

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

CENTRUM BIOLOGIE, GEOVĚD A ENVIGOGIKY

**DETEKCE PROTEINŮ ZE STŘEDOVĚKÉ**

**ARCHEOLOGICKÉ KERAMIKY**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Kateřina Hejnová**

*Přírodovědná studia, obor Biologie se zaměřením na vzdělávání*

Vedoucí práce: Mgr. Jaroslav Pavelka, Ph.D.

**Plzeň, 2020**

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně  
s použitím uvedené literatury a zdrojů.

V Plzni, 30. června 2020

.....  
vlastnoruční podpis

## **Poděkování**

Srdečně bych chtěla poděkovat svému vedoucímu Mgr. Jaroslavu Pavelkovi, PhD., za jeho kreativitu, ochotu, zkušenosti a hlavně za drahocenné rady při zpracování mé kvalifikační práce. Chtěla bych také poděkovat své rodině a blízkým přátelům za obrovskou podporu při mém studiu.

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>DEGRADOVANÉ PROTEINY</b> .....	<b>8</b>
2.1	Degradace proteinů .....	8
2.2	Typy degradace .....	8
2.2.1	Denaturace .....	8
2.2.2	Hydrolyza peptidových vazeb .....	9
2.2.3	Deaminace .....	9
2.2.4	Maillardova reakce .....	9
<b>3</b>	<b>PROBLEMATIKA POTRAVIN V ARCHEOLOGII</b> .....	<b>10</b>
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>11</b>
4.1	Příprava vzorku .....	11
4.2	Antigen-protilátka .....	11
4.3	Hmotnostní spektrometrie .....	12
4.4	ELISA TEST.....	14
4.4.1	Testovací sady.....	15
4.5	Detekce proteinů .....	16
4.5.1	Kompetitivní ELISA .....	16
4.5.2	Sendvičová ELISA.....	17
4.6	Testované proteiny .....	20
4.6.1	Beta-laktoglobulin.....	20
4.6.2	Gliadin .....	20
4.6.3	Kasein.....	23
4.7	Vyhodnocení reakcí.....	24
<b>5</b>	<b>LOKALITY</b> .....	<b>25</b>

5.1	Rokšejn.....	25
5.2	Brno - Janáčkovo kulturní centrum.....	25
5.3	Brno- Vídeňská, Medica.....	25
5.4	Brno - Vojtova .....	25
5.5	Žďár nad Sázavou .....	26
5.6	Počátky u Jihlavy, Školní ulice .....	26
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>27</b>
6.1	Rokšejn.....	27
6.2	Brno – Janáčkovo kulturní centrum .....	28
6.3	Brno – Vídeňská, Medica .....	29
6.4	Brno – Vojtova.....	30
6.5	Žďár nad Sázavou .....	32
6.6	Počátky u Jihlavy - školní ulice .....	32
<b>7</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>34</b>
7.1	Porovnání výsledků podle lokalit.....	34
7.2	Možné kontaminace .....	37
<b>8</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>39</b>
<b>9</b>	<b>RESUMÉ.....</b>	<b>40</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>41</b>
<b>11</b>	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ.....</b>	<b>44</b>
<b>12</b>	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>45</b>

# 1 ÚVOD

Hlavním záměrem této práce je zjistit zachovalost pozůstatků potravin v porézní keramice z raného a pozdního středověku. Práce by měla přiblížit poznání stravy ve středověku a porovnání různých lokalit, kde by se měl odrážet sociální statut původních majitelů testované keramiky.

Má práce vychází z aplikace metody ELISA (z angl. **E**nzyme-**L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay), která byla již použita v konkrétních studiích (Pavelka a Vařeka 2008, Pavelka a Orna 2011, Čiperová et al. 2015, Pavelka et al 2016) a předkládanou prací bych na tyto manuskripty ráda navázala.

Vzorky, které jsem testovala, pochází z vrcholně středověkých lokalit Rokštejna, Brna a Žďáru nad Sázavou a jeden vzorek z Jihlavy. Zjišťuji skladbu potravin, které se zachovaly na archeologické keramice, zejména prověřuji historické poznatky o větším zastoupení masa v jídelníčku obyvatel hradních komplexů a o odlišné stravě na městských parcelách u chudších obyvatel, kde rovněž testuji očekávané vyšší zastoupení obilovin a mléčných produktů.

Předkládaná práce používá jak metody analýzy pomocí protilátek schopných detekovat historické archeologické proteiny, tak také jejich verifikace pomocí hmotnostní spektrometrie. Existuje také návaznost nejen na podobné archeologické publikace, ale i na kvalifikační práce na ZČU, zejména na téma rozlišování původních proteinů a kontaminací (např. Slaná 2018). Už publikované výsledky prokazují existenci kontaminací, ale i původních proteinů a potvrzují poměrně častou přítomnost vepřového masa v testované keramice, které je mnohdy doloženo identifikací mastných kyselin živočišného původu pomocí hmotnostní spektrometrie. Archeologie se studiem keramických nádob zabývá v rozsáhlé míře, proto i původní účel keramiky a analýza zbytků potravin budí pozornost a pomáhá významně dotvářet obraz minulosti. Pro takové studie je nejvýhodnější porézní keramika, kde jsou organické zbytky vhodně absorbovány a dobře se zachovávají, protože jsou dobře ochráněny před destruktivními vlivy prostředí (Craig a Collins, 2000, Eerkens 2005, Baker 2010). Bylo také prokázáno, že původní archeologické proteiny se dají detekovat i v bronzových nádobách, zřejmě oxidy mědi působí podobně jako keramická matrix a chrání proteiny před degradací (Fišerová 2019).

Středověké nádoby můžeme považovat za jeden z nejdůležitějších zdrojů informací, který nám umožní nahlédnout do poměrů tehdejší doby a přiblížit nám jejich ekonomickou situaci v minulosti v dané lokalitě. Z výsledků analýz je možno zjistit, jaké druhy zvířat byly ve středověku v určité lokalitě konzumovány či chovány, zvláště pokud chybí osteologické nálezy zvířat.

Živočišné produkty byly tepelně zpracovávány v různých druzích keramiky, která se někdy dochovala téměř celá, jindy ve zlomcích (střepech). Pro předkládanou práci byly vybrány takové vzorky, ve kterých se zachovaly celé kousky zuhelnatělých potravin (příškvarky), čímž se navazuje na starší výzkumy (Pavelka a Vařeka 2008, Pavelka et al. 2016). V minulosti byly rozpracovány i další způsoby testování organických látek nasáknutých do archeologické keramiky. Proteiny byly z keramiky původně extrahovány řadou postupů (Craig a Collins 2002). Craig a Collins (2002) testovali možnosti řady extrakcí a došli sérií postupů k závěru, že v zásadě každá extrakce historické proteiny poškozuje, jen některá více a jiná méně. Naproti tomu bylo zjištěno, že testy antigen-protilátka vlastně žádnou extrakci nepotřebují, protože nejmenno nadrcená keramika ELISA testům nijak nevádí a dochází k interakcím mezi zachovalými proteiny a komerčními protilátkami (Číperová et al. 2015). Co se týká množství proteinů vsáknutých do keramiky, tak Craig a Collins (2002) uvádí obsah sorbovaného proteinu v keramice  $32\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , toto stanovení bylo provedeno pomocí analýzy celkového organického uhlíku. Craig a Collins (2002) tedy prokazují, že proteiny se vážou na keramiku v relativně velkém množství. Tato práce se zabývá proteiny, i když současné práce kladou větší důraz na lipidy. Je to zejména proto, že lipidy se v keramice dobře zachovávají, ta je ochraňuje před vlivy prostředí, světlem, vlhkostí a vlivy zvětrávání (Evershed, 1993; Evershed et al. 1999).

Kromě výše uvedeného testování odlišné stravy v různých středověkých lokalitách byly analýzy prováděny s myšlenkou ověřit už zpracovanou metodiku (Slaná 2018) o rozlišování původních historických proteinů a kontaminací na odlišném materiálu z mladší doby a na vzorcích jiného typu. V původní práci (Slaná 2018) se jednalo o rozlišení proteinů z keramické matrix ze starších období (halštatská doba, doba bronzová) a nyní jsou data získávána na mladších vzorcích z vrcholného středověku a ve formě příškvarků na keramice. Takto může systematický výzkum proteinů z keramiky přispět k získání odpovědí na otázky typu, čím se lidé v dané době stravovali a jaké materiály měli k dispozici.

## 2 DEGRADOVANÉ PROTEINY

### 2.1 Degradace proteinů

Denaturace proteinů patří k zásadním problémům zachování zbytků potravy. Jde o změnu terciální struktury (Pavelka a Orna 2011). Jedná se o nevratné narušení prostorové struktury a ztráty biologické aktivity bílkoviny. V průběhu času proteiny podléhají řadě přirozených procesů degradace, jako jsou deaminace, denaturace, hydrolýza peptidových vazeb, Maillardova reakce nebo mohou být také napadeny a rozloženy mikroorganismy (Slaná 2018). Řetězce aminokyselin jsou nahloucheny do prostorových struktur a vypadají jako tzv. „klubíčka“ a tato klubíčka se rozpadají, jsou degradovány vlivy prostředí, mnohdy i bakteriemi, a tak dochází k jejich výraznému poškození (Bollag 1990).

Terciální strukturu bílkovin mohou ovlivnit vnější podmínky, ať už fyzikální nebo chemické děje, a to především zvýšením teploty. Proteiny podléhají fyzikální denaturaci při ohřívání a přípravě pokrmů.

Na keramiku a nádoby mohou působit různé chemické látky a sloučeniny, které se vyskytují v zemině. Při uchovávání keramiky se setkáváme i s chemickou denaturací. Tyto chemické sloučeniny mohou být biologického i minerálního původu (Barnard et al. 2007). V posledních letech pozorujeme vliv chemického průmyslu v zemědělství, a to v oblasti hnojiv. K biologické denaturaci dochází vlivem mikroorganismů nebo půdních bakterií (Barnard et al. 2007).

### 2.2 Typy degradace

#### 2.2.1 Denaturace

Denurací se změni prostorové uspořádání molekuly biopolymeru (bílkoviny nebo nukleové kyseliny), při níž dochází k nevratné ztrátě biologických funkcí. Mezi nevratné ztráty patří ztráty hormonálního a enzymového účinku. Dochází také k chemickým a fyzikálním změnám vlastností bílkovin, jako je ztráta rozpustnosti přírodní bílkoviny.

