รายงานการปฏิบัติงานสหกิจศึกษา

พัฒนาผลิตภัณฑ์จาก silverskin coffee
Product development from silverskin coffee

โดย

นางสาว จิดาภา จันทริมา
รหัสนักศึกษา 56080212

ปฏิบัติงาน ณ
บริษัท แบล็คแคนยอน (ประเทศไทย) จำกัด
เลขที่ 2991/8 ซอย ลาดพร้าว101/3 ถนน ลาดพร้าว แขวง คลองจั่น เขต บางกะปิ
กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10240
ปฏิบัติงานสหกิจศึกษาตั้งแต่ วันที่ 4 มกราคม 2560 จนถึง วันที่ 28 เมษายน 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงาน พัฒนาผลิตภัณฑ์จากSilverskin coffee

ชื่อนักศึกษา จิดาภา จันทริมา รหัสนักศึกษา 56080212

หลักสูตร วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

พ.ศ. 2560

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.สวามินี นวลแขกุล

บทคัดย่อ

Silverskin coffeeเป็นผลพลอยได้จากการคั่วเมล็ดกาแฟดิบ ซึ่งSilverskin coffeeจะมีลักษณะเป็นเยื่อหุ้มสีเหลืองทองบางๆเป็นส่วนของSpermodermที่ล้อมรอบเมล็ดกาแฟเอาไว้ จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของSilverskin coffee โดยวิธี proximate analysis พบว่าSilverskin coffee มีส่วนที่เป็นใยอาหารสูงกว่า 62.40%, คาร์โบไฮเดรต 15.78%, ไขมัน 14.48%, ความชื้น 3.36%, แร่ธาตุ 2.70% และโปรตีน 1.28%นอกจากนี้ยังมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ total phenolicsที่อุณหภูมิต่างๆอยู่ในช่วง 76.86-108.86 มิลลิกรัม

จากการวิเคราะห์ผลทางด้านองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นและการสร้างแนวความคิดผลิตภัณฑ์ โดยใช้วิธี Focus group discussionซึ่งมีกลุ่มเป้าหมายคือบุคคลที่มีความสนใจในการดูแลสุขภาพ โดยมีปัจจัยหลักในการเลือกซื้อผลิตภัณฑ์คือ ความสะอาด, ลักษณะหน้าตาของผลิตภัณฑ์ รวมทั้งคุณค่าทางโภชนาการเช่น ไขมันต่ำ, แคลลอรี่ต่ำ, ไฟเบอร์สูง เป็นต้น จึงมีการสร้างผลิตภัณฑ์ต้นแบบออกมา 3 ผลิตภัณฑ์ ได้แก่Raisin banana pound cake, Chocolate banana castella cake ซึ่งทั้ง 2 ชนิดเป็นเค้กเสริมไฟเบอร์ และเครื่องดื่มอีก 1 ชนิด คือ Silverskin coffee Tea

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ต้นแบบมาทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่า ผู้บริโภคให้ความชอบในผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดที่ระดับความชอบรวม 6.4-6.8 (ชอบเล็กน้อยถึงปานกลาง) เพราะSilverskin coffee มีผลต่อเนื้อสัมผัสของขนมทำให้มีความแห้งเพิ่มมากขึ้น และเนื่องจากยังไม่ได้ศึกษาการปรับสัดส่วนของวัตถุดิบอื่นเพิ่มเติม ซึ่งอาจจะต้องปรับส่วนผสมที่ใช้ให้มีความพอดี และอาจเติมสารไฮโดรคอลลอยด์เพื่อเพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

Silverskin coffee is a by-product of roasting raw coffee beans. Silverskin coffee is characterized by a thin yellowish gold membrane, which is a part of Spermoderm surrounding the coffee beans. Through proximate analysis, the study of chemical components of Silverskin coffee showed that it contains over 62.40% fiber, 15.78%carbohydrate,14.48%fat, 3.36% moisture, 2.70% minerals and 1.28% protein. Moreover, it contains total phenolics (antioxidant) at different temperatures ranged from 76.86-108.86 micrograms.

In this study, the effect of chemical components was initially analyzed and idea of product was created with focus group discussion. The sample was health-conscious people. Main factors affecting the product purchase were cleanliness, appearance, nutritional value such as low fat, low calories, high fiber, etc. As these results, three prototype products were created: Raisin banana pound cake, chocolate banana castella cake (two kinds of fiber supplemental cake) and Silverskin coffee Tea, a type of beverage.

When the sensory evaluation of prototype products was conducted, it was found that the consumers preferred all three types of products with overall preference score of6.4-6.8 (slight to moderate preference). This was attributable to the lack of studying the formula modification by adding other raw materials because there is a fact that Silverskin coffee influenced the texture of the dessert, resulting in increased dryness. Thus, the formula modification is important to meet the proper proportion of ingredients. Besides, hydrocolloids may be added for moisturizing the product.

จิดาภา จันทริมา	สวามินี นวลแขกุล
....	....
นางสาวจิดาภา จันทริมา	ดร. สวามินี นวลแขกุล
ผู้จัดทำ	อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้า นางสาว จิดาภา จันทริมา นักศึกษาคณะอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลนีอาหาร สภาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ได้เข้าปฏิบัติงานสหกิจศึกษา ณ บริษัท แบล็คแคนยอน (ประเทศไทย) จำกัด เป็นระยะเวลา 4 เดือน ตั้งแต่วันที่ 4 มกราคม ถึง วันที่ 28 เมษายน 2560 ในฝ่ายผลิต (โรงคั่วกาแฟ) ซึ่งการเข้าปฏิบัติงานสหกิจศึกษาในครั้งนี้ ข้าพเจ้าได้รับความรู้ ทักษะ เทคนิคในการปฏิบัติงานและประสบการณ์ในการทำงานซึ่งได้ลงมือปฏิบัติอย่างแท้จริง

รายงานการปฏิบัติงานสหกิจศึกษาฉบับนี้จะไม่สมบูรณ์ หากไม่ได้รับความร่วมมือในการให้ข้อมูล ความรู้ต่างๆที่เกี่ยวข้องในการคั่วเมล็ดกาแฟและกระบวนการบรรจุผลิตภัณฑ์ต่างๆภายในโรงงาน อีกทั้งได้รับความไว้วางใจในให้มีส่วนร่วมในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆภายในโรงงาน ตลอดจนได้รับการสนับสนุนจากบุคคลากรทุกท่านในหน่วยงาน ฝ่ายผลิต ซึ่งมีดังต่อไปนี้

1. คุณวฐา จิตนราพงศ์ ผู้จัดการโรงงาน
2. คุณกัลยา บุญลือ หัวหน้าฝ่ายผลิตและผู้นิเทศงาน
3. คุณนรุตน์ วอทอง พนักงาน
4. คุณสุมารี จุลขันธ์ พนักงาน

และท่านอื่นๆที่มิได้กล่าวถึงในที่นี้ทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการจัดทำรายงานฉบับนี้

ข้าพเจ้าขอขอบคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่าน ที่มีส่วนร่วมในการถ่ายทอดข้อมูล ความรู้ในการปฏิบัติงานต่างๆอย่างเต็มใจ และค่อยเป็นที่ปรึกษา ให้คำแนะนำในการปฏิบัติงานและการทำรายงานนี้จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์ ตลอดจนการให้การดูแลตลอดการปฏิบัติงานสหกิจศึกษา ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

นางสาวจิดาภา จันทริมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ชื่อและสถานที่ตั้งของสถานประกอบการ	1
1.2 ลักษณะสถานประกอบการ	1
1.3 รูปแบบการจัดการองค์กรและการบริหารงาน	1
1.4 ผลิตภัณฑ์/ผลิตผล	2
1.5 ตำแหน่งและลักษณะงานที่นักศึกษาได้รับมอบหมายให้รับผิดชอบ	2
1.6 ชื่อและตำแหน่งงานของผู้นิเทศงาน	2
1.7 ระยะเวลาที่ปฏิบัติงาน	2
บทที่ 2 วัตถุประสงค์ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและแผนการปฏิบัติสหกิจศึกษา	
2.1 วัตถุประสงค์	3
2.2 ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการปฏิบัติงาน	3
2.2.1 ด้านสถานประกอบการ	3
2.2.2 ด้านนักศึกษา	3
2.2.3 ด้านมหาวิทยาลัย	3
2.3 แผนการทำงาน	4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 ชื่อโครงงานที่ได้รับมอบหมายให้ปฏิบัติ

3.1 หัวข้อโครงงานสหกิจศึกษา 5

3.2 ที่มาและความสำคัญของโครงงาน 5

3.3 ตรวจสอบเอกสาร 6

3.3.1 กาแฟ 6

3.3.2 สุขภาพ 8

3.3.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 8

3.4 วัตถุประสงค์ของโครงงาน 9

3.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ 9

3.6 ขอบเขตของการศึกษา 9

บทที่ 4 วัสดุอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาหรือจัดทำโครงงาน

4.1 วัสดุอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาหรือจัดทำโครงงาน 10

4.1.1 วัสดุอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาองค์ประกอบของ silverskin coffee 10

4.1.2 วัสดุอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ 11

4.2 สารเคมีและส่วนผสมที่ใช้ในการศึกษาหรือจัดทำโครงงาน 12

4.2.1 สารเคมีใช้ในการศึกษาองค์ประกอบของ silverskin coffee 12

4.2.2 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำผลิตภัณฑ์ทดลอง 13

บทที่ 5 วิธีการดำเนินการวิจัย

5.1 ศึกษากระบวนการผลิต 14

5.2 การวิเคราะห์ทางเคมี 14

5.3 สร้างแนวคิดผลิตภัณฑ์ 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

5.4 ทำผลิตภัณฑ์ต้นแบบ **15**

5.4.1 Raisin Banana Pound Cake 15

5.4.2 Chocolate banana castella cake 16

5.4.3 Silverskin coffee Tea 17

5.4.4 ทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส 17

บทที่ 6 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

6.1 ผลการวิเคราะห์ทางเคมีที่ได้จากการวิเคราะห์ 18

6.1.1 Proximate analysis 18

6.1.2 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ total phenolics ที่อุณหภูมิต่างๆ 18

6.2 ข้อมูลงานวิจัยองค์ประกอบทางเคมี 19

6.3 สรุปการสร้างแนวความคิดผลิตภัณฑ์ 20

6.4 ผลการทดลองพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบ 21

6.3.1 Raisin Banana Pound Cake 21

6.3.2 Chocolate banana castella cake 22

6.3.3 Silverskin coffee Tea 23

6.5 วิจารณ์ผลการทดลอง 23

บทที่ 7 สรุปผลการศึกษา

7.1 สรุปผลที่ได้จากการศึกษาทดลอง 24

7.2 สรุปผลที่ได้จากการปฏิบัติงานสหกิจศึกษา 24

7.2.1 ปัญหาและอุปสรรค 24

7.2.2 ประโยชน์ที่ได้รับ 24

7.2.3 ข้อเสนอแนะ 25

เอกสารอ้างอิง **26**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

			หน้า
ภาคผนวก			27
-	ภาคผนวก ก	Proximate Analysis และ Antioxidants (total phenolics)	27
-	ภาคผนวก ข	แบบสอบถามเพื่อใช้สร้างแนวความคิดผลิตภัณฑ์	32
-	ภาคผนวก ค	แบบสอบถามการทดสอบผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์	34
-	ภาคผนวก ง	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	37
-	ภาคผนวก จ	รูปภาพ	65
-	ภาคผนวก ฉ	สมุดบันทึกประจำวัน	68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่1 แผนการทำงาน 4

ตารางที่2 Coffee silverskin nutritional composition (g per 100 g). 19

ตารางที่3 Total phenolics of CS water extraction 20

ตารางที่4 สรุปการสร้างแนวความคิดผลิตภัณฑ์โดยใช้วิธี Focus group discussion 20

ตารางที่5 ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส Hedonic scale และ JAR ต่อผลิตภัณฑ์ Raisin Banana Pound Cake 21

ตารางที่6 ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส Hedonic scale และ JAR ต่อผลิตภัณฑ์ Chocolate banana castella cake 22

ตารางที่7 ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสHedonic scale และ JARต่อผลิตภัณฑ์Silverskin coffee Tea 23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่1 Silverskin coffee 5

ภาพที่2 ส่วนประกอบต่างๆของผลกาแฟ 7

ภาพที่3 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำผลิตภัณฑ์ทดลอง 13

ภาพที่4 Raisin Banana Pound Cake 15

ภาพที่5 Chocolate banana castella Cake 16

ภาพที่6 Silverskin coffeeTea 17

ภาพที่7 Proximate analysis 18

ภาพที่8 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ total phenolics ที่อุณหภูมิต่างๆ 18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ชื่อสถานประกอบการบริษัท แบล็คแคนยอน (ประเทศไทย) จำกัด

เลขที่ 2991/8 ซอย ลาดพร้าว101/3 ถนน ลาดพร้าว แขวงคลองจั่นเขต บางกะปิ

จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10240 โทรศัพท์ 02-3760014

1.2 ลักษณะสถานประกอบการ

ธุรกิจ ร้านกาแฟและอาหาร

1.3 รูปแบบการจัดการองค์กรและการบริหารงาน

บริษัท แบล็คแคนยอน (ประเทศไทย) จำกัด ก่อตั้งขึ้นเมื่อ ปลายปี พ.ศ. 2536 เพื่อให้บริการกาแฟคุณภาพสูง และอาหารนานาชนิด โดยมีการขยายสาขาทั้งในรูปแบบที่บริษัทฯบริหารเองและร้านแฟรนไชส์ทั้งในประเทศและต่างประเทศ

กาแฟ "แบล็คแคนยอน" เริ่มต้นจากการคัดสรรและเลือกใช้กาแฟคุณภาพสูงจากโครงการหลวงถึง 70% ในขณะที่อีก 30% เป็นกาแฟที่นำเข้าจากแหล่งผลิตที่มีชื่อเสียงของโลก ผ่านกระบวนการคั่วกาแฟ โดยเครื่องจักรที่ทันสมัยจากโรงงานคั่วกาแฟของ "แบล็คแคนยอน" ภายใต้การควบคุมและดูแลอย่างใกล้ชิดของผู้เชี่ยวชาญ โรงงานคั่วกาแฟของ "แบล็คแคนยอน" ได้รับมาตรฐาน GMP เพื่อรักษากลิ่น สี รสชาติ และความสดใหม่ตามมาตรฐานที่กำหนด กาแฟที่คั่วเสร็จ จึงถูกบรรจุในซองอลูมิเนียมคุณภาพสูง การชงกาแฟจะใช้เฉพาะเครื่องชงกาแฟเอสเปรสโซคุณภาพสูงจากอิตาลีเพื่อคงไว้ซึ่งความอร่อยและเข้มข้นตามสูตรอันเป็นแบบฉบับของตนเอง

"แบล็คแคนยอน" มุ่งมั่นรักษาความเป็นหนึ่งของธุรกิจ "แฟรนไชส์ร้านกาแฟและอาหาร" และมุ่งมั่นเชื่อมโยงการใช้ฝีมือแรงงาน และวัตถุดิบจากอุตสาหกรรมหลายสาขา โดยมีส่วนสร้างงานให้กับคนไทย พร้อมทั้งประยุกต์ความรู้ความสามารถในการบริหารจัดการสมัยใหม่ เพื่อยกระดับและผลักดันธุรกิจไทย ให้สามารถแข่งขันกับต่างชาติได้ โดยได้รับการสนับสนุนจากภาครัฐเป็นอย่างดี ในการช่วยเหลือพัฒนาธุรกิจให้สามารถดำเนินการได้อย่างเข้มแข็งและยั่งยืนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ผลิตภัณฑ์/ผลิต

- เมล็ดกาแฟคั่วบรรจุถุง 320 กรัม
- เมล็ดกาแฟคั่วบรรจุถุง 14 กรัม
- ผลิตภัณฑ์กาแฟคั่วบด (Drip Coffee)
- ผลิตภัณฑ์กาแฟFreeze dried 3 กรัม
- ผลิตภัณฑ์กาแฟFreeze dried 25 กรัม
- ผลิตภัณฑ์แบล็คโกโก้ 500 กรัม
- เครื่องเทศต่างๆ เช่น อบเชยแท่งและอบเชยผง

1.5 ตำแหน่งและลักษณะงานที่ได้รับมอบหมายให้รับผิดชอบ

- ตรวจสอบน้ำหนักผลิตภัณฑ์เมล็ดกาแฟคั่วบรรจุถุง 320 กรัม, เมล็ดกาแฟคั่วบรรจุถุง 14กรัม, ผลิตภัณฑ์กาแฟคั่วบด (Drip Coffee), ผลิตภัณฑ์กาแฟFreeze dried 3 กรัม, ผลิตภัณฑ์กาแฟFreeze dried 25 กรัม, ผลิตภัณฑ์แบล็คโกโก้ 500 กรัม

- ผลิตผลิตภัณฑ์กาแฟคั่วบด (Drip Coffee) โดยทำหน้าที่ขึ้นรูปกล่องบรรจุ, ตักกาแฟคั่วบดลงซองเยื่อ, บรรจุซองเยื่อใส่ในซองบรรจุ, ปิดผนึกซองเยื่อ/ซองบรรจุและกล่องบรรจุ

- แพ็คสินค้าลงลังสินค้าและทำความสะอาดห้องบรรจุ

1.6 ชื่อและตำแหน่งงานของผู้นิเทศงาน

นางสาว กัลยา บุญลือ ตำแหน่ง หัวหน้าฝ่ายผลิต (โรงคั่วกาแฟ)

1.7 ระยะเวลาที่ปฏิบัติงาน

เริ่มปฏิบัติงานวันที่ 4 มกราคม 2560

สิ้นสุดการปฏิบัติงานวันที่ 28 เมษายน 2560

ระยะเวลารวม 4 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2 วัตถุประสงค์ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและแผนการปฏิบัติสหกิจศึกษา

2.1 วัตถุประสงค์

1. เรียนรู้การปฏิบัติงานในสถานประกอบการจริง
2. เรียนรู้ปัญหาต่างๆ ที่แท้จริงของสถานประกอบการและคิดค้นวิธีแก้ปัญหาเฉพาะหน้า
3. รู้จักปรับตัวให้เข้ากับสังคมในสถานประกอบการ การเป็นผู้นำและเป็นผู้ตามที่เหมาะสม
4. เพื่อนำทฤษฎีที่ศึกษามา นำมาประยุกต์ใช้กับการทำงานจริง
5. นำทฤษฎีที่ศึกษามามาสร้างประโยชน์ให้กับสถานประกอบการ

2.2 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

2.2.1 ด้านสถานประกอบการ

1. เกิดความสัมพันธ์อันดีและความร่วมมือทางวิชาการกับสถานศึกษา
2. พนักงานประจำมีนักศึกษาช่วยงาน และสามารถทำงานที่สำคัญได้มากขึ้น
3. สามารถคิดผลิตภัณฑ์ใหม่ให้แก่สถานประกอบการ

2.2.2 ด้านนักศึกษา

1. ประสบการณ์วิชาชีพตามสาขาวิชาที่เรียนเพิ่มเติมจากห้องเรียน
2. เรียนรู้และพัฒนาตนเอง ที่จะทำงานร่วมกับผู้อื่น รับผิดชอบ และมั่นใจในตนเองมากขึ้น
3. เรียนรู้และมีทักษะต่างๆ ที่จำเป็นต่อการปฏิบัติงานจริง
4. ได้รับค่าตอบแทนการปฏิบัติงาน
5. ได้ประยุกต์ใช้ความรู้เชิงทฤษฎีที่ศึกษามาเพื่อมาปฏิบัติใช้จริง

2.2.3 ด้านมหาวิทยาลัย

1. สร้างเครือข่ายร่วมกับสถานประกอบการหรือองค์กรผู้ใช้บัณฑิตภายนอก เพื่อผลิตบัณฑิตที่มีคุณภาพสู่ตลาดแรงงาน
2. สถาบันได้รับข้อมูลย้อนกลับ เพื่อนำมากำหนดหรือพัฒนาหลักสูตรการเรียนการสอนให้มีความทันสมัยและสอดคล้องกับความต้องการของตลาดแรงงาน
3. สามารถนำปัญหาที่เกิดขึ้นจริงมาประยุกต์ให้เป็นปัญหาหรือประเด็นศึกษาในห้องเรียนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 แผนการทำงาน

ตารางที่1 แผนการทำงาน

หัวข้องาน		เดือนที่ 1				เดือนที่ 2				เดือนที่ 3				เดือนที่ 4			
1.	สังเกตการณ์ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	■															
		■															
2.	ลงมือฝึกปฏิบัติงานในฝ่ายผลิต		■														
			■														
3.	เก็บข้อมูลเพื่อกำหนดเป้าหมายของงานวิจัยและกำหนดงานวิจัย			■	■												
				■	■												
4.	เก็บข้อมูลทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย					■	■										
						■	■										
5.	วิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย							■	■								
								■	■								
6.	ทำการทดลองงานวิจัย									■	■						
									■	■	■	■	■				
7.	ปรับปรุงและแก้ไขงานวิจัย											■	■	■	■		
														■	■		
8.	สรุปผลงานวิจัย															■	■
																■	■

* หมายเหตุ ■ วางแผน ■ ปฏิบัติจริง

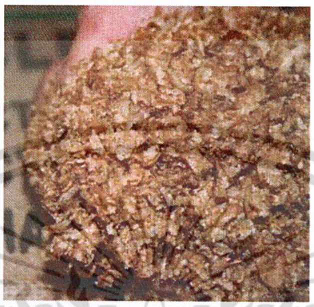
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3ชื่อโครงงานที่ได้รับมอบหมายให้ปฏิบัติ

3.1 หัวข้อโครงงานสหกิจศึกษา

ภาษาไทยพัฒนาผลิตภัณฑ์จาก Silverskin coffee

ภาษาอังกฤษProduct development from Silverskin coffee



ภาพที่1 Silverskin coffee

3.2 ที่มาและความสำคัญของโครงงาน

Silverskin coffeeเป็น byproduct ที่ได้จากขั้นตอนการคั่วเมล็ดกาแฟ โดยพบได้ในโรงคั่วกาแฟเป็นจำนวนมากแต่ยังไม่มีการนำbyproduct นี้ไปสร้างประโยชน์ จึงเป็นผลให้ผู้จัดทำโครงงานมีความสนใจที่จะพัฒนาSilverskin coffeeที่มีเป็นจำนวนมากในโรงคั่วกาแฟนั้น เพื่อเพิ่มมูลค่าและลดปริมาณขยะในโรงงาน โดยการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ Silverskin coffeeเพื่อนำมาทำการวิเคราะห์และสร้างแนวคิดในการแปรรูปผลิตภัณฑ์จาก Silverskin coffee

สำหรับการแปรรูปผลิตภัณฑ์จาก Silverskin coffeeเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ที่ยังไม่มีในประเทศไทยและยังไม่เป็นที่รู้จักมากนัก แต่มีงานวิจัยในหลายประเทศที่ได้ทำการวิเคราะห์ให้เห็นถึงประโยชน์ของ Silverskin coffee และนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ยกตัวอย่างเช่นA novel antioxidant beverage for body weight control based on coffee Silverskin (N. Martinez-Saezet al.,2014) เป็นงานวิจัยของประเทศสเปน ที่พัฒนา Silverskin coffee มาเป็นเครื่องดื่มแนวใหม่เพื่อควบคุมน้ำหนัก ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นแรงบันดาลใจให้แก่ผู้จัดทำโครงงานการสร้างแนวคิด เพื่อพัฒนาแปรรูปผลิตภัณฑ์จาก Silverskin coffee ที่มีอยู่เป็นจำนวนมากในโรงคั่วกาแฟ

ดังนั้นโครงงานฉบับนี้จึงมุ่งศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ Silverskin coffee ที่มีประโยชน์ต่อการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มมูลค่าและสร้างรายได้เพิ่มเติมให้แก่บริษัท แบล็คแคนยอน (ประเทศไทย) จำกัด

เอกสาร ... ด้านการค้า
ไม่ว่า ... ทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ตรวจสอบเอกสาร

3.3.1 กาแฟ

กาแฟเป็นผลผลิตที่ได้จากพืชชนิดหนึ่งคือ ต้นกาแฟ (Coffee Tree: Coffea) ผลกาแฟมีลักษณะเป็นผลกลมรี เมื่อสุกจะมีสีแดงสดเหมือนลูกเชอรี่ (แต่มีบางสายพันธุ์ที่สุกแล้วมีสีเหลือง) ภายในจะมีเมล็ด 2 เมล็ดประกบกันโดยทั่วไปแล้ว จะนิยมเรียกผลดิบนี้ว่าเชอรี่ (Cherry) ส่วนที่นำมารับประทานคือ เมล็ด ซึ่งต้องนำมาผ่านกระบวนการแยกเนื้อออกก่อน หลังจากนั้นจึงนำเมล็ดมาตากแห้ง เมื่อได้เมล็ดแห้ง (Green beans) แล้ว เกษตรกรจึงนำไปขายให้แก่พ่อค้าโครงการหรือโรงงานคั่ว ซึ่งโรงงานคั่วจะคั่วกาแฟที่เลือกซื้อมาคั่วตามสูตรเฉพาะของตัวเอง

- **สายพันธุ์กาแฟ**

กาแฟมีพันธุ์ใหญ่ๆ ได้อยู่ 4 กลุ่ม

1. กาแฟพันธุ์อราบิก้า (Arabica) เป็นกาแฟที่มีความสำคัญมากที่สุด ซึ่งมีผลผลิตประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ของกาแฟที่ปลูกทั่วโลก
2. กาแฟพันธุ์โรบัสต้า (Robusta) มีความสำคัญรองลงมาจากกาแฟอราบิก้า และ คุณภาพด้อยกว่าอราบิก้า
3. กาแฟพันธุ์เอ็กเซลซ่า (Excelsa) ไม่มีความสำคัญและปริมาณในทางการค้า เพราะคุณภาพไม่ดี มีกลิ่นเหม็นเขียว
4. กาแฟพันธุ์ลิเบอริก้า (Liberrica) เป็นกาแฟพื้นเมืองของแองโกล่า คุณภาพสารกาแฟไม่ดีพอ ไม่เป็นที่สนใจของตลาดและนักดื่ม

- กาแฟอราบิก้าไทย

พันธุ์อราบิก้าชื่อ "คาติมอร์" (CatiMor) เป็นการเรียกชื่อพันธุ์มาจากคำว่า คาทูร่า (Catturra) และ ไฮบริโด เดอ ติมอร์ (Hibrido de Timor) เป็น ชื่อเรียกตามการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างคาทูร่าผลแดง เป็นต้นแม่พันธุ์ และ ไฮบริโด เดอ ติมอร์เป็นต้นพ่อพันธุ์ ผลการผสมระหว่างลูกผสมข้ามชนิด ทำให้ลูกผสมที่ได้มีความต้านทานต่อโรคราสนิมและได้ลักษณะทรงเตี้ย ผลผลิตสูงและใช้หมายเลขCIFC 19/1 และ 832/1 ซึ่งกำหนดโดยนักปรับปรุงพันธุ์พืชที่ Centro de Investicao-das Ferrugens de Cafeeiro (CIFC) ในประเทศโปรตุเกส

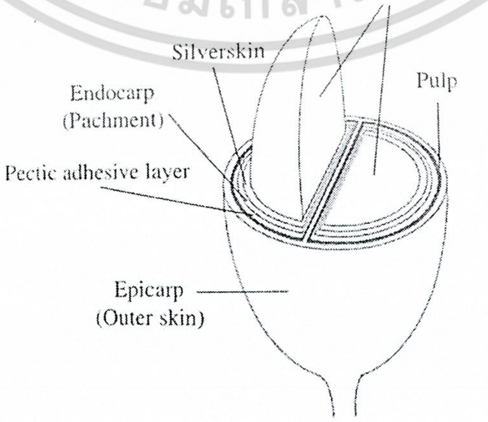
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถานีวิจัย CIFC ได้เริ่มแผนการปรับปรุงพันธุ์ในตอนต้นปี พ.ศ.2503 เป็นลูกผสมรุ่นที่ 1 รวมทั้งการศึกษาทดลองผสมพันธุ์กับกาแฟอราบิก้าตัวอื่นๆ อีกจำนวนมากมายหลายรุ่น หลายชั่วอายุสายพันธุ์ และได้นำมาคัดเลือกความต้านทานโรคราสนิม โรคอื่นๆในเมืองไทย รวมทั้งค้นหาศักยภาพในการให้ผลผลิต และ คุณภาพที่ดี ณ โครงการศูนย์วิจัยและพัฒนากาแฟบนที่สูง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ ของกรมวิชาการเกษตร รวมทั้งหน่วยงานพัฒนาเกษตรที่สูงหลายหน่วยงาน จนเป็นที่ยอมรับว่า พันธุ์กาแฟคาติมอร์ มีคุณภาพดีเหมาะสมแด่การส่งเสริมไปสู่แปลงปลูกของเกษตรกรชาวไทยภูเขา มาจนถึงปัจจุบัน อย่างไรก็ตามการศึกษา-วิจัย และติดตามประเมินผล ต่อปัญหาที่เกิดขึ้นกับการเจริญเติมโต การดูแลรักษา ปรับปรุงบำรุงพันธุ์ก็ยังต้องมีต่อไป

สำหรับการคัดเลือกในการผลิตกาแฟนั้น พันธุ์ควรเป็นต้นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงสม่ำเสมอติดต่อกันไม่น้อยกว่า 3 ปี มีจำนวนผล/ข้อมาก น้ำหนักเมล็ดเฉลี่ยไม่น้อยกว่า 15 กรัม/100 เมล็ด

- **ผลกาแฟ**

ผลสดของกาแฟประกอบด้วยส่วนต่างๆดังนี้คือเปลือกผล (Exocarp=Skin) มักมีสีแดง แต่กาแฟบางชนิด/บางสายพันธุ์มีเปลือกผลสีแดงสด แดงเข้มเลือดหมู สีเหลือง และ สีส้มอยู่บ้างเนื้อบางๆสีใส หรือ สีเหลืองอ่อน(Mesocarp=Pulp) ที่อยู่ใต้เปลือกผลและ หุ้มรอบกะลากาแฟ มีรสหวานเล็กน้อยเมื่อผลสุกกะลา (Endocarp=Parchment) เป็นส่วนที่อยู่ใต้เนื้อบางใส กะละเป็นส่วนที่มีความเหนียวและ แข็งหุ้มเมล็ดไว้ภายในเยื่อบางๆหุ้มเมล็ด (Spermoderm/Testa = Silver skin) เป็นส่วนเยื่อบางๆสีเหลืองอ่อนติดเมล็ดเนื้อเมล็ด (Endosperm=Seed/Bean) อยู่ภายใต้กะลา ภายในเมล็ดมีคัพภะ-(Embryo) ใกล้ฐานของเมล็ด ส่วนของเมล็ดนี้เองที่นำมาใช้ประโยชน์โดยการนำมาคั่วด้วยความร้อนจนเกิดสีน้ำตาล มีกลิ่นหอม เมื่อนำมาบดให้เป็นผงละเอียดแล้วชงด้วยน้ำร้อนทำเป็นเครื่องดื่มกาแฟ



ภาพที่2 ส่วนประกอบต่างๆของผลกาแฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 สุขภาพ

สุขภาพหมายถึง ภาวะของความสมบูรณ์ของ ร่างกาย จิตใจ และการดำรงชีวิตอยู่ในสังคม ปราศจากโรคภัย สุขภาพมีความหมายเชิงบวก นั่นคือต้องมีทั้ง สุขภาพกายที่ดี สุขภาพจิตที่ดี สุขภาพสังคมที่ดี สุขภาพจิตวิญญาณที่ดี จึงจะกล่าวได้ว่ามีสุขภาพที่ดี ซึ่งผู้มีสุขภาพดีถือเป็นกำไรของชีวิต เพราะผู้ที่มีจะดำรงชีวิตได้อย่างทีความสุข

ความหมายของสุขภาพ แบ่งออกเป็น 4 องค์ประกอบด้วยกันคือ

1. **สุขภาพกาย(Physical Health)** คือ ร่างกายแข็งแรงสมบูรณ์ ไม่มีโรคภัยเบียดเบียน ร่างกายทำงานได้ตามปกติ อย่างมีประสิทธิภาพ ดังคำกล่าวที่ว่า การไม่มีโรคเป็นลาภอันประเสริฐ
2. **สุขภาพจิต(Mental Health)** คือ จิตใจเบิกบานแจ่มใส ควบคุมตัวเองได้ดี ดังคำกล่าวที่ว่า จิตใจที่แจ่มใส ย่อมอยู่ในร่างกายที่สมบูรณ์
3. **สุขภาพสังคม(Social Health)** คือ สภาวะกาย ใจ สมบูรณ์ ปรับตัวให้เข้ากับสังคม ดำเนินชีวิตอยู่ในสังคมได้อย่างมีความสุข มีปฏิสัมพันธ์กับคนรอบข้าง
4. **สุขภาพจิตวิญญาณ(Spiritual Health)** คือ ปัญญารู้เท่าทัน ความดีและความชั่ว ประโยชน์และโทษ มีจิตใจดีงาม เอื้อเฟื้อเผื่อแผ่ มีคุณธรรม ดำรงชีวิตอยู่ในศีลธรรมอันดีงาม

