

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET**

Mr Aleksandra N. Tepić, dipl. ing.

DOKTORSKA DISERTACIJA

**KARAKTERISTIKE OLEORIZINA
MLEVENE ZAČINSKE PAPRIKE
DOBIJENOG KLASIČNOM I EKSTRAKCIJOM
SUPERKRITIČNIM UGLJEN-DIOKSIDOM**

Mentor:
Dr Biserka Vujičić, red. prof.

Novi Sad, 2009.

UNIVERZITET U NOVOM SADU

TEHNOLOŠKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije:
TD Monografska dokumentacija

Tip zapisa:
TZ Tekstualni štampani materijal

Vrsta rada:
VR Doktorska disertacija

Autor:
AU Aleksandra N. Tepić

Mentor / ko-mentor:
MN Dr Biserka Vujičić, redovni profesor

Naslov rada:
NR Karakteristike oleorizina mlevene začinske paprike dobijenog klasičnom i ekstrakcijom superkritičnim ugljen-dioksidom

Jezik publikacije:
JP Srpski (latinica)

Jezik izvoda:
JI Srpski / Engleski

Zemlja publikovanja:
ZP Srbija

Uže geografsko područje:
UGP AP Vojvodina

Godina:
GO 2009

Izdavač:
IZ autorski reprint

Mesto i adresa:
MA 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

Fizički opis rada:
FO (br. pogl. / str. /lit. citata / tabela / slika / grafikona / priloga)
6 138 145 40 63 - -

Naučna oblast:
NO Prehrambena tehnologija

Naučna disciplina:
ND Tehnologija proizvoda od voća i povrća

Predmetna odrednica / ključne reči:
PO Mlevena začinska paprika, ekstrakcija, Soxhlet, superkritični ugljen-dioksid, oleorizin, ASTA, sastav masnih kiselina, sadržaj karotenoida, sadržaj tokoferola, antioksidativna svojstva

UDK

Čuva se:

ČU

Važna napomena:

VN

U biblioteci Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

21000 Novi Sad, Srbija, Bulevar Cara Lazara 1

Rad je deo rezultata rada na projektu koji je finansirao Pokrajinski sekretarijat za nauku i tehnološki razvoj pokrajine Vojvodine, pod nazivom "*Karakteristike oleorizina mlevene začinske paprike dobijenog klasičnom i ekstrakcijom superkritičnim ugljen-dioksidom*", br. 114-451-01458 (2006-2008).

Izvod / abstrakt:

IA

Cilj istraživanja u ovom radu bilo je ispitivanje uticaja različitih vidova ekstrakcije (konvencionalna ekstrakcija organskim rastvaračem i superkritična ekstrakcija ugljen-dioksidom) na kvalitet oleorizina začinske paprike u pogledu kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja bojnih materija, sastava masnih kiselina i antioksidativnih svojstava. Pošto u Vojvodini postoje značajni kapaciteti za proizvodnju i preradu začinske paprike, smatramo da će rezultati ovih ispitivanja dati uvid u kinetiku različitih tipova ekstrakcije i pružiti informacije o uslovima potrebnim za dobijanje proizvoda vrhunskog kvaliteta.

Datum prihvatanja teme od strane

NN veća:

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

(Naučni stepen / ime i prezime / zvanje i fakultet)

KO

21.06.2007. godine, na XII sednici Senata Univerziteta u

Novom Sadu

Predsednik:

Dr Vračar Ljubo, vanredni profesor, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Srbija

Član:

Dr Vujičić Biserka, redovni profesor, mentor, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Srbija

Član:

Dr Zoran Zeković, redovni profesor, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Srbija

Član:

Dr Midhat Jašić, vanredni profesor, Tehnološki fakultet Univerzitet u Tuzli, Bosna i Hercegovina

UNIVERSITY OF NOVI SAD

FACULTY OF TECHNOLOGY

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type:
DT Monographic publication

Type of record:
TR Textual material, printed

Contents code:
CC PhD Thesis

Author:
AU Aleksandra N. Tepić

Mentor:
MN Vujičić Biserka, PhD., prof.

Title:
TI Characteristics of ground pepper oleoresin, produced by classic and supercritical fluid extraction with carbon-dioxide

Language of text:
LT Serbian

Language of abstract:
LS Serbian / English

Country of publication:
CP Serbia

Locality of publication:
LP AP Vojvodina

Publication year:
PY 2009

Publisher:
PB Author reprint

Publication place:
PL 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

Physical description:
PD (Chapters / pages / ref. / tables / figures / graphs / app.)
6 138 145 40 63 - -

Scientific field:
SF Food Technology

Scientific discipline:
SD Fruit and vegetable processing technology

Subject / Key words:
SX Ground pepper, extraction, Soxhlet, supercritical carbon-dioxide, oleoresin, ASTA, fatty acid composition, carotenoid content, tocopherol content, antioxidant properties

UC

Holding data:
HD

Library of Faculty of Technology, Novi Sad
21000 Novi Sad, Boulevard Cara Lazara 1

Note:
N

The thesis is the part of the project "Characteristics of ground pepper oleoresin, produced by classic and supercritical fluid extraction with carbon-dioxide", supported by the Provincial Secretariat for Science and Technological Development of Vojvodina, No. 114-451-01458 (2006-2008).

Abstract:
AB

The aim of the work was to investigate the influence of different extraction methods (conventional extraction using organic solvent and supercritical carbon-dioxide extraction) to qualitative and quantitative pigment content, fatty acid content and antioxidant properties of oleoresins. As there have been significant production and processing capacities of spice pepper in Vojvodina, the results of these investigations will give a closer insight into the kinetics of different types of extraction and conditions for obtaining the high quality product.

Accepted by the Scientific Board on:

ASB

Defended on:

DE

Thesis defend board:

(Degree / name / surname / title /
faculty)

DB

President:

Ljubo Vračar, PhD., associate professor, Faculty of
Technology, University of Novi Sad, Serbia

Member:

Biserka Vujičić, PhD., professor, mentor, Faculty of
Technology, University of Novi Sad, Serbia

Member:

Zoran Zeković, PhD, professor, Faculty of Technology,
University of Novi Sad, Serbia

Member:

Midhat Jašić, PhD, associate professor, Faculty of
Technology, University of Tuzla, Bosnia and Herzegovina

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Opšti deo	3
2.1. Poreklo i rasprostranjenost paprike	3
2.1.1. Značaj paprike	5
2.1.2. Hemijski sastav i nutritivna vrednost.....	5
2.2. Tehnološki postupak proizvodnje mlevene začinske paprike	9
2.3. Tehnološki postupak proizvodnje oleorizina.....	16
2.3.1. Klasična ekstrakcija organskim rastvaračem	16
2.3.2. Superkritična ekstrakcija.....	20
2.4. Norme kvaliteta mlevene začinske paprike i oleorizina.....	28
2.5. Bojene materije paprike – karotenoidi.....	30
2.5.1. Strukture i nomenklatura.....	30
2.5.2. Rasprostranjenost u prirodi	38
2.5.3. Uloga i značaj u organizmu životinja	39
2.5.4. Fizičko – hemijske osobine.....	40
2.5.5. Karotenoidi paprike.....	47
2.6. Slobodni radikali i antioksidanti.....	51
2.6.1. Prirodni antioksidanti.....	53
2.7. Analiza kvaliteta mlevene začinske paprike i njenih ekstrakata	58
3. Materijal i metode rada	60
3.1. Uzorci	60
3.1.1. Tehnološki postupak proizvodnje mlevene začinske paprike u fabrici "Aleva" Novi Kneževac	60
3.1.2. Uzorci.....	62

3.2. Srednji prečnik čestica.....	62
3.3. Ekstrakcija mlevene začinske paprike organskim rastvaračem	63
3.4. Ekstrakcija mlevene začinske paprike superkritičnim fluidom.....	63
3.5. Ekstrahovana boja	63
3.6. Sastav masnih kiselina.....	64
3.7. Kvalitativni i kvantitativni sastav karotenoida u oleorizinima mlevene začinske paprike	64
3.8. Sadržaj tokoferola.....	69
3.9. Antioksidativna aktivnost.....	69
3.10. Statistika	70
4. Rezultati i diskusija	71
4.1. Ekstrakcija mlevene začinske paprike organskim rastvaračem	71
4.2. Superkritična ekstrakcija mlevene začinske paprike.....	72
4.3. Modelovanje superkritične ekstrakcije mlevene začinske paprike	75
4.4. Sastav masnih kiselina oleorizina mlevene začinske paprike dobijenog ekstrakcijom organskim rastvaračem	83
4.5. Sastav masnih kiselina oleorizina mlevene začinske paprike dobijenih superkritičnom ekstrakcijom	85
4.6. Sadržaj ekstrahovane boje u oleorizinima mlevene začinske paprike dobijenih ekstrakcijom organskim rastvaračem i superkritičnim ugljen-dioksidom (ASTA vrednost).....	86
4.7. Kvalitativni i kvantitativni sastav karotenoida u oleorizinima mlevene začinske paprike.....	87
4.7.1. Sadržaj karotenoida u oleorizinu dobijenom ekstrakcijom organskim rastvaračem	89
4.7.2. Sadržaj karotenoida oleorizina dobijenih superkritičnom ekstrakcijom.....	92
4.8. Sadržaj karotenoida ostataka nakon superkritične ekstrakcije	102
4.9. odnos sadržaja karotenoida u oleorizinima dobijenim superkritičnom ekstrakcijom i ekstraktima ostataka nakon superkritične ekstrakcije.....	112
4.10. Sadržaj tokoferola u oleorizinima dobijenim ekstrakcijom organskim rastvaračem i superkritičnim ugljen-dioksidom	117
4.11. Antioksidativna aktivnost oleorizina mlevene začinske paprike	118
4.11.1. ESR spektralna analiza uticaja ekstrakata paprike na peroksidaciju suncokretovog ulja indukovanu liposolubilnim azo-inicijatorom ACVA	120
5. Zaključak	126
6. Literatura	129

1. UVOD

Proizvodnja i prerada začinske paprike (*Capsicum annum* L.) je veoma rasprostranjena i važna privredna grana. Imperativ u proizvodnji začinske paprike je dobijanje proizvoda određenog geografskog porekla visokog kvaliteta, sa postojanim i visokim sadržajem bojenih materija, dobre održivosti. Paprika se može koristiti u tehnološkoj ili fiziološkoj zrelosti, u svežem ili prerađenom stanju, dok se začinska paprika koristi za proizvodnju mlevene začinske paprike i oleorizina.

Pored upotrebe u svežem (sirovom) stanju, veliki broj (preko 1000) farmaceutskih, kozmetičkih i prehrambenih (mlevena začinska paprika, marinirana i biofermentisana paprika, nacionalni specijaliteti (ajvar, đuveč), gotova jela, proizvodi od mesa – kobasice, "salad dressings", mlečni proizvodi – sirevi, konditorski, pekarski i snek proizvodi, testenine, umaci) proizvoda sadrže neke od konstituenata paprike.

Začini (naročito sušeni), kao komponente koje se dodaju prehrambenim proizvodima, veoma su često mikrobiološki kontaminirani. Stoga, prehrambena industrija godinama primenjuje i ekstrakte začina. Oleorizini su tečni ekstrakti začina koji sadrže esencijalna ulja i druge neisparljive komponente. Prednosti oleorizina su doslednost arome, sterilnost, stabilnost pri skladištenju, smanjeni prostor za skladištenje i ekonomičnost.

U tradicionalnim preradama sušena i mlevena paprika se ekstrahuje organskim rastvaračima sa niskom tačkom ključanja. Rastvarač se nakon ekstrakcije mora pažljivo ukloniti pod vakuumom. Ovi postupci imaju nekoliko nedostataka. Većina organskih rastvarača je toksična i propisi ograničavaju njihove rezidue u oleorizinima na vrlo male koncentracije. Tokom uklanjanja ostataka rastvarača pod vakuumom, termolabilna jedinjenja se mogu razgraditi ili izgubiti (deo aroma). Ekstrakcijom superkričnim fluidima proces se odvija na nižim temperaturama pri čemu se izbegava razgradnja termosenzibilnih aromatskih i bojenih komponenata. Ugljen-dioksid je idealan rastvarač za ekstrakciju prirodnih proizvoda pošto je netoksičan, neeksplozivan, lako dostupan i lako se uklanja iz ekstrahovanog proizvoda.

Cilj istraživanja u ovom radu bilo je ispitivanje uticaja različitih vidova ekstrakcije (konvencionalna ekstrakcija organskim rastvaračem i superkritična ekstrakcija ugljen-dioksidom) na kvalitet oleorizina začinske paprike u pogledu kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja bojenih materija, sastava masnih kiselina, sadržaja α -tokoferola i antioksidativnih svojstava. Pošto u Vojvodini postoje značajni kapaciteti za proizvodnju i preradu začinske paprike, rezultati ovih ispitivanja će dati uvid u kinetiku različitih tipova ekstrakcije i pružiti informacije o optimalnim uslovima potrebnim za dobijanje proizvoda vrhunskog kvaliteta (boja kao osnovna kvalitativna karakteristika).

Ovaj rad je deo rezultata rada na projektu koji je finansirao Pokrajinski sekretarijat za nauku i tehnološki razvoj pokrajine Vojvodine, pod nazivom "*Karakteristike oleorizina mlevene začinske paprike dobijenog klasičnom i ekstrakcijom superkritičnim ugljen-dioksidom*", br. 114-451-01458 (2006-2008).

2. OPŠTI DEO

2.1. POREKLO I RASPROSTRANJENOST PAPRIKE

Paprika vodi poreklo iz Južne Amerike i pripada rodu *Capsicum*, familija *Solanaceae*. U literaturi se mogu naći različite nomenklature, koje mogu dovesti do zabune: chilli, chile, hot pepper, bell pepper, red pepper, pod pepper, cayene pepper, paprika, pimento, pimienta, capsicum. Termin "chilli/chillies" odnosi se na sitnoplodne, ljute sorte, "capsicum" na krupnije, umereno ljute sorte, a termin "paprika" na mlevenu papriku koja se koristi kao začin.

U većini jezika reč paprika vodi poreklo od grčkih i latinskih reči peper-piper, koje znače crni biber (black pepper). Indijanski nazivi za papriku *agi*, *aji* (adži) i *chilli* nisu prihvaćeni u Evropi. Botaničko ime paprike, *Capsicum*, vodi poreklo od grčkih reči kapsa, kaptein (ljutina, gutati) i kapsakes (mahuna).

Nazivi (termini) za papriku na nekim jezicima su:

Nemački	Spanischer Pfeffer, Paprika
Italijanski	Peperone, paprica
Španski	Páprika, pimiento dulce, pimiento morrón, pimentón
Portugalski	Pimento, pimentão doce
Francuski	Piment, poivre
Engleski	Pepper, paprika, bell pepper, pod pepper, sweet pepper
Holandski	Peper, paprika
Norveški	Pepper
Švedski	Spansk pepper, paprika

Ruski	Perec
Mađarski	Paprika, édes paprika, piros paprika, fűszerpaprika
Poljski	Papryka, pieprz
Bugarski	Piper
Rumunski	Piparca, ardei
Finski	Pippuri
Estonski	Pipar
Litvanski	Pipari
Turski	Biber
Jermenski	Bibar
Arapski	Felfel

Srpski naziv paprika potiče od grčko-latinske reči piper, kojoj je dodat nastavak "ka" i dobijen prvi naziv piperka, odnosno paprika (Marković i Vračar, 1998).

Smatra se da je Južna Amerika postojbina paprike. Indijanci Meksika i Perua uzgajali su papriku pre dolaska belog čoveka. Izvorna postojbina paprike su Meksiko i Gvatemala. Odatle se uzgajanje širilo na sever i jug (Kolumbija, Venecuela, Ekvador, Brazil, Peru, Bolivija, Paragvaj, Čile, Argentina i Urugvaj). Nakon pronalaska Amerike prenosi se u Evropu i Aziju, a odatle širom sveta.

Pre više od 3000-4000 godina paprika se nalazila među kultivisanim usevima u Peruu, koji je imao naprednu poljoprivredu, za šta postoje i materijalni dokazi. Grnčarija pronađena u grobovima često je ukrašavana prikazima paprike. Vezene šare na indijanskoj odeći staroj oko 2000 godina takođe su imale motive paprike.

Neki zapisi iz vremena pre otkrića Amerike koji su bili povezivani sa paprikom odnose se na biljke ljutog ukusa pod imenom "peper" i "apromekes", i nisu mogle biti identične paprici, ali su verovatno pripadale rodu *Piper*. Dioskor (Dioskorides, I vek n.e.), koji je kao lekar pratio vojsku tokom vladavine Nerona, u svojoj knjizi "Materia" na grubom duborezu predstavlja papriku pod imenom "Piper indicum".

Plinije (23.-79. g.n.e.) takođe spominje Piperites i Siliquastrum i preporučuje ih za poboljšanje varenja. Verovalo se da su ove dve biljke bile identične paprici, ali bez dokaza.

Prva informacija o biljci poznatoj kao paprika u Evropi danas se vezuje uz ime d'Anghiera, koji je 1493. godine naveo da je Kolumbo sa putovanja doneo biljku (pepper) koja je bila ljuća od do tada poznate biljke. Godinu dana kasnije, Diego Chanca, brodski lekar u drugoj Kolumbovoj ekspediciji u svojim pismima španskim plemićima opisuje novi začim.

Kaluđer Bernabé Cobo, koji je otputovao u Peru devedesetih godina XVI veka i živeo nekoliko decenija među Indijancima na prostoru današnjeg Perua i Meksika, dao je opis gajenja paprike. U knjizi "Istorija Novog sveta" (oko 1642.), u kojoj je opisao svoja iskustva, pominje između ostalog da se u Peruu gajilo 40 vrsta paprike, uglavnom za začinjavanje jela. Svi varijeteti su bili ljuti (lokalni termin je bio "aji") (Somos, 1984).

U Evropi se paprika pojavila u ranom XVI veku. Pojava se vezuje za mornara D'Aveiro-a. Potrošnja paprike se brzo širila, prvo u Portugalu, mada je njena pojava izazvala uzbunu među trgovcima na tržištu crnog bibera i drugih začina, usled velikih gubitaka izazvanih brzim širenjem jeftine paprike. Zbog toga je naređeno radikalno istrebljivanje paprike. Po svemu sudeći, ovo je doprinelo još većem širenju kulture paprike u Evropi sredinom XVI veka.

Prvi detaljniji opisi paprike mogu se naći u radovima Gonzalo Fernandez de Oviedo-a ("Sumario de la natural y general historia de las Indias", 1526). U knjizi Joseph de Acosta-e ("Historia natural y moral de las Indias", 1590) mogu se naći detaljni opisi uzgajanja paprike u Južnoj Americi. On daje i izveštaje o svom iskustvu gajenja paprike u saksijama. O uticaju paprike na zdravlje, kaže da ona ima isti efekat kao i pravi biber.

U Evropi, paprika je prvobitno gajena u saksijama u staklenim baštama, kao kućna dekorativna biljka. U Nemačkoj je bila poznata još 1542. Neki nemački naučnici su smatrali da paprika izaziva oboljenja bubrega i jetre, što je umanjilo rasprostiranje. Međutim, u XVII veku paprika se upotrebljavala ne samo za začinjavanje supa i mesa, već se pojavila i u salatama. Upotreba paprike u sirovom stanju proširila se na Španiju, Italiju i na Balkansko poluostrvo.

U našu zemlju paprika je prenet iz Turske, za vreme turske okupacije u XVII veku i danas se najviše gaji u ravničarskim predelima Srbije. U naše severne krajeve moguće je da je prenet iz Mađarske. U svetu, paprika se danas najviše gaji u Aziji, Evropi i Americi, uglavnom u zoni umerenog pojasa, nešto u tropskim predelima, a u Evropi je to kultura južnih delova (Marković i Vračar, 1998).

Prema podacima FAO-a iz 1995., u svetu se paprika gaji na oko 1.207.000 ha, sa prosečnim prinom od 9,5 t/ha.

2.1.1. Značaj paprike

Paprika se može koristiti u tehnološkoj ili fiziološkoj zrelosti, u svežem ili prerađenom stanju, dok se začinska paprika koristi za proizvodnju mlevene začinske paprike i oleorizina. Veliki je broj prehrambenih proizvoda koji sadrže papriku ili njene pojedine sastojke: mlevena začinska paprika, marinirana i biofermentisana paprika, nacionalni specijaliteti (ajvar, đuveč), gotova jela, proizvodi od mesa – kobasice, "salad dressings", mlečni proizvodi – sirevi, konditorski, pekarski i sneg proizvodi, testenine, umaci. Uljni ekstrakti paprike (poznati kao oleorizin *Capsicum*) velike ljutine i slabije boje koriste se i u farmaceutskoj industriji u proizvodnji balsama za ublažavanje bolova. Bez obzira na mali dnevni unos, proizvodi od paprike smatraju se važnom zdravom hranom ili dodacima ishrani, zbog visokog sadržaja bioaktivnih komponenata, kao što su karotenoidi i antioksidativni vitamini.

2.1.2. Hemijski sastav i nutritivna vrednost

Nutritivna vrednost definisana je hemijskim sastavom sirovine.

Ugljeni hidrati

Šećeri – Sadržaj šećera u paprici zavisi od više faktora: uslova uzgoja, kao i sortnih karakteristika. Većinu šećera u paprici čini glukoza (90-98%). Ostatak čini saharoza. U ranoj

fazi razvoja sadržaj šećera je skoro 20% (na suhu materiju), da bi kasnije, u fazi zrelosti, dostigao maksimum od 40% (Marković i Vračar, 1998), posle čega se njihov sadržaj smanjuje (Somogyi i sar., 2003).

Polisaharidi – U paprici su najzastupljeniji celuloza, hemiceluloza i pektini.

Sirova vlakna – Sadržaj u mlevenoj paprici se kreće od 20-24%. U perikarpu, sadržaj vlakana je oko 20%, dok je u semenu oko 18% (Marković i Vračar, 1998).

Od ostalih komponenata paprike važno je spomenuti etarska ulja koja doprinose aromi paprike (0,1-0,15%, u nekim slučajevima i 0,25-0,30%), lipide (0,4%), amino kiseline, proteine (16-17% na suhu materiju u perikarpu, 18% u semenu), organske kiseline (veoma mala količina, ali bitno doprinose ukusu), vodu, mineralne materije, mikroelemente i dr (Marković i Vračar, 1998).

Vitamini

Provitamini A – U paprici se vitamin A ne nalazi slobodan, već samo u obliku svojih provitamina, α - i β -karotena i β - kriptoksantina. Iz ovih jedinjenja, u jetri, dobija se vitamin A. Iz jednog molekula β -karotena dobijaju se dva molekula, dok se iz jednog molekula α -karotena (i β -kriptoksantina) dobija jedan molekul vitamina A. Dnevne potrebe organizma za vitaminom A (2 mg) zadovoljavaju se konzumiranjem 3-4 g crvene mlevene paprike (Somos, 1984).

Vitamin C – Paprika je značajan izvor vitamina C čiji sadržaj zavisi od (Somos, 1984):

- stepena zrelosti;
- veličine ploda (sitnoplodne sorte sadrže više vitamina C od krupnoplodnih);
- uslova gajenja (veći je sadržaj vitamina C u plodovima gajenim na poljima nego u staklenicima);
- faze zrelosti (veći sadržaj vitamina C u botaničkoj nego u tehnološkoj zrelosti);
- načina gajenja;
- gustine sadnje (veći sadržaj vitamina C pri ređoj nego pri gušćoj sadnji, pošto plodovi dobijaju više svetlosti).

Sadržaj vitamina C je najveći u mesu ploda.

α -tokoferol – Prirodni antioksidant, može se naći u količini od $>1.000 \mu\text{g/g}$ suve materije u zreлом plodu paprike (Márkus i sar., 1999). Vitamini C i E predstavljaju veoma važna jedinjenja sa antioksidativnim svojstvima.

Vitamin P – Nalazi se uglavnom u crvenim plodovima, a ima funkciju u regulaciji krvnog pritiska i održavanju propustljivosti krvnih sudova (Marković i Vračar, 1998).

Ostale nutritivno bitne komponente

Istraživanja su takođe otkrila da je seme paprike izuzetno bogato mineralnim materijama (Cu, Zn, Fe, Mn, Mg, Na, Ca, P, a posebno K) i esencijalnim aminokiselinama (38,9% od ukupnih) (El-Adawy i Taha, 2001).

Sastav masnih kiselina ulja

Ulje sadrži 82,5% nezasićenih masnih kiselina, i to 18:2 (67,8%), 18:1 (14,6%) i 16:1 (0,12%). Od zasićenih najzastupljenije su 16:0 i 18:0 masne kiseline (El-Adawy i Taha, 2001). Ulje iz semena daje finu, sjajnu, intenzivnu boju prahu mlevene začinske paprike, a

takođe i stabilnost, zbog svojih prirodnih antioksidanata (Mínguez-Mosquera i sar., 2000), pre svega tokoferola.

Sastav masnih kiselina i α -tokoferola semena i osušenog ploda prikazan je u tabeli 1 (Pérez-Gálvez i sar., 1999).

Tabela 1. Sadržaj masnih kiselina i tokoferola u ulju semena i osušenom plodu paprike

Masna kiselina	Seme		Osušeni plod	
	mg/kg	%	mg/kg	%
Laurinska (12:0)	nd*	0	0,75	3,0
Dodecenska (12:1)	nd	0	0,24	0,96
Miristinska (14:0)	1,1	0,12	2,27	9,1
Palmitinska (16:0)	96,1	10,9	5,03	20,1
Palmitooleinska (16:1)	2,0	0,22	0,27	1,1
Stearinska (18:0)	25,7	2,9	1,05	4,2
Oleinska (18:1)	70,7	8,0	3,21	12,8
Linolna (18:2)	685,2	77,4	5,91	23,6
Linolenska (18:3)	2,8	0,31	6,10	24,4
Arahidonska (20:0)	2,1	0,24	0,20	0,80
α -Tokoferol (mg/kg)	755		356	

* nd – nije detektovano

Seme sadrži oko 20% ulja, dok osušeni plod sadrži oko 3% ulja (Pérez-Gálvez i sar., 1999), kao i neke antinutrijente kao što su rafinoza, stahioza, verbaskoza, fitinska kiselina, tanini i tripsin inhibitor.

Kapsaicin

Ljutina paprike potiče od alkaloida kapsaicina. Najveća količina kapsaicina nalazi se u žilicama ili bočnim pregradama ploda, u specijalnim ćelijama koje su ugrađene između tkiva žilica, i u semenu (slika 1).

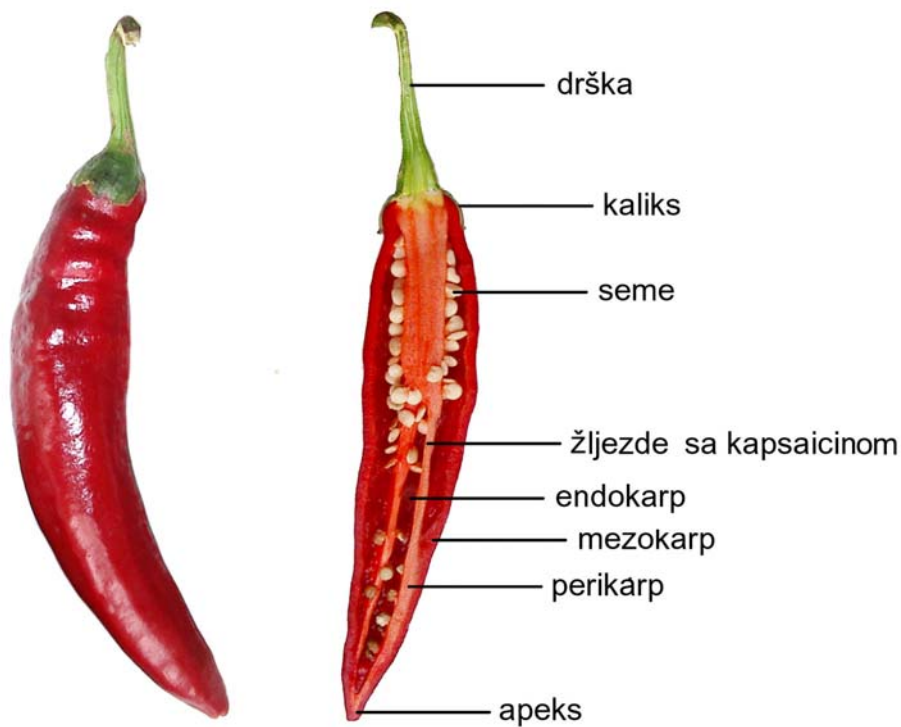
Kapsaicin iz paprike u organizmu podstiče peristaltiku creva, pomaže varenje, povećava apetit. Utrljavanjem u kožu peče (žari) i izaziva priliv krvi u potkožno tkivo, stvarajući osećaj toplote, pa se može primenjivati u lečenju reumatskih tegoba. U većoj koncentraciji kapsaicin je štetan (Johnson, 2007).

Kapsaicin (N-vanilin-8-metoksil-6-(E)-noneamid) je najljući u grupi jedinjenja kapsaicinoida. Slabo je rastvoran u vodi. Dobro se rastvara u mastima, uljima i alkoholu. Pored kapsaicina, ovoj grupi jedinjenja pripadaju dihidrokapsaicin, nordihidro-kapsaicin, homokapsaicin i homodihidro-kapsaicin (slika 2). Kapsaicin i dihidrokapsaicin čine 80-90% kapsaicinoida u paprici. Ukupan sadržaj kapsaicinoida u paprici kreće se između 0,1 i 1,0% (www.chezwilliams.com).

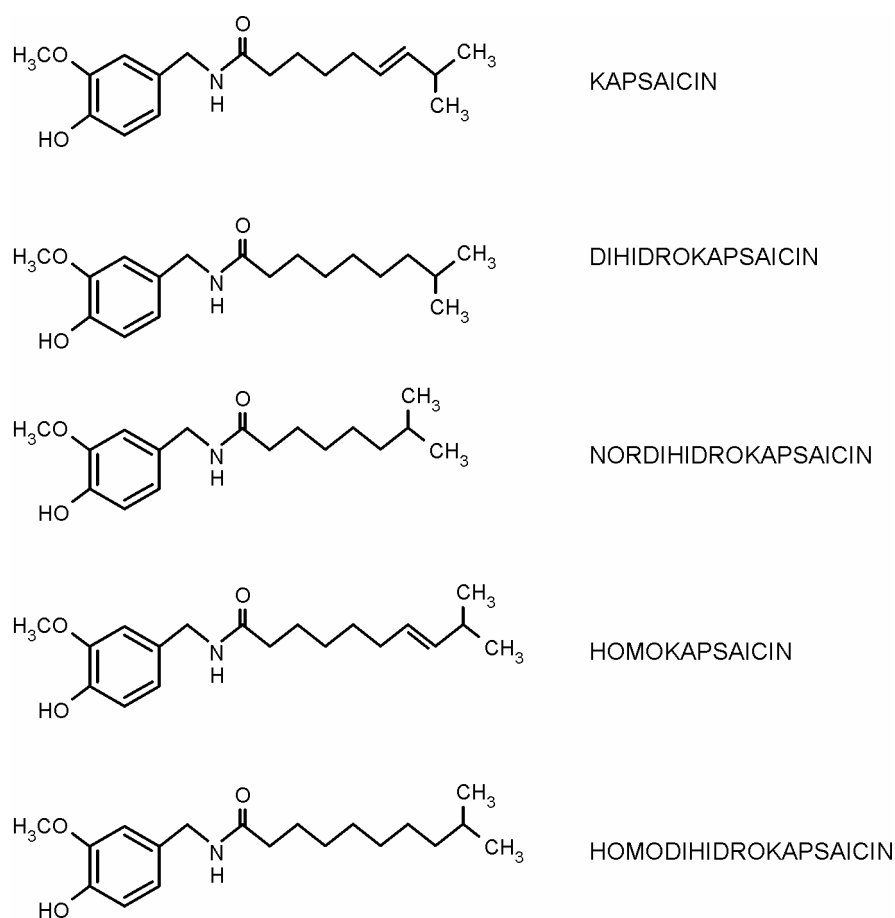
Ljutina paprike izražava se u SU (Scoville Units) jedinicama. Broj SU jedinica dodeljuje se na osnovu podatka koliko puta je treba razblažiti da se ne oseti ljutoća. Čili paprike sadrže i do 1% kapsaicina i srodnih jedinjenja (kapsaicinoida), što je oko 150.000 SU jedinica. Centralnoameričku vrstu *Capsicum chinense* karakteriše veoma visok sadržaj kapsaicina,

oko 2% (oko 300.000 SU). Zaštićena kultura Red Savina Habanero, dugo se smatrala najljućom čili paprikom na svetu, sa 3,7% (560.000 SU) kapsaicina. Avgusta 2000. godine, indijski naučnici su otkrili novu kulturu, *Capsicum frutescens* Cv. *Nagahari*, gajenu u planinama blizu grada Tezपुरa, sa 5,7% kapsaicina po suvoj materiji (4,3% kapsaicina i 1,4% dihidrokapsaicina), što je oko 855.000 SU (www.spizes.com/spiceonline). Navodno postoje planovi za upotrebu ove biljke u proizvodnji oružja ("pepper spray"), u lične i vojne svrhe.

Čist kapsaicin ima ljutinu 16.000.000 SU jedinica.



Slika 1. Anatomija ploda začinske paprike



Slika 2. Strukturne formule kapsaicinoida

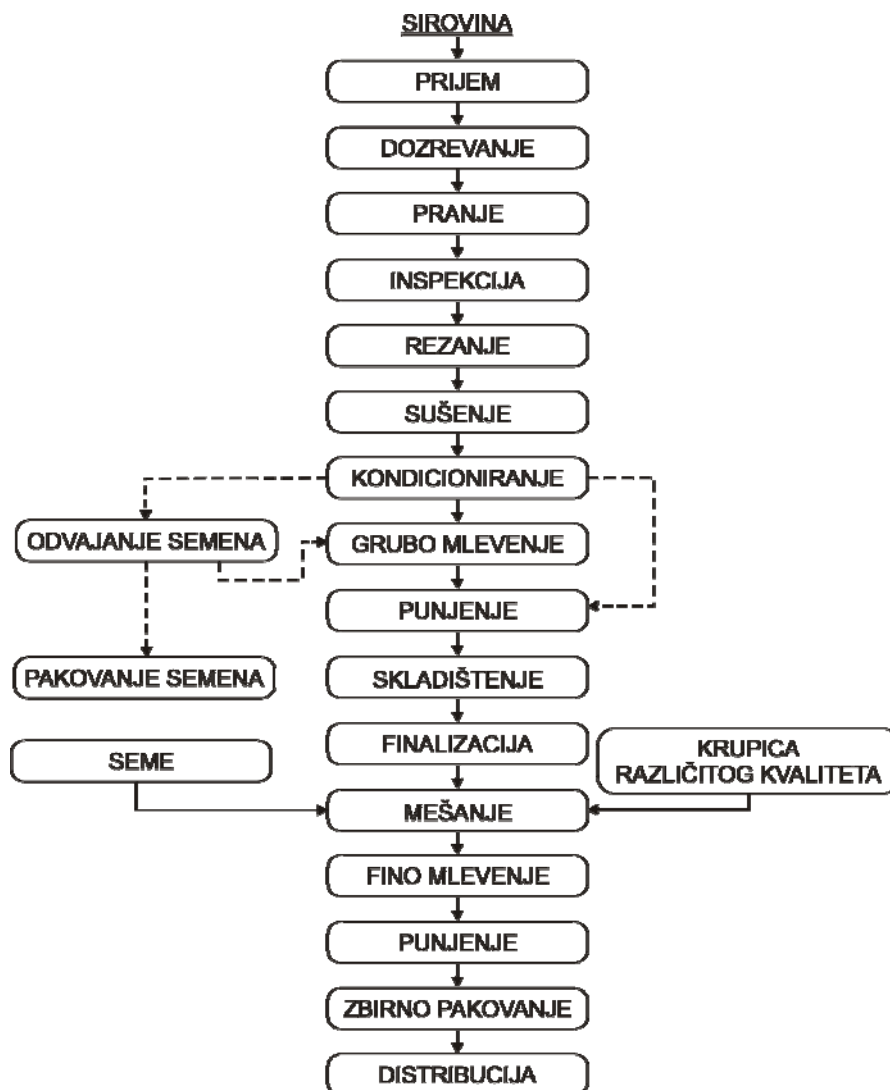
2.2. TEHNOLOŠKI POSTUPAK PROIZVODNJE MLEVENE ZAČINSKE PAPRIKE

Mlevena začinska paprika je proizvod dobijen sušenjem i mlevenjem celog, fiziološki zrelog ploda odgovarajuće sorte. To je začim crvene boje, dobre moći bojenja, prijatne arome i ukusa. Za proizvodnju mlevene začinske paprike koriste se sorte koje se u fiziološkoj zrelosti odlikuju intenzivnom crvenom bojom, tankim perikarpom, visokim sadržajem suve materije i bojenih materija.

Opšta šema tehnološkog procesa proizvodnje mlevene začinske paprike (Marković i Vračar, 1998) prikazana je na slici 3.

Prvi korak u proizvodnji sirovine (začinske paprike) jeste priprema zemljišta za proizvodnju začinske paprike i sejanje kvalitetnog semena. Primena pesticida i herbicida mora biti usklađena sa zakonskom regulativom. Radi kontrole štetočina, primenjuju se tehnike koje ne zagađuju okolinu (ekološki i biološki preparati).

Proces prerade začinske paprike počinje utvrđivanjem stepena zrelosti plodova, tj. najpovoljnijeg momenta berbe. Tokom branja i transporta treba nastojati da se plodovi što manje oštećuju da bi se izbeglo njihovo kvarenje i širenje kvarenja na veći broj plodova u masi. Po prijemu, paprika se razvrstava prema boji i veličini ploda u klase, nakon čega se istresa na betonske piste i formiraju se prizme radi dozreivanja. Dozreivanje paprike je složen problem. Pored prostornog rešenja, kojim se mora obezbediti nesmetan pristup, kapaciteta i najkraće veze sa pogonom, veoma su bitna tehničko-tehnološka rešenja vezana za prihvati i način skladištenja, smanjenje uticaja negativnih vremenskih faktora i racionalno dopremanje na preradu. Kod nas, dozreivanje se odvija najčešće na betonskim pistama sa odgovarajućim nagibom radi odvođenja vode, na kojima se paprika skladišti u prizmama sa osnovom 80-100 cm, visine do 80 cm (Marković i Vračar, 1998).



Slika 3. Opšta šema tehnološkog procesa proizvodnje mlevene začinske paprike

Kvalitetno dozrevanje može se postići i u specijalno konstruisanim (suvim i provetrenim) skladištima, gde se paprika raspoređuje na specijalne lese koje su složene jedna na drugu, tako da je obezbeđeno intenzivno provetravanje, lak pristup i kompletna kontrola, kao i kvalitetno dozrevanje u specijalnim kontejnerima od žičanog pletiva odgovarajućih dimenzija. U manjim kapacitetima prerade, plodovi se mogu povezati u niz. Dozrevanje traje 10-40 dana (Szegedi, Kalocsai paprika) da bi se postigao najveći mogući porast bojnih materija (www.fvm.hu). Poželjno je da u tom periodu bude što više sunčanih dana, sa što manje kiše i jutarnje rose.

Tokom dozrevanja dolazi do povećanja sadržaja bojnih materija 30-300 puta (Deli i Toth, 1997), kao i sadržaja suve materije. Sinteza karotenoida ima za posledicu smanjenje sadržaja šećera, ali je ovaj gubitak tehnološki poželjan, jer se smanjuje mogućnost nepoželjnog neenzimatskog potamnjenja tokom sušenja i mlevenja.

Nakon dozrevanja najbolje je papriku odmah probrati na inspekcijom trakama, kako bi se odstranila mehanička nečistoća, truli i zeleni plodovi. U praksi se često paprika direktno sa piste doprema do bazena sa vodom, gde se grubo opere. Grubo oprana paprika prebacuje se u mašinu za fino pranje (sa barbotiranjem, ili sa rotacionim bubnjem) opremljenu tuševima. Ova operacija je veoma važna, jer se uklanjaju pre svega prašina i mehaničke nečistoće, a mikrobiološka kontaminacija, koja je bila prisutna u dozrelim plodovima na pisti, svodi se na minimum. Oprana paprika pada na inspekcijonu traku, na konačnu kontrolu i odvajanje preostalih mehaničkih nečistoća.

Nakon inspekcije, paprika se dozira do mašine za rezanje. Celi plodovi zajedno sa peteljkom i čašičnim listovima upadaju u zazor između rotirajućih i fiksnih noževa, gde se seku na 4-5 delova. Oštrina noževa i odgovarajući broj obrtaja sprečavaju gnječenje plodova i isticanje soka. Rezanje je obavezna operacija kojom se povećava specifična površina ploda, pospešuje otparavanje vode, odnosno olakšava sušenje, kojim se sadržaj vlage smanjuje na 8-10%.

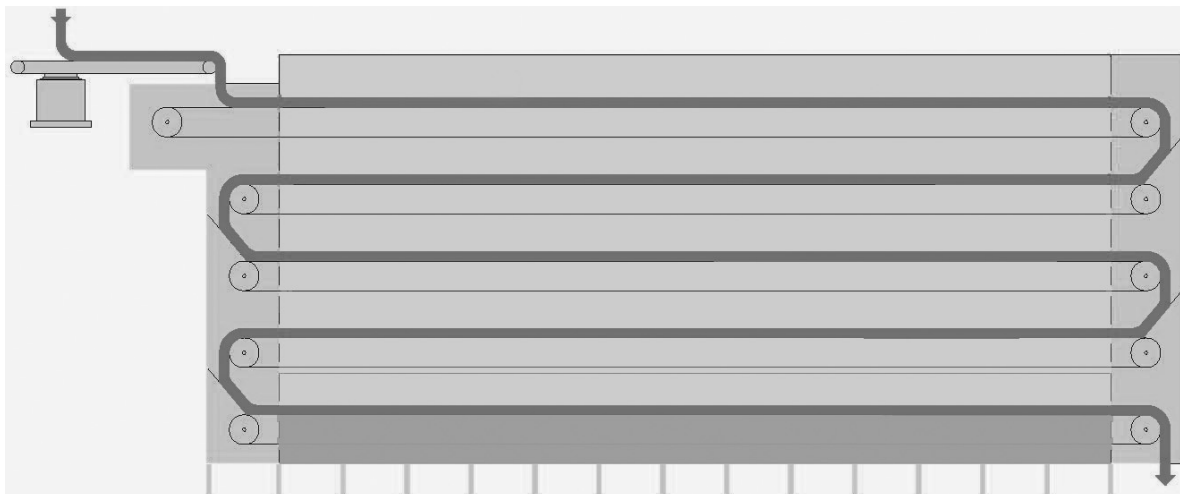
Začinska paprika se suši primenom kontinualnih trakastih sušara (slika 4). Temperaturni režim sušenja podešava se tako da se hemijske i fizičke promene (karamelizacija šećera, neenzimatsko potamnjenje, reakcije šećera i amino kiselina koje dovode do promena boje, ukusa i mirisa, gubitak vitamina C) svedu na najmanju moguću meru. U početnoj fazi sušenja temperatura može da bude nešto viša (ispod 80°C za svežu papriku, 75°C za delimično prosušenu papriku). U završnoj fazi sušenja temperatura ne treba da pređe 60°C. Vreme sušenja zavisi od početnog sadržaja vlage i vlage u osušenom proizvodu i obično traje 3-5 časova (Marković i Vračar, 1998).

Dobijeni poluproizvod se zatim skladišti u kondicioniranim prostorijama, na temperaturi 0-10°C. Skladišta moraju biti suva, čista, bez prisustva prirodnog svetla i zaštićena od glodara i insekata. Nakon kondicioniranja dalja priprema i čuvanje osušene začinske paprike kao poluproizvoda odvija se na jedan od sledećih načina:

- direktno punjenje u odgovarajuću ambalažu,
- grubo mlevenje na mlinovima čekićarima, a potom punjenje,
- izdvajanje semena, grubo mlevenje perikarpa i odvojeno pakovanje.

Osušena paprika pripremljena na bilo koji od navedenih načina, puni se najčešće u jutane ili natron vreće u kojima se, do finalizacije, odlaže u pripremljeno skladište.

Pre mlevenja poluproizvoda, u nekim tehnologijama (npr. u proizvodnji Szegedi i Kalocsai mlevene začinske paprike), uklanjaju se peteljke, osušeni delovi plodova kratkotrajno se izlažu struji vrućeg vazduha, radi uklanjanja eventualno zaostalih mikroorganizama na površini, ispod zakonski dozvoljenog broja (www.fvm.hu).



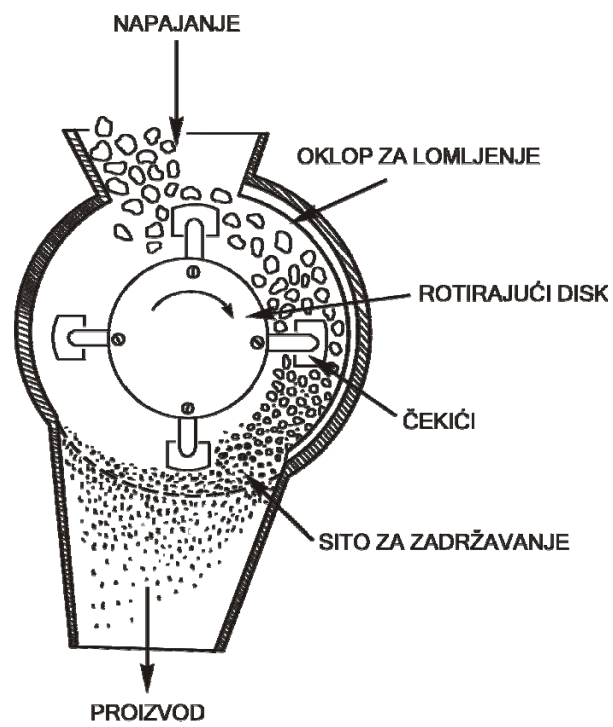
Slika 4. Šematski prikaz trakaste sušare

Operacijom drobljenja osušena paprika se usitnjava do čestica veličine 2-3 mm. Ovakav poluproizvod je pogodan za mlevenje. Drobljenje se obavlja na mlinu čekićaru (slika 5 i šema sa slike 6). U središtu mlina postavljena je horizontalna osovinna na kojoj su pričvršćeni čekići čijim se okretanjem i udaranjem osušeni delovi ploda usitnjavaju. Krajevi čekića su stepenasti, tako da postoji veći broj ivica koji stvara i veću udarnu silu. Ispod rotirajućeg dela je smešteno sito, koje zadržava izdrobljene čestice sve dok ne dostignu dimenzije manje od perforacije sita. Dobijena prekrupa se mlevenjem prevodi u krajnji proizvod. Pre mlevenja, po potrebi, meša se krupica različitog kvaliteta, s ciljem da se obezbedi standardni proizvod. Pored toga, određenoj krupici ili smeši dodaje se izvesna količina semena, ako je prethodno izdvojeno, radi obezbeđenja potrebne količine ulja.

Za fino mlevenje se koriste mlinovi sa kamenom (slika 7). U drvenom kućištu smeštena su dva mlinska kamena. Gornji, pogonski, ima broj obrtaja 200-300 o/min. Prekrupa se pomoću dovodne cevi sa dozatorom unosi u prostor između dva kamena. Prostor između dva kamena se sužava polazeći od unutrašnjosti ka spoljašnjosti. U ovom prostoru se stvara velika sila trenja i smicanja, usled kojih se prekrupa melje. Dobijena meljavina odlazi iz mlina preko odvodnih cevi. Žljebovi urezani na površini mlinskog kamena služe kao ventilacioni kanali koji obezbeđuju stalnu cirkulaciju vazduha, čime se sprečava pregrevanje meljave. Samleveni proizvod se zatim prosejava na šestouglaonom rotirajućem situ sa četiri sekcije. Perforacije sita su 150-500 μm . Meljava koja se zadržava na situ ponovo se vraća na naknadno mlevenje.



Slika 5. Mlin čekičar



Slika 6. Šematski prikaz mlina čekičara



Slika 7. Kameni mlin

Završna faza proizvodnje mlevene začinske paprike je njeno pakovanje kao poluproizvoda ili gotovog proizvoda. Za pakovanje se koriste ambalažni materijali nepropusni za svetlost, vlagu i ulja. To su najčešće kombinovani (kompleksni) ambalažni materijali (pergament obložen spolja celofanom, kaširane alufolijske kesice, pergament kesice sa limenom ambalažom, poliestar/aluminijum/polietilen kesice, različitih veličina) (Marković iVračar, 1998).

Faktori kvaliteta mlevene začinske paprike

Kvalitetna mlevena začinska paprika sa dobro očuvanom bojom je imperativ u proizvodnji ovog začina. Da bi finalni proizvod imao dobar kvalitet, potrebno je obezbediti efektanu i efikasnu dehidraciju paprike. Kinetika dehidracije zavisi pre svega od permeabilnosti pokožice. Debeo epikutikularni sloj voska na površini ploda paprike pruža veliki otpor prenosu mase. Dugo vreme dehidracije ima za posledicu loš kvalitet proizvoda, usled karamelizacije, Maillard-ovih reakcija, enzimskih reakcija, degradacije pigmentata i oksidacije L-askorbinske kiseline. Hemijski (natrijum hidroksid, hlorovodonična kiselina, etil oleat) i fizički (bušenje pokožice, blanširanje) tretmani pokožice utiču na prenos mase (Ramesh i sar., 2001). Međutim, tržište zahteva minimalno (termički, hemijski, fizički) tretirane proizvode. Alternativa pomenutim tretmanima su primena visokog hidrostatičkog pritiska (HHP – high hydrostatic pressure) i pulsirajućeg električnog polja visokog intenziteta (HELP – high intensity electric field pulse; PEF – pulsed electric field), koji, kao netermički tretmani, povećavaju brzinu dehidracije, kao i koeficijente prenosa mase i toplote, a hemijske promene supstrata su neznatne (Ade-Omowaye i sar., 2001; Ade-Omowaye i sar., 2003a, Ade-Omowaye i sar., 2003b, Ade-Omowaye i sar., 2003c).

U literaturi se može naći primena etilen oksida, zračenja i sterilizacije parom (HTST postupak) u sterilizaciji začina, međutim, primena etilen oksida je zabranjena u Evropi, zračene namirnice nisu prihvatljive kod potrošača, a primena pare nije preporučljiva kod prahova, zbog apsorpcije vlage iz vodene pare (www.foodproductdesign.com), ali se u praksi ipak iznuđeno koristi.

U literaturi se mogu naći podaci o pokušajima sušenja paprike u inertnoj atmosferi, koja nije imala znatnog uticaja na kvalitet gotovog proizvoda, osim u pogledu većeg sadržaja vitamina C (Ramesh i sar., 2001).

