Analysis of Amylose Chain Lengths Forming Complexes with Lysophosphatidylcholines

(Received June 26, 2003 ; Accepted September 12, 2003)

Masatsugu Yamashita,^{1,*} Hajime Taniguchi,² Satoru Onogi³ and Makoto Hisamatsu³

¹Taiyo Kagaku Central Research Laboratories
 (1-3, Takara-machi, Yokkaichi 510-0844, Japan)

²Department of Biological Chemistry, Chubu University
 (1200, Matsumoto-cho, Kasugai 487-8501, Japan)

³Faculty of Bioresources, Mie University
 (1515, Kamihama, Tsu 514-8507, Japan)

Abstract: The formation of amylose complexes with eight lysophosphatidylcholines; 1-capryl lysophosphatidylcholine (LPC-C 10 : 0), 1-lauroyl LPC (LPC-C 12 : 0), 1-myristoyl LPC (LPC-C 14 : 0), 1-palmitoyl LPC (LPC-C 16 : 0), 1-stearoyl LPC (LPC-C 18 : 0), 1-oleoyl LPC (LPC-C 18 : 1), 1-linoleoyl LPC (LPC-18 : 2) and 1-arachidoyl LPC (LPC-C 20 : 0), was conducted in aqueous solution using a commercial amylose with an average degree of polymerization (DP) of 18. The chain distributions of amylose precipitated by forming a complex in aqueous solution (2°C) were analyzed by high-performance anion exchange chromatography with a pulsed amperometric detector (HPAEC-PAD). The smallest DPs of amylose forming complexes with LPC-C 14 : 0, LPC-C 16 : 0, LPC-C 18 : 0, LPC-C 18 : 1, LPC-18 : 2 and LPC-C 20 : 0 were DP 27, DP 29, DP 29, DP 31, DP 31 and DP 35, respectively. The principal amylose chains found in complexes with LPC-C 14 : 0, LPC-C 16 : 0, LPC-C 18 : 0, LPC-C 18 : 1, LPC-18 : 2 and LPC-C 20 : 0 were DP 34–36, DP 32–34, DP 33–35, DP 34–36, DP 36–38 and DP 36–38, respectively.

Key words: amylose complex, amylose-chain length, lysophosphatidylcholine

リゾホスファチジルコリンと複合体を形成するアミロース鎖長の解析

山下政統^{1,*}, 谷口 肇², 小野木悟³, 久松 眞³

¹太陽化学株式会社総合研究所 (510-0844 四日市市宝町 1-3)

²中部大学応用生物学部 (487-8501 春日井市松本町 1200)

³三重大学生物資源学部 (514-8507 津市上浜町 1515)

米, トウモロコシ, 小麦などの穀物種子の澱粉粒には, 主にオレイン酸, リノール酸などの不飽和脂肪酸から構成されるリゾリン脂質, 遊離脂肪酸, 脂肪酸モノグリセリドなどの内部脂質が含まれており, 澱粉と複合体を形成している^{1,2)}. これらの脂質は, *in vitro* でもアミロース, 澱粉と複合体を形成することが報告されている³⁻⁵⁾.

種々の平均重合度 ($\overline{DP}$) のアミロースを用いた複合体形成の実験により, 飽和脂肪酸や脂肪酸モノグリセリドの複合体形成に必要なアミロースの重合度を決定することが試みられている⁵⁻⁸⁾. しかしながら, これまでの実験では単一の重合度からなる高純度のアミロースを使用していないこと, また, 複合体を構成するアミロース鎖長を分析していないことにより, その包摂に必要なアミロースの重合度は研究者によって異なっている⁵⁻¹⁰⁾. さらに, 穀物澱粉の内部脂質として多く含まれているリゾリン脂質の複合体形成に必要なアミロースの重合度に関してはこれまで報告さ

れていない.

われわれは, 先に $\overline{DP}$ 18 の市販アミロースとステアリン酸モノグリセリドおよびオレイン酸モノグリセリドを用いた複合体形成実験により, それぞれの複合体を構成するアミロース鎖長分布を測定し, その複合体を形成するアミロースの重合度を明らかにした¹¹⁾.

