

# 秦川牛花纹肉剪切力值与胶原蛋白吡啶交联 和热溶解性的关系

卢桂松, 王复龙, 朱 易, 万可慧, 彭增起

(南京农业大学农业部畜产品加工与质量控制重点开放实验室, 南京 210095)

**摘要:**【目的】通过对花纹肉剪切力值与胶原蛋白吡啶交联含量的对比研究, 发掘脂肪沉积改善牛肉嫩度的内在原因。【方法】以秦川公牛花纹肉为试验材料, 研究相同年龄不同花纹等级、相同花纹等级不同年龄的牛肉样品剪切力值、胶原蛋白热溶解性以及吡啶交联含量的变化规律。【结果】对花纹等级相同(B级)的西冷来说, 随着年龄的增长, 羟赖氨酰吡啶啉(HP)交联逐渐增加, 赖氨酰吡啶啉(LP)交联先增加后减少, 胶原蛋白热溶解性下降, 牛肉剪切力值增加; 对相同年龄的西冷来说(4对永久齿), 随着花纹等级的提高, HP交联含量逐渐减少, 胶原蛋白热溶解性升高, 牛肉剪切力值下降。【结论】脂肪沉积过程中, 胶原蛋白中HP交联受抑, 胶原蛋白未能形成丰富的成熟交联, 加热时更容易形成明胶, 使牛肉剪切力值下降, 嫩度提高。

**关键词:** 牛肉; 大理石纹; 羟赖氨酰吡啶啉; 赖氨酰吡啶啉; 嫩度; 吡啶啉

## Study on the Relationships Between Pyridinoline Cross-Links and Solubility of Collagen and Shear Force of Qinchuan Marbling Beef

LU Gui-song, WANG Fu-long, ZHU Yi, WAN Ke-hui, PENG Zeng-qi

(Key Laboratory of Agricultural and Animal Products Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

**Abstract:** 【Objective】 The objective of this experiment is to study the pyridinoline cross-links of collagen and dissect its relevance to the shear force of beef. 【Method】 Samples were divided into two groups. The first group consists of the same marbling with different ages. The second consists of the same age with different marblings. The shear force of beef, solubility and hydroxylysylpyridinium, lysylpyridinium of collagen were measured. 【Result】 According to the results of the first group, as bull aged, HP cross-links increased, LP cross-links increased firstly, and then decreased, which was followed by the decreasing of collagen solubility and the increasing of shear force. According to the results of the second group, as fattening, HP cross-links decreased, the solubility of collagen increased, and the shear force of beef decreased. 【Conclusion】 In the fattening, the synthesization of HP cross-link was restrained. There are shorts of mature cross-links in collagen, resulting in transition of gelatin more easily. So beef turns tenderer.

**Key words:** beef; marbling; hydroxylysylpyridinium; lysylpyridinium; tenderness; pyridinoline

## 0 引言

【研究意义】肌内脂肪沉积形成的大理石花纹是影响牛肉品质的主要因素之一, 不同花纹等级的牛肉

市场价格差别很大, 最高可达几十倍。主要是因为脂肪沉积提高了牛肉咀嚼时的风味, 并且改善了牛肉嫩度。风味的提高与脂肪沉积有较强的关系, 但脂肪沉积改善牛肉嫩度的深层原因仍不明确, 对此研究具有

收稿日期: 2012-07-11; 接受日期: 2012-10-24

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(NYCYTX-38)

联系方式: 卢桂松, Tel: 13770501565; E-mail: 2010108030@njau.edu.cn. 通信作者彭增起, Tel: 025-84399028; E-mail: zqpeng@njau.edu.cn

