

1 養殖ブリ血合筋の褐変機序に及ぼす筋肉糖代謝並びに脂質酸化の影  
2 響

3 ブリ血合筋の褐変初期および進行機序

4

5 久保久美子, <sup>1\*</sup>,<sup>2</sup> 桑原浩一, <sup>1</sup>野口絵理香, <sup>1</sup>谷山茂人, <sup>2</sup>橘勝康, <sup>2</sup>

6 村田昌一<sup>2</sup>

7 <sup>1</sup>長崎県総合水産試験場,<sup>2</sup>長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科

8

9 Influence of the muscle glycometabolism and the lipid oxidation  
10 on a discoloration mechanism of the dark muscle in cultured

11 yellowtail *Seriola quinqueradiata*

12

13 KUMIKO KUBO,<sup>1,\*2</sup> KOICHI KUWAHARA,<sup>1</sup> ERIKA NOGUCHI,<sup>1</sup> SHIGETO

14 TANIYAMA,<sup>2</sup> KATSUYASU TACHIBANA<sup>2</sup> AND MASAKAZU MURATA<sup>2</sup>

15

16 <sup>1</sup>Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries, Nagasaki, Nagasaki

17 851-2213 and <sup>2</sup>Laboratory of Fisheries Nutritional Science, Graduate

18 School of Sciences & Environmental Studies, Nagasaki University,

19 Bunkyo-machi Nagasaki, Nagasaki 852-8521, Japan

20

21 \*Tel.:81-95-850-6314.Fax:81-95-850-6365.

22 Email:ku.kubo@pref.nagasaki.lg.jp

23 養殖ブリ血合筋の褐変機序に及ぼす筋肉糖代謝並びに脂質酸化の影  
24 響

25

26 久保久美子，<sup>1,\*</sup> 桑原浩一，<sup>1</sup>野口絵理香，<sup>1</sup>谷山茂人，<sup>2</sup>橘勝康，<sup>2</sup>  
27 村田昌一<sup>2</sup>

28 <sup>1</sup>長崎水試，<sup>2</sup>長大院水環

29

30 ブリ血合筋の褐変は血合筋と普通筋の境界部分から起こり，体表  
31 側に向かって進行する。これらの現象を解明するために，ミオグロ  
32 ビンのメト化に關与する各筋肉の糖代謝および脂質酸化を測定した。  
33 褐変は乳酸の生成に伴い pH が最も低下した血合筋と普通筋の境界  
34 部分で始まると考えた。次に，血合筋から抽出された脂質とミオグ  
35 ロピンとの混合実験から，リン脂質の酸化がメト化を促進すること  
36 が観察された。以上の結果から，褐変はリン脂質の酸化により血合  
37 筋と普通筋の境界部分から体表側に向かって進行したと考えた。

38

39

40 キーワード：pH，解糖系酵素（カイトウケイコウソ）褐変（カッペ  
41 ン），脂質酸化（シシツサンカ），血合筋（チアイキン），普通筋（フ  
42 ツウキン），メト化（カ），ブリ

43 The discoloration of the yellowtail dark muscle begins at the  
44 boundary part between dark muscle and ordinary muscle, and  
45 progresses toward the body surface side. For deeper understanding  
46 of this phenomenon, we examined the processes of glycolysis and  
47 lipid oxidation in the two types of muscles. The glycolysis  
48 analyses indicated that increase of lactic acid and decline of pH  
49 occurred at the boundary between dark muscle and ordinary  
50 muscle. An in vitro experiment using the dark muscle extract  
51 showed that decline of pH promoted the oxidation of myoglobin.  
52 An in vitro experiment using the mixture of extracted lipid and  
53 myoglobin from the dark muscle showed that oxidation of  
54 phospholipid promoted the oxidation of myoglobin. Thus, we  
55 conclude that the discoloration, caused by decline of pH at the  
56 boundary between dark muscle and ordinary muscle, progresses  
57 toward the body surface with oxidation of the phospholipid.

58 魚類筋肉中にある色素タンパク質のミオグロビンのヘム鉄は二価  
59 (オキシミオグロビン, 還元型ミオグロビン) と三価 (メトミオグ  
60 ロビン) の状態で存在し, ヘム鉄の電価とこれに結合する分子によ  
61 って色調は変化する。<sup>1)</sup> 生体では, 三価のメトミオグロビンは還元  
62 性物質や NADH-チトクロム b<sub>5</sub> 還元酵素 (EC 1.6.2.2) により直ち  
63 にミオグロビンに還元されるが, 死後は還元作用を失い, メトミオ  
64 グロビンが蓄積し筋肉の褐色化 (褐変) を引き起こす。<sup>2)</sup> 死後, ヘ  
65 ム鉄の二価から三価への変化 (メト化) は筋肉中の温度, pH, 酸素  
66 分圧, 過酸化物等の影響を受け自働酸化で進行する。<sup>3,4,5,6)</sup> このた  
67 め, マグロ, ブリ, カツオ類等のミオグロビンが多い赤身魚では褐  
68 変が発生しやすく商品価値の低下に結びついている。

69 これらの報告を基に, 養殖クロマグロでは出荷前の絶食によりグ  
70 リコーゲンを減らし, pH 低下を抑制, メト化の自働酸化速度を遅  
71 くする試みが行われ,<sup>7)</sup> 養殖ブリでは直接ミオグロビンのメト化防  
72 止またはメトミオグロビンの還元を目的とし, ビタミン E, ビタミ  
73 ン C, フェノール類などを多く含むユズ果汁や果皮, オリーブ葉粉  
74 末などを添加する試みが行われている。<sup>8,9,10,11)</sup>

75 しかしながら, これらの手法によっても完全なメト化防止 (予防)  
76 とはなりえず, ブリの場合, 褐変は血合筋の一部分から始まり, 徐々  
77 に血合筋全体に広がるようである。大山らは背骨周辺部から始まり,  
78 徐々に体表部に向け進行し, 褐変化の進行時における血合筋の色調  
79 は均一ではないと報告している。<sup>11)</sup> また, この現象に関して, 森岡

80 らは、ブリ血合筋の褐変は血合筋と普通筋の境界から始まり、それ  
81 が血合肉全体に広がることを確認しており、さらに血合筋と普通筋  
82 の pH の差がこの現象に関係していることを報告している。<sup>12)</sup> しか  
83 し、その詳細については十分にはわかっていない。

84 ミオグロビンの自働酸化は塩濃度、pH、温度、酸素分圧に影響さ  
85 れる一次反応であり、<sup>3)</sup> 普通筋との境界から始まった褐変が徐々に  
86 体表部に向け進行する現象は、血合筋と普通筋の pH の差だけでは  
87 説明できないと考える。ブリを含む魚類ではミオグロビンのメト化  
88 が脂質酸化を促進することが報告されている。<sup>13,14,15,16)</sup> 一方、n-6  
89 脂肪酸酸化の副産物である 4-ヒドロキシノネナールがミオグロビ  
90 ンのメト化を促進する報告があり、<sup>17)</sup> ブリでは脂質酸化を抑制する  
91 ことで褐変抑制の効果が認められ、脂質酸化とメト化との相互作用  
92 が示唆されている。<sup>18,19)</sup> Baron and Andersen は脂質を多く含む筋  
93 肉食品の酸化による劣化の理解には主要な脂質成分であるトリグリ  
94 セリドおよびリン脂質とヘムタンパク質との相互作用について更な  
95 る検討が必要と述べている。<sup>20)</sup>

96 そこで、本研究では養殖ブリ血合筋の褐変機序に及ぼす筋肉糖代  
97 謝に着目し、褐変が血合筋と普通筋の境界から生じる要因を検討し  
98 た。また、褐変が周辺部に徐々に進行する要因は脂質酸化に着目し、  
99 脂質酸化がメト化に及ぼす影響を検討した。

