

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

CENTRUM BIOLOGIE, GEOVĚD A ENVIGOGIKY

**Detekce mléčných a dalších proteinů na
archeologické keramice**

MAREK HONS

PŘÍRODOVĚDNÁ STUDIA, OBOR BIOLOGIE SE ZAMĚŘENÍM NA VZDĚLÁVÁNÍ

Vedoucí práce: Mgr. Jaroslav Pavelka, PhD.

PLZEŇ, 2020

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně
s použitím uvedené literatury a zdrojů informací.

V Plzni, 27. června 2020

.....
vlastnoruční podpis

Poděkování

Rád bych poděkoval svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Jaroslavu Pavelkovi, Ph.D. za trpělivost, ochotu, pomoc a cenné rady při zpracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat mé rodině a přátelům za podporu při mém studiu.

Obsah

1. Úvod	3
1. 1 Cíle práce	4
1. 2 Historie	5
1. 2. 1 Rataje u Bechyně	5
1. 2. 2 Milenovice	6
1. 2. 3 Praha-Modřany	6
1. 2. 4 Knovízská kultura	7
1. 3 Materiál	8
1. 3. 1 Amfory	8
1. 3. 2 Zásobnice	8
2. Možnosti testování organických zbytků na archeologické keramice	10
2.1 Proteiny (bílkoviny)	13
2.1.1 Proteiny a jejich denaturace v čase	14
2.2 Zkoumané proteiny	15
2.2.1 Mléčný protein – Kasein	15
2.2.2 Mléčný protein – β -lactoglobulin	15
2.2.3 obilný protein – Gliadin	16
3. způsoby detekce proteinů	17
3.1 ELISA test – Sendvičová ELISA	17
3.2 ELISA test – Kompetitivní ELISA	19
3. 3 ELISA testy pro zbylé proteiny	20
3. 4 Experimentální archeologizace	22
3. 5 Vyhodnocení výsledků	23
4. Výsledky	24
5. Diskuse	28
5. 1 Mléko	28
5. 2 Obilí	30
5.3. Identifikace živočišných proteinů	30
5. 4 Verifikace testů	32
6. Závěr	34
7. Shrnutí	35
8. Resumé	35
Seznam Literatury	36
Seznam obrázků	46

Seznam tabulek..... 47

1. Úvod

Studie mléka, mléčných proteinů a lipidů ve výživě minulých populací přináší v posledních letech nové poznatky o potravních technikách a změnách potravních preferencí v průběhu posledních tisíciletí. Předkládaná práce se snaží navazovat na publikace předních autorů (Craig a Collins 2000; Solazzo et al. 2008), ale také na podobné studie zpracované na Západočeské univerzitě (Čiperová et al. 2015; Hlásek et al. 2015). Hlavní část práce je studium mléčných proteinů na tzv. amforách, které svým tvarem dokládají, že byly používány především na nějaké tekutiny a nejsou příliš vhodné na pevné potraviny. Dále také práce obsahuje příspěvek k problematice trávení laktózy v minulosti. Pokouším se pomocí biologických technik a částečně i dodaných výsledků z hmotnostní spektrometrie odhalit původ proteinů v tomto druhu keramiky a určit druh potravin, pro které byly používány. Současně se práce zabývá riziky kontaminace a věrohodnosti získaných dat.

1. 1 Cíle práce

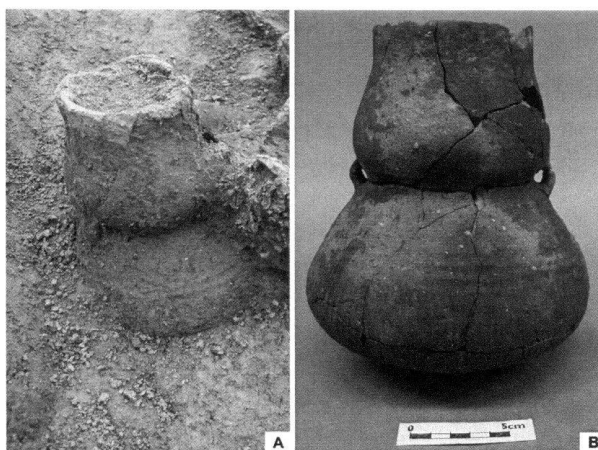
Práce měla několik cílů, na prvním místě se pokusit pro potřeby archeologie osvětlit, k jakému účelu byl skutečně používán specifický typ keramiky, tzv. amfory, (nejedná se o klasické amfory na víno známé ze Středomoří). Archeologové o této problematice mnoho let teoretizovali, ale bez konkrétních důkazů. Jedno z velkých podezření bylo na mléko, čemuž přispívaly první dosud nepublikované výsledky. Problematikou mléka a mléčných výrobků v minulosti se zabývala řada prací (Cramp et al. 2014; Copley et al. 2003; Craig et al. 2004; Craig et al. 2005a; Craig et al. 2005b; Craig et al. 2011). Studie, na kterou se pokouším přímo navázat je práce Číperové et al. (2015), kde se mléčné zbytky analyzovaly pomocí systému antigen-protilátka, kde byla vypracována metodika analýzy proteinů přímo z keramické matrix, lišící se od starších prací, kde se potravinové zbytky analyzovaly z příškvarků na keramice (Pavelka a Vařeka 2008; Pavelka a Orna 2011). Tato metodika významně rozšiřuje možnosti poznání minulosti, protože zatímco příškvarků potravin se nalézají poměrně málo, porézní keramiky z různých časových období existuje poměrně velké množství. Pro testování byla využita keramika s menším zřetelem na časové období, ale s větším ohledem na druh nádob, aby bylo možno určit druhy potravin, pro které byla používána. I přes tento výběr se všechny nádoby nacházejí z mladší doby bronzové, zejména pro dostupnost a vhodnost nálezů. Problematika mléka a mléčných produktů je důležitá pro pochopení změn v lidském genomu, je zde mnoho nevyjasněného, zejména je s podivem jak a proč vlastně v historické době, nikoliv snad už v neolitu narůstá v evropských populacích, hlavně na severu, procento obyvatel schopných trávit laktózu (Burger et al. 2007; Gamba et al. 2014; Malmström et al. 2010; Witas et al. 2015). Z historických pramenů zatím nelze vyčíst příčiny, proč k takovému trendu šíření mutace pro trávení laktózy vlastně došlo. Mléko se zpracovávalo od neolitu a k šíření mutace dochází zřejmě až ve středověku (Krüttli et al. 2014; Nagy et al. 2011). Použité testy na bázi antigen-protilátka umožňují do určité míry rozlišit původ mléka, což se pomocí hmotnostní spektrometrie určuje obtížně, případně to není možné vůbec, jako zejména u lipidů, které se v zahraničních studiích určují z keramiky nejčastěji (např. Copley et al. 2005b). Tato práce má také snahu přispět novými daty k problematice trávení laktózy v minulosti.

Další testy na bázi protilátek měly určit, zda se v analyzovaných amforách používalo pouze mléko, nebo také jiné potraviny. Testy na hovězí a vepřové maso, mohou dokázat, zda se např. v nádobách mohly uchovávat masové vývary, nebo různé druhy polévek, což je další možný způsob použití. V předkládané práci nedisponuji testy na přítomnost alkoholických nápojů, ale při nepřítomnosti jakýchkoliv proteinů se dá o použití této keramiky na alkoholické nápoje spekulovat. V práci bych předložil také výsledky, potvrzující věrohodnost použité metodiky na archeologizovaných proteinech, u kterých je znám původ. Tyto výsledky by také mohly přispět k pochopení kontaminací v půdě ze zemědělských hnojiv, které se inkorporovaly do archeologické keramiky a přinášejí falešné pozitivní výsledky.

1. 2 Historie

1. 2. 1 Rataje u Bechyně

Archeologické výzkumy v Ratajích u Bechyně odhalily, že se jedná o významnou lokalitu s velkým množstvím pravěké keramiky. Podařilo se zjistit, že se jedná o sídliště, které se datuje do doby pozdní a mladší doby bronzové, což je období přibližně 1000 let před našim letopočtem (Chvojka a Töröková 2017). Celé území je velmi zatíženo orbou a bylo zde nalezeno a zkoumáno 13 sídlištních objektů odlišných velikostí. Po prozkoumání byla většina (11) sídlištních objektů zařazena do doby mladší doby bronzové (cca 11. století př. n. l.) (Chvojka a Töröková 2017). Kromě keramických nádob se v jámách nacházela i celá řada dalších artefaktů (Chvojka a Töröková 2017). Další významný průlom bylo zjištění, že lidské osídlení zde bylo v mladší i pozdní době bronzové. Toto zjištění je významné díky tomu, že v lokalitě jižních Čech je takovéto osídlení spíše výjimkou (Chvojka a Töröková 2017). Nádoby zkoumané v mé bakalářské práci pochází z objektu č.13/2016. Mezi nalezenými nádobami byly amfory s vydutými hrdly (tzv. etážovité amfory), které jsou pro mladší dobu bronzovou příznačné (Chvojka a Töröková 2017). Mezi testovanými nádobami byla i poškozená etážovitá amfora (viz Obr. 1). Po předběžném prozkoumání objektu č.13/2016 se předpokládá, že se jedná o zbytky nějakého pravěkého obřadu (Chvojka a Töröková 2017).



Obr. 1. Torzo etážovitě amfory (foto Chvojka a Töröková 2017).

1. 2. 2 Milenovice

Další archeologické naleziště, z kterého se v této práci zpracovaly vzorky, jsou Milenovice. V mikroregionu Milenovice se nachází přítok řeky Blanice (Chábera et al. 1985), na který jsou všechny lokality nacházející se v Milenovicích vázány, protože se žádná z lokalit nenachází od řeky dále než půl kilometru. Nachází se zde i druhý vodní tok, který byl pro tuto lokalitu velmi významný a to Radomilický potok, který následně vtéká do Blanice (Michálek a Fröhlich 1979; Beneš et al. 1999). Z nalezeného zlomkového materiálu, který zde byl nalezen, se podařilo identifikovat několik keramických nádob. Jednalo se o neúplné torzo amfory s válcovitým hrdlem. To bylo nalezeno na nalezišti hradiště Skalka. Datace nám říká, že se jedná o nádobu typu mlado bronzových amfor (Bouzek 1963; Hrala 1973). Ve velkém počtu jsou v lokalitě Milenovice doloženy i typické kusy knovízské kultury a to převážně amforovité zásobnice (Fröhlich a Chvojka 2001).

1. 2. 3 Praha-Modřany

Již v roce 1977 byl na lokalitě Praha-Modřany udělán z archeologického hlediska vcelku velký hromadný nález keramických nádob z období knovízské kultury. Bylo zde v kruhové jámě, která byla z části recentně porušena, nalezeno deset keramických nádob (Kovařík 1979). Tyto nádoby byly ve stavu, že jejich rekonstrukce do původního stavu byla možná. Skladba tvarů nalezených keramických nádob byla velmi různorodá. Díky velké různorodosti druhů nádob výzkumníci té doby došli k závěru, že se jednalo o jakousi „jídelní obětinu“, která je datována do mladší doby bronzové neboli knovízské kultury (Kovařík 1979).

Kromě této teorie je možná i teorie, že se jednalo o keramický set, který sloužil ke konzumaci, přípravě a servírování piva nebo tekutin podobných dnešnímu pivu (Pavelka a Hlásek ústní sdělení). Jelikož, se tyto tekutiny připravují z obilných plodin, existovalo podezření na zbytky proteinů obilnin. Ale nebylo možno vyloučit ani další potraviny, proto byl učiněn výběr této keramiky pro analýzy zbytků potravin. Mezi testovanými nádobami byla i vyobrazená keramická nádoba (viz Obr. 2.).



