



مقایسه ترکیبات زیست فعال مستخرج از پوست کدو حلوائی با استفاده از روش های سیال فوق بحرانی و آب زیر بحرانی

آزاده سلامی^۱، نارملا آصفی^{۲*}، رضا اسماعیل زاده کناری^۳، مهدی قره خانی^۴

۱. دانش آموخته دکترای مهندسی علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز. نشانی پستی: تبریز- ضلع شرقی

اتوبان پاسداران- مجتمع دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز.

۲. *دانشیار گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز.

۳. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران.

۴. استادیار گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز.

چکیده

اطلاعات مقاله

یکی از مهمترین مشکلات صنعت غذا اکسیداسیون مواد غذایی است که منجر به کاهش ارزش تغذیه ای و عمر ماندگاری می شود. پوست کدو به دلیل دارا بودن ترکیبات فنولی و کاروتنوئیدی با خاصیت آنتی اکسیدانی مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش عصاره فنولی و کاروتنوئیدی پوست کدو حلوائی با استفاده از دو روش استخراج با آب زیر بحرانی و استخراج با سیال فوق بحرانی استحصال و اندازه گیری شد. عصاره های ترکیبی به دلیل خاصیت سینرژیستی دارای بالاترین خاصیت آنتی اکسیدانی بودند. بطور کلی در تمام روش های ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ترکیبی استخراج شده با استفاده از سیال فوق بحرانی و پس از آن عصاره ترکیبی استخراج شده به روش آب زیر بحرانی بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان دادند. همچنین روش استخراج با آب زیر بحرانی برای استخراج کاروتنوئیدها و روش استخراج با سیال فوق بحرانی برای استخراج ترکیبات فنولی موثرتر عمل نمود. بین میزان ترکیبات فنولی و کاروتنوئیدی عصاره ها و خاصیت آنتی اکسیدانی رابطه وجود داشت و با افزایش غلظت فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها در هر سه روش خاصیت آنتی اکسیدانی افزایش یافت. نتایج نشان داد عصاره ترکیبی فنولی-کاروتنوئیدی پوست کدو حلوائی می تواند به عنوان یک آنتی اکسیدان طبیعی جایگزین مناسبی برای آنتی اکسیدان های سنتزی باشد.

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۸/۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۴/۵

کلمات کلیدی:

کدو حلوائی،

آب زیر بحرانی،

سیال فوق بحرانی،

آنتی اکسیدان

DOI: 10.22034/FSCT.22.163.50.

* مسئول مکاتبات:

narmela@iau.ac.ir

۱-مقدمه

کدو حلوائی با نام علمی (*Cucurbita pepo*) از خانواده (*Cucurbitaceae*) دارای ارزش غذایی بالایی بوده و دارای ۲ تا ۱۰ میلی گرم در هر ۱۰۰ گرم ویتامین C و ۱۰-۹ میلی گرم در هر ۱۰۰ گرم ویتامین E می باشد. بعنوان منبع عالی کاروتنوئیدها و ترکیبات فنلی برای مصرف انسان است. علاوه بر لیکوپن، بتاکاروتن و آلفاکاروتن دارای لوتئین نیز می باشد که در پوست این میوه به وفور یافت می شوند و دارای ویژگی هایی نظیر فعالیت پیش ویتامینی، آنتی اکسیدانی و بهبود سلامتی انسان می باشند [5,6,7]

استخراج یک مرحله بحرانی در دستیابی بالای ترکیبات ارزشمند مانند ترکیبات فنلی و کاروتنوئیدی از بافت های گیاهی است. انتخاب روش استخراج مناسب، به نوع ترکیبات مورد نظری که باید استخراج شوند، ویژگی های ساختاری ماتریس گیاهی (میوه، ساقه، دانه، برگ، ریشه و گل و...)، کیفیت و بازده مورد نیاز برای عصاره شرایط فرآیند (دما، فشار و...) و سنجش اقتصادی فرآیند بستگی دارد [8]. از روشهای نوین استخراج آنتی اکسیدانها در حال حاضر استفاده از سیال فوق بحرانی و آب زیر دمای بحرانی (SWE)^۴ می باشد. استخراج با سیال فوق بحرانی (SFE^۵) مزیت های بسیاری دارد که از مهمترین آنها می توان به کاهش زمان استخراج و عدم آلودگی محیط زیست اشاره کرد و همچنین حلالیت بالای آنها باعث افزایش انتقال جرم می-شوند. (SFE) خصوصیات مابین یک گاز و یک مایع را داراست. ویژگی اصلی سیال فوق بحرانی برای استخراج، چگالی بالای آن است. سیال فوق بحرانی نفوذ پذیری زیاد، ویسکوزیته کمتری نسبت به حلال های مایع دارد. بهترین حلال برای این روش استخراج، در استخراج ترکیبات طبیعی گیاهان، CO₂ است. زیرا CO₂ یک ترکیب ارزان، خنثی، در دسترس، بی مزه و حلال لیست GRAS می باشد [9]. SWE به عنوان آبی تعریف می شود که دمای آن بین ۱۰۰

واکنشهای اکسیداسیون علاوه بر تغییر ویژگی های ارگانولپتیکی مواد غذایی، ارزش غذایی و عمر نگهداری مواد غذایی را کاهش می دهند و به دلیل تولید ترکیبات نامطلوب که برای سلامتی مصرف کنندگان تاثیر سوئی دارند باعث پیر شدن، ایجاد بیماری های قلبی، ایجاد جهش و ایجاد سرطان می شود، از این رو پایدارسازی مواد غذایی تحت شرایط حرارتی و ذخیره سازی اجتناب ناپذیر است. روش های مختلفی برای پایدارسازی مواد غذایی کاربرد دارد که یکی از مهمترین روش ها استفاده از آنتی اکسیدانها می باشد. [1] علیرغم اینکه آنتی اکسیدان های سنتزی طی فرایندهای حرارتی و شرایط ذخیره سازی موثر عمل می کنند اما استفاده نمودن از این آنتی اکسیدانها از نظر سمی بودن و امنیت مواد غذایی بحث برانگیز است. قویترین آنتی اکسیدان سنتتیک (TBHQ^۴) در ژاپن، کانادا و اروپا اجازه مصرف ندارد و BHA^۲ نیز از لیست ترکیبات GRAS^۳ حذف شده است، بنابراین تحقیق برای آنتی اکسیدان های طبیعی به عنوان جایگزینی برای آنتی اکسیدان های مصنوعی از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد [2] مطالعات نشان داده است که فعالیت آنتی اکسیدانی بعضی از میوه ها و سبزیجات به مقدار کل ترکیبات فنلی آنها بستگی دارد [15]. ترکیبات فنلی یک گروه متابولیت های ثانویه آروماتیک گیاهی بوده که بطور گسترده ای در سراسر گیاه پخش شده اند و دارای اثرات بیولوژیکی متعدد مانند فعالیت آنتی اکسیدانی و فعالیت ضد باکتریایی می باشند [3]. امروزه ضایعات مواد غذایی خوراکی دارای اهمیت و جایگاه ارزشمندی می باشند و میتواند به عنوان منبع سرشار از پلی فنول های آنتی اکسیدانی در نظر گرفته شوند. استفاده از این ضایعات به عنوان منبعی از پلی فنول ها می تواند برای تولید کنندگان مواد غذایی از نظر اقتصادی دارای فواید قابل ملاحظه باشد [4]

