

養殖ブリの冷解凍にともなう血合肉の色調評価法と基準値の設定

上西由翁^{1*}, DONG THI HAI YEN¹, 林田顕正¹, 浅田洋平¹

Color evaluation and criteria on dark meat of cultured yellowtail after freezing and thawing

Yoshio Kaminishi^{1*}, Dong Thi Hai Yen, Akimasa Hayashida and Youhei Asada

Keywords: メト化率, L,a,b 測色, ブリ血合肉, 褐変の評価基準

Abstract

When farmed yellowtail is frozen and thawed, the dark meat of the yellowtail rapidly browns. This causes a problem when exporting frozen yellowtail, as it deteriorates the appearance. The dark meat browning occurs due to the oxidation of the muscle pigment myoglobin (Mb), and the met Mb ratio is generally used as an indicator of browning. When measuring the met Mb ratio of yellowtail dark meat, it was difficult because of the intense turbidity caused by the large amount of lipids and the presence of hemoglobin (Hb), a blood component. To solve these problems, a new method of met Mb ratio was developed using HPLC. On the other hand, the browning of yellowtail dark meat after freezing and thawing was localized, and the values of met Mb ratio did not match the visual appearance, therefore making it an inappropriate indicator. In this study, we investigated a method for evaluating the color tone of yellowtail dark meat after freezing and thawing by analyzing the L,a,b values, and established evaluation criteria based on the brawn index (b/a) < 0.8–0.9 and hue difference < 9–10, which matched the visual appearance.

日本食のユネスコ無形文化遺産登録を背景として、日本からの食品の輸出増加を目的に輸出戦略が進んでいる。農林水産省では、2019年の「農林水産物及び食品の輸出の促進に関する法律」に基づき、2030年までに農林水産物の輸出額5兆円を目標に個別戦略を立てている。水産物では養殖ブリを輸出重点品目のひとつに指定し、水産庁では2021年7月に「養殖業成長産業化総合戦略」を策定し¹⁾、2030年までにブリ類の輸出目標額を1,600億円とした。

養殖ブリの輸出先は50%以上が米国であり、輸送コストを考慮して8割が冷凍ブリで流通している。冷凍ブリにおいては、-20℃での流通・貯蔵において1ヵ月程度で血合肉が褐変化（メト化）するために、褐変防止法として一酸化炭素処理が一部で適用されているが、米国以外では禁止されている。

凍結貯蔵中のメト化防止として、マグロでは冷凍F4

級の超低温貯蔵が定着している。ブリにおいてもメト化抑制のために貯蔵温度帯の見直しが検討されている。私たちの研究室では冷凍F2級の-35℃で貯蔵した冷凍カンパチで、少なくとも3ヵ月は商品としての色調を保持していることを報告²⁾した。同様に、養殖ブリを用いた実験においても3ヵ月間の色調は保持されていた（未発表）。しかし、養殖ブリを凍結し解凍すると、急激な褐変化が起こる。養殖業成長産業化行動計画（ブリ類編）の中で海外市場の開拓において、特に、冷凍品の輸出に際して解凍後の血合肉の急速な褐変が問題視されており、重要課題として褐変防止技術の開発が望まれている³⁾。

血合肉の色素はミオグロビン（Mb）であり、凍結貯蔵中のタンパク質変性にともないメト化して褐変化する。色調劣化の指標としてメト化率が一般的に適用されるが、ブリ血合肉のメト化率測定の場合には、多量に含まれる脂質が原因の激しい濁りや、血液成分のヘモグロビ

¹ 鹿児島大学水産学部（Faculty of Fisheries, Kagoshima University, 4-50-20 Shimoarata, Kagoshima 890-0056, Japan）

* Corresponding Author, Email: kaminisi@fish.kagoshima-u.ac.jp

ン (Hb) が含まれる問題があった。また、凍結変性により血合肉全体が褐変している場合のメト化率測定は指標として使えるが、冷解凍後の血合肉の褐変化は局在しているために、不適切な指標と思われた。そこで本研究では、従来のメト化率測定法を改良して迅速定量法を開発するとともに、ブリ血合肉の冷解凍後の色調評価法を L, a, b 値の解析により検討し、さらに褐変防止の技術開発における褐色度の定量のために評価指標と基準値を設けた。

実験方法

試料魚

試料魚として、魚類市場から直接購入した養殖ブリと鹿児島湾内の養殖業者から入手した養殖ブリを用いた。養殖ブリからフィレーを調製し、背肉を 10cm 程度切り分けて個別に真空パックし、 $-25^{\circ}\text{C} \sim -30^{\circ}\text{C}$ のアルコールブラインで急速凍結したものを所定の温度で貯蔵した。解凍は、氷水中で 2 時間程度行った。

