

アミノ酸ハイブリット型食塩を用いた塩焙煎コーヒー豆中の成分および ヒストン修飾プロファイルの解析

神平 梨絵¹, 小野澤 真帆¹, 中村 文彬², 中尾 洋一^{1,2}

¹ 早稲田大学理工学術院先進理工学研究科, ² 早稲田大学理工学術院総合研究所

概要

近年, 潜在患者を含め約 4000 万人の高血圧患者が存在すると推定されている日本では, 高血圧に対する塩分の摂取量の関係が原因として挙げられ, 食に関する減塩を求める傾向がみられている。我々はこのような背景のもと, 一般に食卓に用いられる精製塩と比較して 25%NaCl がカットされたアミノ酸ハイブリット型食塩を開発している。NaCl を KCl に置き換えた混合塩の使用によって高血圧の予防につながる可能性が示されているなど, アミノ酸ハイブリット型塩の摂取が高血圧ならびに関連する脳卒中, 心血管系の疾病への予防につながることを期待される。

一方, コーヒーは豆の種類, 焙煎方法, 淹れ方など様々なパターンがあり, 人々の好みに合わせて楽しむことのできる飲料である。一般にコーヒーの成分は眠気を覚ますカフェインが広く知られていたが, その他の成分の機能性も報告されており, コーヒーによる健康増進効果も期待されている。

当研究室が研究開発を行っている塩焙煎コーヒーは, 生豆をアミノ酸ハイブリット型食塩のもととなる海底湧海水に浸漬させたのちに工程を経て焙煎を行う。本研究では, 塩焙煎による成分や味わいのコントロールなど, アミノ酸ハイブリット型食塩の新たな用途開発やコーヒーという身近な飲料から機能性食品開発につながるような知見を得ることを目的とした。

塩焙煎によるコーヒー豆中の成分や生物活性プロファイルを解析するために, 浸漬する時間, 焙煎条件, 抽出条件の検討を行った。各種機器による成分の解析を行い, 成分プロファイリングを試みたところ, 解析の結果から, 一部の有機成分や無機成分に関して含有量の変化が認められ, 海底湧海水による浸漬について, 生豆中の成分を調節する用途が期待される結果となった。また, 機能性に関する知見を得るべく, 分画した抽出物を用いて遺伝子発現のスイッチ機構であるヒストン修飾調節活性(最大24種類)のプロファイルを調べ, 特徴的な変化が認められるか検討を行った。

以上の結果から, アミノ酸ハイブリット型食塩のもととなる海底湧海水を用いて生豆を浸漬するという前処理によって, コーヒー豆に含まれる成分や生物活性に変化が生じることが示唆された。今後はコーヒー成分の解析のためのデータベースの拡充を試み, コーヒーに含まれるより多くの成分の解析を可能にし, 塩焙煎による成分プロファイルの変化の解析と味わいや機能性を解析試みたい。

1. 研究目的

近年, 潜在患者を含めて約 4000 万人の高血圧患者が存在すると推定されている日本では, 高血圧に対する塩分の摂取量の関係が原因として挙げられ, 様々な食に関する減塩を求める傾向がみられている。我々はこのような背景のもと, 一般に食卓に用いられる精製塩

(100%NaCl)と比較して 25%NaCl がカットされたアミノ酸ハイブリット型食塩を開発している。100%NaCl の食塩を摂取した群と, NaCl:KCl(75:25) 摂取した群では脳卒中や心血管系の疾病率, および死亡率が有意に低下する報告¹⁾もあり, NaCl を KCl に置き換えるなど, 混合塩の使用によって高血圧の予防につながる可能性が示

されている。このことから、アミノ酸ハイブリット型塩の摂取が高血圧ならびに関連する脳卒中、心血管系の疾病への予防につながる事が期待される。

一方、コーヒーは豆の種類、焙煎方法、淹れ方など様々なパターンがあり、人々の好みに合わせて楽しむことのできる飲料の一つである。一般に、コーヒーの成分といえば眠気を覚ますカフェイン(caffeine)が広く知られていた。しかしながら、クロロゲン酸のようにカフェイン以外の成分の機能性も報告されており、コーヒーを飲むことによる健康増進効果も期待されている。

塩焙煎では焙煎する前の生豆を、海底湧海水を用いて研ぎ、浸し、洗い流すことなく天日干を経て、焙煎される。この方法で淹れたコーヒーは苦みや酸味が控えめなすっきりとした味わいとなる。当研究室が開発を行っているアミノ酸ハイブリット型食塩はこの海底湧海水を基に作られた塩であり、海底湧海水は外洋の海水と比較してアミ

ノ酸を含み、塩分濃度が低いという特徴を有する。本研究では、生豆を海底湧海水に浸漬させる工程によってコーヒー豆中の成分や機能性に及ぼす影響を代謝産物や生物活性プロファイルを評価し、塩焙煎によって成分や味わいのコントロールをするなど、アミノ酸ハイブリット型食塩の新たな用途やコーヒーという身近な飲料から機能性食品開発につながるような知見を得ることを目的とした。

2. 研究方法

2.1 コーヒー豆中の成分分析に用いるサンプル調製方法の条件検討

成分分析に用いたサンプルの概要について図1に示す。

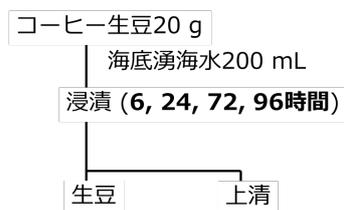
コーヒーに関する研究はさまざま行われているが、使用されている豆の焙煎度合いや抽出方法は定まっていないため、はじめに生豆の浸漬時間、焙煎条件および抽出方法の検討を行った。



図1. 成分分析に用いたサンプル調製の概要

2. 1. 1 浸漬条件の検討

コーヒー生豆 20 g に対して海底湧海水 200 mL を用いて浸漬させた。浸漬条件は 6, 24, 72, 96 時間の 4 点で行い、静置、4°C で浸漬させた(図 2)。浸漬後、生豆と上清に分離し、生豆については表面をキムワイプで拭拭したのち凍結乾燥機で1日乾燥させた。乾燥後、焙煎を行って抽出後、それぞれ逆相 HPLC 分析に付した。ピーク面積の秤量値から生豆および上清に含まれる caffeine の含有量、caffeine 標品を用いた検量線を基に算出して生豆 1 g あたりに換算して caffeine の流出入量の経時変化を解析した。



