

**Západočeská univerzita v Plzni  
Fakulta filozofická**

**Bakalářská práce**  
**Detekce potravin na archeologické keramice**

**Podtitul**  
**Mléčné proteiny v porézní keramice a význam mléka v minulosti  
a v archeologickém kontextu, zejména v neolitu jihozápadních  
a středních Čech.**

**Monika Čiperová**

**Plzeň 2015**

**Západočeská univerzita v Plzni**

**Fakulta filozofická**

Katedra archeologie

**Studijní program Archeologie**

**Studijní obor Archeologie**

**Bakalářská práce**

## **Detekce potravin na archeologické keramice**

**Podtitul**

**Mléčné proteiny v porézní keramice a význam mléka v minulosti  
a v archeologickém kontextu, zejména v neolitu jihozápadních  
a středních Čech.**

**Monika Čiperová**

*Vedoucí práce:*

Mgr. Jaroslav Pavelka, PhD.

Katedra archeologie

Fakulta filozofická Západočeské univerzity v Plzni

Plzeň 2015

Prohlašuji, že jsem práci zpracovala samostatně a použila jen uvedených pramenů a literatury.

*Plzeň, duben 2015*

.....

## **Poděkování**

Ráda bych na prvním místě poděkovala svému vedoucímu Mgr. Jaroslavu Pavelkovi, PhD., za jeho cenné rady, celkové vedení mé bakalářské práce a velmi vstřícný přístup.

Velké poděkování patří především mé rodině a přátelům za neochvějnou podporu při mém studiu.

# Obsah

<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1. 1 Cíle práce .....</b>	<b>1</b>
<b>2 PROBLEMATIKA POTRAVIN V ARCHEOLOGII.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Vývoj metodiky pro detekci proteinů z archeologické keramiky pro ELISA testy (enzyme-linked immunosorbent assay)7</b>	
<b>2. 2 Testovací sady.....</b>	<b>9</b>
<b>2. 3 Příprava vzorků a průběh testu .....</b>	<b>11</b>
<b>2. 4 Detekce proteinů mléka .....</b>	<b>11</b>
2. 4. 1 Postup při detekci proteinů mléka skotu. ....	11
2. 4. 2 Postup při detekci proteinů kozího mléka .....	13
<b>2. 5 Lokality a časová datace odebraných vzorků .....</b>	<b>15</b>
<b>2. 6 Obecná charakteristika neolitické keramiky kultury s lineární keramikou .....</b>	<b>16</b>
<b>3 VÝSLEDKY TESTŮ – ANALÝZY ZBYTKŮ POMOCÍ METODY ANTIGEN-PROTILÁTKA.....</b>	<b>18</b>
<b>3. 1 Vyhodnocení metodiky .....</b>	<b>24</b>
<b>4. INTERPRETACE ZÍSKANÝCH DAT A V KONTEXTU VÝŽIVY V NEOLITU .....</b>	<b>25</b>
<b>4. 1 Rozpor v keramických nálezech identifikujících mléko s výsledky sekvenace archaické DNA .....</b>	<b>27</b>
4. 1. 1 Mutace 13910 * T pro schopnost trávení laktózy v dospělosti .....	27
4. 1. 2 Oblast vzniku mutace.....	28
4. 1. 3 Šíření mutace.....	30
4. 1. 4. Zpracování mléka a keramika.....	31
4. 1. 5 Proteiny v archeologii.....	32

<b>5. ZÁVĚR.....</b>	<b>35</b>
<b>6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>36</b>
<b>7 RESUMÉ .....</b>	<b>44</b>
<b>8 PŘÍLOHY.....</b>	<b>45</b>

# 1 Úvod

V archeologii se poslední dobou stále více prosazují analýzy organických zbytků. Velkou oblastí výzkumu na tomto poli je studium keramiky, ve které se mohou uchovat zejména lipidy a proteiny (Craig – Collins 2000; Solazzo a kol. 2008). V této práci bych se stručně chtěla zmínit o obecně používaných metodách pro analýzy organických zbytků z keramiky. Konkrétněji je práce zaměřena na problematiku mléčných produktů. Uvádím přehled hlavních dosažených poznatků na tomto poli, zejména z evropských výzkumů a doplňuji je o výsledky vlastních analýz získaných z několika lokalit jihozápadních a středních Čech. Diskutuji data, která potvrzují přítomnost mléčných zbytků s daty z literatury na archaické (ancient) DNA, která překvapivě prokazují nemožnost trávení laktózy u většiny obyvatel pravěkých populací Evropy.

## 1. 1 Cíle práce

Prvním cílem mé práce je zaměřit se na problematiku potravin v archeologii, zpracovat většinu dostupných informací a utřídit je přehledným způsobem. Během plnění dalšího cíle, kterým je zajišťování souboru keramiky, se zaměřím na vypracování nové a jednoduché metodiky pro analýzy keramiky na přítomnost mléčných zbytků na bázi přítomnosti proteinů a její aplikace na vzorky z našeho území. Jedná se o některé inovace při analýzách potravních zbytků pomocí systému antigen-protilátka. Pro testování bude vybrána pravěká keramika z období, kdy je používání mléčných produktů už všeobecně předpokládáno, případně i doloženo historicky a také bude jednorázově použita středověká keramika. Analýzy budou zaměřeny na důkaz přítomnosti, či nepřítomnosti mléčných produktů na neolitické keramice, protože tento důkaz potvrzující začátky zemědělství na našem území zatím chybí. Práce se okrajově dotkne i pří-

pravy vzorků pro měření na hmotnostním spektrometru. Připravím vzorky, které budou dále zpracovány pomocí hmotnostní spektrometrie, pro verifikaci metodiky antigen-protilátka, přímo z keramické matrix. Získaná data budou v rámci posledního cíle interpretována z několika hledisek, zejména pro pochopení některých aspektů, jak byla původní keramika pravděpodobně obecně používána. V závěru bude také diskutována problematika výskytu mléčných produktů na keramice v kontextu trávení laktózy. Využití důkazů mléčných proteinů pro lepší pochopení funkce a účelu některých konkrétních nádob nebude cílem práce, ale představuje možnost dalšího výzkumu.

## **2 Problematika potravin v archeologii**

Běžně nalézané keramické artefakty, které jsou používány v řadě archeologických kontextů, sloužily původně převážně jako nádoby pro přípravu jídel a je proto pravděpodobné, že obsahují zbytky pravěké stravy (Baker 2010). Samotná porézní keramika je vhodná k absorpci a uchování organických zbytků a zároveň je chrání před mnohými tafonomickými procesy (Craig – Collins, 2000; Eerkens 2005; Baker 2010).

Analýzy organických zbytků se mohou provádět na více úrovních a s několika hlavními komponentami. Jedná se zejména o archaickou DNA, proteiny, lipidy a alkaloidy. Samozřejmě mnohé důležité poznatky mohou přinést i tradiční analýzy, např. určení druhů pylů ve zbytcích potravy. Vzhledem k obrovskému rozvoji metod a studia DNA (z anglického deoxyribonucleic acid), se také začaly provádět extrakce a analýzy DNA z archeologických vzorků. V počátcích způsobilo největší zájem úspěšné klonování DNA extrahované z egyptské mumie (Pääbo 1985). Ovšem výsledky byly často zpochybňovány a napadány, zejména kvůli možné kontaminaci současnou DNA, která je v archeologii velikým problémem (Pruvost a kol. 2005).



Práce s DNA z organického materiálu starého stovky až desetitisíce let je poznamenána řadou problémů, zejména degradací (rozpadem na stále menší části), pak také dochází k modifikaci spontánními chemickými reakcemi, hlavně hydrolýzou a oxidací (Hofreiter a kol. 2001). Velkým nebezpečím je rovněž kontaminace vzorků cizorodou DNA. Toto riziko je zřejmě nejzávažnější v případě studia lidských pozůstatků. Naděje na získání prokazatelně čisté DNA izolací z vnitřku kostí nebo zubů nebyly asi oprávněné (Gilbert a kol. 2005). Tím vším zmíněné výhody, které jsou patrné na recentním materiálu, silně ustupují do pozadí. Naproti tomu zachovalost proteinů pro reakci se specifickými protilátkami je i přes bakteriální kontaminaci často lepší než v případě DNA. Už dříve bylo poukázáno na to, že se mohou vyskytovat rozdíly v analýze DNA extrahované ze starých organických zbytků analyzované pomocí metody PCR a na druhou stranu pomocí imunochemické detekce. Je to zřejmě tím, že hydrolytické štěpení řetězců dlouhých molekul, je mnohem fatálnější pro úseky DNA, které jsou nutné pro PCR reakce, než pro krátké úseky DNA, které mohou být detekovány imunochemicky (Waite a kol. 1997). Protilátky zůstávají i v současnosti vhodným nástrojem pro archeologii. Vhodnou metodikou pro výzkum archaických proteinů je také tzv. Western blots za pomoci specifických protilátek. Touto cestou byly detekovány proteiny imunitního systému a kolagenních bílkovin (Schmidt-Schultz – Schultz 2004). Rovněž samotná imunodetekce a kvantifikace byla úspěšná u nekologenních proteinů v kostech z archeologických nalezišť (Brandt a kol. 2002). Dokonce se podařilo identifikovat a sekvenovat protein starý 65 miliónu let (Asara 2007) a 80 miliónů let (Schweitzer a kol. 2009). Ovšem i proteiny podléhají celé řadě transformací, jako jsou kupříkladu denaturace, hydrolýzy peptidových vazeb, deaminace, napadení mikroorganismy a podobně (Barnard a kol. 2007). Ovšem práce s proteiny je kupříkladu oproti lipidům složitější. Proteiny jsou velké složité a různorodé a jako takové se každý chovají velmi odlišně (Barker 2010). Běžně nacházený kolagen je hydrofobní, zatímco bovinní sérový albumin se snadno

rozpouští ve vodě (Barker 2010). Nelze tedy použít jednu metodu k extrakci a identifikaci všech proteinů (Barker 2010). Problém extrakce je velmi důležitý a proto se k němu ještě vrátím v další kapitole.

Jsou dvě hlavní možnosti jak detekovat proteiny v keramice. První je pomocí protilátek a druhá pomocí hmotnostní spektrometrie (zkratka MS z anglického *Mass spectrometry*). Metoda pomocí protilátek je poněkud diskreditována špatným přístupem v minulosti. Především díky zásadní chybě, které se dopouštěli mnozí z těch, kteří ji používali v archeologii. A to jsou cross-reakce (nespecifické reakce mezi antigenem a protilátkou), které vznikají mezi protilátkou a jinými antigeny. Dochází k reakci jinde, než jsou specifické cíle, proti kterým byly protilátky vytvořeny (Child – Pollard 1992; Brandt a kol. 2002). Protilátky nebyly vytvořeny proti proteinům ve formě, v jaké se vyskytují v archeologických nálezech, ale proti podobě v jaké se vyskytují v čerstvém nativním stavu. Pak někdy mohou na staré proteiny fungovat, ale často ne, nebo fungují nepřesně. Lze tomu čelit přípravou protilátek proti denaturovaným proteinům, ale je nutno mít znalosti o jejich formě (Craig – kol. 2000). Nicméně tyto problémy nejsou uspokojivě řešeny (Barker 2010). Lze je však vhodně obejít využitím speciálních komerčních sad pro identifikaci potravin (Pavelka – Vařeka 2008; Pavelka – Orna 2011). V tomto případě jsou k dispozici protilátky, které jsou používány na detekci proteinů v potravinách. Jsou tedy připraveny proti tepelně upraveným denaturovaným formám, často se vyskytujícími jen v malých koncentracích (viz Björklund a kol 2001). Pro detekci proteinů je v současnosti uznávanější metodou hmotnostní spektrometrie. Jedna z prvních prací analyzující zbytky potravin z archeologické keramiky pomocí hmotnostní spektrometrie spolu s pyrolýzou-plynovou chromatografií, identifikovala ve zbytcích na vnitřních stranách nádob řadu organických sloučenin. Jednalo se převážně o mastné kyseliny, ale byly také zjištěny markery charakteristické pro proteiny a polysacharidy (Oudemans – Boon 1991). Při přípravě na vlastní analýzu hmotnostní spektrometrií se proteiny extrahují pomocí

různých roztoků, nebo fyzikálních postupů případně i za použití gelové elektroforézy (Barnard a kol. 2007). Pak je nutno použít činidla štěpící proteiny do menších kusů ve specifických místech, například enzymem trypsinem. Tak vznikají menší peptidy, které jsou identifikovány pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie-hmotnostní spektrometrie. Vzorky se nejprve oddělí na základě jejich chemických vlastností pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie. Následně se vzorky rozpuštěné v roztoku vedou přes kapilární trubice se speciálními povlaky, které mají afinitu k některým substrátům. Sloučeniny, které mají větší afinitu k substrátům, jsou zachyceny, ty které mají afinitu menší, prochází dál. Pak mohou být jednotlivé sloučeniny analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie (Pollard a kol. 2007; Barker 2010). Hmotnostní spektrometrie je metoda, která stanovuje hmotnosti molekul a atomů po jejich převedení na ionty. Podstatou hmotnostní spektrometrie je separace iontů produkovaných v iontovém zdroji přístroje na základě jejich efektivní hmotnosti ( $m/z$ , kde  $m$ -hmotnost iontu a  $z$ -nábojové číslo), a pak následuje jejich detekce. Postup má několik nezbytných kroků. Všechny procesy probíhají v uzavřeném prostoru, ve kterém je pomocí systému pump kontinuálně udržováno vakuum. Nejdříve je vzorek umístěn do přístroje, kde podstoupí odpařování. Složky vzorku jsou ionizovány jedním z mnoha způsobů (např. dopadem elektronového paprsku), což má za následek vytvoření nabitých částic – iontů. Ionty jsou odděleny podle  $m/z$  poměru v analyzátoru elektromagnetického pole. Ionty jsou poté detekovány, obvykle kvantitativní metodou a zpracovány hmotnostním spektrometrem. Hmotnostní spektrometry se skládají ze tří modulů. Prvním modulem je zdroj iontů, jímž lze převést molekuly plynu na ionty. Druhým modulem je hmotnostní analyzátor, který třídí ionty podle jejich hmotnosti s použitím elektromagnetických polí. Třetím modulem je detektor, který měří hodnotu indikátoru množství, a tak poskytuje data pro výpočet hojnosti každého iontu v reálném čase. Mezi hlavní použití patří identifikace neznámých látek, nebo určování izotopového složení prvků v molekule a stanovení

struktury sloučeniny (viz Karasek – Clement 1988; Lee 2012). Pomocí hmotnostní spektrometrie se také analyzují lipidy a alkaloidy.