Uticaj zrelosti plodova, primenjenog predtretmana, uslova, metoda i kinetike sušenja na kvalitet gotovog proizvoda bio je predmet interesovanja mnogih autora (Doymaz and Pala, 2002; Németh-Kiss i sar., 1996; Akpinar i sar., 2003; Mínguez-Mosquera i sar., 1994; Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez, 1997; Daood i sar., 1996). Mínguez-Mosquera i Hornero-Méndez (1997) ispitivali su uticaj sušenja i mlevenja na sadržaj provitamina A. Paprika je pripremljena na tradicionalan način, sveži plodovi su obrani zreli i sušeni u sušarama 10 do 15 dana, toplotom dobijenom sagorevanjem drveta. Tokom ovog procesa vlaga u proizvodu se smanjuje sa 90 na 10%. Zatim je proizvod (pomešan sa 40% semena) samleven na mlinovima čekićarima, ohlađen i upakovan. Autori su uočili veći pad sadržaja žutih (među kojima se nalaze i provitamini A) od crvenih pigmenata, što je imalo za posledicu i smanjenje provitaminske vrednosti. Mínguez-Mosquera i sar. (1994) su poredili sporo sušenje (sagorevanjem drveta) i brzo sušenje toplim vazduhom. Akpinar i sar. (2003) su ispitivali dinamiku promene vlage u zavisnosti od vremena sušenja i promenu brzine sušenja u zavisnosti od vremena sušenja, na temperaturama 55, 60 i 70°C, pri strujanju vazduha od 1,5 m/s. Povećanje temperature vazduha uslovalo je smanjenje vremena sušenja. Vreme potrebno za postizanje 10% vlage pri različitim temperaturama vazduha bilo je između 160 i 300 minuta. Brzina sušenja opadala je sa povećanjem vremena sušenja. Daood i sar. (1996) ispitivali su sadržaj antioksidativnih vitamina (tokoferola, askorbinske kiseline i β -karotena) u zavisnosti od načina sušenja. Tokom klasičnog sušenja u uslovima spoljašnje sredine došlo je do intenzivnog gubitka tokoferola i askorbinske kiseline, dok je gubitak β -karotena bio sporiji. Primena sušenja u struji vazduha dovela je do znatno većeg zadržavanja antioksidativnih vitamina u sušenom i mlevenom proizvodu.

U smeši dehidrisanih plodova i semena nalaze se dva osnovna sastojka: masne kiseline, koje mogu da stvaraju hidroperoksidi, i tokoferoli, kao prirodni antioksidanti. Čestice mlevene začinske paprike imaju veliku specifičnu površinu, pa su bojene materije direktno izložene vazduhu, svetlosti i toploti. Kada se doda seme, njegovo ulje prekriva čestice tankim filmom, popunjavajući šupljine i na taj način smanjuje površinu izloženu kiseoniku, dok tokoferoli iz ulja semena zaustavljaju reakcije stvaranja peroksida i njihove reakcije sa bojenim materijama.

Pérez-Gálvez i sar. (1999) su napravili sledeći ogled: osušeni plod paprike pomešali su sa različitom količinom semena (0, 20, 40 i 60%; w/w). Smeše su samlevene do veličine čestica od 0,5 mm. Uzorci su držani u petri pločama, na temperaturi od 70°C, bez svetlosti. Do retencije karotenoida od 50% najstabilniji je bio uzorak sa 60% semena, dok je najlošiji bio onaj bez dodatog semena (najveća degradacija karotenoida). Međutim, kada je retencija pigmenata opala ispod 30%, situacija se obrnula – uzorak sa najviše semena pokazao je najveću degradaciju, dok je uzorak bez dodatog semena pokazao manju (sporiju) degradaciju preostalih karotenoida. Tokom prve faze degradacije, dodatak većeg udela semena imao je zaštitni efekat na karotenoide. U mlevenom plodu bez dodatog semena karotenoide su bili direktno izloženi dejstvu kiseonika iz vazduha, a mala količina hidroperoksida (nastalih iz masnih kiselina) direktno napada karotenoide. Međutim, u drugoj fazi, masne kiseline iz semena dovele su do formiranja hidroperoksida, koji su inicirali degradaciju karotenoida do bezbojnih jedinjenja. Naime, pošto su oksidativne reakcije započete, zahvata se velika količina supstrata, pa se prevazilazi antioksidativna efikasnost tokoferola.

U literaturi se može naći nekoliko pokušaja smanjenja autooksidacije karotenoida i gubitka boje u mlevenoj paprici: dodatak antioksidanata, kontrola vlage, dodatak semena, dodatak ulja iz semena (Pérez-Gálvez i sar., 1999).

U sličnom ogledu, Klieber i Bagnato (1999) pratili su promene kvaliteta na 37°C mlevenih uzoraka mađarske, američke i američke čili paprike upakovanih u polietilenske vreće sa različitim odnosom plod:seme. Održivost mađarske paprike je bila najbolja kod uzoraka u odnosima 100:0 i 100:10, američke paprike i američke čili paprike 100:0, 100:10 i 100:45. Manji sadržaj semena imao je kao posledicu bolju početnu boju. Međutim, sa ekonomskog aspekta, manji sadržaj semena znači istovremeno i smanjenje količine gotovog proizvoda. Dodatak ulja iz semena nije imao pozitivan efekat, pošto je u uzorcima izazivao užegao miris. Vitamin E pokazao se kao dobar antioksidant, u koncentraciji od 3 mg/g suve materije. Najefikasnije je bilo skladištenje u atmosferi azota. Dodatak vitamina E produžio je održivost proizvoda za 1-2 nedelje. Uzorak u inertnoj atmosferi bio je najbolji, sa održivošću 7 nedelja (mađarska paprika), odnosno 11-13 nedelja (američke sorte paprike).

Preveliki udeo semena dovodi ne samo do autooksidacije polinezasićenih masnih kiselina, već i do enzimske oksidacije usled delovanja lipoksigenaze i lipid peroksidaze prisutnih u semenu (Biacs i sar., 1992).

Najbolji rezultati postižu se odabiranjem kultura sa visokim sadržajem bojnih materija, dodavanjem semena u prirodnom odnosu plod:seme (npr. 100:45 za mađarsku papriku, 100:60 za američku papriku i američku čili papriku) i čuvanjem proizvoda u atmosferi azota. Ukoliko nije izvodljivo skladištenje u atmosferi azota, crvena boja se može stabilizovati smanjenjem udela semena (npr. na 100:10 kod mađarske paprike), pri čemu se smanjuje prinos za 25% (Klieber i Bagnato, 1999). Dodatak semena u većem udelu može dovesti i do smanjenja količine bojnih materija, usled efekta razblaživanja

2.3. TEHNOLOŠKI POSTUPAK PROIZVODNJE OLEORIZINA

2.3.1. Klasična ekstrakcija organskim rastvaračem

Oleorizin paprike se uglavnom koristi u prehrambenoj industriji kao boja, kao i u farmaceutskim proizvodima. Prerada začinske paprike u cilju proizvodnje oleorizina uključuje prethodnu dehidraciju i usitnjavanje (mlevenje) radi dobijanja praha i ekstrakcije liposolubilnih jedinjenja - karotenoida. Ovaj postupak nije selektivan, pošto se pored karotenoida ekstrahuju i druga liposolubilna jedinjenja, koja ostaju u gotovom proizvodu. Za ekstrakciju oleorizina koriste se organski i superkritični rastvarači.

Začini i bilje se dobijaju iz aromatičnih delova biljaka (koren, kora, lišće, cvetovi, delovi cvetova, plod, seme). Ljudi su počeli da primenjuju začine pre nekoliko hiljada godina da bi poboljšali ukus hrane. Začini su se vekovima ubirali u zemljama porekla, transportovali i prodavali u razvijenim zemljama. Brzo su postali robna marka i sve niža

cena učinila ih je dostupnim za širu populaciju ljudi. Začini se mogu koristiti kao sveži proizvodi, ali radi omogućivanja transporta na velike razdaljine i skladištenja duže vreme, suše se u cilju konzervisanja. Komercijalni začini i bilje dostupni su kao celi, lomljeni, drobljeni ili mleveni.

Celi i mleveni začini ne ispunjavaju zahteve za uniformnim, doslednim, sterilnim i održivim prehrambenim proizvodom. Stoga, prehrambena industrija godinama koristi njihove ekstrakte. Oleorizini su tečni ekstrakti začina koji sadrže etarska ulja i neisparljive komponente. Proizvodnja oleorizina sastoji se od selekcije i mlevenja sirovina, ekstrakcije rastvaračem, uklanjanja rastvarača i finalizacije oleorizina standardizacijom. Prednosti oleorizina su uniformnost arome i mirisa, bolja stabilnost tokom skladištenja u poređenju sa prirodnim začинима i biljem, koji usled isparavanja, polimerizacije i oksidacije gube isparljiva etarska ulja, vrlo mala mikrobiološka kontaminacija, olakšana dalja prerada u prehrambenoj industriji, smanjeni skladišni prostor, ekonomičnost. Jedan od nedostataka konvencionalnih oleorizina je njihova kontaminacija malim količinama organskog rastvarača, a uklanjanjem rastvarača pod vakuumom gubi se deo početne arome. Za ekstrakciju se može primeniti niz rastvarača, ali propisi nalažu njihovo uklanjanje na propisani nivo rezidua (Britton i sar., 2004). Tokom ekstrakcije i uparavanja rastvarača toplotna nestabilnost vrednih komponenata može biti ograničavajući faktor pri primeni povišenih temperatura. Takođe, nečistoće primenjenog rastvarača sa visokim tačkama ključanja prelaze u gotov proizvod.

Tradicionalne metode ekstrakcije, kao što je ekstrakcija po Soxhlet-u, koje se primenjuju decenijama, dugotrajne su i zahtevaju velike količine rastvarača. Među proizvođačima biljnih ekstrakata postoji interesovanje za novim tehnikama sa skraćenim vremenom, smanjenom potrošnjom rastvarača i manjim zagađenjem životne sredine. Nove metode ekstrakcije (ultrazvučna, mikrotalasna, ekstrakcija superkritičnim tečnostima i ubrzana tečna ekstrakcija) su brze i efikasne pri ekstrahovanju supstanci iz čvrstih biljnih materijala. Ove metode pružaju mogućnost rada na povišenoj temperaturi i/ili pritisku, znatno skraćujući vreme ekstrakcije.

Ekstrakcija po Soxhlet-u, koja se dugo primenjuje, je standardna tehnika koja služi kao referentna pri ocenjivanju izvođenja drugih metoda čvrsto-tečno ekstrakcije. Ekstrakcija po Soxhlet-u je opšta i dobro razrađena tehnika koja u izvođenju prevazilazi druge konvencionalne metode ekstrakcije, izuzev u slučaju ekstrakcije termolabilnih jedinjenja (u ograničenim slučajevima). Pri ekstrakciji po Soxhlet-u za ekstrakciju ciljanih jedinjenja treba odabrati odgovarajući rastvarač (heksan, aceton, dihlormetan, benzen). Različiti rastvarači doprineće različitom sastavu ekstrakta. Najčešće korišćeni rastvarač za ekstrakciju ulja iz biljnih materijala je heksan. Heksan ima mali interval temperature ključanja (63-69°C) i odličan je u smislu rastvorljivosti ulja i lakoće uklanjanja. Međutim, n-heksan, osnovi sastojak komercijalnog heksana, nalazi se na listi opasnih zagađivača vazduha. Primena alternativnih rastvarača (izopropanol, etanol, ugljovodonici, voda) je porasla iz ekoloških, zdravstvenih i bezbednosnih razloga. Međutim, alternativni rastvarači često dovode do smanjenog prinosa usled manjeg afiniteta između rastvarača i rastvorka. Pored toga, cena alternativnih rastvarača može biti veća. U cilju povećanja polarnosti rastvarača nekada se dodaju ko-solventi.

Proizvodnja oleorizina u našoj industriji sastoji se iz tri faze (Marković i Vračar, 1998) - priprema, ekstrakcija i finalizacija (slika 8). Polazna sirovina za proizvodnju oleorizina je grubo mlevena začinska paprika (krupica). Pre ekstrakcije oleorizina potrebno je pripremiti

krupicu, tretmanom pregrejanom vodenom parom u specijalnom uparivaču sa mešalicom, u vremenu od oko 3 h. Ovlažena i nabubrela masa dozira se između dva metalna valjka u cilju razbijanja kompaktnosti čestica. Sa valjaka masa pada na transporter (dozator) kojim se dozira u rotacioni ekstraktor sa 6 komora. U napunjenu komoru dodaje se rastvarač. U našim industrijskim uslovima najčešće se kao rastvarač koristi dihlor-metan. Ekstrakcija najčešće traje 6-7 h. Dobijeni ukupni ekstrakt se iz komore pumpom prebacuje u sud za odvajanje vode i rastvarača (dekanter). Dekantacijom izdvojen oleorizin, koji još uvek sadrži rastvarač, vodu i druge balastne materije, odvodi se na uparavanje, tj. koncentrovanje. Oleorizin u obliku polukoncentrata se prihvata u sud za dekantaciju. Odvaja se tečni deo i puni u specijalne metalne sudove, a zaostali talog posle blagog ispiranja organskim rastvaračem najčešće se baca.

Čvrsti ostatak u ekstraktoru (sačma) se prazni i transporterom odnosi u isparivač na odvajanje rastvarača. Nakon odvajanja rastvarača, sačma se puni u vreće i odlaže u skladište do dalje upotrebe (stočna hrana i sl.).

Rastvarač izdvojen nakon uparavanja po potrebi se može prečistiti i vratiti u proces, u smeši sa svežim rastvaračem.

Rastvarač se bira na osnovu selektivnosti i prinosa, mogućnosti reciklovanja rastvarača iz ulja, kao i njegovog potpunog uklanjanja iz proizvoda. Takođe, primena određenog rastvarača ograničena je zakonskom regulativom svake zemlje. Aceton, dihlor metan, etil acetat i metanol, rastvarači čija je primena dozvoljena za ekstrakciju, imaju nedostatke kao što su mali prinos ekstrakcije i zaostajanje u gotovom proizvodu. Za ekstrakciju se najčešće primenjuju heksan, metilen hlorid i etil acetat, kojima se postiže dobar prinos, dobra boja, sa malim tragovima rezidua (Pérez-Gálvez i sar., 2006).

Najjednostavniji načini ekstrakcije su protivstrujna šaržna i kontinualna ekstrakcija. Pri šaržnoj ekstrakciji potreban je odnos materijal-rastvarač od oko 0,6 kg/L, a kvantitativna ekstrakcija se postiže za 5 časova. Pri kontinualnoj protivstrujnoj ekstrakciji ovaj odnos je 4 kg/L i 3 h ekstrakcije.

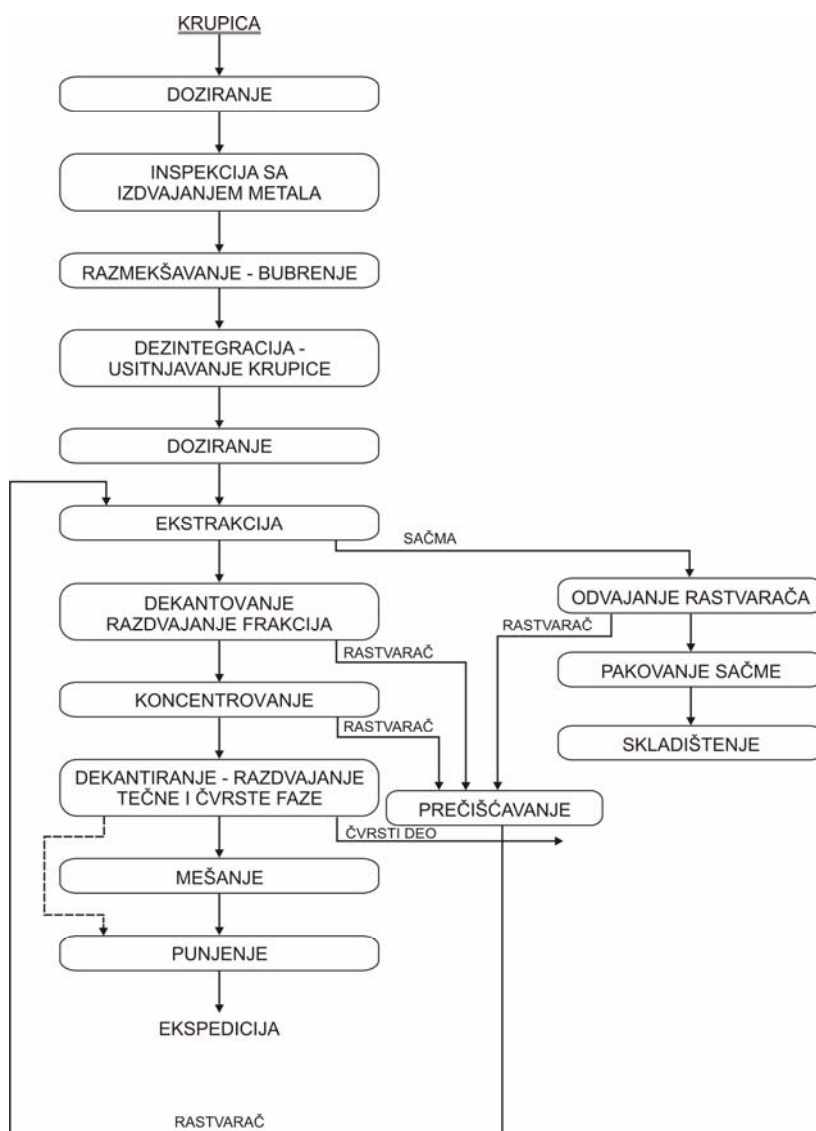
Vreme ekstrakcije zavisi od boje paprike u različitim vremenskim intervalima. Nakon postizanja kvantitativne ekstrakcije (koja se određuje ekonomskim parametrima i postupcima ekstrakcije), rastvarač se pod vakuumom uklanja iz oleorizina. Nakon koncentrovanja u oleorizinu zaostaje oko 1-4% rastvarača. Stoga se iz proizvoda moraju ukloniti rezidue rastvarača, da bi se zadovoljila regulativa za maksimalno dozvoljenu količinu rezidua u oleorizinu.

Jedno od postojećih rešenja za ekstrakciju paprike organskim rastvaračem u industrijskim uslovima koje je dao Pruthi (2003) prikazano je na slici 9.

Direktive Evropske Unije koje se odnose na upotrebu rastvarača za ekstrakciju i nivo rezidua su 88/344/CEE i 97/60/CE (Council Directive 88/344/CEE, 1988; Directive 97/60/EC, 1997). Maksimalna koncentracija rezidua rastvarača je 50 mg/kg, osim za metilen hlorid (10 mg/kg).

Ekstrakcija po Soxhlet-u veoma zavisi od osobina i veličine čestica uzorka, pošto unutrašnja difuzija može biti limitirajući faktor tokom ekstrakcije.

Temperatura ekstrakcije i uparavanja imaju znatnog uticaja na kvalitet finalnog proizvoda. Visoka temperatura pri uklanjanju rastvarača može se smanjiti primenom vakuuma ili se za recikliranje rastvarača koristi membranska separacija.



Slika 8. Šema tehnološkog postupka proizvodnje oleorizina paprike

Neke od prednosti i nedostataka konvencionalne ekstrakcije (Lock i Simándi, 2001; de Castro i García-Ayuso, 1998) su sledeće:

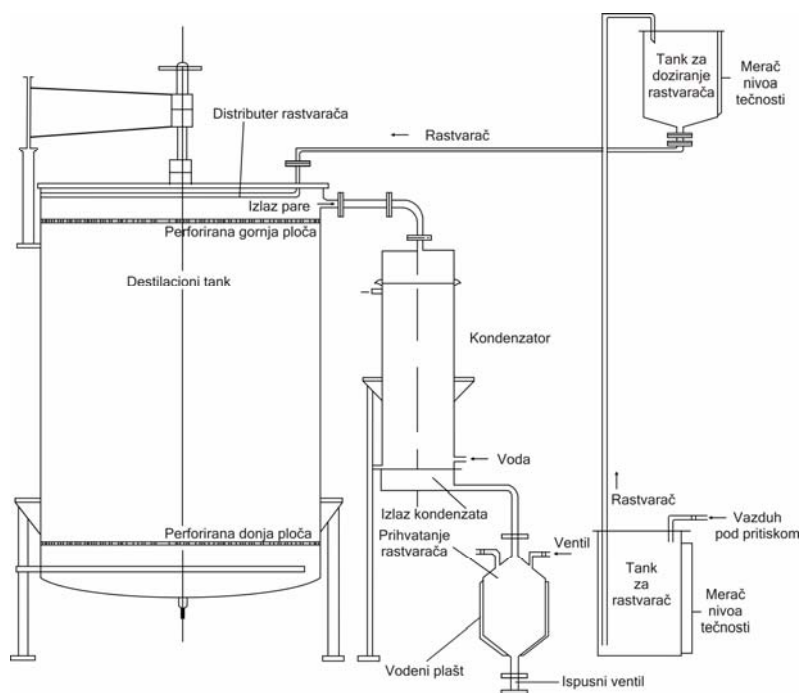
Prednosti

- održavanje relativno visoke temperature ekstrakcije van ekstrakcione posude;
- metoda je veoma jednostavna i jeftina;
- sistem se stalno dovodi u kontakt sa svežim rastvaračem, pomažući na taj način pomeranje ravnoteže prenosa mase;
- nije potrebno filtriranje;

Nedostaci

- dugo vreme ekstrakcije i relativno velika količina rastvarača, što je i relativno skupo, a takođe ima i negativne posledice po životnu sredinu;

- usled velike potrošnje rastvarača, neophodna je evaporacija nakon ekstrakcije;
- s obzirom da se ekstrakcija izvodi na tački ključanja rastvarača, u zavisnosti od primenjenog rastvarača ne može se zanemariti mogućnost termičke razgradnje ciljanih jedinjenja;
- tehnika je ograničena selektivnošću rastvarača i ne može se lako automatizovati;
- konvencionalna ekstrakcija nema mogućnost mešanja, što bi ubrzalo proces;
- većina organskih rastvarača je toksična;
- u uljanom ekstraktu ostaju rezidue organskog rastvarača.



Slika 9. Šema proizvodnje oleorizina organskim rastvaračem u industrijskim uslovima

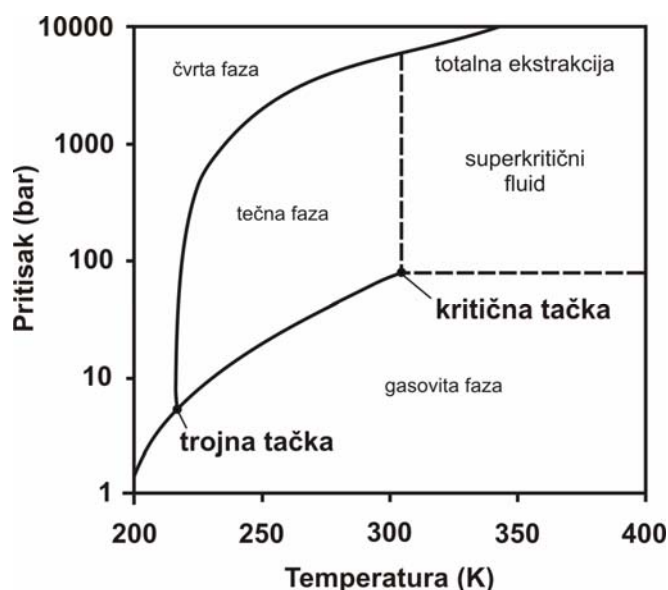
2.3.2. Superkritična ekstrakcija

Oštre restrikcije u pogledu primene organskih rastvarača i niske dozvoljene granice njihovih rezidua u gotovom proizvodu predstavljaju ozbiljna ograničenja za primenu organskih rastvarača. Pored toga, smanjena selektivnost klasičnog postupka predstavlja nedostatak, pošto tržišta zahtevaju ekstrakte sa čistim funkcionalnim sastojcima, te proizvođači moraju da primenjuju skupe postupke za uklanjanje nefunkcionalnih jedinjenja kao što su masti, voskovi i gume. Svi ovi nedostaci mogu se prevazići primenom superkritičnih fluida kao ekstrakcionih sredstava. Ovim postupkom se mogu dobiti ekstrakti (čisti karotenoidni oleorizini) i frakcionisani ekstrakti (ulja bogata β -karotenom, žuti ili crveni oleorizini). Kao posledica, proizvođačima se pruža šansa da prošire asortiman proizvoda, čime mogu da zadovolje potrebe prehrambene, farmaceutske i kozmetičke industrije.

Savremeni trend potrošača prema prirodnim proizvodima zahteva nove tehnologije proizvodnje začinskih ulja i ekstrakata, bez prisutnih nepoželjnih materija. Poslednjih godina raste interesovanje za superkričnom i subkričnom ekstrakcijom koje koriste ugljen-dioksid (CO_2) kao rastvarač. Ugljen-dioksid je idealan rastvarač za ekstrakciju prirodnih proizvoda pošto je netoksičan, neeksplozivan, dostupan i lako se uklanja iz proizvoda.

Principi i mehanizmi ekstrakcije superkričnim fluidom (Supercritical Fluid Extraction – SFE)

Superkrično stanje se postiže kada se temperatura i pritisak povećavaju iznad kričnih vrednosti nekog gasa ili tečnosti. Superkrični fluid ima osobine i gasova i tečnosti. Svi gasovi se mogu prevesti u tečno stanje povišenjem pritiska, ali samo na temperaturama nižim od krične. Iznad krične temperature čista gasovita supstanca se ne može prevesti u tečno stanje, bez obzira na primenjeni pritisak. Ugljen-dioksid je gas koji se najčešće koristi kao rastvarač u superkričnoj ekstrakciji. Fazni dijagram za ovaj gas prikazan je na slici 10. Na slici se mogu uočiti strogo odvojene oblasti, u kojima CO_2 ima različita faza stanja. Karakteristične su oblasti u kojima je CO_2 u gasnom, tečnom i čvrstom stanju. Trojna tačka se nalazi na mestu dodira sve tri oblasti. S druge strane, povišenjem vrednosti pritiska i temperature iznad krične tačke ulazi se u oblast u kojoj je CO_2 zapravo smeša gasa i tečnosti, odnosno superkrični fluid. U ovoj oblasti nema stvarne razlike između gasa i tečnosti, tako da nema ni fazne transformacije materije iz jednog stanja u drugo. Drugim rečima, superkrični fluid se ponaša kao vrlo gusti gas ili retka, vrlo pokretna tečnost.



Slika 10. Fazni dijagram ugljen dioksida

Superkrični fluidi imaju nekoliko prednosti u poređenju sa tečnim rastvaračima: moć rastvaranja superkričnog fluida zavisi od njegove gustine, koja se lako podešava promenom pritiska i/ili temperature; superkrični fluid ima veći koeficijent difuzije, manji viskozitet i površinski napon od tečnog rastvarača, dovodeći do boljeg prenosa mase.

Rastvorljivost i selektivnost superkritičnog fluida su vrlo zavisni od pritiska i temperature. Pri pritiscima čije su vrednosti nešto iznad kritičnog pritiska, i temperaturama znatno višim od kritične temperature, radi se o postupku razdvajanja, poznatom kao deodorizacija. U oblasti umerenih temperatura, nešto viših od kritične, i povišenih pritisaka, relativno viših od kritične vrednosti, postupak razdvajanja se naziva frakcionisanje. Za skoro potpunu ekstrakciju rastvorka, pomoću superkritičnog fluida kao što je CO₂, koriste se najviše vrednosti pritiska i umerene vrednosti temperature, pošto je tada najveća rastvorljivost željenih komponenata, što je predstavljeno zonom totalne ekstrakcije (slika 10). Ekstrakt u superkritičnom fluidu prolazi kroz seriju sudova za razdvajanje, u kojima se pritisak ili temperatura menjaju skokovito, pri čemu se zapravo radi o višestepenom frakcionisanju komponenata. Tako, npr., za proizvodnju lakoisparljivih mirisnih komponenata, primenjuju se radni uslovi bliski kritičnoj tački. U ovom slučaju rastvorljivosti komponenata u superkritičnom fluidu su niske, ali je selektivnost rastvarača za veliki broj komponenata izuzetno visoka.

Ravnotežni fazni dijagrami za jednu ili više komponenata u superkritičnom CO₂ ili drugom rastvaraču su vrlo komplikovani. U literaturi se nalazi relativno malo podataka o višekomponentnim sistemima u superkritičnoj oblasti. Razlog ovome je vrlo skupa oprema, potrebna za izvođenje eksperimenata sa visokim pritiscima i teškoće vezane za aplikaciju rezultata dobijenih na laboratorijskom nivou na uslove rada u industrijskom procesu.

Osnovni kriterijumi za izbor rastvarača za superkritičnu ekstrakciju su dobra moć rastvaranja, inertnost prema ekstraktibilnim supstancama, lako razdvajanje od ekstrakta, niska cena, niske vrednosti kritičnih parametara. Kritična tačka ugljen-dioksida je na 304 K (31,06°C) i 7,3 MPa (73,8 bar). Takođe, ugljen-dioksid je nezapaljiv i netoksičan. Superkritični CO₂ je selektivan prema jedinjenjima malih molekulskih masa (ispod 250), dok mu veliki kvadrupolni momenat omogućuje rastvaranje nekih umereno polarnih jedinjenja, kao što su lipidi, holesterol, aldehidi, alkoholni etri, estri i ketoni, dok su relativno nerastvorljiva jedinjenja molekulskih masa preko 400, ili polarne grupe kao što su hidroksi, karboksni grupe, šećeri, polisaharidi, aminokiseline, proteini, fosfatidi, glikozidi i neorganske soli.

U cilju ekstrakcije polarnih jedinjenja, razmatrana je primena polarnih superkritičnih fluida. Dva takva uspešno primenjena polarna rastvarača su freon-22 (hlorodifluorometan) i azot-oksidi (N₂O). Međutim, njihova primena je ograničena usled njihovih nepovoljnih osobina u pogledu bezbednosti i zaštite životne sredine (Wang i Weller, 2006). N₂O je eksplozivan, a freon-22 nije više komercijalno dostupan zbog efekta "trošenja" ozona u gornjim delovima atmosfere.

Primena modifikatora verovatno je do sada najjednostavniji način postizanja željene polarosti fluida na bazi CO₂. Izborom modifikatora ili jednostavnom promenom molarnog udela modifikatora može se lako manipulirati osobinama fluida. Obično dodatak male količine tečnog modifikatora može znatno povećati efikasnost i smanjiti vreme ekstrakcije. Od svih modifikatora najčešće se koristi metanol, pošto se do 20% meša sa CO₂. Iako nije polaran kao metanol, etanol bi mogao biti bolji izbor u SFE prirodnih proizvoda zbog manje toksičnosti. Zavisno od osobina uzorka i željenih jedinjenja, najbolji modifikator se obično određuje na osnovu preliminarnih eksperimenata. Modifikatori, odnosno kosolventi deluju specifičnim hemijskim interakcijama (vodonične veze, kiselo-bazne interakcije) ili fizičkim interakcijama (dipol-dipol, indukivni dipol) sa rastvorkom ili interakcijom sa rastvaračem. Pored toga, kosolvent može da obezbedi specifičan mehanizam za selektivnu

ekstrakciju. Upotrebom kosolventa ostvaren je značajan napredak u praktičnoj primeni superkritične ekstrakcije. Međutim, pri dodavanju kosolventa mora se imati u vidu da čak i njegove male količine menjaju kritične osobine rezultujuće smeše sa superkritičnim fluidom, tj. može izazvati lošu selektivnost, odnosno mnoga neželjena jedinjenja, kao što su hlorofili i voskaste materije, mogu se ekstrahovati zajedno sa željenim jedinjenjima. U stvari, modifikatori nisu neophodni i nisu od pomoći u svim SFE procesima. U nekim slučajevima, modifikator može samo neznatno povećati prinos, tako da nije neophodan.

Iako su freoni, amonijak i organski rastvarači primenjivani kao superkritične tečnosti, najčešće korišćeni superkritični fluid je ugljen-dioksid, zbog svoje male toksičnosti i nezapaljivosti, niskih kritičnih uslova i hemijske inertnosti (de Castro i García-Ayuso, 1998).

Prednosti i nedostaci SFE

SFE daje neobične mogućnosti za selektivne ekstrakcije i frakcionisanja, pošto se na rastvorljivost jedinjenja u superkritičnom fluidu može uticati promenom pritiska i/ili temperature fluida. Štaviše, superkritični fluidi imaju gustinu tečnosti i mogu da rastvaraju čvrste supstance kao i tečni rastvarač. Rastvorljivost čvrste supstance u superkritičnom fluidu se povećava sa gustinom fluida, koja se može postići pri visokim pritislima.

Rastvorene supstance se mogu izdvojiti iz fluida smanjenjem gustine superkritičnog fluida, najčešće smanjenjem pritiska. Dakle, superkritičnom ekstrakcijom se može eliminisati postupak koncentrovanja, koji obično dugo traje. Osim toga, rastvorak se može razdvojiti od superkritičnog rastvarača bez gubitka lako isparljivih jedinjenja, usled ekstremne isparljivosti superkritičnog fluida.

Koeficijent difuzije superkritičnog fluida je jedan do dva puta veći od tečnih rastvarača, što omogućuje brzi prenos mase i daje veću brzinu ekstrakcije od konvencionalne. Superkritična ekstrakcija ugljen-dioksidom primenjuje umerene temperature. Niska superkritična temperatura je pogodna za ekstrakciju termolabilnih jedinjenja. Pošto se u SFE koristi vrlo malo (organski modifikatori) ili se ne koriste organski rastvarači, sa ekološkog aspekta je prihvatljivija od konvencionalne čvrsto-tečno ekstrakcije. Uređaj za SFE se može direktno vezati sa aparatom za hromatografiju, za simultanu ekstrakciju i kvantifikaciju visoko isparljivih ekstrahovanih jedinjenja.

Prva industrijska ekstrakcija superkritičnim fluidom bila je primenjena u Nemačkoj 1978. godine za dekofeinizaciju zrna zelene kafe. Dve godine kasnije, u Austriji, Carlton and United Breweries razvili su proces ekstrakcije arome hmelja pomoću ugljen-dioksida. Obe primene su bile komercijalno uspešne i dovele su do brojnih varijacija i poboljšanja koja su primenjena na industrijskom nivou (Raventós i sar., 2002).

Veličina čestica i način pripreme uzorka su veoma važni za ekstrakciju ulja, pa je neophodno njihovo mlevenje ili smanjenje sadržaja vlage (sušenje).

Izostanak kontinualnih sistema za ekstrakciju čvrstih materijala nameće ozbiljne restrikcije kapaciteta. Najvažnije ograničenje SFE je cena neophodne opreme. Međutim, ekonomski razlozi i uslovi SFE ograničili su primenu na neka vrlo specijalizovana polja. Za sada se proizvode samo skupi proizvodi u malim količinama, ali u budućnosti bi tehnika mogla biti ekonomski konkurentna za dobijanje većih količina proizvoda.

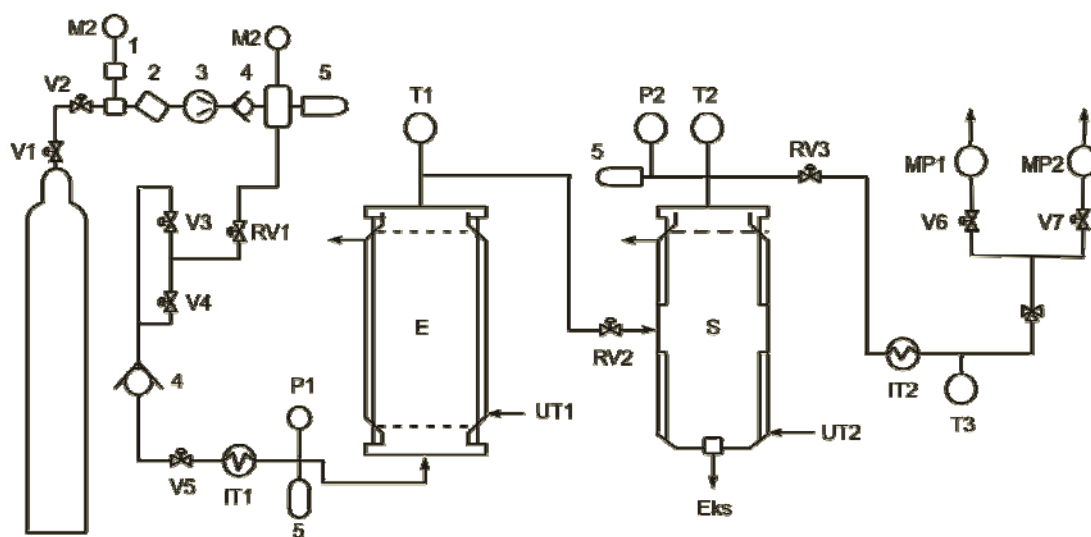
Može se rezimirati da su prednosti ekstrakcije superkritičnim fluidima (SF) nad destilacijom vodenom parom ili klasičnim rastvaračima (heksan, etanol) sledeće (Lang i Wai, 2001; Wang i Weller, 2006; Sovilj, 2004):

- netoksičnost superkritičnog fluida;
- superkritični fluidi imaju relativno manji viskozitet i veću difuzivnost (difuzivnost SF je $\sim 10^{-4}$ cm²/s, a tečnih rastvarača $\sim 10^{-5}$ cm²/s). Stoga, SF može da prođe u porozne čvrste materijale efektivnije od tečnih rastvarača i postigne veći prenos mase sa kraćim vremenom ekstrakcije. Na primer, vreme ekstrakcije se može skratiti od nekoliko sati ili dana (pri ekstrakciji tečno-čvrsto) na nekoliko desetina minuta;
- pri SFE svež fluid prolazi kontinualno kroz uzorak, i stoga omogućuje kvantitativnu ili kompletnu ekstrakciju;
- pri superkritičnoj ekstrakciji, rastvorna moć fluida se može menjati promenom pritiska i/ili temperature, i tako se može postići značajno velika selektivnost. Ova "podesiva" rastvorna moć SF je posebno korisna za ekstrakciju kompleksnih uzoraka kao što su biljni materijali. Rastvaranje pojedinih komponenata u superkritičnom stanju može se objasniti, između ostalog, i gustinom superkritičnih fluida, koja je slična gustini tečnosti, odnosno jakim intermolekularnim silama, koje su rezultat gusto pakovanih molekula rastvarača oko molekula rastvorka;
- rastvorene supstance u superkritičnom ugljen-dioksidu mogu se lako izdvojiti snižavanjem pritiska ili temperature, pa se eliminiše koncentrovanje uzoraka, koje obično dugo traje i ima za posledicu gubitak isparljivih jedinjenja;
- SFE se obično izvodi na niskim temperaturama koje izazivaju manje promene termički nestabilnih komponenata u ekstraktu, pa zato može biti idealna tehnika za separaciju termolabilnih jedinjenja;
- SFE se može direktno povezati sa hromatografijom, što može biti korisno sredstvo za ekstrakciju i kvantifikaciju visokoisparljivih jedinjenja;
- u poređenju sa masom uzorka 20–100 g, obično potrebnih za tečno-čvrsto ekstrakcije, za SFE je potrebno mnogo manje (0,5–1,5 g). Objavljeno je da se iz samo 1,5 g svežeg biljnog materijala primenom SFE može dobiti više od 100 isparljivih i poluisparljivih jedinjenja, a zatim ih detektovati gasnom hromatografijom i masenom spektroskopijom (GC-MC), od kojih je više od 80 jedinjenja u dovoljnoj količini za kvantitativno određivanje (Henning i sar., 1994);
- u procesu SFE nije potrebno ili je potrebno vrlo malo organskih rastvarača (modifikatora);
- u velikim pogonima za SFE, fluid (obično CO₂) se može reciklirati ili ponovo koristiti, što smanjuje potrošnju rastvarača potrebnog za ekstrakciju, odnosno cenu procesa;
- SFE se može primeniti na sisteme različitog kapaciteta - od analitičkih (manje od grama do nekoliko grama uzorka), preparativnih (nekoliko stotina grama uzorka), i pilot (kilogram uzorka) do velikih industrijskih postrojenja (tone sirovine, kao što je SFE kafe);
- eliminisan je problem sa reziduama toksičnih rastvarača;
- ekstrakti dobijeni SFE sa CO₂ imaju skoro ista organoleptička svojstva kao i polazni materijal.

Uređaji za superkritičnu ekstrakciju

Svaki postupak sa superkritičnim fluidom podrazumeva najmanje dve samostalne operacije: superkritičnu ekstrakciju i postupak separacije dobijenih produkata ekstrakcije. Postupci koji prate superkritičnu ekstrakciju iz nekog materijala su: zagrevanje materijala, hlađenje produkata, transport polazne smeše, rastvarača i produkata, kao i kondenzacija produkata. U osnovi, bitno je da se rastvorak izdvaja iz polazne smeše na povišenom pritisku i transportuje zajedno sa rastvaračem do odgovarajućeg separatora. U separatoru (jednom ili više) rastvorak se razdvaja od rastvarača tako što se smanjuje moć rastvaranja rastvarača. Sve navedene faze u radu sa superkritičnim fluidom zahtevaju specijalne uređaje, koji su namenski pravljene za ove svrhe.

Primer uređaja za ekstrakciju sa superkritičnim fluidom korišćen je pri ekstrakciji etarskih ulja i drugih aktivnih komponenata, značajnih za prehrambenu i farmaceutsku industriju (plodovi kleke, mlevna začinska paprika, lekovito bilje i dr.) (slika 11). U aparaturi se biljni materijal u ekstraktoru (E) najpre oslobađa prisutnog vazduha produvanjem ugljen-dioksida u gasovitom stanju, nakon čega se zatvore ventil (V₅) i regulacioni ventil (RV₂). Ultratermostatima (UT₁) i (UT₂) se održavaju radne temperature u ekstraktoru i separatoru (S) pri zatvorenom ventilu (V₁) boce sa ugljen-dioksidom. Zatim se, nakon otvaranja ventila od V₁ do V₅ (V₄ je zatvoren), kompresor na kome je podešen pritisak nešto iznad radnog pritiska pusti u pogon i regulacionim ventilom (RV₁) se podesi radni pritisak ekstrakcije. Ugljen-dioksid se nakon prolaska kroz izmenjivač toplote (IT₁) otvaranjem ventila (V₅) uvodi u ekstraktor pri čemu je regulacioni ventil (RV₂) zatvoren. Otvaranjem i podešavanjem regulacionih ventila (RV₂) i (RV₃) se ostvaruje pritisak u separatoru, kao i održavanje željenog protoka ekstrakta (Zeković, 1998).



Slika 11. Šema uređaja za superkritičnu ekstrakciju

Primena SFE

SFE je potencijalna alternativa konvencionalnoj metodi ekstrakcije sa organskim rastvaračima za ekstrakciju biološki aktivnih komponenata iz biljnih materijala. Veliki je broj literaturnih navoda koji se bave ispitivanjem superkritične ekstrakcije različitih sirovina: karotenoida iz mrkve (Vega i sar., 1996; Sun i Temelli, 2006), algi (Mendes i sar. 1995), luka (Simándi i sar., 2000), hmelja (Zeković i sar., 2007), kleke (Barjaktarović i sar., 2005), luteina iz cvetnih latica (Ambrogi i Eggers, 1997), likopen iz paradajza (Favati i sar., 1997; Vasapollo i sar., 2004; Sabio i sar., 2003), aromatičnog bilja (Zeković i sar., 2000). U radu Palmer i Ting (1995) dat je veliki broj primera ekstrakcije masti i ulja, holesterola iz namirnica životinjskog porekla, frakcionisanja i rafinisanja masti i ulja i ekstrakcije aroma iz biljnih materijala. S obzirom na temu ovog rada, od posebnog interesa su radovi u kojima su se autori bavili superkritičnom ekstrakcijom paprike pomoću ugljen-dioksida (Daood i sar., 2002; Uquiche i sar., 2004; Vesper i Nitz, 1997a, 1997b; Skerget i sar., 1998; Jarén-Galán i sar., 1999; Weathers i sar., 1999; del Valle i sar., 2003; Ambrogi i sar., 2002; Gnaifed i sar., 2001b; Duarte i sar., 2004).

Superkritična ekstrakcija začinske paprike

Oleorizini začinske paprike mogu se smatrati funkcionalnim dodacima ishrani, zbog znatnog sadržaja karotenoida i antioksidativnih vitamina, kao što su E i C.

Kvalitet oleorizina začinske paprike koji se dobijaju superkritičnom ekstrakcijom zavisi od primenjenog rastvarača, uslova pod kojima se ekstrakcija izvodi, kao i karakteristika polazne sirovine, tj. mlevene začinske paprike (sorta, stepen zrelosti, klimatski i geografski uslovi, uslovi uzgoja, uslovi prerade, kao i uslovi skladištenja). Kvalitet dobijenog oleorizina iste sorte paprike zavisi takođe od udela semena u gotovom proizvodu. Naime, ukoliko se melje samo perikarp ploda, oleorizin praktično predstavlja koncentrat boje sa vrlo malo ulja, a prinos ekstrakcije je mali. Ukoliko se perikarp meša u određenom odnosu sa semenom, ulje iz semena, koje se dobro rastvara u superkritičnom fluidu, znatno povećava prinos, ali pritom "razblažuje" bojene materije u finalnom proizvodu. Iz tabele 2 se mogu videti neki primeri karakteristika oleorizina u zavisnosti od sirovine (Lock i Simándi, 2001). Ekstrakcijom indijske čili paprike pomoću CO₂ mogu se dobiti ekstrakti boje do 3.000 ASTA jedinica, sa 2–2,5% kapsaicina, koji se mogu ukloniti. Kao rezultat se dobija ekstrakt sa 5.000 i više ASTA jedinica i ljuta frakcija sa preko 20% (w/w) kapsaicina.

Optimalni pritisak za proizvodnju oleorizina paprike trebao bi biti od 350 do 500 bara. Viši pritisci brzo ekstrahuju masno ulje, koje se ponaša kao "nosáč" pigmentata. Ispod 300 bara rastvorljivost pigmentata je isuviše mala i ekstrahuju se uglavnom masna ulja.

Niži pritisak daje mali prinos, posebno kapsantina (oko 48% početnog sadržaja). Veći pritisak ekstrakcije (500 bara) omogućuje ekstrakciju kapsantina.

Na konstantnoj temperaturi, primenjeni pritisak određuje kapacitet rastvorljivosti ulja u superkritičnom ugljen-dioksidu (Tabela 3). Pored ugljen-dioksida, u superkritičnoj ekstrakciji mogu se upotrebiti i drugi rastvarači. Ukoliko se kao superkritični fluid koristi propan, sadržaj boje u oleorizinima može biti 4-5 puta veći od boje oleorizina dobijenih ekstrakcijom SC-CO₂ (Daood i sar., 2002; Gnaifed i sar., 2001b). Primenjeni pritisak pri ekstrakciji propanom ne utiče na sadržaj karotenoida, tako da se ovim rastvaračem može

dobiti oleorizin sa velikim sadržajem boje i pri pritiscima nižim od 30 bara. Značajna razlika između SC-CO₂ i subkritičnog propana je u količini potrebnog rastvarača, tj. utrošeno je oko 10 puta manje propana. Štaviše, pokazale su se i velike razlike u intenzitetu boje oleorizina dobijenih pomoću ova dva rastvarača. Međutim, velika rastvorljivost karotenoida u subkritičnom propanu, uključujući β -karoten, izaziva značajno visok sadržaj *cis*-izomera u ekstraktu.

Tabela 2. Kvalitet oleorizina u zavistnosti od sorte paprike

Sorta	Boja sirovine	Boja oleorizina	Primedbe
Sweet Paprika Hungary	50 ASTA	350 – 500 ASTA (prinos 15-17%)	sa semenom i drškom
Paprika Sweet Hungary "Kalocsai"	120 ASTA	1.200 – 1.400 ASTA	bez semena
Paprika Sweet Hungary "Kalocsai"	140 ASTA	1.500 – 1.650 ASTA	bez semena
Chilli Sweet India	150 ASTA	1.800 – 2.000 ASTA	bez semena
Paprika Sweet Spain	200 ASTA	2.200 – 2.500 ASTA	bez semena
Paprika Sweet South Afrika	240 ASTA	> 2500 ASTA	bez semena

Tabela 3. Sadržaj glavnih karotenoida u oleorizinu ljute paprike dobijenom superkritičnim ugljen-dioksidom i subkritičnim propanom pod različitim uslovima

Uslovi ekstrakcije			Sadržaj karotenoida ($\mu\text{g/g}$ ulja)			
P (bar)	Temperatura (°C)	Rastvarač	β -Karoten	<i>cis</i> - β -Karoten	Diistri	Ukupno
200	35	CO ₂	409	133	53	943
300	35	CO ₂	470	120	206	1.470
400	35	CO ₂	791	252	479	3.317
200	55	CO ₂	397	111	120	1.312
300	55	CO ₂	403	131	559	2.288
400	55	CO ₂	609	179	413	2.587
200	25	CO ₂	485	152	168	1.617
50	25	Propan	1.981	589	6.110	14.376
80	25	Propan	1.941	529	5.681	13.828

Vesper i Nitz (1997b) su uporedili primenu superkritičnog CO₂ na 350 bara i 50°C sa primenom heksana i utvrdili da je heksan imao neznatno veći sadržaj karotenoida, dok su ekstrakti dobijeni SFE imali veći sadržaj vode. Nakon skladištenja ovih ekstrakata na 40°C utvrđeno je da su ekstrakti dobijeni SFE imali lošiju stabilnost masnih kiselina u poređenju sa uzorcima dobijenim ekstrakcijom sa heksanom (Vesper i Nitz 1997a).

Jarén-Galán i sar. (1999) i Skerget i sar. (1998) analizirali su uticaj temperature i pritiska na sastav ekstrakata paprike. Utvrđeno je da je selektivnost CO₂ veća na nižim temperaturama (40°C) i da je optimalni pritisak za ekstrakciju aromatičnih jedinjenja 150 bara, a bojenih materija 400 bara (Skerget i sar. 1998). Do sličnih zaključaka došli su i Stahl i sar. (1988). Nakon daljih analiza utvrđeno je da su pigmenti izdvojeni pri nižim pritiscima sadržavali uglavnom β-karoten. Ekstrakti dobijeni pri višim pritiscima sadržavali su veće količine kapsorubina i kapsantina, zeaksantina i β-kriptoksantina, a malo β-karotena. Del Valle i sar. (2003) zabeležili su da radni pritisak >290 bara nije imao uticaja na brzinu ekstrakcije i prinos, dok je veličina čestica imala najvažniji uticaj na kinetiku ekstrakcije.

2.4. NORME KVALITETA MLEVENE ZAČINSKE PAPRIKE I OLEORIZINA

Prema Pravilniku o kvalitetu proizvoda od voća, povrća i pečurki i pektinskih preparata (Sl. list SFRJ, 1/79), mlevena začinska paprika je proizvod dobijen mlevenjem zrelih plodova paprike (*Capsicum annuum* L. var. *Longum*, *Grossum*, *Abreviatum*, *Typicum*, itd.). Melju se perikarp i seme.

Mlevena začinska paprika koja se stavlja u promet mora ispunjavati sledeće uslove:

- da je karakteristično crvena, crveno-narandžasta ili bledo-crvena;
- da je ukus bez ljutine, ljut ili blago ljut;
- da je miris prijatan i karakterističan;
- ne sme imati strane mirise i loš ukus (nakiseo, gorak, plesniv, miris na užeglost);
- ne sme sadržavati žive i mrtve insekte ili njihove delove, zagađenja od glodara i plesni vidljive golim okom ili uz upotrebu povećanja od 10 puta;
- ne sme sadržavati strane materije i druge materije biljnog porekla, materije za bojenje, ulje i druge materije koje prividno poboljšavaju kvalitet i prikrivaju nedostatke. Ove materije mogu se delimično otkriti mikroskopski.

Mlevena začinska paprika stavlja se u promet (Sl. list SFRJ, 1/79) kao:

1. delikates ekstra mlevena začinska paprika;
2. delikates mlevena začinska paprika;
3. crvena slatka mlevena začinska paprika;
4. crvena ljuta mlevena začinska paprika;
5. bledo-crvena ljuta mlevena začinska paprika.