今回, $\overline{DP}$ 18 の市販アミロースと炭素数 10-20 の脂肪酸からなるリゾホスファチジルコリンを用いて複合体を調製し, それぞれの複合体を構成するアミロース鎖長分布について, HPAEC-PAD 分析を行ったので報告する.

実験方法

1. 試料

リゾホスファチジルコリン (LPC) は, フナコシ(株)製の 1-カプリルリゾホスファチジルコリン (LPC-C 10 : 0, 純度 99%), 1-ラウロイルリゾホスファチジルコリン (LPC-C 12 : 0, 純度 99%), 1-ミリスチルリゾホスファチジルコリン (LPC-C 14 : 0, 純度 99%), 1-パルミトイルリゾホ

*Corresponding author (Tel. +81-593-47-5413, Fax. +81-593-47-5417, E-mail: myamashita@taiyokagaku.co.jp).

スファチジルコリン (LPC-C 16:0, 純度 99%), 1-ステアロイルリゾホスファチジルコリン (LPC-C 18:0, 純度 99%), 1-オレオイルリゾホスファチジルコリン (LPC-C 18:1, 純度 99%), 1-リノレオイルリゾホスファチジルコリン (LPC-C 18:2, 純度 94%), 1-アラキドイルリゾホスファチジルコリン (LPC-C 20:0, 純度 99%) を用いた。

アミロースはトウモロコシ由来の(株)林原生物化学研究所の商品名: アミロース EX-1 (DP 18, 粗タンパク: 0.02%, 水分: 7.90%) を用いた。

水酸化カリウム, 塩酸, 水酸化ナトリウム, 酢酸ナトリウムは和光純薬工業(株)の特級試薬をそのまま用いた。水は蒸留水を用いた。

2. アミロース-脂質複合体の調製

1) アミロース水溶液の調製

アミロース EX-1 2.0 g を水 100 mL に懸濁させ, 4°C で 1 晩放置しアミロースを膨潤させた。その後, 1 M 水酸化カリウム 100 mL を加え, 1 M 塩酸で pH 6.0 に調整し, 水で 1000 mL に定容して 0.2% (w/v) アミロース水溶液を得た。

2) 複合体の調製

ビーカー (50 mL) に入れた 0.16 mol に相当する各 LPC (66–88 mg) に水 50 mL を加え, 60°C で 30 分間攪拌し分散溶解させてそれぞれの水溶液を調製した。この水溶液を 0.2% (w/v) アミロース水溶液 250 mL に加え, 60°C で 30 分間, ときどき攪拌した。2°C まで氷冷し, 2 時間放置した後, 8000 g で 20 分間遠心分離し, 沈澱物 (複合体) を沈降させた。上澄み液を注意深くデカンテーションにより除去した後, 沈澱物に 20°C の水 300 mL を加えて攪拌しながら 60°C まで昇温することにより沈澱物を水洗した後, 2°C まで氷冷し, 2 時間放置し, 8000 × g で 20 分間遠心分離し, 沈澱物を沈降させた。この操作を 2 回行った。沈澱物を回収し, 凍結乾燥して LPC-アミロース複合体の粉末 (A) を得た。遠心分離後の上清部をあつめて凍結乾燥することにより複合体を形成しなかった LPC とアミロースの混合粉末 (B) を得た。

また, コントロールとして水 50 mL を 0.2% (w/v) アミロース水溶液 250 mL に加え, 60°C で 30 分間, ときどき攪拌した後 2°C まで氷冷し, 2 時間放置し沈澱の有無を観察した。

3. DSC 測定

銀製の 70 μ L 容量の密封型試料容器に, 凍結乾燥した LPC-アミロース複合体粉末 (A) 10 mg に水 40 mg を加えて, セイコー電子工業(株)製の示差走査熱量計 DSC-100 を用いて昇温速度 1.5°C/min にて 30°C から 130°C の範囲で DSC 測定を行った。また, 遠心分離後の上清部の LPC とアミロースの混合粉末 (B) および各 LPC についても, 同様に測定した。LPC-C 12:0 のアミロース複合体粉末 (A) は, その収量が非常に少なかったために DSC 測定を行わなかった。

