



基于多肽质谱检测的丝绸细菌劣化机理研究

泮林丹¹,陈浩¹,杨海亮²,王秉¹

(1.浙江理工大学材料科学与工程学院,杭州310018;2.中国丝绸博物馆,杭州310002)

摘要:为研究丝绸文物的微生物劣化降解机理,选取铜绿假单胞菌和嗜麦芽窄食单胞菌对丝织品进行模拟劣化,并通过扫描电子显微镜和傅里叶红外光谱分别观察了丝绸劣化后微观形貌和二级结构的变化,同时对丝绸的劣化降解液进行了基于蚕丝蛋白数据库匹配的多肽质谱检测,以揭示2种细菌对丝绸蛋白的降解机理。结果显示:丝绸纤维表面经劣化后发生了纵向剥离;2种细菌对丝绸纤维无定形区的降解程度比结晶域高;降解的丝绸蛋白绝大多数为重链和轻链以外的其他蛋白,且嗜麦芽窄食单胞菌对丝蛋白的整体破坏能力强于铜绿假单胞菌;将组成重链蛋白的氨基酸残基分成了Header、Linker、(GX)_n和C-ter 4个基序,对其进行降解分析,结果表明Header和Linker基序处的氨基酸残基相较于(GX)_n和C-ter基序更易断裂,细菌对Linker基序的破坏能力差异是影响重链蛋白降解效果的重要因素;丝蛋白链中无定形区的破坏会暴露丝蛋白大分子链上的微晶体嵌段,进一步加剧丝肽溶出,导致丝织品逐渐降解。该研究为探索古代丝绸的微生物劣化机理研究提供了一种新思路。

关键词:肽段;质谱分析;丝织品;嗜麦芽窄食单胞菌;铜绿假单胞菌;重链蛋白

中图分类号:TS141

文献标志码:A

文章编号:1673-3851(2023)07-0493-07

引文格式:泮林丹,陈浩,杨海亮,等.基于多肽质谱检测的丝绸细菌劣化机理研究[J].浙江理工大学学报(自然科学),2023,49(4):493-499.

Reference Format: PAN Lindan, CHEN Hao, YANG Hailiang, et al. Study on bacterial degradation of silk based on detection of peptide by mass spectrometry[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2023, 49(4): 493-499.

Study on bacterial degradation of silk based on detection of peptide by mass spectrometry

PAN Lindan¹, CHEN Hao¹, YANG Hailiang², WANG Bing¹

(1.School of Materials Science & Engineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 2.China National Silk Museum, Hangzhou 310002, China)

Abstract: In order to study the microbial degradation mechanism of silk cultural relics, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* were selected to simulate the degradation of silk fabrics, and the changes in the microscopic morphology and secondary structure of silk after degradation were observed by scanning electron microscopy and Fourier infrared spectroscopy. Meanwhile, the degradation solution of silk was detected by polypeptide mass spectrometry based on the matching of silk protein database to reveal the degradation mechanism of silk protein by two bacteria. The results show that the surface of silk fibers is axially peeled after deterioration. The degradation degree of the two bacteria in the amorphous region of silk fibers is higher than that in the crystalline region. Most of the degraded proteins are other proteins except heavy chain and light chain proteins, and the overall destructive ability of *Stenotrophomonas maltophilia* to silk filaments is stronger than that of *Pseudomonas aeruginosa*. The amino acid residues of the heavy chain protein were divided into four moieties, namely, Header, Linker,

收稿日期:2023-01-10 网络出版日期:2023-03-01

基金项目:国家重点研发计划(2019YFC1520300);国家自然科学基金项目(52273096);浙江省文物保护科技项目(2020012)

作者简介:泮林丹(1997-),女,浙江台州人,硕士研究生,主要从事文物保护方面的研究。

通信作者:王秉, E-mail: wbing388@168.com

(GX) n and C-ter, which were further analyzed for the degradation of the heavy chain protein. The results show that the amino acid residues in the Header and Linker moieties are more likely to be broken than those in the (GX) n and C-ter motifs, and the difference in the destruction ability of Linker moieties is a significant factor that affects the degradation effect of the heavy chain protein. The destruction of amorphous regions can lead to the exposure of micro-crystal blocks on the molecular chains of silk proteins and further accelerate the dissolution of silk peptides, resulting in gradual degradation of silk fabrics. This research provides a new insight into the mechanism of microbial degradation of ancient silk.