100

101

## 材料と方法

102 供試魚 長崎県長崎市地先で EP 給餌により養殖されたブリを用  
103 いた。

104 **ブリ切身の色調の経時変化** 2017 年 11 月 20 日にブリ 3 尾 (2  
105 年魚, 体重:  $5.8 \pm 0.4$  kg) を延髄刺殺し, 24 時間の氷蔵後, 魚体中  
106 央部を厚さ 1 cm の切身状に 5 枚切り出した。切身は乾燥を防ぐた  
107 め蓋付きプラスチック製容器 (蝶プラ工業社製 タイトボックス)  
108 に入れ, 上面が空気に曝される状態で 10 保管し, 経時的にデジタ  
109 ルカメラ (オリンパス社製  $\mu$  790SW) を用いて撮影した。また,  
110 血合筋中央部の色調を色彩色差計 (コニカミノルタ社製 CR-300)  
111 で  $L^*$  値 ( $+L^*$  = 白色,  $-L^*$  = 黒色),  $a^*$  値 ( $+a^*$  = 赤色,  $-a^*$  = 緑色),  
112  $b^*$  値 ( $+b^*$  = 黄色,  $-b^*$  = 青色) を用いて切身毎に測定し, 最大値,  
113 最小値を除く 3 回の測定値から平均値を求めた。

114 **魚肉ブロックの pH と糖代謝関連成分の測定** 切身の色調測定に  
115 用いたブリ 3 尾の頭部側筋肉ブロック 5 cm を取上げ後直ちに切出  
116 し, 血合筋 (Fig. 1a), 普通筋 (Fig. 1b) および血合筋と普通筋の  
117 境界面 (以後, 境界面 (Fig. 1c)) の pH を測定した。pH 測定は測  
118 定電極が直径 3 mm の円錐形の pH メーター (テスト社製 Testo <Fig. 1  
119 205) を用い, 境界面の測定は pH メーターの先端が境界面を捉える  
120 ように差し込んだ。切出した筋肉ブロックはポリエチレン製の袋に  
121 入れ氷蔵し, 経時的に測定した。

122 血合筋と普通筋のグリコーゲン量と乳酸量の測定は背側中央部を  
123 用いて 0, 24 時間後に後述の方法により測定した。

124 境界面モデルの調製と pH および糖代謝関連成分の測定 境界面  
125 から褐変が生じる状況を再現することを目的として境界面モデルを  
126 作製した。

127 2016年6月28日に延髄刺殺し氷蔵で搬入(所要時間15分)し  
128 たブリ(3年魚,体重:6.4 kg)から直ちに血合筋と普通筋を採取  
129 し,それぞれの試料に5倍量の蒸留水を加え,ホモジナイズしたも  
130 のを血合筋懸濁液と普通筋懸濁液とした。それぞれの懸濁液に等量  
131 の蒸留水を加えた血合筋ホモジネート,普通筋ホモジネートおよび  
132 それぞれの懸濁液を等量混合した混合ホモジネートを調製し,5  
133 で保管,経時的にpH,グリコーゲン量,乳酸量を測定した。なお,  
134 pH測定は卓上型pHメーター(HORIBA社製 F-54)を用いた。

135 血合筋と普通筋の解糖系関連酵素活性の測定 2016年11月1日  
136 に活魚で搬入したブリ6尾(当歳魚,体重±標準偏差:0.9±0.1 kg)  
137 を延髄刺殺後直ちに血合筋と普通筋を採取し,それぞれのグリコー  
138 ゲン・ホスホリラーゼ(EC 2.4.1.11, GPase),ホスホフルクトキナ  
139 ーゼ(EC 2.7.1.11, PFK)ピルビン酸キナーゼ(EC 2.7.1.40, PK),  
140 および乳酸脱水素酵素(EC 1.1.1.27, LDH)の活性を測定した。試  
141 料はマイクロチューブ(nippi社製 Bio Masher )に0.01 gを精  
142 秤し,抽出用緩衝液あるいは蒸留水 200  $\mu$ L を加え,電動攪拌機  
143 (nippi社製 Power Masher )を用いてホモジナイズした。その  
144 後,4 ,15,000  $\times g$  で20分間遠心分離し,上清を粗酵素液とした。  
145 GPase の抽出緩衝液は1 mM EDTA, 10 mM NaF, 5 mM 2-メルカ

146 プトエタノール, 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.8) を用い, 活性測  
147 定は Hata らの方法<sup>21)</sup> に従った。PFK 抽出緩衝液は 50 mM リン酸  
148 緩衝液 (pH 8.0) を用い, 活性測定は垂井, 河野の方法<sup>22)</sup> に準じ  
149 て測定した。すなわち, 終濃度が 91.2 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH  
150 9.0), 5 mM フルクトース-6-リン酸・2Na, 1.3 mM ATP, 1.12 mM  
151 フォスファエノールピルビン酸・TCA, 0.262 mM NADH, 5 mM KCl,  
152 2 mM MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O, PK, LDH を含む反応液 300 μL に粗酵素液 1  
153 μL を加え, 30 における 340 nm の吸光度を 5 分間測定した。PK  
154 抽出は蒸留水を用い, 活性測定は Moon and Johnston の方法<sup>23)</sup> に  
155 従った。LDH 抽出は Johnston の方法<sup>24)</sup>, 活性測定は Vassalt の方  
156 法<sup>25)</sup> に従った。各酵素活性は組織重量 (g) あたり 1 分間に変化す  
157 る補酵素の μmol 数で示した。

158 **ミオグロビンのメト化に及ぼす pH の影響** 2012 年 3 月 26 日に  
159 延髄刺殺し, 24 時間氷蔵したブリ 1 尾 (1 年魚, 体重: 0.8 kg) の  
160 血合筋からミオグロビンを抽出した。ミオグロビンの抽出は尾藤の  
161 方法<sup>26)</sup> を改変し, 血合筋に冷却した蒸留水を 9 倍量加え, 石英砂  
162 と共に乳鉢で磨り潰し, 濾紙 (アドバンテック社製 5A) で濾過した  
163 ものを粗ミオグロビン抽出液とした。抽出液は 8,500 ×g で 5 分間冷  
164 却遠心分離し, この上清に NaOH 水溶液あるいはマレイン酸で pH  
165 を 7.0, 6.5, 6.0, 5.5 に調整し, バイオマルチインキュベータ (NK  
166 システム社製 LH-30-8CT) 内で 10 保存し, 経時的にメト化率を  
167 測定した。なお, pH は混合ホモジネートの pH を参考にして 5.5 か



168 ら 7.0 の範囲とした。

169 **普通筋と接する血合筋の脂質酸化度** 切身の色調測定に用いた  
170 ブリ 3 尾の中央部より後端部分の血合筋を厚さ 5 mm の刺身状にス  
171 ライスして用いた。試料は乾燥を防ぐため蓋付きプラスチック製容  
172 器（蝶プラ工業社製 タイトボックス）に入れ，両面が空気に曝さ  
173 れるよう容器の中にはステンレス金網を敷き 10 で保管し，経時的  
174 に脂質酸化度を測定した。脂質酸化度はチオバルビツール酸  
175 （TBARS）比色法による過酸化脂質とした。普通筋に接する側から  
176 3 mm までの血合筋と体表側から 3 mm までの血合筋をそれぞれ接  
177 触側と体表側とした。細い部分は中間線で切り分け接触側と体表側  
178 とし，残りの血合筋を中間部として用いた。なお，ソックスレー抽  
179 出法を用いて血合筋の脂肪量を測定した。