写真撮影

Canon EOS X-9 の一眼レフカメラを用いて撮影した。撮影ボックスは内面が写真撮影用に白色で覆われた Box を使い、照明は演色評価指数 (CRI) 95 以上、テレビ照明一貫性指数 (TLCI) 97 以上の NAN LITE Pavo Tube II 6C の 2 台を用いて、色温度は 5,300K に設定し、影ができないように照明を当てた。適正露出条件の設定は、露出計 EX-1 (COMET 社) で行った。カメラのホワイトバランスは 5,300K に設定し、この条件で撮影した写真と見た目の色が近いことを全員で確認した。

HPLC によるメト化率の測定

試料液の調製は測定部位の魚肉 2g を秤量し、18mL の 0.1M 冷リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) で細碎後、遠心分離 (10,000g, 10min, 4°C) した。ブリ血合肉の抽出液には多量の脂質が多く含まれており、濁りがひどいために遠心分離を繰り返し、 $0.45\mu\text{m}$ のフィルタ (Millex LCR) でろ過した。

HPLC を用いた分析では、 $0.5\text{mL}/\text{min}$ の流速で 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) を使い、カラムは Inertsil WP300 Diol $5\mu\text{m}$ $4.6 \times 150\text{mm}$ を 2 本直結した分子サイズ排除クロマトグラフィ (以下、ゲルろ過) で行った。検出器は、島津 SPD-M20A のフォトダイオードアレイを用いて吸光面積を測定した。

メト化率測定の際の基礎データの収集では、ウマ Mb 標準物質 (ナカライテスク) とウシ Hb 標準物質 (ナカライテスク) を用いた。

L^*, a^*, b^* による色調の評価

L^*, a^*, b^* (以下、 L, a, b と略) はコニカミノルタ製の CR-13 を用いて測色した。 L, a, b の測定値から褐色度指数 (b/a) を求めて、商業的な判断基準値を設定した。また、色の変化量の定量では貯蔵初日を基準値として、既報⁴⁾ に準じて色差 (ΔE)、色相角差 (Δh) と彩度差 (ΔC) を算出し、知覚される色の官能評価表に照合して評価項目と基準値を設定した。

結果および考察

HPLC による Mb と Hb の分離の確認

ブリ血合肉の抽出液では、Fig.1 にみられるように、抽出液はひどく濁っていた。そこで、遠心分離操作の繰り返しで Fig.1 (Centrifugate) のように浮かんできた多量の脂質と沈殿物の除去を試みたが、濁りは取れなかった。さらに、 $0.45\mu\text{m}$ のフィルタ (Millex LCR) でろ過したがやはり濁りは完全に除去できず、分光光度計を用いた従来法でのメト化率の測定はできなかった。

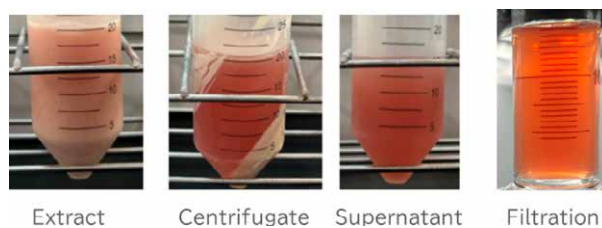


Fig. 1. Turbidity of solution on Mb preparation process from yellowtail dark muscle.

そこで、HPLC のゲルろ過を適用したところ、フィルタ処理後の僅かな濁りの影響を受けることなく安定して測定できた。また、混在している Hb についても、Fig. 2 のように Mb の分子量 17kDa と Hb の約 67kDa は、HPLC ゲルろ過で分離が可能であった。

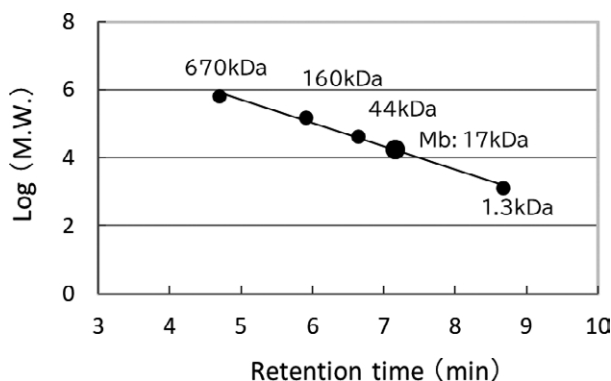


Fig. 2. Separation of Mb and Hb by HPLC gel filtration.

