



微生物对不同产地驴皮腐败变质的影响*

张萌¹⁾ 李秋梅²⁾ 康佳威²⁾ 于杰^{2)**} 李霞^{1,3)**} 余跃^{1,3)}

(¹⁾ 制革清洁技术国家工程实验室(四川大学), 成都 610065; (²⁾ 东阿阿胶股份有限公司, 聊城 252201; (³⁾ 皮革化学与工程教育部重点实验室(四川大学), 成都 610065)

摘要 目的 驴皮保藏过程中的品质稳定性直接决定阿胶的药效与安全性。本研究聚焦于微生物群落结构的动态演变, 旨在阐明微生物种群差异对驴皮胶原结构及关键生化成分的降解规律, 为构建基于微生物调控的针对性保藏策略提供理论支撑。**方法** 本研究选取了4种不同地区的驴皮, 通过微生物老化加速实验, 模拟驴皮腐败变质的过程。采用高通量测序技术解析微生物群落组成, 利用扫描电子显微镜和压汞仪分析其微观结构, 同时测定油脂、蛋白质及糖分等主要成分含量。**结果** 老化96 h后, 非洲驴皮(Africa donkeys hides, ADH)的胶原纤维结构出现明显降解与塌陷, 新疆驴皮(Xinjiang donkeys hides, XDH)次之; 秘鲁驴皮(Peru donkeys hides, PDH)与东阿黑毛驴皮(Dong'e black donkeys hides, DDH)的微观结构则保持相对完整。4种驴皮的油脂与蛋白质含量均下降, ADH与XDH的胶原蛋白降解最为严重, PDH老化液中可溶性总糖和ADH老化液中羟脯氨酸含量大幅度上升。宏基因组学分析显示, 老化96 h后, ADH、PDH和XDH中广古菌门相对丰度分别从97.73%、93.19%和30.1%急剧下降至1.43%、0.79%和0.02%; 而厚壁菌门丰度均显著上升, 尤其是在ADH中高达93%。此外, PDH中假单胞菌门的丰度由0.10%增至87.84%, 这表明厚壁菌门和假单胞菌门可能是加剧驴皮腐败变质的关键因素。与其他三种驴皮不同, DDH的优势菌则由假单胞菌门演变为拟杆菌门。**结论** 不同地区驴皮在微生物老化过程中, 存在差异化的结构降解与营养利用模式。驴皮的腐败变质与其特定微生物群落的演替密切相关。因此, 通过精准调控环境因子以抑制厚壁菌门等有害菌群, 针对驴皮的地域来源制定差异化的防腐策略, 有望显著提升其保藏质量。

关键词 驴皮, 腐败变质, 微生物, 老化, 胶原蛋白, 保藏, 宏基因组

中图分类号 Q5, TS52

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0499

CSTR: 32369.14.pibb.20250499

动物皮作为制革、食品和药品加工行业的重要基础原料, 其品质是保障后续加工顺利进行与终端产品优质可靠的根本前提^[1-3]。动物皮的主要成分为胶原蛋白、脂肪和水分, 脱离生物体后极易受微生物侵染。这些微生物分泌蛋白酶等水解酶类, 导致胶原网络结构降解及生化成分改变, 最终严重影响原料皮的工业品质与价值^[4-5]。驴皮作为一种具有特殊药用价值的原料皮, 其保藏要求远高于普通工业用皮^[6]。据《中国药典》规定, 驴皮为制备传统名贵中药阿胶的唯一合法原料, 其胶原蛋白的三维结构、分子完整性及超微构造直接影响了阿胶的药理功效与产品质量^[7-8]。这一生物特异性对保藏技术提出了更高要求, 需同时兼顾有效抑菌与成分保护的双重目标。

不同地区环境中的微生物群落结构存在显著的

地域性差异^[9-10]。动物皮作为天然的胶原基材料, 是细菌、霉菌等微生物生长的理想介质^[11]。因此, 在保藏过程中, 动物皮中不同群落结构也会导致不同的微生物老化机制^[12]。Orlita等^[13]综述了皮革制备过程中因微生物老化引发的各类损害, 并指出了损害类型与特定微生物种类密切相关。例如, 嗜盐细菌的代谢产物会导致色素沉积, 形成红色或紫色斑点; 芽孢杆菌与假单胞菌可引起皮革表面腐烂甚至形成孔洞; 而某些霉菌则会在皮革干燥过程中

* 中央高校基本科研业务费专项资金和山东省泰山产业领军人才项目(tscx202408114)资助。

** 通讯联系人。

于杰 Tel: 18264506688, E-mail: yujie1@dongeejiao.com

李霞 Tel: 028-85402585, E-mail: sclixia@scu.edu.cn

收稿日期: 2025-11-09, 接受日期: 2025-12-22

生长,则会导致绿色、棕色和灰色斑点的形成。

然而,目前研究主要集中在活体驴皮肤微生物和已鞣制成品皮革的微生物上,关于驴皮保藏过程中微生物群落的构成与动态变化规律仍缺乏系统性研究,特别是微生物群落组成、丰度动态及功能基因特征等对胶原结构的影响机制尚未明确。随着分子生物学和基因组学技术的迅猛发展,高通量测序技术已成为解析复杂微生物群落结构及功能的重要工具^[14-15]。该技术无需对微生物进行分离培养,可直接从环境样本中提取总DNA,通过宏基因组学测序策略,深入解析微生物群落组成、多样性、演化关系及功能预测。目前,高通量测序已被广泛应用于各类环境样本(如土壤、水体、肠道)中的微生物群落研究,展现出卓越的分辨率和广泛的应用前景^[16-17]。

本研究综合运用高通量测序与生物信息学方法,采用模拟老化加速实验对来自4种不同产地驴皮在微生物老化过程中的群落结构、丰度演变与功能预测进行了解析,并结合扫描电子显微镜、压汞法、组织学等微观结构表征技术,以及3,5-二硝基水杨酸显色法、对二甲氨基苯甲醛显色法等生化成分分析方法,系统探究微生物老化对不同地区驴皮腐败变质程度的影响。未来将进一步通过模拟与实际相结合,建立快速、高效、专业化的保藏状态结果表征体系,为开发更具代表性、针对性的原皮保藏技术提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

东阿黑毛驴驴皮(Dong'e black donkeys hides, DDH),新疆驴皮(Xinjiang donkeys hides, XDH),秘鲁驴皮(Peru donkeys hides, PDH),非洲驴皮(Africa donkeys hides, ADH),东阿阿胶股份有限公司。10%中性甲醛溶液,苏木素染液,伊红染液,北京索莱宝科技有限公司;3M Petrifilm 6406菌落总数测试片,上海明尼苏达矿业制造公司;氯化钠,二氯甲烷,成都市科隆化学制品有限公司;其他用于分析的试剂均为分析纯。

1.2 模拟微生物老化实验

DDH、XDH、PDH和ADH驴皮样品均为已存放时间为3个月左右的盐干驴皮,水分活度均在0.63~0.69,存储条件均为阴凉通风环境下自然存放。选取4种盐干驴皮(DDH、XDH、PDH、ADH)臀部区域相同规格的小块3份(每种驴皮每

份25 g)。将盐干驴皮剪成1 cm×1 cm小块放入500 ml锥形瓶中,加入225 ml无菌生理盐水,在恒温振荡摇床中37℃条件下分别进行老化96 h。取老化0~96 h后的皮块及老化液,用于驴皮胶原微观结构表征、组织学观察、化学成分测定,以及微生物的数量和生物多样性分析。

1.3 驴皮结构表征

1.3.1 微观结构表征

采用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)和压汞仪表征4种不同地区驴皮的微观结构变化,以考察微生物老化对胶原纤维三维网络结构的影响。SEM分析:将皮试样用裁刀裁剪后,粘至试样台上喷金,观察驴皮试样的横截面形貌。压汞仪分析:将干燥样品置于膨胀计,抽真空后注入汞,依据Washburn方程计算孔径分布及孔隙率^[18]。