Key words: peptide fragments; mass spectrometry; silk fabrics; *Stenotrophomonas maltophilia*; *Pseudomonas aeruginosa*; heavy chain protein

0 引言

古代丝织品是古老中华文明的重要象征,承载了各个历史时期的政治、经济和文化信息^[1]。丝织品文物在长期埋藏的过程中遭受了不同程度的损坏,丢失了其蕴含的历史文化信息,破坏了其科学与文化价值^[2]。因此,关于古代丝织品的降解、修复和保存的研究是文物研究的焦点,其中有关丝织品劣化机理的研究是修复和保存工作的前提^[3]。

蚕丝纤维以氨基酸残基作为基本构建单元,是一种具有优异机械性能的蛋白质高聚物^[4-6]。天然蚕丝纤维主要由丝素蛋白和丝胶 2 种蛋白质组成,其中:丝素蛋白由 390 kDa 的重链和 26 kDa 的轻链组成,两者通过分子间二硫键连接形成复合物,该复合物通过疏水作用以 6:1 的比例结合糖蛋白(P25)形成一个胶束单元;丝胶则起到了胶水的作用,将两条丝素纤维固定在一起^[7-8]。因此,丝织品材料易受物理化学和生物等因素的劣化。关于物理化学因素的影响作用研究主要集中在酸^[9]、碱^[10]、光和热^[11]等,而有关生物因素的影响作用研究主要集中在生物酶的降解作用^[12-14]。目前,关于丝织品的劣化机理研究主要关注残留丝纤维结构和丝蛋白组成这两方面。丝纤维结构方面的研究,考察的主要对象是降解后残存丝蛋白大分子链通过分子间作用力形成的二级结构^[15]和特定重复的氨基酸序列形成的结晶域^[16];而丝蛋白组成方面的研究,考察对象主要是分子量和特征蛋白相对含量的变化^[17]。

近年来,高通量检测逐渐成为研究生物降解机理的重要技术之一,目前也被应用于丝织品文物的微生物劣化研究。Szulc 等^[18]使用高通量光照测序、表面辅助激光解吸/电离质谱对银纳米颗粒增强靶标(109 Ag SALDI)和激光消解-远程电喷雾电离-选择反应监测环境质谱成像(LARESI MSI),对 18 世纪古丝绸样品表面微生物及其代谢物的多样

性进行表征,阐明了生物体及其代谢物的空间关系。Brzozowska 等^[19]通过 16 S rRNA 测序,对约翰三世国王宫殿博物馆历史丝绸天鹅绒纺织品上的细菌多样性进行评估,发现保存程序和气流对微生物种群结构几乎没有影响。杨弢^[20]构建了 16 S rRNA 基因克隆文库,对徐州狮子山楚王陵墓葬的微生物菌落结构进行分析,发现嗜麦芽窄食单胞菌为腐蚀丝绸的主要微生物。

微生物对丝织品的劣化是多方面降解的综合效果,劣化过程中微生物分泌的有机酸和微生物蛋白酶均会对丝纤维产生破坏作用^[21]。Seves 等^[22]对土壤中的微生物进行分离后对丝织物进行生物降解,发现假单胞菌属对蚕丝蛋白有着广泛的降解能力。因此,本文选取土壤中常见的铜绿假单胞菌^[23]和嗜麦芽窄食单胞菌对丝织品进行劣化,以模拟古代丝织品的微生物退化过程;并对劣化后的丝绸样品进行了形貌表征和二级结构变化分析,同时对丝绸的细菌劣化液进行了基于蚕丝蛋白数据库匹配的多肽质谱检测,以评估细菌对丝绸文物的劣化作用,揭示丝绸的细菌降解机理。本文所采取的研究方法可为古代丝织品劣化机理研究提供新思路,研究结果可为丝织品的生物退化机制相关研究提供参考。

1 实验部分

1.1 实验材料和主要仪器设备

实验材料:现代丝绸购自杭州富丝工贸有限公司;葡萄糖($C_6H_{12}O_6$)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、磷酸氢二钾(K_2HPO_4)、硫酸铵($(NH_4)_2SO_4$)、硫酸镁($MgSO_4 \cdot H_2O$)、氯化钙($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)、硫酸亚铁($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)、硼酸(H_3BO_3)、氯化钴($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)、硫酸锌($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)、氯化锰($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)、钼酸钠($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$)、氯化镍($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)和氯化铜($CuCl_2 \cdot 2H_2O$)均购自美国阿拉丁工业公司;乙腈(ACN, 质谱级)购自美国赛默飞公