Denaturačně působí chemické látky, například kyseliny, zásady, organická rozpouštědla (aceton, alkohol). Tyto chemické látky jsou schopny uvolnit iontové



vazby, které podmiňují terciární strukturu bílkovin. Také i vyšší teplota může způsobit tzv. teplou či teplotní denaturaci.

Kromě toho jsou bílkoviny náchylné i na fyzikální faktory, mezi které patří rentgenové záření a ultrafialové paprsky. Dopadem těchto faktorů bílkoviny přijdou o hydrofilní vlastnosti a stanou se hydrofobními (Slaná 2018).

### 2.2.2 Hydrolýza peptidových vazeb

Peptidová vazba je kovalentní chemická vazba, která spojuje dvě molekuly aminokyselin. Obsahuje seskupení atomů  $-CO-NH-$ . Vyskytuje se například u proteinů a polypeptidů. Přidáním molekuly vody neboli hydrolýzou může peptidová vazba degradovat. Přítomností vody se uvolní energie a peptidová vazba se rozpadne. Tento průběh je velice pomalý a trvá až několik století (Valenta 2009).

### 2.2.3 Deaminace

Při deaminaci je odebrána aminoskupina ( $-NH_2$ ) od molekuly. Zbytek aminokyseliny je tvořen nejčastěji uhlíkem a vodíkem.

### 2.2.4 Maillardova reakce

Maillardova reakce je soubor chemických reakcí, které redukuje sacharidy a aminosloučeniny (aminokyseliny a bílkoviny). Při průběhu reakcí se vytváří mnoho reaktivních karbonylových sloučenin, které vzájemně reagují také s přítomnými aminosloučeninami, což způsobuje tzv. neenzymatické hnědnutí potravin. Tato reakce probíhá okolo  $150^\circ\text{C}$ .

### 3 PROBLEMATIKA POTRAVIN V ARCHEOLOGII

Keramické nádoby, které byly nalezeny na určených stanovištích, se původně využívaly jako nádoby pro přípravu pokrmů, a proto je pravděpodobné, že se na nich uchytily zbytky pravěké stravy (Baker 2010). S nástupem nových technik a metod se začaly realizovat analýzy DNA (z anglického deoxyribonucleic acid) a extrakce z archeologických vzorků. Avšak výsledky byly vystaveny tvrdé kritice a výrazně zpochybněny vzhledem k pravděpodobné kontaminaci současnou DNA, která představuje v archeologii výrazný problém (Pruvost et al. 2005).

Stovky až desetitisíce let starý vzorek organického materiálu DNA je obvykle poškozený, a to zejména chemickými reakcemi hydrolyzou a oxidací a nebo degradací – rozpad materiálu na malé části (Hofreiter et al. 2001). Výjimku představují např. vzorky z permafrostu.

Pochopitelně i proteiny podléhají celé sérii přeměn, jako je například deaminace, hydrolyza peptidových vazeb, denaturace, napadení mikroorganismy a tak dále (Barnard et al. 2007). Proteiny jsou velmi rozmanité a složité, proto se každý chová velmi rozdílně a práce s nimi je velmi obtížná, tudíž nemůžeme zvolit jednu metodu k identifikaci a extrakci všech proteinů (Barker 2010).

Existují v současnosti dvě hlavní varianty, jak analyzovat proteiny v keramice. První možnost je pomocí hmotnostní spektroskopie a druhá je pomocí protilátek.

## 4 MATERIÁL A METODY

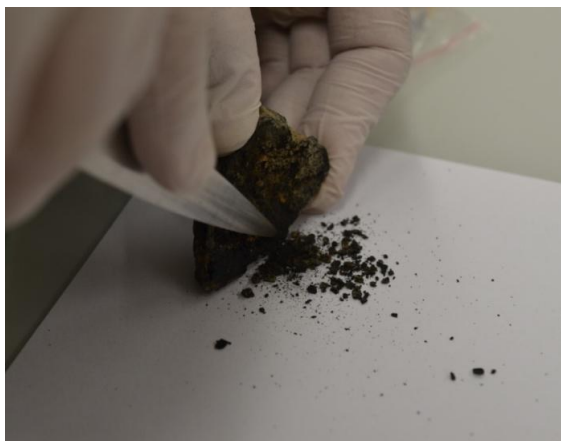
### 4.1 Příprava vzorku

Ze zbytků dochované keramiky byla seškrabána vrstva 2-5 cm<sup>2</sup> do hloubky 1-3 mm (viz. obr. 1)

První povrchová vrstva je často kontaminována, a proto není použita pro testy. Do plastických zkumavek (eppendorf) se nasypají seškrabané vzorky keramiky.

Směs vzorku je rozdrčena ještě na jemnější prášek extračním roztokem v objemu 200 - 400μl. Extrační roztok je součástí komerčního kitu.

Stejným způsobem byl odebrán vzorek i pro hmotnostní spektrometrii.



Obrázek 1: Odběr vzorku z keramiky bohaté na karbonizované usazeniny (příškvarky)

### 4.2 Antigen-protilátka

Současné protilátky nemusí reagovat na proteiny, které jsou staré několik stovek až tisíců let. Metoda antigen-protilátka byla zkoušena asi před dvaceti lety a byla zahrnuta, ovšem bylo to kvůli špatnému používání a nedostatečnému chápání jejích možností a specifičnosti. Zejména docházelo k tzv. cross-reakcím, což jsou nespecifické reakce, které vytvářejí vazbu mezi protilátkou a jinými antigeny, než proti jakým byly určeny (Brandt et al 2002). Na historické proteiny z archeologické keramiky nemusí reagovat protilátky, protože jsou vytvořeny na současné nativní antigeny (Craig et al 2000). Je možno tomu předejít, a to výrobou protilátek proti proteinům, které již podlely denaturaci (Craig et al 2000).

Existují komerční protilátky, které jsou průběžně testovány, aby byly schopny analyzovat velmi nepatrné pozůstatky různých tkání v rozdílně zpracovaných pokrmech (Björklund et al. 2001).

Pro identifikaci potravin lze použít specifické komerční sady, které jsou určeny k identifikaci tepelně denaturovaných proteinů. Jejich správná detekce archeologických proteinů se opakovaně prokázala při analýze tepelně upravených bílkovin v potravě, konkrétně se osvědčily zejména protilátky od firmy Neogen (Pavelka a Orna 2011, Čiperová et al. 2015, Pavelka et al. 2016).

### 4.3 Hmotnostní spektrometrie

Vzorky byly rovněž analyzovány pomocí hmotnostní spektroskopie v laboratoři separačních metod a hmotnostní spektroskopie, na katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Tato katedra analytické chemie se mimo jiné zabývá výzkumem archeologických materiálů, díky tomu byli ochotni analyzovat 34 vzorků z porézní keramiky pro naše potřeby. Výsledky identifikovaných vzorků jsou předloženy dále v práci.

Hmotnostní spektrometrie je metoda analytické chemie, která převádí molekuly na ionty a poté stanovuje jejich hmotnosti. Považujeme ji za nástroj biologického výzkumu, a to především za metodu identifikace, charakterizace a kvantifikace proteinů a metabolitů.

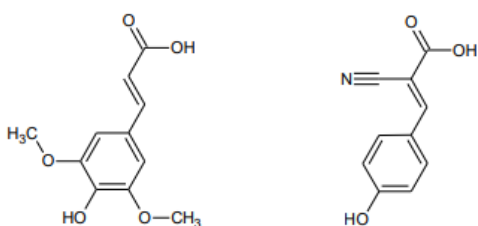
Používá se hlavně při identifikaci neznámých látek, k analýze proteinů při kontrole kvality makromolekul a ostatních rekombinantních proteinů. Také k identifikaci proteinů v biologických látkách, pro detekci a charakterizaci posttranslačních modifikací. Stanovuje strukturu sloučeniny a určuje izotopové složení prvků v molekule a především se používá k hledání bio markerů pro daná onemocnění (Lee 2012).

Molekuly látky jsou ionizovány a separovány na soubor fragmentů odlišujících se poměrem hmotnost/náboj ( $m/z$ ) (Opekar a kol. 2005).

Hmotnostní spektra se vytvářejí v hmotnostním spektrometru. Je nezbytné, aby veškeré hmotnostní spektrometry měly několik podstatných částí – analyzátor, iontový zdroj a detektor částic (Fridecký a Lemr 2012).

Nejprve je vzorek látky vložen do zdroje iontů, spektrometru. Zde je látka převedena do plynné fáze, dále probíhá ionizace. Je potřeba převést analyty za pomoci vhodné ionizační techniky na ionty. Důsledkem ionizování dochází k vytvoření nabitých částic – iontů. Ionty jsou poté separovány v analyzátoru elektromagnetického pole podle poměru ( $m/z$ ) neboli hmotnosti.

Pro ionizaci biologických látek se používají tzv. měkké ionizační techniky, které nepodléhají jejich fragmentaci. Setkáváme se s ionizací elektrosprejem (electrospray ionization – ESI) či nanosprejem (nanoESI) a ionizací za pomoci laseru za přítomnosti matrice (matrix-assisted laser desorption ionization – MALDI). Při ionizaci MALDI se nanosený vzorek na MALDI destičce smíchá s vhodnou matricí (pro proteiny se používá kyselina sinapová a pro peptidy např.  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina) a celé to necháme společně krystalizovat (obr. 2).



Obrázek 2: Často používané MALDI matrice: kyselina sinapová a kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová

Do vakuované části MS umístíme destičku se vzorky. Vzorek je ozařován krátkými laserovými pulzy, kdy energie laserového pulsu je pohlcena matricí, čímž dochází k její rychlé desorbci včetně iontů analytu. Převážně vznikají jednonásobně nabitě ionty.

Elektrosprejová ionizace (ESI) je atmosférická ionizační technika, kde ionizace probíhá v přítomnosti rozpouštědla (methanol, acetonitril nebo jejich směs s vodou) za vysokého napětí (2-6 kV) působícího na kapalinu. Analyty jsou ionizovány v roztoku, proto je ESI obvykle spojována se separačními technikami, a to např. s kapalinovou chromatografií LC-ESI nebo s kapilární elektroforézou CE-ESI. Vysokým napětím dochází k vytvoření kapiček analytu obalených rozpouštědlem. Postupným odpařováním rozpouštědla se uvolní vzniklé ionty, které jsou elektricky směřovány do MS. Tato ionizační technika elektrosprejem vytváří vícenásobně nabitě ionty  $[M+nH]^{n+}$ .

V ionizačním zdroji se objevují vzniklé ionty, které jsou poté usměřovány iontovou optikou a jsou převedeny do hmotnostního analyzátoru. V hmotnostním analyzátoru probíhá oddělování iontů za vysokého vakua a uplatňují se i různé fyzikální principy.