5-supercritical fluid extraction

1-tertiary butyl hydroquinone

2- Butylated hydroxyanisole

3-Generally recognized as safe

4-Subcritical water extraction

تا ۳۰۰ درجه سانتیگراد است. یک حلال مؤثر برای ترکیب-های قطبی و غیر قطبی است. حالت مایع خود را در دمای بین ۱۰۰ درجه سانتیگراد (نقطه جوش آب) و ۳۷۴ درجه سانتیگراد (نقطه بحرانی آب) زیر فشار بحرانی ۲۲ مگا پاسکال حفظ می‌کند. از طرفی دیگر آب مایعی است که در همه جا وجود دارد، غیر سمی است و هزینه مصرفی پایینی دارد. در این راستا SWE یک گزینه ایده‌آل برای استفاده به عنوان یک حلال برای مواد دارویی و غذایی است [10]

با توجه به تاثیر روش استخراج و شرایط استخراج عصاره بر کارایی استخراج و نوع ترکیبات حاصله و از طرفی بهبود کارایی سیستم و افزایش راندمان فرایند بدون افزایش هزینه، در تحقیق حاضر استفاده از سیال فوق بحرانی (SFE) و آب زیر دمای بحرانی (SWE) به عنوان دو روش استخراج ترکیبات (فنی و کاروتنوئیدها) از پوست کدو حلوانی بدون آسیب حرارتی انجام شد و مورد مقایسه قرار گرفت.

۲ - مواد و روش ها

۲-۱- مواد

کدو حلوانی گونه Cucurbita pepo واریته Styarica که دارای رنگ نارنجی تری نسبت به سایر هستند تهیه و پس از شستشوی کامل، پوست آن‌ها جدا شد. ضخامت پوست جدا شده 1 ± 0.2 سانتیمتر بود. سپس درون آن تحت خلأ دمای ۴۰ درجه سانتیگراد خشک و با آسیاب به پودر با اندازه ذرات ۲ میلی متر تبدیل شد [11]

۲-۲- روش کار

۲-۲-۱- استخراج با استفاده از سیال فوق بحرانی

برای استخراج عصاره ابتدا ۱۲ گرم پوست کدو به همراه مهره های شیشه ای درون اکستراکتور قرار داده شد. سپس استخراج کننده روی هیتر نصب شد. سیال کربن دی اکسید به عنوان حلال با نرخ جریان ۱۵ میلی لیتر بر دقیقه با استفاده از پمپ HPLC برای رسیدن به فشار مورد نظر پمپ شد.

سپس اتانول: آب (۸۰:۲۰) با استفاده از پمپ HPLC در نرخ ۰/۲۵ میلی لیتر بر دقیقه پمپ شد. مخلوط کربن دی-اکسید و اتانول: آب (۸۰:۲۰) به درون اکستراکتور وارد شد. فشار بوسیله یک رگلاتور حرارتی تنظیم شد. کربن دی اکسید و حلال اتانول: آب با استفاده از یک پیش گرمکن برای رسیدن به دمای عملیاتی حرارت داده شد. برای اطمینان از رسیدن به درجه حرارت مورد نظر استخراج، دمای ورودی و خروجی اکستراکتور اندازه گیری شد. دما، زمان و فشار مورد استفاده به ترتیب ۶۰ درجه سانتیگراد، ۳ ساعت و ۲۵ مگاپاسکال بود. محلول استخراج شده ۳۰ دقیقه یکبار در ویال جمع آوری شد و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد [12] برای استخراج ترکیبات زیست فعال ابتدا ۲۰ گرم از نمونه با ۱۰۰ میلی لیتر حلال کمکی اتانول مخلوط و جهت استخراج ترکیبات فنی شرایط دستگاه به صورت (دما در محدوده ۳۰۸-۳۸۵ کلوین فشار در محدوده: ۰/۳-۰/۲۵ مگاپاسکال و زمان در محدوده ۳۰ دقیقه) و برای کاروتنوئید شرایط (دما در محدوده ۷۰-۴۰ کلوین فشار در محدوده: ۳۵-۲۵ مگاپاسکال و زمان در محدوده ۳۰ دقیقه) خواهد بود. پس از استخراج، ترکیبات فنی و کاروتنوئید تا زمان انجام آزمایش در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری می-شوند.

۲-۲-۲- استخراج با استفاده از سیال آب زیر بحرانی

برای استخراج کلی عصاره ابتدا ۱۲ گرم پوست کدو به همراه مهره های شیشه ای درون اکستراکتور قرار داده شد. سپس استخراج کننده روی هیتر نصب شد. آب به عنوان حلال با نرخ جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه با استفاده از پمپ HPLC برای رسیدن به فشار مورد نظر پمپ شد. فشار بوسیله یک رگلاتور حرارتی تنظیم شد. آب با استفاده از یک پیش گرمکن برای رسیدن به دمای عملیاتی حرارت داده شد. برای اطمینان از رسیدن به درجه حرارت مورد نظر استخراج، دمای ورودی و خروجی اکستراکتور اندازه گیری شد. دما، زمان و فشار مورد استفاده به ترتیب ۱۲۰ درجه سانتیگراد، ۳

آزمایشات بعدی در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتیگراد نگهداری می‌گردد.

بعد از عصاره گیری منفرد از پوست کدو با دو روش سیال فوق بحرانی و آب زیر بحرانی به صورت کلی عصاره گیری انجام شد. در نهایت از لحاظ میزان ترکیبات فنلی و قدرت آنتی اکسیدانی، عصاره های حاصل شده از این دو روش استخراج نوین و ترکیبی در پایداری اکسایشی روغن کانولا با هم مقایسه شدند.

ساعت و ۵ مگاپاسکال بود. محلول استخراج شده ۳۰ دقیقه یکبار در ویال جمع آوری شد و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد [12] در این روش برای استخراج ترکیبات زیست فعال، عصاره گیری توسط استخراج کننده آب زیر نقطه بحرانی با شرایط دستگاهی زیر جهت استخراج ترکیبات فنلی است به صورت (دما در محدوده ۱۰۰-۲۰۰ کلوین فشار در محدوده: ۶/۸۹ مگا پاسکال و زمان در محدوده ۱۰-۵۰ دقیقه) و برای کارتنوئید شرایط (دما در محدوده ۱۶۰-۲۰۰ کلوین فشار در محدوده: ۶/۸۹ مگا پاسکال و زمان در محدوده ۳۰ دقیقه) خواهد بود. مواد مستخرج تا زمان انجام