メト化率測定の際のオキシ型 Mb の判断基準

メト化率の測定では、オキシ型 Mb とメト型 Mb 溶液を調製し、それに対する試料液の吸光値を比較する必要がある。最初に、ウマ Mb を標品としてヒドロサルファイト (HyS) による還元処理の条件を設定し、その後のオキシ型の状態の基準値を求めた。還元剤として HyS を用時調製して用いた。20%HyS の添加量は 1mL の抽出液に対して 20 μ L/mL で還元処理した。酸化は、その溶液に酸素を吹き込んで、15 分間氷上でゆっくりと振とうすることで酸素に十分接触させた。メト型 Mb 溶液の調製は、1% フェリシアン化カリウム溶液 5 μ L を抽出した Mb 溶液に入れて行った。

還元型ウマ Mb では、Fig.3 (上) のように 555nm に最大吸収波長を示すが、オキシ型 Mb ではおよそ 540nm と 577nm の 2 つに最大吸収波長をもつ (Fig. 3. 下)。ウマ Mb がほぼ完全なオキシ型になったときには、540nm / 555nm の比率が 1.3 以上にあった。

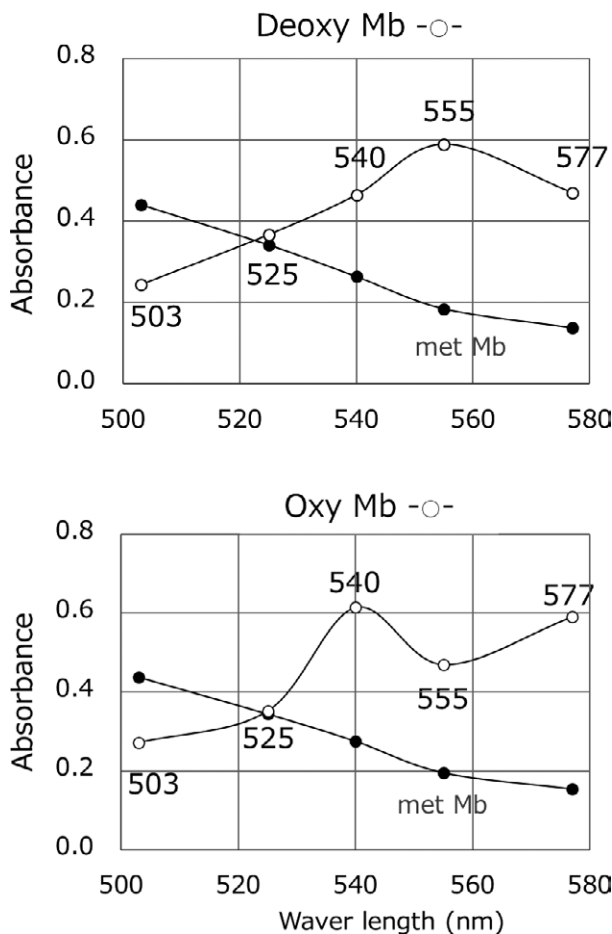


Fig. 3. Criteria for determining oxy-Mb by reduction and oxygenation treatment using horse Mb (1 mg/mL).
Upper: after reduction treatment
Lower: after 15 minutes of oxygenation

このオキシ型溶液を用いて、HPLC で分析したところ、Fig. 4 のようなスペクトルが得られた。その時の吸光面積比を比較したところ、オキシ型の状態では 540 / 555nm > 1.2 であった。なお、577nm / 555nm も判断基準としたが、これはオキシ型からメト化へ進行する際に初期に大きく低下するために、メト化移行の指標とした。

よって、ブリから抽出した Mb 溶液においても、十分なオキシ型 Mb 状態の指標として、HPLC 面積で 555nm に対する 540 および 577nm 比率が 1.2 と 1.0 以上であることを確認して実験に供した。

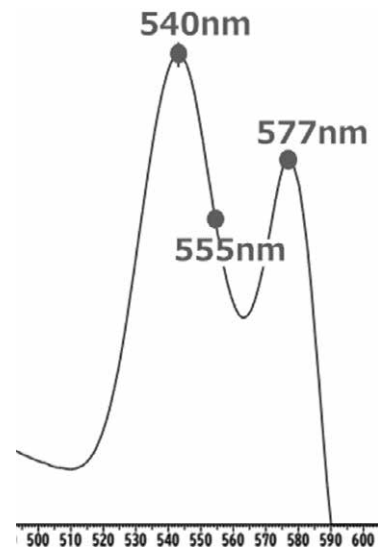


Fig.4. Absorption spectroscopy in the analysis of Oxy Mb in horses.