RP HPLCを行い、
ピーク面積からcaffeine含有量を計算した

図 2. 浸漬時間の条件検討

2. 1. 2 焙煎条件の検討

焙煎条件の検討に用いた条件を表 1 に示す。

(1) 焙煎時間を一定(13分)で温度を X, Y, Z°C に変化させた場合と(2) 焙煎温度は一定(Z°C)で時間を 7, 10, 13 分と変化させた場合と条件を振って焙煎を行った。コーヒー豆の焙煎中に生じる「ハゼ」とは、加熱により豆内部の圧力が上昇し、細胞壁が破裂することで発生する破裂音を指す。温度上昇に伴って第 1 ハゼ、第 2 ハゼが生じ、それぞれ物理的膨張や熱分解を伴い、焙煎の進行度や風味特性の指標として用いられている。そこで焙煎条件の評価には焙煎度合いの均一さとハゼが生じる時間を評価した。

表 1. 焙煎の条件検討

固定した条件	検討項目
時間一定(13分)	温度: X°C, Y°C, Z°C
温度一定(Z°C)	焙煎時間: 7分, 10分, 13分

2. 1. 3 抽出方法・回数の検討

抽出条件の検討では浸漬なしのコーヒー生豆を 230°C で 10 分間焙煎してホモジナイザーによって粉末にした。コーヒー粉末 0.5 g を CHCl₃ 90 mL を用いて抽出する際のメタノールの温度や攪拌条件振った。抽出方法①～③の条件を下記に示す(図 3)。抽出して、抽出物の秤量値を比較した。

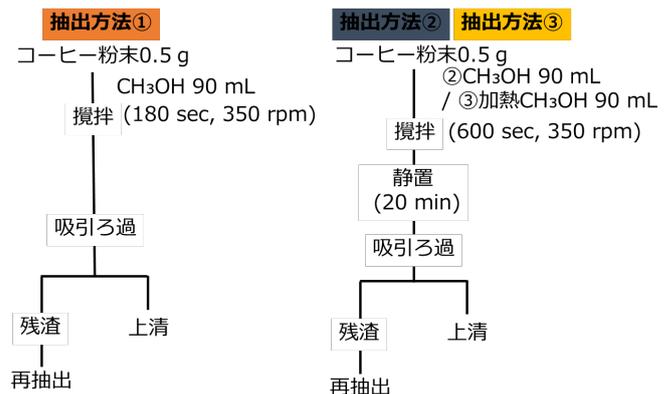


図 3. 抽出方法の条件検討

2. 2 塩焙煎によるコーヒー豆中の成分プロファイルの解析

2. 2. 1 LC/MSMS を用いた成分の解析

LC/MSMS 解析には分離導入部 Vanquish™ Flex UHPLC システム(Thermo Scientific 社)分析部は Orbitrap Exploris™ 120 質量分析計から構成される LC-MS システムを使用した。

2. 1での条件検討から決定した、LC/MS 解析用サンプルの調製方法を図 4 に示す。ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーによって分画したのち CH₃OH 溶出画分を LC/MSMS によって成分分析したが caffeine の含有量が多く、それら以外のマススペクトルがほとんど観測されなかったため、CH₃OH 溶出画分から逆相 HPLC によって caffeine が溶出する時間を取り除いたマイナー画分を調製した。分画した caffeine については、逆相 HPLC に付し、ピーク面積から caffeine を定量した。一方、マイナー画分は LC/MSMS 分析に付し、解析ソフトウェア Compound Discoverer 3.3 Free Style 1.8(Thermo Fisher Scientific 社)を用いた化合物の推定を試みた。

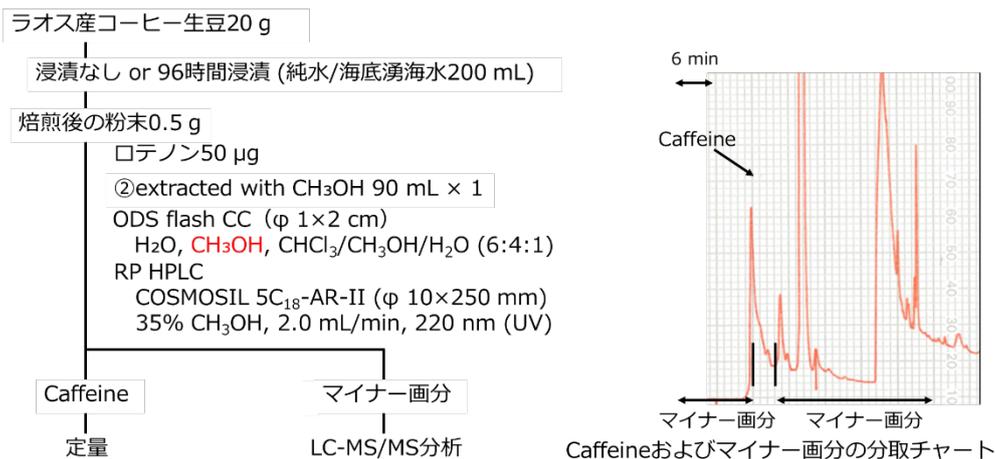


図 4. 解析用サンプルの分画

2. 2. 2 無機成分の分析

浸漬によって変化する生豆に含まれる無機成分の分析は下記手順に従って行った。無機成分の分析には ICP 発光分光分析装置 (ICP-OES: Agilent 5100/5110 ICP-OES) を使用した。浸漬なし又は 24 時間の浸漬後のコーヒー生豆をそれぞれ焙煎した。ICP-OES 測定前にコーヒー粉末 120 mg に 60% HNO₃ と 30% H₂O₂ を加えてマイクロ波試料酸分解法による前処理マイクロウェーブ前処理 (以下 MW 処理) したのち純水に溶解して測定を行った (n = 4)。一方、海底湧海水そのものおよび浸漬に用いたのち生豆とその上清 (海底湧海水) についても測定を行い、浸漬処理によるコーヒー生豆への無機成分の流入出を分析した。

