

FORUM / 2019 / ROČ. IX / Č. 2

PRO KONZERVÁTORY-RESTAURÁTORY FORUM FOR CONSERVATORS-RESTORERS

2019 / Vol. IX / No. 2
Peer-reviewed open access journal

Chief editor: Ing. Alena Selucká
Editors: Mgr. Pavla Stöhrová, Mgr. Jana Fricová

Editorial Board:
Ing. Ivo Štěpánek (Head of Editorial board)
doc. Dr. Ing. Michal Ďurovič
Akad. mal. Igor Fogaš
Ing. Pavel Jirásek
Ing. Jan Josef
doc. Akad. sochař Petr Kuthan
prof. RNDr. Jiří Příhoda,
Ing. Radka Šefců
Mgr. Pavla Stöhrová (Secretary)

Open access since 2019 available for free
on <https://mck.technicalmuseum.cz/casopis-fkr/>
The journal is indexed and abstracted in EBSCO.

Published by:
Technické muzeum v Brně
Purkyňova 105, 612 00 Brno, Czech Republic

Contact for communication:
fricova@tmbrno.cz / stohrova@tmbrno.cz / selucka@tmbrno.cz

© Technické muzeum v Brně, 2019
ISSN (Online) 2571-4384
ISSN (Print) 1805-0050

 TECHNICKÉ
MUZEUM
V BRNĚ

 METODICKÉ
CENTRUM
KONZERVACE

PROTEINY V HISTORICKÝCH MALTÁCH – IDENTIFIKACE, KVANTIFIKACE A MOŽNOSTI DATOVÁNÍ

Štěpánka Kučková^{1,2} • Tatiana Smirnova^{1,2}

1 Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

2 Univerzita Karlova, Pedagogická fakulta

Doc. Ing. Mgr. Štěpánka Kučková, Ph.D., pracuje na Vysoké škole chemicko-technologické a Pedagogické fakultě Univerzity Karlovy, kde vyučuje zejména biochemii a analytickou chemii. Jejím hlavním vědeckým zaměřením je identifikace proteinových materiálů v uměleckých dílech, ale věnuje se i analýze proteinů v různých typech lidských tkání pomocí hmotnostní spektrometrických technik. (kuckovas@vscht.cz)

Bílkovinné materiály (např. mléko, vejce, klijy a tvaroh) se přidávaly do malt již od starověku, protože pozitivně ovlivňují jejich mechanické vlastnosti. Historické recepty se však až dodnes nedochovaly, protože se v rodinách mistrů stavitelů předávaly pouze ústně z otce na syna. Dnes se stavební průmysl i restaurátoři zajímají o tyto zapomenuté starodávne recepty, a chemici proto bojují s mnoha náročnými překážkami při jejich odhalování. V současné době můžeme použít techniky hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF a LC-MS/MS) i pro identifikaci neočekávaných bílkovinných materiálů obsažených v historických maltách. Pro odhad celkového množství přidávaných proteinových aditiv můžeme použít analytické metody včetně zmiňované hmotnostní spektrometrie a také různé imunochemické techniky.

Neměnnost počtu peptidů ve vzorcích modelových malt s přidávkou proteinových aditiv, které byly odebrány od prvního dne do čtvrtého roku po přípravě malty, byla potvrzena metodou LC-MS/MS a relativní kvantifikační metodou TOP3. Analýzou hlavních komponent, která byla aplikována na jiný typ vzorku (ale měla analogii s maltovými vzorky), bylo prokázáno, že je možné rozlišit různé časy stárnutí. Což by, alespoň teoreticky, mohlo být v určitých případech použito jako další způsob datování historických objektů.

Klíčová slova: historické malty; proteinová aditiva; hmotnostní spektrometrie; datování

PROTEINS IN HISTORICAL MORTARS – IDENTIFICATION, QUANTIFICATION AND DATING POSSIBILITY

Protein additives (e.g. milk, eggs, animal glue, and curd) have been added to mortars since ancient times because they positively influence their mechanical properties. However, historical recipes did not survive until today, because they were only orally inherited in the families of master-builders from father to son. Today, building industry and also restorers search for the forgotten ancient recipes and chemists struggle with many challenging obstacles in their revealing.

Nowadays we can use mass spectrometric techniques (MALDI-TOF and LC-MS/MS) for identification of even unexpected proteins in historical mortars. For the estimation of total amount of protein additives in mortars we can apply different analytical methods including mass spectrometry and immunochemical techniques. Immutability in number of peptides (after enzymatic cleaving by trypsin), in model mortar samples that were sampled from the first day to fourth year after the mortar preparation, was confirmed by LC-MS/MS and relative quantification method TOP3. By principle component analysis applied on another type of sample (but having an analogy to mortar samples) was proven that it is possible to distinguish between different times of ageing. This at least theoretically could be used as another way for object dating.