Obr. 2. Nádoba z mladší doby bronzové, která byla nalezena v lokalitě Praha-Modřany (foto D. Hlásek – nepublikováno).

1. 2. 4 Knovízská kultura

V mladší době bronzové se na území Čech vyskytovala knovízská kultura (Kornelaková 2010). Doba bronzová je rozdělena do několika etap, které trvaly na našem území přibližně 1500 let. Etapa mladší a pozdní doby bronzové byla dobou kultury tzv. popelnicových polí, kam se mimo jiné řadí i knovízská kultura (Jiráň 2008). Tato kultura se řadí do hornodunajského okruhu a časem se sblížovala se svými sousedními kulturami z jihu a západu (Podborský 2006). Další etapy doby bronzové se dělí na střední dobu bronzovou, v níž se vyskytovala mohylová kultura a na její nejstarší časový úsek, v kterém prosperovala tzv. kultura únětická (Jiráň 2008). Archeologické prameny prokázaly, že během 1,5 tisíce let došlo k velikým změnám v kultuře, jak z pohledu ekonomického, tak i z pohledu sociálního. Došlo k obrovskému skoku v organizovanosti obchodu i výrobě různých předmětů i do delších vzdáleností než doposud (Jiráň 2008).

Nádoby zkoumané v této bakalářské práci se stářím řadí právě do období knovízské kultury tedy mladší doby bronzové.

1. 3 Materiál

V této práci bylo zkoumáno a testováno několik druhů keramických nádob z období mladší doby bronzové.

1. 3. 1 Amfory

Amfory, nazývané též jako osudí, jsou keramické nádoby různých velikostí, které během let podstoupily i řadu vizuálních změn (Jiráň 2008). Tento termín je s největší pravděpodobností přejat z běžné řecké terminologie (Neustupný 1997). Jedny z prvních nádob tohoto druhu jsou vysoké, štíhlé a mají válcovitý tvar hrdla. Většina těchto amfor má ucho v horní části nádoby ovšem byly nalezeny i amfory, které toto ucho neměly (Jiráň 2008). Kvůli svému zúženému a vysokému hrdlu je přístup do nich velmi obtížný, krom toho je těžiště u těchto keramických nádob nastaveno výše, než u jiných druhů nádob. Tyto morfologické znaky nám říkají, že s největší pravděpodobností sloužili k transportu a přechovávání různých druhů tekutin. Díky vysoko postavenému těžišti je stabilita keramických amfor výhodná pro naklání a tím pádem i vylévání tekutin v nich uskladněných (Henrickson a McDonald 1983). Keramické nádoby ale během let podstoupily i jakýsi vývoj jejich tvaru a to převážně v období pozdní doby bronzové, kdy došlo ke změnám tvaru hrdla, které se snížilo a částečně také došlo ke zvětšení jeho průměru. Další změny se vyskytly i u ucha, které bylo posunuto níže, ale největší vizuální změna je v podobě výzdoby, která navazuje na etážovité nádoby z knovízské kultury (Jiráň 2008). Mezi další nádoby toho druhu se řadí tzv. štítarské amfory, které mají spíše baňatý tvar spodní části, který je mimo jiné i lineárně ozdoben. K dalším typickým rysům patří nálevkovité velmi nízké hrdlo a ouška se nachází v oblasti pod hrdlem. U dalších typů amfor se již ouška nevyskytují vůbec nebo pouze výjimečně (Jiráň 2008). Lze nalézt i mladší amfory s konickými nebo rovnými hrdly anebo amfory se širokými těly, které jsou většinou svisle zdobené (Jiráň 2008).

1. 3. 2 Zásobnice

Vývoj těchto keramických nádob je znám až do pozdních etap doby bronzové, poté již splývají s jinými keramickými nádobami (Jiráň 2008). V mladších etapách

doby bronzové lze rozeznávat amfory a zásobnice od sebe a to zejména díky rozdílnému materiálu, který byl využíván k tvorbě, ale také díky odlišným morfologickým znakům. V pozdních etapách doby bronzové se mění jejich povrchové ozdobení (Jiráň 2008). Zásobnice z dob knovízské kultury se dělí na 3 typy: vejčité, amforovité a zásobnice kvadratického tvaru. Amforovité zásobnice je možné ještě dále rozvětvit na dva další typy. Prvním typem je amforovitá zásobnice s válcovitým hrdlem a druhým typem jsou amforovité zásobnice, které mají nálevkovité hrdlo (Jiráň 2008).

2. Možnosti testování organických zbytků na archeologické keramice

V současnosti je několik postupů, jak je možno studovat zbytky po historických potravinách. Nejrozšířenější a nejuznávanější je pomocí hmotnostní spektrometrie, (zkratka MS z anglického *Mass spectrometry*). Metoda byla poprvé pro archeologické zbytky potravin využita již v roce 1991 (Oudemans a Boon 1991). Proteiny pro analýzu hmotnostní spektrometrií musí být nejprve upraveny, například za použití gelové elektroforézy, nebo extrakcí v roztocích (Barnard et al. 2007). Následně se použije enzym trypsin, který funguje jako činidlo k rozštěpení (fragmentace) proteinů do kratších peptidických řetězců, jež je pak možné analyzovat hmotnostní spektrometrií. Rozdělené peptidické řetězce jsou rozpuštěny v roztoku a na základě jejich schopnosti slučovat se s jinou látkou nebo částicí jsou přitahovány k podkladu, kde se buď zachytí, nebo projdou dále (Pollard et al. 2007; Barker 2010). Samotný přístroj je složen z 3 základních částí – detektor částic, analyzátor a iontový zdroj (Friedecký a Lemr 2012). V iontovém zdroji jsou neutrální plynové molekuly upravovány na nabitě částice (ionty). V analyzátoru dochází k rozřazování nabitých částic na základě jejich efektivních hmotností. V poslední části přístroje, nazývané jako detektor, dochází k výpočtu výskytu nabitých částic v reálném čase (Karasek a Clement 1988; Lee 2012). Principem hmotnostní spektrometrie je určení hmotnosti iontů pomocí jejich efektivní hmotnosti (hmotnost iontu/náboj). Prvním krokem hmotnostní spektrometrie je odpařování vzorků. Poté následuje ionizace pomocí UV záření (APPI) nebo laseru (Friedecký a Lemr 2012). Vzniklé nabitě částice jsou dále rozřazovány dle jejich efektivní hmotnosti v části přístroje, nazývané jako analyzátor, kde je elektrické nebo magnetické pole (Karasek a Clement 1988; Lee 2012; Friedecký a Lemr 2012). Celý proces detekce probíhá v uzavřeném systému ve vakuu. Tato metoda se krom analýzy proteinů dá využít i k analýze alkaloidů či lipidů. Kromě určování neznámých látek lze hmotnostní spektrometrie využít například ke zjišťování struktur látek (Karasek a Clement 1988; Lee 2012). Mezi hlavní nevýhody hmotnostní spektrometrie patří náročná manipulace a potřeba speciálních kroků při práci s archeologickými vzorky (Barker 2010; Čiperová 2015). Další nepochybnou nevýhodou je neschopnost identifikace druhově specifických proteinů, jež se nacházejí v mléce a bez toho je nemožné

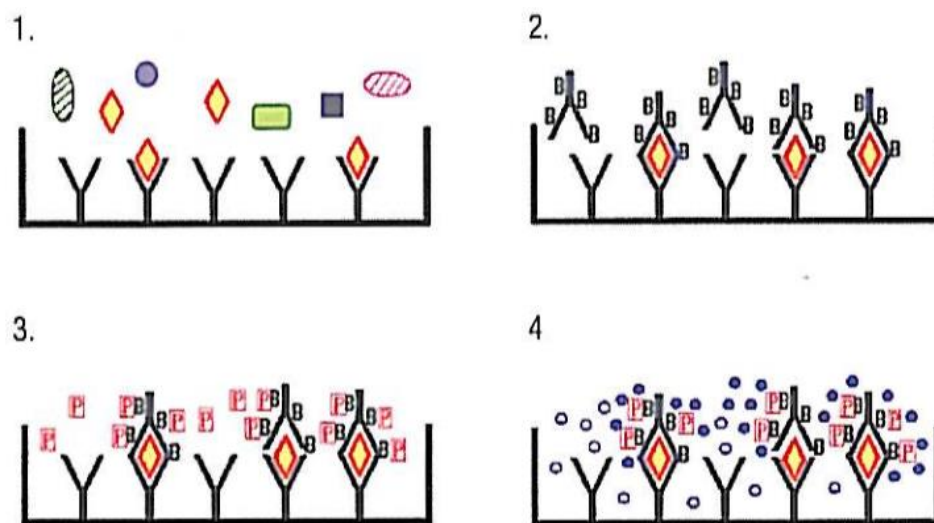
určit konkrétní druh mléka (viz Pavelka a Vařeka 2008; Pavelka a Orna 2011). Výhody této metody souvisí s vyšší přesností výsledků a snazší opakovatelností (Barker 2010).

Lipidy se v porézní keramice uchovávají velmi dobře, z důvodu jejich ochrany před fyzikálními a biologickými vlivy z okolí (Evershed 1993, Evershed et al. 1999). Hmotnostní spektrometrie nám částečně dovoluje odlišovat od sebe lipidy zdomácnělých zvířat (kozy, prasata, ovce, tur) (Mottram et al. 1999). Ovšem k dokonalejším identifikacím není tato metoda vhodná. Díky hmotnostní spektrometrii byly analyzovány lipidy na porézní keramice z Velké Británie a z výsledků je zřejmé, že lidé se po nástupu zemědělství začali místo z mořských úlovků živit vyprodukovanými potravinami (Cramp et al. 2014). Toto nepřímo potvrzuje i předešlá studie, jež zkoumala mléčné lipidy v keramice na území Británie z dob neolitu (Copley et al. 2003). Až u 25% vzorků byla potvrzena přítomnost mléka v keramice (Copley et al. 2005).

Tato metoda byla využita i k analýze vzorků, u kterých se předpokládala přítomnost alkaloidů, z období Middle Woodland, které se používá pro datování v Severní Americe (1000 př.nl. – 1000 n. l., a zahrnuje období od archaických lovců sběračů do zemědělců Mississipské kultury). Zde se pomocí hmotnostní spektrometrie podařilo prokázat například alkaloid nikotin (Rafferty 2002), nebo bylo možné prokázat alkaloid harmin, který se nalézá v některých rostlinách. Tyto výsledky potvrdily rozsáhlý obchodní systém s tímto zbožím v indiánských kulturách, protože tento alkaloid byl prokázán i v místech, kde se tyto rostliny nevyskytují (Ogalde et al. 2009). Hmotnostní spektrometrie se využilo i při zkoumání keramických nádob ze starověkého Egypta. Podařilo se určit řadu látek, které napovídají o využití nádob. Ze získaných výsledků se předpokládá, že nádoby byly využívány na alkohol (bílé víno) (Guasch-Jané et al. 2006).