Table 1: Treatments examined in extract tests

نوع آنتی اکسیدان مورد استفاده	کد تیمار
فاقد آنتی اکسیدان	CON
۱۰۰ ppm آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ	TBHQ
عصاره فنولی استخراج شده با سیال فوق بحرانی	PHSP
عصاره کاروتنوئیدی استخراج شده با سیال فوق بحرانی	CASP
عصاره فنولی استخراج شده با آب زیر بحرانی	PHSB
عصاره کاروتنوئیدی استخراج شده با آب زیر بحرانی	CASB
ترکیبی از عصاره فنولی- کاروتنوئیدی استخراج شده با سیال فوق بحرانی	MIXSP
ترکیبی از عصاره فنولی- کاروتنوئیدی استخراج شده با آب زیر بحرانی	MIXSB

اتیل استات حل شدند و با استفاده از HPLC با ستون XDB-C18 (۵ میکرومتر؛ ۴/۶×۱۵۰ میلی متر) و دتکتور UV-vis آنالیز شدند. جداسازی کروماتوگرافی نمونه های در نرخ ثابت ۱/۵ میلی لیتر بر دقیقه و طول موج ۴۷۰ نانومتر و شستشو با استفاده از حلال ترکیبی استونیتریل: دی کلرومتان (۷۵:۲۵ حجمی/حجمی) انجام شد. کاروتن های موجود در عصاره بر اساس زمان بازداری و مساحت پیک

۲-۳-آزمون ها

۲-۳-۱ - اندازه گیری کمی و کیفی فنول کل، فلاونوئید و کاروتن کل عصاره ها

به منظور تشخیص کمی و کیفی فنول، فلاونوئید و کاروتن های موجود در عصاره ها از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده شد. عصاره های کاروتنوئیدی استخراج شده در

تشکیل شده با نمونه استاندارد مقایسه شدند. هر عصاره ۲ بار آنالیز شد.

۲-۳-۲- خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره

۲-۳-۲-۱- مهار رادیکال آزاد DPPH

۲/۷ میلی لیتر از محلول تازه تهیه شده DPPH (۵- 10×10^{-3} مول بر لیتر) با ۰/۳ میلی لیتر از غلظت های مختلف ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ ppm از عصاره و ۱۰۰ ppm آنتی اکسیدانی سنتزی TBHQ به عنوان کنترل مثبت ترکیب شد. مخلوط حاضر به شدت به هم زده شد و به مدت ۱ ساعت در تاریکی نگه داشته شد. سپس جذب آنها در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد و بر اساس رابطه زیر محاسبه شد

$$\%DPPH \text{ quenched} = [1 - (A_{\text{sample}})/(A_{DPPH})] \times 100$$

در این رابطه A_{sample} و A_{DPPH} به ترتیب جذب عصاره و شاهد فاقد عصاره هستند [13]

۲-۳-۲-۲- احیا آهن

۲/۵ میلی لیتر از محلول عصاره با ۲/۵ میلی لیتر بافر سدیم فسفات ۲۰۰ میلی مول بر لیتر و ۲/۵ میلی لیتر فری سیانید ۱ درصد ترکیب و مخلوط بالا به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس ۲/۵ میلی لیتر از تری کلرو استیک اسید ۱۰٪ حجمی / حجمی به آن اضافه شد و سپس مخلوط در ۱۱۶/۲۷۲ g به مدت ۸ دقیقه سانتیفریژ شد. ۵ میلی لیتر از محلول بالایی با ۵ میلی لیتر آب دیونیزه و ۱ میلی لیتر کلرید آهن ۰/۱ درصد ترکیب شد. سرانجام جذب محلول حاصله در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ به میزان ۱۰۰ ppm به عنوان کنترل مثبت استفاده شد [13]

۲-۳-۳- بی رنگ شدن بتا کاروتن- لینولئیک اسید

بدین منظور ابتدا یک محلول پایه تهیه گردید: ۵ میلی گرم از بتاکاروتن در ۱۰ میلی لیتر کلروفرم حل شد، ۶۰۰ میکرو لیتر از محلول تهیه شده به مخلوط ۴۰ میلی گرم لینولئیک اسید و ۴۰۰ میلی گرم توتین ۴۰ اضافه شد. سپس با روش تبخیر در خلا کلروفرم جدا گردید و ۱۰۰ میلی لیتر آب اکسیژنه به آن اضافه و شدیداً هم زده شد. ۵ میلی لیتر از امولسیون تهیه شده فوق به لوله آزمایش منتقل و ۲۰۰ میکرولیتر از هر عصاره به لوله آزمایش اضافه گردید. جذب نوری نمونه ها با اسپکترومتر در ۴۷۰ نانومتر در زمان صفر و همچنین بعد از ۱۲۰ دقیقه قرار گرفتن در حمام آب ۵۰ درجه سانتیگراد قرائت شد. نمونه شاهد حاوی تمام ترکیبات مذکور به جز عصاره است. ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره به عنوان درصد بازداري با استفاده از فرمول زیر محاسبه می-شود.

$$\% \text{فعالیت آنتی اکسیدانی} = \frac{(DRc - DRs)}{DRc} \times 100$$

DRc = میزان تجزیه نمونه شاهد
 DRs = میزان تجزیه عصاره

مقادیر DRc و DRs بر حسب $\ln(a/b)$ محاسبه می شوند که a جذب در زمان صفر و b جذب بعد از ۱۲۰ دقیقه است [14].

۳- نتایج و بحث

۳-۱- میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و کاروتنوئیدی عصاره ها

استخراج مرحله مهم و اولیه برای بازیافت و جداسازی ترکیبات زیست فعال از نمونه های گیاهی است [15]. نتایج مربوط به میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و کاروتنوئیدی عصاره ها در جدول ۲ نشان داده شده است. ترکیبات فنولی مسئول مهار رادیکال های آزاد در نمونه های گیاهی هستند و فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه وابسته به نوع و میزان ترکیبات فنولی است. بیشترین میزان ترکیبات فنولی در عصاره

کدو حلوائی افزایش می دهد [19]. Mala و همکاران (۲۰۱۶)، مقدار بتاکاروتن استخراج شده از پوست کدو را ۱۱/۸۹ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم گزارش نمودند. Sing و همکاران (۲۰۱۶)، ضمن بررسی میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره پوست کدو حلوائی مقدار آن را با استفاده از حلال های مختلف به ترتیب $33/48 \text{ mg GA}/100 \text{ g}$ - $3/79$ - $11/72 \text{ mg QE}/100 \text{ g}$ برای فنول کل و $3/79$ - $11/72 \text{ mg QE}/100 \text{ g}$ برای فلاونوئید اعلام نمودند که کمتر از مقادیر بدست آمده در پژوهش حاضر است. با توجه به اینکه آنها از روش تکان دادن و حلال برای استخراج عصاره پوست کدو استفاده کرده بودند میتوان گفت روش استخراج با آب زیر بحرانی و سیال فوق بحرانی در استخراج ترکیبات فنولی موثرتر عمل نموده است. هر دو ترکیبات فنولی و کاروتنوئیدی توانایی کاهش غلظت رادیکال های آزاد یا اکسیژن یگانه، اهدا اتم های هیدروژن و تجزیه رادیکال های آزاد را دارند [17]

