

原著論文

閉鎖循環式養殖システムで飼養したバナメイエビと他のエビ類における筋肉中遊離アミノ酸含量の比較

奥津智之^{*1}・進士淳平^{*2,3}・野原節雄^{*4}・野村武史^{*4}・
前野幸男^{*1}・マーシー N. ワイルダー^{*1}

Free Amino Acids in the Muscle of Whiteleg Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Reared under a Closed, Recirculating Production System

Tomoyuki OKUTSU, Junpei SHINJI, Setsuo NOHARA, Takeshi NOMURA,
Yukio MAENO and Marcy N. WILDER

In the recently developed Indoor Shrimp Production System (ISPS), whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) are reared to market-size in low salinity water (5 ppt). In general, crustaceans show decreased free amino acid (FAA) levels in muscle under low salinity conditions, which lowers their value as a food product. In the present study, FAAs in the muscle of *L. vannamei* produced by ISPS (ISPS-whiteleg shrimp), and other commercially cultured shrimp species, were analyzed by high performance liquid chromatography. ISPS-whiteleg shrimp showed high levels of key FAAs. These levels were similar to those of Kuruma prawn produced in Japan, but higher than those of imported shrimp species. These results show that a high-value shrimp product can be produced by ISPS.

2010年6月22日受付, 2010年8月11日受理

日本は世界でも有数のエビ消費国であり、エビ類輸入量は年間約20万トンに達する。しかし、国内ではエビ類の漁獲量が2万トン、養殖ではクルマエビが1600トン生産されているのみであり、エビ類の自給率はわずか10%程度にとどまっている。世界的な水産資源の枯渇が懸念されるなか¹⁾、食の安定供給にはエビ類の国内養殖生産量の増大は重要な課題である。近年、エビ類の新たな養殖技術として、閉鎖循環式養殖システムを利用した屋内型エビ生産システム (Indoor Shrimp Production System, ISPS) が開発された^{2,3)}。ISPSは独自に設計した80tの初期育成水槽と40m×12mの育成水槽2基に造波装置や沈殿物排出装置などを備えた施設で、エビ類の高密度養殖に適している。現在、バナメイエビ *Litope-*

naeus vannamei のウイルスや病原菌を持たない specific pathogen-free (SPF) 種苗⁴⁾ を用いて事業規模での養殖を行い、市場に流通している³⁾。バナメイエビはクルマエビ科に属し、中南米の太平洋側沿岸において海水から汽水域まで生息している広塩性のエビである^{5,6)}。筆者らの研究グループは、バナメイエビの広塩性の性質を利用し、海水から低塩分水への馴致技術を開発、5 ppt の低塩分海水でも高い生残率と良好な成長が得られることを見出した⁷⁾。この技術により ISPS では生産コストの低減を可能にすることができた。しかしながら、甲殻類では環境水中塩分の変化により体内の遊離アミノ酸含量が変動することが知られており、特に低塩分海水中では筋肉中の遊離アミノ酸含量が低下する⁸⁾。遊離アミノ酸

*1 独立行政法人 国際農林水産業研究センター 〒305-8686 茨城県つくば市大わし 1-1

Japan International Research Center for Agricultural Sciences, 1-1 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8686, Japan
okutsu@affrc.go.jp

*2 東京大学大学院農学生命科学研究科

*3 日本学術振興会 特別研究員 DC

*4 株式会社 アイ・エム・ティー

は甲殻類において主要な呈味成分であることから、体内の遊離アミノ酸含量の低下はエビの味、すなわち商品価値に重大な影響をおよぼす⁹⁾。そこで本研究では、新たな養殖技術である ISPS で養殖、出荷されたバナメイエビとクルマエビ科に属する 5 種類の市販エビの筋肉中遊離アミノ酸含量の比較検討を行った。