1.3.2 组织学观察

通过组织切片染色对老化0 h、48 h和96 h的驴皮进行组织学观察。将不同品种驴皮样品在10%中性甲醛溶液中固定48 h。流水冲洗后,采用冷冻切片机(CM1950,徕卡,德国)切取驴皮,得到厚度为20 μm的纵切面切片。室温下干燥24 h,将切片用苏木素和伊红(HE)染色^[19]。运用生物显微镜(DMi8,徕卡,德国)观察驴皮表皮、毛囊和胶原纤维结构。

1.4 驴皮化学成分的测定

取1 cm×1 cm干燥后的老化前后的驴皮,经傅里叶红外光谱仪(Fourier transform infrared spectrometer, FTIR)扫描(扫描范围:4 000 cm⁻¹~300 cm⁻¹),得到相应的红外光谱图。将25 g驴皮剪成0.5 cm×0.5 cm的小颗粒置于烘箱中,采用直接干燥法测定其水分含量^[20]。取5 g干燥后的皮样于干滤纸筒内,放入抽提管中,采用索氏抽提法测定驴皮中油脂含量^[21]。将微生物老化液离心取上清液,用6 mol/L的盐酸溶液水解,分别采用3,5-二硝基水杨酸法显色法和对二甲氨基苯甲醛显色法测定溶液中可溶性总糖和羟脯氨酸含量^[22-23]。取10 mg干燥后的皮样,采用有机元素分析仪测试样品中氮(nitrogen, N)含量,经氮含量与蛋白质含量换算(换算系数6.25)^[24],得到驴皮中蛋白质含量。

1.5 微生物数量的测定

微生物数量采用菌落总数测定法进行分析^[25]。取0 h、48 h和96 h的老化液,进行梯度稀释,均

匀平铺在菌落总数测试片上, 在 $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 48 h 后, 计算每克驴皮中的菌落总数。

1.6 驴皮微生物多样性分析

采用四层无菌纱布过滤老化液, 将滤液离心得到菌体。将菌体迅速放入液氮冷冻, 并在 -80°C 保存。利用 Mag-Bind® Soil DNA Kit (Omega Bio-tek, 美国) 试剂盒进行样品 DNA 抽提。通过 Covaris M220 (基因公司, 中国) 将 DNA 片段化, 筛选约 350 bp 的片段, 用于构建 PE 文库。采用 Illumina NovaSeq™ X Plus (Illumina, 美国) 测序平台进行宏基因组测序。使用软件 MEGAHIT (version 1.1.2) 对优化序列进行拼接组装。DNA 提取和高通量测序工作由上海美吉生物科技有限公司完成。

运用 SOAPaligner 软件 (version soap2.21 release), 分别将每个样品的高质量 reads 与非冗余基因集进行比对 (95% identity), 统计基因在对应样品中的丰度信息, 计算样品的 Chao1 指数和 Shannon 指数。通过 ANOSIM 法对微生物群落组成进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 以可视化样本之间的差异。采用 Diamond (version 2.0.13) 将非冗余基因集的氨基酸序列与 KEGG 数据库进行比对获得基因对应的 KEGG 功能。

1.7 统计学分析

采用 Origin Pro 2021 (OriginLab, 美国) 进行统计分析。每个实验均进行了 3 次重复, 结果以平均值 $\pm$ 标准差的形式表示。

2 结果与讨论

2.1 驴皮结构分析

非洲、新疆、秘鲁和东阿是覆盖全球主要产区 and 贸易来源的地区^[26], 饲养方式、品种存在巨大差异, 因此选取这 4 个地区的驴皮作为代表性的研究对象, 以考察微生物对不同产地驴皮腐败变质的影响。采用微生物老化加速实验, 模拟驴皮的腐败变质过程 (图 1a)。未老化 (0 h) 的 DDH、XDH、PDH 和 ADH 4 种驴皮截面, 均观察到清晰的胶原纤维结构 (图 1b)。胶原纤维是动物皮中的主要成分, 由直径为 100 nm 的胶原原纤维组成, 以直径范围为 $0.5\sim 20\ \mu\text{m}$ 的束状形式紧密排列^[27]。老化 96 h 后, DDH 的纤维结构基本保持完整; XDH 与 PDH 则出现明显的胶原纤维粘连现象; 而 ADH 的

胶原结构受损严重, 已难以辨识其纤维形态, 从数码照片中可以看出, 胶原纤维肉眼可见几乎完全降解。可见, 微生物老化会破坏胶原纤维的结构, 且该破坏作用具有明显的地域性特征。

动物皮作为一种天然的多孔材料, 纳米级的胶原纤维间隙到微米级的纤维束间孔隙, 共同构成了其三维网络结构^[27]。4 种驴皮在老化前孔隙率均较低 (图 1c), 表明其纤维结构较为致密, 保存状态良好。在老化过程中, DDH、XDH、PDH 和 ADH 的孔隙率分别从 27.9%、15.7%、30.3% 和 46.2% 增加至 36.5%、52.6%、42.8% 和 57.7%。这可能是微生物老化作用破坏了原本紧密的纤维结构, 具体表现为大、中孔径所占比例大幅提升 (图 1d)。其中, DDH 各组分变化幅度较小; PDH 次之, 大、中孔径比例略有上升; 而 XDH 与 ADH 大、中孔径比例明显增加。这进一步表明, 不同来源驴皮的胶原纤维降解存在明显差异, ADH 更容易受到微生物破坏, 而 DDH 能较好地保持胶原纤维结构。

组织学观察是一种研究材料微观结构 (如胶原纤维等组分) 的空间分布与形态学特征的常见方法^[28]。初始状态下, DDH 与 XDH 的胶原纤维结构致密、排列均匀分散, PDH 胶原纤维分布较为紧密, 而 ADH 的纤维则相对粗大 (图 2)。老化 48 h 后, 四种驴皮的表皮和毛囊均开始逐渐脱落。当时间延长至 96 h, 驴皮的表皮层出现较大程度的分离, 大部分胶原纤维出现团聚现象, XDH 和 ADH 的变化最为明显, 且 ADH 出现胶原纤维结构的明显降解与严重塌陷, 表明其耐微生物老化性能最弱, 此结果与 SEM 的结果一致。

2.2 驴皮成分分析

2.2.1 化学官能团组成

FTIR 技术是一种基于分子官能团对红外光的特征吸收, 从而对材料化学结构进行定性分析的常用方法^[29-30]。图 3a~d 分别为 DDH、XDH、PDH 和 ADH 在微生物老化前后的 FTIR 谱图。老化前 (0 h), 皮胶原蛋白的 C—O 伸缩振动带和 $-\text{NH}_2$ 的弯曲振动带分别出现在 $1\ 638\sim 1\ 633\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 547\ \text{cm}^{-1}$ 处。这是胶原蛋白中酰胺键酰胺 I 带和酰胺 II 带的特征吸收频带^[31]。经 96 h 老化, XDH 酰胺带相对强度较弱, ADH 未见胶原酰胺 I 带, 可能是胶原含量较低的缘故。这进一步证明, XDH 和 ADH 微生物老化后胶原蛋白降解较为严重, 相比之下, DDH 和 PDH 胶原结构保持较为完整。此外, $2\ 950\ \text{cm}^{-1}$ 与 $2\ 850\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰归属于脂质中 C—H 的