メト化率相当の簡易・迅速定量法と商品としての閾値

メト化率の算出にはブリ血合肉から得られたオキシ型溶液とメト型溶液の吸光面積、試料液の吸光面積の 3 点が必要である。従来のメト化率では、マグロのように赤色の鮮やかさに関係する際には 540nm (緑色波長で赤色は補色) の波長が適切と思われるが、ブリの血合肉では赤色から 577nm の領域である黄色が加わり褐色化する⁴⁾。そのため、①褐色化に影響する黄色 577nm の変化量が適切であること、②メト化型の吸光スペクトルでは 577nm が 540nm より平坦で安定していること、③オキシ型とメト化型の 577nm における吸光度の比が 1 : 4 と 540nm に比べて大きい利点をもつことから 577nm の吸光値を採用した⁵⁾。540nm でのメト化率と区別するため、ここではメト化率相当と表記した。

計算では、オキシ型 (還元・酸化処理) をメト化率相当 0%、メト型をメト化率相当 100% の基準として、試料液の相対的な位置からメト化率相当 (%) を算出した。以下にメト化率相当の算出式を示す。

$$\text{メト化率相当 (\%)} = (\text{オキシ型} - \text{抽出溶液} / (\text{オキシ型} - \text{メト型})) \times 100$$

このようにして、ブリ血合肉からメト化率相当を測定した一例を Fig. 5 に示す。-20℃貯蔵 (Fig.5. 上) のブリのメト化率相当では 57.1% で、血合肉は褐変化しており商品としては不適であった。-35℃の場合は Fig.5 (下) のようにきれいな赤色を呈していた。林田ら⁶⁾は、10 数回のブリとカンパチ血合肉の分析から、メト化率相当を目安とした商品価値の閾値として 40~50% であると報

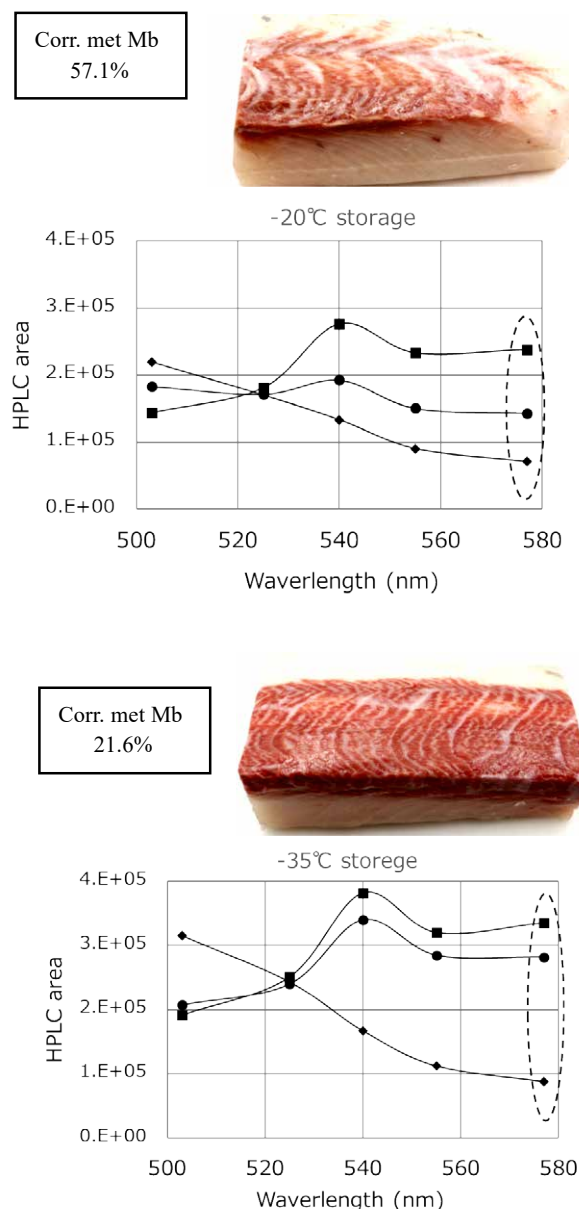


Fig. 5. Examples of met Mb (%) in dark meat of yellowtail during frozen storage by HPLC.