2. 3 ヒストン修飾調節活性試験 (顕微鏡)

2. 3. 1 ヒストン修飾調節活性試験用サンプルの分画

(図 5)

ラオス産コーヒー生豆 20 g を浸漬なし、または 96 時間浸漬 (純水または海底湧海水 200 mL) させたものを焙煎した。焙煎後の粉末約 1.0 g 分 (浸漬なし 1.0001 g, 純水浸漬 0.9987 g, 海底湧海水浸漬 1.0017 g) をそれぞれ CH₃OH 90 mL で抽出後、エバポレーターによって濃縮・乾固した。得られた抽出物は逆相の ODS フラッシュカラムクロマトグラフィー [φ2.0 cm×3 cm; H₂O, CH₃OH (20, 50, 70, 100%, CHCl₃/CH₃OH/H₂O (6:4:1))] によって分画した。得られた画分のうち、CH₃OH (20, 50, 70, 100%, CHCl₃/MeOH/H₂O (6:4:1)) の 5 つの画分を DMSO に溶解して活性試験に使用した。

2. 3. 2 ヒストン修飾調節活性試験 (顕微鏡) (図 6)

ヒストン修飾調節活性試験は、ヒト子宮頸がん細胞由来細胞株 HeLa を用いて行った。HeLa 細胞を 96 ウェルプレートに 5.0 × 10³ cells/well 播種となるように播種し、DMSO に溶解したサンプルを含む培地を添加して 5%CO₂ の下、37°C にて 48 時間培養した。各サンプルの培養液中での終濃度は 10 μg/mL (DMSO 終濃度 0.1%) となるように添加した。上清を除去したのち、4%パラホルムアルデヒド (PFA, 富士フィルム和光純薬工業) 溶液を加えて 10 分間静置し、固定を行った。次に、1% TtitonX-100 (Alfa Aear) による透過処理および Blocking One-P (ナカライテスク) によるブロッキングをそれぞれ 20 分間行った。蛍光標識したヒストン修飾特異的なモノクローナル抗体 (モノクローナル抗体研究所) および核染色試薬 Hoechst33342 を含む染色溶液を加えて 2 時間反応させた。反応後は、PBS 洗浄および PBS 置換を行って、蛍光顕微鏡による撮影を行った。

得られた蛍光画像は画像処理ソフト NIS-Elements (Nikon) を用いて解析することによってヒストン修飾レベルを算出した。コントロール (DMSO) の蛍光強度と比較することで各サンプルによるヒストン修飾調節活性を評価した。

2. 4 スペクトル型セルアナライザー (SONY) を用いたヒストン修飾調節活性試験 (図 7)

スペクトル型セルアナライザーは ID7000 (SONY, 搭載レーザー 405, 488, 561 nm) を使用した。スペクトル型の

セルアナライザーは使用する蛍光色素の蛍光スペクトルの全体を記録して独自のアルゴリズムによる分離(アンミキシング)によって、従来のバンドパスフィルター型のフローサイトメトリーよりもより多くの蛍光色素の識別が可能となっている。本研究では独自に構築したヒストン修飾調節活性試験法の蛍光色素および抗体の組み合わせを用いて 24 種類のヒストン修飾について調節活性による評価を行った。評価するサンプルは 2. 3. 1 で得られた ODS フラッシュカラムクロマトグラフィー分画後の画分のうち、浸漬なしおよび、海底湧海水で浸漬したサンプル $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (6:4:1) 画分を用いた。

ヒストン修飾調節活性試験は、蛍光顕微鏡を用いた活性試験と同様に HeLa 細胞を用いて行った。HeLa 細胞を $\phi 10\text{ cm}$ ディッシュに 1.5×10^6 cells となるように播種し、DMSO に溶解したサンプルを含む培地を添加して 5% CO_2 の下、 37°C にて 48 時間培養した。各サンプル[コントロール DMSO, 浸漬なしの焙煎後のコーヒー豆由来 $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (6:4:1) 画分, 海底湧海水浸漬処理した $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (6:4:1) 画分]の培養液中での終濃度は $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ (DMSO 終濃度 0.1%) となるように添

加した ($n=3$)。48 時間の培養後、PBS 洗浄後、0.25%トリプシン溶液(富士フィルム和光純薬工業)を用いて CO_2 の下、 37°C で 5 分間インキュベートした。培地を加えてトリプシンの活性を止め、細胞を 15 mL チューブに回収した後、1000 rpm 5 分間遠心した。上清除去と PBS 洗浄を行って、4%パラホルムアルデヒド(PFA, 富士フィルム和光純薬工業)溶液を加えて 10 分間静置し、固定を行った。次に、1% TtitonX-100 (Alfa Aear) による透過処理および Blocking One-P(ナカライテスク)によるブロッキングをそれぞれ 20 分間行った。ブロッキング後の細胞を 3 等分して蛍光標識したヒストン修飾特異的なモノクローナル抗体(モノクローナル抗体研究所)を含む染色試薬(Set1 ~ Set3)をそれぞれ加えて 2 時間反応させた。抗原-抗体反応後に、遠心を伴う PBS 洗浄を 2 回行って PBS に懸濁し、 $41\ \mu\text{m}$ のナイロンメッシュを通し、スペクトル型セルアナライザーによる測定および解析を行った。各蛍光色素による平均蛍光強度をコントロール(DMSO)の蛍光強度と比較することで各サンプルによるヒストン修飾調節活性を評価した。