Metoda založená na systému antigen-protilátka je brána spíše skepticky z důvodů používání protilátek primárně určených pro identifikaci nativních proteinů na denaturované historické proteiny. Problém spočíval v nespecifických reakcích označovaných také jako cross-reakce. K těmto reakcím dochází mezi protilátkami a jinými antigeny, než je typ, proti kterým byly vytvořeny (Child a Pollard 1992; Brandt et al. 2002). Těmto nežádoucím reakcím se dá vyhnout. Je nutné, aby byly využity protilátky, které budou reagovat pouze s denaturovanými proteiny, které se v archeologických vzorcích nachází. Ovšem to není možné bez znalosti o jejich

formě (Craig et al. 2000). Pro identifikaci proteinů pomocí imunologického systému antigen-protilátka lze velmi dobře využít komerčních sad, jež se využívají k identifikaci potravin. Výhodou je snadná opakovatelnost (Pavelka a Vařeka 2008; Pavelka a Orna 2011). Těchto komerčních sad lze využít především proto, že dostupné protilátky jsou připravovány právě pro detekci denaturovaných proteinů (Björklund et al. 2001), které jsou denaturovány stejným způsobem, jako proteiny nacházející se v archeologických nálezích. Tato metoda založená na systému antigen-protilátka se nazývá také ELISA test a lze ji jednoduše vysvětlit ze schématu (viz Obr. 3.).



Obr. 3. Průběh ELISA testu (Neogen Corporation[®]).

2.1 Proteiny (bílkoviny)

Proteiny, nazývané též jako bílkoviny, jsou jednou z nepostradatelných a nenahraditelných složek potravy pro každého živočicha. Mezi potraviny s nejvyšším obsahem bílkovin patří všechny druhy masa, vejce ale také luštěniny (Doubrava et al. 1984). Proteiny se řadí mezi makromolekulární sloučeniny, jež jsou tvořeny ze stovek molekul aminokyselin ať už esenciálních nebo neesenciálních. Tyto molekuly jsou propojovány pomocí peptidických vazeb (Ledvina et al. 2009; Matouš et al. 2010; Koolman a Röhm 2012). Stavba proteinu je ovlivňována rozložením jednotlivých aminokyselin v řetězci (Alberts et al. 2005). Na stavbě proteinů se podílejí kromě aminokyselin a peptidických vazeb i další vazby. Můžeme mezi ně zařadit vodíkové můstky, jež se nachází mezi jednotlivými složkami aminokyseliny ale také slabé van der Waalsovy síly (Alberts et al. 2005). S těmito vazbami souvisí i jejich snadná degradace (Alberts et al. 2005). Struktura proteinů má několik úrovní, přesněji 4 (Alberts et al. 2005). Primární struktura proteinu je dána pořadím jednotlivých aminokyselin v řetězci. Sekundární struktura proteinu je určena prostorovým uspořádáním aminokyselin (α -šroubovice a β -skládané listy) (Ledvina et al. 2009; Matouš et al. 2010; Koolman a Röhm 2012). Terciální struktura proteinu je definována jako trojrozměrná konformace z řetězců peptidů (Alberts et al. 2005). Kvarterní struktura proteinu souvisí s vyšším počtem polypeptidických řetězců (Alberts et al. 2005). Kvarterní strukturu můžeme nalézt u hemoglobinu (Ledvina et al. 2009; Matouš et al. 2010; Koolman a Röhm 2012). Imunitní systém živočichů vytváří protilátky, jež slouží organismu k obraně před nežádoucími vlivy okolí ale i samotného organismu. Tyto protilátky jsou svojí stavbou řazeny mezi proteiny (Alberts et al. 2005). Na principu systému antigen-protilátka jsou založeny testovací metody v této práci. Tato testovací metoda je běžně využívána v medicíně pro testování na alergeny (Pavelka a Vařeka 2008).

2.1.1 Proteiny a jejich denaturace v čase

V posledních letech se v archeologii začalo využívat k analýze proteinů porézní keramiky. Keramické nádoby byly hojně užívány, proto je vysoká pravděpodobnost nálezu proteinů v matrixu keramiky. Mimo jiné jsou proteiny v keramice částečně chráněny před denaturací. Kvůli tomu je výhodné provádět analýzu proteinů nalezených v této keramice (Craig a Collins 2000).

V minulosti byly analyzovány proteiny staré 60 až 80 milionů let (Asara 2007; Schweitzer et al. 2009) ale i přes tyto úspěchy není identifikace proteinů snadná. Dochází u nich k řadě procesu, jež způsobují rozpady nebo jiné deformace polypeptidických řetězců (Barnard et al. 2007). Další problémy se vyskytují při získávání proteinů z porézní keramiky. Van der Waalsovy a další síly, které se vyskytují ve struktuře proteinů, způsobují to, že se proteiny ke keramice „přichytí“ a jejich následné vylouhování je velmi náročné (Baker 2010). S použitím nové metody ELISA testů je možné keramiku rozmělnit a analyzovat spolu se zkoumanými proteiny (viz Čiperová 2015).

Denaturace proteinů znamená změnu terciální struktury (Pavelka a Orna 2011). Při tomto procesu dojde rozpadu dlouhých řetězců na kratší úseky. Existují tři možné denaturace. Prvním typem denaturace je chemická denaturace a ta souvisí s interakcemi keramiky s chemickými látkami, jež se vyskytují v půdě. Druhým typem denaturace je fyzikální denaturace, která souvisí se zvýšenou teplotou. K fyzikální denaturaci tedy dochází při přípravě pokrmů. Vliv dekompozitorů spadá pod biologickou denaturaci (Barnard et al. 2007). Bylo ale prokázáno, že proteiny nalézající se v porézní keramice jsou částečně před vnějšími vlivy chráněny a proto u nich k denaturaci dochází o něco méně (Craig a Collins 2000; Baker 2010; Eerkens 2005). Jeden z největších důvodů způsobující denaturaci proteinů v porézní keramice jsou mikroorganismy spolu s půdní zvířenou (mezofauní živočichové) (Loll a Bollag 1983).

Konzervované proteiny nacházející se v archeologické porézní keramice jsou relativně oblíbené, jelikož jejich identifikace je stále jednodušší, než u archaické DNA, u které dochází k hydrolýze (Gerlach et al. 1995; Hofreiter et al. 2001). Dalším důvodem je i mnohonásobně větší množství vzorků, než u archaické DNA (Gerlach et al. 1995). Kromě keramiky je můžeme analyzovat z fosilií (Schwiezter et al. 2009), ze sedimentů (Belluomini et al. 1986),

z nástěnných maleb (Tokarski et al. 2006; Kuckova et al. 2007; Fremout et al. 2009) a nástrojů (Kooyman et al. 2001).

2.2 Zkoumané proteiny

V této práci se nám v keramických střepech podařilo nalézt řadu proteinů.

2.2.1 Mléčný protein – Kasein

Kasein je mléčný fosfoprotein, který se v mléce nalézá ve formě micel a kaseinových komplexů. Micely jsou tvořeny přibližně z 90 % kaseiny, dále z vápenatých iontů, volného fosfátu a fosfoserinu (Kasper a Burghardt 2015; Velíšek a Hajšlová 2009; Svačina et al. 2008). Kasein je důležitý protein podílející se na růstu a rozvoji nově narozených živočichů a to kvůli svému obsahu aminokyselin a biogenních prvků (Slaná 2018). Během trávení kaseinu ve střevech živočichů se kasein mění na β -kasomorfiny. Ty se řadí mezi heptapeptidy a jsou odolné proti intestinálním proteázám. Tyto peptidy nepřechází skrze cévní stěny do krve a zkoumá se jejich potenciál v medicíně pro léčbu průjmových onemocnění (Kasper a Burghardt 2015; Velíšek a Hajšlová 2009; Svačina et al. 2008).

Kaseinové micely mají specifickou multimolekulární strukturu, která se jeví zrnitá a je složena z více podobných proteinů. Tato morfologie kaseinu pomáhá během trávení v trávicím traktu vzniku hmoty připomínající gel, díky čemuž jeho trávení trvá déle, než u jiných proteinů nalézajících se v mléce (Cockburn 2010). Velikost multimolekulárních kaseinových struktur nazývaných jako micely se pohybuje v řádu desítek až stovek nanometrů (Cockburn 2010). Kasein je typický pro různá mléka savců, ale je otázkou, zda komerční protilátky jsou po archeologizaci v půdě, schopné detekovat kasein z různých druhů savců. Testování vzorků z různých předem definovaných druhů, by mělo být jedním ze závěrů práce.

2.2.2 Mléčný protein – β -lactoglobulin

Mezi mléčné proteiny se kromě kaseinu řadí i syrovátkový protein β -lactoglobulin. Tento protein se v kravském mléce vyskytuje v řádu jednotek procent. Tento protein se ale nevyskytuje jen v kravském mléce, ale můžeme jeho stopy nalézt

i v mléce ovčím (Čiperová 2015; Slaná 2018). Testovaný β -lactoglobulin je globulární protein, u kterého je primární struktura tvořena 162 aminokyselinovými zbytky (Čiperová 2015; Slaná 2018). Během 80. let minulého století se podařilo popsat jeho celkovou aminokyselinovou sekvenci (Whitney et al. 1976). Klíčovou otázkou pro další testy a interpretace bylo, zda a jak je tento protein detekovatelný po archeologizaci v půdě. A podobně, zda je nějaká reakce také u mléka z jiných druhů, než je skot, protože protilátky byly připravené speciálně proti β -laktoglobulinu skotu. Na antigeny jiných druhů, než je skot, by protilátky neměly reagovat vůbec, nebo velmi slabě.

2.2.3 obilný protein – Gliadin

Gliadin je protein, který se řadí do kategorie monomerních proteinů. Jedná se o protein tvořený z jedno řetězcových polypeptidů, jehož obsah v obilí se pohybuje v řádech desítek procent. Mimo jiné jsou gliadiny alkoholem rozpustné na polymorfni směsi (Anderson a Greene 1997). Gliadin je protein s globulárním charakterem, který je daný vazbami v molekule, které se nazývají jako cystein disulfidové můstky (Shewry et al. 2003).

3. způsoby detekce proteinů

3.1 ELISA test – Sendvičová ELISA

Detekce masa byla prováděna pomocí přímého sendvičového ELISA testu Neogen Corporation[®] Biokits for Species Identification, který je speciálně vytvořený pro detekci tepelně degradovaných proteinů. Tento kit byl využíván pro detekci kravského a prasečího masa. Stejně metody je využito u obou výše zmíněných druhů mas, kromě toho lze této metody využít i pro detekci podobných druhově specifických proteinů. Protilátky celé této série kitů jsou schopné detekovat denaturované proteiny nejen z masa, ale i z jiných částí těl savců a reakce antigen-protilátka je stále druhově specifická:

1. Připravit si mikrotitrační destičky s dostatečným množstvím mikrotitračních jamek, které bude potřeba k danému testování.

2. Dále si připravit dostatečné množství promývacího roztoku a následně i extrakčního roztoku.

3. Na automatické pipetě se nastaví 100 µl. Toto množství pozitivní kontroly nebo extraktu vzorku se následně odpipetuje do připravených mikrotitračních jamek. Aby bylo možné se vyhnout kontaminacím už v této fázi, je důležité pro každé pipetování nového vzorku vzít novou špičku.

4. Mikrotitrační destičky s napipetovanými vzorky se nyní musí mírně promíchat protřepáním. Následně se nechají inkubovat nejméně 45 minut, ale je vhodnější je nechat 60 minut. Inkubace vzorků by měla probíhat při pokojové teplotě.

5. Poté je možné vzorky odpipetovat zpět a využít dále při dalších testech, jelikož nedojde k jejich znehodnocení.

6. První promývací fáze, kdy se každá jamka promyje promývacím roztokem nejméně 3x, ale je vhodné vícrát.

7. Pomocí pipety se do mikrotitračních jamek přidá 50 µl biotinu.

8. Mikrotitrační destičky s napipetovaným biotinem se nyní musí mírně promíchat protřepáním. Následně se uloží do tmy a nechají se inkubovat 45 minut. Inkubace vzorků by měla probíhat při pokojové teplotě.