■: Oxy type Mb
●: Sample solution
◆: Met type Mb
Corr.: Abbreviation "Corresponding"

告しており、メト化率相当と見た目の感覚では Fig.5 の写真のように同様の閾値の評価が適用できると考えられた。尾藤⁷⁾は赤色の指標となる 540nm を用いて、マグロにおけるメト化率の閾値を 30% としたが、論文では 30% から赤色の退色が見られ、50% を超えると褐色が認められたと報告している。また、ED Strange⁸⁾らは、Van den Oord らからの引用として、メト化率で約 50% になると牛肉はほとんどの消費者に受け入れられなくなり、小売りには不適切になることを報告した。対象となる試料や測定波長、測定法が異なるので直接の比較はできないものの、人の感覚と比較して 50% を許容上限として、メト化率 40~50% が血合肉の商品価値の閾値として妥当と思われた。

しかし、この測定法では、ひとつの試料に対してオキシ型とメト型、試料液の 3 検液を分析する必要がある。また、ブリのメト化率測定に際して、3 試料液の測定中にメト化率が低下することが確認された。そこで迅速化を図るために、525nm の等吸収点から求めた比率と実測値から算出できないかを検討した。

等吸収点から還元型 Mb やオキシ型 Mb、メト型 Mb の定量法については、Snyder の報告がある⁹⁾。牛肉を使って反射スペクトルを測定したところ、3 つの Mb 誘導体の等吸収点である 525 nm を調整点として、オキシ型 Mb とメト型 Mb における 474nm の等吸収点と、オキシ型 Mb と還元型 Mb の 571 nm の等吸収点をもとに、ミオグロビン誘導体の混合物 (いわゆるメト化率) のモデルを提案した。本研究では、ブリ Mb の Q 帯におけるオキシ型の 2 つの最大吸収スペクトルのひとつである 577nm を用いて、525nm におけるオキシ型の相対値と 577nm から得られたメト化率相当の実測値との比較から、簡易的にメト化率相当の測定法を検討した。

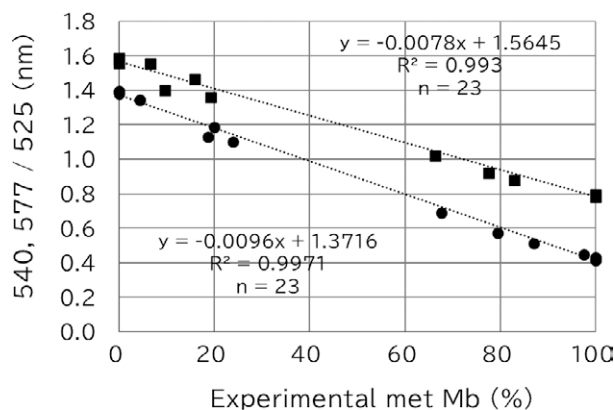


Fig. 6. Rapid measurement on corresponding met Mb (%) in yellowtail dark meat by HPLC. Symbols indicate the ratio of 577(●) and 540(■) nm to isosbestic point 525nm

メト化率相当の測定で得られた 23 試料液の実測値を横軸に、525nm に対するそれぞれの比率を縦軸にプロットすると、Fig. 6 のように両者に高い相関性がみられた。メト化率相当が低い時には、577nm に比べて 540nm では多少ばらつきがあった。両者の傾きを見ると 577nm での傾きが大きいが、それは 540nm でのオキシ型とメト化型の吸光度比が大きいため、540nm の測定で誤差を生じやすいと考えられた。また、本法では 577nm と 540nm のいずれもオキシ型 Mb と還元型 Mb に共通した等吸収点を採用していないため、還元型 Mb の影響により低いメト化率で誤差が生じやすいのかもしれない。これらを考慮した上で 577nm の回帰式より次の計算式を HPLC 簡易法では用いた。

$$\text{メト化率相当 (\%)} = (1.3716 - 577/525\text{nm 比}) / 0.0096$$

この方法では、抽出液の遠心分離の時間によるが、フィルタ処理前までに 15～30 分、HPLC 分析の 15 分と合わせて、1 時間以内には測定が可能である。特に、ブリの血合肉では測定中の色の劣化が速いため、迅速定量法は有効と考えられる。

ブリ血合肉の外観の色調変化におけるメト化率測定の妥当性の検証

ブリ血合肉の褐変度の評価には、従来はメト化率が用いられてきた。凍結貯蔵中に血合肉全体が褐変している場合は、例えば Fig.7 の -20℃ の 0 時間のように、メト化率相当で 50% を超えると褐色に変色していると想像され、実際の写真のように褐変が確認できた。同様に、-35℃ と -75℃ での 0 時間ではメト化率相当の測定値で 40% と 20% 付近であり、従来のメト化率から想像される赤色を呈しており、指標としては適切であった。しかし、