Výhodou hmotnostní spektrometrie oproti imunologickým technikám jsou více reprodukovatelné a přesnější výsledky. Také je schopna pokrýt širší spektrum zkoumaných látek. Nevýhody jsou obtížná dostupnost vhodných zařízení, speciální úpravy vzorků, které mohou být u archeologického materiálu problematické (Barker 2010), mnohdy také nutnost vypracování speciálních postupů pro archeologické vzorky, které se liší od běžně analyzovaných (Koník, laboratoř hmotnostní spektrometrie JU, ústní sdělení). Pro téma mé práce je ale podstatné, že hmotnostní spektrometrie nedokáže spolehlivě rozlišit mléko kravské od jiných typů, zejména od kozího. Je to zřejmě proto, že zachytí a rozliší peptidy, které se vyskytují ve všech druzích mléka, ale ne ty druhově specifické. V tomto jsou protilátky výhodnější (viz Pavelka – Vařeka 2008; Pavelka – Orna 2011).

Proti lipidům je v odborné literatuře málo výhrad. Přetrvávají dobře v keramice, která je chrání před nepříznivými vlivy, zejména slunečním světlem, vlhkostí a dalšími zdroji zvětrávání (Evershed, 1993; Evershed a kol 1999). Umožní např. rozlišit původ z nejdůležitějších domácích zvířat – ovce, kozy, dobytek, prasata (Mottram a kol. 1999). Pomocí hmotnostní spektrometrie byla již analyzována data z více lokalit. Testování lipidů na keramice z lokalit ostrovů v severovýchodním Atlantiku (blízko Británie) prokázalo, že obyvatelé zřejmě s nástupem zemědělství opouštěli stravování z mořských zdrojů a přecházeli na zemědělské produkty (Cramp a kol. 2014). Zajímavé jsou výsledky mléčných lipidů. Copley a kol. (2003) zpracovali vzorky z 958 archeologických keramických nádob ze 14 britských lokalit od časného neolitu do pozdní doby železné. Výsledky potvrdily používání mléka už od neolitického období a autoři to pokládají za důkaz dobře vyvinutého zemědělství v pátém tisíciletí před naším letopočtem (Copley a kol. 2003). Podobně zkoumání lipidů na keramických zlomcích z několika britských lokalit doby bronzové a železné prokázalo

u 25% keramických zlomků přítomnost mléčných lipidů (Copley a kol. 2005).

Alkaloidy jsou dosud zkoumány méně a s menším vztahem k potravinám. Na zbytcích dýmek v severní Americe z období 1000 př. n. l. – 1 n. l. (Middle Woodland), byl pomocí plynové chromatografie / hmotnostní spektrometrie prokázán alkaloid nikotin (Rafferty 2002). Pomocí plynové chromatografie / hmotnostní spektrometrie byl také prokázán harmin, z rostliny *Banisteriopsis campii*, z naleziště Azapa, severní Chile, 500-1000 n. l., tím bylo potvrzeno nejen používání psychoaktivních rostlin v indiánských společnostech, ale i rozsáhlý obchod, protože podél pobřeží Atakama rostlina neroste (Ogalde a kol. 2009).

Kromě výše uvedených analýz se pro zbytky potravin také používají metody plynové chromatografie / hmotnostní spektrometrie, pro detekci dalších látek. Např. v amforách Tutanchamonovy hrobky byla identifikována kyselina tartarová a swingová a barvivo malvidin, které byly určeny jako pozůstatky bílého vína (Guasch-Jané a kol. 2006).

## **2.1 Vývoj metodiky pro detekci proteinů z archeologické keramiky pro ELISA testy (enzyme-linked immunosorbent assay)**

Práce začíná cíleným odběrem vzorků, nejvýhodnější je odebrat materiál tak, aby byla vyloučena kontaminace současnými proteiny a, pokud je to možné, je vhodné uskutečnit odběr na více částech jedné nádoby pro kontrolní analýzy. Odběr se často provádí vrtáním (Craig – kol 2000; Copley a kol. 2003), nicméně jsem zvolila škrábání ostrým kovovým nástrojem, protože se domnívám, že nejvíce proteinů je v povrchových vrstvách a pro imunologické analýzy je nutné získat větší podíl proteinů, než pro hmotnostní spektrometrii.

Dalším krokem měla být extrakce. Právě extrakce jsou popisovány jako největší problém (Baker 2010). Použila jsem stejné detekční sady

jako Pavelka – Vařeka (2008) a Pavelka – Orna (2011), avšak v těchto případech šlo o karbonizované zbytky potravin – příškvarky, extrakce proto nebyla nutná, neboť proteiny nebyly v keramice, ale na ní. Musela jsem použít jiný způsob. Pro plánované imunotesty byl už způsob extrakce proteinů z keramiky publikován (Craig – Collins 2002). V této práci jsou popsány různě extrakční roztoky a jejich vliv na ELISA testy. Práce je ukázkou vývoje experimentální metody pro potřeby archeologie. Na čistou drcenou keramiku byly aplikovány proteiny bovinního séra (BSA), směs se vařila po dobu jednoho týdne v 85 °C a pak byla dvakrát promyta 100 ml milli-Q vody. BSA proteiny pak autoři zkusili vyextrahovat různými činidly a identifikovat imunologicky. Ve všech testech byla použita filtrovaná a sterilizovaná milli-Q voda a hojně používaný komerční BDH pufr. Pro extrakci byly postupně používány tyto činidla: SDS (dodecylsírán sodný) (2%) [pH 6·4], BDH; guanidin-HCl (6 M [pH 5·6]), BDH; močovina (8 M [pH 8·5]), BDH; fosfátový pufr (10 mM fosfátu, 0,149M NaCl [pH 7·4]); voda (Milli-Q [pH 7·1]); amoniak (5% hmotnost / objem [pH 11·5]), BDH; K<sub>2</sub>EDTA (di-draselná ethylendiamintetraoctová kyselina) (10% hmotn. /obj. [pH 10·0]), BDH (CraigCollins 2002). Extrakce byly rovněž prováděny různě dlouhou dobu. Autoři dokumentují, že pouze tři extrakční činidla, nenarušily imunologickou identifikaci. Jednalo se o 6 hodin extrakce pomocí močoviny, 48 hodin pomocí guanidin-HCl a 48 hodin pomocí SDS (Craig – Collins 2002).

Bylo možné některou z těchto úspěšných extrakčních metod použít. Avšak jednoduchá úvaha mě vedla k tomu, že částice keramiky nikterak nenaruší imunologickou reakci antigenu a protilátky, takže nebude na překážku, pokud tam zůstanou a protilátka dokáže rozlišit i protein navázaný na keramice. Proto stačí, pokud bude archeologická keramika ve formě jemné drti. Navíc vybrané komerční sady jsou připravené pro tepelně zpracované, tedy denaturované a poškozené proteiny a obsahují už připravený extrakční roztok, který by měl do určité míry uvolnit proteiny i z keramiky. Proto místo složité extrakce stačí odběr keramiky škrábá-

ním kovovým ostrým nástrojem, tím se docílí jemné drti a následným dalším drcením v plastické zkumavce se odebrané částice keramiky ještě více zjemní.

## 2. 2 Testovací sady

Analýza kravského mléka se prováděla díky identifikaci proteinu  $\beta$ -laktoglobulinu skotu pomocí komerční sady (kitu) BLOKITS BLG ( $\beta$ -Lactoglobulin) Assay od firmy Neogen (dříve Tepnel *BioSystems*).

Přítomnost kozího mléka byla testována kitem od společnosti RIDASCREEN® GIS (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany), který se osvědčil i v minulosti (Pavelka – Orna, 2011; Pavelka – Vařeka, 2008). Specifická testu je založena na imunologické detekci kozího IgG (imunoglobulinu třídy G), který se vyskytuje v kozím mléku.

Testy byly založené na metodě ELISA (z angl. **E**nzyme-**L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay), někdy je metoda také označována jako EIA (**E**nzyme **I**mmuno**a**ssay). Přes problematické a nevhodné použití v archeologii v minulých letech je v jiných oborech jednou z nejpoužívanějších imunologických metod, pomocí které je možno identifikovat jak protilátky, tak antigen (specifický protein, který je buď dopředu připravený – pro identifikaci protilátky, nebo naopak je detekován pomocí dopředu připravené protilátky). Metoda využívá několika vlastností imunoglobulinů, především jejich schopnost vázat se na povrch některých plastů, druhá věc je schopnost vázat na svou část enzymy (jedná se tzv. FC fragment, kterým se normálně protilátky vážou na povrch leukocytů na jim odpovídající FC receptory). Tím je možné imunoglobulin „přilepit“ k povrchu mikrotitračních jamek, nebo k nim přidat značení, které reakci zviditelní.

Testy jsou založené na reakci substrátu (antigenu) a protilátky, tyto testy jsou velmi citlivé a kalibrované, jejich reakce jsou garantované. Původně jsou určeny pro testování alergenů<sup>1</sup> v různě tepelně upravených

---

<sup>1</sup>Alergen – antigen, který je schopen u vnímavých jedinců vyvolat patologickou imunitní reakci – alergii.

potravinách, to znamená, že jsou schopny detekovat v potravinách i pouhé kontaminace proteinů, proto jsou citlivé i na archeologické zbytky, kde musíme navíc počítat s řadou změn a poškození ve struktuře proteinů. Klíčové detekční protilátky jsou přichyceny na dně jamek mikrotitrační destičky a ty zachycují příslušné proteiny z testovaného vzorku. Množství zachycených proteinů, tedy intenzitu reakce je však nutno zviditelnit a k tomu se používají další tzv. sekundární druhově specifické protilátky, které jsou biotinylově<sup>2</sup> značeny. Během práce se používá několik promývacích kroků. Metody ELISA se dělí podle způsobu provedení a detekce do několika kategorií. Přímá ELISA – pro detekci antigenu, nepřímá ELISA – pro detekci specifických protilátek, přímá sendvičová ELISA – pro detekci antigenu, nepřímá sendvičová ELISA – pro detekci specifických protilátek (viz Crowther 2001). V této práci používaný test BLOKITS BLG Assay ELISA spadá do kategorie kompetitivní, což znamená, že u tohoto typu soutěží o vazbu na omezený počet vazebných míst, na pevném povrchu imobilizovaných protilátek, neoznačený antigen s antigenem označeným enzymem. Reakce se nechá inkubovat a poté se odmyjí nenavázané molekuly. Následně je přidán substrát (látka, která reaguje s enzymem a tím změní svou barvu). Tento substrát přemění enzym přítomný ve vázané frakci na barevný produkt (viz Crowther 2001). V tomto případě, čím více je reakce zbarvena, tím méně vzorek obsahoval proteinu  $\beta$ -lactoglobulinu skotu. Tedy negativní reakce je zbarvena a silně pozitivní vůbec (zbarvení viz obr. 4). Proto je naprosto nezbytná pozitivní a negativní kontrolní reakce, aby bylo umožněno srovnání. Pro vyhodnocování je možná optická detekce pouhým okem, ale mnohem přesnější je detekce spektrofotometrická<sup>3</sup>. V měřených vzorcích byla ve všech případech

---

<sup>2</sup> Biotinylace – proces vazby biotinu (vitamin H) k molekule proteinu pomocí  $\text{NH}_2$  skupiny

<sup>3</sup> Spektrofotometry – přístroje, které umožňují měřit část absorpčního spektra v určitém úseku vlnových délek, přičemž monochromatické světlo prochází vzorkem. Většinou se pracuje s roztoky, které se plní do standardních kyvet s optickou dráhou 1 cm.



použita detekce na spektrofotometru. Měření bylo prováděno na ELISA readeru VERSAmax™ (Molecular Devices) při 450 nm (obr 5).