司;甲酸(FA,质谱级)、碳酸氢铵(质谱级)、二硫苏糖醇(DTT,分析纯)、碘乙酰胺(IAA,分析纯)均购自美国默克公司;嗜麦芽窄食单胞菌和铜绿假单胞菌购自北京百欧博伟生物技术公司。

实验仪器:FA2104型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司)、BPH-9042恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)、Sartorius BP211d分析天平(瑞士赛多利斯)、Gemini SEM 500型场发射扫描电子显微镜(德国卡尔蔡司)、Tensor 27型红外光谱仪(德国布鲁克)、Concentrator plus型真空离心浓缩仪(德国艾本德)、Microfuge 22R Centrifuge型低温高速离心机(美国贝克曼库尔特)、MX-S型涡旋仪(美国赛洛捷克)、Easy-nLC 1200型毛细管高效液相色谱仪(美国赛默飞)和Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer型电喷雾-组合型离子阱 Orbitrap 质谱仪(美国赛默飞)。

1.2 实验方法

1.2.1 丝织品细菌劣化实验

细菌培养基配制方法参考文献[24],具体如下:分别取3.00 g $C_6H_{12}O_6$ 、0.694 g KH_2PO_4 、0.854 g K_2HPO_4 、1.234 g $(NH_4)_2SO_4$ 、0.460 g $MgSO_4 \cdot H_2O$ 、0.176 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、0.001 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 和5 mL微量金属溶液,完全溶解于1 L纯水中,常规高压灭菌备用(121 °C, 20 min)。微量金属溶液的配方为:60 mg H_3BO_3 , 40 mg $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 20 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 6 mg $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 6 mg $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 4 mg $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 2 mg $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 和1 L H_2O 。

将嗜麦芽窄食单胞菌和铜绿假单胞菌接种于液体培养基中,置于37 °C恒温培养箱中培养18 h,获得细菌种子液。现代丝绸灭菌后用无菌水冲洗3遍以去除表面杂质,室温下晾干于超净台上,风干后裁剪成2 cm×5 cm的均匀碎片,并取同等数量的丝绸碎片放入装有50 mL无菌培养基的锥形瓶中;加入2种细菌种子液各50 μ L,用封口膜封住瓶口,在37 °C恒温培养箱中30 d。以无菌培养基中加入丝绸碎片作为对照组。

1.2.2 劣化丝绸样品和劣化液的收集

劣化结束后取出丝绸碎片,纯水冲洗6遍,并晾晒于超净台风干,得到嗜麦芽窄食单胞菌老化丝绸样和铜绿假单胞菌老化丝绸样;对照组中的丝绸碎片作为丝绸对照样。残留的丝绸降解液用一次性无菌过滤器(孔径为0.25 μ m亲水膜)过滤处理,收集液体。嗜麦芽窄食单胞菌劣化液命名为S劣化液,

铜绿假单胞菌命名为P劣化液;对照组中残留的劣化液命名为对照液。

1.2.3 劣化液前处理

在劣化液中加入终浓度为10 mmol/L DTT溶液,于56 °C水浴中还原1 h;然后加入终浓度为50 mmol/L的IAA溶液进行烷基化,避光反应40 min。随后使用自填脱盐柱脱盐,于45 °C真空离心浓缩仪中挥干剩余溶剂,色谱分析前重悬于10 μ L 0.1%甲酸溶液中。

1.3 测试与表征

1.3.1 形貌表征

将2种细菌处理的劣化样和对照丝绸样用碳导电胶固定在样品台上,喷金180 s,然后通过扫描电子显微镜对样品形貌进行表征。

1.3.2 红外光谱及二级结构分析

采用傅里叶红外光谱仪对丝绸老化样进行红外光谱和二级结构变化分析,波数范围为4000~400 cm^{-1} 。二级结构的变化由酰胺I区^[25](1700~1600 cm^{-1})的峰拟合得到,其中1637~1616 cm^{-1} 处的峰面积归属于 β -折叠,其余归属于无定形区。具体步骤如下:采用傅里叶去卷积法确定峰值位置,固定峰中心,设置峰宽和峰面积为最小值0,容差设置为 1×10^{-6} ;迭代拟合,直至收敛。