Key words: historical mortars; proteinaceous additives; mass spectrometry; dating

Již v dávných dobách stavitelé experimentovali s přidáváním organických materiálů do malt, protože věděli, že organické přísady (např. vejce, klijy, oleje, sláma) zlepšují její kvalitu [Pollio, 1953; Chandra, 1957]. Pro restaurátory je důležitá znalost přesného složení historických malt. Původní recepty na jejich přípravu byly ale ztraceny, a proto nám dnes chybí znalosti, jak bychom mohli připravit takové jedinečné stavební materiály, jaké se kdysi poměrně běžně používaly.

Identifikace proteinových přísad je komplikována jejich nízkým obsahem v maltě (obvykle nižším než 0,5 %) a také kvůli změnám struktury těchto organických materiálů, ke kterým dochází v průběhu času [Colombini, 1999]. Změny ve struktuře mohou být vyvolány vnějšími vlivy (vlhkostí, změnami teploty, krystalizací anorganických solí) i vnitřními vlivy (alkalickým pH, mikroorganismy atd.). Proteiny v maltách nejčastěji podléhají hydrolyze, oxidaci, redukci, deaminaci nebo racemizaci. Přesto přesné procesy degradace bílkovin v maltách dosud nebyly dostatečně popsány, i když identifikace produktů rozkladu bílkovin vzniklých během procesu stárnutí by značně usnadnila určení původních přísad.

Mezi hlavní vlivy způsobující degradaci bílkovin uvnitř malty patří vysoké pH, které je způsobeno přítomností silně alkalického hydroxidu vápenatého, jež se používá jako pojivo ve vápenných maltách. Vysoké pH těchto malt, které je v maltě hned od počátku jejich přípravy, má za následek alkalickou hydrolyzu. Během tohoto procesu se z proteinového řetězce odštěpují jednotlivé aminokyseliny nebo krátké peptidy o délce dvou až pěti aminokyselin. Navíc mohou být například odštěpeny z postranních řetězců glykoproteinů sacharidové zbytky anebo z fosforylovaných aminokyselin fosfátové skupiny.

Proteiny mohou být v maltách také modifikovány, a to nejčastěji oxidací, jelikož kyslík je během sušení malty přirozeně začleněn do struktury proteinů. Kromě toho vysoké pH zvyšuje rychlost oxidace [Manning, 2010]. Oxidovaný může být jak hlavní proteinový řetězec, tak i postranní řetězec aminokyselin. Nejsnadněji jsou oxidované postranní řetězce aminokyselin, které obsahují atomy síry (cystein a methionin) a aminokyseliny s aromatickými vedlejšími řetězci (tyrosin a tryptofan). Proteiny jsou během stárnutí malt také často neenzymaticky deamidovány. Tato modifikace byla dokonce detekována jako hlavní modifikace mléčných a kolagenních proteinů v některých uměleckých objektech [Leo, 2011]. Aminokyseliny, které se nejsnáze deamidují, jsou asparagin a glutamin [Leo, 2011]. Při nízkých hodnotách pH dochází k deamidaci těchto aminokyselinových zbytků za tvorby aspartátu nebo glutamátu. Nicméně alkalické prostředí v maltě mění reakční mechanismus těchto dějů a v daných podmínkách tak mohou vznikat intramolekulární cyklické produkty, jako je například sukcinimid [Manning, 2010]. Zejména při alkalickém pH se asparagin podrobuje deamidaci mnohem rychleji než glutamin [De Boni, 2004], což z glutaminu dělá vhodnější specifický marker pro určení stáří malty [Leo, 2011; Bischoff, 1984].

Vedle těchto aminokyselin dochází také k přeměně argininu na ornithin, respektive na 3-amino-2-piperidin [Murray, 1965].

Pro analýzu bílkovin v historických maltách se obvykle používá hned několik metod. Velmi často se používají chromatografické techniky, jako je kapalinová chromatografie [Kurugol, 2012] nebo plynová chromatografie [Sýkorová, 2011]. Plynová chromatografie a pyrolyzní plynová chromatografie se používají hlavně pro analýzu aditiv, která kromě bílkovin obsahují i velké množství mastných kyselin, jako jsou například vejce [Halpine, 1992]. V současné době se ale nejčastěji používá plynová nebo kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí, protože hmotnostně spektrometrické metody jsou velmi přesné a citlivé, což umožňuje identifikovat proteinové přísady i při nízkých koncentracích [Chambery, 2009]. Díky tomu lze analyzovat i velmi malá množství malt odebraných z historických objektů [Křížková, 2014; Kučková, 2009 a, Kučková, 2009 b; Rao, 2015].