PHSP و کمترین میزان ترکیبات فنولی در CASB مشاهده شد. روش استخراج با سیال فوق بحرانی در استخراج ترکیبات فنولی موثرتر از استخراج با آب زیر بحرانی عمل نموده است [16,17]. مقدار ترکیبات فنولی در تفاله کدو را $160/23$ میلی گرم بر گرم وزن خشک تفاله اعلام نمودند [18]. مقدار ترکیبات فنولی کلی عصاره کدو حلوائی را $672/19$ میلی گرم گالیک اسید بر ۱۰۰ گرم عصاره محاسبه نمودند که از مقدار بدست آمده در پژوهش حاضر بیشتر است و دلیل اختلاف روش استفاده شده در استخراج می باشد. بیشترین میزان کاروتن کل در عصاره CASB مشاهده شد. مقدار کاروتن کل استخراج شده در روش آب زیر بحرانی بیشتر از سیال فوق بحرانی بود. اعمال دما و فشار همزمان در روش استخراج با سیال فوق بحرانی نقش مهمی در افزایش قدرت حلالیت کربن دی اکسید دارد و به طور موثری استخراج فیتوکمیکال ها و مواد مغذی را از پوست

Table 2 Amount of phenolic, flavonoids and carotenoid compounds of the extracts

total carotene (mg β -carot/100 g E)	Total flavonoids (mg QE/100 g E)	Total phenol (mg GA/100 g E)	Type of extract
3.88 ± 0.90^d	218.72 ± 3.48^b	203.8 ± 0.87^b	PHSB
12.16 ± 2.47^b	2.03 ± 0.36^c	9.82 ± 1.68^c	CASB
8.04 ± 3.36^a	1.11 ± 0.04^d	10.29 ± 1.43^d	CASP
3.22 ± 2.35^c	276.21 ± 2.19^a	343.5 ± 8.84^a	PHSP

Non-identical lowercase letters in each column indicate statistically significant differences at the 5% level.

اتم هیدروژن خنثی می شوند. این روش ها آسان و ارزان هستند و میتوانند به آسانی در کارخانجات مورد استفاده قرار بگیرند [20]. اکسیداسیون لینولئیک اسید شکل گیری رادیکال های آزاد را تسریع می نماید که در نهایت منجر به بیرنگ شدن مولکول های بتاکاروتن بسیار غیر اشباع میگردد. لذا اضافه کردن یک آنتی اکسیدان به امولسیون بتاکاروتن: لینولئیک اسید ممکن است با خنثی نمودن رادیکال های آزاد لینولات از بیرنگ شدن بتاکاروتن جلوگیری نماید [21,22] قطبیت ترکیبات مهار کننده رادیکال های آزاد یک پارامتر بسیار مهم در تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی آنها می باشد [16]. نتایج مربوط به اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها با استفاده از روش مهار رادیکال DPPH، احیا

۳-۲- خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره ها

روش مهار رادیکال آزاد DPPH یکی از روش های سریع برای تعیین ظرفیت اهدا هیدروژن مواد شیمیایی و در نتیجه ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی آنها است. زمانیکه مولکول DPPH با رادیکال پروتون مواجه میشود، رنگ خاکستری آن به سرعت محو میشود [19]. روش ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی DPPH در واقع وابسته به توانایی DPPH به عنوان یک رادیکال آزاد پایدار در جهت رنگبری در حضور آنتی اکسیدان ها است. لذا مقدار کمتر دلیلی برای توانایی بالای عصاره در مهار رادیکال های آزاد است. در روش احیا آهن رادیکال های آزاد با استفاده از انتقال الکترون و یا دفع

نمودند [23,24]. Abootalebian و همکاران (۲۰۱۶)، از روش مهار رادیکال آزاد DPPH به عنوان یک روش سریع جهت اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی چند عصاره خانواده *Mentha* استفاده نمودند و نشان دادند که با افزایش غلظت عصاره از ۵۰ به ۵۰۰ ppm فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره به صورت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش می یابد و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره بالاتر از آنتی اکسیدان سنتزی BHA بود که مطابق با نتایج بدست آمده از این پژوهش در غلظت ۴۰۰ ppm عصاره است.

آهن و بیرنگ شدن بتاکاروتن: لینولتیک اسید در نمودارهای ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده میشود با افزایش غلظت عصاره ها میزان مهار رادیکال های آزاد، احیا آهن و بیرنگ شدن بتاکاروتن: لینولتیک اسید افزایش یافته است و اختلاف معنی دار آماری ایجاد شده است. [16] نشان دادند که با افزایش میزان ترکیبات فنولی خاصیت آنتی اکسیدانی به صورت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش می یابد که مطابق با نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر است. پژوهشگران دیگر نیز به اتفاق افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره همراه با افزایش ترکیبات فنولی را گزارش

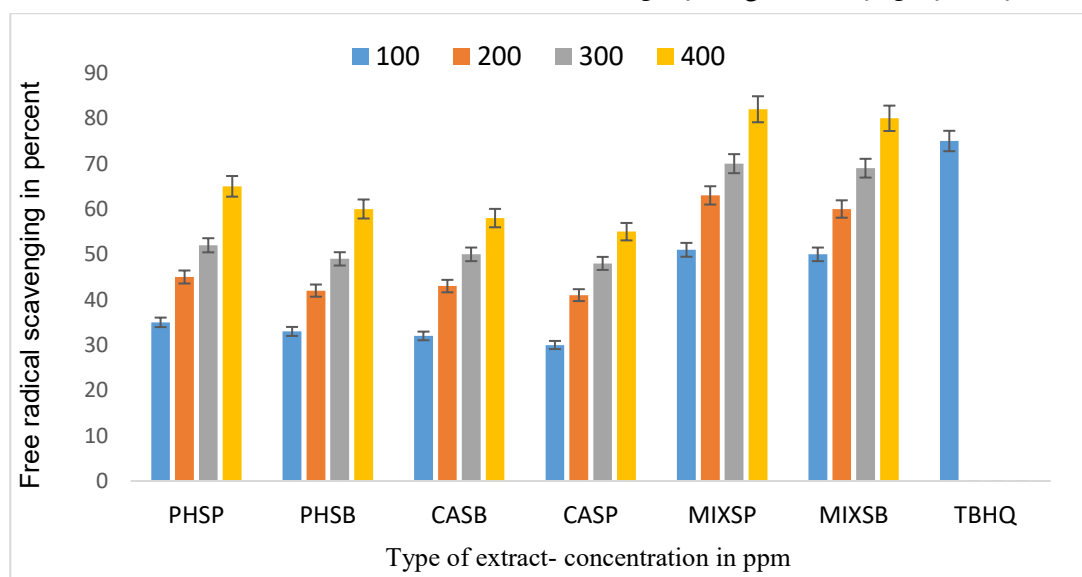


Fig1 DPPH free radical inhibition rate of different concentrations of extract (100-400 ppm) and synthetic antioxidant TBHQ (100 ppm)

غلظت عصاره خاصیت آنتی اکسیدانی افزایش یافته است که مطابق با نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر است. همانطور که مشاهده شد کیفیت ترکیبات فنولی در عصاره های استخراج شده با روش های مختلف متفاوت بود. بنظر میرسد ترکیبات غیر فنولی موجود در عصاره مانند مولکول های با وزن مولکولی پائین پروتئینی و کربوهیدراتی نیز بر میزان مهار رادیکال های آزاد تاثیر دارند [24]. از آنجاییکه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها مرتبط با تعداد و موقعیت گروه های هیدروکسیل ترکیبات فنولی است. به عنوان مثال کافئیک اسید با دو گروه هیدروکسیل دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به کوماریک اسید با یک گروه هیدروکسیل