## **2. 3 Příprava vzorků a průběh testu**

Z vybraných částí nádob a keramických zlomků byla seškrabána vrstva 2– 5 cm<sup>2</sup> do hloubky 1 – 3 mm (viz obr. 1). Kvůli možné kontaminaci recentními proteiny byla mnohdy první povrchová vrstva vyhozena a nepoužita pro testy. Seškrábané vzorky keramiky byly po odebrání rozděleny do dvou plastických zkumavek (viz obr. 2), aby mohla být jedna použita pro testování proteinů kravského mléka a druhá pro kozí. Keramika po odběru vzorku vykazuje poškození jen do poměrně malé hloubky (obr. 3 a, b). Směs drcené keramiky v plastických zkumavkách byla posléze v laboratoři nadrcena ještě jemněji v extrakčním roztoku od výrobce komerčního kitu (v objemu cca 200 - 400μl; v případě kozího IgG šlo o destilovanou vodu). U testu na β-laktoglobulin skotu byla použita vyšší koncentrace, než uvádí výrobce pro recentní potraviny a to v poměru 1:10, nebo 1:15. Další postup byl podle instrukcí výrobce.

Vzorek pro hmotnostní spektrometrii byl odebrán obdobným způsobem jako vzorky pro testy pomocí protilátek.

## **2. 4 Detekce proteinů mléka**

### **2. 4. 1 Postup při detekci proteinů mléka skotu.**

1. V prvním kroku je nutno připravit a naředit extrakčních a promývacích roztoky a patřičný počet plastických jamek pro testování (obr. 4).

2. Do jamek se napipetuje automatickou pipetou 100 μl extrakčního roztoku (0,05 M karbonátový/bikarbonátový pufr pH 9,6; používá se jako negativní standard), dále BLG (β-laktoglobulin) kontrolního standardu a naředěné a připravené vzorky proteinů společně s keramikou. Je nutno

měnit špičky na pipetování a ve všech krocích dbát na to, aby se zabránilo vzájemné cross-kontaminaci.

3. Na rozdíl od jiných typů ELISA analýz je nutno okamžitě přidat do každé jamky 50 ml BLG biotinu (s navázanou sekundární protilátkou).

4. Následně je mikrotitrační destička umístěna na třepačku a inkubuje se za intenzivního třepání při pokojové teplotě po dobu 60 minut.

5. Obsah jamek je odstraněn a jamky jsou pětkrát promyty pomocí speciálního promývacího roztoku, který je předem připravený. Destička je důkladně zbavena zbytků roztoku a případných bublin několikerým silným klepnutím na vrstvě buničiny.

6. Pak je nutno do všech jamek přidat 50 ml avidin peroxidázy.

7. Mikrotitrační destička je opětovně umístěna na třepačku a inkubuje se za intenzivního třepání při pokojové teplotě po dobu 15 minut.

8. Na konci inkubace, je nutno další promývání, které opakuje postup popsany v bodu 5.

9. Po promývání je přidáno do každé jamky 100  $\mu$ l TMB substrátu (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin).

10. Destička je opatrně přenesena na rovnou plochu a ponechána nejlépe ve tmě 45 minut při pokojové teplotě, bez třepání. Rychlost vývoje reakčního zabarvení je závislá na laboratorních podmínkách, musí být postupně monitorována, aby se dosáhlo vhodné úrovně pro měření při OD 450 nm. V pokusech na proteinech z archeologické keramiky se osvědčilo interval inkubace protáhnout na 2 hodiny.

11. V závěrečném kroku se do každé jamky přidává 50 ml STOP roztoku na zastavení reakce. STOP roztok je tvořen zředěnou kyselinou-fosforečnou. Destička je v ruce jemně protřepána a tím je zabráněno dalšímu vývoji. Barva se mění z modré na žlutou a postupně se zintenzivňuje.

je. I v tomto případě se osvědčilo protáhnout inkubační čas na 1 – 2 hodiny, přestože firma doporučuje jako limit 10 minut.

12. Po poslední inkubaci je mikrotitrační destička měřena, měří se absorbance roztoků v každé jamce při 450 nm, v tomto případě na ELISA readeru VERSAmax™ (Molecular Devices). Číselné naměřené hodnoty jsou díky příslušnému software zaznamenány na připojeném počítači v tabulce v programu Microsoft EXCEL (viz Tab 4). Protože se jednalo o ELISA kompetitivní test, specifickým zabarvením se projeví negativní reakce.

Pro potřeby identifikace  $\beta$ -lactoglobulinu skotu je nutno vycházet z pozitivní a negativní kontroly a z nich vždy pro konkrétní případ stanovit limitní hodnoty. Tedy hodnoty blížíící se negativní (<X ppm<sup>4</sup>) kontrole vyhodnotit jako negativní a blížíící se pozitivní (> X ppm) vyhodnotit jako pozitivní, případně mírně pozitivní, pokud se jedná o slabší reakce.

#### **2. 4. 2 Postup při detekci proteinů kozího mléka**

1. Nejdříve je nutno opět připravit potřebný počet testovacích jamek pro příslušné standardy, negativní kontrolu a vzorky. Je třeba provést ředění a přípravu promývacího roztoku. Kit obsahuje několik koncentrací standardních roztoků, pro měření byla vybrána nejmenší měřitelná 0,0625  $\mu$ g/ml (0,005% kozího mléka). Vzorek proteinů s keramikou byl nadrcen podle návodu místo v pufru, pouze v destilované vodě.

2. Do jamek se napipetuje 100  $\mu$ l pozitivní kontroly (standardního roztoku), negativní kontroly (destilované vody) a sada vzorků. Následuje 30 minut inkubace při pokojové teplotě (20 - 25° C).

---

<sup>4</sup>Z fyzikálního hlediska bezrozměrná jednotka. Parts per million (z angličtiny, česky „dílů či částic na jeden milion“), zkráceně též ppm, je výraz pro jednu miliontinu (celku); někdy je tento výraz odvozován i z latinského *pars per milion*. Je běžně užívána při měření absorbance při spektrometrickém měření.

3. Roztoky z jamek je po inkubaci nutno odstranit, vzorky je možno v tomto případě uchovat pro další analýzy. Destička je důkladně zbavena zbytků roztoku a případných bublin několikerým silným klepnutím na vrstvě buničiny. Jamky jsou třikrát promyty 250  $\mu$ l promývacího roztoku.

4. Rychle je nutno naředit protilátku (konjugát, což je sekundární protilátka s navázaným enzymem) s přiloženým puftrem, protože naředěná je nestabilní. 100  $\mu$ l naředěného roztoku konjugátu enzymu se pak napipetuje do každé jamky a nechá inkubovat 30 minut při teplotě místnosti 20 – 25 °C.

5. Po inkubaci je nutno další promývání. Opakuje se krok 3.

6. Po promytí jsou do každé jamky přidány další připravené roztoky z kitu, které způsobí identifikační zbarvení reakce. Jedná se o 50  $\mu$ l substrátu a 50  $\mu$ l chromogenu, které je nutno napipetovat do každé jamky a jemně promíchat ručním třepáním. Následuje závěrečná inkubace 30 minut v pokojovou teplotě 20-25 °C a ve tmě.

7. Po 30 minutách je nutno přidat 100  $\mu$ l STOP roztoku. Opět je nutné jemné ruční promíchání.

Následuje měření absorpance při 450 nm. Podle různých standardů je možno vypočítat koncentraci kozího mléka ve vzorku, ale pro potřeby archeologie, a protože je nutno počítat s vysokou degradací proteinů, postačí stanovení přítomnosti, či nepřítomnosti. Protože se jedná o přímou metodu ELISA, nikoliv kompetitivní jako u stanovení mléka skotu, je vyhodnocení snazší. Reakci vyšší než X ppm negativní kontroly bylo možno definovat jako pozitivní, případně podle kontextu jako slabě pozitivní.

## 2. 5 Lokality a časová datace odebraných vzorků

Pro prověření nové metodiky byly zvoleny vzorky s širokým časovým rozptylem. Proto bylo odebráno několik vzorků z pravěku a jeden z přelomu raného a vrcholného středověku, souhrnně z období, kdy se obecně přijímá za skutečnost, že používání mléka a mléčných výrobků bylo součástí každodenního jídelníčku. Lokality, z kterých byly odebrány vzorky s příslušnými datacemi, jsou přehledně uvedeny v Tab. 1.

Veškerá keramika, ze které byly odebírány vzorky, vykazovala zachovalý povrch, bez eroze, se zachovalou původní silou materiálu. Velikost zlomků se pochybovala přibližně od pěti do deseti centimetrů v průměru, materiál z doby bronzové byl někdy větší, z neolitu zas o něco menší, ale nikdy nebyly pro oděr vzorků použity drobné kusy o průměru pod dva centimetry.

Vzorky byly poskytnuty více institucemi. Soubor pro testování metodiky pocházel z Jihočeského muzea v Českých Budějovicích a Prácheňského muzea v Písku. Střední doba bronzová byla zastoupena vzorky z lokality Řepeč (okr. Tábor). Větší počet vzorků byl získán z mladší doby bronzové a šlo o jeden keramický zlomek z depotu z katastru obce Podolí, tři dna nádob, cedník a dvakeramicé zlomky z lokality Rataje III (okr. Tábor). Mladší období jsou zastoupena vzorky ze starší doby železné (doba halštatská), jedná se keramický zlomek pocházejícím z hrobu z lokality Březnice (okr. Tábor), a o keramické zlomky z lokality Albrechtice nad Vltavou (okr. Písek), zde šlo o zlomek ze sídlištního objektu, druhý byl z mohyly na pohřebišti. Pro zajištění většího časového rozptylu byl použit jeden vzorek z přelomu raného a vrcholného středověku z lokality Heřmaň, kde se jednalo o jeden keramický vzorek ze sídlištního objektu.

Klíčové pro testování byly vzorky z neolitu, protože výsledky by měly přispět do kontextu výzkumů počátků zemědělství v Evropě (Tab. 2). Byly využity nedávno vyzvednuté keramické zlomky z lokality Mažice ze sídlištního objektu (mladá fáze kultury s lineární keramikou – volutové),

ze sbírek Jihočeského muzea. Kromě neolitických keramických zlomků byl jako určitá kontrola (půdní podmínky), využit středověký vzorek z téže lokality. Další neolitický materiál byl získán ze Západočeského muzea v Plzni. Byly to keramické zlomky z Oddělení záchranných archeologických výzkumů z kultury s lineární keramikou fáze IIc z lokality Radobyčice (okr. Plzeň-město) (Smetana 2010). Z Oddělení pravěku Západočeského muzea byl testován vzorek z neolitické lokality Křimice, jednalo se o bombovitou nádobu. Z lokality Křimice-Balící pošta (okr. Plzeň-město), byl odebrán vzorek z pohárku nalezeného v dětském hrobě. Jako další geograficky odlišná neolitická lokalita byly využity dosud nepublikované keramické zlomky ze Středních Čech z katastru obce Horoměřice (okr. Praha-západ; lineární keramika fáze II-III), ovšem charakteristika lokality již publikována byla (Nový – Řídký 2005).

## **2. 6 Obecná charakteristika neolitické keramiky kultury s lineární keramikou**

Nálezy keramiky představují nejzásadnější artefakty pro relativní datování. Hlavním sledovaným znakem je přitom její výzdoba. Během fáze Ia až Ic nejstaršího stupně LnK se mění poměr žlábkované a středně ryté výzdoby (meandry, klikatky, obloučky, vlnice i spirály) a to ve prospěch jemněji ryté výzdoby. Nejstarší stupeň končí krátkou fází I/II, ve které se v Čechách objevuje tzv. „áčkový“ styl a na západní hranici se objevuje tzv. styl flombornský. Střední stupeň zahrnuje fáze IIa až IIc a prezentuje klasickou podobu LnK. Keramika z tohoto období je typicky zdobena rytou linií kreslenou širokou páskou (typická pro severozápadní Čechy), která je v některých případech vyplněna vpichy (typické pro středočeskou oblast). V průběhu doby se tato páska zužuje, může být vyplněna třetí linií a v pozdějším období příp. také svazkem linií. Motivy výzdoby jsou typicky oběžné a jedná se o spirálu a klikatku, které se vyskytují v přibližně stejném počtu případů. Doplňkově pak nacházíme orna-

menty pod okrajem a dále různé formy trojúhelníků a obloučků. Objevuje se také tzv. notová výzdoba (typická zejm. pro východní Čechy), která během doby prochází taktéž vývojem. Zpočátku jsou noty, vytvářené např. vpichem, nebo otiskem nehtu, větší a řidčeji vysazené na linii, postupně se pak noty zmenšují a na konci tohoto období můžeme říci, že jsou noty středně hustě řazeny na linii. V následujícím mladším stupni (fáze IIIa až IIIb) kulminuje notová výzdoba ve středních a východních Čechách a vyplňovaná páska v Čechách severozápadních. Notová výzdoba dále spěje k stále většímu zahušťování not na linii. Vyplňovaná páska se postupně zužuje a zčásti dochází k jejímu nahrazení úzkou páskou, která je vyplněna buď vpichy, nebo příčkami (tzv. žebříček). Vedle těchto základních motivů se znovuobjevuje v úzké formě trojlinková páska. V pozdním tzv. šáreckém stupni (fáze IVa až IVb) většinou převažuje notová výzdoba vytvářená notami umístěnými těsně u sebe nad hustě přesekávanou linií. Obecně dochází ke zhušťování výzdoby na nádobách, která pokrývá v podstatě celý jejich povrch (Pavlů – Zápotocká 2007, 28 – 34, 66).

