

\*statistički značajan uticaj

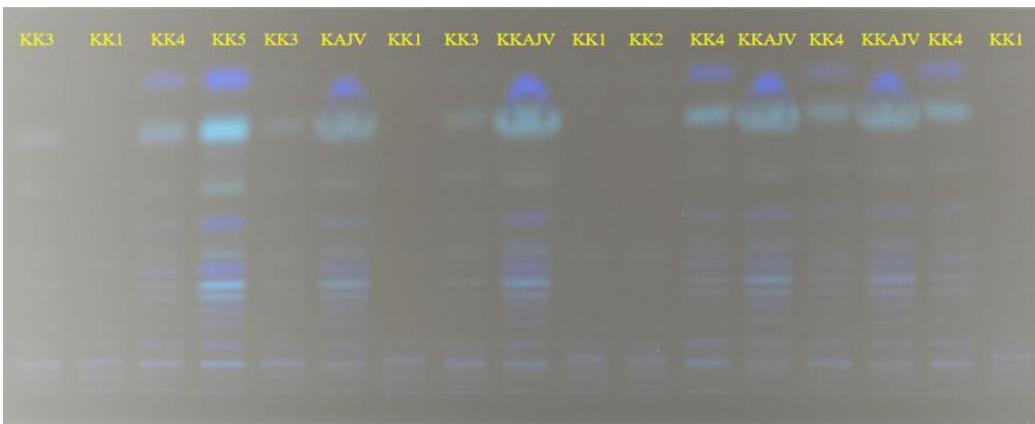
## PRILOG 2



Slika P1. Karotenoidni profil ispitivanih uzoraka paprike i ajvara dobijenih HPTLC metodom



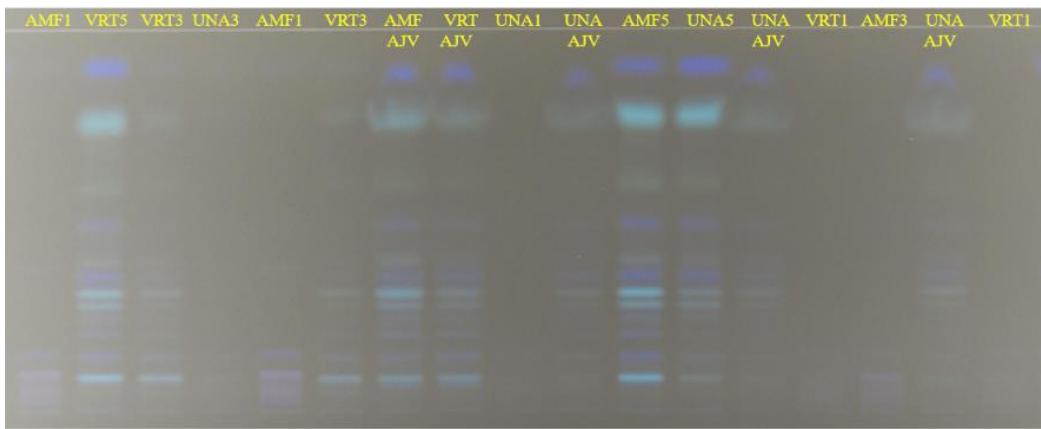
Slika P2. Karotenoidni profil ispitivanih uzoraka paprike i ajvara dobijenih HPTLC metodom



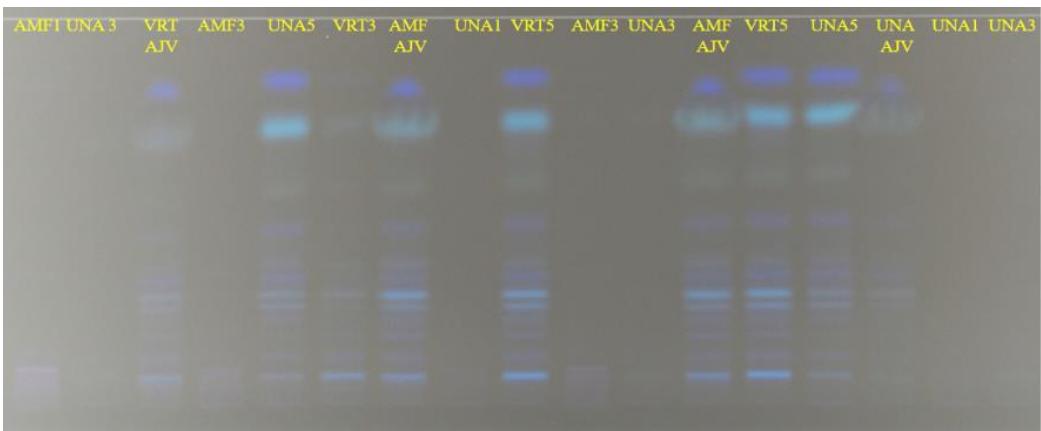
Slika P3. Karotenoidni profil ispitivanih uzoraka paprike i ajvara dobijenih HPTLC metodom



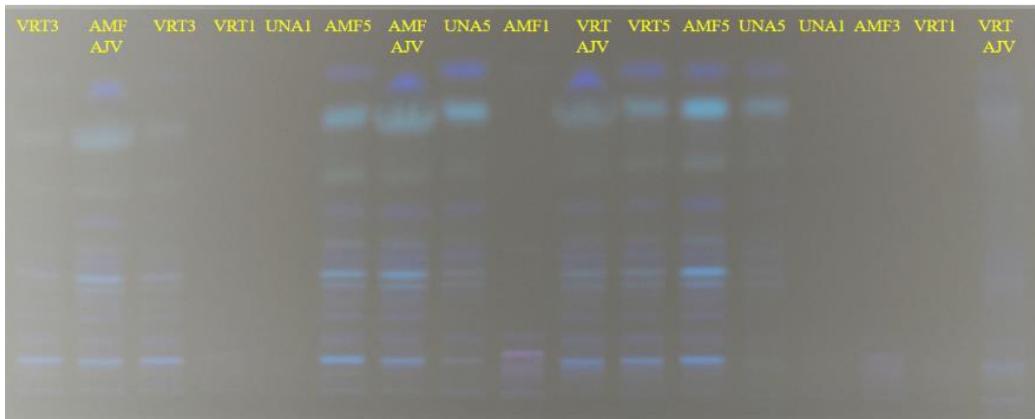
Slika P4. Karotenoidni profil ispitivanih uzoraka paprike i ajvara dobijenih HPTLC metodom



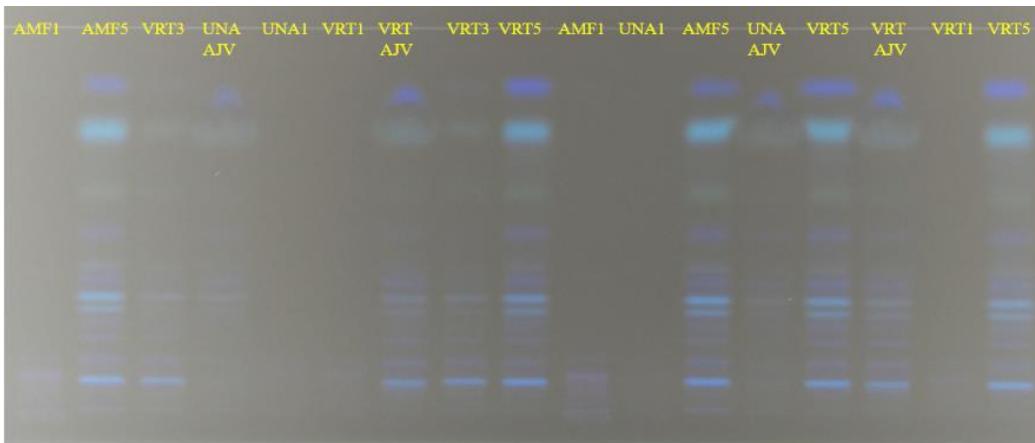
Slika P5. Karotenoidni profil ispitivanih uzoraka paprike i ajvara dobijenih HPTLC metodom



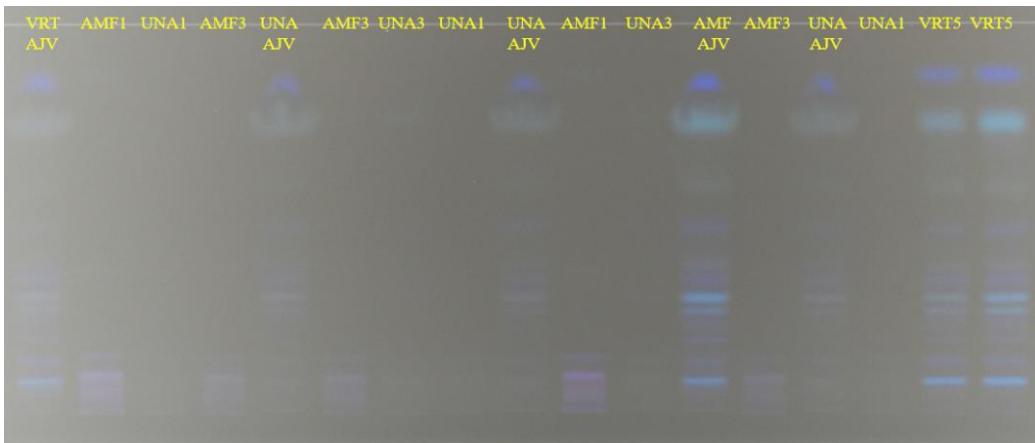
Slika P6. Karotenoidni profil ispitivanih uzoraka paprike i ajvara dobijenih HPTLC metodom



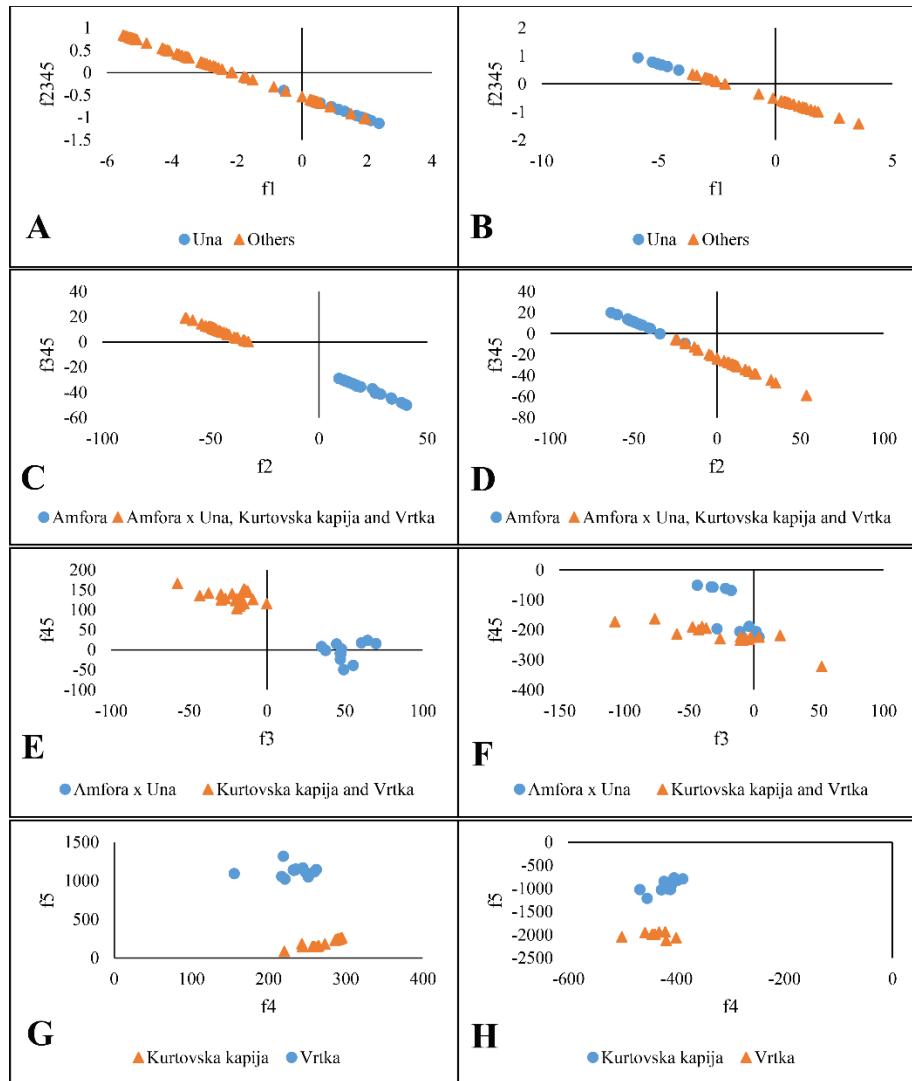
**Slika P7.** Karotenoidni profil ispitivanih uzoraka paprike i ajvara dobijenih HPTLC metodom