X. Agregán و همکاران (۲۰۱۷)، فعالیت آنتی

اکسیدانی عصاره های گیاهی در آزمون احیا آهن را مرتبط با غلظت عصاره ها دانستند و با افزایش غلظت عصاره روند افزایشی در میزان مهار رادیکال های آزاد گزارش نمودند. نوع ترکیبات موجود در عصاره بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی آنها اثرگذار است. Mala و همکاران (۲۰۱۶)، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره پوست و پالپ کدو حلوائی را با استفاده از سه روش مهار رادیکال آزاد DPPH احیا آهن و رادیکال ABTS مورد بررسی قرار دادند که مشخص شد در تمام روش های ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی با افزایش

است که میزان هر دو فنول ذکر شده در عصاره استخراج شده با آب زیر بحرانی بالاتر از سیال فوق بحرانی بود. کاروتنوئیدهای موجود در عصاره های کاروتنوئیدی از پراکسیداسیون جلوگیری می نمایند. آنها توانایی اهدای اکسیژن یگانه که منجر به تولید رادیکال های آزاد و آسیب به سلول ها میشود را دارا هستند. عصاره ها ترکیبات زیست فعالی هستند که برای کنترل واکنش های اکسیداتیو مورد استفاده قرار میگیرند.

کاروتنوئیدها و ترکیبات فنولی موجود در عصاره به عنوان گیرنده های رادیکالی عمل می نمایند و میتوانند نقش مهمی در جلوگیری از اکسیداسیون بازی کنند. همچنین عصاره فنولی استخراج شده با استفاده از آب زیر بحرانی در هر سه روش ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی، دارای اثرات مهاري بیشتری بود و خاصیت آنتی اکسیدانی بالاتری نشان داد. عصاره های فنولی نسبت به عصاره های کاروتنوئیدی دارای اثرات آنتی اکسیدانی بیشتری بودند. دلیل این امر میتواند مرتبط با حضور پیوندهای دوگانه در ساختمان کاروتنوئیدها باشد. زیرا اکسیداسیون در کاروتنوئیدها در موقعیت ایزومریزاسیون و حضور اکسیژن بیشتر اتفاق می افتد [25]. به عبارت دیگر مولکول های کاروتنوئید در ماتریکس سلول های کدو نسبتا پایدار هستند اما در مواجهه با نور، گرما، اکسیژن و اسید بسیار حساس میشوند [26].

Avila و همکاران (۲۰۱۸)، فعالیت آنتی اکسیدانی آرد پوست کدو حلوائی را اندازه گیری نمودند و مشخص

گردید که این آرد در آزمون احیای آهن فعالیت آنتی اکسیدانی از خود نشان می دهد که به دلیل وجود ترکیبات زیست فعال در پوست کدو حلوائی می باشد. John و همکاران (۲۰۱۴)، رابطه مستقیم بین میزان ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی اکسیدانی وجود دارد. Maizura و همکاران (۲۰۱۱)، نیز رابطه مستقیمی بین میزان ترکیبات فنولی و خاصیت احیا کنندگی آهن در آزمون FRAP برای عصاره های زردچوبه و زنجبیل گزارش نمودند که مطابق با نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر است. J. Singh و همکاران (۲۰۱۶)، ضمن بررسی اثرات آنتی اکسیدانی عصاره پوست کدو با استفاده از آزمون های مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS و همچنین احیا آهن نشان دادند که بین غلظت ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی اکسیدانی رابطه وجود دارد و با افزایش غلظت ترکیبات فنولی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها افزایش می یابد که مطابق با نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر است. Maghsoudlou و همکاران (۲۰۱۷)، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره پوست و پالپ دو واریته انجیر را با استفاده از آزمون های مهار رادیکال آزاد DPPH و احیا آهن مورد بررسی قرار دادند و مشخص گردید با افزایش غلظت عصاره فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش می یابد که مطابق با نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر است.

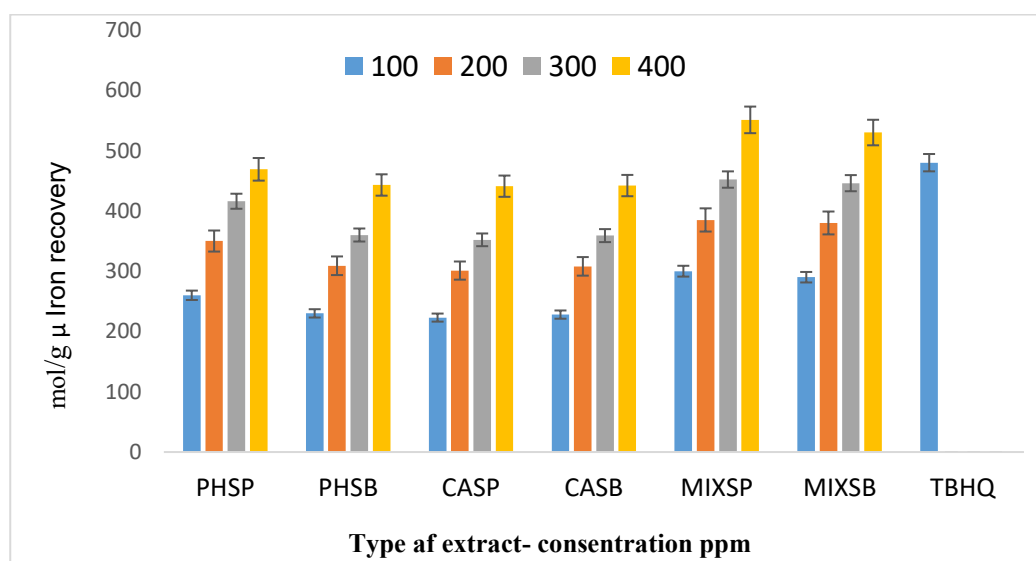


Fig 2 Iron reduction rate of different concentrations of extract (100-400 ppm) and synthetic antioxidant TBHQ (100 ppm)

در عصاره می باشد. Abootalebian و همکاران (۲۰۱۶)، ضمن اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی غلظت های مختلف عصاره های خانواده نعنا نشان دادند که با افزایش غلظت عصاره فعالیت آنتی اکسیدانی آن به صورت بیرنگ شدن بتاکاروتن: لینولئیک اسید افزایش می یابد که همراستا با نتایج بدست آمده از این پژوهش است. مشاهده میشود که در ارزیابی آنتی اکسیدانی هر سه روش بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی مربوط به نمونه های ترکیبی فنولی و کاروتنوئیدی بود که نشان دهنده اثرات سینرژیستی ترکیبات فنولی و کاروتنوئیدی در بروز خصوصیات آنتی اکسیدانی است.