Internacionalni standard ISO 7540-1984 (E) za mlevenu začinsku papriku propisuje tri klase mlevene začinske paprike u zemljama glavnim proizvođačima (Mađarska, Španija, Bugarska i Rumunija). U I klasu ubrajaju se delikates ekstra, delikates i crvena slatka mlevena začinska paprika, u II klasu ubrajaju se crvena ljuta mlevena začinska paprika, dok III klasi pripada bledo-crvena ljuta mlevena začinska paprika.

Delikates ekstra mlevena začinska paprika proizvodi se od zdravih i zrelih plodova prve berbe, i to od čisto slatkih sorti paprika i mora ispunjavati sledeće uslove:

- da ne sadrži vlage više od 11%;
- da ne sadrži više od 7% pepela ni više od 0,30% pepela nerastvornog u HCl u odnosu na suhu materiju;
- da sadrži najviše 14% etarskog ekstrakta u odnosu na suhu materiju;
- da na 1 kg suve materije sadrži najmanje 3,5 g kapsantina i da ne sadrži kapsaicin.

Delikates mlevena začinska paprika proizvodi se od zdravih i zrelih plodova prve i druge berbe čisto slatkih sorti. Ovaj kvalitet ne sme sadržavati više od 5% mestimično izbledelih delova perikarpa.

Delikates mlevena začinska paprika koja se stavlja u promet mora ispunjavati sledeće uslove:

- da ne sadrži vlage više od 11%;
- da ne sadrži više od 7% pepela ni više od 0,30% pepela nerastvornog u HCl u odnosu na suhu materiju;
- da sadrži najviše 14% etarskog ekstrakta u odnosu na suhu materiju;
- da 1kg suve materije sadrži najmanje 3 g kapsantina i da ne sadrži kapsaicin.

Crvena slatka mlevena začinska paprika proizvodi se od zdravih i zrelih plodova prve i druge berbe slatkih sorti paprika. Ovaj kvalitet paprike može u sebi sadržati mali deo ljutih plodova i ne sme sadržati više od 10% mestimično izbledelih delova perikarpa.

Crvena slatka mlevena začinska paprika koja se stavlja u promet mora ispunjavati sledeće uslove:

- da ne sadrži vlage više od 11%;
- da ne sadrži više od 7,5% pepela ni više od 0,55% pepela nerastvorljivog u HCl u odnosu na suhu materiju;
- da sadrži najviše 16% etarskog ekstrakta u odnosu na suhu materiju;
- da na 1 kg suve materije sadrži najmanje 2 g kapsantina i jedva primetnu količinu kapsaicina.

Crvena ljuta mlevena začinska paprika proizvodi se od zdravih i zrelih plodova prve i druge berbe kvalitetnih ljutih sorti. Ovaj kvalitet ne sme sadržati više od 10% mestimično izbledelih delova perikarpa.

Crvena ljuta mlevena začinska paprika koja se stavlja u promet mora ispunjavati sledeće uslove:

- da ne sadrži vlage više od 11%;
- da ne sadrži više od 7,5% pepela ni više od 0,55% pepela nerastvornog u HCl u odnosu na suhu materiju;
- da sadrži najviše 16% etarskog ekstrakta u odnosu na suhu materiju;
- da na 1 kg suve materije sadrži najmanje 2 g kapsantina i kapsaicina od 0,05 do 0,07%.

Bledo-crvena ljuta mlevena začinska paprika proizvodi se od zdravih i nedozrelih ljutih plodova svih berbi.

Bledo-crvena ljuta mlevena začinska paprika koja se stavlja u promet mora ispunjavati sledeće uslove:

- da ne sadrži vlage više od 11%;
- da ne sadrži više od 8,5% pepela ni više od 0,85% pepela nerastvornog u HCl u odnosu na suhu materiju;
- da sadrži najviše 17% etarskog ekstrakta u odnosu na suhu materiju;
- da na 1 kg suve materije sadrži najmanje 1,20 g kapsantina i najmanje 0,07% kapsaicina.

Mlevena začinska paprika može se staviti u promet samo u originalnom pakovanju. Pakuje se u kesice od pergamenta obložene spolja celofanom, kaširane alufolijske kesice ili pergament kesice sa limenom ambalažom. Ambalaža u koju se pakuje mlevena začinska paprika mora biti čista i izrađena od takvog materijala koji ne propušta svetlost, vodu i ulje.

Ekstrakt od paprike je proizvod dobijen ekstrakcijom mlevene začinske paprike, a sadrži prirodnu boju i druge osnovne začinske sastojke koji su rastvoreni u prirodnom ulju paprike.

Ekstrakt od paprike može se proizvoditi i stavlјati u promet i u vidu paste, može mu se dodati određena količina antioksidanata. Može se stavlјati u promet samo u originalnom pakovanju.

Deklaracija za ekstrakt od paprike mora sadržati i podatak o sadržaju boje i kapsaicina (Sl. list SFRJ, 1/79).

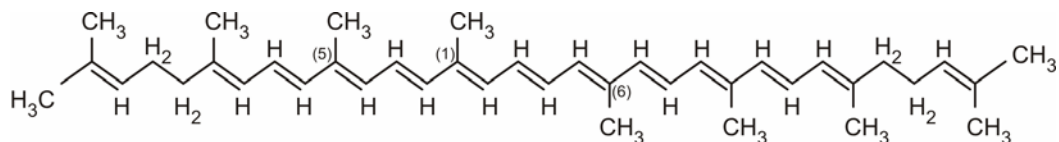
2.5. BOJENE MATERIJE PAPRIKE – KAROTENOIDI

Karotenoidi su najrasprostranjenija grupa pigmenata u prirodi. 1960. godine bilo je poznato oko 80 karotenoida, 1980. oko 500, a danas preko 700. Od 1980. godine objavljeno je oko 7.500 radova o karotenoidima, i oko 1.100 radova o analizi karotenoida (Feltl i sar., 2005; Britton i sar., 2004). Ima ih u svim fotosintetskim organizmima, i nosioci su većine žutih do crvenih obojenja voća, povrća i cveća. Karakteristična boja nekih ptica, insekata i morskih beskičmenjaka potiče od karotenoida. Pošto životinje nemaju sposobnost sinteze karotenoida, izvor ovih jedinjenja nalaze u hrani. Karotenoidi se komercijalno koriste kao sredstva za bojenje namirnica i kao dodaci ishrani. Veliko je interesovanje za primenu karotenoida u ishrani, s obzirom na njihove antioksidativne osobine.

2.5.1. Strukture i nomenklatura

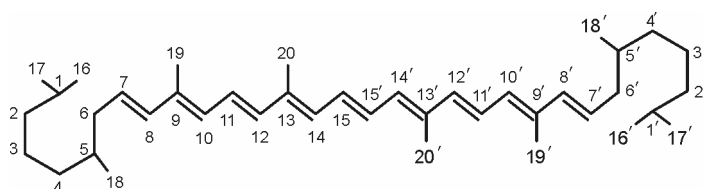
Karotenoidi su grupa ugljovodonika (karoteni) i njihovih oksigenovanih derivata (ksantofili), čiji se molekuli sastoje od osam izoprenskih jedinica i imaju molekulsku formulu $C_{40}H_{56}$. Centralni deo molekula sadrži četiri izoprenske jedinice, čija su dva centra vezana rep-za-rep, i otvoreni lanac ili prsten na krajevima lanca. Dve centralne metil grupe su u položaju 1,6 (slika 12), a ostale neterminalne metil grupe u položaju 1,5. Velika većina prirodnih karotena imaju dvostruke veze u isključivo *trans* položaju. Svega nekoliko prirodnih karotena ispoljavaju *cis-trans* konfiguraciju. Svi karotenoidi mogu se dobiti iz

aciklične strukture $C_{40}H_{56}$ reakcijama hidrogenizacije, dehidrogenizacije, ciklizacije, oksidacije ili kombinacijom navedenih reakcija.



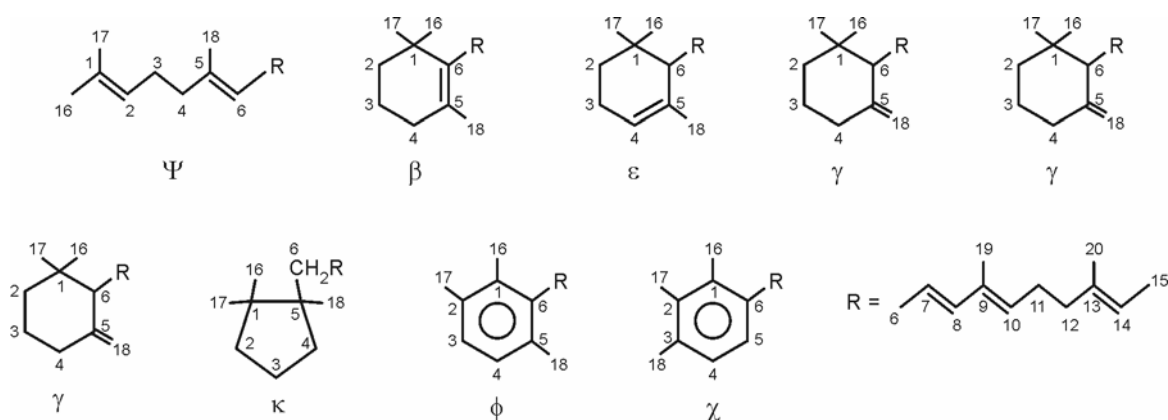
Slika 12. Osnovni ugljovodonični lanac karotenoida

Specifični nazivi izvedeni su iz osnove imena "karoten" koji odgovara strukturi i numerisanju sa slike 13. Pojedina jedinjenja mogu imati C_9 aciklične krajnje grupe sa dve dvostruke veze u pozicijama 1,2 i 5,6 ili ciklične krajnje grupe (slika 14).



Slika 13. Osnovna struktura i numerisanje karotenoida

Mnoga trivijalna imena karotenoida odnose se na njihovo poreklo, npr. β -karoten je izolovan iz mrkve (karote) (tabela 4). Karotenoidi sačinjeni od atoma vodonika i ugljenika nazivaju se *karoteni*. Druga grupa karotenoida su oksigenovani derivati karotena sa različitim kombinacijama, npr. hidroksi-, epoksi-, alkohol-, aldehid-, keto-, lakton-, karbonske kiseline-, estarske- ili fenolne funkcije. Ova jedinjenja se nazivaju *ksantofilima*. Funkcionalne grupe koje sadrže kiseonik ne nalaze se u konjugovanom sistemu dvostrukih veza, već na krajevima lanca. Kod prirodnih karotenoida do sada nije utvrđeno postojanje još nekog heteroatoma osim kiseonika.

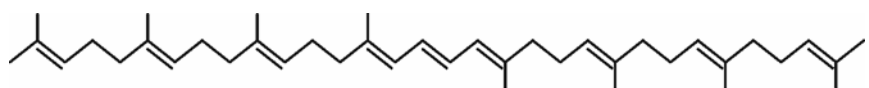


Slika 14. Karakteristične krajnje grupe karotenoida

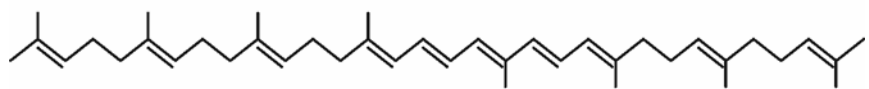
Tabela 4. Trivijalna i IUPAC polusistematska imena nekih karotenoida

Trivijalno ime	Polusistematsko ime
Anteraksantin	5,6-Epoksi-5,6-dihidro- β,β -karoten-3,3'-diol
Astaksantin	3,3'-Dihidroksi- β,β -karoten-4,4'-dion
Auroksantin	5,8,5',8'-Diepoksi-5,8,5',8'-tetrahidro- β,β -karoten-3,3'-diol
Biksin	Metil hidrogen 9'- <i>cis</i> -6,6'-diapokaroten-6,6'-dioat
Kantaksantin	β,β -Karoten-4,4'-dion
Kapsantin	3,3'-Dihidroksi- β,κ -karoten-6'-on
Kapsorubin	3,3'-Dihidroksi- κ,κ -karoten-6,6'-dion
α -Karoten	β,ϵ -Karoten
β -Karoten	β,β -Karoten
β -Karoten-5,6-epoksid	5,6-Epoksi-5,6-dihidro- β,β -karoten
β -Karoten-5,8-epoksid (mutatohrom)	5,8-Epoksi-5,8-dihidro- β,β -karoten
β -Karoten-5,6,5',6'-diepoksid	5,6,5',6'-Diepoksi-5,6,5',6'-tetrahidro- β,β -karoten
δ -Karoten	ϵ,ψ -Karoten
γ -Karoten	β,ψ -Karoten
ζ -Karoten	7,8,7',8'-Tetrahidro- ψ,ψ -karoten
Krocetin	8,8'-Diapokaroten-8,8'-dioinska kielina
α -Kriptoksantin	β,ϵ -Karoten-3'-ol
β -Kriptoksantin	β,β -Karoten-3-ol
Ehinenon	β,β -Karoten-4-on
Lutein	β,ϵ -Karoten-3,3'-diol
Lutein-5,6-epoksid (taraksantin)	5,6-Epoksi-5,6-dihidro- β,ϵ -karoten-3,3'-diol
Likopen	ψ,ψ -Karoten
Neoksantin	5',6'-Epoksi-6,7-didehidro-5,6,5',6'-tetrahidro- β,β -karoten-3,5,3'-triol
Neurosporen	7,8-Dihidro- ψ,ψ -karoten
Fitoen	7,8,11,12,7',8',11',12'-Oktahidro- ψ,ψ -karoten
Fitofluen	7,8,11,12,7',8'-Heksahidro- ψ,ψ -karoten
Rubiksantin	β,ψ -Karoten-3-ol
Violaksantin	5,6,5',6'-Diepoksi-5,6,5',6'-tetrahidro- β,β -karoten-3,3'-diol
α -Zeakaroten	7',8'-Dihidro- ϵ,ψ -karoten
β -Zeakaroten	7',8'-Dihidro- β,ψ -karoten
Zeaksantin	β,β -Karoten-3,3'-diol
Zeinoksantin	β,ϵ -Karoten-3-ol

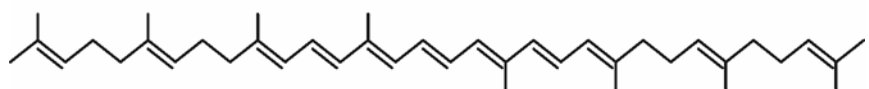
Na slikama 15a-15e prikazane su strukturne formule nekih karotenoida (Britton i sar., 2004).



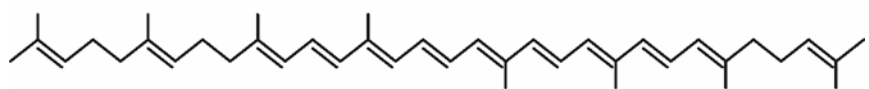
FITOEN



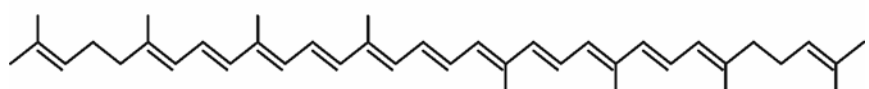
FITOFLUEN



ζ - KAROTEN

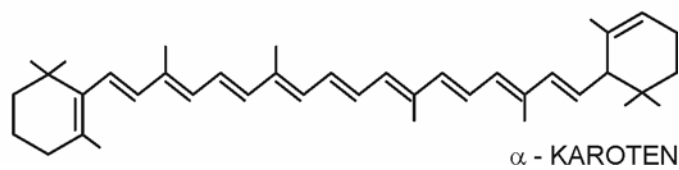
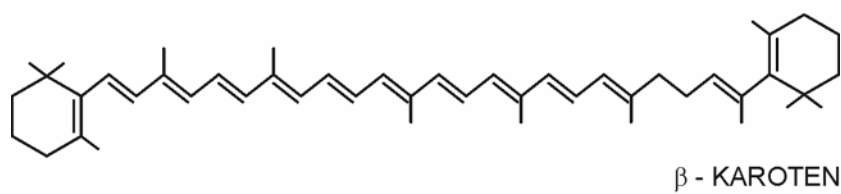
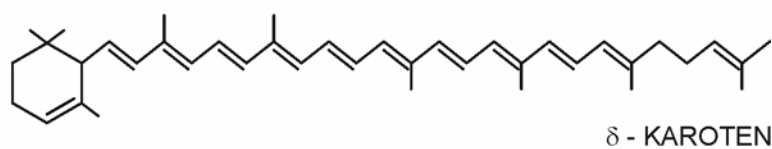
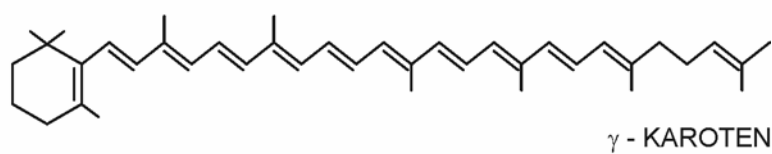
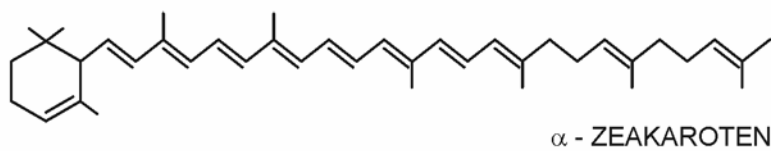
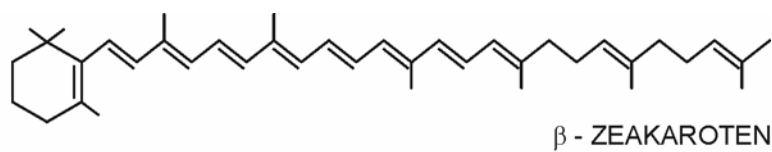


NEUROSPOREN

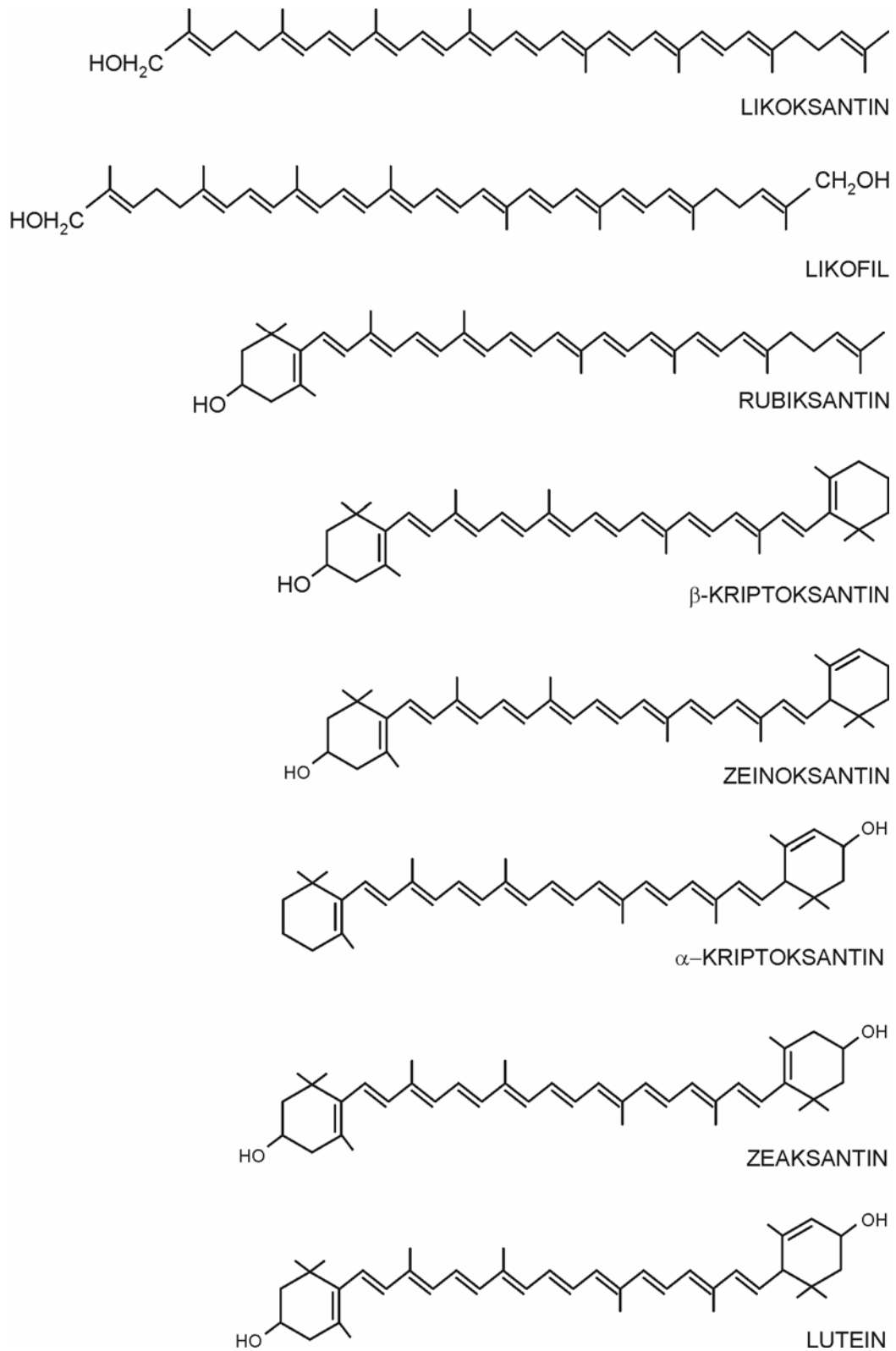


LIKOPEN

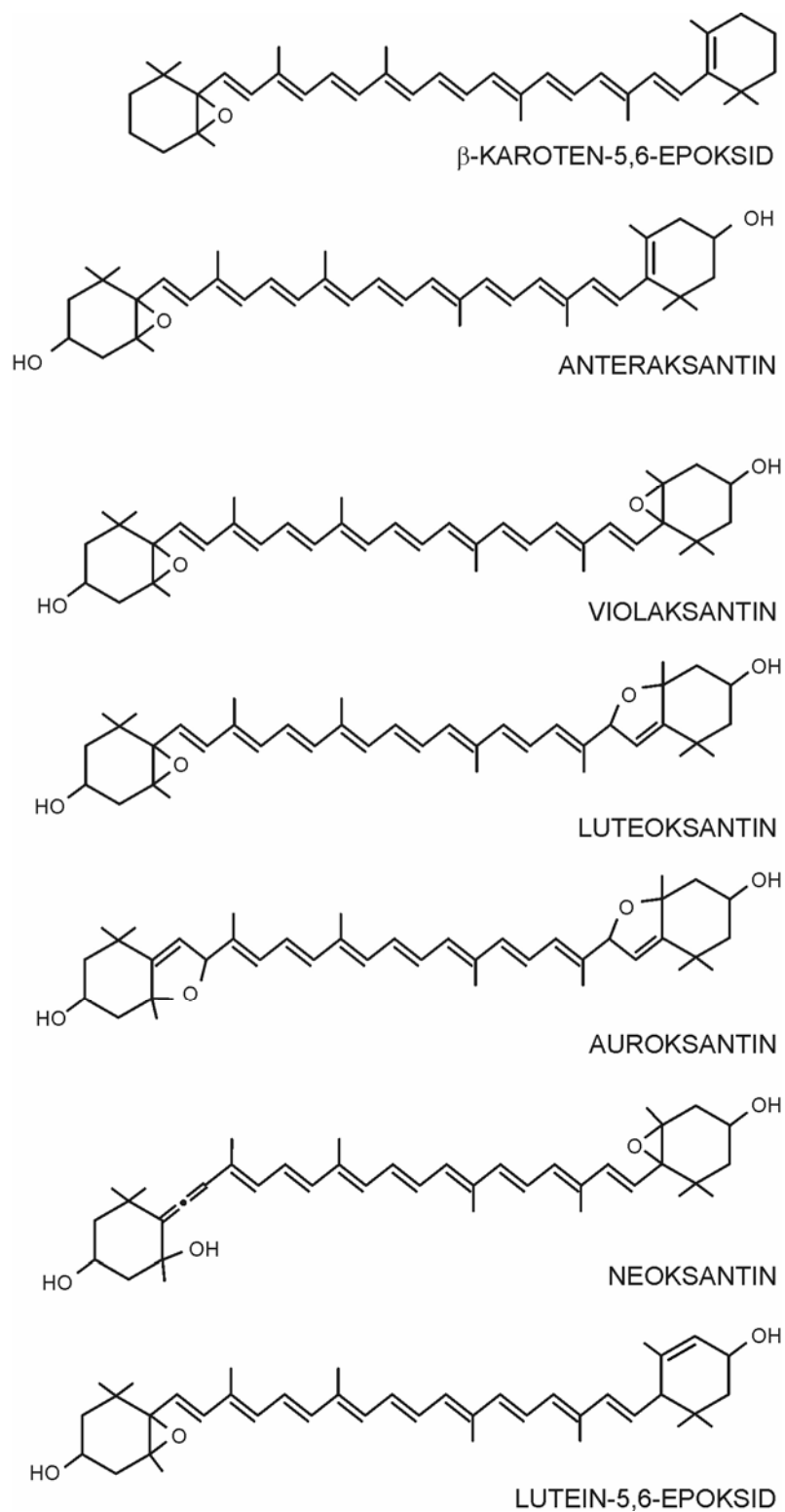
Slika 15a. Strukturne formule acikličnih karotena



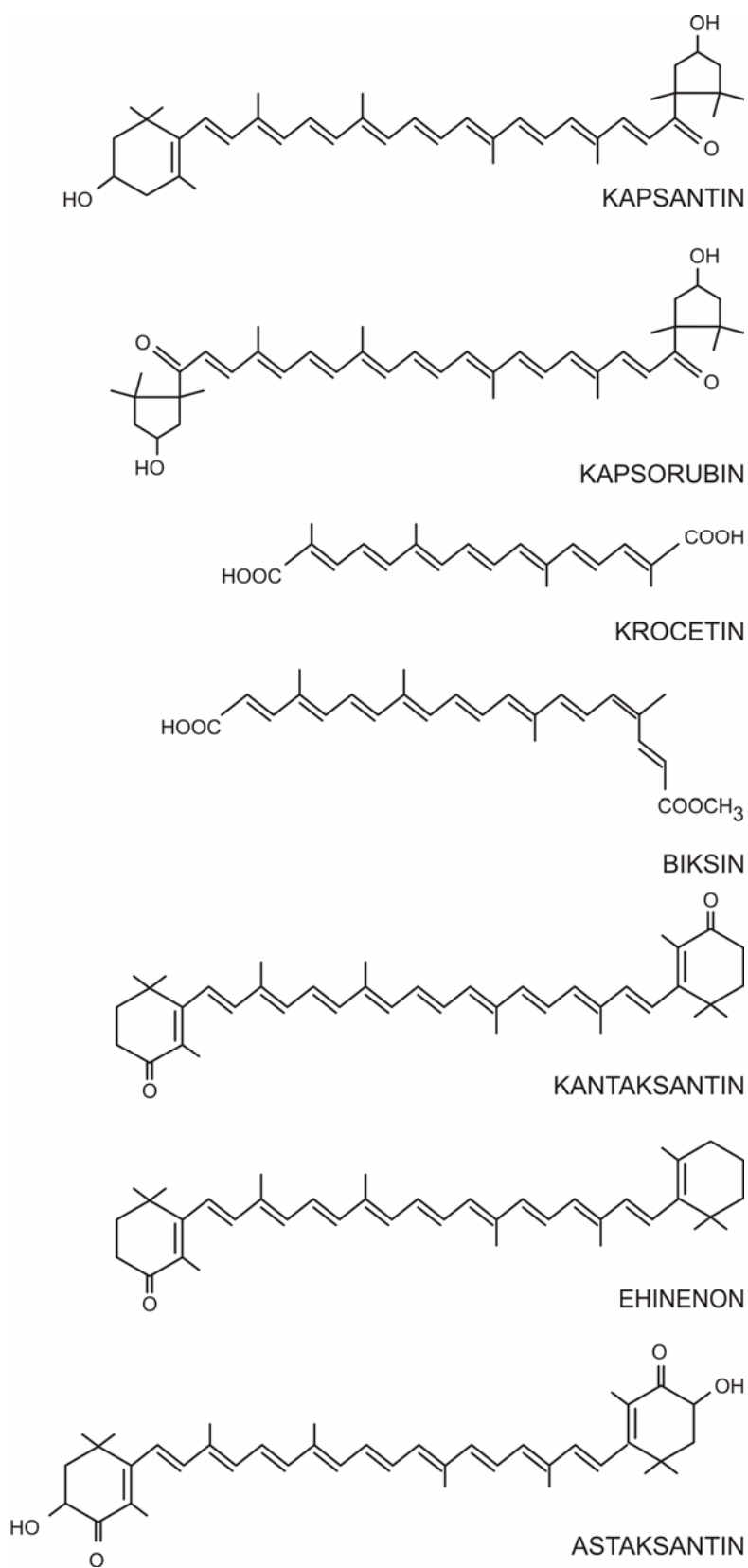
Slika 15b. Strukturne formule cikličnih karotena



Slika 15c. Strukturne formule nekih karotenola (hidroksikarotenoida)



Slika 15d. Strukturne formule nekih epoksi karotenoida



Slika 15e. Strukturne formule nekih tipičnih biljnih i animalnih karotenoida

2.5.2. Rasprostranjenost u prirodi

Karotenoidi u ljudskoj ishrani su uglavnom poreklom iz biljaka, u kojima su rasprostranjeni u korenju, izdancima, semenu, lišću, plodovima i cveću. U voću i povrću koje se koristi u ljudskoj ishrani identifikovano je oko 60 različitih karotenoida. U tabeli 5 dat je sadržaj karotenoida u nekim sirovinama (Fraser i Bramley, 2004).

Tabela 5. Sadržaj karotenoida (mg/100g) u nekim namirnicama

Namirnica	α -Karoten	β -Karoten	Lutein	Likopen	β -Kriptoksantin
Jabuka	–*	0,022	0,051	–	0,010
Kajsija	0,037	0,953	0,066	–	0,130
Banana	0,042	0,038	0,022	–	–
Kupina	0,004	0,078	–	–	0,000
Borovnica	0,000	0,204	–	–	–
Prokelj	–	0,324	0,669	–	–
Crveni kupus	–	0,006	0,017	–	–
Mrkva	2,186	7,975	0,271	–	–
Celer, zeleni	–	0,570	0,860	–	–
Celer, beli	–	0,065	0,163	–	–
Grejpfrut	0,006	0,005	0,008	–	0,003
Grejpfrut, crveni	0,000	1,310	0,000	3,362	0,000
Praziluk	–	0,069	0,121	–	–
Mango	–	1,30	–	–	0,054
Dinja	–	0,03	–	–	–
Nektarina	–	0,05	–	–	0,03
Narandža	0,016	0,025	0,092	–	0,266
Mandarina	0,016	0,152	0,106	–	1,309
Peršun	–	5,062	8,006	–	–
Breskva	0,003	0,084	0,060	–	0,070
Paradajz	–	0,608	0,077	2,718	–
Paradajz, sok	–	0,423	0,030	9,675	–
Kečap	–	5,000	0,210	9,900	–
Paradajz pire	–	0,480	0,110	14,57	–
Lubenica	0,000	0,154	0,027	3,477	–

* nema navedenih vrednosti

β -karoten je najrasprostranjeniji karotenoid u prirodi. Najviše ga ima u kajsiji, mrkvi, mango. α -Karotena ima dosta u mrkvi i bundevi, γ -karotena i rubiksantina u šipku, β -kripto-

ksantina u breskvi, nektarinama, urmama, paprici, likopena u paradajzu, lubenici, šipku, crvenom i ružičastom grejpfrutu, guavi, papaji, luteina u lišću, zelenom povrću, žutom cveću, zeaksantina u žutom kukuruzu i paprici.

Sadržaj karotenoida u biljci zavisi od vrste i tipa biljke, dela biljke koji se koristi, stepena zrelosti, klimatskih i geografskih uslova, uslova uzgoja, vremena berbe, uslova skladištenja (temperatura, svetlost) i uslova prerade.

Biološka iskoristivost karotenoida iz namirnica – Biološka iskoristivost je definisana kao deo unete hrane koji je iskoristiv za fiziološke funkcije organizma ili kao njegova rezerva. Postoji nekoliko faktora koji utiču na biološku dostupnost karotenoida: vrsta karotenoida, molekulske veze, količina uneta hranom, sredina u kojoj je karotenoid inkorporiran, ostvarena apsorpcija i biokonverzija. Pošto su karotenoidi liposolubilni, u crevima se lakše apsorbuju iz masne hrane, mada je potrebna količina lipida mala, oko 3-5 g po obroku (Fraser i Bramley, 2004). Izgleda da su *cis*-izomeri bolje biološki dostupni od *trans*-izomera, verovatno zbog bolje rastvorljivosti u micelama žučne kiseline i tako bolje inkorporiranosti u hilomikronima (česticama masti, uključenim u metabolizam masti). Navodi se da pojedini karotenoidi antagonišu apsorpciju drugih.

2.5.3. Uloga i značaj u organizmu životinja

Provitaminska aktivnost – Provitaminska aktivnost je najbolje poznata funkcija karotenoida. Da bi neko jedinjenje bilo provitamin A, potrebno je da u molekulu sadrži nezasićen β -prsten sa polienskim lancem C_{11} . Adiranjem vode na kraj lateralnog polienskog lanca β -karotena dobijaju se dva molekula vitamina A. Prema tome, β -karoten je snažan provitamin A, sa 100% aktiviteta. Jedinjenja koja imaju nezasićeni prsten imaju polovinu bioaktivnosti u odnosu na β -karoten. To su γ -karoten, α -karoten, β -kriptoksantin, α -kriptoksantin, β -karoten-5,6-epoksid. Aciklični karotenoidi (bez β -prstena) i ksantofili (sa β -prstenom, koji imaju hidroksi, epoksi ili karbonilne grupe) nemaju provitaminsku vrednost (Rodriguez-Amaya, 2001).

Antioksidativna svojstva – Pored značajne uloge u organizmu u zaštiti od kardiovaskularnih bolesti i nekih vrsta kancera i zaštite biljaka od fotooksidativnih procesa (Deli i sar., 2001.), karotenoidi su i dobri antioksidanti, zahvaljujući sposobnosti dvostrukih veza polienskog lanca da "hvataju" slobodne radikale, kao i da vezuju singletni kiseonik (Müller, 1997; Matsufuji i sar., 1998). Antioksidativnu aktivnost pokazuju jedinjenja sa najmanje devet dvostrukih veza u polienskom lancu. Na antioksidativne osobine utiče broj konjugovanih dvostrukih veza u molekulu, struktura lanca, kao i funkcionalne grupe (Matsufuji i sar., 1998).

Uloga u prevenciji bolesti – U literaturi su se 1970-tih godina pojavili navodi o vezi između velikog unosa karotenoida i koristi po zdravlje. Provitamini A mogu da spreče neka oboljenja oka. Pojedini karotenoidi mogu da redukuju slučajeve katarakte i makularne degeneracije. U literaturi se mogu naći podaci da su karotenoidi ključni faktor u redukciji slučajeva nekih bolesti (kancer), ali i da se u visokorizičnim grupama (npr. pušači) može dogoditi suprotan efekat pri visokim dozama karotenoida, verovatno zbog njihovih prooksidativnih osobina.

2.5.4. Fizičko – hemijske osobine

Rastvorljivost

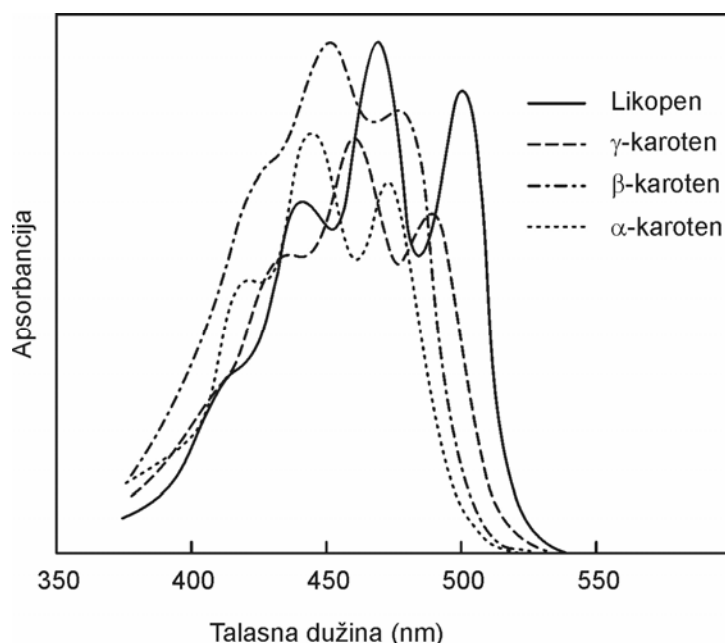
Pored nekoliko izuzetaka, većina karotenoida je lipofilna. Nerastvorni su u vodi, a rastvaraju se u organskim rastvaračima kao što su aceton, alkohol, etil etar, hloroform, etil acetat. Karoteni se lako rastvaraju u petrol etru, heksanu i toluenu. Ksantofili se bolje rastvaraju u metanolu i etanolu. Kristalni karotenoidi se teže rastvaraju u pomenutim rastvaračima, ali se rastvaraju u benzenu i dihlormetanu.

Apsorpcija svetlosti

Sistem konjugovanih dvostrukih veza čini hromofornu grupu koja apsorbuje svetlost, dajući pri tome boju karotenoidima i apsorpcioni spektar na osnovu koga se mogu identifikovati i kvantitativno odrediti. Promena ili gubitak boje tokom analize ukazuju da je došlo do degeneracije ili neke promene u strukturi molekula.

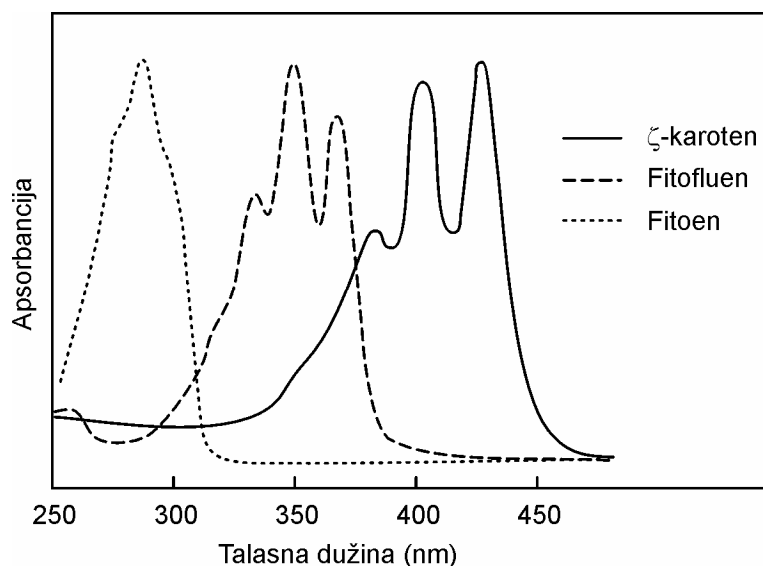
Karotenoidi se mogu identifikovati na osnovu UV i VIS spektra. Talasna dužina maksimuma apsorpcije (λ_{\max}) i oblik spektra su karakteristika hromofora (Rodriguez-Amaya, 2001).

Većina karotenoida ima tri maksimuma apsorpcije (tabela 6) (Rodriguez-Amaya, 2001). Povećanje broja konjugovanih dvostrukih veza daje veće vrednosti λ_{\max} . Stoga, najnezasićeniji aciklični karotenoid, likopen, sa 11 konjugovanih dvostrukih veza, je crven i maksimumi apsorpcije su na talasnim dužinama λ_{\max} 444, 470 i 502 nm (slika 16). Da bi karotenoid imao vidljivu boju, potrebno je da u molekulu ima najmanje 7 konjugovanih dvostrukih veza. Tako, npr. ζ -karoten je svetlo žut. Pošto je acikličan, njegov spektar ima tri dobro definisana pika, koji su na mnogo manjim talasnim dužinama λ_{\max} 378, 400 i 425 nm u odnosu na likopen (slika 17).



Slika 16. Apsorpcioni spektri likopena, β -karotena, α -karotena i γ -karotena

Dva karotenoida koji prethode ζ -karotenu u biosintezi, fitoen (3 konjugovane dvostruke veze) i fitofluen (5 konjugovanih dvostrukih veza) su bezbojni i imaju maksimume apsorpcije na talasnim dužinama 276, 286 i 297 nm, odnosno 331, 348 i 367 nm (slika 17).



Slika 17. Apsorpcijski spektri ζ -karotena, fitofluena i fitoena

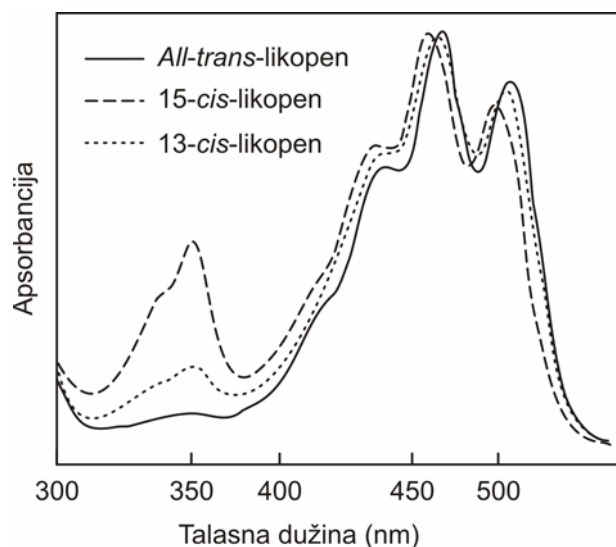
Ciklizacija dovodi do sternih smetnji između metil grupe prstena na C5 i vodonikovog atoma na C8 polienskog lanca. Kao posledica javlja se hipsokromni pomak (pomeranje λ_{\max} ka manjim talasnim dužinama), hipokromni efekat (smanjenje apsorpcije) i lošije definisani pikovi na spektru. Otuda je biciklični β -karoten, iako poseduje isti broj konjugovanih dvostrukih veza kao i likopen, žuto-narandžast, sa λ_{\max} na 450 i 477 nm i sa malim "ramenom" na 425 nm (slika 16). Monociklični γ -karoten je crveno-narandžast i daje spektar između likopenovog i β -karotenovog. Dvostruka veza u ϵ prstenu α -karotena nije konjugovana, ostavljajući 10 konjugovanih dvostrukih veza (9 u polienskom lancu i jednu u β -prstenu). Stoga je ovaj karotenoid svetlo žut i apsorpcijski spektar mu je bolje definisan, sa neznatno manjim λ_{\max} (422, 445 i 473 nm) u odnosu na β -karoten.

Izolovana karbonilna grupa, koja nije u konjugaciji sa hromoforom, ne menja spektar. Karbonilna grupa u konjugaciji sa konjugovanim dvostrukim vezama povećava (proširuje) hromoforu, što dovodi do batokromnog efekta (ka većim talasnim dužinama) i spektra sa lošije definisanim pikovima do te mere da su tri pika vezana u široku krivu (tabela 6).

Uvođenje hidroksi i metoksi supstituenata u molekul karotenoida ne utiče na hromofore i nema uticaja ni na apsorpcijski spektar. Otuda, spektri luteina, zeinoksantina i α -kriptoksantina liče na spektar α -karotena, a spektri β -kriptoksantina i zeaksantina su identični spektru β -karotena.

Cis-izomerizacija hromofornih dvostrukih veza izaziva blagi gubitak boje, mali hipsokromni pomak (obično 2-6 nm za mono-*cis*) i hipokromni efekat, uz pojavu *cis*-pika u ili u blizini UV oblasti. Intenzitet *cis*-trake je veći što je *cis*-dvostruka veza bliža centru molekula.

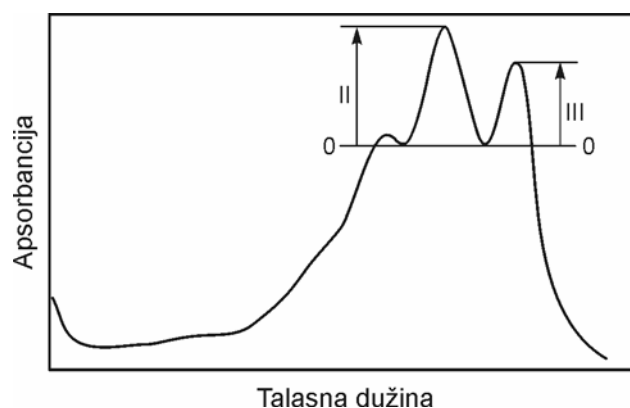
Stoga, 15-*cis* izomer, u kome je *cis* dvostruka veza u centru molekula, ima intenzivan *cis* pik (slika 18).



Slika 18. Spektar *all-trans*-likopena, 15-*cis*-likopena i 13-*cis*-likopena

5,6-Monoepoksid i 5,6,5',6'-diepoksid cikličnih karotenoida, koji su izgubili jednu, odnosno dve dvostruke veze u prstenu, imaju maksimume apsorbančije 5 i 10 nm manje i svetlije su obojeni od svojih "osnovnih" jedinjenja. Kada 5,6-epoksid pređe u 5,8-epoksid (furanoid), gubi se još jedna dvostruka veza, ovoga puta iz polienskog lanca. Otuda, λ_{\max} 5,8-monoepoksida i 5,8,5',8'-diepoksida su za 20-25 i 50 nm manje od "osnovnih" jedinjenja.

Da bi se predstavila struktura, odnosno definisanost spektra, pored λ_{\max} vrednosti može se navesti i vrednost % III/II (slika 19). % III/II je odnos visine pika na najvećoj talasnoj dužini, označen sa III, i visine srednjeg pika, označenog sa II, uzimajući kao osnovu minimum između dva pika, pomnožene sa 100. U nekim slučajevima, npr. kod ζ -karotena, III je veće od II, pa je vrednost % III/II nešto veća od 100 (tabela 6). Kod konjugovanih ketokarotenoida, kao što su kantaksantin i ehinenon, spektar se sastoji od jednog širokog maksimuma, pa je % III/II = 0.



Slika 19. Određivanje % III/II kao karakteristike strukture spektra ($\% \text{ III/II} = \text{III/II} \times 100$)

Apsorpcioni spektri karotenoida znatno zavise od upotrebljenog rastvarača (tabela 6, Rodriguez-Amaya, 2001).

Tabela 6. UV i VIS apsorpcioni podaci za karotenoide

Karotenoid	Rastvarač	λ_{\max} , nm			% III/II
Anteraksantin	hloroform	430	456	484	
	etanol	422	444	472	55
	heksan, petrol etar	422	445	472	60
Astaksantin	aceton		480		0
	benzen, hlороform		485		0
	etanol		478		0
	petrol etar		468		0
Auroksantin	aceton	381	402	427	101
	hlороform	385	413	438	
	etanol, petrol etar	380	400	425	102
Biksin	hlороform	433	470	502	
	etanol	429	457	484	
	petrol etar	432	456	490	
Kantaksantin	hlороform		482		0
	etanol		474		0
	petrol etar		466		0
Kapsantin	etanol		476		
	petrol etar	(450)	474	505	
Kapsorubin	petrol etar	(455)	479	510	
α -Karoten	aceton	424	448	476	55
	hlороform	433	457	484	
	etanol	423	444	473	
	heksan, petrol etar	422	445	473	55
β -Karoten	aceton	(429)	452	478	15
	hlороform	(435)	461	485	
	etanol	(425)	450	478	25
	heksan, petrol etar	(425)	450	477	25
β -Karoten-5,6-epoksid	etanol	423	445	474	

Tabela 6. Nastavak

β -Karoten-5,8-epoksid	etanol	407	428	452	
β -Karoten-5,6,5',6'-diepoksid	etanol	417	440	468	
β -Karoten-5,8,5',8'-diepoksid	etanol	338	400	425	
δ -Karoten	hloroform	440	470	503	
	petrol etar	431	456	489	85
γ -Karoten	aceton	439	461	491	
	hloroform	446	475	509	
	etanol	440	460	489	35
	heksan, petrol etar	437	462	494	40
ζ -Karoten	etanol	377	399	425	
	heksan, petrol etar	378	400	425	103
Krocetin	hloroform	413	435	462	
	etanol	401	423	447	
	pet ro etar	400	422	450	
α -Kriptoksantin / zeinoksantin	hloroform	435	459	487	
	etanol	423	446	473	60
	heksan	421	445	475	60
β -Kriptoksantin	hloroform	(435)	459	485	
	etanol	(428)	450	478	27
	petrol etar	(425)	449	476	25
Ehinenon	aceton		460		0
	hloroform		471		
	etanol		461		0
	petrol etar		458	(482)	
Lutein	hloroform	435	458	485	
	etanol	422	445	474	60
	petrol etar	421	445	474	60
Lutein-5,6-epoksid	hloroform	433	453	483	
	etanol	420	441	470	85
	heksan, petrol etar	420	440	470	85

Tabela 6. Nastavak

Likopen	acetone	448	474	505	
	hloroform	458	484	518	
	etanol	446	472	503	65
	petrol etar	444	470	502	65
Mutatoksantin	hloroform		437	468	
	etanol	409	427	457	50
	petrol etar	407	426	456	45
Neoksantin	acetone	416	440	470	85
	hloroform	423	448	476	
	etanol	415	439	467	80
	petrol etar	416	438	467	87
Neurosporen	hloroform	424	451	480	
	etanol, heksan	416	440	470	
	petrol etar	414	439	467	100
Fitoen	heksan, petrol etar	(276)	286	(297)	10
Fitofluen	heksan, petrol etar	331	348	367	90
Rubiksantin	hloroform	439	474	509	
	etanol	433	463	496	40
	petrol etar	434	460	490	
Violaksantin	hloroform	426	449	478	
	etanol	419	440	470	95
	petrol etar	416	440	465	98
α -Zeakaroten	heksan	398	421	449	
β -Zeakaroten	etanol, heksan, petrol etar	406	428	454	
Zeaksantin	acetone	(430)	452	479	
	hloroform	(433)	462	493	
	etanol	(428)	450	478	26
	petrol etar	(424)	449	476	25

Specifični apsorpcioni koeficijent $A_{1\text{cm}}^{1\%} \left(\frac{A}{c \times l} \right)$ karotenoida (apsorbancija na datoj talasnoj dužini 1% - tnog rastvora - c , u kiveti spektrofotometra od 1 cm - l) koji se koristi pri izračunavanjima koncentracije takođe primetno zavisi od rastvarača (tabela 7, Rodriguez-Amaya, 2001).