材料と方法

供試試料 ISPS で育成されたバナメイエビ *Litopenaeus vannamei* (以下、ISPS バナメイエビ) と市販されているクルマエビ科 4 種 (日本産クルマエビ *Marsupenaeus japonicus*, ベトナム産ウシエビ *Penaeus monodon*, サウジアラビア産インドエビ *Fenneropenaeus indicus*, ニューカレドニア産ブルーシュリンプ *Litopenaeus stylirostris*) およびインドネシア産バナメイエビ *L. vannamei* (以下、輸入バナメイエビ), それぞれ 4~5 尾を実験に供した (表 1)。全ての試料は冷凍状態で入手し、実験に使用するまで -80℃ で保存した。

筋肉抽出液の調製 アミノ酸分析に供する筋肉抽出液は OKUMA and ABE¹⁰⁾ の方法に概ね従って抽出した。まず、-80℃ で冷凍保存された検体を解凍後、氷上で約 1 g の筋肉組織を採取した。次に、採取した筋肉組織に 4 倍量の過塩素酸を加え、ホモジナイズ後、ホモジネートを 4℃, 20,000G × 10 分間遠心分離し、上清を得た。このとき、夾雑物除去の効率化のため過塩素酸濃度は 15% とした。得られた上清を等量の 1.6 M 炭酸水素カリウムで中和した後、4℃, 20,000G × 10 分間遠心分離を行い、過塩素酸カリウムの結晶を除去した。この上清を 10 倍に希釈後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるアミノ酸分析に付した。

HPLC による遊離アミノ酸分析 NIMURA and KINOSHITA¹¹⁾ の方法に従い、Shimadzu LC-10 HPLC システム (島津製作所, 京都) を用い、筋肉抽出液の遊離アミノ酸含量の分析をプレカラム誘導体化法により行った。すなわち、移動相に 50 mM 酢酸ナトリウムとメタノールを用い、ガードカラムとして Develosil ODS-UG-5 (6 mm I.D. ×

35 mmL), 分析用カラムとして Develosil ODS-UG-5 (6 mm I.D. × 200 mmL) を使用した。なお、移動相中の夾雑物を除去するために、送液ポンプと試料導入部の間に Shim-pack GRD-ODS (4 mm I.D. × 250 mmL) を接続した。アミノ酸分析用試料は、筋肉抽出物、0.1 M ホウ酸ナトリウムおよびキラル誘導体化試薬を 1:3:2 の比率で混合することにより調製した。混合 4 分後に 20 μ l を HPLC のシステムに注入した。キラル誘導体化試薬には、*o*-フタルジアルデヒド (OPA) 80 mg および *N*-アセチル-L-システイン 100 mg をメタノール 10 ml に溶解したものを使用した。注入後、表 2 のタイムプログラムに従い、カラム温度 28.0℃, 励起波長 350 nm, 検出波長 450 nm で分析を行った。なお、遊離アミノ酸には L 型と D 型が存在するが、甲殻類の組織中においては、アラニンは L と D の両型が存在する一方、アラニン以外のアミノ酸ではそのほとんどが L 型であり、D 型は極めて微量にしか存在しない⁸⁾。したがって、本研究ではアラニンは L 型と D 型の合計を、アラニン以外のアミノ酸については L 型のみを、それぞれの遊離アミノ酸含量として扱った。

統計処理 分析結果は分散の検定後、Bonferroni 検定あるいは Scheffe 検定を使用し、*p* 値が 0.05 以下のとき統計的に有意な差があると見なした。

表 2. アミノ酸分析に使用した HPLC のタイムプログラム^{*1}

| Time (min) | B. Conc. (%) ^{*2} | Flow (ml/min) ^{*3} |
|------------|----------------------------|-----------------------------|
| 0.01 | 0 | 1.2 |
| 3.00 | 12 | |
| 7.00 | 18 | |
| 18.00 | 24 | |
| 39.00 | 40 | |
| 50.00 | 40 | |
| 52.00 | 52 | |
| 64.00 | 67 | |
| 64.01 | 80 | |
| 69.00 | 80 | |
| 69.01 | | 1.5 |