Pokud jde o tvary keramických nádob LnK, v nejstarším období se podobají těm známým z kultury starčevsko-křišské (Balkán). Typické jsou jednoduché polokulovité nádoby s mírně esovitě rozevřeným ústím a hluboké misky. Velké amfory se vyskytují méně často. Ve středním stupni dominují polokulovité oproti miskám a lahvím, přičemž tento poměr je na rozdíl od výzdoby ve všech regionech obdobný (zřejmě se jedná o důsledek podobného funkčního složení keramických souborů). Ve středním stupni se také objevují na polokulovitých nádobách esovitě prohnuté okraje. V mladším stupni dochází ke zvyšování podílu misek, ale stále převažují polokulovité nádoby. Objevují se dále nádoby s mírně esovitě prohnutým okrajem. V pozdním šáreckém stupni se nově objevují nádoby hruškovitého tvaru. Tento typ však není znám z jižních Čech. Běžné jsou v tomto období polokulovité tvary s esovitě prohnutým okrajem (Pavlů, I. – Zápotocká, M. 2007, 31 – 34, 66).

Není bez zajímavosti, že v nejstarším období se v keramické hlíně objevuje typicky organická příměs, podobně jako v nejstarších nádobách z Předního východu (Pavlů – Zápotocká 2007, 66).

### **3 Výsledky testů – analýzy zbytků pomocí metody antigen-protilátka**

Použité testy se dobře v minulosti osvědčily na archeologickém materiálu (Pavelka – Vařeka 2008, John – Pavelka 2010, Pavelka – Orna 2011), ovšem jednalo se přímo o zbytky potravin. Nyní se jednalo o testování proteinů v keramické hmotě. Použití testů na  $\beta$ -laktoglobulin kravského mléka prokázalo plnou použitelnost i tomto případě, kdy se jednalo o mléčné zbytky z porézní keramiky. V případě ověřovací série se z počtu 12 vzorků podařilo u 4 prokázat pozitivní reakce (Tab. 1, konkrétní naměřené hodnoty viz Tab. 4). Všechny čtyři pocházely z mladší doby bronzové, jednalo se o lokality Březnice, Podolí a dvakrát Rataje. V návaznosti na tuto práci byla metodika také ověřována hmotnostní spektrometrií, kdy byl vzorek získán z částí keramiky obdobným způsobem jako vzorky v této práci, ale v tomto případě z amfory z knovízského období (Hlásek a kol. v příp.). Rovněž tak byl pro hmotnostní spektrometrii vybrán jeden vzorek z neolitické lokality Radobyčice. Proteiny byly extrahovány na pracovišti hmotnostní spektrometrie v Českých Budějovicích (Jihočeská univerzita), kde byla také provedena analýza, výsledky odpovídaly údajům získaným pomocí testů na základě komerčních protilátek (Hlásek, a kol. v příp.). Stejné komerční sady byly použity i v této práci. Proto je možno metodiku považovat za průkaznou a výsledky za opakovatelné.

Velmi slabá reakce může podle instrukcí výrobce znamenat také špatné provedení analýzy, zejména nedostatečné promývání, které zanechá některé kontaminace látkami, které vyvolávají zbarvení reakcí. Jedná



se především o substrát TMB a Avidin peroxidázu. Proto jsem případné velmi slabé reakce brala jako negativní výsledky.

Jako nepoužitelná se metoda ukázala v případě, že proteiny v keramice jsou odmyty, nebo výrazně poškozeny (Hlásek a kol. in prep.). Proteiny jsou uvnitř keramiky poměrně chráněny a přes vlivy půdního prostředí a degradace v čase je možno stále detekovat jejich původ a základní složení. Avšak pokud je keramika čištěna kyselinou chlorovodíkovou a tekutým mýdlem, jsou zřejmě proteiny odstraněny, nebo nenávratně poškozeny (Hlásek a kol. v příp.).

Neolitické vzorky vykazovaly různé zastoupení zbytků mléka na odlišných lokalitách (Tab. 2, naměřené hodnoty viz Tab. 4). Jihočeská lokalita Mažice (mladší fáze kultury s lineární keramikou), neobsahovala na testovaných keramických zlomcích stopy mléka skotu, i když kontrolní středověký vzorek z téhož místa slabou pozitivitu vykazoval. Podobně na středočeské neolitické lokalitě Horoměřice (lineární keramika fáze II – III), byl z pěti vzorků pouze jeden, kde byl slabý signál, ovšem na takové úrovni, že je zde pozitivita sporná. Západočeská lokalita Radobyčice (lineární keramika fáze II) přinesla odlišné výsledky. Z pěti keramických zlomků byl jeden pozitivní, další slabě pozitivní a tři byly pro mléko skotu negativní (Tab. 2). Negativní vzorek byl do určité míry kontrolní, protože se jednalo o příškvarek jako v dříve publikovaných pracích (Pavelka – Vařeka 2008, Pavelka – Orna 2011), ostatní vzorky byly získány striktně z keramické hmoty. Vzorky z obou lokalit v Křimicích byly oba na  $\beta$  laktoglobulin skotu pozitivní, i když reakce byla slabší.

Tab 1. Ověřování funkčnosti metody

Datum odběru	Muzeum	Nádob	Datace	Lokalita	Cattle βLG	Poznámka
10.11.2014	Jihočeské muzeum v ČB	dno	ml. bronz	Rataje III	pozitivní	S 1/14, obj. 3/14, vr. 0-10, sekt. E, 26.8.14; sídlištní objekt, nemyto
10.11.2014	Jihočeské muzeum v ČB	dno	ml. bronz	Rataje III	negativní	S 2/14, obj. 8/14, vr. 0-10, sekt. B, 28.8.14, dno; ml. bronz, sídlištní objekt;
10.11.2014	Jihočeské muzeum v ČB	cedník	ml. bronz	Rataje III	pozitivní	S 1/14, obj. 1/14, vr.10-20, sekt. A, 2.9.14, ml. bronz, sídlištní objekt;
10.11.2014	Jihočeské muzeum v ČB	dno	ml. bronz	Rataje III	negativní	S 1/14, obj. 1/14, vr.10-20, sekt. A, 2.9.14, sídlištní objekt; nemyto
10.11.2014	Jihočeské muzeum v ČB	keramický zlomek	ml. bronz	Rataje III	negativní	S 1/14, obj. 3/14, povrch, 19.8.14, z, sídlištní objekt
10.11.2014	Jihočeské muzeum v ČB	keramický zlomek	ml. bronz	Rataje III	pozitivní	S 2/14, obj. 8/14, vr. 0-10, sekt. B, 28.8.14, dno; ml. bronz, sídlištní objekt
10.11.2014	Jihočeské muzeum v ČB	keramický zlomek	st. d. žel.	Březnice	negativní	S 4, obj. 8, dno, starší doba železná, hrob;
10.11.2014	Jihočeské muzeum v ČB	nádoba 1	stř. bronz	Řepeč	negativní	mohyla
10.11.2014	Prácheňské muzeum v Písku	keramický zlomek	st. d. žel.	Albrechtice nad Vltavou	negativní	B285R, mohyla
10.11.2014	Prácheňské muzeum v Písku	keramický zlomek	st. d. žel.	Albrechtice nad Vltavou	negativní	CAC2, začištění na vr. 43, VS, sídlištní objekt;
10.11.2014	Prácheňské muzeum v Písku	keramický zlomek	RSVS	Heřmaň	negativní	RS/VS, T 281, 6, sídlištní objekt
10.11.2014	Prácheňské muzeum v Písku	keramický zlomek	ml. bronz	Podolí	pozitivní	depot, 24.7. 2014

V případě testů na přítomnost kozího mléka se překvapivě ukázalo, že kozí mléko je na testované keramice vysoce zastoupeno. Z čtrnácti testovaných vzorků bylo třináct pozitivních. Všechny testované vzorky z lokalit Horoměřice a Mažice byly pozitivní a pouze jeden vzorek z Radobyčic byl negativní a odpovídal kontrole. Negativní kontrola byla zcela shodná s jedním z testovaných vzorků, to vylučuje případnou falešnou pozitivitu testu, který vyšel překvapivě v takovém rozsahu pozitivně. Z finančních důvodů byly testovány pouze vzorky z neolitu. Bohužel díky nedostatku prostředků nebylo možno testovat dva vzorky z Křimic, které byly pozitivní na mléko skotu. Jako kontrola byl zvolen standard s velmi malým obsahem kozího mléka (0,05%). Všechny zaznamenané výsledky toto hodnotu vysoce překračovaly. Pro přesnější odhad množství kozího mléka v keramice, by však byla zapotřebí další série testů. Pro potřeby archeologie je však dostatečný důkaz přítomnosti kozích IgG na téměř každém testovaném keramickém zlomku.

Pomocí hmotnostní spektrometrie se v mém případě bohužel nepodařilo přímo potvrdit některý mléčný protein jako v předchozím testovaném případě (Hlásek a kol. v přípravě), nicméně o proteinech kozy asi svědčí ribozomální protein, který byl zachycen v signifikantním množství (Tab. 3). Je určen pomocí databáze jako protein skotu, ale pro konzervativnost těchto proteinů nelze vyloučit, že je kozí, nebo jiného blízkého zvířete. Také by mohlo jít o zbytek nějakého pokrmu. Rovněž je významný lidský, nebo zvířecí keratin, který pravděpodobně pochází z kůže některého z archeologů a byly zachyceny též bakteriální proteiny. Uvedený trypsin je přidáván do směsi před reakcí kvůli štěpení, nejedná se tedy o původní protein z keramiky. Výsledky svědčí pro velkou citlivost protilátek, které jsou schopny detekovat i velmi malé stopy proteinů, na rozdíl od hmotnostní spektrometrie.

Tab 2. Analýza vzorků z neolitické keramiky

Datum odběru	Muzeum	Nádoba	Datace	Lokalita	Cattle βLG	Goat IgG	Poznámka
7.11.2014	Jihočeské muzeum v ČB	keramický zlomek	LnK III	Mažice 1	negativní	slabě pozitivní	sonda 1 obj. 1/13, mech. úr. 10-20 z. sektor
7.11.2014	Jihočeské muzeum v ČB	keramický zlomek	středověk	Mažice 2	slabě pozitivní		sonda 1 obj. 1/12, mech. úr. 0-10 z. sektor
7.11.2014	Jihočeské muzeum v ČB	keramický zlomek	LnK III	Mažice 3	negativní	slabě pozitivní	sonda 1 obj. 1/13, mech. úr. 0-10 z. sektor
7.11.2014	Jihočeské muzeum v ČB	keramický zlomek	LnK III	Mažice 4	negativní	slabě pozitivní	sonda 1 obj. 1/13, mech. úr. 0-10 z. sektor
7.11.2014	Jihočeské muzeum v ČB	keramický zlomek	LnK III	Mažice 5	negativní	slabě pozitivní	sonda 1 obj. 1/2, mech. úr. 30-40 z. sektor
7.11.2014	Jihočeské muzeum v ČB	keramický zlomek	LnK III	Mažice 6	negativní		sonda 1, mech. úr. 30-40 z. sektor
18.11.2014	Západočeské muzeum OZAV	keramický zlomek	LnK II	Radobyčice 1	negativní	pozitivní	příškvarek
18.11.2014	Západočeské muzeum OZAV	keramický zlomek	LnK II	Radobyčice 2	pozitivní	pozitivní	dno
18.11.2014	Západočeské muzeum OZAV	keramický zlomek	LnK II	Radobyčice 3	negativní	pozitivní	dno
18.11.2014	Západočeské muzeum OZAV	keramický zlomek	LnK II	Radobyčice 4	slabě pozitivní	negativní	
18.11.2014	Západočeské muzeum OZAV	keramický zlomek	LnK II	Radobyčice 5	negativní	pozitivní	
18.11.2014	Západočeské muzeum Pravěk	pohárek	LnK II	Křimice - Balící pošta	slabě pozitivní		dětský hrob, rytá výzdoba
18.11.2014	Západočeské muzeum Pravěk	bombovítá nádoba	LnK II	Křimice 98	slabě pozitivní		

Tab 2. Analýza vzorků z neolitické keramiky (pokračování)

Datum odběru	Muzeum	Nádoba	Datace	Lokalita	Cattle βLG	Goat IgG	Poznámka
6.1.2015	Středočeské muzeum Roztoky	keramický zlomek	LnK II-III	Horoměřice 1	negativní	pozitivní	parcela 103/1, sáček č. J/2, segment 112
6.1.2015	Středočeské muzeum Roztoky	keramický zlomek	LnK II-III	Horoměřice 2	negativní	pozitivní	Hor 4/08/2
6.1.2015	Středočeské muzeum Roztoky	keramický zlomek	LnK II-III	Horoměřice 3	negativní	pozitivní	
6.1.2015	Středočeské muzeum Roztoky	keramický zlomek	LnK II-III	Horoměřice 4	velmi slabě pozitivní	pozitivní	
6.1.2015	Středočeské muzeum Roztoky	keramický zlomek	LnK II-III	Horoměřice 5	negativní	pozitivní	

Tab. 3. Identifikované proteiny pomocí hmotnostní spektrometrie ve vzorku z neolitické lokality Radobyčice (vzorek č. 3).