重要理论意义。【前人研究进展】根据农业部行业标准《NY/T676. 牛肉等级规格》，大理石花纹等级可以分为 5（极丰富）、4（较丰富）、3（中等）、2（少量）、1（几乎没有）五个等级<sup>[1]</sup>。众多学者研究发现<sup>[2-3]</sup>，牛肉剪切力值随牛龄的增长逐渐升高。有趣的是 Nishimura 研究得出了看似矛盾的观点<sup>[4]</sup>，他发现年龄增加到一定程度以后，牛肉剪切力值不再增加，嫩度反而有所改善。Nishimura 推测是脂肪沉积破坏了肌肉中结缔组织的结构，导致其机械强度下降，从而改善了牛肉嫩度。此现象逐渐引起越来越多学者的关注，可惜没有深入研究的相关报道。影响牛肉嫩度的因素很多，其中胶原蛋白的理化特性对肉嫩度的影响较大。胶原蛋白分子由三条多肽链组成<sup>[5]</sup>，肽链之间的连接通过某些特殊的氨基酸形成共价交联<sup>[6-7]</sup>，胶原蛋白中的交联种类很多，不同交联的热稳定性不同<sup>[8-9]</sup>，随着动物年龄的增长，肽链之间的交联逐渐转变成非还原性的成熟交联<sup>[10]</sup>，主要分为两种结构<sup>[11]</sup>：一种是羟赖氨酰吡啶啉（hydroxylysylpyridinium, HP）结构，另一种是赖氨酰吡啶啉（lysylpyridinium, LP）结构，后者在胞外基质中含量很少，但统称为吡啶交联（pyridinoline）。吡啶交联的形成能够提高胶原蛋白分子的空间稳定性，但是关于吡啶交联与嫩度关系的研究仍然存在较大争议<sup>[12-13]</sup>。【本研究切入点】本文以秦川公牛背肌为研究对象，着重研究相同年龄，不同花纹等级以及不同年龄，相同花纹等级下，胶原蛋白中吡啶交联的变化与嫩度的关系，以及二者与胶原蛋白热溶解性的关联。【拟解决的关键问题】本文通过研究不同年龄和不同肌肉脂肪沉积情况下，结缔组织中成熟交联羟赖氨酰吡啶啉（HP）和赖氨酰吡啶啉（LP）的变化，探究其与嫩度的相关性，试图从胶原蛋白成熟交联深层角度发掘脂肪沉积改善牛肉嫩度的内在原因。

## 1 材料与方法

本试验样品采集时间为 2011 年 10 月 20—28 日，所有试验内容在 2011 年 11 月完成于南京农业大学农业部农畜产品加工与质量控制重点开放实验室。

### 1.1 材料与试剂

样品取自秦宝牧业发展有限公司的未阉割公牛，宰后冷却排酸 48 h 后分割获得西冷，取样后冷冻保藏。花纹等级为 2（B 级）的样品体重在 460—600 kg 内，选取：0 对、1 对、2 对、3 对和 4 对永久齿 5 个研究组，每组 6 头牛。花纹等级为 3（A 级）的样品体重

在 600 kg 左右，选取 4 对永久齿的研究组，A 级试验组 6 头牛。花纹等级为 4（S 级）的样品体重在 600 kg 左右，选取 4 对永久齿的研究组，S 级试验组 5 头牛。

石油醚、浓硫酸、氯胺 T、对二甲氨基苯甲醛、高氯酸、正丙醇、异丙醇，均为分析纯、国药集团；牛赖氨酰吡啶（LP）ELISA 试剂盒，上海蓝基生物有限公司；牛羟赖氨酸吡啶（HP）ELISA 试剂盒，上海蓝基生物有限公司。

### 1.2 仪器与设备

BS223S 型电子分析天平，北京赛多利斯仪器系统有限公司；HH-42 型快速恒温数显水浴锅，常州国华电器有限公司；C-LM3B 型数显示肌肉嫩度仪，东北农业大学；DU730 型紫外可见分光光度计，美国 BECKMAN；UV-1601 酶标仪，日本岛津。