^{*1} 移動相には 50 mM 酢酸ナトリウムとメタノールを使用した

^{*2} メタノール濃度を表す

^{*3} 流量を表す

表 1. 実験に供した試料

| 本文中表記 | 英名 | 学名 | 生産国 | 供試個体数 |
|-----------|-------------------|---------------------------------|----------|-------|
| ISPS バナメイ | whiteleg shrimp | <i>Litopenaeus vannamei</i> | 日本 | 5 |
| クルマエビ | Kuruma prawn | <i>Marsupenaeus japonicus</i> | 日本 | 5 |
| ウシエビ | giant tiger prawn | <i>Penaeus monodon</i> | ベトナム | 5 |
| インドエビ | Indian shrimp | <i>Fenneropenaeus indicus</i> | サウジアラビア | 5 |
| ブルーシュリンプ | blue shrimp | <i>Litopenaeus stylirostris</i> | ニューカレドニア | 4 |
| 輸入バナメイ | whiteleg shrimp | <i>Litopenaeus vannamei</i> | インドネシア | 5 |

結果と考察

本分析で得られたクロマトグラムを図1に示す。本実験で使用した6種類のエビ筋肉の主要な遊離アミノ酸は、グルタミン、グリシン、アルギニンで全体の69%～87%を占めた(表3)。次に、これら3種の各遊離アミノ酸および総遊離アミノ酸含量について比較を行った

結果、ISPS バナメイエビは、他のエビよりも有意にグルタミン含量が高かった(図2A)。また、ISPS バナメイエビのグリシン、アルギニン、総遊離アミノ酸含量はクルマエビと同等で、輸入バナメイエビよりも有意に高く、ウシエビ、インドエビ、ブルーシュリンプの外国産エビよりも高い傾向を示した(図2B-D)。前述のように、ISPS バナメイエビは5 pptの希釈海水で飼育されている