3.3.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

3.3.3.1 Review on utilization and composition of coffee Silverskin (Y. Narita & K. Inouye, 2014)

เป็นการรวบรวมงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับSilverskin coffee ในส่วนของการใช้ประโยชน์และองค์ประกอบต่างๆที่มีความสำคัญของSilverskin coffee เช่นลักษณะของผลกาแฟ, ตำแหน่งของ Silverskin coffeeในผลกาแฟ, องค์ประกอบทางเคมีของSilverskin coffee เป็นต้น

3.3.3.2 High antioxidant activity of coffee Silverskin extracts obtained by the treatment of coffee Silverskin with subcritical water (Y. Narita & K. Inouye, 2012)

งานวิจัยประเทศญี่ปุ่น งานวิจัยนี้มุ่งเน้นในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร antioxidant activityที่มีอยู่ในSilverskin coffee โดยใช้อุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกันและใช้อุณหภูมิของกรด-ด่างที่แตกต่างกันเป็นปัจจัยในการทำการทดลอง ซึ่งจากงานวิจัยนี้ทำให้ทราบปริมาณสาร antioxidant activity และองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ เช่น ปริมาณ Caffeine, total sugar, reducing sugar เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3.3 A novel antioxidant beverage for body weight control based on **coffee Silverskin** (Nuria Martinez-Saezet al.,2014)

งานวิจัยประเทศสเปน โดยงานวิจัยนี้ได้พัฒนาSilverskin coffee ให้เป็นเครื่องดื่มที่ช่วยในการควบคุมน้ำหนัก ซึ่งได้มีการทดสอบผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ในห้องทดลองและทดสอบกับสิ่งมีชีวิตแล้วพบว่าเครื่องดื่มชนิดนี้มีศักยภาพในการป้องกันการเก็บสะสมไขมันและควบคุมน้ำหนักที่มากเกินไป ได้จากลักษณะพิเศษด้านเคมีและโภชนาการของ Silverskin coffee

3.4 วัตถุประสงค์ของโครงงาน

1. เพื่อศึกษาประโยชน์ของSilverskin coffee
2. เพื่อสร้างประโยชน์ในการใช้งานจากbyproduct (Silverskin coffee)ภายในโรงงาน
3. เพื่อเพิ่มมูลค่าให้แก่ byproduct (Silverskin coffee)ภายในโรงงาน

3.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบประโยชน์ของ Silverskin coffee ที่สามารถนำมาพัฒนาต่อได้
2. สามารถนำประโยชน์จากองค์ประกอบของ Silverskin coffeeมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผู้บริโภคยอมรับ
3. เพิ่มมูลค่าให้กับ Silverskin coffeeโดยการนำมาแปรรูเป็นผลิตภัณฑ์

3.6 ขอบเขตของการศึกษา

3.6.1 การศึกษาองค์ประกอบของ Silverskin coffee

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบของ Silverskin coffee2 องค์ประกอบ ได้แก่

- Proximate analysis
- ปริมาณ Antioxidants (total phenolics) โดยวิธี Folin-Ciocalteu reagent

2. ค้นคว้าจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

3.6.2 **การสร้างแนวความคิดผลิตภัณฑ์** โดยวิธีFocus group discussion

3.6.3 **ทดลองทำผลิตภัณฑ์ต้นแบบและทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส** โดยวิธี9-Point Hedonic scale และJust About Right (JAR)

3.6.4 **ระยะเวลาในการทดลอง** ทั้งสิ้น 4 เดือน ตั้งแต่วันที่ 4 มกราคม 2560 ถึง วันที่ 28 เมษายน 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4 วัสดุอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาหรือจัดทำโครงงาน

4.1 วัสดุอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาหรือจัดทำโครงงาน

4.1.1 วัสดุอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาองค์ประกอบทางของ Silverskin coffee

- Proximate analysis

1. ความชื้น (Moisture)

- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง
- Aluminium can
- ตู้อบไฟฟ้า (Hot Air Oven) ที่ควบคุมอุณหภูมิได้
- โถดูดความชื้น (desiccator)
- ที่คีบ (Tong)

2. เถ้า (Ash)

- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง
- ถ้วยกระเบื้อง (Crucible)
- เตาเผาไฟฟ้าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (muffle furnace)
- Hot plate
- ที่คีบ (Tong)

3. ไขมัน (Crude Fat)

- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง
- เครื่องสกัดซอกซ์เล็ต (Soxhlet apparatus) พร้อมทิมเบิล (thimble) และบีกเกอร์ไขมัน
- ตู้อบไฟฟ้า(Hot air oven) ที่ควบคุมอุณหภูมิได้
- โถดูดความชื้น (Desiccator)
- ที่คีบ (Tong)
- Boiling chip

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. โปรตีน (Crude Protein)
- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง
- Kjeldahl flask
- เครื่องย่อยและเครื่องกลั่นไนโตรเจน
- บิวเรตขนาด 50 มล.
- Erlenmeyer flask ขนาด 250-450 มล.
- boiling chip

5. ใยอาหาร (Crudefiber)
- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง
- เครื่องวิเคราะห์ใยอาหาร (fiber extraction apparatus)
- ถ้วยชนิดทนไฟ (sinter glass crucible)ขนาดของตัวกรองประมาณ 40-90 ไมครอน
- เตาเผาไฟฟ้า (muffle furnace)
- ตู้อบไฟฟ้า (Hot Air Oven)
- ที่คีบ (Tong)

- Antioxidants (total phenolics) โดยวิธี Folin-Ciocalteu reagent

- Spectrophotometer และคิวเวท (Cuvette)
- ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 ml
- ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml
- บีกเกอร์ขนาด 250 ml
- หลอดทดลอง
- ปิเปตขนาด 1 ml, 5 ml, 10 ml
- ไมโครปิเปต
- ช้อนตักสาร

4.1.2 วัสดุอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์
- เตาอบไฟฟ้า
- เครื่องผสมมือไฟฟ้า
- เครื่องปั่นอาหารแบบแห้ง
- ตระกร้อมือ
- ช้อนตวง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ถ้วยตวง
- เครื่องชั่งแบบดิจิทัล
- ชามผสม
- ถ้วยอะลูมิเนียม
- พายยาง
- ช้อน
- ถาดอบ
- ถ้วยอะลูมิเนียมฟอยล์
- ซองเยื่อ หรือถุงบรรจุชา

4.2 สารเคมีและส่วนผสมที่ใช้ในการศึกษาหรือจัดทำโครงงาน

4.2.1 สารเคมีใช้ในการศึกษาองค์ประกอบของ Silverskin coffee

- Proximate analysis

1. ไขมัน (Crude Fat)
- ปิโตเลียมอีเทอร์ที่มีจุดเดือด 40-60 องศาเซลเซียส
2. โปรตีน (Crude Protein)
- กรดซัลฟูริกเข้มข้น
- กรดบอริก 2%
- สารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก 0.1 หรือ 0.01 N
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 32%
- ตัวเร่ง(Catalyst) (เตรียมจาก 1:8 ของ $CuSO_4/K_2SO_4$)
- สารละลายอินดิเคเตอร์ 0.1% Methyl green
0.1% Methyl red
3. ใยอาหาร (Crudefiber)
- สารละลายกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น 0.255 N.
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.313 N.
- อะซีโตน
- n-Octanal(Anti foam)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Antioxidants (total phenolics) โดยวิธี Folin-Ciocalteu reagent
  - Gallic acid
  - Folin-Ciocalteau
  - Sodium carbonates (10%)
  - Ethanol (95%)

4.2.2 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำผลิตภัณฑ์ทดลอง

- กล้วยหอม
- ไข่ไก่
- น้ำตาลทราย
- น้ำตาลไอซิ่ง
- แป้งขนมปัง
- แป้งเค้ก
- แป้งอัลมอนด์ (อัลมอนด์บดละเอียด)
- ผงโกโก้
- น้ำผึ้ง
- นมข้นหวาน
- นมสดรสจืด
- Silverskin coffee บดละเอียด

ภาพที่3 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำผลิตภัณฑ์ทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5 วิธีการดำเนินการวิจัย

5.1 ศึกษากระบวนการผลิต

5.1.1 ขั้นตอนการคั่วเมล็ดกาแฟ

เริ่มจากการนำกาแฟสายพันธุ์อราบิก้า 50 กิโลกรัม เทลงในที่พักเมล็ดกาแฟ จากนั้นตรวจวัดความชื้นเมล็ดกาแฟดิบ โดยใช้เครื่อง grain moisture tester ซึ่งเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่ต้องการจะอยู่ในช่วง 10-13% จึงจะปล่อยเมล็ดกาแฟดิบเข้าสู่เครื่องคั่วเมล็ดกาแฟ โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการคั่วเมล็ดกาแฟจะอยู่ที่ 170-180 องศาเซลเซียสใช้เวลาในการคั่ว 30-40 นาทีโดยประมาณ และสังเกตการแตกตัวของเมล็ดกาแฟโดยการฟังเสียง ซึ่งการแตกตัวของเมล็ดกาแฟจะอยู่ในระยะเวลาประมาณนาทีที่20 ของการคั่วกาแฟ เมื่อคั่วเมล็ดกาแฟจนได้เมล็ดกาแฟมีสีน้ำตาลเข้มที่สม่ำเสมอ จากนั้นปล่อยเมล็ดกาแฟจากเครื่องคั่วกาแฟเข้าสู่ถังกวนเมล็ดกาแฟเพื่อระบายความร้อนและทำให้เมล็ดกาแฟเย็นตัวลงซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 4 นาที แล้วปล่อยเมล็ดกาแฟคั่วลงในกระบะบรรจุเมล็ดกาแฟ

5.2 การวิเคราะห์ทางเคมี

5.2.1 Proximate Analysisโดยมีการวิเคราะห์ความชื้น, เถ้า, ไขมัน, โปรตีนและใยอาหาร

5.2.2 Antioxidants (total phenolics) โดยวิธี Folin-Ciocalteu reagent ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก

5.3 สร้างแนวคิดผลิตภัณฑ์

โดยใช้วิธี Focus group discussion

มีผู้เข้าร่วมทำ Focus group discussionจำนวน 8คน โดยกำหนดกลุ่มเป้าหมาย คือ กลุ่มคนควบคุมน้ำหนักและกลุ่มคนรักสุขภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.4 ทำผลิตภัณฑ์ต้นแบบ

5.4.1 Raisin Banana Pound Cake

ส่วนผสม

ไข่ไก่ (เฉพาะไข่ขาว)	2 ฟอง	น้ำตาลทราย (1)	30 กรัม
ไข่ไก่ (เฉพาะไข่แดง)	2 ฟอง	น้ำตาลทราย (2)	40 กรัม
นมข้นหวาน	25 มิลลิลิตร	น้ำผึ้ง	30 มิลลิลิตร
นมสดรสจืด	2 ช้อนโต๊ะ	แป้งเค้ก	120 กรัม
แป้งอัลมอนด์	15 กรัม	Silverskin coffee บดละเอียด	6 กรัม
กล้วยหอม	150 กรัม	ผงฟู	½ ช้อนชา
ลูกเกดอบแห้ง	50 กรัม		

วิธีทำ

1. อุ่นเตาอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส
2. ปูกระดาษไขลงในพิมพ์
3. ผสมนมข้นหวาน, น้ำผึ้งและนมสดให้เข้ากัน
4. ผสมแป้งเค้ก, แป้งอัลมอนด์, Silverskin coffee บดละเอียดและผงฟูให้เข้ากัน
5. ทำเมอแรงโดยใช้หัวตีรูปตะกร้อตีไข่ขาวกับน้ำตาลทราย(1)ด้วยความเร็วสูงจนตั้งยอดแล้วพักไว้
6. .ใช้หัวตีรูปตะกร้อตีไข่แดงกับน้ำตาลทราย(2)ด้วยความเร็วต่ำจนข้นขึ้นและมีสีเหลืองนวล จากนั้นเติมส่วนผสมกล้วยหอมบดและนมข้นหวานที่เตรียมไว้ลงผสมต่อให้กัน
7. นำส่วนผสมแป้งที่เตรียมไว้ผสมเข้ากับข้อที่6 แล้วตีต่อจนเข้ากันดีและไม่เห็นเม็ดแป้ง
8. แบ่งเมอแรงครึ่งส่วนใส่ลงผสมกับส่วนผสมในข้อ7 ให้เข้ากัน ตามด้วยลูกเกดอบแห้งที่เตรียมไว้ และเมอแรงส่วนที่เหลือ โดยใช้พายยางกวาดส่วนผสมจากก้นชามขึ้นมาผสมให้เข้ากัน(ระวังอย่าให้ฟองอากาศแตก)
9. เทส่วนผสมลงในพิมพ์เกลี่ยหน้าให้เรียบ นำเข้าเตาอบนาน 35 นาที รอจนเค้กสุกดี(ทดสอบได้โดยการใช้ไม้ปลายแหลมจิ้มเค้ก หากไม่มีเศษเค้กติดขึ้นมาแสดงว่าสุกดีแล้ว) วางพักบนตะแกรงให้เย็นสนิท แกะเค้กออกจากพิมพ์และลอกกระดาษไขออก

ภาพที่4 Raisin Banana Pound Cake

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาต ... ค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของ

5.4.2 Chocolate banana castella cake

ส่วนผสม

ไข่ไก่ (เฉพาะไข่ขาว)	3 ฟอง	น้ำตาลทราย	80 กรัม
ไข่ไก่ (เฉพาะไข่แดง)	3 ฟอง	แป้งขนมปัง	90 กรัม
นมข้นหวาน	40 กรัม	ผงโกโก้	25 กรัม
น้ำผึ้ง	40 กรัม	ผงฟู	½ ช้อนชา
นมสดรสจืด	2 ช้อนโต๊ะ	Silverskin coffee บดละเอียด	4.5 กรัม
กล้วยหอม	150 กรัม	น้ำตาลไอซิ่งสำหรับตกแต่ง	

วิธีทำ

1. อุ่นเตาอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส
2. ปูกระดาษไขลงในพิมพ์
3. ผสมนมข้นหวาน, น้ำผึ้งและนมสดให้เข้ากัน
4. ผสมแป้งเค้ก, ผงโกโก้, Silverskin coffee บดละเอียดและผงฟูให้เข้ากัน
5. ทำเมอแรงโดยใช้หัวตีรูปตะกร้อตีไข่ขาวกับน้ำตาลทรายด้วยความเร็วสูงจนตั้งยอดแล้วพักไว้
6. ใช้หัวตีรูปตะกร้อตีไข่แดงและส่วนผสมของกล้วยหอมบดและนมข้นหวานที่เตรียมไว้ด้วยความเร็วต่ำในชามผสมอีกใบจนเนื้อเนียนเข้ากันดี จากนั้นเทลงในชามเมอแรงแล้วตีต่อจนส่วนผสมเข้ากันดี
7. นำส่วนผสมแป้งที่เตรียมไว้ผสมเข้ากับส่วนผสมในข้อที่6 แล้วตีด้วยความเร็วต่ำนานประมาณ 5-10 วินาที จนไม่เห็นเม็ดแป้ง จากนั้นใช้พายยางกวาดแป้งที่ขอบชามลงผสมให้เข้ากัน
8. เทส่วนผสมลงในพิมพ์เกลี่ยหน้าให้เรียบ นำเข้าเตาอบนาน 30 นาที รอจนเค้กสุกดี(ทดสอบได้โดยการใช้ไม้ปลายแหลมจิ้มเค้ก หากไม่มีเศษเค้กติดขึ้นมาแสดงว่าสุกดีแล้ว) วางพักบนตะแกรงให้เย็นสนิท แกะเค้กออกจากพิมพ์และลอกกระดาษไขออก

เอกสารนี้เป็นเอกส... การศึกษาเท่... ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่5 Chocolate banana castella cake

5.4.3 Silverskin coffeeTea

ส่วนผสม

Silverskin coffee อบแห้งบดละเอียด 10 กรัม

วิธีทำ

1. นำSilverskin coffee อบที่ 120 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมงแล้วนำออกจากตู้อบใส่โถดูดความชื้น (desiccator) ทิ้งไว้ให้เย็น
2. นำSilverskin coffee ที่เย็นแล้วมาบดละเอียด ด้วยเครื่องปั่นอาหารแบบแห้ง
3. บรรจุSilverskin coffee อบแห้งที่บดละเอียดปริมาณ 10 กรัม ลงในซองเยื่อหรือถุงบรรจุชา
4. ปิดผนึกซองเยื่อหรือถุงบรรจุชา

5.5 ทดลองพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบ

โดยการเลือกผลิตภัณฑ์ Chocolate banana castella cake เป็นผลิตภัณฑ์ที่จะนำมาพัฒนาเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบซึ่งจะใช้แบบสอบถามการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส Hedonic scale และ JAR โดยใช้ผู้ทำการทดสอบจำนวน 30 คน ในการทดสอบผลิตภัณฑ์ต้นแบบข้อมูลที่ได้จากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส Hedonic scale และ JARจะนำมาใช้ในการปรับปรุงสูตรและพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

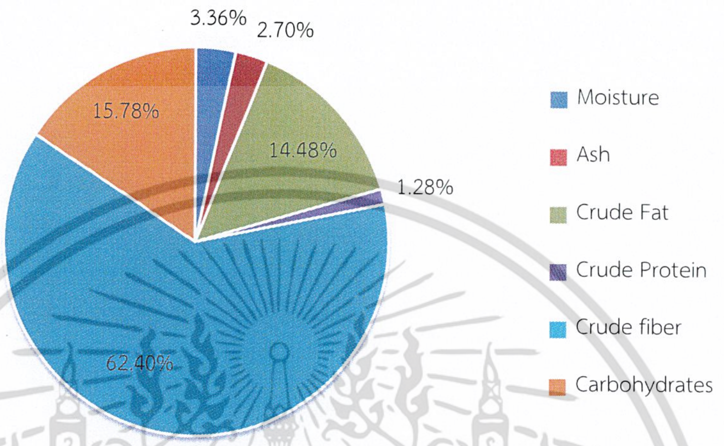
ภาพที่6 Silverskin coffeeTea

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

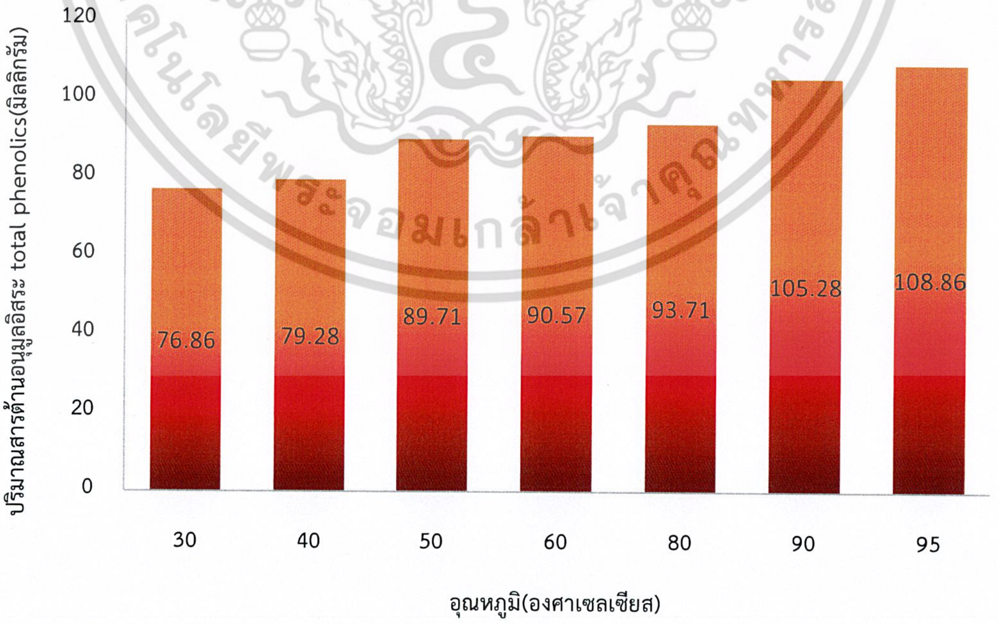
6.1 ผลการวิเคราะห์ทางเคมีที่ได้จากการวิเคราะห์

6.1.1 Proximate analysis



ภาพที่7 Proximate analysis

6.1.2 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ total phenolicsที่อุณหภูมิต่างๆ



ภาพที่8 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ total phenolics ที่อุณหภูมิต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.2 ข้อมูลงานวิจัยองค์ประกอบทางเคมี

6.1 Proximate analysis

ตารางที่2 Coffee Silverskin nutritional composition (g per 100 g).

Component	Coffee Silverskin	Coffee Silverskin from Arabica	Coffee Silverskin from Canephora
Proteins	18.6±0.6	18.6±0.3	17.9-19.0
Fats	2.2±0.1	2.2±0.5	2.50-2.92
Carbohydrates	62.1±1.6	65.1±1.2	47.0-80.5
Reducing sugars	0.2±0.01	N.A.[a]	N.D.[b]
Moisture	7.3±0.4	7.1±0.2	N.A.
Minerals (Ashes)	7.0±0.2	7.0±0.2	N.A.
Total dietary fiber	62.4±0.6	62.4±0.5	53.4-69.2
Insoluble dietary fiber	53.7±0.2	53.7±0.4	48.5-64.2
Soluble dietary fiber	8.8±0.4	8.8±0.6	4.9-9.3
References	A	B	C

From Borrelli et al. (2004) and Napolitano et al. (2006) (A), Pourfarzad et al. (2013) (B), Napolitano et al. (2007) (C); [a] Not analyzed. [b] Not detected.

จากตารางที่ 2 แสดงค่าองค์ประกอบทางเคมีของSilverskincoffee จากงานวิจัยต่างๆ จะพบว่าSilverskincoffee ที่ต่างสายพันธ์จะมีค่าองค์ประกอบทางเคมีที่ใกล้เคียงกัน โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่จะประกอบด้วยใยอาหารและคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.2 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ total phenolicsที่อุณหภูมิต่างๆ

ตารางที่3 Total phenolicsof CS water extraction

Extraction temperature (°C)	Total phenolics (g/100 g)	Total phenolic (mg/g ofCS)
25	3.6±0.3	6±0
80	3.5±0.1	7±0
180	8.5±0.5	22±1
210	12.4±0.9	36±3
240	13.0±0.6	35±2
270	12.3±0.9	28±1

From Narita and Inouye (2012).

จากตารางที่ 3 พบว่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ total phenolicsที่อุณหภูมิต่างๆ จะมีปริมาณที่สูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการสกัดสูงขึ้น ซึ่งจากตารางนี้จะพบว่าอุณหภูมิที่สามารถสกัดtotal phenolics ได้มากที่สุดอยู่ที่ 240 องศาเซลเซียส

6.3 สรุปการสร้างแนวความคิดผลิตภัณฑ์

ตารางที่4 สรุปการสร้างแนวความคิดผลิตภัณฑ์โดยใช้วิธี Focus group discussion

ลักษณะผลิตภัณฑ์	ทางเลือก
ชนิดของผลิตภัณฑ์ (ขนม)	ขนมปังโฮมวีต, บราวนี่, บัตเตอร์เค้ก, เวเฟอร์, มัฟฟิน, เค้กผลไม้,คุ้กกี้, ขนมปังฮอดดอก
ชนิดของผลิตภัณฑ์ (เครื่องดื่ม)	ชา,โกโก้เย็น,คาราเมลปั้น,อิตาเลียนโซดา
วิธีการใช้	รับประทานได้ทันที
วัตถุดิบ	ผลไม้สด, ไม่มีครีม, ช๊อคโกแลต, กล้วย, ถั่ว
อายุการเก็บรักษา	3 วัน, 2 อาทิตย์ (สำหรับขนม)
คุณค่าทางโภชนาการ	หวานน้อย, ไขมันต่ำ, แคลลอรี่ต่ำ, ไฟเบอร์สูง
ราคา	40-60 บาท/ชิ้น
ปัจจัยในการเลือกซื้อผลิตภัณฑ์	ความสะอาด, ลักษณะหน้าตาของผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.4 ผลการทดลองพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบ

6.4.1 ผลิตภัณฑ์ Raisin Banana Pound Cake

ตารางที่5 ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส Hedonic scale และ JAR ต่อผลิตภัณฑ์ Raisin Banana Pound Cake

ปัจจัยคุณภาพ	คะแนนความชอบ	%พอดี
สี	7.4±0.8	93.30
กลิ่น Silverskin coffee	6.2±1.7	56.67
กลิ่นกล้วย	5.9±1.6	56.67
เนื้อสัมผัสความนุ่ม	5.8±1.3	36.67
ความชุ่มชื้น	5.6±1.5	23.33
ความเป็นเนื้อเดียวกัน	6.4±1.2	73.33
ความหวาน	6.5±1.5	66.67
ความชอบรวม	6.4±1.2	

จากตารางที่5 ซึ่งเป็นผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส Hedonic scale และ JAR ต่อผลิตภัณฑ์ Raisin Banana Pound Cake พบว่ากลิ่น Silverskin coffee, กลิ่นกล้วย, เนื้อสัมผัสความนุ่ม และเนื้อสัมผัสความชุ่มชื้น ยังไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค โดยปัจจัยคุณภาพที่ได้รับการยอมรับที่สุด ได้แก่ สี ที่มีค่าเปอร์เซ็นความพอดีสูงถึง 93.3% ในส่วนของปัจจัยคุณภาพที่ได้รับการยอมรับต่ำที่สุด ได้แก่ ความชุ่มชื้นของผลิตภัณฑ์ ที่มีค่าเปอร์เซ็นความพอดีเพียง 23.3% และคะแนนความชอบเฉลี่ยเพียง 5.6 เท่านั้น ดังนั้นปัจจัยคุณภาพที่มีความเกี่ยวข้องกับเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์จึงควรที่จะปรับปรุงก่อนเป็นอันดับแรก ซึ่งอาจเติมส่วนผสมที่เป็นของเหลว เช่น น้ำเปล่า, นมสด หรือใช้สารไฮโดรคอลลอยด์ ในการเพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.4.2 ผลิตภัณฑ์ Chocolate banana castella cake

ตารางที่6 ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส Hedonic scale และ JAR ต่อผลิตภัณฑ์ Chocolate banana castella cake

ปัจจัยคุณภาพ	คะแนนความชอบ	%พอดี
สี	7.4±0.9	83.33
กลิ่น โกโก้	6.3±1.1	46.66
กลิ่นกล้วย	6.0±1.6	53.33
เนื้อสัมผัสความนุ่ม	6.8±1.1	76.67
ความชุ่มชื้น	6.6±1.1	73.33
ความเป็นเนื้อเดียวกัน	6.9±1.0	83.33
ความหวาน	6.3±1.4	63.33
ความเข้มของโกโก้	6.3±1.7	73.33
ความชอบรวม	6.8±1.2	

จากตารางที่6 พบว่าปัจจัยคุณภาพส่วนใหญ่ที่ใช้ในการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสนี้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค มีเพียงสองปัจจัยคุณภาพเท่านั้นที่ยังไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคคือ ปัจจัยคุณภาพของกลิ่นโกโก้และกลิ่นกล้วย ซึ่งในการปรับปรุงสูตรอาจมีการใช้สารเติมแต่งกลิ่นในการปรับปรุงปัจจัยคุณภาพนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.4.3 ผลิตภัณฑ์Silverskin coffee Tea

ตารางที่7 ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสHedonic scale และ JARต่อผลิตภัณฑ์Silverskin coffee Tea

ปัจจัยคุณภาพ	คะแนนความชอบ	%พอดี
สี	7.7±0.9	96.67
กลิ่น Silverskincoffee	6.9±1.4	63.33
กลิ่นรส	5.9±1.6	53.33
ความเป็นเนื้อเดียวกัน	7.0±1.1	90
รสขม	5.5±1.8	56.67
ความชอบรวม	6.7±0.8	

จากตารางที่7 พบว่าปัจจัยคุณภาพทุกปัจจัยที่ใช้ในการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสนี้โดยส่วนใหญ่แล้วเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค มีเพียงแค่ปัจจัยคุณภาพในด้านกลิ่นรสและรสขมเท่านั้นที่ยังมีคะแนนความชอบเฉลี่ยต่ำที่สุดอยู่ที่ 5.9 และ 5.5 ตามลำดับ ซึ่งอาจใช้สารสกัดธรรมชาติ เช่น หญ้าหวาน ในการปรับปรุงกลิ่นรสและรสชาติเพื่อให้ผลิตภัณฑ์ชนิดนี้เป็นที่ยอมรับมากยิ่งขึ้น

จากการคำนวณหาความแตกต่างด้านความชอบโดยรวมของผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด โดยใช้วิธีการคำนวณแบบ RCBD พบว่าผลิตภัณฑ์ทั้งสามชนิดมีความชอบโดยรวมจากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยใช้ผู้บริโภคจำนวน 30 คน นั้นไม่มีความแตกต่างกันของความชอบในเชิงสถิติ

6.5 วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองการนำSilverskin coffee ซึ่งเป็นby-product ภายในโรงงานคั่วกาแฟ พบว่าSilverskin coffee มีสมบัติในการอุ้มน้ำ ทำให้เมื่อนำSilverskin coffee มาเป็นส่วนประกอบในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ในส่วนที่เป็นขนมนั้นจะทำให้เนื้อสัมผัสของขนมแห้ง จึงมีข้อจำกัดในการใส่และต้องมีการปรับปริมาณSilverskin coffee ที่ใช้ให้เหมาะสมรวมถึงอาจนำวัตถุดิบอื่นมาช่วยในการเพิ่มความชุ่มชื่นแก่ขนมเช่น การใช้สารไฮโดรคอลลอยด์หรือปรับปริมาณน้ำให้เพิ่มมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 7 สรุปผลการศึกษา

7.1 สรุปผลที่ได้จากการศึกษาทดลอง

จากผลการทดลองและการศึกษางานวิจัยเกี่ยวกับSilverskin coffee พบว่าSilverskin coffee มีองค์ประกอบทางเคมีที่สามารถนำมาประยุกต์และดัดแปลงเป็นอาหารและเครื่องดื่ม เพื่อเพิ่มมูลค่าให้แก่by-product นี้ได้ ซึ่งจากการสร้างแนวความคิดผลิตภัณฑ์โดยใช้วิธี Focus group discussion พบว่า ผู้บริโภคส่วนใหญ่ในปัจจุบันมีความสนใจที่จะดูแลสุขภาพ ทำให้ผู้บริโภคในปัจจุบันมีความใส่ใน ในการเลือกทานอาหาร ขนม และเครื่องดื่มเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้องค์ประกอบทางเคมีของSilverskin coffee มีลักษณะเด่นคือ ใยอาหาร และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ total phenolics จึงนำองค์ประกอบเด่นเหล่านี้มาเป็นส่วนประกอบในการสร้างผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ซึ่งเป็นขนม 2 ชนิดได้แก่ Raisin banana pound cake, Chocolate banana castella cake และเครื่องดื่ม 1 ชนิด ได้แก่ Silverskin coffee Tea

7.2 สรุปผลที่ได้จากการปฏิบัติงานสหกิจศึกษา

7.2.1 ปัญหาและอุปสรรค

อุปสรรคในการปฏิบัติงานสหกิจศึกษาในครั้งนี้คือการแบ่งเวลาในการทำงานที่สถานประกอบการและการทำงานวิจัย ซึ่งต้องขอขอบพระคุณผู้นิเทศงานและคุณวฐา จิตนราพงศ์ ผู้จัดการโรงงานที่อนุญาตการกลับมาทำการวิจัยนี้ที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร อีกทั้งยังให้คำชี้แนะเกี่ยวกับการทำงานวิจัยในครั้งนี้อีกด้วย

7.2.2 ประโยชน์ที่ได้รับ

ประโยชน์ที่ได้รับจากการปฏิบัติงานสหกิจศึกษาในครั้งนี้ทำให้ได้พบกับประสบการณ์ในการทำงานร่วมกับพนักงานอย่างใกล้ชิด ได้เรียนรู้การวางตัวในโรงงานขนาดเล็ก ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในการนำประสบการณ์ที่ได้จากการปฏิบัติงานในครั้งนี้ไปใช้กับการทำงานจริงในภายภาคหน้า อีกทั้งยังได้เรียนรู้วิธีแก้ปัญหาและได้พัฒนาความคิดในส่วนของการทำงานวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.2.3 ข้อเสนอแนะ

จากการปฏิบัติงานสหกิจศึกษาในครั้งนี้พบว่าการประสานงานของทางสถานประกอบการยังไม่ดีนัก ไม่มีการชี้แจ้งหน้าที่ให้กับนักศึกษาได้อย่างชัดเจน อีกทั้งความล่าช้าในการประสานงานกับทางสถาบันการศึกษา จึงทำให้นักศึกษาเกิดความรู้สึกที่ไม่มั่นใจในสถานประกอบการ และทางสถาบันควรที่จะมีการคัดเลือกสถานประกอบการให้มีความหลากหลายและดูความพร้อมของสถานประกอบการในด้านของตำแหน่งที่เปิดให้นักศึกษาสมัคร ว่าทางสถานประกอบการมีความพร้อมมากเพียงใด ก่อนที่จะส่งนักศึกษาไปปฏิบัติงานจริง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ยุพร พืชกมุทร. (2558). เอกสารประกอบการสอนวิชาเคมีอาหาร (โปรตีนและไขมันในอาหาร). คณะอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ยุพร พืชกมุทร. (2558). คู่มือปฏิบัติการวิชาเคมีอาหาร. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อิบาราก คุมิโกะ. (2557). เบเกอรี่กินไม่อ้วน. แปลโดย สุพรรณี เตชรุ่งถวิล. หน้า39-59.