### 1.3 试验方法

1.3.1 剪切力测定 在半解冻状态下，将样品沿肌纤维方向切成 1 cm×1 cm×3 cm 大小的肉样，注意避开明显的结缔组织。避免使用取样器，在大块肉中取样很难避开结缔组织，会增加系统误差。封口包装后放入 80℃ 水浴锅中加热，至肉样中心温度达到 75℃ 后取出，冷却至室温，用嫩度仪测样品的剪切力，计算平均值。

1.3.2 胶原蛋白热溶解性测定 参照 Krystyna Palka 的方法<sup>[14]</sup>，略有改动。分别取冷冻干燥后的样品 50 mg 于带盖试管中，加入 1.5 mL 蒸馏水，4℃ 下放置 12 h。用 1 mL 蒸馏水洗好试管壁上的样品，在 77℃ 水浴条件下加热 70 min。保持热状态离心（1000×g，30 min）。将上清液倒入具塞试管中，加入 1 mL 蒸馏水，再次离心（1000×g，30 min）。将上清液倒入同一个试管中，加入等量的浓盐酸；沉淀放入另一个具塞试管中加入 5—10 mL 6 mol L<sup>-1</sup> 盐酸后，在 110℃ 的烘箱中加热 24 h，分解后除去盐酸。然后按国标《肉与肉制品羟脯氨酸含量测定》中的方法<sup>[15]</sup>，分别算出上清和沉淀中的羟脯氨酸含量，胶原蛋白热溶解性=上清羟脯氨酸含量/（上清羟脯氨酸含量+沉淀羟脯氨酸含量）。

1.3.3 HP 和 LP 测定 取出试剂盒于室温（25℃ 左右）下放置 30 min，取出酶标板，按照标准品的次序分别加入 100 μL 的标准品溶液于空白微孔中（做标准曲线用）。另选空白微孔加入 100 μL 样品，空白对照加入 100 μL 蒸馏水，样品孔再加入 10 μL 的缓冲液。然后在各孔中加入 50 μL 的酶标记溶液（不含空白对照孔），将酶标板用封口胶密封后，于 37℃ 孵育反应 1 h。充分清洗酶标板 5 次（浓缩洗涤液以 1 : 100 的比例与

蒸馏水稀释), 之后用吸水纸彻底拍干。各孔分别加入显色剂 A、B 50 μL, 在 25℃ 条件下反应 15 min, 最后各孔加入 50 μL 终止液, 迅速于波长 450 nm 下读取各孔吸光值, 根据标准曲线计算各吸光值对应的样品浓度。

1.4 数据处理和统计分析

试验数据采用 SAS 9.0 统计软件进行统计分析。处理组之间差异显著性分析采用邓肯氏多重比较 (Duncan's 检验) 法, 数据采用“平均值±标准差”的表示方法。相关性分析采用 Spearman 相关系数分析法。

2 结果

2.1 HP 和 LP 试验方法建立

本试验采用 ELISA 免疫反应首次测定了牛肉中 HP、LP 的含量, 根据牛肉中特异性的 HP、LP 抗原与试验制备的 HP、LP 抗体发生专一性结合, 反应体系中的催化酶被固定在一种底物上, 这种底物可以和 HP、LP 抗体竞争性结合 HP、LP 抗原。利用标准 HP、LP 抗原与抗体反应制作的标准曲线如图 1、2 所示。

2.2 剪切力与胶原蛋白热溶解性的关系

牛的牙齿有乳齿和永久齿之分, 随着年龄的增长乳齿逐渐换成永久齿。永久齿共有 4 对, 一旦长出不再变换。因年龄的不同, 牙齿表面形成不同程度的磨损, 根据永久齿的数量以及其磨损程度可以判断牛的年龄大小。牙齿的变化情况与年龄的关系如下<sup>[16]</sup>: 全乳齿 (0 对永久齿) 牛龄为 1—1.5 岁, 1 对永久齿形成牛龄为 1.5—2 岁, 2 对永久齿形成牛龄为 2.5 岁左右, 3 对永久齿形成牛龄为 3.5 岁左右, 4 对永久齿形