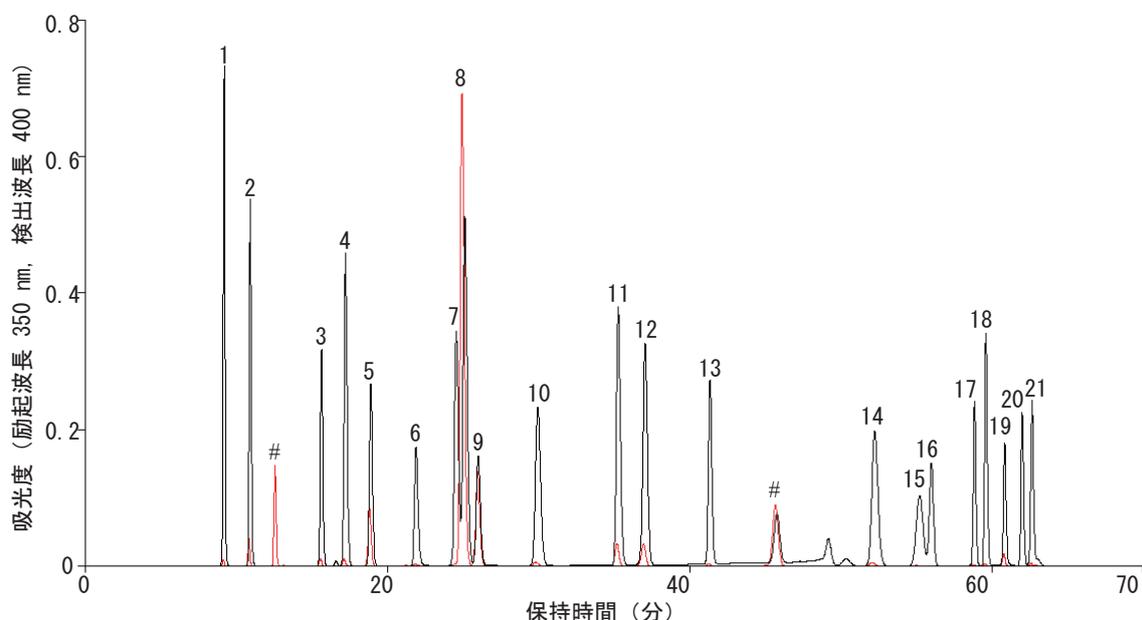


図1. 本研究で用いたアミノ酸スタンダードのクロマトグラム(黒)およびISPS バナメイエビの筋肉抽出物のクロマトグラム(赤)各ピークの種類とアミノ酸スタンダードの量: 1 = L-Asp 744 mg/L; 2 = L-Glu 720 mg/L; 3 = L-Asn 624 mg/L; 4 = L-Ser 676 mg/L; 5 = L-Gln 640 mg/L; 6 = L-His 868 mg/L; 7 = L-Thr 848 mg/L; 8 = Gly 692 mg/L; 9 = L-Arg 712 mg/L; 10 = Tau 744 mg/L; 11 = D-Ala 608 mg/L; 12 = L-Ala 604 mg/L; 13 = L-Tyr 856 mg/L; 14 = L-Val 668 mg/L; 15 = L-Met 648 mg/L; 16 = L-Trp 728 mg/L; 17 = L-Phe 632 mg/L; 18 = L-Ile 644 mg/L; 19 = L-Lys 496 mg/L; 20 = D-Leu 516 mg/L; 21 = L-Leu 676 mg/L; # = 未同定成分

表3. エビ各種の筋肉中遊離アミノ酸含量(mg/100g)*1

| | ISPSバナメイエビ (n=5) | クルマエビ (n=5) | ウシエビ (n=5) | インドエビ (n=5) | ブルーシュリンプ (n=4) | 輸入バナメイエビ (n=5) |
|-------------------|---------------------|------------------|----------------|----------------|-------------------|-------------------|
| Asp | 13.2 ± 1.5 | 16.0 ± 23.9 | 2.4 ± 1.2 | 4.5 ± 3.7 | 5.4 ± 4.2 | 5.1 ± 3.6 |
| Glu | 39.9 ± 15.3 | 36.8 ± 24.2 | 26.6 ± 4.6 | 38.7 ± 4.5 | 29.5 ± 3.5 | 49.1 ± 7.5 |
| Asn | 46.4 ± 12.1 | 23.8 ± 7.2 | 32.8 ± 7.5 | 37.8 ± 7.0 | 20.8 ± 6.2 | 28.5 ± 5.5 |
| Ser | 18.4 ± 6.0 | 10.7 ± 4.0 | 25.4 ± 13.8 | 8.6 ± 2.5 | 6.8 ± 0.9 | 30.2 ± 7.0 |
| Gln | 379.9 ± 102.9 | 191.9 ± 54.7 | 156.1 ± 50.0 | 195.6 ± 91.3 | 188.5 ± 91.0 | 155.5 ± 37.5 |
| His | 55.6 ± 21.8 | 51.1 ± 37.9 | 30.7 ± 8.5 | 25.8 ± 17.5 | 40.0 ± 14.5 | 27.7 ± 11.8 |
| Thr | ND ^{*2} | ND ^{*2} | 7.5 ± 10.0 | 6.5 ± 9.1 | ND ^{*2} | 17.3 ± 4.3 |
| Gly | 1501.6 ± 542.1 | 1754.0 ± 630.4 | 652.1 ± 65.0 | 669.2 ± 291.5 | 806.8 ± 239.5 | 422.1 ± 34.8 |
| Arg | 1094.7 ± 210.5 | 992.0 ± 181.9 | 731.7 ± 105.7 | 936.0 ± 163.1 | 749.8 ± 184.0 | 617.3 ± 25.9 |
| Tau | 50.9 ± 9.9 | 76.4 ± 12.4 | 45.5 ± 19.7 | 40.0 ± 23.3 | 52.0 ± 12.3 | 29.8 ± 3.3 |
| Ala | 49.1 ± 2.9 | 103.8 ± 16.3 | 42.6 ± 1.3 | 99.5 ± 17.2 | 75.5 ± 26.2 | 98.2 ± 13.8 |
| Tyr | 21.1 ± 7.1 | 14.5 ± 11.9 | 12.7 ± 8.0 | 17.4 ± 5.2 | 12.3 ± 3.2 | 26.3 ± 4.9 |
| Val | 28.8 ± 15.9 | 11.1 ± 4.5 | 22.3 ± 9.4 | 20.9 ± 12.2 | 13.6 ± 7.0 | 29.0 ± 5.2 |
| Met | 8.0 ± 7.2 | 2.8 ± 2.5 | 12.7 ± 8.5 | 1.3 ± 1.0 | 1.0 ± 1.3 | 14.2 ± 2.2 |
| Trp | 9.0 ± 16.4 | 5.7 ± 8.6 | 21.5 ± 40.7 | 10.7 ± 17.0 | 4.5 ± 5.2 | 4.6 ± 0.8 |
| Phe | 29.3 ± 26.7 | 15.0 ± 16.5 | 29.7 ± 18.3 | 18.6 ± 13.1 | 19.0 ± 23.6 | 13.4 ± 12.7 |
| Ile | 15.7 ± 10.0 | 5.2 ± 3.1 | 9.4 ± 5.6 | 15.8 ± 12.4 | 14.0 ± 6.1 | 18.8 ± 3.4 |
| Lys | 26.9 ± 17.5 | 27.0 ± 15.1 | 17.6 ± 10.0 | 24.6 ± 5.6 | 18.2 ± 14.2 | 43.6 ± 13.4 |
| Leu | 18.8 ± 18.2 | 11.6 ± 7.7 | 16.0 ± 8.9 | 14.7 ± 13.2 | 15.9 ± 10.8 | 29.9 ± 5.1 |
| SUM ^{*3} | 3454.1 ± 662.4 | 3440.0 ± 550.1 | 1924.7 ± 217.9 | 2067.8 ± 278.4 | 2136.9 ± 542.9 | 1733.8 ± 88.7 |