Tabela 7. Specifični apsorpcioni koeficijenti karotenoida

Karotenoid	Rastvarač	$A_{1\text{cm}}^{1\%}$
Anteraksantin	etanol	2.350
Astaksantin	heksan	2.100
Auroksantin	etanol	1.850
Biksin	petrol etar	4.200
Kantaksantin	petrol etar	2.200
Kapsantin	benzen	2.072
Kapsorubin	benzen	2.200
α -Karoten	petrol etar	2.800
	heksan	2.710
β -Karoten	petrol etar	2.592
	etanol	2.620
	hloroform	2.396
β -Karoten-5,6-epoksid	heksan	2.590
β -Karoten-5,6,5',6'-diepoksid	heksan	2.690
δ -Karoten	petrol etar	3.290
γ -Karoten	petrol etar	3.100
	heksan	2.760
ζ -Karoten	heksan	2.555
Krocetin	petrol etar	4.320
α -Kriptoksantin /zeinoksanin	heksan	2.636
β -Kriptoksantin	petrol etar	2.386
	heksan	2.460
Ehinenon	petrol etar	2.158
Lutein	etanol	2.550
	dietil etar	2.480
	dietil etar	2.600
Lutein-5,6-epoksid	etanol	2.400
	etanol	2.800
Likopen	petrol etar	3.450
Likoksantin	acetone	3.080
Mutatohrom	dietil etar	2.260

Tabela 7. Nastavak

Neoksantin	etanol	2.470
	etanol	2.243
Neurosporen	heksan	2.918
Fitoen	petrol etar	1.250
Fitofluen	petrol etar	1.350
	heksan	1.577
Rubiksantin	petrol etar	2.750
Violaksantin	etanol	2.550
	aceton	2.400
α -Zeakaroten	petrol etar	2.450
	heksan	1.850
β -Zeakaroten	petrol etar	2.520
	heksan	1.940
Zeaksantin	petrol etar	2.348
	etanol	2.480
	etanol	2.540
	aceton	2.340

Za karotenoide u rastvoru važi Lambert-Beer-ovom zakon: apsorbancija je direktno proporcionalna koncentraciji, pa se koncentracija karotenoida može odrediti spektrofotometrijski.

Izomerizacija i oksidacija

Karotenoidi su skloni reakcijama izomerizacije i oksidacije. Pod delovanjem toplote, svetlosti, kiselina, adsorpcije na aktivnu površinu, prelaze iz svoje uobičajene *trans* konfiguracije, u *cis*-oblik, što dovodi do gubitka boje i provitaminske aktivnosti. Oksidativna degradacija je stimulirana kiseonikom, svetlošću, enzimima, metalima i ko-oksidacijom sa lipidnim hidroperoksidazama.

2.5.5. Karotenoidi paprike

Karotenoidi su široko rasprostranjeni u biljnom svetu. Zreli plodovi različitih vrsta paprike (*Capsicum annuum* L.) su značajan izvor karotenoida, pa se paprika i proizvodi od paprike koriste kao prirodne bojene materije, kao prah (paprika, mlevena začinska paprika) ili kao koncentrovani ekstrakt, oleorizin. Sazrevanjem plodova hlorofili nestaju, i ne samo da dolaze do izražaja tipični karotenoidi hloroplasta (β -karoten, lutein, neoksantin, violaksantin), već se sintetizuju i neki novi karotenoidi. Promena boje plodova vezana je za proces degeneracije hloroplasta i pojave hromoplasta, koji sadrže karotenogene enzime. Sazrevanjem plodova

karotenoidi se postepeno esterifikuju masnim kiselinama, tako da se povećava njihova raznolikost (mogu se naći neesterifikovani, delimično i potpuno esterifikovani oblici). Prema nekim istraživanjima, esterifikovani oblici su stabilniji od neesterifikovanih. Takođe, pigmenti esterifikovani zasićenim su stabilniji od pigmenata esterifikovanih nezasićenim masnim kiselinama. Proces esterifikacije karotenoida ne menja hromoforne osobine molekula, ali modifikuje njegovo neposredno okruženje, povećavajući liposolubilnost i bolju inkorporiranost u strukturu membrana. Što se tiče karotenoida, skoro istovremeno se dešavaju dva povezana procesa – konverzija postojećih pigmenata i sinteza istih *de novo*. Posledica ovih promena je povećanje sadržaja ukupnih karotenoida.

U voće i povrće koje sadrži esterifikovane ksantofile ubrajaju se jabuka, kajsija, avokado, čili paprika, klementina, mango, narandža, papaja, breskva, žuta i crvena paprika, krompir i bundeva. Među voćem i povrćem bez estara ksantofila nalaze se banana, brokoli, mrkva, kukuruz, limun, spanać i paradajz (Pérez-Gálvez i Mínguez-Mosquera, 2005).

Zelena boja ploda paprike potiče od hlorofila i karotenoida tipičnih za hloroplaste: ksantofila (violaksantin, neoksantin, lutein) i β -karotena. Kada otpočne sazrevanje, plod dobija narandžastu boju, a na kraju procesa intenzivnu crvenu boju. Ova promena se dešava uglavnom zbog sintetizovanih novih oksigenovanih karotenoida (sa keto grupama), od kojih su najvažniji **kapsantin** (3,3'-dihidroksi- κ,κ -karoten-6'-on) i **kapsorubin** (3,3'-dihidroksi- κ,κ -karoten-6,6'-dion), koji čine 65-80% ukupne boje crvene paprike i karakteristični su samo za papriku, tj. rod *Capsicum* (Weissenberg i sar., 1997; Jarén-Galán i Mínguez-Mosquera, 1999). Sadržaj ukupnih karotenoida može da se poveća sa 34,76 mg/kg u nezrelom plodu na 962,50 mg/kg u zreom plodu (Mínguez-Mosquera i Hornero-Mendez, 1994).

U tabeli 8 mogu se videti promene u koncentracijama karotenoida u različitim fazama zrelosti (Mínguez-Mosquera i Hornero-Mendez, 1994). U literaturi se može naći još sličnih podataka (Mínguez-Mosquera i Hornero-Mendez, 1993; Wall i sar., 2001). Može se videti da *de novo* sinteza karotenoida dovodi do povećanja sadržaja karotenoida 30 do 300 puta (Deli i Toth, 1997). Neoksantin i lutein nestaju, a sintetizuju se novi pigmenti: zeaksantin, β -kriptoksantin, kapsantin i kapsorubin. U literaturi se mogu naći i podaci o postojanju i drugih karotenoida kao što su latoksantin, karpoksantin, luteoksantin, auroksantin, kukurbitaksantin, kapsanton, cikloviolaksantin, mutatoksantin, nigroksantin i drugi, koji su zastupljeni u malom procentu u paprici (Deli i Toth, 1997; Deli i sar., 2001).

Karotenoidni sastav paprike zavisi od vremenskih prilika tokom sazrevanja (padavine, broj sunčanih dana, temperatura), uslova gajenja, vremena branja (faza zrelosti tokom branja) i od sorte, odnosno varijeteta paprike (Almela i sar., 1991).

U tabeli 9 se može videti procentualni sastav masnih kiselina koje esterifikuju osnovne ksantofile (kapsantin, kapsorubin, β -kriptoksantin, zeaksantin). Masne kiseline su: laurinska (12:0), miristinska (14:0), palmitinska (16:0) i linolna (18:2 ^{$\Delta^9,12$}). Mogu se naći i male količine drugih masnih kiselina, kao što su palmitooleinska (16:1 ^{Δ^9}), oleinska (18:1 ^{Δ^9}), stearinska (18:0) i linolenska (18:3 ^{$\Delta^9,12,15$}), koji čine ne više od 2% ukupnih masnih kiselina (Mínguez-Mosquera i Hornero-Méndez, 1994; Biacs i sar., 1989).

Tabela 8. Promene koncentracije karotenoida (mg/kg svežeg ploda)^a u različitim fazama zrelosti, varijeteta Bola

Pigment	Faza zrelosti						
	zelena	I promena boje ¹		II promena boje ²		crvena I ³	crvena II ⁴
		tr	tr	tr ^b	tr		
Neoksantin	7,23 ± 0,87	0,17 ± 0,10				–	–
Kapsorubin	–	4,18 ± 0,82		12,02 ± 1,04		27,75 ± 0,51	62,03 ± 1,72
Violaksantin	9,72 ± 0,83	11,02 ± 1,20		15,83 ± 1,61		24,17 ± 1,50	58,36 ± 2,06
Kapsantin 5,6-epoksid	–	4,05 ± 0,73		7,88 ± 0,95		19,30 ± 1,12	39,97 ± 1,93
Kapsantin	–	22,72 ± 2,01		53,45 ± 2,13		202,78 ± 10,81	522,49 ± 14,05
Anteraksantin	0,28 ± 0,03	1,56 ± 0,08		5,12 ± 0,11		16,13 ± 0,28	32,53 ± 0,51
cis-kapsantin	–	tr		4,86 ± 0,20		18,71 ± 1,60	59,42 ± 1,83
Kapsolutein	–	3,02 ± 0,11		7,33 ± 0,69		30,19 ± 1,29	70,05 ± 1,22
Zeaksantin	–	6,09 ± 0,47		13,86 ± 0,93		39,80 ± 1,78	46,03 ± 1,36
cis-zeaksantin	–	1,32 ± 0,05		2,16 ± 0,04		3,98 ± 0,75	5,15 ± 0,43
Lutein	8,89 ± 0,91	2,05 ± 0,07		0,97 ± 0,02		–	–
cis-lutein	1,02 ± 0,01	tr		tr		–	–
β-kriptoksantin	–	3,34 ± 0,20		8,02 ± 0,62		30,93 ± 0,83	41,22 ± 2,39
β-karoten	6,43 ± 0,18	7,52 ± 0,24		8,81 ± 0,57		38,10 ± 1,12	53,80 ± 1,96
Ukupni karotenoidi	33,57 ± 2,85	67,04 ± 6,10		140,31 ± 8,91		451,84 ± 21,60	991,05 ± 29,46
% žutih pigmenta	100,00	53,84		44,26		40,57	30,99
% crvenih pigmenta	0,00	46,16		55,74		59,43	69,01

^a srednja vrednost ± stand. devijacija 4 merenja;^b tr - tragovi;¹ zelena sa narandžastim zonama; ² narandžasta sa zelenim zonama; ³ tamno narandžasta; ⁴ tamno crvena

Tabela 9. Procentualni sastav masnih kiselina koje esterifikuju osnovne ksantofile

Masna kiselina	Ksantofil			
	β -Kriptoksantin	Keaksantin	Kapsantin	Kapsorubin
Laurinska (12:0)	9,7	8,6	26,5	26,0
Miristinska (14:0)	18,2	19,1	48,3	47,4
Palmitinska (16:0)	23,6	21,7	17,6	18,0
Palmitooleinska (16:1)	tr ^a	tr	tr	tr
Stearinska (18:0)	tr	tr	tr	tr
Oleinska (18:1)	2,4	1,8	tr	tr
Linolna (18:2)	48,4	50,6	7,5	8,6
Linolenska (18:3)	tr	tr	tr	tr

^a tr – tragovi ($\leq 0,5$ %)

Crveni ketokarotenoidi kapsantin i kapsorubin su uglavnom esterifikovani zasićenim masnim kiselinama kratkog lanca (uglavnom laurinskom, miristinskom i palmitinskom), dok su ostali ksantofili i žuti pigmenti esterifikovani uglavnom nezasićenom masnom kiselinom sa dve dvostruke veze (linolna kiselina). Na ovaj način se lakše može razumeti bolja stabilnost crvenih pigmenata u odnosu na žute (Pérez-Gálvez i sar., 1999). Bolja stabilnost esterifikovanih pigmenata vezana je i za njihovu veću lipofilnost, koja olakšava njihovu integraciju u membranskim strukturama. Diestri su stabilniji od monoestara i/ili neesterifikovanih karotenoida, što potvrđuje da esterifikacija ksantofila masnim kiselinama povećava njihovu hemijsku stabilnost tokom sazrevanja i toplotne prerade (Daood i sar., 2006; Márkus i sar., 1999). Pošto njih ima u najvećem procentu (tabela 10, Levy i sar., 1995), očigledno je da priroda nije bez razloga "omogućila" njihovu esterifikaciju. Interesantno je da α -linolenska kiselina (18:3) ne uzima učešća u esterifikaciji, iako je u perikarpu zastupljena u velikoj koncentraciji. Ukoliko bi pigmenti bili esterifikovani ovom masnom kiselinom, bili bi podložniji oksidaciji.

Pošto su pigmenti esterifikovani zasićenim masnim kiselinama stabilniji, teže podležu foto- i termooksidativnim procesima, kao i reakcijama u koje je uključen enzim lipoksigenaza (Biacs i sar, 1989).

Istraživanja su pokazala da postoji razlika u stabilnosti pigmenata ljutih i slatkih sorti paprike (Daood i sar., 2006). Razlike u stabilnosti različitih karotenoida prema oksidativnoj razgradnji kod ljute i slatke paprike mogu se pripisati različitoj reaktivnosti u procesu oksidacije koja zavisi od strukture molekula (Pérez-Gálvez i Mínguez-Mosquera, 2001) i/ili neispitanim interakcijama između pigmenata i jedinjenja iz grupe kapsaicinoida koje mogu da zaštite, pod određenim uslovima, neke karotenoide i ubrzaju oksidativnu degradaciju drugih.

Tabela 10. Procenat esterifikacije ksantofila tokom sazrevanja ploda *C. annuum* Cv. *Bola*

Frakcija karotenoida	Faza zrelosti				
	Zelena	Promena boje I	Promena boje II	Crvena I	Crvena II
Neesterifikovani	100,00	49,6	46,2	32,6	21,3
Delimično esterifikovani	0,0	9,8	16,6	24,6	35,6
Potpuno esterifikovani	0,0	40,6	37,2	42,7	43,1
Ukupan sadržaj karotenoida (mg/kg ploda)	33,6	67,1	140,3	451,8	991,1

Iako su esterifikovani karotenoidi stabilniji od slobodnih (neesterifikovanih), paprika i proizvodi od paprike (mlevena začinska paprika, oleorizin) postepeno gube boju, usled uticaja fizičkih, hemijskih i enzimskih faktora, uslova prerade i skladištenja.

2.6. SLOBODNI RADIKALI I ANTIOKSIDANTI

Slobodni radikali su atomi, joni, molekuli ili druge molekulske vrste koje poseduju jedan ili više nesparenih elektrona. Nezasićenost elektronima uzrok je njihove velike reaktivnosti. Nespareni elektron (radikalni centar) može se stvarati i postojati na O, C, S i/ili N- atomu, pa se dele na:

- kiseonikove slobodne radikale ($O_2^{\bullet -}$ – superoksid anjon, $\bullet OH$ – hidroksil, HO_2^{\bullet} – hidroperoksil, LOO^{\bullet} – peroksil, LO^{\bullet} – alkoksil radikal);
- ugljenikove slobodne radikale (R^{\bullet} – alkil, $\bullet CCl_3$ – trihlormetil radikal);
- sumporove slobodne radikale (RS^{\bullet} – tiil radikal);
- azotove slobodne radikale (NO^{\bullet} – nitroksi, $C_6H_5N=N^{\bullet}$ – fenilhidrazin radikal).

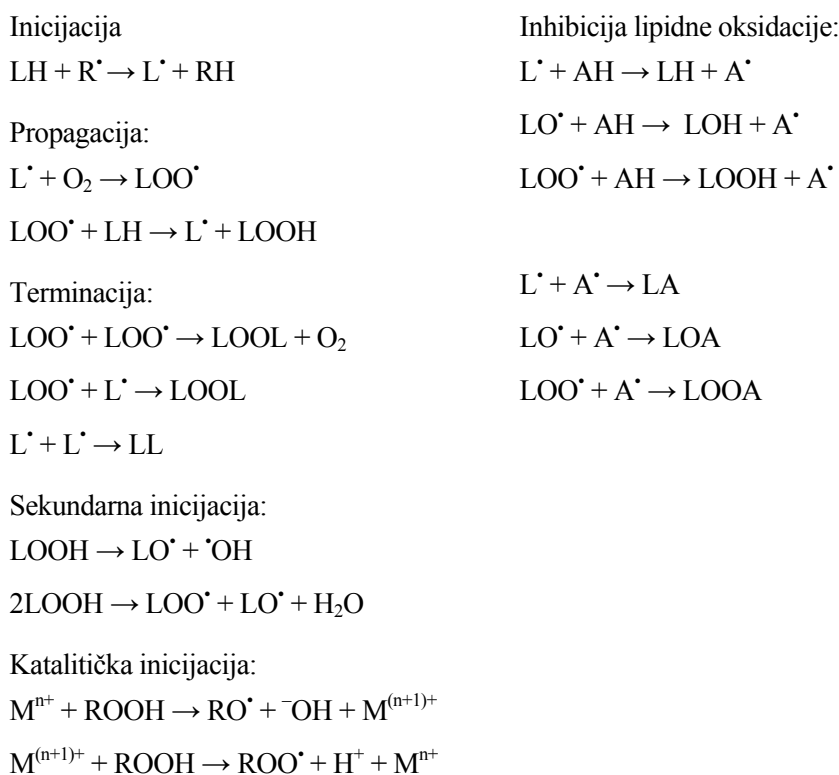
Slobodni radikali nastaju homolitičkim raskidanjem kovalentnih veza u organskim jedinjenjima ili prenosom jednog elektrona na molekul (jon) ili sa molekula (jona). Homolitičko raskidanje kovalentne veze može se indukovati fotolizom, termolizom, radiolizom, radikalnim međuproizvodima ili radikalnim inicijatorima. Slobodni radikali nastaju i tokom oksido-redukcionih procesa (elektrohemijskih, fotohemijskih i hemijskih reakcija) ili dejstvom zračenja visoke energije na molekul.

Na osnovu relativne stabilnosti, slobodni radikali se dele na nepostojane (kratkoživeće) i postojane (dugoživeće). Stabilnost slobodnih radikala predstavlja termodinamičku karakteristiku koja zavisi od sposobnosti ostalog dela molekula da stabilizuje nespareni elektron. Rezonancija i sterni efekat su dva glavna faktora koji utiču na stabilnost slobodnih radikala (Piletić i sar., 1993). Delokalizacija nesparenog spina povećava stabilnost radikala i omogućuje reagovanje preko više različitih položaja. Sterni efekat, kao faktor koji određuje stabilnost radikala, važniji je od efekta delokalizacije.

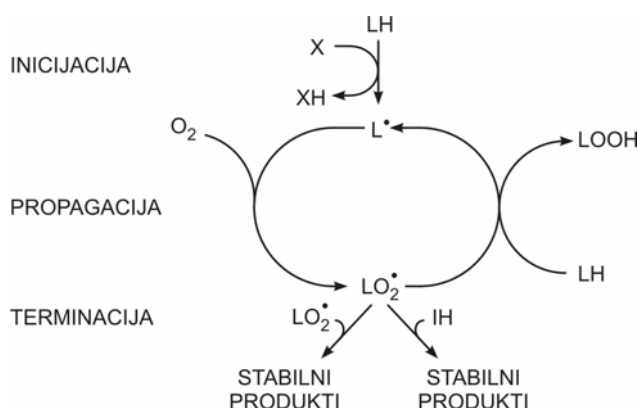
Tokom metaboličkog procesa organizam stvara slobodne radikale, koji, kada se nađu u većoj koncentraciji, oštećuju ćelije i tkiva dovodeći do oksidativnog stresa, ubrzanja procesa starenja i različitih oboljenja (oboljenja srca, artritis i kancer). Ispitivanjem mehanizama mutageneze i karcinogeneze utvrđeno je da su ovi patološki procesi bioloških sistema u velikoj meri zavisni od uticaja reaktivnih kiseonikovih vrsta. Reaktivne kiseonikove vrste (ROS) uključuju, između ostalih, i hidroksil radikale, lipidne alkoksil ili peroksil radikale, sam kiseonik i peroksininitrit nastao iz azot oksida.

Slobodni radikali mogu dovesti do promena prehrambenih i drugih proizvoda (kozmetičkih, farmaceutskih) na bazi lipida. Oksidacija lipida u namirnicama ima i pozitivne i negativne efekte. U malim količinama produkti oksidacije lipida odgovorni su za poželjnu aromu pojedinih namirnica (pržena hrana, kuvano meso). S druge strane, oksidacija lipida uzrokuje užeglost proizvoda, nastajanje toksičnih proizvoda, te hranu čini manje prihvatljivom (ili neprihvatljivom) za konzumiranje.

Lipidna oksidacija je proces u kom slobodnoradikalske i neradikalske vrste kiseonika reaguju sa lipidima izazivajući oksidativnu destrukciju nezasićenih, odnosno polinezasićenih masnih kiselina. Ukoliko se oksidacija odvija u prisustvu atmosferskog kiseonika, naziva se autooksidacija. Mehanizam kompleksne lančane reakcije lipidne oksidacije koja se odvija u tri faze, kao i mehanizam delovanja antioksidanata, prikazani su na slici 20 (Yanishlieva - Maslarova, 2001). Opšta šema oksidacije lipida slobodnim radikalima može se videti na slici 21 (Djilas i sar., 2002).



Slika 20. Mehanizam lančane reakcije lipidne oksidacije i mehanizam delovanja antioksidanata



Slika 21. Oksidacija lipida slobodnim radikalima (slobodnoradikalna lančana reakcija)
LH – lipid; L – lipidni radikal; LOO – lipid peroksidni radikal; IH – antioksidans

Antioksidanti su supstance koje, prisutne u malim količinama u odnosu na supstrat, usporavaju ili sprečavaju oksido-redukcijske reakcije, a mogu da deluju pre ili tokom slobodno-radikalnih reakcija u svim fazama. Delovanje antioksidanata zasniva se na njihovoj sposobnosti da deluju kao hvatači ("skevindžeri") slobodnih radikala, odnosno donori elektrona ili H-atoma. Kompleksiraju jone metala čime je onemogućena kataliza reakcije stvaranja inicijatora oksidacije lipida (npr. $\cdot\text{OH}$) ili reakcije razgradnje hidroperoksida lipida. Razgrađuju hidroperoksidi koji su nastali u fazi propagacije, transformišu ih u neradikalne vrste (npr. alkohole). Eliminiraju dejstvo singletnih oblika kiseonika, inhibiraju neke enzime, pokazuju sinergijske efekte i redukuju neka jedinjenja.

Postoji više načina klasifikovanja antioksidanata. Shi i sar. (2001) su klasifikovali antioksidante prema nivou i načinu delovanja u humanom organizmu na preventivne, "skevindžer" i "reparacione" antioksidante. Jedan od načina klasifikacije je na sintetske i prirodne.

2.6.1. Prirodni antioksidanti

Dobra antioksidativna svojstva pokazuju i neki sintetski antioksidanti: etoksikvin, galati, BHT (butilhidroksitoluen), BHA (butilhidroksianizol) i TBHQ (tercetilhidrokinon). Iako sintetski antioksidanti pokazuju dobra antioksidativna svojstva, prirodni antioksidanti su zdravstveno bezbedniji i bolje prihvaćeni od strane potrošača (Osuna-Garcia i sar., 1997).

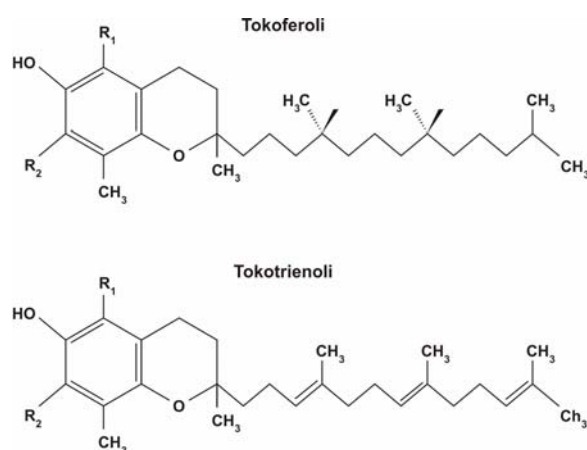
U tabeli 11 prikazani su najznačajniji izvori prirodnih antioksidanata (Djilas i sar., 2002).

Najznačajniji prirodni antioksidanti su tokoferoli, tokotrienoli, askorbinska kiselina, askorbil palmitat i fenolna jedinjenja.

Tabela 11. Izvori prirodnih antioksidanata

Grupa	Primer
Biljke	
uljarice	susam, suncokret
žitarice	pirinčana ljuska, pirinčane mekinje
zrnavlje i koštunice	soja, pasulj
klice i lišće	ječam
voskovi lišća	<i>Eucalyptus prunus</i>
kora i koren	<i>Eucalyptus prunus</i>
voće i povrće	mrkva, peršun
začinsko bilje	ruzmarin, timijan, žalfija
lekovito bilje	<i>Osbeckia chinensis</i> L.
Morski plodovi	rakovi, školjke
Mikrobiološki produkti	metaboliti <i>Streptomyces</i>
Fermentacioni proizvodi	tempeh, natto, miso
Maillard-ova reakcija	melanoidin

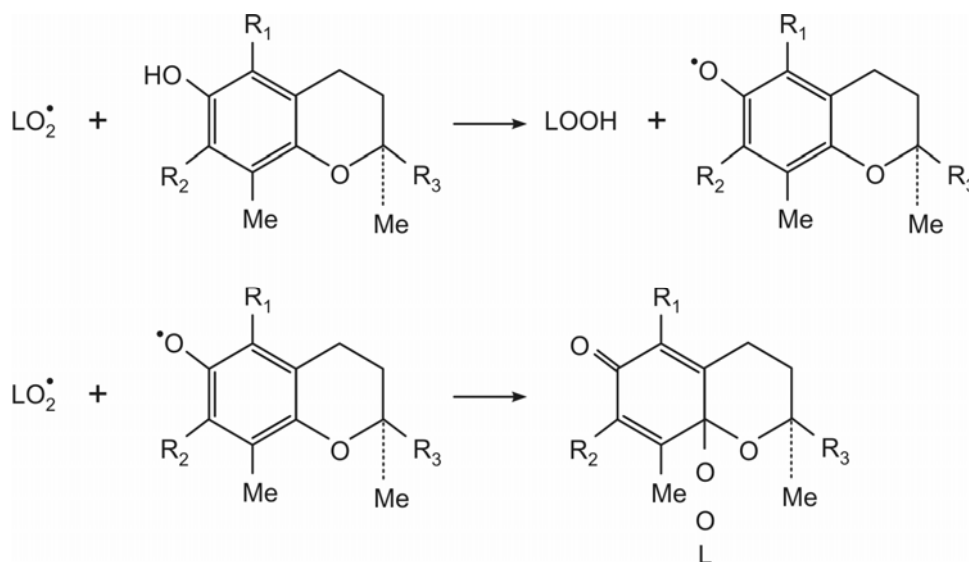
Tokoferoli i tokotrienoli, poznatiji kao vitamini E, su najvažniji liposolubilni prirodni antioksidanti (Osuna-García i sar., 1998). Nalaze se u biljnim uljima (palmino ulje), pirinčanim mekinjama, pšeničnim klicama, ječmu, kokosovom i kukuruznom ulju, ulju semena kaučuka. Poseduju važnu ulogu pri procesu reprodukcije i jedan su od najznačajnijih "hvatača" slobodnih radikala u ćelijskim membranama i lipoproteinima plazme (Frank, 2004). Preporučena dnevna doza vitamina E je 20-30 mg (Piletić i sar., 1993). α -Tokoferol je najaktivniji oblik liposolubilnog vitamina E. Na slici 22 prikazane su hemijske formule izomera tokoferol i tokotrienol oblika vitamina E (Frank, 2004).



Slika 22. Tokoferoli i tokotrienoli (opšta formula)

(α -tokoferol: R₁=CH₃, R₂=CH₃; β -tokoferol: R₁=CH₃, R₂=H; γ -tokoferol: R₁=H, R₂=CH₃; δ -tokoferol: R₁=H, R₂=H; α -tokotrienol: R₁=CH₃, R₂=CH₃; β -tokotrienol: R₁=CH₃, R₂=H; γ -tokotrienol: R₁=H, R₂=CH₃; δ -tokotrienol: R₁=H, R₂=H)

Tokoferoli i tokotrienoli reaguju sa slobodnim radikalima nastalim u propagacionoj fazi lančane reakcije. Fenoksil radikali se konjugativno stabilizuju i brzo reaguju sa drugim peroksilnim radikalom i stvaraju stabilan adukt (slika 23).



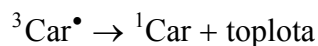
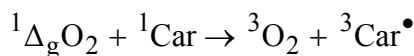
Slika 23. "Skevindžing" efekat vitamina E i peroksil radikala (mehanizam "hvatanja" slobodnih radikala vitaminom E)

Tehnološki najznačajniji prirodni antioksidanti danas su askorbinska i limunska kiselina i njihove soli, tokoferoli i ekstrakti začina. Mnoga naučna istraživanja potvrdila su ulogu prirodnih antioksidanata u zaštiti zdravlja i očuvanju kvaliteta (produžavanju održivosti) namirnica. Međutim, istraživanja su takođe pokazala da u većim dozama i pod određenim uslovima ova jedinjenja mogu ispoljiti toksična pro-oksidativna svojstva (Rietjens i sar., 2002; Stahl i Sies, 2003; El-Agamey i sar., 2004; Krinsky, 2001; Young i Lowe, 2001; Lowe i sar., 2003).

Karotenoidi su privukli pažnju pošto je veliki broj epidemioloških istraživanja otkrio da je ishrana bogata karotenoidima povezana sa smanjenim rizikom od nekoliko degenerativnih poremećaja, uključujući različite vrste kancera, kardiovaskularnih i oftalmoloških oboljenja (Stahl i Sies, 2003). Crvena paprika je povrće poznato po visokom sadržaju antioksidanata (Deepa i sar., 2006). Sadržaj karotenoida varira zavisno od vrste, zrelosti i uslova prerade (Daood i sar., 1996; Howard i sar., 2000; Simone i sar., 1997; Marin i sar., 2004). Raspored konjugovanih dvostrukih veza u polienskoj osnovi karotenoida određuje njihove osobine apsorpcije svetlosti i utiče na antioksidativnu aktivnost (Stahl i Sies, 2003).

Karotenoidi "hvataju" singletni kiseonik primarno fizičkim mehanizmima, pri čemu se višak energije singletnog kiseonika prenosi na strukturu karotenoida bogatu elektronima. Karotenoid se na taj način ekscituje u "tripletno" stanje ($^3\text{Car}^*$), a zatim vraća u prvobitno stanje (^1Car) gubeći energiju toplotom. Pošto je ovo fizički mehanizam, struktura karote-

noida ostaje nepromenjena i karotenoid nastavlja zaštitno delovanje protiv novih singletnih kiseonika:

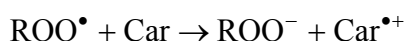


Relativna sposobnost hvatanja singletnog kiseonika nekog karotenoida zavisi od broja konjugovanih dvostrukih veza, a terminalni jononov prsten β -karotena (i srodnih karotenoida) nema uticaja. Karotenoidi sa 4 ili 4' karbonil (okso) supstituentima (astaksantin i kantaksantin) imaju malo povećanu sposobnost hvatača u odnosu na odgovarajući alkil karotenoid (β -karoten), što se pripisuje produženom sistemu konjugovanih dvostrukih veza (www.astaxanthin.org).

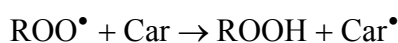
Na antioksidativnu aktivnost može da utiče i priroda i položaj supstituentnih grupa u molekulu.

Karotenoidi mogu da reaguju sa slobodnim radikalima na tri načina (Young i Lowe, 2001; Polyakov i sar., 2001):

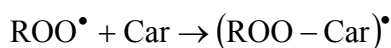
1. prenos elektrona



2. "davanje" vodonika



3. adicija na radikal



Suprotno od fizičkog "hvatanja", hemijske reakcije između ekscitovanog kiseonika i karotenoida su od manje važnosti, jer čine manje od 0,05% ukupne reakcije. Pošto karotenoidi ostaju netaknuti tokom fizičkog "hvatanja" ${}^1\text{O}_2$ ili ekscitovanih molekula, mogu biti iskorišćeni nekoliko puta u ovakvim reakcijama (Stahl i Sies, 2003).

Među različitim radikalima koji se stvaraju pod oksidativnim uslovima u organizmu, karotenoidi najefikasnije reaguju sa peroksil radikalima. Oni se stvaraju u procesu peroksidacije lipida, i hvatanje ovih vrsta prekida reakcije koje konačno dovode do oštećenja lipofilnih delova. Smatra se da karotenoidi igraju važnu ulogu u zaštiti ćelijskih membrana i lipoproteina protiv oksidativnog oštećenja, usled njihove lipofilnosti i specifične osobine skevindžera slobodnih radikala. Antioksidativna aktivnost karotenoida u vezi sa deaktivacijom peroksil radikala verovatno zavisi od mogućnosti formiranja spin adukata ugljeničnih radikala koji imaju sposobnost stabilizacije rezonancijom. Brzina kojom se degradira svaki pigment zavisi od stabilnosti intermedijernog peroksikarotenoidnog radikala koji se obrazuje tokom procesa autooksidacije, i ova stabilnost se zasniva u osnovi na strukturnim osobinama.

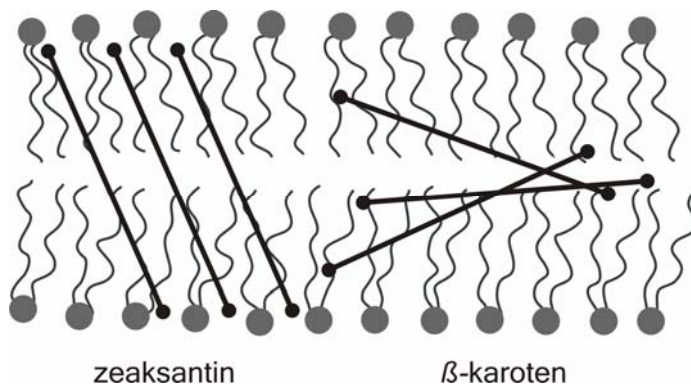
Antioksidativna aktivnost karotenoida zavisi od napona kiseonika u sistemu. Pri niskim parcijalnim pritiscima kiseonika (u tkivima u fiziološkim uslovima), β -karoten inhibira oksidaciju. Suprotno, inicijalna antioksidativna aktivnost β -karotena praćena je prooksi-

dativnim reakcijama pri višim koncentracijama kiseonika (Stahl i Sies, 2003; Rietjens i sar., 2002).

U biološkim sistemima karotenoidi se veoma retko nalaze kao slobodni molekuli "u rastvoru". Uglavnom su vezani (često vrlo čvrsto) za proteinske ili lipoproteinske strukture. Okruženje molekula karotenoida može imati snažan uticaj na njegove osobine, što određuje način funkcionisanja i upravlja, bar delimično, njihovom interakcijom sa drugim jedinjenjima. Karotenoidi takođe direktno utiču na svoje okruženje, tako da doprinose stepenu stabilizacije i u isto vreme i sami se stabilizuju.

Orijentacija molekula karotenoida u membrani zavisi od njegove strukture i sastava same membrane. β -karoten (i drugi karoteni, kao što je likopen) se nalazi paralelno sa površinom membrane, duboko u samoj membrani (slika 24). Suprotno, dihidroksi karotenoid zeaksantin u potpunosti se proteže kroz membranu i stoga su reakcije sa njegovim konjugovanim C=C vezama moguće u dubini membrane. Polarni karotenoidi, kao što je zeaksantin, ponašaju se kao zakivci, učvršćujući membranu, ali istovremeno ograničavaju prodiranje kiseonika u membrane.

Karotenoid poput zeaksantina, čiji se molekul proteže širom membrane (slika 24) teoretski bi bio u stanju da reaguje i sa lipo- i sa hidro-solubilnim antioksidantima. Relativno dugo "vreme života" karotenoid radikal katjona moglo bi da omogući navedeno, i postoje preliminarni dokazi koji pokazuju da u model membranama radikali formirani od karotena unutar hidrofobnog dela zaista mogu efikasno da deluju sa vitaminom E. Pokazalo se da u lipoproteinima male gustine (low-density lipoproteins) vitamin C štiti karotenoide i vitamin E od oksidativne štete izazvane Cu^{2+} .



Slika 24. Šematski prikaz veštačke lipidne membrane koja sadrži dihidroksi karotenoid zeaksantin (levo) ili β -karoten (desno). Ova dva karotenoida orijentišu se različito unutar membrane tako da polarne krajnje grupe zeaksantina vode molekul kroz dubinu membrane, dok β -karoten zauzima položaj duboko u hirofobnom delu membrane

Kapsorubin je pokazao najmanju brzinu autooksidacije (Pérez-Gálvez i Mínguez-Mosquera, 2001). Ovo se može pripisati njegovoj strukturi - keto grupa na krajevima polenskog lanca verovatno povećava stabilnost dobijenog radikala delokališući elektron duž lanca konjugovanih dvostrukih veza. Kod kapsantina jedna keto grupa verovatno ne doprinosi stabilizaciji dobijenog radikala, pošto koncentriše naelektrisanje elektrona na kraju lanca u blizini funkcionalne grupe, povećavajući reaktivnost i, brzinu oksidacije, koja je veća nego kod kapsorubina. Istraživanja su takođe pokazala da crvena frakcija karote-

noida paprike pokazuje veću stabilnost od žutih (Pérez-Gálvez i sar., 1999, 2000; Matsufuji i sar., 1998). Takođe, Matsufuji i sar. (1998) su došli do zaključka da su i esterifikovani i neesterifikovani karotenoidi podjednako dobri skevindžeri radikala, tj. da sposobnost hvatanja slobodnih radikala ne zavisi od stepena esterifikacije, niti od prisustva hidroksilnih grupa u položajima 3- i 3'- u β -jononovom i ciklopentanovom prstenu, već od polienskog lanca i konjugovane keto grupe u molekulu.

2.7. ANALIZA KVALITETA MLEVENE ZAČINSKE PAPRIKE I NJENIH EKSTRAKATA

Širom sveta postoje hiljade varijeteta paprike koji se razlikuju međusobno po veličini, obliku, boji, aromi, kao i intenzitetu ljutine. U najvećoj meri kvalitet svežih i sušenih proizvoda ocenjuje se na osnovu boje.

Boja paprike može se određivati sa tri različita aspekta: ekstrahovana boja (Benedek, ASTA), površinska boja i profil karotenoida (TLC, HPLC).

Određivanje ukupne (ekstrahovane) boje paprike metodom po Benedek-u

Metoda se zasniva na ekstrakciji boje iz uzorka pomoću benzola i merenju apsorbancije bistrog rastvora na spektrofotometru, na talasnoj dužini 477 nm, uz benzol kao slepu probu.

Određivanje ukupne (ekstrahovane) boje paprike metodom ASTA 20

Metoda je razvijena i odobrena od strane AOAC-a (Association of Official Analytical Chemists) i ASTA (Americal Spice Trade Association). Ekstrahovana boja se meri na spektrofotometru i izražava se u ASTA jedinicama. Postupak je jednostavan, ne zahteva komplikovanu opremu i relativno je jeftin. Boja se ekstrahuje pomoću acetona i apsorbancija obojenog ekstrakta meri na 460 nm.

Hromatografija

Gasna hromatografija u kombinaciji sa masenom spektroskopijom (GC-MS) veoma je često u upotrebi za analizu sastava masnih kiselina paprike.

Tankoslojna hromatografija (TLC - Thin Layer Chromatography) se koristi za razdvajanje karotenoida, najčešće u preparativne svrhe (Philip i sar., 1971; Pérez-Gálvez i sar., 1999; Domokos i sar. 1993; Asilbekova, 2003;).

Visokopritisna tečna hromatografija (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) je najefikasnija i najtačnija metoda razdvajanja i kvantifikacije karotenoida (Breithaupt, 2004; Su i sar. 2002; Azevedo-Meleiro i Rodriguez-Amaya 2004; de Sá, Rodriguez-Amaya, 2001; Burns i sar., 2003; Cserhádi i sar., 2002; Lee i sar., 2001; Rodriguez i sar., 1998; Kimura i Rodriguez-Amaya, 2002; Cserhádi i sar., 2000; Deli i sar., 2001; Weissenberg i sar., 1997; Mínguez-Mosquera i Hornero-Méndez, 1993; Vesper i Nitz, 1997c; Deli i Tóth, 1997; Müller, 1997; Weller i Breithaupt, 2003; Maoka i sar., 2001a; Maoka i sar., 2001b; Maoka i sar., 2002; Wall i Bosland, 1998).

Elektron spin rezonantna (ESR) spektroskopija

Elektron spin rezonancija (ESR) je spektroskopska metoda koja se zasniva na rezonantnoj apsorpciji elektromagnetnog zračenja od strane nesparenih elektrona u homogenom magnetnom polju. Ova metoda se često naziva i elektron paramagnetna rezonanca (EPR), jer se njome mogu ispitivati paramagnetne supstance, odnosno supstance koje sadrže atome, jone ili molekule sa nesparenim elektronima.

Metoda ESR omogućuje da se odredi prisustvo i broj nesparenih elektrona u jednom molekulu, kao i njihova raspodela. Ovakvi podaci su od naročitog značaja za hemiju slobodnih radikala, te je ESR spektroskopija osnovna eksperimentalna tehnika za ispitivanje oksido-redukcionih procesa, biradikalskih i triplet stanja molekula, strukture i reakcije polimera, mehanizma organskih reakcija slobodnih radikala.

ESR spektroskopija je najsavremenija, nerazorna i veoma osetljiva metoda za detekciju slobodnih radikala. ESR spektroskopijom se mogu detektovati koncentracije slobodnih radikala niže od 10^{-10} mol/dm³, pod uslovom da su radikali stabilni u ispitivanom sistemu onoliko vremena koliko je potrebno da se detektuju.

Homogeno magnetno polje promenljive jačine proizvodi se elektromagnetom sa precizno izrađenim polovima, a kao izvor mikrotalasnog zračenja najčešće se koristi klistron.

Za analizu hidroksil, alkoksil i peroksil radikala koji su nestabilni najčešće se primenjuje metoda hvatanja radikala, tzv. "spin-trapping" metoda. U sistem sa reaktivnim radikalima dodaju se određena jedinjenja, tzv. "spin-trap"-ovi (hvatači radikala). Interakcijom prisutnih komponenata nastaju relativno stabilni radikali, tzv. "spin-adukti", pogodni za detekciju ESR spektroskopijom.

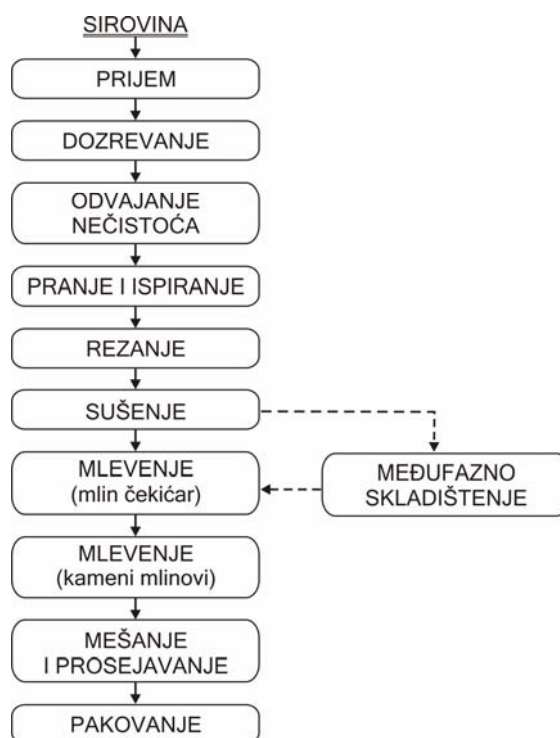
3. MATERIJAL I METODE RADA

3.1. UZORCI

3.1.1. Tehnološki postupak proizvodnje mlevene začinske paprike u fabrici "Aleva" Novi Kneževac

Šema tehnološkog procesa proizvodnje mlevene začinske paprike u fabrici "Aleva" Novi Kneževac prikazan je na slici 25. Po prijemu u fabricu i razvrstavanju po boji i veličini u tri klase, plodovi industrijske paprike istresaju se na betonske piste u obliku prizme radi dozreivanja. Dozreivanje traje 15-21 dan, zavisno od stepena zrelosti i vremenskih prilika. Nakon dozreivanja, sa plodova se uklanjaju prisutne nečistoće pranjem u mašini sa barbotiranjem. Beskrajni puž ugrađen u limenu kadu dužine 6 m, iznad koje su postavljeni tuševi, obezbeđuje kontinualan transport sirovine i pranje pod mlazom vode. Oprana sirovina se trakastim transporterom prenosi do mašine za sečenje, odakle se transportuje do sušare sa tri trake ("Cer", Čačak). Sušenje traje oko 8 časova, na temperaturi do 70°C. Nakon sušenja paprika se međufazno skladišti u mrežastim polipropilenskim vrećama, u mračnim skladištima sa obezbeđenom ventilacijom. Osušeni poluproizvod se usitnjava (drobi) na mlinovima čekićarima do čestica veličine 2-3 mm ("prekrupa"). U cilju dobijanja praha, prekrupa se melje u seriji od 13 kamenih mlinova. Prvih 12, od kojih po tri rade isto usitnjavanje, imaju zadatak da što finije usitne prekrupu, a završni, trinaesti mlin, ima za cilj završno usitnjavanje gotovog proizvoda. Nakon mlevenja proizvod se prosejava na šestougaonom rotirajućem situ, perforacije 150-500 µm. Meljava koja se zadržava na situ vraća se na naknadno mlevenje. Završna faza proizvodnje mlevene začinske paprike je njeno pakovanje u različite ambalažne materijale.

Mlevena začinska paprika se danas u cilju smanjenja ukupnog broja mikroorganizama, odnosno poboljšanja mikrobiološke slike, podvrgava termičkoj obradi - sterilizaciji. Sterilizacija se obavlja u uređaju koji radi na principu pregrijane pare.



Slika 25. Šema tehnološkog postupka proizvodnje mlevene začinske paprike u fabrici "Aleva", Novi Kneževac

U fabrici "Aleva", proizvedena mlevena začinska paprika se posredstvom kosog, rebrastog transportera dozira u cilindrični reduktor sa jednom ravnom trakom unutar koga se nalaze dizne za paru (šema sa slike 26). Izvor pare je kotao u kome je temperatura oko 145°C (mada može biti i 150°C). Temperatura pare je 120°C, a vreme njenog delovanja 25-30 sekundi. Na kraju reduktora temperatura materijala ne sme biti manja od 90°C, što se kontroliše beskontaktnim termometrom koji radi na principu infracrvenih zraka.

Nakon što je obavljena termička obrada, mlevena začinska paprika se transporterom ravnomerno raspoređuje na trake sušnice koja se nalazi ispod cilindričnog reduktora. Unutar sušnice se nalazi ukupno šest traka, pri čemu se na prvih pet obavlja proces sušenja, a na poslednjoj, šestoj traci, hlađenje materijala.

Sušenje se obavlja na temperaturi of 84°C, koju obezbeđuje generator toplog vazduha, mada raspon temperature može da se kreće i do maksimalnih 90°C, što u principu zavisi od sadržaja vlage proizvoda. Veći sadržaj vlage u proizvodu podrazumeva i primenu vazduha veće temperature. Temperatura vazduha za hlađenje je od 2-3°C, a obezbeđuje je klasičan klima uređaj koji vazduh za hlađenje sistemom cevi dovodi do šeste trake na kojoj se obavlja pomenuta operacija. Uređaj mora biti snabdeven filterima za vazduh.

Sterilisana mlevena začinska paprika se zatim prosejava na specijalnom rotacionom situ sa otvorima veličine 500 μm, u cilju dobijanja finih i ujednačenih čestica proizvoda. Gotov proizvod se potom pakuje u jutane džakove i odnosi na specijalne linije za pakovanje u ambalažne jedinice različite veličine. Čestice većeg prečnika vaćaju se u proces, na dodatno usitnjavanje.

Kapacitet opisanog uređaja je 220-230 kg/h.

Po završetku radnog dana, neophodno je dezinfikovati uređaj primenom 0,5% rastvora vodonik-peroksida.



Slika 26. Šema sterilizacije mlevene začinske paprike u fabrici "Aleva" iz Novog Kneževca

3.1.2. Uzorci

U radu je za ispitivanja korišćena crvena slatka mlevena začinska paprika proizvedena prema opisanom tehnološkom postupku u fabrici "Aleva" iz Novog Kneževca.

3.2. SREDNJI PREČNIK ČESTICA

Jedan od parametara koji utiču na operaciju ekstrakcije jeste i prečnik čestica, o kome se posebno mora voditi računa tokom pripreme sirovine (Reverchon i De Marco, 2006; Wang i sar., 2006; del Valle i sar., 2003).

Srednji prečnik čestica uzorka određen je prosejavanjem uzorka kroz sita proizvođača EWREKA, Nemačka (Lepojević, 2001). Mlevena začinska paprika je prenesena na sito, koje je zatvoreno poklopcem, i prosejavana 20 minuta. Deo paprike koji je zaostao na situ je izmeren, a deo koji je prošao proseje se kroz prvo po redosledu gušće sito. Stepennjenosti se može definisati preko veličine srednjeg prečnika čestica (d), koji se određuje na sledeći način: usitnjena mlevena začinska paprika, ispitivanog stepena usitnjenosti, se prenese na set sita (prvo sito u setu, odozgo na dole, je ono kroz koje prolazi celokupna masa usitnjene mlevene začinske paprike, a na kraju je tzv. "slepo sito"), stavi poklopac i seje 20 minuta. Zatim se meri masa dela paprike (na situ sa manjom veličinom otvora) i izraču-

nava maseni procenat svake frakcije i srednji prečnik veličine otvora dva susedna sita. Srednji prečnik čestica se izračunava iz izraza:

$$\frac{100}{d} = \sum \left(\frac{m_i}{d_i} \right)$$

gde je:

m_i - maseni procenat frakcije i ;

d_i - srednji prečnik i -te frakcije.

3.3. EKSTRAKCIJA MLEVENE ZAČINSKE PAPRIKE ORGANSKIM RASTVARAČEM

Konvencionalna ekstrakcija po Soxhlet-u izvedena je pomoću heksana tehničke čistoće kao ekstrakcionog sredstva do potpunog obezbojenja uzorka. Rastvarač je nakon ekstrakcije uklonjen uparavanjem pod vakuumom na vakuum uparivaču. Oleorizin dobijen ovom ekstrakcijom obeležen je oznakom Sx.

3.4. EKSTRAKCIJA MLEVENE ZAČINSKE PAPRIKE SUPERKRITIČNIM FLUIDOM

Superkrična ekstrakcija mlevene začinske paprike izvedena je pomoću uređaja za superkričnu ekstrakciju proizvođača NOVA Swiss, Effretikon, Švajcarska, pri radnoj temperaturi od 40°C, protoku komercijalnog ugljen-dioksida (Tehno-gas, Novi Sad, Srbija) od 3,59 g/min i pritiscima od 150, 200, 300 i 400 bar. Oleorizini dobijeni superkričnom ekstrakcijom u daljem tekstu obeleženi su oznakom SC i brojem koji odgovara prime-njenom pritisku ekstrakcije (SC150, SC200, SC300, SC400).

U oleorizinima dobijenim konvencionalnom (klasičnom) i superkričnom ekstrakcijom ispitana je antioksidativna aktivnost, sastav masnih kiselina i karotenoida.

Uzorak mlevene začinske paprike nakon superkrične ekstrakcije ekstrahovan je organskim rastvaračem (heksanom) po Soxhlet-u, rastvarač je nakon ekstrakcije uklonjen, a u dobijenom ekstraktu je određen sadržaj karotenoida. Uzorci dobijeni na ovaj način obeleženi su oznakom OSC (OSC150, OSC200, OSC300, OSC400).

3.5. EKSTRAHOVANA BOJA

Ukupna ekstrahovana boja paprike određena je metodom ASTA 20.1., merenjem apsorbcije acetonskog ekstrakta na 460 nm (A.S.T.A., 1968), u ekstraktima dobijenim konvencionalnom ekstrakcijom po Soxhlet-u (Sx) i superkričnom ekstrakcijom (SC).

3.6. SASTAV MASNIH KISELINA

Standardi i reagensi

Standardna smeša 19 metil estara masnih kiselina (FAMES), uključujući neke izomere, Supelco (Bellefonte, PA, USA), Cat. No. 47801.