Anabela S.G., Rita C., Ana F., Sérgio V.P., Maria A., Luís M. et al. (2014). Optimization of antioxidants extraction from coffee Silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. Portugal: Universidade Fernando Pessoa and Universidade do Porto.

Letizia B., Luca C., Renato B., Furio B. &Daniele D. (2014). Phenolic composition, caffeine content and antioxidant capacity of coffee Silverskin. Italy: University of Parma.

Nuria M., Mónica U., María A., Patricia M., Salvador G. &Daniel R. (2014). A novel antioxidant beverage for body weight control based on coffee Silverskin. Spain: Institute of Food Science Research and Biopolis S.L.

Yusaku N.&Kuniyo I. (2012). High antioxidant activity of coffee Silverskin extracts obtained by the treatment of coffee Silverskin with subcritical water. Japan: Kyoto University.

Yusaku N.&Kuniyo I. (2014). Review on utilization and composition of coffee Silverskin. Japan: Kyoto University.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ทางเคมี

- Proximate Analysis

- ความชื้น (Moisture)

1. นำ aluminium can อบที่ 120 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมงแล้วนำออกจากตู้อบใส่โถดูดความชื้น (desiccator) ทิ้งไว้ให้เย็นและนำมาชั่งจนได้น้ำหนักแน่นอน 4 ตำแหน่ง
2. ชั่งนำหนักตัวอย่างอาหารที่บดแล้ว0.5กรัม
3. นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมงโดยเปิดฝา aluminium can
4. เมื่อครบเวลาปิดฝานำมาทำให้เย็นใน desicator ก่อนนำมาชั่งน้ำหนัก

คำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้น $= \frac{\text{น้ำหนักอาหารเริ่มต้น}(w-w_1)-\text{น้ำหนักอาหารแห้ง}(w-w_2)}{\text{น้ำหนักอาหารเริ่มต้น}(w-w_1)} \times 100$

- เถ้า (Ash)

1. เผาถ้วยกระเบื้องที่แห้งและสะอาดในเตาเผาที่ 600 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมงแล้วทำให้เย็นในโถดูดความชื้นชั่งน้ำหนักละเอียด4 ตำแหน่ง) บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 0.15 กรัมใส่ในถ้วยกระเบื้อง
3. เผาตัวอย่างบน Hot plate (ทำในตู้ดูดควัน) จนหมดควัน
4. นำไปเผาที่ 600 องศาเซลเซียส 3 – 4 ชั่วโมงจนกระทั่งตัวอย่างกลายเป็นเถ้าสีขาวหรือสีเทา
5. คีบถ้วยกระเบื้องจากเตาเผาทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนักของถ้วยกระเบื้องหลังเผา

คำนวณเปอร์เซ็นเถ้าของอาหาร จากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นเถ้า} = \frac{\text{น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องกับน้ำหนักเถ้าหลังเผา} - \text{น้ำหนักของถ้วยกระเบื้อง}}{\text{น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องกับน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์} - \text{น้ำหนักของถ้วยกระเบื้อง}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- **ไขมัน (Crude Fat)**

1. อบบีกเกอร์ไขมันพร้อมกับ Boiling chip ที่อุณหภูมิ 130องศาเซลเซียส 1ชั่วโมงบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (4 ตำแหน่ง)
2. ชั่งตัวอย่างที่อบไล่ความชื้นแล้ว 0.4 กรัม บันทึกน้ำหนักที่แน่นอนห่อด้วยกระดาษกรองใส่ในทิมเบิล (extraction thimble)
3. ตวงตัวทำละลายปิโตเลียมอีเทอร์จำนวน 140-180 มิลลิลิตรใส่ในบีกเกอร์ไขมันต่อทิมเบิลที่ใส่ตัวอย่างและบีกเกอร์ไขมันเข้ากับเครื่องสกัดไขมันทำการสกัดไขมันตามโปรแกรมของเครื่อง
4. เมื่อครบเวลานำบีกเกอร์ไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเพื่อระเหยปิโตเลียมอีเทอร์ออกไป
5. ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นชั่งน้ำหนักบีกเกอร์คำนวณหาเปอร์เซ็นไขมันในตัวอย่าง

คำนวณเปอร์เซ็นไขมันในตัวอย่าง จากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นไขมัน} = \frac{\text{น้ำหนักของบีกเกอร์ไขมันหลังสกัด} - \text{น้ำหนักตัวอย่าง}}{\text{น้ำหนักของบีกเกอร์ไขมันก่อนสกัด} - \text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

- **โปรตีน (Crude Protein)**

- การย่อย
  1. ชั่งตัวอย่าง 1 กรัมเติมตัวเร่ง 7-10 กรัมเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15-25 มิลลิลิตรใส่ boiling chip 2-3 ลูกใส่ในหลอดย่อยโปรตีน
  2. นำหลอดย่อยโปรตีนวางลงในแลค ก่อนนำไปประกอบเข้ากับเครื่องย่อยโปรตีน ปิดที่บังความร้อนและสวมที่ดูดควันต่อเข้ากับชุดกำจัดไอกรดก่อนจะเปิดสวิทซ์
  3. ตั้งอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยที่ 380 องศาเซลเซียส(หากตัวอย่างเกิดฟองมากในระหว่างการย่อย ให้ลดอุณหภูมิในการย่อยลงมาที่250 นาน15 นาที ก่อนจะปรับไปที่อุณหภูมิที่ใช้ย่อย)
  4. ทำการย่อย จนได้สารละลายสีฟ้าหรือสีเขียวใส
  5. ปิดสวิทซ์ พร้อมยกแลคที่หลอดย่อยตัวอย่างขึ้นพัก รอให้สารละลายที่ได้เย็นตัวลงก่อนนำไปต่อเข้ากับชุดกลั่น
- การกลั่น
  1. นำหลอดย่อยตัวอย่างต่อเข้ากับชุดกลั่นโปรตีน
  2. เติมกรดบอริกเข้มข้น 2% ปริมาณ 60 ใส่ในขวดรูปชมพู่หยดอินดิเคเตอร์ทั้งสอง อย่างละ 1 หยด จะได้สารละลายสีชมพูม่วง วางขวดชมพูลงในชุดกลั่นเสียบท่อพลาสติกที่ต่อจากคอนเด็นเซอร์ลงในกรดบอริก เพื่อดักจับแก๊สแอมโมเนียที่กลั่นออกมาได้
  3. เปิดเครื่องเพื่อเติมน้ำกลั่นและโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในหลอดย่อย สารละลายในหลอดย่อยจะเปลี่ยนเป็นสีดำ

เอกสารนี้เป็น ... รค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ... แปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เปิดไอน้ำและตั้งเวลาในการกลั่น เวลาที่ใช้ในการกลั่นขึ้นอยู่กับปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่าง

- **การไตเตรท**

1. นำขวดรูปชมพูที่บรรจุสารละลายที่กลั่นเสร็จแล้วซึ่งมีสีเขียว มาทำการไตเตรทกับกรดไฮโดคลอริกเข้มข้น1หรือ0.1 N จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูม่วง บันทึกปริมาณกรดไฮโดคลอริกที่ใช้

คำนวณเปอร์เซ็นไนโตรเจนในตัวอย่าง จากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน} = \frac{(A - B) \times N\,HCl \times 14}{Wt.\ sample \times 1000} \times 100$$

A =ปริมาณของสารละลายไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเตรทกับตัวอย่าง

B = ปริมาณของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทกับ blank

เปอร์เซ็นต์โปรตีน = เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน × 6.25

- ใยอาหาร (Crude fiber)

1. เผาถ้วยแก้วชนิดทนไฟที่แห้งและสะอาดในเตาเผาที่ 600 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมงแล้วทำให้เย็นในโถดูดความชื้นชั่งน้ำหนักละเอียด(4 ตำแหน่ง) บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่แห้งและสกัดไขมันออกแล้ว 0.5 กรัม ใส่ในถ้วยชนิดทนไฟที่มีสารช่วยกรอง ซีไรท์(celite)
3. นำถ้วยแก้วชนิดทนไฟ ต่อเข้ากับเครื่องวิเคราะห์ใยอาหาร ในส่วนของ hot extraction unit ปิดล็อคให้แน่น
4. เปิดฝาด้านบนของเครื่อง เติมกรดซัลฟูริก 0.255 N อุ่นๆ ปริมาณ 150 มิลลิลิตร ลงในขวดย่อยของแต่ละตัวอย่าง
5. เติม n-Octanal (Anti foam) ประมาณ 2-3 หยด เพื่อป้องกันการเกิดฟองล้น จากนั้นให้ความร้อนจนเดือด
6. ลดความร้อนลง ต้มต่อเป็นเวลา 30 นาที
7. กรองเอากรดออก โดยเลื่อนคันโยกไปที่ตำแหน่ง vacuum
8. ล้างกากด้วยน้ำกลั่นร้อน 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 30 มิลลิลิตร กรองจนแห้ง
9. เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.313 N อุ่นๆ ปริมาณ 150 มิลลิลิตร เติม n-Octanal (Anti foam) ประมาณ 2-3 หยดล้น จากนั้นให้ความร้อนจนเดือด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนเวลาหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงแหล่งที่มาของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. ทำซ้ำในข้อ 6 ถึงข้อ 8
11. ล้างกากที่อยู่ในถ้วยแก้วทนไฟด้วยอะซิโตน 25 มิลลิลิตร กรองให้แห้ง
12. นำถ้วยแก้วทนไฟไปอบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในใน โถดูดความชื้นชั่งน้ำหนัก(4 ตำแหน่ง) บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน
13. นำเผาถ้วยแก้วชนิดทนไฟเผาในเตาเผาที่ 600 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมงแล้วทำให้เย็น ในโถดูดความชื้นชั่งน้ำหนัก(4 ตำแหน่ง) บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน

คำนวณเปอร์เซ็นใยอาหารของอาหาร จากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นใยอาหาร} = \frac{\text{น้ำหนักของถ้วยแก้วทนไฟกับน้ำหนักเถ้าหลังเผา} - \text{น้ำหนักของถ้วยแก้วทนไฟ}}{\text{น้ำหนักของถ้วยแก้วทนไฟกับน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์} - \text{น้ำหนักของถ้วยแก้วทนไฟ}} \times 100$$

- Antioxidants (total phenolics) โดยวิธี Folin-Ciocalteu reagent

  (Determination of total phenolic contents.Yusaku Narita& Kuniyo Inouye,2012)

  - ขั้นตอนที่ 1 เตรียมสารละลายมาตรฐานของ Gallic acid

1. ละลายกรด gallic acid 0.0200 กรัมด้วยแอลกอฮอล์(95%) ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตรความเข้มข้นที่ได้เท่ากับ 0.4 ไมโครกรัม/ไมโครลิตรซึ่งจะใช้เป็น working standard

หลอดที่	ไมโครลิตรของ Working solution	ไมโครกรัมของ Gallic acid	มิลลิลิตรน้ำกลั่น
1	0	0	10.00
2	50	20	9.95
3	150	60	9.85
4	200	80	9.80
5	250	100	9.75
6	300	120	9.70
7	350	140	9.65

2. ปิเปต working standard ลงในหลอดทดลองสะอาดขนาด 50 มิลลิลิตรโดยให้มีปริมาตรกรด gallic ตั้งแต่ 0 ถึง 140 ไมโครกรัมเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเป็น 10 มิลลิลิตรดังแสดงในตาราง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เติมสารละลาย Folin – Ciocalteau หลอดละ 0.5 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที
4. เติมสาละลาย Na2CO3 (10%) หลอดละ 2 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้อีก 10 นาที
5. วัดค่า Absorbance ของสารละลายที่ λ 730 nm โดยใช้สารละลายหลอดที่ 1 เป็น blank
6. นาผลที่ได้ไปพลอตกราฟเพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน (Standard curve)

- **ขั้นตอนที่ 2 หาปริมาณโพลีฟีนอลในสารตัวอย่าง**

1. เตรียมตัวอย่างโดยนำ silverskin coffee บดละเอียด1 กรัม เติมน้ำกลั่นที่อุณหภูมิต่างๆปริมาณ 50 มิลลิลิตร คนให้ประมาณ 3 นาที
2. กรองแยกส่วนที่เป็นน้ำและกากออกจากกันด้วยกระดาษกรอง
3. ปิเปตตัวอย่างสกัด 0.5 มิลลิลิตรลงในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตรแล้วเติมน้ากลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น 10 มิลลิลิตร
4. ทาการทดลองกับตัวอย่างคล้ายกับวิธีที่อธิบายสาหรับสารละลายมตราฐานข้างต้น
5. นาค่า Absorbance ของสารละลายตัวอย่างไปคานวณปริมาณโพลีฟีนอลโดยใช้ Standard curve

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

แบบสอบถามเพื่อใช้สร้างแนวความคิดผลิตภัณฑ์

- Introduction

สวัสดีค่ะ ข้าพเจ้านางสาวจิดาภา จันทริมา นักศึกษาสหกิจ จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เป็นผู้นำการอภิปายกลุ่ม โดยขั้นแรกขออธิบายเกี่ยวกับรายละเอียดการอภิปรายกลุ่มแบบ Focus group discussion ในการอภิปรายครั้งนี้ มีจุดมุ่งหมายเพื่อต้องการทราบทัศนคติ ข้อคิดเห็น และข้อเสนอแนะ เกี่ยวกับ ผลิตภัณฑ์... โดยดิฉันจะเป็นผู้ถามคำถามให้ทุกท่านตอบ ซึ่งแต่ละคนสามารถตอบได้ตามความคิดของคุณ โดยคำตอบจะไม่มีการตัดสินว่าถูกหรือผิดใดๆทั้งสิน สามารถพูดอะไรก็ได้ ที่เป็นความคิดเห็นทั้งเห็นด้วยหรือไม่เห็นด้วยซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นในการอภิปรายครั้งนี้

- ชี้แจงเกณฑ์การทำ Focus group discussion

ในการอภิปรายจะมีการบันทึกข้อมูลระหว่างการอภิปราย เพื่อความสะดวกรวดเร็วในการดำเนินงาน ซึ่งการบันทึกเสียงนี้จะใช้ในการเตรียมรายงานและไม่มีการอ้างชื่อของคุณในงาน ขอความกรุณาให้ทุกท่านพูดเสียงดังเพื่อให้เพื่อนที่ร่วมอภิปรายกลุ่มได้ยินเสียงอย่างชัดเจน และเมื่อคุณต้องการพูดหรือแสดงความคิดเห็นกรุณายกมือ

กรุณาบอกชื่อของคุณก่อนทุกครั้งเมื่อต้องการพูดหรือแสดงความคิดเห็นหรือถามคำถามใด

- Discussion

<u>-ช่วงแนะนำตัว</u>

พวกเราจะทำความรู้จักกันโดยการแนะนำตัวเพ่อสร้างความสัมพันธ์และความคุ้ยเคยกัน ช่วยบอกชื่อของแต่ละท่านแก่ผู้ร่วมอภิปราย ได้แก่ ชื่อ นามสกุล ชื่อเล่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-ช่วงการอภิปรายเบื้องต้น

คำถามเกี่ยวกับทัศนคติและความต้องการกับผลิตภัณฑ์

โดยมีขั้นตอนการดำเนินการและคำถาม (เนื่องจากยังมิได้ข้อสรุปของผลิตภัณฑ์ที่แน่ชัด อาจมีคำถามอื่นนอกเหนือจากนี้)เช่น

- เครื่องดื่มหรือขนมที่ท่านชอบทานมีอะไรบ้าง?
- ท่านมักรับประทานเครื่องดื่มหรือขนมในช่วงเวลาใดบ้าง?
- ปริมาณหรือขนาดของเครื่องดื่มหรือขนมที่ท่านต้องการ?
- สถานที่ที่ท่านเลือกซื้อ/รับประทานเครื่องดื่มหรือขนม? และเหตุผล
- การเก็บรักษาเครื่องดื่มหรือขนมท่านต้องการการเก็บรักษาแบบใด? และวิธีการนำมารับประทานใหม่?
- ช่วงอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์?
- ช่วงราคาที่ท่านต้องการ?
- สิ่งที่ท่านต้องการเพิ่มเติมในเครื่องดื่มหรือขนมที่ยังยังไม่มีในท้องตลาด?

- Closure

ก่อนที่จะจบการอภิปรายครั้งนี้ท่านใดมีข้อเสนอแนะหรือข้อสงสัยอื่นใด เพิ่มเติมหรือไม่?

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณทุกท่านที่สละเวลาและให้ความร่วมมือในการอภิปรายครั้งนี้ เป็นอย่างดีขอบคุณค่ะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตัวอย่างแบบสอบถามการทดสอบผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ Raisin Banana Pound Cake

แบบที่ 1

แบบสอบถามการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส Hedonic scale และ JAR

ชื่อผู้ทดสอบ... วันที่...........................

ชื่อผลิตภัณฑ์ Raisin Banana Pound Cake ผสม silverskincoffee

คำชี้แจงกรุณาชิมตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทดลองต่อไปนี้และให้คะแนนความชอบตามที่ท่านรู้สึกต่อผลิตภัณฑ์ในแต่ละปัจจัยคุณภาพจากคะแนนสเกลความชอบที่กำหนดให้

กำหนดให้สเกลความชอบ:

1 = ไม่ชอบมากที่สุด 2 = ไม่ชอบมาก 3 = ไม่ชอบปานกลาง 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย

5 = เฉยๆ 6 = ชอบเล็กน้อย 7 = ชอบปานกลาง 8 = ชอบมาก 9 = ชอบมากที่สุด

และกรุณาใส่เครื่องหมาย / ลงในช่องน้อยไป, พอดี, มากไป ที่ท่านเห็นเหมาะสมที่สุด

ตัวอย่าง...........................

ปัจจัยคุณภาพ	คะแนนความชอบ	น้อยไป	พอดี	มากไป
สี				
กลิ่น silverskincoffee				
กลิ่นกล้วย				
เนื้อสัมผัสความนุ่ม				
ความชุ่มชื้น				
ความเป็นเนื้อเดียวกัน				
ความหวาน				
ความชอบโดยรวม				

คำแนะนำ...

....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างแบบสอบถามการทดสอบผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์Chocolate banana castella cake แบบที่ 2

แบบสอบถามการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส Hedonic scale และ JAR

ชื่อผู้ทดสอบ... วันที่...........................

ชื่อผลิตภัณฑ์ Chocolate banana castella cake ผสม silverskincoffee

คำชี้แจงกรุณาชิมตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทดลองต่อไปนี้และให้คะแนนความชอบตามที่ท่านรู้สึกต่อผลิตภัณฑ์ในแต่ละปัจจัยคุณภาพจากคะแนนสเกลความชอบที่กำหนดให้

กำหนดให้สเกลความชอบ:

1 = ไม่ชอบมากที่สุด 2 = ไม่ชอบมาก 3 = ไม่ชอบปานกลาง 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย

5 = เฉยๆ 6 = ชอบเล็กน้อย 7 = ชอบปานกลาง 8 = ชอบมาก 9 = ชอบมากที่สุด

และกรุณาใส่เครื่องหมาย / ลงในช่องน้อยไป, พอดี, มากไป ที่ท่านเห็นเหมาะสมที่สุด

ตัวอย่าง............................

ปัจจัยคุณภาพ	คะแนนความชอบ	น้อยไป	พอดี	มากไป
สี				
กลิ่น โกโก้				
กลิ่นกล้วย				
เนื้อสัมผัสความนุ่ม				
ความชุ่มชื้น				
ความเป็นเนื้อเดียวกัน				
ความหวาน				
ความเข้มของโกโก้				
ความชอบโดยรวม				

คำแนะนำ...

....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างแบบสอบถามการทดสอบผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ Silverskin coffeeTea

แบบที่ 3

แบบสอบถามการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส Hedonic scale และ JAR

ชื่อผู้ทดสอบ.. วันที่..........................

ชื่อผลิตภัณฑ์ Silverskin coffeeTea

คำชี้แจงกรุณาชิมตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทดลองต่อไปนี้และให้คะแนนความชอบตามที่ท่านรู้สึกต่อผลิตภัณฑ์ในแต่ละปัจจัยคุณภาพจากคะแนนสเกลความชอบที่กำหนดให้

กำหนดให้สเกลความชอบ:

1 = ไม่ชอบมากที่สุด 2 = ไม่ชอบมาก 3 = ไม่ชอบปานกลาง 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย

5 = เฉยๆ 6 = ชอบเล็กน้อย 7 = ชอบปานกลาง 8 = ชอบมาก 9 = ชอบมากที่สุด

และกรุณาใส่เครื่องหมาย / ลงในช่องน้อยไป, พอดี, มากไป ที่ท่านเห็นเหมาะสมที่สุด

ตัวอย่าง.............................

ปัจจัยคุณภาพ	คะแนนความชอบ	น้อยไป	พอดี	มากไป
สี				
กลิ่น silverskincoffee				
กลิ่นรส				
ความเป็นเนื้อเดียวกัน				
ความขม				
ความชอบโดยรวม				

คำแนะนำ...

....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Food Chemistry 150 (2014) 227–234

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Analytical Methods

A novel antioxidant beverage for body weight control based on coffee silverskin

Nuria Martinez-Saez [a], Mónica Ullate [a], María A. Martin-Cabrejas [a], Patricia Martorell [b], Salvador Genovés [b], Daniel Ramon [b], María Dolores del Castillo [a,*]

[a] Institute of Food Science Research (UAM–CSIC), Nicolás Cabrera 9, 28049 Madrid, Spain
[b] Biopolis S.L., Catedrático Agustín Escardino Benlloch 9 Edif 2, 46980 Paterna, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 March 2013
Received in revised form 24 September 2013
Accepted 23 October 2013
Available online 31 October 2013

Keywords:
Antioxidant
Body weight control
Coffee silverskin
Innovative revalorisation of coffee by-products
Novel beverage

ABSTRACT

The present research aimed to add value to coffee silverskin by looking for new innovative applications. Formulation of novel beverages based on coffee silverskin for body fat reduction and body weight control was proposed. Conditions for beverage preparation were optimised. Data on chemical composition and sensorial quality of the new drink were acquired. Health benefits were evaluated *in vitro* and *in vivo* employing as animal model *Caenorhabditis elegans*. An antioxidant beverage containing physiological active concentrations of caffeine and chlorogenic acid for prevention body fat accumulation and possessing acceptable sensorial properties was obtained. Our findings support that the use of coffee silverskin for obtaining bioactive extract is an innovative way for revalorisation of coffee by-product.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

There has been is a rapid and greatly increased demand for the revalorization of coffee by-products such as coffee silverskin (bean testa, epidermis). Because of its chemical composition, it may be an ideal natural source of a range of compounds with putative health benefits (Borrelli, Esposito, Napolitano, Ritieni, & Fogliano, 2004; del Castillo et al., 2013; Murthy & Naidu, 2012; Murthy, Naidu, & Srinivas, 2009; Napolitano, Fogliano, Tafuri, & Ritieni, 2007). It has been proposed as source of prebiotics (Borrelli et al., 2004; Jaquet, Rochat, Moulin, Cavin, & Bibiloni, 2009), dietary fibre and antioxidants (Borrelli et al., 2004; del Castillo et al., 2013; Napolitano et al., 2007; Narita & Inouye, 2012) as well as inhibitor of hyaluronidase enzyme (Furosawa, Narita, Iwai, Fukunaga, & Nakagiri, 2011) and has already been used as ingredient for formulation of low calorie and high dietary fibre bread (Pourfarzad, Mahdavian-Mehr, & Sedaghat, 2013).

Obesity is increasing worldwide, and among the pathologies associated with this 21th century epidemic, cardiovascular diseases, cancers, metabolic syndrome and diabetes stand out. Consequently, a search for novel foods, drugs or supplements to prevent and treat obesity is a priority worldwide. Several epidemiological investigations associate coffee consumption with weight control. The anti-obesity effect of coffee may be attributed to caffeine (Martin, Clark, Laboy & Davidson, 2010) and chlorogenic acids (CGAs) (Cho et al., 2010; Murase et al., 2011) present in coffee silverskin.

The aim of the present study was to add value to coffee silverskin following an innovative strategy. Its potential as an ingredient in a novel drink for reducing body fat accumulation was evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Bradford reagent was provided by Bio-Rad Laboratories S.A; glucose kit was from Spinreact (Gerona, Spain); fibre kit from Megazyme International Ireland Ltd. Sulphuric acid 93–98% and ethanol 96% from Panreac S.A. (Spain). Bovine serum albumin (BSA), glucose, caffeine, CGA (3-CGA Reference C-3878), phenol 5% (p/v), 2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS)), potassium persulphate, Folin–Ciocalteu reagent and Nile Red (9-diethylamino-5H-benzo[α]phenoxazin-5-one) were from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Water was purified using Milli-Q system. All other chemicals and reagents were of analytical grade.

* Corresponding author. Tel.: +34 91 0017900x953; fax: +34 91 0017905.
E-mail addresses: nur.martinez@titulado.uam.es (N.Martinez-Saez), mullateartiz@ifi.csic.es (M. Ullate), maria.martin@uam.es (M.A. Martin-Cabrejas), patricia.martorell@biopolis.es (P. Martorell), salvador.genoves@biopolis.es (S. Genovés), daniel.ramon@biopolis.es (D. Ramon), mdolores.delcastillo@csic.es (M.D. del Castillo).

0308-8146/$ - see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2. Apparatus

A microplate spectrophotometer BioTek powerWaveTM XS (BioTek Instruments, United States), capillary electrophoresis apparatus Agilent G16000A (Agilent, Madrid, Spain) and FP-6200 system (JASCO Analytical Instruments, Easton, MD, USA) were used for analysis.

2.3. Samples

Raw material: Coffee silverskin from Arabic (*Coffea Arabica*) and Robusta (*Coffea canephora*) were provided by Fortaleza S.A. (Spain). Powdered coffee silverskin extracts, Arabic and Robusta, were produced as described in the patent WO 2013/004873. Tablets of a commercial supplement based on decaffeinated green coffee extract and containing CGA (5-caffeoyl quinic acid) as the main bioactive compound were used for comparative analysis.

Beverages: Bags containing samples were prepared using 10–20 μm filter paper and infused in boiling water for different times. Brewing conditions were optimised by studying influence of: (i) raw material (raw coffee silverskin and coffee silverskin extract; (ii) extraction time (5 and 10 min); (iii) concentration of raw material (2.5, 5 y 10 mg/ml) and (iv) coffee variety (Arabic and Robusta). The colour due to melanoidins from the Arabica and Robusta varieties was determined following the procedure described in Section 2.4. Further characterisation of the chemical and nutritional composition of Arabic and Robusta brews was established by employing those methods described in Sections 2.5–2.11. *In vivo* assays and sensory analysis were carried out as described in Sections 2.12 and 2.13 respectively.

2.4. Melanoidins

The content of melanoidins in the brews was estimated by measuring the absorbance at 420 nm. The analysis was performed according to Adams, Borrelli, Fogliano, & De Kimpe, 2005. All measurements were performed in triplicate.

2.5. Caffeine and CGA

The procedure was performed according to del Castillo, Ames, and Gordon (2002). The separation was carried out in a capillary electrophoresis system with an ultraviolet–visible detection. The capillaries used were made with silica and had an internal diameter of 50 μm and a length of 48.5 cm. Separation was performed at 25 °C, a constant voltage of 20 kV, and injection of 50 mbar for 5 s. Detection was performed at wavelengths of 200 nm, 280 nm and 420 nm, and the absorption spectrum recorded in the range 190 and 600 nm. Calibration curves of caffeine (0.25–5.15 mmol/L) and CGA (0.15–2.5 mmol/L) were constructed. The analysis was performed in triplicate. Results were expressed as μg caffeine or CGA/ml.

2.6. Free glucose

Glucose content was determined by using an enzymatic kit as per the manufacturer's instructions (Glucose-TR *in vitro* diagnostic, SPINREACT, S.A.). All measurements were performed in triplicate and the results were expressed as μg glucose/ml.

2.7. Total carbohydrates

Total carbohydrates were determined using the phenol–sulphuric method as described by Masuko et al. (2005). Samples (100 μl) were mixed with 300 μl concentrated sulphuric acid (93–98%) and 90 μl 5% phenol (w/v) in a glass flask. The mixtures were incubated at 90 °C for 5 min. Samples were cooled to room temperature and absorbance was measured at 490 nm. A calibration curve was constructed using glucose (0.1–0.4 mg/ml). Reagent blank and sample blank were also prepared and analysed in each set of samples. All measurements were performed in triplicate and the results were expressed as μg glucose/ml.

2.8. Water soluble proteins

Bio-Rad Protein Assay, catalogue number 500-006, based on the method of Bradford in micro-method format was used to determine protein concentration. Reagents were preparing according to manufacturer's instructions (Bio-Rad Laboratories, SIG 093094). Briefly, a solution of Bradford reagent (1:4 reagent:milli-Q water) was prepared and filtered using Whatman 4 filter papers. 10 μl of the sample and 200 μl of the Bradford solution were placed in a multi-well microplate. The samples were incubated for 5 min at room temperature, and the absorbance was measured at 595 nm. Sample blank and reagent blank were also analysed. A calibration curve was constructed using BSA (0.05–0.5 mg/ml). All measurements were performed in triplicate. Results were expressed as μg BSA/ml.

2.9. Total phenolic compounds

Folin–Ciocalteu adapted to a micromethod format was the test selected for analysis of total phenolic compounds in the samples (Contini, Baccelloni, Massantini, & Anelli, 2008). The reaction was initiated by mixing 10 μl of sample with 150 μl of Folin–Ciocalteu solution. After incubation at room temperature for 3 min, 50 μl of sodium bicarbonate solution were added. The kinetics of the reaction at 37 °C was followed for 120 min by measuring the absorbance at 735 nm once every minute. Sample blank and reagent blank were also analysed in each set of samples. The CGA calibration curve was used for quantification (0.1–0.8 mg/ml). Results were expressed as μmol CGA eq./ml. All measurements were performed in triplicate.

2.10. Total antioxidant capacity

ABTS decolourisation assay was performed according to Oki, Nagai, Yoshinaga, and Nishiba (2006). An $ABTS^{\cdot+}$ stock solution was prepared by adding 140 mmol/L potassium persulfate (44 μl) to a 7 mmol/L $ABTS^{\cdot+}$ aqueous solution (2.5 ml), and the mixture was then allowed to stand for 16 h at room temperature. The working solution of the radical $ABTS^{\cdot+}$ was prepared by diluting the stock solution 1:75 (v/v) in 5 mmol/L sodium phosphate buffer pH 7.4 to obtain an absorbance value of 0.7 ± 0.02 at 734 nm. Samples (30 μl) were added to 270 μl working solution $ABTS^{\cdot+}$ in a microplate. The absorbance was measured at 734 nm for 10 min at 30 °C with measurements every 2 min. After 5 min, the reaction was complete. CGA calibration (0.15–2 mmol/L) was used to calculate overall antioxidant capacity. Results were expressed as μmol CGA eq./ml. All measurements were performed in triplicate.