9. Druhá promývací fáze, kdy se mikrotitrační jamky promyjí nejméně 3x promývacím roztokem.

10. Ke vzorkům se přidá 50 μ l konjugát avidin peroxidázy, což je enzym peroxidáza získávaný z křenu.

11. Destičku s mikrotitračními jamkami je třeba v ruce mírně protřepat a nechat inkubovat 15 až 20 minut při pokojové teplotě, jako tomu bylo v předešlých krocích.

12. Třetí promývací fáze, kdy je třeba jednotlivé jamky promývat alespoň 5x, ale je vhodné toto promytí provést vícekrát.

13. Ke každému testovanému vzorku se napipetuje 100 μ l TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) substrátu.

14. Destička se vzorky se musí opět protřepat, zakrýt a nechat inkubovat po dobu minimálně 45 minut nejlépe ve tmě při pokojové teplotě.

15. Do všech mikrotitračních jamek se vzorky se přidá 50 μ l roztoku kyseliny fosforečné, jelikož se v předešlých studiích osvědčila velmi dobře (obecně se přidává pod komerčním názvem stop solution).

16. Následně je třeba jamky se vzorky a roztokem kyseliny fosforečné protřepat, čímž by mělo dojít ke změně barvy z modré na žlutou (dojde k zastavení reakcí).

17. Pro získání dat se provede spektrofotometrická analýza. Tato analýza byla prováděna na ELISA readru VERSAmaxTM (Molecular Devices) při vlnové délce 450 nm.

Testy, jež byly využity na detekci různých proteinů, jsou specifické pro konkrétní druh masa, respektive i dalších druhově specifických proteinů, protože je možné určit konkrétní druh domácího zvířete, ze kterého proteiny pochází. Podařilo se vyvinout metodiku, která rozliší původní historické

proteiny z pokrmů a kontaminace z nedenaturovaných proteinů trusu hospodářských zvířat, který je součástí zemědělských hnojiv a kontaminuje často archeologickou keramiku (Slaná 2018). Klíčovou roli v tomto rozlišení hraje tepelná úprava proteinů (Fišerová 2019).

Bylo zjištěno, že tuto metodu rozlišování původních proteinů od současných kontaminací pomocí kitu od firmy Neogen Corporation[®] Biokits for Species Identification lze využít pouze na prasečí proteiny (*Sus scrofa domesticus* nebo *Sus scrofa*). Experimentálně bylo vyzkoušeno testování proteinů nacházejících se v ovčím i kravském mase. Bohužel funkčnost protilátek rozlišit tepelně denaturované od netepelně nedenaturovaných proteinů nebyla prokazatelná (Fišerová 2019).

3.2 ELISA test – Kompetitivní ELISA

Pro detekování proteinu β -lactoglobulinu byla využita u všech vzorků metoda kompetitivní ELISA od firmy Neogen Corporation[®] Biokits for Species Identification .

1. Příprava kitu a potřebných suspenzí se vzorky.
2. Do připravených mikrotitračních destiček se do každé jamky napipetuje 100 μ l nulového standardu, BLG standardy (A-E), vzorky a kontrolní vzorky. Vždy je potřeba použít novou špičku, aby se předešlo kontaminacím, které by způsobily nepřesnost detekce a tím i samotných výsledků.
3. Je velmi nutné okamžité přidání 50 μ l BLG biotinu ke všem testovaným vzorkům. U kompetitivního ELISA testu je toto primární krok, bez kterého by detekce tímto způsobem nemohla být prováděna. Antigeny vzorku a kontrolní antigeny mezi sebou soutěží o konkrétní protilátky. Zpětná recyklace vzorků pro jiné testy je po tomto kroku velmi nevhodná.
4. Mikrotitrační destička se nyní nechá při pokojové teplotě třepat na třepačce po dobu nejméně 60 minut.
5. Roztoky se z jamek vyklepnou nebo odpipetují a následně se jamky se vzorky promývají promývacím roztokem a to nejméně 5x. Je vhodné jamky ale promývat víckrát.

6. Do jamek se vzorky se pipetou přidá 50 µl konjugát avidin peroxidázy.
7. Druhá třepací fáze, která trvá nejméně 15 minut a probíhá opět při pokojové teplotě na automatické třepačce.
8. Roztoky se z jamek se vzorky vyklepnou nebo odpipetují a následně se jamky se vzorky promývají promývacím roztokem a to nejméně 5x. Je vhodné to ale promývat víckrát. Vyklepávání zbytků tekutin je vhodné provádět na papírových utěrkách nebo jiném dobře sacím materiálu (po každém promytí).
9. Ke všem vzorkům se napipetuje 100 µl TMB substrátu.
10. Proveďte se jemné protřepání mikrotitračních jamek pouhou rukou. Protřepaná mikrotitrační destička se nechá při pokojové teplotě na vhodném místě inkubovat a to nejméně 45 minut. Je vhodné destičku nechat inkubovat až 60 minut.
11. Do všech testovaných vzorků se přidá 50 µl kyseliny fosforečné (obecně stop solution). Poté se provede mírné promíchání v ruce. Dojde k zastavení všech probíhajících reakcí a mělo by také dojít téměř ihned ke změně barvy z modré na světle žlutou.
12. Pro získání dat se provede spektrofotometrická analýza. Tato analýza byla prováděna na ELISA readeru VERSAmax™ (Molecular Devices) při vlnové délce 450 nm.

3. 3 ELISA testy pro zbylé proteiny

U zbylých vzorků byly pro detekci dalších proteinů (kasein, gliadin) využity ELISA testy typu VERATOX od firmy Neogen Corporation®. Gliadin je protein, jež nám slouží k prokázání obilí v daných vzorcích.

Kasein

1. Do připravených mikrotitračních destiček se samostatně do každé jamky napipetuje 150 µl vzorků a pozitivních kontrol. Vždy je vhodné použít novou špičku.
2. Do každé jamky s protilátkami se přidá 100 µl zchlazených vzorků a pozitivních kontrol. Poté se nechá inkubovat nejméně 10 minut. Osvědčilo se nám ale inkubační dobu navýšit na 30 až 50 minut.

3. Tekutiny z jamek se odstraní jedním rychlým vyklepnutím. Následně se jamky pečlivě promyjí pomocí promývacího roztoku a automatické pipety a to nejméně 5 krát. Dle vlastního uvážení je možné provést více promytí.
4. Zbytky tekutin se z jamek vyklepají na rovném povrchu na sací materiál, který slouží ke kontrole. Je vhodné použít papírové utěrky nebo filtrační papír.
5. Přidá se 100 µl konjugátu ke každé jamce s protilátkou. Konjugát se musí vždy připravit čerstvý, jinak by jeho účinnost mohla být výrazně menší nebo žádná. Je vhodné, také k tomuto kroku, využít automatickou pipetu se 6, 8 nebo 12 kanálky.
6. Nechá se inkubovat po dobu 10 minut v klidu.
7. Tekutiny z jamek se odstraní vyklepnutím.
8. Následně se jamky pečlivě promyjí pomocí promývacího roztoku a automatické pipety s 12 kanálky a to nejméně 5x po sobě.
9. Zbytky tekutin se z jamek vyklepnou na rovném povrchu na savý materiál, který slouží ke kontrole. Je vhodné použít papírové utěrky nebo filtrační papír. V jamkách nesmí zůstat žádná tekutina.
10. Do jamek na mikrotitrační destičce se pomocí pipety přidá 100 µl substrátu a nechá se v klidu inkubovat po dobu 10 minut.
11. Pomocí automatické pipety se ke každému vzorku s protilátkami přidá 100 µl stop solution, výrobce doporučuje svůj roztok „Red Stop“, který se na archeologické vzorky příliš neosvědčil, proto byl použit roztok kyseliny fosforečné, který se nachází v kitu pro detekci masových proteinů.
12. Roztok substrátu a kyseliny fosforečné se nechá alespoň 10 minut inkubovat.
13. Pro získání dat se provede spektrofotometrická analýza, která byla prováděna na ELISA readru VERSAmax™ (Molecular Devices) při vlnové délce 450 nm.

Gliadin

Pro detekci obilného proteinu gliadin byla použita testovací sada speciálně připravená pro tento protein od firmy Veratox®.

1. Příprava extrakčního roztoku (55 % ethanol a 45 % destilovaná voda).

2. Příprava zředěných roztoků z jednotlivých extraktů vzorků.
3. Do plastových zkumavek o objemu 1,5 ml se nasype 0,5 miligramů vzorku, který je rozmělněný na velmi jemný prášek.
4. Firma, jež tento kit vyrábí, uvádí přidání ke každé zkumavce lžičku přibaleného extrakčního aditiva. Tento krok se ovšem ukázal jako nevhodný a je výhodnější toto aditivum nepřidávat.
5. Přidání 100-150 μ l 55% ethanolu a následně se provede důkladné promíchání obsahu zkumavek na přístroji značky vortex. Doba třepání by měla být nejméně 20 sekund, ale neměla by přesáhnout 40 sekund.
6. Zkoumané vzorky se extrahují třesením o velikosti 150 rpm pomocí rotátoru nebo s využitím orbitálního shakeru. Třesení probíhá při pokojové teplotě po dobu 15 až 20 minut.
7. Nádoba se zkoumanými vzorky se vloží do stojanu na několik minut.
8. Odeberou se vzorky hned poté, co se usadí materiál, jež byl třesením rozvířen.
9. Odebere se 100 μ l extraktu z vrchních vrstev a vloží se do připravených plastových zkumavek, které jsou naplněny 1,5 ml PBS. Tímto se každý ze vzorků naředí v takovém poměru, který je pro tuto metodu vhodný.
10. Následuje poslední krátká promíchávací fáze, kterou stačí provést pouhou rukou případně krátkým promícháním na přístroji vortex.
11. Probíhá testování připravených a upravených vzorků. Je vhodné provést testování ihned.

3. 4 Experimentální archeologizace

Rozhodli jsme se účinnost detekcí na archeologické proteiny otestovat pomocí vlastních testů, které je možno jednoduše zopakovat. Tento typ testů by se dal zahrnout do kategorie experimentální archeologie (tab. 3.). Aby byly napodobeny co nejvíce podmínky, s kterými se setkávají archeologické proteiny, byly použity porézní keramické střepey. Do těchto střepeů jsme následně nechali nasáknout jednotlivé druhy mléka (kravské, kozí a ovčí). V případě ovce bylo místo mléka použit čerstvý sýr, z důvodu obtížného sehnání toho druhu mléka. Mléko bylo použito od farmářů, bez jakékoliv úpravy v podobě pasterizace, tak aby bylo použito mléko, které je svým složením a konzistencí podobné mléku, které používali v době bronzové. Keramické zlomky byly poté zakopány do hlíny

v hloubce kolem 35 centimetrů a ponechány okolním vlivům. Tato experimentální archeologizace střepeů probíhala více jak dva měsíce. Pro kontrolu kontaminací z půdy byly odebrány i vzorky hlíny v místě experimentu. Kvůli možnostem, které se nabízely, bylo rozhodnuto otestovat i lidské mateřské mléko. Všechny vzorky byly odebrány ze střepeů stejným způsobem, jako v předešlých testech, pomocí ostrého kovového nástroje. Vzorky byly odebírány z hloubky několika milimetrů a povrchové vrstvy byly vyhozeny, aby se předešlo možným kontaminacím vzorků.