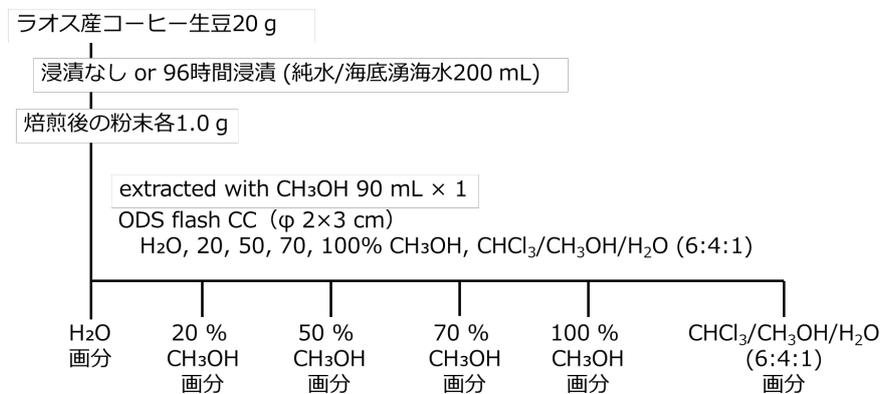


図 5. ヒストン修飾調節活性試験用のサンプルの調製スキーム

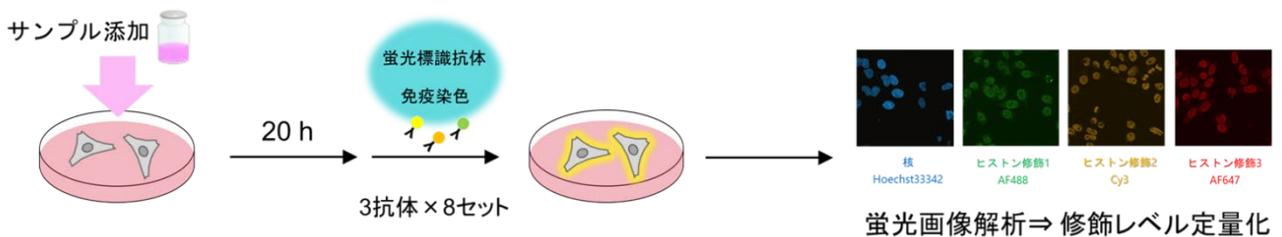


図 6. ヒストン修飾調節活性試験(顕微鏡)

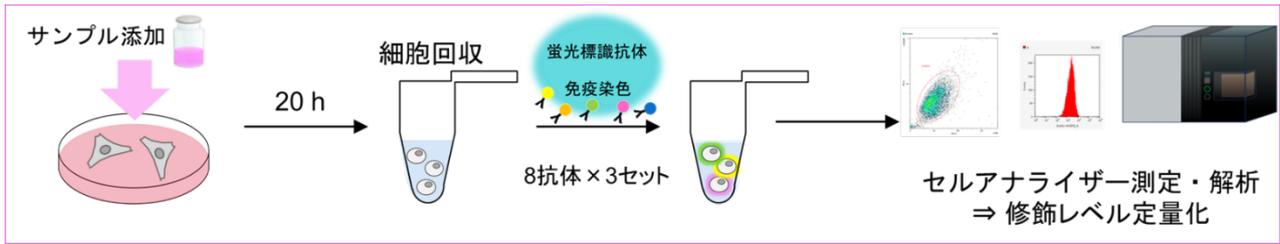


図 7. ヒストン修飾調節活性試験(セルアナライザー)

3. 研究結果

3.1 コーヒー豆サンプルの調製の条件検討

浸漬時間の検討結果を図 8 に示す。コーヒーの生豆を海底湧海水で浸漬させ、逆相 HPLC 分析に付し、ピーク面積から caffeine 含有量を求めた。その結果、caffeine 流出入量の変化は96時間で少なくなったため、浸漬時間は96時間行うこととした。

抽出方法および回数の検討の結果および抽出物の秤量値の結果を図 9 に示す。抽出方法については、3 分間攪拌しながら抽出した①と、10 分間攪拌したのち 20 分間静置させた②および、加熱した CH₃OH を使用した③を比較した。その結果、①に比べて、②と③条件は抽出量が多く、②と③を比較すると加熱の有無による抽出量変化が認められなかった。一方、抽出回数については、1 回目の抽出量が格段に多く、抽出方法は②とした。

焙煎条件の検討では焙煎後のコーヒー豆の観察により、焙煎具合の均一さおよび豆が膨張して組織に変化が起こるハゼの有無を評価した。その結果(図 10)では時間を一定(13分)で温度を変化させたところ、X°Cでは焙煎にムラが認められた。一方、温度一定で時間を変化させた場合は10分が安定した焙煎度合いとなることが分かった。そこで今回のコーヒー中の成分分析のための焙煎条件はZ°C 10 分中煎りの条件で行うこととなった。上記に示した実験結果から、分析のための浸漬時間、抽出条件、焙煎条件を決定することができた。

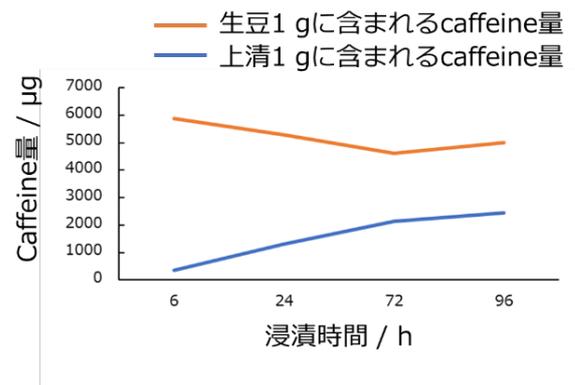


図 8. Caffeine の流出入量の経時変化

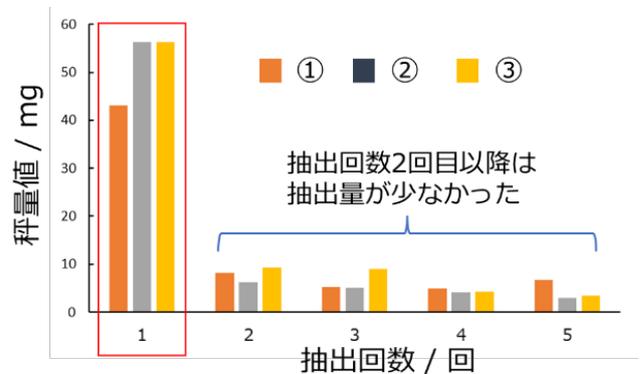


図 9. 各抽出方法の抽出物の秤量値



図 10. 焙煎条件の検討結果

3. 2 コーヒー生豆の海底湧海水の浸漬処理による成分変化の解析

3. 2. 1 LC/MSMS を用いた成分の解析

LC/MSMS 解析によるカフェインの定量結果(図 11)を示す。今回, caffeine の定量の結果, 純水浸漬に比べて海底湧海水浸漬では溶出量は抑えられるものの, 浸漬無しに比べて 16%減少することが分かった。純水では 31%減少していることから海底湧海水浸漬では caffeine の溶出が抑えられる傾向が認められた。

