

Valutazione multidisciplinare dei biodeteriogeni dei rotoli pergamenacei

Prima dell'avvento della carta nel XIV secolo, il supporto alla scrittura era dato dall'utilizzo delle pergamene (2). La lavorazione di tale materiale avveniva in modi diversi, a seconda dell'area geografica e del periodo storico di produzione (16); inoltre, ogni singolo esemplare non aveva un processo di fabbricazione industriale definito, risultando quindi essere un manufatto unico nel suo genere (3). Le pergamene venivano realizzate con pelli di animali (vitello, pecora) non conciate appositamente preparate (11).

Derivando da pelle animale sono quindi costituite da collagene. Questa proteina strutturale è basata sulla ripetizione di tre amminoacidi Gly-Xaa-Yaa che sono rispettivamente Glicina (Gly) e, in genere, Prolina (Pro) o Idrossiprolina (Hyp, forma modificata della prolina). È composto da tre catene alfa: due di tipo I alfa-1 identiche e una di tipo I alfa-2 geneticamente diversa, che si avvolgono l'una intorno all'altra a formare una tripla elica (18; 8). Ogni catena alfa si avvolge in un'alfa elica sinistrorsa, mentre le tre catene combinate superavvolgono in modo destrorso per formare molecole di tripla elica di tropocollagene ovvero l'unità ripetitiva costituente le fibre di collagene (7).

L'analisi di tali proteine, ad esempio, si è rivelata molto utile per chiarire la natura della pergamena di una Bibbia tascabile consegnata da un frate francescano all'imperatore Mogol alla fine del XIII secolo (17). Queste forniscono un'importante fonte di informazione filogenetica in quanto alcune mostrano piccole variazioni nella sequenza amminoacidica nelle diverse specie (5).

Le pergamene costituiscono un'importante eredità del patrimonio culturale; tramandano sin dall'antichità preziose informazioni storiche e sociali, fornendo uno spaccato sulla vita nel passato. Tali documenti antichi sono però soggetti ad attacchi microbici che causano tipiche macchie di colore viola che determinano la delaminazione dello strato superficiale e, di conseguenza, una perdita di leggibilità (13).

L'obiettivo di questo progetto è quello di approfondire le tecniche analitiche e i protocolli di analisi definiti nei precedenti studi, al fine di operare in un'ottica di approccio multidisciplinare che consenta di comprendere la natura e il processo degli attacchi microbici, ricavare importanti informazioni inerenti alla manifattura della pergamena e quindi implementare le conoscenze di questi preziosi manufatti, con lo scopo di conservarli al meglio.

Importanti studi volti all'analisi del biodeterioramento batterico sono stati effettuati su rotoli pergamenacei: il primo relativo al processo di canonizzazione del Beato Lorenzo Loricato (1244 d.C., 13) e il secondo ha riguardato l'analisi di tre pergamene appartenenti ad un fondo archiviato come Faldone Patrizi A 19 (XVI-XVII secolo d.C., 14). I rotoli apparivano visibilmente danneggiati presentando tipiche macchie viola riferibili all'attacco di Proteobacteria, Actinobacteria e Halobacteria. Quest'ultima classe comprende la specie *Halobacterium salinarum*, alofilo estremo adattato a livelli di salinità elevati che, verosimilmente, inizia la sua colonizzazione quando le pelli venivano trattate con il sale producendo inoltre il pigmento rodopsina, responsabile del colore viola (13).

Lo studio di tali reperti ha previsto un approccio multidisciplinare al fine di identificare i microrganismi responsabili dell'attacco microbico, individuare la composizione del pigmento relativo alle macchie viola e caratterizzare la struttura della pergamena (13,14). A tale scopo sono state utilizzate analisi metagenomiche, chimiche e fisiche. La prima prevede l'utilizzo della tecnologia *Next Generation Sequencing* (NGS), che permette di analizzare grandi genomi generando milioni di sequenze in poco tempo (1). La seconda utilizza la spettroscopia RAMAN, rapida e non invasiva, consente di identificare i pigmenti, gli inchiostri e i substrati (12); infine è stata utilizzata la tecnica *Light Transmitted Analysis* (LTA) che permette di studiare e localizzare i danni strutturali (13). È stato quindi possibile ipotizzare un modello di colonizzazione che ha consentito di inferire come, il deterioramento della cosiddetta *purple spot*, fosse comune in documenti di età diverse. Inoltre è stato possibile determinare un modello di degradazione del collagene e stabilire una dinamica di successione microbica multifase (13,14,15).