4. HPAEC-PAD によるアミロース組成分析

1) サンプル調製

凍結乾燥させた LPC-アミロース複合体粉末 (A) 1 mg に 1 M 水酸化カリウム 150 μ L を加えて氷冷しながら攪拌して溶解させた。この溶液 125 μ L に蒸留水 125 μ L を加え, 遠心分離 (3000 rpm, 10 min, 4°C) を行い, 上清 3 μ L を HPAEC-PAD 分析に供した。

2) HPAEC-PAD 装置およびカラム

HPAEC-PAD 分析装置には, Dionex BioLC system (Dionex 社製) を使用し, 検出器にはバルスドアンペロメトリック検出器 (Model PAD II) を用いた。カラム: CarboPac PA 1 Column (4 × 250 mm), 溶媒 A: 150 mM 水酸化ナトリウム, 溶媒 B: 150 mM 水酸化ナトリウム + 500 mM 酢酸ナトリウムを用いて, 流速 1 mL/min で既報¹¹⁾と同条件で分析を行った。

結果と考察

1. 複合体の調製

DP 18 のアミロース EX-1 と LPC の混合溶液は, 60°C では沈澱が形成されず, 冷却すると約 40°C から徐々に白濁し沈澱が形成された。2°C の沈澱物を凍結乾燥して得られた LPC-アミロース複合体の粉末 (A) の収量 (凍結乾燥重量) を Table 1 に示した。アミロース EX-1 の水溶液は沈澱を生成しなかった。LPC-C 10:0 とアミロース EX-1 の混合溶液は沈澱を生成しなかった。LPC-C 12:0 とアミロース EX-1 の混合溶液は沈澱を微量生成した。脂質とアミロースの複合体は, 水不溶性で沈澱することが報告されている^{3,8,11)}。Table 1 の沈澱物の収量から, LPC-C 14:0 と LPC-C 16:0 はアミロース EX-1 と最もよく複合体を形成

Table 1. Yields of amylose-lysophosphatidylcholine complexes.

Complex	Abbreviation	Yield (mg)
Amylose-1-capryl lysophosphatidylcholine	LPC-C 10:0 Complex	0
Amylose-1-lauroyl lysophosphatidylcholine	LPC-C 12:0 Complex	1.7
Amylose-1-myristoyl lysophosphatidylcholine	LPC-C 14:0 Complex	77.5
Amylose-1-palmitoyl lysophosphatidylcholine	LPC-C 16:0 Complex	76.1
Amylose-1-stearoyl lysophosphatidylcholine	LPC-C 18:0 Complex	70.6
Amylose-1-oleoyl lysophosphatidylcholine	LPC-C 18:1 Complex	48.4
Amylose-1-linoleoyl lysophosphatidylcholine	LPC-C 18:2 Complex	46.5
Amylose-1-arachidoyl lysophosphatidylcholine	LPC-C 20:0 Complex	59.8

Table 2. Thermal properties of complexes of amylose-lysophosphatidylcholine.

Sample	$T_o(^{\circ}\text{C})$	$T_p(^{\circ}\text{C})$	$T_c(^{\circ}\text{C})$	$\Delta H(\text{J/g})$
LPC-C 14 : 0 Complex	67.3	82.0	92.1	7.7
LPC-C 16 : 0 Complex	77.0	89.6	99.5	6.6
LPC-C 18 : 0 Complex	78.1	95.0	108.4	5.5
LPC-C 18 : 1 Complex	72.7	89.8	99.5	8.8
LPC-C 18 : 2 Complex	65.0	81.5	100.6	11.6
LPC-C 20 : 0 Complex	85.4	98.9	107.2	4.2

DSC analysis condition; sample, 10 mg; water, 40 mg; heating rate, 1.5°C/min. T_o , onset temperature; T_p , peak temperature; T_c , conclusion temperature; ΔH , enthalpy change. Average values of two measurements.