Test	Popis	mW (Da)	Obsah (%)
K1C10_HUMAN	Keratin type I cytoskeletal 10 OS Homo sapiens GN KRT10 PE 1 SV 6	58791	14,3836
K2C1_HUMAN	Keratin type II cytoskeletal 1 OS Homo sapiens GN KRT1 PE 1 SV 6	65998	5,9006
K2C5_BOVIN	Keratin type II cytoskeletal 5 OS Bos taurus GN KRT5 PE 1 SV 1	62898	4,3261
TRYP_PIG	Trypsin OS Sus scrofa PE 1 SV 1	24393	7,7922
K2C75_RAT	Keratin type II cytoskeletal 75 OS Rattus norvegicus GN Krt75 PE 3 SV 2	58990	4,428
K2C7_BOVIN	Keratin type II cytoskeletal 7 OS Bos taurus GN KRT7 PE 2 SV 1	51546	6,867
K2C75_BOVIN	Keratin type II cytoskeletal 75 OS Bos taurus GN KRT75 PE 2 SV 1	58999	4,0516
TRY1_CANFA	Cationic trypsin OS Canis familiaris PE 2 SV 1	26152	8,9431
K2C6A_RAT	Keratin type II cytoskeletal 6A OS Rattus norvegicus GN Krt6a PE 1 SV 1	59212	3,6232
K2C6A_MOUSE	Keratin type II cytoskeletal 6A OS Mus musculus GN Krt6a PE 2 SV 3	59298	3,9783

### 3. 1 Vyhodnocení metodiky

Metoda se ukázala jako úspěšná a byla potvrzena verifikací na hmotnostním spektrometru (Hlásek a kol. v přípr.). Mnou odebraný vzorek pro hmotnostní spektrometrii sice prokázal lidskou kontaminaci, bakteriální zbytky, nicméně přítomnost kozích bílkovin také nepřímo podporuje. Tím došlo k zásadnímu zjednodušení oproti publikovaným pracím (Craig – Collins 2002). Proto může být snadno využitelná při použití vhodných komerčních sad, nebo pomocí nově vytvořených protilátek pro potřeby archeologie, které však musí splňovat určité dříve opomíjené nároky. Především musí být vytvořeny proti odolným druhově specifickým proteinům v jejich poškozených a denaturovaných formách. Výhodou metody je, že ji může v budoucnu snadno provádět zaškolený archeolog, nebo technický personál. Z přístrojového vybavení je nutný pouze spektrofotometr (Reader), ale je možné metodu provádět i

v terénních podmínkách, pokud se spokojíme pouze s konstatováním, zda testovaný protein je, či není přítomný a slabší reakce budeme ignorovat.

Z výsledků se zdá pravděpodobné, že pro imunologické ELISA testy jsou náročné a nejednotné extrakce proteinů zbytečné a jen se pomocí nich zvyšuje riziko poškození proteinů, protože jemně nadrcené zbytky keramiky, sloužící jako jakési nosiče proteinů, nemají na reakci antigen – protilátka zásadní vliv.

#### **4. Interpretace získaných dat a v kontextu výživy v neolitu**

Díky uvedeným výsledkům (viz Tab. 2) je možno otevřít diskuzi o původu mléka, protože předchozí studie (Craig a kol. 2004; Craig a kol. 2005a; Craig a kol. 2005b; Craig a kol. 2011), nebyly původ mléka schopny rozlišit.

Z dosavadních výsledků se zdá, že se užívání kravského mléka, respektive mléčných výrobků, mohlo lišit v jednotlivých regionech, ovšem oproti jiným studiím (např. Copley a kol. 2003; Craig a kol. 2005a; Craig a kol. 2005b; Craig a kol. 2004) je zpracováno málo údajů z jednotlivých lokalit. Na druhou stranu, tolik pozitivních výsledků na kozí mléko asi nebude pouhá náhoda. I když počet testovaných vzorů není velký, tak vysoké zastoupení možná naznačuje všeobecné používání kozího mléka, nebo z něho připravených výrobků. Je otázka nakolik v lokalitách, kde nebylo mléko skotu identifikováno, skutečně používané nebylo. Nebo, zda je to spíše shoda okolností, že nebylo zaznamenáno. Nelze ani vyloučit možnost, že mléko a mléčné výrobky skotu byly používány stejně, ale keramika byla využívána spíše pro kozí mléko. Nepřítomnost stop mléčných proteinů skotu na některých lokalitách (Mažice), nebo minimální (Horoměřice) a naopak téměř všeobecná přítomnost kozích IgG na keramice, byla neočekávaná. V období kultury s lineární keramikou je skot na našem území v osteologických nálezech zastoupen hojně (Kovačiková a kol. 2012) a byl zřejmě využíván i jako zdroje sekundárních produktů, tedy i mléka (Kovačiková a kol. 2012). Pokud akceptujeme, že na sledovaných lokalitách

převažovalo kozí mléko, případně netestované ovčí, je tento závěr v rozporu s osteologickými nálezy. V období lineární keramiky převládala na testovaných lokalitách bez výjimky skot, zatímco ovce/koza převýšila skot ojediněle na některých lokalitách až později, v období kultury s vypíchanou keramikou (Kovačiková a kol. 2012). Další výzkum na toto téma, zvláště na keramice z lokalit, kde byl proveden podrobný osteologický výzkum, by mohl přesněji podhalit strukturu potravní ekonomiky raného zemědělství. Zvláště když lov můžeme v podstatě zanedbat (Kovačiková a kol. 2012).

Nelze vyloučit, že rozdíly mezi jednotlivými lokalitami mohly vzniknout nevhodným výběrem vzorků, avšak zdá se pravděpodobné, že ve fázi českého neolitu LnK II a LnK III se některé nádoby používaly na mléko skotu a velmi často na mléko kozí. Dalším logickým závěrem je, že pokud se z nějakých důvodů nepoužívala na mléko skotu keramika (musíme vzít v úvahu, že např. na mléko skotu byly upřednostňovány dřevěné nádoby, nebo kožené měchy), tak mohlo jít skutečně o menší využívání kravího mléka oproti kozímu. Ovšem řešení může být i poměrně prosté. Kozím mlékem se přikrmovaly děti, proto je v keramických nádobách, zatímco kravské mléko se v kožených měších zpracovávalo na sýr, případně na se kvasilo na nápoj podobný kobyliímu kumysu. Podávání kozího mléka dětem je známo z lidové tradice a může souviset s jeho lepší stravitelností pro člověka (Devendra – Burns 1983). Další možný důvod vysokého zastoupení je technický, neglazovaná keramika ošetřená kozím mlékem vykazuje lepší vlastnosti, neprotéká a výrazně lépe těsní. Mohla být i přímo vmíchána do keramiky, nebo ještě horká keramika mohla být propláchnutá kozím mlékem a to bylo vysušeno. Takovéto technické řešení podporují analogie i experimenty s replikami neolitické keramiky (Kovárník J. 1982). Kozí mléko se dá s úspěchem využít i k přikrmování prasat (*Sus scrofa f. domestica*), v této době je možná přesnější mluvit ještě o málo domestikovaných formách (*Sus scrofa*) (Gorgan a kol. 2011). Podle některých lidových tradic je takové přikrmování vhodné a prase přibývá rychleji na váze. Ovšem je otázkou, zda je možné takové nedávné poznatky aplikovat na chovy v neolitu a lze těžko předpokládat, že by pro krmení prasat bylo nutno uchovávat v keramice



spíš kozí, než kravské mléko. Zvažovala jsem také, zda se kozí a kravské mléko vzájemně nevylučují. Protože jediný negativní vzorek na kozí mléko z lokality Radobyčice, vykazuje přítomnost kravského mléka, které je v keramice zastoupeno jen občas. Ovšem právě další vzorek z Radobyčic nese jak mléko kravské tak kozí. Podobně i jeden vzorek z lokality Horoměřice. Zdá se, že se obě mléka vzájemně v keramice nevylučují. Zpracování většího množství vzorků v budoucnu by mohlo některé hypotézy podpořit. Např. pokud by bylo mléko detekovatelné, na převážné většině keramiky, nebo i poměrně hluboko v keramické matrix, mohla by nabýt na důležitosti teze o nutnosti použití mléka pro zmenšení propustnosti porézní keramiky. Lepší pohled na danou problematiku mohou přinést data i z pozdějších období, zvláště analýzy na porézní keramice podobné struktury jakou můžeme nalézt v neolitu.

## **4. 1 Rozpor v keramických nálezech identifikujících mléko s výsledky sekvenace archaické DNA**

### **4. 1. 1 Mutace 13910 \* T pro schopnost trávení laktózy v dospělosti**

Na archeologické keramice už z období neolitu, je možno identifikovat stopy po mléku, či jeho produktech, což kromě této studie potvrzují mnohé práce z dalších evropských regionů (Copley a kol. 2003; Craig a kol. 2005; Craig a kol. 2011). Na druhou stranu ze zkoumání archaické DNA (aDNA) pocházející z kostní tkáně je zřejmé, že lidé v neolitu nebyli schopni laktózu trávit (Burger et al., 2007). To bylo dokumentováno sekvenováním 10 vzorků z mezolitu a neolitu z několika evropských regionů a 23 vzorků (úspěšných 13 analýz), z dnešního Maďarska z období od neolitu do doby železné (Burger a kol. 2007; Gamba a kol. 2014). Pouze v jednom a to nejmladším vzorku z doby železné byla identifikována mutace 13910 \* T pro trávení laktózy v dospělém věku (Gamba a kol. 2014). Podobné výsledky přináší i další rozsáhlá studie (Witas et al. 2015) zkoumající alelu pro perzistenci laktázy v archeologickém kosterním materiálu z polských Kujav. Podařilo se určit DNA sekvence ze 131 jedinců datovaných od neolitu (9 vzorků) přes konec doby

bronzové až starší dobu železnou (8 vzorků), dále dobu římskou (34 vzorků) až po středověk (80 vzorků). U žádného neolitického vzorku nebyla identifikována mutace pro trávení laktózy v dospělém věku, teprve DNA z halštatského období nesla u dvou z osmi zkoumaných alelu 13910 \* T, u jednoho už v homozygotním stavu. Na lokalitách z doby římské a středověku byla perzistence laktázy detekována poměrně často, na různých lokalitách se ovšem lišila v rozsahu 46 – 86 %. To přibližně odpovídá i dalším pracím (Krüttli a kol. 2014, Nagy a kol. 2011). Můžeme předběžně shrnout, že mutace se začíná významněji projevovat až v halštatském období, minimálně v oblasti střední Evropy a Polska. Avšak je zarážející, že byla zaznamenána vysoká frekvence tolerance laktózy (27 %) v Baskicku na severu Iberského poloostrova už někdy po roce 3000 př. n. l., tedy ještě v tamním závěru neolitu. Nicméně se v této fázi výzkumu zdá nepravděpodobné, že se alela šířila společně s vlnou příchodících neolitických zemědělců do Evropy z Předního východu (Witas a kol. 2015).

Naskýtá se několik otázek, které řeší některá evropská pracoviště: 1) kde mutace vznikla, 2) jak a kdy se šířila, 3) jak mléko lidé zpracovávali, pokud nedovedli trávit mléčný cukr laktózu.

#### **4. 1. 2 Oblast vzniku mutace**

S největší pravděpodobností mutace vznikla v Evropě v jednom regionu, z kterého se šířila, protože v Evropě je jedna jediná mutace označovaná 13910 \* T. Naopak v Africe jsou 4 známé varianty (možná více), které zahrnují i evropskou mutaci, proto se dá předpokládat nezávislý vznik u populací, které se už zabývaly zemědělstvím (Itan a kol. 2009). Podle současných představ připadají v úvahu dvě oblasti vzniku. Je to oblast střední Evropy, která je takto určena z matematického modelu, který šíření ze středoevropského centra předpokládá už v neolitu (Itan a kol. 2009)<sup>5</sup>. Ovšem tomuto pojetí odporují data

---

<sup>5</sup> Matematický model je abstraktní model, který využívá matematického zápisu k popisu chování systému. Matematický model transformuje model do matematického zápisu, který má následující výhody: a) formalizaci zápisu danou historickým vývojem, b) přesná pravidla pro manipulaci s matematickými symboly. Matematický model obvykle popisuje systém s pomocí množiny proměnných a množiny

získaná z archaické DNA z kostí tehdejších obyvatel, z kterých je jasné, že se mutace nevyskytovala v evropském neolitu vůbec, nebo velmi sporadicky (Burger a kol. 2007; Malmström a kol. 2010; Gamba a kol. 2014). Z analýz vzorků z na území Maďarska zaujímá zvláštní místo, právě jediný pozitivní nálezný mutace 13910 \* T z doby železné, protože podle dalších genových markerů je zde nezanedbatelná souvislost s kočovníky a také hrobové vybavení poukazuje na stepní původ (Gamba a kol. 2014). Kočovníci, kteří v této době mohli být na území dnešního Maďarska, se obvykle řadí k indoevropským Kimmerijcům a Skythům (Chochorowski 1993). Proto lze uvažovat, že mutace vznikla ve stepích, odkud se přirozeným genovým tokem šířila do Evropy. To nevyklučuje ani nález mutace z dnešního Švédska z místní lovecko-sběračské kultury (Pitted-Ware Culture, asi 3200 BC – 2300 BC) (Zvelebil 2004), kde tato mutace byla u jednoho z deseti vzorků v heterozygotním stavu, tedy ve frekvenci 5%, na rozdíl od současnosti, kdy je na tomto území vysoká frekvence 74% (Malmström a kol., 2010), další prameny uvádí ještě vyšší údaje, kolem 90 % (Witas a kol. 2015). K nárazovému zvyšování frekvence mutace by pak docházelo během opakovaných indoevropských migrací z východu. Ovšem je také možné díky výsledkům z Baskitska, že se mutace mohla šířit z Afriky přes Gibraltar na Iberský poloostrov a dále severozápadní Evropou (Witas et al. 2015). Avšak žádná z pracovních hypotéz zatím nebyla přesvědčivě podpořena empirickými daty.