Priprema metil estara masnih kiselina

Metil estri masnih kiselina dobijeni su iz oleorizina, bez prethodne ekstrakcije ulja, po sledećoj proceduri: u epruvetu sa čepom se unese 2 kapi (oko 60 mg) ulja pomoću staklenog štapića. Doda se 2,4 ml n-heksana i mućka oko 10 sekundi. Doda se 0,6 ml 2 mol/dm³ KOH u metanolu i mućka 20 sekundi. Začepljena epruveta se zaroni u vodeno kupatilo zagrejeno na 70°C, 1 minut. Epruveta se izvadi i mućka začepljena još 20 sekundi. Potom se doda 1,2 ml 1 mol/dm³ HCl u metanolu, blago promućka i sačeka se da se sadržaj u epruveti rasloji. Pre nego što se dekantuje, doda se 3 ml n-heksana. Metil estri, koji se nalaze u gornjem sloju, dekantuju se u čistu epruvetu i doda se n-heksan do ukupne zapremine od 5 ml.

GC-MS analiza

Analiza metil estara masnih kiselina izvedena je na gasnom hromatografu HP 5890, uz detekciju masenim spektrometrom HP 5971A. Korišćena je kapilarna kolona Supelco SP-2560 (100 m × 0,25 mm) sa visokopolarnom biscijanopropil polisiloksan stacionarnom likvidnom fazom (debljina filma 0,20 µm). Kao gas nosač korišćen je helijum (5.0) sa konstantnim protokom od 0,59 cm³/min. Primenjen je sledeći temperaturni program: temperatura injektora 230°C, početna temperatura 100°C (održavana 5 min), porast brzinom od 10°C/min do krajnje temperature od 240°C (10 min.). Ukupno vreme analize bilo je 30 min. Injektovanje je izvedeno primenom injektovanja uz razdeljivanje pri čemu je split iznosio 1:82. Temperatura masenog spektroskopa iznosila je 180°C. Maseni spektri su snimani SCAN tehnikom u opsegu od 40 do 400 a.m.u. Korišćen je postupak jonizacije elektronima.

Identifikacija i kvantifikacija masnih kiselina

Masne kiseline su identifikovane upoređivanjem njihovih masenih spektara sa masenim spektrima dobijenim analizom rastvora standarda metil estara masnih kiselina pri istim uslovima. Takođe je korišćena i Wiley baza podataka masenih spektara. Kvantitativno određivanje izvedeno je modifikovanom metodom 100% (AOAC, 2000). Izračunati korekcionni faktori predstavljaju srednju vrednost pet ponovljenih analiza za svaki metil estar.

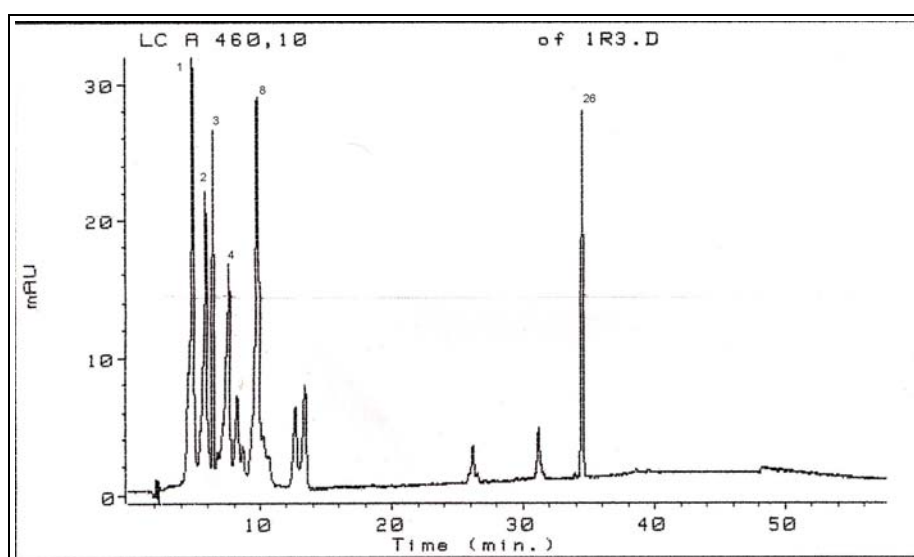
3.7. KVALITATIVNI I KVANTITATIVNI SASTAV KAROTENOIDA U OLEORIZINIMA MLEVENE ZAČINSKE PAPRIKE

Kvalitativno i kvantitativno određivanje karotenoida je izvršeno primenom HPLC prema metodi Morais i sar. (2001) sa malim modifikacijama. Za razdvajanje karotenoida korišćen je tečni hromatograf HP 1090 sa DAD detektorom. Korišćena je Zorbax SB C18 kolona (3,0 × 250 mm, 5 µm) sa pretkolonom Zorbax SB C18 (4,6 × 12 mm, 5 µm). Karo-

tenoidi su razdvojeni korišćenjem gradijenta dve smeše pokretnih faza A – aceton : voda (75 : 25; v/v) i B – aceton : metanol (75 : 25; v/v). Gradijent je bio sledeći: od 0% do 25% B za 10 minuta, zatim do 100% B do 35 minuta, 100% B do 45 minuta, 0% B do 65 minuta, nakon čega je sledio povratak na početne uslove u trajanju od 15 minuta. Protok mobilne faze bio je 0,5 ml/min. Injektovana zapremina uzorka je bila 10 μ l. Karotenoidi su na DAD detektoru registrovani na talasnoj dužini 460 nm; spektri pojedinih karotenoida su snimljeni u opsegu od 350 do 550 nm.

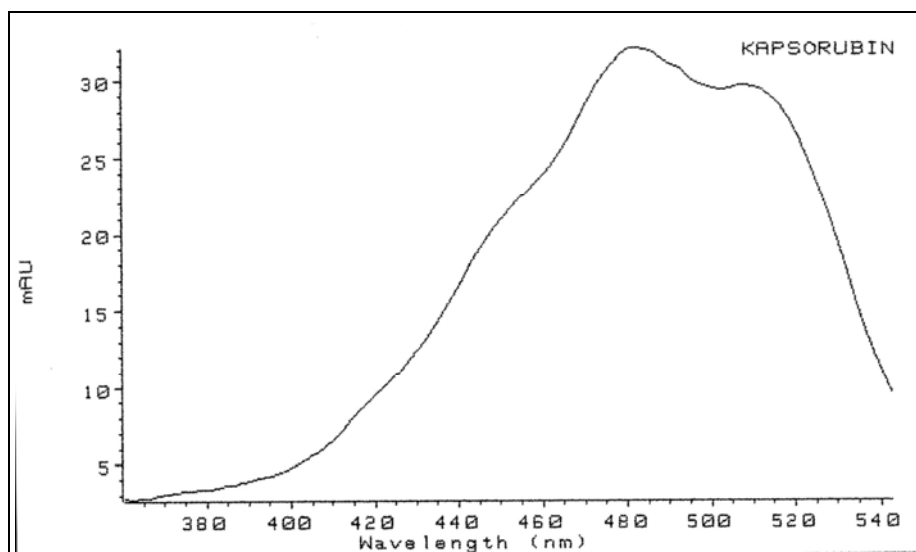
Standardi karakterističnih karotenoida za papriku, kapsantina, kapsorubina, anteraksantina, zeaksantina, violaksantina, β -karotena nabavljeni su od "Carotenature", Švajcarska. Svi korišćeni reagensi bili su HPLC čistoće.

Hromatogram razdvojene smeše standarda karotenoida prikazan je na slici 27.

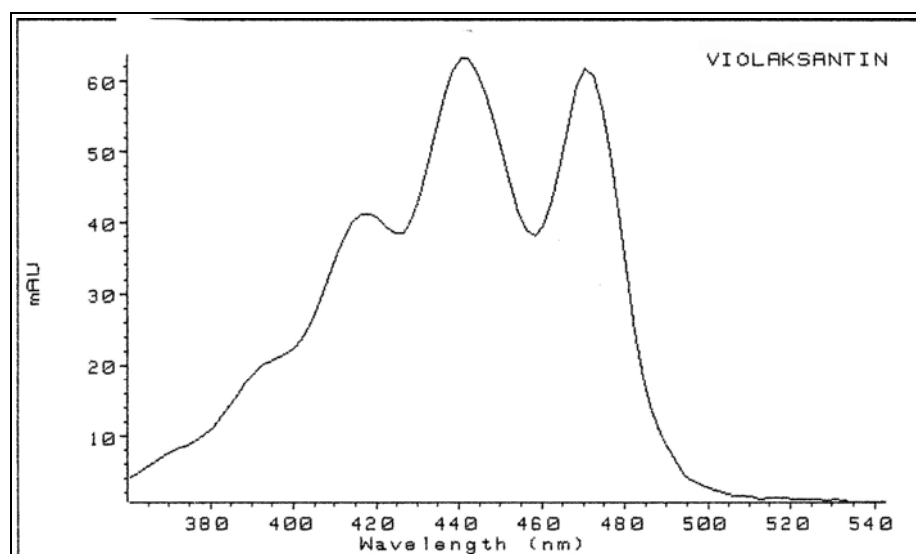


Slika 27. HPLC hromatogram smeše standarda: 1-kapsorubin, 2-violaksantin, 3-kapsantin, 4-anteraksantin, 8-zeaksantin i 26- β -karoten.

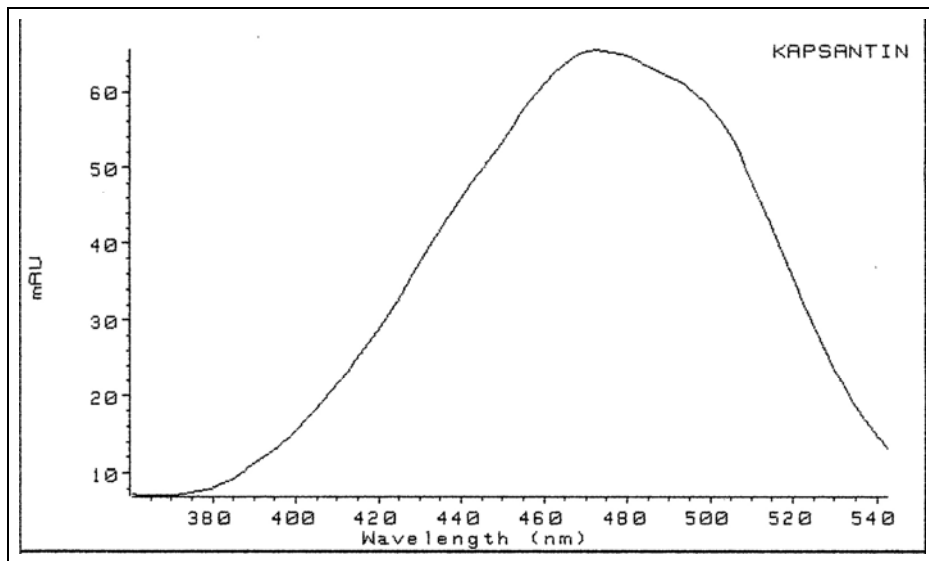
Korišćenje DAD detektora omogućilo je da se determinacija pikova pored retencionog vremena i površine, opiše i apsorpcionim spektrom. Apsorpcioni spektri pojedinih karotenoida iz standardne smeše (kapsorubin, violaksantin, kapsantin, anteraksantin, zeaksantin, β -karoten) prikazani su na slikama 28-33. Nakon determinacije pikova, površine pikova su upoređene sa površinama pikova serije odgovarajućih standarda karotenoida, odnosno za kvantitativnu analizu je primenjena metoda spoljašnjeg standarda.



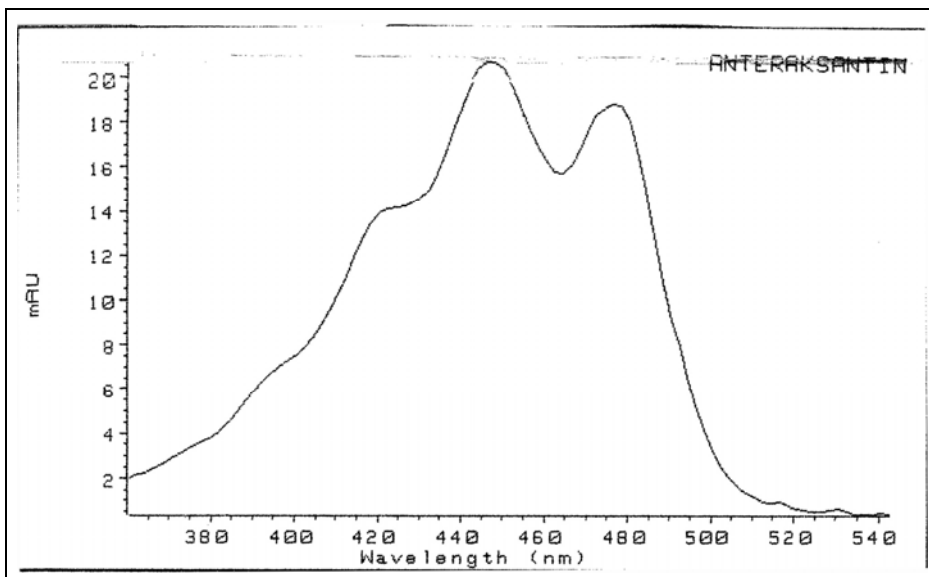
Slika 28. Apsorpcioni spektar kapsorubina (maksimumi na 446, 470, 480)



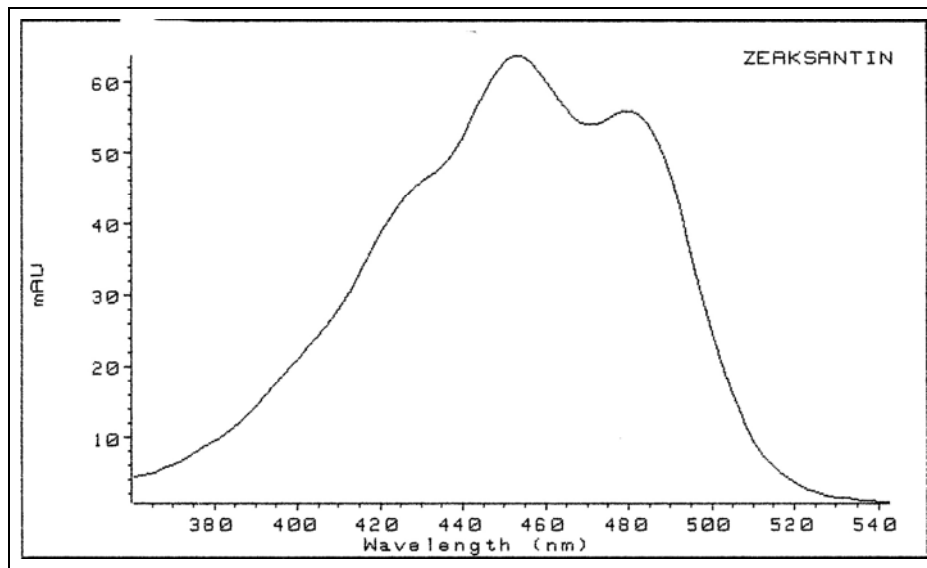
Slika 29. Apsorpcioni spektar violaksantina (maksimumi na 421, 442, 473)



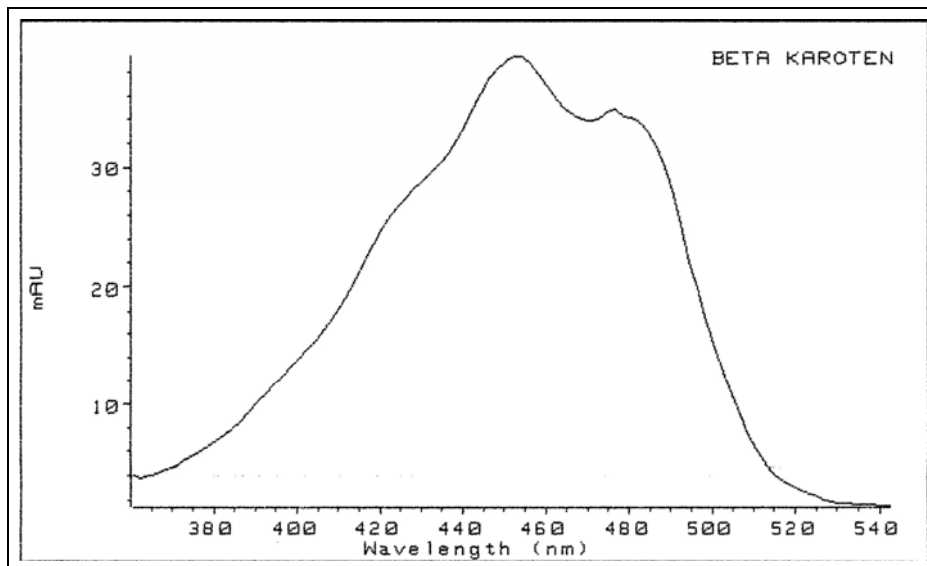
Slika 30. ApSORPCIONI SPEKTAR kapsantina (maksimumi na (446)*, 470, 486)
 *vrednost u zagradi ukazuje na približan položaj nagiba ili ramena kada se pik ne može pouzdano odrediti



Slika 31. ApSORPCIONI SPEKTAR anteraksantina (maksimumi na 422, 445, 472)



Slika 32. Apsorpcioni spektar zeaksantina (maksimumi na 430, 452, 479)



Slika 33. Apsorpcioni spektar β -karotena (maksimumi na (428)*, 450, 484)

*vrednost u zagradi ukazuje na približan položaj nagiba ili ramena kada se pik ne može pouzdano odrediti

3.8. SADRŽAJ TOKOFEROLA

Uzorci oleorizina su pripremljeni tako što su direktno rastvoreni u metanolu i profiltrirani kroz 0,45 μ m Millipore filter. Sadržaj α -tokoferola u pripremljenim uzorcima određen je tečnim hromatografom HP1090, opremljenim sa DAD detektorom (Diode Array Detector). Razdvajanje je izvedeno na reversnoj fazi, korišćena je kolona Zorbax SB-C18 (3,0 \times 250 mm, 5 μ m). Kao mobilna faza je korišćen metanol HPLC čistoće, pri protoku od 0,4 ml/min, na sobnoj temperaturi (24°C). Injektovano je 10 μ l rastvora. Razdvojeni pikovi su detektovani na 294 nm, uz referentnu talasnu dužinu na 550/100 nm.

Kalibracija je izvršena metodom spoljašnjeg standarda, korišćenjem serije razblaženja α -tokoferola (Sigma Aldrich). Konstruisana je kalibraciona kriva

$$A = 6624,7c + 2,5054$$

gde je A-apsorbancija, c-koncentracija

Na osnovu kalibracione krive izračunate su koncentracije α -tokoferola u uzorcima oleorizina dobijenim ekstrakcijom organskim rastvaračem i superkričnim ugljen-dioksidom.

3.9. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST

Hemikalije

N-*tert*-butil- α -fenilnitron (PBN) i 4,4'-azobis(4-cijanovalerijanska kiselina) (ACVA) nabavljeni su od Sigma Chemicals Co., USA.

Suncokretovo ulje nabavljeno je iz fabrike ulja "Vital" Vrbas. U ispitivanjima je korišćeno suncokretovo ulje, koje je zbog karakterističnog sastava masnih kiselina (veliki sadržaj oleinske kiseline) podložno oksidaciji.

Oksidacija suncokretovog ulja indukovana azo-inicijatorom ACVA. – Oksidacija je ispitivana u rastvoru koji sadrži 1 ml suncokretovog ulja, 0,0018 g ACVA, 0,0274 g PBN i ispitivani ekstrakt pri finalnim koncentracijama u opsegu 100-500 mg/ml. Rastvori su inkubirani na 37°C, 3 h u aerobnim uslovima.

Oksidacija lipida merena je praćenjem formiranja peroksil radikala ESR "spin trapping" metodom. ESR spektri formiranih PBN-OOL spin adukata snimani su pri sledećim uslovima: frekvencija modulacije 100 kHz, amplituda modulacije 1,021 G, jačina struje 1 \times 10⁴, vremenska konstanta 20,48 ms, vreme konverzije 327,68 ms, centar polja 3440,00 G, širina polja 100,00 G, frekvencija mikrotalasnog područja 9,64 GHz, snaga 20 mW, temperatura 23°C. Antioksidativna aktivnost (AA_{LOO}) ekstrakta (oleorizina) definisana je kao:

$$AA_{LOO} = \frac{h_0 - h_x}{h_0} 100 (\%),$$

gde su h_0 i h_x visine drugog pika u ESR spektru PBN-OOL spin adukta dobijenog u odsustvu i prisustvu ispitivanih ekstrakata.

Zavisnost dobijenih vrednosti AA (%) od primenjenih koncentracija ispitivanih uzoraka oleorizina prikazane su grafički. Sa prikazanih grafika izračunate su EC_{50} vrednosti (koncentracija uzorka koja redukuje 50% prisutnih radikala) za svaki ispitivani uzorak.

3.10. STATISTIKA

U cilju provere kvaliteta merenja izračunate su njihove standardne devijacije. Srednje vrednosti sadržaja masnih kiselina i karotenoida u oleorizinima dobijenim klasičnom ekstrakcijom organskim rastvaračem i superkritičnom ekstrakcijom pomoću ugljen-dioksida upoređene su primenom Studentovog t-testa uporednih vrednosti, uz verovatnoću od 95%. Modelovanje ekstrakcionog sistema mlevena začinska paprika - superkritični ugljen-dioksid primenom model jednačina urađeno je primenom programa Origin 6.1. i Excell 2003.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

Mlevena začinska paprika i njeni oleorizini su od izuzetnog značaja za prehrambenu industriju i potrošače. Koriste se u velikom broju proizvoda zbog svojih senzorskih svojstava, pre svega arome i boje. S obzirom na značaj oleorizina, u ovom radu je ispitan uticaj različitih vidova ekstrakcije (organskim i superkritičnim rastvaračem) na njegov kvalitet. Mlevena začinska paprika proizvođača "Aleva" iz Novog Kneževca ekstrahovana je klasičnim načinom pomoću heksana i superkritičnim ugljen-dioksidom. Za modelovanje ispitivanog ekstrakcionog sistema mlevena začinska paprika - superkritični ugljen-dioksid primenjeno je nekoliko model jednačina. U dobijenim uljanim ekstraktima (oleorizinima) utvrđen je sastav masnih kiselina, sadržaj bojenih materija (karotenoida) i α -tokoferola, kao i antioksidativne karakteristike. Uzorci mlevene začinske paprike nakon ekstrakcije superkritičnim ugljen-dioksidom ekstrahovani su heksanom i utvrđen je njihov kvalitativni i kvantitativni sastav.

4.1. EKSTRAKCIJA MLEVENE ZAČINSKE PAPRIKE

Oleorizini začinske paprike u prehrambenoj industriji se u našoj zemlji proizvode ekstrakcijom organskim rastvaračem. Iz ovog razloga je u laboratorijskim uslovima izvršena ekstrakcija mlevene začinske paprike primenom metode ekstrakcije sa povremenim ispuštanjem ekstrakta (ekstrakcija po Soxhlet-u) i najčešće korišćenog organskog rastvarača, heksana.

Prethodnim istraživanjima (del Valle i sar., 2003; Reverchon i Marrone, 2001) je potvrđeno da veličina čestica značajno utiče na kinetiku i prinos ekstrakcije. Krupnije čestice mogu produžiti proces ekstrakcije, pošto proces prenosa mase može biti pod većim uticajem unutrašnje difuzije. Sitnije čestice mogu ubrzati ekstrakciju, ali veoma sitan prah

(usled povećanja specifične površine) može izazvati probleme u održavanju odgovarajućeg protoka rastvarača (Reverchon i De Marco, 2006), ukoliko je u pitanju kontinualni proces.

Veličina čestica igra odlučujuću ulogu u procesu ekstrakcije kontrolisane unutrašnjim otporom prenosa mase. Međutim, ukoliko su čestice previše male, unutar ekstrakcionog sloja se formiraju kanali kroz koje prolazi rastvarač, tako da rastvarač ne dolazi u kontakt sa materijalom koji se ekstrahuje, dovodeći do smanjenja efikasnosti i prinosa ekstrakcije. Po pravilu, koriste se čestice srednjeg prečnika u opsegu od 0,25 do 2,0 mm (Reverchon i De Marco, 2006). Optimalne dimenzije čestica materijala se određuju pojedinačno, uzimajući u obzir sadržaj vlage u sirovini i količinu ekstraktibilnih tečnih komponenata koje mogu izazvati fenomen koalescencije među česticama i na taj način uticati na nepravilnu ekstrakciju u ekstrakcionom sloju. Dobijanje vrlo malih čestica mlevenjem može dovesti i do delimičnog gubitka isparljivih jedinjenja. Srednji prečnik čestica mlevene začinske paprike proizvođača "Aleva" iz Novog Kneževca, koja je u okviru ovog rada korišćena kao uzorak za ekstrakciju, iznosio je 0,224 mm.

Ekstrakcijom po Soxhlet-u ispitivane začinske paprike primenom heksana postignut je prinos ekstrakcije od 11,85%. Ovaj prinos je nešto manji od prinosa (12,4%) koji su dobili Daood i sar. (2002). Uzorak Kalocsai paprike, koju su Daood i sar. koristili za ekstrakciju, bio je specijalno pripremljen za njihovo istraživanje i ovaj nešto veći prinos je verovatno posledica dodatka semena u udelu od 40%, dok su dimenzije čestica bile nešto veće (0,4-0,6 mm). Međutim, prinosi ekstrakcije istog uzorka paprike, bez dodatnog obogaćivanja semenom, su iznosili do 11% (Gnayfeed i sar., 2001).

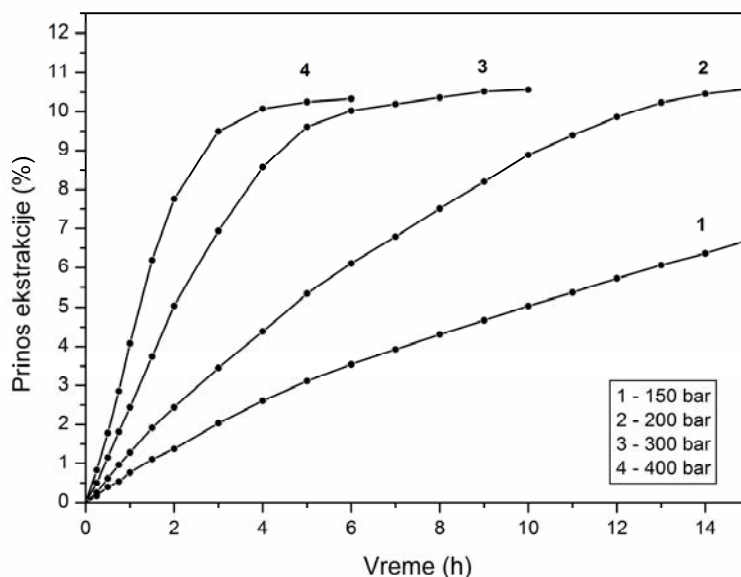
4.2. SUPERKRITIČNA EKSTRAKCIJA MLEVENE ZAČINSKE PAPRIKE

Radni pritisak ugljen-dioksida za superkritičnu ekstrakciju oleorizina mlevene začinske paprike nalazi se u intervalu od 350 do 500 bara, pošto se na ovim pritiscima ekstrahuju masna ulja, koja se ponašaju kao nosači pigmenata (Lock i Simándi, 2001). S druge strane, na pritiscima nižim od 300 bara rastvorljivost pigmenata je isuviše mala i ekstrahuju se uglavnom masna ulja (Lock i Simándi, 2001).

U okviru ispitivanja ekstrakcije mlevene začinske paprike superkritičnim ugljen-dioksidom, ekstrakcija je izvršena na četiri radna pritiska - 150, 200, 300 i 400 bar, pri čemu je temperatura od 40°C bila konstantna. Temperatura ekstrakcije je odabrana u cilju sprečavanja eventualne termičke degradacije komponenata prisutnih u uzorcima mlevene začinske paprike. Kinetička kriva ekstrakcije mlevene začinske paprike superkritičnim ugljen-dioksidom dobijena je kao funkcija prinosa oleorizina (% m/m) od vremena (h) (slika 34).

Na krivoj ekstrakcije, pri konstantnom pritisku (najizraženije na 300 i 400 bara), može se uočiti inicijalni stepen, tj. povećanje rastvorljivosti ulja, odnosno brzi prenos mase, koji teče nekoliko puta brže od drugog dela ekstrakcije. Zatim kriva dolazi u zonu stagnacije, kada se dostiže maksimalni prinos oleorizina, odnosno odvija se spora difuzija rastvorenih supstanci, koja teče sporo i zavisi od koeficijenta prenosa mase unutar biljnog materijala.

Tokom ekstrakcije superkritičnim ugljen-dioksidom praćen je prinos oleorizina i ekstrakcija je prekinuta kada su postignuti približno isti prinosi na 200, 300 i 400 bar. Ekstrakcija na 150 bar prekinuta je nakon 15 časova, pošto je gustina superkritičnog ugljen-dioksida na ovom pritisku suviše mala (0,750 g/ml) (www.criticalprocesses.com), odnosno njegova moć rastvaranja nedovoljna, te bi bilo potrebno veoma dugo vreme ekstrakcije da bi se postigao željeni prinos.



Slika 34. Kinetika ekstrakcije mlevene začinske paprike superkritičnim ugljen-dioksidom na 40°C (1-150 bara; 2-200 bara; 3-300 bara; 4-400 bara)

Na osnovu krive ekstrakcije može se zaključiti da se maksimalni prinos superkritičnom ekstrakcijom na 400 bara postiže u vremenu od oko 6 časova, odnosno 8 časova na 300 bara i 13 časova na 200 bara. Ekstrakcijom na 150 bara za 15 časova može se postići svega oko 65% postignutog maksimalnog prinosa superkritičnom ekstrakcijom na pritiscima 200, 300 i 400 bar.

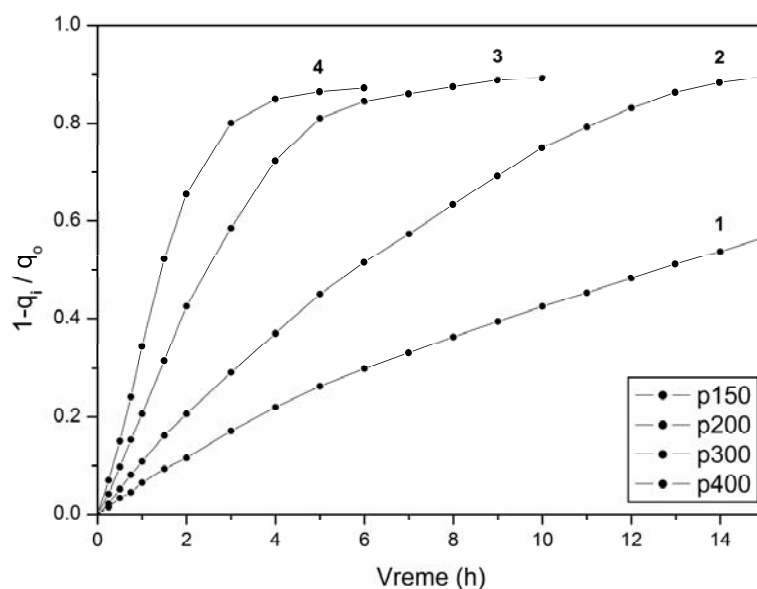
Prinos oleorizina superkritičnom ekstrakcijom (tabela 12) je manji u odnosu na konvencionalni postupak (11,85%). Primenom pritisa od 200, 300 i 400 bar dobijeni su približno isti prinosi do najviše 10,58%, dok je pri 150 bara izdvojeno 6,71% oleorizina.

Tabela 12. Prinosi oleorizina pri ekstrakciji mlevene začinske paprike superkritičnim ugljen-dioksidom na temperaturi 40°C

Pritisak (bar)	d (g/cm ³)	Prinos (g/100g paprike)
150	0,790	6,71
200	0,846	10,58
300	0,911	10,56
400	0,993	10,33

Kao što se može videti sa slike 34, operacija ekstrakcije ima dva perioda, brzu i sporu ekstrakciju. Količina materije dobijena brzom ekstrakcijom, odnosno koeficijent brze ekstrakcije (b), predstavlja parametar koji karakteriše operaciju ekstrakcije. Ako je u usitnjennoj sirovini udeo razorenih ćelija mali, ekstrakcija se veoma usporava i određena je u osnovi brzinom difuzije supstanci iz biljnog materijala, odnosno molekulskom difuzijom. Suprotno, povećanje udela razorenih ćelija u sirovini dovodi do povećanja brzine ekstrakcije, što je posledica prenosa mase iz sirovine konvektivnim putem.

U različitim vremenskim intervalima ekstrakcije određen je sadržaj ekstrahovanih materija (q_i' , %) pomoću koga je, na osnovu početnog sadržaja ukupnih ekstraktivnih materija u polaznom uzorku (q_0 , %), odnosno maksimalnog prinosa ($q_0 = 11,85\%$), izračunat sadržaj zaostalih materija (q_i , %; $q_i = q_0 - q_i'$) posle vremena τ . Na slici 35 prikazana je zavisnost stepena iscrpljenosti mlevene začinske paprike ($1 - q_i/q_0$) u funkciji vremena τ .



Slika 35. Stepen iscrpljenosti mlevene začinske paprike superkričnim ugljen-dioksidom na različitim pritiscima u funkciji vremena (h)

Osnov za izračunavanje koeficijenta brze ekstrakcije (b) je jednačina pravolinijskog dela kinetičke krive (slika 35):

$$1 - \frac{q_i}{q_0} = k' \tau + b \quad (1)$$

gde k' predstavlja koeficijent pravca, a b je odsečak prave na ordinati, odnosno koeficijent brze ekstrakcije. Na osnovu eksperimentalnih rezultata dobijene su vrednosti koeficijenta pravca i vrednosti b koje su date u tabeli 13.

Tabela 13. Koeficijenti brze ekstrakcije (b) mlevene začinske paprike superkritičnim ugljen-dioksidom na 150 (SC150), 200 (SC200), 300 (SC300) i 400 bara (SC400)

Parametar	SC150	SC200	SC300	SC400
k'	0,0273	0,0149	0,0118	0,0109
b	0,1563	0,6712	0,7773	0,8076
r	0,9995	0,9939	0,9924	0,9912

Najveća vrednost za b je dobijena ekstrakcijom uzorka na pritisku od 400 bar (0,8076), a nešto manja vrednost primenom ugljen-dioksida na 300 bar. Na osnovu ovih vrednosti i dijagrama (slika 35) se može zaključiti da pri ovim uslovima ekstrakcije dominira konvektivni prenos mase koji karakteriše period brze ekstrakcije.

Nasuprot tome, dominantni faktor ekstrakcije na pritiscima 150 i 200 bar je molekulska difuzija, odnosno spora ekstrakcija. Najmanja vrednost za b je dobijena primenom ugljen-dioksida na pritisku od 150 bar (0,1563). Vrednosti koeficijenta korelacije, |r|, pokazuju da su za izračunavanje vrednosti koeficijenta brze ekstrakcije (b) odabrane odgovarajuće eksperimentalne vrednosti.

4.3. MODELOVANJE SUPERKRITIČNE EKSTRAKCIJE MLEVENE ZAČINSKE PAPRIKE

Za modelovanje ekstrakcionog sistema mlevena začinska paprika - superkritični ugljen-dioksid primenjene su jednačine Reverchon i Sesti Osseo (1994) i koju je modifikovana jednačina (Zeković, 1998). Reverchon i Sesti Osseo (1994) su za modelovanje ekstrakcije bosiljka primenili jednačinu čija pojednostavljena forma ima oblik (2) i može se koristiti kada je unutrašnja difuzija jedini limitirajući faktor.

$$Y = 100 \left[1 - \exp \left(-\frac{t}{t_i} \right) \right] \quad (2)$$

Y predstavlja normalizovani ekstrakcioni prinos koji se dobija kao $Y = \frac{Y_E}{Y_{MAX}} 100$, gde su Y_E - prinos ekstrakta (%), Y_{max} - maksimalni prinos ekstrakta (%), t - vreme (s), t_i - vreme unutrašnje difuzije (s).

Villiermaux (1987) je izrazio odnos vremena unutrašnje difuzije t_i i koeficijenta unutrašnje difuzije (D) za različite geometrije čestica (3) jednačinom:

$$t_i = \mu^* \frac{l^2}{D} \quad (3)$$

gde su: μ^* - faktor oblika koji zavisi od geometrije čestice (za sfernu česticu njegova vrednost iznosi 3/5);

l - karakteristična geometrijska veličina čestica (m): $l = V_p/A_p$, V_p - zapremina (m^3), A_p - površina čestice (m^2) (za sfernu česticu: $l = r/3$, r - srednji poluprečnik čestica (m)).

Za primenu jednačine (3) u cilju modelovanja ekstrakcionog sistema pretpostavljeno je da su čestice sfernog oblika, tako da su usvojene vrednosti $\mu^* = 3/5$ i $l = r/3$.

U cilju primene jednačine (2) na rezultate ekstrakcije mlevene začinske paprike superkritičnim ugljen-dioksidom, izračunati su koeficijenti unutrašnje difuzije (D , m^2/s) (pretpostavljeni oblik čestice je sfera ekvivalentnog prečnika d_{sr}) (Ponomarev, 1976):

$$D = \frac{d_{sr} \left(\log a_1 - \log \frac{q_i}{q_o} \right)}{0,434 b_1 t} \quad (4)$$

gde je:

d_{sr} - srednji prečnik čestica (m^2);

$a_1 = 6/\pi^2$; $b_1 = \pi^2$;

q_o - ukupni sadržaj ekstraktivnih materija u biljnom materijalu;

q_i - sadržaj ekstraktivnih materija zaostalih u biljnom materijalu nakon vremena t ($q_i = q_o - q_i'$; q_i' - sadržaj ekstrahovanih materija nakon vremena t);

t - vreme ekstrakcije.

Na osnovu srednjih vrednosti D za svaki primenjeni pritisak, izračunate su vrednosti vremena unutrašnje difuzije t_i (3), koje su date u tabeli 14.

Tabela 14. Vrednosti D_{sr} i t_i

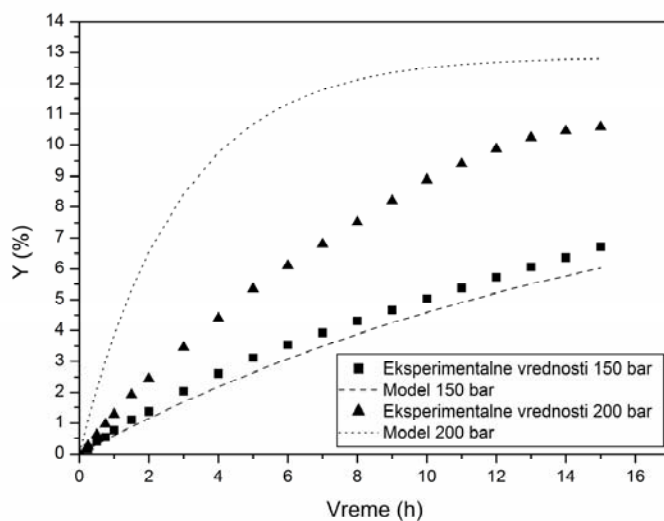
Parametar	SC150	SC200	SC300	SC400
D_{sr} (m^2/s)	$5,64 \times 10^{-14}$	$3,30 \times 10^{-13}$	$3,45 \times 10^{-13}$	$5,36 \times 10^{-13}$
t_i (s)	59.300	10.132	9.704	6.236

Uvođenjem dobijenih vrednosti vremena unutrašnje difuzije u model jednačinu (2) dobijene su jednačine koje opisuju kinetiku na ispitivanim pritiscima (tabela 15).

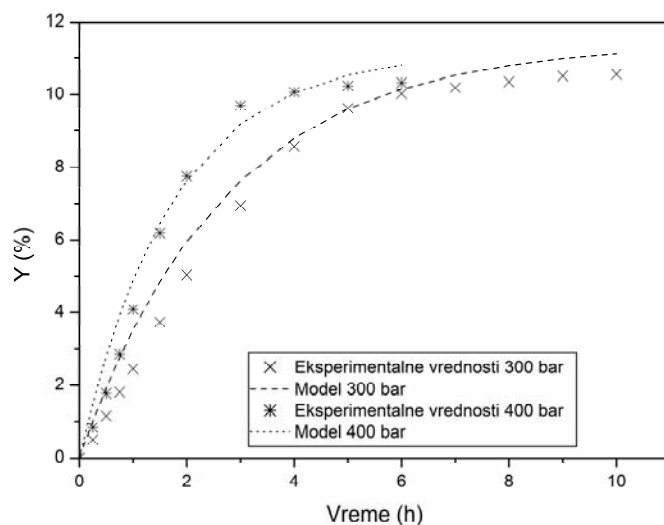
Tabela 15. Jednačina Reverchon i Sesti-Osseo-a za izračunavanje normalizovanog prinosa ekstrakcije mlevene začinske paprike

Uzorak	Jednačina
SC150	$Y = 100 (1 - \exp(-1,68 \times 10^{-5} t))$
SC200	$Y = 100 (1 - \exp(-9,87 \times 10^{-5} t))$
SC300	$Y = 100 (1 - \exp(-1,03 \times 10^{-4} t))$
SC400	$Y = 100 (1 - \exp(-1,60 \times 10^{-4} t))$

Na slikama 36 i 37 uporedo su prikazane dobijene jednačine i eksperimentalne vrednosti. Za dobijene jednačine date u tabeli 15 izračunato je relativno odstupanje od eksperimentalnih podataka (δ), čije su vrednosti date u tabeli 16.



Slika 36. Grafički prikaz jednačine Reverchon i Sesti-Osseo-a (2) i eksperimentalnih podataka za ekstrakciju mlevene začinske paprike superkritičnim ugljen-dioksidom na pritiscima 150 i 200 bar (temperatura 40°C)



Slika 37. Grafički prikaz jednačine Reverchon i Sesti-Osseo-a (2) i eksperimentalnih podataka za ekstrakciju mlevene začinske paprike superkritičnim ugljen-dioksidom na pritiscima 300 i 400 bar (temperatura 40°C)

Tabela 16. Relativno odstupanje jednačine Reverchon i Sesti-Osseo od eksperimentalnih vrednosti

Uzorak	Relativno odstupanje, δ
SC150	13,66
SC200	113,07
SC300	24,70
SC400	21,47

Kao što se može videti, primenjena model jednačina najbolje fituje ($\delta=13,66$) eksperimentalne rezultate ekstrakcije mlevene začinske paprike na pritisku od 150 bar. Relativna odstupanja su veća na pritiscima 300 i 400 bar, dok za ekstrakciju mlevene začinske paprike na 200 bar jednačina Reverchon i Sesti-Osseo-a najlošije prati eksperimentalne vrednosti prinosa, što se može i videti na slikama 36 i 37.

Na osnovu prethodnih rezultata može se zaključiti da prva primenjena model jednačina nije pogodna za modelovanje ispitivanog sistema. Iz tog razloga, primenjena je modifikovana jednačina (Zeković, 1998), prema kojoj je t_i konstantna vrednost za definisani sistem i uslove ekstrakcije:

$$Z = a' t = -\frac{t}{t_i} \quad (5)$$

gde je Z definisano kao:

$$Z = \ln\left(1 - \frac{Y_E}{100}\right) \quad (6)$$

pri čemu je:

a' - konstanta koja u sebi sadrži t_i ;

t - vreme ekstrakcije (h);

Y_E - maksimalni prinos ekstrakta (g/100 g).

U cilju uprošćavanja jednačine (5), izvršeno je njeno proširenje konstantom b , pa se dobija izraz:

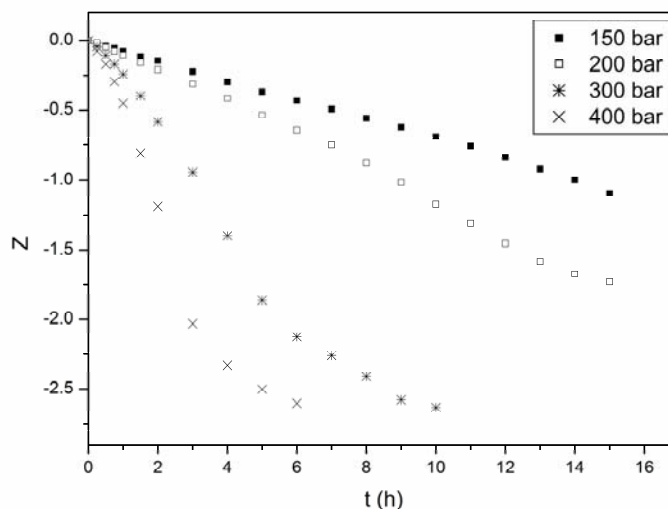
$$Z = a t + b \quad (7)$$

Konstante a i b u jednačini (7) evaluiraju se na osnovu eksperimentalnih podataka.

Uvođenjem izraza za Z u jednačinu (2), dobija se konačni izraz ove modifikovane model jednačine:

$$Y_t = 100 [1 - \exp(a t + b)] \quad (8)$$

Na osnovu prinosa ekstrakta i maksimalnog prinosa ekstrakta izračunate su vrednosti normalizovanog prinosa (Y) a zatim odgovarajuće vrednosti Z primenom jednačine (6). Zavisnosti vrednosti Z od vremena na različitim pritiscima ekstrakcije prikazane su na slici 38.



Slika 38. Zavisnost Z od vremena ekstrakcije

Na osnovu eksperimentalnih vrednosti izračunati su koeficijenti a i b u jednačini (7), čije su vrednosti date u tabeli 17.

Tabela 17. Vrednosti parametara a i b u jednačini (7)

Uzorak	a	b	$ r $
SC150	-0,0703	-0,0053	0,9993
SC200	-0,1202	0,0361	0,9984
SC300	-0,2967	-0,0362	0,9845
SC400	-0,4958	-0,0511	0,9727

Na osnovu dobijenih vrednosti koeficijentata korelacije (r) kod ekstrakcije na pritiscima od 150 i 200 bara može se zaključiti da postoji vrlo visoka linearna zavisnost između veličine Z i vremena ekstrakcije (t), dok pri ekstrakciji na 300 i 400 bara između Z i t postoji nešto manja linearna korelacija, za koju je neophodno da je $r < 0,95$.

Uvođenjem dobijenih vrednosti Z u jednačinu (8), dobija se finalna jednačina za izračunavanje normalizovanog prinosa ekstrakcije mlevene začinske paprike na ispitivanim pritiscima (tabela 18).

Tabela 18. Modifikovana jednačina (8) za izračunavanje normalizovanog prinosa totalnog ekstrakta (Y)

Uzorak	Jednačina
SC150	$Y_1 = 100 [1 - \exp (-0,0703 t - 0,0053)]$
SC200	$Y_1 = 100 [1 - \exp (-0,1202 t + 0,0361)]$
SC300	$Y_1 = 100 [1 - \exp (-0,2967 t - 0,0362)]$
SC400	$Y_1 = 100 [1 - \exp (-0,4958 t - 0,0511)]$

Jednačine (tabela 18) su grafički prikazane na slikama 39-42. Kao i u prethodnom slučaju, i za dobijene modifikovane jednačine su izračunata relativna odstupanja koja su data u tabeli 21. Dobijene vrednosti srednjih relativnih odstupanja pokazuju da modifikovana jednačina I mnogo bolje fituje eksperimentalne podatke u odnosu na polaznu model jednačinu (2) kada su u pitanju pritisci 150 i 200 bar. Za pritiske 300 i 400 bar primenjena jednačina ima bliske vrednosti srednjih relativnih odstupanja kao i polazna jednačina (2), odnosno, može se zaključiti da ni ona nije pogodna za modelovanje ispitivanog sistema na navedenim pritiscima.

S obzirom da prethodne model jednačine nisu dale dobre rezultate fitovanja eksperimentalnih rezultata na svim ispitivanim pritiscima, u jednačinu (7) uveden je još jedan član, tako da ona postaje jednačina polinoma drugog reda:

$$Y_{II} = 100 \left[1 - \exp(A + B_1 t + B_2 t^2) \right] \quad (9)$$

Primenog programa Origin 6.1 dobijene su vrednosti parametara A, B₁ i B₂, odnosno koeficijenti korelacije, koji su dati u tabeli 19.

Tabela 19. Vrednosti konstanti A, B₁ i B₂ iz jednačine (9)

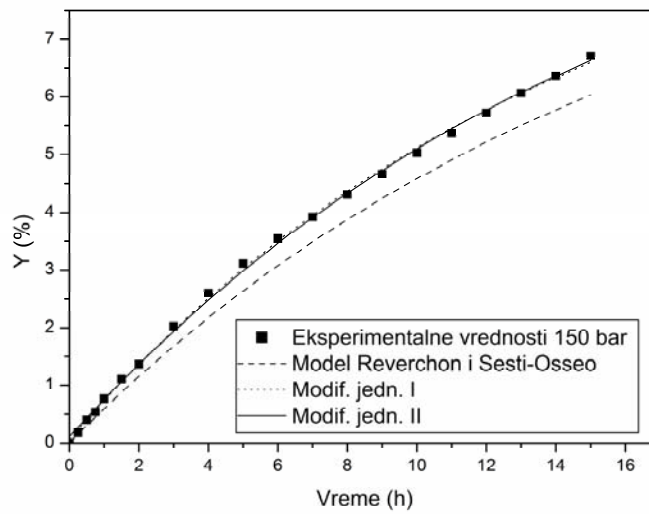
Uzorak	A	B ₁	B ₂	r
SC150	-0,0104	-0,0669	-0,0002	0,9995
SC200	0,0077	-0,1056	-0,0010	0,9989
SC300	0,1462	-0,4637	0,0179	0,9958
SC400	0,2030	-0,8639	0,0642	0,9922

Unošenjem dobijenih vrednosti u jednačinu (9) dobijeni su finalni oblici jednačina za modelovanje eksperimentalnih podataka ekstrakcionog sistema mlevena začinska paprika - superkritični ugljen-dioksid (tabela 20).

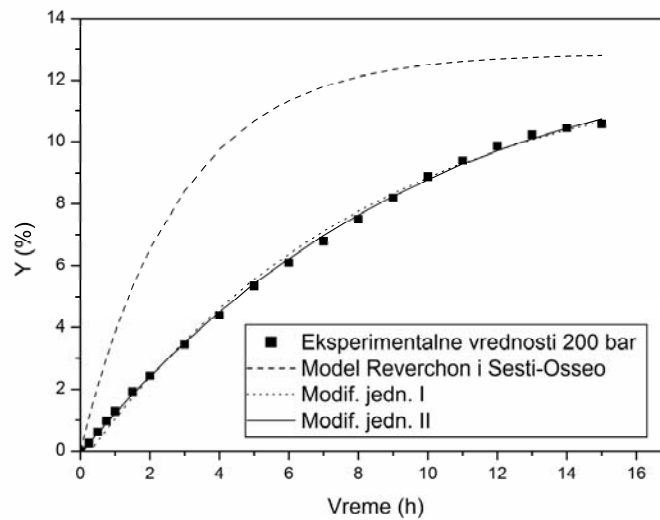
Tabela 20. Modifikovana jednačina II (9) za izračunavanje normalizovanog prinosa totalnog ekstrakta (Y)

Uzorak	Jednačina
SC150	$Y_{II} = -0,0104 - 0,0669 t - 0,0002 t^2$
SC200	$Y_{II} = 0,0077 - 0,1056 t - 0,0010 t^2$
SC300	$Y_{II} = 0,1462 - 0,4637 t + 0,0179 t^2$
SC400	$Y_{II} = 0,2030 - 0,8639 t + 0,0642 t^2$

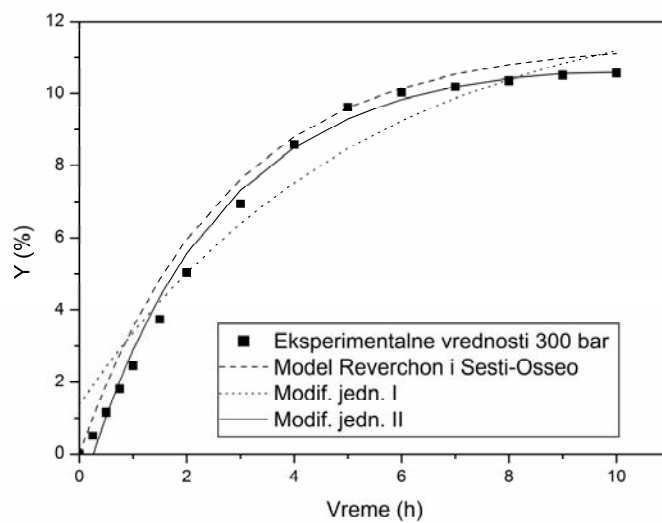
Dobijene jednačine (model (2), modifikovane jednačine I (8) i II (9)) grafički su prikazane na slikama 39-42.