180 **ミオグロビンのメト化に及ぼす脂質酸化の影響** 2017 年 5 月 24  
181 日に延髄刺殺し，24 時間氷蔵したブリ（3 年魚，体重：4.9 kg）の  
182 血合筋から Bligh and Dyer 法<sup>27)</sup>に従い総脂質を抽出し，伊藤らの  
183 方法<sup>28)</sup>に準じてシリカゲルカラムクロマトグラフィーによりトリ  
184 グリセリド（TG），リン脂質（PL）画分を分画した。分画した脂質  
185 は実験に供するまでポリプロピレン製の容器に窒素封入し，-80 で  
186 保管した。また，2017 年 6 月 13 日に延髄刺殺し，24 時間氷蔵した  
187 ブリ（2 年魚，体重：3.8 kg）の血合筋から前述の方法に従いミオ  
188 グロビンを抽出した。抽出液のタンパク質濃度は 16.4 mg/mL であ  
189 った。なお，タンパク質濃度はウマミオグロビン（ナカライテスク

190 社製)を標準物質としてビウレット法<sup>29)</sup>により定量した。

191 総脂質(平均±標準偏差:500.0±0.5 mg)から分画した脂質成分  
192 の全量(TG平均±標準偏差:428.6±4.6 mg, PL平均±標準偏差:  
193 53.4±1.7 mg)を用いた。ミオグロビン(Mb)と混合する区(TG+Mb  
194 区, PL+Mb区)とミオグロビンと混合しない単独区(TG区, PL  
195 区)および粗ミオグロビン抽出液(Mb区)とした。分画した脂質  
196 は粗ミオグロビン抽出液または蒸留水と混合する前に0.2 Mリン酸  
197 緩衝液(pH 7.0)20 mLとジメチルスルフォキシド(DMSO)0.1  
198 mLを加え,超音波分散機(トミー精工社製 UR-20P)を用いて乳  
199 化した。混合区はミオグロビン抽出液と乳化した脂質成分,単独区  
200 は蒸留水,粗ミオグロビン抽出液は0.2 Mリン酸緩衝液(pH 7.0)  
201 を20 mL加え混合し,5℃で保管,経時的にメト化率およびTBARS  
202 を測定した。

203 **成分分析** グリコーゲンの精製およびグリコーゲンからグルコ  
204 ースへの分解は三坂らの方法<sup>30)</sup>を用いた。グリコーゲンを分解し  
205 た液はムタロターゼ-GOD法に基づく測定キットであるグルコース  
206 C テストワコー(和光純薬工業社製標準物質添付 測定波長505  
207 nm)を用い,吸光度測定は分光光度計(島津製作所社製 UV-1650PC)  
208 を用いた。求めたグルコース量に0.9を乗じてグリコーゲン量とし  
209 た。

210 乳酸測定のための試料は過塩素酸でタンパクを除去,1,400×gで  
211 3分間遠心分離し,上清をポアサイズ0.22 μmのメンブランフィル

212 ター (MILLIPORE 社製 MILLEX-GP) で濾過した。濾液は酵素法  
213 <sup>31)</sup>を改変した Igisu *et al.*<sup>32)</sup>に従い 25 で 30 分間経時的に吸光度  
214 (340 nm) を測定した。乳酸濃度は L-乳酸 (和光純薬工業社製,  
215 特級) を標準物質として算出した。

216 メト化率は粗ミオグロビン抽出液を 8,500 ×g で 5 分間冷却遠心分  
217 離し, 上清をポアサイズ 0.22 μm のメンブランフィルターで濾過,  
218 <sup>33)</sup>分光光度計を用いて可視部吸収スペクトル (波長 500 700 nm)  
219 を測定した。メト化率の計算は井ノ原らの方法 <sup>34)</sup>を用いた。すな  
220 わち,  $metMb(\%) = -99.70 (A_{548\text{ nm}}/A_{524\text{ nm}}) + 164.96$ 。A は吸光値。

221 TBARS は精秤した血合筋 0.5 g に 1 % NaCl 5 mL を加えホモジ  
222 ナイズした溶液または粗ミオグロビン抽出液と分画脂質を混ぜた溶  
223 液 0.75 mL に等量の 10 % TCA を加えタンパクを沈殿させた後,  
224 5,300 ×g で 5 分間遠心分離した上清を適宜希釈し, 希釈液 1.5 mL  
225 に 1 % EDTA 0.5 mL および 1 % TBA 試薬 0.5 mL を混合し, 今井,  
226 荒井の方法 <sup>35)</sup> に準じて沸騰水中で 15 分発色させた。発色後, 常温  
227 まで急冷し, 5,300 ×g で 5 分間遠心分離, 上清の吸光度 (532 nm)  
228 を測定, 分子吸光係数  $1.56 \times 10^5$  を用いて TBARS 濃度を算出した。  
229 <sup>36)</sup>

230 **統計処理** 統計処理は Statcel ver.3 を用いた。<sup>37)</sup> 2 種間の比較  
231 には Student の *t* 検定を行い, 3 種間以上の比較は, 正規分布に従  
232 い, 分散が均一とみなせる場合, 一元配置分散分析を行い有意差が  
233 見られた場合は引き続き Tukey-Kramer 検定を行った。危険率は

234 5 %で有意差を判定した。

235

236

## 結果

237 **ブリ切身の色調の経時変化** 切出し直後の血合筋中央部の色調  
238 は L\*値 (平均 ± 標準偏差)  $40.6 \pm 0.3$ , a\*値  $21.0 \pm 0.4$ , b\*値  $9.8 \pm 0.9$   
239 であった。その後 L\*値の変化はほとんどなく, a\*値は4時間後に  $18.5$   
240  $\pm 0.9$  となった後 24 時間までは変化が少なく, その後 36 時間後に  
241 は  $13.5 \pm 1.4$ , 48 時間後には  $8.7 \pm 0.2$  に低下した。b\*値は徐々に増  
242 加し 48 時間には  $13.8 \pm 0.2$  となった。なお, 8 時間後の境界面付近  
243 の血合筋にはわずかに褐変が認められ, その後, 体表側に向け徐々に  
244 に褐変が進行し, 48 時間後には全体的に褐変した (Fig. 1, Fig. 2)。

<Fig. 2

245 **魚肉ブロックの pH と糖代謝関連成分** 血合筋と普通筋および境  
246 界面の pH を Table 1 に示した。取上げ 0 時間の pH (平均 ± 標準偏  
247 差) は血合筋  $7.31 \pm 0.15$ , 普通筋  $7.22 \pm 0.12$ , 境界面  $7.32 \pm 0.02$   
248 と有意な差は認められなかったが, 1 時間以降, 境界面の pH は他  
249 の部位より低い値を示し, 24 時間後の境界面は血合筋に対し有意に  
250 低い値となった ( $p < 0.05$ )。

<Table 1

251 血合筋と普通筋のグリコーゲンおよび乳酸量を Fig. 3 に示した。  
252 0 時間後のグリコーゲン量 (平均 ± 標準偏差) は血合筋  $469.0 \pm 91.0$   
253 mg/100g, 普通筋  $266.6 \pm 28.1$  mg/100g であったが, 24 時間後は血  
254 合筋  $211.5 \pm 35.4$  mg/100g, 普通筋  $32.4 \pm 8.0$  mg/100g となり, 血  
255 合筋では  $257.5$  mg/100g, 普通筋では  $233.6$  mg/100g の減少となっ

<Fig. 3

256 た。一方, 0 時間後の乳酸量は血合筋  $4.4 \pm 1.9 \mu\text{mol/g}$ , 普通筋  $33.6$   
257  $\pm 11.8 \mu\text{mol/g}$  であったが, 24 時間後の血合筋は  $31.2 \pm 5.7 \mu\text{mol/g}$ ,  
258 普通筋は  $89.7 \pm 20.6 \mu\text{mol/g}$  となり, 血合筋では  $26.8 \mu\text{mol/g}$ , 普通  
259 筋では  $56.1 \mu\text{mol/g}$  の増加となった。