2.11. Dietary fibre

Insoluble (IDF), soluble (SDF) and total (TDF) dietary fibre content was determined using the Total Dietary Fibre Assay Kit (Megazyme International Ireland, Ireland) as per the manufacturer's instructions, and based on the enzymatic-gravimetric method. Results are expressed as percent (%).

2.12. Body fat reduction in *Caenorhabditis elegans*: In vivo assays

C. elegans wild type strain N_2 (Bristol), was obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Centre (CGC) at the University of Minnesota (USA) and maintained at 20 °C on nematode growth medium. *Escherichia coli* OP50 strain was used as the standard nematode diet and was also provided by the CGC. Compounds were added on the agar surface: CGA (0.01, 0.1, 1 and 10 μmol/L); caffeine (0.025, 0.25, 2.5 and 25 μmol/L). Arabic and Robusta coffee silverskin extracts (25, 50 and 100 μg/ml) were used for a comparative analysis and, in parallel, another comparative study was performed with a commercial supplement and Robusta coffee silverskin extract (65, 130 and 260 μg/ml). Coffee silverskin extract from Robusta variety was selected for comparison with the commercial supplement because of the levels of chlorogenic acids in the samples. Nematodes were fed under different conditions relatives to type and concentration of the samples until the young adult stage. Total lipid content was determined following Martorell et al. (2012) by measuring the fluorescence at 480 nm λ excitation and 571 nm λ emission. Red Nile was used as a dye to monitor lipid storage in live worms. A total of 120 worms for each test were analysed. Experiments were carried out in duplicate.

2.13. Sensory analysis

Sensory analysis was performed using two different tests; a 9-verbal scale test where hedonic attributes were evaluated and an Acceptance Level Test. Sensory evaluation was carried out in one session involving in total 20 untrained panellists allocated to one of two groups. Colour, odour, taste and general acceptance of the selected beverage, A (Arabic coffee silverskin extract 10 mg/ml), B (Robusta coffee silverskin extract 10 mg/ml), C (Arabic coffee silverskin extract 2.5 mg/ml) and D (Robusta coffee silverskin extract 2.5 mg/ml) were tested. Results of the verbal scale test were converted into a 9-point scale scoring 1 (lowest)-9 (highest). For each attribute, the average of the panellists' scores was calculated. Beverages were considered acceptable if their mean value for overall quality scores was equal or above 5 (neither like nor dislike).

2.14. Statistical analysis

Data were expressed as mean ± standard deviation (SD). *T*-test (independent samples, 2 groups) and Analysis of Variance (more than 2 groups), one-way and two-way ANOVA, were applied to determine differences between means. Differences were considered to be significant at $p < 0.05$, highly significant $p < 0.01$ and very highly significant $p < 0.001$. Relationships between the different parameters analysed were evaluated by computing Pearson linear correlation coefficients at the $p < 0.05$ confidence level.

3. Results and discussion

3.1. Selection of raw material for brewing

3.1.1. Melanoidins

Colour due to coffee melanoidins was estimated by measuring the absorbance values at 420 nm. Values corresponding to silverskin extracts (Fig. 1) were significantly higher ($p < 0.05$) than those corresponding to raw silverskin. Melanoidins are the final product of the Maillard reaction formed during the coffee bean roasting process. The complex and variable structure of coffee melanoidins is basically formed by polysaccharides, proteins and chlorogenic acids. Coffee melanoidin fractions are diverse and they possess different physicochemical properties. It is known that a fraction of coffee melanoidins present anionic character whereas other fractions do not present it or present it to a very small extent. In addition, there are coffee melanoidin fractions presenting hydrophobic character (Moreira, Nunes, Domingues, & Coimbra, 2012). Results shown in Fig. 1 were as expected. Silverskin extract is enriched in coffee melanoidins soluble in hot water. In agreement, higher concentrations of melanoidins should be present in samples prepared with extracts compared to those based on raw silverskin. A significant association was observed between the concentration of melanoidins and extraction time ($p < 0.05$). Results indicate that treatment in boiling water for 10 min was adequate to achieve high solubility of most of coffee melanoidins present either in extracts and raw silverskin.

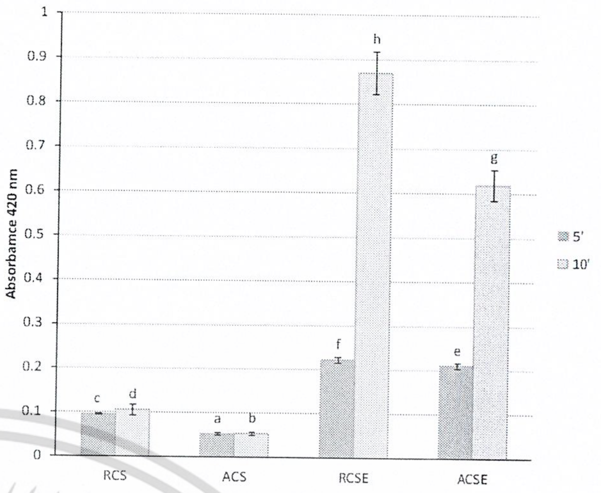


Fig. 1. Release of melanoidins in beverages elaborated with Robusta coffee silverskin (RCS), Arabic coffee silverskin (ACS), Robusta coffee silverskin extract (RCSE) and Arabic coffee silverskin extract (ACSE) (2.5 mg/ml) using 5 and 10 min of extraction. Bars represent the mean values ($n = 3$), and the error bars the standard deviation. Different letters indicate significant differences between the means of the samples ($p < 0.05$).

Silverskin melanoidins may provide taste, aroma and colour to the beverage. From the bioactivity point of view, melanoidins in coffee have many beneficial properties to offer such as antioxidant, antimicrobial, anticariogenic, anti-inflammatory, antihypertensive and antiglycative (Moreira et al., 2012). Other studies have shown that weight gain in rats fed on a diet rich in Maillard reaction products is lower than a matched control group (Šebeková et al., 2012). Therefore, the presence of these compounds in the new beverage may be assessed positively, as they can contribute to the product's sensorial acceptability and its biofunctional properties. Silverskin extracts may give rise to a product with more intense sensorial effects and greater biological activity than those made from silverskin because they contain higher melanoidins concentrations than those with only raw silverskin.

3.1.2. CGA and caffeine content

As expected, the amount of silverskin extract had a significant effect ($p < 0.05$) on caffeine and CGA content of brews (Fig. 2A and B). The lowest concentrations of bioactive compounds were detected in the Arabic coffee silverskin extract samples, with a concentration of 2.5 mg/ml. In comparison, the highest values were found in brews prepared with Robusta coffee silverskin extract, with 10 mg/ml. These results suggest that Robusta coffee silverskin extract is a better source of CGA and caffeine than Arabic coffee silverskin extract.

Currently available data on the chemical composition of coffee silverskin is scarce. Caffeine values between 0.83 and 1.37 g/100 g of silverskin (Napolitano et al., 2007) and CGA in the

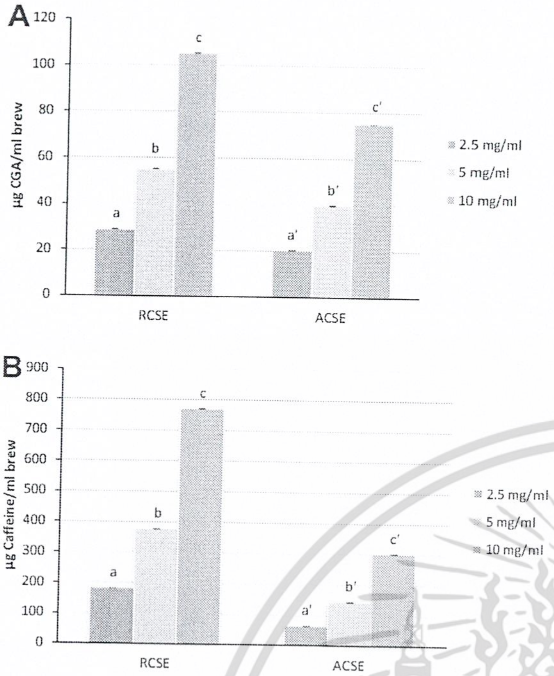


Fig. 2. CGA (A) and caffeine (B) concentrations, expressed as mg CGA/ml brew and µg caffeine/ml brew, in beverages prepared with Robusta coffee silverskin extract (RCSE) and Arabic coffee silverskin extract (ACSE) at three different concentrations, 2.5, 5 and 10 mg/ml, using 10 min of extraction. Bars represent the mean values ($n = 3$), and the error bars the standard deviation. Different letters denote significant differences between the means ($p < 0.05$) within a set of samples.

region of 1.10 mg/100 g (Borrelli et al., 2004) to 3 g/100 g (Murthy & Naidu, 2012) have been reported. The values found in the samples analysed in this study show that the extraction protocol patented by our research group has allowed us to obtain extracts enriched in bioactive compounds, which may allow us to obtain beverages with physiologically active concentrations of those compounds (WO 2013/004873). Extracts were obtained containing 751.20 mg/100 g and 3.02 g/100 g of CGA and caffeine respectively in Arabic coffee silverskin extract and 1053.80 mg CGA/100 g and 7.70 g caffeine/100 g in Robusta coffee silverskin extract. The effect of caffeine and CGA on the metabolism have previously been described for both compounds independently and in combination with other compounds as well as for coffee alone (Glade, 2010; López-García et al., 2006; Murase et al., 2011; Mure et al., 2013).

3.2. Nutritional characterisation of the new beverage

3.2.1. Nutrients

Table 1 shows data on nutrients for brews prepared from Robusta and Arabic coffee silverskin extracts at 2.5 mg/ml and 10 min extraction. No glucose was detected in these beverages. Conversely, in beverages made from Arabic coffee silverskin extract 10 mg/ml, free glucose values were 12.83 ± 6.01 mg/ml and this compound was not detected in the beverage made with Robusta coffee silverskin extract (data not shown). Total carbohydrate levels in the samples differed significantly ($p < 0.05$) with the highest levels of these compounds found in the beverages made from Arabic coffee silverskin extract. Additionally, statistically different results were collected ($p < 0.05$) for extractable protein content, with the highest concentration of this nutrient found in the Robusta sample.

The results for reducing sugars, which are shown in Table 1, correspond to those described by Borrelli et al. (2004) and Napolitano et al. (2007). These authors described null or low concentrations of reducing sugars in coffee silverskin. However, the total carbohydrate and protein levels found in their research were higher than those we detected. Earlier studies suggest that coffee silverskin is a product rich in polysaccharides, mainly arabinogalactans and galactomannans (Borrelli et al., 2004; Napolitano et al., 2007). The highest values encountered for total carbohydrates and proteins in our brews were 13.42 and 5.37 g/100 g, respectively. The differences may be due to the extraction process used. Complex water-insoluble proteins and carbohydrates may have remained integrated in the vegetable matrix that is insoluble in the extraction treatment considered and, thus, disposed of as part of the solid waste resulting from the extraction process.

Table 1
Values of total carbohydrates, glucose and proteins, in Robusta coffee silverskin extract (RCSE) and Arabic coffee silverskin extract (ACSE) brews, 2.5 mg/ml and 10 min of extraction.

Measurement	Variety	
	RCSE	ACSE
Glucose (µg glucose/ml)	n.d.[A]	n.d.[A]
Total carbohydrates (µg glucose/ml)	136.88 ± 6.28^{a}	335.73 ± 33.37^{b}
Water soluble protein (µg BSA/ml)	134.29 ± 3.95^{b}	24.87 ± 1.22^{a}

Each value represents the mean ($n = 3$) ± standard deviation. Different letters denote significant differences ($p < 0.05$) between samples of the same row.
[A] Non-detected.

According to the results shown in Table 1, the beverages obtained may be included in the diet of patients with carbohydrate and energy metabolism problems, as in the case of patients with obesity and diabetes because its free glucose content. The new beverage may be expected to present low glycaemic levels as in the case of the beverage coffee, which is considered to have a low or null glycaemic index (http://www.montignac.com).

3.2.2. Dietary fibre

Coffee silverskin extract as raw material for preparation of the new beverage showed quantities of TDF ranging from 23% to 19% (w/w) for Arabic and Robusta coffee silverskin extract, respectively (data not shown). In both cases, soluble fibre content was greater than insoluble fibre content, with a SDF/IDF ratio of 2.3 for Arabic coffee silverskin extract and 1.8 for Robusta coffee silverskin extract, respectively.

According to the literature, SDF content (~9%) is comparable to that of oat bran, which is considered as a rich source of this dietary compound (Borrelli et al., 2004). Studies on dietary fibre composition of coffee by-products by Murthy and Naidu (2012) suggest that coffee silverskin is the coffee by-product containing the highest quantities of TDF (80%).

Data on TDF in coffee by-products are similar to those described for cereals and vegetables (Figuerola, Hurtado, Estévez, Chiffelle, & Asenjo, 2005). The values found by our research group are lower than those found by other authors employing direct analysis of coffee silverskin. The results indicate that despite such differences, which may be accountable to the extraction process, among other factors, the extract obtained and employed as a raw material for manufacturing the new beverage is a source rich in dietary fibre and especially SDF. These results strengthen the hypotheses that the new beverage could feature a low glycaemic index and be appropriate for the prevention and/or treatment of conditions related to energy and/or carbohydrates metabolism and effective body weight control.

Dietary fibre from coffee is thought to be composed chiefly by cellulose, hemicellulose, pectic substances and lignin (Borrelli et al., 2004), comprising the monosaccharides glucose (cellulose) and xylose, galactose, mannose, arabinose (hemicellulose) (Mussatto,

Machado, Martins, & Teixeira, 2011). Antioxidant properties are associated to coffee silverskin fibre, attributed to the presence of CGA adhering to the dietary fibre matrix formed by a complex carbohydrate structure. Consequently, it has been classified as antioxidant dietary fibre (Murthy & Naidu, 2012; Napolitano et al., 2007).

SDF and IDF present different physiological functions. Studies have shown that SDF is capable of reducing the absorption of macronutrients and slows down gastric emptying, which reduces the postprandial glucose response, total cholesterol levels and low-density lipoproteins (LDL) (King et al., 2007). Moreover, increasing soluble and insoluble fibre intake significantly reduces the risk of gaining weight and fat in women, independent of several potential confounders, including physical activity, dietary fat intake, and others. The influence of fibre seems to occur primarily through reducing energy intake over time (Tucker & Thomas, 2009).

On the basis of the results of our research and those described by other authors it can be considered that the beverages made from Robusta and Arabic coffee silverskin extracts are both potentially of interest in body weight control and prevention of obesity and diabetes. Recommendations with regard to dietary fibre consumption vary depending on the regulatory body issuing them. Thus, for example, the World Health Organization (WHO) recommends a daily intake of 27–40 g of TDF; the U.S. Food and Drug Administration (FDA) proposes 25 g of fibre per day for each 2000 kcal/day in the case of adults, while the American Dietetic Association (ADA) recommends between 20 and 30 g/day of fibre, of which 3–10 g should be SDF (15–30% soluble fibre). The consumption of one cup (200 ml) of coffee silverskin extract beverage with a concentration of 10 mg/ml can provide approximately 0.40 g of TDF and 0.25 g of SDF. Moderate consumption of this beverage, consisting of 3 cups a day, which is comparable to the recommendation for coffee, can provide 10% of the daily average amount of SDF recommended by the ADA. It is important to underscore that not all foods are rich in this type of fibre, which has special physiological properties that may be beneficial in controlling body weight. This rate of consumption would be equivalent to drinking approximately 300 mg of caffeine and 55 mg of CGA a day. The caffeine intake from drinking the beverage prepared as described would be equivalent to the amount present in instant coffee. There are not safety limits established for exposure to caffeine. However, earlier studies suggest that consuming 400 mg/day does not cause adverse effects on adults, and the accepted recommended maximum for caffeine consumption in adults is about 3 mg/kg of body weight (http://www.happily-healthy.com.au/caffeine-knowing-the-facts-2). As a consequence, the beverage prepared as described could have positive physiological effects with potentially no adverse effects on consumers' health. More research is needed to test this hypothesis.

3.3. Biofunctional characterisation of the new beverage

3.3.1. Total antioxidant capacity in vitro

As shown in Fig. 3, while all the beverages had antioxidant capacity, levels were significantly greater ($p < 0.05$) in beverages made with Robusta coffee silverskin extract than Arabic. The same trend was observed applying both of the methods. The correlation test on the data obtained using both methods showed a correlation coefficient close to 1 ($p < 0.05$). The results agree with those described by Napolitano et al. (2007) and del Castillo et al. (2013) who found, in general, a higher proportion of extractable antioxidants in aqueous solution for the samples of Robusta silverskin, in comparison with Arabica samples. Moreover, the beverages made from Robusta and Arabic coffee silverskin extracts, both

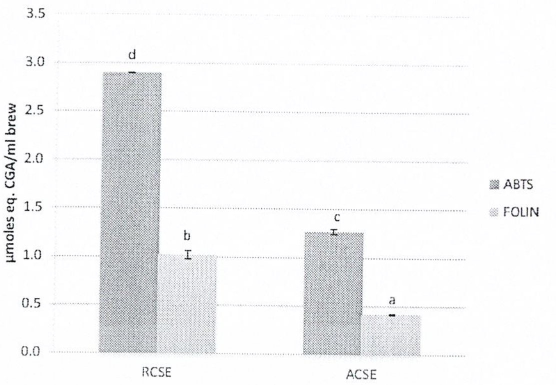


Fig. 3. Data obtained by $ABTS^{\cdot +}$ and Folin–Ciocalteu methods. The beverages made with Robusta coffee silverskin extract (RCSE) and Arabic coffee silverskin extract (ACSE) were prepared at a concentration of 2.5 mg/ml, and 10 min of extraction. Results are expressed as µmoles eq. CGA/ml brew. Bars represent the mean values ($n = 3$) whereas the error bars show the standard deviation of the mean of measurements in triplicate. Different letters denote significant differences between the means ($p < 0.05$).

presented total antioxidant capacities similar to those described for coffee beverage and coffee silverskin (Borrelli et al., 2004).

The differences found in the total antioxidant capacity values in the Arabica and Robusta beverages (Fig. 3) correspond with those detected by analysing their components, melanoidins and CGA (Figs. 1 and 2A). Earlier studies suggest that these compounds contribute to the antioxidant properties of coffee silverskin (del Castillo et al., 2013; Murthy & Naidu, 2012; Napolitano et al., 2007). The beverages made from these extracts contained CGA at 0.09 and 0.06 µmol/ml at a concentration of 2.5 mg/ml Robusta and Arabica, respectively (Fig. 2A). These values are lower than those found by the Folin and ABTS decolourisation methods (Fig. 3). We conclude that although the Folin method was used to determine free phenolic compounds, other components in the beverage may have reacted with the reagent interfering in the final measurement. The preparation of samples for this assay did not involve any prior extraction of phenolic compounds. Moreover, previous studies indicate a lack of selectivity in the method and suggest compounds where CGA may be present, such as melanoidins, may also be determined using this method (del Castillo et al., 2013; Murthy & Naidu, 2012; Napolitano et al., 2007). Therefore, the Folin reaction seems to be providing information on the concentration of CGA, free and linked to complex structures (melanoidins and antioxidant fibre) present in the beverages. These data are supported by those obtained by the ABTS radical cation decolourisation method. In view of the results available, it can be stated that about 3–4% of the total antioxidant capacity of the beverages may be due to free CGA. The low concentrations of free CGA in the sample are due to the fact that the extract is made from a by-product of coffee bean roasting. This procedure has a dramatic effect on the content of those compounds naturally present in the beans, such as CGAs, and gives rise to the formation of neoantioxidants deriving from the Maillard reaction, principally melanoidins (Borrelli, Visconti, Mennella, Anese, & Fogliano, 2002; Vignoli, Bassoli, & Benassi, 2011). There is proof, however, of the incorporation of CGA structures, caffeic and quinic acid in the dietary fibre and melanoidins (Moreira et al., 2012; Silvan, Morales, & Saura-Calixto, 2010).

In summary, the results indicate that total antioxidant capacity of the beverage is an indirect indicator of the concentration of compounds with different bioactivity such as CGA, melanoidins and dietary fibre. A number of studies associate CGA and coffee melanoidins with reduction of body weight, indispensable in the prevention and treatment of obesity (Cho et al., 2010; Murase et al., 2011; Sebekova et al., 2012). Therefore, measuring this property

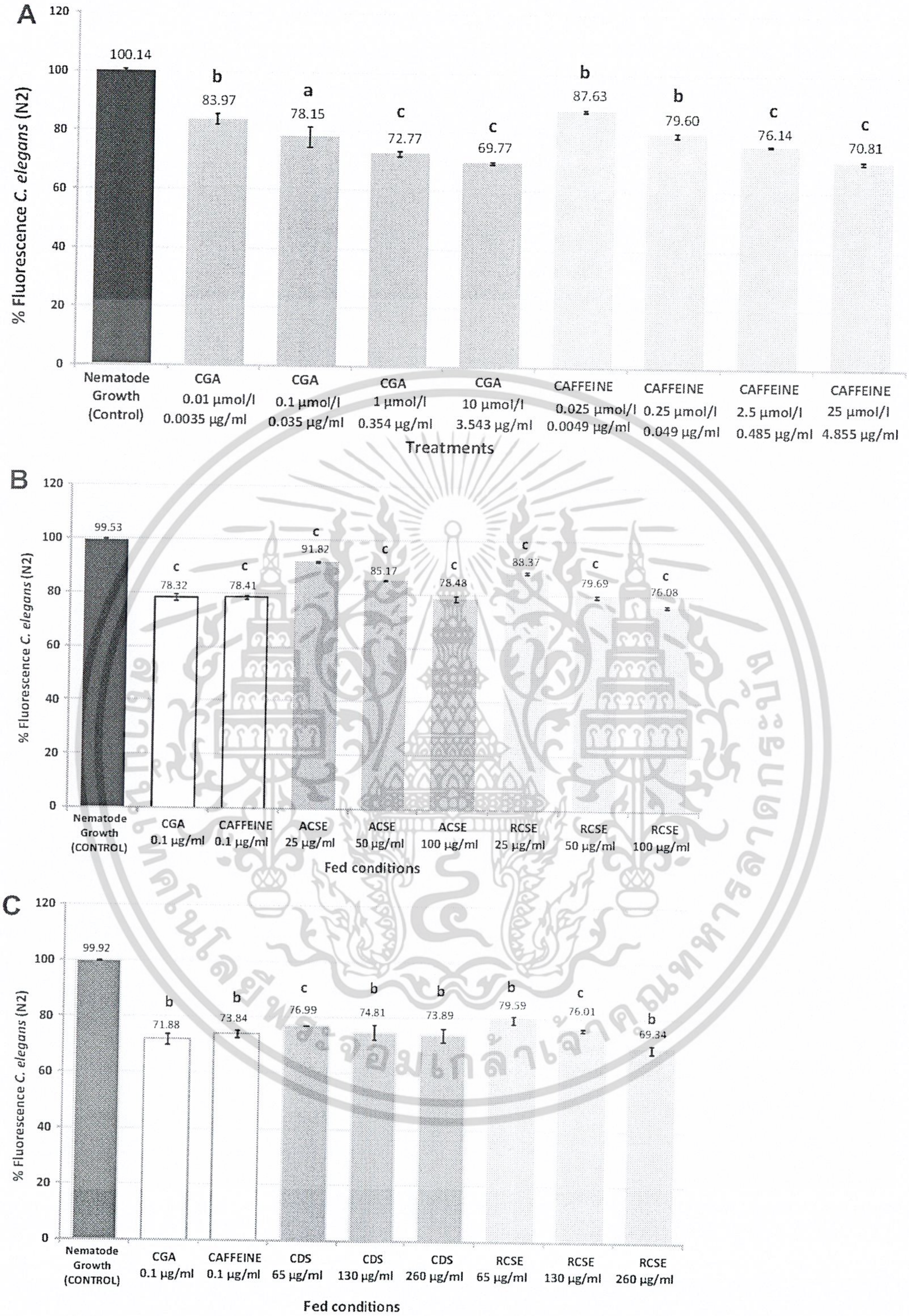


Fig. 4. Percentages of fluorescence obtained in *C. elegans* wild type strain (N2) at young adult stage. (A) Dose–response assay with CGA (0.01–10 µmol/L) and caffeine (0.025–25 µmol/L). (B) Comparison between Arabic (ACSE) and Robusta coffee silverskin extract (RCSE) brews at 25, 50 and 100 µg/ml respectively. (C) Nematodes were fed with a commercial dietetic supplement (CDS) or Robusta coffee silverskin extract (RCSE) brews at three different concentrations (65, 130 and 260 µg/ml). Pure compounds, CGA (0.1 µg/ml) and caffeine (0.1 µg/ml) were also included as positive controls in the experiments. (a) Significant p-value $\leqslant 0.05$; (b) significant p-value $\leqslant 0.01$; (c) significant p-value $\leqslant 0.001$.

may be an appropriate index for tracing the stability of foods, their composition, and forecasting their potential effect on body weight control.

3.3.2. Effect of the new beverage on body fat content in vivo

The results obtained by quantification of fluorescence in each population of nematodes (wild type N2 *C. elegans*) for pure CGA

ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและ

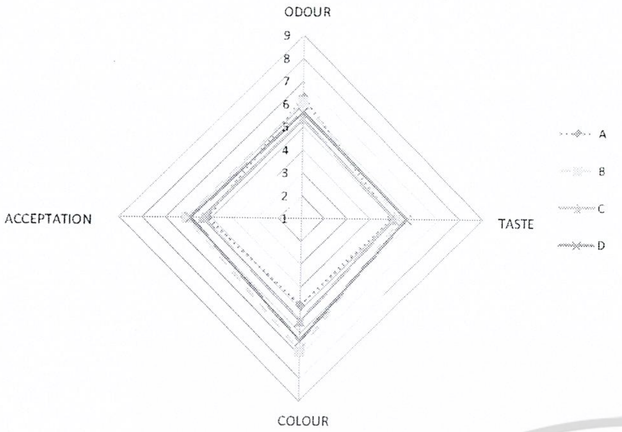


Fig. 5. Spider-web diagram which shows the mean scores ($n = 20$) of 1–9 scale, for each of the attributes and beverages.

compounds (0.01–10 μmol/L) and caffeine (0.025–25 μmol/L) showed a very clear significant dose–response effect on reducing accumulation of body fat, with the reduction increasing as we increased the concentration of the compound (Fig. 4A). The highest values for reducing the percentage of body fat obtained were 30% and 29%, for CGA (10 μmol/L) and caffeine (25 μmol/L) respectively. The results also suggest that CGA has a greater fat reducing effect than caffeine in the animal model studied.

A highly significant decrease in fluorescence was observed with the brews containing Arabica and Robusta silverskin extracts ($p \leqslant 0.001$) (Fig. 4B). All three concentration levels analysed (25, 50 and 100 μg/ml) gave rise to body fat reducing phenotypes. This may highlight the dose–response effect of both extracts, and lower levels of fluorescence, an indicator of fat accumulation, were observed as the extract dose increased in the cultivar medium. The most effective dose was found to be 100 μg/ml, corresponding to the beverage of 10 mg/ml (body fat reduction of 21% and 24% for Arabic and Robusta coffee silverskin extract, respectively). The beverages made from Arabic and Robusta coffee silverskin extracts in this study are equivalent to concentrations in *C. elegans* growth medium of 0.81–3.22 μmol/L and 1.63–6.5 μmol/L of CGA and 3.35–15.6 μmol/L and 9.42–39.7 μmol/L of caffeine, respectively, which are within the range of bioactivity observed for pure compounds (Fig. 4A and B). Therefore, it can be considered that they contain physiologically active doses of these compounds and may have an effect in the prevention of obesity.

The results seem to indicate that the CGA and caffeine compounds simultaneously present in the beverages might exert a synergic and/or additive effect on fat reduction. However, individual pure compounds and those naturally present in the food matrix lead to different fat reduction values. Such differences may be explained by the food matrix effect. Complex molecules such as dietary fibre, proteins and melanoidins in the composition of the beverages could affect the bioavailability of CGA and caffeine, respectively. More research is necessary to confirm this hypothesis. Additionally, a functional effect was observed (Fig. 4B) slightly greater with the beverages made from Robusta coffee silverskin extract than in those made from Arabic. This may be a consequence of the higher concentration levels of CGA and caffeine present in the Robusta coffee silverskin extract (Fig. 2A and B).

The comparison between the commercial supplement made from Robusta decaffeinated green coffee extract and the beverage made from Robusta coffee silverskin extract is shown in Fig. 4C. It was observed that body fat reduction increased as we raised the concentration of the product. Furthermore, similar results were observed for body fat reduction from both Robusta coffee silverskin extract beverages and the commercial dietary supplement.

Concentration levels of 0.28 μmol/L of pure CGA compound (3-CGA), equivalent to 0.1 μg/ml, have similar effects to those registered for concentration assays on the supplement (Fig. 4C). The results suggest that this commercial product is less effective than the pure compound. The minimum CGA concentration, supplemented in the diet with the addition of commercial green coffee extract, was twice as high as the concentration of pure CGA (3-CGA) required for the same effect. As highlighted previously, caffeine is not present in the supplement and, from the results, it was shown that CGA bioavailability can be affected by other compounds in the extract, and CGA, 3-CGA and 5-CGA isomers may have different degrees of bioactivity. The possibility that other compounds in the supplement may also be interfering with the bioactivity can be ruled out.

Therefore, it can be stated that the new beverage made from roasted coffee silverskin extract, under the assay conditions in this study, showed biofunctional qualities comparable to the commercial dietary supplement in terms of body fat reduction. It is a natural alternative to dietary supplements for the prevention of excess weight and obesity.

Several other research studies have been found that illustrate the usefulness of the *C. elegans* model for gathering pre-clinical data on alimentary products similar to the new beverage proposed herein (Dostal, Roberts, & Christopher, 2010; Surco-Laos et al., 2012).

3.4. Sensorial analysis of the new beverage

As shown in Fig. 5, all assayed attributes were given a grade equal to or higher than five. As regards colour, beverage B (Robusta coffee silverskin extract 10 mg/ml) received the highest points, with an average of 7, followed by beverage D (Robusta coffee silverskin extract 2.5 mg/ml). Beverages B and D were the most palatable in terms of taste with the Robusta beverages scoring more higher. Beverages A (Arabic coffee silverskin extract 10 mg/ml) and B were the most attractive in terms of smell, which seems to be related to beverage concentration. Beverages with a concentration of 10 mg/ml scored the highest. These results matched expectations, since the concentration of aromatic compounds determines the beverage's aroma. As expected beverages B and D, made from Robusta coffee silverskin extract, scored the highest points overall amongst the samples tested with a grade. This does not mean, however, that beverages made from Arabic coffee silverskin extract were found distasteful by the panel.

Moreover, regarding the Acceptance Test, it was found that 10% of the testing panel were prepared to consume the beverages as served, 85% would drink them but add another ingredient (sugar, milk, citrus, ice, etc.) and 5% declared they would not drink them. Therefore, we can conclude the acceptance level was satisfactory as 95% of the panel were favourable towards the beverages before being told about the benefits of consumption. Beverage B, made from Robusta coffee silverskin extract 10 mg/ml, which achieved the highest acceptance score in all parameters measured, also showed the highest levels of bioactivity *in vitro* and *in vivo* (Figs. 4 and 5).

The influence of the variables (i) gender, (ii) habitual consumption of caffeinated beverages, and (iii) presence or absence of other added ingredients (sweetener, lemon or milk) on the product's appeal was negligible ($p > 0.05$).

According to the literature on the subject, Arabic coffee is characterised by better quality beans producing fine, aromatic coffee. Robusta coffee, on the other hand, produces a less aromatic coffee, rougher and stronger in flavour (Capel & Pérez, 2010). Albanese, Di Matteo, Poiana, and Spagnamusso (2009), in a study

on the influence of sensorial attributes in *espresso* coffee, observed that samples containing a high percentage of Robusta coffee in the blend were characterised by acid notes, bitter taste and astringent properties. Despite this, the sensorial analysis carried out in this study indicates a higher degree of acceptance for the beverages made from Robusta rather than from Arabica silverskin extract.

4. Conclusion

An antioxidant beverage with right nutritional composition, sensorial quality and potential for preventing fat accumulation and excess weight may be formulated by employing coffee silverskin extract. The characteristically chemical and nutritional composition of the extract supports its potential for other health promoting applications.