Jiným způsobem, jak je možné alespoň detekovat organické přísady v maltách, je použití Ramanovy nebo infračervené spektroskopie (FTIR, infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací). Tyto metody se ale pro analýzu organických sloučenin v maltách používají jen velmi zřídka kvůli nízké kvalitě získaných spekter, kdy vibrační projevy organických látek jsou překryty signálem anorganických látek [Rao, 2015; Sarmiento, 2011; Singh, 2014]. Ve forenzní analýze a archeologii jsou pak testovány slibné imunochemické techniky jako ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) [Palmieri, 2011], CIEP (Crossover Immuno-Electrophoresis) [Seeman, 2008; Yohe, 2013] nebo RIA (Radio Immuno Assay). Tyto metody jsou založeny na interakci protilátka/antigen, a proto vykazují vysokou specifickou citlivost. Nejsou však běžně používány pro analýzy malt především kvůli jejich vysokým finančním nákladům a někdy i ne zcela spolehlivým výsledkům [Nigra, 2015]. V této práci byly k identifikaci proteinových aditiv v modelových vzorcích malt i historickém vzorku a k určení, jestli se v maltách mění obsah přidaných proteinů, použity dvě hmotnostně spektrometrické techniky – kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-ESI-Q-TOF, liquid chromatography coupled with electrospray ionization-quadrupole-time of flight-mass spectrometry) a hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF, mass spectrometry, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight). Zjištění, zda dochází ke změně v obsahu proteinů v maltách, by se za určitých podmínek mohlo využít k datování historických objektů a také k určení původního množství přidávaných aditiv do malt.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Výsledky získané hmotnostní spektrometrií LC-MS/MS a MALDI-TOF byly zpracované relativní kvantifikační metodou TOP3 a vícerozměrnou statistickou metodou analýzy hlavních komponent (PCA, Principal Component Analysis).

Příprava barevné vrstvy obsahující želatinu a kadmiovou žlut

Barevná vrstva byla připravena (v rámci jiného projektu) smícháním 10 g rozpuštěné želatiny (40 g želatiny Fluka bylo rozpuštěno ve 400 ml horké vody) s 0,1 g kadmiové žlutě a pak byla ponechána volně vyschnout bez vystavení přímému světlu. Směs byla natřena na mikroskopické sklíčko a ponechána asi dva týdny uměle stárnout v klimatické komoře za následujících podmínek: teplota 30 °C, relativní vlhkost (RH) 60 %, UV záření 290–400 nm s výkonem 45 W/m². Vzorky byly pro MALDI-TOF analýzu odebírány po 100, 500 a 800 hodinách stárnutí.

Příprava referenčních vzorků malt

K výrobě modelových malt byla připravena směs z písku (0/4) a vápenné kaše (50 % hašeného vápna a 50 % vody) v poměru 4 : 1 (m/m). Celková maltová směs se skládala ze 2 kg písku a 520 g vápenné kaše. Tato směs byla rozdělena do pěti dílů, na pět zkušebních těles. Jedno těleso bylo připraveno bez aditiva jako tzv. blank. Do každého ze zbývajících čtyř dílů bylo přidáno vypočítané množství aditiva a individuální množství vody, aby vytvarované zkušební těleso mělo požadovanou konzistenci a obsah proteinového aditiva ve směsi byl 0,5 % (Tab. 1).

Zkušební tělesa byla ponechána volně stárnout v interiérových podmínkách a vzorky z nich byly odebírány po 1, 30, 90 a 180 dnech a dále po 1, 3 a 4 letech.

Aditivum	Obsah proteinů v aditivu (%)	Hmotnost aditiva v maltě (g)	Celková hmotnost maltové směsi (g)
klih	100	2,0	446
mléko	3	64,5	459
vejce	12	16,2	447

Tab. 1. Složení jednotlivých modelových vzorků malt / Composition of individual model mortar samples

Historický vzorek

Ve článku byl analyzován reálný vzorek středověké malty ze 14. stol. z Tensta Kyrka ve Švédsku.

Štěpení vzorků

Ke každému vzorku malty, ze kterého byly odstraněny drobné kamínky, o hmotnosti přibližně 20 mg bylo přidáno 20 µl zásobního roztoku enzymu trypsinu. Tento roztok obsahoval 2 µl trypsinu o koncentraci 1 µg/µl a 100 µl 50 mM hydrogenuhličitanu amonného. Štěpení probíhalo po dobu dvou hodin za laboratorních podmínek. Takto připravené vzorky byly analyzovány buď metodou MALDI-TOF MS, nebo LC-MS/MS.