260 **境界面モデルの pH および糖代謝関連成分** 境界面モデルの pH,  
261 グリコーゲン量, 乳酸量を Fig. 4 に示した。0 時間の血合筋ホモジ **<Fig. 4**  
262 ネット pH は 6.67 で, 普通筋ホモジネットと混合ホモジネットはそ  
263 れぞれ 6.30, 6.29 であった。血合筋ホモジネットの pH はあまり低  
264 下せず, 普通筋ホモジネットでは 2 時間後まで低下し 5.89 となり,  
265 混合ホモジネットでは 3 時間後まで低下し 5.68 となった。血合筋  
266 ホモジネットのグリコーゲン量は  $0.75 \text{ mg/mL}$  から  $0.62 \text{ mg/mL}$ ,  
267 普通筋は  $0.13 \text{ mg/mL}$  から  $0.08 \text{ mg/mL}$  に減少した。混合ホモジネ  
268 ートのグリコーゲン量は 0 時間で血合筋ホモジネットより低い  $0.63$   
269  $\text{mg/mL}$  を示し, 24 時間後には  $0.34 \text{ mg/mL}$  となった。血合筋ホモ  
270 ジネットの乳酸量は  $0.21 \text{ mg/mL}$  から  $0.56 \text{ mg/mL}$  で推移し, 普通  
271 筋ホモジネットは  $6.48 \text{ mg/mL}$  から  $9.09 \text{ mg/mL}$  に増加した。一方,  
272 0 時間の混合ホモジネットの乳酸量は血合筋ホモジネット  $0.35$   
273  $\mu\text{mol/mL}$  と普通筋ホモジネット  $6.48 \mu\text{mol/mL}$  の合計より高い  
274  $11.34 \mu\text{mol/mL}$  を示し, 24 時間後には  $16.46 \mu\text{mol/mL}$  となった。

275 **血合筋および普通筋の解糖系酵素活性** 血合筋と普通筋の解糖  
276 系酵素活性の結果を Table 2 に示した。GPase 活性は血合筋  $4.6 \pm$  **<Table 2**  
277  $0.5 \mu\text{mol/min/g}$ , 普通筋  $6.6 \pm 0.5 \mu\text{mol/min/g}$ , その差は 1.4 倍であ

278 った。PFK 活性は血合筋  $5.1 \pm 0.4 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  , 普通筋  $21.8 \pm 3.7$   
279  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  , その差は 4.3 倍であった。PK 活性は血合筋  $19.5 \pm 3.8$   
280  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  , 普通筋  $127.3 \pm 42.7 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  , その差は 6.5 倍であ  
281 った。LDH 活性は血合筋  $362.4 \pm 28.2 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  , 普通筋  $1,648.2$   
282  $\pm 149.6 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  , その差は 4.5 倍であった。測定した酵素活性  
283 は血合筋と比較し普通筋がすべて有意に高い値を示した ( $p < 0.05$ )。

284 **ミオグロビンのメト化に及ぼす pH の影響** 異なる pH に調整し  
285 た粗ミオグロビン抽出液のメト化率の経時変化を Fig. 5 に示した。 <Fig. 5  
286 調整直後のメト化率は 9.5-14.5 % の範囲であったが , 24 時間後には  
287 pH7.0 では 14.4 % , pH6.5 では 26.1 % , pH6.0 では 34.1 % , pH5.5  
288 では 55.1 % となりその後も pH が低いほどメト化率が増加した。

289 **普通筋と接する血合筋の脂質酸化度** 血合筋の部位別の TBARS  
290 を Fig. 6 に示した。境界面で褐変が確認された 8 時間後から接触側 <Fig. 6  
291 の TBARS は他より高い  $0.24 \pm 0.01 \mu\text{mol}/\text{g}$  を示し , 24 時間後に  
292  $0.58 \pm 0.01 \mu\text{mol}/\text{g}$  , 48 時間後には  $0.82 \pm 0.08 \mu\text{mol}/\text{g}$  まで増加した。  
293 体表側の TBARS は 24 時間後までは低く  $0.04 \pm 0.02 \mu\text{mol}/\text{g}$  であっ  
294 たがその後増加し , 48 時間では  $0.59 \pm 0.16 \mu\text{mol}/\text{g}$  となった。中間  
295 部は接触側と体表側の間値を示した。なお , 血合筋の脂肪量 (平  
296 均  $\pm$  標準偏差) は  $33.2 \pm 2.7 \%$  (接触側  $29.5 \pm 1.2 \%$  , 中央部  $33.6 \pm$   
297  $1.6 \%$  , 体表側  $36.7 \pm 1.4 \%$ ) であった。

298 **ミオグロビンのメト化に及ぼす脂質酸化の影響** 脂質画分と粗  
299 ミオグロビン抽出液の混合または単独のメト化率および TBARS の

<Fig. 7

300 経時変化を Fig. 7 に示した。血合筋から抽出した脂質成分は TG が  
301 85.7 % , PL は 10.7 % , その他の画分は 1.8 % であった。メト化率  
302 は PL+Mb 区が顕著に増加し 48 時間後には 92.5 % であったが , Mb  
303 区および TG+Mb 区はそれぞれ 18.0 % と 19.5 % であった。Mb 区お  
304 よび TG+Mb 区は 96 時間後まで 28.2 % , 28.9 % と緩やかな増加で  
305 あったが , その後 TG+Mb 区は急増し 168 時間後には 88.9 % となっ  
306 た。

307 TBARS は単独区よりミオグロビンと混合した区が高い値を示し ,  
308 48 時間後 , PL 区は 29.2  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  に対し PL+Mb 区は 40.5  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  ,  
309 TG 区は 0.3  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  に対し TG+Mb 区は 9.8  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  となった。  
310 PL 区および PL+Mb 区の 0 時間はそれぞれ 8.1  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  , 8.3  
311  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  で , その後 96 時間までは他の区より高い値で推移した。  
312 TG+Mb 区は 48 時間後に PL+Mb 区の 0 時間と同程度の 9.8  $\mu\text{mol}/\text{mL}$   
313 となり , 168 時間には最も高い 55.2  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  となった。

314

315

### 考察

316 本研究では養殖ブリ血合筋の褐変機序に及ぼす筋肉糖代謝に着目  
317 し , 褐変が血合筋と普通筋の境界から生じる要因を検討した。また ,  
318 褐変が周辺部に徐々に進行する要因は脂質酸化に着目し , 脂質酸化  
319 がメト化に及ぼす影響を検討した。

320 魚肉ブロック pH は取上げ直後 , 血合筋 , 普通筋 , 境界面とも有  
321 意な差はないが , 1 時間後には境界面が最も低くなり , その後も他

322 の部位より低い傾向を示し，24 時間後の境界面の pH は血合筋より  
323 有意に低い値となった ( Table 1 )。血合筋と普通筋のグリコーゲン  
324 と乳酸量を測定したところ，グリコーゲンは血合筋に多く普通筋に  
325 少なかったが，24 時間後の乳酸は普通筋に多かった ( Fig. 3 )。そ  
326 こで，解糖系酵素活性を測定したところ，活性は血合筋より普通筋  
327 が有意に高い値を示した ( Table 2 )。普通筋は乳酸生成が高い嫌気  
328 的代謝 ( 解糖 )，血合筋では好氣的代謝 ( クエン酸回路 ) が主な代謝  
329 となること<sup>38,39)</sup>と一致する。普通筋に乳酸量が多かったことから，  
330 乳酸が pH 低下の主要因と推察した。