Iontová past (ion trap – IT) spadá mezi hmotnostní analyzátoři, které zachycují ionty pomocí napětí na elektrodách a poté je analyzují. Analyzátor doba letu (TOF) používá čas letu iontů. Kvadrupól (quadrupole – Q) při aplikování hodnot napětí na elektrody v určitý časový okamžik využívá iontů s určitou hodnotou  $m/z$ . Určitý ion s  $m/z$  se dostane k detektoru a ostatní jsou chyceny na tyčích kvadrupolů. Každá hmotnostní spektrometrie se něčím liší, ať už rychlostí analýzy, hmotnostním rozsahem nebo dynamickým rozsahem, rozlišením, senzitivitou či různými technickými specifikacemi [3]. Po rozdělení iontů v hmotnostním analyzátoru dopadají na detektor, který vyhodnocuje signál z dopadajících iontů. Mezi nejpoužívanější detektory patří elektronové fotonásobiče. Ionty dopadají na povrch dynody, ze které vyrazí elektrony a ty jsou následně opakovanými kolizemi nebo systémem dynod zesíleny. Vznikne hmotnostní spektrum, kde (ve kterém) vidíme všechny naměřené měrné hmotnosti a jejich intenzity.

Hmotnostní spektrometrie má mnoho výhod a oproti imunologickým technikám se může pyšnit (honosit) vyšší škálou analyzovaných látek. Některé proteiny, např. hovězí a vepřové nebo mléčné proteiny podle druhů, zatím rozlišit nedokáže. Nevýhodou je dostupnost vhodného zařízení a také to, že vzorek musí být speciálně upraven. U archeologického materiálu může být speciální úprava problémem (Barker 2010).

#### 4.4 ELISA TEST

Vybrané a prověřené ELISA testy jsou kalibrované a primárně slouží pro testování alergenů (Pavelka et al 2016). Zakládají se na reakci protilátky a substrátu (antigenu). Testy jsou schopné rozpoznat a zachytit i nepostřehnutelné kontaminace nežádoucích proteinů v potravě. Bylo u nich ověřeno, že mají výraznou citlivost pro historické denaturované proteiny z potravin, které se dochovaly v archeologické keramice jako makrozbytky potravy nebo v omezeném množství nasáklém v keramické matrix. Testy jsou zaměřeny na různé proteiny, zejména na takové, které vykazují výraznou termostabilitu, především v případě proteinů z masa hospodářských zvířat.

Z dochovaných makrozbytků byl úspěšně testován gluten (důkaz obilnin), ovomucid (vaječný protein, který se za zvýšených teplot nemění ani nerozkládá) a kasein (můžeme jej považovat za hlavní mléčný protein).

Testem také můžeme prokázat přítomnost  $\beta$ -laktoglobulinu skotu. Výsledkem lze potvrdit, či vyvrátit, zda jsou mléčné produkty od skotu či jiných zvířat (Pavelka a Vařeka 2008).

Testy jsou navrženy hlavně pro tepelně zpracovanou potravu, proto dokáží zachytit i degradované proteiny. Kvůli tomu není míra karbonizace pro test ELISA zábranou.

Žlutým zbarvením se vyznačuje pozitivní reakce, stejně tak jako kontrola. Negativní kontrola se neprojeví vůbec nebo jen mírným odstínem (Pavelka a Orna 2011)

Hlavní výhodou této metody je snadné provedení a finanční dostupnost. Oproti jiným metodám metoda ELISA je schopna vyhodnotit relativně značné množství vzorků za krátký čas.

Jedinou negativní věcí, co můžeme metodě vytknout, je limitovaný objem vzorku. Hmotnostní spektrometrii stačí jen 20-30 ug, na ELISA test potřebujeme 0,5 - 1mg na jednu analýzu (Pavelka a Vařeka 2008).

### 4.4.1 Testovací sady

K analýze různého druhu masa jsem si vybrala testovací sady BioKits – Cooked Species Identification Test Kit vyrobené firmou Neogen Corporation®. Analýza kravského mléka se realizovala díky identifikaci kaseinu a  $\beta$ -laktoglobulinu skotu pomocí ověřené komerční sady, kterou nabízí firma Neogen Corporation® (viz Pavelka et al. 2016). Tyto již prověřené komerční sady byly použity rovněž k identifikaci gliadinu u obilovin.

Testy byly vyrobeny, aby pracovaly na základě metody ELISA (z angl. EnzymeLinked ImmunoSorbent Assay). Tato imunologická metoda je jedna z nejcitlivějších imunoanalýz, která se vyskytuje na území laboratorního výzkumu. ELISA využívá vlastnosti imunoglobulinů, a to je schopnost navázat na sebe antigeny. (protilátky se obvykle vážou na povrch leukocytů pomocí tzv. FC fragmentu na adekvátní FC receptory.) Tímto způsobem se může připevnit imunoglobulin k povrchu

mikrotitrační jamky. Druhou vlastností imunoglobulinů je jeho schopnost navázat se na povrch některých plastů (Číperová et al. 2015).

## 4.5 Detekce proteinů

### 4.5.1 Kompetitivní ELISA

Jedná se o případ, kdy soupeří o navázání testovaný vzorek se značeným ligandem, oba soutěží o navázání na omezená vazebná místa na protilátkách. Po ustanovení rovnováhy se systém promyje a změří se aktivita nahromaděná na pevné fázi. Čím více antigenů testovaný vzorek obsahuje, tím nižší enzymatická aktivita bude zaznamenána (Crowther 2009). To znamená, že silně pozitivní vzorek je bezbarvý, naopak negativní je silně zbarvený. U běžné nekompetitivní sendvičové ELISY je to opačně.

Kompetitivní je v našem případě detekce kravského mléka na beta-lactoglobulin, ostatní jsou nekompetitivní.

1. Nejprve se musí naředit extrakční a promývací roztoky a přiměřený počet kitů pro testování.

2. Do testovacích kitů se automatickou pipetou napipetuje 100 µl extračního roztoku (karbonátový/bikarbonátový tlumivý roztok s pH 9,6; který se uplatňuje jako nulový standard). Poté se aplikují BLG (β-laktoglobulin) kontroly standardu a nakonec se přidají zředěné a předem připravené vzorky proteinů společně se seškrabanou keramikou. Při každém pipetování je potřeba si vzít novou špičku na pipetu, aby se zabránilo vzniku cross- kontaminaci.

3. U této analýzy ELISA je třeba rychle přidat do každé testovací jamky zvlášť 50 µl BLG biotinu. Vzorky nelze opětovně využít na další testy kvůli okamžitému přidání specifického biotinu.

4. V následujícím kroku se umístí testovací kity na třepačku a nechají se zde za intenzivního třepání cca 60 minut při pokojové teplotě.

5. Obsah testovacích jamek se odstraní a hned nato se jamky pětikrát promyjí předem připraveným promývacím roztokem.

Jamky jsou pečlivě vymyty a očištěny od pozůstatků roztoku.

6. Následně je potřeba přidat do všech testovacích jamek 50 µl avidin peroxidázy.



7. Mikrotitrační destička je ještě jednou umístěna na třepačku a je zde ponechána za intenzivního třepání cca 15 minut opět při pokojové teplotě.

8. Obsah testovacích jamek se odstraní a hned nato se jamky pětkrát promyjí předem připraveným promývacím roztokem.

9. Do všech vymytých testovacích jamek je přidáno 100  $\mu$ l TMB substrátu (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin).

10. Testovací jamky jsou přemístěny na rovný povrch a necháme je 45 minut v klidu odstát, nejlépe ve tmě, ale tma není podmínkou, při pokojové teplotě, a tentokrát bez třepání. Na laboratorních podmínkách závisí rychlost reakčního zbarvení.

11. Na závěr je potřeba zastavit reakci, a proto se přidá do každé jamky 50  $\mu$ l stop solution roztoku. V našem případě je stop roztokem zředěná kyselina fosforečná. Testovací jamky jsou v ruce lehce promíchány a tím je reakce zastavena. Dochází ke změně barvy, a to z modré na žlutou. Změna postupně nabývá na intenzitě barvy.

12. V posledním kroku je mikrotitrační destička měřena a získaná data jsou zaznamenána. V každé testovací jamce byla měřena absorbance roztoků při 450 nm na ELISA readeru VERSAmax™ (Molecular Devices). Negativní reakce se projeví negativním zbarvením, protože jde o ELISA kompetitivní test.

Z pozitivní a negativní kontroly je nezbytné si vytyčit limitní hodnoty a z nich při identifikaci vycházet. Hodnoty, které se blíží negativní kontrole ( $< X$  ppm), vyhodnocujeme jako negativní a hodnoty pozitivní se blíží k ( $> X$  ppm), jde spíše o slabší reakci.

### 4.5.2 Sendvičová ELISA

Podmínkou je pochopitelně přítomnost nejméně dvou a více vazebných míst na antigenu. V sendvičové ELISA se použijí dvě protilátky, které mezi sebou zadrží antigen a vytvoří „sendvič“. Antigen se zadrží na imobilizované protilátce a po promytí se připojí značená protilátka. Následující promytí odstraní nenávané značené protilátky. Po přidání substrátu pro enzym se po jisté době reakce zastaví. Na závěr se změří intenzita vzniklého zbarvení.

Byla použita sendvičová ELISA Neogen Corporation® Biokits for Species Identification pro analýzu vzorků z vepřového, hovězího a ovčího masa, které byly

nalezeny v daných lokalitách. Sendvičová ELISA předpokládá, že vzorky jsou původem z masa (tepelně upravené proteiny), ale samozřejmě ji lze použít i na další specifické proteiny.

1. Jako první se musí připravit naředěné extrakční a promývací roztoky a přiměřený počet kitů pro testování.

2. Do testovacích kitů se automatickou pipetou napipetuje 100 µl extračního roztoku nebo pozitivní kontroly. Při každém pipetování je třeba použít novou špičku na pipetu, aby se zabránilo vzniku cross-kontaminaci.

3. Je potřeba vzorky jemně protřepat v ruce. Při pokojové teplotě se nechají inkubovat 45 minut.

Vzorky lze opětovně využít na další ELISA testy. Stačí je pouze odpipetovat do plastických zkumavek značky eppendorf a nechat je připraveny k dalšímu použití.