Měření pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Prvním krokem byla příprava matrice, která vznikla rozpuštěním 8–9 mg 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny ve 100 µl acetonitrilu, 250 µl 0,2% kyseliny trifluoroctové a 100 µl vody. 16 µl takto připravené matrice bylo smícháno s 8 µl analyzovaného vzorku a vzniklá směs byla nanášena na ocelovou měřicí desku v alespoň trojích opakováních a nechána vykristalizovat. Poté byla deska vložena do hmotnostního spektrometru MALDI-TOF/TOF (Autoflex Speed, Bruker Daltonics, Německo). Měření probíhalo v pozitivním reflektorovém módu a mez detekce pro jednotlivé vzorky byla 900–2000 Da. Spektra získaná z minimálně 3000 snímků byla následně sumarizována do jednoho výsledného spektra.

Měření pomocí LC-MS/MS

Měření všech vzorků proběhlo na UHPLC Dionex Ultimate3000 RSLC nano (Dionex, Německo), který byl spojen s hmotnostním spektrometrem ESI-Q-TOF Maxis Impact (Bruker Daltonics, Německo). Měření probíhalo s výběrem prekurzoru v rozsahu 400–2200 m/z. Získaná data z hmotnostního spektrometru byla extrahována programem Data Analysis 4.1. (Bruker Daltonics, Německo). Identifikace proteinů probíhala pomocí softwaru Mascot, verze 2.4.01 (Matrix Science, Velká Británie). Sekvence získaných proteinů byly vždy porovnávány se sekvencemi obsaženými v databázi Uniprot s těmito parametry: variabilní modifikace u oxidovaného methioninu a cysteinu a fixní modifikace u acetamidovaného cysteinu. Přesnost měření byla 10 ppm a MS/MS přiřazení hmotností peptidových štěpů probíhalo s přesností 0,05 Da.

Vyhodnocení dat pomocí PCA

Vyhodnocení naměřených spekter pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie bylo provedeno pomocí softwaru mMass a analýzy hlavních komponent (PCA) s využitím matematického software R a skriptem multiMS-toolbox [http://uprt.vscht.cz/ms/]. Jednotlivá aditiva byla analyzována zvlášť. Informace z hmotnostních spekter byly extrahovány do souborů „peaklist“ a „spectrum“, které byly vytvořeny pomocí ms-alone. Následovala normalizace dat v software multiMS-toolbox, aby mohlo dojít k sumarizaci všech přiřazených piků na stejnou hodnotu. Tento krok umožnil pozorování změn intenzit piků u jednotlivých vzorků.

Relativní kvantifikace TOP3

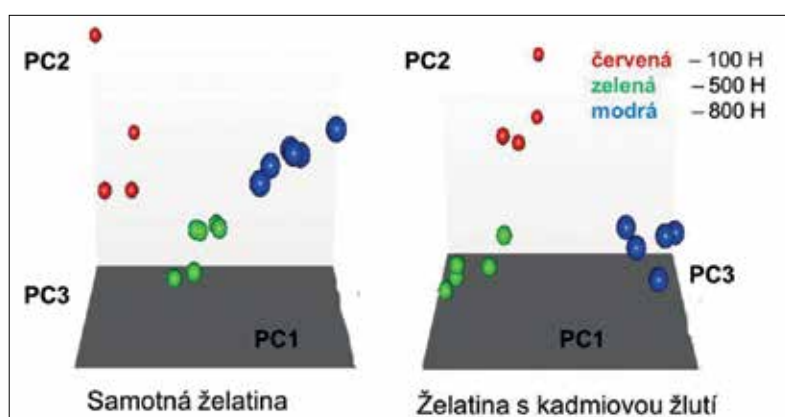
Tento způsob vyhodnocení výsledků získaných z LC-MS/MS se používá k relativnímu určení množství proteinů ve vzorcích. K vyhodnocení se využívá průměr ze tří nejintenzivnějších signálů peptidů pocházejících z konkrétního proteinu, který koreluje s množstvím bílkoviny obsažené ve vzorku.