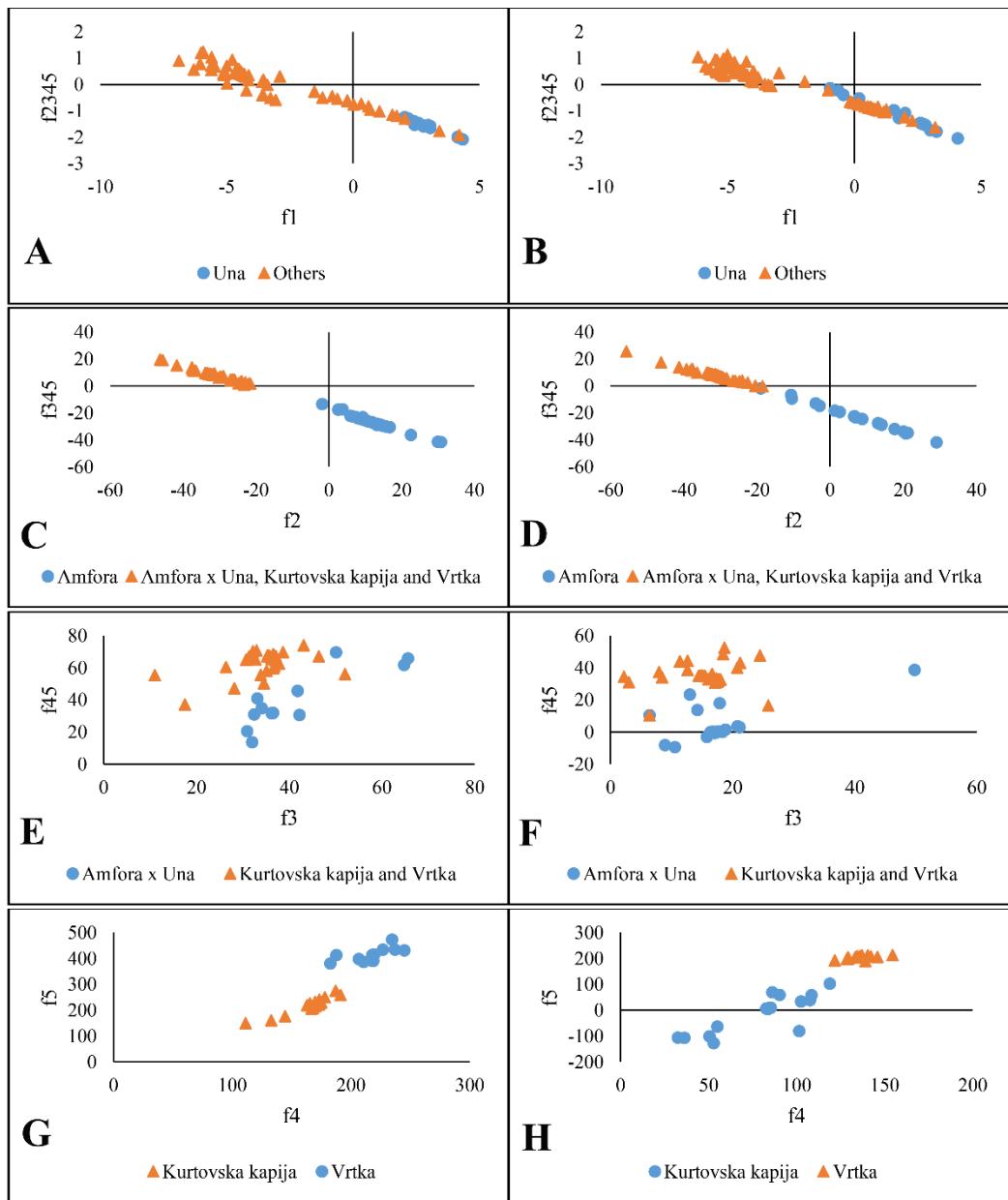
**Slika P8.** Karotenoidni profil ispitivanih uzoraka paprike i ajvara dobijenih HPTLC metodom



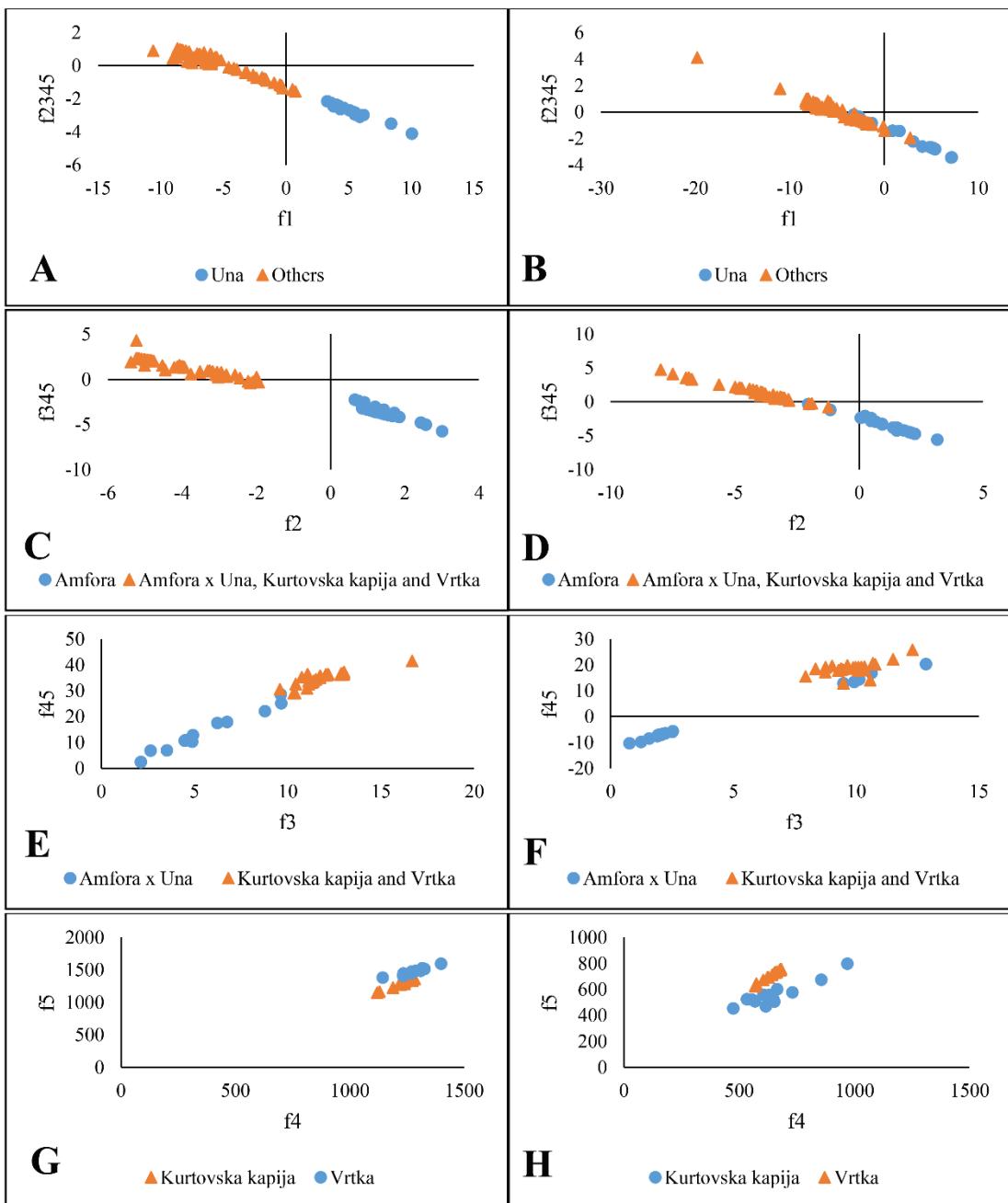
**Slika P9.** Karotenoidni profil ispitivanih uzoraka paprike i ajvara dobijenih HPTLC metodom



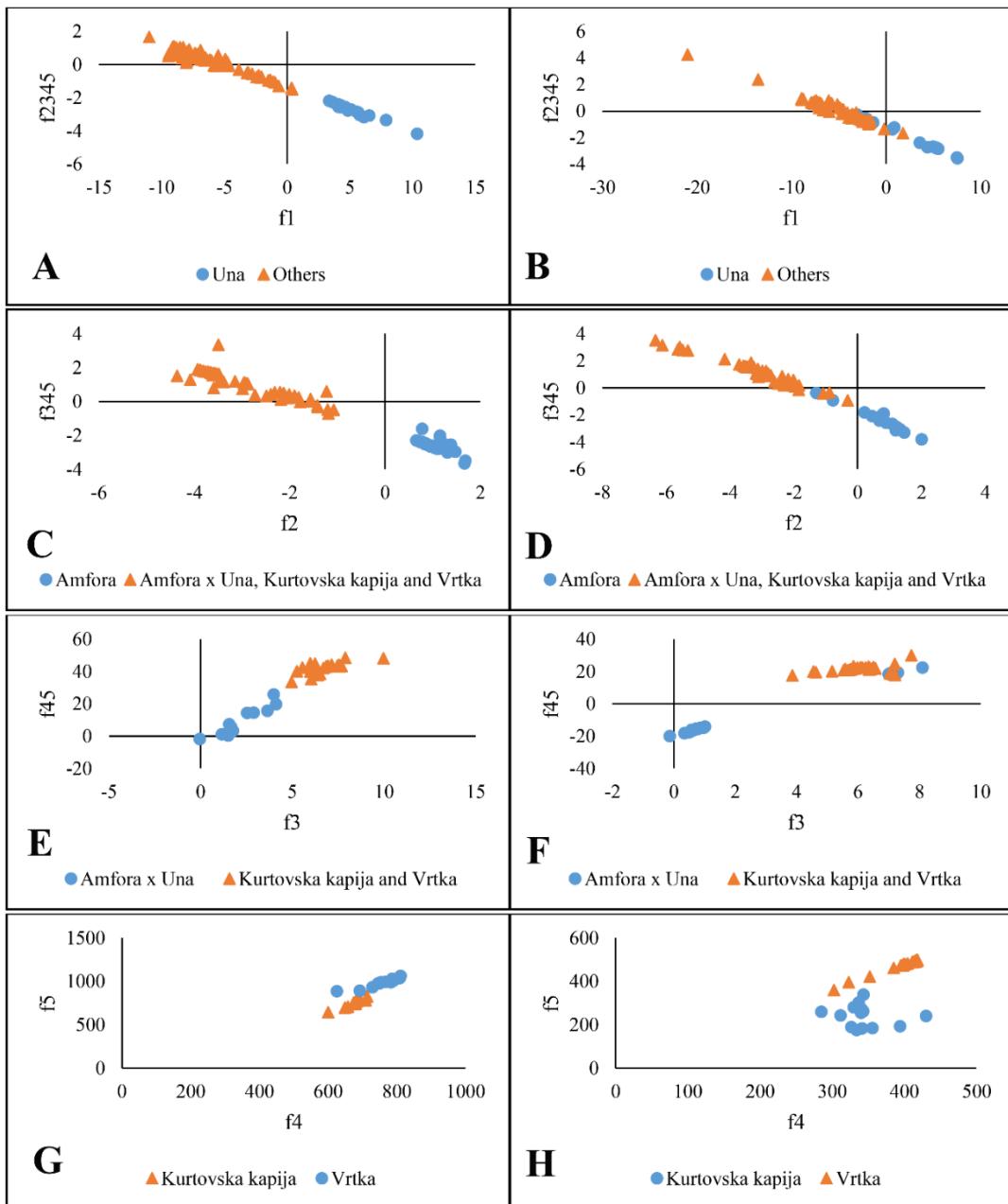
**Slika P10.** PCA-LDA diskriminacioni plotovi (korekcija bazne linije+normalizacija): A (trening set) i B (test set) ilustruju diskriminaciju između sorte Una i ostalih sorti/linije (Amfora, Amfora x Una, Kurtovska kapija and Vrtka); C (trening set) i D (test set) ilustruju diskriminaciju između sorte Amfora i preostalih sorti/linije (Amfora x Una, Kurtovska kapija and Vrtka varieties); E (trening set) i F (test set) ilustruju diskriminaciju između linije Amfora x Una i preostalih sorti (Kurtovska kapija i Vrtka); G (trening set) i H (test set) ilustruju diskriminaciju između sorte Kurtovska kapija i Vrtka. Diskriminacioni skorovi ( $f_1$ ,  $f_2$ ,  $f_3$ ,  $f_4$ ,  $f_5$ ,  $f_{2345}$  i  $f_{345}$ ) određuju pripadnost uzorka određenoj klasi.