3.5 Vyhodnocení výsledků

Za negativní kontrolu byla považována taková kontrola, která není zbarvena vůbec. Zatímco pozitivní kontrola je zbarvena světle žlutě a lze to poznat pouhým okem. Za pozitivní výsledek u jednotlivých vzorků považujeme výsledky, které se svým zbarvením přibližují výsledkům pozitivní kontroly. Jsou-li vzorky zbarveny výrazně méně než je pozitivní kontrola, tak takové výsledky považujeme za slabě pozitivní. Všechny ostatní vzorky a jejich výsledky jsou brány jako negativní. Někdy se můžou vyskytnout velmi málo zbarvené vzorky a takové vzorky bereme jako velmi slabě pozitivní případně, jako nespecifické reakce. Stanovování výsledků za použití pouhého oka není příliš přesné, tak při našich testech bylo využito spektrofotometrického vyhodnocování za použití přístroje ELISA readru VERSAmax™ (Molecular Devices) při vlnové délce 450 nm. Pomůckou byly vzory hodnocení na firemních návodech ke každému kitu, ze kterých bylo vždy nějakým způsobem vycházeno.

4. Výsledky

U několika vybraných nádob (Tab. 2.) se podařilo celkem úspěšně prokázat přítomnost mléka skotu, ale u většího souboru (Tab. 1.) přítomnost mléčných proteinů nebyla tak výrazná, jak se předpokládalo, našly se jen u menšího počtu vzorků. Další hypotézou, kterou bylo nutno zvážit, bylo, že tento typ nádob se používal na pivo. Avšak přítomnost gliadinu byla poměrně nízká, je pravda, že není zatím jasné, jak testy zachytávají ječmen, ale přítomnost pšenice je velmi málo výrazná a i u několika pozitivních nálezů byly výsledky tak slabé, že je existence obilí, či spíš obilných produktů, v těchto nádobách, spíše nepravděpodobná. Pšeničná piva lze přitom v minulosti očekávat mnohem výrazněji než v současnosti. Naproti tomu proteiny prasat se vyskytují hojněji a jsou to převážně proteiny tepelně upravované, nikoliv kontaminace z hnoje či současného zemědělského hnojení. Nicméně vyskytují se i v kontrolní zemině, kde pravděpodobně představují pozůstatek po kuchyňském odpadu. Podobně hovězí proteiny, u lokality Praha-Modřany jsou sice dobře detekovatelné u keramiky, ale nachází se též u kontrolní hlíny. U lokality Rataje vychází kontrola negativně, což prozrazuje, že půda, ve které jsou nálezy, není kontaminovaná současnými proteiny, ale výsledky na amforách byly negativní až na slabou přítomnost mléčných proteinů, naopak zde překvapivě přinesla úspěšné výsledky hmotnostní spektrometrie, pomocí které byly na keramice detekovány proteiny savců a vzorek u kterého přinesla metoda ELISA mírně pozitivní výsledky na kasein, prokázala i hmotnostní spektrometrie totéž.

Data získaná pomocí hmotnostní spektrometrie korespondují u daných souborů s ELISA testy jen částečně (viz Tab. 1.). Vždy byly identifikovány hovězí proteiny, což ale souvisí se způsoby detekce a zpracováním výsledků v databázích, kde u savčích proteinů je automaticky abecedně z aminokyselinových sekvencí vyhodnocen na prvním místě *Bos taurus*, i když se daná sekvence aminokyselin vyskytuje u řady jiných savců. Převážně se jedná o kolagenní proteiny několika typů, ale byl zaznamenán i alfa-S1-kasein a β -kasein. Pomocí hmotnostní spektrometrie byly nalezeny savčí proteiny jak v tzv. sintru na hrdle keramické amfory, tak v kontrolní hlíně, ale nikoliv na keramice. V případě sintru není jasné, zda identifikované proteiny byly součástí keramiky, nebo okolní zeminy, takže určit jejich původ je obtížné. Savčí proteiny

byly také nalezeny v hlíně na dně keramiky z lokality Rataje, kde naopak nebyly pomocí ELISA testů proteiny z domácích zvířat žádné pozitivní výsledky. O něco víc signifikantněji vyšel vzorek z amfory z Písku, kde výsledky hmotnostní spektrometrie korespondují s ELISA testy. Bohužel u vzorků z Milenovic se z finančních důvodů, nepodařilo provést všechny potřebné ELISA testy.

Účinnost detekcí historických proteinů byla testována pomocí testů, které je možno zahrnout pod kategorii experimentální archeologie (tab. 3.), kromě ovce byly všechny proteiny potvrzeny, dle očekávání. β -lactoglobulin reaguje na mléko skotu a velmi slabě na ostatní mléka, na mléko skotu v hlíně, které bývá součástí mnohých organických hnojiv, asi nereaguje, i když testy na mléčný protein kasein jeho přítomnost v půdě zaznamenávají. Kasein byl detekován ve všech případech kromě ovce, což potvrzuje jeho dobrou perzistenci v půdě.

Naše experimentální výsledky prokázaly, že v lidském mateřském mléce stopy β -lactoglobulinu nenalezneme, stejně tak jako v mléce kozím.

Tab. 1. ELISA testy na proteiny z potravin z archeologické keramiky (amfory a zásobnice, případně zlomky z nich).

Typ keramiky	Lokalita	Kasein mléko	Beta lacto skot	Gliadin obilí	Hovězí proteiny	Prase proteiny nevařeno	Prase Proteiny vařeno	Hmotnostní spektrometrie	Určení proteinu, dle databáze
amfora	Praha Modřany	"++"	0	"+"	"0 +"	0	"0 +" K	Collagen alpha-1(I) chain Collagen alpha-2(I) chain	hovězí
amfora vysrážený sinter	Praha Modřany	"0+"	0	"0+"	"++"	0	"0 +" K		
Vejčítá zásobnice	Praha Modřany		0		"++"	0			
amfora	Praha Modřany	"0+"	0	"+"	"++"	"+"	"+"		
amfora	Praha Modřany	"0+"	0			"++"	"++"		
amfora	Praha Modřany	"0+"			"++"	"+"	"+"		
amfora	Praha Modřany	0	"0 +"						
amfora	Praha Modřany	0	0	0	"++"	"++"	"++"		
Vejčítá zásobnice	Rataje		0	"0 +"	0				
Vejčítá zásobnice	Rataje		0						
fragment	Rataje		0						
fragment	Rataje	0	0	0		0	0		
fragment	Rataje					0	0		
sintr u hrdla	Rataje		"0 +"		0	0	0	Collagen alpha-1(I) chain Collagen alpha-2(I) chain Alpha-S1-casein Beta-casein	hovězí
amfora	Milenovice	0	0	"+" / "0+"				Collagen alpha-1(I) chain Collagen alpha-2(I) chain Collagen alpha-1(III) chain	hovězí
zásobnice	Milenovice	0	0	"0" / "0+"					
amfora	Řepeč	"++"	0						
zásobnice	Písek				"+"	"0+"	"0+"	Collagen alpha-1(I) chain Collagen alpha-2(I) chain Collagen alpha-1(III) chain (Fragment)	
Kontrola									
Hlína z amfory	Praha Modřany	0		"0+"	"++"	"++"	"++"		
hlína	Milovice	0	0	0					
hlína na dně nádoby	Rataje		"0 +"		0	0	0	Collagen alpha-1(I) chain Collagen alpha-2(I) chain Collagen alpha-1(III) chain (Fragment)	hovězí

"++" pozitivní
 "+" slabě pozitivní
 "0+" velmi slabě pozitivní - možná nespecifická reakce
 0 negativní
 "+" / "0+" opakované měření různých částí vzorku s různými výsledky
 K kontaminace, nebo historický trus prasete

NEVAŘ – pokud je vzorek pozitivní – zřejmě původní jídlo

VAŘ – pokud vzorek předním negativní je po vaření pozitivní – zřejmě se jedná o kontaminace z prasečího hnoje

Tab. 2. ELISA testy u vybrané keramiky pouze na β -lactoglobulin skotu.

Typ keramiky	Lokalita	Beta lacto skot
amfora	Praha Modřany	"++"
amfora	Planá u Č. Budějovic	"+"
větší amfora	Roudné	"++"
amfora	Radčice	0
amforka	Mašovice	"++"
vejčitý hrnec s odsazeným hrdlem	Doubravka	0

"++" pozitivní
 "+" slabě pozitivní
 0 negativní

Tab. 3. Zlomky keramiky potřené definovanými proteiny, které byly zakopány do země a archeologizovány.

Keramické zlomky 3 měsíce v hlině

hovězí	Beta lactoglobulin	kasein	
	"0+"	"+"	Koza
	"++"	"++"	Kráva
	0	0	Ovce
	"0+"	"++"	Člověk
"++"	0	"0+"	Hlína

"++" pozitivní
 "+" slabě pozitivní
 "0+" velmi slabě pozitivní - možná nespecifická reakce
 0 negativní

5. Diskuse

Předběžně se z výsledků jeví, že představa keramiky specializované na určitý typ potravin je málo pravděpodobná i u tak typově vyhraněných nádob jako jsou amfory z našeho území. Zdá se, že byly používány na různé druhy potravin. I když je pravděpodobné, že převažovaly tekutiny. Pro kategoričtější závěr by bylo nutno provést další analýzy, především z lokality, kde nebyla okolní kontrolní hlína součástí odpadní jámy, nebo kontaminována zemědělstvím. Nicméně zůstává otázka, zda primární funkcí nebylo např. uchovávání vína a pro další potraviny byly amfory používány později. I když amfory z našeho území tvarově a mnohdy ani objemově nádoby na víno nepřipomínají. Avšak testy na víno (viz Guasch-Jané et al. 2006), by musely být prováděny na jiném specializovaném pracovišti. Z experimentálních výsledků se částečně potvrzuje, že díky zemědělství je zřejmě kasein častý v půdě, díky současnému zemědělství a snad může kontaminovat archeologickou keramiku. Podobně proteiny skotu mohou mnohdy pocházet ze současného zemědělství. Ovšem výsledků není příliš mnoho na nějaké definitivní závěry. Zejména by bylo vhodné testovat častěji hlínu v těsné blízkosti nálezů a také několik vzorků v okolí, aby se aspoň zčásti odlišily historické kontaminace z tehdejších odpadků a ze současného zemědělství.

Kontrolní hlína by musela být také odebrána z povrchových vrstev ale i z vrstev ve stejné hloubce jako nalezené keramické střepy.