一方, マイナー画分については Compound Discoverer 3.3 FreeStyle 1.8 (Thermo 社)を用いてコーヒーに含まれる主要な化合物の解析を試みた。しかしながら多くの化合物は異性体の情報やマススペクトル情報など, 化合物推定に必要となるデータベースの情報不十分であり, 多くの化合物の解析は行うことができなかった。このため, 今回の研究では化合物推定が可能な 3 つの化合物 (cafestol, trigonelline, shikimic acid) について成分の比較を行った(図 12)。その結果, cafestol は海底湧海水による浸漬で含有量が少なくなる傾向が認められた。また, shikimic acid は浸漬なしの場合と比較して, 純水と海底湧海水による浸漬では同程度の溶出が確認された。一方, trigonelline は caffeine と同様に海底湧海水によって浸漬溶出が抑えられる傾向が認められた(図 13)ことから, 成

分によってコーヒー豆からの成分の流出パターンは異なることが示された。

3. 2. 2 ICP-OES を用いた成分の解析

ICP-OES によって複数の無機成分の分析を行い, 浸漬した生豆や, 浸漬に用いた海底湧海水等を分析して無機成分のコーヒー豆への流出量の定量を行った。その結果, コーヒー豆中では成分 A が増加し, 成分 B は減少がみられた(図 14)。海底湧海水の分析結果と照らし合わせると, 海底湧海水中に含まれる成分 A などは豆に吸収され, 豆に多く含まれる成分 B などは流出する傾向があり, 海底湧海水浸漬によって, すべてのミネラル成分が増加するわけではないという結果が得られた。したがって, 海底湧海水に浸漬することで, 本来豆には含まれていない無機成分が増加するなどの変化が起こり, 塩焙煎コーヒーの味にも大きく影響を与えている可能性が考えられる。

3. 3 ヒストン修飾調節活性試験結果

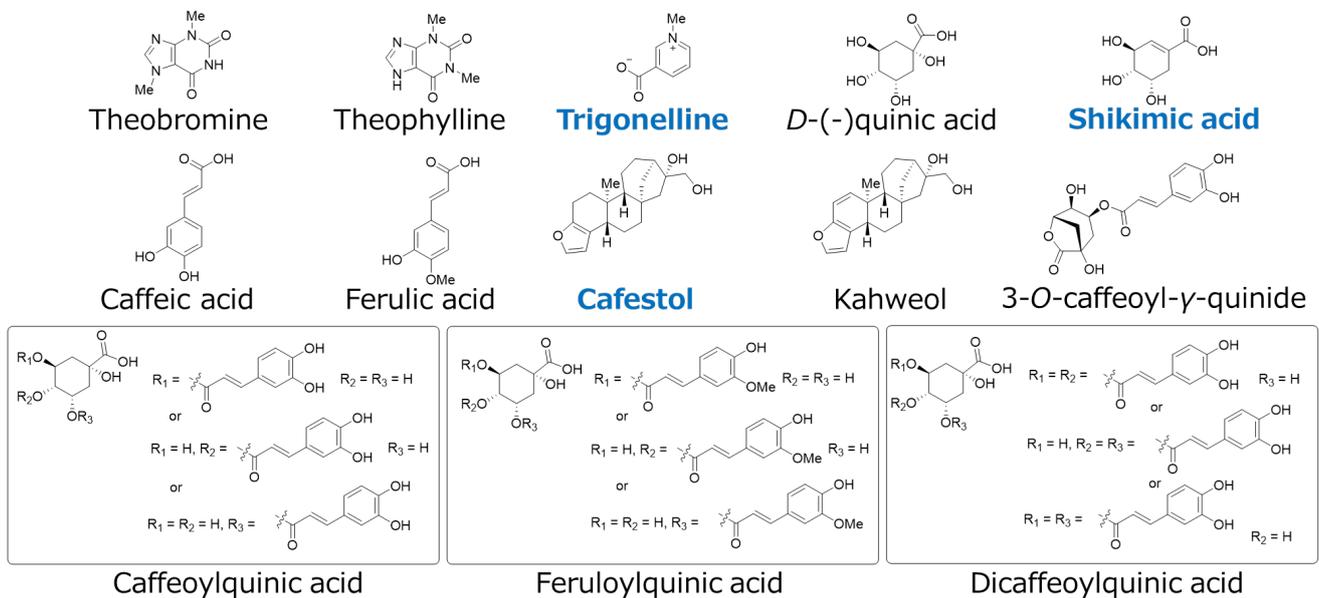
蛍光顕微鏡を用いた HeLa 細胞に対する浸漬なし, 純水浸漬, 海底湧海水浸漬(以下, 海水浸漬と示す)後の分画サンプル用いたヒストン修飾調節活性試験結果を示す(図 15)。結果はコントロール比として示されており, 凡例に示すようにヒストン修飾レベルの変化を, ヒートマップを作成して示している(赤:促進, 緑:抑制)。蛍光顕微鏡の実験結果からは各条件(浸漬なし, 純水浸漬, 海水浸漬)

のコーヒー豆の焙煎抽出物の ODS 後の各分画によるヒストン修飾の変化の幅は 0.7~1.1 であった。ヒートマップより、ヒストン H3 番目の 9 番目のリジン残基のジメチル化 (H3K9me3) はいずれの画分および浸漬条件でもほとんど変化がないもしくは抑制されている様子が見られる (0.9~1.0)。また、各修飾に関して強く亢進を示すサンプルは認められなかった。一方、20%CH₃OH 溶出画分では、コントロールと比較してヒス H4K20me について、海水浸漬では抑制傾向が見られた。100% CH₃OH 溶出画分に注目すると H4K16ac について、純水や海水では抑制される傾向 (コントロール比 0.7 倍) が見られた。また、CHCl₃/CH₃OH/H₂O (6:4:1) 画分は H4K20me2 および H4K8ac, H4K16ac の抑制傾向が見られ、ヒストン修飾変化のプロファイリングの変化が観察された。しかしながら追試験を行ったものの再現性は得られなかった。