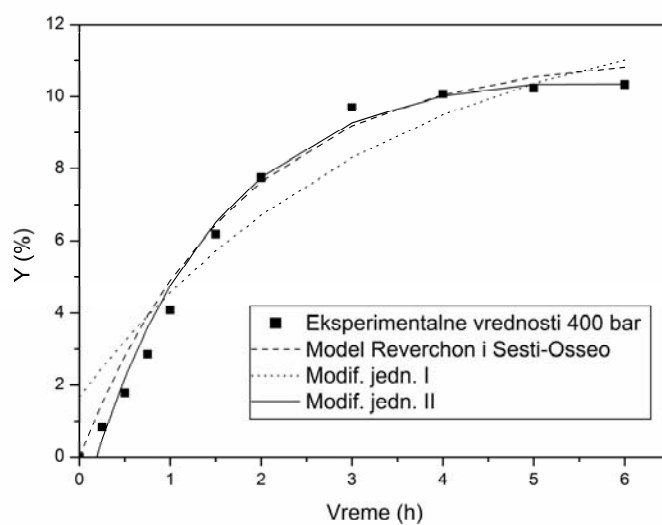
Slika 39. Grafički prikaz jednačine Reverchon i Sesti Osseo-a (2) i modifikovanih jednačina (I i II) za ekstrakciju mlevene začinske paprike superkritičnim ugljen-dioksidom na 150 bar



Slika 40. Grafički prikaz jednačine Reverchon i Sesti Osseo-a (2) i modifikovanih jednačina (I i II) za ekstrakciju mlevene začinske paprike superkritičnim ugljen-dioksidom na 200 bar



Slika 41. Grafički prikaz jednačine Reverchon i Sesti Osseo-a (2) i modifikovanih jednačina (I i II) za ekstrakciju mlevene začinske paprike superkritičnim ugljen-dioksidom na 300 bar



Slika 42. Grafički prikaz jednačine Reverchon i Sesti Osseo-a (2) i modifikovanih jednačina (I i II) za ekstrakciju mlevene začinske paprike superkritičnim ugljen-dioksidom na 400 bar

Vrednosti srednjih relativnih odstupanja (δ) jednačina (tabela 20) date su u tabeli 21).

Tabela 21. Srednje relativno odstupanje, δ

Relativno odstupanje, $\pm \delta$	
150	
Modif. jednačina I	3,54
Modif. jednačina II	5,48
200	
Modif. jednačina I	14,47
Modif. jednačina II	2,58
300	
Modif. jednačina I	23,35
Modif. jednačina II	19,80
400	
Modif. jednačina I	25,30
Modif. jednačina II	18,14

Upoređivanjem dobijenih srednjih vrednosti relativnih odstupanja za primenjene jednačine, može se zaključiti da modifikovana jednačina II (9) najbolje fituje eksperimentalne podatke u odnosu na model jednačine (2) i (8) i da se može primeniti za modelovanje ispitivanog sistema. Osim toga, jednačine (2) i (8) se mogu primeniti za modelovanje ispitivanog ekstrakcionog sistema na pritiscima nižim od 200 bar.

4.4. SASTAV MASNIH KISELINA OLEORIZINA MLEVENE ZAČINSKE PAPRIKE DOBIJENOG EKSTRAKCIJOM ORGANSKIM RASTVARAČEM

Bojene materije začinske paprike, karotenoidi, mogu se naći slobodni i esterifikovani masnim kiselinama, i to u vidu mono- i diestara. Proces esterifikacije karotenoida masnim kiselinama vezan je sa procesom sazrevanja plodova, pošto se odvija istovremeno sa degradacijom hlorofila, nestankom hloroplasta i stvaranjem hromoplasta (Pérez-Gálvez i Mínguez-Mosquera, 2005). Esterifikacija utiče na smanjenje polarnosti u odnosu na slobodne karotenoide. Ketokarotenoidi kapsantin i kapsorubin uglavnom su esterifikovani zasićenim, dok su ostali ksantofili esterifikovani nezasićenim masnim kiselinama.

Masne kiseline koje esterifikuju ksantofile su uglavnom laurinska, miristinska, palmitinska, oleinska i linolna (Minguez-Mosquera i Hornero-Mendez, 1994; Biacs i sar., 1989; Breithaupt i Schwack, 2000).

Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu sastava oleorizina začinske paprike dobijenog ekstrakcijom heksanom primenjena je GC-MS metoda. Rezultati ove analize su dati u tabeli 22.

Tabela 22. Sastav masnih kiselina (%; m/m)* oleorizina dobijenog klasičnom ekstrakcijom po Soxhlet-u (Sx)

Masna kiselina	Sx
Miristinska (14 : 0)	0,46 ± 0,04
Palmitinska (16 : 0)	9,66 ± 0,57
Palmitooleinska (16 : 1)	0,29 ± 0,02
Stearinska (18 : 0)	2,23 ± 0,12
Oleinska (18 : 1)	8,20 ± 0,41
Linolna (18 : 2)	75,70 ± 1,20
Linolenska (18 : 3)	2,93 ± 0,12
Arahidinska (20 : 0)	0,29 ± 0,02
Behenska (22 : 0)	0,24 ± 0,02
Ukupne zasićene m.k.	12,88
Ukupne nezasićene m.k.	87,12
Mono-nezasićene m.k.	8,49
Poli-nezasićene m.k.	78,63
Odnos nezasić. : zasić. m.k.	6,76 : 1
Udeo C18 m.k.	0,87

* dobijene srednje vrednosti su rezultat pet ponavljanja i predstavljene su kao srednja vrednost ± SD

U oleorizinu mlevene začinske paprike je detektovano prisustvo devet masnih kiselina (5 zasićenih i 4 nezasićene). Najveći udeo u masnim kiselinama ovog ekstrakta čini esencijalna, polinezasićena linolna kiselina (75,70%). Od nezasićenih masnih kiselina najzastupljenije su, pored linolne, oleinska (8,20%) i linolenska (2,93%). Najzastupljenije zasićene masne kiseline su palmitinska (9,66%) i stearinska (2,23%). Odnos nezasićenih prema zasićenim kiselinama u ovom uzorku iznosio je 6,76.

4.5. SASTAV MASNIH KISELINA OLEORIZINA MLEVENE ZAČINSKE PAPRIKE DOBIJENIH SUPERKRITIČNOM EKSTRAKCIJOM

GC-MS metoda je primenjena za određivanje sastava masnih kiselina u ekstraktima dobijenim superkritičnom ekstrakcijom primenom ugljen-dioksida (tabela 23).

Tabela 23. Sastav masnih kiselina (%; m/m)* oleorizina mlevene začinske paprike dobijenih ekstrakcijom superkritičnim ugljen-dioksidom

Masna kiselina	SC150	SC200	SC300	SC400
Miristinska (14:0)	0,52 ± 0,06	0,18 ± 0,02	0,27 ± 0,03	0,28 ± 0,03
Palmitinska (16:0)	10,39 ± 0,74	9,11 ± 0,71	9,60 ± 0,46	10,14 ± 0,74
Palmitooleinska (16:1)	0,33 ± 0,02	0,31 ± 0,04	0,29 ± 0,04	0,30 ± 0,05
Stearinska (18:0)	1,81 ± 0,04	1,90 ± 0,07	1,97 ± 0,12	1,93 ± 0,12
Oleinska (18:1)	8,02 ± 0,15	8,14 ± 0,76	7,69 ± 0,54	7,92 ± 0,60
Linolna (18:2)	76,62 ± 0,91	78,26 ± 0,95	77,91 ± 0,84	77,20 ± 1,22
Linolenska (18:3)	1,91 ± 0,05	1,65 ± 0,14	1,73 ± 0,08	1,71 ± 0,07
Arahidinska (20:0)	0,23 ± 0,03	0,25 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,31 ± 0,03
Behenska (22:0)	0,15 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,20 ± 0,02
Ukupne zasićene m.k.	13,12	11,63	12,37	12,86
Ukupne nezasićene m.k.	86,88	88,37	87,63	87,14
Mono-nezasićene m.k.	8,35	8,45	7,99	8,22
Poli-nezasićene m.k.	78,53	79,91	79,65	78,92
Odnos nezasić. : zasić. m.k.	6,62 : 1	7,59 : 1	7,09 : 1	6,77 : 1
Udeo C18 m.k.	0,87	0,88	0,87	0,87

* dobijene srednje vrednosti su rezultat pet ponavljanja i predstavljene su kao srednja vrednost ± SD

U oleorizinima SC150, SC200, SC300 i SC400 utvrđeno je prisustvo devet masnih kiselina, kao i u oleorizinu dobijenom ekstrakcijom po Soxhlet-u. Najveći deo masnih kiselina ovih ekstrakata takođe čini esencijalna linolna kiselina (76,62-78,26%).

Najzastupljenije nezasićene masne kiseline pored linolne, su oleinska i linolenska; a od zasićenih masnih kiselina palmitinska i stearinska. Sličan odnos masnih kiselina potvrdili su El-Adawy i Taha (2001) i Pérez-Gálvez i sar. (1999b). Naime, u ulju paprike oni su utvrdili 5, odnosno 8 masnih kiselina, sa linolnom kao dominantnom (67,8% i 69,24%). El-Adawy i Taha (2001) nisu detektovali miristinsku i linolensku kiselinu. Pérez-Gálvez i sar.

(1999b) su dokazali prisustvo masne kiseline sa 12 C-atoma (laurinska). Ulja ekstrahovana iz paprike Aleva N.K. (klasičnom i superkritičnom ekstrakcijom) nisu sadržavala laurinsku kiselinu u svom sastavu, ali su imala arahidinsku i behensku kiselinu. Rezultati pokazuju da preko 87% ukupnih masnih kiselina ekstrahovanih klasičnom i superkritičnom ekstrakcijom čine C18 masne kiseline. Odnos nezasićenih i zasićenih masnih kiselina u ovim uljima dobijenim superkritičnom ekstrakcijom bio je u opsegu od 6,62 do 7,59, što predstavlja veću vrednost od istog odnosa koje su objavili El-Adawy i Taha (2001) i Pérez-Gálvez i sar. (1999b) (4,72, odnosno 4,75). S obzirom da su u navedenoj literaturi primenjivani različiti načini pripreme za ekstrakciju, različiti vidovi i uslovi ekstrakcije, kao i različit sortiment paprike, teško je napraviti objektivno poređenje rezultata. Poređenje se još više komplikuje uzimajući u obzir i to da su korišćene različite sorte i varijeteti.

Iako su nezasićene masne kiseline podložnije autooksidaciji, veliki udeo linolne, kao esencijalne masne kiseline, ukazuje na izuzetan nutritivni značaj ovakvog proizvoda. Pošto su ispitivani uljani ekstrakti bogati oleinskom i linolnom kiselinom, mogu se primeniti i kao jestiva i salatna ulja, kao i za proizvodnju margarina.

Analizom je potvrđeno da između sastava masnih kiselina oleorizina dobijenih ekstrakcijom organskim rastvaračem i superkritičnim ugljen-dioksidom, kao ni između oleorizina dobijenih superkritičnom ekstrakcijom pri različitom pritisku, nema statistički značajne razlike. To znači da se superkritičnom ekstrakcijom mogu dobiti uljni ekstrakti veoma sličnog sastava masnih kiselina, s tim da superkritična ekstrakcija ima prednost, pošto ekstrakti ne sadrže tragove organskog rastvarača, a istovremeno nemaju promenjene funkcionalne komponente, kao što su bojene materije i arome, usled nižih temperatura na kojima se ekstrakcija odvija.

4.6. SADRŽAJ EKSTRAHOVANE BOJE U OLEORIZINIMA MLEVENE ZAČINSKE PAPIRIKE DOBIJENIH EKSTRAKCIJOM ORGANSKIM RASTVARAČEM I SUPERKRITIČNIM UGLJEN- DIOKSIDOM (ASTA VREDNOST)

Boja i kvalitet paprike i oleorizina su povezani pojmovi, u smislu da se kvalitet paprike i oleorizina povećava sa povećanjem kapaciteta obojenosti ("coloring capacity") (Mínguez-Mosquera i Pérez-Gálvez, 1998). Intenzivnija boja takođe povećava njihovu komercijalnu vrednost.

ASTA vrednost mlevene začinske paprike (uzorak za ekstrakciju) iznosila je 108,24, što sa komercijalnog aspekta predstavlja papriku sa zadovoljavajućim sadržajem ekstrahovane boje, s obzirom da se na našem tržištu mogu naći mlevene začinske paprike i sa manjim ASTA vrednostima (Tepić i sar., 2008). Međutim, pažljivim odabirom uzoraka sorte može se dobiti mlevena začinska paprika sa daleko boljim svojstvima, sa preko 200 ASTA jedinica (Tepić i Vujičić, 2004).

U tabeli 24 prikazane su ASTA vrednosti oleorizina dobijenih ekstrakcijom organskim rastvaračem i superkritičnim ekstrakcijama. Kao što se moglo pretpostaviti na osnovu

karakteristika primenjenih rastvarača, najintenzivniju boju imao je uzorak dobijen ekstrakcijom pomoću heksana (Sx). Najlošiju boju imao je uzorak dobijen ekstrakcijom na 200 bara, svega 15,06% boje oleorizina Sx. Pri najvećem primenjenom pritisku dobijen je oleorizin sa 47,09% boje (u poređenju sa Sx). Ovo je ujedno najintenzivnije obojen SC oleorizin dobijen ekstrakcijom superkritičnim ugljen-dioksidom.

Tabela 24. ASTA vrednosti oleorizina dobijenih ekstrakcijom po Soxhlet-u i superkritičnom ekstrakcijom ugljen-dioksidom

Uzorak	ASTA
Sx	886,02
SC150	305,05
SC200	133,48
SC300	368,97
SC400	417,24

S obzirom da boja komercijalnih oleorizina paprike, prema različitim literaturnim podacima, može biti u intervalu od 300 do 2.500 ASTA jedinica (tj. 12.000 do 100.000 standardnih jedinica boje; 40 jedinica boje = 1 ASTA) (Pruthi, 2003), od preko 1.400 do preko 3.600 (Mínguez-Mosquera i Pérez-Gálvez, 1998), odnosno od 500 do 3.500 ASTA (www.occidentalfoods.com), uzorak SC200 ne bi bio komercijalno prihvatljiv sa ovog aspekta. Prema Nguyen i sar. (1998), ekstrakcijom i frakcionisanjem mlevene začinske paprike primenom superkritičnog ugljen-dioksida mogu se dobiti oleorizini sa čak preko 7000 ASTA jedinica (tzv. "teška frakcija"). Međutim, s obzirom da obojenost, tj. ekstrahovanu boju (ASTA), kao merilo ukupnog sadržaja pigmenata, veoma zavisi pre svega od sortimenta paprike, može se pretpostaviti da se navedeni literaturni podaci odnose na inostrane sorte, izuzetno bogate karotenoidima.

4.7. KVALITATIVNI I KVANTITATIVNI SASTAV KAROTENOIDA U OLEORIZINIMA MLEVENE ZAČINSKE PAPIRIKE

Brze metode određivanja boje paprike i oleorizina (kao što je ASTA) su više komercijalne procene stepena obojenosti. Primenom naprednijih metoda, kao što je visokopritisna tečna hromatografija (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), može se dobiti detaljniji uvid u profil bojenih materija. Maksimumi apsorbancije i retencionna vremena karotenoida, dobijeni hromatografskom analizom oleorizina paprike dobijenih ekstrakcijom po Soxhletu i superkritičnim ugljen-dioksidom i ostataka nakon ekstrakcije dati su u tabeli 25.

Kvalitativnom i kvantitativnom analizom oleorizina identifikovano je više pikova mono- i diestara istog karotenoida, esterifikovanih različitim masnim kiselinama, sa različitim retencionim vremenima.

Kako standardi za esterifikovane karotenoide nisu bili dostupni, nije bilo moguće definisanje svih pikova na hromatogramima ekstrakata paprike. Iz tih razloga, ispitani su UV/VIS spektri svih pikova da bi se dobile informacije o osnovnoj strukturi bojene materije koja čini osnovu intenzivne crvene boje uzoraka. Na osnovu njihovih spektara svi pikovi mogu da se odnose na jednu od dve grupe: jedinjenja sa spektrom sličnim zeaksantinu i jedinjenja sa spektrima sličnim kapsantinu. Iako je spektar β -karotena sličan zeaksantinu, razmatra se kao posebna grupa, pošto je njegov sadržaj u paprici veliki i hromatografski se lako razdvaja od ostalih pigmenta. Karotenoidi sa karbonilnom grupom u alilnoj grupi ubrajaju se u grupu kapsantina, pošto su strukturno slični. Oni apsorbuju u opsegu 400 - 500 nm i imaju apsorpcione maksimume na 470 - 480 nm.

Karotenoidi bez funkcionalne grupe u alilnom sistemu pripadaju zeaksantin grupi. Apsorbuju između 370 - 500 nm i imaju maksimume na 440 - 450 nm. Pored osnovnog maksimuma, ova jedinjenja takođe imaju jedan ili dva maksimuma na manjim ili većim talasnim dužinama. Na osnovu UV/VIS spektra karotenoidi su identifikovani kao žuti (bez karbonilne grupe u molekulu) ili crveni (koji sadrže kiseonik) (Vesper i Nitz, 1997b).

Tabela 25. Maksimumi apsorpcije (λ_{\max}) i retenciona vremena (t_R) karotenoida, dobijeni HPLC analizom oleorizina i ostataka nakon ekstrakcije paprike

Red. br	Karotenoid	Boja	λ_{\max} (nm)	t_R (min)
1	Kapsorubin ¹	crven	446,470,480	4,883
2	Violaksantin ¹	žut	421,442,473	5,788
3	Kapsantin ¹	crven	(446),470,486	6,928
4	<i>cis</i> -Kapsantin ³	crven	422,445,472	7,501
6	n.i.*	žut	(402),432,454,488	8,678
7	n.i.	žut	464-2,486	9,246
8	Zeaksantin ¹	žut	430,452,479	9,895
9	Anteraksantin ¹	žut	(430),448,475	10,665
14	β -Kriptoksantin ³	žut	(434),452,476	26,177
15	Kapsorubin ²	crven	(446),470,480	27,802
16	Kapsantin ²	crven	(446),470,486	29,450
17	Kapsantin ²	crven	474,(502)	29,915
18	Kapsantin ²	crven	474,(502)	30,244
19	n.i.	žut	⁽³⁷⁴⁾ , (434),456,486	31,145
20	Kapsantin ²	crven	(446),470,502	31,514
21	Kapsantin ²	crven	468	31,850
25	n.i.	žut	(428),450,475	33,384
26	β -Karoten ¹	žut	(428),450,484	34,442
27	<i>cis</i> - β -Karoten ³	žut	^(352,366) , (422),450,484	34,794
28	Kapsorubin ²	crven	460,480	35,832

Tabela 25. Nastavak

29	Kapsantin ²	crven	(444),474,502	36,760
31	Kapsantin ²	crven	472,(500)	37,677
32	Kapsantin ²	crven	472,(500)	38,551
33	Kapsantin ²	crven	472,(500)	39,536
34	Kapsantin ²	crven	472,(500)	40,664

Identifikacija karotenoida: 1-na osnovu retencionog vremena i apsorpcionog spektra; 2-na osnovu apsorpcionog spektra; 3-na osnovu apsorpcionog spektra i literaturnih podataka

* n.i. – nije identifikovan

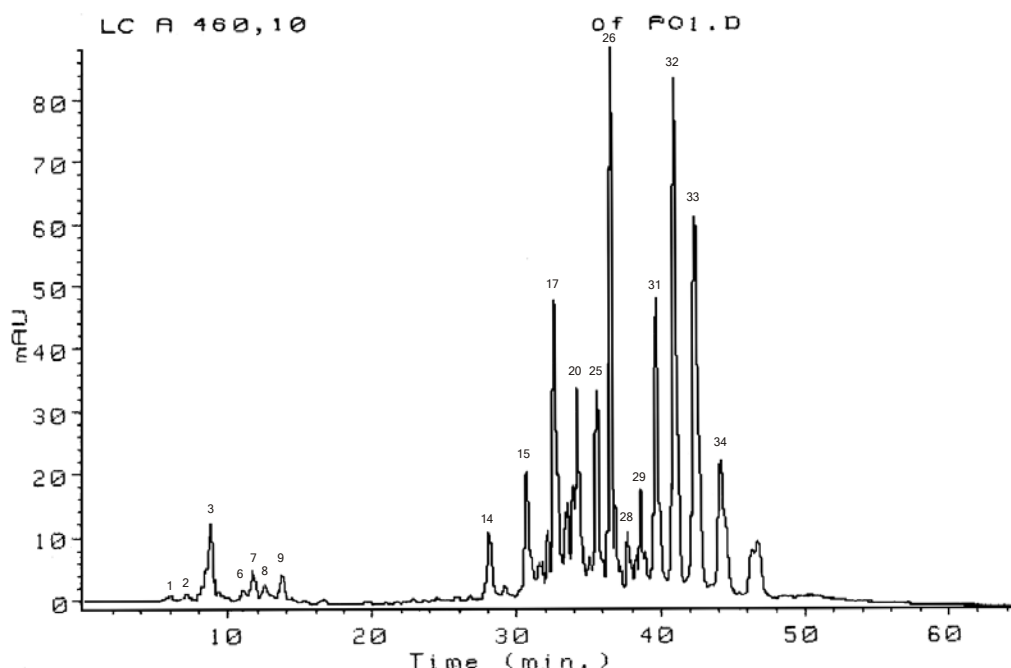
1-14 – slobodni karotenoidi

15-25 – monoestri

28-34 – diestri

4.7.1. Sadržaj karotenoida u oleorizinu dobijenom ekstrakcijom organskim rastvaračem

Na slici 43 prikazan je HPLC hromatogram oleorizina mlevene začinske paprike dobijenog ekstrakcijom po Soxhlet-u. Sadržaji karotenoida u ovom uzorku su dati u tabeli 26.



Slika 43. HPLC hromatogram oleorizina mlevene začinske paprike dobijenog konvencionalnom ekstrakcijom pomoću organskog rastvarača (Sx). Identifikacija pikova: 1-kapsorubin; 2-violaksantin; 3-kapsantin; 4-*cis*-kapsantin; 8-zeaksanthin; 9-anteraksantin; 14- β -kriptoksantin; 15-monoestar kapsorubina; 17, 20-monoestri kapsantina; 26- β -karoten; 28-diestar kapsorubina; 29,31,32, 33, 34-diestri kapsantina

Tabela 26. Sadržaj karotenoida oleorizina dobijenog konvencionalnom ekstrakcijom organskim rastvaračem (Sx)

Red. br.	t _R (min)	Karotenoid	Sadržaj (mg/kg)*
1	4,883	Kapsorubin ¹	88,6 ± 2,45
2	5,788	Violaksantin ¹	254 ± 13,6
3	6,928	Kapsantin ¹	1.102 ± 21,8
4	7,501	<i>cis</i> -Kapsantin ³	154 ± 8,01
6	8,678	n.i.**	77,6 ± 2,32
7	9,246	n.i.	162 ± 10,3
8	9,895	Zeaksantin ¹	256 ± 17,5
9	10,665	Anteraksantin ¹	361 ± 12,7
14	26,177	β-Kriptoksantin ³	345 ± 7,29
15	27,802	Kapsorubin ²	1.253 ± 43,5
17	29,915	Kapsantin ²	2.949 ± 102
19	31,145	n.i.	496 ± 22,0
20	31,514	Kapsantin ²	1.865 ± 153
25	33,384	n.i.	1.232 ± 43,4
26	34,442	β-Karoten ¹	3.251 ± 285
28	35,832	Kapsorubin ²	274 ± 9,78
29	36,760	Kapsantin ²	626 ± 20,1
31	37,677	Kapsantin ²	3.088 ± 113
32	38,551	Kapsantin ²	5.811 ± 138
33	39,536	Kapsantin ²	5.369 ± 113
34	40,664	Kapsantin ²	2.461 ± 80,0
Ukupno:			31.475,2

* dobijene srednje vrednosti su rezultat tri ponavljanja i predstavljene su kao srednja vrednost ± SD

Identifikacija karotenoida: 1-na osnovu retencionog vremena i apsorpcionog spektra; 2-na osnovu apsorpcionog spektra; 3-na osnovu apsorpcionog spektra i literaturnih podataka

** n.i. – nije identifikovan

1-14 – slobodni karotenoidi

15-25 – monoestri

28-34 – diestri

Iz rezultata datih u tabelama 26 i 27 može se videti da je u Sx oleorizinu bilo 6.051,2 mg/kg slobodnih (neesterifikovanih) karotenoida, što čini 19,22% od ukupnih, među kojima su, na osnovu retencionih vremena i spektara, identifikovani kapsantin, *cis*-kapsantin, kapsorubin, violaksantin, zeaksantin, anteraksantin, β-kriptoksantin i β-karoten.

Organskim rastvaračem izdvojeno je 24,76% monoestara i 56,01% diestara u odnosu na maksimalnu količinu prisutnih pigmenata (31.475,2 mg/kg).

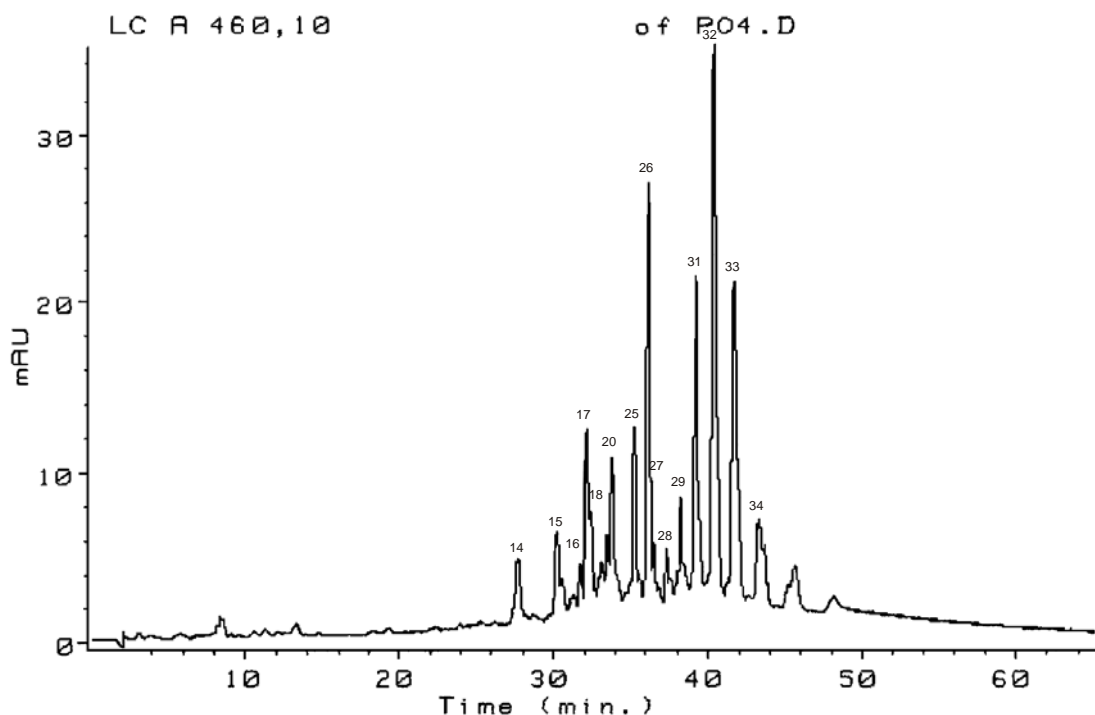
Analiza je potvrdila da je dominantni crveni pigment u oleorizinu dobijenom ekstrakcijom organskim rastvaračem bio kapsantin, čiji je udeo 74,42% u odnosu na ukupne pigmente.

Tabela 27. Sadržaj slobodnih i esterifikovanih karotenoida (mg/kg) u oleorizinu mlevene začinske paprike dobijenom konvencionalnom ekstrakcijom

Karotenoidi	Boja	Sx
slobodni	žuti	4.706,6
slobodni	kapsantin	1.256
slobodni	kapsorubin	88,6
slobodni	crveni	1.344,6
slobodni	ukupno	6.051,2
monoestri	žuti	1.728
monoestri	kapsantin	4.814
monoestri	kapsorubin	1.253
monoestri	crveni	6.067
monoestri	ukupno	7.795
diestri	žuti	0,00
diestri	kapsantin	17.355
diestri	kapsorubin	274
diestri	crveni	17.629
diestri	ukupno	17.629
ukupno	žuti	6.435
	kapsantin	23.425
	kapsorubin	1.616
	crveni	25.041
	Ukupno:	31.475,2

4.7.2 Sadržaj karotenoida oleorizina dobijenih superkritičnom ekstrakcijom

Na slikama 44-47 prikazani su hromatogrami oleorizina paprike dobijenih superkritičnom ekstrakcijom pomoću ugljen-dioksida na 150, 200, 300 i 400 bara i temperaturi 40°C, dok je u tabelama 28-31 prikazan sadržaj karotenoida u istim ekstraktima dobijen njihovom kvantitativnom analizom.



Slika 44. HPLC hromatogram oleorizina dobijenog superkritičnom ekstrakcijom mlevene začinske paprike na pritisku 150 bara i 40°C (SC150). Identifikacija pikova: 14- β -kriptoksantin; 15-monoestar kapsorubina; 17, 20-monoestri kapsantina; 26- β -karoten; 27-*cis*- β -karoten; 28-diestar kapsorubina; 29, 31, 32, 33, 34-diestri kapsantina

Tabela 28. Sadržaj karotenoida oleorizina dobijenog superkritičnom ekstrakcijom na 150 bara (SC150)

Red. br.	t _R (min)	Karotenoid	Sadržaj (mg/kg) *
14	26,177	β-Kriptoksantin ³	122 ± 6,26
15	27,802	Kapsorubin ²	237 ± 14,2
17	29,915	Kapsantin ²	504 ± 35,9
19	31,145	n.i.**	151 ± 7,13
20	31,514	Kapsantin ²	526 ± 35,9
25	33,384	n.i.	379 ± 26,4
26	34,442	β-Karoten ¹	890 ± 38,3
27	34,794	cis-β-Karoten ³	118 ± 5,92
28	35,832	Kapsorubin ²	75,1 ± 2,75
29	36,760	Kapsantin ²	167 ± 8,17
31	37,677	Kapsantin ²	904 ± 37,8
32	38,551	Kapsantin ²	1.862 ± 163
33	39,536	Kapsantin ²	1.394 ± 115
34	40,664	Kapsantin ²	329 ± 21,3
Ukupno:			7.658,1

* dobijene srednje vrednosti su rezultat tri ponavljanja i predstavljene su kao srednja vrednost ± SD

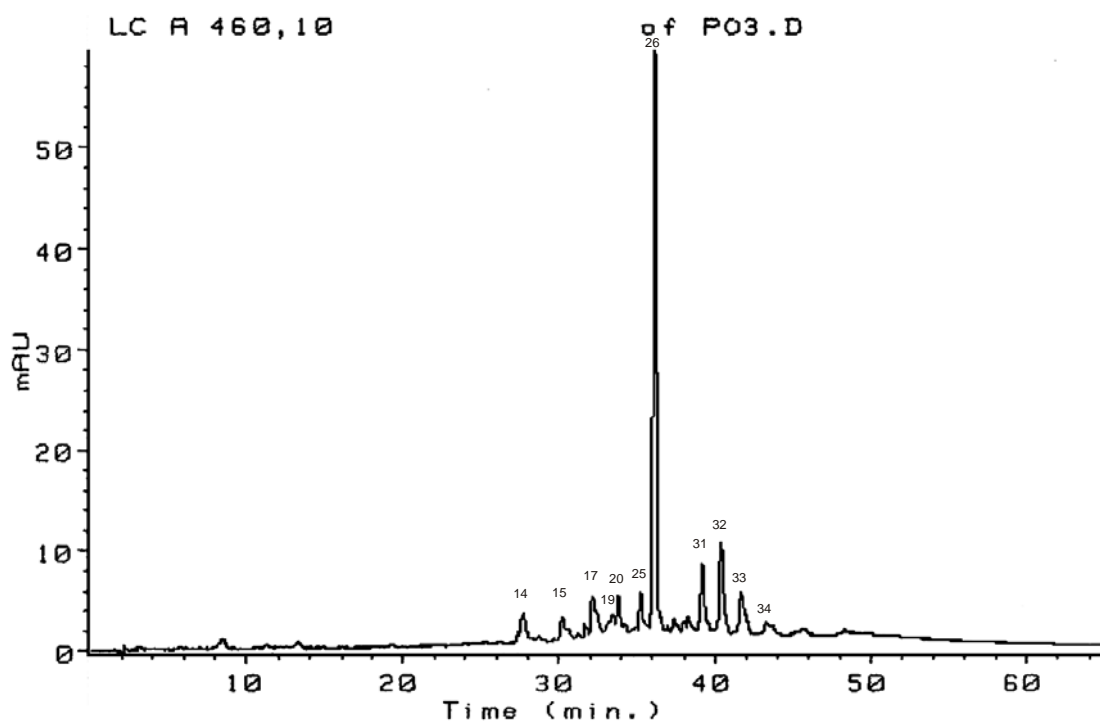
Identifikacija karotenoida: 1-na osnovu retencionog vremena i apsorpcionog spektra; 2-na osnovu apsorpcionog spektra; 3-na osnovu apsorpcionog spektra i literaturnih podataka

** n.i. – nije identifikovan

1-14 – slobodni karotenoidi

15-25 – monoestri

28-34 – diestri



Slika 45. HPLC hromatogram oleorizina dobijenog superkritičnom ekstrakcijom mlevene začinske paprike na pritisku 200 bara i 40°C (SC200)
Identifikacija pikova: 14- β -kriptoksantin; 15-monoestar kapsorubina; 17, 20-monoestri kapsantina; 26- β -karoten; 31, 32, 33, 34-diestri kapsantina

Tabela 29. Karotenoidni sastav oleorizina dobijenog superkričnom ekstrakcijom na 200 bara i 40°C (SC200)

Red. br.	t _R (min)	Karotenoid	Sadržaj (mg/kg)*
14	26,177	β-Kriptoksantin ³	102 ± 7,44
15	27,802	Kapsorubin ²	118 ± 6,15
17	29,915	Kapsantin ²	240 ± 15,4
19	31,145	n.i.**	113 ± 5,64
20	31,514	Kapsantin ²	181 ± 11,7
25	33,384	n.i.	150 ± 10,1
26	34,442	β-Karoten ¹	2.240 ± 192
31	37,677	Kapsantin ²	383 ± 12,9
32	38,551	Kapsantin ²	570 ± 27,6
33	39,536	Kapsantin ²	346 ± 15,8
34	40,664	Kapsantin ²	86,8 ± 1,94
Ukupno:			4.529,8

* dobijene srednje vrednosti su rezultat tri ponavljanja i predstavljene su kao srednja vrednost ± SD

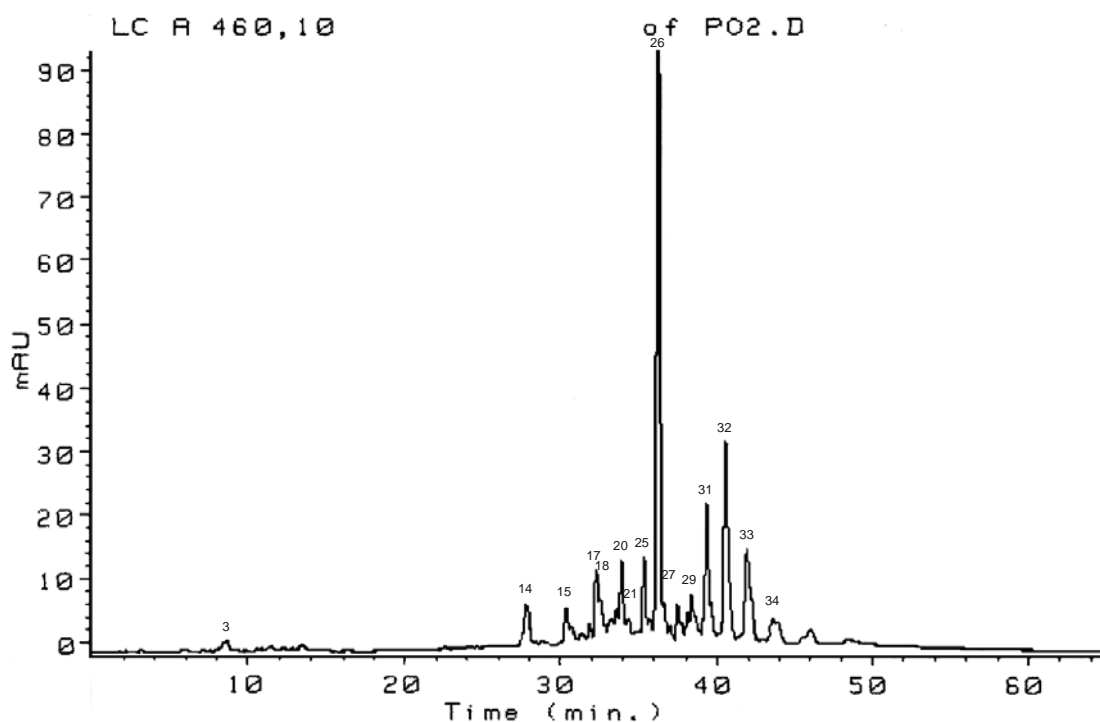
Identifikacija karotenoida: 1-na osnovu retencionog vremena i apsorpcionog spektra; 2-na osnovu apsorpcionog spektra; 3-na osnovu apsorpcionog spektra i literaturnih podataka

** n.i. – nije identifikovan

1-14 – slobodni karotenoidi

15-25 – monoestri

28-34 – diestri



Slika 46. HPLC hromatogram oleorizina dobijenog superkritičnom ekstrakcijom mlevene začinske paprike na pritisku 300 bara i 40°C (SC300)
Identifikacija pikova: 3-kapsantin; 14- β -kriptoksantin; 15-monoestar kapsorubina; 17, 18, 20, 21-monoestri kapsantina; 26- β -karoten; 27-*cis*- β -karoten; 29, 31, 32, 33, 34-diestri kapsantina

Tabela 30. Karotenoidni sastav oleorizina dobijenog superkričnom ekstrakcijom na 300 bara (SC300)

Red. br.	t _R (min)	Karotenoid	Sadržaj (mg/kg) *
3	6,928	Kapsantin ¹	159 ± 8,49
14	26,177	β-Kriptoksantin ³	219 ± 14,3
15	27,802	Kapsorubin ²	272 ± 18,1
17	29,915	Kapsantin ²	456 ± 29,7
18	30,244	Kapsantin ²	279 ± 17,1
19	31,145	n.i.**	127 ± 6,49
20	31,514	Kapsantin ²	576 ± 28,6
21	31,850	Kapsantin ²	130 ± 5,82
25	33,384	n.i.	459 ± 19,8
26	34,442	β-Karoten ¹	3.514 ± 315
27	34,794	cis-β-Karoten ³	193 ± 11,7
29	36,760	Kapsantin ²	292 ± 15,3
31	37,677	Kapsantin ²	1.175 ± 40,4
32	38,551	Kapsantin ²	1.968 ± 137
33	39,536	Kapsantin ²	1.274 ± 74,9
34	40,664	Kapsantin ²	487 ± 27,4
Ukupno:			11.580

* dobijene srednje vrednosti su rezultat tri ponavljanja i predstavljene su kao srednja vrednost ± SD

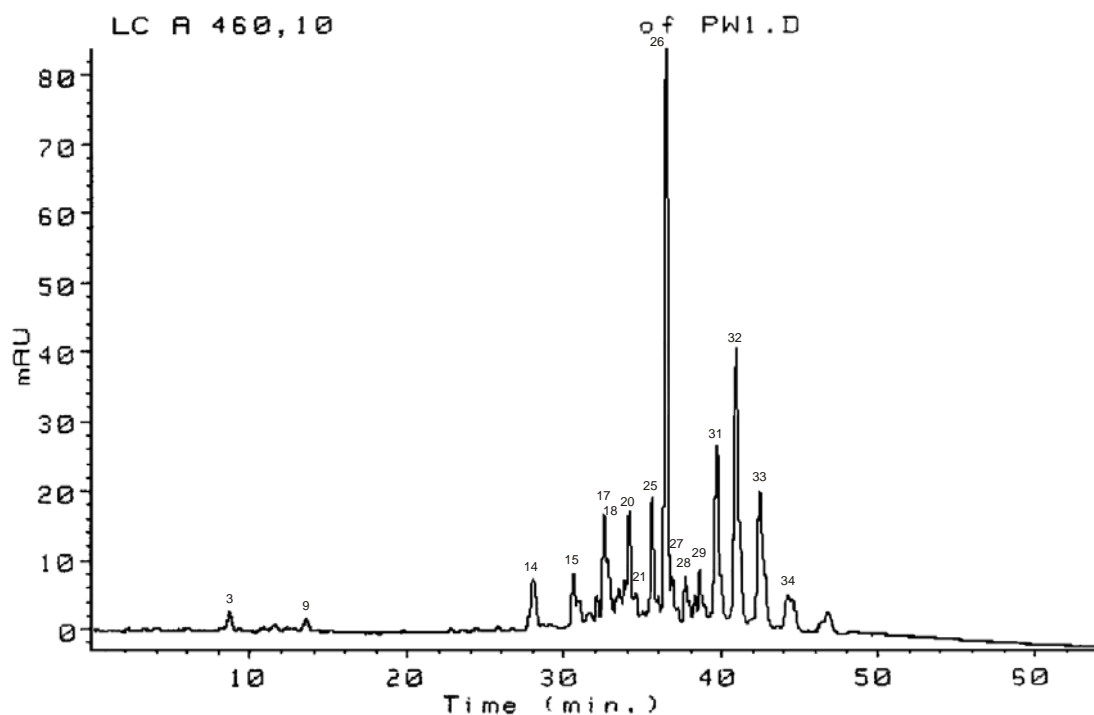
Identifikacija karotenoida: 1-na osnovu retencionog vremena i apsorpcionog spektra; 2-na osnovu apsorpcionog spektra; 3-na osnovu apsorpcionog spektra i literaturnih podataka

** n.i. – nije identifikovan

1-14 – slobodni karotenoidi

15-25 – monoestri

28-34 – diestri



Slika 47. HPLC hromatogram oleorizina dobijenog superkritičnom ekstrakcijom mlevene začinske paprike na pritisku 400 bara i 40°C (SC400)
Identifikacija pikova: 3-kapsantin; 9-anteraksantin; 14- β -kriptoksantin; 15-monoestar kapsorubina; 17, 18, 20, 21-monoestri kapsantina; 26- β -karoten; 27-*cis*- β -karoten; 28-diestar kapsorubina; 29, 31, 32, 33, 34-diestri kapsantina

Tabela 31. Karotenoidni sastav oleorizina dobijenog superkritičnom ekstrakcijom na 400 bara (SC400)

Red. br.	t _R (min)	Karotenoid	Sadržaj (mg/kg) *
3	6,928	Kapsantin ¹	192 ± 5,02
9	10,665	Anteraksantin ¹	124 ± 5,91
14	26,177	β-Kriptoksantin ³	232 ± 14,6
15	27,802	Kapsorubin ²	363 ± 25,3
17	29,915	Kapsantin ²	751 ± 50,5
18	30,244	Kapsantin ²	530 ± 27,9
19	31,145	n.i.**	198 ± 10,5
20	31,514	Kapsantin ²	816 ± 57,3
21	31,850	Kapsantin ²	218 ± 11,8
25	33,384	n.i.	657 ± 25,6
26	34,442	β-Karoten ¹	2.920 ± 234
27	34,794	cis-β-Karoten ³	235 ± 15,0
28	35,832	Kapsorubin ²	201 ± 11,6
29	36,760	Kapsantin ²	427 ± 19,6
31	37,677	Kapsantin ²	1.614 ± 101
32	38,551	Kapsantin ²	2.608 ± 189
33	39,536	Kapsantin ²	1.687 ± 101
34	40,664	Kapsantin ²	361 ± 18,3
Ukupno:			14.134

* dobijene srednje vrednosti su rezultat tri ponavljanja i predstavljene su kao srednja vrednost ± SD

Identifikacija karotenoida: 1-na osnovu retencionog vremena i apsorpcionog spektra; 2-na osnovu apsorpcionog spektra; 3-na osnovu apsorpcionog spektra i literaturnih podataka

** n.i. – nije identifikovan

1-14 – slobodni karotenoidi

15-25 – monoestri

28-34 – diestri

Sa prikazanih hromatograma se jasno vidi da je superkritični ugljen-dioksid pokazao lošiju rastvornu moć prema slobodnim (neesterifikovanim) karotenoidima u poređenju sa organskim rastvaračem (heksanom).

Sadržaj ukupnih karotenoida u oleorizinima je u skladu sa izmerenim ASTA vrednostima, što je u saglasnosti sa konstatacijama objavljenim u naučnim radovima na ovu temu (Mínguez-Mosquera i Pérez-Gálvez, 1998). U superkritičnim ekstraktima bilo je vidno manje ukupnih pigmentata u poređenju sa Sx (2,23-6,95 puta), što je potvrda manje

selektivnosti i bolje rastvorne moći organskog rastvarača prema karotenoidima u odnosu na superkritični ugljen-dioksid. Superkritični ugljen-dioksid pokazuje veći afinitet prema nepolarnim jedinjenjima, tj. estrima karotenoida i masnih kiselina sadržanih u ispitivanim uzorcima, što je i očekivano, jer je ugljen-dioksid izrazito nepolaran rastvarač.

Superkritični ugljen-dioksid ima manji afinitet prema neesterifikovanim pigmentima. Kod svih oleorizina dobijenih primenom SFE utvrđeno je prisustvo β -kriptoksantina, dok je kapsantin detektovan samo u uzorcima SC300 i SC400, a anteraksantin samo u uzorku SC400. Ekstrakti dobijeni superkritičnom ekstrakcijom nisu sadržavali kapsorubin, violaksantin, niti zeaksantin. β -karoten je bio zastupljen u svim uzorcima, a u SC150, SC300 i SC400 identifikovano je i prisustvo *cis*- β -karotena, koji nije prisutan u prirodi, a posledica je *trans-cis* izomerizacije β -karotena usled uticaja uslova ekstrakcije, te se može zaključiti da povećanje pritiska ekstrakcije povećava i stepen izomerizacije ovog jedinjenja, što nije poželjno sa nutritivnog aspekta, pošto smanjuje vitaminsku vrednost namirnica. Kada se govori o doprinosu β -karotena hranljivoj vrednosti prehrambenih proizvoda, interesantno je napomenuti da je u uzorku Sx bilo 10,33% β -karotena, uzorci SC150, SC300 i SC400 imali su 11,62%, 30,34% i 20,66% β -karotena, dok je SC200 imao čak 49,45% ovog biološki važnog jedinjenja, bez prisutnog *cis*-izomera, koji nije detektovan ni u uzorku dobijenom ekstrakcijom po Soxhlet-u.

U svim ekstraktima, na osnovu raspoloživih standarda, identifikovani su monoestri kapsantina i kapsorubina.

Ispitivanja su pokazala da povećanje pritiska ekstrakcije superkritičnim fluidom povećava količinu pigmenata koji se izdvajaju, tj. povećanjem gustine radnog fluida povećava se i njegova rastvorna moć (Lock i Simándi, 2001). Na osnovu pregleda literature moglo se očekivati da će povećanje radnog pritiska dovesti do povećanja koncentracije pigmenata u oleorizinima. Međutim, u eksperimentu je zabeleženo jedno odstupanje. Naime, ekstrakcijom na 200 bara u trajanju od 10 h dobijen je oleorizin sa ukupno 4.529,8 mg/kg karotenoida, što, kao što se iz tabele 32 može videti, predstavlja nižu koncentraciju u odnosu na uzorak dobijen na nižem pritisku (150 bara). Razlog za ovu pojavu u slučaju oleorizina paprike može se pretpostaviti na osnovu rezultata koje su dobili Ambrogi i sar. (2002). Oni su utvrdili da se pri superkritičnoj ekstrakciji u prvoj fazi (linearnoj) dobija oko 75% ekstrakta, ali je koncentracija karotenoida mala. U drugoj, nelinearnoj fazi, brzina ekstrakcije je bila znatno manja, ali se koncentracija karotenoida naglo povećavala.

Ekstrakcijom paprike pri radnom pritisku od 150 bara dobijen je relativno mali prinos, (6,71%). Povećanjem pritiska na 200 bara prinos je znatno povećan (10,58%) usled povećanja rastvorljivosti ulja u superkritičnom fluidu. U ovom uzorku (SC200) bio je najmanji udeo mono- i diestara u odnosu na ostale ekstrakte, a udeo β -karotena veoma visok (49,45%). Imajući u vidu povećanje prinosa (usled povećanja količine ulja), ovo je ujedno i uzrok niske ASTA vrednosti i sadržaja ukupnih karotenoida. Ulje koje se izdvaja na pritiscima ≥ 200 bara, povećavajući prinos ekstrakcije, takođe razblažuje izdvojene pigmente, smanjujući njihovu koncentraciju u finalnom proizvodu, tj. oleorizinu.

Dominantni crveni pigment u svim oleorizinima bio je kapsantin (93,55-96,15%). Najmanji odnos crvenih i žutih pigmenata (R/Y), kao i udeo ukupnih crvenih pigmenata, bili su u ekstraktu SC200 (0,74 i 42,49%). Najveći odnos R/Y i najveći udeo crvenih (od ukupnih) pigmenata bili su u Sx ekstraktu (3,89 i 79,56%). Kao što se moglo i očekivati, najmanji odnos R/Y bio je u ekstraktu SC200 (0,74). Odnos R/Y predstavlja najkorisniji i

najprikladniji parametar kod uzgajanja i selekcije paprika sa visokim sadržajem karotenoida. Pošto je komercijalna vrednost paprike određena intenzitetom crvene boje, selekcija i uzgajanje kultura paprike treba da se usmeri ne samo na povećanje ukupnog sadržaja bojenih materija, već i na odnos R/Y (Ayuso i sar., 2008). Osim toga, R/Y odnos je pokazatelj gubitaka bojenih materija tokom prerade. Međutim, oleorizini sa najvećim odnosom R/Y ne moraju imati i najveći sadržaj boje. Dokazano je da postoji dobra korelacija između ASTA vrednosti i sadržaja ukupnih karotenoida, ali ne i sa R/Y odnosom (Mínguez-Mosquera i Pérez-Gálvez, 1998).