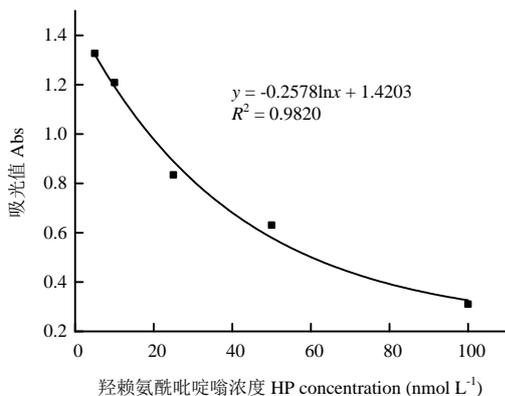


图 1 利用抗原抗体酶联免疫法制作羟赖氨酸吡啶啉标准曲线

Fig. 1 Standard curve of HP made by ELISA

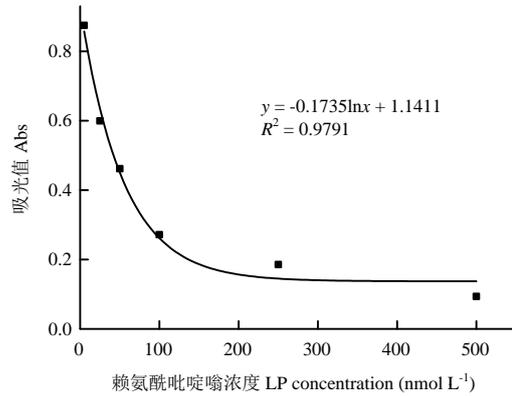
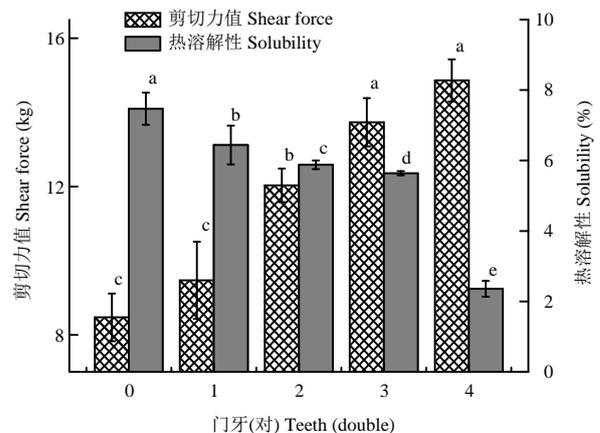


图 2 利用抗原抗体酶联免疫法制作赖氨酸吡啶啉标准曲线

Fig. 2 Standard curve of LP made by ELISA

成牛龄为 4.5 岁左右。

由图 3 可知, 花纹等级相同, 随着年龄逐渐增长, 牛背最长肌剪切力值总体呈增加趋势, 牛肉嫩度逐渐降低。其中, 1 对永久齿形成之前的牛肉剪切力差异不显著。1 对永久齿形成到 3 对永久齿形成期间, 牛肉剪切力值显著增加, 嫩度显著降低 ( $P < 0.05$ )。3 对永久齿形成以后, 牛肉剪切力值虽有增加, 但增幅较小。另外, 年龄不断增长, 牛背最长肌胶原蛋白热溶解性逐渐降低, 差异显著 ( $P < 0.05$ )。

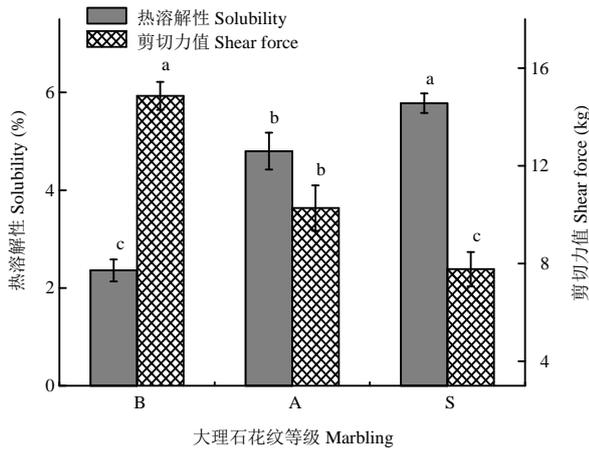


数据用平均数±标准差的形式表示  
Data were shown as mean ± standard error of the mean

图 3 年龄对牛肉剪切力值和胶原蛋白热溶解性的影响 (n=6)