Nelze také zatím vyloučit třetí možnost, že mutace vznikla v mnohem dávnějších lovecko-sběračských dobách a velmi sporadicky se vyskytovala v evropské populaci a postupně její frekvence narostla. Především v období kdy se pro její nositele stala selekčně výhodná.

---

rovnice, které určují vztahy mezi nimi (Hřebíček a Škrdla 2006). V práci Itan a kol. (2009) byl využit bayesiánský způsob výpočtu (ABC) a soubor metod umožňující odhad parametrů v rámci modelu, který je příliš složitý pro běžnou metodumaximální věrohodnosti. Při porovnání popisné statistiky s pozorovanými daty, které byly generované simulovanými datovými soubory, ABC umožnila autorům klíčové demografické a evoluční parametry, včetně oblastí, kde začala v Evropě koevoluce schopnosti trávit laktózu a mlékárenství.

Tuto problematiku s velkou pravděpodobností vyřeší další analýzy archaické DNA z různých evropských regionů a časových období, včetně dat ze stepí východní Evropy. Zvláště je vhodné, aby bylo možno porovnat data ze stejných časových období.

#### **4. 1. 3 Šíření mutace**

Jakým způsobem se mutace v Evropě šířila, není příliš jasné, ze současných výzkumů se však už dají tvořit první závěry a hypotézy. Není to pouze uváděný případ z území Švédska, kde byla frekvence v neolitu 5% a nyní je 74% (Malmström a kol. 2010), eventuálně kolem 90 % (Witas a kol. 2015), existují i data ze středověku. Byly osekvenovány vzorky z kostní tkáně ze středověkého hřbitova v Dalheimu v Německu, datované kolem roku 1200 našeho letopočtu. Extrakce byla prováděna u 36 jedinců a z toho u 18 úspěšně. Frekvence mutace pro trávení laktózy byla 70%, což se blíží současnosti, kdy je v Německu a Rakousku frekvence mutace 71 až 80% (Krüttli a kol. 2014). Autoři uvádějí, že minimálně do roku 1200 našeho letopočtu stoupla tolerance k laktóze oproti starším dobám na téměř současné hodnoty, minimálně ve sledované lokalitě (Krüttli et al., 2014). Ale v nepříliš starší lokalitě z dnešního Maďarska, z 10. – 11. st. n. l., kde se podařilo analyzovat 23 jedinců, se prokázalo, že mutantní alela tam byla pouze ve frekvenci 11% (Nagy a kol. 2011). Zdá se, že se jednotlivé regiony poměrně lišily. Někteří autoři spekulují, že zvýšení četnosti mutace mohl způsobit selekční tlak a genetický drift za morových epidemií (Krüttli et al. 2014). Tento argument by si zasloužil více rozvést, protože nejen morové epidemie, ale i další krize jako války a migrace mohly způsobit přechodné snížení lokálních populací a tak se mohl uplatnit genetický drift i zvýšená selekce. Zhoršené životní podmínky a demografické změny mohly být způsobeny v minulosti také klimatem (Kaniewski a kol. 2013), nebo sociálně-ekonomickými faktory (Shennan a kol. 2013). Právě v extrémních podmínkách dochází k větší výměně genů mezi populacemi, a jestliže by také docházelo k selekčnímu tlaku, při kterém by obtížněji přežívali jedinci neschopní trávit laktózu, četnost mutace pro její trávení by se zvyšovala. Je také

nutno vzít v úvahu současný stav, kdy je největší frekvence mutace na severozápadě Evropy (Leonardi a kol. 2012), ovšem to může úzce souviset s přírodními podmínkami<sup>6</sup>.

I když je dat získaný na základě studia aDNA zatím málo a evropské regiony nejsou vhodně geograficky a časově zmapovány, je zcela jasné, že četnost alely pro trávení laktózy se během času zvyšuje. Pochopení způsobu šíření by např. pomohlo analyzovat lokální populace před nástupem velkých krizí a po nich, avšak extrakce a sekvenace aDNA by neměly být omezeny na jednu lokalitu, ale na reprezentativní počet.

#### **4. 1. 4. Zpracování mléka a keramika**

Závažnou otázkou zůstává, jak bylo syrové mléko zpracováváno a v čem. Zda to byla dochovaná keramika. Pokud ano, pak by po takových procesech na ní mohly zůstat stopy. Jak je zřejmé z uvedených výsledků na lidské aDNA (Burger a kol., 2007; Malmström a kol. 2010; Nagy a kol. 2011; Gamba a kol. 2014), většina populace v neolitu i dlouho později laktózu v dospělém věku trávit nemohla, přesto jsou na keramice stopy po mléčných produktech. Laktóza tedy musela být z mléka v nějaké míře odstraňována (Curry 2013). Co se stane, pokud nejsou lidé schopni trávit laktózu, a přesto ji konzumují, je poměrně známo. Pacienti, kteří nejsou schopni hydrolyzovat nebo absorbovat laktózu, trpí nadýmáním, křečemi v břiše a průjmem (Preger – Amberg 1967). I když výsledky v této práci naznačují v neolitu vyšší konzumaci kozího mléka, které je sice stravitelnější než kravské (Devendra – Burns 1983), intoleranci laktózy však neřeší, protože laktóza je obsažena i v kozím mléce.

---

<sup>6</sup>Mléko je významným zdrojem vitaminů D (kalciferolů), které jsou důležité pro hospodaření s vápníkem. Vitamíny skupiny D se v těle vytváří přirozeně pomocí záření slunce, avšak při jeho nedostatku je potřebné ho tělu dodávat v potravě, tedy nejlépe v mléku. Proto je výhoda trávit laktózu právě na severu Evropy. To ovšem nevysvětluje zvýšenou frekvenci výskytu mutace v některých oblastech položených blízko rovníku, jako je západní Afrika a jihozápadní Asie (Check 2006). Zdá se, že došlo k několika nezávislým procesům adaptace na trávení laktózy a jedná se o složitější proces, než jak naznačovaly starší studie.

První zemědělci tedy museli nalézt způsob jak učinit mléko stravitelným. Jako nejsnazší se jeví kysnutí mléka. Neolit začal v jižních oblastech, kde mléko kysne rychle, proto se první postup nabízel sám. Kysnutím se může obsah laktózy snížit o 20 – 50% (Alm 1982). Postup výroby sýra už byl obtížnější, zemědělci museli použít nějaké syřidlo, zřejmě obsah telecího žaludku. Ten obsahuje enzym chymozin, který v první řadě slouží je srážení mléka. Rozklad laktózy zprostředkují laktobacily a bifidobaktérie, které lze předpokládat jako kontaminaci. Pokud se sýr nechá dobře zrát, nemusí laktózu obsahovat vůbec i když záleží na podmínkách (teplota, poměr soli a vlhkosti) (Turner – Thomas 1980). Je ale otázka, zda k takovým procesům byla používána nalezená keramika a tak vyvstává problém, zda vůbec lze tento předpokládaný postup potvrdit. Navíc v současné době metodika, pomocí které by bylo možné v keramice stanovit stopy po laktobacilech a bifidobaktériích, neexistuje. Stejně tak se ještě nikdo nepokoušel najít v archeologické keramice stopy enzymu chymozinu. Obdobná je situace, pokud bylo mléko kvašeno. Keramika nemusí být vhodná ani pro kvašení mléka, např. Kazaši na Altaji pro výrobu kumysu používají výhradně kožené měchy (Pavelka, ústní sdělení), podobně proteiny kvasinek z keramiky také ještě nikdo extrahovat, nebo se nepokoušel určit. Vytvoření metodiky na detekci proteinů laktobacilů, bifidobaktérií a kvasinek by však představovalo další krok k poznání zpracování mléka, protože pokud se na keramice stopy mléčných produktů nachází, mělo by jít o produkty už nějakým způsobem zpracované a proto je šance na identifikování stop důležitých mikroorganismů.

#### **4. 1. 5 Proteiny v archeologii**

Proteiny jsou pro archeologické studie v budoucnu poměrně slibné. Je to zejména proto, že s nimi nejsou takové problémy jako s archaickou DNA, přitom jejich struktura je odvozená z genetického kódu, takže mohou poskytnout specifitější informace než třeba lipidy, zejména po taxonomické stránce. Samozřejmě DNA může obsahovat mnohem více informací o celém původním organismu, proteiny jsou mnohem omezenější, nicméně jejich informační hod-

nota je stále poměrně vysoká. DNA na sebe přitahuje větší pozornost odborné i laické veřejnosti, avšak proteiny jsou pro archeologii stejně tak důležité, protože se nachází hojněji a to na nejrůznějších artefaktech včetně kamenných nástrojů (Gerlach a kol. 1996).

Metoda ELISA, která byla v práci aplikována, se v současné době používá především k detekci virových a bakteriálních patogenů ve výzkumné praxi i v praktické medicíně, avšak pro druhovou determinaci, určování pohlaví a podobně již nikoli. Takto zaměřené testy zaznamenaly největší úspěch v osmdesátých letech dvacátého století, pak byly s příchodem metody PCR (Polymerase Chain Reaction) nahrazeny testy na DNA, neboť testování na DNA je rychlejší, levnější a spolehlivější. To však platí u recentního biologického materiálu. Práce s DNA z archeologického materiálu je mnohem komplikovanější, DNA se rozpadá, hydrolyzuje, oxiduje, snadno je kontaminována a podobně (Hofreiter a kol. 2001). V posledních letech nastává změna situace, protože tzv. nové sekvenační metody pracují s krátkými úseky, které jsou vhodně pro analýzu archaické DNA (např. viz Keller a kol 2012). Nicméně, aby nějaká DNA mohla být zpracována, musí se zachovat a tady zůstává výhoda na straně proteinů. Mnohé studie prokázaly, že proteiny se zachovávají lépe než DNA, ať už v kostech (Collins a kol. 2002), a to i ve fosilních kostech starých milióny let (Schwiezter a kol. 2009), keramice (Craig a kol. 2005a; Craig a kol. 2005b), malířské barvě (Tokarski a kol. 2006; Kucková a kol. 2007; Fremout a kol. 2009), v sedimentech (Belluomini a kol. 1986), nebo na povrchu kamenných nástrojů (Kooyman a kol. 2001). Proteiny lze samozřejmě také sekvenovat, nicméně protilátky zůstávají i v současnosti vhodným nástrojem pro archeologii. Vhodnou metodikou pro výzkum archaických proteinů je také Western blot založený na specifických protilátkách. Touto cestou byly detekovány archaické proteiny imunitního systému a kolagenního typu (Schmidt-Schultz – Schultz 2004). Studie sekvence proteinů fosilních hominidů (neandrtálci) přináší výsledky např. pro osteokalcin (Nielsen-Marsh a kol. 2005). Rovněž samotná imunodetekce a kvantifikace byla úspěšná u nekolagenních proteinů v kostech z archeologických nalezišť (Brandt a kol. 2002). Zajímavé vý-

sledky z hlediska výživy plynou také z výzkumů rozdílů kostního kolagenu delta N-15 lidí a domácích zvířat od neolitu po dobu římskou v severozápadní Evropě (Hedges – Reynard 2007).

Pokud se na problematiku proteinů zaměříme z hlediska zaměření této práce, bude nutné stanovit, jaké proteiny se mohou zachovat v keramické matrix, a jakými nejefektivnějšími způsoby je bude možné analyzovat. Imunologický test je zřejmě vhodný způsob, pokud je protilátka správně připravena, ale je nutno stanovit obecnou metodu izolace proteinů z keramiky pro hmotnostní spektrometrii. V našich podmínkách se pro analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie ukázala jako nejvýhodnější izolace proteinů z keramické drti u jednoho vzorku přidáním 50  $\mu$ l 1 % kyseliny mravenčí (od firmy Fluka) a inkubace při teplotě 4 ° C po dobu 18 hodin. Kapalina je následně odsáta a neutralizována pomocí 100 mM hydrogenuhličitanu amonného (Fluka). Následně se nutno vytvořit tzv. protetický stupeň, na což je využít trypsin (Sigma), který je přidán v koncentraci 10 ng/ $\mu$ l a roztok se inkubuje při teplotě 37 ° C po dobu 12 hodin (Hlásek a kol. v přípravě). Pak teprve dochází k izolaci jednotlivých peptidů z roztoku, ale popis přesahuje zaměření této práce. Každá laboratoř používá poněkud jiné metody. Pro obecné srovnání by zřejmě byla lepší unifikace, protože jinak nemusí být výsledky zcela srovnatelné.