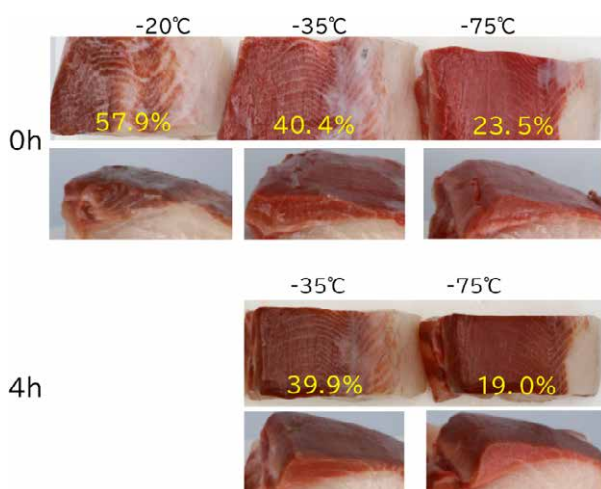


Fig. 7. Photographs of yellowtail cooled at 4°C for 0 and 4h after thawing.
The yellowtail was frozen at -20, -35 and -75°C for 3 months.

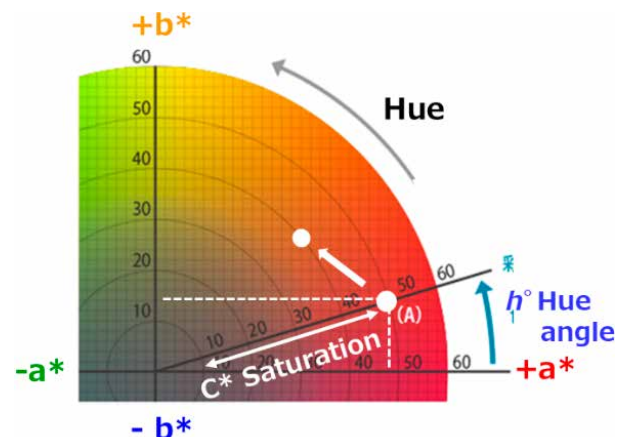
解凍後に開封して 4 時間経過した -35℃ と -75℃ の血合肉表面の色調は、暗褐色に急変した。その時のメト化率相当では、-35℃ と -75℃ で解凍直後の 0 時間とほぼ同じメト化率相当であり、メト化率相当値から想像される色とはほど遠かった。その原因は、褐変が表面においてのみ進行し、内部では解凍直後の色調を保持していたため、冷解凍したブリのように褐変が局在すると、メト化率相当値と見た目の感覚が乖離することが分かった。

よって、ブリ血合肉の外見が主に退色して商品価値に影響する場合、メト化率は適切な指標とはなり得ないと考えた。そこでブリ血合肉の外見の変化を反映する L,a,b 表色系により解析し、見た目の色覚とあわせて総合的な評価法を検討した。

冷解凍したブリ血合肉における L,a,b 解析値

色彩計において簡易で非破壊的に測色できる L,a,b 表色系は、人の感覚に近い均等な色空間であるとされ、L,a,b 空間の 2 点の異なる色の距離に対して知覚される色の差とよい相関を示すことが知られている。その際に、Fig.8 に示すように、色を表現する上で重要なのが「明度」「色相」「彩度」の 3 属性である。L 値は明度で、色相は a 値と b 値から算出され、a は (+) で赤が強く (-) で緑が強くなる。b は (+) で黄が強く (-) で青が強くなる。色相は $\tan^{-1}(b/a)$ の角度で表現でき、その角度が小さければ赤色系に、大きくなるにつれて黄色系が混ざり合った褐色になる。ブリやカンパチの血合肉においては、褐色に変化する際に a 値の減少と b 値の上昇が起り、Fig.8 のように赤色領域から黄色が混ざる褐色領域に移行する。

ブリを冷解凍すると、短時間で血合肉の外観は赤色から褐色へと変色する。その時のブリ血合肉の経時的な褐変変化の写真を Fig.9 に、測色値を Table 1 に示す。Table 1



(Ref: KONICA MINOLTA JAPAN, INC.)

Fig. 8. L,a,b chromaticity diagram.