4. Obsah testovacích jamek se alespoň třikrát promyje předem připraveným promývacím roztokem.

5. Přidá se 50 µl biotinu do všech testovacích kitů.

6. Je potřeba vzorky mírně v ruce protřepat a nechat je inkubovat 45 minut při pokojové teplotě.

7. Testovací jamky se nejméně třikrát promyjí předem připraveným promývacím roztokem.

8. Do všech jamek v mikrotitrační destičce se přidá 50 µl konjugát (bílkovina s navázaným enzymem) avidin peroxidázy.

9. Mikrotitrační destičku je nutné lehce protřepat, testovací jamky se zakryjí a nechají se při pokojové inkubovat po dobu 15 minut.

10. Testovací jamky se nejméně pětkrát promyjí předem připraveným promývacím roztokem.

11. Do všech vymytých testovacích jamek je přidáno 100 µl TMB roztoku.

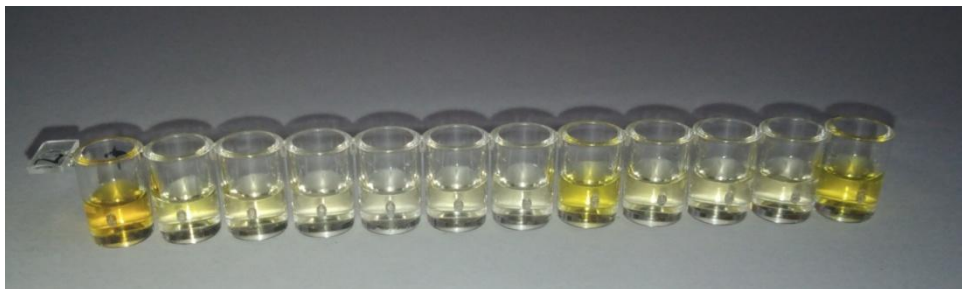
12. Je potřeba vzorky opatrně v ruce protřepat. Zakryté jamky se nechají inkubovat 45 minut při pokojové teplotě.

13. Na závěr je potřeba zastavit reakci, a proto musíme do každé testovací jamky přidat 50 µl stop solution roztoku.

V našem případě je stop roztokem zředěná kyselina fosforečná.

14. Testovací jamky jsou v ruce lehce promíchány a tím je reakce zastavena. Dochází ke změně barvy, a to z modré na žlutou (obr. 3).

15. V posledním kroku je mikrotitrační destička změřena a stanovená data jsou zaznamenána. V každé testovací jamce je měřena absorbance roztoků spektrometricky při 450 nm na ELISA readeru VERSAmax™ (Molecular Devices).



Obrázek 3: Pozitivní a negativní reakce v mikrotitračních jamkách

Pro tuto práci byly vybrány takové vzorky, kde se zachovaly celé kousky zuhelnatělých potravin (příškvarky), čímž se navazuje na starší výzkumy (Pavelka a Vařeka 2008, Pavelka et al. 2016).

Z testování na několik druhů masa z domácích zvířat a jejich proteinů se podařilo získat některá očekávaná data.

Vzorky byly testovány dvakrát a to tak, že poprvé byly nevařené a podruhé vařené, protože záleží na tepelné úpravě. Při tepelné úpravě dochází k denaturaci, a tak je možné odlišit vzorky, které obsahují proteiny prasat (*Sus scrofa domesticus*), jenž byly v minulosti tepelně upravovány, od proteinů ze sliznice tenkého a tlustého střeva, které se vyskytují v prasečích fekáliích. Při prvním testování se u vzorků objeví jen ty tepelně denaturované a po povaření se při druhém testování projeví silný signál i tam, kde předtím nebyl nebo byl velmi slabý. Tak se projevují prasečí proteiny z fekálií. Hmotnostní spektrometrie takový druh rozlišení nedokáže rozpoznat.

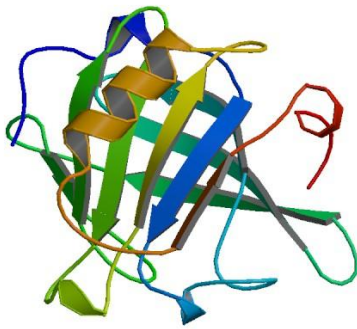
## 4.6 Testované proteiny

Výzkum v této práci se zabývá archeologickou keramikou, ve které mohou být zachovány proteiny. Záměrem práce je stanovit konkrétní proteiny.

### 4.6.1 Beta-laktoglobulin

Syrovátkový protein, který zastupuje z celkového počtu 7-12% mléčných bílkovin. Beta-laktoglobulin (obr. 4) je globulární protein s primární strukturou 162 aminokyselinových zbytků (Číperová 2015). Nachází se především v kravském a ovčím mléce.

Testování beta - laktoglobulinu je část věnovaná testu kompetitivní ELISA. Test je cílený na kravský beta-laktoglobulin a jiné protilátky se zde nezachytávají.

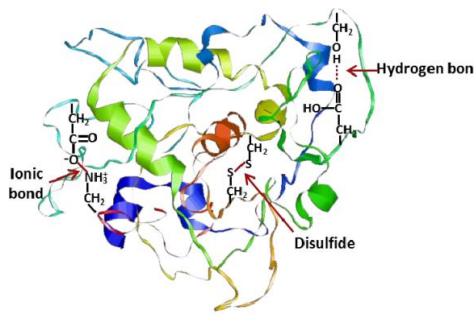


Obrázek 4: Stavba beta - laktoglobulinu (Brownlow 1997) [1]

### 4.6.2 Gliadin

Gliadin je složkou bílkovinného komplexu lepku (glutenu) (obr.5). Je to monomerní protein, zajišťuje regulaci řady buněčných procesů. Skládá se z polypeptidů s jedním řetězcem. Cystein disulfidové můstky jsou vazby, které se tvoří v gliadinu. Tyto vazby jsou rozpustné ve vodě a mohou ovlivnit globulární charakter. (např. tvar klubka (Slaná 2018)). Vyskytuje se převážně v obilných zrnech, jako je žito, ječmen, a nejvíce zastoupený je v pšenici.

K detekci gliadinu byl použit ELISA test, který je vyhrazený k detekci gliadinu obsaženého v obilných zrnech.



Obrázek 5: Stavba gliadinu [2]

## Testování gliadinu

### Příprava vzorků

K testování gliadinu byla vybrána testovací sada od firmy Veratox®. Netepelně upravené vzorky se extrahují orbitálním rotátorem či shakerem.

1. Nejdříve se připraví extrační roztok. Tento roztok je 55%, protože vzniká namícháním 55 dílů ethanolu a 45 dílů destilované vody.

2. Přibližně 0,5 mg rozdrceného vzorku se vloží do 1,5 ml plastové zkumavky (ependorf).

3. Dle výrobce je nutno přidat extrační aditivum do plastové zkumavky. Aditivum se neosvědčilo, proto je lepší jej vynechat.

4. Do plastové zkumavky se napipetuje 375  $\mu$ l vzorku v PBS (*Phosphate Buffered Saline*) a 1125  $\mu$ l 55% ethanolu. Po dobu dvaceti sekund se uzavřená zkumavka nechá na vortexu třepat. Pak se umístí na 40 minut do 50°C.

5. V orbitálním shakeru či rotátoru se vzorek extrahuje pomocí třesení (150 rpm). Nádoba je uchycena na podložce na ploché straně nástroje a připevněna pomocí lepicí pásky. Třeše se s ní po dobu patnácti minut při pokojové teplotě.

6. Je potřeba odebrat čistý vzorek. Nádoba se postaví do stojanu a nechá se zhruba deset minut stát, tím dojde k usazení materiálu a čistý vzorek lze bez problému odebrat.

7. Všechny vzorky se přesunou do zkumavky obsahující 1,5 ml PBS a naředí se v poměru 1:10, rozpustí se v poměru 1:10 v PBS – 200  $\mu$ l extraktu do 1,8 ml PBS.

8. Nádobu je nutno promíchat. Může se protřepat v ruce nebo se položí na pět sekund na vortex.

9. Po extrakci je nezbytné vzorky otestovat do dvou až tří hodin.

### *Testovací postup*

1. Na začátku se pro každý vzorek vezme vyznačená titrační jamka (červená) a pět jamek pro kontroly, které se vloží do stojánku.
2. Pokud se jamky s protilátkami nebudou používat hned, vrací se do zavřeného sterilního obalu, kterým jsou chráněny. Pruh titračních jamek je označený číslem jedna, aby nedošlo k případnému zaměnění vzorků.
3. Všechny reaktanty musí být před použitím promíchány, například krouživým pohybem lahve.
4. Do červených vyznačených jamek se napipetuje 150  $\mu$ l kontroly. Je nutné vždy použít novou pipetovací špičku, aby se zabránilo případné kontaminaci.
5. Do testovacích jamek s protilátkami je napipetováno osmikanálovou pipetou 100  $\mu$ l kontrol. Vzorky je třeba promíchat, a to tak, že je posouváme po hladkém povrchu dopředu a dozadu po dobu dvaceti sekund.
6. Červeně vyznačené jamky se sklídí a zbylé jamky se inkubují po dobu deseti minut za pokojové teploty.
7. Všechny testovací jamky se vezmou a obsah se prudce vylije do výlevky. Každá jamka je propláchnutá promývacím roztokem. Testovací jamky se promyjí celkem pětkrát a pak se jamky vyklepnou do sterilní papírové utěrky. Je nutné, aby v jamkách nezbyla žádná tekutina.
8. Do čisté reagenční nádoby se nalije konjugát z modré lahve. Do všech testovacích jamek se napipetuje 100  $\mu$ l konjugátu osmikanálovou pipetou. Vzorky opět promícháme posouváním po hladkém povrchu dopředu a dozadu po dobu dvaceti sekund.
9. Promíchané vzorky se nechají inkubovat po dobu deseti minut při pokojové teplotě.
10. Promývání jamek stejně jako v kroku číslo sedm.
11. Do čisté reagenční nádoby se nalije objem roztoku substrátu ze zelené lahve.
12. Do každé jamky se napipetuje 100  $\mu$ l substrátu osmikanálovou pipetou, tentokrát se špičky z pipety nevyhazují.
14. Do čisté reagenční nádoby se nalije určitý objem stop solution z červené lahve.

Do každé jamky se osmikanálovou pipetou napipetuje stejnými špičkami 100  $\mu$ l červeného stop solution. Následuje promíchání jamek po dobu dvaceti sekund. Firemní stop roztok se neosvědčil, zvláště pro měření, je proto výhodnější opět použít zředěnou kyselinu fosforečnou.