Pokud jsou proteiny ve větším množství, nebo s dalšími látkami jako jsou škroby a cukry, zvyšuje se pravděpodobnost, že proteiny přečkají dlouhá časová období, mimo jiné mohou být takovým způsobem chráněny před mikroorganismy (Baker 2010). Je také kritické, jakému prostředí byly proteiny v archeologických nálezích vystaveny. Přírozené procesy degradace proteinů, (enzymatické štěpení, dekarboxylace, deaminace apod.), probíhají odlišně za různých podmínek (Baker 2010). Prostředí zřejmě hraje nejdůležitější roli při uchování proteinů, proto jedná o pole pro další výzkum experimentálního charakteru i výzkumu přímo z nálezů. Je pravděpodobné, že velký důraz by měl být kladen na způsob exkavace a následné zpracování nálezů. Například některé konzervační techniky by rozhodně měly být revidovány, zejména čištění keramiky kyselinou chlorovodíkovou, což proteiny spolehlivě odstraní.



## 5. Závěr

V rámci rozvíjení výzkumu potravin v minulosti byla vytvořena funkční metodika na základě reakcí antigen-protilátka, která se ukázala jako použitelná pro detekci mléčných proteinů v porézní archeologické keramice. Její výhody jsou oproti hmotnostní spektrometrii zřejmé, je to jednoduchá použitelnost s omezeným vybavením a relativně snadná zvládnutelnost. Identifikace proteinů v keramice pomocí protilátek je pravděpodobně citlivější, než detekce proteinů v keramice pomocí hmotnostní spektrometrie. Pomocí této techniky byla prokázána přítomnost mléka skotu v testované keramice, zajištěné pro potřeby práce, pocházející převážně z doby bronzové a stejně tak byla prokázána existence kravského a kozího mléka v neolitické keramice. Současně se během zpracování dat ukázaly rozdíly mezi jednotlivými keramickými zbytky, které mohou vypovídat o rozdílné míře využívání mléčných výrobků mezi regiony, nebo svědčí o odlišném používání keramiky. Avšak tyto závěry potvrdí, či zpřesní až další analýzy, protože počty zatím zpracovaných vzorků jsou omezené. Na rozdíl od předchozích prací detekujících zbytky mléka v neolitické keramice se podařilo určit, že v keramice jde převážně o zbytky mléka kozího. Podezření, že by mohlo jít o falešnou pozitivitu testu, vyvrací negativní kontrola a jeden zcela negativní neolitický vzorek. Mléko skotu je zastoupeno výrazně méně. Je navrženo několik hypotéz, které by tuto skutečnost mohly vysvětlovat, jako jedna z nejpravděpodobnějších se z mého pohledu jeví používání keramiky pro krmení dětí kozím mlékem, protože je lépe stravitelné (Devendra – Burns 1983), zatímco kravské mléko mohlo být zpracováno takovým způsobem, že přicházelo do kontaktu s keramikou méně, což ale také mohlo záležet na konkrétních místních tradicích. Alternativní a také velmi pravděpodobné vysvětlení je používání mléka jako technického činidla, které mělo zamezit vysoké propustnosti porézní keramiky.

Vztah mutace pro trávení laktózy v dospělém věku a existence zbytků mléčných zbytků na neolitické keramice, zřejmě není v přímé souvislosti, lidé se pravděpodobně naučili pro konzumaci mléčný cukr odstraňovat, nebo výrazně omezovat. Řešení problémů ohledně mutace pro trávení laktózy a její

šíření v evropské populaci bude zřejmě vyžadovat další výzkum. Stejně jako studium způsobů zpracování mléka v minulosti.

## 6. Seznam použité literatury

Alm, L. 1982: Effect of Fermentation on Lactose, Glucose, and Galactose Content in Milk and Suitability of Fermented Milk Products for Lactose Intolerant Individuals. *Journal of Dairy Science* 65/3, 346–352.

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. 2010: Archaeological proteomics: method development and analysis of protein-ceramic binding. MS Thesis, University of North Texas, Department of Geography.

Barnard, H. – Shoemaker, L. – Craig, O.E. – Rider, M. – Parr, R.E. – Sutton, M.Q. – Yohe, R.M. 2007: Chapter 17: Introduction to the analysis of protein residues in archaeological ceramics. In: Barnard, H. a J. W. E. (Ed.), *Theory and Practice of Archaeological Residue Analysis*. Archaeopress, Oxford, 216-228.

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.

Björklund, E. – Pallaroni, L. – Von Holst, Ch. – 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 International* 84, 1835-1839.

Brandt, E. – Wiechmann, I. – Grupe, G. 2002: How reliable are immunological tools for the detection of ancient proteins in fossil bones? *International Journal of Osteoarchaeology* 12, 307 - 316.

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.

Collins, M. J. – Nielson-Marsh, C. M. – Hiller, J. – Smith, C.I. – Roberts, J.P. – Prigodich, R.V. – Weiss, T.J. – Csapó, J. – Millard, A.R. – Turner-Walker, G. 2002: The survival of organic matter in bone. *Archaeometry* 44, 383-394.

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.

Craig, O.E. – 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, 89-97.

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

Craig, O. E. – 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.

Craig, O. E. – Chapman, J. – Figler, A. – Patay, P. – Taylor, G. – Collins, M. J. 2003: 'Milk Jugs' and other Myths of the Copper Age of Central Europe. *European Journal of Archaeology*, 6/3, 251-265. ISSN 1461-9571.

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.

Cramp, L. J. E. – Jones, J. – Sheridan, A. – Smyth, J. – Whelton, H. – Mulville, J. – Sharples, N. – Evershed, R. 2014: Immediate replacement of fishing with dairying by the earliest farmers of the northeast Atlantic archipelagos. *Proceedings of the Royal Society B* (doi: 10.1098/rspb.2013.2372).

Crowther J. R. 2001: The ELISA Guidebook Humana Press Inc. Totowa, New Jersey 07512 ISBN 0-89603-950-1.

Curry A. 2013: Archaeology: The milk revolution. When a single genetic mutation first let ancient Europeans drink milk, it set the stage for a continental upheaval, Nature 500, 20–22.

Devendra, C., – Burns, M. 1983: Goat production in the tropics (2nd Edition) (Tech. Comm. No. 19. Commonwealth Bureau of Animal Breeding and Genetics) Commonwealth Agricultural Bureaux: Farnham Royal, U.K.

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.

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.

Gamba, C. – Jones, E. R. – Teasdale, M. D. – McLaughlin, R. L. – Gonzalez-Forbes, 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.

Gilbert, M. T. P. – Rudbeck, L. – Willerslev, E. – Hansen, A. J. – Smith, C. – Penkman, K. E. H. – Prangenberg, K. – Nielsen-Marsch, C. M. – Jans, M. E. – Arthur, P. – Lynnerup, N. – Turner-Walker, G. – Biddle, M. – Kjølbye-Biddle, B. – Collins, M. J. 2005a: Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy. J. Archaeol. Sci. 32/5, 785-793.

Gorgan, L. – Stefan, A. – Bejenaru, L. – Cavaleriu, R. – Stanc, S. 2011: Preliminary Study of Molecular Variability for Neolithic Pig (*Sus scrofa domesticus*) from Romania Using the Cytochrome B. Analele Științifice ale Universității „Al. I. Cuza” Iași, Secțiunea Genetica și Biologie Moleculară, Tom XII, 59-64.

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.

Hedges, R.E.M. – Reynard, L.M. 2007: Nitrogen isotopes and the trophic level of humans in archaeology, *Journal of Archaeological Science* 34, 1240-1251.

Hlásek, D. – Čiperová, M. – Pavelka, J., in prep. Amphorae as a part of dairy equipment. Evidence from prehistoric Bohemia.

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.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11726688>.

Hřebíček, J. – Škrdla, M. 2006: Úvod do matematického modelování. Skripta Masarykova univerzita.  
<http://is.muni.cz/el/1431/podzim2007/Bi3101/um/skripta.pdf>

Check, E. 2006: Human evolution: How Africa learned to love the cow. *Nature* 444, 994-996 doi: 10.1038/444994a.

Child, A. M. – Pollard, A. M. 1992: A review of the applications of immunochemistry to archaeological bone. *Journal of Archaeological Science* 19, 39-47.

Chochorowski J. 1993: Ekspansja kimmeryjska na tereny Europy środkowej. *Rozprawy habilitacyjne* Nr 260. Kraków: Uniwersitet Jagielloński.

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.100049.

John, J. – Pavelka, J. 2010: Imunologická analýza rezidua na vnitřní straně eneolitické nádoby z lokality Otmíče – Otmíčská hora (okr. Beroun), in: Křišťuf, P., Vařeka, P. (Eds.), *Opomíjená archeologie 2007–2008 (Neglected Archaeology 2007–2008)*, Katedra archeologie Fakulty filozofické Západočeské univerzity v Plzni, 156-157.

Kaniewski, D. – Van Campo, E. – Guiot, J. – Le Burel, S. – Otto, T. – Guiot, J. – Baeteman, C. 2013: Environmental Roots of the Late Bronze Age Crisis. *PLoS ONE* 8, e71004.

Karasek F. W. – Clement R.E. 1988: *Basic Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Principles and Techniques*. Elsevier Science B.V. ISBN 0-444-42760-0.

Kovačiková, L. – Bréhard, S. – Šumberová, R. – Balasse, M. – Tresset, A. 2012: The new insights into the subsistence and early farming from Neolithic settlements in Central Europe: the archaeozoological evidence from the Czech Republic. *Archaeofauna* 21, 71 - 97.

Keller, A. – Graefen, A. – Ball, M. – Matzas, M. – Boisguerin, V. – Maixner, F. – Leidinger, P. – Backes, C. – Khairat, R. – Forster, M. – Stade, B. – Franke, A. – Mayer, J. – Spangler, J. – McLaughlin, S. – Shah, M. – Lee, C. – Harkins, T.T. – Sartori, A. – Moreno-Estrada, A. – Henn, B. – Sikora, M. – Semino, O. – Chiaroni, J. – Rootsi, S. – Myres, N.M. – Cabrera, V.M. – Underhill, P.A. – Bustamante, C.D. – Vigl, E.E. – Samadelli, M. – Cipollini, G. – Haas, J. – Katus, H. – O'Connor, B.D. – Carlson, M.R. – Meder, B. – Blin, N. – Meese, E. – Pusch, C.M. – Zink, A. 2012: New insights into the Tyrolean Iceman's origin and phenotype as inferred by whole-genome sequencing. *Nat Commun.* 28, 698. doi: 10.1038/ncomms1701.

Kooyman, B. – Newman, M.E. – Cluney, C. – Lobb, M. – Tolman, S. – McNeil, P. – Harris, L.V. 2001: Identification of horse exploitation by clovis hunters based on protein analysis. *American Antiquity* 66, 686-691.

Kovářík J. 1982: K výrobní technologii neolitické keramiky. Sborník prací Filozofické fakulty brněnské univerzity. *Studia minora facultatis philosophicae universitatis Brunensis E 27*. Masarykova univerzita, Filozofická fakulta, Brno ISSN: 0231-7710.

Krüttli, A. – Bouwman, A. – Akgül, G. – Della, D. – Casa, P. – Rühli, F. – Warinner, C. 2014: Ancient DNA analysis reveals high frequency of European-lactasepersistence allele (T-13910) in medieval centraleurope. *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.

Lee M.S. 2012: *Mass Spectrometry Handbook*. John Wiley & Sons, Inc., ISBN: 978-0-470-53673-5.

Leonardi, M. – Gerbault, P. – Thomas, M.G. – Burger, J. 2012: The evolution of lactase persistence in Europe. A synthesis of archaeological and genetic evidence. *J. Int. Dairy J.* 22, 88–97.

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. doi: 10.1186/1471-2148-10-89.

Mottram, H.R. – Dudd, S.N. – Lawrence, G.J. – Stott, A.W. – 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, 209–221.

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. doi: 10.1002/ajpa.21490.

Nielsen-Marsh, C.M. – Richards, M.P. – Hauschka, P.V. – Thomas-Oates, J.E. – Trinkaus, E, Pettitt, P.B. – Karavanic, I. – Poinar, H. – Collins, M.J. 2005: Osteocalcin protein sequence of Neanderthals and modern primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 4409–441.

Nový, P. – Řídký, J. (s příspěvkem L. Šulové) 2005: Neolitické osídlení na katastru Horoměřic (okr. Praha-západ). Menší záchranné akce a sběry k r.2004, *ASČ* 9, 111-141.

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.

Pääbo, S., 1985: Molecular cloning of ancient egyptian mummy DNA. *Nature* 314, 644 - 645.

Pavelka J. – Vařeka P. 2008: Příspěvek k poznání stravy ve vrcholném a pozdním středověku: první výsledky analýzy potravinových zbytků na keramice z archeologických výzkumů. *Kuděj*10/2, 98-109.

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

Pavů, I. – Zápotocká, M. 2007: *Archeologie pravěkých Čech 3. Neolit*. Praha.

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

Preger, L. – Amberg, JR. 1967: Sweet diarrhea. Roentgen diagnosis of disaccharidase deficiency. *American Journal of Roentgenology* 101, 287-295.