Acknowledgements

This work has been funded by Naturage (AGL2010-17779) and CONSOLIDER Ingenio 2010 (FUN-C-FOOD: CSD 2007-00063) projects. Nuria Martínez-Sáez thanks U.A.M. for her research fellowship. Authors also thank Dr. P. Martin for the statistical analysis of the data and Cafinsa, Fortaleza, Vitoria for supplying the raw material for preparation of bioactive extracts.

References

Adams, A., Borrelli, R. C., Fogliano, V., & De Kimpe, N. (2005). Thermal degradation studies of food melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*, 4136–4142.

Albanese, D., Di Matteo, M., Poiana, M., & Spagnamusso, S. (2009). Espresso coffee (EC) by POD: Study of thermal profile during extraction process and influence of water temperature on chemical–physical and sensorial properties. *Food Research International, 42*, 727–732.

Borrelli, R. C., Esposito, F., Napolitano, A., Ritieni, A., & Fogliano, V. (2004). Characterization of a new potential functional ingredient: Coffee silverskin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*, 1338–1343.

Borrelli, R. C., Visconti, A., Mennella, C., Anese, M., & Fogliano, V. (2002). Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*, 6527–6533.

Capel, J.C. & Pérez, J. (2010). Café y estilo de vida saludable. Café, placer y salud. EDIMSA, ISBN: 978-B4-7714-350-5, 15-32.

Cho, A.-S., Jeon, S.-M., Kim, M. J., Yeo, J., Seo, K. I., Choi, M. S., et al. (2010). Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and Chemical Toxicology, 48*, 937–943.

Contini, M., Baccelloni, S., Massantini, R., & Anelli, G. (2008). Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. *Food Chemistry, 110*, 659–669.

del Castillo, M. D., Ames, J. M., & Gordon, M. H. (2002). Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*, 3698–3703.

del Castillo, M. D., Ibáñez, E., Amigo, M., Herrero, M., Plaza, M. & Ullate, M. (2013). *Application of coffee silverskin in anti-aging and functional feed.* WO 2013/004873.

Dostal, V., Roberts, C. M., & Christopher, L. D. (2010). Genetic mechanisms of coffee extract protection in a *Caenorhabditis elegans* model of beta-amyloid peptide toxicity. *Genetics, 186*(3) (657-0163).

Figuerola, F., Hurtado, M. L., Estévez, A. M., Chiffelle, I., & Asenjo, F. (2005). Fiber concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fiber sources for food enrichment. *Food Chemistry, 91*(3), 395–401.

Furosawa, M., Narita, Y., Iwai, K., Fukunaga, F., & Nakagiri, O. (2011). Inhibitory effect of hot water extract of coffee "silverskin" on hyaluronidase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 75*(6), 1205–1207.

Glade, M. J. (2010). Review: Caffeine – Not just a stimulant. *Nutrition Journal, 26*, 932–938.

Jaquet, M., Rochat, I., Moulin, J., Cavin, C., & Bibiloni, R. (2009). Impact of coffee consumption on the gut microbiota: A human volunteer study. *International Journal of Food Microbiology, 130*, 117–121.

King, D. E., Egan, B. M., Woolson, R. F., Mainous, A. G., Al-Solaiman, Y., & Jesri, A. (2007). Effect of a high-fiber diet vs a fiber-supplemented diet on C-reactive protein level. *Archives of Internal Medicine, 167*, 502–506.

López-García, E., van Dam, R. M., Rajpathak, S., Willett, W. C., Manson, J. E., & Hu, F. B. (2006). Changes in caffeine intake and long-term weight change in men and women. *American Journal of Clinical Nutrition, 83*(3), 674–680.

Martorell, P., Llopis, S., González, N., Montón, F., Ortiz, P., Genovés, S., et al. (2012). *Caenorhabditis elegans* as a model to study the effectiveness and metabolic targets of dietary supplements used for obesity treatment: The specific case of a conjugated linoleic acid mixture (Tonalin). *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60*, 11071–11079.

Masuko, T., Minamib, A., Iwasaki, N., Majimab, T., Nishimura, S., & Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry, 339*, 69–72.

Moreira, A. S. P., Nunes, F. M., Domingues, M. R., & Coimbra, M. A. (2012). Coffee melanoidins: Structures, mechanisms of formation and potential health impacts. *Food & Function, 3*, 903.

Murase, T., Misawa, K., Minegishi, Y., Aoki, M., Ominami, H., Suzuki, Y., et al. (2011). Coffee polyphenols suppress diet-induced body fat accumulation by downregulating SREBP-1c and related molecules in C57BL/6J mice. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism, 300*, E122–E133.

Mure, K., Maeda, S., Mukoubayashi, C., Mugitani, K., Iwane, M., Kinoshita, F., et al. (2013). Habitual coffee consumption inversely associated with metabolic syndrome-related biomarkers involving adiponectin. *Nutrition, 29*, 982–987.

Murthy, P. S., & Naidu, M. M. (2012). Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. *Food and Bioprocess Technology, 5*, 897–903.

Murthy, P. S., Naidu, M. M., & Srinivas, P. (2009). Production of α-amylase under solidstate fermentation utilizing coffee waste. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 84*, 1246–1249.

Mussatto, S. I., Machado, E., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food and Bioprocess Technology, 4*, 661–672.

Napolitano, A., Fogliano, V., Tafuri, A., & Ritieni, A. (2007). Natural occurrence of ochratoxin a and antioxidant activities of green and roasted coffees and corresponding byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55*, 10499–10504.

Narita, Y., & Inouye, K. (2012). High antioxidant activity of coffee silverskin extracts obtained by the treatment of coffee silverskin with subcritical water. *Food Chemistry, 135*(3), 943–949.

Oki, T., Nagai, S., Yoshinaga, M., & Nishiba, Y. (2006). Contribution of β-carotene to radical scavenging capacity varies among orange-fleshed sweet potato cultivars. *Food Science and Technology Research, 12*, 156–160.

Pourfarzad, A., Mahdavian-Mehr, H., & Sedaghat, N. (2013). Coffee silverskin as a source of dietary fiber in bread-making: Optimization of chemical treatment using response surface methodology. *LWT – Food Science and Technology, 50*(2), 599–606.

Sebekova, K., Klenovics, K. S., Boor, P., Celeca, P., Behuliak, M., Schieberle, P., et al. (2012). Behaviour and hormonal status in healthy rats on a diet rich in Maillard reaction products with or without solvent extractable aroma compounds. *Physiology & Behavior, 105*, 693–701.

Silvan, J. M., Morales, F. J., & Saura-Calixto, F. (2010). Conceptual study on maillardized dietary fiber in coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*(23), 12244–12249.

Surco-Laos, F., Duenas, M., Gonzalez-Manzano, S., Cabello, J., Santos-Buelga, C., & Gonzalez-Paramas, A. M. (2012). Influence of catechins and their methylated metabolites on lifespan and resistance to oxidative and thermal stress of *Caenorhabditis elegans* and epicatechin uptake. *Food Research International, 46*(2), 514–521.

Tucker, L. A., & Thomas, K. S. (2009). Increasing total fiber intake reduces risk of weight and fat gains in women. *Journal of Nutrition, 139*(3), 576–581.

Vignoli, J. A., Bassoli, D. G., & Benassi, M. T. (2011). Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry, 124*, 863–868.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Food Chemistry 135 (2012) 943–949

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

High antioxidant activity of coffee silverskin extracts obtained by the treatment of coffee silverskin with subcritical water

Yusaku Narita [a,b], Kuniyo Inouye [a,*]

[a] Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan
[b] R&D Center, UCC Ueshima Coffee Co., Ltd., 3-1-4 Zushi, Takatsuki-shi, Osaka 569-0036, Japan

ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 November 2011
Received in revised form 5 May 2012
Accepted 21 May 2012
Available online 28 May 2012

Keywords:
Antioxidant
Biomass
Coffee
Coffee silverskin
Subcritical water

ABSTRACT

Coffee silverskin (CS) is a thin tegument of the outer layer of green coffee beans and a major by-product of the roasting process to produce roasted coffee beans. CS extracts obtained by the treatment of CS with subcritical water at 25–270 °C were investigated for their antioxidant activity using hydrophilic oxygen radical absorption capacity (H-ORAC) and DPPH radical scavenging capacity assays. The antioxidant activity increased with increasing the extraction temperature and the highest activity was observed with the extracts obtained at 270 °C. The H-ORAC and DPPH values of the extracts were 2629 ± 193 and 379 ± 36 μmol TE/g of CS extract, respectively. High correlation (R = 0.999) was observed between H-ORAC and DPPH values for the CS extracts. High correlation of the antioxidant activity was also observed with protein and phenolic contents in the extracts. The CS extracts could be useful as a good source of antioxidative materials.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Coffee is one of the most consumed popular beverages throughout the world. Coffee silverskin (CS) is a thin tegument of the outer layer of green coffee beans and a major by-product of the roasting process to produce roasted coffee beans. Most CS is disposed of as industrial waste because the effective utilising of CS has not yet been developed. Therefore CS can be regarded as biomass which is expected to be utilised. Many investigators have reported the physiological functions of green and roasted coffee beans, such as α-amylase inhibition (Narita & Inouye, 2009, 2011), tyrosinase inhibition (Iwai, Kishimoto, Kakino, Mochida, & Fujita, 2004), and antioxidant activity (Richelle, Tavazzi, & Offord, 2001), etc. On the other hand, the physiological functions of CS reported until now are antioxidant activity (Borrelli, Esposito, Napolitano, Ritieni, & Fogliano, 2004), previotic property (Borrelli et al., 2004), and hyaluronidase inhibition (Furusawa, Narita, Iwai, Fukunaga, & Nakagiri, 2011), but the number of the reports is much less than that for coffee bean.

The water maintained in the liquid state by pressurising in the temperature ranging between 100 and 374 °C is called subcritical water. The specific inductive capacity or dielectric constant of water remarkably decreased with increasing temperature (Miller & Hawthorne, 1998). The specific inductive capacity of subcritical water in the temperature range of between 200 and 300 °C is comparable as polar organic solvents such as methanol and acetone. Moreover, subcritical water has the characteristic which functions as acid or alkali catalyst, because the ionic product of the subcritical water is higher than water under normal temperature and pressure. From these features, research using subcritical water is advanced especially for treatment of food waste, such as grape seeds, okara (Wakita et al., 2004), wheat bran (Kataoka, Wiboonsirikul, Kimura, & Adachi, 2008), defatted rice bran (Wiboonsirikul et al., 2007a). It is expected to be environment-friendly to extract active ingredients, such as proteins and carbohydrates, from food waste using subcritical water without using organic solvents and other catalysts. Furthermore, it is excellent in safety not to use the substances harmful to human at the extraction process.

It is well known that the oxidative stress must be a factor to cause various diseases, such as cancer (Lambert & Yang, 2003), cardiovascular disease (Diaz, Frei, Vita, & Keaney, 1997), type 2 diabetes (Takayanagi, Inoguchi, & Ohnaka, 2011), Alzheimer's disease (Christen, 2000), and Parkinson's disease (Lang & Lozano, 1998). Antioxidants exhibit important effects for human health by reducing oxidative stress, and also are used to prevent food from discolouring and changing flavour. Therefore, antioxidants have recently attracted attention against oxidative stress. Antioxidants are divided roughly into natural and synthesized products. Consumers generally prefer natural antioxidants to synthetic ones because of higher safety of the former than the latter. It is well known that polyphenols such as chlorogenic acids richly contained in coffee

* Corresponding author. Tel.: +81 75 753 6266; fax: +81 75 753 6265.
E-mail address: inouye@kais.kyoto-u.ac.jp (K. Inouye).

0308-8146/$ - see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.078

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Iwai et al., 2004), and catechins contained in tea (Gardner, McPhail, & Duthie, 1998), and ascorbic acid (Gil, Tomas-Barberan, Hess-Pierce, & Kader, 2000) have strong antioxidant activity.

Recently, it has been reported that antioxidants are contained in the by-product of some food such as defatted rice bran (Wiboonsirikul et al., 2007a) and black rice bran (Wiboonsirikul, Hata, Tsuno, Kimura, & Adachi, 2007b). The higher the radical scavenging activity of defatted rice bran extracts, the higher the temperature for extraction ranging from 50 to 250 °C (Wiboonsirikul et al., 2007a). CS extracts that is obtained by the treatments with methanol and water have antioxidant activity (Borrelli et al., 2004). However, the research on the effect of the extraction temperature on the antioxidant activity of CS extracts has not yet been reported. It is expected that the antioxidant activity of CS extracts would be improved by subcritical water treatments.

The purpose of the present study is to evaluate the antioxidant activity of CS extracts obtained by the treatment with water at various temperatures and to investigate the correlation between the antioxidant capacities and the amount of antioxidant components such as protein and total phenolic compounds in the extracts.

2. Materials and methods

2.1. Materials and reagents

Coffee silverskin (CS) produced by roasting coffee beans (*Coffeea arabica* cv. Brazil, *C. arabica* cv. Colombia, *C. canephora* var. *robusta* cv. Vietnum, and *C. canephora* var. *robusta* cv. Indonesia) was obtained from UCC Ueshima Coffee Co., Kobe, Japan. CS easily peels off roasted coffee beans in the roasting process of green coffee beans. The function to separate CS and roasted coffee beans is attached to most industrial coffee roasting machines. CS separated from roasted coffee beans in the iron pot of the roasting machine is collected by aspiration of air to another container. Trolox (lot 648471) was purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Fluorescein sodium salt (lot 079K0141V) was from Sigma (St. Louis, MO, USA). 2,2′-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH, lot STN0525) was from Wako Pure Chemical (Osaka, Japan). 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, lot M9R6579), gallic acid (lot M9R9781), phenol reagent solution (Folin–Ciocalteu's reagent solution, lot L2286), chlorogenic acid hemihydrate (5-CQA, lot M8N8455), caffeine, anhydrous (lot M7T9075), 5-(hydroxymethyl)-2-furfural (5-HMF, lot M9M3597). Bovine serum albumin (BSA, lot M6P3104) and all other chemicals were of reagent grade and were from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan).

2.2. Preparation of CS extracts by the treatments with water, 0.1 M HCl, and 0.1 M NaCl at 25 and 80 °C

One gram of CS was added to 50 ml of distiled water, 0.1 M HCl or 0.1 M NaCl, and was constantly stirred with a magnetic stirrer at 25 or 80 °C for 1 h. The mixture was filtered firstly through Kiriyama No. 3 filter paper (Tokyo, Japan), and the filtrate was filtered secondly through Kiriyama No. 5C filter paper. The filtrate was concentrated with a rotary evaporator. The concentrated sample was freeze-dried and stored at −20 °C.

2.3. Subcritical water treatment of CS

One gram of CS and 50 ml of distiled water were put in a reaction vessel of SUS-316 stainless steel (Taiatsu Techno Co., Osaka, Japan). The vessel was set in a portable reactor model TPR-1 (TVS-N2 specification) (Taiatsu Techno Co.) and heated to a prescribed temperature (180, 210, 240, and 270 °C) and held for 10 min at each temperature. The inner pressures of the vessel at 180, 210, 240, and 270 °C were 1.0, 1.9, 3.2, and 5.3 MPa, respectively. It takes 17, 22, 31, and 42 min to reach the temperatures of 180, 210, 240, and 270 °C, respectively, from 25 °C. Then the mixture in the vessel was filtered firstly through Kiriyama No. 3 filter paper, and the filtrate was filtered secondly through Kiriyama No. 5C filter paper. The filtrate was concentrated with a rotary evaporator. The concentrated sample was freeze-dried and stored at −20 °C.

2.4. HPLC analysis of caffeine, 5-CQA, and 5-HMF

HPLC analysis of caffeine, 5-CQA, and 5-HMF in CS extracts was performed according to the procedures previously reported (Narita & Inouye, 2011) with some modifications. The CS extract solution (10 mg/ml) was applied to reversed-phase column chromatography in a preparative HPLC 7400 system (GL Science, Tokyo, Japan) on an Inertsil ODS-3 [4.6 mm (inner diameter or ID) × 15.0 cm] column (GL Science) at the column temperature of 35 °C. The mobile phase was composed of solvents A (50 mM acetic acid in H_2O) and B (50 mM acetic acid in acetonitrile), and the gradient programme was as follows: 0–30.0 min, 0–20% (v/v) of B; 30.0–45.0 min, 20–35% (v/v) of B; 45.0–50.0 min, 35–80% (v/v) of B; 50.0–50.1 min, 80–5% (v/v) of B; and 50.1–60 min, 0% (v/v) of B. The injection volume of the CS extract solution was 10 μl and the flow-rate was 1.0 ml/min. Caffeine, 5-CQA, and 5-HMF were detected by respective absorption at 270, 325, and 284 nm with a photodiode array. Caffeine, 5-CQA, and 5-HMF in the CS extract were identified by comparing the retention times and the UV spectra of the standard materials. The detection limits of all quantitative analyses were 10 μg/ml.

2.5. Determination of total sugar contents

The total sugar contents of CS extracts were determined by the phenol–sulphuric method (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956). The CS extract solution was prepared to the concentration of 1.0 mg/ml using distiled water. Zero-point-five millilitre of 5% (w/w) phenol was added to 0.5 ml of the CS extract solution of 1.0 mg/ml, followed by adding quickly 2.0 ml of H_2SO_4, and the mixture was mixed well. The mixture was left for 40 min at 25 °C in a water bath. The absorbance at 490 nm was measured using a spectrophotometer. The total sugar contents of the CS extracts were determined using standard curves obtained with D-glucose.

2.6. Determination of reducing sugar contents

The reducing sugar contents of CS extracts were determined by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method (Borel, Hostettler, & Deuel, 1952). The DNS reagent solution consisting of 10 g DNS, 0.5 g sodium sulphate, 2 g phenol, and 10 g sodium hydroxide in 1000 ml distiled water was prepared. The CS extract solutions of 1.0 mg/ml were prepared using distiled water. One millilitre of the extract solution and 3 ml of the DNS reagent solution were mixed and heated in boiling water for 5 min. The mixture was cooled to room temperature, followed by the addition of 21 ml of distiled water. The absorbance at 550 nm was measured with a spectrophotometer. The reducing sugar contents of the CS extracts were calculated using standard curves obtained with D-glucose.

2.7. Determination of protein

The protein content of CS extracts was determined by the Lowry–Folin method (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951). The Lowry's solution was prepared by mixing 50 ml of 5% (w/v) Na_2CO_3 aqueous solution, 0.5 ml of 2% (w/v) sodium potassium tartrate aqueous solution, and 0.5 ml of 1% (w/v) $CuSO_4$ aqueous

solution. Zero-point-two ml of the CS extract solution and 0.2 ml of 2 M NaOH were mixed and stood for 20 min at 25 °C. Then, the mixture was added to 2.0 ml of the Lowry's solution and stood for 20 min at 25 °C. Next, the Folin-reagent was added to the mixture and left for 20 min at 25 °C. The absorbance at 750 nm was measured using a spectrophotometer. The protein contents of the CS extracts were determined using standard curves obtained with BSA.

2.8. Determination of total phenolic contents

The total phenolic contents of CS extracts were determined using a previously reported procedure with the Folin–Ciocalteu's reagent (Singleton & Rossi, 1965). Zero-point-two ml of 1.0 mg/ml CS extract was added to 1.8 ml of distiled water followed by 1.0 ml of the Folin–Ciocalteu's reagent. The mixture was left for 3 min at 25 °C. Then, 5.0 ml of 0.4 M sodium carbonate was added to the mixture. The mixture was incubated at 25 °C for 1 h. The absorbance at 765 nm (A_{765}) was measured using a spectrophotometer and the phenolic contents in CS extracts were evaluated by a standard curve obtained with gallic acid.

2.9. Measurement of DPPH radical scavenging activity

The DPPH radical scavenging activity of CS extracts was assayed by the previously reported method (Aoshima & Ayabe, 2007) with some modifications. Zero-point-two ml of various concentrations of CS extract solution prepared using 50% (v/v) ethanol aqueous solution were mixed with 0.3 ml of 0.2 mM DPPH in ethanol and 0.5 ml of 0.5 M acetic acid buffer at pH 5.5. The mixture was shaken vigorously and placed in the dark for 30 min at 25 °C. The decrease in the absorbance at 517 nm (A_{517}) of DPPH was measured using a spectrophotometer. The DPPH radical scavenging activity was calculated by Eq. (1).

$$\text{DPPH radical scavenging activity}(\%) = [1 - (A_s - A_b)/(A_0 - A_b)] \times 100 \quad (1)$$

where A_s is A_{517} of the mixture in the presence of the sample and DPPH, A_b is A_{517} of the mixture in the absence of the sample and DPPH (blank), and A_0 is A_{517} of the mixture in the absence of the sample and in the presence of DPPH. The DPPH values of the each sample are expressed as the amount (μmol) of trolox equivalents (TE) per gram of the CS extract.

2.10. Measurement of hydrophilic oxygen radical absorbance capacity (H-ORAC)

The H-ORAC assay was carried out according to the previously reported method (Prior et al., 2003) with some modifications. Fluorescein and AAPH solutions were prepared to the concentrations of 94.4 nM and 31.7 mM, respectively, using 75 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4, buffer A). Twenty microlitre of various concentrations of the CS extract solutions and 200 μl of 94.4 nM fluorescein solution were placed in a well of a 96-well microplate and mixed well. The initial fluorescence ($f_{0\ min}$) of each well was measured at the excitation and emission wavelengths of 492 and 530 nm, respectively. An MTP-800Lab micro-titre-plate reader (Corona Electric Co., Ibaraki, Japan) with 492 excitation and 530 emission cut-off filters was used for fluorescence measuring. The mixture was pre-incubated at 37 °C for 10 min, and the reaction was initiated by adding 75 μl of 31.7 mM AAPH solution. The fluorescence depletion was monitored every 2 min for 90 min (from $f_{2\ min}$ to $f_{90\ min}$) at the excitation and emission wavelengths of 492 and 530 nm, respectively. The area under the fluorescence decay curve (AUC) was calculated according to the following Eq. (2).

$$\text{AUC} = (0.5 \times f_{8min} + f_{10min} + f_{14min} + \cdots + f_{88min} + 0.5 \times f_{90min})/f_{0min} \times 2 \quad (2)$$

The net AUC was calculated as follows:

$$\text{net AUC} = \text{AUC} - \text{AUC}_{blanks} \quad (3)$$

where $\text{AUC}_{\text{blank}}$ is the AUC value obtained with buffer A instead of the CS extract solution. The secondary regression equation between the concentration of trolox standard solutions and the AUC was calculated. The H-ORAC values of the CS extract solutions were calculated according to Eq. (4), and were expressed as μmol of TE per gram of the CS extract.

$$\text{H} - \text{ORAC}(\mu\text{molTE}/gofCSextract) = a \times (\text{net AUC})^2 + b \times net\text{AUC} + c \quad (4)$$

where a, b, and c were constants of secondary regression of Eq. (4).

3. Results and discussion

3.1. Yields of CS extracts obtained by the treatments of CS with water, 0.1 M HCl, and 0.1 M NaOH at various temperatures

The CS extracts were obtained by the treatments with water, 0.1 M HCl, and 0.1 M NaOH at various temperatures; the yields of the CS extracts from 1 g CS were shown Table 1. The yield of the CS extract obtained by the treatment with water increased with increasing the extraction temperatures from 25 to 210 °C, although it decreased with increasing the temperature exceeding 210 °C. The highest yield of the CS extracts by the treatment with water was obtained at the extraction temperature of 210 °C; the yield was 29% (w/w), being 1.8 times as high as that (16%, w/w) obtained at 25 °C (Table 1). It was reported previously that the yields of the CS extracts by the treatment with water at 25 and 121 °C were 14% and 20%, respectively (Furusawa et al., 2011). The yield at 121 °C was estimated to be 21% by extrapolating the data in Table 1, and this value is in reasonable agreement with that of Furusawa et al. The yield was considerably different by changing the extracting solvent from water to 0.1 M HCl and 0.1 M NaOH, although the extraction temperatures with those solvents were allowed only at 25 and 80 °C (Table 1). The apparent highest yield (44%) was given by the treatment with 0.1 M NaOH at 80 °C among the conditions examined. This apparent highest yield reflects the dry weight of CS extracts obtained by freeze-drying the resulting mixture from the incubation of 1 g CS and 50 ml of 0.1 M NaOH at 80 °C for 1 h. Therefore, it is thought that about 20% of the apparent yield was re-solidified NaOH or sodium salt resulting from the treatment of 1 g CS with 50 ml of 0.1 M NaOH at 80 °C for 1 h.

Table 1
Yield of CS extracts.[a]

Extraction		Yield (%, w/w)
Solvent	Temperature (°C)	
Water	25	16 ± 1
Water	80	19 ± 1
Water	180	25 ± 1
Water	210	29 ± 1
Water	240	27 ± 1
Water	270	23 ± 1
0.1 M HCl	25	21 ± 2
0.1 M HCl	80	28 ± 2
0.1 M NaOH	25	37 ± 1
0.1 M NaOH	80	44 ± 1

[a] Each value is the mean of triplicate analysis ± standard deviation.

...การศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

3.2. HPLC of caffeine, 5-CQA, and 5-HMF of CS extracts

It is reported that hexose and pentose are decomposed to mainly 5-HMF and furfural in the process by subcritical water treatment (Khajavi, Kimura, Oomori, Matsuno, & Adachi, 2005; Usuki, Kimura, & Adachi, 2008). We analysed caffeine and 5-CQA, which are the main polyphenols in coffee beans and 5-HMF in the CS extracts by reversed-phase HPLC (Fig. 1).

The peak of caffeine was observed at the elution time of 13.8 min. The amounts of caffeine extracted from 1 g CS by the treatment with water were in the range of 4.1–4.4 mg, and did not depend on the extraction temperature from 180 to 270 °C (Table 2). It was reported that the percentage yield of caffeine extracted by subcritical water extraction from tea waste increased depending on the increase in the extraction temperature from 100 to 175 °C. The highest value was obtained at 175 °C was 0.77% (w/w) (Shalmashi, Abedi, Golmohammad, & Eikani, 2010). This difference might be due to the fact that most of the caffeine is contained in CS could be extracted even at 25 °C, although caffeine in tea waste is located in an area where it can be extracted due to the degradation of cell walls and other cell components (Table 2). Another point is the extraction time with subcritical water. In the present study, we applied 10 min for extraction to CS, whereas 120 min was applied to tea waste. It was suggested that caffeine in CS extracts is not decomposed by subcritical water at 180–270 °C from this experimental result. The amounts (4.1–4.2 mg) of caffeine extracted from 1 g CS by the treatment with 0.1 M HCl at 25 and 80 °C were the same. The amounts (1.7–1.8 mg) of caffeine extracted from 1 g CS by the treatment with 0.1 M NaOH at 25 and 80 °C were almost the same, and were lower than those of the CS extracts obtained by treatment with water and 0.1 M HCl. The cause seems to be that the solubility of caffeine is lowered in 0.1 M NaOH at high pH (pH is around 13) because it is a basic material (Table 2).

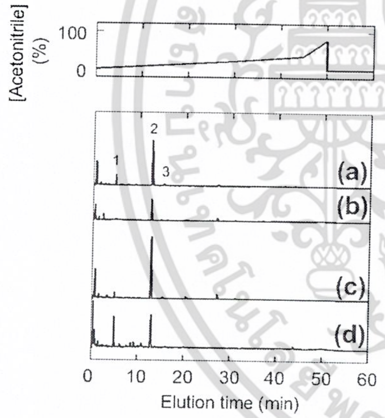


Fig. 1. HPLC chromatograms of the CS extracts obtained by the treatments of CS with water, 0.1 M HCl, and 0.1 M NaOH at 25 and 210 °C. The extraction solvents/temperatures: 0.1 M HCl/25 °C (a), 0.1 M NaOH/25 °C (b), water/25 °C (c), and water/210 °C (d). The wavelength for detection: 270 nm. Peaks (retention times): 1, 5-HMF (5.4 min); 2, caffeine (13.8 min); and 3, 5-CQA (16.5 min).

5-CQA was detected in the CS extracts obtained by the treatments with water at 25, 80, and 180 °C (Table 2), although it was not detected in the CS extracts obtained by the treatments with water at 210, 240, and 270 °C (Table 2). These results suggest that 5-CQA in CS treated by subcritical water above 210 °C was decomposed. It is known that a progressive destruction and transformation of chlorogenic acid with 8–10% is lost for every 1% loss of dry matter during roasting of coffee beans (Clifford, 1999).

No difference was observed in the amounts (1.1 mg) of 5-CQA extracted from 1 g CS with 0.1 M HCl at 25 °C and 80 °C were the same. However, 5-CQA was not detected in the CS extracts obtained with 0.1 M NaOH at 25 °C and 80 °C. It was reported that caffeic acid and chlorogenic acid are stable in phosphate or acetate buffer in acid pH (3–6) (Friedman & Jurgens, 2000). However, they are unstable in borate buffer (pH 7–11) with an increase in pH, and their structural changes are time-dependent and nonreversible (Friedman & Jurgens, 2000). The cause that 5-CQA was not detected in CS extracts obtained with 0.1 M NaOH (pH is around 13) at 25 and 80 °C might be based on the stability of 5-CQA at alkaline pH.

The amount of 5-HMF extracted from 1 g CS increased with increasing the extraction temperature from 25 to 210 °C and reached the maximum (2.0 mg), while it steeply decreased at a temperature of over 210 °C (Table 2). 5-HMF is considered to be a main degradation product formed by dehydration of hexoses through hydrothermolysis (Khajavi et al., 2005; Usuki et al., 2008) and its concentration in general is almost zero. In the present study, CS was produced as a by-product of the roasting process of coffee beans over 200 °C. 5-HMF detected in the CS extract obtained by the treatment of CS with water at 25 °C could have derived from the roasting of coffee beans. The amounts of 5-HMF extracted from 1 g CS obtained with 0.1 M HCl at 25 and 80 °C were almost the same (0.4–0.5 mg), but 5-HMF was not detected in the extract obtained by the treatment with 0.1 M NaOH at 25 and 80 °C (Table 2).

3.3. Total sugar and reducing sugar contents of CS extracts

Table 3 shows the total sugar and reducing sugar contents in 1 g CS extracts obtained by the treatments under various conditions.

Table 2
Caffeine, 5-CQA, and 5-HMF contents of 1 g CS or CS extracts.[a]

Extraction		Caffeine		5-CQA		5-HMF	
Solvent	Temperature (°C)	(mg/g of CS extract)	(mg/g of CS)	(mg/g of CS extract)	(mg/g of CS)	(mg/g of CS extract)	(mg/g of CS)
Water	25	26.4 ± 0.1	4.1 ± 0.1	6.4 ± 0.3	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.1	0.2 ± 0.0
Water	80	23.1 ± 0.3	4.4 ± 0.2	9.0 ± 0.4	1.7 ± 0.1	1.1 ± 0.2	0.2 ± 0.0
Water	180	16.2 ± 0.2	4.1 ± 0.1	6.1 ± 0.2	1.5 ± 0.1	4.6 ± 0.3	1.2 ± 0.1
Water	210	14.4 ± 0.1	4.2 ± 0.1	N. D.[b]	N. D.	6.9 ± 0.3	2.0 ± 0.1
Water	240	15.8 ± 0.1	4.2 ± 0.2	N. D.	N. D.	3.8 ± 0.1	1.0 ± 0.0
Water	270	17.9 ± 0.1	4.1 ± 0.2	N. D.	N. D.	1.8 ± 0.3	0.4 ± 0.1
0.1 M HCl	25	19.0 ± 0.2	4.1 ± 0.3	5.3 ± 0.2	1.1 ± 0.0	1.8 ± 0.2	0.4 ± 0.0
0.1 M HCl	80	15.3 ± 0.2	4.2 ± 0.3	3.8 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.7 ± 0.2	0.5 ± 0.1
0.1 M NaOH	25	5.0 ± 0.2	1.8 ± 0.1	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
0.1 M NaOH	80	3.9 ± 0.3	1.7 ± 0.1	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.