Výsledky a diskuse

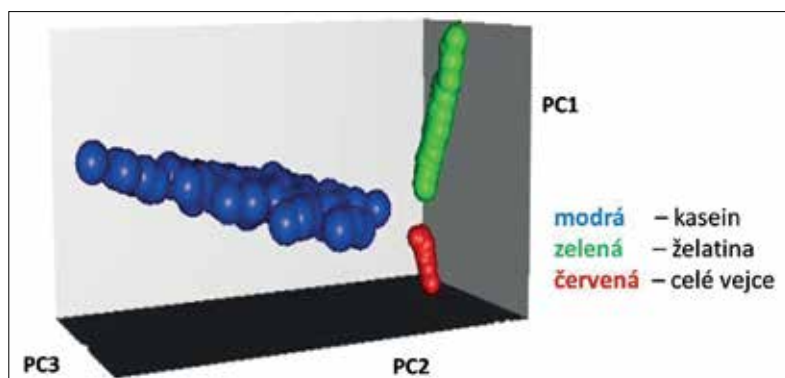
Podnětem pro vznik této práce bylo zjištění, že je možné rozlišit hmotnostní spektra modelových vzorků želatiny a želatiny smíchané s pigmenty, jako je například kadmiová žlutá, v závislosti na délce simulovaného stárnutí (Obr. 1), které bylo studováno v jiném projektu. K rozlišení spekter byla použita metoda analýzy hlavních komponent (PCA), která podobná spektra umísťuje v prostoru blízko sebe do skupin a rozdílná spektra vytváří odlehle skupiny. Takto je možné rozlišit například i proteinové materiály jako celovaječné, kaseinové nebo želatinové aditivum (Obr. 2). V případě rozlišení vzorků želatiny v závislosti na délce stárnutí je možné usuzovat, že rozdíly ve spektech mohou být způsobeny buď rozdílným počtem peptidových

štěpů, které mohou vznikat nekontrolovaným rozpadem proteinových řetězců, nebo výskytem rozdílných modifikací aminokyselin. U rozlišení proteinových materiálů jsou za rozdílná spektra, a tudíž i za vytvoření nepřekrývajících se skupin na obr. 2, zodpovědná různá proteinová složení jednotlivých materiálů.

V této práci jsme se zaměřili na studium změn, kterým podléhají proteiny obsažené ve vápenných maltách. V maltách, ve kterých je kvůli přítomnému vápnu vysoké pH, dochází k alkalické hydrolyze, kdy se proteinový řetězec přerušuje na zcela náhodných místech. Takto vzniklému štěpu se říká nespecifický peptid, jehož modelovou ukázkou se zápisem jeho sekvence aminokyselin jednopísmenným kódem můžeme vidět na obr. 3. Enzymovým štěpením pomocí trypsinu, který jsme použili k přípravě vzorků k analýze, vznikají ale tzv. specifické peptidy. Tyto peptidy vznikají vyštěpením aminokyselinové sekvence z původního proteinu tím, že na jednom konci je aminokyselina, která následovala buď za aminokyselinou lysinem nebo argininem a na jejím druhém konci je buď arginin a nebo lysin. Trypsin totiž specificky štěpí bílkoviny pouze za těmito dvěma aminokyselinami. Třetím případem jsou pak semi-specifické peptidy, které jsou štěpeny trypsinem pouze na jedné straně.



Obr. 1. Rozlišení modelových vzorků želatiny smíchané s kadmiovou žlutí a vystavené umělému stárnutí po dobu 100, 500 a 800 hodin / Resolution of model samples of gelatin mixed with cadmium yellow, which were exposed to artificial ageing for 100, 500 and 800 hours



Obr. 2. Rozlišení mezi celovaječným, kaseinovým a želatinovým aditivem pomocí analýzy hlavních komponentů / Distinction between whole egg, casein and gelatin additive using principal component analysis evaluation

Specifický peptid	R.GRTYK.A
Semispecifický peptid	K.GRTYA.A nebo D.GRTYR.A
Nespecifický peptid	G.GRTYA.A

Obr. 3. Ukázky specifického, semispecifického a nespecifického peptidu se sekvencemi zapsanými pomocí jednopísmenného aminokyselinového kódu. Červeně jsou označeny aminokyseliny lysin (K) a arginin (R), které štěpí trypsin / Specific, semispecific and nonspecific peptides with sequences written using a single letter amino acid code. The amino acids lysine (K) and arginine (R), after which trypsin cleaves, are labelled with red colour

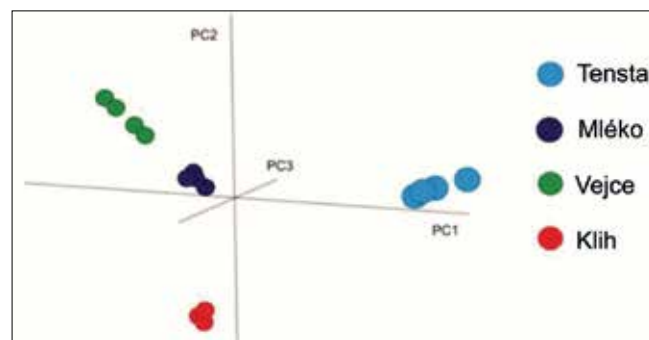
Modelové vzorky malt byly ponechány volnému stárnutí po dobu čtyř let, během nichž byly vzorkovány po 1, 30, 90 a 180 dnech a dále po 1, 3 a 4 letech. Vzorky byly analyzovány hmotnostní spektrometrií LC-MS/MS a byly v nich sledovány počty specifických a nespecifických peptidů z bílkovin, které pocházely z použitých proteinových přísad – klijhu, mléka a vejce (Tab. 2). Nespecifických peptidů bylo ve všech vzorcích řádově více než specifických, a to hlavně kvůli alkalické hydrolyze, která proběhla na začátku přípravy malty, ale dále (po 30–90 dnech stárnutí) už neměla výrazný vliv na počet nespecifických peptidů.