15. V posledním kroku se jamky očistí zespoda, aby mohly být vloženy do čtečky s filtrem 650 nm.

16. Výsledky vyhodnotí spektrofotometr ELISA reader za použití odpovídajícího softwaru.

### 4.6.3 Kasein

Kasein je hlavní bílkovina (protein) obsažená v mléce. Podíl kaseinu v mléce činí kolem 80% z veškerých bílkovin a zbylých 20% je tvořeno různými syrovátkovými proteiny.

Je velmi důležitý pro rozvoj a růst potomků, protože je významným zdrojem aminokyselin, vápníku a fosfátu. Kasein se odlišuje od ostatních proteinů, a to převážně svým chováním, ale také jeho specifickou strukturou. Vyznačuje se multimolekulární zrnitou strukturou, která se nazývá kaseinová micela (Slaná 2018).

#### Testování kaseinu

Byl použit ELISA test typ VERATOX od firmy Neogen Corporation®.

Tento druh testu byl také použit na detekci přítomnosti gliadinu, tedy obilního proteinu, samozřejmě s jiným typem protilátek.

1. V prvním kroku se odměří 150  $\mu$ l roztoku se vzorkem a připraví se také kontroly (samostatně) a vloží se do všech testovacích jamek.

2. Do všech jamek s protilátkami se napipetuje 100  $\mu$ l vychlazených vzorků i s pozitivní kontrolou. Doporučuje se nechat inkubovat 10 minut, ale osvědčilo se nechat vzorky inkubovat 40 minut.

3. Odstraní se obsah testovacích jamek a promyjí se pětkrát za sebou.

4. Všechny testovací jamky se vezmou a obsah se prudce vylije do výlevky, pak se vyklepne zbytek do sterilní papírové utěrky. Je nutné, aby v jamkách nezbyla žádná tekutina.

5. Čisté jamky s protilátkami jsou připraveny na přidání 100  $\mu$ l konjugátu, který se vyrobí ze dvou substrátů kitů. Je nutné, aby konjugát byl vždy čerstvě připravený. K aplikaci se využije osmikanálová automatická pipeta. Poté proběhne inkubace deset minut.

6. Zopakujeme kroky tři, čtyři a pět.

7. Do všech jamek se napipetuje pomocí osmikanálové pipety 100  $\mu$ l substrátu, následuje deset minut inkubace.

8. Na závěr se napipetuje do jamek s protilátkami 100  $\mu$ l Red stop roztok za pomoci osmikanálové automatické pipety. Místo Red stop roztoku, který je obsahem komerčního kitu, se i zde jako vhodnější ukázal roztok kyseliny fosforečné (používá se pro detekci proteinů z masa), takto probarvená reakce je mnohem vhodnější pro měření intenzity při měření na ELISA readeru. Vzorky se opět nechají inkubovat po dobu deseti minut.

### 4.7 Vyhodnocení reakcí

Pozitivní výsledky určíme podle viditelného intenzivního zbarvení. Žlutě se vyznačuje pozitivní kontrola, zatímco negativní kontrola se nezabarví vůbec. Vzorky, které se zabarvily, ale nikoliv tak intenzivně jako pozitivní kontrola, byly hodnoceny jako slabě pozitivní výsledky. Jako negativní výsledky hodnotíme ty, které nejsou vůbec zbarvené, nebo výsledky, jejichž barva je o dost světlejší než barva pozitivní kontroly. Na optické stanovení se nelze vždy s jistotou spolehnout, a proto jsou vždy výsledky kontrolovány spektrofotometricky na přístroji Elisa reader VERSAmax™ (Molecular Devices) při 450 nm.



## 5 LOKALITY

### 5.1 Rokšejn

Hrad vybudovali na konci 13. století zřejmě Rutenštejní, kteří byli původem z Ruska. Rutenštejní hrad financovali hlavně díky těžbě kamene. Později byl hrad zabaven moravským markrabětem v polovině 14. století. Poté se hrad ocitl v majetku Valdštejnů [4]. Na zřícenině hradu probíhají různé archeologické práce a výzkumy. Dokonce byla objevena kostra novorozence v základech hradu, což je předkřesťanská praktika, která měla zajistit bezpečnost a šťastný osud stavby.

### 5.2 Brno - Janáčkovo kulturní centrum

Jedná se o čtyři středověké parcely, kde celková plocha dosahuje až 3000 m<sup>2</sup>. Oblast měšťanských domů zanikla v době budování městských kasáren. Podařilo se prozkoumat i pozůstatky měšťanské zástavby od poloviny 13. století. Našlo se tu mnoho předmětů, ať už zlomky keramických nádob, ale i keramika technická a stavební, předměty železné, dřevěné, kamenné i skleněné a také i zvířecí kosti [5].

### 5.3 Brno- Vídeňská, Medica

V tomto případě se nesporně jedná o opevněné předmostí či předbrodí starobrněnského hradu. V lokalitě se vyskytuje několik sklepů z období vrcholného a pozdního středověku, které byly stavěny z vysokých cihel a zaklenuty valenou klenbou. V tomto areálu žila starobrněnská raně středověká aglomerace [6].

### 5.4 Brno - Vojtova

Kostel Sv. Václava stál v prostoru křižovatky Vojtova a Vídeňská na přelomu 13. a 14. století. Kostel byl za josefínských reforem zrušen a následně roku 1784 zbořen. Byl tu i přilehlý hřbitov, který zasahoval do nynější zkoumané plochy. Z hřbitova byl vybudován park, který byl před 1. světovou válkou narušen výstavbou Vojtovy ulice [7].

### **5.5 Žďár nad Sázavou**

Archeologický průzkum probíhal na náměstí. Před rekonstrukcí náměstí musel proběhnout povinný archeologický výzkum lokality [8]. Z nálezů byly analyzovány keramické zlomky z druhé poloviny 13. stol. Bližší archeologický kontext není dosud publikován.

### **5.6 Počátky u Jihlavy, Školní ulice**

Pod zemí se nachází ukryté zaniklé důlní centrum ze 13. a 14. století. Zkoumaná keramika pochází ze 13. století [9].

## 6 VÝSLEDKY

### 6.1 Rokštejn

Z hradu Rokštejn jsem získala dohromady 5 vzorků z přelomu 13./14. století, tedy z přelomu vrcholného a pozdního středověku. První vzorek z Rokštejnu byl pravděpodobně hrnec. Na hrnci byla odhalena přítomnost syrového i vařeného vepřového masa (tab. 1). Vzorek je podle všeho kontaminován prasečím hnojem. Vzhledem k tomu, že šlo o vzorek z hradu, není moc pravděpodobné, že se jedná o kontaminaci od současných zemědělských hnojiv. Další vzorek (zřejmě také hrnec) byl podroben testování a testy odhalily přítomnost syrového i vařeného vepřového masa. Obilí (gliadin) se zde prokázalo jako výsledek na hranici detekovatelnosti (0+).

U třetího vzorku (hrnec) bylo detekováno pouze uvařené vepřové maso a také stopy obilí (gliadin). Všechny vzorky byly slabě pozitivní a tento vzorek by neměl být kontaminován a mohl by být považován za původní maso. U čtvrtého vzorku se jedná o zásobnici, u které testy prokázaly pouze vařené vepřové maso. U posledního vzorku (hrnec) testy nedetekovaly přítomnost obilí (gliadin). Odhalily však výskyt nevařeného a vařeného vepřového masa, což je pravděpodobně další kontaminace.



*Obrázek 6: Ukázka vzorku z Rokštejna*

Tabulka 1: Výsledky z lokality Rokštejn

POŘADÍ	LOKALITA	TYP NÁDOBY	GLIADIN	PORK NEVAŘ.	PORK VAŘ.	GC/MS (MetPrep) Analýza tuky, vosky, pryskyřice	MALDI
1	Rokštejn	hrnec	"0"	"0+"	"+"	0	0
2	Rokštejn	hrnec	"0+"	"0+"	"+"	0	0
3	Rokštejn	hrnec	"0+"	"0+"	"0+"	0	0
4	Rokštejn	zásobnice	"0"	"0+"	"0+"	0	0
5	Rokštejn	hrnec	"0"	"0+"	"+"	0	0

vysvětlivky:

0 *negativní výsledek*

++ *pozitivní výsledek*

+ *slabě pozitivní výsledek*

0+ *výsledek na hranici detekovatelnosti (není vyloučena pouze nespecifická reakce)*

## 6.2 Brno – Janáčkovo kulturní centrum

Z Brna, přesně z Janáčkova kulturního centra, bylo otestováno 14 vzorků. Vzorky z Janáčkova centra jsou označeny 1-14. U vzorku č. 1 (viz tab. 1) nebyl zaznamenán pomocí protilátek žádný signál, avšak hmotnostní spektrometrie prokázala vysokou variabilitu mastných kyselin a triacylglyceroly poukazující na rostlinný olej (možná lněný).

U vzorků 2, 6, 7, 8 a 9 byly zjištěny slabé signály po vařeném i nevařeném vepřovém masu, ale stejné intenzity. S největší pravděpodobností se jednalo o původní vařené maso. Vzorky jsou totožné, až na výjimku u vzorku č. 8, kde se prokázaly silné signály kys. stearové a palmitové, což potvrzuje živočišné produkty ve vzorku. Zajímavým vzorkem je vzorek č. 3, u kterého byly nalezeny silné stopy po cereáliích a slabé pozůstatky po vepřovém masu, které nejsou kontaminací, ale s největší pravděpodobností originálními zbytky potravin ze středověku. Vzorek č. 4 prokázal pozitivní reakci na kasein, což může napovídat, že se v hrnci uchovávalo mléko. Hmotnostní spektrometrie odhalila také silně oxidovaný rostlinný olej.

Vzorek č. 5 je velice podobný vzorku č. 3, avšak nemá tak výrazný signál na gliadin, test na prasečí proteiny prokazuje slabou kontaminaci. Zásobnice, která se skrývá pod číslem 9, má značně pozitivní kasein, tudíž stopy po mléku. U vepřového masa je slabý signál, ovšem bez náznaku kontaminace.