Fig. 3 Effect of age on shear force and collagen solubility of beef

图 4 横坐标中 B、A、S 分别代表大理石花纹等级的区别，B 级大理石花纹最少，S 级大理石花纹最多。从图 4 可以看出，年龄相同（4 对永久齿），随着花纹等级的提高，牛背最长肌剪切力值显著降低（ $P < 0.05$ ），对应的胶原蛋白热溶解性显著增加（ $P < 0.05$ ），牛肉嫩度明显提高。



数据用平均数±标准差的形式表示  
Data were shown as mean±standard error of the mean

图 4 花纹等级对牛肉剪切力值和胶原蛋白热溶解性的影响 (n=5)

Fig. 4 Effect of marbling on shear force and collagen solubility of beef

### 2.3 成熟性交联

2.3.1 吡啶交联与花纹等级的关系 从表 1 可以看出，相同年龄段（4 对永久齿），随着花纹等级的提高，牛背最长肌胶原蛋白成熟性交联 HP 含量显著降低（ $P < 0.05$ ），LP 含量逐渐下降，但降幅不明显（ $P > 0.05$ ），对应的牛肉剪切力值显著降低，牛肉嫩度明显提高。

2.3.2 吡啶交联与年龄的关系 由表 2 可知，花纹等

表 1 吡啶交联与花纹等级的关系

Table 1 Relationships between marbling and pyridinoline (n=5)

花纹等级 Marbling	B	A	S
羟赖氨酰吡啶噻 HP (nmol g <sup>-1</sup> )	26.59±1.18a	14.56±0.59b	10.80±0.37c
赖氨酰吡啶噻 LP (nmol g <sup>-1</sup> )	34.92±2.81a	34.50±1.04a	29.88±1.16a
剪切力 Shear force (kg)	14.86±0.57a	10.27±0.93b	7.77±0.70c

同行字母不同者差异显著（ $P < 0.05$ ）

Values within a row with different letters (a, b, c) differ significantly ( $P < 0.05$ )

级相同，随着年龄逐渐增长，牛背最长肌胶原蛋白成熟性交联 HP 含量总体上逐渐增高，特别是在 2 对永久齿形成以后，HP 含量升高幅度尤其明显（ $P < 0.05$ ）。LP 含量变化较为复杂，2 对永久齿形成之前显著升高，随后显著下降（ $P < 0.05$ ）。在此过程中，牛肉剪切力值逐渐升高，嫩度逐渐降低。不难发现 2 对永久齿形成之前，牛肉剪切力值随 LP 的增加而增加，2 对永久齿形成以后剪切力值随 HP 的增加而增加。

### 2.4 相关性分析

2.4.1 相同花纹等级不同年龄牛肉剪切力和胶原蛋白热溶解性与吡啶交联的相关性分析 从表 3 可以看出，对于花纹等级相同的牛肉来说（B 级），HP 交联与年龄及剪切力之间极显著正相关，相关性系数分别为 0.829 和 0.758，而与胶原蛋白热溶解性之间极显著负相关，相关性系数为-0.821。LP 交联与年龄、剪切力及胶原蛋白热溶解性之间均无显著相关性，说明 LP 交联跟它们之间不存在线性关系，这与 LP 交联含量在 3 对永久齿形成以后下降有关。