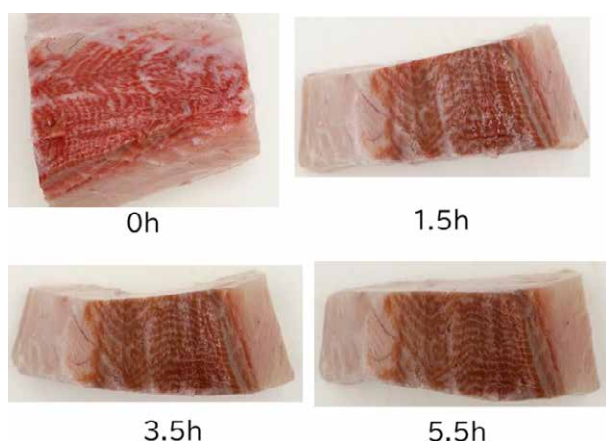


Fig. 9. Changes in the color tone of dark meat during standing time after freezing and thawing of yellowtail.

Table 1. Difference in brownness index (b/a) and hue angle from Lab values of yellowtail dark meat after thawing.

Time (h)	0	1.5	3.5	5.5
L value	40.6	39.0	37.4	39.3
a value	21.0	13.0	13.4	13.0
b value	14.5	14.3	15.7	16.4
Ave. b/a	0.69	1.10	1.17	1.26
ΔE	0	8.2	8.3	8.3
ΔL	0	-1.6	-3.2	-1.3
ΔC	0	6.2	4.9	4.5
Δh	0	13.0	14.9	17.0

Differences are ΔE : Color, ΔL : Brightness, ΔC : Saturation and Δh : Hue angle

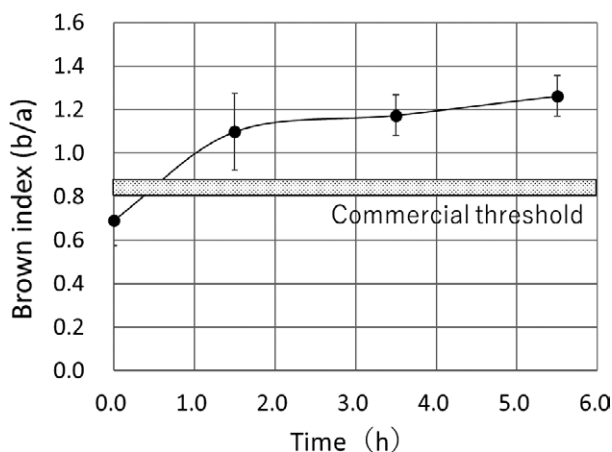


Fig. 10. Changes in the brown index of dark meat during standing time after freezing and thawing of yellowtail. ($p < 0.05$)

には、その時の色相を表す角度の代わりに簡易的な指標としての褐色度指数 (b/a) の平均値と、既報⁴⁾を参考に、初期値と貯蔵中の色調変化から算出される明度差 (ΔL) と彩度差 (ΔC)、色相角差 (Δh)、さらにこれらを総合した色差 (ΔE) を算出した結果も記載した。

ブリの冷解凍直後ではきれいな赤色を示していたが、

1.5 時間後には既に褐変して商品としては不適切であった。その後の 5.5 時間後まで、徐々に褐色化は進んだ。その時の褐色度指数 (b/a) は解凍直後の赤色では 0.69 と低いが、時間とともに b/a 値は増加し、1.5 時間後では 1.10 となった。色彩計による色の評価として本研究では b/a を採用したが、Snyder⁹⁾は逆の a/b 値で新鮮な牛肉の色の評価を行い、a/b が高いときは還元型 Mb とオキシ型 Mb 濃度が高く、低くなるとメト型 Mb 濃度が高くなることを発見した。しかし、Lab 表色系 (CIE Lab 色空間) では、色相は横軸に a 値、縦軸に b 値をプロットするために、そこから表現される色相角は Fig.8 のように、b/a から求めることになる。したがって、赤色や褐色といった色相角の差を表現する際は a/b 値は不適切となる。その他の指標として、ED Strange⁸⁾らは、引用文献から aL 値を牛肉の赤みやブルーミングの尺度として使用していることを記述した。この点については、明るさの因子を考慮した指標に繋がる可能性があり、今後検討したい。