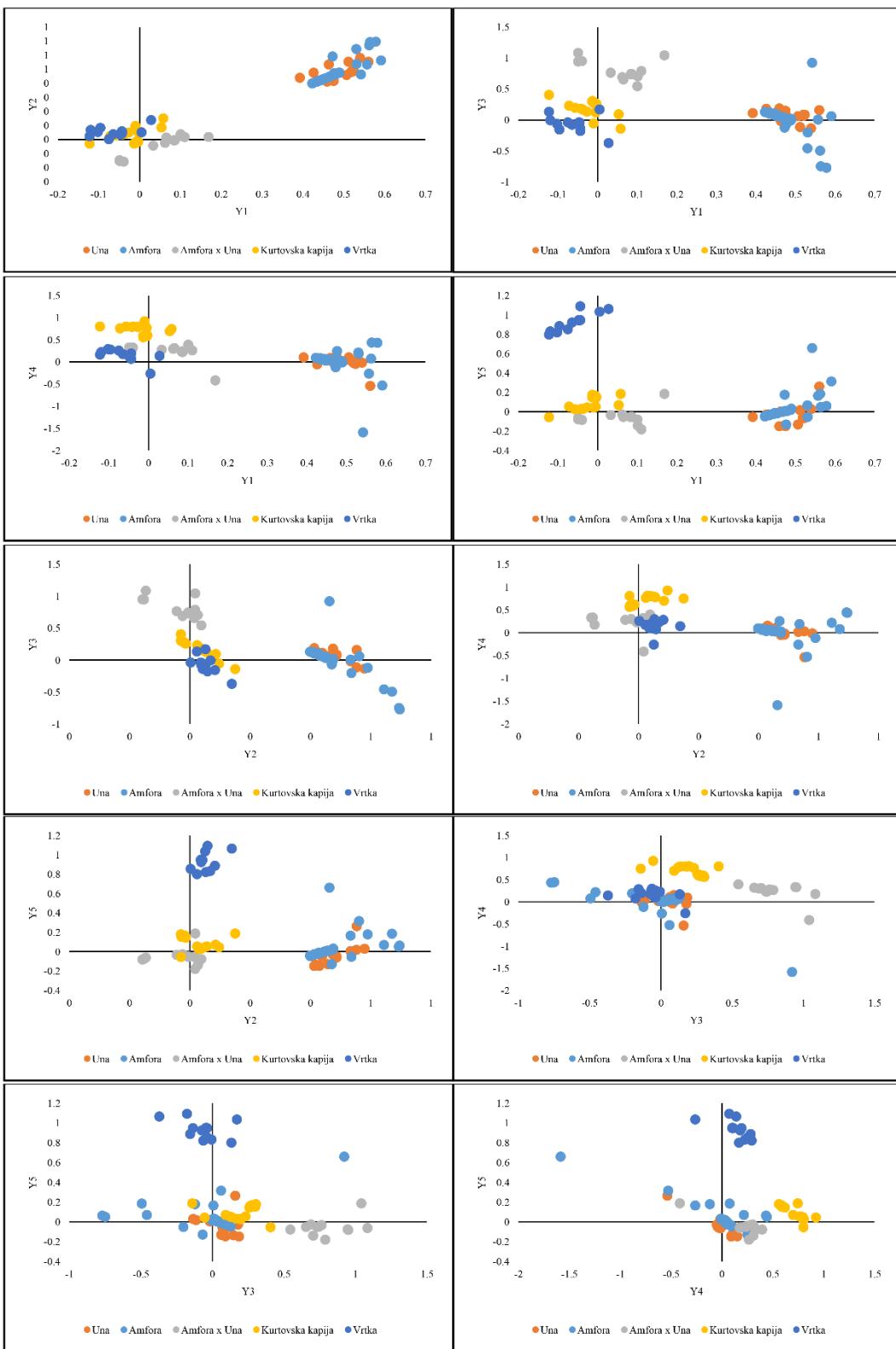
**Slika P11.** PCA-LDA diskriminacioni plotovi (korekcija bazne linije+normalizacija+prvi izvod funkcije): A (trening set) i B (test set) ilustruju diskriminaciju između sorte Una i ostalih sorti/linije (Amfora, Amfora x Una, Kurtovska kapija and Vrtka); C (trening set) i D (test set) ilustruju diskriminaciju između sorte Amfora i preostalih sorti/linije (Amfora x Una, Kurtovska kapija and Vrtka varieties); E (trening set) i F (test set) ilustruju diskriminaciju između linije Amfora x Una i preostalih sorti (Kurtovska kapija i Vrtka); G (trening set) i H (test set) ilustruju diskriminaciju između sorte Kurtovska kapija i Vrtka. Diskriminacioni skorovi ( $f_1$ ,  $f_2$ ,  $f_3$ ,  $f_4$ ,  $f_5$ ,  $f_{45}$  i  $f_{2345}$ ) određuju pripadnost uzorka određenoj klasi.



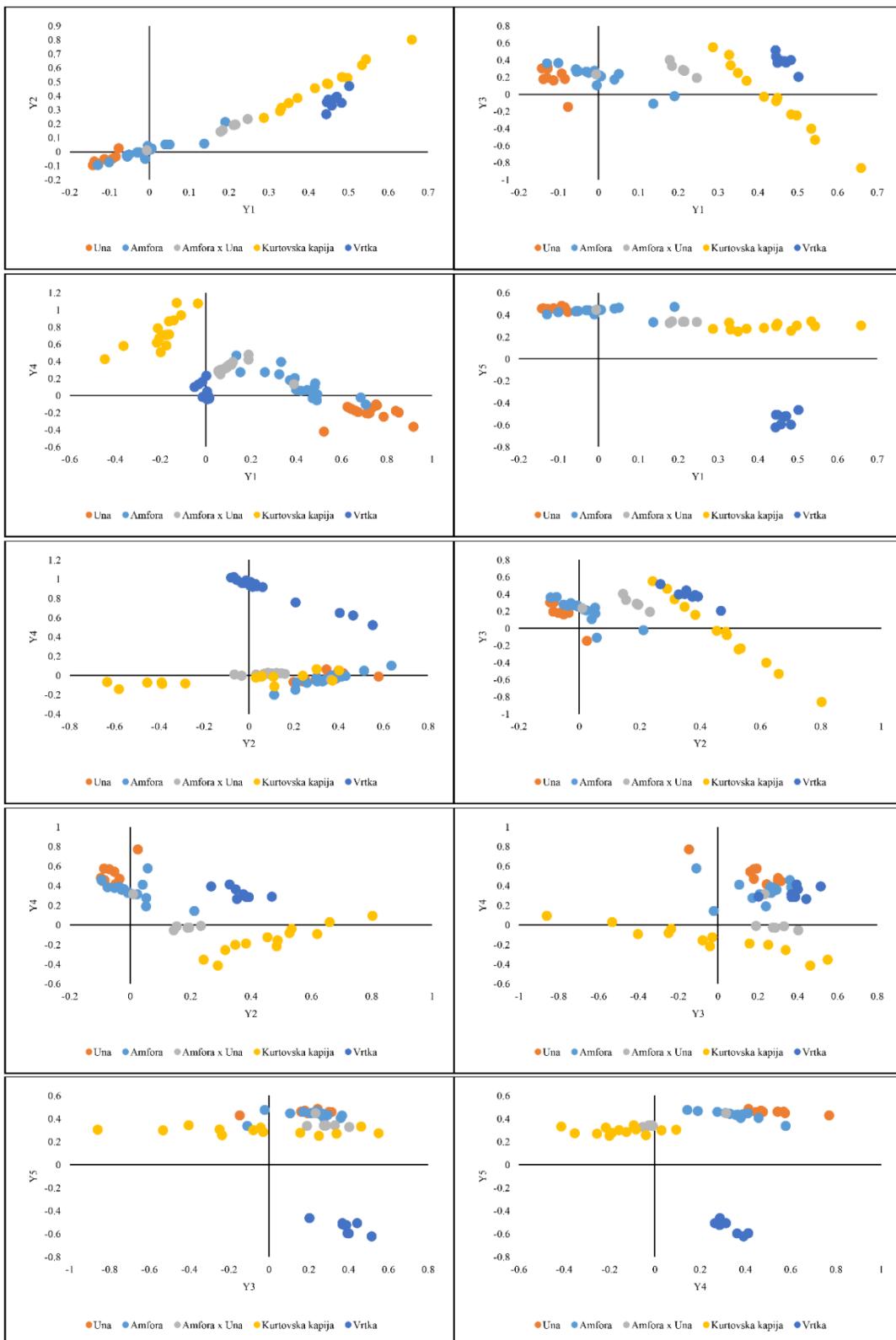
**Slika P12.** PCA-LDA diskriminacioni plotovi (korekcija bazne linije+normalizacija+drugi izvod funkcije): A (trening set) i B (test set) ilustruju diskriminaciju između sorte Una i ostalih sorti/linije (Amfora, Amfora x Una, Kurtovska kapija and Vrtka); C (trening set) i D (test set) ilustruju diskriminaciju između sorte Amfora i preostalih sorti/linije (Amfora x Una, Kurtovska kapija and Vrtka varieties); E (trening set) i F (test set) ilustruju diskriminaciju između linije Amfora x Una i preostalih sorti (Kurtovska kapija i Vrtka); G (trening set) i H (test set) ilustruju diskriminaciju između sorte Kurtovska kapija i Vrtka. Diskriminacioni skorovi ( $f_1$ ,  $f_2$ ,  $f_3$ ,  $f_4$ ,  $f_5$ ,  $f_{345}$  i  $f_{2345}$ ) određuju pripadnost uzorka određenoj klasi.



**Slika P13.** PCA-LDA diskriminacioni plotovi (korekcija bazne linije+normalizacija+treći izvod funkcije): A (trening set) i B (test set) ilustruju diskriminaciju između sorte Una i ostalih sorti/linije (Amfora, Amfora x Una, Kurtovska kapija and Vrtka); C (trening set) i D (test set) ilustruju diskriminaciju između sorte Amfora i preostalih sorti/linije (Amfora x Una, Kurtovska kapija and Vrtka varieties); E (trening set) i F (test set) ilustruju diskriminaciju između linije Amfora x Una i preostalih sorti (Kurtovska kapija i Vrtka); G (trening set) i H (test set) ilustruju diskriminaciju između sorte Kurtovska kapija i Vrtka. Diskriminacioni skorovi ( $f_1$ ,  $f_2$ ,  $f_3$ ,  $f_4$ ,  $f_5$ ,  $f_{45}$  i  $f_{2345}$ ) određuju pripadnost uzorka određenoj klasi.



**Slika P14.** PLS-DA diskriminacioni plotovi trening seta podataka (korekcija bazne linije+normalizacija). Vrednosti Y1, Y2, Y3, Y4 i Y5 predstavljaju predviđeni odgovor.