Aditivum	Klijh		Mléko		Vejce	
	specifické	nespecifické	specifické	nespecifické	specifické	nespecifické
Typ a počet peptidů						
Čas stárnutí						
1 den	3±11	11±8	2±0	13±5	5±2	72±9
30 dní	3±0	55±7	5±1	25±4	7±1	83±3
90 dní	34±5	131±9	16±2	47±3	5±2	45±22
180 dní	3±0	80±3	5±2	29±7	5±2	45±22
1 roky	1±0	20±3	3±1	19±10	3±1	86±6
2 roky	4±1	93±8	5±1	21±10	11±6	50±30
4 roky	12±1	94±5	4±0	24±1	9±3	70±2

Tab. 2. Počty specifických a nespecifických peptidů nalezené pro každé analyzované aditivum během čtyř let, po které byly ponechány malty volnému stárnutí / Numbers of specific and non-specific peptides found for each additive analyzed over four years, after which the mortars were left free aging

Aditivum	Klijh		Mléko	Vejce	
	kolagen 2-(I)	kolagen 2-(II)	ovalbumin	α-S1-kasein	κ-kasein
Protein					
Čas stárnutí					
1 den	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0
30 dní	1,1±0,1	1,1±0,0	1,0±0,0	0,9±0,1	1,1±0,1
90 dní	1,2±0,1	1,2±0,0	1,1±0,1	1,0±0,0	1,1±0,1
180 dní	1,1±0,0	1,1±0,0	1,1±0,1	1,1±0,1	1,1±0,1
1 roky	0,9±0,0	1,1±0,1	1,0±0,1	1,1±0,1	1,1±0,1
2 roky	1,0±0,2	---	1,1±0,1	1,2±0,0	1,1±0,2
4 roky	1,3±0,1	1,2±0,0	---	1,0±0,1	1,1±0,0

Tab. 3. Výsledky relativní kvantifikace u modelových malt s přidavkem klijhu, mléka a celého vejce. Ve dvou případech nebylo možné provést vyhodnocení, což je označeno --- / Results of relative quantification of model mortars with addition of glue, milk and whole egg. In two cases it was not possible to carry out an evaluation, which is indicated ---



Obr. 4. Porovnání středověké malty s modelovými maltami obsahující proteinová aditiva pomocí analýzy hlavních komponent / Comparison of medieval mortar to model mortars containing proteinaceous additives by principal component analysis

Dále nás zajímalo, jestli během stárnutí dochází ke změnám v obsahu proteinů v maltách. Za tímto účelem jsme na výsledky získané metodou LC-MS/MS použili relativní kvantifikační metodu TOP3. Ve výsledcích vzorků modelových malt jsme si pro každé aditivum zvolili nejčastěji se vyskytující proteiny. Pro klijh to byly kolagen 2-(I) a kolagen 2-(II), u mléka α-S1-kasein a κ-kasein a pro vejce ovalbumin (Tab. 3). První den po přípravě malty byl ustanoven jako základní stav (1,0±0,0), ke kterému se vztahují všechny další zjištěné hodnoty – proto relativní kvantifikace. Porovnáním všech naměřených hodnot bylo zjištěno, že se pohybují v rozmezí 0,9 až 1,2 s přesností ±0,2. Z toho vyplývá, že se obsah proteinů v aditivech během stárnutí nemění.

Název proteinu	Počet peptidů
α-S1-kasein (<i>Bos taurus</i>)	17
κ-kasein (<i>Bos taurus</i>)	12
β-kasein (<i>Bos taurus</i>)	9
α-S2-kasein (<i>Bos taurus</i>)	9
Keratin, typ I cytoskeletální	6
Laktadherin (<i>Bos taurus</i>)	4
Laktotransferin (<i>Bos taurus</i>)	3
β-laktoglobulin (<i>Bos taurus</i>)	3

Tab. 4. Výsledky proteinové analýzy historického vzorku ze 14. stol. z kostela ve švédské Tenstě. Keratin je kontaminující protein, který nepatří mezi nalezené mléčné proteiny / Protein analysis of the historical sample from 14th Century from a church in Tensta, Sweden. Keratin is a contaminating protein, which is not one of the found milk proteins