1.3.3 多肽质谱检测

将重悬后的劣化液进行色谱分离,装载样品体积为5 μ L,每个组分分析时长为60 min,总流速为600 nL/min。流动相A为0.1%甲酸溶液,流动相B为20.0%的0.1%甲酸溶液和80.0%乙腈。液相梯度如下:0~1 min, B液线性梯度从0.0%~6.0%;1~5 min, B液线性梯度从6.0%到9.0%;5~20 min, B液线性梯度从9.0%~14.0%;20~50 min, B液线性梯度从14.0%~30.0%;50~58 min, B液线性梯度从30.0%~40.0%;58~60 min, B液线性梯度从40.0%到95.0%。

质谱分析条件为:喷涂电压为2.2 kV,毛细管温度设置为270 °C。一级质谱分辨率:70000 m/z , AGC target: 3×10^6 ,一级最大IT:60 ms,质谱前驱体 m/z 范围:300~1400;二级质谱每次全扫描后触发采集20个最高强度母离子的二级质谱图谱,二级质谱分辨率:17500 m/z , AGC target: 5×10^4 ,二级最大IT为80 ms,MS2激活类型为HCD,激活时间为60 ms,归一化碰撞能量为27 eV。

质谱原始数据使用Byonic检索蚕丝蛋白数据库,检索参数如下:蛋白质固定修饰为甲酰胺甲基

化;可变修饰为氧化;酶特异性设置为非特异性;最大遗漏酶切位点设置为 3 条;前体碎片离子质量误差设置为 20 mmu;二级质谱误差为 0.02 Da;仅选择高置信度鉴定的肽进行下游蛋白鉴定分析。

2 结果与分析

2.1 样品形貌分析

图 1 为丝绸对照样和细菌老化丝绸样的 SEM

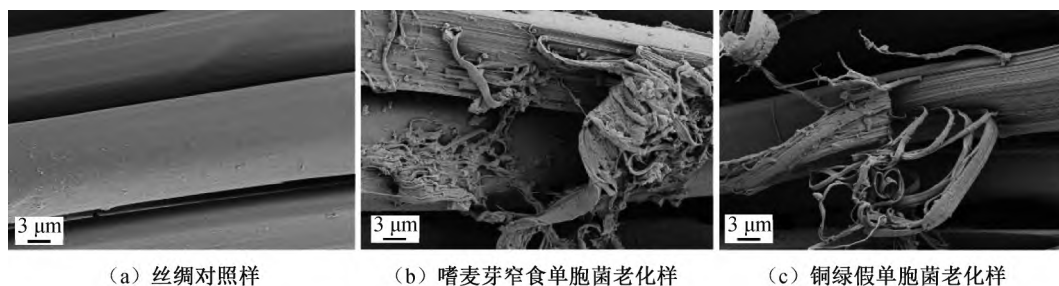
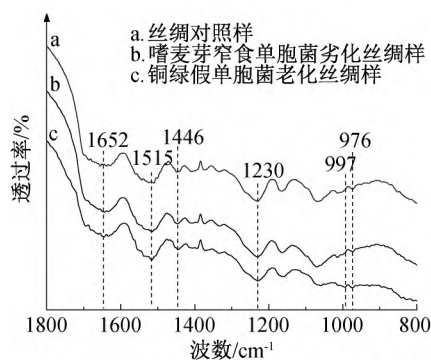


图 1 丝绸对照样和细菌老化丝绸样的 SEM 图

2.2 红外光谱及二级结构变化分析

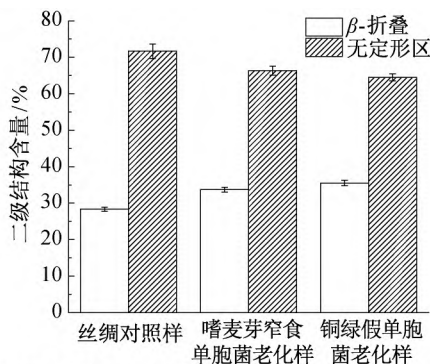
为分析丝纤维链结构的劣化情况和二级结构的变化,对丝绸对照样和细菌老化样进行红外光谱分析,结果如图 2 所示。1652 cm^{-1} 和 1230 cm^{-1} 处的特征吸收峰分别归属于酰胺 I 区和酰胺 III 区的无规卷曲构象,1515 cm^{-1} 和 1446 cm^{-1} 处的特征吸收峰归属于酰胺 II 的 β -折叠构象,997 cm^{-1} 和 976 cm^{-1} 则分别归属于蚕丝蛋白特征序列 Gly-Ala 的 CH_3