Vzorky č. 10 a č. 11 vykazují silnou přítomnost proteinů prasat, jde zřejmě o pozůstatek po vepřovém mase, bez podezření na kontaminaci. U vzorku č. 10 je taktéž vysoce pozitivní signál na gliadin. U vzorku č. 10 se také ukázaly deriváty cholesterolu, což naznačuje přítomnost živočišného tuku. Vzorek č. 11 prokázal pozitivní testy na terpeny a deriváty kys. abietové, které jsou obsaženy ve dřevě jehličnanů i v pryskyřici. Zásobnice pod č. 12 vykazuje vysoce pozitivní signál vařeného vepřového masa a slabý signál nevařeného, v tomto případě se zřejmě jedná o silnou kontaminaci hnojem. Hrnc pod číslem 13 je silně pozitivní na vepřové maso, bez podezření na kontaminaci. Zřejmě šlo o původní vařené maso. Přítomnost masa podporuje také nález kyselin stearové a palmitové. Opět se zde objevují terpeny a deriváty kys. abietové podobně jako u vzorku č. 11. Na závěr bych chtěla okomentovat poslední vzorek z lokality Janáčkova kulturního centra v Brně. Pod vzorkem č. 14 se skrývá miska, která má nejpozitivnější testy ze všech vzorků. Prokazuje vysoce pozitivní stopy obilí (gliadinu), vařeného i nevařeného vepřového masa. Testy také zaznamenaly pozitivní stopy mléka, tudíž tato miska musela sloužit jako prostředek, ze kterého se lidé zřejmě často stravovali. Zajímavostí je také to, že hmotnostní spektrometrie odhalila barnaté ionty mastných kyselin. Barium není v potravě moc obvyklé, proto musí pocházet z hlíny nebo keramiky.

### 6.3 Brno – Vídeňská, Medica

Z ulice Vídeňská jsem získala jeden vzorek s velkou pravděpodobností hrnc z období středověku (obr. 6). Na hrnci byl detekován kasein, což prozrazuje výskyt mléka nebo mléčných výrobků (tab. 2). Vzorek také po povaření prokázal slabý výskyt kontaminace, zřejmě z hnoje.

U tohoto vzorku vyšly na cereálie negativní testy. Hmotnostní spektrometrií byly detekovány mastné kyseliny (triacylglyceroly), které poukazují na živočišný tuk. Nemusí se však jednat o přímou souvislost s proteiny z kontaminace.



*Obrázek 7: Zlomek hrnce z Vídeňské ulice v Brně*

#### **6.4 Brno – Vojtova**

Z této lokality jsem získala celkem tři vzorky, dvě zásobnice (obr. 7) a jeden vzorek nelze identifikovat (tab. 2). U všech těchto tří vzorků byl pouze slabý signál na vepřové maso, který se objevil po povaření. Vzorky proto mohou být kontaminovány hnojem, respektive je možné, že je hnojem zasažená celá oblast, kde se našla keramika.



*Obrázek 8: Ukázka zlomku keramiky ze zásobnice z lokality Vojtova*

Tabulka 2: Výsledky z lokalit v Brně

POŘADÍ	LOKALITA	TYP NÁDOBY	GLIADIN	KASEIN	PORK NEVAŘ	PORK VAŘ	GC/MS (MetPrep) Analýza tuky, vosky, pryskyřice	MALDI
1	Brno - Janáčkovo k.c	hrnec	"0"	"0"	"0"	"0"	vysoká variabilita mastných kyselin	triacylglyceroly poukazující na rostlinný olej (možná lněný)
2	Brno - Janáčkovo k.c	hrnec	"0"	"0"	"0+"	"0+"	"0"	"0"
3	Brno - Janáčkovo k.c	hrnec	"++"	"0"	"0+"	"0+"	"0"	"0"
4	Brno - Janáčkovo k.c	hrnec	"0"	"+"	"0"	"0+"	"0"	silně oxidovaný rostlinný olej (signály TAG)
5	Brno - Janáčkovo k.c	zásobnice	"+"	"0"	"0"	"0+"	-	"0"
6	Brno - Janáčkovo k.c	zásobnice	"0"	"0"	"0+"	"0+"	"0"	"0"
7	Brno - Janáčkovo k.c	zásobnice	"0"	"0"	"0+"	"0+"	"0"	"0"
8	Brno - Janáčkovo k.c	hrnec	"0"	"0"	"0+"	"0+"	deriváty kys. abietové a mastné kyseliny	slabé signály kys. stearové a palmitové
9	Brno - Janáčkovo k.c	zásobnice	"0"	"+"	"0+"	"0+"	"0"	"0"
10	Brno - Janáčkovo k.c	hrnec	"++"	"0"	"++"	"++"	deriváty cholesterolu => živočišný tuk	"0"
11	Brno - Janáčkovo k.c	hrnec	"0"	"0"	"++"	"++"	terpeny, deriváty kys. abietové => dřevo jehličnanů, pryskyřice	silné signály kys. stearové a palmitové
12	Brno - Janáčkovo k.c	zásobnice	"0"	"0"	"0+"	"++"	"0"	"0"
13	Brno - Janáčkovo k.c	hrnec	"0"	"0"	"++"	"++"	terpeny, deriváty kys. abietové => dřevo jehličnanů, pryskyřice	silné signály kys. stearové a palmitové
14	Brno - Janáčkovo k.c	miska	"++"	"+"	"++"	"++"	mastné kyseliny, vysoká konc. kys. olejové => látka bohatá na tuky	Barnaté ionty mastných kyselin (bárium musí pocházet z hlíny nebo keramiky).
	Brno - Vídeňská, Medica	hrnec	"0"	"+"	"0"	"0+"	mastné kyseliny => slabé signály	triacylglyceroly poukazující na živočišný tuk
	Brno - Vojtova	zásobnice	"0"	"0"	"0"	"0+"	"0"	"0"
	Brno - Vojtova	zásobnice	"0"	"0"	"0"	"0+"	"0"	"0"
	Brno - Vojtova	neidentifikováno	"0"		"0"	"0+"		"0"

vysvětlivky:

0 negativní výsledek

++ pozitivní výsledek

+ slabě pozitivní výsledek

0+ výsledek na hranici detekovatelnosti (není vyloučena pouze nespecifická reakce)

## 6.5 Žďár nad Sázavou

Ze Žďáru nad Sázavou jsem získala osm vzorků, šest hrnců a dvě zásobnice. Testované vzorky neprokázaly žádnou stopu po cereáliích ani po kravském mléce, což může naznačovat, že zde žila společnost z vyšších vrstev. Kasein, který je obsažen v mléce, byl testován pouze u čtyř vzorků (viz. tab. 3). Prázdná políčka v tabulce označují, že tyto testy nebyly z finančních důvodů provedeny. U vzorku č. 1 byly detekovány slabé signály mastných kyselin. Je to jediný vzorek z této lokality, u kterého se prokázaly mastné kyseliny. U vzorků č. 4, 5, 6, 7 byla odhalena přítomnost vařeného i nevařeného vepřového masa. Nejsilnější signál měl vzorek č. 6, v tomto případě se pravděpodobně jednalo o původní vařené maso. Pozitivní test na vařené vepřové maso měly také vzorky č. 4 a č. 7. V tomto případě se nebude jednat o původní vařené maso, ale o kontaminaci prasečím hnojem. Ostatní testované vzorky jsou negativní.



Obrázek 9: Testovaná keramika ze Žďáru nad Sázavou

## 6.6 Počátky u Jihlavy - školní ulice

Jako poslední detekovaná nádoba byla zásobnice z Jihlavy. U této nádoby je zřejmá kontaminace hnojem, není však jasné, zda současným či historickým. Silně pozitivní byl detekován gliadin, což napovídá, že tato zásobnice mohla sloužit k uchovávání obilí. Slabě pozitivní signál byl zaznamenán u nevařeného vepřového masa, což může vykazovat možnou existenci původního tepelně zpracovaného masa v minulosti. Tento signál na vepřové maso je však na hranici detekovatelnosti.





Obrázek 10: Zásobnice z Počátků u Jihlavy

Tabulka 3: Výsledky z lokalit Žďár nad Sázavou a Jihlava

POŘADÍ	LOKALITA	TYP NÁDOBY	GLIADIN	KASEIN	PORK NEVAŘ	PORK VAŘ.	GC/MS (MetPrep) Analýza tuky, vosky, pryskyřice	MALDI
1	Žďár nad Sázavou	hrnec	"0"	"0"	"0"	"0"	mastné kyseliny => slabé signály	"0"
2	Žďár nad Sázavou	hrnec	"0"	"0"	"0"	"0"	"0"	"0"
3	Žďár nad Sázavou	hrnec	"0"	"0"	"0"	"0"	"0"	"0"
4	Žďár nad Sázavou	hrnec	"0"		"0+"	"+"	"0"	"0"
5	Žďár nad Sázavou	hrnec	"0"		"0+"	"0+"	"0"	"0"
6	Žďár nad Sázavou	hrnec	"0"		"+"	"+"	"0"	"0"
7	Žďár nad Sázavou	zásobnice	"0"		"0+"	"+"	"0"	"0"
8	Žďár nad Sázavou	zásobnice	"0"	"0"	"0"	"0"	"0"	"0"
	Jihlava, školní u.	zásobnice	"++"		"0+"	"+"	"0"	"0"

## 7 DISKUZE

V minulosti byla vytvořena účelná metodika na základě reakcí antigen-protilátka, která se osvědčila při detekci zbytků potravy v porézní archeologické keramice.

V porovnání s hmotnostní spektrometrií je to jednoduchá metoda s omezeným vybavením a oproti hmotnostní spektrometrii její použití zvládne relativně každý. Pomocí metody antigen-protilátka je detekce proteinů v keramice často výrazně citlivější než identifikace proteinů v porézní keramice pomocí hmotnostní spektrometrie. Tyto metody jsou zcela odlišné, ale snaží se zjistit totéž. Samozřejmě jsou zde oproti hmotnostní spektrometrii také nevýhody. Hmotnostní spektrometrie odhalí široké spektrum proteinů nebo lipidů, zatímco metoda antigen-protilátka reaguje jen na specifické proteiny antigenu, proti kterým je protilátka vytvořena. Hmotnostní spektrometrie se také stále zdokonaluje a možná dosáhne v dohledné době stejné citlivosti jako dobře fungující protilátky.

Prostřednictvím techniky antigen-protilátka se v testované keramice podařilo určit stopy mléka, obilí i zbytky vepřového masa. Během zpracování dat došlo k odhalení rozdílů mezi jednotlivými keramickými vzorky. To svědčí o rozdílné stravě mezi regiony a také to může vypovídat o různém používání keramiky.

### 7.1 Porovnání výsledků podle lokalit

U hradu Rokštejn jsem předpokládala, že v potravě bude výrazně převládat vepřové maso, ale na základě výsledků mohu prohlásit, že mezi výsledky není žádný výrazný rozdíl, zejména při porovnání s městskou parcelou v Brně.