*1 数値は平均値±標準偏差を表す

*2 検出されず

*3 遊離アミノ酸の合計

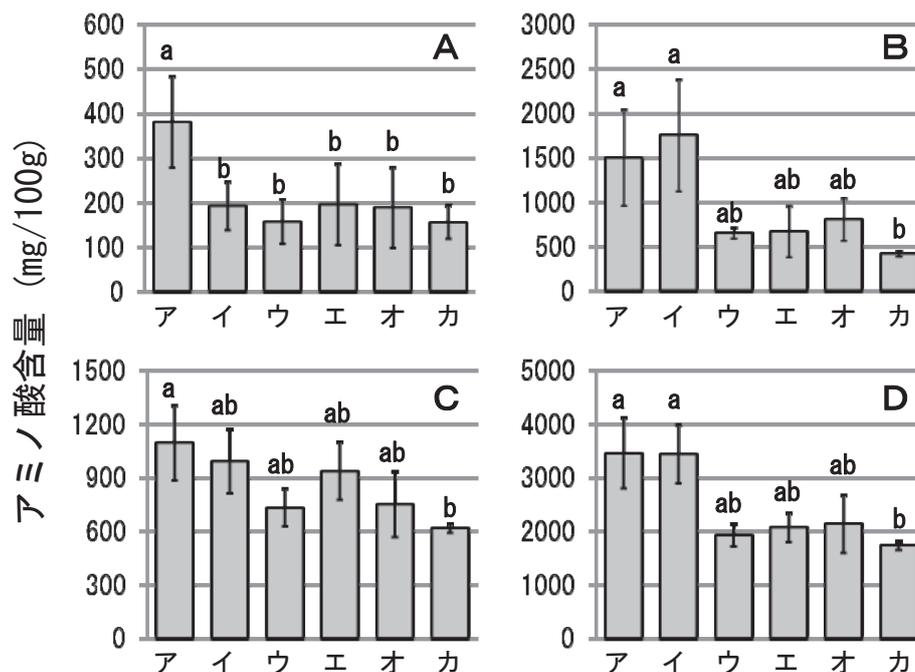


図2. エビ各種のグルタミン・グリシン・アルギニン・総遊離アミノ酸含量の比較
 A: グルタミン, B: グリシン, C: アルギニン, D: 総遊離アミノ酸, の比較結果を示す (ア: ISPS パナメイエビ, イ: クルマエビ, ウ: ウシエビ, エ: インドエビ, オ: ブルーシュリンプ, カ: 輸入パナメイエビ)
 a, b は統計的有意差 ($p < 0.05$) を示す