2.4.2 相同年龄不同花纹等级牛肉剪切力和胶原蛋白热溶解性与吡啶交联的相关性分析 由表 4 可得，对于年龄相同的牛肉来说（4 对永久齿），HP 交联与剪切力之间极显著正相关，相关性系数为 0.883，而与花纹等级及胶原蛋白热溶解性之间极显著负相关，相关性系数分别为-0.949 和-0.883。LP 交联与

表 2 吡啶交联与年龄的关系

Table 2 Relationships between pyridinoline and age (n=6)

永久齿 Teeth	0	1	2	3	4
羟赖氨酰吡啶噻 HP (nmol g <sup>-1</sup> )	12.96±0.38c	15.07±0.71c	13.76±1.47c	17.80±0.84b	21.59±1.18a
赖氨酰吡啶噻 LP (nmol g <sup>-1</sup> )	42.54±2.59c	49.84±2.65b	58.11±5.17a	42.95±4.73c	34.92±2.81d
剪切力 Shear force (kg)	8.47±0.64c	9.47±1.04c	12.03±0.45b	13.73±0.65a	14.86±0.57a

同行字母不同者差异显著（ $P < 0.05$ ） Values within a row with different letters (a, b, c) differ significantly ( $P < 0.05$ )

表 3 相同花纹等级不同年龄牛肉剪切力和胶原蛋白热溶解性与吡啶交联的相关性分析

Table 3 Spearman correlation of shear force, collagen solubility and pyridinoline in the same marbling but different age (n=6)

	年龄 Age	剪切力 Shear force	热溶解性 Solubility
羟赖氨酰吡啶啉 HP	0.829**	0.758**	-0.821**
赖氨酰吡啶啉 LP	0.436ns	0.434ns	0.429ns

\*在置信度(双测)为 0.05 时,相关性显著; \*\*在置信度(双测)为 0.01 时,相关性极显著; n: 相关性不显著。下同

\* The correlation is significant when the confidence level (measurement) is 0.05. \*\* The correlation is extremely significant when the confidence level (measurement) is 0.01. ns: The correlation is not significant. The same as below

剪切力之间显著正相关,相关性系数为 0.717,而与花纹等级及胶原蛋白热溶解性之间显著负相关,相关性系数分别为-0.791 和-0.717。总体来说,HP 交联与花纹等级、胶原蛋白热溶解性及剪切力的相关性均强于 LP 交联。另外,比较表 3 和表 4 可以看出,LP 交联对 B 级牛肉剪切力的影响力不如对花纹肉的影响力强。

表 4 相同年龄不同花纹等级牛肉剪切力和胶原蛋白热溶解性与吡啶交联的相关性分析

Table 4 Spearman correlation of shear force, collagen solubility and pyridinoline in the same age but different marblings (n=5)

	花纹等级 Marbling	剪切力 Shear force	热溶解性 Solubility
羟赖氨酰吡啶啉 HP	-0.949**	0.883**	-0.883**
赖氨酰吡啶啉 LP	-0.791*	0.717*	-0.717*

### 3 讨论

本研究发现,花纹等级高的牛肉剪切力值有所下降,嫩度得到改善。嫩度是评价牛肉品质的重要标准,影响牛肉嫩度的因素有很多,包括品种、年龄、部位、性别、成熟条件等,诸多宏观因素对牛肉嫩度本质上的影响来自肌原纤维蛋白和胶原蛋白特性的不同。越来越多的学者研究表明,胶原蛋白对嫩度的影响作用高于肌原纤维蛋白<sup>[17-18]</sup>,本文着重从胶原蛋白交联特性角度探讨脂肪沉积对牛肉嫩度的影响。

胶原蛋白是肌束膜和肌内膜的主要构成成分,胶原蛋白在肌肉中扮演着类似骨架的作用,它能够缓解肌肉运动产生的压力<sup>[19]</sup>。随着年龄的增长,胶原蛋白的热稳定性越来越高,其热溶解性逐渐降低,在加热