图。从图 1 中可以看出:丝绸对照样纤维表面光滑,未见明显缺陷;经嗜麦芽窄食单胞菌和铜绿假单胞菌劣化后的丝纤维表面均出现了纤丝剥离的现象,剥落的纤丝伴有残留的菌体,表明细菌劣化作用开始于纤维表面;嗜麦芽窄食单胞菌产生的机械损伤是轴向劈裂方式,铜绿假单胞菌则是沿着纤维轴向从表面开始层层剥离,产生的微纤丝随即进入劣化液,有利于进一步降解产生丝肽。



(a) 丝绸对照样和细菌老化样的红外光谱图

和 Gly-Gly 的 C—C 骨架伸缩振动。 β -折叠构成蚕丝蛋白结晶结构域,其含量决定了丝纤维的结晶度^[16]。图 2(a)显示:经 30 d 的细菌劣化后,1652、1515、1446、1230、997 cm^{-1} 和 976 cm^{-1} 处的特征吸收峰均较明显。对酰胺 I 区进行峰拟合,得到图 2(b)中的丝纤维构象变化。经细菌劣化后 β -折叠结构含量明显上升,无定形区含量下降,说明细菌对无定形区降解程度大于对结晶结构域的降解程度。



(b) 丝绸对照样和细菌老化样的二级结构含量图

图 2 丝绸对照样和细菌老化样的红外光谱图和二级结构含量图

2.3 丝绸蛋白降解分析

2.3.1 细菌对丝绸蛋白整体水平的降解分析

为了从分子水平评估细菌降解丝织品的能力以及降解规律,本文对丝织品的劣化液进行基于蚕丝蛋白数据库的多肽质谱检测。图 3(a)为劣化液中溶出丝肽归属的丝蛋白数目。对照液、S 劣化液和 P 劣化液中检测到的丝肽分别归属于 17、98 个和 53 个蚕丝蛋白,表明丝纤维经过细菌降解作用后,更多的丝蛋白降解成肽段进入到劣化液中,且嗜麦芽窄

食单胞菌对丝蛋白降解多样性的增加效果更显著。图 3(b)为归属于轻链蛋白、重链蛋白和其他蛋白的丝肽数目分析。对照液、S 劣化液和 P 劣化液中分别检测到 27、2484 条和 631 条丝肽序列,其中:对照液中检测到的丝肽来自重链蛋白和轻链蛋白以外的其他蛋白,表明丝织品在培养基中浸泡的 30 d 中仅有少部分其他蛋白发生降解,蚕丝的主要蛋白(重链和轻链)并未发生降解。S 劣化液和 P 劣化液中检测到的丝肽序列大部分也来自其他蛋白,其中:S 劣

化液中检测到 313 条来自重链蛋白的丝肽序列,197 条来自于轻链蛋白的丝肽序列;而 P 劣化液中检测到 154 条来自重链蛋白的丝肽序列,165 条来自于轻链蛋白的丝肽序列。以上结果表明这 2 种细菌均

能对丝蛋白重链和轻链进行破坏降解,且嗜麦芽窄食单胞菌对重链蛋白的降解强于对轻链蛋白。相比铜绿假单胞菌,嗜麦芽窄食单胞菌对蛋白的降解更广泛,对丝蛋白的降解能力更显著。