[a] Each value is the mean of triplicate analysis ± standard deviation
[b] Not detected.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 3
Total sugar, reducing sugar, protein and total phenolic contents of 1 g CS or CS extracts.[a]

Extraction		Total sugar		Reducing sugar		Protein		Total phenolic	
Solvent	Temperature (°C)	(mg/g of CS extract)	(mg/g of CS)	(mg/g of CS extract)	(mg/g of CS)	(mg/g of CS extract)	(mg/g of CS)	(mg/g of CS extract)	(mg/g of CS)
Water	25	366 ± 21	57 ± 2	156 ± 4	25 ± 1	212 ± 18	33 ± 2	36 ± 3	6 ± 0
Water	80	405 ± 30	77 ± 9	155 ± 9	28 ± 2	236 ± 12	45 ± 3	35 ± 1	7 ± 0
Water	180	477 ± 29	121 ± 9	206 ± 6	52 ± 2	378 ± 20	95 ± 5	85 ± 5	22 ± 1
Water	210	228 ± 5	67 ± 3	137 ± 3	40 ± 1	535 ± 14	157 ± 4	124 ± 9	36 ± 3
Water	240	86 ± 1	23 ± 1	82 ± 10	21 ± 3	582 ± 10	155 ± 7	130 ± 6	35 ± 2
Water	270	71 ± 6	16 ± 1	70 ± 4	15 ± 1	544 ± 11	125 ± 4	123 ± 9	28 ± 1
0.1 M HCl	25	304 ± 13	65 ± 7	122 ± 1	26 ± 2	189 ± 7	40 ± 4	23 ± 1	5 ± 1
0.1 M HCl	80	345 ± 10	95 ± 4	115 ± 5	32 ± 1	183 ± 13	50 ± 7	24 ± 1	7 ± 0
0.1 M NaOH	25	168 ± 14	62 ± 7	55 ± 18	20 ± 8	205 ± 15	76 ± 8	15 ± 2	5 ± 1
0.1 M NaOH	80	185 ± 28	80 ± 12	49 ± 12	21 ± 5	221 ± 17	97 ± 8	19 ± 2	8 ± 1

[a] Each value is the mean of triplicate analysis ± standard deviation

The values of the total sugar and reducing sugar contents (mg/g CS extract) were converted to their amounts (mg/g CS) contained in 1 g CS (Table 3). When 1 g CS is treated by water at 25–270 °C, the amounts of total sugar and reducing sugar in 1 g CS increased with increasing the extraction temperature from 25 °C to reach the maximum for both at 180 °C to the amounts of 121 ± 9 mg and 52 ± 2 mg, respectively (Table 3). However, the amounts for both decreased at a temperature of over 180 °C and turned to around 15 mg at 270 °C. The total sugar contents of the CS extracts obtained by the treatment with water increased with increasing the temperature up to 180 °C and drastically decreased at an extraction temperature over 180 °C. It was reported that the carbohydrate contents from the defatted rice bran extract obtained by the treatment with water increased with increasing the extraction temperature up to 200 °C, and decreased at a temperature of over 200 °C (Wiboonsirikul et al., 2007a). This profile of the dependence of the carbohydrate contents on the extraction temperature is similar to that shown in Table 3. The decrease in the carbohydrate contents at temperatures over 200 °C was considered to be due to the hydrolysis of poly- or oligosaccharides and the degradation of monosaccharides generated by the high ionic product of water at high temperature under subcritical conditions (Wiboonsirikul et al., 2007a). The decrease in the total sugar contents of the CS extracts at a temperature of over 180 °C would also be ascribed to the same cause. The total sugar and reducing sugar contents of the CS extracts obtained at 240 and 270 °C were almost the same, suggesting that most of the saccharides produced from the CS extracts obtained at 240 and 270 °C could be a mixture of monosaccharides. At the extraction temperature of 25 and 80 °C, the efficiency of the extraction solvent for the amounts of the total sugar extracted was in the order of 0.1 M HCl > 0.1 M NaOH > water, while that of the reducing sugar was in the order of 0.1 M HCl > water > 0.1 M NaOH.

3.4. Protein and total phenolic contents of CS extracts

Table 3 shows the protein and total phenolic contents of 1 g CS extracts obtained by the treatments under various conditions. The values of the protein and total phenolic contents were converted to their amounts (mg/g CS) contained in 1 g CS (Table 3). The protein content in the CS extract obtained by the treatment with water increased with increasing the extraction temperature from 25 to 240 °C and the maximum values were observed at 240 °C, being 582 ± 10 mg per g of CS extract (Table 3). The protein content extracted from 1 g CS increased with increasing the temperature, although the maximum was observed at 210 °C being 157 ± 4 mg per g CS (Table 3). The amount of protein that was extracted from 1 g CS at 210 °C was about five times as high as that extracted with water at 25 °C (33 ± 2 mg). This high extraction degree obtained under the subcritical water condition might due to the enhanced hydrolysis of proteins, solubilisation of insoluble proteins, and degradation of cell walls. It is reported that the solubility of the rice bran protein increased due to the hydrolysis of proteins and the cell walls by subcritical water treatment (Wiboonsirikul et al., 2007a). At an extraction temperature of 25 and 80 °C, the efficacy of the solvent for the protein extraction from 1 g CS was in the order of 0.1 M NaOH > 0.1 M HCl > water (Table 3). The largest amount of protein that was extracted from 1 g CS in these conditions was 97 ± 8 mg, and was obtained by extraction with 0.1 M NaOH at 80 °C. However, the amount of protein that was extracted from 1 g CS with subcritical water at 210 °C was about 1.5 times as high as that extracted with NaOH at 80 °C (Table 3).

The total phenolic content in the CS extract obtained by treatment with water increased with increasing the extraction temperature from 25 to 240 °C, the maximum value was observed at 240 °C and was 130 ± 6 mg per g of the CS extract (Table 3). The largest amount of total phenolic components (36 ± 3 mg) extracted from 1 g CS was also observed with water at 210 °C (Table 3). It was six times as high as that extracted from 1 g CS with water at 25 °C (6 ± 0 mg). This might also be due to the hydrolysis or degradation of polyphenolic compounds, such as lignin and lignan into smaller and soluble compounds. At an extraction temperature of 25 °C and 80 °C, the efficacy of the solvent in the extraction of total phenolic compounds was not much different in these treatments (Table 3). The amount of total phenolic components was 5–8 mg/g of CS (Table 3). The amount of total phenolic components that was extracted from 1 g CS with subcritical water at 210 °C was about five times as high as that extracted with these solvents at 25 and 80 °C (Table 3).

3.5. DPPH radical scavenging activity and H-ORAC of CS extracts

Fig. 2A and Table 4 show the results of the DPPH radical scavenging activity assay on the CS extracts obtained by the treatments with water, 0.1 M HCl, and 0.1 M NaOH at various temperatures. The values of the CS extracts obtained with water increased remarkably in a sigmoid fashion with increasing the extraction temperature from 25 to 270 °C (Fig. 2A). The maximum value that was obtained with the CS extract obtained by the treatment with water at 270 °C was 379 ± 36 μmol TE per g of CS extract (Table 4). The DPPH values of the extracts obtained with water, 0.1 M HCl or 0.1 M NaOH at 25 and 80 °C were very similar, and were in the range of 61–75 μmol TE per g of CS extract (Table 4). The DPPH values of CS extraction by treatment with subcritical water

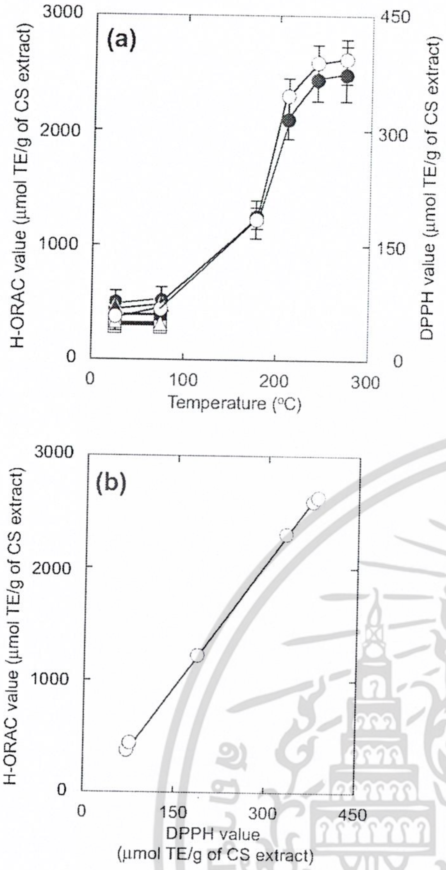


Fig. 2. H-ORAC and DPPH values of the CS extracts. Panel A: H-ORAC (open symbols) and DPPH (solid symbols) values of the CS extracts obtained by the treatments of CS with water (circles), 0.1 M HCl (triangles), and 0.1 M NaOH (squares) at various temperatures. Each point represents the mean and standard deviation of triplicate experiments. Panel B: Relationship between the H-ORAC and DPPH values of the CS extracts obtained by the treatments of CS with water in the temperature range of 25–270 °C.

Table 4
DPPH radical scavenging activity and H-ORAC of CS extracts.[a]

Extraction		H-ORAC	DPPH
Solvent	Temperature (°C)	(μmol TE/g of CS extract)	(μmol TE/g of CS extract)
Water	25	354 ± 44	74 ± 13
Water	80	384 ± 58	75 ± 18
Water	180	1223 ± 65	184 ± 28
Water	210	2321 ± 169	323 ± 39
Water	240	2611 ± 150	371 ± 33
Water	270	2629 ± 193	379 ± 36
0.1 M HCl	25	289 ± 34	67 ± 9
0.1 M HCl	80	284 ± 37	71 ± 11
0.1 M NaOH	25	275 ± 22	61 ± 5
0.1 M NaOH	80	273 ± 20	63 ± 6

[a] Each value is the mean of triplicate analysis ± standard deviation

at 270 °C were about five times as high as the values from the extraction by treatment with water, 0.1 M HCl or 0.1 M NaOH at 25 and 80 °C (Table 4).

The H-ORAC values of the CS extracts obtained by the treatments with water, 0.1 M HCl, and 0.1 M NaOH at the various temperatures were also examined (Fig. 2A & Table 4). The values of the CS extracts obtained with water increased with increasing the temperature from 25 to 270 °C also in a sigmoid fashion (Fig. 2A). The maximum value was given at 270 °C and was 2629 ± 193 μmol TE per g of CS extract (Table 4). The values of the extracts obtained with water, 0.1 M HCl, and 0.1 M NaOH at 25 °C and 80 °C were very similar, and were range of 273–384 μmol TE per g of CS extract (Table 4). The H-ORAC values of CS extraction from the treatment with subcritical water at 270 °C were about seven times as high as the values from the extraction by treatment with water, 0.1 M HCl or 0.1 M NaOH at 25 and 80 °C (Table 4).

It is reported that the CS extracts obtained by the treatments with distiled water and methanol have antioxidant activities as measured with two methods, using *N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine (DMPD) for the water extracts and 2,2′-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) for the methanol extracts (Borrelli et al., 2004). It has not been studied whether the antioxidant activity of the CS extracted with water changes depending on the extraction temperature (Borrelli et al., 2004). There are many methods reported for measuring antioxidative activity. These methods are mainly classified into two types. One is the assay based on hydrogen atom transfer (HAT) which includes the H-ORAC assay and the other is that based on electron transfer (ET), which includes DPPH, ABTS, superoxide dismutase, and ferric reducing antioxidant potential assays (Dudonne, Vitrac, Coutiere, Woillez, & Merillon, 2009). In the present study, we evaluated the antioxidant activities of the CS extracts using the DPPH assay and the H-ORAC assay. The H-ORAC and DPPH values of CS extracts obtained after the treatment with water at 25–270 °C, and both values increased remarkably with increasing the extraction temperatures (Fig. 2A and Table 4). The highest values (2629 ± 193 and 379 ± 36 μmol TE/g of CS extract) of H-ORAC and DPPH, respectively, were observed at 270 °C, respectively (Fig. 2A). There is very good correlation between the DPPH and the H-ORAC values (R = 0.999) (Fig. 2B). The good correlation of the antioxidant activities measured by the H-ORAC and DPPH methods was reported also with sorghum (Awika, Rooney, Wu, Prior, & Cisneros-Zevallos, 2003). Generally, the phenolic compounds contribute highly to the antioxidant activity of food. In particular, the total phenolic contents of the CS extracts have high correlation with their H-ORAC and DPPH values, with correlation coefficients (R) of 0.987 and 0.982, respectively (Fig. 3). It is worthy to note that there is also high correlation between the protein contents and their H-ORAC

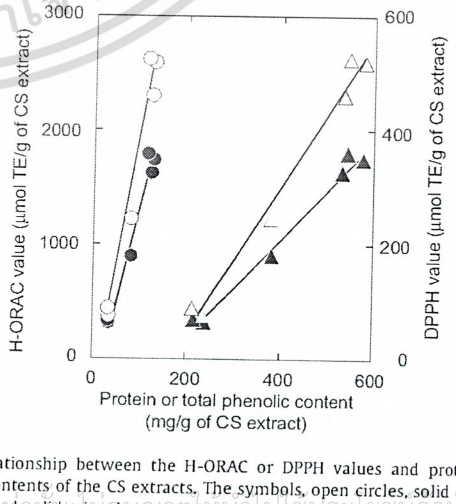


Fig. 3. Relationship between the H-ORAC or DPPH values and protein or total phenolic contents of the CS extracts. The symbols, open circles, solid circles, open triangles, and solid triangles represent the H-ORAC values versus total phenolic contents, DPPH values versus total phenolic contents, H-ORAC values versus total protein contents, and DPPH values versus protein contents of the CS extracts, respectively.

and DPPH values, with the R values of 0.994 and 0.990, respectively (Fig. 3). Peptides produced by the decomposition of soybean protein and wheat gluten were reported to exhibit strong DPPH radical scavenging activity and antioxidant activity against linoleic acid oxidation in emulsion systems (Park, Morimae, Matsumura, Nakamura, & Sato, 2008). Peptides produced by hydrolysing the protein in CS by subcritical water treatment are considered to show such a high antioxidant capacity. The CS extracts obtained by the treatment with water at 210–270 °C did not contain 5-CQA, which is thought to be the main antioxidant component of coffee beans, although the extracts showed high antioxidant activity (Table 2 & Fig. 2A). This antioxidant activity must be due to proteins and peptides. However, it is necessary to identify the component in the CS extract that contributed to the antioxidant capacity by further studies. Finally, this study shows that CS contains fairly strong antioxidant activity and proposes that the subcritical water treatment is an effective method for extraction of antioxidant components from CS.

4. Conclusions

The antioxidant activity of CS extracts obtained by the treatment of CS with water and subcritical water increased with increasing the extraction temperature from 25 to 270 °C in a sigmoid fashion. The maximum H-ORAC and DPPH values of the extracts were obtained at 270 °C and were 2629 ± 193 and 379 ± 36 μmol TE per g of CS extract, respectively. On the other hand, the antioxidant activity evaluated by measuring the H-ORAC and DPPH radical scavenging activity of the CS extracts obtained by the treatment with water, 0.1 M HCl, and 0.1 M NaOH at 25 and 80 °C were very similar. The antioxidant activity of the CS extracts obtained by the treatment of CS with subcritical water was stronger than that extracted by treatment with water, 0.1 M HCl, and 0.1 M NaOH at 25 and 80 °C.

The phenolic contents of the CS extracts obtained by treatment with water and subcritical water at 25–270 °C have a high correlation with their H-ORAC and DPPH values, with correlation coefficients (R) of 0.987 and 0.982, respectively. It is worthy to note that there is also high correlation between the protein contents and their H-ORAC and DPPH values, with R values of 0.994 and 0.990, respectively. Peptides produced by hydrolysing the protein in CS by subcritical water treatment are considered to show such a high antioxidant capacity.

The CS extracts could be useful as a good source of antioxidative materials. Furthermore, the treatment using subcritical water was more efficient for the production of antioxidative materials from CS. Besides, it was shown that the subcritical water treatment is effective for the extraction of total sugar, reducing sugar, protein, phenolic components, and 5-HMF from CS by adjusting the treatment temperature.

References

Aoshima, H., & Ayabe, S. (2007). Prevention of the deterioration of polyphenol-rich beverages. *Food Chemistry, 100*, 350–355.

Awika, J. M., Rooney, L. W., Wu, X., Prior, R. L., & Cisneros-Zevallos, L. (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (sorghum bicolor) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*, 6657–6662.

Borel, E., Hostettler, F., & Deuel, H. (1952). Quantitative Zuckerbestimmung mit 3,5-dinitrosalicylsaure und phenol. *Helvetica Chimica Acta, 35*, 115–120.

Borrelli, R. C., Esposito, F., Napolitano, A., Ritieni, A., & Fogliano, V. (2004). Characterization of a new potential functional ingredient: coffee silverskin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*, 1338–1343.

Clifford, M. N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates: Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 79*, 362–372.

Christen, Y. (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. *The American Journal of Clinical Nutrition, 71*, 621S–629S.

Diaz, M. N., Frei, B., Vita, J. A., & Keaney, J. F. Jr., (1997). Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *The New England Journal of Medicine, 337*, 408–416.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry, 28*, 350–356.

Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., & Merillon, J.-M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57*, 1768–1774.

Friedman, M., & Jurgens, H. S. (2000). Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48*, 2101–2110.

Furusawa, M., Narita, Y., Iwai, K., Fukunaga, T., & Nakagiri, O. (2011). Inhibitory effect of a hot water extract of coffee "silverskin" on hyaluronidase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 75*, 1205–1207.

Gardner, P. T., McPhail, D. B., & Duthie, G. G. (1998). Electron spin resonance spectroscopic assessment of the antioxidant potential of teas in aqueous and organic media. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 76*, 257–262.

Gil, M. I., Tomas-Barberan, F. A., Hess-Pierce, B., & Kader, A. A. (2000). Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*, 4976–4982.

Khajavi, S. H., Kimura, Y., Oomori, T., Matsuno, R., & Adachi, S. (2005). Degradation kinetics of monosaccharides in subcritical water. *Journal of Food Engineering, 68*, 309–313.

Iwai, K., Kishimoto, N., Kakino, Y., Mochida, K., & Fujita, T. (2004). In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*, 4893–4898.

Kataoka, M., Wiboonsirikul, J., Kimura, Y., & Adachi, S. (2008). Properties of extracts from wheat bran by subcritical water treatment. *Food Science and Technology Research, 14*, 553–556.

Lambert, J. D., & Yang, C. S. (2003). Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *The Journal of Nutrition, 133*, 3262S–3267S.

Lang, A. E., & Lozano, A. M. (1998). Parkinson's disease. First of two parts. *The New England Journal of Medicine, 339*, 1044–1053.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry, 193*, 265–275.

Miller, D. J., & Hawthorne, S. B. (1998). Method for determining the solubilities of hydrophobic organics in subcritical water. *Analitical Chemistry, 70*, 1618–1621.

Narita, Y., & Inouye, K. (2009). Kinetic analysis and mechanism on the inhibition of chlorogenic acid and its components against porcine pancreas α-amylase isozymes I and II. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57*, 9218–9225.

Narita, Y., & Inouye, K. (2011). Inhibitory effects of chlorogenic acids from green coffee beans and cinnamate derivatives on the activity of porcine pancreas α-amylase isozyme I. *Food Chemistry, 127*, 1532–1539.

Park, E. Y., Morimae, M., Matsumura, Y., Nakamura, Y., & Sato, K. (2008). Antioxidant activity of some protein hydrolysates and their fractions with different isoelectric points. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56*, 9246–9251.

Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., et al. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity ($ORAC_{FL}$)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*, 3273–3279.

Richelle, M., Tavazzi, I., & Offord, E. (2001). Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49*, 3438–3442.

Shalmashi, A., Abedi, M., Golmohammad, F., & Eikani, M. H. (2010). Isolation of caffeine from tea waste using subcritical water extraction. *Journal of Food Process Engineering, 33*, 701–711.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. Jr., (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture, 16*, 144–158.

Takayanagi, R., Inoguchi, T., & Ohnaka, K. (2011). Clinical and experimental evidence for oxidative stress as an exacerbating factor of diabetes mellitus. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 48*, 72–77.

Usuki, C., Kimura, Y., & Adachi, S. (2008). Degradation of pentaoses and hexouronic acids in subcritical water. *Chemical Engineering and Technology, 31*, 133–137.

Wakita, Y., Harada, O., Kuwata, M., Fujimura, T., Yamada, T., Suzuki, M., et al. (2004). Preparation of subcritical water-treated okara and its effect on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Food Science and Technology Research, 10*, 164–167.

Wiboonsirikul, J., Kimura, Y., Kadota, M., Morita, H., Tsuno, T., & Adachi, S. (2007a). Properties of extracts from defatted rice bran by its subcritical water treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55*, 8759–8765.

Wiboonsirikul, J., Hata, S., Tsuno, T., Kimura, Y., & Adachi, S. (2007b). Production of functional substances from black rice bran by its treatment in subcritical water. *LWT – Food Science and Technology, 40*, 1732–1740.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Industrial Crops and Products 53 (2014) 350–357

Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops and Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop

Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process

Anabela S.G. Costa[a], Rita C. Alves[a,b,*], Ana F. Vinha[a,c], Sérgio V.P. Barreira[c], Maria A. Nunes[a], Luís M. Cunha[d], M. Beatriz P.P. Oliveira[b]

[a] REQUIMTE/Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal
[b] REQUIMTE/Instituto Superior de Engenharia do Porto, Instituto Politécnico do Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 431, 4200-072 Porto, Portugal
[c] FCS-UFP/Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Rua Carlos da Maia, 296, 4200-150 Porto, Portugal
[d] REQUIMTE/DGAOT, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Rua Padre Armando Quintas, 7, Vairão, 4486-661 Vila do Conde, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 August 2013
Received in revised form 13 December 2013
Accepted 2 January 2014

Keywords:
Coffee silverskin
By-products valorization
Extracts
Bioactive compounds
Phenolics
Antioxidant activity

ABSTRACT

Coffee silverskin is a major roasting by-product that could be valued as a source of antioxidant compounds. The effect of the major variables (solvent polarity, temperature and extraction time) affecting the extraction yields of bioactive compounds and antioxidant activity of silverskin extracts was evaluated. The extracts composition varied significantly with the extraction conditions used. A factorial experimental design showed that the use of a hydroalcoholic solvent (50%:50%) at 40 °C for 60 min is a sustainable option to maximize the extraction yield of bioactive compounds and the antioxidant capacity of extracts. Using this set of conditions it was possible to obtain extracts containing total phenolics (302.5 ± 7.1 mg GAE/L), tannins (0.43 ± 0.06 mg TAE/L), and flavonoids (83.0 ± 1.4 mg ECE/L), exhibiting DPPH• scavenging activity (326.0 ± 5.7 mg TE/L) and ferric reducing antioxidant power (1791.9 ± 126.3 mg SFE/L). These conditions allowed, in comparison with other "more effective" for some individual parameters, a cost reduction, saving time and energy.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, sustainability has become an essential aspect to be observed in any human activity. For example, sustainable food manufacturing and processing (which reduces raw materials waste and minimizes refuse) is already a mandatory component of the business model. Furthermore, it can represent a challenge and an opportunity to innovate, looking for better commodities and production technologies, improving the overall environmental performance of products throughout their life-cycle, and, in this way, to gain the confidence of the increasingly informed consumers.

In the specific case of coffee producers, several procedures have already been adopted to obtain a more sustainable product namely: organic farming practices, preserving native forests and biodiversity, bird safe and shade grown coffee, and fair-trade coffee. With this, producers aimed to obtain a certification that will provide them preferential market access and sell at a differential price. Nevertheless, the coffee industry (the second largest commodity in the world after oil industry) still generates large amounts of residues representing serious environmental problems (Mussatto et al., 2011) and, because of that, waste management is also an increasingly important issue. Studies show that coffee husks, a residue from coffee processing, are potential raw materials for bioethanol production (Gouvea et al., 2009). Other alternative is biodiesel production using oil extracted from defective coffee beans instead of roasting for consumption of beverage with depreciated quality (Oliveira et al., 2008b). Other potential examples of by-products valorization in the coffee industry are the use of defective coffee beans press cake (resultant from biodiesel production) or coffee husks to be used as adsorbents for the removal of dyes from aqueous media (Oliveira et al., 2008a). The production of low-cost adsorbents from coffee husks for the treatment of wastewater containing heavy metals has been under study as well (Oliveira et al., 2008c).

The aforementioned recycling alternatives are only interesting for coffee producing countries while in importing countries, where roast of green processed beans is performed, the wastes are mainly associated with roasting and consumption: coffee silverskin and spent grounds, respectively. The last example consists in the remains of ground roasted coffee after beverage preparation. Recently, a lot of attention is being given to their recycling, namely,

* Corresponding author at: REQUIMTE/Instituto Superior de Engenharia do Porto, Instituto Politécnico do Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 431, 4200-072 Porto, Portugal. Tel.: +351 22 834 05 37.
E-mail address: rita.c.alves@gmail.com (R.C. Alves).

0926-6690/$ – see front matter © 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

as a possible fertilizer after composting, a versatile barrier in reducing pesticide leaching through soil, a source of oil for biodiesel or biomass for bunker fuel substitution (Adi and Noor, 2009; Fenoll et al., 2011; Kondamudi et al., 2008).

Coffee silverskin is an integument that covers the raw coffee bean. This light pellicle constitutes a by-product of coffee roasting since it is detached during this procedure. Since usually it is not used to prepare coffee beverages, silverskin is separated from the beans by air flow and used, afterwards, as firelighters or dispatched for landfills.

The preparation of dietary supplements/nutraceuticals, food ingredients, and some pharmaceutical products is increasingly made from the extraction of bioactive compounds from natural products (Dai and Mumper, 2010). We believe that coffee silverskin might be an important source of several bioactive compounds. In fact, the scarce literature about this matrix suggests that it contains dietary fiber (Napolitano et al., 2007; Pourfarzad et al., 2013) and antioxidants (Borrelli et al., 2004; Murthy and Naidu, 2012), two recognized factors in the prevention of chronic diseases (Kris-Etherton et al., 2002). In the work presented herein, we aimed to optimize a sustainable method to obtain silverskin extracts with the highest possible amount of antioxidants. The effect of the main variables affecting the extraction yields and antioxidant activity of extracts were studied, namely, solvent polarity, temperature and time of extraction. Water and ethanol were selected because of their low toxicity. In order to modulate the solvent polarity, different ratio mixtures (25:75, 50:50 and 75:25) were used. An experimental design for analyzing the effects of time and temperature of extraction was performed for each solvent mixture. Extracts were compared regarding their total phenolics, flavonoids and tannins contents. Moreover, their antioxidant capacity was assessed by two complementary procedures, namely, the ferric reducing antioxidant power (FRAP) method and the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH•) scavenging capacity assay.

With this, we aim to contribute to coffee silverskin valorization and recycling, taking advantage of its potential health properties since its extracts could be henceforth applied in products such as antioxidant food supplements or cosmetic products.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and standards

Gallic acid, tannic acid, epicatechin, trolox, sodium acetate, Folin–Ciocalteu's phenol reagent, DPPH• (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), sodium nitrite, ferric chloride, aluminum chloride, TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) solution, and ferrous sulfate heptahydrate were all obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, USA). Sodium carbonate anhydrous, sodium hydroxide and absolute ethanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was treated in a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA) and used to prepare all aqueous solutions.

2.2. Samples and sample preparation

Silverskin sample were gently provided by a national coffee roaster industry (Bicafé – Torrefação e Comércio de Café, Lda., Portugal). Sample was representative of the major by-product of this industry and resulted from the roast of a commercial coffee blend constituted by ~40% of arabica and ~60% of robusta coffee beans (*Coffea arabica* and *Coffea canephora* var. *robusta*, respectively). After reception, samples were ground (Grindomix GM 200, Retsch, Haan, Germany), homogenized and used to prepare extracts.

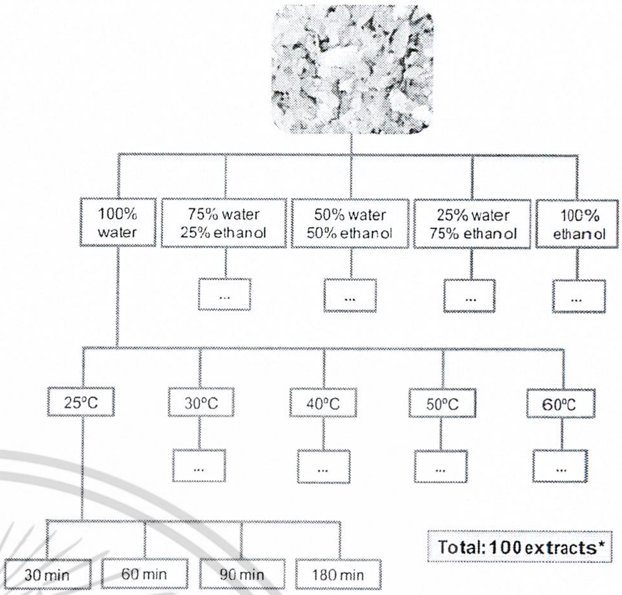


Fig. 1. Scheme of the silverskin extracts preparation. *Each extract was prepared in triplicate and each replicate was analyzed in triplicate.

2.3. Extracts preparation

In order to study the optimal extraction conditions, different procedures were tested by varying solvent polarity, temperature, and time of extraction. Fig. 1 outlines the different conditions used to prepare extracts.

Briefly, 1 g of ground sample and 50 mL of solvent/solvent mixture (100% water, 75% water/25% ethanol, 50% water/50% ethanol, 25% water/75% ethanol or 100% ethanol) were brought into contact at different temperatures (25, 30, 40, 50, and 60 °C), for periods of 30, 60, 90, and 180 min. Extractions were performed on a heating plate with constant stirring (600 rpm) and each set of conditions (solvent, time and temperature) was performed in triplicate. The final extracts were filtered and stored at −25 °C prior analysis.

2.4. Total phenolics content

Total phenolics contents of diluted extracts (1:10) were determined according to Alves et al. (2010). Briefly, 500 μL of each extract were mixed with 2.5 mL of the Folin–Ciocalteu reagent (1:10) and 2 mL of a sodium carbonate solution (7.5% m/v). The mixture was first incubated at 45 °C, during 15 min, followed by 30 min incubation at room temperature before absorbance readings at 765 nm were performed. Total phenolics content was calculated from a calibration curve prepared with gallic acid (10–100 mg/L; r = 0.9997) and expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE)/L of extract.

2.5. Total flavonoids content

Total flavonoids contents were determined according to Barroso et al. (2011) with slight modifications. Aliquots of 1 mL of extract were mixed with 4 mL of distilled water and 300 μL of 25% sodium nitrite. After 5 min at room temperature, 300 μL of 10% $AlCl_3$ were added, and 1 min after 2 mL sodium hydroxide (1 M) and 2.4 mL of ultrapure water. The absorbance was recorded at 510 nm. Total flavonoids content was calculated through a calibration curve of

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

epicatechin (50–450 mg/L; r = 0.9998) and expressed as mg of epicatechin equivalents (ECE)/L of extract.

2.6. Total tannins content

Total tannins contents were determined according to Shad et al. (2012), with slight modifications. Briefly, 500 μL of extract (diluted at 1:10 when necessary) were mixed with 2.5 mL of the Folin–Ciocalteu reagent (1:10). After 3 min, 2 mL of sodium carbonate (7.5% m/v) were added. The mixture was kept in the dark for 2 h. Absorbance readings were carried out at 725 nm. Tannins content was calculated from a calibration curve of tannic acid (0–0.2 mg/L; r = 0.9999) and expressed as mg of tannic acid equivalents (TAE)/L of extract.

2.7. Antioxidant activity

2.7.1. DPPH• scavenging activity

The radical scavenging ability of extracts was analyzed according to the method described by Barroso et al. (2011) with some modifications. Briefly, 14 μL of diluted extract (1:10) were mixed with 186 μL of a freshly prepared DPPH• solution (9.3×10^{-5} mol/L in ethanol). The decrease of the DPPH• was measured in equal time intervals of 10 min by monitoring the decrease of absorption at 525 min, in order to observe the kinetics reaction. The reaction endpoint was attained in 40 min. A calibration curve was prepared with trolox (25–175 mg/L, r = 0.9995) and DPPH• scavenging activity was expressed as mg of trolox equivalents (TE)/L of extract.

2.7.2. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

The FRAP assay was performed according to Benzie and Strain (1996) with slight modifications. Briefly, 90 μL of diluted extract (1:10) were mixed with 270 μL of distilled water and 2.7 mL of the FRAP solution (containing 0.3 M acetate buffer, 10 mM TPTZ solution, and 20 mM of ferric chloride). After homogenization, the mixture was kept for 30 min at 37 °C protected from light. Absorbance was measured at 595 nm. A calibration curve was prepared with ferrous sulfate (50–450 mg/L, r = 0.9998) and ferric reducing antioxidant power was expressed as mg of ferrous sulfate equivalents (FSE)/L of extract.