过程中不宜被降解,收缩强烈,使肉的剪切力值升高,嫩度降低。本研究发现,随着脂肪的沉积,胶原蛋白的热溶解性得到提高。众多学者在研究由年龄引起的嫩度变化时指出<sup>[20-22]</sup>,胶原蛋白的“质量”比数量对嫩度的影响更大。胶原蛋白的“质量”是由其自身结构所决定的,据此可以推测,脂肪沉积可能引起胶原蛋白的某些结构特性发生改变。

Eyre 等研究发现<sup>[23]</sup>,随着动物年龄的增加,胶原蛋白还原性共价交联逐渐转变成稳定的非还原性交联。Lepetit<sup>[10]</sup>和 Bosselmann 等<sup>[24]</sup>在研究不同品种、不同部位时发现,胶原蛋白中 HP、LP 交联含量存在显著差异,不过他们未把这种差异和嫩度之间建立关系。Slatter 等研究发现<sup>[25]</sup>,稳定性交联越多,胶原蛋白的热不溶解性越强,其机械强度越大,肉的嫩度越差。非还原性的成熟交联是三共价键的,连结 3 个胶原蛋白分子,使胶原纤维网状结构更加稳定<sup>[26-27]</sup>。本文研究发现,随着脂肪沉积量增加,花纹等级提高,HP 交联含量显著降低 ( $P < 0.05$ ),两者之间呈极显著负相关关系。LP 含量逐渐下降,但降幅较低 ( $P > 0.05$ )。说明脂肪的沉积过程中,主要抑制了 HP 交联的生成,使胶原蛋白未能形成丰富的成熟交联,其热稳定性降低,进而改善了牛肉嫩度。这可能与催化交联生成的酶有关, van der Slot 等研究发现<sup>[28]</sup>,成熟交联的生成与赖氨酰氧化酶以及赖氨酰羟化酶的表达量有密切关联。脂肪的沉积可能影响这两种酶的活性,进而阻碍了成熟性交联的增加。

### 4 结论

随着花纹等级的提高,胶原蛋白中 HP 交联含量逐渐减少,使胶原蛋白未能形成丰富的成熟交联,提高了胶原蛋白的热溶解性,在加热过程中胶原蛋白更易明胶化,进而使牛肉嫩度得到改善。随着年龄的增长,HP 交联逐渐增加,牛肉剪切力值逐渐升高,嫩度逐渐降低。

### References

- [1] NY/T676. 牛肉等级规格. 2010. NY/T676. *Beef Quality Grading*. 2010. (in Chinese)
- [2] Xiong Y L, Mullins O E, Stika J F, Chen J, Blanchard S P, Moody W G. Tenderness and oxidative stability of post-mortem muscles from mature cows of various ages. *Meat Science*, 2007, 77(1): 105-113.
- [3] Schünfeldt H C, Strydom P E. Effect of age and cut on tenderness of