Dále jsme oběma hmotnostně spektrometrickými metodami (LC-MS/MS a MALDI-TOF) analyzovali historický vzorek středověké malty. Vzorek ze 14. stol. z kostela v Tenstě byl nejdříve naměřen metodou MALDI-TOF a pokusně vyhodnocen pomocí PCA, kdy byl porovnáván s modelovými maltami s přidavky proteinových aditiv, které byly čtyři roky staré (Obr. 4). Identifikace aditiva se ale v tomto případě nepodařila, protože historický vzorek nespadá ani do jedné skupiny modelových malt a stojí osamocněně opodál. Možnou příčinou mohou být rozdílné modifikace (např. oxidace) na aminokyselinách, které ovlivňují hmotnosti peptidů, a které následně významným způsobem mění hmotnostní spektra, se kterými PCA pracuje. Nebo se mění (hlavně zkracují) peptidové řetězce, které mají podobný dopad na hmotnostní spektra a tudíž i na grafický výsledek PCA. Vzorek byl dále zkoumán pomocí LC-MS/MS a byly v něm nalezeny různé mléčné proteiny o celkovém počtu 59 peptidů (Tab. 4).

ZÁVĚR

Studiem změn spojených se stárnutím proteinových materiálů by bylo možné upřesnit původní složení stavebních materiálů, v některých případech i odhadnout vznik historického objektu. Možnost datace historických objektů odvozujeme od výsledků získaných ze stárnutí malířských materiálů. U výsledků z želatiny smíchané s kadmiovou žlutí není zcela zřejmé, proč se vzorky (jejich hmotnostní spektra) vystavené po různé dlouhou dobu umělému stárnutí liší. Do úvahy připadají dvě vysvětlení: vzorky se liší počtem nespecifických peptidů, anebo se analyzované peptidy liší rozdílnými modifikacemi aminokyselin. Provedli jsme proto studii s modelovými vzorky vápenných malt s přísady proteinových aditiv a zaměřili jsme se na počty peptidů. Počty peptidů se ale po dozrání malt (po 30 až 90 dnech od jejich přípravy) výrazně neměnily, což indikuje ukončení štěpení proteinů alkalickou hydrolyzou. Dále jsme provedli relativní kvantifikaci množství proteinových aditiv v závislosti na stáří vzorků, a ani v tomto případě se výsledky statisticky nelišily od prvotního přidání proteinových aditiv do malt. Z toho vyplývá, že během stárnutí nedochází (alespoň v interiérových podmínkách) k výrazným ztrátám proteinových aditiv během času, ale pravděpodobně „jen“ k různým modifikacím aminokyselin, ze kterých jsou tvořeny proteiny. Toto je dobrá zpráva pro restaurátory a chemiky, protože je tak možné určit původní obsah proteinových materiálů, které byly původními staviteli přidávány do malt. Je možné tak původní receptury upřesnit jak co do konkrétního typu proteinového materiálu, tak i do jeho množství.

V historickém vzorku z Tensty se podařilo identifikovat mléčné aditivum pomocí LC-MS/MS, ale nebylo ho možné určit metodou MALDI-TOF na základě porovnání a analýzou hlavních komponentů. Nicméně porovnáním počtu nalezených peptidů ve vzorku a v modelové maltě, které pochází z mléčného aditiva a předpokladu, že počet peptidů se časem nemění, je možné říci, že celkový obsah mléčného aditiva v historické maltě byl od začátku vyšší než 0,5 %, protože celkově obsahoval více peptidů než naše čtyři roky staré modelové malty s přísadou mléka.

PODĚKOVÁNÍ

Autoři děkují grantu specifického vysokoškolského výzkumu (MSMT No 21-SVV/2019) z České republiky.

LITERATURA

- BISCHOFF, R. – KOLBE, H. V. J.: *Deamidation of asparagine and glutamine residues in proteins and peptides – structural determinants and analytical methodology*. Journal of Chromatography B, 1994, vol. 662, s. 261–278.
- CHANDRA, S. A. J.: *Influence of proteins on some properties of portland cement mortars*. The International Journal of Cement Composites and Lightweight Concrete, 1987, vol. 9.
- CHAMBERY, A. – DI MARO, A. – SANGES, C. – SEVERINO, V. – TARANTINO, M. – LAMBERTI, A. – PARENTE, A. – ARCARI, P.: *Improved procedure for protein binder analysis in mural painting by LC-ESI/Q-q-TOF mass spectrometry: detection of different milk species by casein proteotypic peptides*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009, vol. 395, s. 2281–2291.
- COLOMBINI, M. P. – MODUGNO, F. – GIACOMELLI, M. – FRANCESCONI, S.: *Characterisation of proteinaceous binders and drying oils in wall painting samples by gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1999, vol. 846, s. 113–124.
- DE BONI, S. – OBERTHUR, C. – HAMBURGER, M. – SCRIBA, G. K. E.: *Analysis of aspartyl peptide degradation products by high-performance liquid chromatography and high-performance liquid*

chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 2004, vol. 1022, s. 95–102.