することが考えられる。また、炭素数 18 の二重結合をもつ不飽和脂肪酸の LPC (LPC-C 18 : 1, LPC-C 18 : 2) は、同じ炭素数をもつ飽和脂肪酸の LPC-C 18 : 0 よりもアミロースと複合体を形成しにくいことが考えられる。

2. DSC 測定

LPC-アミロース複合体粉末(A)の DSC 測定結果を Table 2 に示した。脂質とアミロースの複合体は、DSC 測定において吸熱カーブを示すことが報告されている^{4,6,7,11)}。アミロース EX-1 は測定した温度範囲 (30–130°C) で吸熱カーブを示さなかった。LPC は 37–52°C の温度範囲で吸熱カーブを示した。炭素数 14 以上の脂肪酸をもつ LPC とアミロース複合体の沈澱物の DSC カーブは、アミロース EX-1 や各 LPC の DSC カーブとは異なり、65–108°C の温度範囲で吸熱カーブを示した。この結果から、これらの沈澱物は複合体を形成していることが確認された。上清部のいずれの LPC とアミロースの混合粉末(B)の DSC 測定においても、アミロース EX-1 と同様に吸熱カーブを示さなかった。これから、上清部の混合粉末(B)には複合体は存在していないことが確認された。

飽和脂肪酸の LPC-アミロース複合体では、その構成脂肪酸の炭素数が増加するに従って吸熱ピーク温度 (T_p) は、高くなる傾向が認められたが、融解熱のエンタルピー変化 (ΔH) は、逆に小さくなる傾向が認められた (Table 2)。炭素数 18 の LPC では、二重結合が増加すると吸熱ピーク温度 (T_p) は低下し、融解熱のエンタルピー変化 (ΔH) は増加する傾向がみられた (Table 2)。しかしながら、われわれが先に炭素数 18 の脂肪酸モノグリセリドのアミロース複合体について報告した結果では、脂肪酸に二重結合が存在すると吸熱ピーク温度 (T_p) は上昇し、融解熱のエンタルピー変化 (ΔH) は減少することが観察され、本結果と逆の関係がみられた¹¹⁾。これらの吸熱ピーク温度 (T_p) や融解熱のエンタルピー変化 (ΔH) は、その脂質-アミロース複合体からの脂質の解離や脂質の構造と関係があると考えられるが詳細は不明である。

3. HPAEC-PAD 分析

HPAEC-PAD 分析による Amylose EX-1 の鎖長分布を Fig. 1 に示した。このアミロースは主成分 DP 11–14 からなる組成であり、Koizumi ら¹²⁾の結果とよく一致した。ま

Fig. 1. HPAEC-PAD analysis of Amylose EX-1 and the amyloses in the precipitates formed by complexes using lysophosphatidylcholines.

た、沈澱物を凍結乾燥した LPC-アミロース複合体粉末 (A) を構成するアミロース鎖長の HPAEC-PAD 分析結果も Fig. 1 に示した。LPC が複合体を形成し始めるアミロース重合度は、LPC-C 14 : 0, LPC-C 16 : 0, LPC-C 18 : 0, LPC-C 18 : 1, LPC-C 18 : 2, LPC-C 20 : 0 でそれぞれ 27, 29, 29, 31, 31, 35 であり、LPC の複合体を構成するおもなアミロース重合度は、それぞれ 34–36, 32–34, 33–35, 34–36, 36–38, 39–41 であった。炭素数 14–20 の飽和脂肪酸の LPC では、その複合体を形成し始めるアミロース重合度は、その脂肪酸の炭素数の増加とともに DP 27 から DP 35 と増加し、またその複合体を構成するおもなアミロース重合度も、その脂肪酸の炭素数の増加とともに

増加する傾向にある。これは、LPCの脂肪酸部を包摂するアミロースは、複合体形成において脂肪酸の炭素数の増加とともにグルコース残基が増加することを示している。本実験で得られたLPC-C 16:0-アミロース複合体を構成するおもなアミロース重合度(DP 32-34)は、M.C. Godetら⁶⁾の推定したパルミチン酸の包接に要するアミロース重合度(DP 30-40)とほぼ同程度と考えられる。LPC-C 12:0-アミロース複合体粉末(A)は、HPAEC-PAD分析によってアミロースのピークが検出されなかったために、その構成アミロース鎖長を求めることができなかった。LPC-C 12:0の複合体を構成するアミロース鎖長の解析には、さらに詳細な検討が必要である。