このように浸漬と浸漬なしで同じような修飾の変化がみられるものや、浸漬と海水で同様の傾向がみられるもの、変化の幅は 0.7~1.1 であるがほとんどが 5%前後の変化であった。H4K20 のメチル化は細胞周期の G1 期に大きく変動するため、追試験の結果はそのような影響を受けた可能性が考えられた。

3. 4 セルアナライザーを用いた活性試験の結果

浸漬なしおよび海底湧海水処理したコーヒー豆の CHCl₃/CH₃OH/H₂O (6:4:1) 画分を用いて試験についてセルアナライザーを用いて活性試験を行った (図 16)。結果はコントロール比として示されており、蛍光顕微鏡での実験と同様に、ヒートマップを作成して示している (赤:促進, 緑:抑制)。実験結果からはコントロールの DMSO と比較して浸漬なしのサンプルはヒストン H4 の 8 番目のリジン残基に対するアセチル化の修飾に抑制がみられる一方、海水浸漬では亢進する傾向が見られた。また、分画によるヒストン修飾の変化の幅は 0.6~2.8 であった。今回のセルアナライザーを用いた実験結果では画分についての試からはサンプル内での蛍光強度のばらつきや、統計的に有意な差が認められない修飾も認められた。サンプル内での測定結果のばらつき等、セルアナライザー用の活性試験のプロセスなどに改善が必要な結果となった。



Machado, F. et al., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2024**, *64*, 10164-10186.

Fujimoto, H. et al., *Food Chemistry* **2021**, *342*.