- HALPINE, S. M.: *Amino acid analysis of proteinaceous media from Cosimo Turas The annunciation with Saint Francis and Saint Louis of Toulouse*. Studies in Conservation, 1992, vol. 37, s. 22–38.
- <http://uprt.vscht.cz/ms/> (21. 2. 2019)
- KUCKOVA, S. – CRHOVA, M. – VANKOVA, L. – HNZIDA, A. – HYNEK, R. – KODICEK, M.: *Towards proteomic analysis of milk proteins in historical building materials*. International Journal of Mass Spectrometry, 2009, vol. 284, s. 42–46. (a)
- KUCKOVA, S. – HYNEK, R. – KODICEK, M.: *Application of peptide mass mapping on proteins in historical mortars*. Journal of Cultural Heritage, 2009, vol. 10, s. 244–247. (b)
- KURUGOL, S. – GULEC, A.: *Physico-chemical, petrographic, and mechanical characteristics of lime mortars in historic yoros castle (Turkey)*. International Journal of Architectural Heritage, 2012, vol. 6, s. 322–341.
- KRIZKOVA, M. C. – KUCKOVA, S. – SANTRUCEK, J. – HYNEK, R.: *Peptide mass mapping as an effective tool for historical mortar analysis*. Construction and Building Materials, 2014, vol. 50, s. 219–225.
- LEO, G. – BONADUCE, I. – ANDREOTTI, A. – MARINO, G. – PUCCI, P. – COLOMBINI, M. P. – BIROLO, L.: *Deamidation at asparagine and glutamine as a major modification upon deterioration/aging of proteinaceous binders in mural paintings*. Analytical Chemistry, 2011, vol. 83, s. 2056–2064.
- NIGRA, B. T. – FAULL, K. F. – BARNARD, H.: *Analytical chemistry in archaeological research*. Analytical Chemistry, 2015, vol. 87, s. 3–18.
- MANNING, M. C. – CHOU, D. K. – MURPHY, B. M. – PAYNE, R. W. – KATAYMA, D. S.: *Stability of protein pharmaceuticals: An update*. Pharmaceutical Research, 2010, vol. 27, s. 544–575.
- MURRAY, K. – STRØIER RASMUSSEN, P. – NEUSTAEDTER, J. – MURRAY LUCK, J.: *The hydrolysis of arginine*. Journal of Biological Chemistry, 1965, vol. 240, s. 705–709.
- PALMIERI, M. – VAGNINI, M. – PITZURRA, L. – ROCCHI, P. – BRUNETTI, B. G. – SGAMELOTTI, A. – CARTECHINI, L.: *Development of an analytical protocol for a fast, sensitive and specific protein recognition in paintings by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, vol. 399, s. 3011–3023.
- POLLIO, M. V.: (1953) *Deset knih o architektuře*, 1. vydání. Státní nakladatelství krásné literatury, hudby a umění, Praha.
- RAO, H. Y. – LI, B. – YANG, Y. M. – MA, Q. L. – WANG, C. S.: *Proteomic identification of organic additives in the mortars of ancient Chinese wooden buildings*. Analytical Methods-UK, 2015, vol. 7, s. 143–149.
- SARMIENTO, A. – PEREZ-ALONSO, M. – OLIVARES, M. – CASTRO, K. – MARTINEZ-ARKARAZO, I. – FERNANDEZ, L. A. – MADARIAGA, J. M.: *Classification and identification of organic binding media in artworks by means of Fourier transform infrared spectroscopy and principal component analysis*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2011, vol. 399, s. 3601–3611.
- SEEMAN, M. F. – NILSSON, N. E. – SUMMERS, G. L. – MORRIS, L. L. – BARANS, P. J. – DOWD, E. – NEWMAN, M.: *Evaluating protein residues on Gainey phase Paleoindian stone tools*. Journal of Archaeological Science, 2008, vol. 35, s. 2742–2750.
- SINGH, M. – WAGHMARE, S. – KUMAR, S. V.: *Characterization of lime plasters used in 16th century Mughal monument*. Journal of Archaeological Science, 2014, vol. 42, s. 430–434.
- SYKOROVA, I. – HAVELCOVA, M. – ZEMAN, A. – TREJTNAROVA, H.: *Carbon air pollution reflected in deposits on chosen building materials of Prague Castle*. Science of the Total Environment, 2011, vol. 409, s. 4606–4611.
- YOHE, R. M. – BAMFORTH, D. B.: *Late Pleistocene protein residues from the Mahaffy cache, Colorado*. Journal of Archaeological Science, 2013, vol. 40, s. 2337–2343.