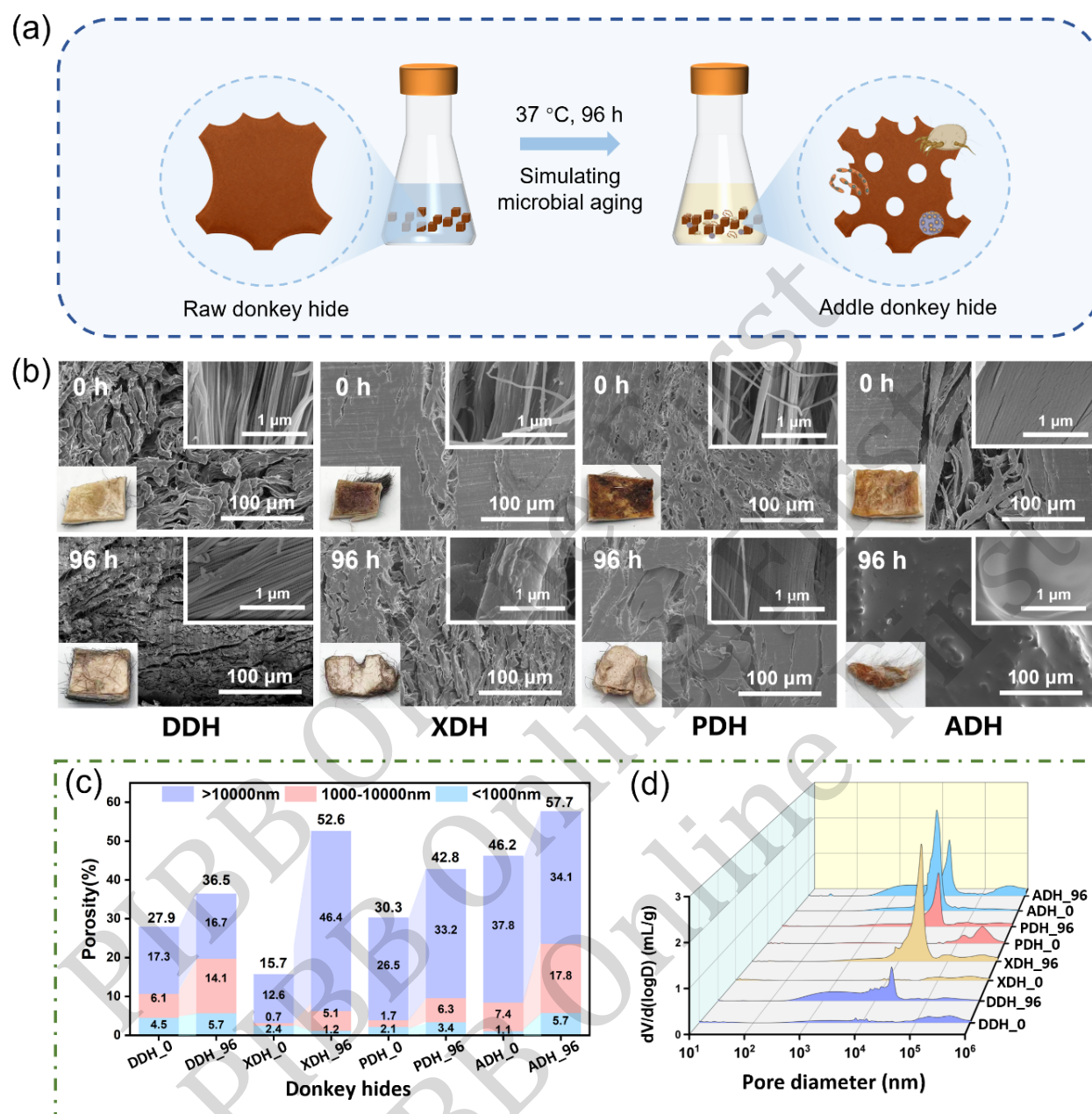


Fig. 1 Effects of microbial aging process on the composition of morphologies and structure of different donkey hides

(a) Schematic diagram of the experiment process for simulating microbial aging. (b) Digital photographs and SEM images of hides including DDH, XDH, PDH, and ADH at microbial aging 0 h and 96 h. (c, d) Porosity and pore diameter distribution of hides before and after microbial aging, respectively. DDH/XDH/PDH/ADH_0 and DDH/XDH/PDH/ADH_96 represent 4 types of donkey hides after 0 h and 96 h of microbial aging, respectively. $dV/d(\log D)$ represents the mercury volume increase per unit mass for a unit increase in the logarithm of applied pressure. A higher value indicates more pores in the corresponding aperture (or aperture segment) and a more developed, concentrated pore structure.

伸缩振动, 1 744 cm^{-1} 处的吸收峰则对应于酯键 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动。老化后, 4 种驴皮中代表脂肪含量的特征吸收峰 ($\text{C}-\text{H}$ 与 $\text{C}=\text{O}$) 的相对强度的降低, 表明其脂质含量减少。

2.2.2 化学成分分析

4 种驴皮在微生物老化过程中其化学成分的变化如图 4 所示。初始状态下, 驴皮的水分含量介于 30% 至 40% 之间 (图 4a)。在老化过程中, 驴皮的水分含量大都呈现先上升后趋于稳定的趋势, 老化

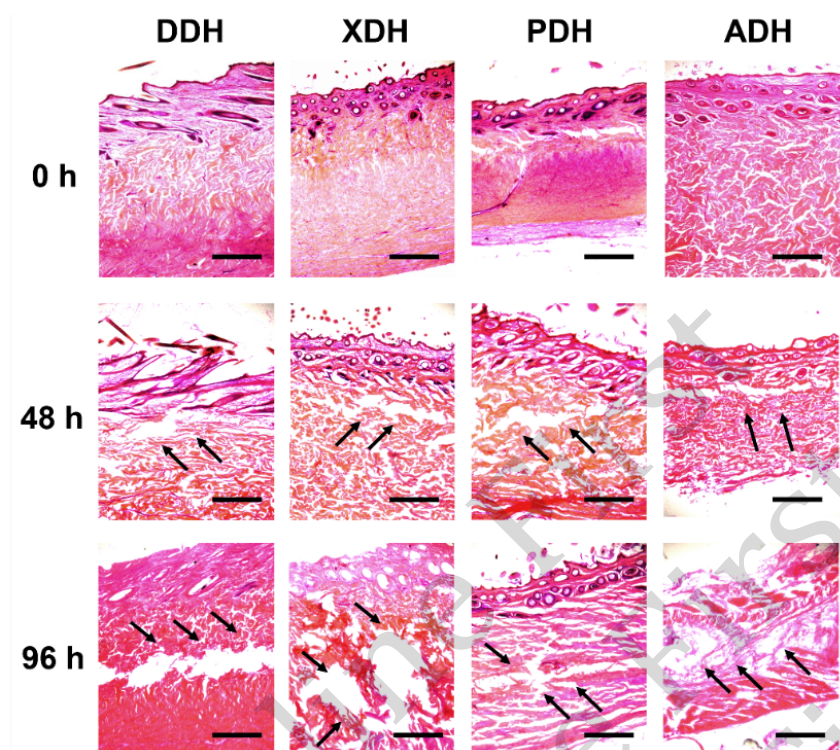


Fig. 2 HE stained longitudinal sections of hides at different microbial aging time (scale bar=200 μm)

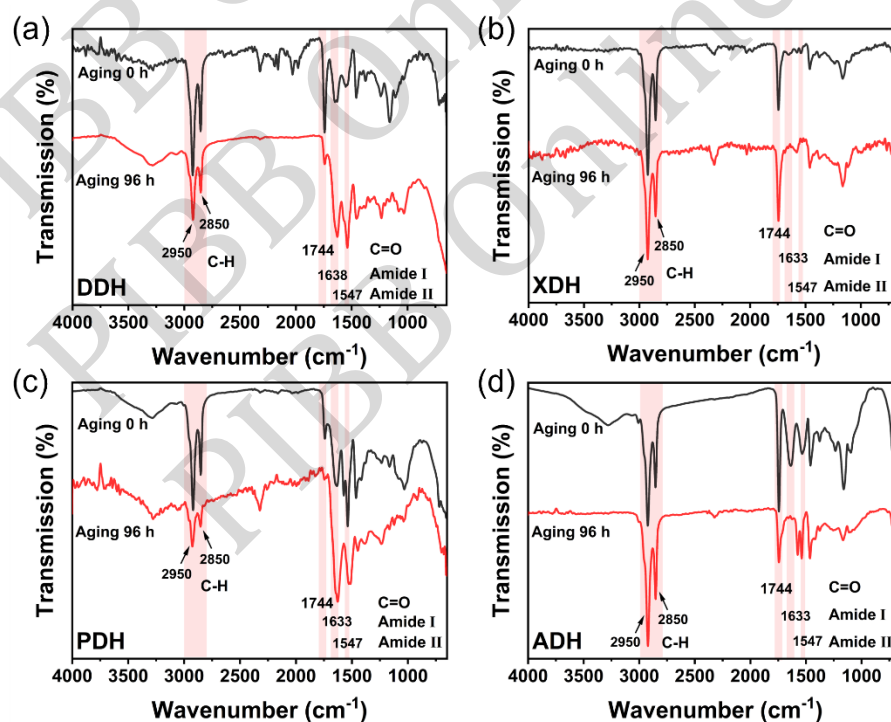


Fig. 3 FTIR spectra of donkey hides before and after microbial aging

(a - d) FTIR spectra of DDH, XDH, PDH, and ADH at 0 and 96 h of microbial aging, respectively.