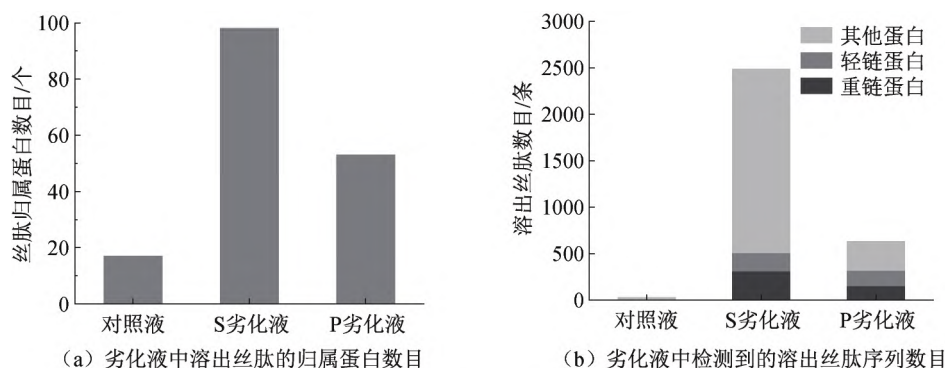


图3 丝绸的细菌劣化液中溶出丝肽的归属蛋白数目及检测到的溶出丝肽序列数目

2.3.2 细菌对丝绸重链蛋白的降解分析

重链蛋白是丝素蛋白的主要组成部分,同时包含了形成结晶结构域的规整重复的氨基酸序列,如 GAGAGS、GAGAGY 和 GAGAGV 等和形成无规卷曲结构的氨基酸序列^[6,15]。因此对重链蛋白进行降解分析,可以推断出 2 种细菌对松散和规整结构域的破坏倾向。为了更直观地揭示重链蛋白降解规律,将组成重链蛋白大分子链的氨基酸残基序列分成 4 个基序:Header、(GX)_n、Linker 和 C-ter,其中 Linker 基序连接两个相邻的 (GX)_n 基序^[26]。因此,根据重链丝肽序列 N 端断裂位置判断该丝肽归属的重链蛋白基序,通过检测丝肽序列的相对丰度表征 4 个基序的破坏程度,由此可推断这 2 种细菌的降解行为。将检测到归属于重链蛋白的丝肽序列按相对丰度从上之下依次排列,并对其进行归属蛋白的判断,结果见表 1。从表 1 可见,S 劣化液中检测到相对丰度前 10 的来自重链蛋白的肽段序列依次为 DEII、DEIIRDAS、GAGT、TFVIT、YFGSDVT、GSSGFGPY、ITTKK、GYEYAW、GYGAGVGA 和 DYF,而 P 劣化液中检测到相对丰度前 10 的来自重链蛋白的肽段序列依次为 TFVIT、DFDEDFYFGSDVT VQ、DFDEDFYFGS、TTDEIIRDASGAVIEE、YAW、NINDFDEDFYFGS、FDEDFYFGSDVT VQ、ESIVEEDV LMKTL、INDFDEDFYFGS 和 DAGAYSQSGPYVSN。TFVIT 为这 2 种细菌降解丝蛋白后产生的共同可溶性丝肽。表 1 进一步显示:重链蛋白中的 Header 和 Linker 处的氨基酸残基相较其他两个基序更容易断裂,嗜麦芽窄食单胞菌对形成结晶结构域的 (GX)_n 基序降解效果显著;而铜绿假单胞菌对重链蛋白的降解则集中在 Header 处。这说明嗜麦芽窄

食单胞菌对规整和无序氨基酸序列均有较强的破坏能力,而铜绿假单胞菌对形成松散结构域的无序氨基酸序列的破坏能力更强。

为了更全面地得到蛋白降解规律,按上述方法对劣化液中所有来自重链蛋白的丝肽序列进行基序归属,结果如图 4 所示。从图 4 可看出:S 劣化液和 P 劣化液中重链蛋白的溶出丝肽按比例依次均来自 Header、Linker、(GX)_n 和 C-ter 基序,表明在 2 种细菌作用下 Header 中的氨基酸残基最容易遭到断裂;S 劣化液中来自于 Header、Linker、(GX)_n 的丝肽序列比例较为接近,而 P 劣化液中的丝肽来自于 Header 的比例高达 68%,表明铜绿假单胞菌对由无规氨基酸序列组成的松散结构域降解能力较强而呈现显著的倾向性,且嗜麦芽窄食单胞菌对松散和规整结构域的降解破坏能力相近;对 Linker 的破坏有利于使形成结晶域的 (GX)_n 基序暴露在劣化液中形成微晶体嵌段,进一步对 (GX)_n 中的规整序列进行降解。因此,可推测嗜麦芽窄食单胞菌对 Linker 的破坏能力更强决定了嗜麦芽窄食单胞菌对重链蛋白的降解效果比铜绿假单胞菌明显(图 3)。综上可推断丝织品的细菌降解规律:随着丝蛋白大分子链上无规序列形成的松散结构域的降解,使得越来越多规整序列形成的微晶体嵌段逐渐暴露在劣化液中,从而导致更多的丝肽溶出,最终实现丝蛋白的完全降解。