331 血合筋はグリコーゲンが多く，普通筋は解糖系酵素活性が高いた  
332 め，血合筋のグリコーゲンと普通筋の解糖系酵素が接触する境界面  
333 で乳酸が生成，pH 低下が起こると考え，血合筋と普通筋の懸濁液  
334 を混合したホモジネートを境界面モデルとして解析した ( Fig. 4 )。  
335 調製直後のグリコーゲン量は血合筋ホモジネート 0.75 mg/mL，普  
336 通筋ホモジネート 0.13 mg/mL であったが，混合ホモジネートは  
337 0.63 mg/mL で血合筋ホモジネートより少なかった。一方，乳酸量  
338 は血合筋ホモジネートが 0.35  $\mu\text{mol/mL}$ ，普通筋ホモジネートが 6.48  
339  $\mu\text{mol/mL}$  であったが，混合ホモジネートは 11.34  $\mu\text{mol/mL}$  と血合  
340 筋と普通筋ホモジネートの合計以上に生成した。酵素活性はホモジ  
341 ネートと筋肉中などその条件によって異なるが，これまでの結果か  
342 ら血合筋のグリコーゲンが普通筋の解糖系酵素によって分解され，  
343 乳酸が生成することにより境界面で pH 低下が起こっている原因と



344 考えた。

345 ミオグロビンのメト化に及ぼす pH の影響を調べ、低い pH でミ  
346 オグロビンのメト化が促進される結果が得られた (Fig. 5)。これは  
347 森岡らの報告<sup>12)</sup>と同様であった。このため、初めに境界面におい  
348 てミオグロビンのメト化が促進されたと推察した。実際、切出し直  
349 後の血合筋の色調では部分的な色の違いは見られなかったが、8 時  
350 間後には境界面付近で変色が確認された (Fig. 1)。以上のことから、  
351 プリ血合筋の部分的な褐変が生じた要因は境界面の pH 低下による  
352 ものと考えた。

353 pH 低下が起きている境界面からミオグロビンのメト化が生じる  
354 と推察したが、境界面以外の血合筋では、境界面から体表側に至る  
355 部分で pH の高低差は確認されなかった。境界面から起きた褐変は  
356 その後徐々に体表側へと進行し、切出し 48 時間後には血合筋全て  
357 が褐変したため、pH だけでメト化が徐々に体表側に向け進行する  
358 ことは説明できない。これまでもミオグロビンのメト化促進因子に  
359 は pH の他に温度、酸素分圧、過酸化物などが報告されている。<sup>3,4,5,6)</sup>  
360 一般的に脂質含量は普通筋より血合筋に多く、体表に近い筋肉は背  
361 骨に近い筋肉より高いとされている。<sup>40)</sup>脂質の酸化はその過程で脂  
362 質ペルオキシラジカルを生成することから褐変の進行には過酸化物  
363 が関係すると考え、血合筋を接触側、中央部、体表側に区分し TBARS  
364 を調べた。脂質が少ない接触側の TBARS は 8 時間後には他の部位  
365 より高い値となった (Fig. 6)。褐変の進行と同様、接触側から脂質

366 酸化が進んでいた。血合筋の色調の経時変化 ( Fig. 1 ) と血合筋の  
367 TBARS ( Fig. 6 ) から脂質の酸化後にメト化が促進されると示唆さ  
368 れた。血合筋は高度不飽和脂肪酸が多いことや PL が多いことが知  
369 られているため、<sup>15,41)</sup>脂質クラス組成別に脂質の酸化とメト化への  
370 影響を調べた。TBARS は粗ミオグロビン抽出液と混合した区  
371 ( PL+Mb 区 , TG+Mb 区 ) が単独区 ( PL 区 , TG 区 ) より高い値を  
372 示したことから、ミオグロビンのメト化が脂質酸化を促進すると考  
373 えられた。このことはこれまでの報告を裏付ける結果である。  
374 <sup>13,14,15,16)</sup>一方、PL+Mb 区は混合 12 時間後に TBARS の増加と同時  
375 にメト化率が増加し、メト化が促進されることを確認した( Fig. 7 )。  
376 PL の酸化がメト化に及ぼす影響は PL が持つ酸化しやすさの他に両  
377 親媒性が関係すると考える。PL は主に細胞膜を構成し、ミオグロ  
378 ビンは筋細胞内に存在する。このため、細胞膜を構成する PL は皮  
379 下組織に蓄積する TG<sup>40)</sup>と比較してミオグロビンとの接触性は高く、  
380 PL の酸化で生じた過酸化物がミオグロビンに影響を与えると考え  
381 られる。これまでにミオグロビンのメト化と脂質酸化との相互作用  
382 は示唆されてきたが、<sup>18,19)</sup>今回、ミオグロビンのメト化初期は PL  
383 の酸化と相互に作用しながら促進されることが明らかとなった。な  
384 お、96 時間以降に TG+Mb 区のメト化が促進された原因は不明だが、  
385 Fig. 1 で示したように褐変は 8 時間後には開始され、48 時間後には  
386 全体に広がることから、褐変抑制を考える上で重要なことは PL の  
387 酸化抑制と考える。

388 以上の結果により，ブリ血合筋は普通筋と接する境界面から褐変  
389 が生じ，徐々に周辺部に進行する要因は，筋肉性状の違いにより血  
390 合筋と普通筋の境界面の pH が低下し，低下した pH により境界面  
391 のミオグロビンがメト化するためと考えた。ミオグロビンのメト化  
392 は脂質酸化を促進し，リン脂質の酸化がミオグロビンのメト化を促  
393 進する相互作用があると推察した。このため，境界面から起きる初  
394 期の褐変を抑えるためには pH 低下の抑制が重要であり，その後の  
395 褐変の進行を抑えるには PL の酸化を抑制する必要がある。pH 低下  
396 抑制とともに，褐変の進行は脂質酸化が血合筋のメト化を促進させ  
397 ていることから，脂質酸化の抑制についてさらなる技術開発が望ま  
398 れる。

399

400

#### 文献

- 401 1 ) 永田致治. 食肉および食肉製品の色と変色「食品の変色の化学」  
402 ( 木村進 , 中林敏郎 , 加藤博通編 ), 光琳 , 東京 . 1995; 385-407 .
- 403 2 ) Arihara K, Itoh M, Kondo Y. Quantification of  
404 NADH-cytochrome *b*<sub>5</sub> reductase (metmyoglobin-reducing  
405 enzyme) in bovine skeletal muscle by an immunoblotting  
406 assay. *Anim. Sci. Technol.* 1997; **68**: 29-33.
- 407 3 ) Matsuura F, Hashimoto K, Kikawada S, Yamaguchi K.  
408 Studies on the autoxidation velocity of fish myoglobin.  
409 *Nippon Suisan Gakkaishi* 1962; doi:10.2331/suisan.28.210

- 410 (in Japanese with English abstract)
- 411 4 ) Bito M, Honma S. Studies on the Retention of Meat Color of  
412 Frozen Tuna- $\ddagger$  . Acceleration of Discoloration of Tuna Meat by  
413 Freezing and Its Relation to Storage Temperatures. *Nippon*  
414 *Suisan Gakkaishi* 1967; doi:10.2331/suisan.33.33 (in  
415 Japanese with English abstract)
- 416 5 )Lin TS, Hultin HO. Oxidation of myoglobin in vitro mediated  
417 by lipid oxidation in microsomal fractions of muscle. *J.*  
418 *Food Sci.* 1977; 42: 136-140.
- 419 6 ) 遊佐 敬介 . 過酸化物によるミオグロビンの酸化反応の解析 . 博  
420 士論文 . 東北大学 . 宮城 . 1987.
- 421 7 ) Nakamura Y, Ando M, Seoka M, Kawasaki K, Sawada Y,  
422 Miyashita S, Okada T, Kumai H, Tsukamasa Y. Effect of  
423 fasting on physical/chemical properties of ordinary muscles  
424 in full-cycle cultured pacific bluefin tuna *Thunnus*  
425 *orientalis* during chilled storage. *Fish. Sci.* 2006; 72:  
426 1079-1085.
- 427 8 ) Arai H, Tani W, Okamoto A, Fukunaga K, Hamada Y,  
428 Tachibana K. Suppression of color degradation of yellowtail  
429 dark muscle during storage by simultaneous dietary  
430 supplementation of vitamins C and E. *Fish Sci.* 2009; 75:  
431 499-505.