همانطور که مشاهده میشود در تمامی عصاره ها با افزایش غلظت عصاره ها میزان فعالیت آنتی اکسیدانی آنها افزایش یافته است. در واقع عصاره استخراج شده با روش آب زیربحرانی به دلیل دارا بودن مقادیر بالایی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری بود. همچنین ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره وابسته به ساختار شیمیایی ترکیبات سازنده در عصاره خام می باشد [27] و تفاوت در فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف که با دو روش متفاوت استخراج شده اند وابسته به نوع و مقدار ترکیبات فنولی و یا کاروتنوئیدی

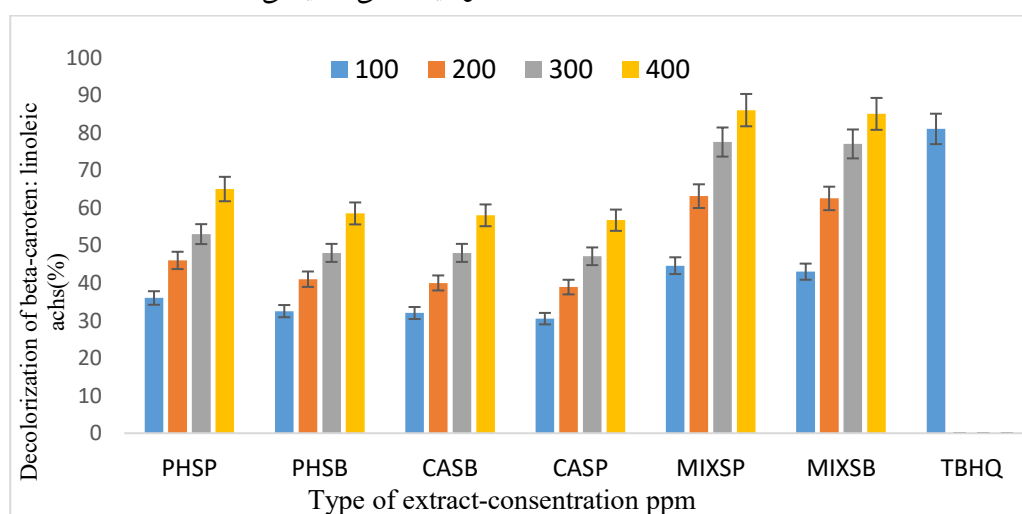


Fig 3 The amount of decolorization of beta-carotene: linoleic acid of different concentrations of extract (100-400 ppm) and synthetic antioxidant TBHQ (100 ppm)

در شرایط فوق بحرانی که مولکول های آن دارای مقدار قطبیت محدود است توسط استفاده توام از کمک حلال قطبی، مقدار قطبیت آن افزایش یافته و در نتیجه توانایی استخراج کربن دی اکسید و حلالیت ترکیبات آلی قطبی بهبود می یابد [18] کاروتنوئید یک ترکیب نامحلول در آب است که در عصاره پوست کدو حاصل از روش آب زیر بحرانی بیشتر مشاهده شده است.

مقایسه میانگین میزان ترکیبات فنولی و کاروتنوئیدی در عصاره استخراج شده توسط روش سیال فوق بحرانی و آب زیر بحرانی در جدول ۳ نشان داده شده است. بیشترین غلظت ترکیبات فنولی مربوط به عصاره حاصل از روش سیال فوق بحرانی بوده است. مقدار کل ترکیبات فنولیک حاصل از حلال های مختلف به علت قطبیت متفاوت هر حلال و توانایی حل کردن آن ها متفاوت است [28] کربن دی اکسید

Table 3 Amount of phenolic and carotenoid compounds of extracted extracts

Samples	Total phenol (mg GA/100 g E)	total carotene (mg/100 g E)
SWE	213.6 ± 5.87 ^b	15.2 ± 2.35 ^a
SFE	353.5 ± 8.84 ^a	11.48 ± 0.90 ^b

(SWE: extract from subcritical water, SFE: extract from supercritical fluid)

ترکیبات موجود در عصاره بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی آنها اثرگذار است [20]. Abootalebian و همکاران (۲۰۱۶)، نشان دادند که همبستگی بالایی بین میزان ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره وجود دارد. فنول ها ترکیبات حساس به حرارت هستند در نتیجه دلیل پایین بودن غلظت فنول عصاره آب زیر بحرانی در مطالعه حاضر این است که احتمالاً رنجی از ترکیبات فنولیک استخراجی در دمای بالا فرایند آب زیر بحرانی تخریب شده اند. Rangsiwong و همکاران (۲۰۰۹)، در بررسی خود کاهش مقدار ترکیبات فنولیک در دما بالاتر فرایند آب زیر بحرانی را، تخریب شدن این ترکیبات تحت دمای بالا دانستند. فعالیت آنتی اکسیدانی مخلوطی از عصاره حاصل از سیال فوق بحرانی و آب زیر بحرانی بیشتر از عصاره SFE و SWE به تنهایی بود. به طوری که عصاره ترکیبی (MIX) (SFE-SWE) در غلظت ۴۰۰ ppm فعالیت بالاتری را نسبت به آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ از خود نشان داد.

۳-۳- خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره ها

نتایج مربوط به اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها با استفاده از روش مهار رادیکال DPPH، احیا آهن و بیرنگ شدن بتاکاروتن: لینولئیک اسید در نمودارهای ۴، ۵ و ۶ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می شود با افزایش غلظت عصاره ها میزان مهار رادیکال های آزاد، احیا آهن و بیرنگ شدن بتاکاروتن: لینولئیک اسید افزایش یافته است و اختلاف معنی دار آماری ایجاد شده است. Konrade و Klava (۲۰۱۷)، نشان دادند که با افزایش میزان ترکیبات فنولی خاصیت آنتی اکسیدانی به صورت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش می یابد که مطابق با نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر است. پژوهشگران دیگر نیز به اتفاق افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره همراه با افزایش ترکیبات فنولی را گزارش نمودند [24,25]

در غلظت برابر عصاره حاصل از روش سیال فوق بحرانی نسبت به آب زیر بحرانی به علت داشتن میزان فنل بیشتر در نتیجه فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری، از خود نشان داد. نوع

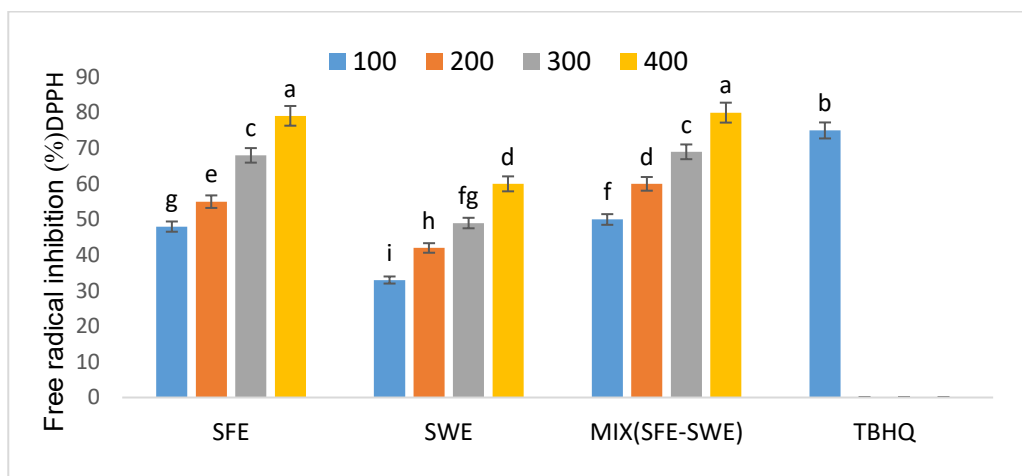


Fig 4 free radical inhibition rate of different DPPH concentrations of extract (100-400 ppm) and synthetic antioxidant TBHQ (100 ppm)

در پوست کدو حلوایی می باشد. John و همکاران (۲۰۱۴)، رابطه مستقیم بین میزان ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی اکسیدانی وجود دارد.