ブリ血合肉の L,a,b 解析値と人の色覚からの評価基準

現在までに当研究室で分析した養殖ブリの血合肉 45 試料では、測色値から算出した色相角で 40° あたりから褐色に変化したと認識されることが多かった。Fig.8 の色図においても、赤色と褐色の境界領域であった。そこで、 $\tan^{-1} 40^\circ$ (b/a) = 0.82 から、計算が簡単な b/a を商品価値から見た褐色度指数の許容限界値とし、褐色度指数 $b/a < 0.8 \sim 0.9$ を基準値と設定した。

また、初期値と経時的な測色値から明度差や彩度差、色相角差についても Table 1 に示した。異なる 2 点の間からのそれぞれの差は、知覚される色の差を反映しているといわれる。ブリ血合肉の色調変化は赤色から褐色へと色が変わっており、測色値から算出したそれぞれの差と比べると、当然ながら明度差や彩度差よりも色相角差の変化量が大きく、ブリ血合肉では色相角差が品質の変化量のよい指標であると考えられた。

既報⁴⁾において、1 週間程度のキハダの色調変化は鮮やかさを示す彩度差がマグロ職人の感覚をよく反映しており、彩度差で 10 程度が商品のレベルを分ける距離であることを報告した。本研究において、鮮度のよいブリの血合肉の b/a 値は 0.6~0.7 程度であり、色調の劣化にともない b/a 値で 0.8~0.9 に達したときに商品として不適切と判断された。その時の色相角差は 9~10 であり、キハダの彩度差からみた色の距離とほぼ同様であった。そこで、色相角差 $< 9 \sim 10$ を褐色変化量の許容境界として設定し、Table 2 のように、色相角差の変化量に応じた色覚に評語を付して「赤色から褐色への変化は識別されない閾値」として設定した。

Table 2. Acceptable criteria for hue angle difference (Δh) of yellowtail dark meat judged from perceived color tone.

Grade	Δh	Expression for Perceived color difference*
Discrimination boundary 5	0~2	Range of error in colorimetric values
	0~3	Limits that a trained person can identify
Color difference recognition 4	3~8	Recognize slight color differences through adjacent comparisons
Tolerance boundary 3	9~10	Visually recognize color changes
Unacceptable 2	11~15	Clearly identify color changes
Different colors 1	15~	Represented as a different color

*Only the hue angle difference is extracted from the previous report⁴⁾

以上、養殖ブリ血合肉における色の評価基準をまとめると、次のようであった。

- ・褐色度指数 (b/a) < 0.8~0.9 商品価値の判断指数
- ・初期からの色相角差 < 9~10 褐色変化量の限界値
- ・メト化率相当 (%) < 40% ~ 50%

ただし、メト化率相当では褐変が局在化した際には適用できない。

引用文献

- 1) 農林水産省 (2021). 養殖業成長産業化総合戦略.
https://www.jfa.maff.go.jp/j/saibai/yousyoku/attach/pdf/seityou_senryaku-4.pdf
- 2) 上西由翁・西本素三・林田顕正 (2023). 冷凍 F2 級貯蔵温度における生食用カンパチの品質保持効果. 令和 5 年度日本水産学会春季大会 (講演番号 0918).
- 3) (一社) 全国海水養魚協会 (2021). 養殖業成長産業化行動計画 (ブリ類編). 水産庁補助事業 令和 2 年度養殖業成長産業化行動計画策定事業.
https://www.jfa.maff.go.jp/j/saibai/yousyoku/attach/pdf/seityou_19-67.pdf
- 4) 上西由翁, 田住瑤子, 舟橋亜希, 安樂和彦 (2019). 生鮮刺身の色変わり特性と官能評価. 鹿児島大学水産学部紀要, 68, 1-7.
<http://hdl.handle.net/10232/00030918>
- 5) 佐野吉彦, 橋本周久 (1958). 冷凍貯蔵中に於ける魚肉の変色に関する研究 - I. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries Vol. 24, 519-523.
<https://doi.org/10.2331/suisan.24.519>
- 6) 林田顕正, 上西由翁 (2022). HPLC を用いたミオグロビンの定量とメト化率相当の検討. 令和 4 年度日本水産学会春季大会 (講演番号 825).
- 7) 尾藤方通 (1967). 冷蔵中におけるマグロ肉の色変. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries Vol. 33(9), 878-882.
<https://doi.org/10.2331/suisan.33.878>
- 8) ED Strange, RC Benedict, RE Gugger, VG Metzger, CE Swift (1974). Simplified methodology for measuring meat color. Journal of Food Science, 39 Issue 5988-992.
- 9) H. E. Snyder (1965). Analysis of pigments at the surface of fresh beef with reflectance spectrophotometry. Journal of Food Science. 30 Issue 3. 457-463.