48 h后,水分含量达到65.1%~68.9%,这是由于驴皮在生理盐水中会持续吸收环境中的水分。值得注意的是,ADH在老化至96 h后的水分含量(86.4%)较48 h仍有明显上升,这可能源于其三维网络结构已严重受损,从而引发了进一步的吸水溶胀。此外,驴皮的初始油脂含量为6%~12%,老化后4种驴皮油脂含量均有一定程度的降低(图4b),表明油脂被微生物消耗利用。其中,ADH油脂几乎被全部消耗,老化96 h后未测出油脂成分。动物皮中不仅含有水分、油脂等物质,还含有胶原蛋白和糖类物质。其中,动物皮中的糖类常与蛋白质结合形成蛋白质-多糖复合物^[32]。进一步地,测试了老化溶液中可溶性总糖的含量。随着老化时间的延长,老化液中可溶性总糖含量也逐渐增加,其中PDH增加最为明显,96 h时达到了0.52 g/L(图4c)。这表明在微生物的作用下,驴皮中的蛋白质-多糖复合物发生降解,导致糖类被释放并溶入老化液中。

基于驴皮N含量测定结果,计算出其初始蛋白质含量约占干皮重量90%,其中DDH蛋白质含量最高达到93.9%(图4d)。在微生物老化过程中,4

种驴皮的蛋白质含量均出现下降,但降解程度存在差异。ADH的损失最为严重,老化96 h后仅剩下24%左右,而DDH的蛋白质保存最为完好,仍高达91.4%。羟脯氨酸是胶原蛋白的特征氨基酸^[33-34]。在胶原蛋白三螺旋结构中,羟脯氨酸通过其羟基形成额外的氢键网络,对维持胶原蛋白的结构至关重要^[35]。引起驴皮腐败的微生物(如假单胞菌、拟杆菌等)能够分泌一系列细胞外蛋白酶和肽酶,这些酶能特异性切割胶原蛋白的三螺旋结构,将其逐步水解为可溶性的多肽和游离氨基酸,从而导致羟脯氨酸在老化液中积累。4种驴皮老化液在48 h的羟脯氨酸含量的差异不大,约为5~10 mg/L(图4e)。当时间延长至96 h时,XDH和ADH则增加至48 h的92倍和168倍。可见,检测老化溶液中的羟脯氨酸含量可以反映胶原蛋白的腐败变质程度。此外,在老化过程中,4种驴皮老化液的pH值均升高至碱性,这可能是因为微生物利用氮源营养,将皮胶原分解为胺类物质或氨基酸释放出 NH_4^+ 等^[36],使得pH值上升(图4f)。以上结果表明,驴皮的地域性差异显著影响了其在微生物老化过程中的降解路径与程度。这可能是不同来源

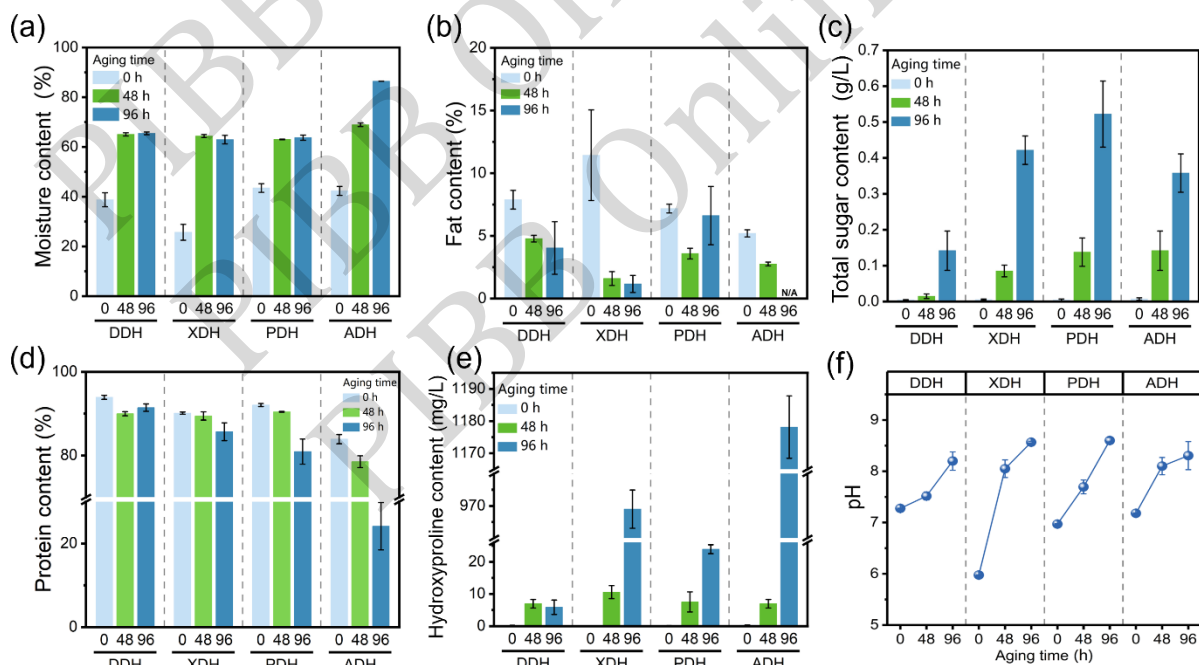


Fig. 4 Effects of microbial aging process on the chemical constituents of different donkey hides

(a, b) Moisture and fat content of hides at different microbial aging time, respectively. (c) Total sugar content of hides aging solutions at different microbial aging time. (d) Protein content of hides at different microbial aging times. (e) Hydroxyproline content in hides aging solutions at different microbial aging time. (f) The change in pH value in hides aging solutions at different microbial aging time.

驴皮的初始化学组成与微生物群落存在显著地域性差异, 导致微生物群落可利用的主要营养物质及代谢路径产生偏好性, 最终表现为差异化的降解模式与程度。

2.3 菌落总数

动物皮腐败变质的主要原因是微生物分泌的各种胞外酶降解胶原蛋白与脂质, 破坏三维结构^[37]。因此, 进一步监测了菌落总数随时间的变化规律, 如图5a所示。在本研究的加速老化体系中, 驴皮是微生物生长的唯一营养来源。测定老化液中的微生物数量变化, 能够有效地反映驴皮-老化液整个体系中微生物活性的总体水平。通过测定老化液, 是一种可靠且可重复的间接监测手段, 已被广泛应用于类似生物降解过程的研究中^[38]。微生物老化前, DDH的菌落总数较高, 约为 5×10^5 CFU/g。微生物老化48 h后, 驴皮老化液中的菌落总数均迅速增加超过4个数量级, 分别达到 6.8×10^9 CFU/g、 1.1×10^{10} CFU/g、 8.2×10^9 CFU/g和 6.0×10^9 CFU/g。96 h后, XDH、PDH和ADH老化液中菌落总数有一定程度的降低, 这可能是营养物质消耗殆尽, 有毒代谢产物不断积累的结果。总体而言, 微生物老化过程中菌落总数增加数量: ADH > PDH > XDH > DDH。