- 432 9 ) Fukada H, Hashiguchi T, Kashiwagi T, Seno A, Takakuwa F,  
433 Morioka K, Sawamura M, Masumoto T. Effects of yuzu  
434 juice-supplemented diets on prevention of dark muscle  
435 discoloration during storage in yellowtail *Seriola*  
436 *quinqueradiata* and detection of yuzu flavor components in  
437 fish meat. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2010;  
438 doi:10.2331/suisan.76.678 (in Japanese with English  
439 abstract)
- 440 1 0 ) Fukada H, Matsuura T, Takahashi N, Masumoto T.  
441 Validating the effects of dietary yuzu-paste  
442 supplementation on growth and prevention of discoloration  
443 and lipid oxidation in dark muscle in yellowtail *Seriola*  
444 *quinqueradiata*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2014;  
445 doi:10.2331/suisan.80.769 (in Japanese with English  
446 abstract)
- 447 1 1 ) 大山憲一 , 棚野元秀 , 植田豊 , 竹森弘征 , 多田武夫 . 養殖ブ  
448 リの血合筋の褐変抑制に及ぼすオリーブ葉粉末添加飼料の投与  
449 効果 . 水産増殖 2010; **58**: 279-287 .
- 450 1 2 ) Morioka K, Ohnishi K, Itoh Y. Comparison of discoloration  
451 of dark muscle between cultured yellowtail *Seriola*  
452 *quinqueradiata* and amberjack *Seriola dumerili* during  
453 chilled storage. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2013;

454 doi:10.2331/suisan.79.1009 (in Japanese with English  
455 abstract)

456 1 3 ) Liang J, Xiao N, Tani W, Yoshida A, Arai H, Takeshita S,  
457 Hamada Y, Murata M, Taniyama S, Tachibana K. A  
458 comparison of the color change of dark muscle in cultured  
459 *Seriola* Cuvier (yellowtail, greater amberjack and  
460 goldstriped amberjack) during storage. *Nippon Suisan*  
461 *Gakkaishi* 2013; doi:10.2331/suisan.79.416 (in Japanese  
462 with English abstract)

463 1 4 ) Oshima T, Wada S, Koizumi C. Influences of Heme  
464 pigment, Non-Heme iron, and nitrite on lipid oxidation in  
465 cooked mackerel meat. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 1988;  
466 doi:10.2331/suisan.54.2165 (in Japanese with English  
467 abstract)

468 1 5 ) Sohn JH, Taki Y, Ushio H, Kohata T, Shioya I, Ohshima  
469 T. Lipid oxidations in ordinary and dark muscles of fish:  
470 influences on rancid off-odor development and color  
471 darkening of yellowtail flesh during ice storage. *J. Food*  
472 *Sci.* 2005, **70**, 490-496.

473 1 6 ) Thiansilakul Y, Benjakul S, Richards MP. Effect of  
474 myoglobin from eastern little tuna muscle on lipid  
475 oxidation of washed asian seabass mince at different pH

476 conditions. *J. Food Sci.* 2011, **76**, 242-249.

477 1 7 ) Faustman C, Sun Q, Mancini R, Suman SP. Myoglobin  
478 and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and  
479 control. *Meat Science* 2010, **86**, 86-94

480 1 8 ) Bao HND, Shinomiya Y, Ikeda H, Ohshima T. Preventing  
481 discoloration and lipid oxidation in dark muscle of  
482 yellowtail by feeding an extract prepared from mushroom  
483 (*Flammulina velutipes*) cultured medium. *Aquaculture* 2009,  
484 **295**, 243-249

485 1 9 ) Seno-o A, Takakuwa F, Hashiguchi T, Morioka K,  
486 Masumoto T, Fukada H. Replacement of dietary fish oil  
487 with olive oil in young yellowtail *Seriola quinqueradiata*:  
488 effects on growth, muscular fatty acid composition and  
489 prevention of dark muscle discoloration during refrigerated  
490 storage. *Fish Sci.* 2008; **74**: 1297-1306.

491 2 0 ) Baron CP, Andersen HJ. Myoglobin-Induced Lipid  
492 Oxidation. A Review. *J. Agric. Food Chem.* 2002, **50**,  
493 3887-3897.

494 2 1 ) Hata K, Yokoyama I, Sudo M, Hata M, Matsuda K.  
495 Purification and properties of glycogen phosphorylase from  
496 the adductor muscle of the scallop, *Patinopecten yessoensis*.  
497 *Comp. Biochem. Physiol.* 1987; **87B**: 747-753.

- 498 2 2 ) 垂井清一郎 , 河野典夫 . 高等動物のホスホフルクトキナーゼ ,  
499 「エネルギー代謝と生体酸化(上)」(日本生化学会編), 東京化  
500 学同人, 東京. 1976; 132-138 .
- 501 2 3 ) Moon TW, Johnston IA. Starvation and the activities of  
502 glycolytic and gluconeogenic Enzymes in Skeletal Muscles  
503 and Liver of the Plaice, *Pleuronectes platessa*. *J. Comp.*  
504 *Physiol.* 1980; **136**: 31-38.
- 505 2 4 ) Johnston IA, Goldspink G. Quantitative studies of muscle  
506 glycogen utilization during sustained swimming in crucian  
507 carp (*Carassius carassius* L.). *J. Exp. Biol.* 1973; **59**:  
508 607-615.
- 509 2 5 ) Vassalt A. *Methods of enzymatic analysis Vol. .*  
510 Bergmeyer H.U. (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.  
511 1987; 118-126.
- 512 2 6 ) 尾藤方通 . メトミオグロビンの測定 , 主としてマグロ肉につ  
513 いて . 「水産生物化学・食品学実験書」(齊藤恒行 , 内山均 , 梅  
514 本滋 , 河端俊治編), 恒星社厚生閣, 東京, 1974; 275-280 .
- 515 2 7 ) Bligh EG and Dyer WJ. A rapid method of total lipid  
516 extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*  
517 1959; **37**: 911-917.
- 518 2 8 ) Ito D, Takahashi K, Okazaki E, Asada J, Saito H, Osako K.  
519 Changes in lipid characteristics of mullet *Mugil cephalus*



520 roe during processing to *Karasumi* product. *Nippon Suisan*  
 521 *Gakkaishi* 2015; doi:10.2331/suisan.81.115 (in Japanese  
 522 with English abstract)

523 2 9 ) Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of  
 524 serum proteins by means of biuret reaction. *J. Biol Chme*,  
 525 1949; 177: 751-766.

526 3 0 ) Misaka N, Mizuno S, Miyakoshi Y, Takeuchi K, Takami T,  
 527 Kasahara N. Changes of triglyceride and glycogen levels in  
 528 the liver of underyearling masu salmon *Oncorhynchus*  
 529 *masou* during starvation. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2004;  
 530 doi:10.2331/suisan.70.168 (in Japanese with English  
 531 abstract)

532 3 1 ) Hohorst HJ. L-(+)-Lactate. Determination with lactic  
 533 dehydrogenase and DPN. In: Bergmever HU (ed). *Methods*  
 534 *of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York. 1965;  
 535 266-270.

536 3 2 ) Igisu H, Dohnao T, Takeya Y. Enzymatic determination of  
 537 lactate in capillary blood. *J. Health Sci.* 1981; 3: 127-131.