2.7.3. Statistical analysis

A factorial experimental design (5 × 5 × 4) was used to evaluate the influence of the variables solvent, temperature and time of extraction on the dependent variables: phenolics, flavonoids, tannins, DPPH• and FRAP. The dependent variables were measured thrice for each set of extraction operating conditions (solvent, temperature, time). The set of vectors (solvent, temperature, time) were grouped into homogeneous groups through a hierarchical Cluster analysis by the method of least distance (Nearest Neighbor) using the squared Euclidean distance as the measure of dissimilarity. The Clusters were compared using a MANOVA analysis after validating the assumptions of multivariate normality and homogeneity of variance–covariance. Whenever the MANOVA analysis detected statistically significant effects, an ANOVA, for each of the dependent variables, was performed followed by Tukey's HSD post hoc test. The Multiple Linear Regression procedure was used to obtain a model that would allow predicting the value of each dependent variable as a function of operating conditions of extraction (water concentration in the solvent, temperature, contact time). Pearson correlation tests were used to ascertain the existence of linear relationships between the contents of bioactive compounds and antioxidant activity. It was considered a 0.05 significance level for all tests. All statistical analyzes were performed with SPSS statistics (v21, IBM SPSS, Chicago, IL).

3. Results and discussion

The extraction yields of bioactive compounds from natural matrices depends highly on several factors (Narita and Inouye, 2012; Pinelo et al., 2004, 2005). Some important variables such as type of solvent, solvent-to-solid ratio, time, temperature, or pressure can be managed in order to optimize compounds extraction. Nevertheless, the role of each of these variables in the mass transfer kinetics of the process is not always obvious (Pinelo et al., 2005). The compounds of interest and the chemical composition of the matrix will then define the best conditions to achieve a maximum yield of extraction.

In this work, as previously described, pure solvents (water (w) or ethanol (e)) or hydroalcoholic mixtures (25%w:75%e, 50%w:50%e, 75%w:25%e) were tested, together with different times and temperatures in an experimental factorial design set up. Total phenolics, flavonoids, and tannins contents, as well as antioxidant activity (using both DPPH• inhibition and FRAP assays) of the obtained extracts were evaluated. Results are depicted in Figs. 2 and 3, respectively.

As can be observed in Fig. 2, the set of conditions used highly influenced the extracts composition. Some of the resulting extracts are considerably richer in phenolic compounds (>310 mg GAE/L). That is the case of those obtained using a hydroalcoholic mixture (50%w:50%e), at 50 °C or 60 °C, during 90 min. On the other hand, 25%w:75%e/60 °C/90 min was the set of conditions that allowed a significantly higher extraction of flavonoids (144 mg ECE/L). The highest tannins concentration (0.43 mg TAE/L) was obtained using 50%w:50%e/40 °C/60 min and 50%w:50%e/60 °C/180 min. Although tannins ingestion has been related with anti-nutritional effects (since they form complexes with proteins, starch, and digestive enzymes causing a reduction in the nutritional value of foods), their antioxidant, anti-mutagenic and antimicrobial properties are also well documented, depending on the amount and type of tannins present in the food (Chung et al., 1998). In any case, the maximum total tannins content found in our extracts (~0.40 mg TAE/L) is very low when compared with other matrices (e.g. 41–64 mg/L for green/black tea (Lima et al., 2012)).

The worst extracting solvent for total phenolics was pure ethanol, followed by 100% water. Both options were also bad choices to extract flavonoids, as expected, due to the intermediate polarity of these compounds (Bravo, 1998). Curiously, for tannins, when extraction was carried out at ambient temperature (25 °C), ethanol was the best extracting solvent (being 25%w:75%e the worst). Even so, never achieved the extraction yield obtained with 50w:50e/40 °C/60 min or 50w:50e/60 °C/180 min. For the remaining temperatures/times of extraction, pure ethanol, followed by 100% water, were the worst solvents.

The best yields obtained for total phenolics in this study were ~3-fold higher than those reported by Narita and Inouye (2012) for silverskin extracts using subcritical water (240 °C, 3.2 MPa): 130 mg GAE/g of extract. This was most likely due to the different solid-solvent ratios as well as the different extraction conditions used. Although Narita and Inouye (2012) also started from 1 g of coffee silverskin in 50 mL of solvent (100% water), they freeze-dried the resultant extract and prepared a new 1.0 mg/mL extract for total phenolics analysis. Therefore, our extracts were more concentrated. However, when comparing phenolics amounts per g of coffee silverskin, Narita and Inouye (2012) achieved superior yields using subcritical conditions (35 mg GAE/g of coffee silverskin against 16 mg GAE/g in our study, for our best set of conditions). Nevertheless, the use of subcritical water needs special equipment that is not always available in laboratories or small industries. That is why, in this work, we optimized the antioxidants extraction using different solvents, times and temperatures of extraction at normal conditions of pressure. When comparing 100% water

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

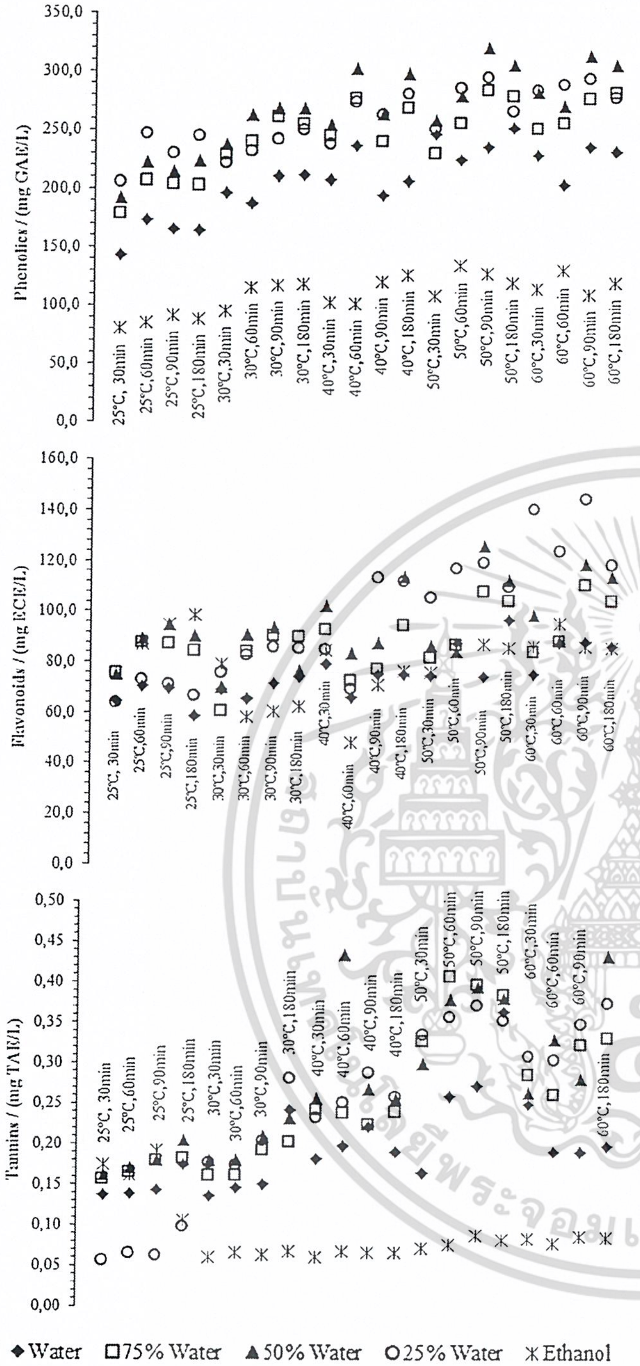


Fig. 2. Effect of solvent, time, and temperature in the extraction yield of total phenolics, flavonoids and tannins contents of the silverskin extracts. ◆water, □ 75% water, ▲ 50% water, ○ 25% water, ⋇ ethanol.

extracts prepared in this work with those of Narita and Inouye (2012) obtained at 25 and 80 °C, during 1 h at normal conditions of pressure (6–7 mg GAE/g of coffee silverskin), we found that the extraction yield could be considerably improved by using a temperature of 50 °C for 30 min (~12 mg GAE/g of coffee silverskin). Nevertheless, Fig. 2 clearly shows that, for the conditions tested in this study, after pure ethanol, 100% water is the worst solvent to extract silverskin bioactive compounds, with the 50w:50e and 25w:75e hydroalcoholic mixtures giving the best results, a fact that

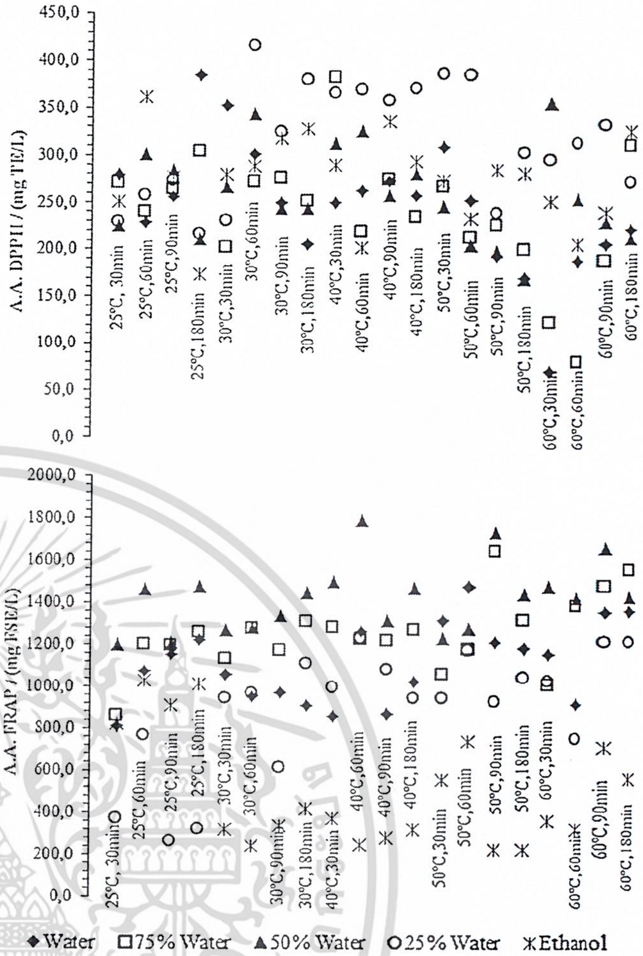


Fig. 3. Effect of solvent, time, and temperature in the antioxidant activity (A.A.) of the silverskin extracts. ◆water, □ 75% water, ▲ 50% water, ○ 25% water, ⋇ ethanol.

is certainly linked with the polarity of the analyzed compounds (Bravo, 1998).

As depicted in Fig. 3, and in accordance with the variations observed for bioactive compounds contents, the extraction conditions also affected significantly the antioxidant capacity of the extracts. Two assays were performed in order to evaluate different and complementary mechanisms of antioxidant action: ferric reducing antioxidant power (FRAP) and DPPH• scavenging ability. In the FRAP assay, the reduction of ferric 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) to a colored product is spectrophotometrically measured. This reaction detects compounds with redox potentials of <0.7 V (the redox potential of Fe^{3+}-TPTZ), being a reasonable screen for the ability to maintain redox status in cells or tissues. The FRAP mechanism is totally electron transfer, therefore this method cannot detect compounds that act by radical quenching (H transfer). On the other hand, in the DPPH• scavenging assay, the radical may be neutralized either by direct reduction via electron transfers or by radical quenching via H atom transfer. This method is based on the measurement of the reducing ability of antioxidants toward DPPH• which can be evaluated by measuring the decrease of its absorbance (Prior et al., 2005).

The extract with the highest DPPH• scavenging ability (416 ± 4.2 mg ET/L) was obtained using the following conditions: 25%w:75%e/30 °C/60 min. In a general way, the best results for DPPH• inhibition were achieved with this hydroalcoholic mixture, as was also previously observed for flavonoids contents,

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

although no correlation was found between results of both parameters ($r = 0.048$). In what concerns to the FRAP assay, values exceeding 1700 mg SFE/L were found in the extracts obtained with 50%w:50%e/40 °C/60 min and 50%w:50%e/50 °C/90 min. These conditions were also among the best options to extract total phenolics and tannins. On the other hand, pure ethanol lead to inferior values in the FRAP assay. A similar behavior was observed for tannins: when extraction was carried out at ambient temperature (25 °C), 25%w:75%e was the worst extracting solvent while for the remaining temperatures/times of extraction, pure ethanol provided the lowest results. Nevertheless, considering all the results together, FRAP levels were more correlated with total phenolics ($r = 0.688$) and tannins ($r = 0.686$) than with flavonoids ($r = 0.376$).

In what concerns to the temperature of extraction, its increase for a given solvent/contact time improved the extraction yield of total phenolics and flavonoids, and increased the reducing power of the extract. In the case of tannins, this tendency was reversed at temperatures above 50 °C. The DPPH• scavenging activity was the only parameter that decreased with higher temperatures of extraction. As no correlation was observed between the results of the DPPH• assay and the contents of the analyzed compounds ($r = -0.053$, 0.048, and -0.083, for total phenolics, flavonoids, and tannins, respectively), other compounds present in coffee silverskin should be responsible for the antiradical activity of the extracts, namely melanoidins. Indeed, these compounds (which are Maillard products generated during the coffee roast) have their antioxidant properties well characterized and have been identified not only in coffee beverages (Nunes and Coimbra, 2007), but also in coffee silverskin (Borrelli et al., 2004). Such lack of correlation was also previously observed for coffee beverages prepared from beans roasted at different degrees (Alves et al., 2010), where a decrease in phenolic contents (due to thermal degradation) was not tracked by DPPH• assay values that were maintained or even increased, being suggested the involvement of melanoidins in this occurrence. Narita and Inouye (2012) also found that, at normal conditions of pressure, the increase of temperature did not improve the results in the DPPH assay. In fact, they found similar values when aqueous extracts were prepared at 25 °C and 80 °C (74–75 μmol TE/g of extract), obtaining an improvement of the extraction yield only at subcritical conditions. Regarding other matrices, some authors (Sasidharan and Menon, 2011; Chew et al., 2011) also reported that the extracting temperature had a negative effect on DPPH• scavenging activity. Chew et al. (2011) described that although the recovery of phenolic compounds increased linearly with extraction temperature, the antioxidant capacities of extracts from *Centella asiatica* decreased when the extraction temperature was higher than 45 °C. Probably, the compounds extracted at higher temperatures have lower anti-radical capacity as compared to those extracted at lower temperatures.

The effect of contact time appeared to depend on temperature. It was generally noticed that, at room temperature and above 50 °C, the extraction time did not influence the levels of the bioactive compounds nor the antioxidant activity of the extracts, while for intermediate temperatures (30, 40 and 50 °C), an increase in the contact time tendentially improved the performance in all parameters (except for the reducing power, whose value did not seem to be affected by this operating variable). At higher extraction temperatures, the contact time had a negative impact on the DPPH• scavenging ability of the extracts. It has been reported that an extended extraction time could lead to a higher oxygen exposure (Naczk and Shahidi, 2004; Chirinos et al., 2007). In this case, it is possible that some degree of oxidation on anti-radical compounds from silverskin may occur.

These trends are confirmed statistically by the results of a multivariate regression analysis (Table 1).

The regression models are all significant ($p < 0.001$) despite explaining always less than 40% of the total variance. P-values also indicate that the operating variable "time of extraction" is not a significant predictor in the case of the dependent variables: phenolics, DPPH• inhibition and FRAP. The sign of the regression coefficients indicates that the reducing power of the extract increases with contact time and water concentration in the solvent mixture. On the other hand, flavonoids and the DPPH• inhibition increases slightly with decreasing concentration of water in the extracting solvent mixture. Notice, however that pure ethanol was, in general, the worst extracting solvent for all the groups of compounds analyzed. Increasing the temperature of the extraction has a beneficial effect on the extract yield of phenolics (1.54 mg GAE/L/°C), flavonoids (0.72 mg GAE/L/°C) and FRAP (4.70 mg GAE/L/°C), but reduces the extract DPPH• radical scavenging capacity in 1.22 mg GAE/L/°C). A Cluster analysis, considering as variables all the extract parameters, showed that the extraction operating conditions can be allocated into 8 groups according to the dendrogram presented in Fig. 4. As can be seen, most of the operating conditions vectors (solvent, temperature, contact time), where the extracting solvent was water are included in Cluster 1. In contrast, the Clusters 5, 6, and 8, which are situated on the opposite side of the dendrogram, comprise vectors of operating conditions wherein the solvent is ethanol or mostly ethanol. Therefore, it may be concluded that the variable solvent is determining in the yields of the several extract parameters, something that the graphical representation of the raw data presented in Figs. 2 and 3 and the multivariable regression analysis already indicated. Clusters 2, 3 and 4 are composed of vectors of intermediate operating conditions (75%w/25%e or 50%w/50%e, 40 °C < temperature < 60 °C, 30 < contact time < 90). Finally, Cluster 7 includes only one set of operating conditions (ethanol, 25 °C, 180 min.). These Clusters (2, 3, 4, and 7) are close in the dendrogram, suggesting that to obtain a similar overall performance with ethanol to that obtained with 50%w/50%e, it is required a considerable increase of the extraction time. Through a MANOVA analysis using the extract concentration of phenolics, flavonoids, tannins, and the two measures of antioxidant activity as dependent variables, it was concluded that these Clusters of operating conditions are statistically different (Pillai's trace = 1.103, $p < 0.001$, Observed power = 1) (Table 2).

It was noted that FRAP values varied more between Clusters, ranging from 305.9 (Cluster 5) to 1791.90 mg SFE/L (Cluster 4). The yield in phenolics also varied considerably from Cluster to Cluster. On the other hand, the flavonoids yield is the parameter for which differences among Clusters are less noticeable. Taking into account the yield in each of the dependent variables, the Clusters may be arranged as follows:

Phenolics:
Cluster 2 ~ Cluster 4 > Cluster 3 > Cluster 6 > Cluster 1 ≫ Cluster 5 > Cluster 8 > Cluster 7
Flavonoid:
Cluster 2 > Cluster 7 > Cluster 1 ~ Cluster 6 ~ Cluster 3 = Cluster 4 ~ Cluster 8 > Cluster 5
Tannins:
Cluster 4 > Cluster 2 > Cluster 3 > Cluster 1 > Cluster 6 ≫ Cluster 7 > Cluster 8 = Cluster 5
DPPH• scavenging activity:
Cluster 4 ~ Cluster 6 ≫ Cluster 8 > Cluster 5 ~ Cluster 1 > Cluster 2 ≫ Cluster 7 > Cluster 3
FRAP:
Cluster 4 > Cluster 2 ≫ Cluster 1 > Cluster 7 ~ Cluster 3 ≫ Cluster 6 > Cluster 8 ≫ Cluster 5

The operating conditions corresponding to Cluster 4 (50%w:50%e/40 °C/60 min) stand out in the extraction yield of

ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 1
Multivariable regression statistics.

Variable	Total phenolics (mg GAE/L) (R^2 = 0.269)			Flavonoids (mg ECE/L) (R^2 = 0.298)			Tannins (mg TAE/L) (R^2 = 0.320)		
	β	95% IC	p	β	95%z IC	p	β	95% IC	p
			<0.001			<0.001			<0.001
Constant	106.93	76.28 to 137.58	<0.001	55.33	46.60 to 64.06	<0.001	–	−0.052 to 0.042	0.834
Temperature/°C	1.54	0.94 to 2.14	<0.001	0.72	0.55 to 0.89	<0.001	0.004	0.003 to 0.005	<0.001
Time/min	0.12	−0.02 to 0.26	0.081	0.06	0.02 to 0.10	0.003	0.000	0.000 to 0.000	0.024
% Water	0.73	0.51 to 0.95	<0.001	−0.069	−0.13 to −0.01	0.029	0.001	0.001 to 0.001	<0.001

Variable	DPPH (mg TE/L) (R^2 = 0.116)			FRAP (mg SFE/L) (R^2 = 0.333)		
	β	95% IC	p	β	95% IC	p
			<0.001			<0.001
Constant	347.16	308.9 to 385.4	<0.001	475.04	290.59 to 659.48	<0.001
Temperature/°C	−1.22	−1.97 to −0.47	0.002	4.70	1.07 to 8.32	0.011
Time/min	−0.04	−0.21 to 0.13	0.632	0.58	−0.25 to 1.40	0.169
% Water	−0.54	−0.81 to −0.26	<0.001	6.29	4.98 to 7.60	<0.001

Independent variables: % water in extraction solvent, temperature and contact time. Dependent variables: extract antioxidant activity (DPPH and FRAP) and concentration of bioactive compounds (total phenolics, flavonoids and tannins).
R^2 is the coefficient of determination; β represents the regression coefficients; the p-values are associated with the hypothesis that the coefficients are not significantly different from zero. 95% IC stands for 95% confidence interval for the β's.

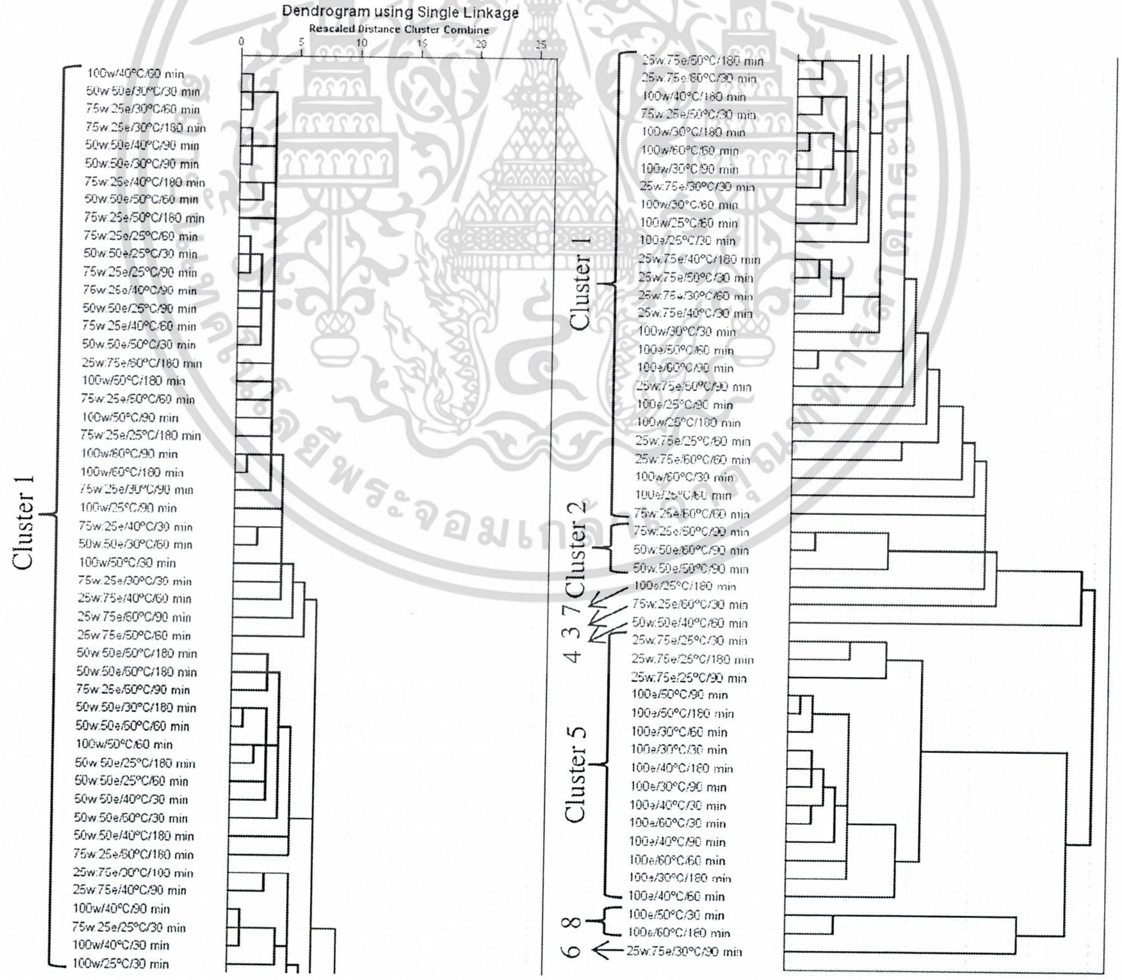


Fig. 4. Dendrogram resulting from a cluster analysis of the extraction operating conditions considering the bioactive compounds concentration in the extracts and their antioxidant capacity as variables.

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 2
Mean values (± standard deviation) of the levels of bioactive compounds and antioxidant activity for the several Clusters of extraction conditions.

Cluster	Phenolics (mg GAE/L)	Flavonoids (mg ECE/L)	Tannins (mg TAE/L)	DPPH (mg TE/L)	FRAP (mg SFE/L)
1	$232.4 \pm 50.6^{a,b}$	$88.6 \pm 18.3^{a,b}$	$0.23 \pm 0.08^{b,c,d}$	$268.1 \pm 75.4^{a,b}$	$1161.2 \pm 239.1^{b,c}$
2	305.8 ± 18.1^{a}	117.3 ± 9.4^{a}	$0.36 \pm 0.06^{a,b}$	$217.0 \pm 27.8^{a,b}$	$1677.6 \pm 236.0^{a,b}$
3	$250.6 \pm 12.8^{a,b}$	$83.8 \pm 8.7^{a,b}$	$0.28 \pm 0.04^{a,b,c}$	121.5 ± 36.1^{b}	$1006.2 \pm 35.4^{c,d}$
4	302.5 ± 7.1^{a}	$83.0 \pm 1.4^{a,b}$	0.43 ± 0.06^{a}	326.0 ± 5.7^{a}	1791.9 ± 126.3^{a}
5	$137.5 \pm 46.8^{b,c}$	72.9 ± 13.5^{b}	0.07 ± 0.01^{d}	$271.5 \pm 55.6^{a,b}$	305.9 ± 78.7^{e}
6	$241.2 \pm 3.2^{a,b}$	$85.5 \pm 14.8^{a,b}$	$0.20 \pm 0.03^{b,c,d}$	324.5 ± 36.1^{a}	$609.7 \pm 242.5^{d,e}$
7	87.7 ± 1.4^{c}	$98.4 \pm 1.1^{a,b}$	$0.11 \pm 0.02^{c,d}$	$173.5 \pm 16.3^{a,b}$	$1013.3 \pm 75.7^{c,d}$
8	113.4 ± 7.1^{c}	$80.8 \pm 6.4^{a,b}$	0.08 ± 0.01^{d}	299.0 ± 49.2^{a}	$556.2 \pm 133.3^{d,e}$

In each column, values having at least one same superscript are not significantly different from each other ($p < 0.05$).

tannins and antioxidant activity. With regard to phenolic yield, are only surpassed by the conditions of Cluster 2 (75%w:25%e/50 °C/90 min; 50%w:50%e/60 °C/90 min; 50%w:50%e/50 °C/90 min). It is only in terms of flavonoids yield that the operating conditions corresponding to Cluster 4 are not among the best. The operating conditions that comprise the Cluster 2 are, after those of 4, the ones that provide better yields. In fact, they exceed the Cluster 4 conditions regarding the yield of flavonoids and phenolics. On the other hand, as previously mentioned, the set of operating conditions that are included in the Clusters 5 and 8 (mainly pure ethanol as solvent) were those that produce, in general, the worst yields. These differences should be mainly associated, as already discussed, with the polarity of the analyzed compounds.

4. Conclusion

Industrial waste production is a problem that affects the society in general. With regard to the coffee industry, several valorization procedures for different by-products are described in literature, nevertheless, the process sustainability is not always taken into consideration, and the options are often not viable from an energetic, economical or environmental point of view.

The present study aimed to select the optimal conditions for extracting antioxidant compounds from coffee silverskin, a main by-product of coffee torrefaction industry. The best set of conditions was variable according to the parameter analyzed (total phenolics, tannins, flavonoids or antioxidant capacity).

The highest phenolic content was obtained using a hydroalcoholic mixture (50%w:50%e), at 50 °C, during 90 min. On the other hand, 25%w:75%e/60 °C/90 min was the set of conditions that allowed a significantly higher extraction of flavonoids. The highest tannins concentration was attained with 50%w:50%e/40 °C/60 min. The extract with the highest DPPH• scavenging ability was obtained using the following conditions: 25%w:75%e/30 °C/60 min. Regarding the FRAP values, the highest ones were achieved using 50%w:50%e/40 °C/60 min.

Nevertheless, in a sustainable perspective, it is possible to attain a compromise between the extraction conditions and the richness of the extract in antioxidants. Using a hydroalcoholic solvent (50%w:50%e), at 40 °C during 60 min, it is possible to obtain an extract rich in phenolic compounds, containing an average concentration of 302.5 ± 7.1 mg GAE/L total phenolics, 83.0 ± 1.4 mg ECE/L flavonoids and 0.43 ± 0.06 mg TAE/L tannins, and exhibiting high antioxidant capacity, saving simultaneously time and energy, compared with other conditions analyzed. Two other aspects of the extraction process studied that deserve to be highlighted are the fact that the recovery of the solvents used is relatively straightforward, which represents a plus in terms of sustainability, and that it is not necessary to separate silverskin batches according to the variety of coffee bean, since the composition of the extracts is not significantly affected by the composition of the samples (data not shown). This can make the extraction process more expedite.

Acknowledgments

This work has been supported by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) (PEst-C/EQB/LA0006/2013) and by QREN (NORTE-07-0124-FEDER-000069-CIÊNCIA DO ALIMENTO). R.C. Alves is grateful to FCT for a post-doc (SFRH/BPD/68883/2010) grant financed by POPH-QREN and subsidized by FSE and MCTES.

References

Adi, A.J., Noor, Z.M., 2009. Waste recycling: utilization of coffee grounds and kitchen waste in vermicomposting. Biores. Technol. 100, 1027–1030.

Alves, R.C., Costa, A.S.G., Jerez, M., Casal, S., Sineiro, J., Núñez, M., Oliveira, M.B.P.P., 2010. Antiradical activity, phenolics profile and hydroxymethylfurfural in expresso coffee: influence of technological factors. J. Agric. Food Chem. 58, 12221–12229.

Barroso, M., Noronha, J., Delerue-Matos, C., Oliveira, M.B.P.P., 2011. Flavored waters: influence of ingredients on antioxidant capacity and terpenoid profile by HS-SPME/GC–MS. J. Agric. Food Chem. 59, 5062–5072.

Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal. Biochem. 239, 70–76.

Borrelli, R.C., Esposito, F., Napolitano, A., Ritieni, A., Fogliano, V., 2004. Characterization of a new potential functional ingredient: coffee silverskin. J. Agric. Food Chem. 52, 1338–1343.

Bravo, L., 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr. Rev. 56, 317–333.

Chew, K.K., Ng, S.Y., Thoo, Y.Y., Khoo, M.Z., Wan Aida, W.M., Ho, C.W., 2011. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts. Int. Food Res. J. 18, 571–578.

Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., Larondelle, Y., 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz and Pavón) tubers. Sep. Purif. Technol. 55, 217–225.

Chung, K.T., Wong, T.Y., Wei, C.I., Huang, Y.W., Lin, Y., 1998. Tannins and human health: a review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 38, 421–464.

Dai, J., Mumper, R.J., 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules 15, 7313–7352.

Fenoll, J., Ruiz, E., Flores, P., Vela, N., Hellín, P., Navarro, S., 2011. Use of farming and agro-industrial wastes as versatile barriers in reducing pesticide leaching through soil columns. J. Hazard. Mater. 187, 206–212.

Gouvea, B.M., Torres, C., Franca, A.S., Oliveira, L.S., Oliveira, E.S., 2009. Feasibility of ethanol production from coffee husks. Biotechnol. Lett. 31, 1315–1319.

Kondamudi, N., Mohapatra, S.K., Misra, M., 2008. Spent coffee grounds as a versatile source of green energy. J. Agric. Food Chem. 56, 11757–11760.

Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E., Etherton, T.D., 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. Am. J. Med. 113, 71S–88S.

Lima, M.B., Andrade, S.I., Harding, D.P., Pistonesi, M.F., Band, B.S., Araújo, M.C., 2012. Turbidimetric and photometric determination of total tannins in tea using a micro-flow-batch analyzer. Talanta 88, 717–723.

Murthy, P.S., Naidu, M.M., 2012. Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. Food Bioprocess Technol. 5, 897–903.

Mussatto, S.I., Machado, E.M.S., Martins, S., Teixeira, J.A., 2011. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. Food Bioprocess Technol. 4, 661–672.

Naczk, M., Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. J. Chrom. A 1054, 95–111.

Napolitano, A., Fogliano, V., Tafuri, A., Ritieni, A., 2007. Natural occurrence of ochratoxin A and antioxidant activities of green and roasted coffees and corresponding byproducts. J. Agric. Food Chem. 55, 10499–10504.

Narita, Y., Inouye, K., 2012. High antioxidant activity of coffee silverskin extracts obtained by the treatment of coffee silverskin with subcritical water. Food Chem. 135, 943–949.