3 结论

本文对嗜麦芽窄食单胞菌和铜绿假单胞菌劣化丝织品后的降解液进行基于蚕丝蛋白数据库的多肽质谱检测,同时对劣化后的丝绸样进行了微观形貌

表 1 S 劣化液和 P 劣化液中相对丰度前 10 的肽段序列

劣化液种类	肽段序列	肽段得分	相对丰度	所属基序
S 劣化液	DEII	74.4	15661000000	Header
	DEIIRDAS	393.9	5608800000	Header
	GAGT	91.3	4347300000	Linker
	TFVIT	256.8	2356000000	Header
	YFGSDVT	336.4	1411400000	Header
	GSSGFGPY	490.6	977600000	Linker
	ITTKK	23.9	844480000	Header
	GYEYAW	317.8	801870000	Linker
	GYGAGVGA	328.2	786690000	(GX) <i>n</i>
	DYF	168.0	549610000	Header
P 劣化液	TFVIT	301.8	814940000	Header
	DFDEDYFGSDVTVQ	355.3	461480000	Header
	DFDEDYFGS	381.5	385310000	Header
	TTDEIIRDASGAVIEE	404.1	355420000	Header
	YAW	159.8	327410000	Header
	NINDFDEDYFGS	350.3	281030000	Header
	FDEDYFGSDVTVQ	329.5	180290000	Header
	ESIVEEDVLMKTL	262.8	180290000	Header
	INDFDEDYFGS	270.0	152400000	Header
	DAGAYSQSGPYVSN	420.3	134920000	Header

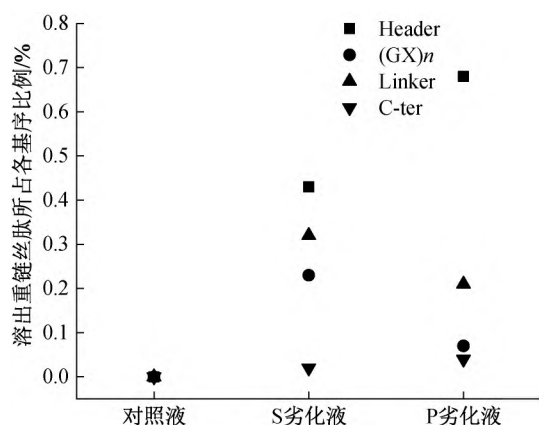


图 4 劣化液中溶出重链蛋白丝肽所占各个基序的比例

观察和二级结构分析,主要结论如下:

a)经过细菌劣化作用,丝蛋白纤维发生轴向撕裂,从表面向轴中心逐步产生物理损伤,这对微纤丝的剥落和进一步降解有促进作用。

b)2 种细菌对丝蛋白中的无定形区均有较强的破坏能力,嗜麦芽窄食单胞菌对规整结构域蛋白的降解能力强于铜绿假单胞菌。

c)细菌劣化作用会促使丝蛋白降解,主要为重链和轻链蛋白以外的其他蛋白;2 种细菌降解丝绸后劣化液中溶出丝肽的多样性增加存在差异性,相比铜绿假单胞菌,嗜麦芽窄食单胞菌对丝蛋白的降解能力更强,作用的目标蛋白更广泛。

d)Linker 基序的氨基酸残基发生断裂,促使

(GX)*n* 形成的微晶体嵌段暴露,有利于重链蛋白结晶域的破坏,促使其进一步降解;细菌对 Linker 基序的破坏能力是影响重链蛋白的降解效果的重要因素。

本文通过观察纤维劣化前后微观形貌、二级结构产生的变化及蛋白分子层面的降解来揭示细菌对丝绸的降解机理,所采取的研究方法可为古代丝织品劣化机理研究提供新思路。该研究结果有助于评估细菌在丝织品生物退化过程中的重要性,为后续微生物代谢物和蛋白酶等单因素对丝织品的降解机理研究提供参考,有助于进一步提出预防丝织品文物生物侵害的有效措施。

参考文献:

- [1] 王岩,王文利,王启明,等. 微缩的相貌: 丝绸文物图案上的历史信息[J]. 丝绸, 2017, 54(6): 91-96.
- [2] 《丝绸文化与产品》编写组. 丝绸服饰的文化与发展(4): 中国古代丝绸服饰文化的成熟期[J]. 现代丝绸科学与技术, 2020, 35(2): 34-36.
- [3] 周静洁,林红,陈宇岳. 古代丝织品老化机理及其保护研究[J]. 苏州大学学报(工科版), 2007, 27(1): 60-64.
- [4] Guo C C, Zhang J, Jordan J S, et al. Structural comparison of various silkworm silks: An insight into the structure-property relationship[J]. Biomacromolecules, 2018, 19(3): 906-917.