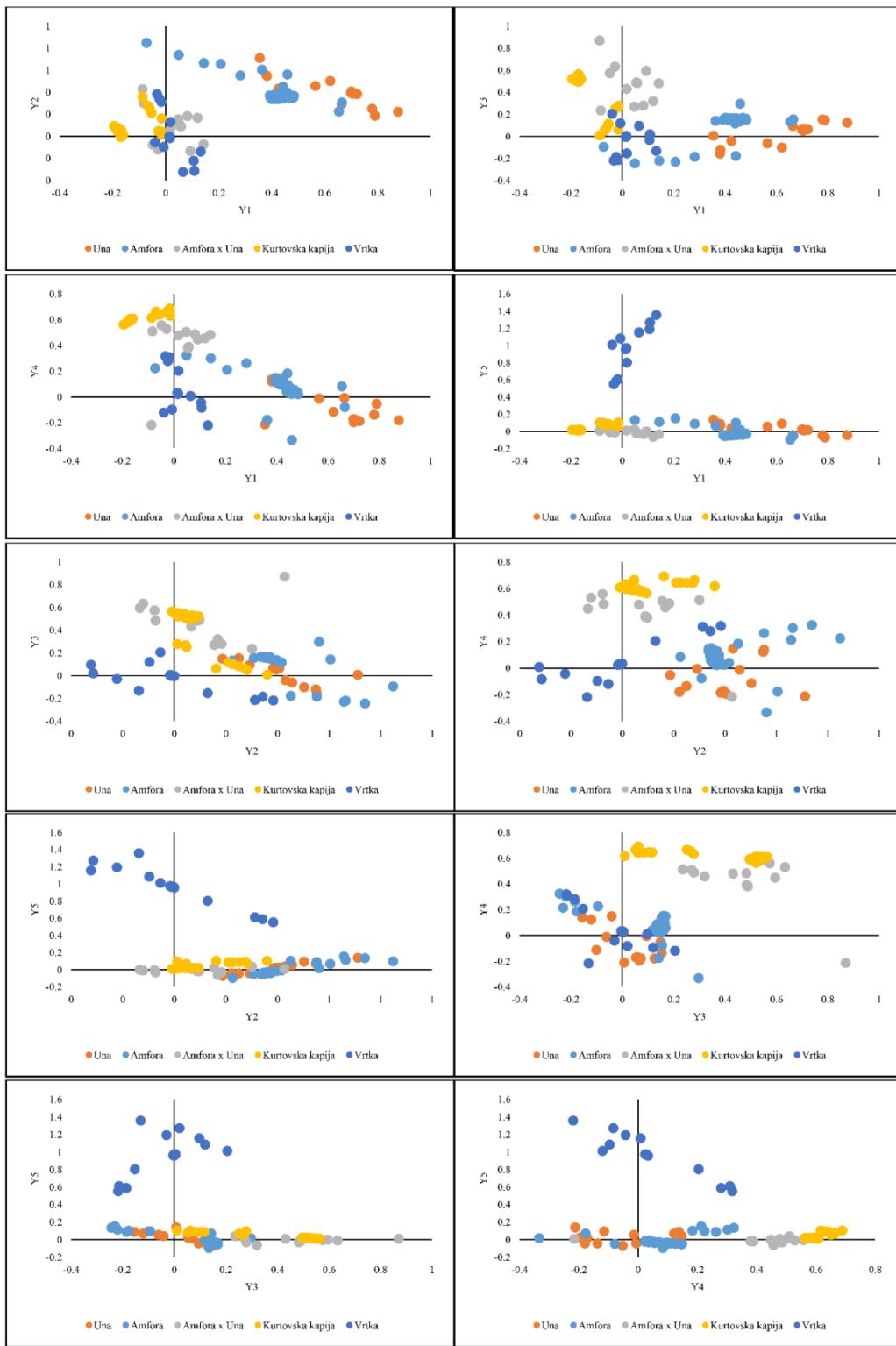
Slika P15. PLS-DA diskriminacioni plotovi test seta podataka (korekcija bazne linije+normalizacija). Vrednosti Y1, Y2, Y3, Y4 i Y5 predstavljaju predviđeni odgovor.



**Slika P16.** PLS-DA diskriminacioni plotovi trening seta podataka (korekcija bazne linije+normalizacija+prvi izvod funkcije). Vrednosti Y1, Y2, Y3, Y4 i Y5 predstavljaju predviđeni odgovor



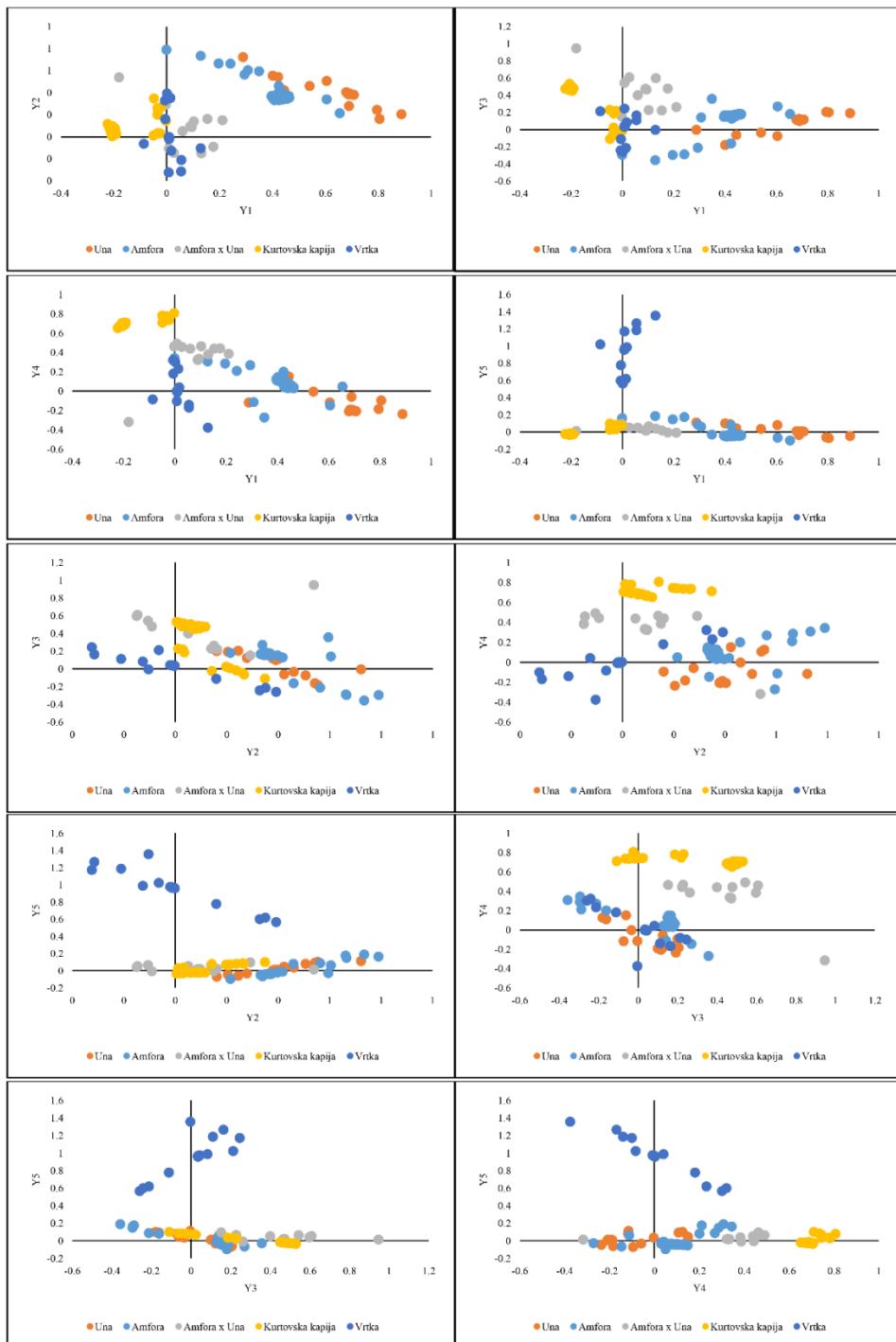
**Slika P17.** PLS-DA diskriminacioni plotovi seta podataka (korekcija bazne linije+normalizacija+prvi izvod funkcije). Vrednosti Y1, Y2, Y3, Y4 i Y5 predstavljaju predviđeni odgovor



**Slika P18.** PLS-DA diskriminacioni plotovi trening seta podataka (korekcija bazne linije+normalizacija+drugi izvod funkcije). Vrednosti Y1, Y2, Y3, Y4 i Y5 predstavljaju predviđeni odgovor



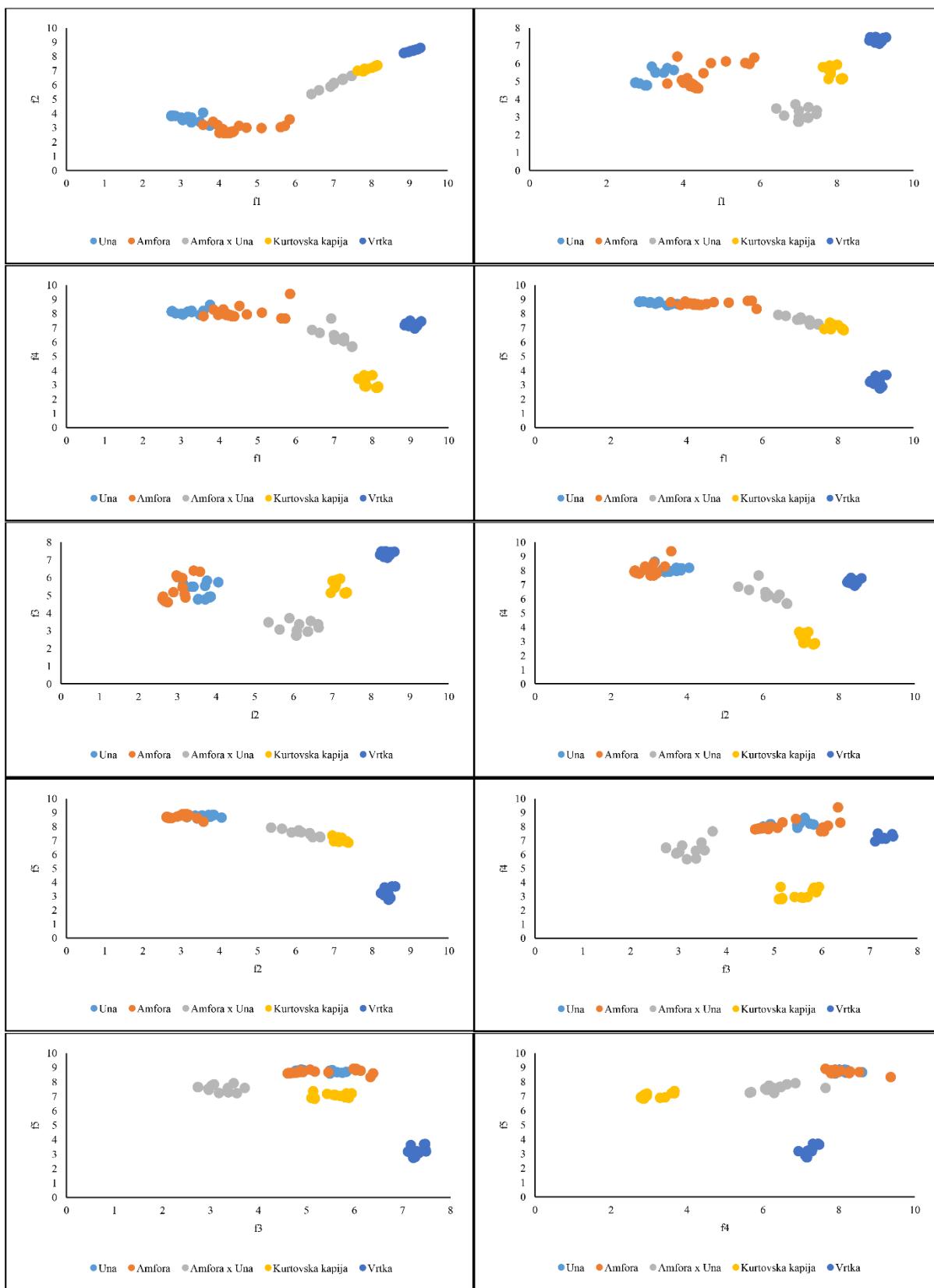
**Slika P19.** PLS-DA diskriminacioni plotovi seta podataka (korekcija bazne linije+normalizacija+drugi izvod funkcije). Vrednosti Y1, Y2, Y3, Y4 i Y5 predstavljaju predviđeni odgovor