Table 1およびFig. 2から、飽和脂肪酸からなるLPC-C 18:0が二重結合を有する不飽和脂肪酸のLPC-C 18:1やLPC-C 18:2よりも、アミロースEX-1と複合体を形成しやすいことがわかった。このような複合体形成の特性は、われわれが先に炭素数18の脂肪酸モノグリセリドについて報告した結果でも同様な傾向にあった¹¹⁾。LPC-C 18:1やLPC-C 18:2の包接に要するアミロースの鎖長は、その二重結合により屈曲した不飽和脂肪酸の構造の影響を受けて、飽和脂肪酸のLPC-C 18:0の包接よりもグルコース残基数が多く必要であると考えられる。

要 約

炭素数10-20の脂肪酸から構成される8種類のリゾホスファチジルコリンとDP 18のアミロースの水溶液で複合体を調製した。2°Cで沈澱した複合体について、そのアミロース鎖長をHPAEC-PADで分析した。LPC-C 10:0はアミロースと沈澱物を生成せず、複合体が形成されなかった。LPC-C 12:0複合体を構成するアミロース鎖長は本HPAEC-PAD分析法では確定できなかった。LPCの複合体を形成し始めるアミロース重合度は、LPC-C 14:0, LPC-C 16:0, LPC-C 18:0, LPC-C 18:1, LPC-C 18:2, LPC-C 20:0でそれぞれ27, 29, 31, 31, 35であり、LPC

の複合体を構成するおもなアミロース重合度は、それぞれ34-36, 32-34, 33-35, 34-36, 36-38, 39-41であった。これらの沈澱物はDSC測定により複合体であることが確認された。

文 献

- 1) 藤野安彦：穀物の脂質。油化学, **32**, 67-81 (1983).
- 2) S.L. Tan and W. Morrison: The distribution of lipids in the germ, endosperm, pericarp and tip cap of amylomaise, LG-11 hybrid maize and waxy maize. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **56**, 531-535 (1979).
- 3) T. Riisom, N. Krog and J. Eriksen: Amylose complexing capacities of *cis*- and *trans*-unsaturated monoglycerides in relation to their functionality in bread. *J. Cereal Sci.*, **2**, 105-118 (1984).
- 4) S. Raphaelides and J. Karkalas: Thermal dissociation of amylose-fatty acid complexes. *Carbohydr. Res.*, **172**, 65-82 (1988).
- 5) J. Lagendijk and H.J. Pennings: Relation between complex formation of starch with monoglycerides and the firmness of bread. *Cereal Sci. Today*, **15**, 354-365 (1970).
- 6) M.C. Godet, H. Bizot and A. Buleon: Crystallization of amylose-fatty acid complexes prepared with different amylose chain lengths. *Carbohydr. Polym.*, **27**, 47-52 (1995).
- 7) M.C. Godet, A. Buleon, V. Tran and P. Colonna: Structural features of fatty acid-amylose complexes. *Carbohydr. Polym.*, **21**, 91-95 (1993).
- 8) J. Karkalas and S. Raphaelides: Quantitative aspects of amylose-lipid interaction. *Carbohydr. Res.*, **157**, 215-234 (1986).
- 9) A. Neszmély, E. László and J. Holló: Biomolecular modeling: An interactive program for the visualization and modeling of carbohydrate (starch and oligosaccharide) complexes in solution. *Starch/ Stärke*, **39**, 393-396 (1987).
- 10) M.C. Godet, V. Tran, M.M. Delage and A. Buleon: Molecular modelling of the specific interactions involved in the amylose complexation by fatty acids. *Int. J. Biol. Macromol.*, **15**, 11-16 (1993).
- 11) M. Yamashita, H. Adachi, T. Nakamura, H. Taniguchi, S. Onogi and M. Hisamatsu: Characteristics of amylose forming complexes with glycerol monooleate and monostearate. *J. Appl. Glycosci.*, **50**, 37-39 (2003).
- 12) K. Koizumi, T. Utamura and Y. Okada: Analysis of homogeneous D-glucosyl-oligosaccharides and -polysaccharides (degree of polymerization up to about 35) by high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.*, **321**, 145-157 (1985).