In ottica di un approccio multidisciplinare, un contributo potrebbe essere dato dall'analisi delle proteine: queste, a differenza del DNA, sono specifiche per diversi tessuti e ambienti (10). Questa forma di analisi proteica è chiamata *peptide mass fingerprinting* ed è la base per il metodo ZooMS (*Zooarchaeology by Mass Spectrometry*) che utilizza la spettrometria di massa MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) al fine di consentire l'identificazione tassonomica (4). Essendo ZooMS un metodo distruttivo è stato sperimentato l'utilizzo di eZooMS, non invasivo e risultato essere idoneo per l'analisi delle pergamene. Questo consiste in un'estrazione triboelettrica delle proteine, ovvero utilizzando una carica elettrostatica generata dallo sfregamento delicato di una gomma in PVC sulle superfici del campione; segue la successiva analisi MS basata sulla tecnica di *soft ionization* MALDI-TOF che permette di analizzare i peptidi senza che questi si frammentino negli amminoacidi costituenti (9, 6). Il vantaggio di questo metodo è che non richiede attrezzature specialistiche o conservazione dei campioni che possono essere raccolti senza la necessità di trasportare i manufatti.

Risulta quindi evidente l'importanza della comprensione dei processi di colonizzazione e di deterioramento batterico. Questo è possibile grazie allo sviluppo di diverse metodologie e protocolli che possano integrarsi tra loro. In particolare, sarà interessante valutare l'adeguatezza del metodo eZooMS.

(1) Behjati, S., Tarpey, P.S., 2013. What is next generation sequencing?. *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 98, 236–238.

(2) Bicchieri et al., 2008. Inside the parchment. 9th International Conference on NDT of Art, Jerusalem Israel.

(3) Bicchieri et al., 2010. Non-destructive spectroscopic characterization of parchment documents. *Vibrational Spectroscopy* 55, 267-272.

(4) Brown, S., Douka, K., Collins, M.J., Richter, K.K., 2021. On the standardization of ZooMS nomenclature. *Journal of proteomics* 235.

(5) Brown, T., Brown, K., 2011. *Biomolecular Archaeology. An Introduction* -Wiley-Blackwell.

(6) Buckley, M., 2013. A molecular phylogeny of Plesiorcycteropus reassigns the extinct mammalian order "Bibymalagasia." *PloS one* 8.

(7) Buckley, M., Wadsworth, C., 2014. Proteome degradation in ancient bone: Diagenesis and phylogenetic potential. *Palaeogeography, palaeoclimatology, palaeoecology* 416, 69–79.

(8) Buckley, M., 2019. Paleoproteomics: An Introduction to the Analysis of Ancient Proteins by Soft Ionisation Mass Spectrometry. In: Lindqvist, C., Rajora, O.P. (Eds.), *Paleogenomics: Genome-Scale Analysis of Ancient DNA*. Springer International Publishing, Cham, pp. 31–52.

(9) Fiddyment et al., 2015. Animal origin of 13th-century uterine vellum revealed using noninvasive peptide fingerprinting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 15066–15071.

(10) Fiddyment et al., 2019. So you want to do biocodicology? A field guide to the biological analysis of parchment. *Heritage Science* 7, 35.

- (11) Giuffrida, M.G., Mazzoli, R., Pessione, E., 2018. Back to the past: deciphering cultural heritage secrets by protein identification. *Applied microbiology and biotechnology* 102, 5445–5455.
- (12) Maguregui et al., 2012. Field Raman analysis to diagnose the conservation state of excavated walls and wall paintings in the archaeological site of Pompeii (Italy). *Journal of Raman Spectroscopy*.
- (13) Migliore et al., 2017. Purple spot damage dynamics investigated by an integrated approach on a 1244 A.D. parchment roll from the Secret Vatican Archive. *Scientific Reports*.
- (14) Migliore et al., 2019. Three ancient documents solve the jigsaw of the parchment purple spot deterioration and validate the microbial succession model. *Scientific Reports*.
- (15) Perini et al., 2020. The Integration of Metagenomics and Chemical Physical Techniques Biodecoded the Buried Traces of the Biodeteriogens of Parchment Purple Spots. *Frontiers in Microbiology* 11.
- (16) Piñar, G., Sterflinger, K., Pinzari, F., 2015. Unmasking the measles-like parchment discoloration: molecular and microanalytical approach. *Environmental Microbiology* 17, 427-443.
- (17) Toniolo et al., 2012. The Silk Road, Marco Polo, a Bible and its proteome: a detective story. *J Proteomics* 75, 3365-3373.
- (18) Welker, F., 2018. Palaeoproteomics for human evolution studies. *Quaternary science reviews* 190, 137–147.