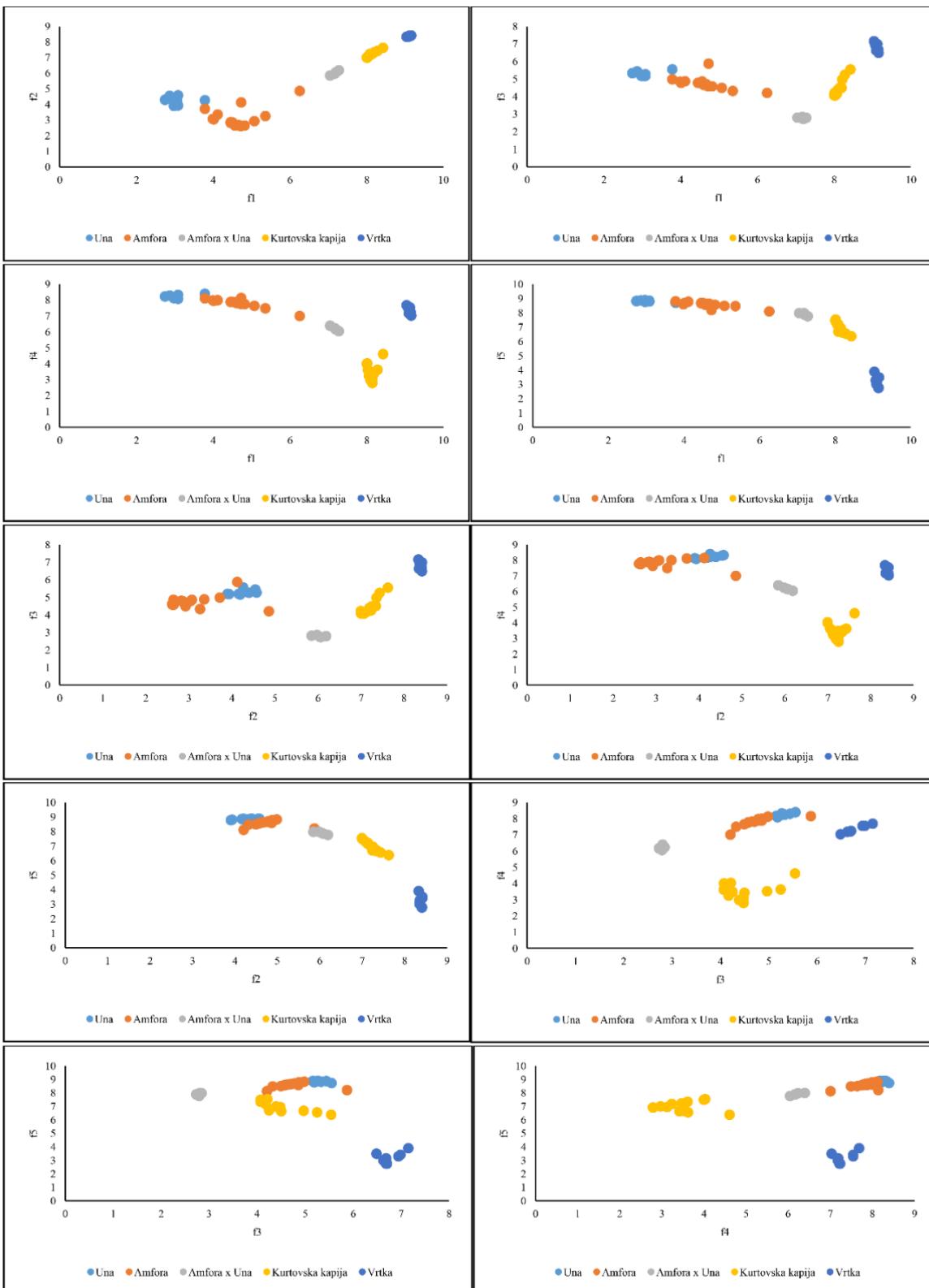
**Slika P20.** PLS-DA diskriminacioni plotovi trening seta podataka (korekcija bazne linije+normalizacija+treći izvod funkcije). Vrednosti Y1, Y2, Y3, Y4 i Y5 predstavljaju predviđeni odgovor



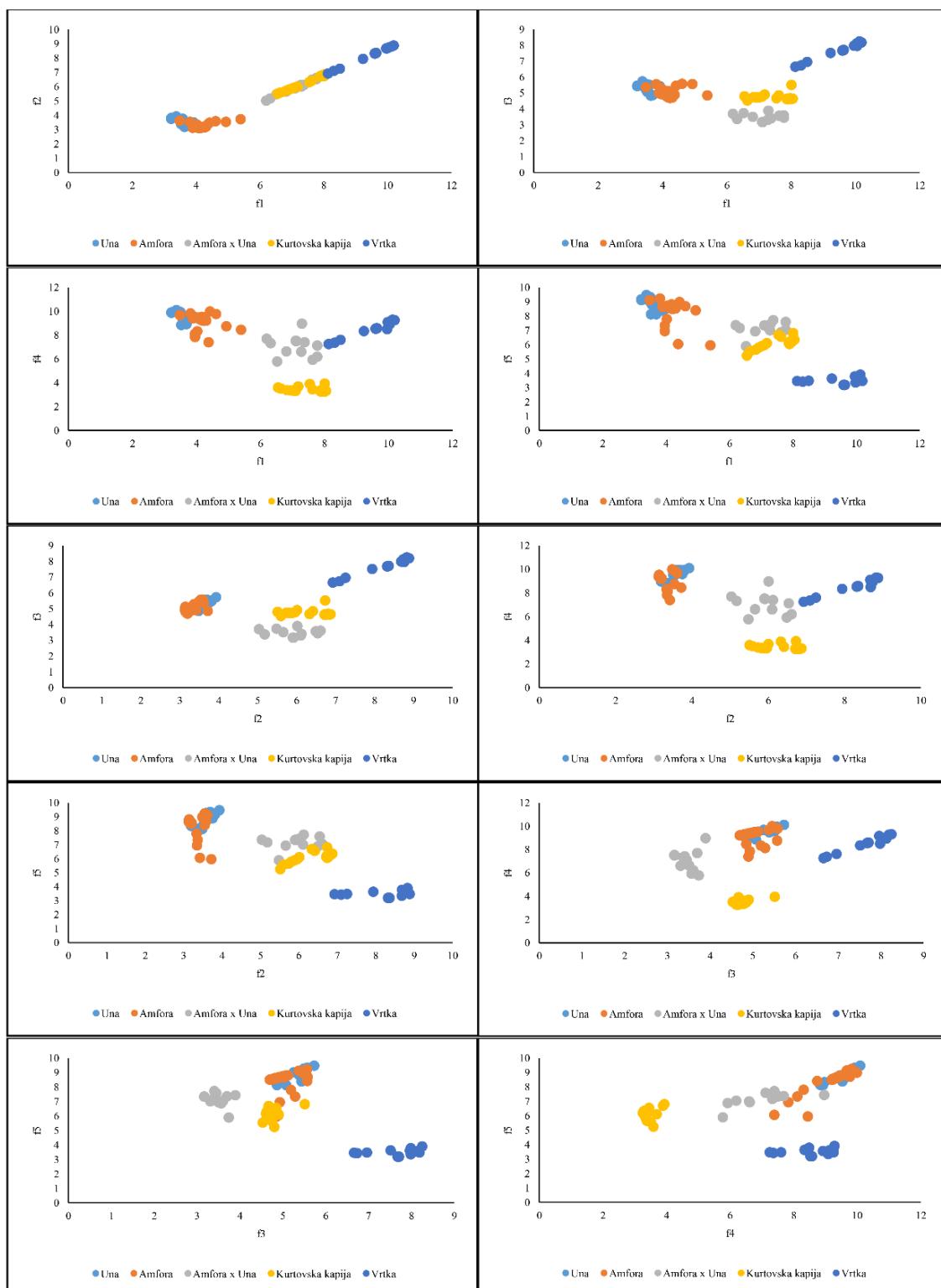
**Slika P21.** PLS-DA diskriminacioni plotovi test seta podataka (korekcija bazne linije+normalizacija+treći izvod funkcije). Vrednosti Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub>, Y<sub>4</sub> i Y<sub>5</sub> predstavljaju predviđeni odgovor



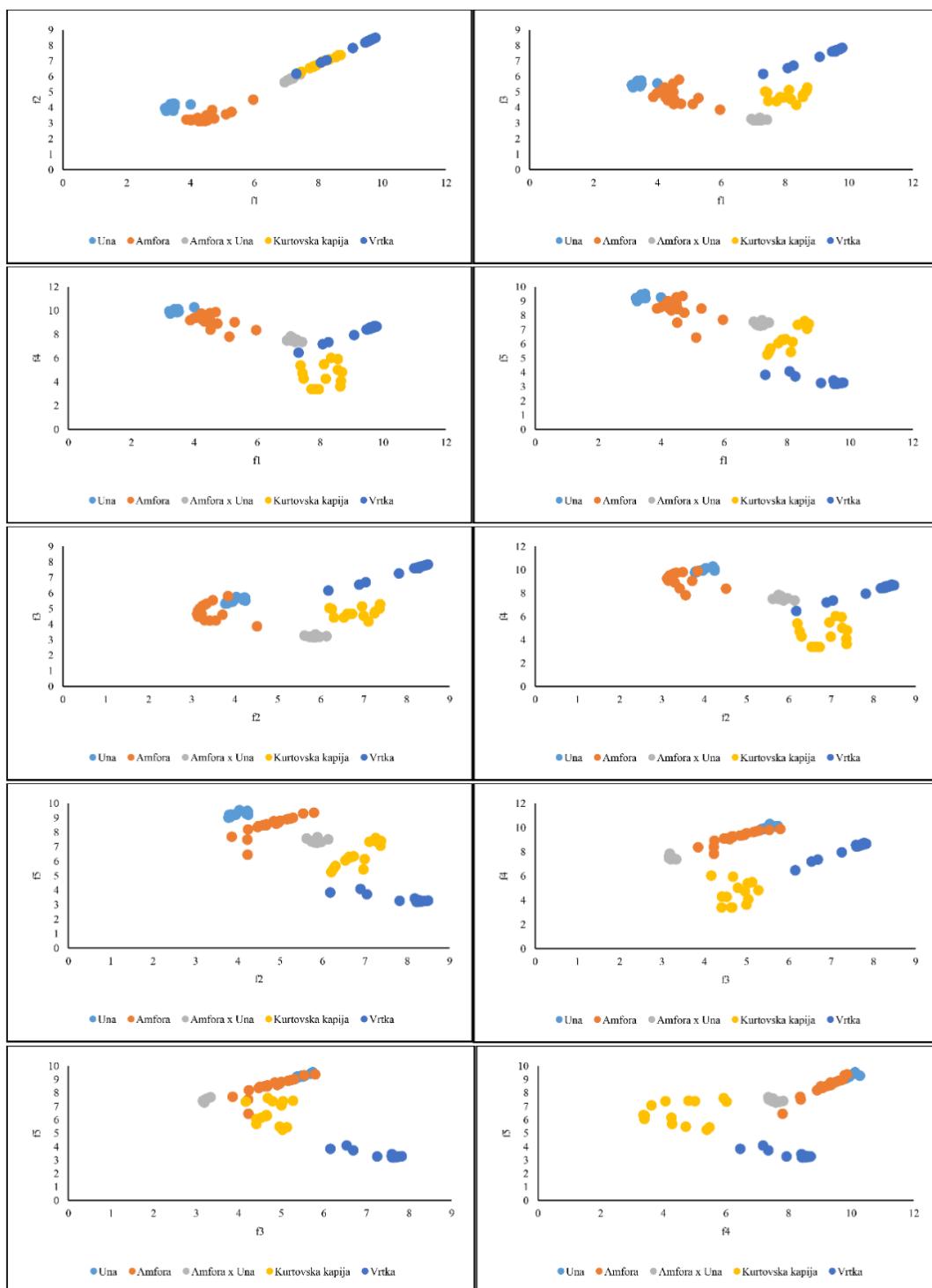
Slika P22. PCA-QDA diskriminacioni plotovi trening seta podataka (korekcija bazne linije+normalizacija).