5.1 Mléko

Stopy mléka v keramice nejsou tak výrazné, jak bylo očekáváno, přesto je zastoupeno na několika vzorcích a bylo také detekováno mléko kravské (Tab. 2.). Protože se z řady prací zdá, že v době bronzové, z které pochází testované vzorky, většina lidské populace v dospělém věku nebyla schopna trávit laktózu (Burger et al. 2007; Gamba et al. 2014, Witas et al. 2015) je otázka, jak byl tento mléčný cukr odstraňován. Rád bych se však nejdřív zastavil u mutace 13910 * T, která v Evropě odpovídá za trávení laktózy v dospělém věku. Mutace se šířila asi z jednoho centra, protože je aspoň pro Evropu jediná, i když v Africe jsou známy čtyři, včetně evropské (Itan et al. 2009). Šíření zřejmě souvisí se vznikem zemědělství, schopnost trávit dostupné a nezpracované mléko představovalo výhodu. A zvláště pro Evropu je nanejvýš pravděpodobné, že se mutace šířila z jednoho centra. Vznik mutace se odhaduje už na neolit (Itan

et al. 2009). Ale rychlost šíření mutace je podivně pomalá. Z archaické (aDNA) izolované z kostní hmoty bylo pomocí sekvence určeno, že neolitická populace laktózu trávit nedokázala (Burger et al. 2007). Počet zkoumaných vzorků je zatím poměrně malý, ale i tak je absence mutace zřejmá. Bylo sekvenováno deset mezolitických a neolitických vzorků z různých oblastí Evropy a dvacet tři, z toho třináct čitelných sekvencí z území současného Maďarska (neolit až doba železná) (Burger et al. 2007; Gamba et al. 2014). Mutace 13910 * T byla nalezena jen jednou a to až z doby železné (Gamba et al. 2014). Podobně vyšly výsledky z polských Kujav, šlo o 131 vzorků z kosterního materiálu z neolitu, doby bronzové, starší železné, římské éry, až po nejvíce zastoupený středověk (Witas et al. 2015). Až v období doby železné, konkrétně v halštatu se podařilo identifikovat u dvou vzorků mutaci 13910 * T, v jednom případě dokonce v homozygotním stavu. V době římské a ve středověku frekvence mutace už stoupá, a existují velké rozdíly mezi lokalitami (Witas et al. 2015). Podobně ve středověku je mutace už poměrně výrazně zastoupena, ale odlišně na různých místech (Krüttli et al. 2014; Nagy et al. 2011). Je otázkou jak se mutace Evropou šířila, domnívám se, že domněnka (Itana et al. 2009), ačkoliv vychází z matematického modelu je ve světle pozdějšího sekvenování historické DNA neudržitelná (viz Čiperová 2015). Mutace se mohla šířit od východu od pastevců kočovníků, jak tomu nasvědčuje sekvence jednoho vzorku z halštatu Maďarska, kde byla nalezena v kostře, v kočovnickém hrobě (Gamba et al. 2014). Nebo naopak ze západu, sekvence z Baskicka, prozrazují, že mutace dosahovala na svou dobu velmi vysokého zastoupení 27 % už ve velmi časném období přibližně po roce 3000 př. n. l. (Plantinga et al. 2012). Což by naznačovalo vznik na západě, možná v Africe. Nicméně pro předkládanou práci je podstatné, že lidí schopných trávit, ve střední Evropě v době bronzové v dospělém věku, laktózu bylo poměrně malé procento. Mléko muselo být proto na požitelnou potravinu nějak zpracováváno. Nabízí se samozřejmě kysnutí, sýření a kvašení mléka (Čiperová 2015). Pro tento účel je možné využívat řadu technik v různých nádobách z různých materiálů. Zdá se, že poměrně malé zastoupení v amforovitých nádobách nasvědčuje, že nebyly k tomuto účelu využívány. Spíš měly primárně jiné využití.

5.2 Obilí

Důkaz obilí na archeologické keramice pomocí hmotnostní spektrometrie ať už na bázi proteinů či dokonce lipidů není v odborné literatuře zmiňován, v případě lipidů je to zcela pochopitelné, protože množství lipidů v cereáliích je poměrně malé. Obiloviny jsou přitom základní evropskou a předovýchodní plodinou. Jediné nalezené důkazy přítomnosti obilí na keramice pochází z pracoviště ZČU (Pavelka a Vařeka 2008; Slaná 2018; Chytráček et al. – v tisku). Nálezy obilných zrn samotných jsou poměrně časté, zachovávají se zvláště díky částečnému zuhelnatění. Domestikace pšenice je v posledních letech datována do období před 10-12 tisíci lety v úrodném půlměsíci. Nejstarší nálezy shrnuje např. Özkan et al. (2011). V předkládané práci jde o mnohem mladší období, kde se předpokládá široké užití a závislost obyvatel na zemědělství a obilnářství zvláště. Kromě placek, chleba a pečiva se dá předpokládat i využití v dalších pokrmech. Ale důkazy z keramiky zatím chybí. Existují však práce, které obilniny dokazují v zubech původních obyvatel, kde se zachovávají mikrofosilní zbytky (Beck 2001, Buckley et al. 2014). Tyto analýzy se v našich podmínkách zatím neprovádí. V amforách podle zatím dosažených výsledků je obilí zastoupeno, i když nepříliš hojně (Tab. 1.). Existence obilnin v amforách nabízí několik možností využití. Asi je možno vyloučit pečivo, i když případné uchovávání proti tvrdnutí je také nutno zvážit. Nicméně nádoba je vhodná spíše pro tekutiny, tak přichází v úvahu polévky, případně řidší obilné kaše, pro které je taková nádoba méně vhodná, nicméně použitelná. Pozornost zaslouží i alkoholické nápoje vytvořené kvašením obilnin. Využití amfor pro obilné polévky a alkohol z obilí se na základě výsledků jeví vcelku pravděpodobné, nicméně se zdá, že ani k tomu primárně tento druh nádob nesloužil.

5.3. Identifikace živočišných proteinů

Detekce živočišných proteinů se u ELISA testů lišily v závislosti na lokalitě, v případě Prahy-Modřany reagovaly vzorky z keramiky velmi výrazně, zatímco vzorky z Ratají byly negativní. Pozitivní zásobnice (Písek) otevírá další úvahy o významu tohoto typu keramiky. Verifikace živočišných proteinů se v případě Prahy-Modřany podařila pouze v jednom případě, v ostatních vzorcích z lokality Praha-Modřany hmotnostní spektroskopie žádné proteiny nezachytila, v dalších případech byla výjimečně úspěšnější než analýza pomocí interakce protilátek

zejména u vzorků z lokality Rataje, kde je značná disproporce mezi oběma použitými metodami. V obou případech kontrolní hlíny se objevily pozitivní výsledky. V případě Prahy-Modřany se jednalo o živočišné proteiny v půdě, která byla nalepena na keramice. Při interpretaci výsledků se díky tomu dostáváme do problémů. Výrazně chybí vzorky hlíny z okolí nálezů, které se nepodařilo získat, mohly by pomoci rozřešit, zda hovězí proteiny v okolní hlíně u nálezů pochází z historické doby a mohou představovat „obětinu“, jak usuzuje samotný archeolog nálezce (Kovářík 1979), nebo se prozaicky jedná o kontaminace ze zemědělských hnojiv. Dva vzorky z analýz prasečích proteinů by to skutečně naznačovaly, po povaření se objevila reakce tam, kde předtím nebyla, což je pozitivní test na kontaminace (Slaná 2018), nicméně obě reakce jsou velmi slabé na hranici detekovatelnosti a navíc u ostatních vzorků z téže lokality (Praha-Modřany) jsou reakce vzácně vyrovnané a spíše jednoznačně prokazují původní historicky tepelně upravené proteiny. Takže koncept „jídelní obětiny“ (Kovářík 1979), se nejeví jako nepravděpodobný. Tomu odpovídá i celkový charakter nálezů. Nicméně zde nelze bez doplňujících analýz rozhodnout s větší určitostí.

V případě nálezů z Prahy-Modřan je vhodné se zastavit u další zajímavé skutečnosti. Keramika z tohoto výzkumu pochází z roku 1977, přesto se podařilo identifikovat proteiny. To, je zřejmě z důvodů uskladnění. Pokud jsou zbytky keramiky ve vytápěných místnostech po delší dobu, jedná se o měsíce, či spíše roky, obvykle dochází k takové degradaci proteinů, že ELISA testy nefungují (Pavelka ústní sdělení). Tento fakt by ovšem na druhou stranu opět naznačoval možnost kontaminací, kde delší existence proteinů v detekovatelné podobě je pravděpodobnější u nedávných kontaminací, než u vzorků tisíce let starých. Záleží na podmínkách depozitáře a nelze nyní již asi zjistit, v jaké teplotě byly převážně nálezy uloženy.

V případě vzorků z Ratají narážíme opět na rozporné výsledky, hmotnostní spektrometrie detekovala řadu kolagenů z hlíny na dně nádoby, která byla analyzována pro kontrolu. Tyto kolageny jsou určeny podle databáze jako „hovězí“, což ale v tomto případě může znamenat spíše „savčí“, pro podobnost savčích kolagenů. I v tomto případě jinak obvykle citlivější ELISA testy žádné hovězí ani prasečí proteiny nezaznamenaly. Samozřejmě to může také znamenat, že hmotnostní spektrometrie detekovala kolageny jiného savce, či savců. Je však otázkou jakého a co by bylo ještě třeba testovat. Např. komerční trh nenabízí

ELISA testy na denaturované proteiny hlodavců, i když na nativní je takových testů mnoho. I zde proto zůstávají výsledky špatně interpretovatelné a bylo by vhodné i zde prověřit i hlínu z různých vzdáleností od nálezů. Pokud připustíme originalitu historických proteinů v amforách, je otázka, o jaké potraviny se mohlo jednat. Protože jsou nádoby svým tvarem často nevhodné na běžné vaření, spíše se hodí na uchovávání tekutin, můžeme spekulovat o masových vývarech a polévkách.

Zajímavě se jeví také zásobnice z lokality Písek, kde živočišné proteiny potvrzují jak ELISA testy tak hmotnostní spektrometrie. Bohužel k této nádobě není kontrolní hlína, ale pokud by se živočišné proteiny prokázaly i u dalších zásobnic, musela by být poněkud přehodnocena představa, že sloužily převážně na obilí.

5. 4 Verifikace testů

Experimentální prověřování účinnosti komerčních kitů (tab. 3.), se ukázalo, jako vcelku úspěšné. Keramika s nasáknutými vzorky mléka od různých druhů byla zakopána do země a pak testována. Protože bylo přesně známo, co každý konkrétní keramický zlomek obsahuje, mohl být proveden test spolehlivosti kitů. Vzorky se po archeologizaci v hlíně chovaly podle předpokladu. Kit na β -laktoglobulin skotu reagoval silně pouze s kravským mlékem a s lidským i s kozím reagoval velmi slabě. Zvlášť zajímavý je z hlediska rozlišení kontaminací výsledek na okolní hlíně. V místě pokusu byla v kontrolní půdě slabá reakce na kasein, snad původem ze zemědělských hnojiv, ale nulová na β -laktoglobulin. Je otázka proč tomu tak je. Dá se předpokládat, že oba proteiny jsou rozpustné ve vodě, β -laktoglobulin není rozpustný v čisté vodě, i když se rozpouští ve zředěných roztocích neutrálních solí (Nagyová 2009). Takže ve spodních vodách by rozpustný být měl, podobně jako kasein, který však denaturovaný vytváří gelovité struktury. Tepelný záhřev blízko neutrální oblasti pH má také vliv na thiolovou skupinu v β -laktoglobulinové molekule. Všechny β -laktoglobuliny se spojují do malých hydrofobních molekul (Nagyová 2009). Hydrofobní molekuly denaturovaného β -laktoglobulinu by se tedy neměly rozpouštět ve vodě a neměly by proto spodními vodami doputovat k archeologické keramice. Tento fenomén by si zasloužil další testy a sledování. Je možné, že takto by se dalo rozeznat původní kravské mléko od recentních kontaminací. Ale je třeba zjistit, v jaké formě

se β -laktoglobulin z hnojiv dostává do půdy, zda obvykle denaturovaný, či nikoliv. Avšak pokud by se tento zatím omezený výsledek dále potvrdil na větším spektru vzorků, můžeme považovat všechny pozitivní výsledky v tabulce 2. za spolehlivé a původně historické proteiny.

Reakce na kasein vyšly víceméně dle předpokladu, u téměř všech testovaných vzorků se kasein projevil pozitivně. U kozího mléka byla reakce slabší, než u kravského a lidského, ale to může být shoda okolností a menším nasáknutím do keramiky.