ことから、筋肉中遊離アミノ酸含量が低下していることが予想されたが、本実験により遊離アミノ酸が比較的高い含量で存在することが明らかとなった。ISPS で使用している飼料の粗タンパク質含量は 38% である。これは、一般的に使用されているパナメイエビ用の飼料組成と差異はなく、クルマエビ用飼料 (54%) よりも低い¹²⁾。しかし、パナメイエビは他のクルマエビ科の種に比べて飼料中のタンパク質を効率よく吸収・利用することができる性質をもつため^{13, 14)}、ISPS パナメイエビは低タンパク飼料を給餌してもクルマエビと同等の遊離アミノ酸含量を維持していたと考えられる。

しかし、ISPS パナメイエビと同種である輸入パナメイエビおよび他の外国産エビは、国内で生産された ISPS パナメイエビやクルマエビに比べて筋肉中遊離アミノ酸含量が低かった。氷蔵や冷蔵などの保存条件は水産物の遊離アミノ酸含量に大きな影響を与えることが知られているが¹⁵⁻¹⁸⁾、甲殻類では諸説あり一定の見解が得られていないため¹⁹⁻²²⁾、本結果と保存状態との関連は明らかでない。しかし、国内で生産・出荷される ISPS パナメイエビやクルマエビに比べ、外国産のエビは生産地での収穫・出荷から日本市場に届くまで複雑な流通経路を長時間に亘って輸送されていることを考慮すると、外国産エビはその流通過程において温度の変化などの影響を受けた結果、国内産のエビよりも遊離アミノ酸含量が低下した可能性が考えられる。一方、ISPS では商品サイズに達したパナメイエビを収穫後に速やかに氷殺したのちに急速冷凍したものを商品として出荷している。こ

の流通経路の差が ISPS パナメイエビが外国産エビよりも高い筋肉中遊離アミノ酸含量を示したひとつの要因となっていると考えられる。

グルタミン、グリシン、アルギニンをはじめ各種遊離アミノ酸は甲殻類の甘味、うま味、風味の向上に重要な役割を果たすが⁹⁾、遊離アミノ酸以外にも ATP 関連化合物や無機イオン、低分子ペプチドなども甲殻類の重要な呈味成分として知られている^{9, 23)}。したがって、食品としての ISPS パナメイエビの味を他のエビ類と正確に比較・評価するためには遊離アミノ酸だけでなく、上記呈味成分を含む詳細な分析や官能評価試験を行う必要がある。しかし、少なくとも遊離アミノ酸含量に関しては、ISPS パナメイエビは国内産クルマエビと同等であり、外国産エビよりも食品として優れた性質を有することが明らかとなった。以上のように高品質なパナメイエビを生産可能な ISPS は、国内におけるエビ類の安定供給という重要課題の解決に対して、呈味という新たな付加価値を生み出す新規のエビ養殖技術として今後の発展が期待される。