Tabela 32. Sadržaj slobodnih i esterifikovanih karotenoida (mg/kg) u ekstraktima mlevene začinske paprike dobijenih konvencionalnom i superkritičnom ekstrakcijom

Karotenoidi	Boja	SC150	SC200	SC300	SC400
slobodni	žuti	1.130	2.342	3.926	3.511
slobodni	kapsantin	0,00	0,00	159	192
slobodni	kapsorubin	0,00	0,00	0,00	0,00
slobodni	crveni	0,00	0,00	159	192
slobodni	ukupno	1.130	2.342	4.085	3.703
monoestri	žuti	530	263	586	855
monoestri	kapsantin	1.030	421	1.441	2.315
monoestri	kapsorubin	237	118	272	363
monoestri	crveni	1.267	539	1.713	2.678
monoestri	ukupno	1.797	802	2.299	3.533
diestri	žuti	0,00	0,00	0,00	0,00
diestri	kapsantin	4.656	1.385,8	5.196	6.697
diestri	kapsorubin	75,1	0,00	0,00	201
diestri	crveni	4.731,1	1.385,8	5.196	6.898
diestri	ukupno	4.731,1	1.385,8	5.196	6.898
ukupno	žuti	1.660	2.605	4.512	4.366
	kapsantin	5.686	1.806,8	6.796	9.204
	kapsorubin	312,1	118	272	564
	crveni	5.998,1	1.924,8	7.068	9.768
	ukupno	7.658,1	4.529,8	11.580	14.134

Prema rezultatima istraživanja Illés i sar (1999), Daood i sar. (2002) i Gnayfeed i sar. (2001), sadržaj karotenoida u oleorizinima može biti manji od rezultata dobijenih u ovom radu. Takođe, postoje komercijalni oleorizini čiji je sadažaj ukupnih karotenoida preko 80.000 mg/kg (Mínguez-Mosquera i Pérez-Gálvez, 1998), Jarén-Galán i Mínguez-Mosquera, 1999). Ovi rezultati potvrđuju da na pigmentni sastav paprike prevashodno utiče odabrana sorta, kao i odabrani način i uslovi ekstrakcije. Pri analizi iste sorte mogu se

dobiti različiti podaci o pigmentima i njihovom stepenu esterifikacije, tj. količini pigmentata i sastavu masnih kiselina, zavisno od stepena zrelosti ploda uzetog za analizu.

4.8. SADRŽAJ KAROTENOIDA U EKSTRAKTU OSTATAKA MLEVENE ZAČINSKE PAPRIKE NAKON SUPERKRITIČNE EKSTRAKCIJE

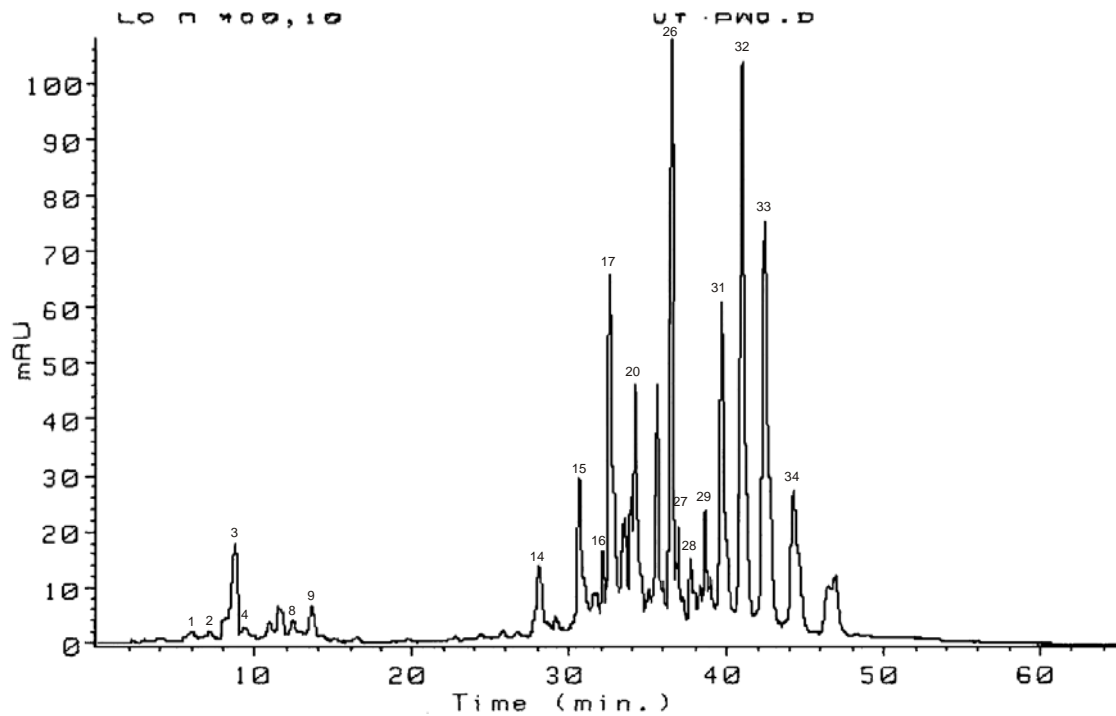
Pošto je sastav pigmentata oleorizina dobijenih superkritičnom ekstrakcijom pomoću ugljen-dioksida potvrdio izraziti afinitet superkritičnog fluida prema nepolarnim jedinjenjima, odnosno mono- i diestrima karotenoida masnim kiselinama, nametnula se potreba za ispitivanjem "zaostalih" jedinjenja. Naime, uzorci mlevene začinske paprike nakon superkritične ekstrakcije ekstrahovani su heksanom, pri čemu su dobijeni prinosi prikazani u tabeli 33. Postignuti prinosi ekstrakata su manji u odnosu na prinose prikazane u tabeli 12, pošto se u njima nalaze komponente koje superkritični ugljen-dioksid nije mogao u potpunosti da ekstrahuje. Dobijeni su veoma viskozni, skoro čvrsti koncentri boje, bez uljne komponente, za razliku od tečnih i uljastih Sx i SC oleorizina. U ekstraktima je određen kvalitativni i kvantitativni sastav bojenih materija, HPLC metodom. Na slikama 48-51 prikazani su hromatogrami ostataka nakon superkritične ekstrakcije. U tabelama 34-37 prikazan je sadržaj karotenoida u ovim uzorcima, dobijen njihovom kvantitativnom analizom.

Tabela 33. Prinosi ekstrakata mlevene začinske paprike prethodno tretirane superkritičnim ugljen-dioksidom

Uzorak	Prinos (g/100g)
OSC150*	6,27
OSC200**	1,84
OSC300***	1,60
OSC400****	1,70

- * ekstrakt ostatka nakon ekstrakcije na 150 bar
- ** ekstrakt ostatka nakon ekstrakcije na 200 bar
- *** ekstrakt ostatka nakon ekstrakcije na 300 bar
- **** ekstrakt ostatka nakon ekstrakcije na 400 bar

Najveći prinos (6,27%) dobijen je ekstrakcijom paprike prethodno tretirane superkritičnim ugljen-dioksidom na 150 bara, dok su prinosi ekstrakcije paprike prethodno tretirane SC CO₂ na 200, 300 i 400 bara bili niži (1,60-1,84%).



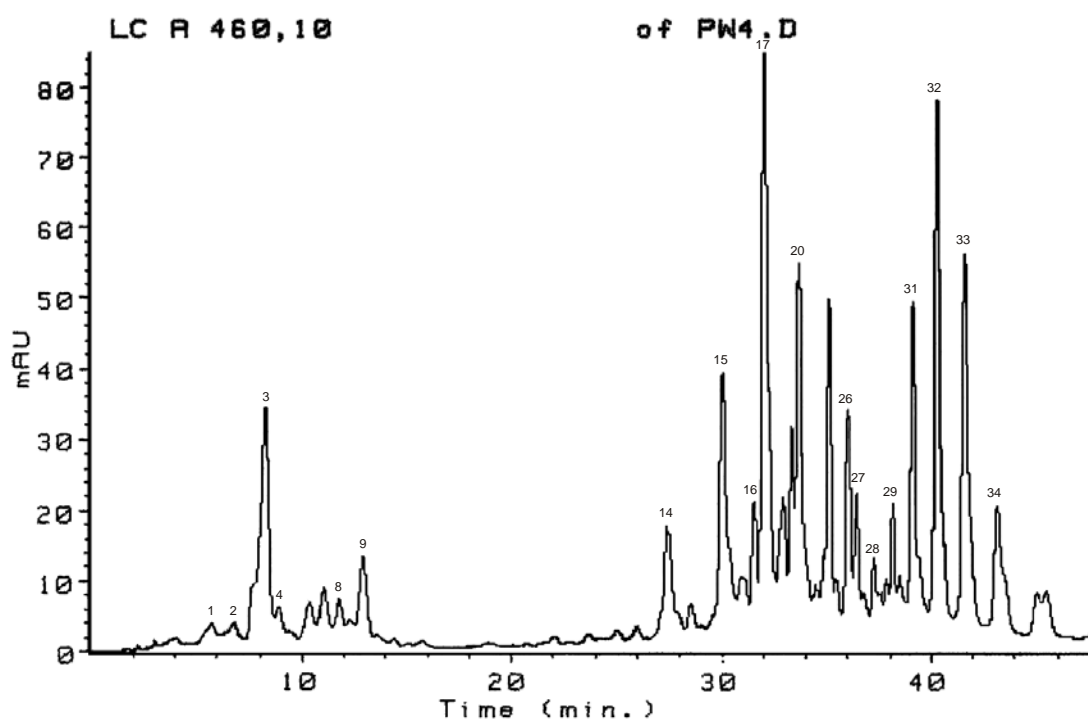
Slika 48. HPLC hromatogram ostatka nakon ekstrakcije pomoću superkritičnog CO₂ na 150 bara (OSC150)
 Identifikacija pikova: 1-kapsorubin; 2-violaksantin; 3-kapsantin; 4-*cis*-kapsantin; 8-zeaksanthin; 9-anteraksantin; 14-β-kriptoksantin; 15-monoestar kapsorubina; 16, 17, 20-monoestri kapsantina; 26-β-karoten; 27-*cis*-β-karoten; 28-diestar kapsorubina; 29, 31, 32, 33, 34-diestri kapsantina

Tabela 34. Karotenoidni sastav ostatka nakon ekstrakcije paprike superkričnom ekstrakcijom na 150 bara (OSC150)

Red. br.	t _R (min)	Karotenoid	Sadržaj (mg/kg)*
1	4,883	Kapsorubin ¹	153 ± 8,02
2	5,788	Violaksantin ¹	323 ± 17,8
3	6,928	Kapsantin ¹	1.552 ± 77,4
4	7,501	<i>cis</i> -Kapsantin ³	237 ± 15,2
6	8,678	n.i.**	132 ± 7,81
7	9,246	n.i.	209 ± 12,5
8	9,895	Zeaksantin ¹	325 ± 10,3
9	10,665	Anteraksantin ¹	485 ± 27,8
14	26,177	β-Kriptoksantin ³	426 ± 27,0
15	27,802	Kapsorubin ²	1.699 ± 81,2
16	29,450	Kapsantin ²	229 ± 12,0
17	29,915	Kapsantin ²	3.789 ± 138
19	31,145	n.i.	627 ± 23,2
20	31,514	Kapsantin ²	2.346 ± 92,0
25	33,384	n.i.	1.546 ± 81,2
26	34,442	β-Karoten ¹	3.830 ± 159
27	34,794	<i>cis</i> -β-Karoten ³	597 ± 24,2
28	35,832	Kapsorubin ²	359 ± 24,3
29	36,760	Kapsantin ²	687 ± 28,8
31	37,677	Kapsantin ²	3.326 ± 103
32	38,551	Kapsantin ²	6.584 ± 166
33	39,536	Kapsantin ²	5.968 ± 187
34	40,664	Kapsantin ²	2.723 ± 82,0
Ukupno:			38.152

* dobijene srednje vrednosti su rezultat tri ponavljanja i predstavljene su kao srednja vrednost ± SD
 Identifikacija karotenoida: 1-na osnovu retencionog vremena i apsorpcionog spektra; 2-na osnovu apsorpcionog spektra; 3-na osnovu apsorpcionog spektra i literaturnih podataka

** n.i. – nije identifikovan
 1-14 – slobodni karotenoidi
 15-25 – monoestri
 28-34 – diestri



Slika 49. HPLC hromatogram ostatka nakon ekstrakcije pomoću superkritičnog CO₂ na 200 bara (OSC200)

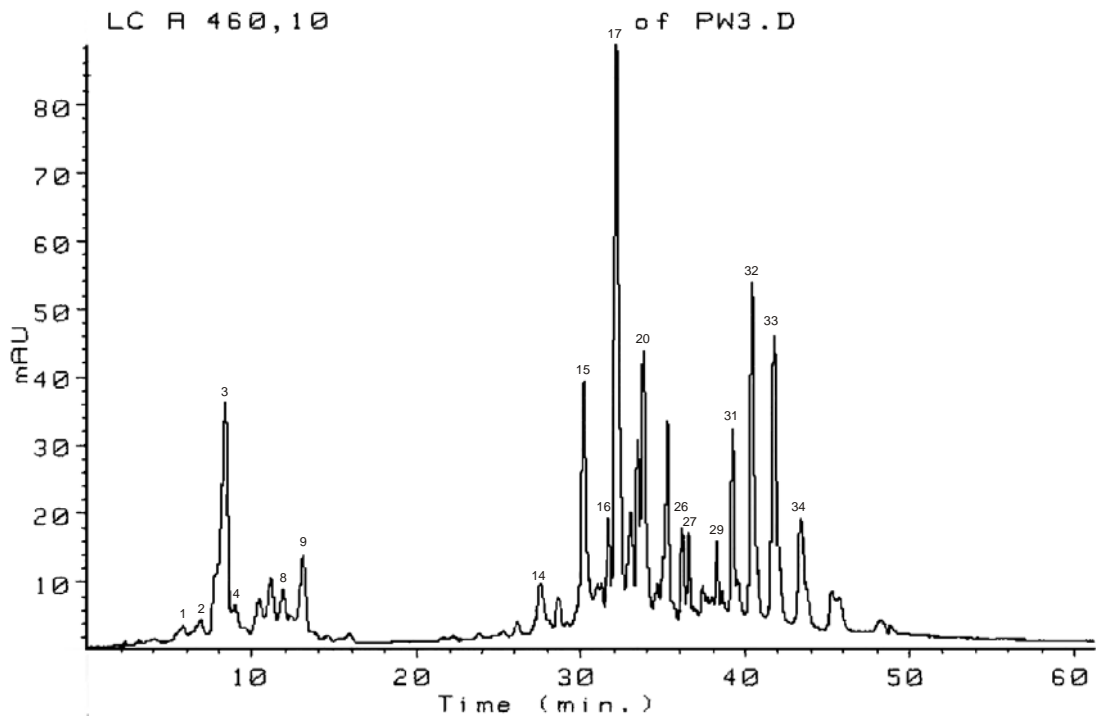
Identifikacija pikova: 1-kapsorubin; 2-violaksantin; 3-kapsantin; 4-*cis*-kapsantin; 8-zeaksanthin; 9-anteraksantin; 14-β-kriptoksantin; 15-monoestar kapsorubina; 16, 17, 20-monoestri kapsantina; 26-β-karoten; 27-*cis*-β-karoten; 28-diestar kapsorubina; 29, 31, 32, 33, 34-diestri kapsantina

Tabela 35. Karotenoidni sastav ostatka nakon ekstrakcije paprike superkritičnom ekstrakcijom na 200 bara (OSC200)

Red. br.	t _R (min)	Karotenoid	Sadržaj(mg/kg)*
1	4,883	Kapsorubin ¹	128 ± 6,54
2	5,788	Violaksantin ¹	313 ± 20,9
3	6,928	Kapsantin ¹	3.071 ± 107
4	7,501	<i>cis</i> -Kapsantin ³	354 ± 12,3
6	8,678	n.i.**	203 ± 12,6
7	9,246	n.i.	273 ± 15,6
8	9,895	Zeaksantin ¹	521 ± 16,7
9	10,665	Anteraksantin ¹	980 ± 48,2
14	26,177	β-Kriptoksantin ³	523 ± 28,0
15	27,802	Kapsorubin ²	2.896 ± 134
16	29,450	Kapsantin ²	940 ± 53,0
17	29,915	Kapsantin ²	6.137 ± 201
19	31,145	n.i.	1.046 ± 54,1
20	31,514	Kapsantin ²	3.308 ± 104
25	33,384	n.i.	2.024 ± 102
26	34,442	β-Karoten ¹	1.194 ± 59,8
27	34,794	<i>cis</i> -β-Karoten ³	660 ± 46,5
28	35,832	Kapsorubin ²	201 ± 12,1
29	36,760	Kapsantin ²	480 ± 26,8
31	37,677	Kapsantin ²	2.324 ± 115
32	38,551	Kapsantin ²	4.462 ± 175
33	39,536	Kapsantin ²	3.896 ± 157
34	40,664	Kapsantin ²	1.711 ± 81,8
Ukupno:			37.645

* dobijene srednje vrednosti su rezultat tri ponavljanja i predstavljene su kao srednja vrednost ± SD
 Identifikacija karotenoida: 1-na osnovu retencionog vremena i apsorpcionog spektra; 2-na osnovu apsorpcionog spektra; 3-na osnovu apsorpcionog spektra i literaturnih podataka

** n.i. – nije identifikovan
 1-14 – slobodni karotenoidi
 15-25 – monoestri
 28-34 – diestri



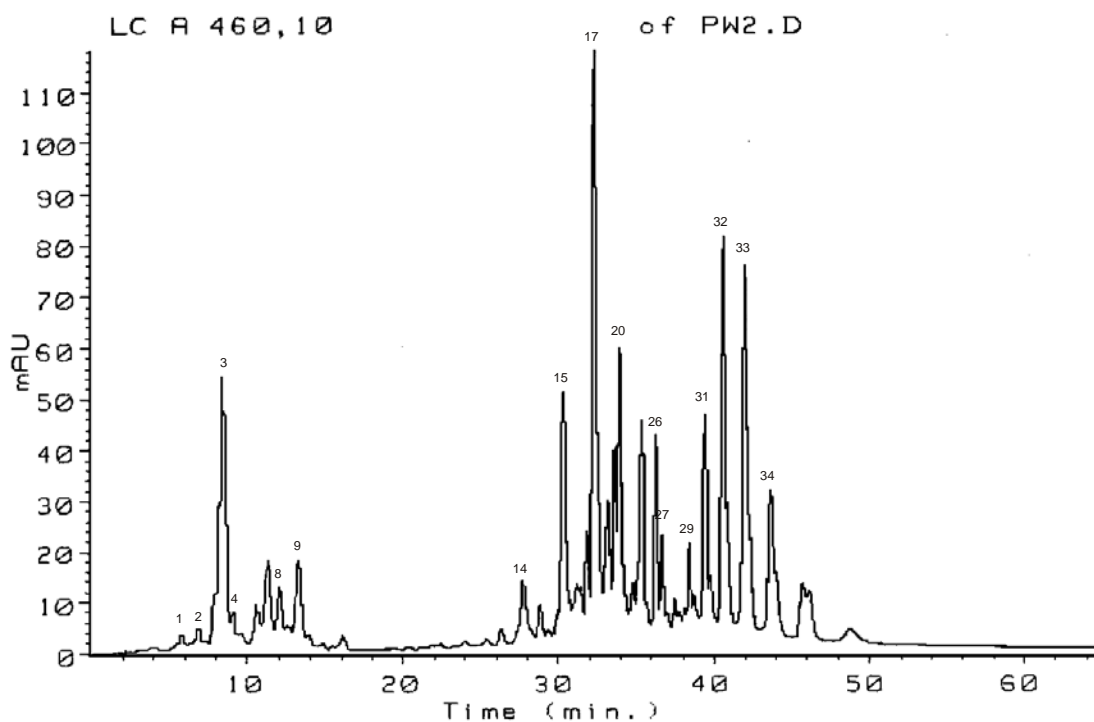
Slika 50. HPLC hromatogram ostatka nakon ekstrakcije pomoću superkritičnog CO₂ na 300 bara (OSC300)
 Identifikacija pikova: 1-kapsorubin; 2-violaksantin; 3-kapsantin; 4-*cis*-kapsantin; 8-zeaksanthin; 9-anteraksantin; 14- β -kriptoksantin; 15-monoestar kapsorubina; 16, 17, 20-monoestri kapsantina; 26- β -karoten; 27-*cis*- β -karoten; 29, 31, 32, 33, 34-diestri kapsantina

Tabela 36. Karotenoidni sastav ostatka nakon ekstrakcije paprike superkritičnom ekstrakcijom na 300 bara (OSC300)

Red. br.	t _R (min)	Karotenoid	Sadržaj (mg/kg)*
1	4,883	Kapsorubin ¹	227 ± 13,0
2	5,788	Violaksantin ¹	826 ± 43,3
3	6,928	Kapsantin ¹	4.470 ± 321
4	7,501	<i>cis</i> -Kapsantin ³	528 ± 31,8
6	8,678	n.i.**	290 ± 17,9
7	9,246	n.i.	386 ± 26,0
8	9,895	Zeaksantin ¹	781 ± 53,2
9	10,665	Anteraksantin ¹	1.167 ± 54,0
14	26,177	β-Kriptoksantin ³	309 ± 21,7
15	27,802	Kapsorubin ²	2.967 ± 207
16	29,450	Kapsantin ²	946 ± 50,4
17	29,915	Kapsantin ²	6.595 ± 536
19	31,145	n.i.	1.164 ± 40,4
20	31,514	Kapsantin ²	2.850 ± 201
25	33,384	n.i.	273 ± 13,6
26	34,442	β-Karoten ¹	581 ± 31,9
27	34,794	<i>cis</i> -β-Karoten ³	476 ± 29,6
29	36,760	Kapsantin ²	372 ± 17,9
31	37,677	Kapsantin ²	1.367 ± 55,9
32	38,551	Kapsantin ²	3.404 ± 133
33	39,536	Kapsantin ²	3.515 ± 106
34	40,664	Kapsantin ²	1.660 ± 68,6
Ukupno:			35.154

* dobijene srednje vrednosti su rezultat tri ponavljanja i predstavljene su kao srednja vrednost ± SD
 Identifikacija karotenoida: 1-na osnovu retencionog vremena i apsorpcionog spektra; 2-na osnovu apsorpcionog spektra; 3-na osnovu apsorpcionog spektra i literaturnih podataka

** n.i. – nije identifikovan
 1-14 – slobodni karotenoidi
 15-25 – monoestri
 28-34 – diestri



Slika 51. HPLC hromatogram ostatka nakon ekstrakcije pomoću superkritičnog CO₂ na 400 bara (OSC400)

Identifikacija pikova: 1-kapsorubin; 2-violaksantin; 3-kapsantin; 4-*cis*-kapsantin; 8-zeaksanthin; 9-anteraksantin; 14-β-kriptoksantin; 15-monoestar kapsorubina; 17, 20-monoestri kapsantina; 26-β-karoten; 27-*cis*-β-karoten; 29, 31, 32, 33, 34-diestri kapsantina

Tabela 37. Karotenoidni sastav ostatka nakon ekstrakcije paprike superkričnom ekstrakcijom na 400 bara (OSC400)

Red. br.	t _R (min)	Karotenoid	Sadržaj (mg/kg)*
1	4,883	Kapsorubin ¹	261 ± 17,0
2	5,788	Violaksantin ¹	704 ± 49,5
3	6,928	Kapsantin ¹	4.349 ± 142
4	7,501	<i>cis</i> -Kapsantin ³	626 ± 42,1
6	8,678	n.i.**	324 ± 20,5
7	9,246	n.i.	593 ± 41,4
8	9,895	Zeaksantin ¹	984 ± 52,2
9	10,665	Anteraksantin ¹	1.312 ± 62,6
14	26,177	β-Kriptoksantin ³	431 ± 24,5
15	27,802	Kapsorubin ²	3.111 ± 137
17	29,915	Kapsantin ²	7.289 ± 179
19	31,145	n.i.	1.314 ± 41,6
20	31,514	Kapsantin ²	3.389 ± 135
25	33,384	n.i.	1.917 ± 76,5
26	34,442	β-Karoten ¹	1.438 ± 62,3
27	34,794	<i>cis</i> -β-Karoten ³	625 ± 41,8
29	36,760	Kapsantin ²	550 ± 37,1
31	37,677	Kapsantin ²	1.886 ± 57,9
32	38,551	Kapsantin ²	4.911 ± 335
33	39,536	Kapsantin ²	5.553 ± 238
34	40,664	Kapsantin ²	2.755 ± 168
Ukupno:			44.322

* dobijene srednje vrednosti su rezultat tri ponavljanja i predstavljene su kao srednja vrednost ± SD

Identifikacija karotenoida: 1-na osnovu retencionog vremena i apsorpcionog spektra; 2-na osnovu apsorpcionog spektra; 3-na osnovu apsorpcionog spektra i literaturnih podataka

** n.i. – nije identifikovan

1-14 – slobodni karotenoidi

15-25 – monoestri

28-34 – diestri

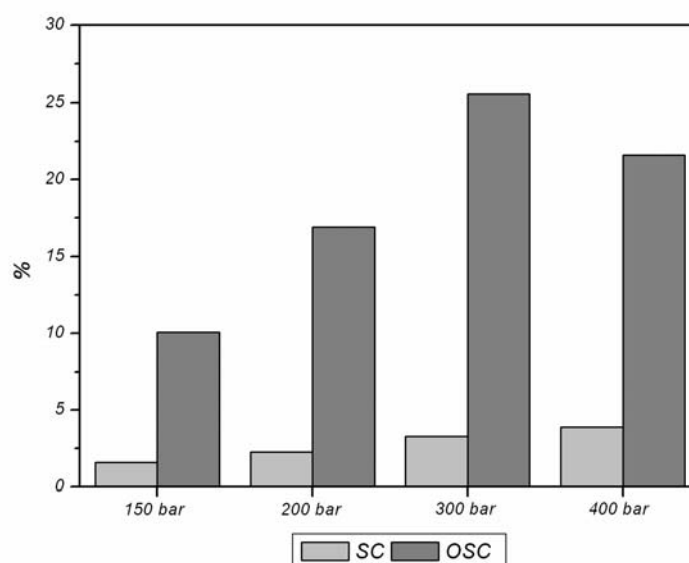
Kao što se iz sadržaja karotenoida može videti (tabela 38), ostaci nakon superkritične ekstrakcije bili su veoma bogati slobodnim (neesterifikovanim) karotenoidima. U svim ostacima, pored crvenih kapsantina, *cis*-kapsantina i kapsorubina, dokazano je prisustvo žutih pigmenata - violaksantina, zeaksantina i anteraksantina.

Tabela 38. Sadržaj slobodnih i esterifikovanih karotenoida (mg/kg) u ostacima nakon superkritične ekstrakcije mlevene začinske paprike

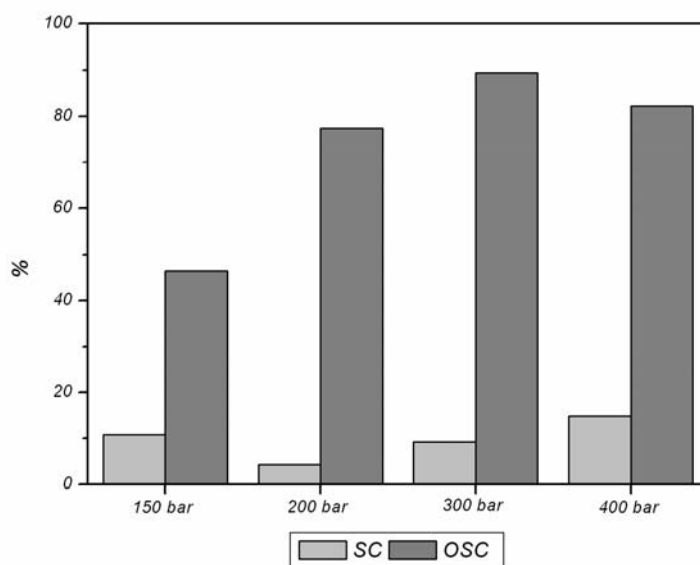
Karotenoidi	Boja	OSC150	OSC200	OSC300	OSC400
slobodni	žuti	6.327	4.667	4.816	6.411
slobodni	kapsantin	1.789	3.425	4.998	4.975
slobodni	kapsorubin	153	128	227	261
slobodni	crveni	1.942	3.553	5.225	5.236
slobodni	ukupni	8.269	8.220	10.041	11.647
monoestri	žuti	2.173	3.070	1.437	3.231
monoestri	kapsantin	6.364	10.385	10.391	10.678
monoestri	kapsorubin	1.699	2.896	2.967	3.111
monoestri	crveni	8.063	13.281	13.358	13.789
monoestri	ukupni	10.236	16.351	14.795	17.020
diestri	žuti	0,00	0,00	0,00	0,00
diestri	kapsantin	19.288	12.873	10.318	15.655
diestri	kapsorubin	359	201	0,00	0,00
diestri	crveni	19.647	13.074	10.318	15.655
diestri	ukupni	19.647	13.074	10.318	15.655
ukupno	žuti	8.500	7.737	6.253	9.642
	kapsantin	27.441	26.683	25.707	31.308
	kapsorubin	2.211	3.225	3.194	3.372
	crveni	29.652	29.908	28.901	34.670
	Ukupni	38.152	37.645	35.154	44.322

4.9. ODNOS SADRŽAJA KAROTENOIDA U OLEORIZINIMA DOBIJENIM SUPERKRITIČNOM EKSTRAKCIJOM I EKSTRAKTIMA OSTATAKA NAKON SUPERKRITIČNE EKSTRAKCIJE

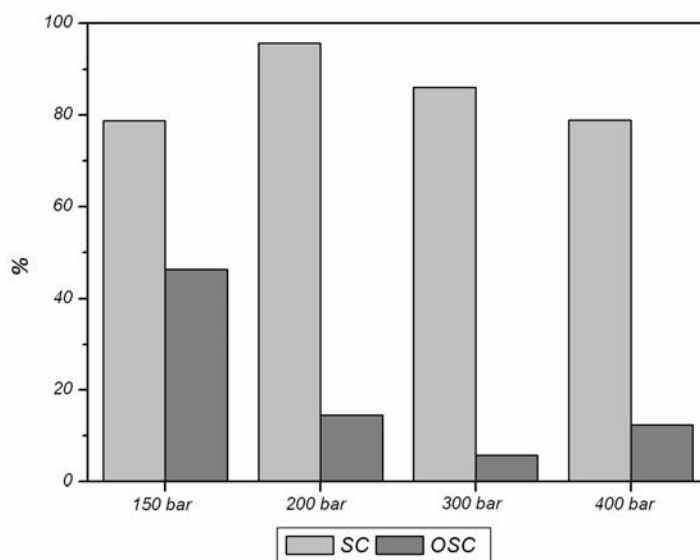
Na slici 52 prikazan je udeo neesterifikovanih pigmenata (bez β -karotena i *cis*- β -karotena) u ukupnim pigmentima (u poređenju sa oleorizinima). Udeo neesterifikovanih pigmenata u ekstraktima ostataka znatno je veći u odnosu na oleorizine dobijene superkritičnom ekstrakcijom. Naime, sadržaj slobodnih karotenoida (bez β -karotena i *cis*- β -karotena) u odnosu na ukupne karotenoide porastao je sa 1,59-3,88 na 10,07-25,56%, njihov sadržaj u ukupnim slobodnim karotenoidima (slika 53) povećao se sa 4,35-14,80% na 46,46-89,47%. Udeo β -karotena u slobodnim pigmentima opao je sa 78,76-95,64% na 5,79-46,32% (slika 54), dok je udeo β -karotena u ukupnim pigmentima znatno opao sa 11,62-49,45% na 1,65-10,04% (slika 55).



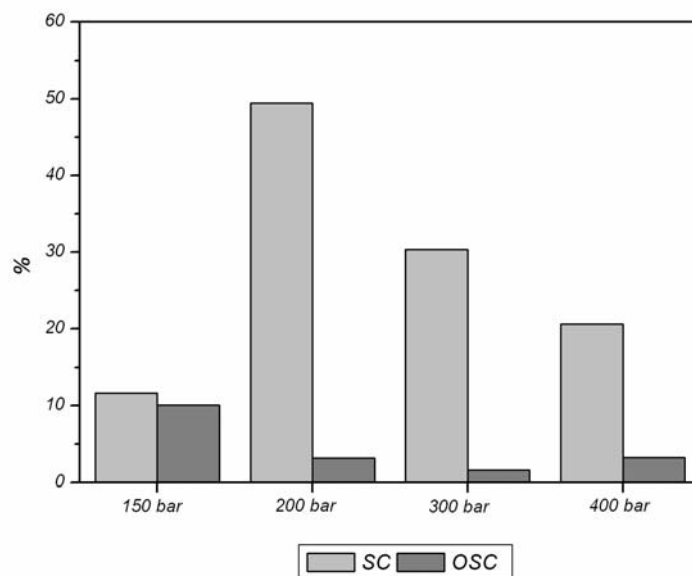
Slika 52. Odnos slobodnih karotenoida (bez β -karotena i *cis*- β -karotena) i ukupnih pigmenata u oleorizinima dobijenim superkritičnom ekstrakcijom i ekstraktima začinske paprike nakon superkritične ekstrakcije



Slika 53. Odnos udela slobodnih karotenoida (bez β -karotena i *cis*- β -karotena) i ukupnih slobodnih (neesterifikovanih) pigmentata u oleorizinima dobijenim superkritičnom ekstrakcijom i ekstraktima začinske paprike nakon superkritične ekstrakcije



Slika 54. Odnos β -karotena i slobodnih (neesterifikovanih) pigmentata u oleorizinima dobijenim superkritičnom ekstrakcijom i ekstraktima začinske paprike nakon superkritične ekstrakcije

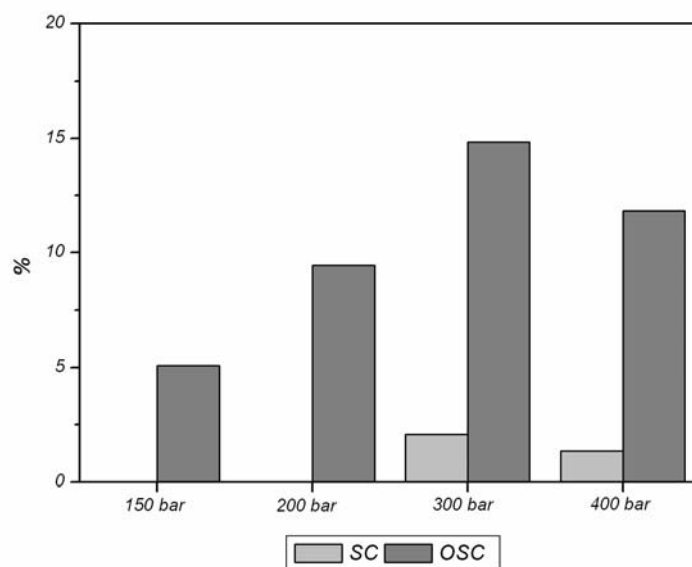


Slika 55. Odnos β -karotena i ukupnih pigmenata u oleorizinima dobijenim superkritičnom ekstrakcijom i ekstraktima začinske paprike nakon superkritične ekstrakcije

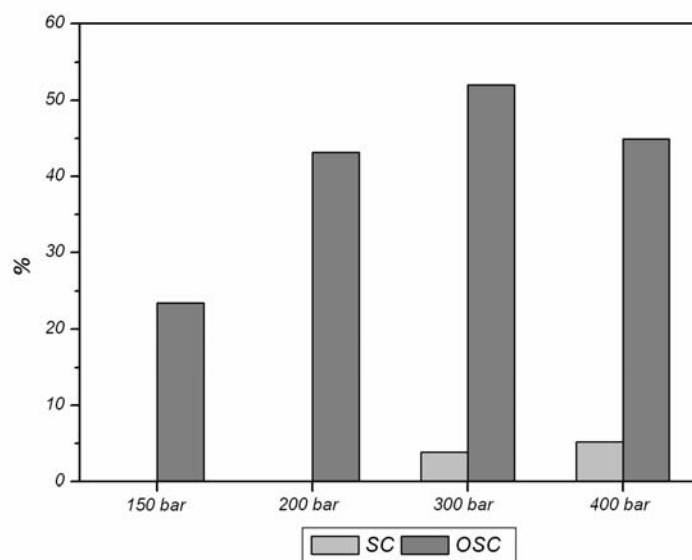
Odnos slobodnih crvenih i ukupnih slobodnih pigmenata ostataka znatno je povećan u odnosu na odgovarajuće oleorizine. Naime, udeo slobodnih crvenih u ukupnim pigmentima povećan je sa 0-1,37% (oleorizini) na 5,09-14,86% (ostaci) (slika 56), dok je u slobodnim pigmentima udeo neesterifikovanih crvenih pigmenata porastao sa 0-5,18% (oleorizini) na 23,48-52,04% (ostaci) (slika 57).

U svim ostacima zabeleženo je prisustvo *cis*- β -karotena.

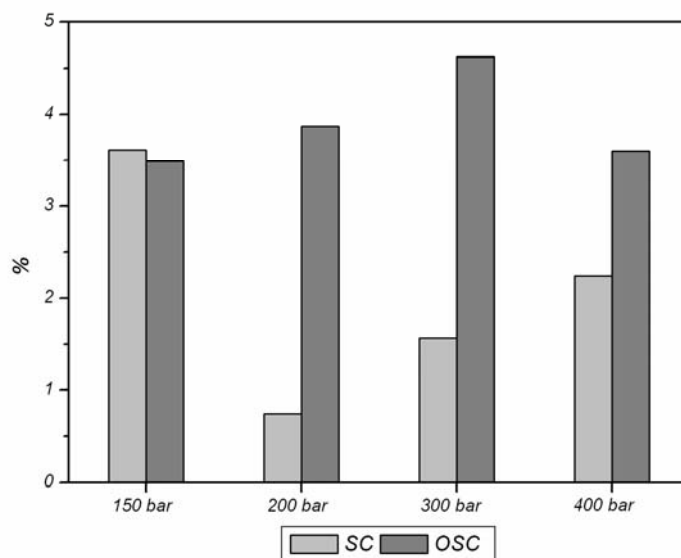
U ostacima OSC200, OSC300 i OSC400 povećan je odnos crvenih i žutih pigmenata, R/Y (3,87; 4,62 i 3,60) u poređenju sa odgovarajućim oleorizinima SC200, SC300 i SC400 (0,74; 1,57 i 2,24). Uzorak OSC150 imao je nešto manji odnos R/Y (3,49) u odnosu na odgovarajući oleorizin SC150 (3,61), usled smanjenja udela crvenih pigmenata (sa 78,32% na 77,72%) i istovremenog povećanja udela žutih pigmenata (sa 21,68% na 22,28%) u ukupnim karotenoidima (slika 58). Iako su uzorci ostataka nakon superkritične ekstrakcije značajno bogatiji ukupnim karotenoidima u odnosu na njihove odgovarajuće oleorizine, veoma je važno naglasiti da je prinos ovih ekstrakata veoma mali.



Slika 56. Odnos slobodnih (neesterifikovanih) crvenih i ukupnih pigmenata u oleorizinima dobijenim superkričnom ekstrakcijom i ekstraktima začinske paprike nakon superkrične ekstrakcije



Slika 57. Odnos slobodnih (neesterifikovanih) crvenih i slobodnih (neesterifikovanih) pigmenata u oleorizinima dobijenim superkričnom ekstrakcijom i ekstraktima začinske paprike nakon superkrične ekstrakcije



Slika 58. Odnos crvenih i žutih pigmenata (R/Y) u oleorizinima dobijenim superkritičnom ekstrakcijom i ekstraktima začinske paprike nakon superkritične ekstrakcije

Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da je superkritični ugljen-dioksid ekstrahovao uglavnom nepolarna jedinjenja (mono- i diestere karotenoida), dok je u ostatku mlevene začinske paprike nakon superkritične ekstrakcije ostao najveći deo slobodnih (neesterifikovanih) pigmenata (slike 52 i 53). Superkritičnim fluidom ekstrahovan je veći deo β -karotena (slike 54 i 55). Vrednosti R/Y u SC150 i OSC150 su vrlo bliske (3,61 i 3,49). Odnos R/Y najmanji je u oleorizinu SC200 (slika 58), što je najverovatnije posledica zajedničkog delovanja većeg radnog pritiska i produženog vremena ekstrakcije.

S obzirom na činjenicu da je prinos superkritičnom ekstrakcijom na 150 bara iznosio 6,71%, i da se ekstrakcijom ostatka organskim rastvaračem dobija dodatnih 6,27% (sa značajno većom koncentracijom pigmenata), može se pretpostaviti da bi se uslovi superkritične ekstrakcije mogli podesiti tako da se pri primenjenim uslovima (niži pritisak) dobije oleorizin sa manje bojenih materija i većim sadržajem ulja, a zatim naknadnom ekstrakcijom (organskim rastvaračem, ili superkritičnim fluidom, pri većim radnim pritiscima) uzorak bez ili sa vrlo malo uljne komponente, ali sa velikim sadržajem boje.

4.10. SADRŽAJ TOKOFEROLA U OLEORIZINIMA DOBIJENIM EKSTRAKCIJOM ORGANSKIM RASTVARAČEM I SUPERKRITIČNIM UGLJEN-DIOKSIDOM

Pored karotenoida, jedinjenja koja značajno utiču na antioksidativnu aktivnost paprike su hidrosolubilni vitamin C i liposolubilni α -tokoferol. U tabeli 39 je prikazan sadržaj α -tokoferola u superkritičnim i konvencionalnim ekstraktima paprike. Sadržaj vitamina C u ekstraktima s razlogom nije ispitan, pošto je hidrosolubilna, a uzorci dobijeni ekstrakcijom organskim rastvaračem i superkritičnim ugljen-dioksidom su liposolubilnog karaktera.

Sadržaj tokoferola, kao važnog faktora stabilnosti boje, zavisi prevashodno od varijeteta paprike (Biacs i sar., 1992; Daood i sar., 1996), kao i stepena zrelosti (Márkus i sar., 1999).

Tabela 39. Sadržaj α -tokoferola u ekstraktima paprike dobijenih konvencionalnom i superkritičnom ekstrakcijom

Ekstrakt	Sadržaj α -tokoferola (mg/g)
Sx	3,35
SF 150	4,85
SF 200	3,85
SF 300	3,09
SF 400	3,26

Sadržaj tokoferola u oleorizinima dobijenim ekstrakcijom organskim rastvaračem (heksanom) i superkritičnim ugljen-dioksidom manji je od sadržaja (4-10 mg/g) koji su objavili drugi autori (Kanner i sar., 1979; Vesper i Nitz, 1997a; Vesper i Nitz, 1997b), ali je u dobroj saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Daood i sar. (2002) i Gnayfeed i sar. (2001).

Ekstrakcijom mlevene začinske paprike najveći prinos tokoferola dobija se na nižim pritiscima, što su zaključili i Daood i sar. (2002). Isti autori pretpostavljaju da bi se veći prinos (bolja rastvorljivost tokoferola) mogao postići ekstrakcijom na subkritičnim temperaturama (< 25°C).

Prisustvo bioaktivnih jedinjenja u mlevenoj začinskoj paprici i njenim proizvodima čini ih značajnom funkcionalnom hranom ili dodacima ishrani. Parametri koji najverovatnije utiču na sadržaj bioaktivnih jedinjenja u paprici uključuju stepen zrelosti, genotip i tehnologiju, odnosno način prerade (Gnayfeed i sar., 2001; Daood i sar., 2006).

4.11. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST OLEORIZINA MLEVENE ZAČINSKE PAPRIKE

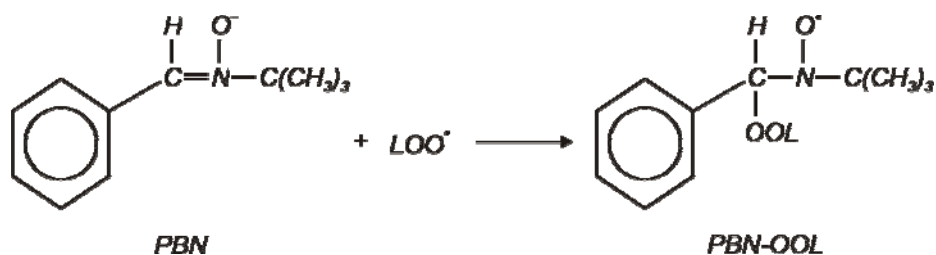
Paprika je značajan izvor nutrijenata u ishrani i odličan izvor vitamina A i C, kao i neutralnih i kiselih fenolnih jedinjenja, koji su važni antioksidanti. Količina ovih jedinjenja zavisi od genotipa i stepena zrelosti i zavisi od uslova uzgoja i gubitaka tokom i nakon prerade. Sazrevanjem plodova paprike sadržaj karotenoida, askorbinske kiseline, flavonoida, fenolnih kiselina i drugih jedinjenja se povećava. Antioksidanti su važni inhibitori peroksidacije lipida, ne samo u hrani, već i kao odbrambeni mehanizam živih ćelija od oksidativnih i degenerativnih oštećenja (starenje, kancer, dijabetes, kardiovaskularna oboljenja).

Ispitivanja antioksidativne aktivnosti paprike pokazala su da su crvene sorte dobar izvor antioksidanata, saglasno visokom sadržaju karotenoida u fazi zrelosti, odnosno antioksidativna aktivnost ekstrakata nekih varijeteta se može uporediti sa komercijalnim antioksidantima (Guil-Guerrero i sar., 2006). β -Karoten se ponaša kao hvatač singletnog kiseonika i skevindžer slobodnih radikala. Ksantofili, koji nemaju provitaminsko delovanje, takođe su dobri antioksidanti. Esterifikovani ksantofili su dobri skevindžeri slobodnih radikala, kao i neesterifikovani oblici, a stepen esterifikacije ne utiče na antioksidativnu aktivnost. Sposobnosti skevindžera radikala doprinose konjugovane keto grupe i polienski lanac u molekulu (Matsufuji i sar., 1998; Kiokas i Oreopoulou, 2006). Takođe je potvrđeno da antioksidativni efekat kapsantina može trajati duže nego kod drugih karotenoida, tj. kapsantin se ponaša kao bolji antioksidant od β -karotena. Karotenoidi paprike mogu se razmotriti sa nutritivnog aspekta kao mogući aditivi i dodaci ishrani, a sa zdravstvenog aspekta kao antitumor promoteri i hemopreventivna sredstva u hemijskoj karcinogenezi (Maoka i sar., 2001).

Peroksil radikali spadaju u veoma reaktivne kiseonikove radikale, koji reaguju sa važnim biomolekulima uslovljavajući sniženje nutritivne vrednosti prehrambenih proizvoda i razna degenerativna oštećenja u biološkim sistemima. Njihovom inhibicijom, ili pak snižavanjem njihove koncentracije, umnogome bi se smanjile transformacije masti i ulja u prehrambenim proizvodima i produžila vitalnost ćelijskih membrana.

S tog stanovišta, ESR spektralnom analizom ispitivan je uticaj ekstrakata paprike dobijenih ekstrakcijom organskim rastvaračem i superkritičnim ugljen-dioksidom na nastajanje i transformaciju peroksil radikala.

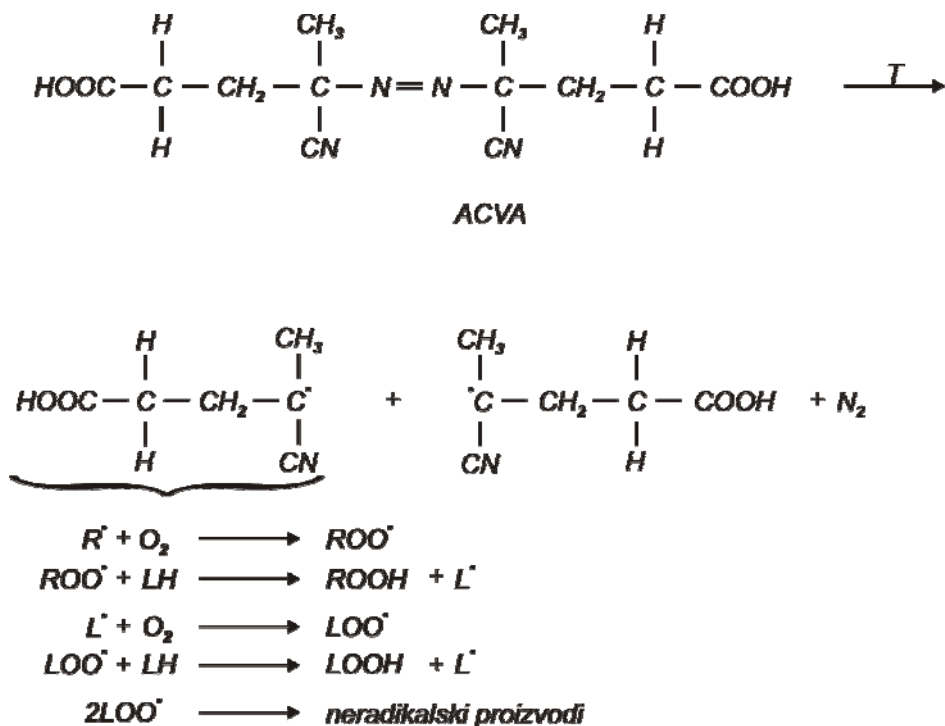
Reaktivni lipidni peroksil radikali, koji nastaju bilo u prirodnim hemijskim ili biološkim sistemima, stabilizuju se reakcijom sa "spin trapom" (PBN) i daju stabilne "spin adukte" (PBN-OOL):



Uticaj slobodnih radikala nastalih lipidnom peroksidacijom biomolekula u *in vitro* i *in vivo* uslovima, kao i zaštitno delovanje hidrofilnih i lipofilnih antioksidanata, ispituje se u prisustvu azo-inicijatora.

Azo-inicijatori, termičkom degradacijom u vodenoj ili uljanoj fazi, u zavisnosti od rastvorljivosti, stvaraju slobodne alkil i/ili peroksil radikale. Nastali radikali indukuju lipidnu peroksidaciju uz formiranje lipidnih peroksil radikala.