2.4 驴皮微生物多样性分析

2.4.1 驴皮微生物群落结构变化

高通量测序技术是当前解析微生物多样性的常用手段之一。黄怡等^[14]采用该技术对窖泥微生物群落进行分析, 发现其中细菌群落的丰富度与多样性均显著高于真菌, 并鉴定出15个优势细菌属。在驴皮加速老化实验中, PCA分析发现, 不同地区驴皮样品呈现出明显的组间分离与组内聚集模式, 表明地域来源是导致驴皮微生物群落组成差异的主要因素(图5b)。此外, 老化前(0 h)4种驴皮样本和老化后(96 h)4种驴皮样本有明显的聚类现象。图5c、d中的维恩图显示, 4种驴皮老化前和老化后共有或独有的操作分类单元数量均发生变化, 这说明驴皮微生物在老化过程中, 其群落结构发生了演替。Chao1指数和Shannon指数分别衡量物种丰富度和物种多样性的常用指标^[14]。微生物老化后, DDH、PDH和ADH的chao1指数则出现明显下降(图5e)。这一差异可能源于老化过程中微生物对皮内营养物质(如蛋白质和脂质)的迅

速消耗, 促使具有蛋白水解能力的菌群等快速增殖成为优势类群, 竞争性抑制其他微生物的生长, 导致群落丰富度降低。与丰富度变化趋势不同, Shannon指数在微生物老化后均有一定程度的增加(图5f)。其原因可能在于, 老化过程作为一种强烈的环境筛选压力, 使部分耐受性微生物(如耐盐类群)得以富集。这些适应高盐环境的菌群在老化后大量生长, 提高了群落内物种分布的均匀性。

4种驴皮老化前后的微生物群落, 在门水平上的相对丰度均具有明显差异(图5g)。ADH、PDH和XDH老化后, 广古菌门(Euryarchaeota)的相对丰度分别从93.19%、97.73%和30.08%降低至0.79%、1.43%和0.02%。宏基因组学分析揭示该类群具有更加适应高盐高温环境特征^[39]。然而, 厚壁菌门(Bacillota)在ADH、PDH、和XDH中丰度大大增加, 由1.21%、0.74%和28.95%分别增加至92.75%、10.12%和68.99%。Moraga等^[40]研究发现该菌门能分泌活性很强的蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶等水解酶类。事实上, 厚壁菌门中的短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)不仅能利用胶原水解物作为碳源和氮源用于细胞生长繁殖, 还可将其用于碱性蛋白酶的生产^[41]。此外, PDH中的假单胞菌门(Pseudomonadota)的相对丰度从0.10%急剧上升至老化后的87.84%, 表明PDH的优势菌群已由广古菌门转变为假单胞菌门。PDH的假单胞菌门中相对丰度排名前三的属分别是*Modicisalibacter*、*Chromohalobacter*和*Lysobacter*, 其相对丰度分别为20.71%、9.62%和5.34%。事实上, 假单胞菌门具有多样的代谢功能, 可利用多种碳源进行生长^[42]。可见, 厚壁菌门和假单胞菌门微生物可能是导致这3种驴皮胶原蛋白降解流失的主要原因。值得注意的是, 与其他3种驴皮不同, DDH的优势菌群则由假单胞菌门演变为拟杆菌门(Bacteroidota), 后者的丰度从0.13%增加至44.22%。该菌门能够通过VI型分泌系统抑制其他微生物, 以获得生态竞争优势^[43]。可见, 优势菌群的更替, 尤其是拟杆菌门微生物的显著富集, 可能是减缓DDH腐败的主要原因之一。DDH所表现出的独特微生物演替和更好的结构稳定性, 很可能是其固有的理化特性与微生物群落之间综合作用的结果。

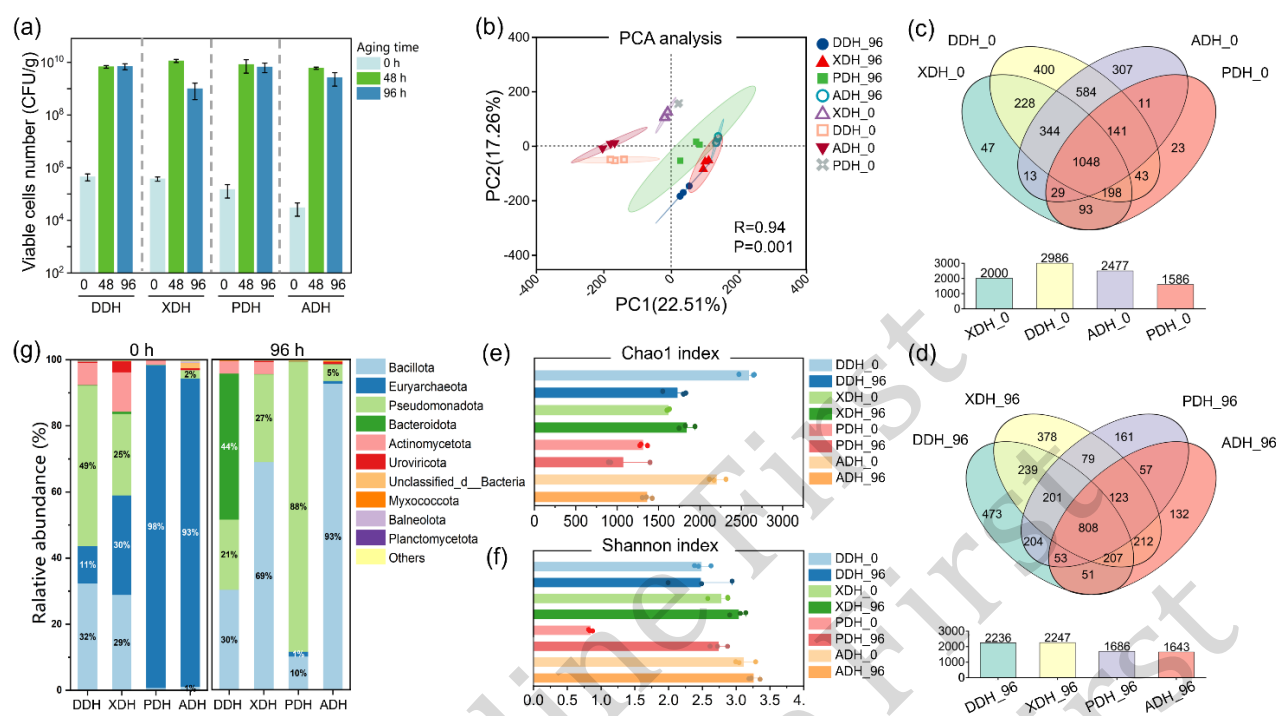


Fig. 5 Effects of microbial aging process on the composition of microbial communities of the donkey hides

(a) The total number of microorganism colonies during the aging process. (b) Principal component analysis of microbial communities on hides at microbial aging 0 h and 96 h. (c, d) Venn assay shows the changes of mutual operational taxonomic units from microbial community on hides in aging process. (e, f) Chao1 and Shannon indexes of microorganism of hides at microbial aging 0 h and 96 h, respectively. (g) The relative abundance of microorganisms at phylum level in donkey hides at microbial aging 0 h and 96 h. DDH/XDH/PDH/ADH_0 and DDH/XDH/PDH/ADH_96 represent 4 types of donkey hides after 0 h and 96 h of microbial aging, respectively.