Střední vrstva lidí ve městech podle všeho maso vcelku konzumovala, i když jsou výsledky velmi slabé. Mohou to být zbytky po vaření nebo i po vývarech, kdy se do keramiky příliš proteinů masa nedostalo. Ve sledovaném období bylo vaření považováno za dominantní způsob přípravy pokrmů, avšak musíme brát ohled na chybějící informace. Opékání masa na rožni či pečení v peci nezanechá stopy na keramice. V archeologických nálezech chybí kovové nádoby, které se také zřejmě používaly při vaření. Limitujícím omezením jsou nástroje k detekci ovoce a zeleniny, které se nacházejí ve zbytcích potravy. Doposud není žádná metoda, která by zvládla

detekci ovoce a zeleniny, což vede k výraznému omezení možností při zkoumání detailního jídelníčku (Pavelka a Vařeka 2008).

Bohužel z analyzovaných lokalit nejsou k dispozici například nějaké pekáče, tam by mohly být signály výraznější, ale je otázkou, zda tehdejší obyvatelé vůbec něco takového používali.

Hmotnostní spektrometrie jednoznačně odhalila v Brně přítomnost mastných kyselin, zřejmě jako pozůstatky po mase. Je ale zvláštní, že na hradě Rokštejn nebyly pomocí hmotnostní spektrometrie pozůstatky po mase identifikovány. Zde bychom čekali naopak jasné výsledky. Je otázkou, proč tomu tak nebylo. Možná nalezená keramika se pro maso používala omezeně, tak se podařilo zachytit nějaké proteiny, ale ne mastné kyseliny. A není vyloučeno, že se na hradě maso připravovalo jiným způsobem, po kterém se zbytky nedochovaly. Například se tam maso mohlo více rožnit, zatímco měšťané v Brně maso spíše vařili. Vzorků je také omezený počet, problém mohl vzniknout také tím, že se nepodařilo analyzovat reprezentativní keramiku.

Nicméně na základě výsledků je možno předběžně vyvodit, že masité pokrmy nebyly v městské zástavbě v Brně ojedinělé, pokud vzorky porovnáme s podobnými výsledky (Pavelka a Vařeka 2008), vidíme četné rozdíly. V případě městských parcel z Prahy z 2. poloviny 14. -15./16. století (Pavelka a Vařeka 2008) a nyní testovaných městských parcel v Brně od poloviny 13. století jsou odlišnosti, hlavně v nalezených proteinech masa. Je otázkou, proč v Brně kolem poloviny 13. století na městských parcelách maso měli, i když možná omezeně, zatímco v Praze ve 14. - 15. století ne. Nabízí se dvě vysvětlení. V Brně byly zachyceny bohatší vrstvy městského obyvatelstva, zatímco v Praze málo majetné, nebo se ve spotřebě odráží historický vývoj. V Praze mohlo být zachyceno husitské období, kdy byly možná dodávky masa omezené, zatímco v Brně se jednalo o období větší prosperity, kdy bylo maso více běžnou stravou. Pozůstatky po obilí mohou pocházet z obilných kaší. Zbytky po mléku, které byly v Praze téměř všude, se naopak v Brně vyskytují jen zřídka.

„Husitskou hypotézu“ není možno lépe dokumentovat, protože v žádné lokalitě není přesná datace a původ organických zbytků v keramice se může lišit o celá desetiletí. Tato zjištění u dalších typů potravin mohou podporovat obě předešlé hypotézy, ať už došlo v Praze k zachycení historické etapy nedostatku nebo shodou okolností byla testována keramika od chudších obyvatel.

Na základě výsledků je pravděpodobné, že na městských parcelách v Brně v 13. století měli více masa, zřejmě vařeného, o čemž svědčí sice častý, i když většinou slabý signál na souborech testovaných keramik, zatímco později, někdy v 14. -15./16. století, se v Praze museli spokojit s jídly na bázi mléka a obilnin. Je pravděpodobné, že jídelníček byl bohatší o ovoce a zeleninu, ale takovými testy nedisponujeme.

Ve všech testovaných lokalitách je menší obsah mléka, než jak to bylo v Praze při testování vzorků z chudinské čtvrti, které se nacházela na městské parcele v Novém Městě pražském (Pavelka a Vařeka 2008). To napovídá, že strava těch nejchudších byla pravděpodobně více založena na mléce než u bohatších. Také se čekalo větší zastoupení gliadinu, protože podle dostupných pramenů se měly jíst poměrně často tepelně upravené obilné kaše. Kaše se řadily k velmi populárním pokrmům. Připravovaly se na slaný i sladký způsob a vařily se převážně z pšeničné či žitné mouky. I tyto závěry jsou v souladu s uvedenými hypotézami a na základě výsledků se zdá vysoce pravděpodobné, že skladba potravin na městských parcelách byla lokálně a časově odlišná.

V Brně ve Vídeňské ulici hmotnostní spektrometrie odhalila stopy po mastných kyselinách stearové a palmitové, což koresponduje s výsledky testu antigen-protilátka (tab. 2) Je možné, že zde lidé chovali domácí zvířata, která poskytovala mléko, jež bylo zpracováno pro výrobu mléčných výrobků nebo také k okamžité konzumaci. Bohužel není možné přímé testování kozího mléka jako v dřívějších případech (Pavelka a Vařeka 2008, Čiperová et al. 2016), protože jediná firma, která vyráběla protilátky citlivé na archeologizované kozí proteiny v mléce, je vyrábět přestala a produkty ostatních firem na historické kozí mléčné proteiny nefungují. V současných podmínkách je možno dalšími testy určit mléko kravské a nekravské jako doplněk k testům na kasein, ale z finančních důvodů nebyly tyto testy provedeny, proto nelze určit, zda také převažovalo mléko kozí, nicméně je to pravděpodobné. Kozy byly ve středověkých městech, na rozdíl od krav, poměrně běžné.

Na parcelách pod současným Janáčkovým kulturním centrem v Brně byla strava velice pestrá. Testy ukázaly přítomnost všech testovaných surovin. Zajímavostí je, že hmotnostní spektrometrie odhalila v porézni keramice barnaté ionty, což není moc obvyklé. Barium pochází zřejmě z hlíny, ze které se vypalovala keramika.

Můžeme porovnat také dvorec a hrad z přibližně stejné doby. Hrad Rokštejn (přelom 13. a 14. století) a dvorec Mladá Boleslav - Na Karmeli (přelom 13. a 14. století) (Pavelka a Vařeka 2008). Bohužel nemáme z hradu Rokštejn (přelom 13. a 14. století) analyzované mléko, což znesnadňuje porovnání, protože keramika z dvorce z Mladé Boleslavi obsahovala značné množství kravského a také koziho mléka, respektive produktů z něho (Pavelka a Vařeka 2008). Avšak masité produkty jsou zastoupeny podobně, i když u hradu Rokštejn je bohužel u mnoha vzorků kontaminace trusem a nelze stanovit, zda historickým, nebo ze současných hnojiv. Přítomnost masa u bohatších vrstev je vcelku očekávané zjištění. Co však zarazí, je nepřítomnost glutenu, tedy obilnin, na dvorci a jeho častější detekce na hradě. Chléb jistě používali na obou místech, ale v keramice se najdou stopy spíše po pokrmu typu – obilná kaše. Obilné kaše byly v té době chápány spíše jako chudší jídlo, proto je s podivem, proč na hradu obilné kaše konzumovali a ve dvorci ne. Může to souviset s lokálními odlišnostmi nebo např. s finančními problémy na hradě a prosperitou dvorce, ale bez dalšího průzkumu historických a archeologických záznamů zůstávám v rovině spekulací.

Velice překvapivé byly výsledky ze Žďáru nad Sázavou. Čekala bych zde nějaké stopy po cereáliích a po mléku, ale místo toho jsou tu pouze pozitivní signály na vepřové maso, což může napovídat, že v měšťanských domech žili lidé z vyšších vrstev.

Naopak v Jihlavě dominuje konzumace cereálií. Je otázkou, jestli je vzorek z chudinské čtvrti nebo jestli bylo v Jihlavě již touto dobou rozvinuté zemědělství. Z Jihlavy máme pouze jeden vzorek, takže nemůžeme stoprocentně tvrdit, že konzumovali převážně cereálie.

## 7.2 Možné kontaminace

Kontaminace mohou pocházet ze středověku nebo ze zemědělských hnojiv současnosti. Gliadin je možno detekovat bez problému, protože to je protein nerozpustný ve vodě, ale v alkoholu. Z tohoto důvodu se dá spolehnout na to, že opravdu pochází ze středověku. Také, když se potvrdila přítomnost obilí v zásobnici, tak se jedná o potvrzení funkčnosti metody, protože co lze očekávat v zásobnici jiného než obilí. Nicméně se tam obilí pravděpodobně pouze skladovalo, zřejmě proto se jej podařilo zachytit jen jednou, i když se testovalo více zásobnic. Bez tepelné úpravy nebyla taková možnost, aby gliadin mohl proniknout do keramické matrix.

Proto jsou skladovací nádoby pro analýzy málo vhodné.

Pokud se v nich nenajdou přímo zbytky vysušených potravin, v takovém případě je samozřejmě analýza snadnější a přesnější než z běžné keramiky, jako třeba v lokalitě Rovná, kde se našly zbytky suchých potravin (viz Fišerová 2019). U kaseinu a proteinů hospodářských zvířat je situace složitější. Nalezené proteiny prasat (*Sus scrofa domestica*) byly testovány podle nedávno vyvinuté metodiky na odlišení vařených proteinů od tepelně nedenaturovaných (což představuje trus, popřípadě zbytky syrových tkání) (Slaná 2018). Výsledné hodnoty v některých případech prokazují kontaminace, avšak není možno rozhodnout, zda historické, nebo ze současné doby. Pravděpodobně se spíše jedná o původní nedenaturované proteiny ze středověku. Je známo, že ve městech se prasata chovala, a tak se tam jistě vyskytoval i jejich trus, který se mohl dostat i do vyhozené keramiky. Naopak v současném Brně se nehnojí prasečím trusem, tak není příliš pravděpodobné, že se spodními vodami dostaly proteiny až do archeologické keramiky. V případě kaseinu, pokud není možno otestovat vzorky půdy v blízkosti nálezů, nelze dostupnými testy určit, zda se jedná o proteiny z původního pokrmu, nebo o kontaminace. V případě, že se jedná o keramiku z odpadní jámy, je vhodné testovat půdu i ze vzdálenějšího místa, protože v odpadní jámě se mohou vyskytovat v půdě mnohé proteiny z odpadů. Ale i v případě kaseinu můžeme uvažovat, že na území města Brna se nyní příliš nehnojí zemědělskými hnojivy s příměsí mléčných výrobků, a tak lze dosažené výsledky chápat jako původní historická data.