図 11. 各抽出方法の抽出物の秤量値

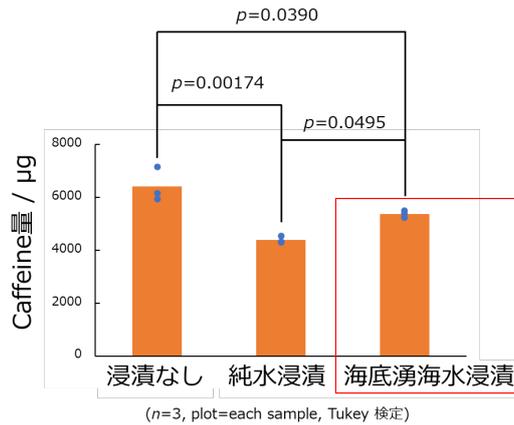


図 12. 生豆 1 g あたりの caffeine 量

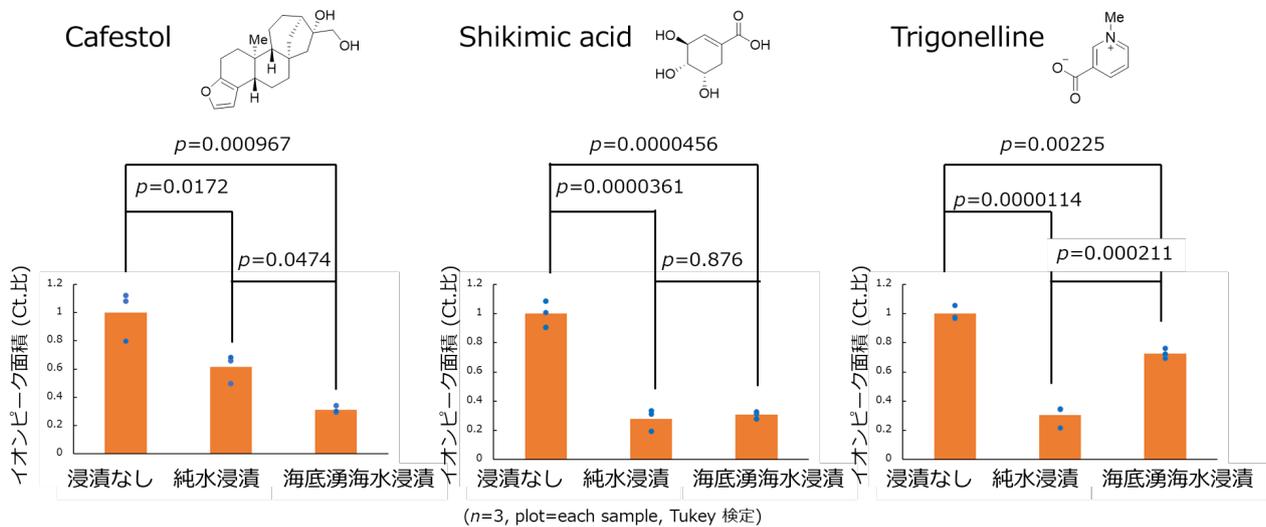


図 13. LC-MS/MS を用いた成分分析の結果

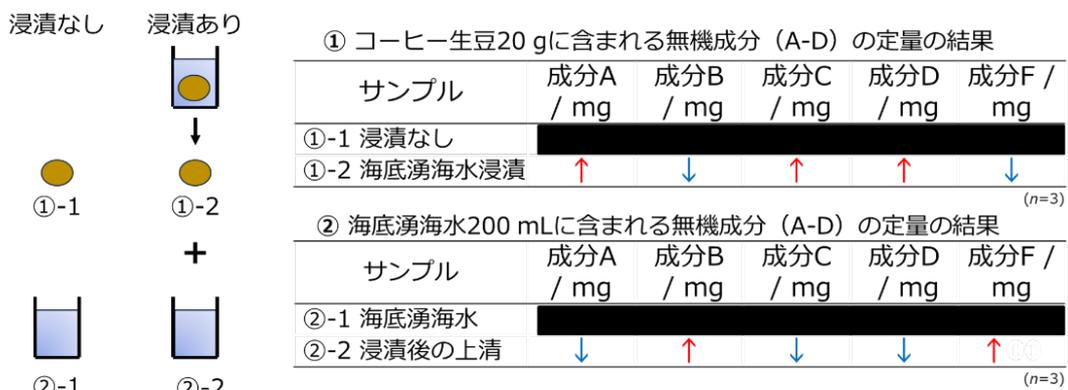


図 14. ICP-OES を用いた成分分析の結果



図 15. ヒストン修飾調節活性試験(顕微鏡)の結果

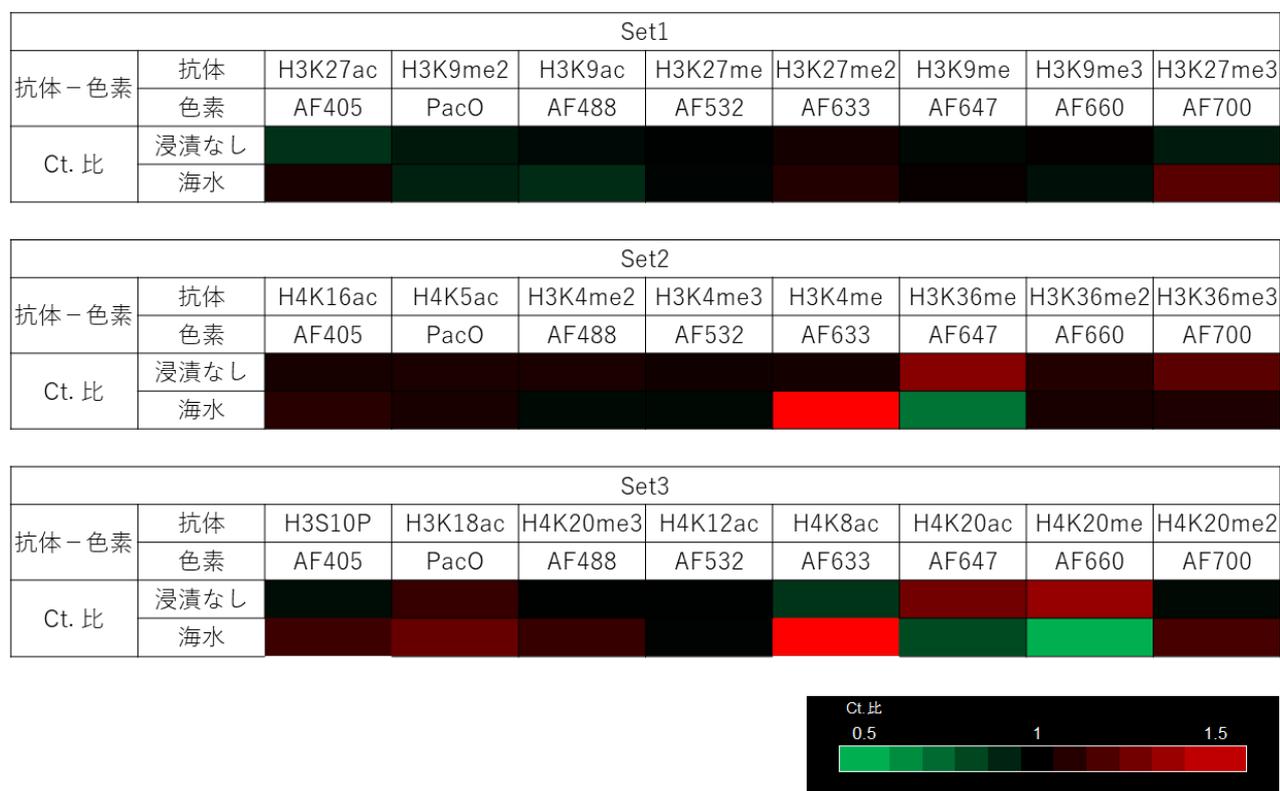


図 16. セルアナライザーを用いたヒストン修飾調節活性試験の結果

4. 考察

4.1 塩焙煎による成分変化の解析

今回はコーヒー中の主要成分に関する MSMS データベース情報の不足から有機成分については 4 成分についての解析となり、コーヒーに含まれる主な成分について MSMS データのライブラリーを構築する必要性が新たに生じた。多くの成分については変化を分析することは

できなかったものの、浸漬処理の有無や、浸漬する溶媒(純水、海底湧海水)処理によって成分の溶出に違いが見られた。これらの結果から塩焙煎(=浸漬)による成分調節方法が期待される。一般に caffeine は苦みとして認識される。コーヒー中の苦み成分の一種である caffeine は全体の 10~30%程度、trigonelline が約 1%程度と考えられている²⁾。caffeine 抜きコーヒーにも苦みがあること

から、caffeine 以外の苦み成分に関する研究もなされておりクロゲン酸ラクトン(CGL)や 4-ビニルカテコールオリゴマー(VCO)も苦味化合物として認識されている^{3,4)}。コーヒーの味わいに関する成分も変化していると予想される。

塩焙煎したコーヒーは味に関して官能試験などの科学的評価は行っていないが、酸味が抑えられたすっきりした味わいを特徴としている。しかしながら、この味わいをもたらす成分の変化の解析には至っていない。本研究では苦み成分の一種である trigonelline が海底湧海水では減る減少する傾向が示された。このような結果を踏まえ、塩焙煎によるコーヒーの主要成分変化の網羅的なプロファイリングを行うためのライブラリー構築が今後の課題である。今後は、塩焙煎コーヒーの味わいに寄与する成分を同定し、目的の味わいや成分の調節を行うなど、今後もアミノ酸ハイブリッド型食塩および海底湧海水の機能性を最大限に活用する方策を模索していく。現在これらの成分変化をより詳細に把握するため、LC/MSMS を用いたプロファイリングの継続的な実施を検討している。また、官能試験などによって、塩焙煎コーヒーの味わいを数値化して、味の特徴を科学的に明らかにするために、共同研究を行っていく予定であり、現在その実験実施に向けて準備を行っている。アミノ酸ハイブリッド型食塩のもととなる海底湧海水による浸漬処理によって、コーヒー中に含まれる主な有機成分の多くは解析を行うことができなかったものの、味に関わるような一部の有機成分および、無機成分について塩焙煎による成分変化を分析することができた。塩焙煎によってコーヒー豆中の無機成分をコントロールする新たな手法を得ることができ、海底湧海水ないしはアミノ酸ハイブリッド型食塩の新たな活用方法を見出す知見を得ることができた。