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.

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.

Shennan, S. – Downey, S.S. – Timpson, A. – Edinborough, K. – Colledge, S. – Kerig, T. – Manning, K. – Thomas, M. G. 2013: Regional population collapse followed initial agriculture booms in mid-Holocene Europe. *Nature Communications* 4, 2486. doi:10.1038/ncomms3486.

Schmidt-Schultz, T.H. – Schultz, M. 2004: Bone protects proteins over thousands of years: Extraction, analysis, and interpretation of extracellular matrix proteins in archeological skeletal remains. *American Journal of Physical Anthropology* 123, 30-39.

Smetana, J. 2010: Neolitické osídlení povodí řeky Úhlavy. Diplomová práce ZČU, katedra archeologie.

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. – Laine, W. S. – Cottrell, J. S. – Horner, J. R. – Cantley, L. C. – Kalluri, R. – Asara, J. M. 2009: Biomolecular characterization and protein sequences of the campanian hadrosaur *B. canadensis*. *Science* 324, 626-631.

Solazzo, C. – Fitzhugh, W. W. – Rolando, C. – Tokarski, C. 2008: Identification of protein remains in archaeological potsherds by proteomics. *Analytical Chemistry* 80, 4590-4597.

Tokarski, C. – Martin, E. – Rolando, C. – Cren-Olive, C. 2006: Identification of proteins in renaissance paintings by proteomics. *Analytical Chemistry* 78, 1494-1502.

Turner, K. W. – Thomas, T. D. 1980: Lactose fermentation in Cheddar cheese and the effect of salt. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 15 265-276.

Waite, E. R. – Child, A.M. – Craig, O.E. – Collins, M.J. – Gelsthorpe, K. – Brown, T.A. 1997: A preliminary investigation of DNA stability in bone during artificial diagenesis. *Bulletin de la Société Géologique de France* 168, 547-554.



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.

Zvelebil, M. 2004: Pitted Ware and related cultures of Neolithic Northern Europe, in P. Bogucki and P. J. Crabtree (eds.), *Ancient Europe 8000 BC–AD 1000: Encyclopaedia of the Barbarian World, Vol. I The Mesolithic to Copper Age (c. 8000-2000 B. C.)*.

## 7 Resumé

While developing the research of food strategies in the past a new methodology of antigen-antibody reaction has been established and verified for the detection of milk proteins in the porous surfaces of archaeological ceramics. We demonstrate the presence of cow and goat milk in the examined Neolithic pottery and the presence of cow milk in the Bronze Age pottery. Contrary to the previous published research we show that goat milk prevails among the samples of Neolithic pottery; the cow milk is much less frequent. I prefer to suggest the hypothesis

The most likely hypothesis explaining my view seems to reside in the use of pottery for feeding babies with goat milk, which is much easier to digest, whereas cow's milk could have been processed more often in non-ceramic vessels. The variations recorded in our assemblage may indicate the various extend of dairy production in researched regions, or they may suggest the different use of various ceramic vessels.

The presence of milk residues within Neolithic pottery and the lactose tolerance mutation by adults does not seem to be related. Neolithic people probably learned to reduce or eliminate the content of milk sugar. Nevertheless, the further research is necessary for solving the problems of the lactose tolerance mutation and its spreading within European populations. As well as the study of the ways of diary production in the past.

## 8 Přílohy

### *Rejstřík příloh:*

Tab. 4 Naměřené hodnoty z jednotlivých měření

Obr. 1 Odběr vzorku keramiky pro analýzu

Obr. 2 Ukládání odebraného vzorku do plastické zkumavky

Obr. 3a. Detail keramiky po odběru vzorku – neumytý keramický zlomek

Obr. 3b. Detail keramiky po odběru vzorku – umytý keramický zlomek

Obr. 4. Mikrotitrační destička před měřením absorbance

Obr. 5. Příklad na měření absorbance výsledných reakcí na mikrotitračních destičkách - ELISA reader VERSAmax™ (Molecular Devices)

## Tab. 4 Naměřené hodnoty z jednotlivých měření

Každé měření je určitým způsobem nezávislé, proto jsou data uvedena v konkrétních oddělených tabulkách s vlastní pozitivní a negativní kontrolou, jak byla získána.

Measurement

mode:

Measurement wavelength: 450

Reference wavelength: 620

Read mode: Normal

Dual wave data (difference)

**Jednotlivá měření:**

### Cattle $\beta$ LG

<>	1	2	3	4	5
A	1,0880	Řepeč 1	0,0370	pozitiv	0,0000
B	0,6410	Rataje1	1,4500	negativ	0,0000
C	1,3330	Březnice	0,0000	0,0000	0,0000
D	0,9940	Rataje2	0,0000	0,0000	0,0000
E	1,4700	Rataje3	0,0000	0,0000	0,0000
F	1,4630	Rataje4	0,0000	0,0000	0,0000
G	1,5040	Albrecht285	0,0000	0,0000	0,0000
H	1,3940	Albrecht43	0,0000	0,0000	0,0000

<>	1	2	3	4	5
A	0,0180	pozitiv	0,2360	Rataje5	0,0000
B	1,9320	negativ	0,1860	RatajCed	0,0000
C	1,7130	Mažice1	1,3290	Heřmaň	0,0000
D	0,2830	Mažice2	0,1900	Podolí	0,0000
E	1,7110	Mažice3	0,0000	0,0000	0,0000
F	1,6070	Mažice4	0,0000	0,0000	0,0000
G	1,5810	Mažice5	0,0000	0,0000	0,0000
H	1,5010	Mažice6	0,0000	0,0000	0,0000

<>	1	2	3	4	5
A	0,0050	pozitivní	0,0000	0,0000	0,0000
B	1,3470	negativní	0,0000	0,0000	0,0000
C	0,3470	Křimice 96	0,0000	0,0000	0,0000
D	0,3140	Radobyčice 4	0,0000	0,0000	0,0000
E	1,3960	Radobyčice 1	0,0000	0,0000	0,0000

F	0,3210	Radobyčice2	0,0000	0,0000	0,0000
G	0,6670	Křimice 1	0,0000	0,0000	0,0000
H	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

<>	1	2	3	4	5
A	0,0160	Pozitivní	0,0000	0,0000	0,0000
B	2,5360	negativní	0,0000	0,0000	0,0000
C	2,1070	Horom1	0,0000	0,0000	0,0000
D	1,8530	Horom2	0,0000	0,0000	0,0000
E	2,1180	Horom3	0,0000	0,0000	0,0000
F	1,5460	Horom4	0,0000	0,0000	0,0000
G	1,8600	Horom5	0,0000	0,0000	0,0000
H	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

<>	1	2	3	4	5
A	0,0090	pozitivní	0,0000	0,0000	0,0000
B	0,8770	negativní	0,0000	0,0000	0,0000
C	0,9890	Radobyč3	0,0000	0,0000	0,0000
D	1,3670	Radobyč5	0,0000	0,0000	0,0000
E	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
F	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
G	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
H	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

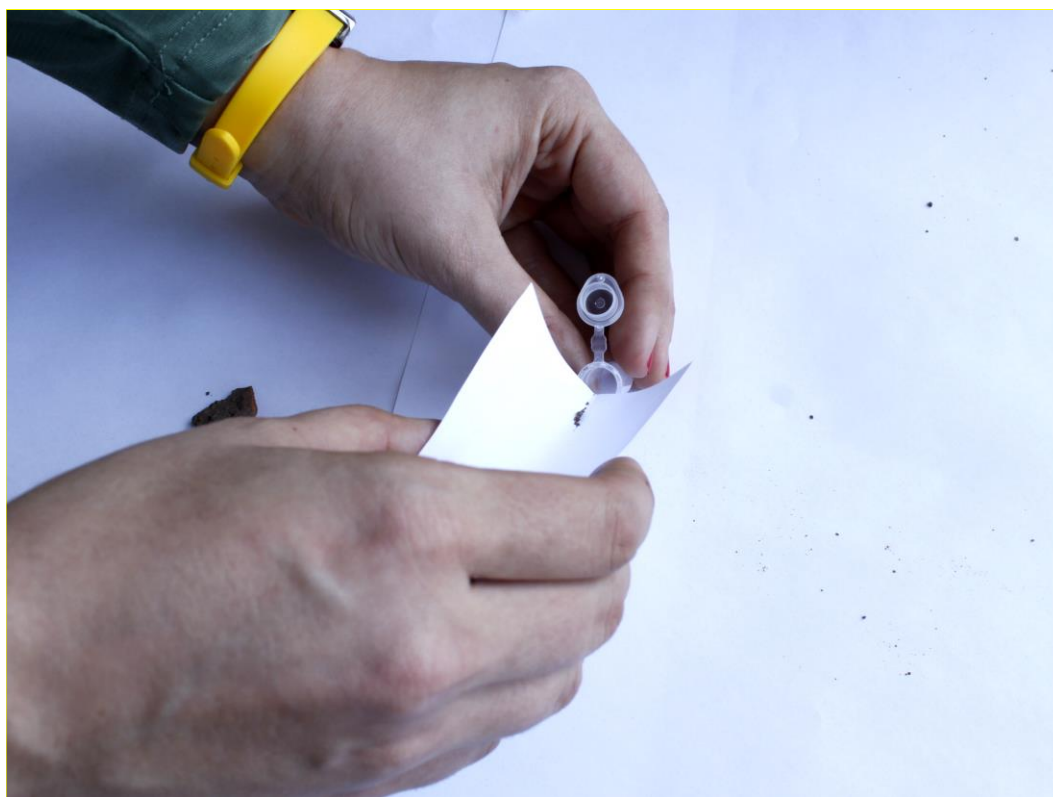
## Goat IgG

<>	1	2	3	4	5
A	0,7660	Pozit. 0,005%	3,2700	Horomě.2	0,0000
B	0,0970	negat. H2O	3,4520	Horomě.3	0,0000
C	2,6200	Radobyčice1	3,3310	Horomě.4	0,0000
D	2,3890	Radobyčice2	3,6180	Horomě.5	0,0000
E	1,4740	Radobyčice3	0,6910	Mažice1	0,0000
F	0,4650	Radobyčice4	0,3650	Mažice3	0,0000
G	3,6210	Radobyčice5	0,4240	Mažice4	0,0000
H	3,4700	Horomě.1	0,5030	Mažice5	0,0000

Obr. 1 Odběr vzorku keramiky pro analýzu



Obr. 2 Ukládání odebraného vzorku do plastikové zkumavky



Obr. 3a. Detail keramiky po odběru vzorku – neumytý keramický zlomek  
(Rataje III – mladší doba bronzová)

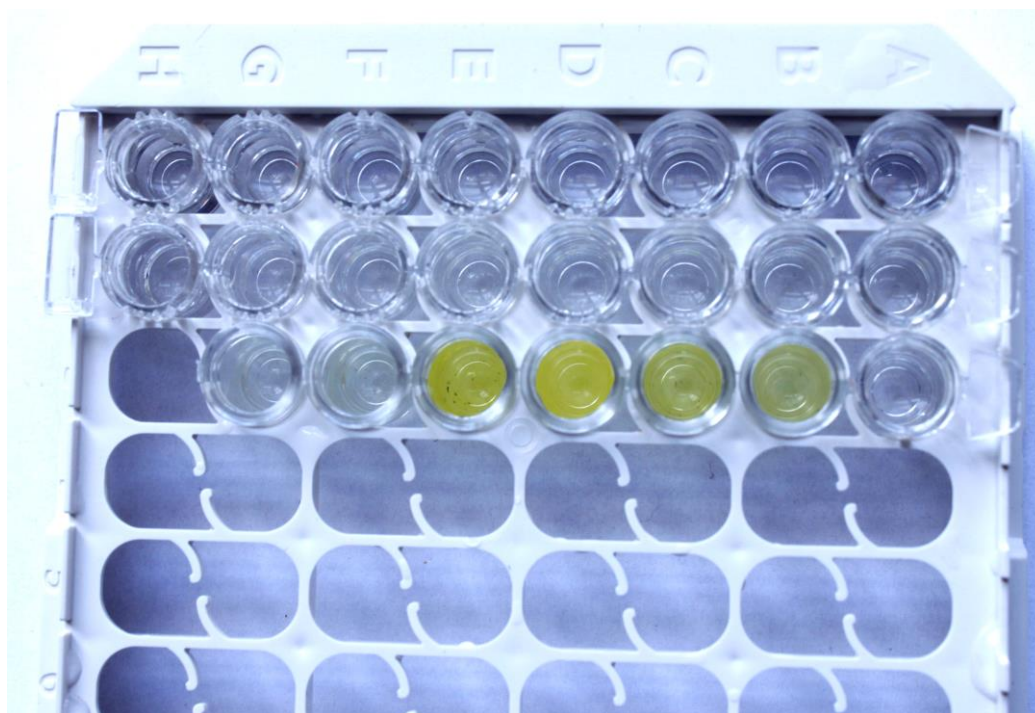




Obr. 3b. Detail keramiky po odběru vzorku – umytý keramický zlomek  
(Radobyčice 3, LnK II)



Obr. 4. Mikrotitrační destička před měřením absorbance



Obr. 5. Příklad přístroje na měření absorbance výsledných reakcí na mikrotitračních destičkách - ELISA reader VERSAmax™ (Molecular Devices).