- South African beef. *Meat Science*, 2011, 87(3): 206-218.
- [4] Nishimura T, Hattori A, Takahashi K. Structural changes in intramuscular connective tissue during the fattening of Japanese black cattle: effect of marbling on beef tenderization. *Journal of Animal Science*, 1999, 77(1): 93-104.
- [5] 李卫林, 曹健. 胶原蛋白结构和稳定性关系研究. *中国皮革*, 2005, 34(23): 14-16.
- Li W L, Cao J. Study on the structure and stability of collagen. *China Leather*, 2005, 34(23): 14-16. (in Chinese)
- [6] Ranmshaw J A, Shah N K, Brodsky B. Gly-X-Y triple-tide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptide. *Journal of Structure Biology*, 1998, 23(7): 86-91.
- [7] Ngapo T M, Berge P, Culioli J, Dransfield E, De Smet S, Claeys E. Perimysial collagen crosslinking and meat tenderness in Belgian Blue double-musled cattle. *Meat Science*, 2002, 61(1): 91-102.
- [8] Knott L, Bailey A J. Collagen cross-links in mineralizing tissues: A review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone*, 1998, 23(3): 181-187.
- [9] Banse X, Devogelaer J P, Lafosse A, Sims T J, Grynepas M, Bailey A J. Cross-link profile of bone collagen correlates with structural organization of trabeculae. *Bone*, 2002, 31(1): 70-76.
- [10] Lepetit J. A theoretical approach of the relationships between collagen content, collagen cross-links and meat tenderness. *Meat Science*, 2007, 76(1): 147-159.
- [11] Atley L M, Mort J S, Lalumiere M, Eyre D R. Proteolysis of human bone collagen by cathepsin K: characterization of the cleavage sites generating the cross-linked N-telopeptide neoepitope. *Bone*, 2000, 26(3): 241-247.
- [12] Bailey A J, Shimokomaki M S. Age related changes in the reducible cross-links of collagen. *FEBS Letters*, 1971, 16(2): 86-88.
- [13] Field R A, McCormick R J, Brown D R, Snowden G D. Collagen crosslinks in longissimus muscle from lambs expressing the callipyge gene. *Journal of Animal Science*, 1996, 74(12): 2943-2947.
- [14] Palka K. The influence of post-mortem ageing and roasting on the microstructure, texture, and collagen solubility of bovine semitendinosus muscle. *Meat Science*, 2003, 64(2): 191-198.
- [15] GB/T9695.23. 肉与肉制品羟脯氨酸含量测定. 2008.
- GB/T9695.23. *Meat and Meat Products-Determination of Hydroxyproline Content*. 2008. (in Chinese)
- [16] 陈伯华. 通过牙齿判断牛的年龄. *山西农业*, 2002, 1(1): 32-33.
- Chen B H. How to know the age of cow by teeth? *Shanxi Agriculture*, 2002, 1(1): 32-33. (in Chinese)
- [17] Lepetit J. Collagen contribution to meat toughness: Theoretical aspects. *Meat Science*, 2008, 80(4): 960-967.
- [18] Nishimura T. The role of intramuscular connective tissue in meat texture. *Animal Science Journal*, 2010, 81(1): 21-27.
- [19] Shoulders M D, Raines R T. Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, 78(1): 929-958.
- [20] Wang X, Shen X, Li X, Agrawal M. Age-related changes in the collagen network and toughness. *Bone*, 2002, 31(1): 1-7.
- [21] Young O A, Braggins T J. Tenderness of ovine semimembranosus: Is collagen concentration or solubility the critical factor? *Meat Science*, 1993, 35(2): 213-222.
- [22] Avery N C, Sims T J, Warkup C, Bailey A J. Collagen cross-linking in porcine longissimus lumborum: Absence of a relationship with variation in texture at pork weight. *Meat Science*, 1996, 42(3): 355-369.
- [23] Eyre D R, Koob T J, van Ness K P. Quantization of hydroxypyridinium crosslinks in collagen by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 1984, 137(2): 380-388.
- [24] Bosselmann A, Steinhart H, Möller C, Kirchgessner M, Schwarz F J. Pyridinoline cross-links in bovine muscle collagen. *Journal of Food Science*, 1995, 60(5): 953-957.
- [25] Slatter D A, Avery N C, Bailey A J. Collagen in its fibrillar state is protected from glycation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2008, 40(10): 2253-2263.
- [26] Eyre D R, Paz M A, Gallop P M. Cross-linking in collagen and elastin. *Annual Review of Biochemistry*, 1984, 53(1): 717-748.
- [27] Reiser K, McCormick R J, Rucker R B. Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. *The FASEB Journal*, 1992, 6(7): 2439-2449.
- [28] van der Slot A J, Zuurmond A M, van den Bogaardt A J, Ulrich M M, Middlekoop E, Boers W, Kard Runday H, DeGroot J, Huizinga T W, Bank R A. Increased formation of pyridinoline cross-links due to higher telopeptide lysyl hydroxylase levels is a general fibrotic phenomenon. *Matrix Biology*, 2004, 23(4): 251-257.