- [5] Zeng Y, Peng Z Q, Wang B, et al. Application of electron paramagnetic resonance and solid-state ^{13}C nuclear magnetic resonance of cross-polarization/magic angle spinning to study enzymatic degradation of silk fabrics[J]. *Analytical Sciences*, 2017, 33(5): 579-584.
- [6] Badillo-Sanchez D, Chelazzi D, Giorgi R, et al. Characterization of the secondary structure of degummed *Bombyx mori* silk in modern and historical samples[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2018, 157: 53-62.
- [7] 黄悦, 张晓梅, 原思训. 红外光谱法研究不同丝胶含量老化蚕丝蛋白[J]. *文物保护与考古科学*, 2009, 21(1): 44-49.
- [8] Du S, Zhang J, Zhou W T, et al. Interactions between fibroin and sericin proteins from *Antheraea pernyi* and *Bombyx mori* silk fibers[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2016, 478: 316-323.
- [9] 黄诗莹, 陈文翔, 赵丰, 等. 酸性水解条件下丝织品的结构及稳定同位素变化[J]. *浙江理工大学学报(自然科学版)*, 2022, 47(3): 300-307.
- [10] 何宇杰, 彭志勤, 贾丽玲, 等. 碱老化对丝织物结构及稳定同位素比值的影响[J]. *丝绸*, 2022, 59(5): 14-19.
- [11] Zhao M H, Qi Z Z, Tao X S, et al. Chemical, thermal, time, and enzymatic stability of silk materials with silk I structure[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(8): 4136.
- [12] Wongpinyochit T, Johnston B F, Seib F P. Degradation behavior of silk nanoparticles-enzyme responsiveness[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2018, 4(3): 942-951.
- [13] Guo C C, Li C M, Kaplan D L. Enzymatic degradation of *Bombyx mori* silk materials: A review[J]. *Biomacromolecules*, 2020, 21(5): 1678-1686.
- [14] Zvinavashe A T, Barghouti Z, Cao Y T, et al. Degradation of regenerated silk fibroin in soil and marine environments[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2022, 10(34): 11088-11097.
- [15] Chen X, Knight D P, Shao Z Z. β -turn formation during the conformation transition in silk fibroin[J]. *Soft Matter*, 2009, 5(14): 2777-2781.
- [16] Drummy L F, Farmer B L, Naik R R. Correlation of the β -sheet crystal size in silk fibers with the protein amino acid sequence[J]. *Soft Matter*, 2007, 3(7): 877-882.
- [17] Chen R R, Hu M Z, Zheng H L, et al. Proteomics and immunology provide insight into the degradation mechanism of historic and artificially aged silk[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(3): 2435-2442.
- [18] Szulc J, Karbowska-Berent J, Drajńska A, et al. Metabolomics and metagenomics analysis of 18th century archaeological silk[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2021, 156: 105120.
- [19] Brzozowska I, Bogdanowicz A, Szczesny P, et al. Evaluation of bacterial diversity on historical silk velvet textiles from the Museum of King John III's Palace at Wilanów, Poland[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2018, 131: 78-87.
- [20] 杨弢. 狮子山楚王陵土壤中丝绸腐蚀微生物的分离与抑制[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2013.
- [21] Taha A, Omar A, El-Wekeel F. Microbial degradation of ancient textiles housed in the Egyptian textile museum and methods of its control[J]. *Egyptian Journal of Archaeological and Restoration Studies*, 2019, 9(1): 27-37.
- [22] Seves A, Romanò M, Maifreni T, et al. The microbial degradation of silk: A laboratory investigation[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1998, 42(4): 203-211.
- [23] Mielko K A, Jabłoński S J, Milczewska J, et al. Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 35(11): 178.
- [24] Song M K, Jiang L F, Zhang D Y, et al. Bacteria capable of degrading anthracene, phenanthrene, and fluoranthene as revealed by DNA based stable-isotope probing in a forest soil[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 308: 50-57.
- [25] Badillo-Sanchez D, Chelazzi D, Giorgi R, et al. Understanding the structural degradation of South American historical silk: A Focal Plane Array (FPA) FTIR and multivariate analysis[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 1-10.
- [26] Asakura T. Structure of silk I (*Bombyx mori* silk fibroin before spinning)-type II β -turn, not α -helix[J]. *Molecules*, 2021, 26(12): 3706.

(责任编辑: 廖乾生)