4. 2 塩焙煎コーヒーを用いたヒストン修飾調節活性の変化

蛍光顕微鏡の実験結果からは、H4K20me, H4K20me2 や H4K8ac, H4K16ac の変化がみられたものの、追加実験による再現性が得られなかった。ヒストン修飾によっては細胞周期によって変化するものもあるため、細胞の同調を行うなど、細胞周期の影響を加味してより詳細な解析を行う必要がある。また、ヒストン修飾は修飾の種類および位置が組み合わせとなって機能するという“ヒストン暗号仮

説”が提唱されている⁵⁾。塩焙煎コーヒーの活性についても、どのような修飾パターンとなって現れるか、パターン解析も試みたい。

予備実験の結果ではあるが、セルアナライザーの試験結果からは海水浸漬したサンプルについて H4K8 のアセチル化(H4K8ac)の亢進する様子が見られた。H4K8ac は DNA 損傷修復因子をリクルートする足場となってゲノムの安定性の維持への寄与が示唆されているため、塩焙煎コーヒーのように海底湧海水への浸漬を行うことで変化する成分の中から新たな機能性を見出してゆきたい。当研究の先行研究においてコーヒー生豆や焙煎度合い違いによって生物活性を有する化合物の探索を行ってきた。しかしながら、粗精製の段階では活性の再現性が得られないこともあったため、コーヒー中に含まれる成分についても、より精製を進めた段階で活性評価が望ましいと考えられる。塩焙煎コーヒーについても、さらなる精製を進めたうえで、塩焙煎で含有割合が変化する成分や微量成分から新たな機能性を見出してゆきたい。

染色の抗原-抗体の組み合わせを色素の輝度×抗原量の値がなるべく等しくなるような設計を行った上で抗体および蛍光色素を組み合わせている。しかしながら、設計時の蛍光強度に差もみられるため、適切なスペクトル分解のためには、新たな色素を導入するなど、抗体と蛍光色素の組み合わせの変更等改善が必要となると考えられる。また、ヒストンの種類によっては細胞周期によって修飾が大きく変化するものがあるため、本来のサンプルによる修飾調節活性が細胞周期の変化に埋もれてしまっていることも想定される。そこで、今後はより再現よく最適な測定・解析が行えるよう、手法の改善を試みつつ、細胞周期ごとのヒストン修飾活性をコーヒー由来のサンプルに適用して、より詳細な塩焙煎によるヒストン修飾プロファイルの詳細の解析を試みたい。

5. 今後の課題

本研究を通じて、コーヒーに含まれる成分に関する LC/MSMS ライブラリー構築の必要性が明らかとなった。この課題を解決するために、コーヒー中の主要成分の単離精製と、コーヒーに関する独自のデータベースの構築を図り、今後も塩焙煎による成分プロファイルの変化の解析を試みる。

6. 文献

- 1) Neal, B.; Tian, M.; Li, N.; Elliott, P.; Yan, L. L.; Labarthe, D. R.; Huang, L.; Yin, X.; Hao, Z.; Stepien, S.; et al. Effect of Salt Substitution on Cardiovascular Events and Death. *N. Engl. J. Med.* **2021**, 385, 1067–1077.
- 2) Fujimoto, H.; Narita, Y.; Iwai, K.; Hanzawa, T.; Kobayashi, T.; Kakiuchi, M.; Arika, S.; Wu, X.; Miyake, K.; Tahara, Y.; Ikezaki, H.; Fukunaga, T.; Toko, K. Bitterness Compounds in Coffee Brew Measured by Analytical Instruments and Taste Sensing System. *Food Chem.* **2021**, 342, 128228.
- 3) Frank, O.; Zehentbauer, G.; Hofmann, T. Bioresponse-Guided Decomposition of Roast Coffee Beverage and Identification of Key Bitter Taste Compounds. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, 222, 492–508.
- 4) Frank, O.; Blumberg, S.; Krümpel, G.; Hofmann, T. Structure Determination of 3-O-Caffeoyl-epi- γ -quinide, an Orphan Bitter Lactone in Roasted Coffee. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 9581–9585.
- 5) Strahl, B. D.; Allis, C. D. The language of covalent histone modifications, *Nature* **2000**, 403, 41-45.

Analysis of Constituents and Histone Modification Profiles in Salt-Roasted Coffee Beans using Amino Acid Hybridized Salt

Rie Kamihira¹, Maho Onozawa¹, Fumiaki Nakamura^{1,2}, Yoichi Nakao^{1,2}

¹ Graduate School of Advanced Science & Engineering, Waseda University,

² Waseda Research Institute for Science and Engineering, Waseda University

Summary

In Japan, where an estimated 40 million people, including potential patients, are affected by hypertension, there is a growing trend toward reducing dietary salt intake. This tendency stems from the established link between excessive sodium consumption and elevated blood pressure. Against this backdrop, we have developed an amino acid hybrid salt with 25% less NaCl compared to ordinary table salt. Previous reports suggest that substituting NaCl with KCl in mixed salts may help prevent hypertension, strokes, and cardiovascular diseases. Thus, the intake of amino acid hybrid salt is expected to offer potential health benefits.

Coffee, a widely enjoyed beverage, is valued not only for its caffeine content but also for other functional ingredients that may contribute to health promotion. Our laboratory has focused on a unique salt-roasted coffee, wherein green coffee beans are pre-soaked in submarine spring water—the basis of the amino acid hybrid salt—before roasting. This study aims to explore the potential of amino acid hybrid salt for new applications, such as flavor modulation and the development of functional beverages from familiar sources like coffee.

We examined how varying the soaking time, roasting conditions, and extraction parameters influence the coffee bean's composition and bioactivity. Component profiling using analytical instruments revealed changes in both organic and inorganic constituents, suggesting the potential of brine soaking to modulate bean chemistry. To assess functional attributes, we conducted histone modification profiling (24 types), which serves as an indicator of gene expression regulation, using fractionated extracts.

In summary, our results suggest that pre-soaking green coffee beans in submarine spring water—the source of amino acid hybrid salt—may influence the beans' chemical and bioactive profiles. Future efforts will expand our compound database for coffee analysis, enabling further investigation into the compositional and functional changes caused by salt roasting.