Tím spíše, že se jedná o poměrně sporadické pozitivní detekce. Pokud by šlo o kontaminaci, dá se předpokládat výskyt kaseinu u všech vzorků z dané lokality.

## 8 ZÁVĚR

Práce podporuje závěr, že nejlepší možná volba pro analýzu potravin z archeologických zbytků je kombinovat metodu antigen-protilátka a analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie, protože se vzájemně doplňují a zvyšují množství získaných dat. Celkové zachycení všech testovaných potravin bylo poměrně menší, než se čekalo (očekávalo), což mohlo být nevhodným skladováním vzorků. Proteiny po vyjmutí z půdy v keramice, pokud je uskladněna v teple, poměrně rychle (v řádu měsíců) degradují a časem se nedají zachytit. Naopak v chladném depozitáři mohou vydržet v keramice po mnoho let (Pavelka ústní sdělení). Testování potravin může prozradit konkrétní historické skutečnosti, které se v písemném ani běžném archeologickém kontextu nedochovaly. Konkrétně výstupem této práce jsou odlišná data z městských parcel vrcholně a pozdně středověkého Brna, která se značně odlišují od skladby potravin na městských parcelách v Praze (Pavelka a Vařeka 2008), kde byly zaznamenány rozdílné, v zásadě opačné poměry, masa, mléka a obilnin.

Častý výskyt masa ve Žďáru nad Sázavou evokuje spíše měšťanské domy než parcely chudiny, což je ve shodě s tím, že šlo o nálezy z náměstí. Poměrně neočekávaná byla pravděpodobná identifikace obilné kaše na hradě Rokštejn, protože kaše je považována za jídlo chudých.

Problémem, který provází podobné analýzy, jsou kontaminace. V práci bylo řešeno, zda nalezené kontaminace vepřového masa jsou středověké, nebo až současné. Na základě úvah se domnívám, že se pravděpodobněji jedná o kontaminace keramiky prasečím trusem ze středověku a nejedná se o recentní proteiny. Podobně je to u kaseinu, zde považuji za pravděpodobný závěr, že se jedná buď o středověkou potravinu, nebo o zbytek vyhozeného mléčného produktu v minulosti, ale nejde o současnou kontaminaci.

## 9 RESUMÉ

The work provides evidence of the composition of food on urban plots in several localities and in one case deals with the remains of food from the castle. In contrast to the older results, which were achieved by the same methods in Prague, it seems that in Brno and other currently tested plots there was a higher proportion of meat and less milk and cereals. It is hypothesized that fragments of pottery from more affluent sections of the urban population than in Prague were captured, or that the epoch of the Hussite wars was captured in Prague, and older times are depicted in the now researched localities. The dating of ceramics is not accurate for decades, so this hypothesis cannot be better substantiated or completely ruled out. The work also addressed the problem of contamination and the reliability of the results obtained.

It seems probable that the protein contaminations found on ceramics are native to the Middle Ages and related to the environment, rather than the contamination from the present. Similarly, the milk proteins found are probably native to food. Contamination of identified proteins from cereals is very likely to be ruled out.

To obtain data for this work, a proven ELISA method was used, which can detect proteins on porous ceramics based on the reaction of antigen with antibody. This method has proven to be very advantageous due to its simplicity and simplicity. Compared to mass spectrometry, the antigen-antibody method is more sensitive.



**10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

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.

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.

Bollag J.M Soil Biochemistry Volume 6: Volume 6 ISBN 9780824782320 Published March 22, 1990 by CRC Press 584 Pages

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>

Craig, O. E. and 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)

Craig, O. E. and Collins, M. J. 2002. The removal of protein residues from mineral surfaces: Implications for residue analysis of archaeological materials. *Journal of Archaeological Science* 29, 1077-1082.

Crowther J.R. (2009): Systems in ELISA. In: The ELISA guidebook, second edition. J.M. Walker (ed), 1-71. Humana Press Inc, Totawa, New Jersey.

Číperová, M., Pavelka, J., a Šmejda, L. 2015. Detekce stop mléka v porézni 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. ISSN 2336-6346.

Dvořáková , P., Hernychová L., Vojtěšek B. (2014) Analýza proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. *Analysis of Protein Using Mass Spectrometry* 104-109. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/395/4498.pdf>

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

- Evershed, R. P., 1993: Biomolecular archaeology and lipids. *World Archaeology* 25, 74 - 93.
- Evershed, R. P. Dudd, S. N. Charters, S. Mottram, H.R. Stott, A.W. Raven, A. van Bergen, P.F. Bland, H.A. 1999: Lipids as carriers of anthropogenic signals from pre-history. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 354, 19-31.
- Friedecký, D. a Lemr, K. 2012. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Bichem. Metab.* 20(41), 152-157.
- Hofreiter, M.; Jaenicke, V.; Serre, D.; von Haeseler, A.; Pääbo, S.: DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA, 2001. *Nucleic Acid Research* 29, 4793 - 4799.
- Lee M.S. 2012: *Mass Spectrometry Handbook*. John Wiley & Sons, Inc., ISBN: 978-0-470-53673-5.
- 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. ISSN 1802-0364.
- Pavelka, J. a Vařeka, P. 2008. Příspěvek v poznání stravy ve vrcholném a pozdním středověku: první výsledky analýzy potravinových zbytků na keramice z archeologických výzkumů. *Kuděj* 10(2), 98-109. ISSN 1211-8109.
- Pavelka, J., Šmejda, L., Hynek, R. a Hrdličková-Kučková, Š. 2016. Immunological detection of denatured proteins as a method for rapid identification of food residues on archaeological pottery. *Journal of Archaeological Science* 73, 25-35. ISSN 0305-4403.
- Pruvost, M. Grange, T. Geigl, E. M. 2005: Minimizing DNA contamination by using UNG-coupled quantitative real-time PCR on degraded DNA samples: application to ancient DNA studies. *Biotechniques*. Apr;38(4):569-75.
- Slaná, K. 2018. Identifikace proteinů z keramické matrix archeologických nálezů. MS, Bakalářská práce, depon. in Západočeská univerzita v Plzni, 44 s. Plzeň.
- Valenta, T.: *Enzymatická hydrolýza sacharidů a proteinů*, 2009. Univerzita T. Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. Ústav potravinářského inženýrství.

## INTERNETOVÉ ZDROJE

- [1] Protein Data Bank (1997) Biological Macromolecular Structures Enabling Breakthroughs in Research and Education. *Protein Data Bank* 15. 5. 1997 [online]. [cit. 2020-05-25] Dostupné z: <http://www.rcsb.org/structure/1S9V>
- [2] Rasheed F, 2015 Tailoring the structure-function relationship in wheat gluten [online]. [cit. 2020-04-17] Dostupné z: <https://www.semanticscholar.org/paper/Tailoring-the-structure-function-relationship-in-Rasheed/6c44d9d41e522110972ab58fee4baac2fa4b5b78>
- [3] Holčapek, M. (2014) Experimentální metody strukturálního výzkumu. Hmotnostní spektrometrie [online]. [cit. 2020-03-12] Dostupné z: [http://holcapek.upce.cz/teaching/Holcapek\\_EMSV\\_MS.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/Holcapek_EMSV_MS.pdf)
- [4] Konečný, V. (2016) V ruinách hradu Rokštejna byla zazděna kostra novorozence. *Novinky.cz* [online]. [cit. 2019-04-24]. Dostupné z: <https://www.novinky.cz/vase-zpravy/clanek/v-ruinach-hradu-rokstejna-byla-zazdena-kostra-novorozence-40177118>
- [5] Merta, D., Sedláčková L. (2016) Záchraný archeologický výzkum JKC v Brně [online]. [cit. 2019-04-24]. Dostupné z: [https://www.archaiabrno.org/home\\_cs/?acc=zapisnicek&blog\\_id=710&blog\\_date=2016-07-08](https://www.archaiabrno.org/home_cs/?acc=zapisnicek&blog_id=710&blog_date=2016-07-08)
- [6] Merta, D., Zůbek A. Komise na Vídeňské 6-8 (2013) Komise na Vídeňské 6-8 [online]. [cit. 2020-04-27]. Dostupné z: [https://www.archaiabrno.org/home\\_cs/?acc=zapisnicek&blog\\_id=561](https://www.archaiabrno.org/home_cs/?acc=zapisnicek&blog_id=561)
- [7] Kolařík, V a kol. (2017) Záchraný archeologický výzkum na Vojtově ulici v Brně I. [online]. [cit. 2020-04-25]. Dostupné z: [https://www.archaiabrno.org/home\\_cs/?acc=zapisnicek&blog\\_id=806&blog\\_date=2017-07-11](https://www.archaiabrno.org/home_cs/?acc=zapisnicek&blog_id=806&blog_date=2017-07-11)
- [8] Mašová, L. (2016) Archeologové prozkoumají žďárské náměstí Republiky [online]. [cit. 2020-04-25]. Dostupné z: [https://zdarsky.denik.cz/zpravy\\_region/archeologove-prozkoumajizdarske-namesti-republiky-20160509.html](https://zdarsky.denik.cz/zpravy_region/archeologove-prozkoumajizdarske-namesti-republiky-20160509.html)
- [9] Malý, M. (2018) Záchraný výzkum v Jihlavě nabízí možnost stát se na pár týdnů skutečným archeologem [online]. [cit. 2020-04-25]. Dostupné z: <https://vysocina.rozhlas.cz/zachranny-vyzkum-v-jihlave-nabizi-moznost-stat-se-na-par-tydnu-skutecnym-71727>

## 11 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Odběr vzorku z keramiky bohaté na karbonizované usazeniny (příškvarky) .....	11
Obrázek 2: Často používané MALDI matrice: kyselina sinapová a kyselina a-kyano-4-hydroxyskořicová .....	13
Obrázek 3: Pozitivní a negativní reakce v mikrotitračních jamkách .....	19
Obrázek 4: Stavba beta - laktoglobulinu (Brownlow 1997).....	20
Obrázek 5: Stavba gliadinu .....	21
Obrázek 6: Ukázka vzorku z Rokštejna .....	27
Obrázek 7: Zlomek hrnce z Vídeňské ulice v Brně .....	30
Obrázek 8: Ukázka zlomku keramiky ze zásobnice z lokality Vojtova .....	30
Obrázek 9: Testovaná keramika ze Žďáru na Sázavou .....	32
Obrázek 10: Zásobnice z počátků u Jihlavy .....	33

**12 SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Výsledky z lokality Rokštejn .....	28
Tabulka 2: Výsledky z lokalit v Brně .....	31
Tabulka 3: Výsledky z lokalit Žďár nad Sázavou a Jihlavy .....	33