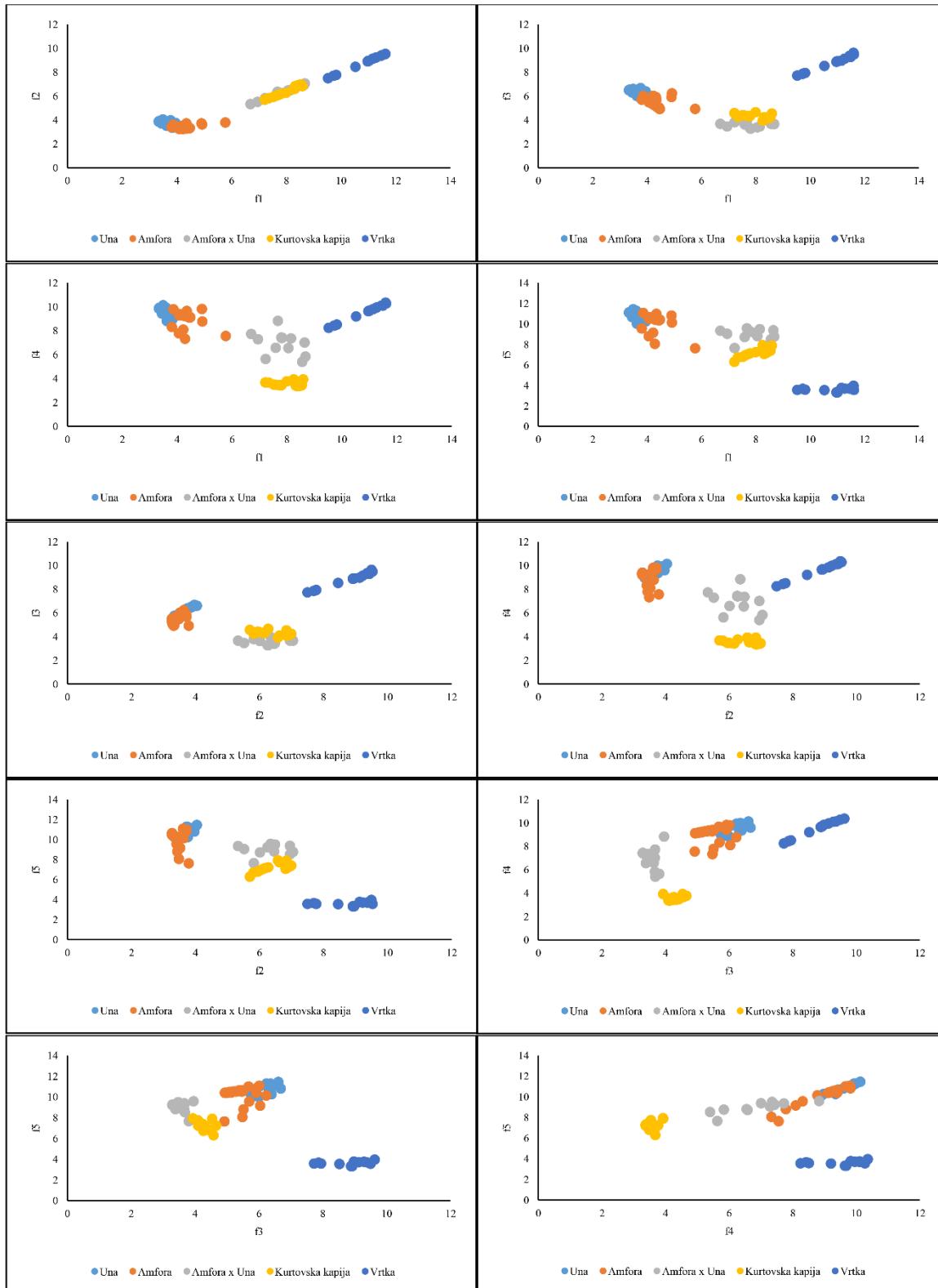
**Slika P23.** PCA-QDA diskriminacioni plotovi seta podataka (korekcija bazne linije+normalizacija).



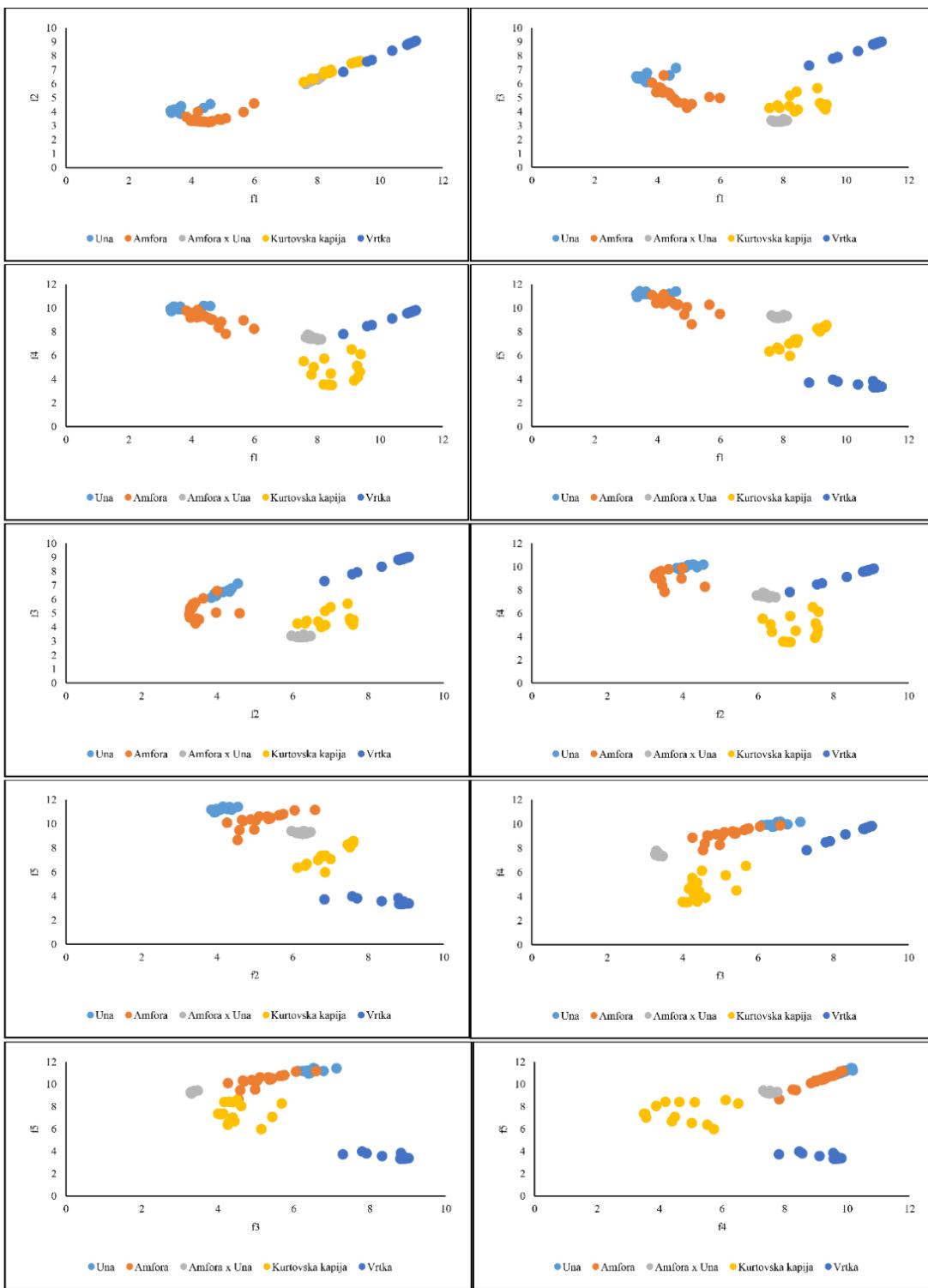
**Slika P24.** PCA-QDA diskriminacioni plotovi trening seta podataka (korekcija bazne linije+normalizacija+prvi izvod funkcije).



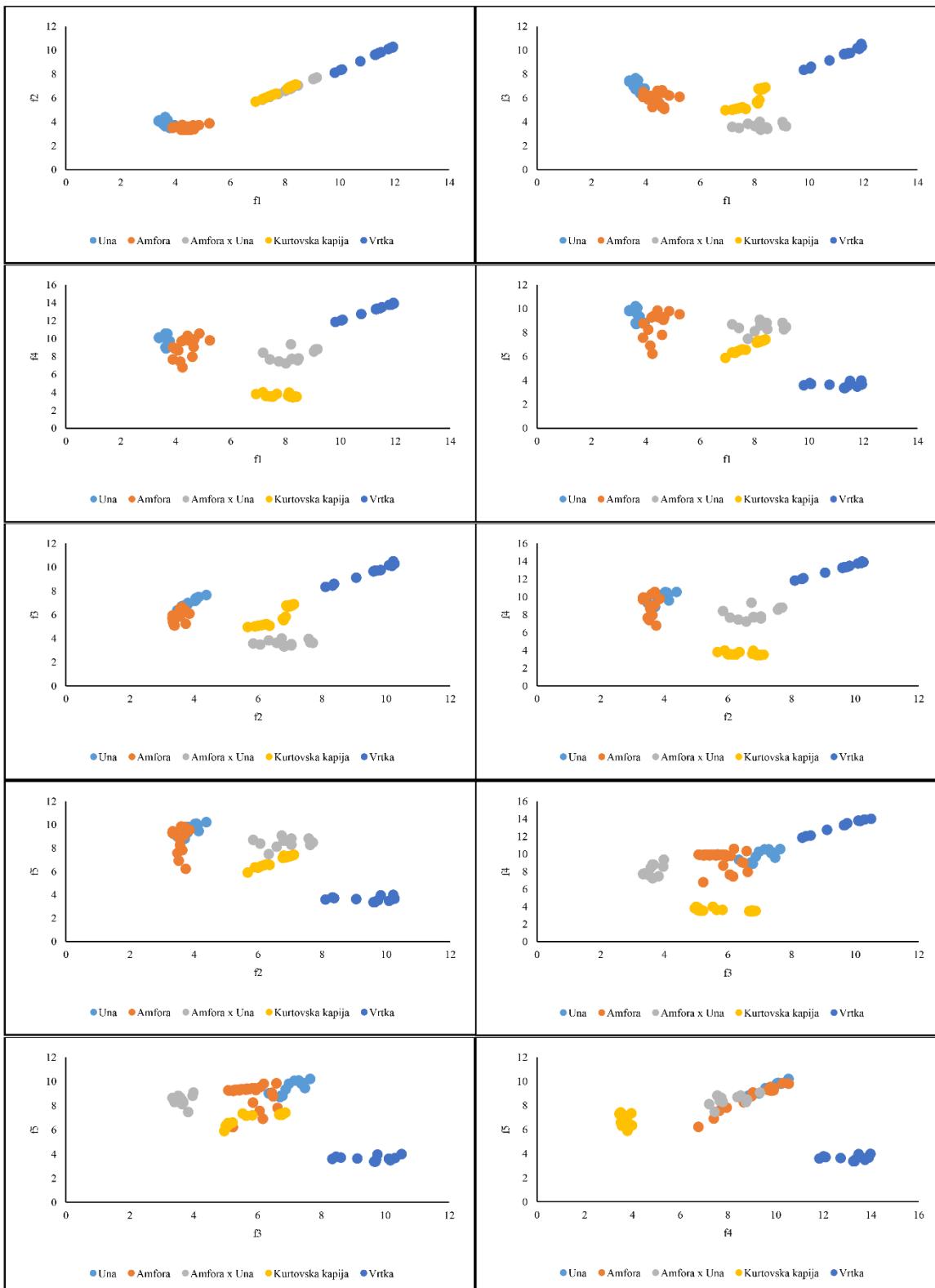
**Slika P25.** PCA-QDA diskriminacioni plotovi seta podataka (korekcija bazne linije+normalizacija+prvi izvod funkcije).



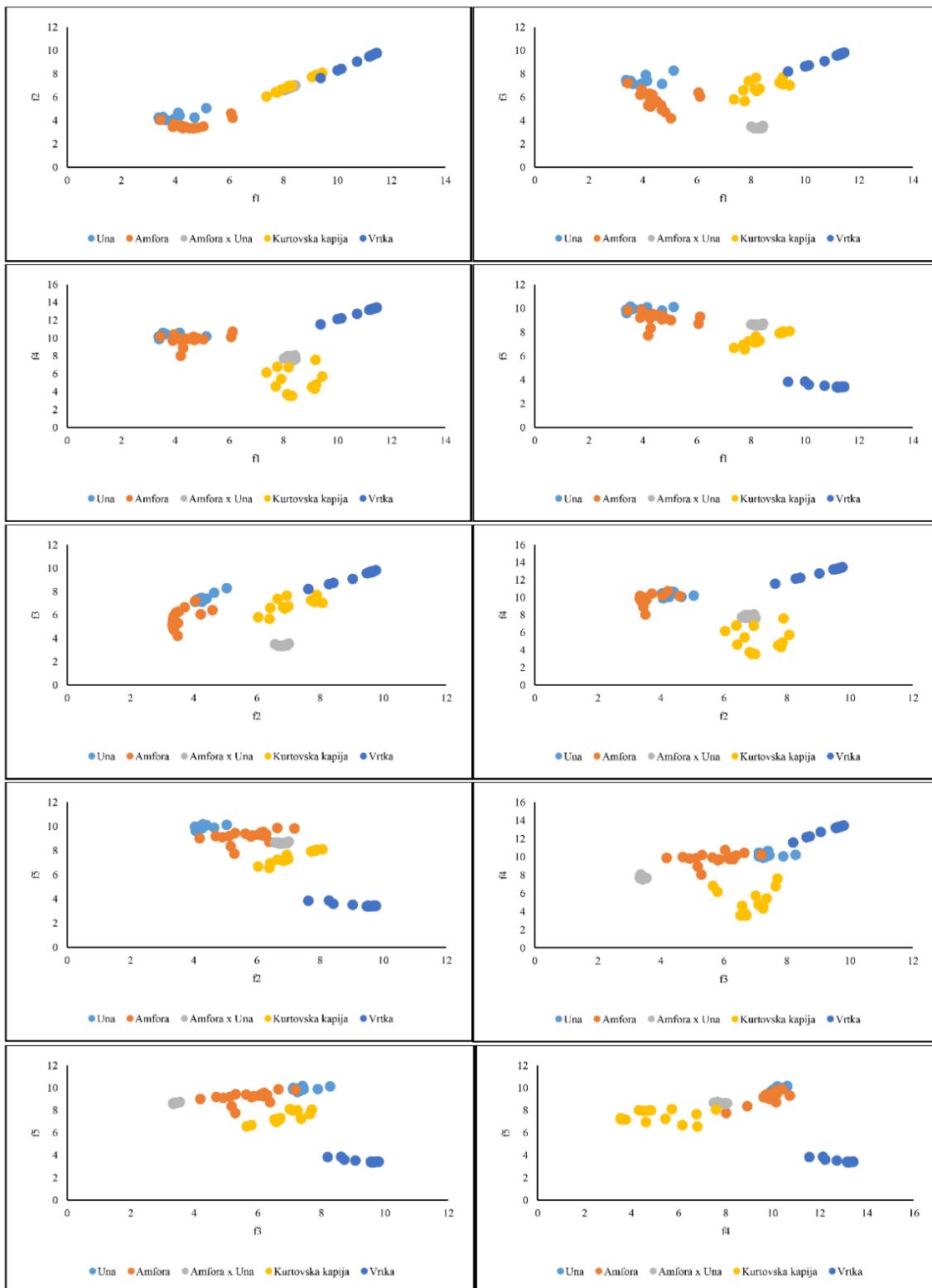
**Slika P26.** PCA-QDA diskriminacioni plotovi trening seta podataka (korekcija bazne linije+normalizacija+drugi izvod funkcije).