2.4.2 驴皮微生物群落KEGG功能注释分析

基于KEGG数据库的功能注释分析,发现DDH_0涉及环境信息处理(environmental information processing)、遗传信息处理(genetic information processing)和细胞过程(cellular processes)相关通路基因的相对丰度高于另外3种驴皮(图6a)。而XDH_96、PDH_96和ADH_96相关通路的丰度明显增加,并高于DDH_96。这表明环境和遗传因素可能是驱动驴皮老化过程中微生物的群落演变的主要动力。为深入解析微生物群落代谢的差异性,进一步比较了其脂质与关键氨基酸的代谢功能。在老化后,4种驴皮微生物的脂质代谢功能均发生了明显改变(图6b),这表明脂质是微生物代谢利用的营养物质之一。ADH_0和ADH_

96中涉及脂肪酸合成(fatty acid biosynthesis)通路基因的相对丰度低于其他驴皮。可见,在老化过程中ADH的脂质消耗最彻底,此结果与脂质成分测定结果相符。胶原蛋白富含甘氨酸、脯氨酸和丙氨酸^[44]。因此,对比了DDH和ADH在老化前后的氨基酸代谢通路(图6c, d)。在甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢(glycine, serine and threonine metabolism),以及氨基酸的生物合成(biosynthesis of amino acids)等关键通路上,两者的基因相对丰度存在显著差异,说明DDH和ADH的微生物群落具有不同的氨基酸代谢模式。这进一步表明,不同地区驴皮微生物在老化过程中,降解和利用胶原蛋白的方式具有特异性。

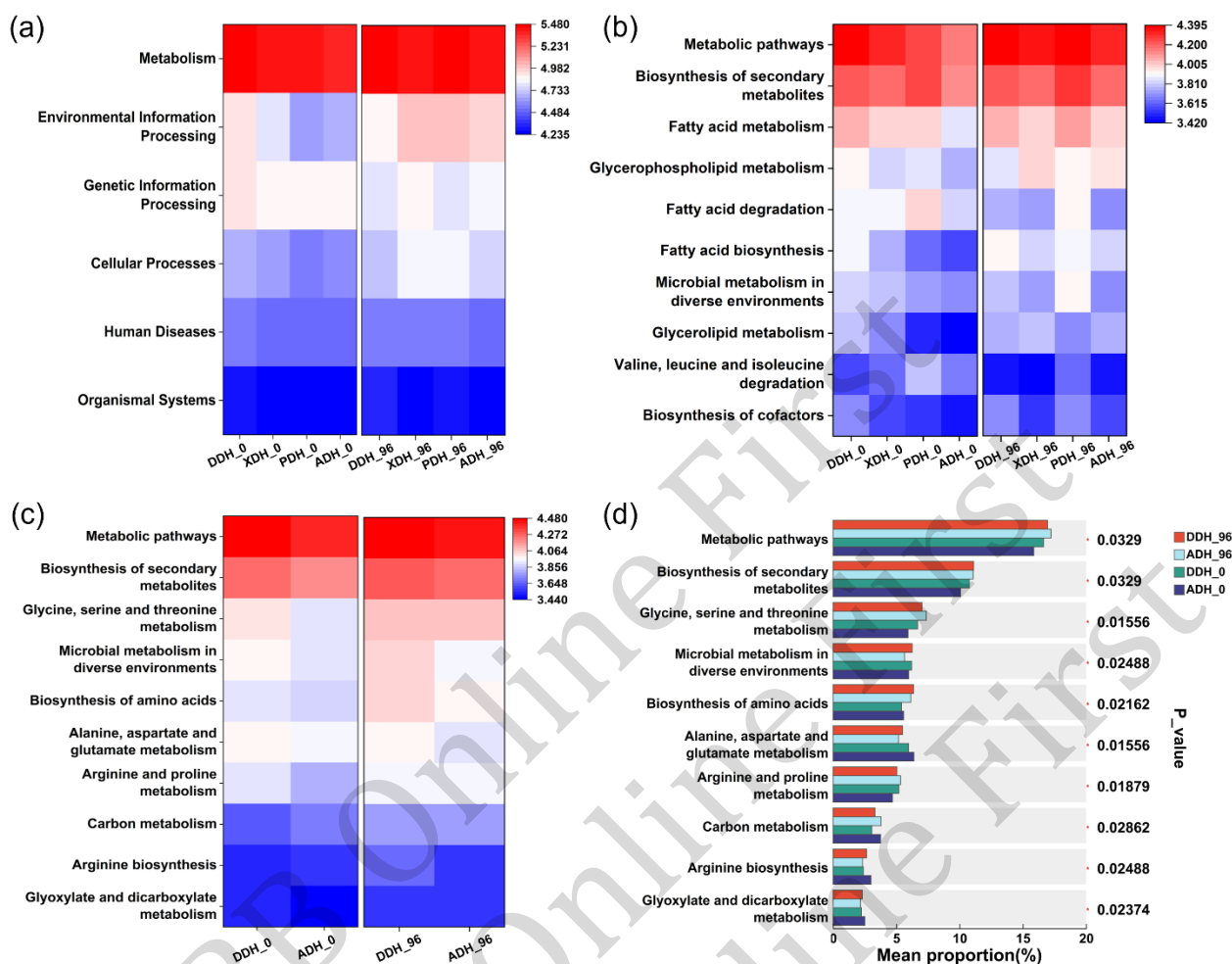


Fig. 6 KEGG function annotation analysis of microorganisms on the donkey hides

(a) KEGG primary function annotation analysis of DDH, XDH, PDH, and ADH at microbial aging 0 h and 96 h. (b) Lipid metabolic function of DDH, XDH, PDH, and ADH at microbial aging 0 h and 96 h. (c) Heatmap illustrating the genes abundance of related to glycine, proline and alanine metabolic pathway of DDH and ADH at microbial aging 0 h and 96 h. (d) Glycine, proline and alanine metabolic pathway differences of DDH and ADH at microbial aging 0 h and 96 h. DDH/XDH/PDH/ADH_0 and DDH/XDH/PDH/ADH_96 represent 4 types of donkey hides after 0 h and 96 h of microbial aging, respectively.

3 结论

在老化过程中, 不同来源驴皮的胶原纤维降解程度存在明显差异, ADH胶原结构更容易受到微生物破坏, 而DDH则较好地保持胶原纤维结构, 显示出优良的抗老化性能。油脂与蛋白质是微生物生长繁殖的主要营养物质。厚壁菌门和假单胞菌门可能是加剧驴皮腐败变质的关键因素, 而拟杆菌门微生物的富集可能缓解驴皮的腐败。此外, 不同来源驴皮微生物降解和利用胶原蛋白的方式具有特异性。因此, 不同地区驴皮在微生物老化过程中, 存在差异化的结构降解与营养利用模式。值得注意的

是, 驴皮的腐败变质与其特定微生物群落的演替密切相关, 而环境和遗传因素可能是驱动驴皮腐败过程中微生物群落演变的主要动力。本研究从微生物群落结构-功能关系的角度, 阐明了不同来源驴皮在老化过程中腐败差异的机制, 为建立基于区域特征的差异化防腐策略、定向调控环境因子以抑制有害菌群, 提供了关键的理论依据。

参考文献

- [1] Ugbede A S, Abioye O P, Aransiola S A, *et al.* Production, optimization and partial purification of bacterial and fungal proteases for animal skin dehairing: a sustainable development in