Avail و همکاران (۲۰۱۸)، فعالیت آنتی اکسیدانی آرد پوست کدو حلوایی را اندازه گیری نمودند و مشخص گردید که این آرد در آزمون احیای آهن فعالیت آنتی اکسیدانی از خود نشان می دهد که به دلیل وجود ترکیبات زیست فعال

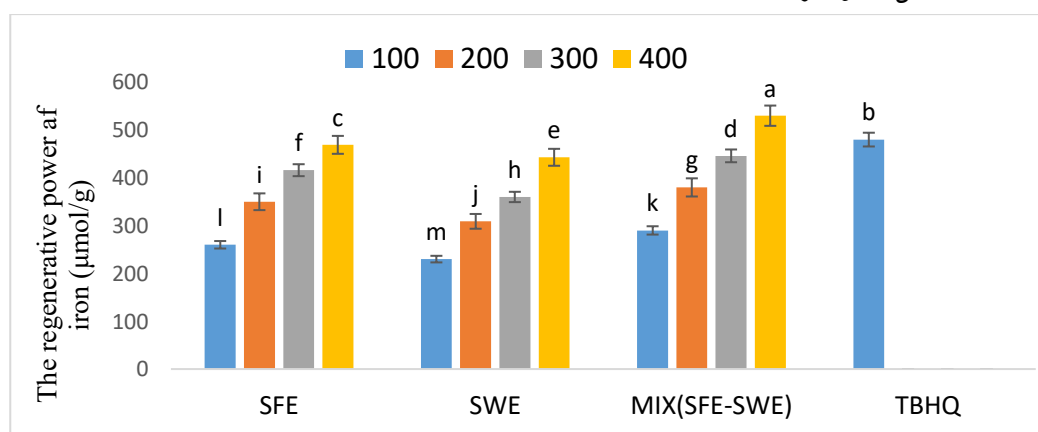


Fig 5 The amount of iron reduction power in different concentrations of extract (100-400 ppm) and synthetic antioxidant TBHQ (100 ppm)

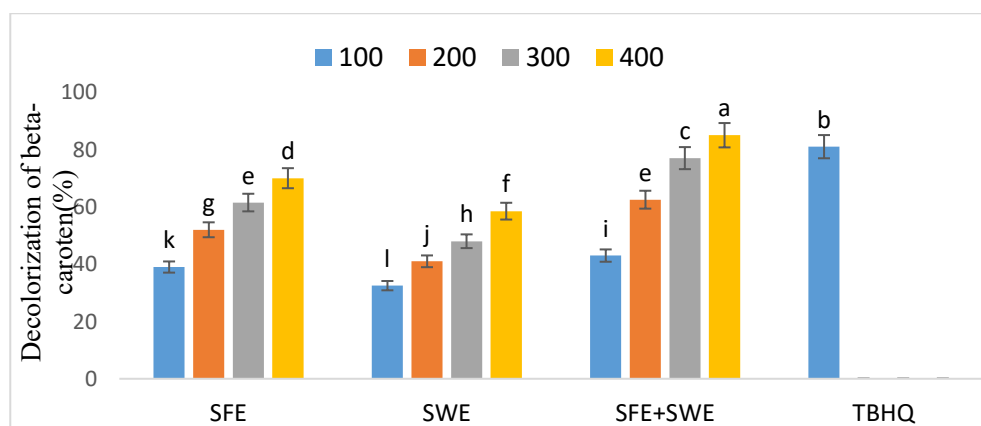


Fig 6 The amount of decolorization of beta-carotene: linoleic acid in different concentrations of extract (100-400 ppm) and synthetic antioxidant TBHQ (100 ppm)

استخراج با آب زیر بحرانی برای استخراج کاروتنوئیدها و روش استخراج با سیال فوق بحرانی برای استخراج ترکیبات فنولی موثرتر عمل نمود. همبستگی قوی بین خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره ها با میزان ترکیبات فنولی و کاروتنوئیدی آنها مشاهده شد. همچنین عصاره ترکیبی که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بیشتر در هر سه روش مهار رادیکال آزاد، احیا آهن و بیرنگ شدن بتاکاروتن دارای لینولئیک اسید بیشتری نسبت به عصاره های جداگانه بود. پوست کدو فرآورده جانبی کارخانجات فرآوری کدو حلوائی و منبع غنی از ترکیبات فنولی و کاروتنوئیدی و سایر ترکیبات زیست فعال است. یافته های این پژوهش نشان می دهد که آنتی اکسیدان طبیعی عصاره ترکیبی پوست کدو به دلیل دارا بودن ترکیبات فنولی و کاروتنوئیدی میتواند به عنوان یک جایگزین برای آنتی اکسیدان های سنتزی در کارخانجات مواد غذایی مورد استفاده قرار بگیرند.

۴ - نتیجه گیری

در این پژوهش عصاره فنولی و کاروتنوئیدی پوست کدو حلوائی با استفاده از روش های استخراج با سیال فوق بحرانی و استخراج با آب زیر بحرانی جمع آوری شد. خصوصیات آنتی اکسیدانی عصاره ها در غلظت های مختلف اندازه گیری و با آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ مقایسه شد و مشخص گردید عصاره های ترکیبی به دلیل خاصیت سینرژیستی عصاره ها دارای بالاترین خاصیت آنتی اکسیدانی در هر سه روش مورد بررسی را داشتند. بطور کلی در تمام روش های ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ترکیبی استخراج شده با استفاده از سیال فوق بحرانی و پس از آن عصاره ترکیبی استخراج شده به روش آب زیر بحرانی بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان دادند. همچنین روش