538 3 3 ) 角田聖齊, 内山均. メト化率によるマグロの肉色判定法の改  
 539 良, 「魚の低温貯蔵と品質評価法」(小泉千秋編), 恒星社厚生閣,  
 540 東京. 1986; 60-65.

541 3 4 ) Inohara K, Onoue Y, Kimura I. Method of measuring the

542 ratio of metmyoglobin formation in fish meat. *Nippon*  
543 *Suisan Gakkaishi* 2015; doi:10.2331/suisan.81.456 (in  
544 Japanese with English abstract)

545 3 5 ) Imai H, Arai Z. Hydrolysis of 1, 1, 3,  
546 3-tetramethoxypropane and spectrophotometric  
547 determination of its product, malondialdehyde. *Bunseki*  
548 *Kagaku* 1991; doi:10.2116/bunsekikagaku.40.3\_143 (in  
549 Japanese with English abstract)

550 3 6 ) 桜井民子 , 島崎弘幸 . 生体内過酸化脂質の測定 ( 1 ) . 化学と  
551 生物 1992; **30**: 604-607.

552 3 7 ) 柳井久江 . 「4Steps エクセル統計 ( 第 3 版 ) 」オーエムエス出  
553 版 , 埼玉 . 2011 .

554 3 8 ) 塚本勝巳 . 魚類の遊泳運動 : 水中への適応 . 比較生理生化学  
555 1993; **10**: 249-262.

556 3 9 ) 池田静徳 . 炭水化物・有機酸 , 「魚介類の微量成分」( 池田静  
557 徳編 ) , 恒星社厚生閣 , 東京 . 1981; 52-80 .

558 4 0 ) 魚介類筋肉の主要成分「水産食品学」( 須山三千三 , 鴻巣章二  
559 編 ) , 恒星社厚生閣 , 東京 . 1987; 14-70 .

560 4 1 ) 佃信夫 . 多獲性赤身魚の脂質 . 日本食品工業学会誌 1980; **27**:  
561 210-219.

562

563 Fig. 1 Changes in the typical appearance of yellowtail muscle  
564 slice during storage at 10 °C. Sliced muscle was prepared  
565 from fish stored in ice for one day after sacrificing. Circles  
566 are pH measurement part. (a): dark muscle, (b): ordinary  
567 muscle, (c): boundary part between dark muscle and  
568 ordinary muscle. 0 h: 0 hours storage, 8 h: 8 hours storage,  
569 24 h: 24 hours storage, 48 h: 48 hours storage.

570 Fig. 2 Changes in L\*, a\* and b\* values in dark muscle of sliced  
571 meat prepared from yellowtail during storage at 10 °C.  
572 Sliced meat was prepared from fish stored in ice for one  
573 day after sacrificing. Data are presented as meat ±  
574 standard deviation (n=3).

575 Fig. 3 Changes in glycogen and lactic acid content of ordinary  
576 muscle and dark muscle in yellowtail during ice storage.  
577 Data are presented as meat ± standard deviation (n=3). 0 h,  
578 24 h: 0, 24 hours after sacrificing. Asterisks show  
579 significant difference from 0 hours (p<0.05).

580 Fig. 4 Changes in pH (a), glycogen (b) and lactic acid (c) of  
581 muscle homogenate in yellowtail. Symbols are as follows:  
582 triangle: dark muscle homogenate, diamond: mixture of  
583 dark muscle homogenate and ordinary muscle homogenate,  
584 circle: ordinary muscle homogenate, solid line: measured

585 values, dashed line: calculated values when mixing dark  
586 muscle homogenate and ordinary muscle homogenate.

587 Fig. 5 Effect of pH on the ratio of metmyoglobin to total  
588 myoglobin (metMb) in crude myoglobin solution prepared  
589 from dark muscle in yellowtail. Crude myoglobin solution  
590 was incubated at 10 . Symbols are as follows: open  
591 circles: pH5.5, closed circles: pH6.0, squares: pH6.5,  
592 triangles: pH7.0.

593 Fig. 6 Changes in thiobarbituric acid reactive substance  
594 (TBARS) levels by site of dark muscle in yellowtail during  
595 storage at 10 . Sliced dark muscle was prepared from fish  
596 stored in ice for one day after sacrificing. Symbols are as  
597 follows: circles: contact side, squares: center, triangles:  
598 body surface side. Data are presented as mean  $\pm$  standard  
599 deviation ( $n=3$ ).

600 Fig. 7 Changes in metMb and TBARS levels of the mixture of  
601 extracted crude myoglobin and lipid fractionation from  
602 dark muscle in yellowtail ( $n=3$ ). Symbols are as follows:  
603 circles: phosphalipids, squares: triacylglycerols, opened  
604 symbols: mixture of crude myoglobin and lipid extracted  
605 from dark muscle, closed symbols: lipid, cross marks: crude  
606 myoglobin extract.