**Slika P27.** PCA-QDA diskriminacioni plotovi seta podataka (korekcija bazne linije+normalizacija+drugi izvod funkcije)

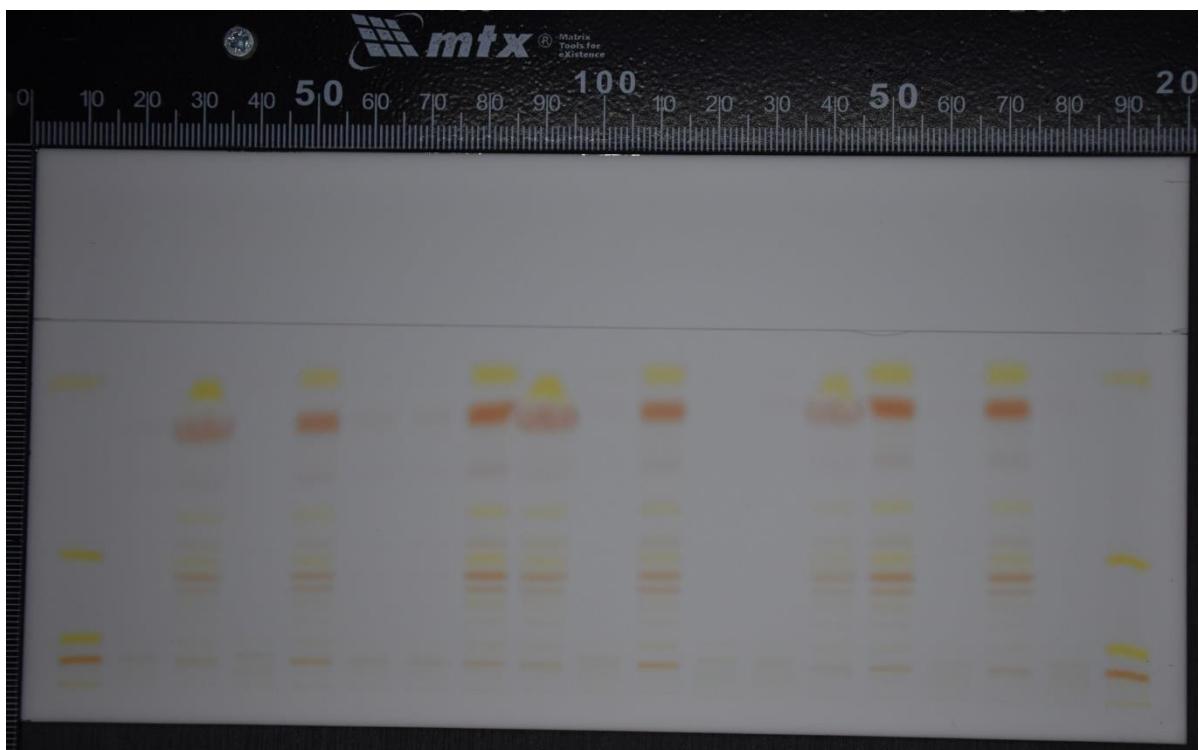


**Slika P28.** PCA-QDA diskriminacioni plotovi trening+ seta podataka (korekcija bazne linije+normalizacija+treći izvod funkcije).

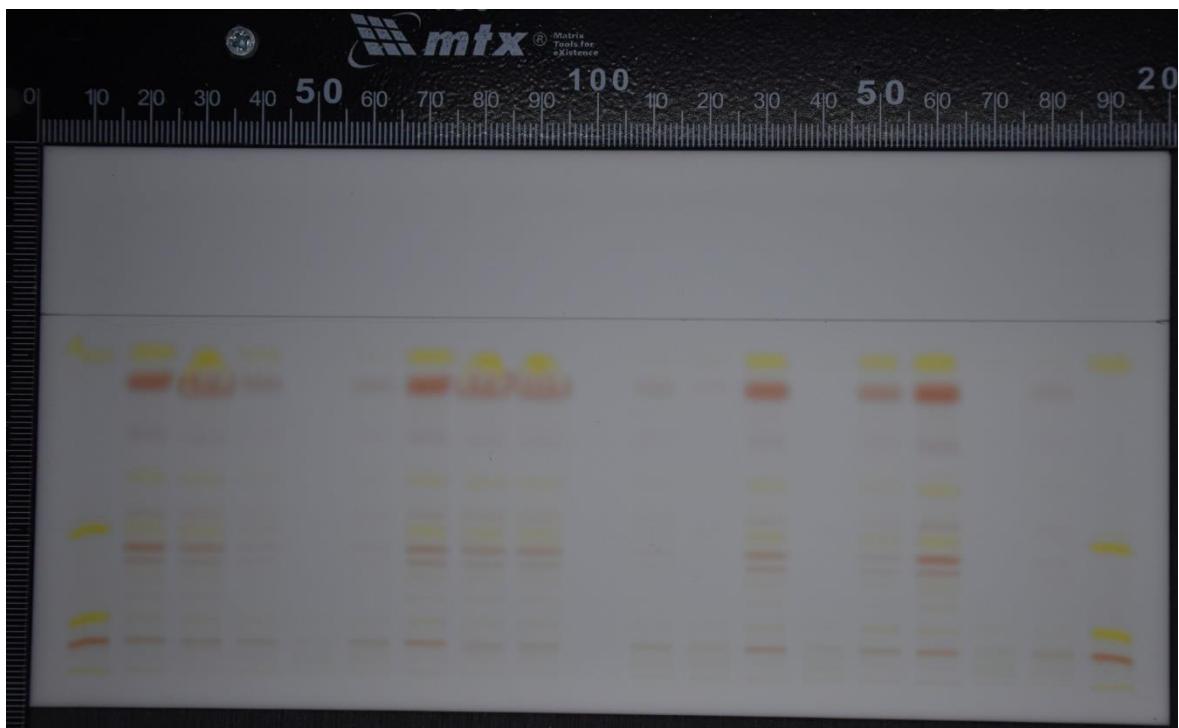


**Slika P29.** PCA-QDA diskriminacioni plotovi seta podataka (korekcija bazne linije+normalizacija+treći izvod funkcije).

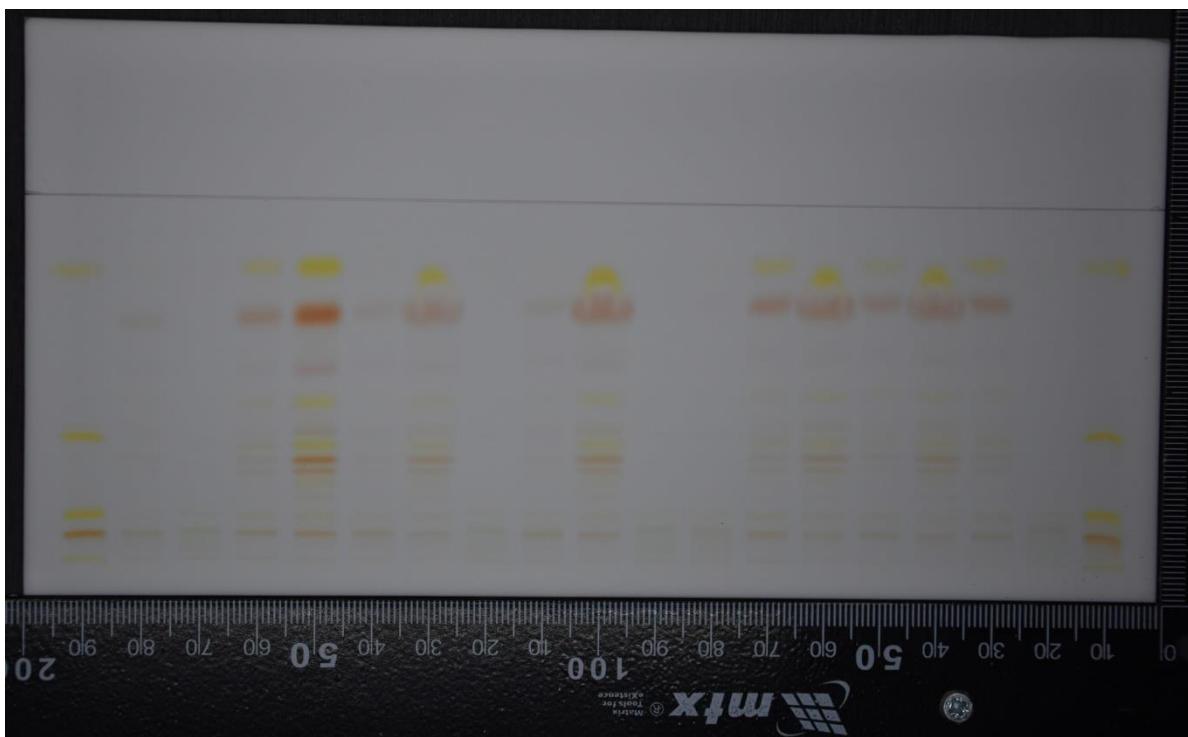
### PRILOG 3



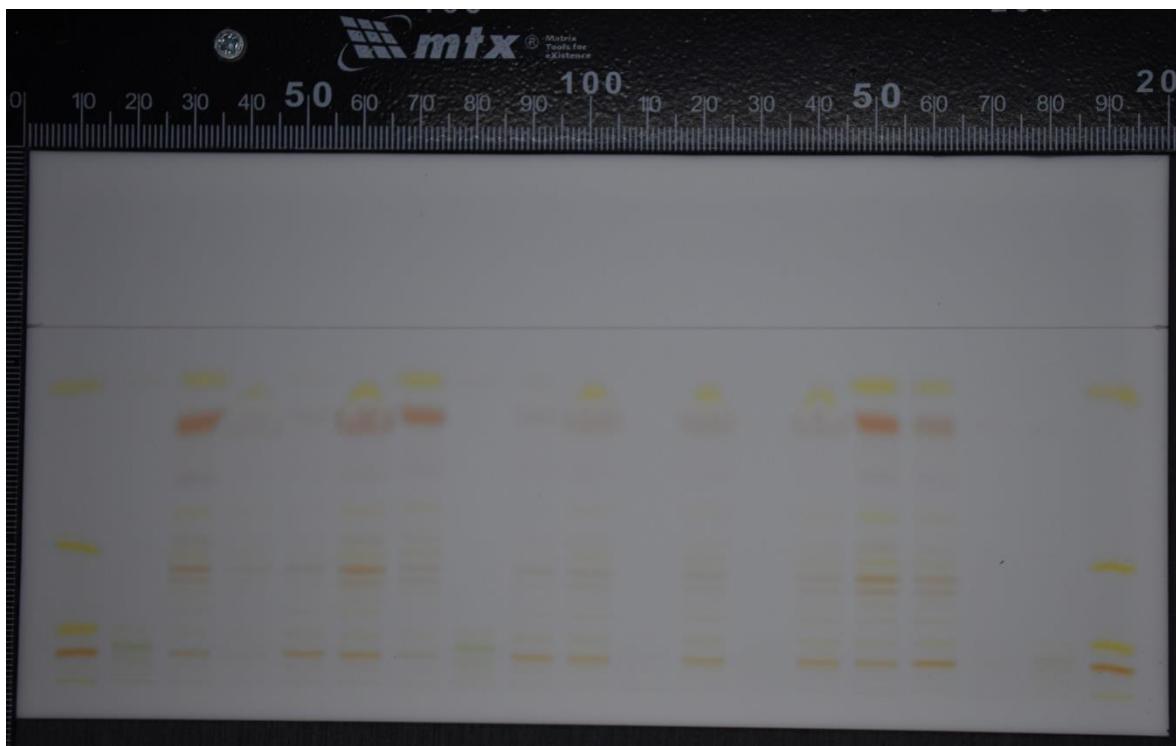
Slika P30. Hromatografske ploče ispitivanih karotenoida