۵-منابع

- [1] Moshiry, A., Sari, A., & Aghajani, N. 2018. Optimizing the extraction conditions of the acetone extract of Ajowan seed and its effect on the stabilization of crude soybean oil. Quarterly Journal of New Food Technologies, 5, 3, 469-483.
- [2] Esmaeilzadeh Kenari, R., Mehdipour, S.Z., & Razavi, R. 2017. Investigating the changes of fatty acids and antioxidant properties of kiwi peel extract in the stabilization of sunflower oil during thermal conditions. Quarterly Journal of Food Science and Industry. 68, 14, 125-135
- [3] Caili, F., Huan, S., & Quanhong, L. 2006. A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin. Plant Foods for Human Nutrition, 61(2), 70-77.
- [4] Kabir, F., Tow, W. W., Hamauzu, Y., Katayama, S., Tanaka, S., & Nakamura, S. 2015. Antioxidant and cytoprotective activities of extracts prepared from fruit and vegetable wastes and by-products. Food Chemistry, 167, 358-362.
- [5] Ashwini Sopan, B., Vasantrao, D., & Ajit, S. 2014. Total phenolic content and antioxidant potential of cucurbita maxima (pumpkin) powder. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 5, 1903-1907
- [6] Bhat, M. A., & Anju, B. 2013. Study on physico-chemical characteristics of pumpkin blended cake. Journal of Food Processing and Technology, 4(9).
- [7] Ghaboos, S. H. H., Ardabili, S. M. S., Kashaninejad, M., Asadi, G., & Aalami, M. 2016. Combined infrared-vacuum drying of pumpkin slices. Journal of food science and technology, 53(5), 2380-2388.
- [8] Aliakbarian, B., Fathi, A., Perego, P., & Dehghani, F. 2012. Extraction of antioxidants from winery wastes using subcritical water. The Journal of Supercritical Fluids, 65, 18-24.
- [9] Gelmez, N., Kincal, N. S., & Yener, M. E. 2009. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from roasted wheat germ based on yield, total phenolic and tocopherol contents, and antioxidant activities of

the extracts. The Journal of Supercritical Fluids, 48(3), 217-224

[10] Shitu, A., Izhar, S., & Tahir, T. 2015. Sub-critical water as a green solvent for production of valuable materials from agricultural waste biomass: a review of recent work. Global Journal of Environmental Science and Management, 1(3), 255-264.

[11] Cuco, R. P., Cardozo-Filho, L., & da Silva, C. 2019. Simultaneous extraction of seed oil and active compounds from peel of pumpkin (*Cucurbita maxima*) using pressurized carbon dioxide as solvent. The Journal of Supercritical Fluids, 143, 8-15

[12] Setyorini, D., Aanisah, R., Machmudah, S., Winardi, S., Kanda, H., & Goto, M. 2018. Extraction of Phytochemical Compounds from *Eucheuma cottonii* and *Gracilaria* sp using Supercritical CO₂ Followed by Subcritical Water. Paper presented at the MATEC Web of Conferences.

[13] Esmaeilzadeh Kenari, R., Mohsenzadeh, F., Amiri, Z. R. J. F. s., & nutrition. 2014. Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound-assisted extraction methods. 2(4), 426-435.

[14] Amarowicz, R., Pegg, R., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J. J. F. c. 2004. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. 84(4), 551-562.

[15] Singh, J., Singh, V., Shukla, S., & Rai, A. 2016. Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Selected Cucurbit Fruits Extracted with Different Solvents. J Nutr Food Sci, 6(565), 2.

[16] Konrade, D., & Klava, D. 2017. Total Content of Phenolics and Antioxidant Activity in Crispbreads with Plant By-product addition. Rural Sustainability Research, 38(333), 24-31.

[17] Kubola, J., & Siriamornpun, S. 2011. Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). Food Chemistry, 127(3), 1138-1145.

[18] Priecina, L., & Karklina, D. 2014. Natural antioxidant changes in fresh and dried spices and vegetables. Int J Biol Vet Agric Food Eng, 8, 480-484.

[19] Prado, J. M., Veggi, P. C., & Meireles, M. A. A. 2014. Extraction methods for obtaining carotenoids from vegetables-review. Current Analytical Chemistry, 10(1), 29.

[20] Agregán, R., Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Dominguez, R., Carballo, J., & Franco, D. 2017. Assessment of the antioxidant activity of *Bifurcaria bifurcata* aqueous extract on canola oil. Effect of extract concentration on the oxidation stability and volatile compound generation during oil storage. Food research international, 99, 1095- 1102.

[21] Hiranvarachat, B., & Devahastin, S. 2014. Enhancement of microwave-assisted extraction via intermittent radiation: Extraction of carotenoids from carrot peels. Journal of Food Engineering, 126, 17-26.

[22] Sarikurkcu, C., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., & Harmandar, M. 2008. Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. *globosum* (lamiaceae) by three different chemical assays. Bioresource Technology, 99(10), 4239-4246.

[23] Singh, R., Chidambara Murthy, K., & Jayaprakasha, G. 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. Journal of agricultural and food chemistry, 50(1), 81-86.

[24] Sojak, M., Jaros, M., & Głowacki, S. 2014. Analysis of giant pumpkin (*Cucurbita maxima*) quality parameters in various technologies of convective drying after long-term storage. Drying Technology, 32(1), 106-116.

[25] Zargar, F. A., Kumar, S., Bhat, Z. F., & Kumar, P. 2014. Effect of pumpkin on the quality characteristics and storage quality of aerobically packaged chicken sausages. SpringerPlus, 3(1), 39.

[26] Gallardo, G., Guida, L., Martinez, V., López, M. C., Bernhardt, D., Blasco, R. Hermida, L. G. J. F. R. I. 2013. Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. 52(2), 473-482.

- [27] Zepka, L. Q., & Mercadante, A. Z. 2009. Degradation compounds of carotenoids formed during heating of a simulated cashew apple juice. *Food Chemistry*, 117(1), 28-34.
- [28] Amorim-Carrilho, K., Cepeda, A., Fente, C., & Regal, P. 2014. Review of methods for analysis of carotenoids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 56, 49-73.



Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage: www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Comparison of bioactive compounds extracted from pumpkin skin using supercritical fluid and subcritical water methods

Azadeh Salami¹, Narmella Asefi^{2*}, Reza Ismailzadeh Kenari³, Mehdi Gharekhani⁴

1. Ph.D. in Department of Food Science and Technology, Ta.C., Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ta.C., Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Food Science and Industry, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Mazandaran.
4. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Ta.C., Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received: 2022/10/24 Accepted: 2023/6/26 Keywords: Pumpkin, subcritical water, supercritical fluid, canola oil, antioxidant. DOI: 10.22034/FSCT.22.163.50. *Corresponding Author E- narmela@iau.ac.ir	One of the most important problems in the food industry is food oxidation. Pumpkin skin has been noted for having phenolic and carotenoid compounds with antioxidant properties. In this research, phenolic and carotenoid extracts of pumpkin peel were obtained using sub-critical water extraction and supercritical fluid extraction methods and then phenolic and carotenoid compounds were measured. The combined extracts had the highest antioxidant properties due to the synergistic properties of the extracts. In general, in all the antioxidant activity evaluation methods, the combined extract extracted using supercritical fluid and then the combined extract extracted using subcritical water showed the highest antioxidant activity. Also, the extraction method with subcritical water was more effective for extracting carotenoids and the extraction method with supercritical fluid was more effective for extracting phenolic compounds. There was a relationship between the amount of phenolic and carotenoidal compounds of the extracts and the antioxidant activity. In all three methods antioxidant activities of extracts increased by increasing in extract concentration. The results showed that the combined phenolic-carotenoid extract of pumpkin skin can be a suitable alternative to synthetic antioxidants as a natural antioxidant.