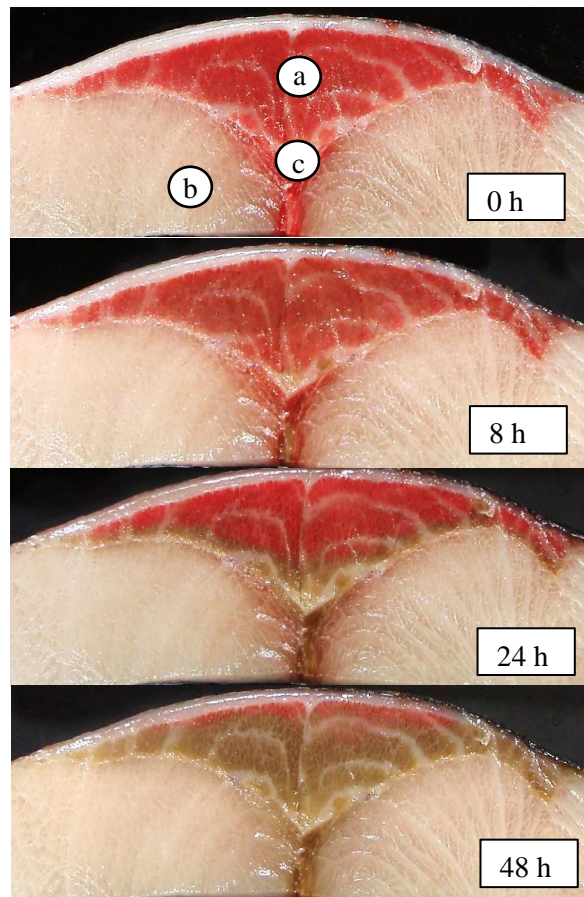


Fig. 1

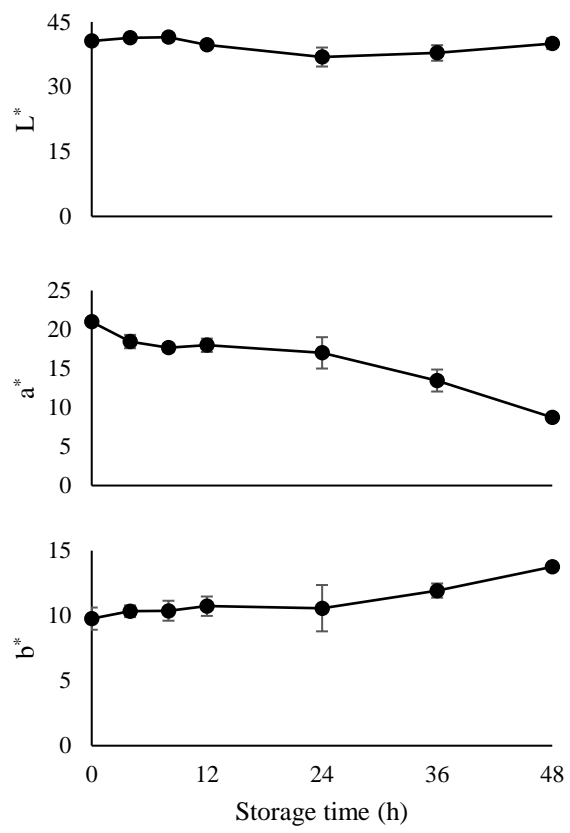


Fig. 2

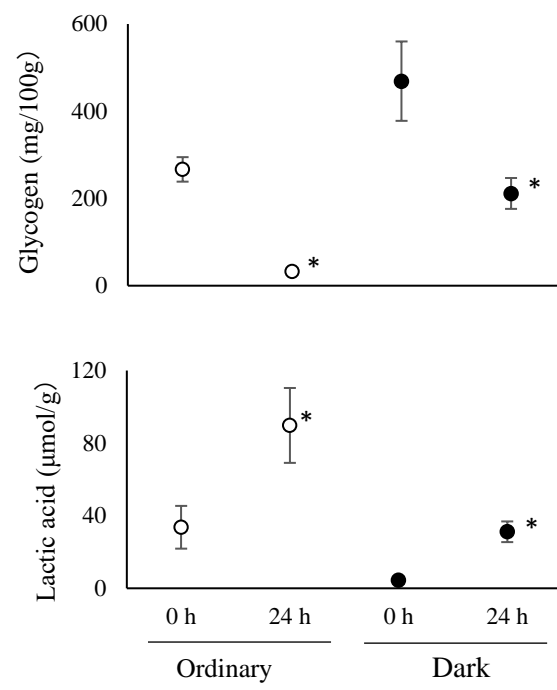


Fig. 3

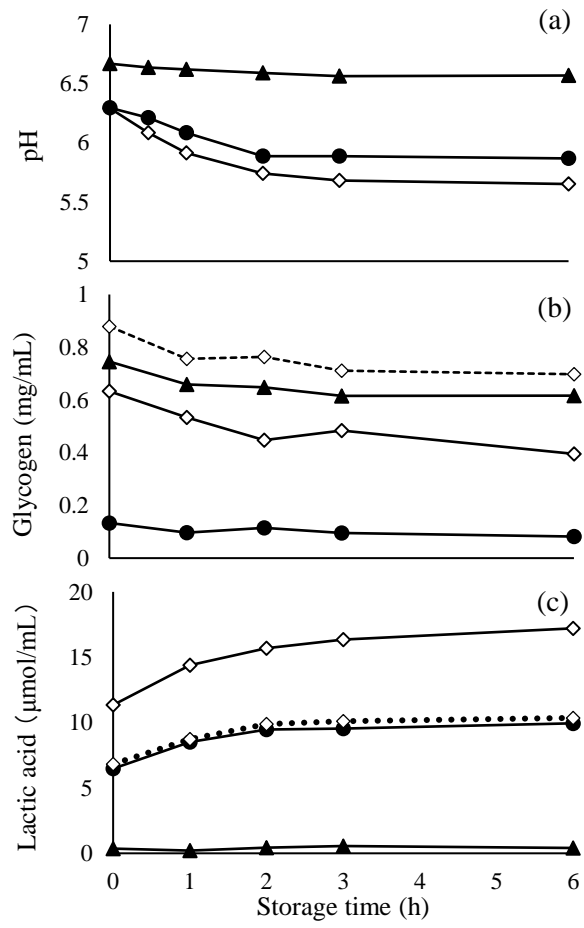


Fig. 4



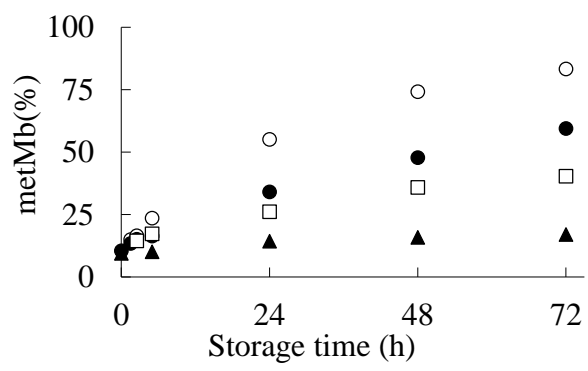


Fig. 5

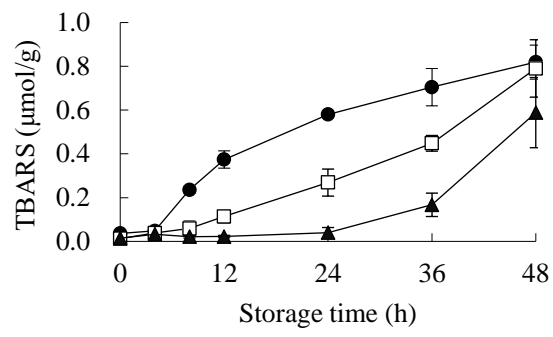


Fig. 6

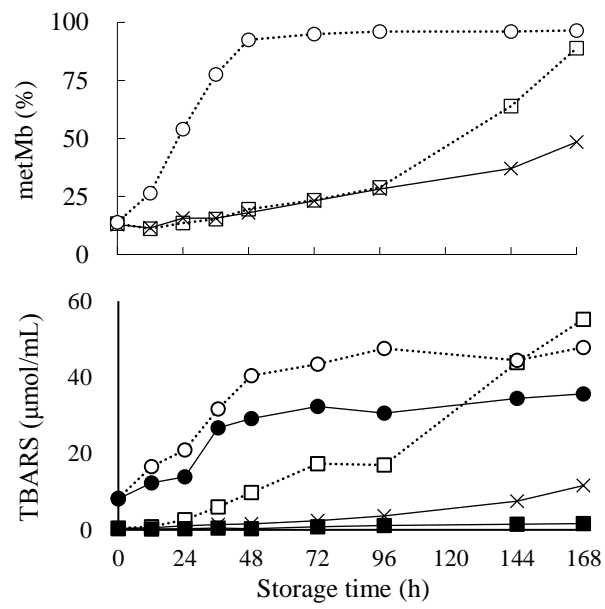


Fig. 7

Table 1 Changes in the pH of yellowtail dark muscle, ordinary muscle and its boundary part during ice storage

	0 h	1 h	2 h	6 h	24 h
Dark muscle	7.31±0.15	7.26±0.09	6.84±0.22 <sup>ab*</sup>	6.39±0.10 <sup>ab*</sup>	6.51±0.07 <sup>a*</sup>
Boundary part	7.32±0.02	6.87±0.51	6.59±0.25 <sup>a*</sup>	6.09±0.08 <sup>a*</sup>	6.15±0.08 <sup>b*</sup>
Ordinary muscle	7.22±0.12	7.34±0.08	7.11±0.09 <sup>b</sup>	6.81±0.35 <sup>b</sup>	6.24±0.15 <sup>b*</sup>

Values are mean ± standard deviation ( $n=3$ ).

Boundary part is between dark muscle and ordinary muscle.

The asterisks show significant difference to 0 h in each part ( $p<0.05$ ).

Sets of letters on each symbol indicate significant difference in each hour ( $p<0.05$ ).

Table 2 Activities ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{wet g}$ ) of selected enzymes in yellowtail dark muscle and ordinary muscle

	Dark muscle	Ordinary muscle
Phosphorylase	4.6 $\pm$ 0.5	6.6 $\pm$ 0.5*
Phosphofructokinase	5.1 $\pm$ 0.4	21.8 $\pm$ 3.7*
Pyruvate kinase	19.5 $\pm$ 3.8	127.3 $\pm$ 42.7*
Lactate dehydrogenase	362.4 $\pm$ 28.2	1648.2 $\pm$ 149.6*

Values are mean  $\pm$  standard deviation ( $n=6$ ).

Asterisks show significant difference from the dark muscle at each enzymes by student's  $t$ -test ( $p < 0.05$ ).