謝 辞

本研究は生物系特定産業技術研究支援センターによるイノベーション創出基礎的研究推進事業 (発展型研究一般枠) の研究資金により行われた。

文 献

- 1) WORM, B., E.B. BARBIER, N. BEAUMONT, J.E. DUFFY, C. FOLKE, B.S. HALPERN, J.B. JACKSON, H.K. LOTZE, F. MICHELI, S.R. PALUMBI, E. SALA, K.A. SELKOE, J.J. STACHOWICZ, and R. WATSON (2006) Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science*, **314**, 787-790.
- 2) 野原節雄 (2008) 全国 600ヶ所での「屋内型エビ生産」を目指して. 農林水産技術研究ジャーナル, **31**, 37-40.
- 3) マーシー ニコル ワイルダー・野原節雄・奥村卓二・福崎竜生 (2009) 生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業 (2008年度終了課題) 研究成果集, 1-4 pp.
- 4) BRIGGS, M., S. F. SMITH, R. SUBASINGHE, and M. PHILLIPS (2004) Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. FAO RAP Publication, 79 pp.
- 5) クラウディオ チャベス フスト (1990) 世界のエビ類養殖 - その技術と応用 -. 緑書房, 東京, 380 pp.
- 6) SAMOCHA, T.M., A.L. LAWRENCE, and D. POOSER (1998) Growth and survival of juvenile *Penaeus vannamei* in low salinity water in a semi-closed recirculating system. *Isr. J. Aquac.-Bamidgeh.*, **50**, 55-59.
- 7) JAYASANKAR, V., S. JASMANI, T. NOMURA, S. NOHARA, D.T.T. HUONG, and M.N. WILDER (2009) Low salinity rearing of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Acclimation, survival and growth of postlarvae and juveniles. *JARQ - Jpn. Agric. Res. Q.*, **43**, 345-350.
- 8) ABE, H., N. YOSHIKAWA, M.G. SAROWER, and S. OKADA (2005) Physiological function and metabolism of free D-alanine in aquatic animals. *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1571-1577.
- 9) 福家眞也 (2003) 水産物の味. 「食品と味」(伏木 亨編), 光琳, 東京, 155-164 pp.
- 10) OKUMA, E., and H. ABE (1994) Total D-amino and other free amino acids increase in the muscle of crayfish during seawater acclimation. *Comm. Biochem. Physiol.*, **109A**, 191-197.
- 11) NIMURA, N., and T. KINOSHITA (1986) Ortho-phthalaldehyde-N-acetyl-L-cysteine as a chiral derivatization reagent for liquid chromatographic optical resolution of amino acid enantiomers and its application to conventional amino acid analysis. *J. Chromatogr.*, **352**, 169-177.
- 12) 越塩俊介 (2009) 甲殻類の栄養と栄養素に対する要求. 「改訂 魚類の栄養と飼料」(渡邊 武編), 恒星社厚生閣, 東京, 169-185 pp.
- 13) SUDARYON, A., E. TSVETNENKO, and L.H. EVANS (1999) Replacement of soybean meal by lupin meal in practical diets for juvenile *Penaeus monodon*. *J. World Aquacult. Soc.*, **30**, 46-57.
- 14) KURESHY, N., and D.A. DAVIS (2002) Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, **204**, 125-143.
- 15) 伊藤 啓二 (1959) 水産動物筋肉エキスのアミノ酸組成-II 貝肉の遊離アミノ酸とその腐敗による消長. 日本水産学会誌, **25**, 658-660.
- 16) SAKAGUCHI, M., M. MURATA, and A. KAWAI (1984) Changes in free amino acids contents in juvenile mackerel *Scomber japonicus* muscle during ice storage. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50**, 323-329.
- 17) 村田道代・赤羽義章・塩田二三子・坂口 守彦 (1993) 氷蔵中のタラとハマチ 筋肉の呈味と IMP 及び遊離アミノ酸含量の変化. 調理科学, **26**, 310-314.
- 18) 小林美穂・落合芳博 (2001) 貝類可食部の冷蔵及び加熱調理に伴う遊離アミノ酸の挙動. 茨城大学教育学部紀要 (自然科学), **50**, 59-66.
- 19) COBB, B.F., C. VANDERZA, and K. HYDER (1974) Effect of ice storage upon free amino-acid contents of tails of white shrimp (*Penaeus setiferus*). *J. Agr. Food Chem.*, **22**, 1052-1055.
- 20) TOKUNAGA, T., H. IIDA, K. NAKAMURA, K. SATO, S. IBE, and A. FUJISHIMA (1983) Changes in freshness and taste of horsehair crab (*Erimacrus isenbekii*) meat during iced storage. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, **110**, 49-58.
- 21) MIYAGAWA, M., Y. TABUCHI, K. YAMANE, H. MATSUDA, S. WATABE, K. HASHIMOTO, R. KATAKAI, and Y. OTSUKA (1990) Changes in the free amino acid profile of snow crab *Chionoecetes opilio* muscle during storage in ice. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 359-364.
- 22) MATSUMOTO, M., and H. YAMANAKA (1990) Changes in contents of glycolytic metabolites and free amino acids in the muscle of Kuruma prawn during storage. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 1515-1520.
- 23) 小山法希・松川雅仁・島田昌彦・佐藤良一 (2008) パナメイエビの筋肉中の ATP 関連化合物の変化と味覚への影響. 日本水産学会誌, **74**, 1068-1074.