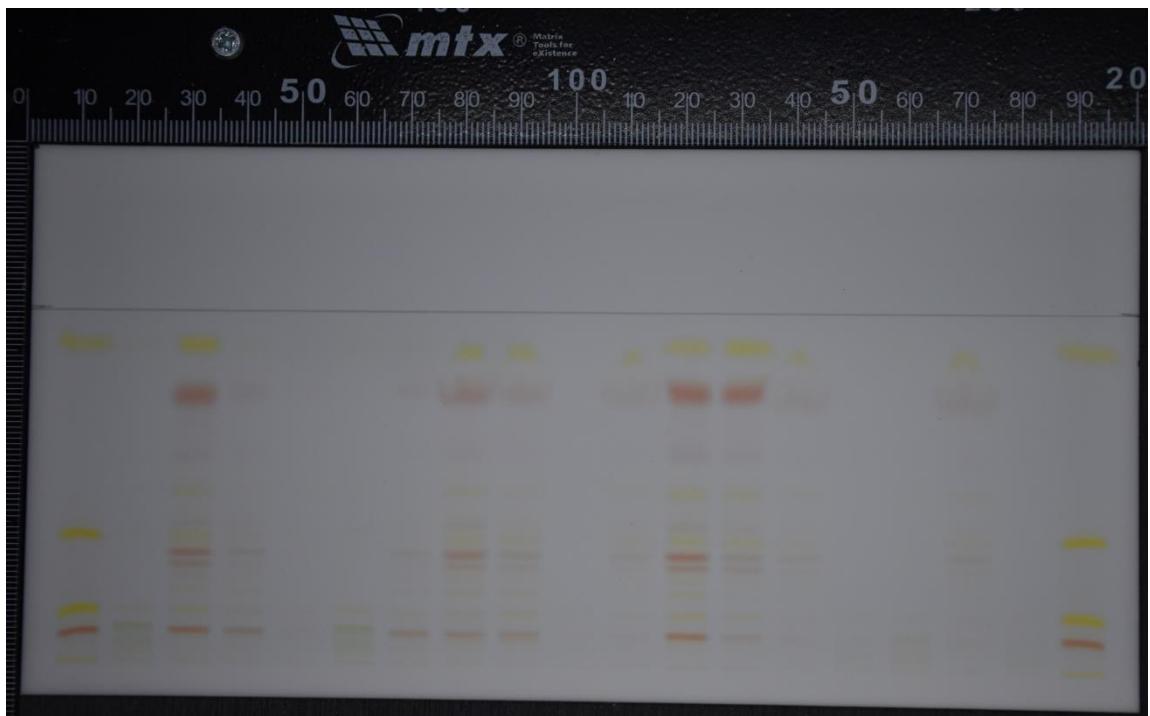
Slika P31. Hromatografske ploče ispitivanih karotenoida



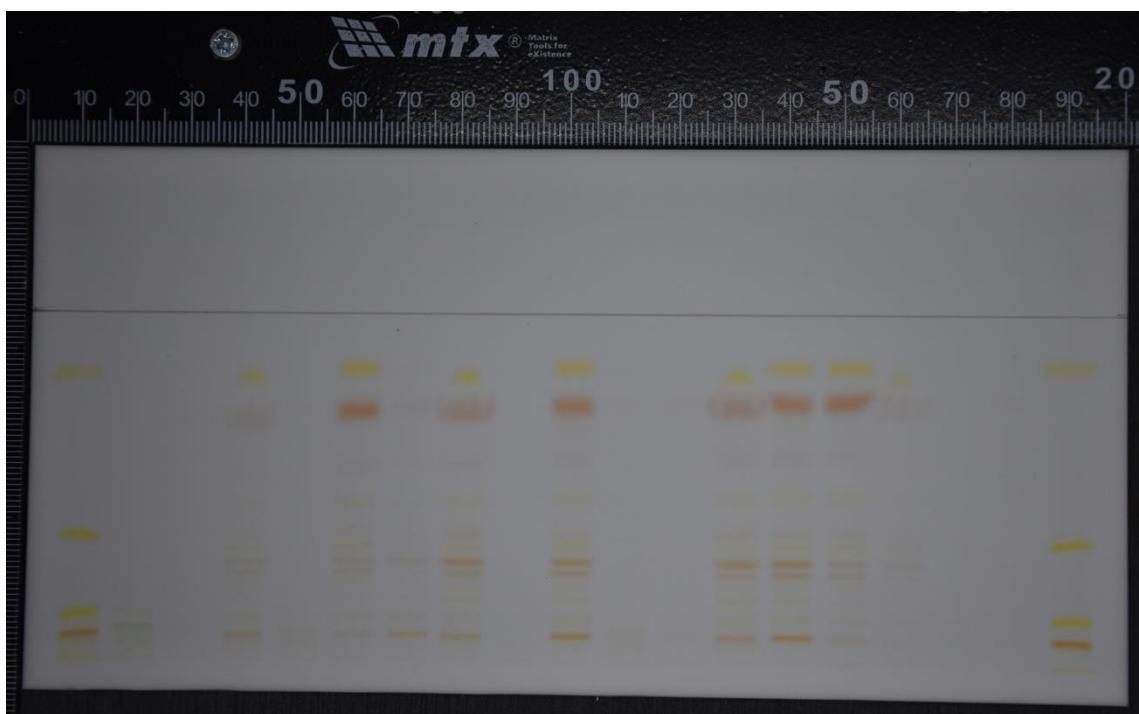
Slika P32. Hromatografske ploče ispitivanih karotenoida



Slika P33. Hromatografske ploče ispitivanih karotenoida



Slika P34. Hromatografske ploče ispitivanih karotenoida



Slika P35. Hromatografske ploče ispitivanih karotenoida

## **9. Biografija autora**

Stefan Kolašinac, mast. inž. poljoprivrede, rođen 26. februara 1990. godine u Beogradu. Osnovnu i srednju školu završio je u Beogradu. Posle završene srednje škole upisuje Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, Odsek za ratarstvo i povrtarstvo na kome je diplomirao 2014. godine sa odličnim uspehom (prosek 9,56). Nagrađen je kao najbolji student Odseka za ratarstvo i povrtarstvo u školskoj 2013/2014. godini. U toku osnovnih studija bio je angažovan kao saradnik-volонter u okviru projekta finansiranog od strane Ministarstva spoljnih poslova Kraljevine Norveške u okviru programa "HERD" – High Education, research and development for Western Balkans fertilizer carrier". Nakon toga upisuje master studije na Odseku za ratarstvo i povrtarstvo i polaže sve predmete predviđene programom sa prosečnom ocenom 10 (deset). Akademski naziv Master inženjer poljoprivrede stekao je 2015. godine odbranivši Master rad pod nazivom: "Uticaj ishrane biljaka cinkom na mineralni sastav ploda i semena paradajza" sa ocenom 10 (deset). Master rad je urađen u okviru osnovnih istraživanja Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja "Mineralni stres i adaptacija biljaka na marginalnim poljoprivrednim zemljиштима" (OI 173028).

Školske 2016/2017. godine Stefan Kolašinac upisuje doktorske studije na Poljoprivrednom fakultetu. Od 2017. do 2021. godine bio je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Tokom doktorskih studija, položio je sve predmete predviđene programom sa prosečnom ocenom 9,90. U toku doktorskih studija, S. Kolašinac je polagao tri predmeta van svog studijskog programa (Instrumentalne metode analiza, Hemijska i biohemijska transformacija proizvoda biljnog porekla i Viši kurs organske hemije) u cilju sticanja znanja neophodnog za razumevanje problematike teme doktorske disertacije. Pored toga, u toku zimskog semestra 2019/20 godine, boravio je, u okviru Erasmus programa razmene studenata, na Hemijskom fakultetu Univerziteta Jagielonija u Krakovu gde je slušao i polagao predmete usko povezane sa spektroskopijom i hemometrijom (Multivariate analysis in chemistry and Spectroscopic methods for characterization and imaging of biomaterials).

Od školske 2016/17 godine, Stefan Kolašinac izvodi vežbe kao demonstrator na predmetima Poljoprivredna botanika i Sistematika cvetnica koji se slušaju na prvoj godini osnovnih akademskih studija na studijskom programu Biljna proizvodnja (modulima Ratarstvo i povrtarstvo, Hortikultura, Voćarstvo i vinogradarstvo) i Fitomedicina (modul Fitomedicina).

Tokom 2017/18. godine Stefan Kolašinac je bio učesnik bilateralne saradnje Srbije sa SR Nemačkom pod nazivom "Application of infrared (IR) and Raman spectroscopy for identification and localization of various bioactive substances in various medical and aromatic plants".

Tokom 2018/19. godine, S. Kolašinac je učestvovao u realizaciji biletaralne saradnje između Republike Srbije i Kine pod nazivom "Biological effects of extracts and molecules isolated from plants from the Balkans"

Od 2017. do 2021. godine, Stefan Kolašinac je učestvovao u realizaciji nacionalnog projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom "Moderno biotehnološki prostup rešavanju problema suše u poljoprivredi Srbije" kao stipendista Ministarstva.

U periodu od juna do jula 2021. godine, Stefan Kolašinac je boravio na stručnom usavršavanju u Portugaliji kao učesnik projekta Horizon2020 (EthnoHERBS-H2020-MSCA-RISE-2018 project).

Od 2020. godine je učesnik projekta R-SPECT (Novel Raman chemometrics-based approach in food quality assessment: carotenoids as model nutrients for application to functional products) finansiranom od strane Fonda za nauku Republike Srbije. U okviru projekta je zadužen za razvijanje klasifikacionih i kvantifikacionih hemometrijskih modela na osnovu rezultata dobijenih Ramanovom spektroskopijom.

Stefan Kolašinac je kao autor ili koautor u saradnji sa kolegama i profesorima do sada objavio 40 publikacija, od čega 16 naučnih radova na SCI listi (M21a, M21, M22 i M23). S. Kolašinac je član Međunarodne asocijacije za lekovito i aromatično bilje zemalja jugoistočne Evrope (Association on medicinal and aromatic plants of the southeast europaeian countries – AMAPSEEC) kao i Međunarodnog društva za karotenoide (International Carotenoid Society). S. Kolašinac poseduje znanje rada u softverima R, Python, Unscrambler, Matlab, Origin koje koristi za statističku (hemometrijsku) obradu podataka. Služi se engleskim jezikom (pričanje, čitanje, pisanje).

## **Izjava o autorstvu**

Ime i prezime autora Stefan M. Kolašinac  
Broj indeksa RA 16/033

### **Izjavljujem**

da je doktorska disertacija pod naslovom: Karotenoidi, njihov antioksidativni kapacitet i biološka aktivnost u odabranim sortama paprike i njihovim tradicionalnim proizvodima

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu-Zemunu,

Potpis autora

---

## **Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije**

Ime i prezime: Stefan M. Kolašinac

Broj indeksa: RA16/033

Studijski program: Poljoprivredne nauke, Ratarstvo i povrtarstvo

Naslov rada: Karotenoidi, njihov antioksidativni kapacitet i biološka aktivnost u odabranim sortama paprike i njihovim tradicionalnim proizvodima

Mentor: dr Zora Dajić-Stevanović

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sa predao radi pohranjivanja u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu. Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktor nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada. Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

## **Izjava o koriščenju**

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Karotenoidi, njihov antioksidativni kapacitet i biološka aktivnost u odabranim sortama paprike i njihovim tradicionalnim proizvodima

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilozima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo-nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo-nekomercijalno-bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo-nekomercijalno-deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo-bez prerade (CC BY-SA)
6. Autorstvo-deliti pod istim uslovima (CC BY-S)

U Beogradu,

Potpis autora

1. Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo–nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo–nekomercijalno–bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo–nekomercijalno–deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo–bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo–deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.