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Food Research International 61 (2014) 16–22

Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Review

Review on utilization and composition of coffee silverskin

Yusaku Narita [b], Kuniyo Inouye [a,*]

[a] Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan
[b] R&D Center, UCC Ueshima Coffee Co., Ltd., 3-1-4 Zushi, Takatsuki-shi, Osaka 569-0036, Japan

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 June 2013
Received in revised form 9 January 2014
Accepted 9 January 2014
Available online 17 January 2014

Keywords:
Coffee
Coffee silverskin
By-product
Composition
Review

ABSTRACT

Coffee is one of the most frequently consumed drinks in the world. Coffee silverskin (CS) is the only by-product produced during the coffee beans roasting process, and large amounts of CS are produced by roasters in coffee-consuming countries. However, methods for the effective utilization of CS have not been developed. Reuse of CS, which is the primary residue from the coffee industry, is important for the environment and economy. Recently, there have been some attempts to reuse CS for biological materials and as a nutrient source for solid-state fermentation. The purpose of this review is to provide an overview about CS, its chemical composition, biological activity, and attempts at its reuse.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction . . . 16
1.1. Coffee . . . 16
1.2. Coffee silverskin . . . 17
2. Chemical composition of CS . . . 17
2.1. Dietary fiber in CS . . . 17
2.2. Protein, fat, and ash in CS . . . 18
2.3. Summary of chapter 2 . . . 18
3. CS water extracts . . . 18
3.1. Yields of soluble solid from CS . . . 18
3.2. Yields of proteins, carbohydrates, caffeine, and total phenolics from CS . . . 19
3.3. Summary of chapter 3 . . . 19
4. Bioactivity of CS . . . 20
4.1. Antioxidant effect of CS . . . 20
4.2. Prebiotic effect and inhibitory activity on hyaluronidase by CS . . . 20
4.3. Summary of chapter 4 . . . 20
5. Solid-state fermentation using CS . . . 20
6. Conclusion . . . 20
References . . . 21

1. Introduction

1.1. Coffee

Coffee is one of the most frequently consumed drinks in the world. Approximately 7 million tons of green coffee beans were produced globally in 2010 (Food and Agricultural Organization). With the increase in the number of coffee consumers in both importing and exporting countries, annual coffee production has increased. Coffee is grown primarily in the area between the 25°N latitude and the 25°S

Abbreviations: CS, Coffee silverskin; CGAs, Chlorogenic acids; 5-CQA, 5-Caffeoylquinic acid; 5-HMF, 5-(Hydroxymethyl)-2-furfural.

* Corresponding author. Tel.: +81 75 753 6266; fax: +81 75 753 6265.
E-mail addresses: yuusaku-narita@ucc.co.jp (Y. Narita), inouye@kais.kais.kyoto-u.ac.jp (K. Inouye).

0963-9969/$ – see front matter © 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.023

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

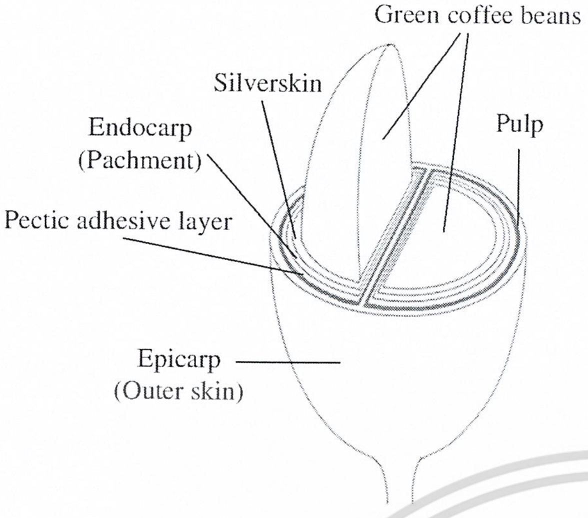


Fig. 1. Typical section of a coffee cherry.

latitude, known as "the coffee belt". More than 60 countries produce green coffee beans (Lashermes, Andrade, & Etienne, 2008; Vieira, 2008). Brazil is the global leader in production of green coffee beans, followed by Vietnam, Indonesia, Colombia, and India (Bacon, 2005; United States Department of Agriculture).

Coffee plants belong to the botanical family Rubiaceae, which includes approximately 80 species. Two major coffee species are cultivated for drinking. *Coffea arabica*, known as arabica coffee, accounts for approximately 75% of global coffee production and *C. canephora*, known as robusta coffee, accounts for approximately 24% of global coffee production (Bertrand, Ramirez, Topart, & Anthony, 2002; Casal, Oliveira, Alves, & Ferreira, 2000; van Boxtel, Berthouly, Carasco, Dufour, & Eskes, 1995). Coffee beans are roasted using dry heat at temperatures between 200 °C and 300 °C with constant agitation to ensure even heating. During roasting, the color of green coffee beans shifts to yellow, then to a suntan-like light brown, and later to a dark, oily brown color. Some of the natural sugars in the beans are transformed into CO_2 gas, and others are caramelized into the complex flavor essences that contribute to good taste and color. Chlorogenic acid lactones produced from chlorogenic acids (CGAs) by roasting green coffee beans has contributed to the bitter taste of brewed coffee (Farah, de Paulis, Moreira, Trugo, & Martin, 2006; Farah, de Paulis, Trugo, & Martin, 2005). In recent years, in addition to studies of taste and flavor, attention has been focused on the biological activities of coffee ingredient. In particular, it has been reported that CGAs have various bioactivities, such as antioxidant activity (Iwai, Kishimoto, Kakino, Mochida, & Fujita, 2004), α-amylase inhibition (Narita & Inouye, 2009, 2011), lipase inhibition (Narita, Iwai, Fukunaga, & Nakagiri, 2012), antihyperglycemic effects (Iwai et al., 2012), and other activities.

1.2. Coffee silverskin

Fig. 1 shows the structure of the fruit (coffee cherry) of the coffee tree (Saenger, Hartge, Werther, Ogada, & Siagi, 2001). The coffee cherry is oval and approximately 10 mm in size. Green coffee beans exist inward in the coffee cherry and are covered by a thin seed skin known as coffee silverskin (CS), an endocarp called the parchment, a pectic adhesive layer, pulp, and epicarp (outer skin) in the order (Saenger et al., 2001). Green coffee beans are generally produced via two processes, purification and thresh process (Bytof, Knopp, Schieberle, Teutsch, & Selmar, 2005; Bytof et al., 2007; Casal et al., 2004; Knopp, Bytof, & Selmar, 2006). For the purification process, two methods generally are used. One is the "washed" or "wet" method and the other is "unwashed", "natural" or "dry" method. In general, more CS is obtained from green coffee beans purified by the dry method than from those purified by the wet method. The outer skin, pulp, pectic adhesive layer, and parchment are completely removed from the green coffee beans in these two processes. However, a portion of CS remains with the green coffee beans after their treatment. The green coffee beans with attached CS are exported to consuming countries from producing countries, and the beans are roasted by suppliers in the consuming countries. Thus, CS is the only by-product produced in the roasting process, and large amounts of CS are produced by large-scale coffee roasters in consuming countries.

Many research groups are focusing on the utilization of coffee wastes that are by-products of the coffee brewing process as source of sugars, minerals and fibers; as alternative renewable energy sources (bio-diesel oil and bio-ethanol); and as electrode materials (Al-Hamamre, Foerster, Hartmann, Kroger, & Kaltschmitt, 2012; Kondamudi, Mohapatra, & Misra, 2008; Mussatto, Carneiro, Silva, Roberto, & Teixeira, 2011; Rufford, Hulicova-Jurcakova, Zhu, & Lu, 2008). Studies on the utilization of coffee waste have advanced worldwide (Esquivel & Jimenez, 2012; Murthy & Naidu, 2012; Mussatto, Machado, Martins, & Teixeira, 2011), but methods for the effective utilization of CS have not been developed. Thus, most CS is disposed of as industrial waste. CS is the only by-product of the coffee bean roasting process, and CS can only be collected in large amounts from roasting factories. Therefore, CS is a resource that may be easy to reuse, and it can be regarded as biomass that is expected to be utilized in the future.

2. Chemical composition of CS

2.1. Dietary fiber in CS

CS ingredients and the amounts thus far reported are summarized into Table 1. Dietary fiber is important for nutrition and health and is used as a therapeutic material for physiological problems such as diabetes and hyperlipidemia (Saura-Calixto, Garcia-Alonso, Goni, & Bravo, 2000). It is thought that dietary fiber will help in preventing cardiovascular disorders by arteriosclerosis or the serious complications of diabetes, because this controls the absorption of cholesterol and fat into the body by adsorbing them. CS has a high dietary fiber (50–60%), which includes 15% soluble dietary fiber and 85% insoluble dietary fiber (Borrelli, Esposito, Napolitano, Ritieni, & Fogliano, 2004; Napolitano, Fogliano, Tafuri, & Ritieni, 2007; Napolitano et al., 2006; Pourfarzad, Mahdavian-Mehr, & Sedaghat, 2013). Napolitano et al. (2007) investigated CS dietary fiber obtained from four types of *C. arabica* samples from Ethiopia, Santos, India, and Costa Rica, and three types of *C. canephora* samples from Ivory Coast, Vietnam, and Cameroon. They reported that there were no significant differences in the dietary fiber and soluble dietary fiber contents between all samples tested. The dietary fiber content of CS is higher than that of dietary plant foods such as apple (28.43%), Broccoli (28.94%), cabbage (22.41%), carrot (28.4%), wheat bran (41.97%), oat bran (28.60%), and potato (2.85%) (Anderson & Bridges, 1988; Chen, Rubenthaler, Leung, & Baranowski, 1988; Southgate, 1978). It has been reported that insoluble dietary fiber shortens intestinal transit, thereby allowing less time for carbohydrates to be absorbed (Montonen, Knekt, Jarvinen, Aromaa, & Reunanen, 2003). Insoluble dietary fiber is considered effective for prevention and remedial treatment of diabetes by controlling the carbohydrate absorption time (Hayashi et al., 2010; van de Laar et al., 2005). Therefore, CS consumption may be effective for the prevention and treatment of diabetes. However, this is the possibility suggested from the results obtained from an in vitro experiment, and in vivo experiment is necessary in order to confirm the presence or absence of the effects. Before that, it is necessary to confirm that there is no toxicity from intake of CS for humans. Recently, Lang et al. reported that 2-*O*-β-D-glucopyranosyl-carboxyatractyligenin, which is a kind of aminoglycoside and inhibits

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ATP-production in isolated mitochondria by blockage of adenine nucleotide translocase, was found in raw coffee bean (Lang et al., 2013).

In general, plant dietary fiber consists of hemicelluloses, cellulose, lignin, oligosaccharides, polysaccharides, pectins, gums, and waxes (Harris & Smith, 2006; Lecumberri et al., 2007; Rodriguez, Jimenez, Bolanos, Guillen, & Heredia, 2006). It is reported that 34.6–80.5% of carbohydrates are included in CS (Borrelli et al., 2004; Napolitano et al., 2006, 2007; Pourfarzad et al., 2013). CS contains approximately 30% lignin, and the polysaccharides in CS are 17.8% glucan, 4.7% xylan, 2% arabinan, 3.8% galactan, and 2.6% mannan (Mussatto, Machado, Carneiro, & Teixeira, 2012). It is suggested that CS has little monosaccharide contents because the contents of reducing sugars was low (Borrelli et al., 2004; Napolitano et al., 2006).

2.2. Protein, fat, and ash in CS

CS contains protein, fat, and ash, at 16.2–19.0%, 1.56–3.28%, and 7%, respectively (Borrelli et al., 2004; Napolitano et al., 2006, 2007; Pourfarzad et al., 2013). The total mineral contents of green coffee beans are approximately 4% (w/w dry matter) (Clarke & Walker, 1974; Grembecka, Malinowska, & Szefer, 2007). It is reported that mineral contents of roasted coffee beans are 4–5% (Franca, Oliveira, Mendonca, & Silva, 2005; Oliveira, Franca, Mendonca, & Barros-Junior, 2006; Tawfik & El Bader, 2005). The main component of mineral in green coffee beans is potassium, and its contents are approximately 40% of the amounts of total mineral (Clarke & Walker, 1974). The compositions of minerals CS have not been clarified so far. de Assuncao et al. (2012) reported that the contents of calcium are higher than potassium in coffee husk. CS has approximately 0.81–1.37% caffeine (Napolitano et al., 2007). Coffee beans contain 1–3% (w/w dry matter) caffeine (Alonso-Salces, Serra, Reniero, & Heberger, 2009; Belay, 2011; Ky et al., 2001). Thus, the caffeine contents of CS are lower than that of coffee beans. Napolitano et al. (2007) investigated seven types of CS from different growing areas and species that differ in their protein, fat, carbohydrate, reducing sugar, caffeine, total dietary fiber, insoluble dietary fiber, and soluble dietary fiber contents. They showed that there were no significant correlations between geographic variety and growth conditions in which CS was produced and the chemical composition of CS.

2.3. Summary of chapter 2

This brief overview describes the CS constituents, and in particular, those that may promote health. There is a possibility that it can be used as a source of dietary fiber and minerals as CS has high contents of these. CS is the major by-product of the roasting process, and easily peels off from roasted coffee beans in the roasting process of green coffee beans. Therefore, it is considered that the amounts of CS ingredients vary with the degree of roasting, because the ingredient contents of roasted coffee beans varies with the degree of roasting (Farah et al., 2005; Somporn, Kamtuo, Theerakulpisut, & Siriamornpun, 2011). We expect to learn more in the future about CS constituents, such as flavor, pigments, and organic acids, and the variety of CS ingredient that differ according to the degree of roasting and the species of green coffee beans.

In the case of using CS to liquid processed products such as beverages and detergents, CS water extracts are more convenient than CS of solid matter. For example, CS has high amounts of dietary fiber of about 50–60 g/100 g (Table 1). However, when the amounts of soluble and insoluble fractions of the dietary fiber in CS are compared, the former is about 1/10 of the latter (Table 1). Then, we summarized CS water extracts in next subject.

3. CS water extracts

3.1. Yields of soluble solid from CS

It has been reported that yields of soluble solid obtained from CS by water extraction change with the extraction temperature (Furusawa, Narita, Iwai, Fukunaga, & Nakagiri, 2011; Narita & Inouye, 2012). The yields with extraction at 25 °C and 80 °C were 16% (w/w dry matter) and 19% (w/w dry matter), respectively (Furusawa et al., 2011; Narita & Inouye, 2012). Furusawa et al. (2011) reported that the amounts of total sugars in CS water extracts were 29.5% (w/w dry matter) and that the extracts contained acidic polysaccharides. It has been suggested that these polysaccharides are pectic substances because they have a high uronic acid content (Furusawa et al., 2011).

Water maintained in the liquid state with pressure at temperatures ranging between 100 °C and 374 °C is called subcritical water. The

Table 1
Coffee silverskin nutritional composition (g per 100 g).

Component	CS				
	–	from Arabica	from Canephora	from Arabica	–
Proteins	18.6 ± 0.6	18.6 ± 0.3	17.9–19.0	18.4–19.0	16.2
Fats	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.5	2.50–2.92	1.56–3.28	N. A.
Carbohydrates	62.1 ± 1.6	65.1 ± 1.2	47.0–80.5	34.6–52.0	N. A.
Reducing sugars	0.2 ± 0.01	N. A.	N. D.[b]	N. D.	N. A.
Moisture	7.3 ± 0.4	7.1 ± 0.2	N. A.	N. A.	4.7
Minerals (Ashes)	7.0 ± 0.2	7.0 ± 0.2	N. A.	N. A.	N. A.
Caffeine	N. A.[a]	N. A.	0.81–1.37	0.83–1.16	N. A.
Ochratoxin A	<4 ppb	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
Total dietary fiber	62.4 ± 0.6	62.4 ± 0.5	53.4–69.2	56.4–65.9	N. A.
Insoluble dietary fiber	53.7 ± 0.2	53.7 ± 0.4	48.5–64.2	50.1–60.7	N. A.
Soluble dietary fiber	8.8 ± 0.4	8.8 ± 0.6	4.9–9.3	5.0–6.3	N. A.
Glucan	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	17.8
Xylan	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	4.7
Arabinan	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	2.0
Galactan	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	3.8
Mannan	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	2.6
Lignin	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	30.2
Acetyl groups	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	3.0
Extractives	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	15.0
References	A	B	C	C	D

From Borrelli et al. (2004) and Napolitano et al. (2006) (A), Pourfarzad et al. (2013) (B), Napolitano et al. (2007) (C), and Mussatto et al. (2012) (D).
[a] Not analyzed.
[b] Not detected.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 2
Yields of soluble solid from CS of solid and each component and antioxidant activity of CS water extraction.[a]

Extraction temperature (°C)	Yields of soluble solid (g/100 g)	Proteins (g/100 g)	Carbohydrates (g/100 g)	Caffeine (g/100 g)	Total phenolics (g/100 g)	H-ORAC (μmol TE/g of CS extracts)	DPPH (μmol TE/g of CS extracts)
25	16 ± 1	21.2 ± 1.8	36.6 ± 2.1	2.6 ± 0.0	3.6 ± 0.3	354 ± 44	74 ± 13
80	19 ± 1	23.6 ± 1.2	40.5 ± 3.0	2.3 ± 0.0	3.5 ± 0.1	384 ± 58	75 ± 18
180	25 ± 1	37.8 ± 2.0	47.7 ± 2.9	1.6 ± 0.0	8.5 ± 0.5	1223 ± 65	184 ± 28
210	29 ± 1	53.5 ± 1.4	22.8 ± 5.0	1.4 ± 0.0	12.4 ± 0.9	2321 ± 169	323 ± 39
240	27 ± 1	58.2 ± 1.0	8.6 ± 1.0	1.6 ± 0.0	13.0 ± 0.6	2611 ± 150	371 ± 33
270	23 ± 1	54.4 ± 1.1	7.1 ± 0.6	1.8 ± 0.0	12.3 ± 0.9	2629 ± 193	379 ± 36

[a] From Narita and Inouye (2012).

specific inductive capacity or dielectric constant of water decreases remarkably with increasing temperature (Miller & Hawthorne, 1998). Moreover, subcritical water functions as an acid or alkali catalyst because the ionic product of subcritical water is higher than water under normal temperature and pressure conditions. Recently, subcritical water has been used extensively for research on extracting ingredients from food waste such as okara (Wakita et al., 2004), wheat bran (Kataoka, Wiboonsirikul, Kimura, & Adachi, 2008), and defatted rice bran (Wiboonsirikul et al., 2007). The yields of CS extracts from water treatment increased with extraction temperature from 25 °C to 210 °C and decreased in a temperature-dependent manner in the temperature range of 210–270 °C (Table 2). The highest yields (29%, w/w dry matter) of CS extracts by water treatment were obtained at an extraction temperature of 210 °C and were 1.8-fold higher than that obtained at 25 °C (Narita & Inouye, 2012). We summarized in Table 2 about the chemical composition such as proteins, carbohydrates, caffeine, and total phenolics of the CS water extracts. Table 2 shows that their chemical composition of CS water extracts changes by difference of extraction temperature.

3.2. Yields of proteins, carbohydrates, caffeine, and total phenolics from CS

We converted the yields of proteins, carbohydrates, caffeine, and total phenolics obtained from CS of solid by water extraction using the amounts of each component of CS water extracts and the yields of soluble solids (Table 3). The amounts of protein extracted from CS by the water treatment at 25–80 °C are about 20% of the protein contents in the CS of solid from values in Tables 1 and 3. It is roughly estimated that the proteins nearly 80% was insoluble from this result. The amounts of protein of approximately 80% in CS of solid were extracted by subcritical water treatment at 240 °C. These results indicate that part of the insoluble proteins in CS of solid was hydrolyzed and solubilized. The soluble proteins produced by subcritical water treatment from CS may be used as nutrients or food additives in food, drinks and supplements for human. However, composition of the proteins extracted from CS by subcritical water treatment has not been reported until now. As undermentioned, it has been reported that CS water extracts have antioxidant activities (Narita & Inouye, 2012). It is reported that proteins produced by subcritical water treatment from deoiled rice bran, which is an agro-industrial residue of the rice milling process, showed high antioxidant activity and were proven to be useful for application as a culture medium for yeast growth (Sereewatthanawut et al., 2008). It is reported that the peptides produced by the decomposition of soybean protein and wheat gluten have high antioxidant activity (Park, Morimae, Matsumura, Nakamura, & Sato, 2008). Proteins or peptides produced by subcritical water treatment from CS might have antioxidant activity. The yields of caffeine from CS were almost constant at 0.4% (w/w dry matter) at extraction temperatures in the range of 25–270 °C (Narita & Inouye, 2012). Total phenolic contents of the CS extracts obtained by water treatment increased with increasing extraction temperature from 25 °C to 240 °C (Narita & Inouye, 2012). Subcritical water treatment was effective for the extraction of phenolic components (Narita & Inouye, 2012). 5-Caffeoylquinic acid (5-CQA) was extracted at 0.1–0.2% (w/w dry matter) from CS in the temperature range of 25–180 °C, but it was not extracted in the temperature range of 210–270 °C (Narita & Inouye, 2012). It was considered that 5-CQA in CS was not detected with heat treatment because it was reported that 5-CQA decreased with increasing temperature (de Maria, Trugo, de Mariz e Miranda, & Salvador, 1998) and under alkaline conditions (Narita & Inouye, 2013). Bresciani et al. reported that CS extract, which is prepared using acidified water (1% aqueous formic acid) at 70 °C for 1 h, are included 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 4-feruloylquinic acid (4-FQA), 5-FQA, 3-coumaroylquinic acid (3-CoA), and 5-CoA (Bresciani, Calani, Bruni, Brighenti, & Del Rio, 2014). The content of 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, total of 4-FQA and 5-FQA, 3-CoA, and 5-CoA are 147.8 mg/100 g, 84.9 mg/100 g, 198.9 mg/100 g, 121.6 mg/100 g, 2.4 mg/100 g, and 5.7 mg/100 g, respectively (Bresciani et al., 2014).

The amounts of 5-(hydroxymethyl)-2-furfural (5-HMF) extracted from CS were increased with subcritical water treatment (Narita & Inouye, 2012). 5-HMF is considered a main degradation product formed by dehydration of hexoses through hydrothermolysis (Khajavi, Kimura, Oomori, Matsuno, & Adachi, 2005; Usuki, Kimura, & Adachi, 2008).

Table 3
Yields of each component obtained from CS of solid by water extraction.[a]

Extraction temperature (°C)	Proteins (g/100 g)	Carbohydrates (g/100 g)	Caffeine (g/100 g)	Total phenolics (g/100 g)
25	3.3 ± 0.2	5.7 ± 0.2	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.0
80	4.5 ± 0.3	7.7 ± 0.9	0.4 ± 0.0	0.7 ± 0.0
180	9.5 ± 5.0	12.1 ± 0.9	0.4 ± 0.0	2.2 ± 0.1
210	15.7 ± 0.4	6.7 ± 0.3	0.4 ± 0.0	3.6 ± 0.3
240	15.5 ± 0.7	2.3 ± 0.1	0.4 ± 0.0	3.5 ± 0.2
270	12.5 ± 0.4	1.6 ± 0.1	0.4 ± 0.0	2.8 ± 0.1

[a] From Narita and Inouye (2012).

3.3. Summary of chapter 3

This brief overview of CS extracts sheds light on the extraction of active ingredients from CS. In particular, it is considered that subcritical water treatment is effective for the extraction of active ingredients such as proteins and phenolic components. The extraction of active ingredients from CS using subcritical water without organic solvents and other catalysts is expected to be environment friendly. We expect more investigational advances in the future on the composition of CS and effective methods for extraction of active ingredients from CS.

About utilization of CS, two usages are suggested. One is the use as bioactive substance, and another is solid-state fermentation using CS. We summarized it in a following subject about the study on these usages.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Bioactivity of CS

4.1. Antioxidant effect of CS

Antioxidants exert important effects for human health by reducing oxidative stress because the stress is a factor in the development of various diseases such as cancer (Lambert & Yang, 2003), cardiovascular disease (Diaz, Frei, Vita, & Keaney, 1997), type 2 diabetes (Takayanagi, Inoguchi, & Ohnaka, 2011), Alzheimer's disease (Christen, 2000), and Parkinson's disease (Lang & Lozano, 1998). Borrelli et al. (2004) reported that CS methanol extracts have an antioxidant activity evaluated with ABTS [(2,2′-azobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) radical scavenging ability similar to that of wheat bran, which is known to have very high antioxidant activity (Andlauer & Furst, 1998). It was reported that CS extracts obtained by water treatment at several temperatures also have antioxidant activity (Narita & Inouye, 2012). The antioxidant activity of CS water extracts were evaluated using H-ORAC assay and DPPH assay (Narita & Inouye, 2012). The H-ORAC and DPPH values of CS extracts obtained after water treatment at 25–270 °C increased remarkably with increasing extraction temperatures (Table 2). The highest H-ORAC and DPPH values of CS extracts were observed at 270 °C, and were 379 μmol TE/g of CS extract and 2629 μmol TE/g of CS extract, respectively (Table 2). In regard to the factors H-ORAC values of CS extracts has increased remarkably with increasing extraction temperatures, Narita and Inouye (2012) have mentioned two possibilities. One is the possibility of the phenolic components that the CS water extracts may contribute, another is the possibility that peptides produced by hydrolysing the proteins in CS by subcritical water treatment in the temperature range of 180–270 °C have a high antioxidant activity (Narita & Inouye, 2012). It is reported that the peptides produced by the decomposition of soybean protein and wheat gluten have high antioxidant activity (Park et al., 2008). H-ORAC values of fruits such as blueberry, plum, raspberry, apple, and orange, and vegetables such as carrot, green pepper, and spinach are in the range of 5–70 μmol TE/g (Wu et al., 2004). Even the H-ORAC value (354 μmol TE/g of CS extracts) of CS extracts by treatment water at 25 °C showed that it was higher than that of the above mentioned fruits and vegetables. However, this is the possibility suggested from the results obtained from an in vitro experiment, and in vivo experiment is necessary in order to confirm the presence or absence of the effects. A study to confirm an antioxidant effect of CS will be necessary in vivo experiment in future. Furthermore, identification of ingredients contributing to the antioxidant effect of CS is necessary in in vitro experiments.

4.2. Prebiotic effect and inhibitory activity on hyaluronidase by CS

It has been reported that CS has prebiotic properties and supports the growth of bifidobacteria (Borrelli et al., 2004). However, CS has also found proliferative activity of coliforms weaker than the increase effect of bifidobacteria (Borrelli et al., 2004). The evaluation of these effects for the microbes is the result obtained after fermentation of 24 h. It seems that a detailed study on growth time and species of bacteria is more necessary. Hyaluronidase inhibitors appear to be effective in suppressing allergies and inflammations (Kakegawa, Matsumoto, & Satoh, 1992). Furusawa et al. (2011) reported that the inhibitory effects of CS extracts against hyalurodidase are similar to those of disodium cromoglycate, which is a potent antiallergen.

4.3. Summary of chapter 4

As noted above, antioxidant, prebiotic substance, and hyaluronidase inhibitor are considered as a utilization method of the CS as a bioactive substance. In particular, there is a possibility that CS could be used as a good source of antioxidants. However, there are very few reports about the bioactivity of CS. Moreover, the contributions of CS ingredients to the physiological functions of CS have not been reported, and it appears that further future research is required.

5. Solid-state fermentation using CS

Solid-state fermentation is one of the effective methods for producing or extracting useful ingredients from food and agricultural waste products (Gombert, Pinto, Castilho, & Freire, 1999; Rodriguez Couto & Sanroman, 2005, 2006). Food waste used as biomass is easy to corrupt because microbe growth tends to increase in it. Therefore, food waste can change to materials with various functions by suitable fermentation processing for promoting propagation of microbes. Murthy, Naidu, and Srinivas (2009) reported that α-amylase production by *Neurospora crassa* CFR 308 with CS as a substrate is possible under solid-state fermentation conditions. Fructooligosaccharides (FOS) are produced commercially via enzymatic synthesis from sucrose by β-fructofuranosidase (EC.3.2.1.26) or fructosyltransferase (EC.2.4.1.9) from fungi such as *Aspergillus*, *Aureobasidum*, and *Penicillium* (Balasubramaniem, Nagarajan, & Paramasamy, 2001; Chien, Lee, & Lin, 2001; Mussatto & Teixeira, 2010). Mussatto and Teixeira (2010) reported that high production of fructooligosaccharides by *A. japonicus* under solid-state fermentation was obtained when CS was used as a nutrient source. Machado, Rodriguez-Jasso, Teixeira, and Mussatto (2012) reported that seven fungal strains, including *A. ustus* PSS, *A. niger* AA20, *A. niger* GH1, *A. niger* PSH, *Mucor* Sp. 3P, *N. crassa* ATCC10337, and *Penicillium purpurogenum* GH2 could grow on CS under solid-state conditions. Moreover, *P. purpurogenum* GH2, *N. crassa* ATCC10337, *and Mucor* Sp. 3P were able to release phenolic compounds from CS (Machado et al., 2012). CS is transformed into value-added products by fermentation under solid-state conditions using various fungi.

SSF is very useful as effective use of industrial waste and excels in environmental, economic, and safety aspect, because it requires only minimum quantity of water. Therefore, a seemingly effective utilization method of CS is to use it as a substrate of SSF. FOS is producible by *A. japonicus* under SSF when CS was used as a nutrient source (Mussatto & Teixeira, 2010), and has been shown to beneficially modulate the composition of intestinal bacterial flora and notably to increase bifidobacteria and lactobacilli in vivo (Orrhage, Sjostedt, & Nord, 2000). As mentioned above, it has been reported that CS has prebiotic properties and supports the growth of bifidobacteria (Borrelli et al., 2004). However, the active ingredients in CS are not clear for both production of FOS by SSF with CS and *A. japonicus* and for prebiotic effects of CS. Identification of these active ingredients of CS is necessary in the future.

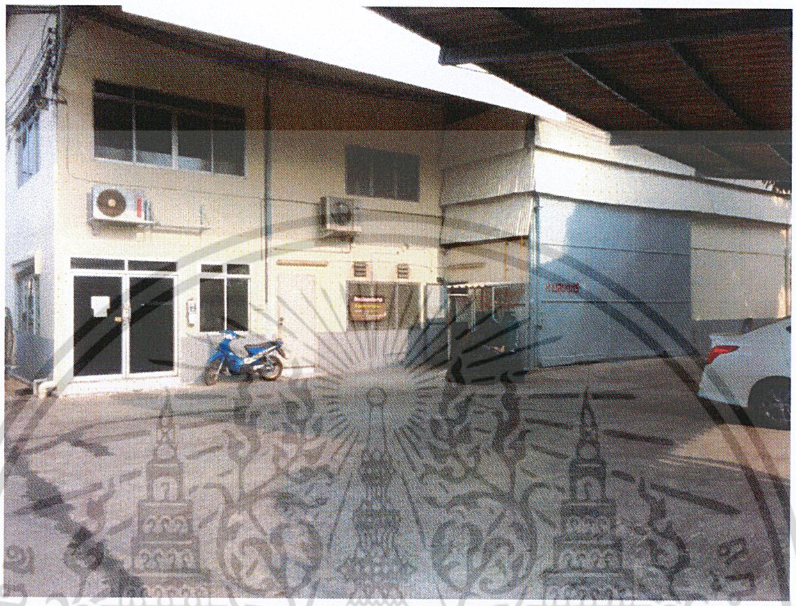
6. Conclusion

Coffee is one of the most frequently consumed drinks in the world. CS is the only by-product produced in the coffee bean roasting process, and large amounts of CS are produced by roasters in consuming countries. Therefore, establishment of effective use of CS is important. Two suggestions are shown for a direction of the utilization of CS. One is the use of CS as a bioactive substance or the source thereof. It is reported that CS has hyaluronidase inhibition, prebiotic properties, and antioxidant activity. Another is the use of CS as a substrate of SSF. It is necessary to identify the active substance in CS against the above-mentioned effects, bioactive activity in particular, in the future. Feasibility will be high if these effects are proved by subsequent experiments such as a large-scale experiment for industrialization and a clinical trial in the future, because there are economic benefits in order that these uses help decrease the cost of disposal of CS.

In order to achieve high utilization of CS as biomass resources, active substances are collected gradually, and the construction of the systematized development system that can finally use it for feed, fertilizer, microbial fermentation materials for biorefinery, and recovery of the energy by combustion is important. In the future, further study on the

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ



รูปโรงงานที่ปฏิบัติงาน

รูปถ่ายร่วมกับโรงงานที่ปฏิบัติงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกา... ...นุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปถ่ายร่วมกับพนักงานโรงงาน

รูปถ่ายร่วมกับผู้นิเทศงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปถ่ายขณะปฏิบัติงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้