Pouze test na ovčí proteiny byl v obou případech neúspěšný, očekávaná reakce na kasein se nedostavila. Domnívám se, že to bylo proto, že v tomto jediném případě byl na keramiku použit sýr, který asi nepronikl dostatečně dovnitř.

6. Závěr

Hlavním cílem této práce je rozlišit a následně doložit k čemu, která keramika byla v mladší době bronzové užívána. Zkoumaná keramika pochází z Knovízské kultury, která se nacházela na území současné České republiky v oblasti středních Čech přibližně 1000 let před Kristem. Keramika byla testována na přítomnost různých potravních reziduí a to zejména na mléko, obilí, hovězí a vepřové maso. Jakmile se prokázal výskyt mléka v nádobách, byly dále testovány na konkrétní druh mléka. Podařilo se rozlišit kravské a „nekravské“ mléko, předpokládáno je kozí a ovčí mléko. U Knovízské kultury se nepředpokládá mléko kobyli. Experimentálně bylo otestováno i lidské mateřské mléko. K analýze potravních zbytků v keramice bylo využito kromě hmotnostní spektrometrie převážně ELISA testů. Jedná se o systém protilátka-antigen, který svojí přesností a finanční nenáročností předčí v některých směrech hmotnostní spektrometrii. Sekundárním cílem je i příspěvek k problematice týkající se trávení laktózy u lidí v mladší době bronzové a dnes. To mělo říci, zda nalézané keramické amfory mohly sloužit k uchování mléka. Což se potvrdilo pouze částečně. V současné fázi je na základě výsledků spíše podezření na řadu různých potravin. Nové otázky přineslo hodnocení kontaminací a uchovaných živočišných proteinů v keramické matrix.

7. Shrnutí

Tato bakalářská práce se snaží navazovat na publikace dalších autorů v tomto oboru. Hlavní částí práce je studium mléčných proteinů na keramických nádobách tzv. amforách. Zkoumaná keramika se řadí do období knovízské kultury, která se nacházela na území České republiky. Ovšem keramika byla testována i na přítomnost dalších druhů proteinů, jako je obilí, vepřové a hovězí maso. Pomocí techniky antigen-protilátka využívajících degradovaných proteinů a částečně i dodaných výsledků z hmotnostní spektrometrie se pokouším zjistit původ proteinů v tomto druhu keramiky. To umožní i určení druhu potravin, pro které byly tyto nádoby používány. Mimo jiné práce zkoumá i rizika kontaminace v hlíně. Jeden z dalších cílů je i potvrzení věrohodnosti získaných výsledků. Byla zde snaha i o určitý příspěvek k problematice týkající se trávení laktózy u lidí dříve a dnes.

8. Resumé

This bachelor's work is trying to follow up the publications of other authors from this field. The main part of this work is lactic proteins examination on ceramic dishes, known as amphoras. Examined pottery belongs to Knovízian culture, which was situated on the territory of Czech republic. However, ceramics was also tested for presence of other types of proteins such as grain, pork and beef. I am trying to find out the origins of the proteins in this type of ceramics, applying antigen-antibody techniques, using degraded proteins and also partly given results from mass spectrometry. It allows us to find out about which type of food those dishes was used for. Among other things, the work analyzes the risks of clay contamination. One of the other purposes is plausibility confirmation of the obtained results. There was also some effort put in making an addition to the problems of lactose digestion of humanity now and then.

Seznam Literatury

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. a Walter, P. 2005. Essential cell biology. Espero, 740 s. Ústí nad Labem.

Anderson, O., a Greene, F., 1997. The α -gliadin gene family. II. DNA and protein sequence variation, subfamily structure, and origins of pseudogenes. Theor Appl Genet 95: 59–65.

Asara, J.M., Schweitzer, M., Freemark, L., Phillips, M., Cantley, L.C., 2007. Protein sequences from mastodon and Tyrannosaurus rex revealed by mass spectrometry. Science 360, 280285.

Barker, A. L. 2010. Archaeological proteomics: method development and analysis of protein-ceramic binding. MS, Diplomová práce, University of North Texas, 86 s. Denton.

Barnard, H., Schoemaker, L., Craig, O. E., Rider, M., Parr, R. E., Sutton, M. Q. a Yohe II, R. M. 2007. Kapitola 17: Introduction to the analysis of protein residues in archaeological ceramics. V: Barnard, H. a Eerkens, J. W. (Ed.), Theory and practise of archaeological residue analysis. Archaeopress, 216-228 s. Oxford.

Belluomini, G., Brancaj, M., Calderoni, G., Schnitzer, M. 1986. Distribution and geochemical significance of amino acids and amino sugars in a clay suite of the Pliocene – Pleistocene age from central Italy, Org. Geochem. 9, 127–133.

Beck, M., 2001. Archaeological Signatures of Corn Preparation in the U.S. Southwest. Kiva 67(2):187- 218.

Beneš, A., Michálek, J., Zavřel, P., 1999. Archeologické nemovité památky okresu České Budějovice. Praha.

Bouzek, J., 1963. Problémy knovízské a milavečské kultury, Sborník Národního muzea v Praze A 17/2-3, 57-118.

Björklund, E., Pallaroni, L., von Holst, CH. a Unglaub, W. 2001. Method of determination of appropriate heat treatment of animal meal by immunoassay developed for detection of cooked beef: Interlaboratory study. *Journal of AOAC* 84(6), 1835-1839. Dostupné z: [http://lib3.dss.go.th/fulltext/Journal/J.AOAC%2019992003/J.AOAC2001/v84n6\(nov-dec\)/v84n6p1839.pdf](http://lib3.dss.go.th/fulltext/Journal/J.AOAC%2019992003/J.AOAC2001/v84n6(nov-dec)/v84n6p1839.pdf)

Brandt, E., Wiechmann, I. a Grupe, G. 2002. How reliable are immunological tools for the detection of ancient proteins in fossil bones? *International Journal of Osteoarchaeology* 12(5), 307-316. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/oa.624>

Buckley, S., Usai, D., Jakob, T., Radini, A., Hardy, K. 2014. Dental Calculus Reveals Unique Insights into Food Items, Cooking and Plant in Prehistoric Central Sudan. *PLoS One* 9: e100808

Burger, J., Kirchner, M., Bramanti, B., Haak, W., Thomas, M. G., 2007. Absence of the lactase-persistence-associated allele in early Neolithic Europeans. *PNAS* 104/10, 3736–3741 doi:10.1073/pnas.0607187104.

Cockburn, E., Stevenson, E., Hayes, PR., Robson-Ansley, P., Howatson, G., 2010. Effect of milk-based carbohydrate-protein supplement timing on the attenuation of exercise-induced muscle damage. *Appl Physiol Nutr Metab.*; 35(3): 270-7. doi: 10.1139/H10-017.

Copley, M. S., Berstan, R., Dudd, S. N., Docherty, G., Mukherjee, A.J., Straker, V., Payne, S., Evershed, R.P. 2003. Direct chemical evidence for widespread dairying in prehistoric Britain. *PNAS* 100, 1524–1529, doi: 10.1073/pnas.0335955100.

Copley, M. S., Berstan, R., Dudd, S. N., Aillaud, S., Mukherjee, A. J., Straker, V., Payne, S., Evershed, R. P. 2005. Processing of milk products in pottery vessels through British prehistory. *Antiquity* 79, 895-908.

Copley, M. S., Berstan, R., Dudd, S. N., Aillaud, S., Mukherjee, A. J., Straker, V., Payne, S., Evershed, R. P. 2005. Processing of milk product in pottery vessels through British prehistory, *Antiquity* 79, 895-908.

Craig, O.; Mulville, J.; Pearson, M. P.; Sokol, R.; Gelsthrpe, K.; Staceyll, R.; Collins, M. 2000. Detecting milk proteins in ancient pots, *Nature* 408, 312.

Craig, O. E., Love, G. D., Isaksson, S., Taylor, G., Snape, C. E. 2004. Stable carbon isotopic characterisation of free and bound lipid constituents of archaeological ceramic vessels released by solvent extraction, alkaline hydrolysis and catalytic hydrolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 71, 613-634.

Craig, O. E., Chapman, J., Heron, C., Willis, L. H., Bartosiewicz, L., Taylor, G., Whittle, A., Collins, M. 2005a. Did the First farmers of central and eastern Europe produce dairy foods? *Antiquity* 79, 882-894.

Craig, O. E., Taylor, G., Mulville, J., Collins, M.J., Pearson, M.P. 2005b. The identification of prehistoric dairying activities in the western isles of Scotland: an integrated biomolecular approach. *Journal of Archaeological Science* 32, 91-103.

Craig, O. E., Steeleb V. J., Fischerb, A., Hartzd S., Andersene S. H., Donohoe P., Glykoug A., Saula H., Martin Jones D. M., Kochh, E., Heronb C. P. 2011. Ancient lipids reveal continuity in culinary practices across the transition to agriculture in Northern Europe. *PNAS* 108/44, 17910–17915, doi: 10.1073/pnas.1107202108.

Craig, O. E., Taylor, G., Mulville, J., Collins, M.J., Pearson, M.P. 2005. The identification of prehistoric dairying activities in the western isles of Scotland: an integrated biomolecular approach, *Journal of Archaeological Science* 32, 91-103.

Craig, O. E. a Collins, M. J. 2000. An improved method for the immunological detection of mineral bound protein using hydrofluoric acid and direct capture. *Journal of Immunological Methods* 236(1-2), 89-97. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S00221759\(99\)00242-2](https://doi.org/10.1016/S00221759(99)00242-2)

Cramp, L. J. E., Jones, J., Sheridan, A., Smyth, J., Whelton, H., Mulville, J., Sharples, N. a Evershed, R. P. 2014. Immediate replacement of fishing with

dairying by the earliest farmers of the northeast Atlantic archipelagos. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281, 1-8.

Čiperová, M., Pavelka, J., a Šmejda, L. 2015. Detekce stop mléka v porézní keramice z neolitu jihozápadních Čech a otázka trávení laktózy u evropských populací v minulosti. *Acta Fakulty filozofické Západočeské univerzity v Plzni* 7(2), 193-211.

Čiperová, M. 2015. Detekce potravin na archeologické keramice, Bakalářská práce. Západočeská univerzita. Fakulta filozofická. Katedra archeologie.

Doubrava, J., Koštíř, J.V., Pospíšil, J. 1984. *Základy biochemie*. Praha: SPN.

Eerkens, J. W. 2005. GC-MS analysis and fatty acid ratios of archaeological potsherds from the western Great Basin of North America. *Archaeometry* 47(1), 83-102.

Evershed, R. P. 1993. Biomolecular archeology and lipids. *World Archaeology* 25(1), 74-93.

Evershed, R. P., Dudd, S. N., Charters, S., Mottram, H., Stott, A. W., Raven, A., van Bergen, P. F. a Bland, H. A. 1999. Lipids as carriers of anthropogenic signals from prehistory. *Philosophical Transaction: Biological Sciences* 354(1379), 19-31. Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/56704>

Fišerová, A. 2019. Studium potravních reziduí z různých nalezišť převážně Halštatských a z doby bronzové. Plzeň, Bakalářská práce. Západočeská univerzita v Plzni.

Friedecký, D. a Lemr, K. 2012. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Bichem. Metab.* 20(41), 152-157.

Fremout, W., Sanyova, J., Saverwyns, S., Vandenabeele, P., Moens, L. 2009. Identification of protein binders in works of art by high-performance liquid

chromatography-diode array detector analysis of their tryptic digests, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393, 1991-1999.