- leather-making process. *Bioresour Technol Rep*, 2023, **24**: 101632
- [2] 高孝忠. 猪蓝湿革加工过程中的常见问题与解决方法. *北京皮革*, 2021, **46**(6): 54
- Gao X Z. *Beijing Leather*, 2021, **46**(6): 54
- [3] 徐秀珍, 曾运航, 田永强, 等. 盐腌皮表面菌群变化及其对原皮保藏的影响. *皮革科学与工程*, 2022, **32**(2): 1-7
- Xu X Z, Zeng Y H, Tian Y Q, *et al.* *Leather Sci Eng*, 2022, **32**(2): 1-7
- [4] Uhm C, Jeong H, Lee S H, *et al.* Comparison of structural characteristics and molecular markers of rabbit skin, pig skin, and reconstructed human epidermis for an *ex vivo* human skin model. *Toxicol Res*, 2023, **39**(3): 477-484
- [5] Matinong A M E, Chisti Y, Pickering K L, *et al.* Collagen extraction from animal skin. *Biology*, 2022, **11**(6): 905
- [6] 汪徽, 王梦园, 余跃, 等. 盐湿驴皮的存储稳定性研究. *中国皮革*, 2024, **53**(12): 1-6
- Wang H, Wang M Y, Yu Y, *et al.* *China Leather*, 2024, **53**(12): 1-6
- [7] 向诚, 郭晶磊. 皮胶类药物在中医应用中的历史演变. *中医药文化*, 2020, **15**(5): 46-58
- Xiang C, Guo J L. *Chin Med Cult*, 2020, **15**(5): 46-58
- [8] Wu H, Ren C, Yang F, *et al.* Extraction and identification of collagen-derived peptides with hematopoietic activity from *Colla Corii Asini*. *J Ethnopharmacol*, 2016, **182**: 129-136
- [9] Palit K, Rath S, Chatterjee S, *et al.* Microbial diversity and ecological interactions of microorganisms in the mangrove ecosystem: Threats, vulnerability, and adaptations. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2022, **29**(22): 32467-32512
- [10] Zhang L, Chen F, Zeng Z, *et al.* Advances in metagenomics and its application in environmental microorganisms. *Front Microbiol*, 2021, **12**: 766364
- [11] 赵丹丹, 陈明辉. 制革中微生物对革的侵蚀及用新型的防腐剂进行控制. *皮革化工*, 1988, **3**: 41-50
- Zhao D D, Chen M H. *Leather Chem*, 1988, **3**: 41-50
- [12] Yang X, Liu Y, Liu Z, *et al.* Compositional analysis of archaeological leather and simulated leather and their degradation research based on HRMS. *Anal Methods*, 2025, **17**(30): 6190-6198
- [13] Orlita A. Microbial biodeterioration of leather and its control: a review. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2004, **53**(3): 157-163
- [14] 黄怡, 胡操正, 詹福安, 等. 基于 MiSeq 高通量测序和纯培养技术解析窖泥微生物多样性. *中国酿造*, 2025, **44**(8): 95-99
- Huang Y, Hu C Z, Zhan F A, *et al.* *China Brew*, 2025, **44**(8): 95-99
- [15] Reuter J A, Spacek D V, Snyder M P. High-throughput sequencing technologies. *Mol Cell*, 2015, **58**(4): 586-597
- [16] Baldrian P, Větrovský T, Lepinay C, *et al.* High-throughput sequencing view on the magnitude of global fungal diversity. *Fungal Divers*, 2022, **114**(1): 539-547
- [17] Reid C J, Farrell M, Kirby J K. Microbial communities in biosolids-amended soils: a critical review of high-throughput sequencing approaches. *J Environ Manag*, 2025, **375**: 124203
- [18] 胡玥, 王嘉莹, 余跃, 等. 不同鞣制方法对皮革轻飘感的影响. *皮革科学与工程*, 2022, **32**(1): 15-20
- Hu Y, Wang J Y, Yu Y, *et al.* *Leather Sci Eng*, 2022, **32**(1): 15-20
- [19] Liu X, Yuan Q, Yang Y, *et al.* Self-assembled Gallic acid-rare earth nano complexes against MRSA with multi-targeting antibacterial mechanisms robustly combating bacterial resistance. *Chem Eng J*, 2025, **510**: 161698
- [20] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB5009.3-2016 食品安全国家标准食品中水分的测定. 北京: 中国标准出版社, 2016
- National Health and Family Planning Commission of People's Republic of China. GB 5009.3-2016 National food safety standard-Determination of moisture in foods. Beijing: China Standards Press, 2016
- [21] 戴红, 徐歌德, 刘丹, 等. 皮革中二氯甲烷萃取物含量测定抽提装置的改进. *皮革科学与工程*, 2016, **26**(6): 38-42
- Dai H, Xu G D, Liu D, *et al.* *Leather Sci Eng*, 2016, **26**(6): 38-42
- [22] 刘雪, 杨金平, 周建永, 等. DNS法测定不同产地北沙参糖类含量. *山东中医药大学学报*, 2025, **49**(3): 360-368
- Liu X, Yang J P, Zhou J Y, *et al.* *J Shandong Univ Tradit Chin Med*, 2025, **49**(3): 360-368
- [23] Yang M, Li X, Wang B, *et al.* Collagen peptide protects *Saccharomyces cerevisiae* from furfural stress for enhancing bioethanol synthesis. *Collagen Leather*, 2025, **7**(1): 4
- [24] Xu M L, Gao Y, Han X X. Structure information analysis and relative content determination of protein and chitin from yellow mealworm larvae using Raman spectroscopy. *Int J Biol Macromol*, 2024, **272**: 132787
- [25] Li X, Cen N, Liu L, *et al.* Collagen peptide provides *saccharomyces cerevisiae* with robust stress tolerance for enhanced bioethanol production. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, **12**(48): 53879-53890
- [26] 庄进光, 庄哲. "东阿黑毛驴"产业纵深发展之路. *中国畜牧业*, 2018, **11**: 80-81
- Zhuang J G, Zhuang Z. *China Anim Ind*, 2018, **11**: 80-81
- [27] Xu S, Xiao H, Shi B. The improvement of dispersity, thermal stability and mechanical properties of collagen fibers by silane modification: an exploration for developing new leather making technology. *J Leather Sci Eng*, 2022, **4**(1): 26
- [28] Wang Q, Ran X, Wang J, *et al.* Elastic fiber-reinforced silk fibroin scaffold with a double-crosslinking network for human ear-shaped cartilage regeneration. *Adv Fiber Mater*, 2023, **5**(3): 1008-1024
- [29] Golea C M, Codină G G, Oroian M. Prediction of wheat flours composition using Fourier transform infrared spectrometry (FT-IR). *Food Control*, 2023, **143**: 109318
- [30] Wei W, He M, Ma J, *et al.* Biomineralized synthesis of luminescent protease- (NH₄)₂Y₃F₁₁•H₂O hybrid nanospheres and their applications as a stable and reusable enzyme reactor. *Collagen Leather*, 2024, **6**(1): 15
- [31] Kristoffersen K A, Måge I, Wubshet S G, *et al.* FTIR-based prediction of collagen content in hydrolyzed protein samples. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2023, **301**: 122919
- [32] 钟祥, 罗凤香, 张旭, 等. 典型牛皮中氨基多糖含量与分布及其在制革过程中的变化. *皮革科学与工程*, 2022, **32**(3): 48-53
- Zhong X, Luo F X, Zhang X, *et al.* *Leather Sci Eng*, 2022, **32**(3): 48-53

- 48-53
- [33] Li X, Liu X, Yang M, *et al.* Enhanced undecylprodigiosin production using collagen hydrolysate: a cost-effective and high-efficiency synthesis strategy. *J Mater Chem B*, 2025, **13**(5): 1653-1665
- [34] Li X, Li M, Guo J, *et al.* Collagen peptide provides *Streptomyces coelicolor* CGMCC 4.7172 with abundant precursors for enhancing undecylprodigiosin production. *J Leather Sci Eng*, 2021, **3**(1): 17
- [35] Li F, XinHuang, Wang R, *et al.* Collagen-based materials in male genitourinary diseases and tissue regeneration. *Collagen Leather*, 2024, **6**(1): 36
- [36] Wang Z, Tu J, Zhou H, *et al.* A comprehensive insight into the effects of microbial spoilage, myoglobin autoxidation, lipid oxidation, and protein oxidation on the discoloration of rabbit meat during retail display. *Meat Sci*, 2021, **172**: 108359
- [37] 张雨鑫, 王圳, 王亚楠. 材料生物降解性评价方法及其在皮革行业的应用进展. *皮革科学与工程*, 2023, **33**(6): 44-51
Zhang Y X, Wang Z, Wang Y N. *Leather Sci Eng*, 2023, **33**(6): 44-51
- [38] 张金伟. 青霉菌对无铬鞣皮粉的降解性研究. *实验科学与技术*, 2026, **24**(1): 1-6
- Zhang J W. *Exp Sci Technol*, 2026, **24**(1): 1-6
- [39] Baker B A, Gutiérrez-Preciado A, Rodríguez del Río Á, *et al.* Expanded phylogeny of extremely halophilic Archaea shows multiple independent adaptations to hypersaline environments. *Nat Microbiol*, 2024, **9**(4): 964-975
- [40] Moraga D, Latorre K, Muñoz-Torres P, *et al.* Diversity of culturable bacteria from endemic medicinal plants of the Highlands of the province of parinacota, Chile. *Biology*, 2023, **12** (7): 920
- [41] Li X, Zeng W C, Zhu D Y, *et al.* Investigation of collagen hydrolysate used as carbon and nitrogen source in the fermentation of *Bacillus pumilus*. *Process Biochem*, 2017, **55**: 11-16
- [42] Tian J, Hu J, Xiong Y, *et al.* Metagenomic and metabolomic insights into microalgal-bacterial symbiosis under low carbon-to-nitrogen ratios. *Bioresour Technol*, 2025, **434**: 132849
- [43] Xiong X, Wan W, Ding B, *et al.* Type VI secretion system drives bacterial diversity and functions in multispecies biofilms. *Microbiol Res*, 2024, **279**: 127570
- [44] Li P, Wu G. Roles of dietary glycine, proline, and hydroxyproline in collagen synthesis and animal growth. *Amino Acids*, 2018, **50** (1): 29-38