Spontanom termičkom dekompozicijom liposolubilnog azo-inicijatora ACVA u prisustvu kiseonika nastaju alkil peroksil radikali (ROO^\bullet). Oni su veoma reaktivni i reaguju sa masnim kiselinama (LH) prisutnim u suncokretovom ulju, formirajući alkil radikale (L^\bullet). Alkil radikali u prisustvu molekuskog kiseonika stvaraju lipid peroksil radikale (LOO^\bullet), koji se mogu detektovati ESR "spin trapping" metodom, sledećim reakcionim mehanizmima:

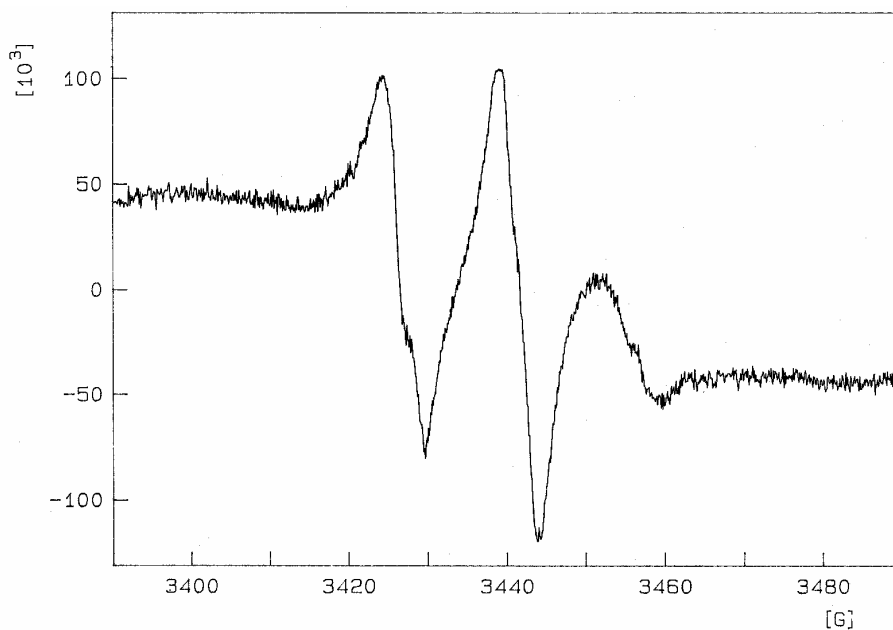


4.11.1. ESR spektralna analiza uticaja ekstrakata paprike dobijenih konvencionalnom i superkriticnom ekstrakcijom na peroksidaciju suncokretovog ulja indukovanu liposolubilnim azo-inicijatorom ACVA

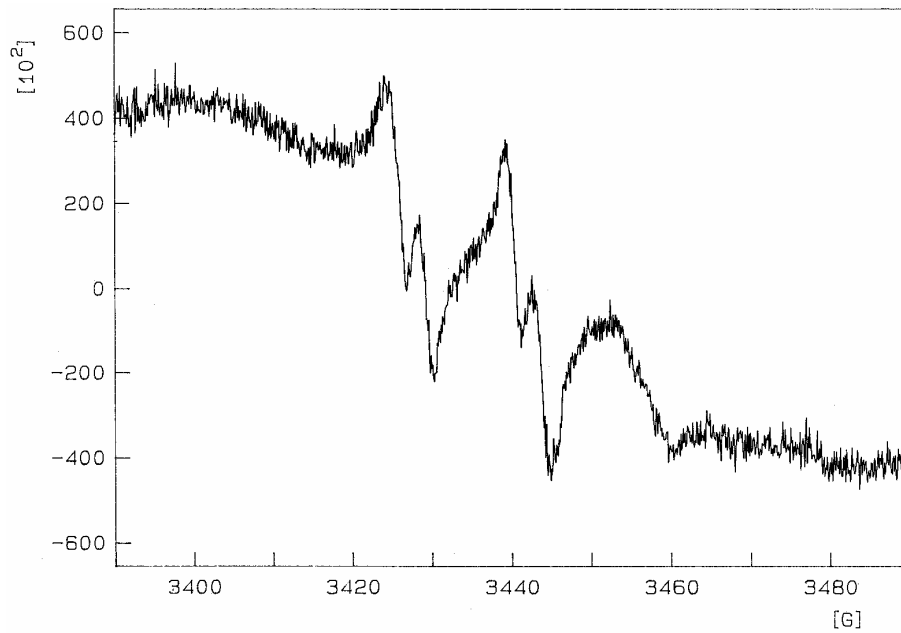
ESR spektar peroksil radikala, odnosno njihovih "spin adukata", nastalih tokom peroksidacije suncokretovog ulja u prisustvu ACVA na 37°C u toku 3 h, prikazan je na slici 59 (slepa proba).

Hiperfina struktura detektovanog signala sastoji se od tri dubleta, a konstante cepanja imaju vrednost $a_N = 14,75G$ i $a_H = 2,80G$.

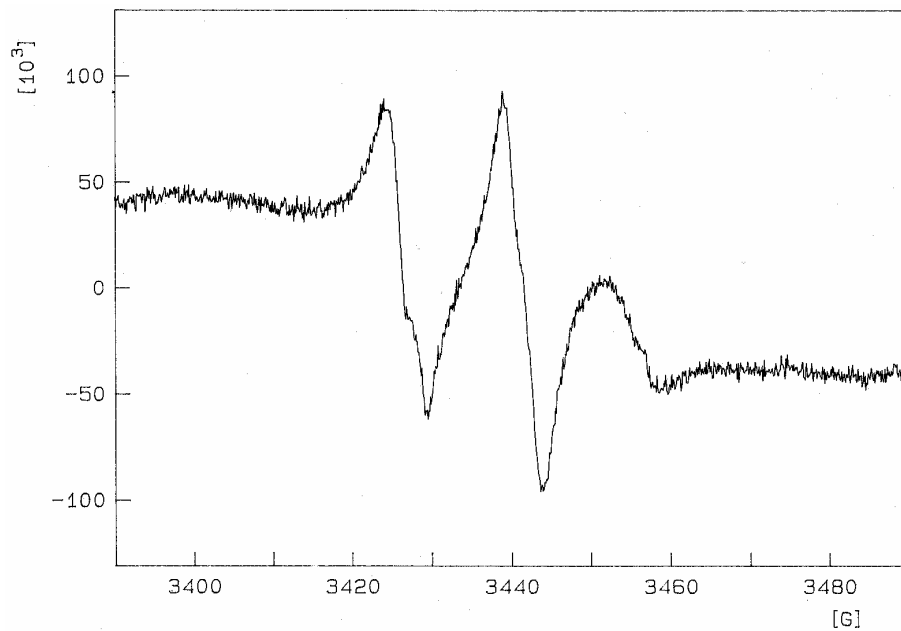
Na slikama 60 i 61 prikazani su ESR spektri PBN-OOL "spin adukata" nastalih tokom ACVA indukovane peroksidacije suncokretovog ulja u prisustvu 500 mg/g SC300 (slika 60) i 300 mg/g SC400 (slika 61) oleorizina paprike, koji su pokazali najveću, odnosno najmanju antioksidativnu aktivnost.



Slika 59. ESR spektar PBN-OOL "spin adukata" dobijenih peroksidacijom suncokretovog ulja u prisustvu ACVA (slepa proba)



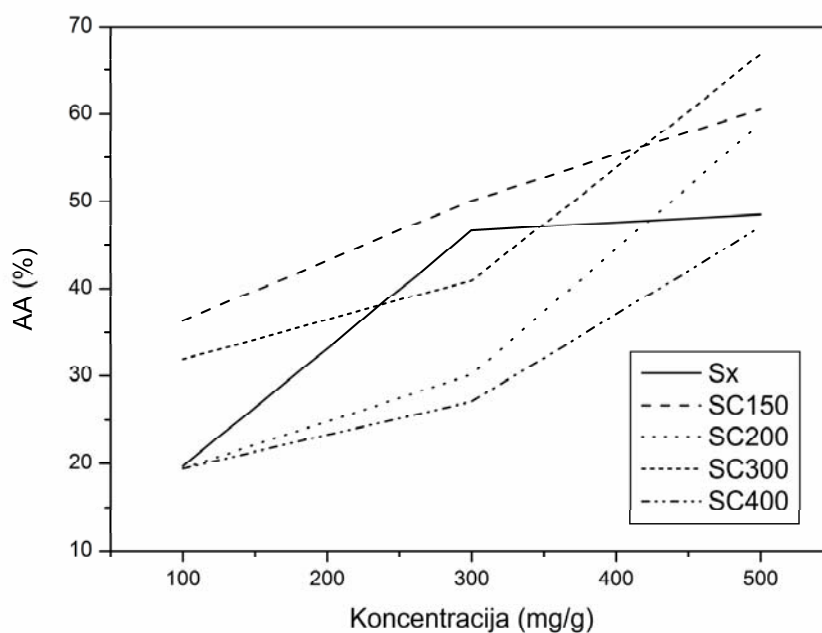
Slika 60. ESR spektar PBN-OOL "spin adukata" nastalih tokom peroksidacije suncokretovog ulja u prisustvu 500 mg/g ekstrakta paprike SC300



Slika 61. ESR spektar PBN-OOL "spin adukata" nastalih tokom peroksidacije suncokretovog ulja u prisustvu 300 mg/g ekstrakta paprike SC400

Upoređenjem ESR spektara prikazanih na slikama 60 i 61 može se videti da su ESR signali PBN-OOL "spin adukata" oleorizina paprike niži u odnosu na ESR signal PBN-OOL "spin adukata" slepe probe (slika 59). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da dobijeni oleorizini imaju inhibitorski efekat na stvaranje peroksil radikala ili učestvuju u njihovoj transformaciji u stabilne proizvode.

Na slici 62 prikazana je antioksidativna aktivnost ekstrakata paprike dobijenih konvencionalnom i superkritičnom ekstrakcijom. Na osnovu slike 62 izračunate su EC_{50} vrednosti (tabela 40). Iako se u literaturi oleorizina paprike navode kao bogat izvor antioksidanata, uzorci dobijeni u ovom radu pokazali su relativno malu antioksidativnu aktivnost, pošto su dobijene relativno visoke vrednosti parametra EC_{50} . Dobijene EC_{50} vrednosti korelirane su sa sadržajem ukupnih karotenoida i α -tokoferola. Koeficijent determinacije sadržaja ukupnih karotenoida sa EC_{50} vrednostima iznosi 0,735, dok je za tokoferole 0,321. Prema Vukoviću (1986), postoji veza između sadržaja ukupnih karotenoida i EC_{50} , dok između sadržaja tokoferola i EC_{50} postoji značajna linearna veza. Na osnovu ovoga, može se reći da antioksidativnoj aktivnosti oleorizina najviše doprinose karotenoidi.



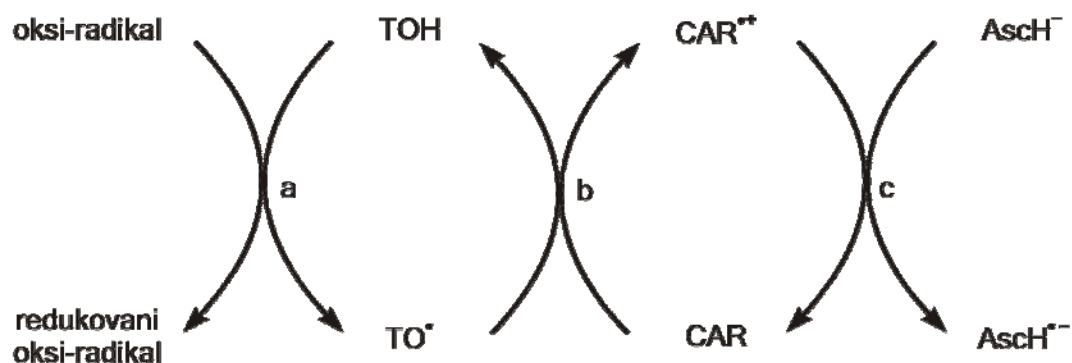
Slika 62. Antioksidativna aktivnost ekstrakata paprike dobijenih konvencionalnom i superkritičnom ekstrakcijom

Tabela 40. EC₅₀ vrednosti ekstrakata paprike

Ekstrakt	EC ₅₀ (mg/ml)
Sx	692,22
SF 150	298,55
SF 200	439,58
SF 300	370,7
SF 400	532,63

U biljnim i životinjskim tkivima ima mnogo različitih antioksidanata, te je relativno teško meriti antioksidativnu aktivnost svakog jedinjenja pojedinačno, odnosno, izolovanje jednog jedinjenja neće precizno odrediti ukupnu aktivnost. Naime, sinergistički efekat koji se može javiti između različitih antioksidanata može dovesti do toga da ukupna antioksidativna aktivnost može biti veća od zbira antioksidativnih aktivnosti pojedinačnih jedinjenja.

Na osnovu literaturnih podataka i dobijenih rezultata može se pretpostaviti da α -tokoferol i karotenoidi imaju sinergističko delovanje. Prema Böhm i sar. (1997), β -karoten ne samo da "hvata" oksi radikale, već takođe "popravlja" α -tokoferoksil radikal (slika 63), koji nastaje kada α -tokoferol "hvata" oksi-radikal (a). Pri ovakvom mehanizmu reakcije karotenoid se konvertuje iz $\text{Car}^{\bullet+}$ u Car (c).



Slika 63. Mehanizam sinergizma koji su predložili Böhm i sar. (1997)

Kao što se može zaključiti iz izloženih rezultata, kao i na osnovu zaključaka koji su izvedeni nakon istraživanja Zhang i Omaye (2001), karotenoidi i tokoferoli se ponašaju kao antioksidanti, ali njihova ispoljena efikasnost zavisi od mnogo faktora, među kojima su najvažniji količina kiseonika, drugih antioksidanata, izvora oksidativnih sredstava, kao i njihovih međusobnih interakcija.

U prošlosti, uljni ekstrakti ljute i slatke paprike dobijali su se tradicionalnim metodama ekstrakcije, primenom organskih rastvarača. Ovakvi načini ekstrakcije

imaju nedostatak između ostalog i u pogledu dobijanja ekstrakata bez rezidua rastvarača.

U današnje vreme, za ekstrakciju oleorizina iz različitog biljnog materijala široko se primenjuje superkrična ekstrakcija. Najčešće primenjivani rastvarač za ovaj način ekstrakcije je ugljen-dioksid. Superkričnom ekstrakcijom dobijaju se ekstrakti bez rezidua organskog rastvarača, a pored toga proces je bezbedan sa ekološkog aspekta.

Organski rastvarači imaju manju selektivnost, te su prinosi ekstrakcije klasičnim načinom ekstrakcije veći od prinosa superkričnom ekstrakcijom. Prinos ekstrakcije organskim rastvaračem zavisi pre svega od karakteristika polaznog materijala, tj. sirovine - vrsta (genotip), stepen zrelosti, uslovi uzgoja, klimatski faktori, udeo semena, uslovi prerade, stepen usitnjenosti materijala, itd.

Za razliku od organskih rastvarača, superkrični ugljen-dioksid je po prirodi izrazito nepolaran rastvarač i ima afinitet ka nepolarnim jedinjenjima. Moć rastvaranja superkričnog fluida utiče na prirodu dobijenih ekstrakata. S obzirom da ova osobina zavisi od uslova ekstrakcije, parametri ekstrakcije (pritisk, temperatura, vreme, protok) mogu se podešavati u cilju dobijanja ekstrakata željenih karakteristika i sastava. Pri konstantnoj temperaturi, povećanje pritiska dovodi do srazmernog povećanja gustine superkričnog ugljen-dioksida, što istovremeno povećava njegovu rastvornu moć. Kao posledica, povećanjem pritiska skraćuje se potrebno vreme ekstrakcije. Takođe, ekstrakcijom na različitim pritiscima, dobijaju se ekstrakti različitih karakteristika i sastava.

Paprika (*Capsicum annuum*) je vrlo važna povrtarska kultura. Sa nutritivnog aspekta predstavlja nezamenjivu namirnicu i/ili dodatak ishrani, usled svojstvenog hemijskog sastava (karotenoidi, esencijalne masne kiseline, vitamini). Sa medicinskog aspekta, paprika je od izuzetnog značaja, zbog velike vitaminske vrednosti (vitamini A, C, E) i antioksidativnih osobina (karotenoidi, tokoferoli, vitamin C).

Ekstrakcijom heksanom i superkričnim ugljen-dioksidom dobijaju se oleorizini sličnog sastava masnih kiselina, pri čemu prednost ima superkrična ekstrakcija, pošto su oleorizini bez rezidua organskog rastvarača. Sastav masnih kiselina oleorizina dobijenih klasičnom i superkričnom ekstrakcijom pokazao je da su uzorci bogati esencijalnom masnom kiselinom, linolnom, što uljni ekstrakt paprike svrstava u visoko vredna ulja, koja se mogu bezbedno koristiti u ishrani.

Rezultati ovog rada potvrdili su da je ASTA vrednost, kao sadržaj ukupne ekstrahovane boje, u pozitivnoj korelaciji sa ukupnim sadržajem karotenoida u oleorizinima. ASTA vrednost oleorizina dobijenog klasičnom ekstrakcijom je najveća, što je i očekivano, pošto je heksan neselektivan rastvarač. U oleorizinima dobijenim klasičnom i superkričnom ekstrakcijom identifikovani su kapsantin, anteraksantin, β -kriptoksantin, zeaksantin, violaksantin, *cis*-kapsantin, kapsorubin i β -karoten, kao i mono- i diestri kapsantina i kapsorubina. Dominantni crveni pigment u svim uzorcima bio je kapsantin.

Ekstrakcijom heksanom ostataka mlevene začinske paprike nakon superkrične ekstrakcije dobijeni su veoma viskozni i čvrsti ekstrakti, sa velikom koncentracijom boje (sadržaj ukupnih karotenoida je veći nego kod oleorizina dobijenog klasičnom ekstrakcijom). Međutim, prinosi ove ekstrakcije su značajno manji, s obzirom na to da se u njima nalaze komponente koje superkrični ugljen-dioksid nije ekstrahovao.

Ekstrakti dobijeni superkritičnom ekstrakcijom bili su značajno bogatiji β -karotenom, dok je sadržaj neesterifikovanih karotenoida (bez β -karotena i *cis*- β -karotena) u odnosu na ukupne značajno veći u ekstraktima ostataka nakon superkritične ekstrakcije.

Odnos sadržaja neesterifikovanih crvenih pigmenata u ukupnim pigmentima, kao i odnos sadržaja istih u ukupnim neesterifikovanim pigmentima bio je veći u ekstraktima ostataka nakon superkritične ekstrakcije.

Na pritiscima većim od 150 bar zabeležen je značajno veći odnos crvenih i žutih pigmenata u ekstraktima ostataka nakon superkritične ekstrakcije u odnosu na odgovarajuće oleorizine, što je posledica delovanja uslova ekstrakcije na ostatke.

Ekstrakcijom na najnižem pritisku dobija se najveći prinos α -tokoferola.

ESR spektralna analiza oleorizina dobijenih klasičnom i superkritičnom ekstrakcijom dokazala je da oleorizini mlevene začinske paprike pokazuju antioksidativno delovanje. Koreliranjem EC_{50} vrednosti (koncentracija uzorka koja redukuje 50% prisutnih radikala) svakog uzorka sa sadržajem α -tokoferola i ukupnih karotenoida može se zaključiti da antioksidativnoj aktivnosti oleorizina najviše doprinose karotenoidi, a na osnovu rezultata i literaturnih podataka, može se pretpostaviti da α -tokoferol i karotenoidi imaju sinergističko delovanje.

5. ZAKLJUČAK

- ✓ Primenom superkritičnog ugljen-dioksida u proizvodnji oleorizina mogu se dobiti proizvodi bez rezidua organskih rastvarača, različitih kvalitativnih i kvantitativnih karakteristika, zavisno od primenjenih uslova ekstrakcije.
- ✓ Ekstrakcijom po Soxhlet-u pomoću heksana postignut je prinos od 11,85% oleorizina paprike.
- ✓ Ekstrakcijom superkritičnim ugljen-dioksidom na pritiscima od 150, 200, 300 i 400 bara postignuti su prinosi ekstrakata od 6,71%, 10,58%, 10,56% i 10,33%.
- ✓ Primenom tri model jednačine za modelovanje ekstrakcionog sistema mlevena začinska paprika - superkritični ugljen-dioksid, zaključeno je da jednačina $Y_{II} = 100 [1 - \exp(A + B_1 t + B_2 t^2)]$ najbolje fituje eksperimentalne podatke.
- ✓ Klasičnom ekstrakcijom pomoću heksana dobijen je oleorizin sa najvećim sadržajem ekstrahovane boje (886,02 ASTA). Oleorizini dobijeni superkritičnom ekstrakcijom imali su 15,06-47,09% boje u poređenju sa oleorizinom dobijenim klasičnim postupkom, što je indikator manje selektivnosti organskog rastvarača u odnosu na superkritični fluid.
- ✓ Superkritični ugljen-dioksid je pokazao lošiju rastvornu moć prema neesterifikovanim oblicima karotenoida, tj. veći afinitet prema estrima karotenoida sa masnim kiselinama.
- ✓ U svim oleorizinima je utvrđeno prisustvo devet masnih kiselina, 5 zasićenih i 4 nezasićene. Najveći udeo masnih kiselina činila je

polinezasićena linolna kiselina (18:2), 75,2-78,26%. Preko 87% masnih kiselina svih dobijenih oleorizina čine C18 masne kiseline. Odnos nezasićenih i zasićenih masnih kiselina u svim oleorizinima iznosio je 6,62-7,59.

- ✓ Iako su nezasićene masne kiseline podložnije autooksidaciji, veliki udeo esencijalne linolne kiseline ukazuje na izuzetan nutritivni značaj oleorizina paprike. Pošto su oleorizini, pored linolne, bogati oleinskom i linolenskom kiselinom, mogu se primeniti i kao jestiva i salatna ulja ili za proizvodnju margarina.
- ✓ Primenom Studentovog t-testa uporednih vrednosti, uz verovatnoću od 95%, utvrđeno je da u sastavu masnih kiselina oleorizina dobijenih klasičnom i superkritičnom ekstrakcijom nema statistički značajne razlike.
- ✓ U oleorizinu paprike dobijenom klasičnom ekstrakcijom od neesterifikovanih pigmenata identifikovani su kapsantin, *cis*-kapsantin, kapsorubin, violaksantin, zeaksantin, anteraksantin i β -kriptoksantin. Kapsantin je identifikovan u superkritičnim ekstraktima dobijenim ekstrakcijom na 300 i 400 bara. Anteraksantin je bio zastupljen samo u ekstraktu dobijenom na 400 bara, dok je β -kriptoksantin je identifikovan u svim superkritičnim oleorizinima.
- ✓ Najveći sadržaj pigmenata imao je oleorizin dobijen klasičnom ekstrakcijom, 31.475,2 mg/kg. Dominantni pigment u ekstraktu bio je kapsantin (74,42%).
- ✓ U poređenju sa oleorizinom dobijenim klasičnim postupkom, superkritični oleorizini imali su 2,23-6,95 puta manje ukupnih pigmenata.
- ✓ Sadržaj ukupnih karotenoida u saglasnosti je sa ASTA vrednostima uzoraka.
- ✓ Povećanjem pritiska ekstrakcije superkritičnim fluidom povećava se prinos pigmenata u oleorizinu, tj. povećanjem gustine fluida povećava se i njegova rastvorna moć.
- ✓ Dominantni crveni pigment u svim oleorizinima je kapsantin, 93,55-96,15%.
- ✓ Ekstrakcijom ostataka nakon superkritične ekstrakcije pomoću heksana, usled iscrpljivanja ulja iz uzorka ekstrakcijom, dobijaju se uzorci sa visokim sadržajem bojnih materija, ali je prinos ekstrakcije relativno mali.
- ✓ Superkritičnom ekstrakcijom na nižim pritiscima dobija se veći prinos tokoferola, jer je njegova rastvorljivost veća u ugljen-dioksidu manje gustine.

- ✓ Oleorizini začinske paprike dobijeni klasičnom i superkritičnom ekstrakcijom pokazali su inhibitorni efekat na stvaranje peroksil radikala ili učestvuju u njihovoj transformaciji u stabilne proizvode.
- ✓ Na osnovu koeficijenta korelacije između sadržaja ukupnih karotenoida i EC_{50} vrednosti i sadržaja tokoferola i EC_{50} vrednosti može se zaključiti da detektovanoj antioksidativnoj aktivnosti oleorizina, istina malo, najviše doprinose karotenoidi.

- ✓ Uslovi superkritične ekstrakcije mogli bi se podesiti tako da se pri nižim pritiscima dobije oleorizin sa manje bojenih materija i većim sadržajem ulja, a zatim naknadnom ekstrakcijom (organskim rastvaračem ili superkritičnim fluidom, pri većim pritiscima) uzorak sa vrlo malo uljne komponente i velikom koncentracijom bojenih materija.

6. L I T E R A T U R A

1. Ade-Omowaye, B., I., O., Rastogi, N., K., Angersbach, A., Knorr, D.: Combined effects of pulsed electric field pre-treatment and partial osmotic dehydration on air drying behaviour of red bell pepper. *Journal of Food Engineering*, 60 (2003a) 89-98.
2. Ade-Omowaye, B., I., O., Rastogi, N., K., Angersbach, A., Knorr, D.: Effect of high hydrostatic pressure or high intensity electrical field pulse pre-treatment on dehydration characteristics of red paprika. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2 (2001) 1-7.
3. Ade-Omowaye, B., I., O., Taiwo, K., A., Eshtiaghi, N., M., Angersbach, A., Knorr, D.: Comparative evaluation of the effects of pulsed electric field and freezing on cell membrane permeabilisation and mass transfer during dehydration of red bell peppers. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4 (2003b) 177-188.
4. Ade-Omowaye, B., I., O., Talens, P., Angersbach, A., Knorr, D.: Kinetics of osmotic dehydration of red bell peppers as influenced by pulsed electric field pretreatment. *Food Research International*, 36 (2003c) 475-483,
5. Akpınar, K., E., Bicer, Y., Yildiz, C.: Thin layer drying of red pepper. *Journal of Food Engineering*, 59 (2003) 99-104,
6. Almela, L., López-Roca, J., M., Candela, M., E., Alcázar, M., D.: Carotenoid composition of new cultivars of red pepper paprika. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 9 (1991) 1606-1609.
7. Ambrogi, A., Cardarelli, D., A., Eggers, R.: Fractional extraction of paprika using supercritical carbon dioxide and on-line determination of carotenoids. *Journal of Food Science* 67, 9 (2002) 3236-3241.
8. Ambrogi, A., Eggers, R.: Extraction and concentration of xanthophyll pigments from marigold (*Tagetes erecta*). In: Reverchon, E., Editor. 4th Italian Conference on Supercritical Fluids and their Applications, 7-10 September 1997, Capri, Italy, Salerno, Italy, Univ. degli Studi di Salerno. P 129-135.

9. American Spice Trade Association. 1968. Official Analytical Methods of the American Spice Trade Association. 2nd. ed. Amer. Spice Trade Assn, Englewood Cliffs, New Jersey.
10. AOAC - Official Method 963.22, Methyl Esters of Fatty Acids in Oils and Fats, Published by AOAC, Washington, 2000.
11. Asilbekova, D., T.: Lipids from *Capsicum annuum* seeds. Chemistry of Natural Compounds, 39, 6 (2003) 528-530.
12. Ayuso, M. C., Bernalte, M. J., Lozano, M., García, M. I., Montero de Espinosa, V., Pérez, M. M., Hernández, M. T., Somogyi, N.: Quality characteristics of different red pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.) for hot paprika production. European Food Research and Technology, 227 (2008) 557–563.
13. Azevedo-Meleiro, C., H., Rodriguez-Amaya, D., B.: Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC – DAD and HPLC – MS. Journal of Food Composition and Analysis, 17, 3-4 (2004) 385-396.
14. Barjaktarović, B., Sovilj, M., Knez, Ž.: Chemical composition of *Juniperus communis* L. fruits supercritical CO₂ extracts: Dependence of pressure and extraction time. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (2005) 2630-2636.
15. Biacs, P., A., Czinkotai, B., Hoschke, A.: Factors affecting stability of colored substances in paprika powders. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, 3 (1992) 363-367.
16. Biacs, P., Daood, H., G., Pavisa, A., Hajdu, F.: Studies on the carotenoid pigments of paprika (*Capsicum annuum* L. var Sz-20). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37, 2 (1989) 350-353.
17. Böhm, F., Edge, R., Land, E. J., McGarvey, D. J., Truscott, G.: Carotenoids enhance vitamin E antioxidant efficiency. Journal of American Chemical Society, 119, 3 (1997) 621-622.
18. Breithaupt, D. E., Schwack, W.: Determination of free and bound carotenoids in paprika (*Capsicum annuum* L.) by LC/MS. European Food Research and Technology, 211 (2000) 52-55.
19. Breithaupt, D., E.: Simultaneous HPLC determination of carotenoids used as food colouring additives: applicability of accelerated solvent extraction. Food Chemistry, 86 (2004) 449-456.
20. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H.: Section I: Introduction and guidelines on the use of the Handbook, pp 5-33. In Carotenoids handbook (2004) Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
21. Burns, J., Fraser, P., D., Bramley, P., M.: Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. Phytochemistry, 62 (2003) 939-947.
22. Cserhádi, T., Forgács, E., Darwish, Y., Morais, H., Mota, T., Ramos, A., C.: Effect of reduced glutathione on the stability of pigments in paprika powders studied by multi-wavelength spectrometry and high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 949 (2002) 269-273.
23. Cserhádi, T., Forgács, E., Morais, M., H., Mota, T., Ramos, A.: Separation and quantification of pigments of chilli powder (*Capsicum frutescens*) by high-performance

- liquid chromatography – diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 896 (2000) 69-73.
24. Daood, H., G., Illés, V., Gnayfeed, M., H., Mészáros, B., Horváth, G., Biach, P., A.: Extraction of pungent spice paprika by supercritical carbon dioxide and subcritical propane. *Journal of Supercritical Fluids* 23 (2002) 143-152.
 25. Daood, H., G., Kapitány, J., Biacs, P., Albrecht, K.: Drying temperature, endogenous antioxidants and capsaicinoids affect carotenoid stability in paprika (red pepper spice). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86 (2006) 2450-2457.
 26. Daood, H., G., Vinkler, M., Márkus, F., Hebshi, E., A., Biach, P., A.: Antioxidant vitamin content of spice red pepper (paprika) as affected by technological and varietal factors. *Food Chemistry*, 55, 4 (1996) 365-372.
 27. de Castro, L., M., D., García-Ayuso, L., E.: Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta* 369 (1998) 1-10.
 28. de Sá, M., Rodriguez-Amaya, D., B.: Optimization of HPLC quantification of carotenoids in cooked green vegetables – comparison of analytical and calculated data. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17 (2004) 37-51.
 29. Deepa, N., Kaur, C., Singh, B., Kapoor, H., V.: Antioxidant activity in some red sweet pepper cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 (2006) 572-578.
 30. del Valle, J., M., Jiménez, M., de la Fuente, J., C.: Extraction kinetics of pre-pelletized Jalapeno peppers with supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids* 25 (2003) 33-44.
 31. Deli, J., Matus, Z., Molnár, P., Tóth, Gy.: Separation and identification of carotenoids from different coloured paprika (*Capsicum annuum*) by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *European Food Research & Technology*, 213 (2001) 301-305.
 32. Deli, J., Tóth, Gy.: Carotenoid composition of the fruits of *Capsicum annuum* Cv Bovet 4 during ripening. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 205 (1997) 388-391.
 33. Djilas, S., M., Čanadanović-Brunet, J., M., Četković, G., S.: Antioxidants in food. *Chem. Ind.*, 56, 3 (2002) 105-112.
 34. Domokos, J., Perédi, J., Bernáth, J.: Examination of Hungarian paprika (*Capsicum annuum*) seed oils. *Acta Horticulturae*, 331 (1993) 49-52.
 35. Doymaz, İ., Pala, M.: Hot-air drying characteristics of red pepper. *Journal of Food Engineering*, 55 (2002) 331-335.
 36. Duarte, C., Moldão-Martins, M., Gouveia, A. F., da Costa, S. B., Leitão, A. E., Bernardo-Gil, M. G.: Supercritical fluid extraction of red pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Supercritical Fluids* 30 (2004) 155-161.
 37. El-Adawy, T., A., Taha, K., M.: Characteristics and composition of watermelon, pumpkin, and paprika seed oils and flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2001) 1253-1259.
 38. El-Agamey, A., Lowe, G., M., McGarvey, D., J., Mortensen, A., Phillip, D., M., Truscott, T., G., Young, A., J.: Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biophysics*, 430, 1 (2004) 37-48.
 39. Favati, F., Galgano, F., Damiano, N., Lnazarini, G.: Supercritical CO₂ extraction of lycopene and β -carotene from by-products of the tomato industry. In: Reverchon E.,

- editor, 4th Italian Conference on Supercritical Fluids and their Applications; 7-10 September 1997; Capri, Italy, Salerno, Italy: Univ. degli Studi di Salerno. P 121-128.
40. Feltl, L., Pacáková, V., Štulík, K., Volka, K.: Reliability of carotenoid analysis: A review. *Current Analytical Chemistry*, 1 (2005) 93-102.
 41. Frank, J. (2004): Dietary phenolic compounds and vitamin E bioavailability model studies in rats and humans. Doctoral thesis, Department of Food Science Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
 42. Fraser, P., D., Bramley, P., M.: The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, 43 (2004) 228-265.
 43. Gnayfeed, M. H., Daood, H. G., Biacs, P. A., Alcaraz, C. F.: Content of bioactive compounds in pungent spice red pepper (paprika) as affected by ripening and genotype. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81 (2001a) 1580-1585.
 44. Gnayfeed, M., H., Daood, H., G., Illés, V., Biacs, P., A.: Supercritical CO₂ and subcritical propane extraction of pungent paprika and quantification of carotenoids, tocopherols, and capsaicinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2001b) 2761-2766.
 45. Guil-Guerrero, J., L., Martínez-Guirado, C., del Mar Rebeloso-Fuentes, M., Carrique-Pérez, A.: Nutrient composition and antioxidant activity of 10 pepper (*Capsicum annuum*) varieties. *European Food Research & Technology*, 224 (2006) 1-9.
 46. Henning, J., A., Core, R., J., Gardea-Torresdey, J., L.: Extracting volatile compounds from single plants using supercritical fluid extraction. *Crop Science*, 34 (1994) 1120-1122.
 47. Howard, L., R., Talcott, S., T., Brenes, C., H., Villalon, B.: Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5 (2000) 1713-1720.
 48. Illés, V.; Daood, H. G.; Biacs, P. A.; Gnayfeed, M. H.; Mészáros, B.: Supercritical CO₂ and subcritical propane extraction of spice red pepper oil with special regard to carotenoid and tocopherol content. *Journal of Chromatographic Science* 37 (1999) 345-352.
 49. International Standard ISO 7540-1984 (E): Ground (powdered) paprika (*Capsicum annuum* Linnaeus) – Specification (1984).
 50. Jarén-Galán, M., Mínguez-Mosquera, M., I.: Quantitative and qualitative changes associated with heat treatments in the carotenoid content of paprika oleoresins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 10 (1999) 4379-4383.
 51. Jarén-Galán, M., Nienaber, U., Schwartz, S., J.: Paprika (*Capsicum annuum*) oleoresin extraction with supercritical carbon dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (1999) 3558-3564.
 52. Johnson, W.: Final report on the safety assessment of *Capsicum annuum* extract, *Capsicum annuum* fruit extract, *Capsicum annuum* resin, *Capsicum annuum* fruit powder, *Capsicum frutescens* fruit, *Capsicum frutescens* fruit extract, *Capsicum frutescens* resin, and capsaicin. *International Journal of Toxicology*, 26, S1 (2007) 3-106.
 53. Kanner, J., Harel, S., Mendel, H.: Content and stability of α -tocopherol in fresh and dehydrated pepper fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27, 6 (1979) 1316-1318.
 54. Kimura, M., Rodríguez-Amaya, D., B.: A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. *Food Chemistry*, 78 (2002) 389-398.

55. Kiokas, S., Oreopoulou, V.: Antioxidant properties of natural carotenoid extracts against the AAPH-initiated oxidation of food emulsions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 7 (2006) 132-139.
56. Klieber, A., Bagnato, A.: Colour stability of paprika and chilli powder. *Food Australia*, 51, 12 (1999) 592-596.
57. Krinsky, I., N. : Carotenoids as antioxidants. *Nutrition*, 17, 10 (2001) 815-817.
58. Lang, Q., Wai, C., M.: Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - a practical review. *Talanta*, 53 (2001) 771-782.
59. Lee, H., S., Castle, W., S., Coates, G., A.: High-performance liquid chromatography for the characterization of carotenoids in the new sweet orange (Earlygold) grown in Florida, USA. *Journal of Chromatography A*, 913 (2001) 371-377.
60. Lepojević, Ž. (2001): *Praktikum hemije i tehnologije farmaceutskih proizvoda*, Tehnološki fakultet Novi Sad.
61. Levy, A., Harel, S., Palevitch, D., Akiri, B., Menagem, E., Kanner, J.: Carotenoid pigments and β -carotene in paprika. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2 (1995) 362-366.
62. Lock, E., Simándi, B. (2001): *Supercritical Fluid Extraction and Fractionation from Solid Materials*, pp 537-62; U: *Industrial Chemistry Library*, Vol. 9 - High Pressure Process Technology: Fundamentals and Applications, Elsevier.
63. Lowe, G., M., Vlismas, K., Young, A., J.: Carotenoids as prooxidants?. *Molecular Aspects of Medicine*, 24 (2003) 363-369.
64. Maoka, T., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., Akimoto, N.: Capsanthone 3,6-epoxide, a new carotenoid from the fruits of the red paprika *Capsicum annuum* L.. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 8 (2001a) 3965-3968.
65. Maoka, T., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., Akimoto, N.: Isolation of a series of apocarotenoids from the fruits of the red paprika *Capsicum annuum* L.. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3 (2001b) 1601-1606.
66. Maoka, T., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., Akimoto, N.: Rapid identification of carotenoids in a combination of liquid chromatography/UV-visible absorption spectrometry by photodiode-array detection and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (LC/PAD/APCI-MS). *J. Oleo Sci.*, 51, 1 (2002) 1-9.
67. Marin, A., Ferreres, F., Tomas-Barberan, F. A., Gil, M. I. (2004): Characterization and quantification of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 3861-3869.
68. Marković, V., Vračar, Lj. (1998): *Proizvodnja i prerada paprike*; Feljton, Novi Sad.
69. Márkus, F., Daood, H., G., Kapitány, J., Biacs, P., A.: Change in the carotenoid and antioxidant content of spice red pepper (paprika) as a function of ripening and some technological factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1 (1999) 100-107.
70. Matsufuji, H., Nakamura, H., Chino, M., Takeda, M.: Antioxidant activity of capsanthin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annuum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 9 (1998) 3468-3472.

71. Mendes, R., L., Fernandes, H., L., Coelho, J., P., Reis, E., C., Cabral, J., M., S., Novais, J., M., Palavra, A., F.: Supercritical CO₂ extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. *Food Chemistry*, 53 (1995) 99-103.
72. Mínguez-Mosquera, I., M., Hornero-Méndez, D.: Separation and quantification of the carotenoid pigments in red peppers (*Capsicum annuum* L.), paprika, and oleoresin by reversed-phase HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 10 (1993) 1616-1620.
73. Mínguez-Mosquera, M., I., Hornero-Méndez, D.: Changes in carotenoid esterification during the fruit ripening of *Capsicum annuum* Cv. *Bola*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 3 (1994) 640-644.
74. Mínguez-Mosquera, M., I., Hornero-Méndez, D.: Changes in provitamin A during paprika processing. *Journal of Food Protection*, 60, 7 (1997) 853-857.
75. Mínguez-Mosquera, M., I., Hornero-Méndez, D.: Comparative study of the effect of paprika processing on the carotenoids in peppers (*Capsicum annuum*) of the Bola and Agridulce varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (1994) 1555-1560.
76. Mínguez-Mosquera, M., I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J.: Influence of the industrial drying processes of pepper fruits (*Capsicum annuum* Cv. *Bola*) for paprika on the carotenoid content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 5 (1994) 1190-1193.
77. Mínguez-Mosquera, M., I., Pérez-Gálvez, A., Garrido-Fernández, J.: Carotenoid content of the varieties *Jaranda* and *Jariza* (*Capsicum annuum* L.) and response during the industrial slow drying and grinding steps in paprika processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 7 (2000) 2972-2976.
78. Mínguez-Mosquera, M., I., Pérez-Gálvez, A.: Color quality in paprika oleoresins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (1998) 5124-5127.
79. Morais, H., Ramos, A., C., Cserhádi, T., Forgács, E.: Effects of fluorescent light and vacuum packaging on the rate of decomposition of pigments in paprika (*Capsicum annuum* L.) powder determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 936 (2001) 139-144.
80. Müller, H.: Determination of the carotenoid content in selected vegetables and fruit by HPLC and photodiode array detection. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 204 (1997) 88-94.
81. Németh Kiss, V., Cserhádi, T., Forgács, E., Holló, J., Mota, T., P.: Stability of pigments of paprika (*Capsicum annuum*) powders during various processing steps. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 5 / 46, 3 (1996) 81-87.
82. Nguyen, U., Anstee, M., Evans, A., D.: Extraction and fractionation of spices using supercritical fluid carbon dioxide. 5th International Symposium on Supercritical Fluids (1998) Nice, France.
83. Osuna-Garcia, J., A., Wall, M., M., Waddell, C., A.: Endogenous levels of tocopherols and ascorbic acid during fruit ripening of new Mexican-type chile (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 12 (1998) 5093-5096.
84. Osuna-Garcia, J., A., Wall, M., M., Waddell, C., A.: Natural antioxidants for preventing color loss in stored paprika. *Journal of Food Science* 62, 5 (1997) 1017-1021.
85. Palmer, M., V., Ting, S., S., T.: Applications for supercritical fluid technology in food processing. *Food Chemistry* 52 (1995) 345-352.

86. Pérez-Gálvez, A., Garrido-Fernández, J., Mínguez-Mosquera, I., M.: Participation of pepper seed oil in the stability of paprika carotenes. *JAOCS*, 76, 12 (1999)*a* 1449-1454.
87. Pérez-Gálvez, A., Garrido-Fernández, J., Mínguez-Mosquera, M., I., Lozano-Ruiz, M., Montero-de-Espinosa, V.: Fatty acid composition of two new pepper varieties (*Capsicum annuum* L. cv. Jaranda and Jariza). Effect of drying process and nutritional aspects. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 76, 2 (1999)*b* 205-208.
88. Pérez-Gálvez, A., Garrido-Fernández, J., Mínguez-Mosquera, M., I.: Effect of high-oleic sunflower seed on the carotenoid stability of ground pepper.; *Journal of American Oil Chemists Society*, 77 (2000) 79-83.
89. Pérez-Gálvez, A., Jarén-Galán, M., Mínguez-Mosquera, M., I.: Processing of red pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) for production of paprika and paprika oleoresin. Iz: Hui, Y., H.: *Handbook of fruits and fruit processing*, Blackwell Publishing (2006) 565-579.
90. Pérez-Gálvez, A., Mínguez-Mosquera, M., I.: Esterification of xanthophylls and its effect on chemical behaviour and bioavailability of carotenoids in the human. *Nutrition Research*, 25 (2005) 631-640.
91. Pérez-Gálvez, A., Mínguez-Mosquera, M., I.: Structure-reactivity relationship in the oxidation of carotenoid pigments of the pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2001) 4864-4869.
92. Philip, T., Nawar, W., W., Francis, F., J.: The nature of fatty acids and capsanthin esters in paprika. *Journal of Food Science*, 36 (1971) 98-100.
93. Piletić, V., M., Milić, Lj., B., Đilas, M., S. (1993): *Organska hemija, II deo*. Prometej, Novi Sad.
94. Polyakov, N., E., Kruppa, A., I., Leshina, T., V., Konovalova, T., A., Kispert, L., D.: Carotenoids as antioxidants: spin trapping EPR and optical study. *Free Radical Biology & Medicine*, 31, 1 (2001) 43-52.
95. Ponomarev, V. D.: *Ekstragirovanie lekarstvenogo syr'ya*, Medicina, Moskva (1976).
96. *Pravilnik o kvalitetu proizvoda od voća i povrća i pečurki i pektinskih preparata*, Službeni list SFRJ 1/79.
97. Pruthi, J., S. (2003): *Advances in post-harvest processing technologies of Capsicum*. Iz: *Medicinal and aromatic plants-industrial profiles* (Hardman, R., ed.), Vol. 33 - *Capsicum* (Kirshna De, A., ed.), Taylor & Francis, London. pp 175-214.
98. Ramesh, M., N., Wolf, W., Tevini, D., Jung, G.: Influence of processing parameters on the drying of spice paprika. *Journal of Food Engineering*, 49 (2001) 63-72.
99. Raventós, M., Duarte, S., Alarcón, R.: Application and possibilities of supercritical CO₂ extraction in food processing industry: An overview. *Food Sci Tech Int* 8, 5 (2002) 269-284.
100. Reverchon, E., De Marco, I.: Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter – review. *Journal of Supercritical Fluids*, 38 (2006) 146 - 166.
101. Reverchon, E., Marrone, C.: Modeling and simulation of the supercritical CO₂ extraction of vegetable oils. *Journal of Supercritical Fluids*, 19 (2001) 161-17.
102. Reverchon, E., Sesti Osseo, L.: Modelling the Supercritical Extraction of Basil Oil, *Proc. 3rd. Int. Symp. Supercritical Fluids Vol. 2* (1994) 189-196

103. Rietjens, I., M., C., M., Boersma, M., G., de Haan, L., Spenkelink, B., Awad, H., M., Cnubben, N., H., P., van Zanden, J., J., van der Woude, H., Alink, G., M., Koeman, J., H.: The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11 (2002) 321-333.
104. Rodriguez – Amaya, D. (2001): A guide to carotenoid analysis in foods; OMNI Research and ILSI Press, Washington.
105. Rodriguez, P., Morais, H., Mota, T., Olivera, S., Forgács, E., Cserhádi, T.: Use of HPLC and multivariate methods for the evaluation of the stability of colour pigments of paprika (*Capsicum annuum*) powder. *Analytica Chimica Acta*, 372 (1998) 411-416.
106. Sabio, E., Lozano, M., Montero de Espinoza, V., Mendes, R., L., Pereira, A., P., Palavra, A., F., Coelho, J., A.: Lycopene and β -carotene extraction from tomato processing waste using supercritical CO₂. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 42 (2003) 6641-6646.
107. Shi, H., Noguchi, N., Niki, E.: Introducing natural antioxidants. U: Antioxidants in food, Practical applications, Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. Woodhead Publishing Limited, Eds., Cambridge, England, pp. 147-158, 2001.
108. Simándi, B., Sass-Kiss, Á., Czukor, B., Deák, A., Prechl, A., Csordás, A., Sawinsky, J.: Pilot-scale extraction and fractional separation of onion oleoresin using supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, 46 (2000) 183-188.
109. Simmone, A., H., Simmone, E., H., Eitenmiller, R., R., Mill, H., A., Green, N., R. (1997): Ascorbic acid and provitamin A content in some unusually coloured bell peppers. *Journal of Food Composition and Analysis* 10, 299–311.
110. Skerget, M., Knez, Z., Novak, Z., Bauman, D.: Separation of paprika components using dense CO₂. *Acta Alimentaria*, 27, 2 (1998) 149-160.
111. Somogy, N., Moór, A., Miklós, P. (2003): The preservation and production of *Capsicum* in Hungary, In *Capsicum*, Krishna De, A. ed. In *Medicinal and aromatic plants - industrial profiles*, Hardman, R., ed., Vol. 33., Taylor & Francis.
112. Somos, A. (1984): The Paprika; Akadémiai Kiadó, Budapest.
113. Sovilj, M. (2004): Difuzione operacije, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
114. Stahl, E., Quirin, K., W., Gerard, D.: Dense gases for extraction and refining; Springer-Verlag, Berlin (1988).
115. Stahl, W., Sies, H.: Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24 (2003) 345-351.
116. Su, Q., Rowley, K., G., Balazs, N., D., H.: Carotenoids: separation methods applicable to biological samples. *Journal of Chromatography B*, 781 (2002) 393-418.
117. Sun, M., Temelli, F.: Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from carrot using canola oil as a continuous co-solvent. *Journal of Supercritical Fluids*, 37 (2006) 397-408.
118. Tepić, N., A., Dimić, R., G., Vujičić, L., B., Kevrešan, S., Ž., Varga, M., Šumić, M., Z.: Quality of commercial ground paprika and its oleoresins. *Acta Periodica Technologica*, 39 (2008) 77-83.
119. Tepić, N., A., Vujičić, L., B.: Colour change in pepper (*Capsicum annuum*) during storage. *Acta Periodica Technologica*, 35 (2004) 59-64.

120. Uquiche, E., del Valle, J., M., Irtiz, J.: Supercritical carbon dioxide extraction of red pepper (*Capsicum annuum* L.) oleoresin. *Journal of Food Engineering* 65 (2004) 55-66.
121. Vasapollo, G., Longo, L., Rescio, L., Ciurlia, L.: Innovative supercritical CO₂ extraction of lycopene from tomato in the presence of vegetable oil as co-solvent. *Journal of Supercritical Fluids*, 29 (2004) 87-96.
122. Vega, P., J., Balaban, M., O., Sims, C., A., O'Keefe, S., F., Cornell, J., A.: Supercritical carbon dioxide extraction. Efficiency for carotenes from carrots by RSM. *Journal of Food Science*, 61, 4 (1996) 757-765.
123. Vesper, H., Nitz, S.: Changes of SFE and hexane extracts from paprika (*Capsicum annuum* L.) during storage. *Advances in Food Science*, 19 (1997a) 178-183.
124. Vesper, H., Nitz, S.: Composition of extracts from paprika (*Capsicum Annum* L.) obtained by conventional and supercritical fluid extraction. *Advances in Food Science*, 19, 5-6 (1997b) 172-177.
125. Vesper, H., Nitz, S.: Isolation and characterization of carotenoids in paprika (*Capsicum annuum* L.). *Advances in Food Science (CMTL)*, 19, 3/4 (1997c) 124-130.
126. Villermaux, J. J. *Chromatogr.*, Vol. 406 (1987) 11.
127. Wall, M., Bosland, P., W. (1998): Analytical methods for color and pungency of chiles (capsicums), in *Instrumental Methods in Food and Beverage Analysis*, Eds. Wetzel D. and Charalambous G., Elsevier Science B. V., 347-373.
128. Wall, M., M., Waddell, C., A., Bosland, P., W.: Variation in β -carotene and total carotenoid content in fruits of *Capsicum*. *Hort Science*, 36, 4 (2001) 746-749.
129. Wang, L., Weller, C., L.: Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology* 17 (2006) 300-312.
130. Weathers, R., M., Beckholt, D., A., Lavella, E., L., Danielson, N., D.: Comparison of acetals as in situ modifiers for the extraction of β -carotene from paprika with carbon dioxide. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 22, 2 (1999) 241-252.
131. Weissenberg, M., Schaeffler, I., Menagem, E., Barzilai, M., Levy, A.: Isocratic non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of capsanthin and capsorubin in red pappers (*Capsicum annuum* L.), paprika and oleoresin. *Journal of Chromatography A*, 757 (1997) 89-95.
132. Weller, P., Breithaupt, D., E.: Identification and quantification of zeaxanthin esters in plants using liquid chromatography – mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 24 (2003) 7044-7049.
133. www.astaxanthin.org
134. www.chez-williams.com/Hot%20Sauce/chemistry_and_scoville_units.htm
135. www.criticalprocesses.com
136. www.foodproductdesign.com/archive/1992/0892DE.html
137. www.fvm.hu/english?kat=foodindustry:05030013
138. www.occidentalfoods.com
139. www.spizes.com/spiceonline

140. Yanishlieva-Maslarova, N. V.: Inhibiting oxidation. U: Antioxidants in food, Practical applications, Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. Woodhead Publishing Limited, Eds., Cambridge, England, pp. 22-70, 2001.
141. Young, A., J., Lowe, G., M.: Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. Archives of Biochemistry and Biophysics, 385, 1 (2001) 20-27.
142. Zeković, Z. (1998): Ekstrakcija timijana (*Thymus vulgaris* L.) superkritičnim ugljendioksidom, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet Novi Sad.
143. Zeković, Z., Lepojević, Ž., Vujić, Dj.: Supercritical extraction of thyme (*Thymus vulgaris* L.). Chromatographia, 51, 3-4 (2000) 175-179.
144. Zeković, Z., Pfaf-Šovljanski, I., Grujić, O.: Supercritical fluid extraction of hops. Journal of the Serbian Chemical Society, 72, 1 (2007) 81-87.
145. Zhang, P., Omaye, S., T.: β -Carotene: interactions with α -tocopherol and ascorbic acid in microsomal lipid peroxidation. Journal of Nutritional Biochemistry, 12 (2001) 38-45.