Fröhlich, J. Chvojka, O., 2001. Knovízské osídlení mikroregionu výšinného sídliště "Skalka" u Milenovic, okr. Písek Archeologické výzkumy v jižních Čechách / České Budějovice: Jihočeské muzeum, 359 s., obr. 80-86260-13-5. 14, (2001) s. 65-158

Gamba, C., Jones, E. R., Teasdale, M. D., McLaughlin, R. L., GonzalezFortes, G., Mattiangeli, V., Domboróczki, L., Kővári, I., Pap, I., Anders, A., Whittle, A., Dani, J., Raczky, P., Higham, T. F., Hofreiter, M., Bradley, D. G., Pinhasi, R. 2014. Genome flux and stasis in a five millennium transect of European prehistory. *Nat Commun.* 21/5: 5257. doi: 10.1038/ncomms6257.

Gerlach, S. C., Newman, M., Knell, E. J., Hall E.S. Jr. 1995. Blood protein residues on lithic artifacts from two archaeological sites in the de long mountains, northwestern Alaska, *Arctic* 49, 1-10.

Guasch-Jané, M.R., Andrés Lacueva, C., Jáuregui, O., Lamuela-Raventós, R.M. 2006. First evidence of white wine in ancient Egypt from Tutankhamun's tomb. *33/8*, 1075 – 1080.

Henrickson, E. M., McDonald, M. A. 1983. Ceramic form and function: an ethnographic search and archaeological explanation, *American Anthropologist* 85, 630-643.

Hlásek, D., Chvojka, O., Šálková, T., Fröhlich, J., Houfková, P., Kovačiková, L., Majer, A., Menšík, P., Michálek, J., Netolický, P., Novák, J., Pavelka, J., Petřík, J., Sosna, D. 2015. Vrcovice. Hradiště z počátku střední doby bronzové. *Archeologické výzkumy v jižních Čechách – Supplementum 10. České Budějovice – Plzeň.*

Hofreiter, M., Jaenicke, V., Serre, D., von Haeseler, A., Pääbo, S. 2001. DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA, *Nucleic Acid Research* 29, 4793 - 4799.

Hrala, J. 1973. Knovízská kultura ve středních Čechách, Archeologické studijní materiály 11, Praha.

Chábera, S., a kol. 1985. Neživá příroda. Jihočeská vlastivěda, České Budějovice.

Child, A. M. a Pollard, M. A. 1992. A review of the applications of immunochemistry to archaeological bone. *Journal of Archaeological Science* 19(1), 39-47. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(92\)90005-N](https://doi.org/10.1016/0305-4403(92)90005-N)

Chvojka, O., a Töröková, L. 2017. Archeologický výzkum v Ratajích u Bechyně a restaurování keramických nádob z vybraných objektů. In: Výroční zpráva Jihočeského muzea v Českých Budějovicích za rok 2016, 78-80.

Chytráček, M., Chvojka, O., Egg, M., John, J., Michálek, J., Cícha, J., Hladil, J., Koník, P., Kozáková, R., Křivánek, R., Kyselý, R., Majer, A., Novák, J., Pavelka, J., Rašková Zelinková, M., Stránská, P., Světlík, I., Šálková, T.: Knížecí mohyla doby halštatské v Rovné u Strakonice a symbolika uměleckého projevu elity starší doby železné. Památky archeologické – v tisku

Itan, Y., Powell, A., Beaumont, M.A., Burger, J., Thomas, M.G. 2009. The origins of lactase persistence in Europe, *PLoS Comput Biol* 5, e1000491. doi:10.1371/journal.pcbi.1000491.

Jiráň, L. 2008. (ed.) *Archeologie pravěkých Čech/5: Doba bronzová*. Praha, s. 11.

Karasek, F.W., Clement, R.E. 1988. *Basic Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Principles and Techniques*. Elsevier Science B.V.

Kasper, H., a Burghardt, W. 2015. *Výživa v medicíně a dietetika*. 1. vydání. Praha : Grada.

Kooyman, B., Newman, M. E., Cluney, CH., Lobb, M., Tolman, S., McNeil, P. a Hills, L. V. 2001. Identification of horse exploitation by clovis hunters based on protein analysis. *American Antiquity* 66(4), 686-691.

Koolman, J., a Röhm. K. H. 2012. Barevný atlas biochemie. 1. vydání. Praha : Grada.

Korneláková, R. 2010. Pohřebiště knovízského okruhu. Bezně, Bakalářská práce. Univerzita Pardubice Fakulta filozofická. Dostupné z: https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/38449/KornelakovaR_Pohrebisteknovizskeho_LJ_2011.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Kovářík, J. 1979. Hromadný nález knovízské keramiky v Praze 4-Modřanech, Archeologické rozhledy 31, 481-490, 601.

Krüttli, A., Bouwman, A., Akgül, G., Della, D., Casa, P., Rühli, F., Warinner, C. 2014. Ancient DNA analysis reveals high frequency of European lactase persistence allele (T-13910) in medieval central Europe. PLoS One 23/9/1:e86251. doi: 10.1371/journal.pone.0086251. eCollection 2014.

Kuckova, S., Hynek, R., Kodicek, M. 2007. Identification of proteinaceous binders used in artworks by MALDI-TOF mass spectrometry, Analytical and Bioanalytical Chemistry 388, 201-206.

Ledvina, M., Stoklasová A. a Cerman J. 2009. Biochemie pro studující medicíny. Vyd. 2. V Praze: Karolinum.

Lee, M.S. 2012. Mass Spectrometry Handbook. John Wiley & Sons, Inc.

Loll, M. J. a Bollag, J. 1983. Protein Transformation in Soil. Advances in Agronomy 36, 351-382. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60358-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60358-2)

Matouš, B., et al. 2010. Základy lékařské chemie a biochemie. 1. vydání. Praha : Galén, 540 s.

Malmström, H., Linderholm, A., Lidén, K., Storí, J., Molnar, P., Holmlund, G., Jakobsson, M., Götherström, A. 2010. High frequency of lactose intolerance in a prehistoric hunter-gatherer population in northern Europe. *BMC Evol Biol.* 10:89.

Michálek, J., Fröhlich, J. 1979. Archeologické nemovité památky v okrese Strakonice. České Budějovice – Strakonice.

Mottram, H. R., Dudd, S. N., Lawrence, J., Stott, A. W. a Evershed, R. P. 1999. New chromatographic, mass spectrometric and stable isotope approaches to the classification of degraded animal fats preserved in archaeological pottery. *Journal of Chromatography A* 833(2), 209-221. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)01041-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)01041-3)

Nagy, D., Tomory, G., Csanyi, B., Bogacsi-Szabo, E., Czibula, A., et al. 2011. Comparison of Lactase Persistence Polymorphism in Ancient and Present-Day Hungarian Populations. *American Journal of Physical Anthropology* 145, 262–269.

Nagyová, G. 2009. Změny proteinové frakce plnotučného sušeného mléka. Zlín, Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Eva okénková. Dostupné z: https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/10733/nagyova%20C3%A1_2009_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Neustupný, E. 1997. Šňůrová sídliště, kulturní normy a symboly, *Archeologické rozhledy* 49, 304-322.

Ogalde, J.P., Arriazab, B.T., Sotoc, E.C. 2009. Identification of psychoactive alkaloids in ancient Andean human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Archaeological Science* 36, 467-472.

Oudemans, T. F. M., Boon, J. J. 1991. Molecular archaeology: analysis of charred (food) remains. from prehistoric pottery by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 20, 197-227.

Özkan, H., Willcox, G., Graner, A., Salamini, F., & Kilian, B. 2011. Geographic distribution and domestication of wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58: 11-53.

Pavelka, J. a Orna, J. 2011. Výsledky analýzy potravinových zbytků na pozdně středověké keramice v Plzni. *Acta Fakulty filozofické Západočeské univerzity v Plzni* 3, 85-98.

Pavelka, J., a Vařeka, P. 2008. Příspěvek k poznání stravy ve vrcholném a pozdním středověku: první výsledky analýzy potravinových zbytků na keramice z archeologických výzkumů. *Kuděj10/2*, 98-109.

Plantinga T.S., Alonso S., Izagirre N., Hervella M., Fregel R., van der Meer J.W., Netea M.G., de la Rúa C. 2012 Low prevalence of lactase persistence in Neolithic South-West Europe. *Eur J Hum Genet*. 20:778-82.

Podborský, V. 2006. *Dějiny pravěku a rané doby dějinné*. Brno, s. 151.

Pollard, M., Batt, C., Stern, B., Young, S. M. M. 2007. *Analytical Chemistry in Archaeology*. Cambridge University Press, Cambridge.

Rafferty, S. M. 2002. Identification of Nicotine by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy Analysis of Smoking Pipe Residue, *Journal of Archaeological Science* 29/8, 897–907.

Slaná, K. 2018. Identifikace proteinů z keramické matrix archeologických nálezů. MS, Bakalářská práce, depon. in Západočeská univerzita v Plzni, 44 s. Plzeň.

Schweitzer, M. H., Zheng, W., Organ, C. L., Avci, R.; Suo, Z., Freimark, L. M., Lebleu, V. S., Duncan, M. B., Heiden, M. G. V., Neveu, J. M., Lane, W. S., Cottrell, J. S., Horner, J. R., Cantley, L. C., Kalluri, R., Asara, J. M. 2009. Biomolecular characterization and protein sequences of the cam-panian hadrosaur *B. canadensis*, *Science* 324, 626-631.

Shewry, P.R., Halford, N.G., Tatham, A.S., Popineau, Y., Lafiandra, D., Belton, P.S. 2003. The high molecular weight subunits of wheat glutenin and their role in determining wheat processing properties. *Advances in Food and Nutrition research*.

Solazzo, C., Fitzhugh, W. W., Rolando, CH. a Tokarski, C. 2008. Identification of protein remains in archaeological potsherds by proteomics. *Analytical Chemistry* 80(12), 4590-4597.

Svačina, Š., et al. 2008. *Klinická dietologie*. 1. vydání. Praha : Grada.

Tokarski, C., Martin, E., Rolando, CH. a Cren-Olivé, C. 2006. Identification of proteins in renaissance paintings by proteomics. *Analytical Chemistry* 78(5), 1494-1502.

Velíšek, J., a Hajšlová, J. 2009. *Chemie potravin*. 2. 3. vydání. Tábor : OSSIS.

Whitney, R.M., Brunner, J.R, Ebner, K.E. 1976. Nomenclature of the proteins of cow's' milk, *Journal of Dairy Science*, 59, 795.

Witas, H. W., Płoszaj, T., Jędrychowska-Dańska, K., Witas, P. J., Masłowska, A., Jerszyńska, B., Kozłowski, T., Osipowicz, G. 2015. Hunting for the LCT-13910*T Allele between the Middle Neolithic and the Middle Ages Suggests Its Absence in Dairying LBK People Entering the Kuyavia Region in the 8th Millennium BP. *PLoS ONE* 10: e0122384. doi:10.1371/journal.pone.0122384.

Seznam obrázků

Obr. 1. Torzo etážovité amfory.....	6
Obr. 3. Nádobu z mladší doby bronzové, která byla nalezena v lokalitě Praha-Modřany.....	7
Obr. 3. Průběh ELISA testu.....	12

Seznam tabulek

Tab. 1. ELISA testy na proteiny z potravin z archeologické keramiky (amfory a zásobnice, případně zlomky z nich).....	26
Tab. 2. ELISA testy u vybrané keramiky pouze na β -lactoglobulin skotu.....	27
Tab. 3. Zlomky keramiky potřené definovanými proteiny, které byly zakopány do země a archeologizovány.....	27