Effect of Microorganisms on The Spoilage of Donkey Hides from Different Regions*

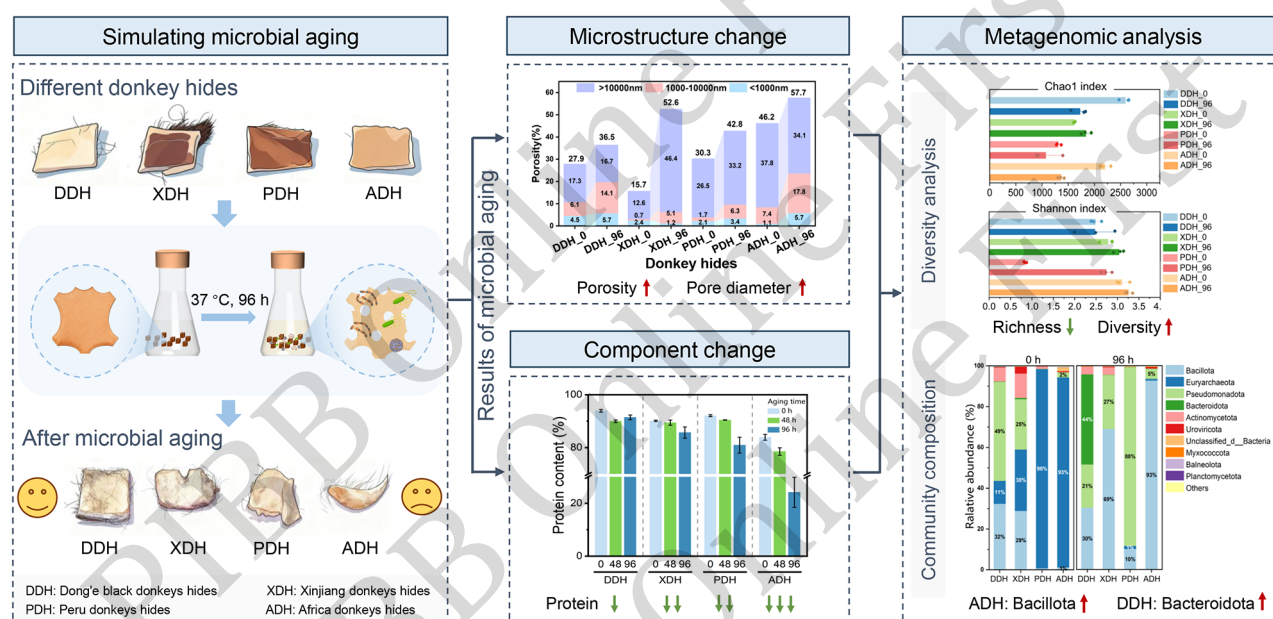
ZHANG Meng¹⁾, LI Qiu-Mei²⁾, KANG Jia-Wei²⁾, YU Jie^{2)**}, LI Xia^{1,3)**}, YU Yue^{1,3)}

¹⁾National Engineering Laboratory for Clean Technology of Leather Manufacture, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

²⁾Dong'e Ejiao Co., Ltd., Liaocheng 252201, China;

³⁾Key Laboratory of Leather Chemistry and Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Donkey hide is the sole legally designated raw material for the preparation of the traditional Chinese medicine Ejiao. The quality stability of donkey hide during preservation directly determines the efficacy and safety of Ejiao. This study focuses on the dynamic succession of microbial communities during the preservation of donkey hides from different origins, aiming to clarify the correlation between microbial biodiversity difference and the degradation profiles of hide collagen and critical biochemical components, thereby providing a theoretical foundation for developing targeted preservation strategies based on microbial regulation.

Methods Donkey hides originating from four different regions were subjected to an accelerated microbial aging assay to simulate the spoilage process. The microbial community succession was analyzed using high-throughput sequence. Microstructure changes and pore structure characteristics were assessed by scanning electron microscopy and mercury intrusion porosimetry, respectively. Additionally, the content of major components, including lipids, proteins, and sugars were determined by biochemical methods.

Results After 96 h of aging, the collagen fiber structure in Africa donkeys hides (ADH) exhibited significant degradation and collapse, followed by Xinjiang donkeys hides (XDH). Instead, the microstructure of Dong'e black donkeys hides (DDH) and Peru donkeys hides (PDH) remained relatively intact. The porosities of DDH, XDH, PDH, and ADH increased from 27.9%, 15.7%, 30.3%, and 46.2% to 36.5%, 52.6%, 42.8%, and 57.7%, respectively, during the aging process,

which suggested that the originally compact fiber structure was disrupted by microbial aging. Fourier transform infrared spectrometer analysis revealed the amide bands in XDH exhibited relatively weak intensity, and no collagen amide I band was observed in ADH. Meanwhile, the lipid and protein contents decreased in all four types of donkey hides, indicating these components served as the primary nutrient sources for the growth of microorganism. Notably, the most severe collagen degradation was observed in XDH and ADH. A substantial increase was detected in the total soluble sugar in PDH aging solution and hydroxyproline in the ADH aging solution, respectively. These results indicated that donkey hides exhibit distinct patterns of structural degradation and nutrient utilization. Furthermore, the viable cells number of donkey hides increased sharply after 48 h of aging. Metagenomic analysis revealed that the relative abundance of Euryarchaeota in ADH, PDH and XDH declining from initial 97.73%, 93.19% and 30.1% to 1.43%, 0.79% and 0.02% after 96 h, respectively. Conversely, a significantly increase was observed in the abundance of Firmicutes, with a marked increase in ADH, peaking at 92.75%. Additionally, the abundance of Pseudomonadota in PDH increased from 0.10% to 87.84%, suggesting that Bacillota and Pseudomonadota may be key factors exacerbating donkey hide spoilage. Unlike the other three types of donkey hides, the dominant bacterial phylum in DDH shifted from Pseudomonadota to Bacteroidota, characterized by a substantial abundance increase of Bacteroidota from 0.13% to 44.22%. **Conclusion** Regional variation in origin significantly influence the microbial aging of donkey hides, leading to distinct patterns of structural deterioration and differential nutrient utilization. Therefore, implementing origin-specific preservation strategies, through the precisely controlling environmental factors to suppress harmful phyla such as Bacillota, is crucial for enhancing the storage quality of donkey hides.

Key words donkey hide, spoilage, microorganism, aging, collagen, preservation, metagenomics

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0499

CSTR: 32369.14.pibb.20250499

* This work was supported by grants from the Fundamental Research Funds for the Central Universities and Shandong Taishan Industrial Leading Talent Program (tscx202408114).

** Corresponding author.

YU Jie. Tel: 86-18264506688, E-mail: yujie1@dongeejiao.com

LI Xia. Tel: 86-28-85402585, E-mail: sclixia@scu.edu.cn

Received: November 9, 2025 Accepted: December 22, 2025